

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号
特表2004-509858
(P2004-509858A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

| | | |
|---------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| CO7K 16/18 | CO7K 16/18 ZNA | 2GO45 |
| C12N 15/09 | GO1N 33/53 D | 4BO24 |
| GO1N 33/53 | C12N 15/00 A | 4HO45 |
| // GO1N 33/483 | GO1N 33/483 C | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 111 頁)

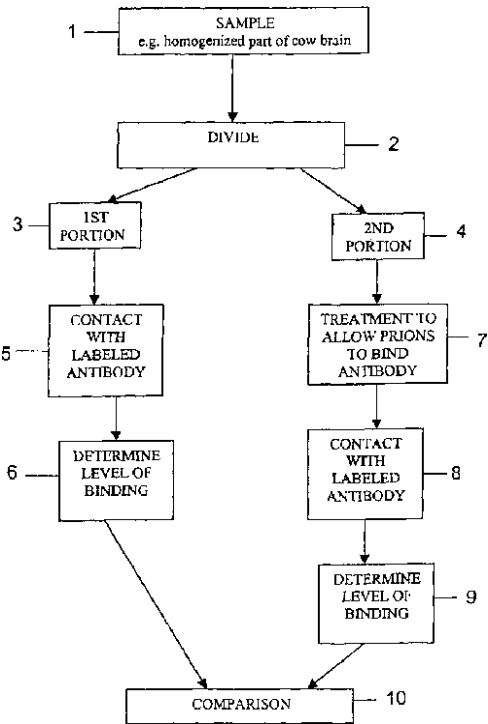
| | |
|--|---|
| (21) 出願番号 特願2002-516054 (P2002-516054) | (71) 出願人 500210903 ザ、リージェンツ、オブ、ザ、ユニバーシ ティ、オブ、カリフォルニア THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIF ORNIA アメリカ合衆国、カリフォルニア 946 07、オークランド、フランクリン・スト リート 1111、トゥエルフス・フロア |
| (86) (22) 出願日 平成13年7月17日 (2001.7.17) | |
| (85) 翻訳文提出日 平成15年1月27日 (2003.1.27) | |
| (86) 国際出願番号 PCT/US2001/022648 | |
| (87) 国際公開番号 W02002/010335 | |
| (87) 国際公開日 平成14年2月7日 (2002.2.7) | |
| (31) 優先権主張番号 09/627, 218 | |
| (32) 優先日 平成12年7月27日 (2000.7.27) | |
| (33) 優先権主張国 米国 (US) | (71) 出願人 399038620 ザ スクリプス リサーチ インスティテ ュート アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ジョラ ノース トリー パインズ ロー ド 10550 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有蹄類 PrP に特異的な抗体

(57) 【要約】

本発明は、インサイチューで天然の有蹄類 PrP C および / または変性した有蹄類 PrP S c に高度の結合親和性で特異的に結合するが、インサイチューで天然の有蹄類 PrP S c に結合しない抗体を提供する。好ましい抗体は、天然のウシ PrP C および処理された PrP S c に結合するが、インサイチューで天然のウシ PrP S c に結合せず、試料が感染性プリオン (すなわち、病原性 PrP S c) に感染しているかどうかを判定するアッセイ法において使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インサイチューで天然の有蹄類 P r P C に優先的に結合できる抗体。

【請求項 2】

乳牛、シカ、ヒツジ、エルク、ウマ、クーズー、ヤギ、ラクダ、およびブタからなる群より選択される有蹄類の天然 P r P C に特異的に結合する、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

抗体が、変性した有蹄類 P r P S c に 10^7 1 / モル以上の結合親和性 K a で結合し、天然の有蹄類 P r P S c に対する結合親和性が 10^6 1 / モル以下の K a である、請求項 1 記載の抗体。

10

【請求項 4】

変性した有蹄類 P r P S c に 10^8 1 / モル以上の結合親和性 K a で結合し、インサイチューで天然の有蹄類 P r P S c には結合しない、請求項 3 記載の抗体。

【請求項 5】

単一の有蹄類種の P r P C に特異的に結合し、該単一有蹄類種の天然 P r P S c にインサイチューで結合しない、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 6】

複数の有蹄類種の P r P C に結合することができ、該複数有蹄類種の天然 P r P S c にインサイチューで結合しない、請求項 1 記載の抗体。

【請求項 7】

以下の段階を含む方法によって生産される、天然の有蹄類 P r P C に特異的に結合する抗体：

ファージ上に抗体ライブラリーを合成する段階；

ファージと、有蹄類 P r P タンパク質を含む組成物を接触させることによって、試料に対してライブラリーをパニングする段階；

天然の有蹄類 P r P C に結合するファージを単離する段階。

【請求項 8】

方法が、単離されたファージを解析して P r P C が結合するアミノ酸配列をコードする配列を決定する段階をさらに含む、請求項 7 記載の抗体。

【請求項 9】

ファージ上の抗体ライブラリーが以下の段階によって調製される、請求項 7 記載の抗体：

免疫応答を生じさせるために、宿主哺乳動物を P r P タンパク質で免疫する段階；

抗体産生を担っている細胞を該宿主哺乳動物から抽出する段階；

宿主哺乳動物の該細胞から R N A を単離する段階；

該 R N A を逆転写して c D N A を生成する段階；

プライマーを用いて該 c D N A を増幅する段階；

抗体がファージ上で発現するように、該 c D N A をファージディスプレイベクターに挿入する段階；および

リボソームに分散させた抗原に対する抗体をパニングする段階。

【請求項 10】

リボソームに分散させた抗原が、P r P S c では入手できない P r P C エピトープをコードするペプチドである、請求項 9 記載の抗体。

【請求項 11】

以下の段階を含む、供給源における有蹄類 P r P S c を検出する方法：

P r P S c を含むと推測される有蹄類試料を、試料中の P r P C を除去するために酵素で処理する段階；

試料中の任意の P r P S c を変性させるように試料をさらに処理する段階；

P r P S c を含むと推測される試料と、試料中の変性した P r P S c に特異的に結合する診断上有効な量の抗体を接触させる段階；および

抗体が試料中の任意の物質に特異的に結合するか否かを判定する段階。

20

30

40

50

【請求項 12】

有蹄類が乳牛である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

支持体表面と該支持体表面に結合した抗体とを含むアッセイ法であって、該抗体が 10^7 l / モル以上の結合親和性で変性した有蹄類 PrPSc に結合できる、アッセイ法。

【請求項 14】

抗体が、流動性を有する液体試料中で、50% 以上の変性した有蹄類 PrPSc に結合できる、請求項 13 記載のアッセイ法。

【請求項 15】

複数の異なる抗体が支持体表面に結合しており、各抗体が、PrPSc に対して 10^7 l / モル以上の K_a を有する、請求項 13 記載のアッセイ法。 10

【請求項 16】

有蹄類におけるプリオンを検出する方法であって、
有蹄類から組織を抽出する段階；
試料を第 1 の部分と第 2 の部分とに分割する段階；
第 1 の部分と、インサイチューで天然の有蹄類 PrPC に優先的に結合する抗体を接触させて、第 1 の PrP 濃度を決定する段階；
第 2 の部分に存在する PrPSc を変性させるため第 2 の部分进行处理する段階；および
変性した第 2 の部分と、インサイチューで天然の有蹄類 PrPC に優先的に結合する抗体を接触させて、第 2 の PrP 濃度を決定する段階、を含み、 20
該試料中の PrPSc の存在が第 2 の濃度から第 1 の濃度を差し引くことによって検出され、第 2 の PrP 濃度に及ぼす処理の影響が考慮される、方法。

【請求項 17】

組織が脳組織であり、乳牛から抽出される、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

以下の段階を含む、有蹄類に由来する試料中の PrPSc の存在を判定する方法：
試料の第 1 の部分と、インサイチューで天然の PrPC に優先的に結合する抗体を接触させる段階；
抗体に対する任意の PrPSc の結合親和性を高めるように試料の第 2 の部分进行处理する段階； 30
試料の処理された第 2 の部分と抗体を接触させて、第 2 の濃度を決定する段階；
第 2 の濃度を調整して、調整された濃度を得る段階であって、この調整によって、処理の結果として生じた、抗体に対する試料中の任意の PrPC の増大した親和性が補正される段階；および
第 1 の濃度と調整された濃度とを比較して、試料中の PrPSc の存在を判定する段階。

【請求項 19】

試料が、疾患の症状を示していない動物から得られる、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

第 1 の濃度および第 2 の濃度が、時間分解解離強化蛍光 (time-resolved, dissociation-enhanced fluorescence) を用いて決定される、請求項 18 記載の方法。 40

【請求項 21】

PrPSc が 1×10^3 粒子 / ml 以下の濃度で試料中に存在する、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

処理する段階が、試料中の任意の PrPSc の少なくとも 2% を、抗体に結合する形態に変換するのに十分な、熱、圧力、および化学的変性からなる群より選択される処理に試料を供する段階を含む、請求項 18 記載の方法。

【請求項 23】

以下の段階を含む、試料中の PrPSc の存在を判定する方法： 50

試料中の任意の P r P S c を、インサイチューで有蹄類 P r P C に結合する抗体に対する親和性を有する結合構造に変換するように、試料を処理する段階；
処理された試料と抗体を接触させて、濃度を決定する段階；
濃度を調整して、調整された濃度を得る段階であって、この調整によって、処理の結果として生じる抗体に対する試料中の P r P C の増大した親和性が補正される段階；および調整された第 1 の濃度と、対照濃度および予め決められた標準濃度からなる群より選択される既知濃度を比較して、P r P S c の存在を判定する段階。

【請求項 2 4】

濃度がフローサイトメトリーを用いて決定される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

調整された濃度が、処理された非感染対照試料から決定された既知濃度と比較される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】

調整された濃度が、非感染集団に由来する処理された試料から予め決定された既知濃度と比較される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 7】

P r P S c が 1×10^3 タンパク質分子 / m l 以下の濃度で試料中に存在し、P r P C が 1×10^6 タンパク質分子 / m l 以上の濃度で試料中に存在する、請求項 2 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、抗体、抗体を入手する方法、およびこのような抗体を使用するためのアッセイ法に関する。より具体的には、本発明は、有蹄類 P r P 抗体、有蹄類に由来する P r P の天然に生じる形態に特異的に結合する抗体を入手する方法、および、乳牛などの有蹄類における感染性プリオンの存在を検出するために抗体を使用するアッセイ法に関する。

【0002】

発明の背景

プリオンは、ヒトおよび動物において中枢神経系海綿状脳症を引き起こす感染性病原体である。プリオンは、細菌、ウイルス、およびウイロイドとは異なる。プリオンタンパク質の感染には核酸成分が必要でなということが、現在、最も有力な仮説である。さらに、動物のある種（例えば、ヒト）に感染するプリオンは、別の種（例えば、マウス）に容易に感染しない。

【0003】

プリオンおよびプリオンが引き起こす疾患の研究における大きな一歩は、プリオンタンパク質（「P r P」）と呼ばれるタンパク質の発見および精製であった（ボルトン（B o l t o n）ら（1982），S c i e n c e 218：1309 - 11；プルシナー（P r u s i n e r）ら（1982），B i o c h e m i s t r y 21：6942 - 50；マッキンレー（M c K i n l e y）ら（1983），C e l l 35：57 - 62）。その後、完全なプリオンタンパク質コード遺伝子のクローニング、配列決定、およびトランスジェニック動物における発現がなされた。P r P C はシングルコピー宿主遺伝子にコードされ（バスラー（B a s l e r）ら（1986），C e l l 46：417 - 28）、通常、ニューロンの外表面に見出される。プリオン病は、P r P S c と呼ばれる変形への P r P C の変換によって生じることが有力な仮説である。

【0004】

P r P S c は、動物およびヒトの伝達性神経変性疾患の伝染および発病に必要であるように思われる。プルシナー，S . B .（1991），S c i e n c e 252：1515 - 1522を参照のこと。最も一般的な動物のプリオン病は、ヒツジおよびヤギのスクレイピーならびにウシのウシ海綿状脳症（B S E）である（ウィレスミス（W i l e s m i t h），J . およびウェルズ（W e l l s）（1991），M i c r o b i o l . I m m u

10

20

30

40

50

no1.172:21-38)。4つのヒトプリオン病が特定されている：(1)クールー、(2)クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、(3)ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病(GSS)、および致死性家族性不眠症(FFI)(ガジュセック(Gajdusek), D.C., (1977) Science 197:943-960; メドリ(Medori)ら(1992), N. Engl. J. Med. 326:444-449)。当初、散发性疾患、遺伝性疾患、および感染性疾患としてのヒトプリオン病の発表が難問を投げかけたが、これは後にPrPの細胞遺伝性起源によって説明された。

【0005】

BSEは、特に英国における重大な社会経済学的問題でもある。175,000匹以上のウシ(主に乳牛)が過去数十年にわたりBSEで死んだ。30ヶ月にわたって殺されたウシに対する英国政府によって実施された試験は、試験された749,631匹の約0.3%すなわち2249匹のウシが、表面的な症状がなくてもBSEにかかっていた可能性があることを示唆している。1996年3月27日、欧州連合(EU)は、英国産のウシ製品(生きたウシ動物;その精液および胚;英国において解体処理されたウシ動物の肉;動物試料またはヒトの食物連鎖に入る恐れのある、英国において解体処理されたウシ動物から得られた製品;医薬品、化粧品、または薬学的製品に使用する予定になっている材料;ならびに哺乳動物由来の肉および骨粉を含む)の輸出を禁止した。この禁止は、課せられてから英国の農業に15億ポンドを超える損害を与え、多くの農家を破産させた。禁止は1999年8月1日に解かれたが、フランスおよびドイツは依然としてEUの決定に反して英国産のウシ製品の輸入を禁止している。

【0006】

ウシプリオンが変異型クロイツフェルト-ヤコブ病(nvCJD)を発症した人間に伝染した可能性によって、BSEを検出する重要性が高まっている(G.チャゾト(Chazot)ら(1996), Lancet 347:1181; R.G.ウィル(Will)ら(1996), Lancet 347:921-925)。初期の研究によって、スクレイビー感染性を失うことなくPrPScのN末端を切断することができ(S.B.ブルシナーら(1982), Biochemistry 21:6942-6950; S.B.ブルシナーら(1984), Cell 38:127-134)、相応して、PrPScのN末端が切り取られているものは依然としてPrPScへの変換を可能にすることが明らかになった(M.ロガース(Rogers)ら(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3182-3186)。ウシからヒトへnvCJDが伝染しうることがインビボ試験によって確かめられており、これは、記録に残されている「種の壁」がこの新たな株と関係があるという励ましとなる推測を、米国立科学アカデミー紀要の12月20日号が揺るがしていることを示唆している(M.R.スコット(Scott)ら(1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15137-15142)。

【0007】

ヒトまたは動物の組織にPrPScが存在することはプリオンに感染したことを示している。PrPScはプリオン感染の不変成分であり、臨床的に罹患した動物およびヒトの脳におけるイムノアッセイ法によって容易に検出することができる唯一の疾患特異的診断マーカーである(メイヤー(Meyer)ら(1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3693-7; セルバン(Serban)ら(1990), Neurology, 40:110-117; トラボウロス(Taraboulos)ら(1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7620-7624; グラスホール(Grathwohl), K.U.D., M.ホリウチ(Horiuchi)ら(1997), Virol. Methods 64:205-216)。残念なことに、PrPScアッセイ法はプリオン力価が高い時だけしか陽性でなく、その一方で、低濃度のPrPScの検出が問題となっていた。高濃度のPrPCの存在下で低濃度のPrPScを測定することも難しいことが分かっている。

【0008】

10

20

30

40

50

世界中のウシの集団および英国における罹患したウシの集団に及ぼす B S E の潜在的な影響の巨大さを考えると、ウシの集団を保護するために B S E に感染した乳牛を評価する方法が大いに必要とされる。ヒトの集団に対する潜在的な健康上のリスクを考えると、ウシプリオンを検出するより感度の高い方法が緊急に必要とされる。

【 0 0 0 9 】

発明の概要

本発明は、高度の親和性および特異性で、天然の有蹄類 P r P C および / または変性した有蹄類 P r P S c に特異的に結合する抗体を提供する。この抗体は、天然の有蹄類 P r P S c に結合する必要はない。抗体はまた高度に特異的である (すなわち、試料 (例えば、ホモジネートされた有蹄類 (特に、ウシ) 脳組織の天然環境) に存在すると予想される他のタンパク質および / または他の分子に結合しない)。抗体は非常に多くの適用において有用であり、特に、有蹄類におけるプリオン感染の決定に有用である。抗体は、以下の特徴の一つまたは複数を特徴とする: (1) 天然の P r P C および変性した P r P S c に特異的に結合できること、(2) プリオンタンパク質が処理 (例えば、変性) されている場合には、インサイチューで (すなわち細胞培養物中の P r P S c にのみ結合する)、またはインビボで P r P C もしくは変性した P r P S c に結合できること。好ましい抗体は、(3) 哺乳動物のただ一つの特異的な種の P r P C タンパク質に結合する (例えば、ウシ P r P C に結合するが他の哺乳動物の P r P C には結合しない) 能力によってさらに特徴付けられる。抗体は、(4) 天然の P r P S c に結合しないこと、および (5) 比較的高度の結合親和性で天然の P r P C に結合することによりさらに特徴付けられる。

10

20

【 0 0 1 0 】

重要な目的は、有蹄類 P r P C の天然の形態に結合する抗体を提供することがである。

【 0 0 1 1 】

別の目的は、動物のある特異的な種の P r P C (例えば、ウシ P r P C) のエピトープに特異的に結合し、他の動物種の P r P C (例えば、マウス P r P C) に結合しない抗体を提供することである。

【 0 0 1 2 】

さらに別の目的は、有蹄類の一つまたは複数の種に由来する一つまたは複数のタイプの P r P C タンパク質に結合できることを特徴とする広範囲の特異的抗体を作成することが可能な特異的な方法を提供することである。

30

【 0 0 1 3 】

本発明の別の目的は、本発明の抗体を用いて、有蹄類における P r P S c を検出するためのアッセイ法を提供することである。

【 0 0 1 4 】

本発明の利点は、有蹄類試料における P r P S c の存在を検出するための、迅速で効率的かつ費用対効果が大きいアッセイ法を提供することである。

【 0 0 1 5 】

特異的な利点は、前記のアッセイ法が、製品 (例えば、(天然供給源由来の) 医薬品、食品、化粧品、またはこのようなプリオンを含む可能性のある任意の材料) にプリオン (すなわち、P r P S c) が存在するかどうかのスクリーニングとして使用することができ、それによって、このような製品の安全性に関するさらなる保障が得られることである。

40

【 0 0 1 6 】

別の利点は、前記の抗体が P r P S c を変性する化合物と共に使用することができ、それによって、試料中の P r P C 濃度と P r P C + P r P S c 濃度を区別する手段が得られることである。

【 0 0 1 7 】

本発明の特徴は、好ましくは、抗体の作成においてファージディスプレイライブラリーを使用することである。

【 0 0 1 8 】

本発明の別の特徴は、ファージが、その表面上に抗体の特異的結合タンパク質を発現する

50

ように遺伝子操作されていることである。

【0019】

本発明の一面は、有蹄類および特に乳牛におけるプリオン病を予防および治療する治療用抗体を提供することである。

【0020】

本発明の別の局面は、ある特定の製品がプリオンを含まないと証明する手段を提供することである。

【0021】

以下にさらに詳細に説明されるキメラ遺伝子、アッセイ法、およびトランスジェニックマウスの詳しい内容を読むことにより、本発明のこれらのおよび他の局面、目的、利点、および特徴は当業者に明らかになると思われる。

【0022】

好ましい態様の詳細な説明

本発明の抗体、このような抗体を生成および使用するためのアッセイ法および方法が開示および説明される前に、本発明は、特定の抗体、アッセイ法、または方法それ自体に限定されず、もちろん変更してもよいことが理解されるべきである。本明細書で用いられる用語は特定の態様だけを説明する目的で用いられ、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本発明を限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

【0023】

特に指示のない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、本明細書で説明されるものと同様のまたは等価な任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法および材料について今から説明する。方法および/または材料を開示および説明するために、本明細書に記載の全ての刊行物が参照として本明細書に組み入れられ、方法および/または材料に関連して刊行物が引用されている

【0024】

定義

「PrPタンパク質」、「PrP」などの用語は本明細書で同義に用いられ、ヒトおよび動物において疾患（海綿状脳症）を引き起こすことが知られている感染粒子形態のPrP^{Sc}と、適切な条件下でPrP^{Sc}感染形態に変換される非感染形態のPrP^Cの両方を意味するものとする。

【0025】

「プリオン」、「プリオンタンパク質」、および「PrP^{Sc}タンパク質」などの用語は、PrPタンパク質の感染性PrP^{Sc}形態を指すために本明細書で同義に用いられ、「タンパク質 (protein)」と「感染 (infection)」という言葉の短縮形であり、この粒子は、限定しないが主として、PrP遺伝子によりコードされるPrP^{Sc}分子からなる。プリオンは、細菌、ウイルス、およびウイロイドとは異なる。既知のプリオンとして、動物に感染してヒツジおよびヤギの神経系伝達性変性疾患であるスクレイビー、ウシ海綿状脳症 (BSE) すなわち狂牛病、ならびにシカおよびエルクの慢性消耗病 (CWD) を引き起こすものが挙げられる。ヒトに罹患することが知られている4つのプリオン病は、(1) クルー、(2) クロイツフェルト-ヤコブ病 (CJD)、(3) ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病 (GSS)、および(4) 致死性家族性不眠症 (FFI) である。本明細書で使用する「プリオン」は、使用される任意の動物、特にヒトおよび家畜において、これらの疾患または他の疾患の全てまたはいずれかを引き起こす全形態のプリオンを含む。

【0026】

「PrP遺伝子」という用語は、副題「病原性変異および多型 (Pathogenic Mutations and Polymorphisms)」で本明細書に列挙されるものなどの多型および変異を有するタンパク質を含むPrP^Cタンパク質を発現する遺伝

物質を述べるために本明細書で用いられる。「PrP遺伝子」という用語は、一般的に、任意の形態のプリオンタンパク質をコードする任意の種の任意の遺伝子を意味する。一般に知られているいくつかのPrP配列が、このような配列を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる、ガブリエル (Gabriel) ら (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9097-9101に記載されている。PrP遺伝子は、本明細書で述べられる「宿主」および「試験」動物を含む任意の動物ならびにその任意および全ての多型および変異に由来してよく、この用語は、まだ発見されていない他のPrP遺伝子を含むことが理解される。このような遺伝子により発現されるタンパク質は、PrPC (非疾患) 形態またはPrPSc (疾患) 形態のいずれをもとることができる。

