

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4897689号
(P4897689)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53

D

請求項の数 9 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2007-536839 (P2007-536839)	(73) 特許権者	507119711
(86) (22) 出願日	平成17年10月13日(2005.10.13)		パソゲン リムーバル アンド ダイアグ
(65) 公表番号	特表2008-516260 (P2008-516260A)		ノスティック テクノロジーズ インコー
(43) 公表日	平成20年5月15日(2008.5.15)		ポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/036676		アメリカ合衆国 19801 デラウェア
(87) 国際公開番号	W02006/044459		州, ウィルミントン, テンス アンド キ
(87) 国際公開日	平成18年4月27日(2006.4.27)		ング ストリーツ, ワン ロドニー スク
審査請求日	平成20年10月10日(2008.10.10)		エア, テンス フロア
(31) 優先権主張番号	10/962, 670	(73) 特許権者	505371508
(32) 優先日	平成16年10月13日(2004.10.13)		ノース カロライナ ステイト ユニバー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		シティー
			アメリカ合衆国 27695-8218
			ノース カロライナ州, ラレイ, リサーチ
			ドライブ 2401, スイート 112
			2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンタンパク質結合物質と使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プリオンタンパク質とポリマー性プリオンタンパク質結合物質の結合を可能にする条件下でサンプルにポリマー性プリオンタンパク質結合物質を接触させることを含んでなる、全血サンプル中の感染性プリオンタンパク質を検出しかつ分離する方法であって、上記ポリマー性プリオンタンパク質結合物質は官能基と結合したマトリックスを含み、そして上記官能基はSYA、-OCH₂-CHOH-CH₂NH₂、DVR、YVHEAおよび(D)ES(nal)PRQ-Eaca (すなわち、D-グルタミン酸-セリン-2-ナフチルアラニン-プロリン-アルギニン-グルタミン-ε-アミノカプロン酸) からなる群より選択される、上記方法。

【請求項 2】

上記マトリックスがポリメタクリレートまたはメタクリレートである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記マトリックスがFRACTOGEL(登録商標)EMD、TOYOPEARL(登録商標)、またはTSK-GEL(登録商標)ポリマーマトリックスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記ポリマーマトリックスがTOYOPEARL(登録商標)アミノ 650 である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

上記プリオンタンパク質がPrPscまたはPrPresである、請求項 1 に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

上記ポリマー性プリオンタンパク質結合物質がクロマトグラフィカラム中に、膜、繊維、ビーズ上に、不織メッシュに含浸されて、繊維をコーティングして、フィルターハウジング内に含有されて、またはそれらの組合せで存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

上記全血がヒトまたは動物由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

上記動物がウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウスまたはシカ科 (Cervidae) 動物である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

上記プリオンタンパク質がヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウス、またはシカ科 (Cervidae) 動物のプリオンタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関係出願の相互参照

本出願は米国特許出願第10/817,117号（2004年4月2日出願）の一部継続出願であって、予備特許出願第60/460,474号（2003年4月4日）の優先権を主張し、それらの内容は本明細書に参照により組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、タンパク質結合の分野に関し、さらに詳しくはプリオンタンパク質に結合する物質、および生体サンプルからプリオンを検出または除去するためのプリオンタンパク質結合物質の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

天然のまたは細胞性プリオンタンパク質「PrPc」は哺乳類動物に広く分布しており、特によく保存されたアミノ酸配列とタンパク質構造とを有する。感染性プリオンは、正常な細胞性 (PrPc) プリオンタンパク質の改変型からなると考えられており、「PrPsc」と呼ばれる。プリオンは他の感染性病原体と共通のいくつかの性質を有するが、核酸を含有しないようである。その代わりに、翻訳後のコンフォメーション変化が非感染性PrPcから感染性PrPscへの変換に関与し、その間に α ヘリックスヘリックスが β シートに変換されると提唱されている。PrPcは3つの α ヘリックスを有し、 β シート構造は少ししか有せず；対照的に、PrPscは β シートに富む。PrPcからPrPscへの変換は、伝染性海綿状脳障害 (TSE) の発症に至り、その間にPrPscが中枢神経系中に蓄積され、神経病理的变化と神経機能不全とを伴うと考えられている。PrPsc（しばしば、プリオンタンパク質の「スクレーピー」型と呼ばれる）は、動物やヒトのこれらの伝染性神経変性疾患の伝染と病理発生に必要であり、かつおそらく充分であると見なされている。

【0004】

TSEの具体例には、ヒツジやヤギが罹るスクレーピー；ウシ海綿状脳症 (BSE)；伝染性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症、および慢性消耗病 (CWD) がある。ヒトではTSE疾患は、クールー、クロイツフェルトーヤコブ病 (CJD)、ゲルストマンーストロイスラーシェインカー症候群 (Gerstman-Straussler-Scheinker Syndrome)、致死的不眠症、および異型クロイツフェルトーヤコブ病 (vCJD) として現れる。vCJDは最近英国でBSE流行の結果としてヒトに現れ、おそらくBSEまたは「狂牛病」に感染したウシから得られる食品の消費により引き起こされた可能性が最も高い。1980年代半ばから1990年代初頭の間に英国では、数えきれない多くの人がBSE感染牛からの神経組織で汚染された可能性のある食物を摂取した。経口的に感染した疾患の潜伏期間はヒトでは20年以上であるため、vCJDの正確な発症率は何年も明らかにならないかも知れない。主に英国で今日まで150人以上がこの

10

20

30

40

50

疾患に罹っていることが知られており、カナダ、フランス、香港、アイルランド、イタリアおよびアメリカ合衆国でも症例が報告されている。汚染されたウシの飼料が英国から世界中に輸出されていることは、BSEが世界的に存在することを示し、従ってvCJDの可能性を示す。これらの観察と一致して、ヨーロッパ諸国、日本、カナダ、アメリカ合衆国およびイスラエルでBSEが検出されている。従って食品を含む種々の物質から、感染性プリオンタンパク質を検出し除去する能力は、非常に重要である。

【0005】

すべてのTSEの特徴は、原因物質に対する測定可能な宿主の免疫応答が欠如していることである。すなわち、現在TSCに特異的な抗体は同定されていない。さらに公知の核酸配列が欠如していることは、ポリメラーゼ連鎖反応ベースの診断法が使用できないことを意味する。すなわち、感染動物を同定するのに従来の血清学的検査を使用できない。最近、屠殺動物の脳中のPrPscを同定するために、改良された免疫学ベースの方法が使用されている。

【0006】

ウシ起源の感染製品の摂取以外に、輸血と臓器移植がヒトのvCJDの別の伝搬様式となる。現在輸血によるヒトのvCJDの伝染のリスクは不明であるが、実験的にBSEに経口感染したヒツジと天然にスクレーピーに感染したヒツジからの伝染を含む実験動物モデルからのデータに基づくと、上記リスクは非常に可能性が高く、すでにvCJDのヒトからヒトへの伝染の原因となっている可能性が高い。他のヒトTSEと異なり、PrPscはvCJD患者のリンパ網内系中に存在し、こうして感染性物質が血中にあり、そして輸血により伝染する可能性を上昇させる。輸血による伝染のリスクの懸念を上昇させる他の要因には、未知であるがおそらくBSEに暴露されるヒトの数が多いこと、およびvCJDの前臨床的診断検査が欠如していることがある。さらに霊長類やマウスで種適応後にvCJDの病原性が強化されるようであり、ヒトからヒトへの伝染がウシからヒトへの伝染より効率的であることを示唆する。すなわち、輸血によるvCJDの伝染を予防する方法に対する緊急のニーズがある。かかる方法には、動物由来の食品、および動物またはヒトの消費または利用を目的とした健康製品、ヒトおよびウシ血液由来の製品、および臓器移植中の、感染ドナーの早期同定とTSE原因物質の隔離、除去、および不活性化がある。残念ながらTSE感染性は、化学的および物理的不活性化法に対して極めて抵抗性であり、選択された不活性化法をうまく逃げてしまう。

【0007】

プリオンタンパク質に結合する多くの物質が同定されている。すべての公知の哺乳動物プリオンタンパク質中で見つかるオクタペプチド繰り返し配列 (PHGGGWGQ) (配列番号1) に結合するリガンドについて、コンビナトリアルペプチドライブラリーがスクリーニングされており、PCT/US01/11150に記載のように一連のリガンドが発見されている。他の物質には、アミロイド班と相互作用するリガンド、例えばコンゴレッド (Ingrosso, L.ら、「コンゴレッドはスクレーピー感染ハムスターの潜伏期間を延長させる (Congo Red Prolongs the Incubation Period in Scrapie-infected Hamsters)」、J. Virology 69: 506-508 (1995)) ; 4-ヨード、4-デオキシドキシソルピシン (Tagliavini, F.ら、「シリアンハムスターの実験的プリオン病に対するアントラサイクリンの有効性 (Effectiveness of Anthracycline Against Experimental Prion Diseases in Syrian Hamsters)」、Science 276:1119-1122 (1997)) ; アンホテリシンB、ポルフィリンおよびフタロシアニン (Priola, S.A.ら、「ポルフィリンとフタロシアニン抗スクレーピー化合物 (Porphyrin and Phthalocyanine Antiscrapie Compounds)」、Science 287:1503-1506 (2000)) ; 金属 (Stockelら、Biochemistry, 37, 7185-7193 (1998)) ; PrPと相互作用して複合体を形成するペプチド (Prusinerらの米国特許第5,750,361号、Soto, C.ら、「合成βシートブレーカーペプチドにおけるプリオンタンパク質のコンフォメーション変化の逆転 (Reversion of Prion Protein Conformational Changes in Synthetic β-sheet Breaker Peptides)」、Lancet, 355:192-197 (2000)) ; ヘパリンと他のポリ硫酸化ポリアニオン (Caughey, B.ら、「プロテアーゼ感受性型のプリオンタンパク質PrPの硫酸化グリコサミノグリカ

10

20

30

40

50

ンとコンゴレッドへの結合 (Binding of the Protease-sensitive Form of Prion Protein PrP to Sulphated Glycosaminoglycan and Congo Red)」、J. Virology 68:2135-2141 (1994)；抗体 (Kascsak, R.J.ら、「プリオン病の免疫診断 (Immunodiagnosis of Prion Disease)」、Immunological Invest. 26:259-268 (1997))；および他のタンパク質、例えばプラスミノゲン (Fischer, M.B.ら、疾患関連プリオンタンパク質のプラスミノゲンへの結合、Nature 408:479-483 (2000))がある。プリオン汚染から血液成分 (例えばヘモグロビン) を精製するためにイオン交換クロマトグラフィーが使用されている (Gawrylらの米国特許第5,808,011号)。しかしGawrylらが教示したクロマトグラフィー物質はヘモグロビンに結合し、精製されたヘモグロビンは次に、勾配溶出により採取される。現在、種々の媒体からプリオンに結合できることが完全に解析されているかまたはわかっている物質は無い。

10

【0008】

今日までヒトのTSE疾患は100%致死的である。残念ながら、多くの化合物 (アンホテリシン、硫酸化ポリアニオン、コンゴレッド色素、およびアントラサイクリン抗生物質を含む) が有望な治療薬として報告されているが、すべてがプリオン増殖を阻害する能力は弱く、比較臨床試験で感染宿主からすでに存在するプリオンの除去に対して効果を有するものは知られていない。従って、新規な治療剤への緊急のニーズがある。

【0009】

正常な可溶性のタンパク質の、コンフォメーションが変化した不溶性型への組み立てと分解は、種々の他の疾患 (その多くは神経疾患である) の原因となる過程である。疾患の発症と正常な可溶性のタンパク質からコンフォメーション改変タンパク質への移行との関係は、あまりよくわかっていない。プリオン以外のこのような不溶性タンパク質の例には以下がある：アルツハイマー病と脳アミロイド血管症のアミロイド斑における β アミロイドペプチド；パーキンソン病のレーヴィ体中の α シヌクレイン (synuclein) 沈着物、前側頭部痴呆とピック病の神経原線維濃縮体中のタウ；筋萎縮性側索硬化症のスーパーオキシドジスムターゼ；およびハンチントン舞踏病のハンチンチン。これらの高度に不溶性のタンパク質は、しばしば β ひだ状シートコンフォメーションの共通の特徴を有する非分枝小繊維からなる凝集物を形成する。

20

【0010】

変換過程を理解し、疾患関連型と特異的に相互作用する構造を見つけるためには、タンパク質の2つ以上の異なるコンフォメーション型 (例えばPrPcとPrPsc) を容易に分離または区別できる方法が必要である。タンパク質のアイソフォームを分離または区別するための現在の方法には以下がある：カオトロピック物質、例えば尿素の存在下でのポリアクリルアミドゲル (すなわちトランスバース尿素勾配 (TUG) ゲル) 中の示差的移動度；プロテアーゼに対する示差的感受性、例えばプロテイナーゼK (PK) 処理とPrPscのPK耐性消化産物 (PrPresと呼ぶ) の検出；示差的温度安定性；非イオン性界面活性剤中の相対的溶解度；およびいくつかの化学物質 (例えば、コンゴレッドおよびイソフラビンS) に結合する小繊維構造の能力。しかし、さらなるプリオン結合物質を同定するニーズは満たされていない。また、コンフォメーション改変タンパク質、特に疾患に関連する型に特異的な高親和性結合物質を同定するニーズがある。かかる試薬は、可能な診断キットの開発、異なる型のタンパク質の分離と精製、治療薬、生物学的製剤、ワクチンおよび食物からの疾患の感染型の除去、および治療に有用であろう。

30

40

【発明の開示】

【0011】

発明の要約

プリオンタンパク質に結合する物質、およびプリオンタンパク質結合物質 (以後「結合物質」) の使用方法が提供される。ある実施形態において結合物質は、プリオンアナライトに選択性と特異性を持って結合するポリマー粒子、好ましくはクロマトグラフィー樹脂である。別の実施形態において結合物質は、プリオン分析質に選択性と特異性を持って結合する無機物質である。結合物質は、細胞性プリオンタンパク質 (PrPc)、感染性プリオ

50

ンタンパク質 (PrPsc)、および組換えプリオンタンパク質 (PrPr) を含むプリオンタンパク質の1つ以上の型に結合することができる。様々な種 (ヒトおよびハムスターを含む) からのプリオンは、結合物質により結合される。クロマトグラフィーカラムのような支持体上に結合物質を含有する組成物も提供される。

【0012】

結合物質は、サンプル (例えば生体液、または環境サンプル) 中で、またはサンプルからプリオンタンパク質を検出、結合、単離、除去、排除、抽出、または分離するのに有用である。結合物質は、サンプルからすべての型のプリオンタンパク質を除去するのに使用されるかまたは単一の型のプリオンタンパク質を選択的に検出または除去するように選ばれてもよい。従って結合物質は、ヒトTSEの患者およびスクレーピー、BSEおよびCWDに罹った動物のサンプル中の感染性と非感染性プリオンタンパク質とを区別するのに使用することができる。ある実施形態において、本明細書に記載の結合物質を使用して生体液から1つ以上のプリオンタンパク質が除去され、次に、精製もしくは汚染除去された生体液は動物またはヒトに投与されるかまたは戻される。血液透析法をこの実施形態において使用することができる。結合物質はまた、サンプル中の1つ以上のプリオンタンパク質の検出に有用である。

10

【0013】

本発明の別の態様は、追加の結合物質、特にコンフォメーション改変型のタンパク質 (そのいくつかは疾患の発症に関与している) に特異的な結合物質を同定する方法を提供する。

20

【0014】

本発明の他の特徴や利点は、以下の詳細な説明と好適な実施形態から明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

詳細な説明

プリオンタンパク質に結合する物質と、プリオンタンパク質結合物質を使用する方法とが本明細書に記載される。結合物質は、特異性と親和性を持ってプリオンタンパク質に結合するポリマー物質 (例えばクロマトグラフィー樹脂もしくはビーズ) または無機物質 (例えば酸化アルミニウム) である。ポリマー物質は、1つ以上の次の官能基: 陰性荷電部分; 陽性荷電部分; 非荷電部分および疎水性部分を含有する。好ましくはポリマー性結合物質は、メタクリレートまたはポリメタクリレートマトリックス骨格に結合した官能基を有する。

30

【0016】

結合物質はサンプル中のプリオンタンパク質と複合体を形成し、サンプル (例えば、ヒトもしくは動物由来の組織、臓器、または生体液、または環境サンプル) 中のまたはサンプルから、プリオンタンパク質を検出、結合、単離、除去、排除、抽出、または分離するのに有用である。ヒトもしくは動物、またはその組織、臓器もしくは生体液中のプリオン病を診断もしくは追跡するための方法も提供される。例えば本明細書に記載の結合物質は、生体サンプル (例えば全血、血液由来組成物もしくは成分、細胞、血清、血漿、血漿誘導体、髄液、尿、涙、扁桃、脳、虫垂など) を試験することにより、CJD、vCJD、GSS、致死的不眠、スクレーピー、BSEおよびCWDおよび他のTSEのような病態を検出または診断するのに有用である。献血、組織または臓器の提供の前に動物もしくは個体のプリオン感染を検出する重要性は、容易に理解される。サンプルまたは生体液 (例えば、全血、血清、血漿、血漿誘導体など) からプリオンタンパク質を除去するのに、結合物質は特に有用である。生体液が他の動物またはヒトに、例えば輸血または血液製剤 (例えば凝固因子) の投与で伝搬される場合、プリオン除去は必須である。結合物質は、サンプルからプリオンタンパク質のすべての異なる型を除去または検出するのに使用してもまたは単一の型のプリオンタンパク質を選択的に検出または除去するように選んでもよく、従ってサンプル中の感染性プリオンタンパク質と非感染性プリオンタンパク質とを区別するのに使用することができる。