10

【0027】

「標準化プリオン調製物」、「プリオン調製物」、「調製物」などの用語は、プリオン (PrPSc) を含む組成物を述べるために本明細書で同義に用いられる。この組成物は、プリオンに関連する実質的に同じ遺伝物質を含む哺乳動物の脳組織 (例えば、プリオン病の徴候を示す一組の哺乳動物からの脳組織) から得られる。この哺乳動物は、(1) 本明細書に記載のトランスジーンを含むか、(2) 切除された内因性プリオンタンパク質遺伝子を有するか、(3) 遺伝的に異なる種に由来する高コピー数のプリオンタンパク質遺伝子を有するか、または(4) 切除された内因性プリオンタンパク質遺伝子と、遺伝的に異なる種に由来するプリオンタンパク質遺伝子とのハイブリッドである。標準化プリオン調製物が得られる哺乳動物は、プリオン接種の結果として、および/または遺伝子組換えされた構造 (例えば、高コピー数のプリオンタンパク質遺伝子) による疾患を発症したために、CNS機能障害の臨床徴候を示す。

20

【0028】

「人工PrP遺伝子」という用語は、用語「キメラPrP遺伝子」、ならびに宿主動物 (例えば、マウス) ゲノムに組み込まれた時に、遺伝的に異なる試験哺乳動物 (例えば、ヒト、ウシ、またはヒツジ) にしか天然では感染しないプリオンに哺乳動物を感染しやすくする他の組換えによって構築された遺伝子を含むために本明細書で用いられる。一般的に、人工遺伝子は、天然配列の一つまたは複数の (全てとは限らないが、一般的に40未満の) コドンが遺伝的に変化し、異なるコドン (好ましくは、遺伝的に異なる哺乳動物 (例えば、乳牛) の対応するコドン) で置換されている哺乳動物PrP遺伝子のコドン配列を含む。遺伝的に変化した哺乳動物は、試料を、遺伝的に異なる哺乳動物にしか感染しないプリオンについてアッセイするのに使用することができる。人工遺伝子の例は、同じ関連位置で、マウスコドンが、乳牛、ヒツジなどに由来する一つまたは複数の異なる置換コドンで置換されているマウスPrP遺伝子である (但し、全てのマウスコドンが、異なるヒト、乳牛、またはヒツジのコドンで置換されているとは限らない)。人工PrP遺伝子は遺伝的に異なる動物のコドンを含むだけでなく、どの天然のPrP遺伝子とも関連しないが、動物に挿入された時に、動物を、通常、遺伝的に異なる動物にしか感染しないプリオンに感染しやすくする、コドンおよびコドン配列を含んでもよい。

30

【0029】

「キメラ遺伝子」、「キメラPrP遺伝子」、「キメラプリオンタンパク質遺伝子」などの用語は、宿主動物 (例えば、マウス) のコドン (このコドンの一つまたは複数の遺伝的に異なる試験動物 (例えば、乳牛またはヒツジ) に由来する対応するコドンで置換されている) を含む人工的に構築された遺伝子を表すために本明細書で同義に用いられる。1つの特定の例において、キメラ遺伝子は、ある宿主哺乳動物種 (例えば、マウス) のPrP遺伝子の開始配列および終結配列 (すなわち、N末端コドンおよびC末端コドン) からなり、第2の種の試験哺乳動物 (例えば、乳牛) のPrP遺伝子の対応する部分のヌクレオチド配列も含む。キメラ遺伝子は、宿主哺乳動物種のゲノムに挿入された時に、その哺乳動物を、通常、第2の種の哺乳動物にしか感染しないプリオンに感染しやすくする。本明細書で開示される好ましいキメラ遺伝子は、マウスPrP遺伝子の開始配列および終結配列ならびに対応するウシ配列で置換された非末端配列領域を含むMBo2Mである。ウシ

40

50

配列は、発現されるタンパク質が9つの残基で異なる点でマウスPrP遺伝子とは異なる（図2を参照のこと）。MBo2MPrPは、同様のキメラPrPトランスジェンについて以前に述べられたように構築され（スコット（Scott），M．，D．グロス（Groth）ら（1993），Cell 73：979 - 988）、MoPrPに8個のウシ置換：97、109、138、143、145、155、184、および186がなされた（位置番号はHuPrP配列に対応する）。

【0030】

「プリオン関連遺伝物質」という用語は、動物がプリオン感染性になる能力をもたらす任意の遺伝物質をカバーすることが意図される。従って、この用語は、本明細書で定義される任意の「PrP遺伝子」、「人工PrP遺伝子」、「キメラPrP遺伝子」または「切除されたPrP遺伝子」、ならびに動物がプリオン感染性になる能力をもたらす、これらの遺伝子が改変されたものを含む。標準化プリオン調製物は複数の動物を用いて生成され、これらの動物は全て、動物の全てが同じタイプのプリオンに感染し、ほぼ同時に感染の兆候を示すように、実質的に同じプリオン関連遺伝物質を有する。

10

【0031】

「宿主動物」および「宿主哺乳動物」という用語は、天然には動物に存在しない遺伝物質を含むように遺伝的および人工的に操作されたゲノムを有する動物を述べるために用いられる。例えば、宿主動物として、PrP遺伝子が切除された（すなわち、機能しなくなった）マウス、ハムスター、およびラットが挙げられる。抗体を産生するために宿主にプリオンタンパク質が接種され、抗体を産生する細胞は、ファージライブラリーを作成するための遺伝物質供給源になり得る。他の宿主動物は天然の（PrP）遺伝子を有してもよく、人工遺伝子の挿入または遺伝的に異なる試験動物の天然のPrP遺伝子の挿入によって変えられた遺伝子を有してもよい。

20

【0032】

「試験動物」および「試験哺乳動物」という用語は、宿主動物のPrP遺伝子と試験動物のPrP遺伝子とが異なる点で宿主動物とは遺伝的に異なる動物を述べるために用いられる。試験動物は、ある特定の試料が、試験動物に感染する能力を有するプリオンを含むかどうかを確かめるためにアッセイ法試験の実施が望まれる任意の動物でよい。例えば、試験動物は、様々な有蹄類プリオンに感染する任意の有蹄類でも哺乳動物（ヒト、乳牛、ヒツジ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、またはニワトリを含む）でもよく、ある特定の試料が、通常、試験動物にしか感染しないプリオンを含むかどうかの確認が望まれる。

30

【0033】

「遺伝的に異なる動物」および「遺伝的に異なる哺乳動物」という用語は、17個以上のコドン、好ましくは20個以上のコドン、最も好ましくは28～40個のコドンで、遺伝的に異なる試験動物と異なる宿主動物の天然のPrPコドン配列を含む動物を述べるために本明細書で用いられる。従って、マウスPrP遺伝子は、乳牛またはヒツジのPrP遺伝子に関して遺伝的に異なるが、ハムスターのPrP遺伝子に関して遺伝的に異なるない。

【0034】

「切除されたPrPタンパク質遺伝子」、「破壊されたPrP遺伝子」などの用語は、遺伝子が機能しなくなるように変化した（例えば、ヌクレオチドが付加および／または除去された）内因性PrP遺伝子を表すために本明細書で同義に用いられる。非機能PrP遺伝子の例およびこのような遺伝子を作成する方法は、ブエラー（Bueler），H．，ら（1992），Nature 356，577 - 582およびワイズマン（Weissman）（国際公開公報第93/10227号）に開示される。遺伝子を切除する方法はチャペチ（Capecci）（1987），Cell 51：503 - 512に開示される。これらの全てが参照として本明細書に組み入れられる。好ましくは、遺伝子の両対立遺伝子が破壊される。

40

【0035】

「ハイブリッド動物」、「トランスジェニックハイブリッド動物」などの用語は、切除さ

50

れた内因性プリオンタンパク質遺伝子を有する第1の動物と、(1)キメラ遺伝子もしくは人工PrP遺伝子または(2)遺伝的に異なる動物のPrP遺伝子のいずれかを含む第2の動物を交雑することによって得られた動物を表すために本明細書で同義に用いられる。例えば、ハイブリッドマウスは、切除されたマウス遺伝子を有するマウスと、(1)ウシもしくは他の有蹄類PrP遺伝子(高コピー数で存在してもよい)または(2)キメラマウス/有蹄類PrP遺伝子を含むマウスを交雑することによって得られる。用語「ハイブリッド」は、ハイブリッドの任意の子孫(結果として生じる子孫が、通常、遺伝的に異なる種にしか感染しないプリオンに感染しやすくなれば、2匹のハイブリッドの同系交配子孫を含む)を含む。ハイブリッド動物にプリオンを接種し、この動物を、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作成するための細胞供給源にすることができる。 10

【0036】

「感染しやすい」および「プリオンに感染しやすい」などの用語は、通常、遺伝的に異なる試験動物にしか感染しないプリオンを接種した場合に、疾患を発症するトランスジェニックまたはハイブリッド試験動物を述べるために本明細書で同義に用いられる。この用語は、キメラPrP遺伝子があればウシプリオンに感染しないが、キメラ遺伝子があるとウシプリオンに感染しやすいトランスジェニックまたはハイブリッド動物(例えば、トランスジェニックマウスTg(MBo2M))を述べるために用いられる。

【0037】

本明細書で使用する「有蹄類」という用語は、ひづめのある任意の哺乳動物を意味する。 20
有蹄類として、乳牛、シカ、エルク、ヒツジ、およびヤギが挙げられるが、これに限定されない。本発明に好ましい有蹄類は乳牛である。

【0038】

「抗体」とは、抗原に結合することができる免疫グロブリンタンパク質を意味する。本明細書で使用する抗体は、抗体全体ならびに関心対象のエピトープ、抗原、または抗原断片に結合することができる任意の抗体断片(例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv)を含むことが意図される。

【0039】

本発明の抗体は、有蹄類PrPCタンパク質に対して免疫反応性または免疫特異的であり、従って、有蹄類PrPCタンパク質に特異的かつ選択的に結合する。天然または天然のPrPCに対して免疫反応性または免疫特異的な抗体が好ましい。PrPCに対する抗体は、好ましくは免疫特異的である(すなわち、関連物質と実質的に交差反応しない)。用語「抗体」は全てのタイプの抗体(例えば、モノクローナル)を含むが、本発明の抗体は、好ましくは、本明細書に記載のファージディスプレイ法を用いて生成される。 30

【0040】

「精製された抗体」は、天然で結合している他のタンパク質、炭水化物、および脂質を十分に含まない抗体を意味する。このような抗体は、天然のPrPCタンパク質、変性したPrPSc、またはそれぞれの抗原断片に「優先的に結合」する(すなわち、他の抗原的に関連しない分子(天然のPrPScを含む)を実質的に認識せず、結合しない)。本発明の精製された抗体は、好ましくは、特定の種のPrPCタンパク質に対して免疫反応性かつ免疫特異的であり、より好ましくは、天然のウシPrPに対して免疫特異的である。 40

【0041】

PrPタンパク質の「抗原断片」は、本発明の抗体に結合することができる、このようなタンパク質の一部を意味する。

【0042】

「特異的に結合する」は、PrPタンパク質の特定のポリペプチド(すなわち、エピトープ)に対する抗体の高アビジティおよび/または高親和性結合を意味する。好ましくは、この特定のポリペプチド上のエピトープへの抗体の結合は、他の任意のエピトープ(特に、関心対象の特定のポリペプチドと同じ試料に結合する分子または同じ試料中の分子に存在し得るエピトープ)への同じ抗体の結合より強い(例えば、他のタンパク質(乳牛の 50

天然のPrPSc、または哺乳動物（例えば、ヒト、イヌ、ネコなど）に由来するPrPScもしくはPrPCを含む）より強く有蹄類PrPCに結合する）。関心対象のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、弱いが検出可能なレベル（例えば、関心対象のポリペプチドに対して示される結合の10%以下）で他のポリペプチドに結合できてもよい。このような弱い結合またはバックグラウンド結合は、例えば、適切な対照を使用することによって、関心対象の化合物またはポリペプチドに対する特異的抗体結合と容易に区別することができる。一般的に、 10^7 モル/l以上、好ましくは、 10^8 モル/リットル以上の結合親和性で有蹄類PrPCに結合する本発明の抗体が、PrPCに特異的に結合すると言われる。一般的に、 10^6 モル/リットル以下の結合親和性を有する抗体は、現在用いられている従来法を用いて、検出可能なレベルで抗原に結合しないので有用でない。本発明の好ましい抗体は、天然のウシPrPScと比較して、ウシPrPCに対して4倍以上、好ましくは10倍以上の結合親和性を有する。より好ましくは、本発明の抗体は、天然のウシPrPScと比較して、ウシPrPCに対して100倍以上または1,000倍以上の結合親和性を有する。

10

20

30

【0043】

「検出可能に標識された抗体」、「検出可能に標識された抗PrP」、「または「検出可能に標識された抗PrP断片」は、取り付けられた検出可能な標識を有する抗体（または結合特異性を保持している抗体断片）を意味する。検出可能な標識は、通常、化学結合によって取り付けられるが、標識がポリペプチドの場合、もう一つの選択肢として遺伝子工学的技法によって取り付けることができる。検出可能に標識されたタンパク質を作成する方法は当技術分野において周知である。検出可能な標識は、当技術分野において周知の様々な標識から選択することができるが、通常、放射性同位体、蛍光体、常磁性標識、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、または検出可能なシグナル（例えば、放射能、蛍光、色）を発するか、もしくは標識を基質に暴露した後に検出可能なシグナルを発する他の部分もしくは化合物である。様々な検出可能な標識/基質対（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ/ジアミノベンジジン、アビジン/ストレプトアビジン、ルシフェラーゼ/ルシフェリン）、抗体を標識する方法、および標識抗体を使用する方法が当技術分野において周知である（例えば、ハーロー（Harlow）およびレーン（Lane）編（抗体：実験マニュアル（Antibody: A Laboratory Manual）（1988）Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）を参照のこと）。

【0044】

「治療」、「治療する」などの用語は、一般的に、望ましい薬理学的効果および/または生理学的効果を得ることを表すために本明細書で用いられる。効果は、疾患もしくはその症状の完全もしくは部分的な予防の点から見た予防的効果でもよく、ならびに/または疾患および/もしくは疾患に起因する副作用の部分的もしくは完全な治療の点から見た治療的効果でもよい。本明細書で使用する「治療」は、哺乳動物（特に、有蹄類）における疾患の任意の治療をカバーし、

（a）疾患にかかる素因があるが、疾患にかかっているとまだ診断されていない被験者において疾患が起こらないようにすること；

40

（b）疾患を抑止する、すなわち、疾患の発症をくいとめること；または

（c）疾患を緩和する、すなわち、疾患を後退させること、を含む。

【0045】

本明細書で用いられる略語として以下が挙げられる。

CNS：中枢神経系；

BSE：ウシ海綿状脳症；

CWD：シカまたはエルクの慢性消耗病；

CJD：クロイツフェルト - ヤコブ病；

FFI：致死性家族性不眠症；

GSS：ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病；

50

H u : ヒト ;
 H u P r P : ヒトプリオンタンパク質 ;
 M o : マウス ;
 M o P r P : マウスプリオンタンパク質 ;
 S H a : シリアンハムスター ;
 S H a P r P : シリアンハムスタープリオンタンパク質 ;
 B o v : 乳牛 ;
 B o v P r P : 乳牛プリオンタンパク質 ;
 T g : トランスジェニック ;
 T g (S H a P r P) : シリアンハムスターの P r P 遺伝子を含むトランスジェニックマウス ; 10
 T g (H u P r P) : 完全なヒト P r P 遺伝子を含むトランスジェニックマウス ;
 T g (S h e P r P) : 完全なヒツジ P r P 遺伝子を含むトランスジェニックマウス ;
 T g (B o v P r P) : 完全な乳牛 P r P 遺伝子を含むトランスジェニックマウス ;
 P r P S c : プリオンタンパク質のスクレイピーアイソフォーム ;
 P r P C : プリオンタンパク質の細胞に含まれる一般的な正常アイソフォーム ;
 M o P r P S c : マウスプリオンタンパク質のスクレイピーアイソフォーム ;
 M H u 2 M : マウス P r P 遺伝子の領域が、9 個のコドンでマウス P r P と異なる対応するヒト配列で置換されている、キメラマウス / ヒト P r P 遺伝子 ;
 T g (M H u 2 M) マウスは、キメラ M H u 2 M 遺伝子を含む本発明のトランスジェニックマウスである ; 20
 M B o 2 M : マウス P r P 遺伝子の領域が、9 個のコドンでマウス P r P と異なる対応するウシ配列で置換されている、キメラマウス / ヒト P r P 遺伝子 ;
 T g (M B o 2 M) マウスは、キメラ M B o 2 M 遺伝子を含む本発明のトランスジェニックマウスである ;
 M B o 2 M P r P C : キメラウシ / マウス P r P 遺伝子のスクレイピーアイソフォーム ;
 P r P C J D : P r P 遺伝子の C J D アイソフォーム ;
 P r n p 0 / 0 : 内因性プリオンタンパク質遺伝子 (例えば、M o P r P 遺伝子) の両対立遺伝子が切除されているもの ; 30
 T g (S H a P r P + / 0) 8 1 / P r n p 0 / 0 : S H a P r P を発現する特定のトランスジェニックマウス系統 (8 1)、+ / 0 はヘテロ接合体を示す ;
 T g (B o v P r P) / P r n p 0 / 0 : ウシプリオンタンパク質遺伝子 (B o v P r P) を有するマウスと、内因性プリオンタンパク質遺伝子の両対立遺伝子が破壊されたマウスを交雑させることによって得られたハイブリッドマウス ;
 T g (M B o 2 M) / P r n p 0 / 0 : キメラプリオンタンパク質遺伝子 (M H u 2 M) を有するマウスと、内因性プリオンタンパク質遺伝子の両対立遺伝子が破壊されたマウスを交雑させることによって得られたハイブリッドマウス ;
 F V B : F V B マウスの卵は比較的大きく、外因性 D N A のマイクロインジェクションを比較的良好に受け入れるために、トランスジェニックマウスの作成によく用いられる標準的な近交系マウス。 40

【0046】

本発明の一般的な局面

本発明は、有蹄類 (例えば、乳牛、ヒツジ、またはシカ) P r P C または変性した有蹄類 P r P S c に特異的に結合する抗体を提供する。この抗体はまた、天然の有蹄類 P r P S c に結合しないことを特徴とし得る。さらに詳細に述べると、本発明の方法は、プリオンタンパク質 (特に、有蹄類 (例えば、乳牛、ヒツジ、およびシカ) に由来するプリオンタンパク質) の異常配座異性体において入手できないエピトープを認識することができる抗体の開発をもたらす。本発明の抗体および検出法は、プリオンタンパク質の異常アイソフォームの感染状態と非感染状態を、ならびにプリオンタンパク質の異常アイソフォームと

正常アイソフォームを定量的に区別することができる。好ましくは、抗体は、単一の種に対して 10^7 モル/リットル以上、好ましくは 10^8 モル/リットル以上の親和性で、単一の種のインサイチューで変性した有蹄類 PrPSc タンパク質に結合する。本発明の抗体は、複数種（例えば、複数種の有蹄類）に対して親和性を有してもよく、単一の種（例えば、乳牛）に特異的でもよい。抗体は、PrPSc の天然の形態では入手できない PrPC または変性した PrPC のエピトープを、恐らく、PrPC と PrPSc との構造の違いによって認識する。有蹄類 PrP タンパク質遺伝子の異なる変異および/または多型によってコードされる全てのタンパク質に結合できる抗体を、本発明のプロトコルを用いて単離することができる。または、一組の抗体（2つ以上の異なる抗体）を提供することができ、この組の各抗体は、有蹄類 PrP 遺伝子の異なる変異または多型によってコードされるタンパク質に特異的に結合する。従って、抗体を支持体表面に結合させ、有蹄類 PrPC の特定の対立遺伝子が存在するかどうかインビトロで試料をアッセイするのに使用することができる。

10

20

30

40

50

【0047】

本発明の抗体は、部分的に、ファージディスプレイライブラリーを用いた単離によって特徴付けられる。抗体（特に、抗体の Fab 部分）発現用のファージディスプレイライブラリーの構築は当技術分野において周知である。好ましくは、抗体を発現するファージディスプレイ抗体ライブラリーは、1993年6月29日に発行された米国特許第5,223,409号および1998年12月8日に発行された米国特許第5,846,533号（両方とも参照として本明細書に組み入れられる）に記載の方法に従って調製される。一般的な方法の手順を、本発明の開示を用いて、本発明の抗体を産生するように合わせることができる。

【0048】

本発明は、BoPrPSc の隠れたエピトープ（特に、エピトープ I と呼ばれる残基 90 - 120）に対応する短い合成ペプチドに対して、開発された抗体をパニングおよびスクリーニングする方法を含む。

【0049】

本発明の抗体は、インビトロ方法を用いてプリオンを検出するのに特に有用である。この方法において、ヒトまたは動物の組織に PrPSc が存在することはプリオンに感染したことを示している。構造依存性イムノアッセイ法（CDI）は、本発明の抗体を使用して有蹄類 PrPSc を検出するための、迅速かつ特異的かつ非常に感度の高い方法を提供する。このアッセイ法は、名前が示すように構造感受性であり、PrPC が 100 倍過剰に存在する脳ホモジネートにおいて比較的低い濃度の PrPSc を検出することができる。本発明の前に、乳牛の様々な組織において BSE プリオンを早期検出するための CDI の迅速な利用は、変性したウシ PrP の残基 90 - 120（エピトープ I）と反応する高親和性抗体が無かったために複雑であった。本発明の前に作成されたモノクローナル抗体または組換え抗体は全てウシ PrP に対して低い親和性を有するか、エピトープ I から離れたエピトープを認識する。このエピトープはウシ PrP の確実な検出に重要なだけでなく、CDI の構造感度にも重要である。CDI の構造感度は、アッセイ法の特異性および PrPSc と PrPC を区別する能力に重要である。本発明の方法は、特に、構造依存性イムノアッセイ法（CDI）（例えば、野生型および新規（*de novo*）ウシ、ヒツジ、およびシカプリオンに対するアッセイ法）において使用することができる高親和性の抗 PrPC 有蹄類抗体の合理的な開発および特異的な選択をもたらす。

【0050】

CDI アッセイ法は、1999年4月6日に発行された米国特許第5,891,641号に記載されている。2001年4月10日に発行された米国特許第6,214,565号および1999年8月28日に公開された国際公開公報第99/42829号も参照のこと。これらの全てがその全体が参照として本明細書に組み入れられる。CDI アッセイ法の基本的な段階を図1の流れ図に示す。試料1（好ましくは、ウシ脳試料）を2つの部分3および4に分割する。第1の部分3と、本発明の抗体（好ましくは、検出可能な標識

に取り付けられた抗体)を接触させる5。次いで、ウシPrPCに対する結合レベル6を決定する。次いで、抗体が結合するエピトープを暴露するように、試料の第2の部分4を処理する(すなわち、試料中のタンパク質を変性する)7。この処理によってPrPSc上にエピトープが暴露し、処理されたPrPScに抗体8が結合できるようになる。従って、試料中にPrPScが存在すれば、処理されていない第1の部分に対する結合レベルと比較して、処理された第2の部分に対する結合レベル9は大きい。処理によってPrPCに対する結合レベルが増加することがある。従って、第2の部分にPrPScが存在しない時でさえ、いくらかの増加が予想される。このために、処理された第2の部分4に対する結合レベルを基準量の分だけ下方修正することが必要になる。下方修正した後、このレベルと第1の部分3で得られたレベル6を比較し10、PrPScが試料1に存在するかどうかについて判断を下す。

10

【0051】

定量計算

前記の方法を使用して、処理されていない試料から得られたシグナル量と処理された試料を用いて得られたシグナル量との差を計算することが可能である。この差は、(非疾患構造に及ぼす処理の影響に合わせて調整した後に)元々の試料に存在する疾患構造のタンパク質の量に相当する。差が得られた後に、以下に示した式を用いて、体積単位当たりの、元々の試料に存在する疾患構造のタンパク質の量を計算することができる。

a) $F_n = F_n + F_n$ $F_n = F_n - F_n$, $F_n \sim$ バックグラウンド

b) $F_d = F_d + F_d$

$F_{nd} = F_{nv} + F_{nd}$

$F_{nd} = F_d - F_n - F_{nd}$

[PrP]または[DRC] $\sim F_{nd} = F_d - (F_n * f_{nd})$

【0052】

前記の各変数の定義を以下に示す。

F - 蛍光シグナル(任意の検出可能なシグナルを使用できることに留意のこと) ;

F_n - 天然の構造の蛍光シグナル ;

F_n および F_n - それぞれ、天然のヘリックス構造およびシート構造の蛍光シグナル ;

F_d - 処理された、すなわち変性した状態のPrPの蛍光シグナル ;

F_d および F_d - 変性したヘリックス状態またはシート状態のPrPのシグナル ;

F_{nd} - 天然の状態から変性した状態に移行した際の蛍光シグナルの増加 ;

F_{nd} - 天然の状態から変性した状態に移行した際のヘリックス構造の蛍光シグナルの増加 ;

F_{nd} - 天然の状態から変性した状態に移行した際のシート構造のシグナルの増加 ;

f_{nd} - ヘリックスPrPが天然の状態から変性した状態に移行するための相関係数 ;

[PrP] - シート構造のプリオンタンパク質の濃度 ;

[DRC] - 疾患関連構造の任意のタンパク質の濃度。

【0053】

前記の式は、特に、シート構造のプリオンタンパク質の濃度を計算するのに用いられる。しかしながら、任意のタンパク質の濃度(すなわち、任意の疾患構造のタンパク質(例えば、[A4])の濃度)を計算するのに同じ式を使用することができる。さらに詳細に述べると、[DRC]は、疾患関連構造のタンパク質の濃度を示す。

【0054】

具体的な例を示すために、特に、PrPタンパク質(このタンパク質は、ヘリックス立体配置を含む少なくとも1つの非疾患構造(PrPC)とシート立体配置を含む少なくとも1つの疾患関連構造(PrPSc)を含む)に関して、前記の定義がなされた。この

50

式は、試料に存在する疾患関連構造のタンパク質の濃度を計算するのに用いられる。前記で示された特定の式および定義によれば、この式は、シート立体配置を含むプリオンタンパク質の濃度を計算するのに用いられる（実施例 8 を参照のこと）。

【 0 0 5 5 】

前記の式の計算において用いられるシグナルは蛍光シグナルである。しかしながら、任意の検出可能なシグナルを使用することができる。全シグナルは、疾患関連構造および非疾患関連構造から受け取ったシグナルの組み合わせである F_n によって表される。これは、前記のアッセイ法に従って処理されていない部分番号 1 から計算されたシグナルである。変数 F_d は、試料の部分番号 2 を処理することによって得られたシグナルである。このシグナルは、処理された非疾患構造のタンパク質と処理された疾患構造のタンパク質から受け取ったシグナルの組み合わせである。

10

【 0 0 5 6 】

疾患関連構造のタンパク質を含まない試料を処理することによって得られるシグナルに差があることが認められている。正確な測定値を得るために、この差を計上すべきである。天然の試料と処理された試料との得られたシグナルの差は、もちろん、疾患関連構造および非疾患構造を処理することによって得られたシグナルの差の組み合わせである。疾患構造を処理することによって得られたシグナルの増加（すなわち、処理されていない疾患構造のシグナルと処理された疾患構造から受け取ったシグナルの差）は、処理されていない非疾患構造および処理された非疾患構造から得られたシグナルの増加の計算から受け取ったシグナルから、全試料を処理することから受け取ったシグナルを差し引くことによって計算することができる。これらの式を用いて、元々の試料に存在する疾患構造のタンパク質の濃度を得る最終的な式を作成することが可能である（実施例 8 を参照のこと）。

20

【 0 0 5 7 】

作成された抗体断片

本発明の方法を用いて、C D I フォーマットの E L I S A において、変性した B o P r P S c にきつく結合するが、天然の構造の同じタンパク質には結合しない 3 つの組換え抗体断片（F a b）が単離された。3 つ全ての F a b が、ウシプリオンタンパク質の 9 6 - 1 0 5 領域に対して作成された。クローン「O」および「S」はウシ P r P のみを認識したのに対して、「P」は、S H a、M o、O v、および H u、ならびにウシ P r P S c に結合した。「O」および「P」組換え抗体断片（F a b）はマウス c D N A から単離され、大腸菌においてヒト - マウス（H u M）キメラ F a b を発現するベクターにクローニングされた。次いで、精製された F a b はユーロピウムで標識され、ウシ、ヒツジ、およびシカ P r P S c を測定するために構造依存性イムノアッセイ法（C D I）で用いられた。感染単位に関して C D I の感度を校正するために、ウシ P r P S c を発現するトランスジェニックマウスが将来、用いられるだろう。

30

【 0 0 5 8 】

抗体および結果として生じるアッセイ法の選択は、試料中で直接、またはプリオン含有試料が接種された動物の脳において間接的に行うことができる。

【 0 0 5 9 】

任意の所与の抗原から抗体を産生するために既知の手段があるが、ある特定のタンパク質（例えば、P r P C）に結合する抗体を産生することが特に難しいことは経験から分かっている。P r P C に対する抗体（および P r P S c に対する抗体）を得ることが難しいことは、部分的に、その構造上の特性に関連している。本明細書に記載の手順に従うことで、有蹄類 P r P C に結合する抗体が得られた。他の人は、抗体を作成するのが難しい P r P C および他のタンパク質（例えば、他種の P r P C タンパク質）に対する他の抗体を得るために本明細書に記載の手順をまねすることができる。

40

【 0 0 6 0 】

本発明の抗体を産生するために、宿主哺乳動物に、望ましい有蹄類 P r P C からの接種物を接種することから始めることが好ましい。宿主哺乳動物は任意の哺乳動物でよく、好ましくは、本明細書で定義されたタイプの宿主哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ

50

、モルモット、またはハムスター)であり、最も好ましくは、マウスである。宿主動物には、有蹄類の種に内因性のプリオンタンパク質が接種される。例えば、マウスにウシPrP^Cペプチドが接種される。このように正常な宿主哺乳動物を用いて、抗体の発生を誘発することが可能である。しかしながら、宿主動物はプリオンタンパク質遺伝子を含んでおり、遺伝的に異なる種のPrP^Cが接種されるので、抗体は、あったとしても、宿主動物のプリオンタンパク質のエピトープと遺伝的に異なる種に由来するPrP^Cのエピトープとで異なるエピトープに対してしか作成されない。これは、作成され得る抗体の量を実質的に制限し、有蹄類PrP^Cに選択的に結合する抗体を発見する能力を低下させる。従って、異なる種のプリオンタンパク質を区別する抗体を作成する試みでは、インタクトな内因性PrP^{Sc}遺伝子を有する哺乳動物を用いて抗体産生プロセスを開始することが好ましい 10

【0061】

抗体はまた、切除されたプリオンタンパク質遺伝子、すなわち、ヌルPrP^{Sc}遺伝子(Prnp^{0/0}と略す)を有する動物において作成することができる。これは、宿主動物PrP^{Sc}遺伝子と有蹄類PrP^{Sc}遺伝子の間で保存されている有蹄類PrP^C領域に対して抗体を作成するのを可能にする。従って、本発明はまた、このような「ヌル」哺乳動物の使用に関して説明され、さらに詳細に述べると「ヌルマウス」に関して説明される。

【0062】

ヌルマウスは、あるDNAセグメントを正常マウスPrP^{Sc}遺伝子に挿入および/またはPrP^{Sc}遺伝子の一部を除去して破壊されたPrP^{Sc}遺伝子を生じさせることによって作成することができる。破壊された遺伝子はマウス胚に注入され、相同組換えによって内因性PrP^{Sc}遺伝子と入れ替わる。 20

【0063】

ヌルマウスには、抗体形成を刺激するために有蹄類PrP^{Sc}ペプチドが注射される。抗体作成を最大限にするために、ペプチドと共にアジュバント注射を使用することができる。次いで、マウスは屠殺され、骨髓細胞および脾臓細胞が取り出される。細胞が溶解され、RNAが抽出され、cDNAに逆転写される。次いで、抗体重鎖および軽鎖(またはその一部)がPCRによって増幅される。増幅されたcDNAライブラリーはそのまま使用してもよく、広範囲のバリエーションを作成し、それによってライブラリーサイズを大きくするためにさらに操作してもよい。 30

【0064】

IgG抗体ファージディスプレイライブラリーは、1つのベクターがベクターの第1の発現カセットに重鎖断片をコードするcDNAインサートを含み、ベクターの第2の発現カセットに軽鎖断片をコードするcDNAインサートを含むように、IgG重鎖をコードする増幅cDNAおよび軽鎖をコードする増幅cDNAをファージディスプレイベクター(例えば、pComb3ベクター)に挿入することによって構築される。

【0065】

連結されたベクターは、当技術分野において周知の方法を用いて、ファージディスプレイベクター(例えば、繊維状ファージM13)によってパッケージングされる。パッケージングされたライブラリーは、ファージ粒子数を増幅するために大腸菌培養物に感染するのに用いられる。ファージが細胞から押し出された後、ファージ粒子が単離され、パニング法に用いられる。作成されたライブラリーは、適切なプリオンを含む組成物に対してパニングされる。次いで、PrP^{Sc}(例えば、ウシPrP^{Sc})に選択的に結合する抗体断片が単離される。 40

【0066】

抗体の入手 - 一般的な手順

本発明の抗体は様々な技法によって入手することができる。1つの特定の態様は、ファージ表面上のタンパク質(すなわち、抗体またはその一部)ライブラリーを用いて抗体を作成する方法を提供する。このライブラリーは、PrP^{Sc}タンパク質を含む組成物(特に、天然に生じるPrP^{Sc}含有組成物)と接触される。PrP^{Sc}に結合するファージが同定され 50

、PrPCタンパク質に結合する抗体またはその一部が単離される。抗体またはその一部をコードする遺伝物質の配列を決定することが望ましい。さらに、さらなる抗体を産生するために、それだけでまたは他の遺伝物質と共に配列を増幅し、適切なベクターおよび細胞系に挿入することができる。例えば、PrPScでは隠されているPrPCエピトープに結合する可変領域をコードする配列を、抗体の有蹄類（例えば、ウシ）定常領域をコードする配列と融合して、定常/可変構築物を作成することができる。この構築物を増幅し、適切なベクターに挿入し、抗体産生に適した細胞系にトランスフェクトすることができる。このような手順は、このような手順を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる、1989年3月28日に発行されたキャビリー（Cabbilly）らへの米国特許第4,816,567号に記載されている。さらに、ボブルゼクカ（Bobrzeka）ら（1980）Immunology Letters, 2, 151-155頁およびコニエクズニー（Konieczny）ら（1981）Haematologia 14（1）, 85-91頁（これらも参照として本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

【0067】

PrPCタンパク質に結合する抗体またはその一部をコードする遺伝物質が単離されると、結合PrPCタンパク質に対してより大きな親和性を有する他の抗体またはその一部を産生するために、その遺伝物質を使用することが可能である。これは、部位特異的変異誘発技術またはランダム変異誘発および選択によって行われる。詳細に述べると、配列内の個々のコドンまたはコドン群を除去するか、異なるアミノ酸をコードするコドンで置換することができる。さらなるファージの表面上に抗体またはその一部の変形を発現させるために、多数の異なる配列を作成、増幅、および使用することができる。次いで、これらのファージは、PrPタンパク質に対する抗体の結合親和性について試験するのに使用することができる。

【0068】

ファージライブラリーは様々な異なるやり方で作成することができる。ある手順によれば、マウスまたはラットなどの宿主動物がPrPCタンパク質で免疫化される。免疫化は、より多量かつより多くのタイプの抗体に合わせて最適化するためにアジュバントと共に行ってもよい。抗体作成に十分な時間をとった後に、抗体産生を担う細胞が、接種された宿主哺乳動物から取り出される。cDNAライブラリーを作成するために、RNAが、取り出された細胞から単離され、逆転写にかけられる。抽出されたcDNAがプライマーを用いて増幅され、適切なファージディスプレイベクターに挿入される。このベクターは、ファージ表面上での抗体またはその一部を発現を可能にする。ディスプレイベクターに挿入する前に、cDNAを部位特異的変異誘発にかけることも可能である。詳細に述べると、より大きなライブラリー（すなわち、多くのバリエーションからなるライブラリー）を作成するために、コドンを除去するか、異なるアミノ酸をコードするコドンで置換することができる。次いで、ライブラリーをファージ表面上に発現させる。その後、前記のように、ファージと試料を接触させ、PrPタンパク質に結合するファージが単離される。

【0069】

プリオン特異的抗体をコードするRNAの単離

コンビナトリアル抗体ライブラリー技術（例えば、M13繊維状ファージ表面上に発現する抗体ライブラリーからの、抗原に基づく選択）はモノクローナル抗体作成の新たなアプローチを提供し、本発明に特に関係するハイブリドーマ法と比較して多数の利点を有する（ヒューズ（Huse），W.D.，L.サストリー（Sastri）ら（1989）Science 246:1275-1281.；バルバス（Barbas），C.F.，III，A.S.ファン（Fang），ら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.；ブルトン（Burton），D.R.およびC.F.バルバス，III（1994）Adv. Immunol. 57:191-280）。

【0070】

本発明は、B o v P r P免疫化P r n p 0 / 0マウスから調製されたファージ抗体ライブラリーからP r P特異的モノクローナル抗体を得るための、このような技術を利用した方法を提供する。本発明は、インサイチューでB o v P r Pを認識する最初のモノクローナル抗体を提供し、ヌルマウスから特異的抗体をクローニングするためのコンビナトリアルライブラリーの応用を証明する。本発明は寛容の問題を回避し、部分的にヌルマウスを用いて、B o v P r Pおよび他のP r P上の様々なエピトープを認識することができるモノクローナル抗体パネルをより効率的に作成する。P r n p 0 / 0マウスは、M o、B o v、およびヒトP r Pに対するI g G血清力価を、アジュバントに溶解した比較的少量の各々の精製P r P 2 7 - 3 0を用いた免疫化後に発生する。抗体作成に十分な時間をかけた後に、従来のやり方でハイブリドーマを作成するために免疫化P r n p 0 / 0マウスを屠殺する。これらのマウスから得られた融合細胞はP r P C特異的抗体を分泌する。ファージディスプレイ技術を用いた大きなコンビナトリアルライブラリーの作成に關与する一般的な方法は、1 9 9 3年6月29日に発行された米国特許第5, 2 2 3, 4 0 9号に説明および開示されている。この特許は、ファージディスプレイ技術を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる。

10

【0071】

一般的に、ファージディスプレイ抗P r P抗体ライブラリーは、まず最初に、抗P r P抗体をコードするRNAを含むRNAプールを単離することによって調製される。これを達成するために、動物（例えば、マウス、ラット、またはハムスター）を、関心対象のタンパク質またはペプチドで免疫化する。しかしながら、正常な動物は、検出可能なまたは十分に高いレベルでプリオンに対する抗体を産生しない。この問題は、(P r P)遺伝子が両対立遺伝子で切除されている動物を免疫化することによって避けられる。このようなマウスはP r n p 0 / 0と呼ばれ、このようなマウスを作成する方法は、ブエラー(B u e l l e r)ら(1992)Nature 356: 577 - 582および1993年5月27日に公開されたワイズマン(Weissmann)国際公開公報第93/10227号に開示されている。ヌル動物にP r P CまたはP r P Cペプチドを接種すると、プリオンに対するI g G血清力価が生じる(プルシナーら, P N A S, 1993)。1つの好ましい態様において、免疫化のために選択される動物は、ブエラーおよびワイズマンによって述べられたP r n p 0 / 0マウスである。一般的に、「ヌル」動物において血清抗体反応を誘発するのに必要なタンパク質量は約0.01mg/kg ~ 約500mg/kgである。

20

30

【0072】

一般的に、P r Pタンパク質は、注射、好ましくは静脈内注射、より好ましくは腹腔内注射によって動物に投与される。動物に1回注射し、一般的に、その後、1 ~ 4回追加免疫注射し、好ましくは、少なくとも3回追加免疫注射する。免疫化後、動物の抗血清とプリオンとの反応性を、標準的な免疫学的アッセイ法（例えば、E L I S Aまたはウエスタンブロット）を用いて当技術分野において周知の方法に従って試験することができる（例えば、ハーローおよびレーン, 1988, 抗体: 実験マニュアル, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと）。プリオンに結合する抗血清を有する動物を、P r P Cのさらなる注射によって追加免疫刺激してもよい。

40

【0073】

血清抗体レベルは、抗体分泌、従って、リンパ球（特に、プラズマ細胞）における特異的mRNAのレベルを予測するものである。従って、血清抗体（特に、比較的高レベルの血清抗体）の検出は、高レベルの、血清抗体をコードするmRNAを産生するリンパ球（例えば、プラズマ細胞）と相関している。従って、特に、最後の追加免疫注射後、短時間（例えば、約2 ~ 5日、好ましくは3日）でプラズマ細胞をマウスから単離した時に、P r P C免疫化マウスから単離されたプラズマ細胞は、高い割合の、プリオン特異的抗体を産生するリンパ球（例えば、プラズマ細胞）を含んでいる。従って、マウスの免疫化およびその後の追加免疫注射は、マウスプラズマ細胞の全集団に存在する抗P r P C抗体産生プラズマ細胞の総パーセントを高めるのに役立つ。さらに、抗P r P C抗体はピーク血清レ

50

ベルまたはピーク血清レベル付近で産生されているので、抗PrP抗体産生プラズマ細胞は、ピークレベルまたはピークレベル付近で、抗PrPC抗体、従って、これらの抗体をコードするmRNAを産生している。

【0074】

抗原特異的抗体の血清レベルと、抗原特異的抗体を産生するリンパ球の数と、抗原特異的抗体をコードする総mRNAの量との前記の相関関係は、関心対象の抗原特異的抗体をコードするmRNAが濃縮されたmRNAプールを単離する手段をもたす。プラズマ細胞を含むリンパ球は、当技術分野において周知の方法に従って、プリオン免疫化動物に由来する脾臓および/または骨髄から単離される（例えば、フーズW. D., L. サストリーら（1989）（補足説明を参照のこと）Science 246: 1275-1281を参照のこと）。好ましくは、リンパ球は、最後の追加免疫注射の約2～5日後、好ましくは約3日後に単離される。これらの細胞から総RNAが抽出される。哺乳動物細胞からRNAを単離する方法は当技術分野において周知である（例えば、サンプルック（Sambrook）ら，1989，分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual），第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，NYを参照のこと）。

10

【0075】

リンパ球mRNAからの抗体をコードするcDNAの作成

cDNAは、当技術分野において周知の方法に従って逆転写酵素を用いて単離RNAから作成することができる（例えば、サンプルックら，前記を参照のこと）。抗体の重鎖または軽鎖をコードするcDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて増幅することができる。重鎖または軽鎖をコードするcDNAを増幅するのに用いられる3'プライマーは、特定の抗体サブクラスの重鎖または軽鎖抗体に共通する既知のヌクレオチド配列に基づいている。例えば、IgG1重鎖定常領域をコードする遺伝子に基づく一組のプライマーが、IgG1サブクラスの重鎖を増幅するのに使用することができ、その一方で、軽鎖定常部分をコードする遺伝子に基づくもう一組のプライマーが、軽鎖レパートリーを増幅するのに用いられる。5'プライマーは、データベースにおける多数の可変配列の調査に基づいたコンセンサス配列である。このように、増幅されたDNAによるコードされる抗体の抗原特異性に関係なく、特定の抗体クラスまたはサブクラスの全ての抗体をコードするDNAを増幅することができる。重鎖または軽鎖をコードする遺伝子全体を増幅することができる。または、重鎖または軽鎖をコードする遺伝子の一部のみを増幅することができる。但し、PCR増幅産物は、対応する重鎖または軽鎖と結合することができ、抗原結合において機能する（すなわち、プリオンタンパク質に選択的に結合する）重鎖または軽鎖遺伝子産物をコードする。好ましくは、ファージディスプレイ産物は、FabまたはFv抗体断片である。

20

30

【0076】

増幅のために選択される抗体コードcDNAは任意のアイソタイプをコードしてもよく、好ましくは、IgGサブクラスをコードする。例示的なマウスIgGサブクラスとして、IgG1、IgG2a、IgG2b、およびIgG3が挙げられる。増幅のための特定の抗体サブクラスをコードするcDNAの選択は、様々な要因（例えば、抗原に対する動物の血清抗体反応を含む）によって異なる。好ましくは、PCR増幅のために選択される抗体サブクラスをコードするcDNAは、動物が最も高い抗体力価を生じる抗体サブクラスである。例えば、血清IgG1の力価が、血清抗体反応において検出された他のどのIgGサブクラスよりも高い場合、IgG1をコードするcDNAがcDNAプールから増幅される。