40

50

【0017】

定義

用語「a」、「an」および「the」は本明細書において「1つ以上の」を意味すると定義され、文脈から不適切でない場合は複数を含む。

【0018】

用語「3F4抗体」は、PrPcの天然型に特異的であるが、天然のPrPscまたはPrPresには特異的ではないモノクローナル抗体を意味する。この抗体は、ハムスターおよびヒトのPrPc、PrPscおよびPrPresの変性型に対する特異性を有する。

【0019】

本明細書において用語「血液由来組成物」、「血液成分」および「血液組成物」は同義で使用され、全血、赤血球濃縮物、血漿、血清、血小板多画分および血小板欠乏画分、血小板濃縮物、白血球、血漿沈殿物、血漿分画沈殿物および上清、免疫グロブリン調製物（IgA、IgE、IgGおよびIgMを含む）、精製された凝固因子濃縮物、フィブリノゲン濃縮物、血漿分画中間体、アルブミン調製物、またはヒトもしくは動物血液由来の他の種々の物質を含む。この用語はまた、当該分野で一般的な種々の方法（イオン交換、親和性、ゲル浸透、および／または疎水性クロマトグラフィー、またはアルコールもしくはポリエチレングリコールによる示差的沈殿）により調製される精製血液由来タンパク質を含む。

【0020】

用語「PrPc」は、哺乳動物の体内で自然にかつ広く発現される天然のプリオンタンパク質分子を意味する。その構造は高度に保存され、疾患状態には関連しない。

【0021】

用語「PrPsc」は、PrPc分子のコンフォメーション改変型を意味し、これは当業者により、TSE／プリオン病[vCJD、CJD、クールー、致死的不眠、GSS、スクレーピー、BSE、CWD、および他のTSE（捕獲動物および実験動物のまれなTSEを含む）]のような疾患に関連すると考えられている。PrPscは正常な細胞性PrPcと同じアミノ酸配列を有するが、 α ヘリックスの一部が β シート型に変換されており、疾患状態に関連する。

用語「PrPres」は、プロテイナーゼK (PK) によるPrPscの部分分解後に残存する分子量27~30kDaのPrPscタンパク質のプロテイナーゼ耐性誘導体を意味する。

【0022】

用語「PrPr」は、組換え技術により発現されるプリオンタンパク質を意味する。

用語「PrP」は、プリオンタンパク質一般を意味する。

【0023】

用語「ビーズ」は、反応性基または結合成分が結合する固相粒子または顆粒を意味する。不規則な形を有するビーズならびに球形、楕円形、桿状、またはさらに角張った形を有するビーズが、この用語の範囲に含まれる。

【0024】

用語「樹脂」はポリマー性媒体を意味する。

【0025】

本明細書において用語「ポリマー性」は、いくつかのより小さい繰り返し性の化学単位または構造単位（モノマー）からなる化合物または分子を示す。

【0026】

サンプル

本明細書において用語「サンプル」は、本発明のいくつかの態様および実施形態の方法によってプリオン結合物質と接触させる任意の溶液、懸濁物、抽出物、組成物、調製物、生成物、成分、組織、臓器、細胞、または他の物質を意味する。本発明のいくつかの態様および実施形態のサンプルには、特に限定されないが、生体サンプル、食品、環境サンプル、または水サンプルがある。生体サンプルには特に限定されないが、以下が含まれる：血液由来サンプル；脳由来サンプル；体液、例えば特に限定されないが、血液、血漿、血清、髄液、尿、唾液、ミルク、管液、涙または精液；生体抽出物、例えばコラーゲン抽出物、腺抽出物、または組織ホモジネートもしくは抽出物。生体サンプルは、ヒトまたは動

10

20

30

40

50

物（特に限定されないが、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ネズミ、またはシカ科（Cervidae）動物由来である。血液由来のサンプルには、特に限定されないが、血小板濃縮物、血漿タンパク質調製物、免疫グロブリン調製物、フィブリノゲン調製物、第XIII因子調製物、トロンビン調製物、第VIII因子調製物、フォンウィルブラント因子調製物、プロテインC調製物、または活性化プロテインC調製物がある。本発明のいくつかの態様および実施形態のサンプルにはまた、特に限定されないが、医薬組成物、治療用組成物、化粧品用組成物および製品、食物、または食品、または栄養補給組成物がある。食品サンプルの例には、特に限定されないが、ゼラチン、ゼリー、ミルク、酪農製品、コラーゲン、または乳児用調製粉乳がある。

【0027】

いくつかの態様および好適な実施形態のサンプルには、種々のタンパク質（特に限定されないが、ヒトまたは動物血清アルブミン）を含むタンパク質溶液がある。例えばサンプルには特に限定されないが、ヒト血清アルブミン；ヒトもしくは動物血清アルブミン調製物；またはヒトもしくは動物血清アルブミンを安定剤として含有する調製物がある。本発明のいくつかの好適な実施形態のサンプルは、ヒトまたは動物血清アルブミンを、最大約50% (w/v)、または約1%～約50%、または約5%～約25%の濃度で含有することができる。1つの態様において本発明はその好適な実施形態において予想外にかつ有利に、高濃度のタンパク質、特に血液タンパク質（例えば血清アルブミン）を有するサンプルからまたはその中のプリオンタンパク質を除去、分離、または結合することを可能にする。

【0028】

環境サンプルには、特に限定されないが、土壌、下水、または水（例えば、小川、川、帯水層、井戸、水処理施設またはレクリエーション施設水のような供給源からの水）がある。

【0029】

サンプルには、特に限定されないが、液体サンプル、固体サンプル、またはコロイドサンプルがある。固体サンプルは、水性溶媒、有機溶媒または臨界液体を用いて抽出することができ、得られる上清は結合物質と接触させることができる。固体サンプルの例には、特に限定されないが、動物由来の生成物、特にプリオンを伝搬する物質に暴露されたもの（例えばウシから得られる骨粉、脳組織、角膜組織、糞便、骨粉、ビーフ副産物、ヒツジ、ヒツジ副産物、シカおよびエルク、シカおよびエルク副産物、ならびに他の動物と動物由来生成物）がある。

【0030】

物質

本明細書に記載の結合物質は、プリオンタンパク質由来のペプチドまたはポリペプチド、またはプリオン完全分子に結合し、種々の分離法、特に限定されないが、クロマトグラフィー（例えば特に限定されないが、薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、およびバッチクロマトグラフィー）；固体支持体と膜分離；反応槽分離；磁気分離；免疫分離；およびコロイド分離で使用するすることができる。ある好適な実施形態において、結合物質はカラム（例えばクロマトグラフィーカラム）に含有され、サンプルはカラム中に導入され、そこを通過して、サンプル中のプリオンタンパク質が結合物質に結合してカラムに保持されるようになる。サンプルの他の成分はカラムを通過し、採取される。本明細書に記載の結合物質の使用は、バッチまたはカラムクロマトグラフィーに限定されないことを理解されたい。プリオンタンパク質を結合させるための結合物質の使用の種々の構成、修飾および変更が企図され、これは本発明の範囲に包含される。かかる変化および修飾には、特に限定されないが以下がある：バッチ法；連続法；移動床クロマトグラフィー法；低、中または高圧法；小、中または大規模な方法。別の実施形態において結合物質は、膜、繊維、ビーズ上にある、不織布メッシュ中に含浸される、繊維をコーティングする、フィルターハウジングに含有されるなどである。

【0031】

無機成分

第1の実施形態において結合物質は、無機化合物または成分（例えば特に限定されないが、アルミニウムまたはシリカ）を含む。好ましくはアルミニウムは酸化アルミニウムであり、シリカはヒュームドシリカである。最も好ましくは無機化合物は、 Al_2O_3 または SiO_2 である。これらの結合物質は、種々の形（特に限定されないが、ビーズまたは樹脂）で提供することができる。結合物質は種々の分離方法で使用でき、クロマトグラフィーカラム、膜、または任意の適当な分離装置もしくは器具中に含有されるかまたはこれらに作り上げられ、またはバッチ法で使用されるか、または任意の分離法で使用され、プリオン結合物質とプリオンとの複合体形成を可能にする条件下で物質にサンプルを接触させることを可能にする。無機化合物を含有する結合物質は、種々の官能基を有することができる。官能基は親水性、例えば陽性荷電、陰性荷電、非荷電または中性、疎水性、両親媒性、またはこれらの組合せである。具体的な官能基は、詳細に後述される。官能基は無機化合物中に本質的に存在するか、または無機化合物は官能基を含むようにさらに修飾することができる。官能基は有機または無機官能基を含む。

10

【0032】

ポリマー成分

第2の実施形態において結合物質は、ポリマー物質または成分を含み、好ましくはポリマーマトリックス（ポリマーマトリックス骨格とも呼ぶ）を含む。場合によっては1つ以上の官能基がポリマーマトリックスに結合される。好適な実施形態においてポリマー物質は樹脂、好ましくはクロマトグラフィー樹脂である。ポリマー性ポリマーマトリックス骨格は好ましくはメタクリレート骨格であり、特に限定されないが市販のTSK（登録商標）およびTOYOPERL（登録商標）またはFRACTOGEL（登録商標）樹脂（Tosoh Bioscience, Montgomeryville, ペンシルバニア州）である。これは特に限定されないが、陽性荷電、陰性荷電、非荷電、疎水性の官能基またはこれらの組合せである。特に好適な官能基は、後に詳述される。

20

【0033】

結合物質は任意の形を取り、または任意の固体支持体（例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリエチレンテレフタレート、レーヨン、ナイロン、ポリ(酪酸ビニル)、二フッ化ポリビニルピロリドン(PVDF)、シリコーン、ポリホルムアルデヒド、セルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロースなどで最初に被覆された、ビーズ、膜、カートリッジ、フィルター、ディップスティック、マイクロタイタープレート、試験管、固体粉末、鋳型もしくは押出し成形モジュール、メッシュ、磁性粒子複合体、または任意の他の固体物質）に製造されるか、任意の固体支持体の形に作られるか、形成されるか、または適用される。あるいは、ゲルを形成する物質、例えばタンパク質（例えばゼラチン）、リポ多糖、ケイ酸塩、アガロースおよびポリアクリルアミドが使用される。いくつかの水相を形成するポリマー（例えば、デキストラン、ポリアルキレングリコール）または界面活性剤（例えばリン脂質、長鎖（12～24炭素原子）アルキルアンモニウム塩など）も適している。結合物質は随時これらの成分中に分散される。

30

【0034】

結合物質は好ましくは、粒子、顆粒またはビーズ型である。粒子結合物質は好ましくは、約 $1\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の範囲、さらに好ましくは約 $20\mu\text{m}$ ～ $150\mu\text{m}$ の範囲の粒子またはビーズを有する。

40

【0035】

官能基

本発明のいくつかの態様と実施形態のプリオン結合物質は官能基を含む。本明細書において用語「官能基」は、分子または物質に特徴的な化学的、物理的または物理化学的挙動を付与する化学基、サブ基またはサブ構造を意味する。本明細書に記載の官能基は、特に限定されないが、親水性（例えば陽性荷電、陰性荷電、または非荷電もしくは中性）または疎水性である。両親媒性または多官能性官能基もまた企図され、本発明の範囲に含まれる。官能基には有機および無機官能基がある。好適な官能基は、アミン、フェニルまたは

50

亜硫酸基がある。好適なアミン基は、1級、2級、3級、または4級アンモニウムイオンであり、例えばジメチルアミノエチル (DMAE) またはトリメチルアミノエチル (TMAE) である。他の官能基の例には、特に限定されないが以下がある： $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ； $-\text{C}_6\text{H}_5$ ； $-(\text{C}_2\text{H}_5)_3-\text{CH}_3$ ； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ； $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ ； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ； $-\text{SO}_3^{2-}$ 。さらに、有用な官能基にはスルホニル基とトレシル基がある。

【0036】

本説明に拘束はされないが、プリオンタンパク質は、それぞれ陽性荷電の官能基、陰性荷電の官能基、および疎水性官能基に結合する3つの異なる結合領域を有すると考えられる。従って、それぞれ1つ以上の種類の官能基を含む1つまたはいくつかの結合物質の使用は、サンプル中のプリオンの増強されたおよび／またはより特異的な同定または除去を提供する。2つ以上の結合物質を使用する時、試料は2つ以上の結合物質と、同時にまたは任意の順序で連続して接触させる。従って結合物質は好ましくは、それぞれが陽性荷電の官能基、陰性荷電の官能基、および非荷電の官能基、または疎水性官能基を含有する2つ以上の結合物質からなる。結合物質を粒子状でカラムクロマトグラフィーで使用する時、それぞれ異なる種類の結合物質を同じカラムまたは異なるカラム中で使用する。より好適な実施形態においては3つの結合物質を使用して、1つは陽性荷電の官能基を有し、1つは陰性荷電の官能基を有し、そして1つは疎水性官能基を有する。

【0037】

本明細書において用語「陽性荷電の官能基」は、正味の陽性荷電を有する任意の化学部分を意味する。陽性荷電の官能基の限定するものでない例には、アミノ含有基、例えば1級アミン、ジエチルアミノエチル、ジメチルアミノエチル、トリメチルアミノエチル、および4級アミノ基がある。本明細書において用語「陰性荷電の官能基」は、正味の陰性荷電を有する任意の化学部分を意味する。本明細書において用語「非荷電の官能基」は、中性のまたは荷電の無い任意の化学部分を意味する。陰性荷電の官能基の限定するものでない例には、亜硫酸塩含有基を含む。さらに用語「疎水性官能基」は、水による湿潤化に抵抗する任意の基を意味し、アルキル、芳香族、シロキサン、およびフッ化官能基がある。疎水性官能基の限定するものでない例はフェニルおよびブチル含有基である。用語「両親媒性官能基」は、疎水性でありかつ親水性である基を意味する。

【0038】

本発明のいくつかの態様と実施形態において、プリオン結合物質は、陽性荷電の官能基、陰性荷電の官能基、非荷電もしくは中性官能基、疎水性官能基、および／またはその両方を含有する。陰性荷電の官能基の例は亜硫酸塩含有基である。陽性荷電の官能基の例はアミノ基である。非荷電官能基の例はフェニルまたはブチル基である。疎水性官能基の例はフェニル基またはブチル基である。本発明のいくつかの態様と実施形態において、結合物質中のアミノ基（1級、2級、3級、または4級アミノ基を含む）の使用は、プリオン結合にとって特に有利である。しかし、特定のプリオンタンパク質、サンプル、およびサンプルと結合物質が接触される条件により、種々の基の使用が企図され、本発明の範囲内に包含される。

【0039】

結合物質に種々の所望の性質を付与するために、結合物質上で複数の異なる物質（積層物など）が随時使用される。例えば、非特異結合を避けシグナル検出を増強するなどのためにタンパク質コーティング（例えばゼラチン）が使用される。

【0040】

表面官能基化とスパーサー

好適な実施形態において結合物質は、表面上に種々の官能基を有する。結合物質の表面上には固有に官能基が存在するか、または当業者に公知の方法により結合物質の表面に官能基を付加できることを理解されたい。種々の基または化合物を種々の表面に結合させる方法は公知であり、文献に多く例示されている。

【0041】

官能基は、本明細書に記載の方法に従って、プリオンを結合するため、追加の官能基を

10

20

30

40

50

連結するため、または物質の任意の物理的、化学的、または物理化学的性質（例えば特に限定されないが、イオン性または疎水性）を修飾するためである。好適な結合物質の表面上に存在する官能基には、特に限定されないが、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基、エポキシなどがある。

【0042】

好適な実施形態において官能基はスペーサー基を含む。スペーサーは、材料（マトリックスまたは支持体とも呼ぶ）の表面と官能基との間にスペースまたは距離を与えるための基である。スペーサーは好ましくは、炭素、窒素、または酸素原子からなる。ある態様において、プリオン結合物質のプリオン結合性を有利に改変するためにスペーサーが使用される。ある実施形態においてスペーサーは、最大20原子の長さ、または最大15原子の長さ、または5~10原子の長さである。スペーサーは好ましくは、特に限定されないが、アルキル基、ポリエチレングリコール（PEG）、炭化水素基、アミノ酸、最大20アミノ酸の長さのペプチド、または1~10アミノ酸の長さのペプチド、またはこれらの混合物である。最も好ましくはスペーサーは、アルキル基とPEGの組合せを含有する。

【0043】

市販のクロマトグラフィー樹脂

好ましくは結合物質は1つ以上の以下の市販のクロマトグラフィー樹脂である：FRACTOGEL（登録商標）EMD；TOYOPEARL（登録商標）アミノ、ブチル、フェニル、またはAF-トレシル；またはTSK-GEL（登録商標）アミノ、フェニルまたはDEAE樹脂。さらに好ましくは結合物質には、特に限定されないが、以下がある：FRACTOGEL（登録商標）EMD TMAE、FRACTOGEL（登録商標）EMD SO_3^{2-} 、FRACTOGEL（登録商標）EMD DMAE、TOYOPEARL（登録商標）アミノ、TSK-GEL（登録商標）アミノ、TSK-GEL（登録商標）フェニル、TSK-GEL（登録商標）DEAE、TOYOPEARL（登録商標）ブチル、TOYOPEARL（登録商標）フェニル、酸化アルミニウム、TOYOPEARL（登録商標）AF-トレシル、およびシリカ樹脂。最も好適な実施形態において結合物質は、TOYOPEARL（登録商標）アミノ、TSK-GEL（登録商標）フェニル、またはFRACTOGEL（登録商標）EMD SO_3^{2-} である。他の市販のクロマトグラフィー樹脂と支持体（無機支持体を含む）の使用が企図され、本発明の範囲に含まれる。

【0044】

本発明の好適な実施形態において結合物質は、ポリメタクリレート、ヒドロキシポリメタクリレート、またはアミノ650（登録商標）樹脂（Toshoh Biosciences）、およびアミノ基、例えば1級、2級、3級アミンを含む。好適な実施形態の結合物質はさらに、式O-R-O- CH_2 -CHOH- CH_2 （ここでRは1~10炭素の長さである）のスペーサーを含む。結合物質は随時、固体支持体（例えばビーズ、膜またはクロマトグラフィー樹脂）に適用されるかまたは形成される。

【0045】

結合物質同定

上記結合物質以外に、さらなる結合物質を以下のように同定することができる。プリオンアナライトへの結合能力について、結合物質をスクリーニングする。本明細書において用語「アナライト」は、多数の分子（特に限定されないが、タンパク質、多糖、および任意の凝集物、またはこれらの組合せを含む）を意味する。結合物質をプリオンタンパク質を含有することが公知のサンプルとインキュベートし、結合しなかったタンパク質を除去し、結合したタンパク質をプリオンタンパク質に特異的な標識抗体などの従来の方法を使用して検出する。アナライトが結合した結合物質を適当な結合物質として同定する。1次または2次抗体の無い対照も、非特異結合物質を排除するために使用する。

【0046】

好適な実施形態において、同定される結合物質が結合するプリオンアナライトは、ヒトまたは動物由来の血液または脳サンプル中に存在するプリオンタンパク質である。さらに好ましくは上記アナライトは、血液または血液由来生成物中に存在する。さらに上記アナライトは、ヒトまたは動物中のTSEと関連するか、またはその原因因子であることが好ましい。

【0047】

プリオンを除去するための結合物質の使用

プリオンタンパク質またはプリオンタンパク質の断片に結合する結合物質は、種々の分析、調製、および診断上の応用に有用である。ある実施形態において結合物質は、サンプルからのプリオンタンパク質またはペプチドに結合し除去するために使用できるビーズまたは膜の形の固相、または固体表面を含有する。結合物質を、プリオン結合物質複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下でサンプル（例えば生体液）と接触させると、サンプル中のプリオンタンパク質は結合物質に結合する。次に結合物質をサンプルから分離し、こうしてリガンドに結合したプリオンタンパク質はサンプルから除去される。タンパク質に結合するためのビーズや膜の使用法は当該分野で公知であり、例えばBaumbachらの米国特許第5,834,318号およびPCT/US01/11150に記載されている。

10

【0048】

本発明のある実施形態において、実質的にすべてのプリオンタンパク質がサンプルから除去される。「実質的にすべて」とは、プリオンタンパク質の濃度が有意に低下することを意味する。すなわちサンプルのすべてまたは一部の、本来は健康な患者への移動が公衆衛生ガイドラインで許容される低リスクのプリオン感染しかもたらさない。実質的にすべてのプリオンタンパク質を、単一の結合物質または複数の結合物質を同時にまたは連続して使用することにより、サンプルから除去することができる。複数の結合物質を使用する時は、上記のように、それぞれが陽性荷電の官能基、陰性荷電の官能基、または疎水性官能基を有する2つ以上の結合物質を使用することが好ましい。より好適な実施形態において、それぞれが陰性荷電の官能基または疎水性官能基を含有する2つ以上の結合物質が使用される。サンプルを2つ以上の結合物質と、連続して任意の順序で接触させる。好適な実施形態において、それぞれが1つの陽性荷電の官能基、陰性荷電の官能基、および疎水性官能基を含有する3つの結合物質が使用される。

20

他の実施形態において、特定のプリオン物質のみがサンプルから除去される。例えば感染性プリオン（PrPsc）のみがサンプルから除去されるか、または非感染性プリオン（PrPc）のみがサンプルから除去される。本明細書に記載の重要な発見は、異なるプリオン特異性を有する多数の結合物質の同定である。表4は、ハムスターおよびヒトの非感染性および感染性プリオンに対するいくつかの結合物質とその特異性を示す。ヒトPrPscの選択的除去のための好適な結合物質はアミノ基、例えばTOYOPEARL（登録商標）アミノ-650MまたはTSK-GEL（登録商標）アミノ750Cクロマトグラフィー樹脂またはその機能性同等物に含有されるアミノ基を含有するか、またはフェニル基、例えばTSK-GEL（登録商標）フェニル-5PWまたは機能性同等物に含有されるフェニル基を含有する。

30

【0049】

好ましくは結合物質を、例えばクロマトグラフィーカラムのようなカラムに充填する。次にサンプル溶液、ホモジネートまたは懸濁物を、重力または加圧下（例えば高速液体クロマトグラフィーカラム）で、カラムを通過させる。サンプル中のプリオンタンパク質は、カラム中の本明細書に記載の結合物質に結合する。カラムを通過するサンプルを採取すると、プリオン汚染が無い、またはプリオン物質のレベルが少なくとも低下している。

【0050】

40

いったんサンプルがカラムを通過すると、結合したプリオンタンパク質を、分析のために、または所望であれば診断もしくは予後診断の目的のために、溶出されるかまたは採取されうる。結合物質からプリオンタンパク質を除去することが好ましいなら、カラムの移動相をまず、弱く結合した汚染物質を除去してカラムをすすぎ洗う緩衝液に変更する。次に、沸騰することにより、または強い界面活性剤、例えばSarkosyl界面活性剤（サルコシン硫酸ナトリウム、Shelton Scientific-IBI、Shelton、コネチカット州）またはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、カオトロピック物質（例えば塩酸グアニジン）または低pHを有する物質（例えば酢酸）を含有する溶液を加えることにより、または結合リガンドの化学的修飾（例えばアミノ基のアセチル化）により、カラムからプリオンタンパク質が除去される。

50

【0051】

プリオンを除去しうる生体サンプルの例には、特に限定されないが、全血、血液由来組成物または成分、血清、髄液、尿、唾液、ミルク、管液、涙、精液、またはヒトまたは動物の脳由来組成物がある。他の生体サンプルには、コラーゲンまたは腺抽出物を含むものがある。ある実施形態においてプリオンは、本明細書に記載の1つ以上の結合物質を含有する血液透析回路を使用することにより、ヒトまたは動物の血液から除去される。この実施形態において血液は、ヒトまたは動物から、本明細書に記載の結合物質の1つ以上を含有する装置に直接入れられ、ここでプリオンタンパク質は結合物質に結合するので血液から除去され、次にプリオンを含まないかまたはプリオンが減少した血液はヒトまたは動物に戻される。

10

【0052】

プリオンタンパク質はまた、本明細書に記載の結合物質を使用して、食品（動物またはヒトの消費用の）のような生体サンプルから除去することができる。例えばサンプルは、任意の動物（例えば特に限定されないが、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、マウス、ハムスターまたはシカ）から誘導されるかまたは得られる動物物質を含有する。あるいはサンプル物質は、ヒト；ウシ；ヒツジ；ブタ；ウマ；ネズミ、例えばマウスおよびハムスター；およびシカ科動物由来の物質、例えばシカおよびエルクでもよい。本発明のいくつかの態様と実施形態の方法によりプリオンタンパク質を除去しうる動物由来の物質は、特に限定されないが、ゼラチン、ゼリー、ミルク、コラーゲン、または乳児用調製粉乳がある。本発明のいくつかの態様と実施形態の方法によりプリオンタンパク質を除去しうるサンプルは、特に限定されないが、医薬組成物、治療用組成物、栄養補給組成物、食物、または化粧品組成物がある。

20

【0053】

好適な実施形態のサンプルはタンパク質溶液であり、種々のタンパク質（特に限定されないが、ヒトまたは動物血清アルブミンを含む）を含有する。例えばサンプルは、特に限定されないが、安定剤としてヒト血清アルブミンを含有する血漿タンパク質調製物、免疫グロブリン調製物、フィブリノゲン調製物、第XIII因子調製物、トロニン調製物、第VII因子調製物、フォンウィルブラント因子調製物、プロテインC調製物、または活性化プロテインC調製物、または上記組合せの調製物、または前記の変形物、；ヒト血清アルブミンを含有する治療用製品；ヒトまたは動物血清アルブミン調製物；および安定剤としてヒトまたは動物血清アルブミンを含有する希薄タンパク質調製物でもよい。好適な実施形態のサンプルは、ヒトまたは動物血清アルブミンを最大約50% (w/v)、または約1%～約50%、または約5%～約25%の濃度で含有することができる。1つの態様において本発明はその好適な実施形態において予想外にかつ有利に、高濃度のタンパク質、特に血液タンパク質（例えば血清アルブミン）を有するサンプルからまたはサンプル中のプリオンタンパク質を除去、分離、または結合することを可能にする。

30

【0054】

本明細書に記載の結合物質はまた、小川、川、帯水層、井戸、水処理施設またはレクリエーション施設水のような供給源からの水のような環境サンプルからプリオンタンパク質を除去するのににも有用である。

40

【0055】

プリオンを検出するための結合物質の使用

本明細書に記載の結合物質はまた、生体サンプルまたは環境サンプル中のプリオンタンパク質またはペプチドの存在を検出または定量する方法において有用である。プリオンタンパク質が検出される生体サンプルには、特に限定されないが、全血、血液由来組成物もしくは成分、血清、髄液、尿、唾液、ミルク、管液、涙、精液、脳由来組成物、糞便、またはコラーゲンの抽出物、腺、組織（例えば扁桃または虫垂）、または臓器がある。定性的および定量的方法の両方が企図され、本発明のいくつかの態様と実施形態の範囲に含まれる。

【0056】

50

プリオンタンパク質除去について上記した結合物質はまた、食品として使用される動物由来の物質中のプリオンタンパク質の検出にも有用である。検出目的に対する、用語「動物由来の物質」は、上記物質、ならびに動物の部分（例えば筋肉、結合組織または臓器組織）を含有する物質を意味する。動物由来の物質はさらに、特に限定されないが、骨粉、ビーフ、ビーフ副産物、ヒツジ、ヒツジ副産物、エルク、エルク副産物、ブタ副産物、ソーセージ、ハンバーガー、および幼児食を含む。

【0057】

本明細書に記載の結合物質はまた、例えば上記のおよび土壌抽出物のような環境サンプル中のプリオンタンパク質を検出するのに有用である。

【0058】

異なるプリオン結合特性を有する多数の結合物質が発見されたので、結合物質は、単一のサンプル中のまたはサンプル間の感染性と非感染性プリオンを区別する方法において有用である。従って、ヒトまたは動物のプリオン病の診断と予後診断のための方法が提供される。プリオン病には、特に限定されないが、伝染性海綿状脳障害（TSE）、例えば、ヒツジやヤギが罹るスクレーピー；ウシが罹るウシ海綿状脳症（BSE）；伝染性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症、およびミュールジカ、オジロジカ、オグロジカおよびエルクの慢性消耗病（CWD）；ヒトが罹る、クールー、クロイツフェルトーヤコブ病（CJD）、ゲルストマンーストロイスラーシェインカー症候群（Gerstman-Straussler-Scheinker SyndromeまたはGSS）、致死的不眠症、および異型クロイツフェルトーヤコブ病（vCJD）がある。

【0059】

ある実施形態において、PrPcよりPrPscに対して高い特異性を有する結合物質にサンプルを通過させ、結合したPrPscプリオンを後述の方法を使用して検出する。次に、同じサンプルをPrPscよりPrPcに対して高い特異性を有する結合物質に通過させ、結合したPrPcを後述の方法を使用して検出する。PrPcとPrPscに対するいくつかの結合物質の特異性を表4に示す。ヒトPrPscの選択的検出のための好適な結合物質は、TOYOPEARL（登録商標）アミノ-650MまたはTSK-GEL（登録商標）-アミノ750C化合物に含有されたものと同様のアミノ基を含有するか、またはTSK-GEL（登録商標）フェニル-5PWに含有されたものと同様のフェニル基を含有する（すべての樹脂はTosoh Biosciences, Montgomeryville, ペンシルバニア州から得られる）。

【0060】

サンプル中のプリオンを検出するために本明細書に記載の方法を使用する時、サンプルを、プリオンタンパク質と結合物質との間で複合体の形成を生じるのに十分な条件下で結合物質と接触させる。次に複合体を従来法により検出し、こうしてサンプル中のプリオンの存在を検出する。例えば結合物質（第1リガンド）を検出可能な標識物を用いて標識することができる。代わりの例として、複合体は、第2のリガンド（例えば抗体または他のタンパク質）を標識し、標識した第2リガンドを結合物質の存在下でサンプルと組合せ、そして標識した第2リガンドープリオンー結合物質複合体を検出することにより、複合体が検出される。第2リガンドは、共有結合または非共有結合的にプリオンに結合させることができる。広範囲の標識物および結合法が公知であり、科学的文献および特許文献に十分に記載されている。ある実施形態において第2リガンドは、その製造中に標識される。適当な標識物には、放射性核種、酵素、基質、補助因子、インヒビター、蛍光部分、化学発光成分、磁性粒子などがある。

【0061】

本発明のいくつかの態様と実施形態の範囲に含まれるのは、プリオンタンパク質結合物質に結合したプリオンタンパク質またはプリオンタンパク質ープリオン結合物質複合体の、定性的または定量的検出法である。複合体を形成するプリオン結合物質は、カラム、膜、またはフィルター中に充填するもしくは作り上げることできるか、または固体支持体上に結合、作り上げ、または固定化することができる。また、プリオン結合物質に結合して次いでプリオン結合物質から放出されるプリオンタンパク質の定性的または定量的検出法も、本発明のいくつかの態様と実施形態の範囲に含まれる。

【0062】

検出は、免疫ブロッティング、ウェスタン分析、ゲル移動度シフトアッセイ、放射活性または生物発光マーカーの追跡、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、ストップドフロースペクトル法、カラムクロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、またはサイズもしくは荷電もしくはその両方の変化に基づき分子を追跡する他の方法を含む任意の方法により進行することができる。2次リガンド-プリオン複合体は、検出前に結合物質から分離してもしなくてもよい。他のアッセイフォーマットには、特に限定されないが、特定の分子（例えば2次リガンド）に結合し封入された試薬またはマーカーを放出するように設計したリポソームを使用するリポソームイムノアッセイ（LIA）がある。放出された化学物質は、次に標準的方法により検出される。

10

【0063】

非放射活性標識物はしばしば間接的手段により結合される。一般に2次リガンド分子（例えばビオチン）は結合物質（第1のリガンド）に共有結合される。次に2次リガンドは3次リガンド（例えば、ストレプトアビジン）分子に結合し、これは本質的に検出可能であるかまたはシグナルシステム（例えば、検出可能な酵素、蛍光化合物、または化学発光化合物）に共有結合される。多くの2次および3次リガンドを使用することができる。2次リガンドは天然の3次リガンド（例えば、ビオチン、チロキシンおよびコルチゾール）を有する場合、これは、標識された天然に存在する3次リガンドとともに使用することができる。あるいは任意のハプテンまたは抗原性化合物を、抗体と組合せて使用することができる。

20

【0064】

結合物質-プリオン複合体を検出するのに使用される具体的な標識物または検出可能な基は決定的に重要ではない。検出可能な基は、検出可能な物理的または化学的性質を有する任意の物質でもよい。かかる検出可能な標識物は多く開発されており、一般にかかる方法に有用な標識物は本方法に応用することができる。すなわち標識物は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的手段により検出可能な任意の組成物である。有用な標識物には、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど）、放射能標識物（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、酵素（例えば、EIA（酵素免疫定量法）またはELISA（酵素結合免疫吸着測定法）で検出可能な酵素として一般に使用される、lacZ（ベータガラクトシダーゼ）、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、および比色法標識物、例えば金コロイド、着色ガラスまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズなどがある。標識物は直接または間接に、当該分野で公知の方法に従って測定法の所望の成分に結合される。上記したように種々の標識物が使用され、標識物の選択は、必要な感度、化合物の結合の容易さ、安定性要件、利用可能な装置、および廃棄規定に依存する。

30

【0065】

2次リガンドはまた、酵素または蛍光物質を用いる結合によってシグナル生成化合物に直接結合してもよい。標識物として関係する酵素は、主にヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、エステラーゼ、およびグリコシダーゼ、または酸化還元酵素、特にペルオキシダーゼである。蛍光化合物には、特に限定されないが、フルオレセインとその誘導体、ローダミンとその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどがある。化学発光化合物には、ルシフェリンおよび2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えばルミノールがある。

40

【0066】

標識物の検出手段は当業者に公知である。すなわち、例えば標識物が放射能標識物である場合、検出手段には、特に限定されないが、シンチレーションカウンタまたはオートラジオグラフィーのような写真フィルムがある。標識物が蛍光標識物である場合、これは蛍光色素を適切な波長の光で励起し、得られる蛍光を例えば顕微鏡、視覚的検査、写真フィルム、電子的検出器（例えば電荷結合素子（CCD）もしくは光増幅器など）を使用して

50

、検出することにより検出することができる。同様に酵素標識物は、酵素の適切な基質を提供し、得られる反応生成物を検出することにより検出される。最後に、単純な比色法標識物は、標識物に関連する色を単に観察することにより検出することができる。すなわち、種々のディップスティックアッセイでは、結合した金はしばしばピンク色となり、一方種々の結合したビーズはビーズの色で出現する。

【0067】

本発明の結合物質はまた、固体サンプル材料から溶液中に抽出されたプリオンタンパク質またはペプチドを除去または検出するのに使用することもできる。例えば固体サンプルを水性溶媒、有機溶媒、または臨界流体で抽出し、得られる上清を結合物質と接触させることができる。固体サンプルの例には、特に限定されないが、動物由来の生成物、特にプリオンを伝搬する物質に暴露されたもの、例えばウシ起源から得られる骨粉がある。ある実施形態の結合物質は、土壌中のプリオンタンパク質の存在を検出するのに使用することができる。他の固体サンプルには、特に限定されないが、脳組織、角膜組織、糞便、骨粉、ビーフ、ビーフ副産物、ヒツジ、ヒツジ副産物、シカとエルク、シカとエルク副産物、および他の動物と動物由来産物がある。