40

【0077】

好ましくは、2つの別個の増幅cDNAプール：1）重鎖cDNAアンプライマー産物を含むcDNAプール（この場合、重鎖は特定の抗体サブクラスの重鎖である）および2）軽鎖cDNAアンプライマー産物を含むcDNAプールを生じるように、重鎖および軽鎖

50

がプラズマ細胞 c D N A から増幅される。

【 0 0 7 8 】

トランスジェニック動物からの抗体

動物に抗原を感染させ、その後、抗体産生を担う細胞（およびその D N A ）を取り出すことによって、抗体をコードする遺伝物質を得ることに加えて、抗体産生用のトランスジェニック動物を作成することによって遺伝物質を得ることが可能である。説明された技術およびトランスジェニック動物技術は、例えば、キメラマウス/ウシ抗体または完全にウシの抗体を産生するのに使用することができる。キメラまたは完全に外来の免疫グロブリンを産生する技術は、所望の抗原に結合する免疫グロブリンの全てまたは一部をコードする遺伝物質が生殖系列細胞に挿入されているトランスジェニック動物の細胞を得ることを必要とする。ウシ抗体をコードする遺伝物質がゲノムに挿入されているトランスジェニックマウスから、完全にウシの抗体を産生することができる。トランスジェニック動物からこのような抗体を産生する同様の技術が、1990年4月19日に公開された国際公開公報第90/04036号に記載されている。さらに、グッドハルト（Goodhardt）ら（1987年6月）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4229-4233およびブクシン（Bucchine）ら（1987年3月26日）Nature 326: 409-411を参照のこと。トランスジェニック動物から抗体を産生する方法を開示および説明するために、これらの全てが参照として本明細書に組み入れられる。

10

【 0 0 7 9 】

本発明は、主として、ヌルマウス（すなわち、PrP遺伝子の両対立遺伝子が切除されたFVBマウス）に関して本明細書で説明される。しかしながら、他の宿主動物を使用することができ、好ましい宿主動物はマウスおよびハムスターであり、マウスは、トランスジェニック動物の作成についてかなりの情報がある点で最も好ましい。可能な宿主動物として、ハツカネズミ属（Mus）（例えば、マウス）、クマネズミ属（Rattus）（例えば、ラット）、アナウサギ属（Oryctolagus）（例えば、ウサギ）、メソクリセタス属（Mesocricetus）（例えば、ハムスター）、およびテンジクネズミ属（Cavia）（例えば、モルモット）から選択される属に属する宿主動物が挙げられる。一般的に、繁殖および管理しやすい、正常な完全に成長した成獣体重が1kg未満の哺乳動物を使用することができる。

20

30

【 0 0 8 0 】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーと共に使用するベクター

次いで、重鎖をコードするcDNAおよび軽鎖をコードするcDNAが、好ましくは、適切なベクターの別々の発現カセットに挿入される。好ましくは、ベクターは、融合ポリペプチドをコードし、発現することができるヌクレオチド配列を含む。この融合ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、1) 原核生物分泌シグナルドメイン、2) 異種ポリペプチドをコードするDNA（例えば、重鎖をコードするcDNAまたは軽鎖をコードするcDNA）の挿入部位、および3) 重鎖cDNA用の発現カセットでは繊維状ファージ膜アンカードメインを含む。

【 0 0 8 1 】

ベクターは、融合ポリペプチドを発現するための原核生物または哺乳動物DNA発現制御配列（好ましくは、原核生物制御配列）を含む。DNA発現制御配列は、構造遺伝子産物を発現するための任意の発現シグナルを含んでもよく、異種ポリペプチドを発現するために発現カセットに作動可能に連結される5'および3'エレメントを含んでもよい。5'制御配列は、転写開始のためのプロモーター、および上流翻訳配列の5'末端に作動可能に連結されるリボソーム結合部位を規定する。ベクターは、さらに、原核細胞（好ましくは、大腸菌などのグラム陰性細胞）における維持および複製のための複製起点を含む。ベクターはまた、発現によって、選択に有利な点（例えば、薬物耐性）がベクターで形質転換される原核細胞または真核細胞に付与される遺伝子を含んでもよい。

40

【 0 0 8 2 】

50

繊維状ファージ膜アンカーは、好ましくは、繊維状ファージ粒子のマトリックスに結合し、それによって融合ポリペプチドをファージ表面上に組み込むことが可能な c p I I I または c p V I I I コートタンパク質のドメインである。分泌シグナルは、あるタンパク質のリーダーペプチドドメインであり、これによってタンパク質はグラム陰性細菌のペリプラズム膜に向けられる。グラム陰性細菌（例えば、大腸菌）のこのようなリーダー配列は当技術分野において周知である（例えば、オリバー（O l i v e r）, ナイドハルド（N e i d h a r d）F . C .（編）（1987）大腸菌およびネズミチフス菌（E s c h e r i c h i a c o l i a n d S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m）, A m e r i c a n S o c i e t y f o r M i c r o b i o l o g y , W a s h i n g t o n , D . C . , 1 : 5 6 - 6 9 を参照のこと）。

10

【0083】

ファージディスプレイベクターにおいて使用する繊維状ファージ膜アンカー

ベクターに好ましい膜アンカーは、繊維状ファージ M 1 3、f 1、f d、および同等の繊維状ファージから得ることができる。好ましい膜アンカードメインは、遺伝子 I I I および遺伝子 V I I I によってコードされるコートタンパク質に見出される。繊維状ファージコートタンパク質の膜アンカードメインはコートタンパク質のカルボキシ末端領域の一部であり、脂質二重膜にまたがる疎水性アミノ酸残基の領域および通常、膜の細胞質側に見出され、膜から延びている荷電アミノ酸残基の領域を含む。ファージ f 1 において、遺伝子 V I I I コートタンパク質の膜にまたがる領域は、41 ~ 52 のカルボキシ末端 11 残基を含んでいる（オオカワ（O h k a w a）ら（1981）J . B i o l . C h e m . 2 5 6 : 9 9 5 1 - 9 9 5 8）。例示的な膜アンカーは c p V I I I の残基 26 ~ 40 からなる。従って、好ましい膜アンカードメインのアミノ酸残基配列は、M 1 3 繊維状ファージ遺伝子 V I I I コートタンパク質（c p V I I I または C P 8 と呼ばれる）から得られる。遺伝子 V I I I コートタンパク質は、一般的に約 2500 ~ 3000 コピーのコートタンパク質を有するファージ粒子の大部分にわたって成熟繊維状ファージに存在する。

20

【0084】

別の好ましい膜アンカードメインのアミノ酸残基配列は、M 1 3 繊維状ファージ遺伝子 I I I コートタンパク質（c p I I I と呼ばれる）から得られる。遺伝子 I I I コートタンパク質は、一般的に約 4 ~ 6 コピーのコートタンパク質を有するファージ粒子の一端に、成熟繊維状ファージに存在する。繊維状ファージ粒子の構造、そのコートタンパク質、および粒子集合の詳細な説明は、ラシェド（R a c h e d）ら（1986）M i c r o b i o l . R e v , 5 0 : 4 0 1 - 4 2 7 による概説およびモデル（M o d e l）ら（1988）バクテリオファージ（T h e B a c t e r i o p h a g e s）：第2巻，R . カレンダー（C a l e n d a r）編，P l e n u m P u b l i s h i n g C o . , 3 7 5 - 4 5 6 頁に見られる。

30

【0085】

好ましくは、ファージ膜アンカーをコードする D N A が容易に切り出され、ベクターの発現カセットの残りが破壊されることなくベクターが再連結されるように、繊維状ファージ膜アンカーをコードする D N A はライブラリーベクターにおいて c D N A インサートの 3' 側に導入される。ベクターからファージ膜アンカーをコードする D N A を除去し、このベクターを適切な宿主細胞において発現すると、可溶性抗体（F a b）断片が産生される。可溶性の F a b 断片はファージ結合 F a b の抗原結合性を保持しており、従って、（断片化していない）抗体全体を使用するようにアッセイ法および治療に使用することができる。

40

【0086】

本発明と共に使用するベクターは、ヘテロ 2 量体型受容体（例えば、抗体または抗体 F a b）を発現することができなければならない。すなわち、ベクターは、2 つの別個の c D N A インサート（例えば、重鎖 c D N A および軽鎖 c D N A）を独立して含有し、発現することができなければならない。繊維状ファージ膜アンカーをコードする D N A が重鎖 c D N A 用発現カセットにのみ存在することを除いて、それぞれの発現カセットは前記のエ

50

レメントを含んでもよい。従って、抗体または F a b がファージ表面上に発現されると、重鎖ポリペプチドだけがファージ表面に固定される。軽鎖はファージ表面に直接結合しないが、重鎖ポリペプチドの遊離部分（すなわち、ファージ表面に結合していない重鎖部分）との結合を介してファージに間接的に結合する。

【0087】

好ましくは、ベクターは、定方向連結を可能にするヌクレオチド配列（すなわち、ポリリンカー）を含む。ポリリンカーは、複製および輸送のために上流および下流の翻訳可能な DNA 配列を作動可能に連結し、ベクターへの DNA 配列の定方向連結のための部位または手段を提供する DNA 発現ベクターの領域である。一般的に、定方向ポリリンカーは、2 つ以上の制限エンドヌクレアーゼ認識配列を規定するヌクレオチド配列である。制限酵素で切断すると、2 つの部位が付着末端を生じ、この付着末端で、翻訳可能な DNA 配列を DNA 発現ベクターに連結することができる。好ましくは、2 つの付着末端は相補せず、そのために、カセットへの c DNA の定方向挿入が可能になる。ポリリンカーは 1 つまたは複数の定方向クローニング部位をもたらしことができ、挿入された c DNA の発現中に翻訳されてもよく、翻訳されなくてもよい。

【0088】

特定の態様において、発現ベクターは、繊維状ファージ粒子の形で操作することができる。このような DNA 発現ベクターは、適切な遺伝的に必要な全てのもの（genetic complement）が提示されるとベクターが一本鎖複製型の繊維状ファージとして複製することができ、繊維状ファージ粒子にパッケージングできるように、繊維状ファージ複製起点を規定するヌクレオチド配列をさらに含む。この特徴は、（例えば、単離された細菌コロニーの感染および単離された細菌コロニーにおける複製によって）個々のファージ粒子を後で単離するために DNA 発現ベクターがファージ粒子にパッケージングされるのを可能にする。

【0089】

繊維状ファージ複製起点は、複製によって産生される複製型の複製開始、複製終結、およびパッケージングのための部位を規定するファージゲノムの領域である（例えば、ラシェド（Rasched）ら（1986）Microbiol. Rev. 50: 401-427；ホリウチ（Horiiuchi）（1986）J. Mol. Biol. 188: 215-223 を参照のこと）。本発明での使用に好ましい繊維状ファージ複製起点は、M13、f1、または fd ファージ複製起点である（ショート（Short）ら（1988）Nuccl. Acid Res. 16: 7583-7600）。好ましい DNA 発現ベクターは、発現ベクター pCOMB8、pCKAB8、pCOMB2-8、pCOMB3、pCKAB3、pCOMB2-3、pCOMB2-3'、および pCOMB3H である。

【0090】

pComb3H ベクターは、（i）重鎖および軽鎖が個々のプロモーターではなく単一の Lac プロモーターから発現され、（ii）重鎖および軽鎖が同じリーダー配列（pHB）ではなく 2 つの異なるリーダー配列（pg1B および ompA）を有する、pComb3 の改変型である。pComb3H については、ヤング（Yang）ら（1995）J. Mol. Biol., 254: 392-403 を参照のこと。pComb3H の原理は基本的に pComb3 と同じである。

【0091】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーの作成

重鎖および軽鎖 cDNA が発現ベクターにクローニングされた後、適切な繊維状ファージを用いてライブラリー全体をパッケージングする。次いで、このファージを用いて、ファージ感受性の細菌培養物（例えば、大腸菌株）に感染させる。ファージは複製し、細胞を溶解し、溶解産物が細菌細胞破片から単離される。ファージ溶解産物は繊維状ファージを含み、この繊維状ファージは、免疫化動物から単離されたクローニングされた重鎖および軽鎖を表面上に発現している。一般的に、重鎖および軽鎖は F a b 抗体断片としてファージ表面上に存在し、F a b の重鎖は、融合ポリペプチドの繊維状ファージ膜アンカー部分

10

20

30

40

50

を介してファージ表面に固定されている。軽鎖は、抗原結合部位を形成するように重鎖に結合している。キメラ抗体を作成する方法は、このような手順を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる、1989年3月28日に発行されたキャビリイ (C a b i l l y) らへの米国特許第4,816,567号に記載されている。さらに、ボブルゼカ (B o b r z e c k a) ら (1980) *Immunology Letters*, 2, 151-155頁およびコンイエンジ (K o n i e c z n y) ら (1981) *Hematologia* 14 (1) 85-91頁を参照のこと。これらも参照として本明細書に組み入れられる。

【0092】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーからのPrPC抗原特異的Fabの選択

10

PrPCでは入手できないPrPCエピトープに特異的に結合する抗体またはFabを発現するファージは、モノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体を同定および単離するための任意の様々なプロトコルを用いて単離することができる。このような方法として、イムノアフィニティ精製 (例えば、抗原が結合しているカラムにファージを結合させる) および抗体パニング法 (例えば、抗原に対して高結合親和性のファージを選択するために、固体支持体に結合した抗原にファージを繰り返し結合させる) が挙げられる。好ましくは、ファージは、当技術分野において周知の技法を用いてパニングによって選択される。

【0093】

例示的なパニングプロトコルは2回繰り返して行われる。第1回のパニングは、ウシ残基90-145に対応するC末端ピオチン化合物ペプチドに対して行われる。ペプチドは、全ての抗体の単離を容易にするために支持層に固定化される (例えば、ストレプトアビジンで高密度に予めコーティングされているELISAプレートに取り付けられる)。ペプチドを結合させ、結合クローンを単離した後、選択されたファージがPrPCタンパク質 (例えば、天然の有蹄類PrPCまたはキメラマウス/有蹄類PrPC) に対してパニングされる。記載のように (ウィリアムソン (W i l l i a m s o n), R. A., D. ペレズ (P e r e t z) ら (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7279-7282; ペレズ, D., R. A. ウィリアムソンら (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 614-622)、選択されたFabは大腸菌において発現され、精製される。

20

30

【0094】

抗PrPC抗体を発現するファージを同定および単離した後、このファージを用いて細菌培養物に感染させ、1個のファージ単離物を同定することができる。前記の方法の一つまたは複数を用いて、別個の各ファージ単離物を再スクリーニングすることができる。抗原に対するファージの親和性をさらに確認し、および/または抗原に対するファージの相対的な親和性を決定するために、抗体またはFabをコードするDNAをファージから単離し、当技術分野において周知の方法を用いて、ベクターに含まれる重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列を決定することができる (例えば、サンプルックら, 前記を参照のこと)。

【0095】

ファージディスプレイ抗体ライブラリーから選択されたファージからの可溶性Fabの単離

40

可溶性抗体またはFabは、抗体重鎖用の発現カセットに結合している繊維状ファージアンカー膜タンパク質をコードするDNAを切り出すことによって改変ディスプレイから生成することができる。好ましくは、アンカー膜をコードするDNAには、重鎖発現カセットの残りを破壊することも発現ベクターの他のどの部分も破壊することなくアンカー膜配列の切り出しを可能にする便利な制限部位が隣接している。そのため、アンカー膜配列のない改変ベクターは、改変ベクターを用いた細菌細胞のパッケージングおよび感染後に可溶性重鎖ならびに可溶性軽鎖の生成を可能にする。

【0096】

または、ベクターが適切な哺乳動物発現配列を含む場合、Fab発現のために真核細胞 (

50

例えば、哺乳動物細胞または酵母細胞、好ましくは、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）を形質転換するのに、この改変ベクターを使用することができる。改変ベクターが真核細胞発現をもたらさない場合、ベクターは、好ましくは、適切なベクターにサブクロニングするために重鎖発現カセットおよび軽鎖発現カセットを両方とも1個のDNA断片として切り出すことができる。原核細胞および/または真核細胞においてタンパク質を発現させるための非常に多くのベクターが市販されており、および/または当技術分野において周知である（例えば、サンプルックら、前記を参照のこと）。

【0097】

PrP遺伝子およびPrPタンパク質の詳細

多くの異なる動物種についてPrP遺伝子を構成する遺伝物質が知られている（ガブリエル（Gabriel）ら（1992）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9097-9101を参照のこと）。さらに、異なる哺乳動物のPrP遺伝子の間にはかなりの相同性がある。PrP遺伝子についてかなりの遺伝的相同性があるが、場合によっては差が顕著である。さらに詳細に述べると、異なる哺乳動物のPrP遺伝子によりコードされるタンパク質にわずかな差があるために、ある哺乳動物（例えば、ヒト）に感染するプリオンは、通常、別の哺乳動物（例えば、マウス）に感染しない。この「種の壁」のために、一般的に、特定の試料が、通常、異なる種の動物（例えば、ヒト）に感染するプリオンを含むかどうかを確かめるために、マウスなどの正常な動物（すなわち、操作されたPrPタンパク質に関連する遺伝物質を有さない動物）を使用することは不可能である。本発明は、有蹄類に由来する試料中のプリオンを検出するために、有蹄類PrP遺伝子またはキメラ有蹄類PrP遺伝子を有する組換えトランスジェニック動物を使用する方法を提供する。本発明の抗体は、これらの有蹄類プリオンをアッセイ法において検出することができる手段を提供する。

【0098】

精製された感染性プリオンの主成分（PrP²⁷⁻³⁰と呼ばれる）は、遍在性細胞タンパク質PrP^Cの疾患を引き起こす形態である大きな天然タンパク質PrP^{Sc}のプロテイナーゼK耐性コアである。PrP^{Sc}はスクレイピーに感染した細胞にしか見られないが、PrP^Cは感染細胞および非感染細胞の両方に存在し、このために、PrP^{Sc}は、感染性プリオン粒子の唯一ではないが主要な成分とみなされる。PrP^CおよびPrP^{Sc}は両方とも同じシングルコピー遺伝子によってコードされるので、多大な労力が、PrP^CからPrP^{Sc}が生じる機構の解明に向けられてきた。この目標の中心をなすのは、これらの2つの分子間の物理的および化学的な差の特徴付けであった。PrP^{Sc}とPrP^Cを区別する特性として、低い溶解度（メヤー（Meyer）ら（1986）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3693-7）、不十分な抗原性（カスクサク（Kascsak）ら（1987）「スクレイピー関連線維タンパク質に対するマウスポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体（Mouse Polyclonal and Monoclonal Antibody to Scrapie-Associated Fibril Proteins）」J. Virol. 61（12）: 3688-3693；セルバン（Serban）ら（1990）、Neurology 40: 110-117）、プロテアーゼ耐性（オエシュ（Oesch）ら（1985）、Cell 40: 735-746）、ならびにスクレイピーに罹患した脳で見られるPrP^{Sc}アミロイド斑に超微細構造および組織化学レベルで非常によく似た棒状凝集体へのPrP²⁷⁻³⁰の重合（プルシナーら（1983）Cell）が挙げられる。プロテイナーゼKを用いることで、PrP^Cを変性することができるが、PrP^{Sc}を変性することはできない。現在、PrP^{Sc}への変換につながる、PrP^Cでの移行後化学修飾を特定しようとする試みは無駄なことが判明している（スタール（Stahl）ら（1993）Biochemistry）。その結果として、PrP^CおよびPrP^{Sc}が実際に同じ分子の配座異性体であることが提唱されている。

【0099】

従来の技法を用いたPrPの構造を図示することは、溶解度および十分な量の純粋なタンパク質を生成することの難しさの問題によって妨げられてきた。しかしながら、PrPCおよびPrPScは構造が異なる。いくつかの種に由来するPrPsのアミノ酸配列に基づく理論計算から、分子内に4つの推定らせんモチーフがあることが予測された。実験によって得た分光分析データから、PrPCでは、これらの領域はヘリックス配置をとり、実質的にシートがないことが分かった(パン(Pan), K.M.ら(1993)PNAS 90:10962:6)。非常に対照的に、同じ研究において、PrPScおよびPrP27-30はかなりのシート含有量を有することが見出され、これはアミロイドタンパク質に特有のものである。さらに、PrPアミノ酸残基90-145に対応する、伸長された合成ペプチドを用いた研究から、これらの短縮された分子は、溶液条件を変えてヘリックス構造またはシート構造のどちらにも変換できることが証明された。PrPCからPrPScへの移行には、以前にはヘリックスであった領域がシート構造をとることが必要である。

10

【0100】

前記で引用された刊行物に記載のタイプの抗体がPrPCに結合するが、PrPScには結合しない理由は完全に分かっていない。どの特定の理論にも拘束されるつもりはないが、タンパク質がPrPC構造にある時に暴露されているエピトープが、タンパク質が比較的不溶性であり、密に折り畳まれているPrPSc立体配置では変化し、暴露されず、または部分的に隠されているために、このようなことが起こり得ることが示唆される。PrPScへのわずかな結合が起こる可能性があるので、抗体がPrPCに結合するがPrPScには結合しないと述べるのは絶対という点から見ると間違っていると指摘される(しかし、一般に受け入れられている点から見ると正しい)。本発明のために、結合が起こらないことを示すのは、平衡定数すなわち親和定数Kaが 10^6 l/mol以下であることを意味する。さらに、結合は、Kaが 10^7 l/mol以上、好ましくは 10^8 l/mol以上である時に存在すると認められる。 10^7 l/mol以上の結合親和性は、(1)単一のモノクローナル抗体(すなわち、多数の1種類の抗体)、(2)複数の異なるモノクローナル抗体(例えば、多数の、5種類の異なる各モノクローナル抗体)、または(3)多数のポリクローナル抗体に起因するかもしれない。(1)~(3)の組み合わせを用いることも可能である。

20

【0101】

抗体/抗原結合力

抗原および抗体を結合させる力は、本質的に、任意の2つの非関連タンパク質(すなわち、ヒト血清アルブミンおよびヒトトランスフェリンなどの他の巨大分子)間で生じる非特異的な相互作用となんら違いはない。これらの分子間力は、4つの一般的な分野(1)静電気力;(2)水素結合力;(3)疎水力;および(4)ファンデルワールス力に分類することができる。静電気力は、2つのタンパク質側鎖にある反対に荷電したイオン基間の引力によるものである。引力(F)の力は、電荷間の距離(d)の二乗に反比例する。水素結合力は、-OH、-NH₂、および-COOHなどの親水基間の可逆的な水素結合の形成によって生じる。これらの力は、これらの基を有する2つの分子の密接した位置に大きく依存している。疎水力は、水中の油滴が合体して1個の大きな小滴を形成するのと同じ方法で作用する。従って、バリン、ロイシン、およびフェニルアラニンにある側鎖などの非極性疎水基は水性環境において会合する傾向がある。最後に、ファンデルワールス力は、外側電子雲間の相互作用に依存する分子間で生じる力である。