10

【0068】

あるいは、プリオンとプリオン-結合物質複合体をプロテイナーゼK (PK) を用いて処理することができる。PrPcはPKに対して高度に感受性である一方、PrPscは部分的に消化されてPrPresを生成する。PrPres分子自体はタンパク質分解に対して耐性である。すなわちPK処理はPrPcを消化し、PK感受性PrPscをPrPresに変換する。PKの除去後、PrPresは変性させて、3F4のような抗体により検出することができる。

20

【0069】

別の実施形態において本発明の結合物質は、PrPcに対するPrPscの選択的濃縮のために使用することができる。

【0070】

プリオンを定量するための、結合物質の使用

結合物質-プリオン複合体、または代わりに、プリオンもしくは結合物質-プリオン複合体に対する抗体は、当業者に公知の任意の多くの方法の任意のものを用いて検出および定量することができる。これらには、特に限定されないが、分析的生化学的方法（例えば分光法、放射線写真法、電気泳動、毛細管電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、高分散クロマトグラフィーなど）、および種々の免疫学的方法（例えば、特に限定されないが、流体またはゲル沈降反応、免疫拡散法（一重または二重）、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、免疫蛍光アッセイなど）がある。

30

【0071】

非特異的結合の低下

サンプルのプリオンタンパク質の検出のためのアッセイの成分として固体支持体を使用する時、固体支持体への非特異的結合を低下させることが好ましいことがしばしばあることを当業者は理解するであろう。かかる非特異的結合を低下させる手段は当業者に公知である。代表的にはこれは、固体支持体をタンパク質性組成物で被覆することを含む。特に、ウシ血清アルブミン (BSA) やヒト血清アルブミン、およびゼラチンのようなタンパク質組成物が広く使用される。

40

【実施例】

【0072】

本発明を具体例により詳細に説明する。以下の例は例示目的であり、決して本発明を限定するものでも規定するものでもない。

【0073】

実施例1 プリオン結合物質の同定

後述するように正常なハムスター脳ホモジネートを使用して、NBT/BCIPクロモゲン（ニトロブルーテトラゾリウム/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-1-ホスフェート-p-トルイ

50

ジン塩)によりビーズ上プリオン結合試験を使用して、80個のポリマーまたは無機粒子を試験した。結合結果を表1に示すが、ここで「-」は結合無し、「+」は結合有りを示す。粒子評価において「+」が多いほど、強い結合が観察されたことを示す。「++」以上の結合結果を有する12個の粒子をさらに評価した。表2は、正常なハムスタープリオンに結合する12個の粒子の能力を要約する。スコアが大きいほど、プリオン結合量が多いことを示す。

【表1】

プリオンタンパク質結合についてのポリマー物質または無機粒子のスクリーニング

参照番号	名前	製造業者	結合結果
1	Toyopearl™ アミノ-650M	Tosoh Bioscience (Montgomeryville, PA)	+++
1'	アセチル化アミノ-650M	アセチル化はToyopearl™ アミノ 650Mを使用して North Carolina State University (NC SU) が行った	-
2	TSK-GEL™ アミノ 750C	Tosoh Bioscience	+++
3	Toyopearl™ エポキシ 700EC	Tosoh Bioscience	+
4	Toyopearl™ AF-カルボキシ-650M	Tosoh Bioscience	-
5	Toyopearl™ AF-ヘパリン-650M	Tosoh Bioscience	+
6	Amberchrom™ CG-71m	Tosoh Bioscience	-
7	Amberchrom™ CG-300m	Tosoh Bioscience	-
8	Toyopearl™ HW-40C	Tosoh Bioscience	-
9	Toyopearl™ HW-50F	Tosoh Bioscience	-
10	Toyopearl™ AF-Chelate-650M	Tosoh Bioscience	-
11	Toyopearl™ DEAE-650M	Tosoh Bioscience	+
12	Toyopearl™ DEAE-650C	Tosoh Bioscience	-
13	Toyopearl™ Super Q-650M	Tosoh Bioscience	+
14	Toyopearl™ Super Q-650C	Tosoh Bioscience	+
15	Toyopearl™ QAE-550C	Tosoh Bioscience	-
16	Toyopearl™ CM-650M	Tosoh Bioscience	-
16'	Toyopearl™ CM-650C	Tosoh Bioscience	-
17	Toyopearl™ SP-650M	Tosoh Bioscience	-
18	Toyopearl™ SP-550C	Tosoh Bioscience	-
19	TSK-GEL™ エーテル-5PW	Tosoh Bioscience	-
20	TSK-GEL™ フェニル-5PW	Tosoh Bioscience	+++
21	Toyopearl™ プチル-650C	Tosoh Bioscience	++
22	Toyopearl™ フェニル-650C	Tosoh Bioscience	++
23	Toyopearl™ ヘキシル-650C	Tosoh Bioscience	-
24	TSK-GEL™ DEAE - 5PW	Tosoh Bioscience	+++
25	TSK-GEL™ Q - 5PW	Tosoh Bioscience	+
26	Toyopearl™ AF-トレシル 650M	Tosoh Bioscience	++
27	Amberlite™ XAD-7 HP	Supelco (Bellefonte, PA)	-
28	Amberlite™ XAD-1180	Supelco	-
29	Diaion/sepabeads™ HP 20SS	Supelco	-
30	Diaion/sepabeads™ SP 207	Supelco	+
31	MCI GEL CHP 20P	Supelco	-
32	シリカゲル grade 7754	Supelco	-
33	Davisil™ シリカゲル grade 634	Supelco	-
34	Davisil™ シリカゲル grade 643	Supelco	-
35	トリスルホン化Blue rayon	Supelco	試験せず。これはblue

【0074】

	(フタロシアン銅と同じ)		rayon fiberである。
36	Amberlite™ IRC-718	Supelco	-
37	Diaion™ CR 20	Supelco	-
38	Amberlite™ IRA-958	Supelco	-
39	Dowex™ MSA-1	Supelco	-
40	Amberlite™ IRA-910	Supelco	+
41	Diaion™ PA 418	Supelco	-
42	Fractogel™ EMD DMAE 650(S)	E. Merck (Gibbstown, NJ)	++++
43	Fractogel™ EMD フェニル 1 650(S)	E. Merck	-
44	Fractogel™ EMD TMAE 650(S)	E. Merck	+++++
45	Fractogel™ EMD プロピル 650(S)	E. Merck	-
46	Fractogel™ EMD アミノ (M)	E. Merck	-
47	Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S)	E. Merck	++
48	Fractogel™ EMD COO ⁻ 650(S)	E. Merck	+
49	PMMA ポリ(メチルメタクリレート)	Bangs Laboratories (Fishers, IN)	-
50	酸化アルミニウム-100+325	Aldrich (Milwaukee, WI)	++
51	ポリエチレン	Aldrich	-
52	酸化アルミニウム-100+400	Aldrich	+
53	ポリ(スチレン/無水マレイン酸)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)	-
54	アミノメチルポリスチレン樹脂	Aldrich	-
55	酸化アルミニウム, 活性化	Aldrich	-
56	ヒュームドシリカ	Aldrich	++
57	PVDF SOLVAY 1008/1001	Solvay (Auburn Hills, MI)	++++ (非特異的)*
58	PVDF SOLVAY 1015/1001	Solvay	+++ (非特異的)*
59	カラム用シリカ ゲル, 35-70 μm	Acros (Pittsburgh, PA)	-
60	シリカ ゲル 60-200メッシュ	Acros	-
61	ポリスチレン, 0.93 μm	Bangs	試験せず, エマルジョン
62	Bangs Lab シリカ, 0.20 μm	Bangs	試験せず, エマルジョン
63	Bangs Lab シリカ, 0.97 μm	Bangs	試験せず, エマルジョン
64	1,2 DAP ¹ - エポキシ 700EC	Aldrich	-
65	1,3 DAP - エポキシ 700EC	Aldrich	-
66	1,4 DAP ² - エポキシ 700EC	Aldrich	-
67	L-リシン - エポキシ 700EC	Aldrich	+
68	TETA ³ - エポキシ 700EC	Aldrich	+
69	Prometic CG-1083	Prometic BioSciences (Cambridge, UK)	++++ (非特異的)*
70	Prometic CG-1085	Prometic BioSciences	+
71	Prometic CG-1086	Prometic BioSciences	+
72	Prometic CG-1082 (紫色)	Prometic BioSciences	+
73	Prometic CG-1084 (紫色)	Prometic BioSciences	++ (非特異的)*
74	Prometic CG-1087 (紫色)	Prometic BioSciences	+
75	Prometic CG-1014 (紫色)	Prometic BioSciences	++ (非特異的)*
78	Prometic CG-1107 (紫色)	Prometic BioSciences	++++ (非特異的)*

【0075】

79	Prometic CG-1108 (紫色)	Prometic BioSciences	++++ (非特異的)*
76	エチレンジアミン, ポリマー結合	Aldrich	-
77	Pharmacia Source 30Q	Pharmacia (Piscataway, NJ)	+
80	Clear-Base Resin (HCl)	ペプチド International (Louisville, KY)	-

【0076】

10

20

30

40

50

- 1 DAP：ジアミノプロパン
- 2 DAB：ジアミノブタン
- 3 TETA：トリエチレンテトラミン
- 4 Amberchom（登録商標）は、Rohm and Haas Company（ペンシルバニア州フィラデルフィア）の登録商標である。

【0077】

* 非特異的：抗体3F4の無い陰性対照が、抗体3F4有りて試験したものと同一シグナルを有することを示す。

【表2】

正常なハムスタープリオン（HaPrPc）に結合するポリマー性結合物質の能力

ポリマー化合物	基礎樹脂	製造業者	HaPrPc
Fractogel™ EMD TMAE 650(S)	PMMA**	E. Merck	5
Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S)	PMMA	E. Merck	2
Fractogel™ EMD DMAE 650(S)	PMMA	E. Merck	4
Toyoparl™ アミノ-650M	PMMA	Tosoh Bioscience	3
TSK-GEL™ アミノ 750C	PMMA	Tosoh Bioscience	3
TSK-GEL™ フェニル-5PW	PMMA	Tosoh Bioscience	3
TSK-GEL™ DEAE-5PW	PMMA	Tosoh Bioscience	3
Toyoparl™ ブチル-650C	PMMA	Tosoh Bioscience	2
Toyoparl™ フェニル-650C	PMMA	Tosoh Bioscience	2
酸化アルミニウム-100+325	Al ₂ O ₃	Aldrich	2
Aldrich ヒュームドシリカ	SiO ₂	Aldrich	2
Toyoparl™ AF-トレシル 650M	PMMA	Tosoh Bioscience	2

【0078】

** PMMA：ポリマー性メタクリレート

NBT/BCIPによるビーズ上プリオン結合試験は以下のように行った。10%ハムスター脳ホモジネートからの正常なPrPで開始する時、サンプルを0.5% Sarkosyl（200 μlの10%を4 mlの脳に）で攪拌器上で室温で30分可溶化した。サンプルを14,000rpmで5分間遠心分離した。上清を取りだし、所望の培地中で上清の希釈物を作った。96ウェルマイクロタイタープレート（カタログ番号3075、Becton Dickinson、Franklin lanes, NJ）とMillipore MultiScreen-DVプレート（カタログ番号MADV N65 10、Millipore Corporation, Bedford, MA）を、まずPierce（Rockford, IL）の200 μl／ウェルの1%（w/v）カゼインを用いて65℃で1時間ブロックした。10ミリグラム（mg）の乾燥ビーズを1mlの10mM PBS（pH7.4）中で膨潤させ、2回洗浄した。マイクロタイタープレートを空にし、各ウェルに20～30 μlの膨潤ビーズの懸濁物を加えた。懸濁物を沈降させ、過剰の水を除去した。

【0079】

正常なハムスター脳ホモジネートを、すでに60℃で10時間熱処理しておいた5%ヒト血清アルブミン（Alpha Therapeutic Corp. Los Angeles, CA）で1：10に希釈した。懸濁物を150 μl容量／ウェルで加え、ビーズとともに室温で1.5時間インキュベートした。非結合タンパク質溶液を除去し、100 μlの3F4モノクローナル抗体（Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA）（1%カゼインで1：4000に希釈）を実験ウェルに加えた。対照ウェルは

100 μ lの1%カゼインを含有した。ビーズを3F4とともに4℃で一晩静かに攪拌してインキュベートした。

【0080】

次にビーズを10mM PBS+10 μ M CuCl₂ (pH7.4) で2回洗浄した。第2抗体である抗マウスIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート (#A3688, Sigma, St. Louis, MO) (1%カゼインで1:1000に希釈した) を100 μ ウェル/ウェルの容量で加えた。サンプルを室温で攪拌しながら1時間インキュベートした。洗浄を行うために、すべてのビーズをMillipore (Bedford, MA) MultiScreen-DVプレートに移した。サンプルをPBS+Cu²⁺ ツイーン20 (0.05%) (pH7.4) で3回、PBS+Cu²⁺ で3回、そして50mM トリス塩酸+5mM MgCl₂ (pH9.5) で2回洗浄した。

10

【0081】

1-Step NBT/BCIP基質を充分混合し、所望の発色（淡い紫色）があるまで100 μ lを直接各ウェルに加えた。代表的なインキュベーションは、5～15分間であった。ろ紙 (#170393 2, BioRad, Hercules, CA) を形に切り、蒸留水で湿らせた。ビーズ懸濁物を、真空下でS&S Minifold I ドットプロットシステム (Schleicher-Schuell Bioscience, Keene, NH) のプロットウェルに加えた。ウェルを水ですすぎ洗い、結果をコンピューターにスキャンさせた。

【0082】

実施例2 プリオン結合物質の同定

プリオン結合物質の同定は、ハムスター脳ホモジネートをバッチフォーマットを使用して、2つの異なる検出系を使用して行った。最初の方法では、物質に結合したプリオンの量を、標的物質とインキュベーション後にビーズを染色して検出した。第2の方法は、SDS-PAGEとウェスタンブロットを使用して、フロースルーと洗浄サンプル中に含有される非結合画分中に存在するプリオンの量を検出した。各方法の詳細な説明を以下に示す。

20

【0083】

表3で後述するように、Toyopearl（登録商標）アミノ-650M、TSK-GEL（登録商標）アミノ750CおよびTSK-GEL（登録商標）フェニル-5PWは、ハムスター脳PrPcの最も特異的な結合を与えた。

【表3】

30

2次スクリーニングの結果

ポリマー 粒子	結合はNBT/BCIPを用いるビーズ上試験により評価した	結合はECL-plusを用いるウェスタンブロットにより評価した
Toyopearl™ アミノ-650M	+++	+++
TSK-GEL™ アミノ 750C	+++	+++
TSK-GEL™ フェニル-5PW	+++	++++
Toyopearl™ プチル-650C	++	+
Toyopearl™ フェニル-650C	++	+
TSK-GEL™ DEAE-5PW	+++	5+ (非特異的)
Toyopearl™ AF-トレシル 650M	++	-
Fractogel™ EMD DMAE 650(S)	++++	5+ (非特異的)
Fractogel™ EMD TMAE 650(S)	+++++	5+ (非特異的)
Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S)	++	+++
酸化アルミニウム-100+325	++	+
Aldrich ヒュームドシリカ	++	5+ (非特異的)

40

【0084】

ビーズ上検出法については、96ウェルマイクロタイタープレート（カタログ番号3075、

50

Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ) と Millipore Multiscreen-DV プレート (カタログ番号 MADV N65 10, Millipore, Bedford, MA) を、200 μ l / ウェルの 1% (w/v) カゼインで 65°C で 1 時間ブロックした。各ポリマーの 10mg のアリコート を 1ml の 10mM PBS (pH7.4) 中に浸漬し、2 回洗浄した。マイクロタイタープレートから水を切り、20~30 μ l の樹脂の懸濁物を各ウェルに加えた。樹脂を沈降させ、過剰の溶液を除去した。樹脂に 5% ヒト血清アルブミン中の正常なハムスター脳ホモジネートの 1:10 溶液の 150 μ l を加えた。混合物を室温で 1.5 時間インキュベートした。ウェルから水を切り、1% カゼイン中の 100 μ l の 3F4 抗体 (1:4,000) を各ウェルに加え、冷蔵温度で静かに攪拌しながら一晩インキュベートした。次にビーズを 10mM PBS + 10 μ M CuCl₂ (pH7.4) で 2 回、次に 100 μ l / ウェルの第 2 抗体である抗マウス IgG アルカリホスファターゼコンジュゲート (#A3688, Sigma, St. Louis, MO) を添加し、静かに攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。

10

【0085】

すべてのウェルから水を切り、ビーズを Multiscreen プレートに移し、10mM PBS + 10 μ M CuCl₂ + 0.05% ツイーン 20 (pH7.4) で 3 回、次に 10mM PBS + 10 μ M CuCl₂ で洗浄し、1M NaCl で 2 回、50mM トリス塩酸 + 5mM MgCl₂ (pH9.5) で 2 回洗浄した。

【0086】

発色のために、洗浄したビーズを 100 μ l の NBT/BCIP 基質と 5~15 分間反応させた。ビーズを S&S Minifold I ドットプロットシステムを使用してろ紙に移し、生じた色を評価した。

【0087】

非結合画分の検出については、あらかじめ 10mM PBS (pH7.4) で 4°C で一晩湿潤させた各ビーズサンプルの 100 μ l をマイクロフュージ管に入れた。PBS で少なくとも 4 回洗浄後、ビーズを Ultrafree-MC 0.45 μ m フィルターユニット (UFC30HVN, Millipore, Bedford, MA) に移し、PBS で再度すすぎ洗いをした。10% のハムスター脳ホモジネート (HBH) を 0.5% Sarkosyl で処理し、PBS で 1:10 と 1:20 に希釈した。その 200 μ l アリコートを各ビーズサンプルに加え、攪拌しながら 8 分間インキュベートし、次に 10,000rpm で 2 分間遠心分離して非結合画分を回収した。フロースルーのアリコート 26 μ l を 0.7ml のマイクロ遠心分離管に入れ、ウェスタンブロット解析のために -20°C で保存した。

20

【0088】

ウェスタンブロット前にサンプルを解凍し、10 μ l のサンプルバッファー (NuPAGE SDS サンプルバッファー, NP0007, Invitrogen, Carlsbad, CA) と 4 μ l の還元剤 (NuPAGE サンプル還元剤, NP0004, Invitrogen) (DTT, H₂O 中 1M) を加えた。溶液を 90~100°C で 10 分間インキュベートした。サンプルを 15 ウェルの NuPAGE4-12% ビスートリスゲル (np0323, Invitrogen) に適用した。ウェスタンブロット解析のためにゲルの各ウェルに 17 μ l を適用し、タンパク質染色ゲルのために 14 μ l を適用した。分子量マーカー (MultiMark Multi-Colored Standard, LC5725, Invitrogen) の量は 5 μ l であった。ウェスタンブロットは、PVDF 膜、ブロッカーとして 1% カゼイン、1 次抗体として 1:10,000 の 3F4、2 次抗体として 1:3000 のヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート、および基質として ECL plus を使用した。フィルムは 6 分間露光した。

30

【0089】

結合物質に対して高 PrP 結合を有するサンプルはフロースルーにシグナルを発生せず、スコア「5+」とした。結合を持たないものは「-」とした。他のサンプルはこれらの値の中間に等級付けされる。

40

【0090】

実施例 3

プリオン結合特異性の測定

一般に、異なる結合物質からなる湿潤ビーズを、個々のディスポーザブルカラムに量的に入れた。カラムは、ビーズを保持するのに充分小さいが抗原添加 (challenge) 溶液のフロースルーを可能にするのに充分大きいフリット (frit) を含有した。抗原添加溶液は、赤血球濃縮液混合物中に加えた Sarkosyl (Sigma) 中のプリオン含有脳ホモジネート

50

であった。さらに詳しくは抗原添加溶液は、TSE感染性ヒト脳ホモジネート、感染性ハムスター脳ホモジネート、非感染性ヒト脳ホモジネート、または非感染性ハムスター脳ホモジネートを含有していた。抗原添加溶液を一定時間、標的結合物質を通過させる一方、そのフロースルーを集めた。次にビーズをすすぎ洗い、それらのカラムから定量的に採取バイアルに移し、そこから、特異的プリオン結合と非特異的タンパク質結合を測定する以後の処理のために、既知量を取った。フロースルー溶液と反応したビーズの残りもまた、将来あるかも知れない分析のために保存した。

【0091】

後に詳述される方法を使用して、プリオンタンパク質についての11個の結合物質の結合活性を表4に記載のように測定した。結合物質は、正常なまたは感染性ヒトもしくはハムスタープリオンタンパク質に結合する能力についてランク付けされる（ランク1はプリオンタンパク質への最大の結合量を示す結合物質である）。例えばFractogel（登録商標）EMD TMAE650(S)結合物質（メタクリレート骨格と官能基-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃を有する）は、ハムスターとヒトの感染性プリオンタンパク質（PrPsc）の最大量に結合し、Fractogel（登録商標）EMD SO₃²⁻E650(S)結合物質（メタクリレート骨格と官能基-SO₃²⁻を有する）は、ハムスターとヒトの正常なプリオンタンパク質の最大量に結合した。これらの量は、プリオン結合物質から結合したタンパク質を放出させ、放出されたタンパク質を電気泳動により分離し、ウェスタンブロットを使用してプリオン特異的モノクローナル抗体を用いて、結合物質から放出されたタンパク質の免疫反応性を分析することにより測定した。プリオンタンパク質への抗体の結合は、化学発光により検出された。定量は、フィルム上の電気泳動バンドの濃さ（結合物質に結合したプリオンタンパク質に結合した抗体を示す）を、2ng、10ng、および50ngのマウスIgGと比較し、結合物質にスコアを割り当てることにより行った。同じスコアを有する結合物質のランク付けは、サンプルバンドを互いに直接比較することにより行った。

【表4】

2次スクリーニング後の正常なハムスター（HaPrPc）、および正常なヒトプリオン（HuPrPc）、感染性ハムスタープリオン（HaPrPsc）、および感染性ヒトプリオン（HuPrPsc）に結合する能力に基づく11個のポリマー化合物のランク付け

ポリマー化合物と官能基	ベース樹脂	製造業者	HaPrPc	HuPrPc	HaPrPsc	HuPrPsc
Fractogel™ EMD TMAE 650(S) -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃	PMMA	E. Merck	2	2	1	1
Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S) -SO ₃ ²⁻	PMMA	E. Merck	1	1	10	9
Fractogel™ EMD DMAE 650(S) -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ H(CH ₃) ₂	PMMA	E. Merck	3	3	2	7
Toyopearl™ アミノ-650M -CH ₂ -CHOH-CH ₂ NH ₂	PMMA	Tosoh Bioscience	6	10	4	4
TSK-GEL™ アミノ 750C -CH ₂ -CHOH-CH ₂ NH ₂	PMMA	Tosoh Bioscience	5	9	3	3
TSK-GEL™ フェニル-5PW -C ₆ H ₅	PMMA	Tosoh Bioscience	7	5	5	2
TSK-GEL™ DEAE-5PW -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ H(C ₂ H ₅) ₂	PMMA	Tosoh Bioscience	4	7	6	8
Toyopearl™ ブチル-650C -(CH ₂) ₃ -CH ₃	PMMA	Tosoh Bioscience	8	4	8	5
Toyopearl™ フェニル-650C C ₆ H ₅	PMMA	Tosoh Bioscience	9	6	9	6
酸化アルミニウム -100+325	Al ₂ O ₃	Aldrich	10	8	7	10
Toyopearl™ AF-トレシル 650M SO ₂ -CH ₂ -CF ₃	PMMA	Tosoh Bioscience	11	11	11	11

【0092】

乾燥ビーズの調製

20%メタノール水溶液でビーズを湿潤させて、乾燥ビーズをまとめて調製した。使用前少なくとも24時間ビーズを放置した。乾燥ビーズの元々の量が0.5 g～2.5 gである時、あらかじめ湿潤させたビーズスラリーを50mlのプラスチック円錐管に移した。過剰の液体を取り出し除去し、20%メタノール25mlを加えた。次にサンプルを30秒間静かに振盪または転倒させた。元々のビーズ重量が上記範囲外である時、0.5 g未満の樹脂についてはメタノールの容量を10ml、そして2.5～4.0 gについては40mlを使用して調整した。ビーズを重力により約12～15分間、またはほとんどのビーズがチューブの底に来るまで沈降させた。上清溶液（微粉を含む）を注意深く取り出し除去した。メタノールによるすすぎ洗いを再度繰り返し、次に20%メタノールを加えて、1:1(v/v)ビーズスラリーを作成した。ビーズを4℃で保存した。

10

【0093】

ビーズスラリーの調製

440 μ lのビーズスラリーを15mlのプラスチック円錐管（使用したカラム当たり220 μ lの湿潤ビーズ）に移し、10mlのワーキングバッファー（20mM クエン酸バッファー／140mM NaCl、pH7.0）を加えた。サンプルを30秒間静かに振盪または転倒させた。ビーズを重力により約12～15分間、またはほとんどのビーズがチューブの底に来るまで沈降させた。上清溶液（微粉を含む）を注意深く取り出し除去した。ワーキングバッファーによるすすぎ洗いをさらに2回繰り返し、次に充分量のワーキングバッファーを加えて、1:1容量比を作成した。サンプルを再度30秒間静かに振盪または転倒させ、室温で一晩放置した。必要であればワーキングバッファーを加えてワーキングバッファーの容量を1:1に維持し、水和したビーズをバッファーで4℃で、使用するまで保存した。

20

【0094】

プレ水和ビーズの調製

アミノToyopearl（登録商標）と他のビーズを20%エタノール中の湿潤スラリーとして得た。追加の水和工程は必要が無かった。しかしワーキングバッファーへの平衡化を以下のように行った。製造業者は市販のスラリーが約72%容量の樹脂を含有すると予測し、カラム当たり300 μ lのスラリーを使用した。ビーズを15mlのプラスチックチューブ（例えばFalcon）に移し、10mlのワーキングバッファーを加えた。サンプルを30秒間静かに振盪または転倒させた。ビーズを重力により約12～15分間、またはほとんどのビーズがチューブの底に来るまで沈降させた。上清溶液（微粉を含む）を注意深く取り出し除去した。ワーキングバッファーによるすすぎ洗いをさらに2回繰り返し、次に充分量のワーキングバッファーを加えて、1:1容量比とした。サンプルを再度30秒間静かに振盪または転倒させ、室温で一晩放置した。必要であればワーキングバッファーを加えてワーキングバッファーの容量を1:1に維持し、水和したビーズをバッファーで4℃で、使用するまで保存した。

30

【0095】

赤血球の調製と取り扱い

110mlのAdsol（登録商標）のバッグ（Baxter, Bloomington, IN）を、約250～300mlのRBCと残存する白血球と血小板とを含有する赤血球濃縮液（RBC）の250mlバッグに加えた。得られるヘマトクリット（赤血球（RBC）の容量／総量）は約50～55%であった。Adsol（登録商標）：CPD（クエン酸リン酸デキストロース）およびRBCを転倒混和した。次に混合物を採取から8時間以内に室温でPall 白血球減少フィルター（Pall Corporation, East Hills, NY）に通し、新しいバッグに入れた。この操作は、RBC混合物中の白血球の数を低下させた。白血球ろ過したRBCを新しいバッグ中で4℃で42日間保持した。この調製物中のバッファー混合物の最終組成は、30.6% Adsol／8.5% CPD (v:v)であった。使用前に、遠心分離後の上清を415nmで吸光度を測定して、RBC調製物の溶血パーセントをチェックした。調製直後に得られた溶血値より2%以上多い溶血のあったRBC調製物は使用しなかった。

40

50

【0096】

脳ホモジネートの調製と取り扱い

Maryland大学のRobert Rohwer博士と共同研究者により、彼らが確立した方法に従って、正常なハムスター脳ホモジネート（10% (w/v)）が調製された。1.8ml容量でアリコート

【0097】

脳ホモジネートサンプルの解凍後、サンプルを氷上に置いた。各60 μ lアリコートの解凍した脳ホモジネートに、6.6 μ lの5% Sarkosyl試薬（9.5mlのCPD:Adsolバッファ（8.5% CPD、30.6% Adsol および60.9% PBS v:v:v）に溶解した）を加えた。サンプルをボルテックス混合し、湿潤氷上で静かに30分間ゆすって変性させた。次にサンプルを14,000 rpmでマイクロ遠心分離管中で4℃で5分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、ペレットを捨てた。上清を湿潤氷上で最大1時間保持した。得られた上清は、0.5% Sarkosyl試薬を含有する10%脳ホモジネートであった。作成したアリコートを調製後1時間以内にカラムに適用し、取り扱いの間、湿潤氷上に維持した。

【0098】

水和ビーズのカラムへの定量的移動

空の各カラムに、750 μ lの0.1%ツイーン（登録商標）20を加えた。次に各カラムに1mlの20%エタノール（v:v）を加え、重力で流した。さらに2×1mlの脱気した脱イオン水を各カラムに加えてエタノール溶液を洗い出し、フリット中に捕捉されている空気を除去した。定量的ピペッターを使用して、400 μ lの水和ビーズ懸濁物をカラムに移した。過剰のワーキングバッファ（登録商標）を移した湿潤ビーズ中を重力で流れさせ、次にカラムを1mlのワーキングバッファで3回洗浄後、サンプルを導入した。

【0099】

RBC共混合物（抗原添加溶液）の調製

シリンジと18ゲージ（またはそれ以上）の針を使用して、540 μ l RBC／カラムをポリプロピレン円錐管に入れた。円錐管を3,000rpmで10分間遠心分離して、Adsol（登録商標）層を上に分離した。Adsol（登録商標）層の上に60 μ lの10%処理脳ホモジネートを加え、こうしてRBC調製物と高濃縮添加物質、すなわち脳ホモジネートとSarkosyl試薬との直接接触を減らした。共混合物を転倒混和し、湿潤氷上に維持し、調製して4時間以内に使用した。カラムアッセイで使用する前に、混合物を10分間室温に戻した。

【0100】

カラムへの抗原添加溶液の添加

すべてのカラムにいったん水和ビーズを充填すると、抗原添加溶液を混合し、非常に注意深く0.5ml／カラムの容量でビーズ上に重層した。溶液を重力によりカラムを流した。総フロー時間は約5～20分間であった。

【0101】

最初の0.5mlの抗原添加溶液フロースルーを2mlのクリオバイアルに採取した。さらに0.5mlのワーキングバッファを各カラムに加え、フロースルーを同じクリオバイアルに採取した。次にビーズカラムを1mlのワーキングバッファで5回すすぎ洗い、この間ピペットで連続的に再懸濁して完全に均一に洗浄できるようにした。次にビーズを後述するようにカラムから回収した。

【0102】

結合したビーズの定量的回収

各カラムに0.75mlのワーキングバッファを加えた。ピペットを使用してカラムをフラッシュしてビーズを懸濁し、懸濁物をすばやく目盛り付チューブに移した。ビーズ懸濁物をチューブ中で沈降させ、ビーズ層を乱すことなくできるだけ多くの上清を取り出した。次に上清を同じカラムに戻し、上記工程を2回繰り返して、残存するビーズをカラムからチューブに移した。次にビーズを10分間重力により沈降させ、目盛り付チューブ中のビー

ズ層の容量を記録した。

【0103】

分析のための結合したビーズの調製

まず各チューブ中のワーキングバッファのレベルを1mlに調整し、チューブを静かにボルテックス混合してビーズの懸濁物を作製した。ピペットを使用して500 μ lの懸濁物を取り出し、小エッペンドルフ（登録商標）（Brinkmann instruments, Westbury, NY）マイクロフュージ管に移した。懸濁物を10分間沈降させ、沈降したビーズの容量を100 μ lに調整した。次に、移したビーズを遠心分離し、上清を除去した。直ちにビーズアリコート、電気泳動とウェスタンブロット解析のために調製した。

【0104】

乾燥ビーズ対水和ビーズの定量

沈降したビーズの容量と膨潤比に基づき、以下のように乾燥重量を算出した：

ビーズの乾燥重量 = 沈降した容量 / 膨潤比

膨潤比 = 水和ビーズ容量 (μ l) / 乾燥重量 (mg)

Toyopearl（登録商標）について42.5mg乾燥重量 = 20%メタノール中の200 μ l湿潤ビーズ

膨潤比 (20%メタノール中) = 200 / 42.5 = 4.71

実施例4 ウェスタンブロット解析

赤血球濃縮物（RBC）中に加えた脳ホモジネートの溶液から回収したまたは成分が減少した感染性および非感染性プリオンタンパク質の評価を可能にするために、以下のウェスタンブロット法を計画した。これらの方法は、実施例3で上記したカラムプリオン結合アッセイから得られたサンプル（抗原添加溶液に暴露したビーズのサンプルとカラムを流れ出て採取された抗原添加溶液のサンプルを含む）に適用された。

【0105】

一般にサンプルは、プリオン含有溶液と反応させた標的結合物質を有するビーズのカラム結合アッセイから、またはこれらの反応のフロースルーから得られる。調製されたサンプルは次に、プリオンタンパク質の存在についてウェスタンブロットにより分析される。プリオンタンパク質の免疫検出は、プリオンタンパク質に特異的な1次マウスモノクローナル抗体を使用して行った。次にこれらのプリオン免疫複合体は、アルカリホスファターゼ結合2次抗体を用いて検出され、化学発光反応はX線フィルム上で視覚化された。

【0106】

ゲル電気泳動サンプルの調製

以下の工程は好ましくは、実施例3のカラムアッセイの直後に行われる。

【0107】

調製されたすべてのカラムビーズサンプルについて、100 μ lの充分懸濁したビーズを100 μ lのInvitrogen 2 $\times$ サンプルバッファとボルテックス混合した。対照も、カラムアッセイからの未使用の脳ホモジネート（正常なヒト脳、散发性CJD脳、正常なハムスター脳、スクレーピーハムスター脳など）をInvitrogen 2 $\times$ サンプルバッファと混合して調製した。さらに詳しくは20 μ lアリコートの脳ホモジネートを40 μ lの2 $\times$ サンプルバッファに加えた。

【0108】

マウスIgGの対照も以下のように調製した。レーン当たり50ngの標準物質を、20 μ lの2.5mg/mlマウスIgGを480 μ lのPBSと混合して調製した（これは100 μ l/mlに等しい）。25 μ lのこの混合物を475 μ lの2 $\times$ Invitrogenサンプルバッファに加えて、5ng/ml溶液を得た。レーン当たりこの10 μ lは、高濃度直接添加ゲル標準物質用の50ng/レーンを与えた。5 μ lの100 μ g/ml マウスIgG溶液を495 μ lの2 $\times$ Invitrogen低下サンプルバッファと混合した。これにより1ng/ μ l マウスIgGを得た；レーン当たりこの10 μ lは10ng/レーンを与えた（高濃度直接添加ゲル標準物質）（10ng/レーン）。マウスIgG低濃度直接添加ゲル標準物質（2ng/レーン）も前工程の中濃度標準物質を希釈して調製し、ローディングバッファ中の50 μ Lの1ng/ μ lマウスIgGを200 μ lのInvitrogen 2 $\times$ サンプルバッファと混合することによって（0.2ng/ μ Lになる）。ウェル当たりのこの10 μ lは2ng/レーンを