30

40

【0102】

異なるタイプの力のそれぞれに関するさらなる情報は、「必須免疫学(Essential Immunology)」I.M.ロイティ(Roitt)編(第6版)Blackwell Scientific Publications, 1988から得ることができる。本発明に関して、有用な抗体はこれらの力を全て示す。これらの力が多量に累積したものを得ることで、PrPタンパク質に対して高度の親和性または結合強度を有する抗体、特に、有蹄類PrPCに対して高度の結合強度を有する抗体を得ることが可能であ

50

る。

【0103】

抗体 / 抗原結合強度の測定

抗体と抗原との結合親和性を測定することができる。結合親和性の測定値は、前記の全ての力の測定値を累積したものである。このような測定を行うための標準的な手順が存在し、有蹄類 PrPC を含む PrP タンパク質に対する本発明の抗体の親和性を測定するのに直接適用することができる。

【0104】

抗体 / 抗原結合親和性を測定する 1 つの標準的な方法は透析袋を用いた方法である。透析袋は、抗原は透過するが抗体は透過しない材料からなる容器である。抗体に完全または部分的に結合した抗原を、水などの溶媒に入れた透析袋に入れる。次いで、この袋を、抗体または抗原を含まないが水などの溶媒だけを含む大きな容器に入れる。抗原だけが透析膜を通して拡散できるので、透析袋の中の抗原の濃度および外側の大きな容器の中の抗原の濃度は平衡に達しようとする。透析袋を大きな容器に入れ、平衡に達する時間をとった後、透析袋および周囲容器の中の抗原の濃度を測定し、次いで、濃度の差を求めることが可能である。これによって、透析袋の中の、抗体に結合したままの抗原の量、および抗体から解離し、周囲容器に拡散した量を計算することが可能になる。周囲容器に拡散した抗原を除去するように周囲容器の中の溶媒（例えば、水）を絶えず交換することで、透析袋の中で抗原から抗体を完全に解離させることが可能である。周囲の溶媒を交換しなければ、この系は平衡に達し、反応（すなわち、抗体と抗原との会合および解離）の平衡定数（ K ）を計算することが可能である。平衡定数（ K ）は、透析袋の中の抗原に結合した抗体の濃度 / 遊離の抗体結合部位の濃度 \times 遊離の抗原の濃度に等しい量として計算される。平衡定数すなわち「 K 」値は、一般的にリットル / モルで測定される。 K 値は、抗原および抗体の複合体化形態と比較した遊離状態の抗原と抗体との自由エネルギー（ ΔG ）の差の尺度である。以下で説明するファージディスプレイ法を用いた時に、得られる抗体の親和性すなわち K 値は 10^7 モル / リットル以上である。

【0105】

抗体アビディティ

前記に示したように、「親和性」という用語は、単一の抗原決定基（ $\text{antigen determinant}$ ）に対する抗体の結合を表す。しかしながら、最も現実的な状況では、抗体を多価抗原との相互作用に関心が持たれる。「アビディティ」という用語は、この結合を表すために用いられる。アビディティに寄与する要因は複雑であり、ある特定の血清に含まれる、抗原上の各決定基に対する抗体の不均一性、および決定基それ自体の不均一性を含む。ほとんどの抗原の多価性が、興味深い「ボーナス」効果につながる。ボーナス効果では、抗体による 2 つの抗原分子の結合が、個々の抗体結合の算術和より常に大きく、通常何倍も大きい。従って、抗血清と多価抗原との間で測定されたアビディティは、1 個の抗体と単一の抗原決定基との間の親和性よりいくらか大きいと理解することができる。

【0106】

構造依存性アッセイ法（CDI）

構造依存性アッセイ法すなわち「CDI」は、PrPC を排除するためにプロテイナーゼ K で前消化することなく、脳ホモジネート中の PrPSc 量を直接測定することができる。このアッセイ法は構造成受性であり、PrPC が 100 倍過剰に存在する脳ホモジネート中で比較的低い濃度の PrPSc を検出することができる。ディファレンシャルイムノアッセイ法の前に PrPSc を選択的に沈殿させることで、3,000 倍過剰の PrPC の存在下で PrPSc を測定することができる。現在、このアッセイ法は、5 桁のダイナミックレンジで、脳ホモジネート中の 1 ng/ml 未満の PrPSc を定量することができる（サファー（Safar）, J., H. ウィル（Willie）ら（1998）, Nat. Med., 4（10）: 1157 - 1165）。臨床的に罹患している CJD 患者の脳ホモジネート中のプリオン力価は、 10^6 ID₅₀ 単位 / ml の 5 % 脳ホモジネートに

10

20

30

40

50

等しいか、またはそれより小さいので（未発表データ）、ディファレンシャルイムノアッセイ法は、1 ID50 単位 / ml と小さなプリオン力価を検出することができる。

【0107】

C D Iを用いると、限定されたプロテイナーゼ K 消化の前後に P r P S c 濃度の関数として変性した P r P / 天然の P r P の比をプロットすることで複数のプリオン株を区別することができる。対照的に、限定されたタンパク質分解の後のウエスタンブロッティングでは、1つの株（D Y）（ベッセン（B e s s e n）, R . A . および R . F . マーシュ（M a r s h）（1994）, J . V i r o l . 68 : 7859 - 7868）しか他の7つの株と区別することができなかった。さらに、D Y プリオンにおける P r P S c の比較的増大したプロテアーゼ感受性は、イムノブロッティングによるその濃度の過小評価につながる可能性がある（スコット（S c o t t）, M . R . , D . グロス（G r o t h）ら（1997）, J . V i r o l . 71 : 9032 - 9044）。

10

【0108】

詳細に述べると、有蹄類残基 90 - 120（エピトープ I）に対する抗体は、C D I が乳牛、シカ、エルク、ヒツジ、および他の有蹄類におけるプリオンを検出するのを可能にする。この高親和性抗体は変性したウシ P r P のエピトープ I と相互作用し、C D I アッセイ法が、例えば、試験試料中のウシプリオンの存在を検出するのを可能にする。このエピトープは、C D I の絶対的な感度だけでなく、構造感度にも重要である。C D I の構造感度は、アッセイ法の特異性および P r P S c と P r P C を区別する能力に重要である。

【0109】

20

病原性変異および多型

ヒト P r P 遺伝子には多くの既知の病原性変異がある。さらに、ヒト、ヒツジ、およびウシ P r P 遺伝子には既知の多型がある。本発明の抗体は、P r P 遺伝子の特定の対立遺伝子を認識することに照準を合わせることができる。または、ある種（例えば、ヒト）において病原性であることが知られている多型または変異を、有蹄類 P r P からのペプチドに付加することができる。以下は、このような変異および多型のリストである。

【0110】

【表 1】

| 病原性ウシ変異 | ヒト多型 | ヒツジ多型 | ウシ多型 |
|----------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 2 オクタリピートインサート | コドン129 Met/Val | コドン171 Arg/Glu | 5または6 オクタリピート |
| 4 オクタリピートインサート | コドン219 Glu/Lys | コドン136 Ala/Val | |
| 5 オクタリピートインサート | | | |
| 6 オクタリピートインサート | | | |
| 7 オクタリピートインサート | | | |
| 8 オクタリピートインサート | | | |
| 9 オクタリピートインサート | | | |
| コドン102 Pro-Leu | | | |
| コドン105 Pro-Leu | | | |
| コドン117 Ala-Val | | | |
| コドン145 Stop | | | |
| コドン178 Asp-Asn | | | |
| コドン180 Val-Ile | | | |
| コドン198 Phe-Ser | | | |
| コドン200 Glu-Lys | | | |
| コドン210 Val-Ile | | | |
| コドン217 Asn-Arg | | | |
| コドン232 Met-Ala | | | |

10

20

30

40

50

【0111】

ヒツジおよび乳牛PrP遺伝子のDNA配列は決定されており、このため、どちらの場合でも、各PrPタンパク質の完全なアミノ酸配列を推定することができる。大部分の個体において生じる正常なアミノ酸配列は野生型PrP配列と呼ばれる。この野生型配列は、ある特徴的な多型変化を受けやすい。ヒツジPrPの場合、遺伝子は残基171および136で2つのアミノ酸多型を示すのに対して、ウシPrPは、成熟プリオンタンパクのアミノ末端領域において8アミノ酸モチーフ配列の5回または6回の反復を有する。これらの多型はどれもそれ自体では病原性でないが、プリオン病に影響を及ぼすように見える。野生型PrPタンパク質のこれらの正常変化とは異なり、PrPの特定のアミノ酸残基またはオクタリピートの数を変える、ヒトPrP遺伝子のある特定の変異が同定されており、この変異は遺伝性ヒトプリオン病と共に分離する。

【0112】

変異および多型を証明する前記の表にさらなる意味を与えるために、公表されたPrP遺伝子配列について言及することができる。例えば、ニワトリ、ウシ、ヒツジ、ラット、およびマウスPrP遺伝子が、ガブリエル(Gabriel)ら(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9097-9101に開示および公表されている。シリアンハムスターの配列は、バスラー(Basler)ら(1986)Cell 46:417-428において公表されている。ヒツジPrP遺伝子は、ゴールドマン(Goldmann)ら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2476-2480によって公表されている。ウシPrP遺伝子配列は、ゴールドマン(1991)J. Gen. Virol. 72:201-204において公表されてい

る。ニワトリPrP遺伝子配列は、ハリス(Harris)ら(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7664-7668において公表されている。ミンクPrP遺伝子配列は、クレズシュマー(Kretzschmar)ら(1992)J. Gen. Virol. 73:2757-2761において公表されている。ヒトPrP遺伝子配列は、クレズシュマーら(1986)DNA 5:315-324において公表されている。マウスPrP遺伝子配列は、ロシュト(Locht)ら(1986)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6372-6376において公表されている。ヒツジPrP遺伝子配列は、ウェスタウェイ(Westaway)ら(1994)Genes Dev. 8:959-969において公表されている。これらの刊行物は全て、PrP遺伝子およびPrPアミノ酸配列を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる。

10

【0113】

標準化プリオン調製物

本発明のアッセイ法を試験し、それによってアッセイ法の信頼性を改善するために、標準化プリオン調製物を生成することができる。この調製物は任意の動物から得ることができるが、好ましくは、試験動物のプリオンを含む脳材料を有する宿主動物から得られる。例えば、ウシプリオンタンパク質遺伝子を含むトランスジェニックマウスはウシプリオンを産生することができ、このようなマウスの脳は標準化ウシプリオン調製物を生成するのに使用することができる。さらに、この調製物は「標準」になるので、好ましくは、一組(例えば、100匹、1,000匹、またはより多くの動物)の実質的に同一の動物から得られる。例えば、100匹のマウス(全て、非常に多くのコピー数のウシPrP遺伝子(全ての多型および変異)を含んでいる)は疾患を自発的に発症し、有用な標準化プリオン調製物を作成するために、各マウスからの脳組織を一つにすることができる。標準化プリオン調製物は、1999年6月1日に発行された米国特許第5,908,969号および2000年2月1日に発行された米国特許第6,020,537号に説明および開示される。両方ともその全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0114】

標準化プリオン調製物は、前記のタイプの組換え宿主哺乳動物のどれを用いても生成することができる。例えば、標準化プリオン調製物は、プリオンに感染しやすいように遺伝子組換えされたマウス、ラット、ウサギ、ハムスター、またはモルモットを用いて生成することができる。このプリオンは、一般的に、乳牛、ヒツジ、シカ、またはウマなどの遺伝的に異なる種にしか感染せず、組換え宿主哺乳動物は、プリオン接種後350日以内またはそれより短い期間内でCNS機能不全の臨床兆候を発症する。一つには、使用するのにマウスが安価であり、トランスジェニックマウスの作成に関する経験が他のタイプの宿主動物の作成に関する経験より多く得られているという理由で、最も好ましい宿主哺乳動物はマウスである。標準化プリオン調製物の作成に関する詳細は米国特許第6,008,435号および同第6,020,537号に記載されている。両方とも参照として本明細書に組み入れられる。

30

【0115】

一旦、適切なタイプの宿主(例えば、マウス)が選択されると、次の段階は、標準化プリオン処方物を生成するために用いられる適切なタイプの遺伝子操作を選択することである。例えば、マウスは、本発明のキメラ遺伝子の挿入によって遺伝子組換えされたマウスでもよい。このグループ内で、マウスは、高コピー数のキメラ遺伝子の組み込みによって、および/またはキメラ遺伝子の発現レベルを高めるために複数のプロモーターの組み込みによって組換えされてもよい。または、本発明のハイブリッドマウスを使用することができ、ここで、内因性PrP遺伝子が切除されたマウスと、ゲノムにウシPrP遺伝子が挿入されたマウスを交雑させる。もちろん、このようなハイブリッドマウスの様々な下位区分がある。例えば、ウシPrP遺伝子を高コピー数で挿入してもよく、および/または発現を増強するために複数のプロモーターと共に使用してもよい。さらに別の選択肢では、様々な異なるプリオンに感染しやすい(すなわち、一般的に、2つ以上のタイプの試験動

40

50

物に感染する)マウスを作成するために複数の異なるPrP遺伝子をゲノムに挿入することによって、マウスを作成することができる。例えば、乳牛配列の一部を含むキメラ遺伝子、シカ配列の一部を含む別のキメラ遺伝子、およびヒツジ配列の一部を含むさらに別のキメラ遺伝子を含むマウスを作成することができる。3つの異なるタイプのキメラ遺伝子が全てマウスゲノムに挿入されれば、マウスは、一般的に、乳牛、シカ、およびヒツジにしか感染しないプリオンに感染しやすくなるだろう。

【0116】

適切な哺乳動物(例えば、マウス)および適切な遺伝子組換え法(例えば、MBo2MなどのキメラPrP遺伝子の挿入)を選択した後、次の段階は、プリオン関連遺伝物質の点で実質的に同一である多数のこのような哺乳動物を作成することである。さらに詳しく述べると、作成された各マウスは、実質に同じコピー数でゲノムに存在する同一のキメラ遺伝子を含む。これらのマウスは、マウスの95%以上が、接種後350日以内またはそれより短い期間内でCNS機能不全の臨床兆候を発症し、マウスの全てが、ほぼ同時に(例えば、30日以内に)このようなCNS機能不全を発症するように、プリオン関連遺伝物質の点で遺伝的に十分に同一であるべきである。

10

【0117】

一度に、このようなマウスの大きなグループ、例えば50匹以上、より好ましくは100匹以上、さらにより好ましくは500匹以上が作成される。次の段階は、マウスに、一般的に、遺伝的に異なる哺乳動物にしか感染しないプリオン(例えば、ヒツジ、乳牛、シカ、またはウマなどの有蹄類に由来するプリオン)を接種することである。異なる哺乳動物グループに与える量は異なってもよい。哺乳動物にプリオンを接種した後に、哺乳動物がプリオン感染の症状(例えば、CNS機能不全の臨床兆候)を示すまで観察を行う。プリオン感染の症状を示した後、各哺乳動物の脳または脳組織の少なくとも一部が取り出される。取り出された脳組織はホモジナイズされ、標準化プリオン調製物が得られる。

20

【0118】

トランスジェニックマウスグループに、遺伝的に異なる動物に由来するプリオンを接種する代わりとして、プリオン関連疾患を自発的に発症するマウスを作成することが可能である。これは、例えば、極端に多いコピー数の乳牛PrP遺伝子をマウスゲノムに組み込ませることによって行うことができる。コピー数を、例えば、100コピー以上まで増やすと、マウスはCNS機能不全の臨床兆候を自発的に発症し、脳組織内にはヒトに感染することが可能なプリオンを有する。標準化プリオン調製物を生成するために、これらの動物の脳またはこれらの動物の脳組織の一部を取り出し、ホモジナイズすることができる。

30

【0119】

標準化プリオン調製物は直接使用してもよく、様々な異なる陽性対照を得るように希釈および力価測定してもよい。さらに詳しく述べると、第1の組のトランスジェニック対照マウスに接種するために、様々な既知量のこのような標準化調製物を使用することができる。第2の組の実質的に同一のマウスには、試験しようとする材料(すなわち、プリオンを含む可能性のある材料)が接種される。第3のグループの実質的に同一のマウスにはどの材料も注射しない。次いで、3つのグループを観察する。もちろん、第3のグループは、どの材料も注射しなかったので発症しないはずである。このようなマウスが発症すれば、アッセイ法は不正確である(恐らく、疾患を自発的に発症するマウスを作成した結果が原因である)。標準化調製物を注射した第1のグループが発症しなければ、このアッセイ法も不正確である。なぜなら、一般的に遺伝的に異なる哺乳動物にしか感染しないプリオンを接種した時に発症するように、マウスが正しく作成されなかったためである。しかしながら、第1のグループが発症し、第3のグループが発症しなければ、アッセイ法は正確であるとみなされる。従って、第2のグループが発症しなければ、試験材料はプリオンを含まず、第2のグループが発症すれば、試験材料はプリオンを含んでいる。

40

【0120】

本発明の標準化プリオン調製物を使用することによって、極端に希釈したプリオン含有組成物を作成することが可能である。例えば、1ppm以下、さらに1ppb以下のプリオ

50

ンを含む組成物を作成することができる。このような組成物は、プリオンの存在の検出における本発明の抗体、アッセイ法、および方法の感度を試験するのに使用することができる。

【0121】

プリオン調製物は、一定量のプリオンを含み、同質遺伝子背景から抽出される点で望ましい。従って、調製物中の汚染物質は一定であり、制御することができる。標準化プリオン調製物は、有蹄類を使用することによって製造された様々な医薬品、製品（食品、化粧品などを含む）にプリオンがもしあれば、その存在を確かめるためにバイオアッセイ法を実施する際に有用である。

【0122】

有用な適用

前記で示され、以下で詳細な実施例においてさらに説明されるように、広範囲の異なる抗体（すなわち、異なる特異性を有する抗体）を作成するために本発明の方法を使用することが可能である。例えば、単一の有蹄類種に天然に生じるPrPCタンパク質にのみ結合し、他の種に天然に生じるPrPCタンパク質には結合しない抗体を作成することができる。さらに、有蹄類プリオンタンパク質の非感染形態（例えば、PrPC）にのみ結合し、感染形態（例えば、PrPSc）には結合しないように抗体を設計することができる。次いで、アッセイ法装置を作成するために、単一の抗体または一組の異なる抗体を使用することができる。このようなアッセイ法装置は、当業者に周知の従来の技術を用いて作成することができる。抗体を、周知の技法を用いて精製および単離し、周知の手順を用いて支持体表面に結合させることができる。結果として生じる抗体が結合した表面は、試料が一つまたは複数のタイプの抗体を含むかどうかを確かめるために、試料をインビトロでアッセイするのに使用することができる。

【0123】

抗体は、米国特許第5,891,641号に記載のタイプのCDIアッセイ法を実施する際に最も有用である。さらに、抗体は、治療の際に、PrPCに結合させ、それによってPrPCがPrPScに変換するのを妨げることによって使用することができる。

【0124】

商業用アッセイ法

本発明の一態様は、1)効果的にPrPCを分解し、PrPScを変性する酵素で試料を消化するか、またはPrPCを分解するがPrPScを分解しない酵素、次いで、PrPScを変性する酵素を用いて連続的に処理し、2)本発明の抗体を用いて変性したPrPScを検出することによって、有蹄類試料中のPrPScの検出を可能にする商業用アッセイ法を特徴とする。例えば、ウシPrPタンパク質（すなわち、PrPCおよびPrPSc）を含む試料を、プロテイナーゼK（PK）消化を用いて変性することができる。このような酵素の使用はPrPCを消化するが、PrPScを消化しない。プロテイナーゼK消化後、試料を、PrPScを変性するようにさらに処理し、適切な結合条件下で本発明の抗体と接触させる。好ましくは、抗体を支持層に結合させ、試料と、抗体が結合した支持層材料が容易に接触できるように配置することができる。材料が支持層上の抗体に結合すれば、感染性PrPScの存在が確かめられる。

【0125】

別の態様において、試験しようとする試料を2つの部分に分割し、一方を、試料中のPrPCを破壊することなく試料中のPrPScを変性するように消化する。両部分を本発明の抗体と接触させる。抗体は、処理されていない部分のPrPCならびに処理された部分のPrPCおよびPrPScの両方に結合する。PrPCまたはPrPC+PrPScの濃度が検出され、試料中のPrPSc量が、2つの試料間の検出可能なシグナルの差から明らかになる。

【0126】

本発明の商業的な態様において、サンドイッチ型アッセイ法において本発明の抗体を使用することが望ましい場合もある。さらに詳細に述べると、本発明の抗体を支持層の支持体

10

20

30

40

50

表面に結合させることができる。試験しようとする変性した試料と支持体表面を結合が可能な条件下で接触させる。その後、未反応部位をブロックし、表面と、表面上のタンパク質に結合する汎用抗体 (generalized antibody) を接触させる。汎用抗体は検出可能な標識と結合している。検出可能な標識を有する汎用抗体は、支持体表面上の抗体に結合した変性した PrPSc に結合する。結合が起これば、例えば、発色させることで標識は検出可能になり、それにより、試料中の PrPSc の存在を間接的に示す標識の存在が分かる。このアッセイ法は、1 ppm 以下、さらに 1 ppb 以下の量で存在する変性した PrPSc を検出することができる。PrPSc は、(a) 動物供給源から抽出された治療有効成分を含む薬学的処方物、(b) 食品、(c) ヒト供給源から取り出された器官、組織、体液、または細胞、(d) 注射可能物質、経口薬、クリーム、座薬、および肺内送達処方物などの動物性製品、(e) 化粧品、ならびに (f) 哺乳動物細胞培養物から抽出された薬学的に有効な化合物からなる群より選択される供給源に存在してもよい。

10

【0127】

実施例

以下の実施例は、当業者に、本発明を製造および使用方法の完全な開示および説明を提供するために示され、本発明とみなされるものの範囲を限定することが意図されない。使用された数字 (例えば、量、温度、濃度など) を確実なものにするために努力が払われたが、ある程度の実験誤差および偏差を見込んでおくべきである。特に指示のない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は雰囲気圧であるか、または雰囲気圧に近い。