与えた。製造業者の説明書に従ってInvitrogen SeeBlue Plus2 前染色した分子量標準物質も調製した。

【0109】

すべてのサンプルをInvitrogenバッファー中で90℃で10分間加熱した。次にサンプルを短時間遠心分離し、-20℃で一晩保存した。翌朝、加熱法を繰り返した後、サンプルをSDS-PAGEゲルに適用した。

【0110】

免疫反応法

12%のビストリスNuPAGE SDS-PAGEゲルに上記サンプルを添加後、ゲルを200Vの一定電圧で45分間電気泳動し、エレクトロブロットトランスファー法を行った。次に、タンパク質を移した膜をFisher Square Dish中に入れ、振盪台の上で室温で25mlのWestern Breezeブロッキング剤（12.5mlの水、5mlの希釈液A、および7.5mlの希釈液B）中で1時間インキュベートした。ブロッキング溶液を捨てた。

【0111】

20mlの新鮮なWestern Breeze1次抗体希釈液（14mlの水、4mlの希釈液A、および2mlの希釈液B）中のSignet 3F4 1次抗体溶液の1：5,000希釈液中で膜をインキュベートした。1次抗体はあらかじめグリセロール中で1：1希釈し、従ってワーキング希釈液は1：10,000であった。水を冷蔵温度で振盪台上でインキュベートした。

【0112】

1次抗体溶液を捨て、振盪台上で室温で20mlのWestern Breeze（登録商標）抗体洗浄液（18.75mlの水の中の1.25mlの抗体洗浄溶液（16×））中で、膜をそれぞれ10分間3回洗浄した。次に振盪台上で室温で20mlのWestern Breeze1次抗体希釈液中の1：10,000 AP3（KPL, Gaithersburg, MD）2次抗体中で、膜を60分間インキュベートした。2次抗体溶液を捨て、上記したようにWestern Breeze抗体洗浄液中で膜を洗浄した。次に膜を、20mlの20mM トリス塩酸、1mM MgCl₂（pH9.8）で室温で10分間洗浄した。

【0113】

化学発光法

膜を乾燥トレイに移し、5mlのWestern Breezeを前混合した化学発光基質（CDP Star（登録商標）基質、Applied Biosystems, Foster City, CA）に静かに攪拌しながら5分間浸漬した。ペーパータオルで軽く膜の水気を取り、次にシートプロテクターに入れた。次に膜をシートプロテクター中でフィルムカセット（強化スクリーンは無し）に移して室温で30分間保持し、室温で5分間オートラジオグラフィーに暴露した。

【0114】

実施例5 ヒト血漿からの内因性PrPcの結合

内因性の、PrPcをスパイクしていないヒト血漿からPrPcを除去するプリオン結合樹脂の能力を証明するために、以下の実験を行った。

【0115】

内因性PrPcのプリオン結合物質による結合のために、希釈していない新鮮なプールヒト血漿を使用した。凍結したプールヒト血漿を37℃で解凍し、0.45μmフィルターでろ過し、Sarkosylを最終濃度0.05%になるように加えた。血漿のカラムとの結合およびプリオンの検出は、本明細書の別のところに記載のように行った。

【0116】

ヒト血漿からの内因性PrPcの結合試験の結果を図1に示す。パネルAは、Sarkosylの非存在下でのビーズ溶出液中のプリオンタンパク質のウェスタンブロットによる検出結果を示す（レーン1は分子量マーカである；レーン2-Mo IgG lo；レーン3-Mo IgG med；レーン4-Mo IgG high；レーン5-正常ヒト血小板；レーン6-7-樹脂a；レーン8-9-樹脂b；レーン10-11-アミノ650-M；レーン12-13-アセチル化アミノ650）。パネルBは、パネルA中のサンプルの非結合画分のウェスタンブロットによる検出結果を示す（レーン1-分子量マーカ；レーン2-Mo IgG low；レーン3-Mo IgG med；レーン4-Mo IgG high；レーン5-正常なハムスター脳（nHB）；レーン6-正常ヒト血小板；レーン7-8-樹脂a；

レーン9～10－樹脂b；レーン11～12－アミノ650-M；レーン13～14－アセチル化アミノ650）。パネルCは、Sarkosylの存在下でのプリオンタンパク質のウェスタンブロットによる検出結果を示す（レーン1－分子量マーカー；レーン2－Mo IgG low；レーン3－Mo IgG med；レーン4－Mo IgG high；レーン5－正常なハムスター脳；レーン6－ヒト血小板；レーン7－正常ヒト血漿＋Sarkosyl、1：10；レーン8－樹脂a；レーン9－樹脂a；レーン10－樹脂b；レーン11－樹脂b；レーン12－アミノ650-1；レーン13－アミノ650-2）。パネルDは、Sarkosylの存在下でのプリオンタンパク質のウェスタンブロットによるパネルCのサンプルの非結合画分の検出結果を示す（レーン1－分子量マーカー；レーン2－Mo IgG low；レーン3－Mo IgG med；レーン4－Mo IgG high；レーン5－正常なハムスター脳；レーン6－ヒト血小板；レーン7－正常ヒト血漿＋Sarkosyl；レーン8－樹脂a；レーン9－樹脂a；レーン10－樹脂b；レーン11－樹脂b；レーン12－アミノ650-1；レーン13－アミノ650-2）。

10

【0117】

図1のパネルAのレーン10と11およびパネルCのレーン12と13において、Toyopearl（登録商標）アミノ650-M樹脂へのPrPcの結合が検出された；アセチル化によりアミノ基上の電荷を除去すると結合は無くなった（パネルAのレーン12と13の結果）。

【0118】

実験結果は、ヒト血漿からの内因性PrPcに結合する樹脂の能力を証明し、従ってヒトまたは動物から得られたサンプルのPrPの除去について、樹脂が有用であるという証拠を提供している。

20

【0119】

実施例6 血液画分からのPrPscの結合のためのスペーサーの必要性

図1に示すように、Toyopearl（登録商標）アミノ650-M樹脂はヒト血漿からの内因性PrPcに結合した。この樹脂の少なくとも一部は、Tosoh（登録商標）に独自のスペーサーアームまたは基を含有した。PrPc結合のためのスペーサーの重要性を調べた。

【0120】

4つの吸着剤同定用タンパク質単離キット（Protein Isolation Kit for Sorbent Identification；PIKSI（登録商標））カラム（それぞれ0.5mlを以下のように充填した：スペーサーの欠如したToyopearl（登録商標）アミノ650Mの実験サンプル；およびスペーサーのある市販Toyopearl（登録商標）アミノ650M樹脂のそれぞれ2つのカラム）。スペーサーの欠如したToyopearl（登録商標）アミノ650C樹脂も試験した。

30

【0121】

2mlの10%スクレーピー脳ホモジネート（SBH）を0.5%Sarkosylで処理した。3mlのSBHを297mgのワーキングバッファーに加えることによりワーキングバッファーで希釈した（1：100）Sarkosyl処理上清を用いてカラムに抗原添加した。流速0.5ml／分で供給することによりバッファーで希釈したSBHの10mlを、二重でカラムに抗原添加した。フロースルー溶液を採取し、各カラムから樹脂のアリコートを取り、10mlのワーキングバッファーで洗浄した。

【0122】

40

各サンプルの半分を、各樹脂のプロテイナーゼK消化およびバッファー中の抗原添加に付した。本明細書の別のところに記載したようにサンプルをウェスタンブロットにより試験した。結果を図2に示す（レーン1－分子量マーカー；レーン2－バッファー中の0.1% Sarkosyl処理SBH－PK；レーン3－バッファー中の0.1% Sarkosyl処理SBH＋PK；レーン4－WM；レーン5－アミノ650M（市販）－PK(1)；レーン6－アミノ650M（市販）－PK(2)；レーン7－アミノ650M（市販）＋PK(1)；レーン8－アミノ650M（市販）＋PK(2)；レーン9－アミノ650M（実験）＋PK(1)；レーン10－アミノ650M（実験）＋PK(2)；レーン11－アミノ650M（実験）＋PK(1)；レーン12－アミノ650M（実験）＋PK(2)；レーン13－アミノ650C－PK(1)；レーン14－アミノ650C－PK(2)；レーン15－アミノ650C＋PK(1)；レーン16－アミノ650C＋PK(2)）。図2に示す実験結果は、スペーサーアームの存在がアミノ650-M樹脂による

50

PrPsc結合にとって必要であることを明瞭に示している。

【0123】

実施例7 ヒト血清アルブミン(HSA)の高濃縮物の存在下でのPrPcの捕捉

種々のタンパク質を含有する治療用製品からPrPを除去する樹脂の能力を証明するために、ヒト血清アルブミンの存在下でのPrPcの結合を調べた。

【0124】

4つのBio-Rad(登録商標)カラムにToyopearl(登録商標)アミノ650Mアミノ樹脂を充填した。樹脂ベッドの高さは1cmであり、容量は0.5mlであった。カラムをワーキングバッファーで十分に洗浄した。カラムにのせたサンプルは以下の通りである：

カラムIーワーキングバッファー中の1% nHaBH(正常なハムスター脳ホモジネート)、

カラムIIーワーキングバッファー中の1% HaBH、25% HSA(Sigma)、

カラムIIIーワーキングバッファー中の1% HaBH、25% HSA(Sigma) および20mM N-Ac-Trp(Acros Organics、ベルギー)、

カラムIVー1% HaBH、アメリカ赤十字調製物(ARC prep)。

【0125】

20mMのN-Ac-Trpをワーキングバッファー中の25% HSAに、振盪し37℃で加熱しながら45分間溶解した。10% nHaBH上清は上記したように調製し、選択した物質(工程2)に1:10で希釈して1% nHaBHを得た。

【0126】

各カラムの底に4-チャンネルペリスタポンプを連結した。前工程で調製した1% nHaBHの5mlを流速0.5ml/分でカラムI~IVに流した。カラムを10mlのワーキングバッファー/カラムで流速0.5ml/分で洗浄した。樹脂を回収し、サンプルを上記したように調製し、12%ビスートリスSDS-PAGEゲルに流した。

【0127】

3F41次抗体を使用するウェスタンブロットを使用して、樹脂に捕捉されたPrPcを検出した。ブロットの写真を図3に示す(レーン1ー低濃度マウスIgG対照；レーン2ー中濃度マウスIgG対照；レーン3ーnHaBH対照；レーン4ー1% HaBHカラム；レーン5ー1% HaBH、25% HSAカラム；レーン6ー1% HaBH、25% HSA、20mM N-Ac-Trpカラム；レーン7ー1% HaBH、ARC prep カラム)。各レーンでほぼ同じ強さのバンドが見られ、Toyopearl(登録商標)650-Mアミノ樹脂が、種々の供給源から得られた25%ヒト血清アルブミンの存在下で、ハムスター脳ホモジネートからのPrPcを捕捉したことを示している。

【0128】

図3に示す実験結果は、ヒト血清アルブミンを含むサンプルからのプリオンタンパク質に結合する樹脂の能力を証明し、それにより上記樹脂は種々の治療用製品中のプリオンタンパク質に結合するのに有用でありかつ血液タンパク質が例えば安定剤または治療薬として使用され、PrPで汚染されうる治療用製品の安全性を確保するという証拠を提供する。

【0129】

実施例8 ヒト血清アルブミン中のアミノ樹脂へのPrPscの結合

アルブミンに添加した感染性PrPscの結合が以下の実験で証明された。12個のPIKSIカラム(各0.5ml)に、Toyopearl(登録商標)アミノ650M樹脂を充填した。2mlの10%SBH(スクレーピー脳ホモジネート)を0.5% Sarkosylで処理した。

【0130】

以下の6通りの抗原添加を後述するように準備した。

【0131】

1. バッファー中のSBHによる抗原添加：Sarkosyl処理上清をワーキングバッファーで希釈(1:100)し；0.22mlのSBHを22mlのワーキングバッファーに加えた。

【0132】

2. HSA(アメリカ赤十字(ARC)調製物)中のSBHによる抗原添加：Sarkosyl処理上清を25% HSAで希釈(1:100)し；0.22mlのSBHを22mlのHSA(アメリカ赤十字(ARC)調製物)に加えた。

【0133】

3. N-アセチル-DL-トリプトファンとカプリル酸を有するHSA (Sigma) 中のSBHによる抗原添加：Sarkosyl処理上清を20mM N-アセチルTrpと20mMカプリル酸を含有する25% HSAで希釈 (1:100)；アルブミンはSigmaから入手し、添加剤は含有しなかった；0.22mlのSBHを2mlのHSA溶液に加えた。

【0134】

4. N-アセチル Trpを有するHSA (Sigma) 中のSBHによる抗原添加：Sarkosyl処理上清を25% HSAで希釈 (1:100) し；0.22mlのSBHを20mM N-アセチル Trpを有する22mlのHSAに加えた。

【0135】

5. カプリル酸を有するHSA (Sigma) 中のSBHによる抗原添加：Sarkosyl処理上清を25% HSAで希釈 (1:100) し；0.22mlのSBHを20mM カプリル酸を有する22mlのHSAに加えた。

【0136】

6. HSA (Sigma) 単独中のSBHによる抗原添加：Sarkosyl処理上清を25% HSAで希釈 (1:100) し；0.22mlのSBHを22mlのHSA (Sigma) に加えた。

【0137】

各樹脂を二重測定で10mlの溶液を用いて抗原添加した。カラムをペリスタポンプを用いて0.5ml/分の流速で充填した。各カラムからの樹脂に対するフロースルー溶液を採取した。各樹脂でプロテイナーゼK消化を行い、バッファー中の抗原添加を行った。本明細書に記載の方法に従ってサンプルをウェスタンブロットに付した。ブロットは図4に記載される (パネルA：レーン1-分子量標準物質；レーン2-バッファー-PK中の0.1% Sarkosyl処理SBH；レーン3-バッファー+PK中の0.1% Sarkosyl処理SBH；レーン4-バッファー-PK(1)中のSBH；レーン5-バッファー-PK(2)中のSBH；レーン6-バッファー+PK(1)中のSBH；レーン7-バッファー+PK(2)中のSBH；レーン8-HSA (ARC調製物) -PK(1)中のSBH；レーン9-HSA (ARC調製物) -PK(2)中のSBH；レーン10-HSA (ARC調製物) +PK(1)中のSBH；レーン11-HSA (ARC調製物) +PK(2)中のSBH；レーン12-HSA (Sigma) -PK(1)中のSBH；レーン13-HSA (Sigma) -PK(2)中のSBH；レーン14-HSA (Sigma) +PK(1)中のSBH；レーン15-HSA (Sigma) +PK(2)中のSBH；パネルB：レーン1-分子量標準物質；レーン2-バッファー-PK中の0.1% Sarkosyl処理SBH；レーン3-バッファー+PK中の0.1% Sarkosyl処理SBH；レーン4-アセチルTrp-PK(1)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン5-アセチルTrp-PK(2)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン6-アセチルTrp+PK(1)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン7-アセチルTrp+PK(2)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン8-カプリル酸-PK(1)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン9-カプリル酸-PK(2)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン10-カプリル酸+PK(1)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン11-カプリル酸+PK(2)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン12-アセチルTrpとカプリル酸-PK(1)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン13-アセチルTrpとカプリル酸-PK(2)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン14-アセチルTrpとカプリル酸+PK(1)を有するHSA (Sigma) 中のSBH；レーン15-アセチルTrpとカプリル酸+PK(2)を有するHSA (Sigma) 中のSBH。

【0138】

図4に示す結果は、感染性PrPresがヒト血清アルブミンと組合せであったときにアミノ樹脂に結合できること、そして種々の添加剤は結合を妨害しないことを証明した。

【0139】

実施例9： プリオンタンパク質と結合しかつ除去する能力について、樹脂のスクリーニング

目的

本研究は、PRDT (Pathogen Removal and Detection Technologies) 社が選択した樹脂フォーマットにより得られる伝染性海綿状脳症感染性除去のレベルを評価するために実施した。樹脂に対する抗原添加は、ハムスタースクレーピー脳ホモジネートをスパイクした低白血球濃度のヒト赤血球濃縮物のユニットで行った。

【0140】

背景

伝染性海綿状脳症（TSE）感染性は、いくつかの研究室において実験および自然感染した動物の血液で実証されている。BREF/UMは、263K株のスクレーピーに感染したハムスター全血液の1ミリリットル当たり4～20 ID（感染用量）の感染性を一貫してかつ再現性良く測定している。さらに、vCJD（TSEのヒト型）の血液によるヒトからヒトへの伝染の疑われる2例が既に報じられている。これらの結果は、ヒトへの血液および血液製品によるTSE伝染の潜在的リスクについて問題を提起した。TSE作用物質は通常の病原体不活性化手順に対して耐性がありかつ感受性のある前臨床TSE診断試験が存在しないので、TSE作用物質の除去が血液によるTSE伝染に対する最も有望な解決法である。