20

【0128】

実施例 1 : 抗ウシ抗体の同定および単離

Prnp0/0 マウスを用いて、ウシ PrPC または変性した PrPSc を認識する抗体を作成した。マウスを、KLH に結合した合成ウシ PrPC ペプチド (ウシ PrP の残基 96 - 115 に対応する) で免疫化した。ファージディスプレイライブラリーを、同一抗原に対して高力価の血清を示すマウスに由来する脾臓および骨髓から構築した。その後、本発明者らは、様々な長さの合成 PrP ペプチドおよび組換え PrP 抗原に対してライブラリーをパニングし、32 個の異なる陽性クローンを選択した。選択されたクローンを CDIFォーマットの ELISA によってスクリーニングし、脳ホモジネートのウエスタン

30

クローン P

ELVMTQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGNNLNWIQQKPDGTIKRLIYATSSLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLT
ISSLESEDFADYYCLQHDTFPLTFGGGTKLEIKRTVAA (配列番号 :1)

【0129】

単離された重鎖は以下の通りであった。

40

FR2

クローン P EVQLLEQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIEDSYIH WVKQRPEQ (配列番号 :2)

クローン S EVQLLEQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIEDYYIH WVIQRPGQ (配列番号 :3)

FR2

FR3

クローン P GLEWIG RIDPEDGETKYAPKFQG KATITADTSSNTAYLHLRRLTS (配列番号 :4)

クローン S GLEWIG RIDPEDGETKYAPKFQD KATLTADTSSNTAYLHLRSLTS (配列番号 :5)

FR3

FR4

クローン P EDTAIYYCGR GAYYIKEDF- WGQGTTLTVSSASTK (配列番号 :6)

クローン S EDTAIYFCGR NDGLYAGQDY WGQGTTLTVSSASTK (配列番号 :7)

10

【0130】

I g Gファージディスプレイライブラリーは、1つのベクターがベクターの第1の発現カセットに重鎖断片をコードするcDNAインサートを含み、ベクターの第2の発現カセットに軽鎖断片をコードするcDNAインサートを含むように、I g G重鎖断片をコードする増幅cDNAおよび軽鎖をコードする増幅cDNAをファージディスプレイベクター(例えば、pComb3ベクター)に挿入することによって構築された。連結されたベクターを、当技術分野において周知の方法を用いて繊維状ファージM13によってパッケージングし、ファージ粒子数を増幅させるために大腸菌培養物に感染するのに使用した。細菌細胞の溶解後、ファージ粒子を単離し、パニング手順に使用した。作成されたライブラリーをウシプリオン含有組成物に対してパニングした。次いで、ウシPrPCに選択的に結合する抗体断片を単離した(バルバス(Barbas), C. F., IIIおよびD. R. ブルトン(Burton)(1996) Trends Biotechnol. 14: 230-234; ウィリアムスン(Williamson), R. A., D. プレッツ(Perez)ら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7279-7282.; ウィリアムスン, R. A., D. プレッツら(1998) J. Virol. 72: 9413-9418)。組換えマウスFabのO、P、およびSのエピトープは、BoPrP(90-145)配列に対応し3残基重複する合成デカペプチドライブラリーを用いてマッピングされた。3つ全てのFabが、ウシPrPの残基96-105の単一線状エピトープのみと反応した。しかしながら、P抗体は他の種における類似配列に対して広範囲の特異性を示し、共通のエピトープモチーフは、HG(S, N)QWNKPSKPKTN(配列番号: 8および9)とまとめることができる。このエピトープは、ウシ、ミュールジカ、オジロジカ(white-tail deer)、ロッドデアー(rod deer)、エルク、ラクダ、クーズー、ヤギ、ヒツジ、およびブタを含む全ての有蹄類PrP配列に存在する。さらに、このエピトープは、フェレット、ネコ、ミンク、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、プレスビティス(presbitis)、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、マカク、クモザル、リスザル、ヒヒ、およびマーモセットなどの他の種に由来するPrP配列にも存在する。従って、Pクローンは、前記で列挙された全てのPrPを等しく認識すると予想される。クローンPを用いた抗体をEu-(HuM)Fab Pとして単離し、クローンSを用いた抗体をEu-(HuM)Fab Sとして単離した。

20

30

40

【0131】

実施例2: マウス脳ホモジネートにおけるキメラウシPrPの検出

構造依存性イムノアッセイ法(CDI)を用いて、単離された抗体Eu-(HuM)Fab PおよびEu-(HuM)Fab Sを、キメラMBo2M PrPを検出する感度について試験した。キメラ組換えタンパク質rPrP(MBo2M)を5% PrP0/0マウス脳ホモジネートで希釈し、2種類のウシ抗PrPC抗体を、天然のPrPC形態のタンパク質を検出する能力について試験した。簡単に述べると、PrPタンパク質を発現しないPrnp0/0マウスの脳を、氷上で、PBS(pH7.4)中でPower Genホモジナイザー(フィッシャーサイエンティフィク(Fisher Scien

50

t i f i c) , P i t t s b u r g h , P A) に 3×30 秒押し付けることでホモジネートした。結果として生じた 10% (w/v) ホモジネートを卓上遠心分離器で 500g で 5 分間回転させた。上清を、 PBS ($\text{pH} 7.4$) に溶解した 4% サルコシルと $1:1$ で混合した。精製組換え PrP ($\text{MBo}2\text{M}$) をホモジネートで希釈し、各試料を 2 つのアリコート: (1) 処理されないアリコート (天然のアリコートと呼ぶ); (2) 最終 4M Gdn HCl と混合し、 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ で 5 分間加熱したアリコート (変性したアリコートと呼ぶ) に分けた。両試料を H_2O で 20 倍に希釈し、 PBS に溶解した 0.2% グルタルアルデヒドで 1 時間活性化したポリスチレンプレートの上にアリコートを置いた。 5°C で一晩インキュベートしたプレートを、 0.5% BSA (w/v) および 6% ソルビトール (w/v) を含む TBS ($\text{pH} 7.8$) でブロックした。

10

【0132】

試料を、 0.05% (v/v) $\text{Tween } 20$ を含む TBS ($\text{pH} 7.8$) で 3 回洗浄し、ユーロピウム標識キメラ組換え Fab P および S と 2 時間インキュベートした。ユーロピウム標識供給業者 (ワラック (Wallac Inc.), Turku, Finland) により供給された強化液 (enhancement solution) でさらに洗浄した後にプレートを発色させ、 Discovery (パッカー (Packard Inc.)) 時間分解蛍光分光計を用いてシグナルを評価した。記載のように (サファー (Safar), $\text{J.}, \text{H.}$ ウィリー (Willie) ら (1998) Nat. Med. , 4 (10): $1157 - 1165$), PrP 濃度を計算し、様々な抗体濃度に対してプロットした (図 3)。データ点およびバーは平均濃度を表す。 SEM は、抗体濃度 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ での 3 回の独立した実験から得た。両組換え抗体におけるユーロピウム密度は $4.3\text{ Eu}/\text{Fab}$ である。

20

【0133】

実施例 3: マウス脳ホモジネートにおけるウシ PrP^{Sc} の検出感度

$\text{Eu} - (\text{HuM}) \text{Fab P}$ を用いて、 BSE 感染 Tg (BoPrP) マウス脳ホモジネート中のウシ PrP^{Sc} を検出した。実施例 2 に記載のように調製した、 2% サルコシル (w/v) に溶解した BSE 感染 5% (w/v) 脳ホモジネートの連続希釈を含む試料を、 CDI の前に、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテイナーゼ K で処理し、 0.3% (w/v) NaPTA および 1.7 mM MgCl_2 で濃縮した。 PTA 沈殿の後、各試料を 2 つのアリコート: (1) 処理されないアリコート (天然のアリコートと呼ぶ); (2) 4M Gdn HCl と混合し、 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ で 5 分間加熱したアリコート (変性したアリコートと呼ぶ) に分けた。両試料を H_2O で 20 倍に希釈し、 PBS に溶解した 0.2% グルタルアルデヒドで 1 時間活性化したポリスチレンプレートの上にアリコートを置いた。 5°C で一晩インキュベートしたプレートを、 0.5% BSA (w/v) および 6% ソルビトール (w/v) を含む TBS ($\text{pH} 7.8$) でブロックした。次いで、試料を、 0.05% (v/v) $\text{Tween } 20$ を含む TBS ($\text{pH} 7.8$) で 3 回洗浄し、ユーロピウム標識キメラ組換え Fab P および S と 2 時間インキュベートした。ユーロピウム標識供給業者 (ワラック, Turku, Finland) により供給された強化液によるさらに 7 回の洗浄段階後に、プレートを発色させた。 Discovery (パッカー) 時間分解蛍光分光計を用いてシグナルを評価し、記載のように (サファー, $\text{J.}, \text{H.}$ ウィリー ら (1998) Nat. Med. , 4 (10): $1157 - 1165$), PrP 濃度を計算した。各試料からの天然のアリコートおよび変性したアリコートをグルタルアルデヒド活性化 ELISA プレートに架橋させ、両アリコートをユーロピウム標識 ($\text{HuM}) \text{Fab P}$ 抗体とインキュベートした。洗浄後、 Discovery (パッカー) 時間分解蛍光分光計を用いてシグナルを評価した。結果は、各試料の変性した (TRFD) アリコートおよび天然の (TRFN) アリコートからのシグナルの比 (図 4) または差 (図 5) として表す。 BoPrP^{Sc} の検出のダイナミックレンジは $100,000$ 倍であることが分かった。

30

40

【0134】

実施例 4: 乳牛脳ホモジネートにおけるウシ PrP^{Sc} の検出感度

50

Eu - (HuM) Fab Pを用いて、BSE感染乳牛のホモジネート中のウシPrPScも検出した。BSE感染乳牛および正常な乳牛の脳を、氷上で、PBS (pH 7.4) 中でPower Genホモジナイザー (フィッシャーサイエンティフィック, Pittsburgh, PA) に3×30秒押し付けることでホモジネートした。結果として生じた10% (w/v) ホモジネートを卓上遠心分離器で500gで5分間回転させた。上清を、PBS (pH 7.4) に溶解した4%サルコシルと1:1で混合した。6つのBSE感染脳ホモジネートを正常乳牛脳ホモジネートで連続希釈し、各アリコート、まず最初に、5μg/ml プロテイナーゼKで37℃で1時間処理した。0.5mM PMSFおよびアプロチニンおよびロイペプチン (各2μg/ml) で反応物をブロックした後、記載のように (サファール, J., H. ウィリーら (1998) Nat. Med., 4 (10): 1157-1165)、試料をNaPTAおよびMgCl₂で沈殿させ、各試料を2つのアリコート: (1) 処理されないアリコート (天然のアリコートと呼ぶ); (2) 4M Gdn HClと混合し、80~100℃で5分間加熱したアリコート (変性したアリコートと呼ぶ) に分けた。両試料をH₂Oで20倍に希釈し、PBSに溶解した0.2%グルタルアルデヒドで1時間活性化したポリスチレンプレートの上にアリコートを置いた。5℃で一晩インキュベートしたプレートを、0.5% BSA (w/v) および6% ソルビトール (w/v) を含むTBS (pH 7.8) でブロックした。

【0135】

試料を、0.05% (v/v) Tween 20を含むTBS (pH 7.8) で3回洗浄し、ユーロピウム標識キメラ組換えFab Pと2時間インキュベートした。ユーロピウム標識供給業者 (ワラック, Turku, Finland) により供給された強化液によるさらなる洗浄段階後に、プレートを発色させた。Discovery (パッカーカード) 時間分解蛍光分光計を用いてシグナルを評価し、記載のように (サファール, J., H. ウィリーら (1998) Nat. Med., 4 (10): 1157-1165)、PrP濃度を計算した。Eu - (HuM) Fab Pを用いて、ウシPrPScがBSE感染英国産乳牛の脳ホモジネート中に検出された。BoPrPScの検出のダイナミックレンジは、2%サルコシル (w/v) に溶解したBSE感染5% (w/v) 脳ホモジネートの連続希釈を含む試料中で100,000倍である。この試料は、CDIの前に、5μg/ml プロテイナーゼKで処理され、0.3% (w/v) NaPTAおよび1.7mM MgCl₂で濃縮された。各試料の天然のアリコートおよび変性したアリコートをインキュベートし、各試料からの変性した (TRFD) アリコートおよび天然の (TRFN) アリコートからのDiscovery (パッカーカード) 時間分解蛍光分光計を用いて評価した。結果は、各試料の変性した (TRFD) アリコートおよび天然の (TRFN) アリコートからのシグナルの比 (図6) または差 (図7) として表す。

【0136】

実施例5: 感染乳牛脳ホモジネートにおけるウシPrPScに対する抗体の株感度

BSE株の特徴の差によるEu - (HuM) Fab P検出の差を、32匹の異なるBSE感染英国産乳牛からのホモジネートを用いて確かめた。32匹のBSE感染乳牛および7匹の正常な米国産乳牛の脳を、氷上で、PBS (pH 7.4) 中でPower Genホモジナイザー (フィッシャーサイエンティフィック, Pittsburgh, PA) に3×30秒押し付けることでホモジネートした。結果として生じた10% (w/v) ホモジネートを卓上遠心分離器で500gで5分間回転させた。上清を、PBS (pH 7.4) に溶解した4%サルコシルと1:1で混合した。BSE感染脳ホモジネートを非接種Tg (Bo) マウスホモジネートで連続希釈し、各アリコートを、まず最初に、5μg/ml プロテイナーゼKで37℃で1時間処理した。0.5mM PMSFおよびアプロチニンおよびロイペプチン (各2μg/ml) で反応物をブロックした後、記載のように (サファール, J., H. ウィリーら (1998) Nat. Med., 4 (10): 1157-1165)、試料をNaPTAおよびMgCl₂で沈殿させ、各試料を2つのアリコート: (1) 処理されないアリコート (天然のアリコートと呼ぶ); (2) 4M Gdn HClと混合し、80~100℃で5分間加熱したアリコート (変性したアリコートと呼ぶ) に分け

た。両試料をH₂Oで20倍に希釈し、PBSに溶解した0.2%グルタルアルデヒドで1時間活性化したポリスチレンプレートの上にアリコートをした。5で一晚インキュベートしたプレートを、0.5%BSA(w/v)および6%ソルビトール(w/v)を含むTBS(pH7.8)でブロックした。

【0137】

次いで、試料を、0.05%(v/v)Tween 20を含むTBS(pH7.8)で3回洗浄し、ユーロピウム標識キメラ組換えFab Pと2時間インキュベートした。ユーロピウム標識供給業者(ワラック, Turku, Finland)により供給された強化液によるさらなる洗浄段階後に、プレートを発色させた。Discovery(パッカーード)時間分解蛍光分光計を用いてシグナルを評価し、記載のように(サファール, J., H. ウィリーら(1998) Nat. Med, 4(10): 1157-1165)、PrP濃度を計算した。PrP²⁷⁻³⁰濃度を、32匹のBSE感染英国産乳牛および12匹の米国産対照でのCDIによって求められた変性/天然の比に対してプロットした(図8)。このデータは平均±SEMとして表す。以前に記載されたように(サファール, J., H. ウィリーら(1998) Nat. Med, 4(10): 1157-1165)、PrP²⁷⁻³⁰濃度を計算した。

10

【0138】

実施例6: Eu-(HuM)Fab Pの異種間感度

次いで、ミュールジカ、エルク、およびオジロジカを含む様々な有蹄類種においてプリオンを検出する能力について、Eu-(HuM)Fab P抗体を試験した。慢性消耗病(CWD)に感染したミュールジカ、エルク、オジロジカ、および正常対照の脳ホモジネートを、これらの異なる種においてEu-(HuM)Fab P抗体がプリオンを認識する能力を確かめるために実施例4と同様に処理した。PrP^{Sc}に対するCDI試験の結果を図9および10に示す。結果は、各試料の変性した(TRFD)アリコートおよび天然の(TRFN)アリコートからの時間分解蛍光(TRF)シグナルの比(図9)または差(図10)として表す。

20

【0139】

実施例7: CWDに感染したシカにおけるプリオンの検出

Eu(HuM)Fab Pを用いて、CWDに感染したシカの脳ホモジネートにおいてシカPrP^{Sc}を検出した。2%サルコシル(w/v)に溶解したCWD感染5%(w/v)脳ホモジネートの連続希釈を含む試料を、CDIの前に、5μg/mlプロテイナーゼKで処理し、0.3%(w/v)NaPTAおよび1.7mM MgCL₂で濃縮した。各試料からの天然のアリコートおよび変性したアリコートをグルタルアルデヒド活性化ELISAプレートに架橋させ、両アリコートをユーロピウム標識(HuM)Fab P抗体とインキュベートした。7回の洗浄段階後、Discovery(パッカーード)時間分解蛍光分光計を用いてシグナルを評価した。結果は、各試料の変性した(TRFD)アリコートおよび天然の(TRFN)アリコートからのシグナルの比(図11)または差(図12)として表す。

30

【0140】

実施例8

スクレイピー感染シリアンハムスターの脳ホモジネートを用いた以下の実施例においてアッセイ法が証明される。これは、乳牛または有蹄類の脳に適用された方法と同様に行った。ホモジネートをPrn P0/0マウス脳ホモジネートで4倍に希釈する。

40

【0141】

a) 各プレートを、変性したSHaPrP⁹⁰⁻²³¹の5つの希釈点からなる内部標準で校正する。総PrPの時間分解蛍光(TRF)をEu標識3F4 IgGで発色させ、時間分解蛍光値をPrP濃度の関数としてプロットする。データを、最小2乗法を用いて一次方程式または多項方程式にフィットさせ、変性したPrPの計算のために最も良い関数を選択する。

$$\text{PrP} [\mu\text{g/ml}] = -0.22935 + 0.00026567 * [\text{TRF}] + 0.0000000012255 * [\text{TRF}]^2 \quad (1)$$

【 0 1 4 2 】

b) 残りのプレートにおいて、スクレイピー感染シリアンハムスター脳ホモジネートの天然のアリコートおよび変性したアリコートを4倍に希釈し、プラスチック支持体に架橋させ、Eu標識3F4 IgGとインキュベートした。前記の式に従って、総PrP含有量を、変性した試料の蛍光シグナルから計算した。

【 0 1 4 3 】

【表 2】

| スクレイピー感染脳 ホモジネートの濃度 [%] | 天然のTRF [cpm] | 変性した TRF [cpm] | PrPC+Sc [μg/ml] |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| 5 | 4214 | 109814 | 43.7 |
| 1.25 | 1381 | 30804 | 9.1 |
| 0.3125 | 1070 | 11240 | 2.9 |

10

20

【 0 1 4 4 】

c) 変性した試料と天然の試料との蛍光シグナルの比を計算する。

【表 3】

| スクレイピー感染脳 ホモジネートの濃度 [%] | 天然のTRF [cpm] | 変性した TRF [cpm] | 変性 / 天然比 |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|----------|
| 5 | 4214 | 109814 | 26.1 |
| 1.25 | 1381 | 30804 | 22.3 |
| 0.3125 | 1070 | 11240 | 10.5 |

30

【 0 1 4 5 】

正常ハムスター脳ホモジネートから求められたPrPCの正常値は2.2である。2.2を超える値は異常とみなされ、PrPScの存在を示す。

【 0 1 4 6 】

d) 天然の状態から変性した状態に移行した際の、ヘリックスPrPについて予想される蛍光シグナルを超える過剰な蛍光シグナルはPrPScの量の尺度であり、示された式に従って計算される。

$$F_{nd} = F_d - (F_n * f_{nd}) \quad (2)$$

40

式中、fは、PrPCが天然の状態から変性した状態に移行した際の蛍光シグナルの要因の最大値である。Fdは変性した試料の蛍光であり、Fnは天然の試料の蛍光である。次いで、PrPSc量が、Fndおよび式(1)から計算される。

【 0 1 4 7 】

【表 4】

| スクレイピー感染脳 ホモジネートの濃度 [%] | $\Delta\text{TRF}\beta_{\text{n-d}}$ [cpm] | PrPSc [$\mu\text{g/ml}$] |
|-------------------------------|---|-------------------------------|
| 5 | 100543.2 | 38.9 |
| 1.25 | 27765.8 | 8.1 |
| 0.3125 | 8886 | 2.2 |

【0148】

10

シート形態のプリオンタンパク質に対して計算された正の値は、PrPScの存在を示す。

【0149】

本発明は、本発明の特定の態様を参照して説明したが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更が可能であり、等価物で置換できることが当業者に理解されるはずである。さらに、特定の状況、材料、物質の組成物、プロセス、一つまたは複数のプロセス段階を本発明の目的、精神、および範囲に合うように、多くの変更を加えることができる。全てのこのような変更は、添付の特許請求の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本明細書で説明および開示される抗ウシ抗体を用いた、構造依存性イムノアッセイ法(CDI)の工程の流れ図である。 20

【図2】マウスPrPのアミノ酸配列を示し、マウスPrPとウシPrPとの差を具体的に示す。

【図3】Eu-(HuM)Fab PおよびEu-(HuM)Fab SによるキメラMo2M PrPの検出における構造依存性イムノアッセイ法(CDI)の感度を示す。

【図4および5】Eu-(HuM)Fab Pを用いてBSE感染Tg(BoPrP)マウスの脳ホモジネート中にウシPrPScを検出するためのCDIの感度を示す。

【図6および7】Eu-(HuM)Fab Pを用いてBSE感染英国産乳牛の脳ホモジネート中にウシPrPScを検出するためのCDIの感度を示す。

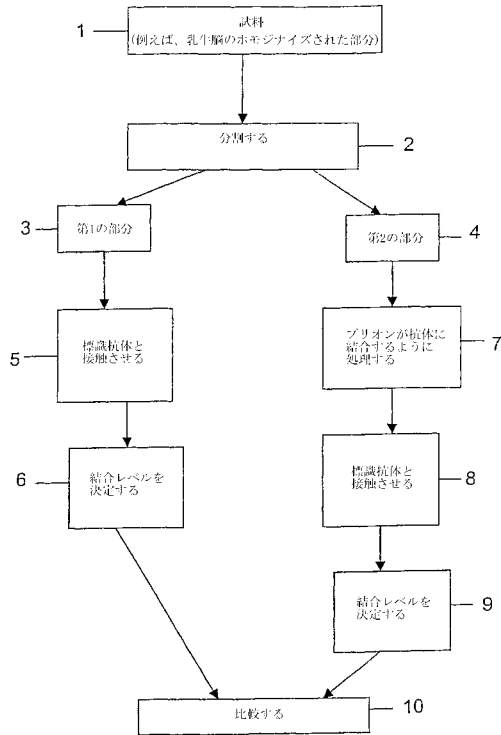
【図8】32匹のBSE感染英国産乳牛および12匹の非感染米国産対照におけるCDIによって確かめられた、変性/天然比に対してプロットされたPrP27-30の濃度を示す。 30