10

【0141】

PRDTの計画は可能性をもつリガンドを化学およびペプチドライブラリーから作製する方法を用いた。上記ライブラリーをPrP^{res}結合特性を有するリガンドについて1次および2次スクリーニングを介してスクリーニングし、その際、上記PrP^{res}結合特性は樹脂に結合したタンパク質のウェスタンブロットによりおよびフロースルー溶液中のPrP^{res}のELISAアッセイにより測定した。PrP^{res}はTSE感染性に対する生化学マーカーと考えられる。これらのスクリーニングは、TSE除去に対して有望な特性をもついくつかのリガンドを同定した。本研究の目的は、これらの選択したリガンドによるTSE感染性除去のレベルを測定して、低白血球濃度の赤血球濃縮物（RBCC）からTES感染性を除去するデバイスに利用することであった。8種のPRDT樹脂を、ヒトRBCC中にスパイクしたヒト（散发性CJD）およびハムスター（スクレーピーの263K株）感染脳溶液の両方からのPrP^{res}の特異的捕捉について選択した。これらの選択した樹脂は、SYA、アミノ650M、フェニル650M、TMAE650、DVR、YVHEA、WFDEA、および(D)ES(nal)PRQ-Eacaであった。2つのネガティブ対照、アセチル化SYAおよびアセチル化アミノ650Mも含まれた。コード番号を表5に示した（この表にはアミノ酸に対する標準的略語を用いた）。広範なアセチル化酢酸無水物がプリオン結合を阻害することは以前からわかっている。

20

【表5】

樹脂コード

樹脂	コード
SYA	R1
Ac. SYA	R2
アミノ650	R3
Ac. アミノ650	R4
TMAE	R5
フェニル650M	R6
DVR	R7
YVHEA	R8
WFDEA	R9
(D)ES(nal)PRQ-Eaca	R10

30

40

【0142】

実験設計樹脂適合性

予備研究において、最初に各樹脂候補をRBCC機能と安定性に対する現行規格との適合性について試験した。全ての樹脂はRBCCについて適合性があることがわかったのでTSE感染性除去研究に用いた。一実施形態においては、PRDT樹脂を直列の2カラムを用いて試験した。各カラム（またはデバイス）はほぼ10mLの樹脂を含有した。直列のカラムを用いた理

50

論的根拠は、除去のタイプを確認して推計学的または選択的捕捉機構の間の区別をすることにあった。推計学的機構では、樹脂が飽和条件下でない限り、第2デバイスさらなる感染性を除去する。選択的機構では、第2のデバイスはさらなる感染性を除去しない。

【0143】

一実施例において、直列の2つのTMAE樹脂カラムに、1%スクレーパー脳ホモジネートをスパイクしたRBCCの1ユニットを用いて抗原添加した。TMAE樹脂を選んだ理由は入手しうることからであった。その結果は、第2カラムが第1カラムと同じだけのPrP^{res}を除去し、従って、第2カラムのフロースルー中にさらにPrP^{res}が存在しうることを示した。この結果から、第1デバイスは飽和したと結論した。各樹脂によるPrP^{res}除去のレベルをウェスタンブロットにより定量し、ウェスタンブロットの検出レベルより低いPrP^{res}除去を示す樹脂は力価測定した。

10

【0144】

一実施形態においては、全実験を1日で実施し、1つの血液プールを一度にスパイクして、試験した各PRDTリガンドに対する抗原添加に使用した。本計画は僅かな費用増加で研究効果を高めた。本研究はまた、スパイクしたRBCCの1ユニットを用いて各樹脂に抗原添加して、デバイスの実際に可能性のある最終的適用を模擬するように設計した。

【0145】

ハムスタースクレーパー脳ホモジネートをRBCC用スパイク物質として選んだ。この決定の論理的根拠は次に基づく：

- 1) ハムスタースクレーパー脳ホモジネートは高力価を有し、スパイク物質を何倍にも希釈しなければならないスパイクの研究にとって理想的であること、
- 2) ハムスターモデルは、色々なTSE株の実験モデルのなかで、潜伏時間が最も短いものの1つであること、
- 3) 選択されるリガンドは既にハムスタースクレーパー脳ホモジネートからのPrP^{res}の結合について選択されていること、および
- 4) ハムスターモデルは本発明者らの研究室においてよく確立されており、大量のスパイク物質を容易に調製できること。

20

【0146】

樹脂容量

理論的樹脂容量の計算を感染性研究後に実施した。一般に、研究に用いた樹脂は、理論的に、樹脂1グラム（膨潤樹脂4.7ml）当たり30～40mgのタンパク質と結合することができる。この容量は、抗原添加において全合計（PrP^c+PrP^{res}）と結合するように選んだものである。しかしこの容量は理想的挙動を有するタンパク質（例えば、樹脂ビーズ孔の内部／外部に分配する）に対して計算された。PrPは理想的なタンパク質でなく、抗原添加の際に界面活性剤処理後ですら、様々な次元のサイズをもつかまたは他のタンパク質と複合した凝集形態で存在する。また、PrPはビーズ孔に貫入しないで樹脂ビーズの表面と結合するだけであることも示されている。この制限にも関わらず、50mLの樹脂（組み合わせた5つのデバイスの全体積）は抗原添加物中の全PrPと結合するのに十分であることが見出された。

30

【0147】

濾過の目標流速は10mL/分であった。この流速は、1ユニットの血液を40分間で濾過する必要性から決めたものである。これらの条件下で、接触時間はほぼ1mL/分であり、これは感染性がリガンドと結合するのに十分であると考えられた。樹脂と結合したPrP^{res}のウェスタンブロットおよびELISA分析はフロースルーについて実施した。

40

【0148】

実験手順

血液プール

10ユニットのヒトRBCCをARC（オランダ研究室）にて採取し、当技術分野で公知の標準手順に従いPallフィルター上で白血球濾過を行った。バッグ中の血液は、実験前日に研究室に輸送し、一晩4℃にて冷蔵庫で保存した。実験日に、血液を大きい血液バッグ中にブ

50

ールした。全ての希釈と体積測定は重量基準で行い、RBCCの密度として1.06g/mLを用いて体積に変換した。

【0149】

スパイク調製、血液のスパイク実施および再分配

スパイクしていない血液プールのアリコートを取り出し、力価測定用連続希釈物を調製する希釈剤として使用した。PRDTスクレーパー脳ホモジネート(SBH)プールのアリコートを0.5% Sarkosylを用いて30分間氷上で処理した。そのサンプルを遠心分離し、上清「Sarkosyl処理した10%SBH」を取り出して血液プールとゆっくり混合した。スパイクの体積を血液重量に基づいて計算し、血液中の最終濃度0.1%w/vに調製した(10%SBHの1:100希釈)。スパイクした血液を注意深く混合した後、血液プールバッグを予め準備したマニホールドに結合して、スパイクした血液を10個の血液バッグにそれぞれほぼ1ユニットずつ再分配した。移動は重力により行い、充填するバッグを秤の上に置いて重量を監視した。ほぼ1ユニット重量の血液を各バッグ中に移動し、最終重量を抗原添加1として記録した。スパイクした血液のアリコートを取り出して力価測定した。

10

【0150】

濾過

スパイクしたRBCCを含有する血液バッグを予め準備した濾過装置と結合した。各濾過装置は直列の同じ樹脂(1カラム当たりほぼ10mL樹脂)の5つのカラムおよび各濾過からのフロースルーを採取する5つの血液バッグを含有する。血液バッグは吊るされ、カラムはフローに垂直に固定され、そして受器バッグはある表面上に平たく置かれた。濾過は、カラムの直ぐ上と下に置かれた2つのクランプを緩めることにより開始した。各カラムの濾過の時間を測りバッグとカラムの間の高さを記録した。カラムと受器の間の距離は全ての濾過装置に対して同じであることに注意しなければならない。いくつかの事例においては、濾過中、血液バッグとカラムの間の高さを減少するかまたは増加して流速を調節した。各カラムの濾過後に受器バッグを秤量し、フロースルーのアリコートを取り出してバッグを再び秤量し、そして次の濾過に備えた。

20

【0151】

樹脂の取出し

各濾過の後、カラムを装置の残部から取り外して傍らに置き、続いて樹脂を取り出す。バッファをゆっくりとカラム中に溜めて樹脂が出てくるのを待つと、各カラムからほぼ60mLのバッファに全10mLの樹脂を採取することができた。ほぼ3~5mLの樹脂を使い捨てクロマトグラフィカラムへ移してクエン酸バッファを用いて洗浄した。残りの樹脂は廃棄した。

30

【0152】

生化学的な特徴付け

樹脂をPrP^{res}の捕捉についてウェスタンブロットにより分析した。その結果は、SYA、アミノ650M、DVR、YVHEAおよび(D)ES(nal)PRQ-EacaがPrP^{res}を検出限界まで第2カラムによって除去したことを示した。言い換えると、第3、第4および第5カラムと結合したPrP^{res}シグナルは検出されなかった。

40

【0153】

ELISAアッセイは、パイロット試験で4種の樹脂:DVR、フェニル、アミノおよびTMAEからの5カラムのフロースルー溶液について実施した。サンプル調製の手順は次の通りであった:2容積の水の添加、2%SDS(最終濃度)の添加および100°Cにて10分間加熱(TSE不活性化手順)。ELISAに適用する前に、サンプルをアッセイバッファを用いて50倍希釈した。最終サンプル希釈は150倍であった。その結果はウェスタンブロット結果の一般的傾向と整合した。ELISA結果による最良の樹脂はアミノ樹脂、次いでDVR、TMAEおよびフェニルであった。

【0154】

力価測定

力価測定のための、樹脂およびフロースルーの選択

50

樹脂結合したPrP^{res}のウェスタンブロット結果に基づいて、5種のリガンドが第3カラム後に検出限界までPrP^{res}を除去したことを見出した。これらの5種のリガンドは、DVR、アミノ650M、SYA、YVHEAおよび(D)ES(nal)PRQ-Eacaであった。これらの5種のリガンドの感染性除去を、対照としてTMAEおよびアセチル化SYA樹脂と一緒に実施した。研究における動物の全数を減らすために、フロースルー溶液の全てを力価測定しなかった。ウェスタンブロット結果に基づいて、カラム2のPrP^{res}シグナルが強くて全PrP^{res}およびおそらくは感染性がカラム1により除去されないことを示したので、フロースルー#1は廃棄した。選ばれて試験したフロースルー溶液は2と5であった。フロースルー溶液2を選んだ理由は、全事例（対照を除く）において、カラム3がほとんどシグナルを示さず、フロースルー2における有意なPrP^{res}の濃度低下を示したからである。フロースルー溶液5を選んだ理由は、全感染性を除去する最良の機会を有するからであった。後の研究において、フロースルー溶液3および4も力価測定した。しかし、本報告は最初の感染性研究だけに関するものである。

10

【0155】

潜伏時間法による力価測定

フロースルー溶液の力価測定は潜伏時間法を用いて実施した。本方法は2つの近い力価（ 2-log_{10} 以下）の間を区別するには十分正確でないが、 3-log_{10} 以上異なる力価の感染性に対しては理想的であって、その理由は、さらに正確な終点力価測定法よりも迅速でありかつ少ない動物しか必要としないからである。本研究の目標は、 3-log_{10} 以上の感染性を除去する樹脂を選択することにあったので、潜伏時間法が正しい選択であると決定した。潜伏時間はハムスター中に接種した感染性の用量と逆比例する。この関係は感染性の用量の高さに対して直線的でありかつその直線性は低用量の感染性では低下して外れる。スパイクしなかったRBCC中に希釈されたスパイクしたRBCCプールの2つの独立した10倍希釈シリーズ（全脳に対して相対的に $10^{-3}\sim 10^{-11}$ ）を力価測定して、潜伏時間に基づく2つの用量応答曲線を作成した。

20

【0156】

動物を別けて繰返し測定し、潜伏時間値ならびに終点希釈力価の両方の統計的正当性を改善した。較正曲線から得た結果は、抗原添加（ 10^{-3} ）で開始して最高濃度として 10^{-4} 、 10^{-5} 等々のそれぞれの希釈における疾患の平均潜伏時間を決定した。同じ2つの連続希釈を用いて終点力価測定法によりスパイク物質の正確な力価を決定した。最終的な樹脂による除去は、連続希釈抗原添加の潜伏時間から実験的に得た用量応答曲線の式を用いて決定した。

30

【0157】

終点力価測定

同じ実験において、10%スクレーピー脳ホモジネートならびにSarkosyl上清を終点力価測定法により力価測定した。これらの力価測定を加えた理論的根拠は、PRDTのSBHプールの出発力価およびRBCCなしの実スパイクの力価の正確な測定値を得ることにあった。

【0158】

接種

フロースルー溶液は無希釈で接種した。2かごの動物（8ハムスター）にフロースルー溶液を、そして4かごの動物（16ハムスター）に抗原添加溶液を接種した。アミノ樹脂によるフロースルー2を4かご（16ハムスター）に接種した。独立した希釈シリーズの用量応答曲線を調製した。2かごの動物をそれぞれ、 10^{-3} で開始して 10^{-11} までの希釈（希釈は、全脳を 10^0 希釈と呼ぶ）で接種した。SBHおよびSarkosyl SBHの力価測定については、1かごの動物を $10^{-1}\sim 10^{-11}$ の希釈で接種した。

40

【0159】

体重データ

従来の研究はスクレーピーを患う動物が疾患の進行とともに体重を失うことを示していた。この判定基準を潜伏時間の終点を決定するために用いることに決めた。潜伏時間の終点は、動物がその最大体重の80%に低下する日として設定した。この方法の利点は偏りが

50

なくかつ人的誤差を受けないことにある。各動物を毎週1回、そして疾患の最初のサインが出ると毎週2回体重測定して体重を記録し、そして各動物の接種後の日数に対してプロットした。フロースルー溶液を接種した各動物と標準曲線の動物に対する最終潜伏時間は「最大の80%」の標題の最終列で合体される。「PI日数」と「最大の80%」のもとで記録された接種後日数は常に整合するわけではない、その理由は、いくつかの動物は最大体重の80%に低下した日に犠牲になるわけではなく、数日遅くなるからである。しかし、動物は目標体重に到達する前に犠牲になることはなかった。「最大の80%」列の接種後日数は体重表から決定し、動物が目標体重に到達した最初の日を示した。これらの数字の平均値および標準偏差も測定して以下の表6に示した。

【0160】

10

臨床データ

フロースルー溶液を接種した動物は接種後239日以内に死亡した。終点力価測定はまだ進行中であり、365日まで継続してSBHの正確な力価は決定する予定である。しかし、これらの残りの動物の体重測定はもう行わなかった。介入性死亡はなく、7動物は接種後最初の2週間内に血液毒性が原因で死亡した。これらの動物は最終の力価計算から除外した。

【0161】

Sarkosyl処理有りまたは無しのSBHの力価測定を、毎週2回、動物の臨床スコアリングによって動物が立ち上がれなくなるまで実施し、その時点で動物を犠牲にした。動物の症候群記録を調べてファイル化した。

20

【表6】

用量応答曲線における各希釈に対する潜伏時間

希釈 $\log_{10}$ RBCC中のSBH	(I)		(II)	
	平均	SD	平均	SD
-3	94	4.2	99	5.4
-4	105	8	104	6
-5	114	5.2	111	3.8
-6	128	9.4	117	4.8
-7	137	15	158	54
-8	227	49	182	73
-9	147	—	206.5	104
-10	151	—	0	—

30

【0162】

計算と結果

終点力価測定

SBHの力価の計算はReedおよびMuenchの方法を用いて1gの脳に対して実施した。終点力価測定法において、4データセットを作製した：標準曲線2セット、10%SBHの希釈1セットおよびSarkosyl処理後の10%SBH上清の希釈1セット。後者はRBCC中の実スパイクである。表7は力価測定結果を表にまとめものである。PRDT 10% SBHプールの力価は $10^{9.18}$ ID/mLである。Sarkosyl処理および不溶性ペレットの除去後に、力価は $10^{8.10}$ ID/mLまで低下し、ほぼ1-logの感染性（90%）が可溶性手順に関わらず遠心分離により除去されたことを示す。二重で実施した抗原添加溶液（0.1% SBH）の力価測定は完全に整合し、力価は両方とも $10^{6.72}$ ID/mLであった。この力価は、バッファーに100倍希釈して0.1%（ $10^{8.1}/100=10^{6.1}$ ）としたSarkosyl処理したSBHの計算力価より僅かに高い。何によってこの差を生じるのかは明らかでない。

40

50

【表 7】

終点希釈法による力価

	力価、 $\log_{10}$
10% SBHストック	9.18
10% SBH Sark 上清	8.10
0.1% RBCC中のSBH(I)	6.72
0.1% RBCC中のSBH(II)	6.72

【0 1 6 3】

10

潜伏時間力価測定

潜伏時間力価測定においては、希釈の $\log_{10}$ 値を用いた。用量応答曲線は、抗原添加の各希釈 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ に対する実験潜伏時間を用いて作成した。表6に報じた2つの曲線間の平均値を平均化した（表8）。

【表 8】

2曲線に対して平均化した潜伏時間

-3	96.5
-4	104.5
-5	112.5
-6	122.5
-7	148.5
-8	204.5

20

【0 1 6 4】

表8の値に最も適合した曲線を引き、それを式：

30

$$y = a + b^{(-x/c)}$$

〔式中、a、bおよびcは報じられた値をもつ定数であり、yは全脳に対する希釈であり（すなわち0.1%SBHは 10^{-3} 全脳希釈である）そしてxは潜伏時間である〕の指数曲線に対応させた。フロースルー潜伏時間の平均および標準偏差は表9に報じた。それぞれの潜伏時間に対応する希釈は上記式を用いて計算した。除去は各フロースルーの希釈と抗原添加の希釈との間の差として計算した。

【0 1 6 5】

除去結果（表9）はフロースルー2溶液が感染性の $1 - \log_{10}$ 以下を捕捉され、そしてR3FT2（アミノ650M樹脂）が最良であったことを示す。また、ネガティブ対照樹脂、R4FT2（アセチル化アミノ）は感染性を除去しない一方、R5FT2（TMAE）は感染性の $0.5 - \log$ しか除去しなかった。他方、フロースルー5は、R1、R3、R7およびR8（それぞれSYA、アミノ650M、DVRおよびYVHEA）が全て、感染性の $3 - \log_{10}$ 超を除去し、SYAが $4.2 - \log_{10}$ を除去して最良であることを示した。

40

【表 9】

TSE感染性除去

	樹脂	DPI*	SD	希釈 (log ₁₀)	除去 (log ₁₀)
	抗原応答	89	2.6	3	—
R1FT2	SYA	102	7.9	3.7	0.7
R3FT2	アミノ650M	104	4.2	4.0	1.0
R4FT2	アセチル化アミノ650M	92	3.6	3.0	0.0
R5FT2	TMAE	95	6.7	3.0	0.0
R7FT2	DVR	102	2.7	3.7	0.7
R8FT2	WFDEA	100	5.0	3.6	0.6
R10FT2	(D)ES(nal)PRQ-Eaca	98	1.4	3.3	0.3
R1FT5	SYA	151	34.1	7.2	4.2
R3FT5	アミノ650M	142	35.3	6.9	3.9
R4FT5	アセチル化アミノ650M	95	3.6	3.0	0.0
R5FT5	TMAE	99	3.5	3.4	0.4
R7FT5	DVR	130	7.7	6.4	3.4
R8FT5	YVHEA	139	27.8	6.8	3.8
R10FT5	(D)ES(nal)PRQ-Eaca	123	11.5	5.8	2.8

【0166】

* DPI = 接種後日数

結論

本研究は、有効なTSE除去についての2次スクリーニングから選択したリガンドのなかに、最良のPRDTリガンドを同定した。2次スクリーニングがPrP^{res}の捕捉と除去を実証した一方、本研究は上記リガンドがRBCC中にスパイクされた感染性を除去することを確認した。これらの樹脂は研究の目標を達成し、ほとんどのリガンドが脳由来の感染性の3-log₁₀超を除去する一方、アミノ650MおよびSYAはほぼ4-log₁₀を除去した。さらにこの除去は特異的であり、また、ネガティブ対照リガンドが感染性を除去しなかったので、大きい凝集物のサイズ排除によるものでなかった。データはまた、上記リガンドが抗原添加物中に存在する全ての感染性を除去しないことも示した。これは極く高濃度の感染性を用いて抗原添加したので、当然のことである。ReedおよびMuenchの方法により測定した力価に基づいて、樹脂を10^{6.72} ID/mLまで暴露したが、これはTSEに感染したげっ歯類モデルの血液で測定した感染性のレベル(10 ID/mL)より100,000倍高かった。

【0167】

結論として、SYA、アミノ650M、DVRおよびYVHEAは全て優れた性能を有し、そして恐らくSYAおよびアミノ650Mが僅かにより優れている。これらの樹脂は3~4-log₁₀の範囲でTSE感染性を除去した。この除去のレベルは血液から十分に全ての感染性を捕捉するものである、何故なら、1ユニットの感染した血液(ハムスターモデルにおいて)はほぼ5,000感染性用量を含有するからである。従って、もし脳中の感染性が血液中の感染性と同様であれば、PRDTのデバイスは血液から全てのTSE感染性を除去すると予想される。

【0168】

実施例 10 アミノ650Mとアミノ650Uに対する、SBHをスパイクしたバッファー、濾過血漿、および全血液中のPrP^{Sc}結合の比較

アミノ650Uはアミノ650Mを含む異なるピーズサイズの混合物であって、650Mを製造するより安価である。アミノ650Uを内因性PrP、および現在使用している全てのマトリックス

、すなわちバッファー、濾過血漿および全血液中のPrP^scと結合する能力について試験して、スパイクした全血液を用いて抗原添加したアミノ650Mとの結合と比較した。実験は、スパイクしたバッファー、血漿、および全血液中のPrP^scのアミノ650Uとの結合を比較し、かつ血漿および全血液中の内因性PrP^cのアミノ650Uとの結合を確立するように設計した。さらに、実験は、PrP^cの除去における白血球濾過の効果を定量するように設計した。

【0169】

血漿または全血液中に存在するときには、650Uまたは650Mによるプリオン除去についてシグナルの相違は見出されなかった。結局、アミノ650Uと650Mの性能は同じであった。白血球濾過により除去されたPrP^cの量は血小板および白血球中に一緒に存在するときに見積もられたよりも多かった。従って、白血球濾過は血漿由来の若干のPrP^cも捕捉する可能性があった。白血球フィルターはヒトとハムスター血漿由来のPrP^cの捕捉については異なる挙動を示すことも示されている。ハムスター血漿PrP^cが濾過されなかった一方、ヒト血漿PrP^cがフィルターにより濾過された可能性もある。最後に、2つの結果の間の相違はPrP^cと感染性の間に相関が無いことによる可能性もある。

10

【0170】

白血球濾過により除去されたPrP^cの量は血小板および白血球中に一緒にあると見積もられるよりも多かった。従って、白血球濾過は血漿由来の若干のPrP^cも捕捉する可能性があった。白血球フィルターがヒトとハムスター血漿由来のPrP^cの捕捉については異なる挙動を示すことも示されている。ハムスター血漿PrP^cが濾過されなかった一方、ヒト血漿PrP^cがフィルターにより濾過された可能性もある。最後に、2つの結果の間の相違はPrP^cと感

20

【0171】

実施例 1 1 ハムスター脳PrP^scのAMN樹脂との結合

比較結合実験を、一連の樹脂（例えば、AMN-13、14、15、16、および17、アミノ650Mおよびアミノ650U）について実施した。上記樹脂はスパイクしたバッファー、血漿、および全血液由来のPrP^scと結合した。その結果は、スパイクしたバッファーおよびスパイクした全血液の両方を用いて抗原添加したときに、全てのAMN樹脂が等しくよく結合することを実証した。さらに、AMN樹脂によるシグナルはアミノ650Mおよび650Uによるシグナルと同じであった。スパイクした血漿由来のPrPの樹脂結合を比較すると、全ての他の樹脂と比較して、アミノ650Mから若干より強いシグナルがあった。AMN樹脂のなかで、#13は弱いPrPシグナルを有すると思われたが、アミノ650Uと非常に比較しうるものである一方、#15、16、17は全てアミノ650Uより優れた性能を有した。AMN14、15、16、17樹脂の間には認めうる相違は観察されなかった。

30

【0172】

結論として、本研究は上記樹脂のなかでのより強い類似性を実証し、そして最も重要なこととして、アミノ650Mとよりも、アミノ650Uとより近い相関を示した。血漿について観察された相違は少なくとも置換レベルを低下する抗原添加が有利でありうることおよび該樹脂がアミノ650Mとより近い性能を有することを示唆した。

【0173】

実施例 1 2 樹脂包埋膜と結合したタンパク質の抽出および正常ハムスター脳ホモジネート中のPrP^cの結合の定量

40

樹脂に包埋されカレンダーされた膜を用いる新しいデバイスの開発によって、結合したタンパク質を樹脂から抽出する新手法を開発する必要が生じた。物質の取扱い、ならびに抽出液の組成、濃度および体積に変更を加えなければならなかった。実験はまた、Toyopearlアミノ650Mおよびそのアセチル化型の両方の包埋膜を用いる、新しいフォーマットにおける結合評価も行うように設計した。

【0174】

正常ハムスター脳ホモジネート（HaBH）をSarkosylを用いて処理し、そして遠心脱水した。得られる上清をワーキングバッファーまたはヒト全血液を用いて希釈し、最終濃度1%とした。スパイクした溶液50 μlを、Toyopearlアミノ650Mまたはそのアセチル化型のい

50

ずれか4mg/cm²で包埋されカレンダーされた膜の4層サンドイッチを含有する47mm Swinnex フィルターホルダー (Millipore) に通過させた。流速は0.5mL/分とし、蠕動ポンプを使用した。スパイクした溶液および膜型のそれぞれについて5mLのアリコート10件をそれぞれ採取した。スパイクしたバッファーを用いて抗原添加した両方の膜のフロースルーサンプルをELISAにより分析した。アセチル化樹脂を含有するおよびスパイクした全血液を用いて抗原添加した膜をワーキングバッファーを用いてすすぎ洗いをした。

【0175】

膜の切片 (いくつかの事例では全スタック) をSDS-PAGEサンプルバッファーかまたは99% 蟻酸のいずれかを用いて処理した。蟻酸による処理は、0.5mLの99% 蟻酸と10 μ Lの20% SDSを膜サンドイッチの4分の1に加えること、続いて液を1時間除去するためのインキュベーション、そしてSpeedVacを用いる蒸発から成った。サンプルを水を用いて15 μ Lの体積に調節し、次いで15 μ Lの2X サンプルバッファーを加えた。サンプルバッファーによる処理は、3mLの1Xサンプルバッファーを膜の完全なスタックに加えること、次いで30分間のインキュベーション、そして7分間の煮沸から成った。膜をプレスせずに溶液を収穫し、そして簡単に遠心分離して全ての樹脂を取り除いた。上記処理の変法も試験した。変法は、1mLの2Xサンプルバッファーを、2つの別の膜のスタック (フィルターの1/4に対応する) に加え、1時間インキュベートし、次いでそれらの1つだけを煮沸することから成った。もし感染性を用いるときにフィルターホルダーの解体があまりにも危険であれば、煮沸せずにサンプルバッファーによる溶出を用いてもよい。

【0176】

試験した最終条件はサンプルバッファーによる膜のセクション (1/4) のインキュベーションを行い、第1、第2、第3および第4膜との結合を立証するために抗原添加溶液と接触させることであった。次いでサンプルをSDS-PAGEゲル上に泳動させて全タンパク質を染色した。ウェスタンブロットも実施した。フィルターホルダーの空隙体積はほぼ7mLであった。抗原添加溶液を、それぞれのフィルターを通過させた後に、空気を通すと、回復した体積は全血液について45および47mLであった。スパイクしたバッファーを用いると、回復した体積は46および46mLであった。異なる抗原添加溶液を用いたときに有意差は認められなかった。

【0177】

開放した最初のフィルターホルダーは、スパイクした全血液を用いて抗原添加したアセチル化Toyopearlによる膜を含有するフィルターホルダーであった。空気の通過とバッファーによるすすぎ洗いにも関わらず、若干の血液がフィルター内部になお存在した。膜をバッファーを用いてすすぎ洗う試みの間に、樹脂の有意なロスがあり、その膜は廃棄した。

【0178】

全血液を用いて抗原添加したToyopearlアミノ650Mをもつフィルターホルダーを、余分の200mLのバッファーを用いてすすぎ洗いをした。流速は最大 (目盛り盤で999) より高かった。ホルダーを開けると、内部、とりわけ層間に若干の血液がなお存在することを認めた。また、放射状分配器により描かれた一対のセクションが洗浄中にバイパスされていることも認めた。

【0179】

膜のスタックを4分の1にカットした。断片の1つは分離された4つの層を有し、サンプルバッファーを用いて処理して、異なる層が異なる結合を有するかを研究した。他の4分の1も断片に分離して蟻酸で処理した。残りの2つの4分の1を用いて加熱有りまたは無しの処理を比較した。

【0180】

スパイクしたバッファーを用いて抗原添加した2つのフィルターを、それぞれ200mLのワーキングバッファーを用いてすすぎ洗いをした。フィルターを開放し、全スタックを小さいガラスバイアルへ移し、3mLのサンプルバッファーを加えた。

【0181】

カレンダー膜に包埋された樹脂は、カラムフォーマットの樹脂に特徴的な同じPrP結合特性を維持するように見えた。アセチル化アミノはアミノシグナルと比較して弱い膜結合PrPシグナルを示し、これは、アセチル化アミノはPrPと効率的に結合しないことおよび2つのシグナル間の差はアミノ樹脂に特異的であるという結論を支持した。一般的にこの結果は、ブレンド型であれまたは化学合成によるものであれ、50%アセチル化がPrP^{res}結合を低下させることを示した。

【0182】

実施例13 SBHスパイクした血漿および全血液からのPrP^{Sc}のD4との結合

スパイクしたバッファー、濾過血漿、および全血液由来のPrP^{res}のD4樹脂との結合と内因性PrP^CのD4との結合を比較する実験を実施した。スパイクしたRBCC (UM-R-T-SE-180603) を用いて試験したPrometicのミメチック樹脂のなかで、D4はPrP^{Sc}と最良の結合を示した。この樹脂を内因性感染性研究に使用した。スパイクした脳由来のPrP^{res}のD4との結合性能を、血漿、全血液、および対照としてのバッファーの存在のもとで試験した。この試験はまた、血漿または全血液中の内因性PrP^C単独を用いて、D4に抗原添加もした。

10

【0183】

ウェスタンブロットシグナルは、D4が血漿中および全血液にスパイクされたPrPresと結合することを示した。D4は全血液由来の内因性PrP^Cと、恐らくアミノ650Mより強く結合することが可能である。

【0184】

実施例14 色々なアセチル化処理をした樹脂によるPrP^{res}の捕捉

20

本研究は、アミノ650Mのアセチル化がPrPresとの結合に与える効果を比較した。色々なレベルのアセチル化を、(1)全アセチル化と非アセチル化樹脂のブレンドを用いて、および(2)同じビーズに対する部分的化学反応により実施した。結果は、樹脂が化学反応による20%アセチル化に耐えることができ、そしてさらにPrPと結合することを示した。さらに、アセチル化樹脂の50%混合物のブレンドもPrPと結合することができる。

【0185】

本発明の実施と試験において、本明細書に記載のものと同様または同等の方法と材料が使用できるが、適切な方法と材料を記載した。本明細書に記載のすべての刊行物、特許出願、特許、および他の引用文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、材料、方法、および実施例は単に例示のためであり、限定的ではない。

30

【0186】

前記説明は、本発明に関する種々の実施形態を説明するために提供される。本発明の範囲と精神を逸脱することなく、その実施形態と構成に種々の修飾、付加および欠失が可能であろう。

【図面の簡単な説明】

【0187】

【図1】ヒト血漿サンプルからの内因性PrP^Cの、プリオン結合物質および適切な対照との結合を示すウェスタンブロットの写真である。

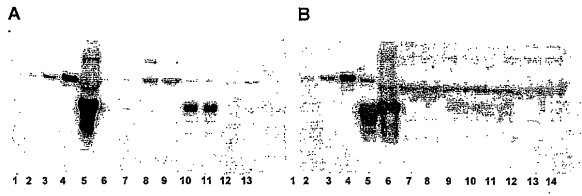
【図2】スクレーピー脳ホモジネートからのPrP^{Sc}の、プリオン結合物質および適切な対照との結合を示すウェスタンブロットの写真である。

40

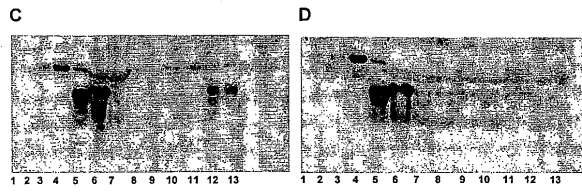
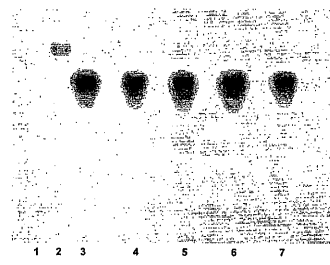
【図3】ヒト血清アルブミンおよび適切な対照を含有するサンプル中の、プリオン結合物質によるPrP^Cの捕捉を示すウェスタンブロットの写真である。

【図4】ヒト血清アルブミン中にスパイクしたPrPresの、アミノ官能基を含む樹脂を用いる除去を示すウェスタンブロットの写真である。

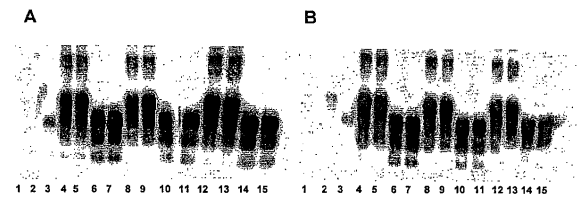
【図 1】



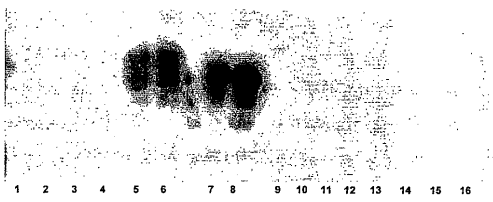
【図 3】



【図 4】



【図 2】



【配列表】

0004897689000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
- (74)代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
- (74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
- (74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
- (72)発明者 ハモンド, デヴィッド, ジョン
アメリカ合衆国 20882 メリーランド州, レイトンズビル, リップルミード コート 49
16
- (72)発明者 カーボネル, ルーベン, ジー.
アメリカ合衆国 27612 ノースカロライナ州, ローリー, ゴッドフレイ ドライブ 610
5
- (72)発明者 シェン, ホングルー
アメリカ合衆国 27603 ノースカロライナ州, ローリー, アルダー リッジ レーン 26
16
- (72)発明者 グーゲル, パトリック, ブイ.
アメリカ合衆国 27606 ノースカロライナ州, ローリー, アイリーン ドライブ 3133
- (72)発明者 ウィルツシャーライリー, ビタローズ
アメリカ合衆国 27616 ノースカロライナ州, ローリー, マラトン レーン 4716
- (72)発明者 バートン, スティーブン, ジェイ.
イギリス国 シービー3 7エイチビー ケンブリッジ, リトル エバースデン, ハールトン ロ
ード 23

審査官 廣田 健介

- (56)参考文献 特表2003-530554 (JP, A)
特表2004-518966 (JP, A)
特表2005-522712 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

G01N 30/00-30/96

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)