【図9および10】慢性消耗病(CWD)に感染したミュールジカ、エルク、オジロジカ、および正常対照におけるPrPScについてのCDI試験の結果を示す。

び正常対照におけるPrPScについてのCDI試験の結果を示す。

【図11および12】Eu-(HuM)Fab Pを用いてCWD感染シカの前頭皮質におけるシカPrPScを検出するためのCDIの感度を示す。シカPrPSc検出のダイナミックレンジは100,000倍である。

【図 1】



【図 2】

Mo Met Ala Asn Leu --- --- Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr
Bo Val Lys Ser His Ile Ser Ile Val Ala

Mo Met Trp Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
Bo Ser

Mo --- Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
Bo

Mo Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly --- Thr Trp Gly Gln Pro His
Bo Gly Gly

Mo Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His
Bo Gly

Mo Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln --- ---
Bo Gly Pro His

Mo --- --- --- --- --- Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys
Bo Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly

Mo Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
Bo Met

Mo Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
Bo

Mo Met Ser Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr
Bo Leu Ser Tyr

Mo Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
Bo His

Mo Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
Bo

Mo Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
Bo Val Glu

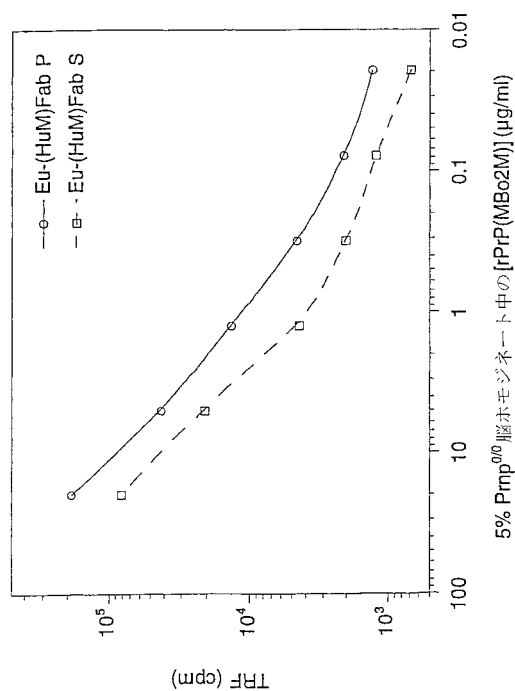
Mo Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
Bo Ile

Mo Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg
Bo Gln ---

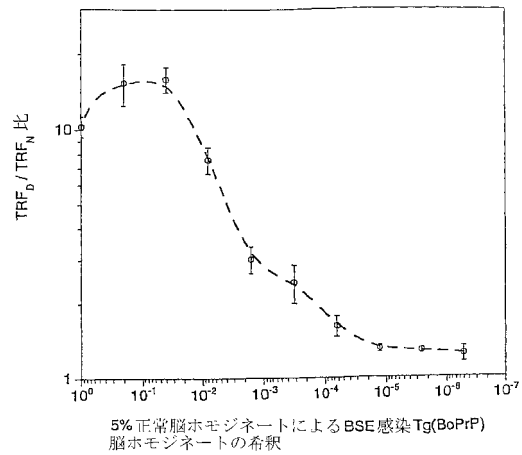
Mo Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile Leu Leu
Bo - Gly Ala Val Ile

Mo Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
Bo

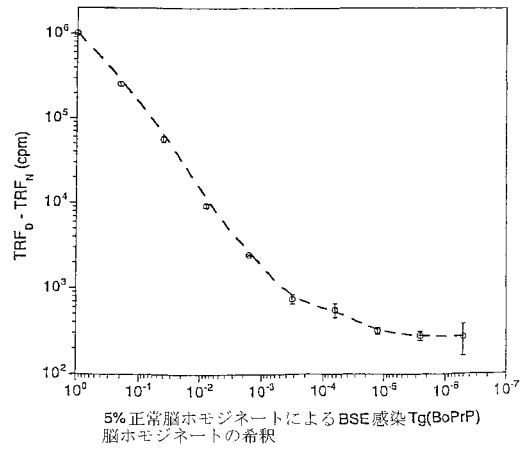
【図 3】



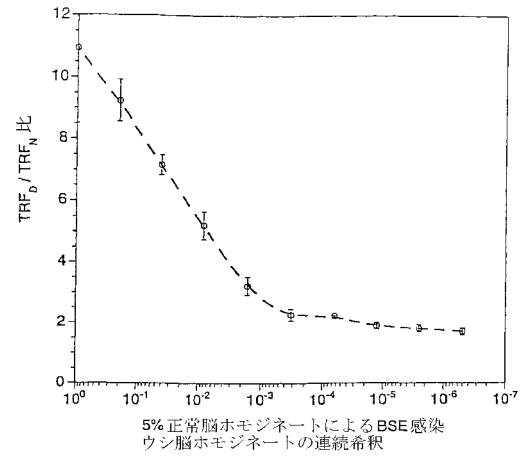
【図 4】



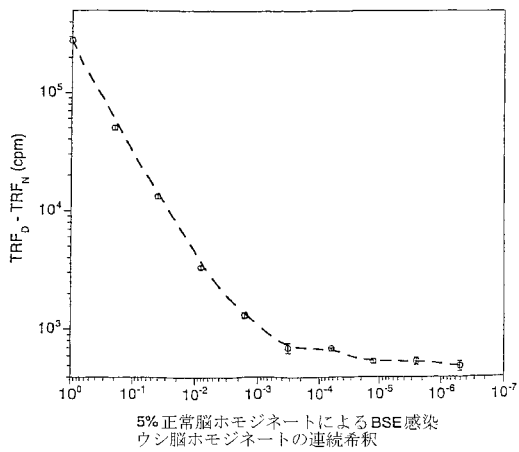
【図 5】



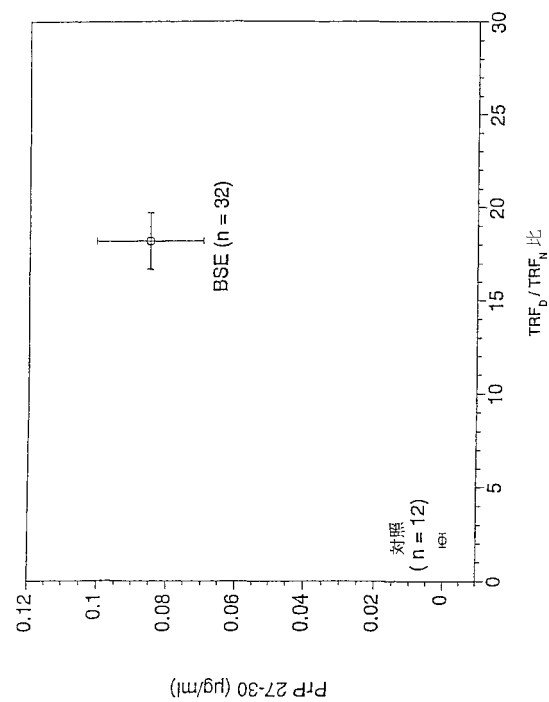
【図 6】



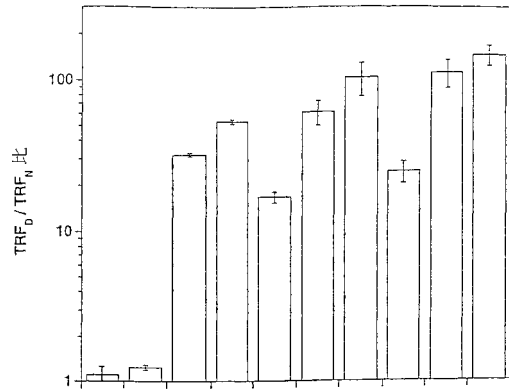
【図 7】



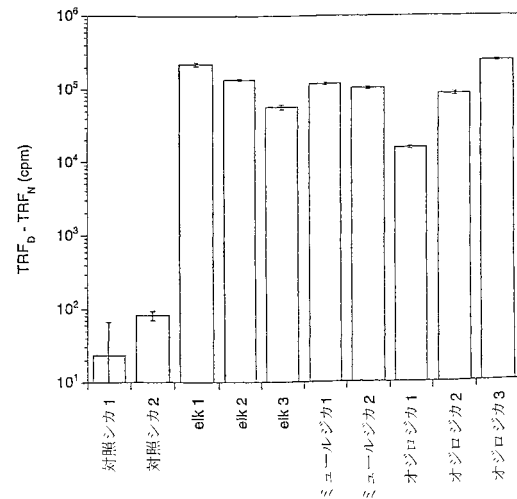
【図 8】



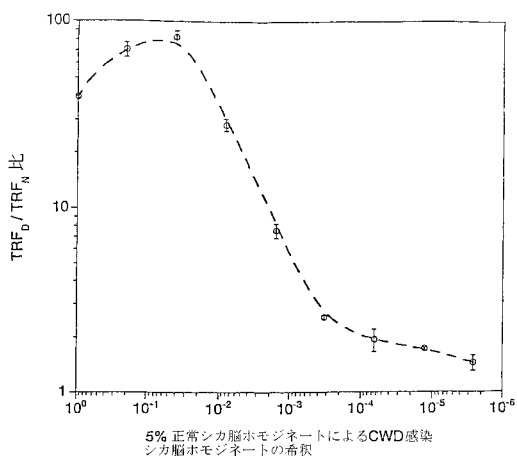
【図 9】



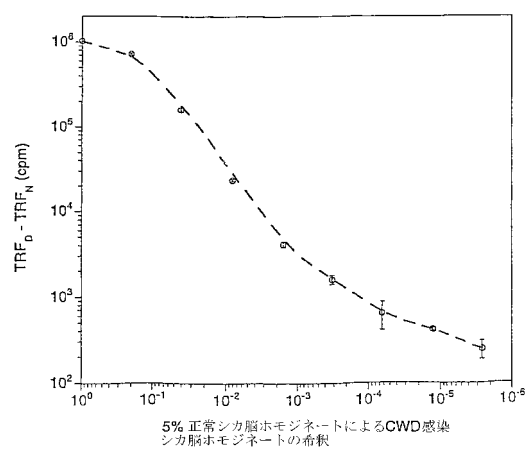
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10335 A2

(51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US01/22648
(22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 09/627,218 27 July 2000 (27.07.2000) US

(71) Applicants (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607-5200 (US). SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, THE [US/US]; 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US).

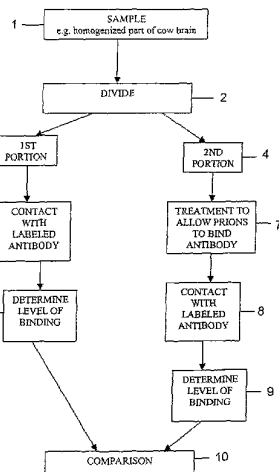
(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): PRUSINER, Stanley, R. [US/US]; 2615 Divisadero Street, San Francisco, CA 94123 (US). SAFAR, Jiri [CZ/US]; 3322 Sugar Berry Lane, Walnut Creek, CA 94598 (US). WILLIAMSON, Anthony, R. [GB/US]; 12567-166 Rnette Alliente, San Diego, CA 92130 (US). BURTON, Dennis, R. [GB/US]; 6044 Beaumont Avenue, La Jolla, CA 92037 (US).

(74) Agent: BOZICEVIC, Karl; Bozicevic, Field & Francis LLP, Suite 200, 200 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES SPECIFIC FOR UNGULATE PrP



(57) Abstract: The present invention provides antibodies that specifically bind with a high degree of binding affinity to a native ungulate PrP in situ and/or a denatured ungulate PrPSc, but not to a native ungulate PrPSc in situ. Preferred antibodies bind native bovine PrP and treated PrPSc but not native bovine PrPSc in situ and can be used in an assay to determine if a sample is infected with infectious prions, i.e. pathogenic PrPSc.

WO 02/10335 A2

WO 02/10335 A2



SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

ANTIBODIES SPECIFIC FOR UNGULATE PrP**Field of the Invention**

This invention relates to antibodies, methods for obtaining antibodies and
5 assays for using such antibodies. More specifically, the invention relates to ungulate PrP
antibodies, methods of obtaining antibodies which specifically bind to naturally occurring
forms of PrP from ungulates and assays which use the antibodies to detect the presence of
infectious prions in an ungulate such as a cow.

Background of the Invention

10 Prions are infectious pathogens that cause central nervous system spongiform
encephalopathies in humans and animals. Prions are distinct from bacteria, viruses and
viroids. The predominant hypothesis at present is that no nucleic acid component is
necessary for infectivity of prion protein. Further, a prion which infects one species of
15 animal (e.g., a human) will not readily infect another (e.g., a mouse).

A major step in the study of prions and the diseases that they cause was the
discovery and purification of a protein designated prion protein ("PrP") (Bolton et al. (1982),
Science 218:1309-11 ; Prusiner et al. (1982), Biochemistry 21:6942-50; McKinley
et al.(1983), Cell 35:57-62). Complete prion protein-encoding genes have since been cloned,
20 sequenced and expressed in transgenic animals. PrPC is encoded by a single-copy host gene
(Basler et al.(1986), Cell 46:417-28) and is normally found at the outer surface of neurons.
A leading hypothesis is that prion diseases result from conversion of PrPC into a modified
form called PrPSc.

It appears that PrPSc is necessary for both the transmission and pathogenesis
25 of the transmissible neurodegenerative diseases of animals and humans. See Prusiner,
S.B.(1991), Science 252:1515-1522. The most common prion diseases of animals are
scrapie of sheep and goats, and bovine spongiform encephalopathy (BSE) of cattle
(Wilesmith, J. and Wells (1991), Microbiol. Immunol. 172:21-38). Four prion diseases of
humans have been identified: (1) kuru, (2) Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), (3) Gerstmann-
30 Strassler-Scheinker Disease (GSS), and (4) fatal familial insomnia (FFI) (Gajdusek, D.C.,
(1977) Science 197:943-960; Medori et al.(1992), N. Engl. J. Med. 326:444-449). The
presentation of human prion diseases as sporadic, genetic and infectious illnesses initially
posed a conundrum which has been explained by the cellular genetic origin of PrP.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

BSE is also a major socioeconomic problem, particularly in Britain. More than 175,000 cattle, primarily dairy cows, have died of BSE during the past decades. Tests conducted by the British government on cattle killed over a 30 month period suggest that about 0.3% of the 749,631 tested, or 2249 cattle may have had BSE even though they did not display any outward symptoms. On March 27, 1996, the European Union (EU) placed a ban on the export of British bovine products, including: live bovine animals, their semen and embryos; meat of bovine animals slaughtered in UK; products obtained from bovine animals slaughtered in UK which are liable to enter the animal feed or human food chain; materials destined for use in medicinal products, cosmetics or pharmaceutical products; and mammalian derived meat and bone-meal. This ban has cost the British farming industry more than 1.5 billion pounds since it was imposed, and left many farmers bankrupt. Although the ban was lifted August 1, 1999, both France and Germany still ban the import of British bovine products, contrary to the EU ruling.

The importance of detecting BSE has been heightened by the possibility that bovine prions have been transmitted to humans who developed new variant Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD) (G. Chazot et al.(1996), *Lancet* 347:1181; R.G. Will et al. (1996), *Lancet* 347:921-925). Earlier studies had shown that the N-terminus of PrPSc could be truncated without loss of scrapie infectivity (S.B. Prusiner et al.(1982), *Biochemistry* 21:6942-6950; S.B. Prusiner et al. (1984), *Cell* 38:127-134) and correspondingly, the truncation of the N-terminus of PrPSc still allowed its conversion into PrPSc (M. Rogers et al.(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3182-3186). The ability of transmission of nvCJD from cattle to humans has been confirmed through in vivo testing, suggesting that the December 20 issue of *Proceedings of National Academy of Sciences* undermining the comforting presumption that the documented "species barrier" is relevant to this new strain (M. R. Scott et al. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15137-15142).

The presence of PrPSc in tissues of humans or animals is indicative of prion infection. PrPSc is the invariant component of prion infection and is the only disease-specific diagnostic marker that can be readily detected by immunoassay in the brains of clinically ill animals and humans Meyer et al. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3693-7; Serban et al. (1990), *Neurology*, 40:110-117; Taraboulos et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7620-7624; Grathwohl, K. U. D., M. Horiuchi et al. (1997), *Virol. Methods* 64:205-216. Unfortunately, PrPSc assays are positive only when the prion titer is high, while

WO 02/10335

PCT/US01/22648

detection of low levels of PrPSc has been problematic. It has also proven difficult to measure low levels of PrPSc in the presence of high levels of PrPC.

Given the enormity of the potential effect of BSE on the world wide cattle population and the affected cattle population in Great Britain, there is a great need for a method of assessing a cow has been infected with BSE to protect the cattle populations. Given the potential health risk to the human population, more sensitive methods for detection of bovine prions are urgently needed.

Summary of the Invention

The present invention provides antibodies that will specifically bind with a high degree of affinity and specificity to native ungulate PrPC and/or a denatured ungulate PrPSc. The antibody need not bind to native ungulate PrPSc. The antibodies are also highly specific, i.e. do not bind to other proteins and/or other molecules which would be expected to be present in the sample such as the natural milieu of homogenated ungulate (specifically bovine) brain tissue. The antibodies are useful in numerous applications, and particularly for determining prion infection in ungulates. The antibodies are characterized by one or more of the following features (1) an ability to bind to native PrPC and denatured PrPSc with specificity, (2) an ability to bind to PrPC or denatured PrPSc in situ i.e., will only bind to PrPSc in a cell culture or in vivo if the prion protein has been treated (e.g. denatured). Preferred antibodies are further characterized by an ability to (3) bind to a PrPC protein of only a specific species of mammals e.g., bind to bovine PrPC and not to PrPC of other mammals. The antibody may be further characterized by (4) not binding to native PrPSc, and (5) binding to native PrPC with a relatively high degree of binding affinity.

An important object is to provide antibodies which bind to a native form of ungulate PrPC.

Another object is to provide antibodies which specifically bind to epitopes of PrPC of a specific species of animal (e.g. bovine PrPC) and not to the PrPC of other species of animals (e.g. mouse PrPC).

Still another object is to provide specific methodology to allow others to generate a wide range of specific antibodies characterized by their ability to bind one or more types of PrPC proteins from one or more species of ungulates.

Another object of the invention is to provide an assay for the detection of PrPSc in an ungulate using the antibodies of the invention.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

An advantage of the invention is that it provides a fast, efficient cost effective assay for detecting the presence of PrPSc in an ungulate sample.

A specific advantage is that the assay can be used as a screen for the presence of prions (i.e., PrPSc) in products such as pharmaceuticals (derived from natural sources) food, cosmetics or any material which might contain such prions and thereby provide further assurances as to the safety of such products.

Another advantage is that the antibodies can be used with a compound which denatures PrPSc thereby providing for a means of differentiating levels of PrPC and PrPC + PrPSc in a sample.

A feature of the invention is that it preferably uses phage display libraries in the creation of the antibodies.

Another feature of the invention is that the phage are genetically engineered to express a specific binding protein of an antibody on their surface.

An aspect of the invention is to provide a therapeutic antibody which prevents or treats prion disease in ungulates and specifically in cows.

Another aspect of the invention is to provide a means for certifying certain products as being prion free.

These and other aspects, objects, advantages, and features of the invention will become apparent to those persons skilled in the art upon reading the details of the chimeric gene, assay method, and transgenic mouse as more fully described below.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a flow diagram of the steps of the conformation - dependant immunoassay (CDI) uses anti-bovine antibodies described and disclosed here.

Figure 2 shows the amino acid sequence of mouse PrP and specifically shows differences between mouse PrP and bovine PrP.

Figure 3 illustrates the sensitivity of conformation-dependent immunoassay (CDI) in the detection of chimeric MBo2M PrP by Eu-(HuM)Fab P and Eu-(HuM)Fab S.

Figures 4 and 5 illustrate the sensitivity of CDI for detection of Bovine PrPsc in the brain homogenates of BSE-infected Tg(BoPrP) mice using Eu-(HuM)Fab P.

Figures 6 and 7 illustrate the sensitivity of CDI for detection of bovine PrPSc in the brain homogenates of BSE-infected British cows using Eu-(HuM) Fab P.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Figure 8 illustrates the concentration of PrP 27-30 plotted against denatured/native ratio determined by CDI in 32 British cows infected by BSE and 12 noninfected U.S. controls.

Figures 9 and 10 show the results of CDI testing for PrPSc in chronic wasting diseases (CWD)-infected mule deer, elk, white-tail deer, and normal controls.

Figures 11 and 12 illustrate the sensitivity of CDI for detection of deer PrPSc in the frontal cortex of CWD-infected deer using Eu-(HuM) Fab P. Dynamic range of the detection of deer PrPSc is 100,000-fold.

Detailed Description of Preferred Embodiments

Before the present antibodies, assays and methods for producing and using such are disclosed and described, it is to be understood that this invention is not limited to particular antibodies, assays or method as such may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference to disclose and describe the methods and/or materials in connection with which the publications are cited.

DEFINITIONS

The terms "PrP protein", "PrP" and the like are used interchangeably herein and shall mean both the infectious particle form PrPSc known to cause diseases (spongiform encephalopathies) in humans and animals and the non-infectious form PrPC which, under appropriate conditions is converted to the infectious PrPSc form.

The terms "prion", "prion protein" and "PrPSc protein" and the like used interchangeably herein to refer to the infectious PrPSc form of a PrP protein and is a contraction of the words "protein" and "infection" and the particles are comprised largely if not exclusively of PrPSc molecules encoded by a PrP gene. Prions are distinct from bacteria,

WO 02/10335

PCT/US01/22648

viruses and viroids. Known prions include those which infect animals to cause scrapie, a transmissible, degenerative disease of the nervous system of sheep and goats as well as bovine spongiform encephalopathies (BSE) or mad cow disease and chronic wasting disease (CWD) of deer and elk. Four prion diseases known to affect humans are (1) kuru, 5 (2) Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), (3) Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease (GSS), and (4) fatal familial insomnia (FFI). As used herein prion includes all forms of prions causing all or any of these diseases or others in any animals used C and in particular in humans and in domesticated farm animals.

The term "PrP gene" is used herein to describe genetic material which 10 expresses PrPC proteins, including proteins having polymorphisms and mutations such as those listed herein under the subheading "Pathogenic Mutations and Polymorphisms." The term "PrP gene" refers generally to any gene of any species which encodes any form of a prion protein. Some commonly known PrP sequences are described in Gabriel et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9097-9101, which is incorporated herein by reference to 15 disclose and describe such sequences. The PrP gene can be from any animal including the "host" and "test" animals described herein and any and all polymorphisms and mutations thereof, it being recognized that the terms include other such PrP genes that are yet to be discovered. The protein expressed by such a gene can assume either a PrPC (non-disease) of PrPSc (disease) form.

20 The terms "standardized prion preparation", "prion preparation", "preparation" and the like are used interchangeably herein to describe a composition containing prions (PrPSc) which composition is obtained from brain tissue of mammals which contain substantially the same genetic material as relates to prions, e.g., brain tissue from a set of mammals which exhibit signs of prion disease which mammals (1) include a transgene as 25 described herein; (2) have an ablated endogenous prion protein gene; (3) have a high copy number of prion protein gene from a genetically diverse species; or (4) are hybrids with an ablated endogenous prion protein gene and a prion protein gene from a genetically diverse species. The mammals from which standardized prion preparations are obtained exhibit clinical signs of CNS dysfunction as a result of inoculation with prions and/or due to 30 developing the disease due to their genetically modified make up, e.g., high copy number of prion protein genes.

The term "artificial PrP gene" is used herein to encompass the term "chimeric PrP gene" as well as other recombinantly constructed genes which when included in the

WO 02/10335

PCT/US01/22648

genome of a host animal (e.g., a mouse) will render the mammal susceptible to infection from prions which naturally only infect a genetically diverse test mammal, e.g., human, bovine or ovine. In general, an artificial gene will include the codon sequence of the PrP gene of the mammal being genetically altered with one or more (but not all, and generally less than 40) codons of the natural sequence being replaced with a different codon C preferably a corresponding codon of a genetically diverse mammal (such as a cow). The genetically altered mammal can be used to assay samples for prions which only infect the genetically diverse mammal. Examples of artificial genes are mouse PrP genes having one or more different replacement codons from cows, sheep and the like replacing mouse codons at the same relative position, with the proviso that not all the mouse codons are replaced with differing human, cow or sheep codons. Artificial PrP genes can include not only codons of genetically diverse animals but may include codons and codon sequences not associated with any native PrP gene but which, when inserted into an animal, render the animal susceptible to infection with prions which would normally only infect a genetically diverse animal.

The terms "chimeric gene", "chimeric PrP gene", "chimeric prion protein gene" and the like are used interchangeably herein to mean an artificially constructed gene containing the codons of a host animal, such as a mouse, with one or more of the codons being replaced with corresponding codons from a genetically diverse test animal, such as a cow or sheep. In one specific example the chimeric gene is comprised of the starting and terminating sequence (i.e., N- and C- terminal codons) of a PrP gene of a mammal of a host species (e.g. a mouse) and also containing a nucleotide sequence of a corresponding portion of a PrP gene of a test mammal of a second species (e.g. a cow). A chimeric gene will, when inserted into the genome of a mammal of the host species, render the mammal susceptible to infection with prions which normally infect only mammals of the second species. The preferred chimeric gene disclosed herein is MBo2M which contains the starting and terminating sequence of a mouse PrP gene and a non-terminal sequence region replaced with a corresponding bovine sequence. The bovine sequence differs from a mouse PrP gene in a manner such that the protein expressed thereby differs at nine residues (see Figure 2). MBo2M PrP was constructed as described previously for similar chimeric PrP transgenes (Scott, M., D. Groth et al. (1993), Cell 73: 979-988) and resulting in eight bovine substitutions in MoPrP (position numbers correspond to HuPrP sequence): 97, 109, 138, 143, 145, 155, 184 and 186.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

The term "genetic material related to prions" is intended to cover any genetic material which effects the ability of an animal to become infected with prions. Thus, the term encompasses any "PrP gene", "artificial PrP gene", "chimeric PrP gene" or "ablated PrP gene" which terms are defined herein as well as modification of such which effect the ability of an animal to become infected with prions. Standardized prion preparations are produced using animals which all have substantially the same genetic material related to prions so that all of the animals will become infected with the same type of prions and will exhibit signs of infection at about the same time.

The terms "host animal" and "host mammal" are used to describe animals which will have their genome genetically and artificially manipulated so as to include genetic material which is not naturally present within the animal. For example, host animals include mice, hamsters and rats which have their PrP gene ablated, i.e., rendered inoperative. The host is inoculated with prion proteins to generate antibodies, and the cells producing the antibodies can be a source of genetic material for making a phage library. Other host animals can have a natural (PrP) gene or one which is altered by the insertion of an artificial gene or by the insertion of a native PrP gene of a genetically diverse test animal.

The terms "test animal" and "test mammal" are used to describe the animal which is genetically diverse from the host animal in terms of differences between the PrP gene of the host animal and the PrP gene of the test animal. The test animal may be any animal for which one wishes to run an assay test to determine whether a given sample contains prions with the ability to infect test animal. For example, the test animal may be any ungulate or mammal infected with a variant ungulate prion, including human, cow, sheep, pig, horse, cat, dog or chicken, and one may wish to determine whether a particular sample includes prions which would normally infect only the test animal.

The terms "genetically diverse animal" and "genetically diverse mammal" are used herein to describe an animal which includes a native PrP codon sequence of the host animal differing from the genetically diverse test animal by 17 or more codons, preferably 20 or more codons, and most preferably 28-40 codons. Thus, a mouse PrP gene is genetically diverse with respect to the PrP gene of a cow or sheep, but is not genetically diverse with respect to the PrP gene of a hamster.

The terms "ablated PrP protein gene", "disrupted PrP gene", and the like are used interchangeably herein to mean an endogenous PrP gene which has been altered (e.g., added and/or removed nucleotides) in a manner so as to render the gene inoperative.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Examples of non-functional PrP genes and methods of making such are disclosed in Büeler, H., et al. (1992), Nature 356, 577-582 and Weissman (WO 93/10227). The methodology for ablating a gene is taught in Capecchi (1987), Cell 51:503-512, all of which are incorporated herein by reference. Preferably both alleles of the genes are disrupted.

5 The terms "hybrid animal", "transgenic hybrid animal" and the like are used interchangeably herein to mean an animal obtained from the cross-breeding of a first animal having an ablated endogenous prion protein gene with a second animal which includes either (1) a chimeric gene or artificial PrP gene or (2) a PrP gene from a genetically diverse animal. For example a hybrid mouse is obtained by cross-breeding a mouse with an ablated mouse
10 gene with a mouse containing (1) bovine or other ungulate PrP genes (which may be present in high copy numbers) or (2) chimeric mouse/ungulate PrP genes. The term hybrid includes any offspring of a hybrid including inbred offspring of two hybrids provided the resulting offspring is susceptible to infection with prions with normal infect only a genetically diverse species. A hybrid animal can be inoculated with prions and serve as a source of cells for the
15 creation of hybridomas to make monoclonal antibodies of the invention.

The terms "susceptible to infection" and "susceptible to infection by prions" and the like are used interchangeably herein to describe a transgenic or hybrid test animal which develops a disease if inoculated with prions which would normally only infect a genetically diverse test animal. The terms are used to describe a transgenic or hybrid animal
20 such as a transgenic mouse Tg(MBo2M) which, without the chimeric PrP gene, would not become infected with a bovine prion but with the chimeric gene is susceptible to infection with bovine prions.

The term Aungulate@ as used herein refers to any hoofed mammal. This includes, but is not limited to, cows, deer, elk, sheep and goats. For purposes of the
25 invention a preferred ungulate is a cow.

By "antibody" is meant an immunoglobulin protein which is capable of binding an antigen. Antibody as used herein is meant to include the entire antibody as well as any antibody fragments (e.g. F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) capable of binding the epitope, antigen or antigenic fragment of interest.

30 Antibodies of the invention are immunoreactive or immunospecific for and therefore specifically and selectively bind to an ungulate PrPC protein. Antibodies which are immunoreactive and immunospecific for natural or native PrPC are preferred. Antibodies for PrPC are preferably immunospecific -- i.e., not substantially cross-reactive with related

WO 02/10335

PCT/US01/22648

materials. Although the term "antibody" encompasses all types of antibodies (e.g., monoclonal) the antibodies of the invention are preferably produced using the phage display methodology described herein.

By "purified antibody" is meant one which is sufficiently free of other proteins, carbohydrates, and lipids with which it is naturally associated. Such an antibody "preferentially binds" to a native PrPC protein, a denatured PrPSc, or an antigenic fragment of each, i.e., does not substantially recognize and bind to other antigenically-unrelated molecules, including native PrPSc. A purified antibody of the invention is preferably immunoreactive with and immunospecific for a PrPC protein of specific species and more preferably immunospecific for native bovine PrP.

By "antigenic fragment" of a PrP protein is meant a portion of such a protein which is capable of binding an antibody of the invention.

By "binds specifically" is meant high avidity and/or high affinity binding of an antibody to a specific polypeptide i.e., epitope of a PrP protein. Antibody binding to its epitope on this specific polypeptide is preferably stronger than binding of the same antibody to any other epitope, particularly those which may be present in molecules in association with, or in the same sample, as the specific polypeptide of interest e.g., binds more strongly to ungulate PrPC than to other proteins, including native PrPSc of a cow, or PrPSc or PrPC from mammals such as humans, dogs, cats, etc. Antibodies which bind specifically to a polypeptide of interest may be capable of binding other polypeptides at a weak, yet detectable, level (e.g., 10% or less of the binding shown to the polypeptide of interest). Such weak binding, or background binding, is readily discernible from the specific antibody binding to the compound or polypeptide of interest, e.g. by use of appropriate controls. In general, antibodies of the invention which bind to ungulate PrPC with a binding affinity of 10⁷ mole/l or more, preferably 10⁸ mole/liters or more are said to bind specifically to PrPC. In general, an antibody with a binding affinity of 10⁶ mole/liters or less is not useful in that it will not bind an antigen at a detectable level using conventional methodology currently used. A preferred antibody of the invention has 4 fold or more and preferably 10 or more greater binding affinity for bovine PrPC as compared to native bovine PrPSc. More preferably, an antibody of the invention has 100 fold or more or 1,000 fold or more greater binding affinity for bovine PrPC as compared to native bovine PrPSc.

By "detectably labeled antibody", "detectably labeled anti-PrP" or "detectably labeled anti-PrP fragment" is meant an antibody (or antibody fragment which retains binding

WO 02/10335

PCT/US01/22648

specificity), having an attached detectable label. The detectable label is normally attached by chemical conjugation, but where the label is a polypeptide, it could alternatively be attached by genetic engineering techniques. Methods for production of detectably labeled proteins are well known in the art. Detectable labels may be selected from a variety of such labels known in the art, but normally are radioisotopes, fluorophores, paramagnetic labels, enzymes (e.g., horseradish peroxidase), or other moieties or compounds which either emit a detectable signal (e.g., radioactivity, fluorescence, color) or emit a detectable signal after exposure of the label to its substrate. Various detectable label/substrate pairs (e.g., horseradish peroxidase/diaminobenzidine, avidin/streptavidin, luciferase/luciferin), methods for labeling antibodies, and methods for using labeled antibodies are well known in the art (see, for example, Harlow and Lane, eds. (Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)).

The terms "treatment", "treating" and the like are used herein to generally mean obtaining a desired pharmacologic and/or physiologic effect. The effect may be prophylactic in terms of completely or partially preventing a disease or symptom thereof and/or may be therapeutic in terms of a partial or complete cure for a disease and/or adverse effect attributable to the disease. "Treatment" as used herein covers any treatment of a disease in a mammal, particularly an ungulate, and includes:

- (a) preventing the disease from occurring in a subject which may be predisposed to the disease but has not yet been diagnosed as having it;
- (b) inhibiting the disease, i.e., arresting its development; or
- (c) relieving the disease, i.e., causing regression of the disease.

Abbreviations used herein include:

- CNS for central nervous system;
- BSE for bovine spongiform encephalopathy;
- CWD for chronic wasting disease of deer or elk;
- CJD for Creutzfeldt-Jakob Disease;
- FFI for fatal familial insomnia;
- GSS for Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease;
- Hu for human;
- HuPrP for a human prion protein;
- Mo for mouse;

WO 02/10335

PCT/US01/22648

- MoPrP for a mouse prion protein;
 SHa for a Syrian hamster;
 SHaPrP for a Syrian hamster prion protein;
 Bov for cow;
 5 BovPrP for a cow prion protein;
 Tg for transgenic;
 Tg(SHaPrP) for a transgenic mouse containing the PrP gene of a Syrian hamster;
 Tg(HuPrP) for transgenic mice containing the complete human PrP gene;
 Tg(ShePrP) for transgenic mice containing the complete sheep PrP gene;
 10 Tg(BovPrP) for transgenic mice containing the complete cow PrP gene;
 PrPSc for the scrapie isoform of the prion protein;
 PrPC for the cellular contained common, normal isoform of
 the prion protein;
 MoPrPSc for the scrapie isoform of the mouse prion protein;
 15 MHu2M for a chimeric mouse/human PrP gene wherein a region of the mouse PrP
 gene is replaced by a corresponding human sequence which differs from mouse PrP at 9
 codons;
 Tg(MHu2M) mice are transgenic mice of the invention which include the chimeric
 MHu2M gene;
 20 MBo2M for a chimeric mouse/human PrP gene wherein a region of the mouse PrP
 gene is replaced by a corresponding bovine sequence which differs from mouse PrP at 9
 codons;
 Tg(MBo2M) mice are transgenic mice of the invention which include the chimeric
 MBo2M gene;
 25 MBo2M PrPC for the scrapie isoform of the chimeric bovine/mouse PrP gene;
 PrPCJD for the CJD isoform of a PrP gene;
 Pmp0/0 for ablation of both alleles of an endogenous prion protein gene, e.g., the
 MoPrP gene;
 Tg(SHaPrP+/0)81/Pmp0/0 for a particular line (81) of transgenic mice expressing
 30 SHaPrP, +/0 indicates heterozygous;
 Tg(BovPrP)/Pmp0/0 for a hybrid mouse obtained
 by crossing a mouse with a bovine prion protein gene (BovPrP) with a mouse with
 both alleles of the endogenous prion protein gene disrupted;

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Tg(MBo2M)/Prnp0/0 for a hybrid mouse obtained by crossing a mouse with a chimeric prion protein gene (MHu2M) with a mouse with both alleles of the endogenous prion protein gene disrupted.

5 FVB for a standard inbred strain of mice often used in the production of transgenic mice since eggs of FVB mice are relatively large and tolerate microinjection of exogenous DNA relatively well.

General Aspects of the Invention

10 The present invention provides an antibody which specifically binds to an ungulate (e.g., cow, sheep or deer) PrPC or denatured ungulate PrPSc. The antibody may also be characterized by not binding to native ungulate PrPSc. More specifically, the methods of the invention provide for the development of antibodies that are able to recognize epitopes that are unavailable on the abnormal conformers of the prion protein, and in particular of the prion protein from ungulates such as cows, sheep and deer. The antibodies and detection methods of the invention allow the quantitative distinction between the
15 infectious and noninfectious state of abnormal isoforms of prion protein, as well as between the abnormal and normal isoforms of the prion protein. Preferably, the antibodies bind to a denatured ungulate PrPSc protein in situ with an affinity of 10⁷ moles/liter or more, preferable 10⁸ moles/liter or more of a single species. Antibodies of the invention may have
20 an affinity for multiple species, e.g., multiple ungulates, or may be specific to a single species, e.g., cow. The antibodies recognize an epitope of the PrPC or denatured PrPC that is unavailable in the native form of PrPSc, presumably due to the conformational difference between PrPC and PrPSc. Antibodies may be isolated, using the protocols of the present invention, with the ability to bind to all proteins coded by the different mutations and/or
25 polymorphisms of the ungulate PrP protein gene. Alternatively, a battery of antibodies (2 or more different antibodies) can be provided wherein each antibody of the battery specifically binds to a protein encoded by a different mutation or polymorphism of an ungulate PrP gene. Thus, the antibody can be bound to a support surface and used to assay a sample in vitro for the presence of a particular allele of ungulate PrPC.

30 The antibodies of the present invention are characterized in part by isolation using a phage display library. Construction of phage display libraries for expression of antibodies, particularly the Fab portion of antibodies, is well known in the art. Preferably, the phage display antibody libraries that express antibodies are prepared according to the

WO 02/10335

PCT/US01/22648

methods described in U.S. Patent 5,223,409, issued June 29, 1993 and U.S. Patent 5,846,533 issued December 8, 1998, both incorporated herein by reference. Procedures of the general methodology can be adapted using the present disclosure to produce antibodies of the present invention.

5 The present invention includes a method for panning and screening of antibodies developed against short synthetic peptides that correspond to the hidden epitopes of BoPrPSc and in particular residues 90-120, which is designated as epitope I.

10 The antibodies of the present invention are especially useful to detect prions utilizing in vitro methods, in which the presence of PrPSc in tissues of humans or animals indicates prion infection. A conformation-dependent immunoassay (CDI) offers a rapid, specific, and highly sensitive method for the detection of ungulate PrPSc using the antibodies of the invention. The assay, as the name indicates, is conformation-sensitive and can detect relatively low levels of PrPSc in brain homogenates in which PrPC is present in a 100-fold excess. Prior to the present invention, rapid application of CDI for early detection of BSE

15 prions in different tissues of cows was complicated by the lack of high-affinity antibody reacting within the residues 90-120 (epitope I) of the denatured bovine PrP. All the monoclonal or recombinant antibodies generated prior to the invention have either low affinity for bovine PrP or recognize epitopes distant from epitope I. This epitope is critical not only for absolute detection of bovine PrP, but also for conformational sensitivity of CDI.

20 Conformational sensitivity of CDI is crucial for specificity of the assay and the ability to distinguish PrPSc from PrPC. The methods of the invention provide the rational development and specific selection of high-affinity anti-PrPC ungulate antibodies that can be used in, among other things, conformation-dependent immunoassays (CDI), for example, in assays for wild type and de novo bovine, sheep, and deer prions.

25 A CDI assay is described in U.S. Patent 5,891,641 issued April 6, 1999 -- see also U.S. Patent 6,214,565 issued April 10, 2001 and PCT Publication WO 99/42829 published August 28, 1999, all of which are incorporated herein by reference in their entirety.

30 The basic steps of a CDI assay are shown in the flow diagram of Figure 1. A sample 1 which is preferably a bovine brain sample is divided 2 into two portions 3 and 4. The first portion 3 is contacted 5 with an antibody of the invention which is preferably attached to a detectable label. The level of binding 6 to the bovine PrPC is then determined. The second portion 4 of the sample is then treated 7 in a manner which exposes an epitope which the antibody will bind to, i.e. denaturing proteins within the sample. The treatment exposes

WO 02/10335

PCT/US01/22648

epitopes on PrPSc making it possible for the antibodies 8 to bind the treated PrPSc. Thus, if the sample had PrPSc in it, the level of binding 9 to the second, treated portion will be higher as compared to the level of binding to the first, untreated portion. The treatment can cause increased levels of binding to PrPC. Thus, some increase is expected even when there is no

5 PrPSc in the second portion. This makes it necessary to adjust the level of binding on the second, treated portion 4 downward by some standard amount. After making the downward adjustment, the level is compared 10 to the level 6 obtained with the first portion 3 and a determination is made as to whether PrPSc is present in the sample 1.

10

QUANTITATIVE CALCULATIONS

Using the methodology described above it is possible to calculate the difference between the amount of signal obtained from a sample which has not been treated and the signal obtained with a sample which has been treated. This difference represents (after adjusting for the effect of treatment on the non-disease conformation) the amount of

15 protein in disease conformation present in the original sample. After obtaining the difference the formula put forth below can be used to calculate the amount of protein in the disease conformation present in the original sample per unit of volume.

$$\begin{aligned} \text{a) } F_n &= F_{n\alpha} + F_{n\beta} \rightarrow F_{n\alpha} = F_n - F_{n\beta}, F_{n\beta} \sim \text{background} \\ \text{b) } F_d &= F_{d\alpha} + F_{d\beta} \\ \Delta F_{n \rightarrow d} &= \Delta F_{\alpha n \rightarrow d} + \Delta F_{\beta n \rightarrow d} \\ \Delta F_{\beta n \rightarrow d} &= F_d - F_n - \Delta F_{\alpha n \rightarrow d} \\ [\text{PrP}\beta] \text{ or } [\text{DRC}] \sim \Delta F_{\beta n \rightarrow d} &= F_d - (F_n * f_{\alpha n \rightarrow d}) \end{aligned}$$

25

The definition of each of the above variables is provided below.

F - fluorescence signal (note that any detectable signal could be used);

F_n - fluorescence signal of native conformation;

$F_{n\alpha}$ and $F_{n\beta}$ - fluorescence signals of native α -helical and β -sheet

30

conformations, respectively;

F_d - fluorescence signal of PrP in the treated or denatured state;

$F_{d\alpha}$ and $F_{d\beta}$ - are the signals of denatured α -helical of β -sheet states of PrP;

WO 02/10335

PCT/US01/22648

$\Delta F_n - d$ - increase of the fluorescence signal in the transition from native to denatured state;

$\Delta F_{\alpha n} - d$ - increase in the fluorescence signal of α -helical conformation in the transition from native to denatured state;

5 $\Delta F_{\beta n} - d$ - increase in the signal of β -sheet conformation in the transition from native to denatured state;

$f_{\alpha n} - d$ - correlation factor for the transition from native to denatured state of α -helical PrP;

$[PrP\beta]$ - concentration of prion protein in β -sheet conformation.

10 $[DRC]$ - concentration of any protein in disease related conformation.

The formula provided above is used to specifically calculate the concentration of prion protein in the β -sheet conformation. However, the same formulae can be used to calculate the concentration of any protein i.e., the concentration of any disease conformation of a protein such as $[\beta A4\beta]$. More generally, $[DRC]$ represents the concentration of the disease related conformation of a protein.

To provide a specific example, the above definitions have been provided specifically with respect to PrP proteins which proteins include at least one non-disease conformation (PrPC) which includes an α -helical configuration and at least one disease related conformation (PrPSc) which includes a β -sheet configuration. The formulae are used to calculate the concentration of the disease related conformation of the protein present in the sample. Per the specific formulae and definitions provided above the formulae are used to calculate the concentration of prion proteins which include the β -sheet configuration (see Example 8).

25 The signal used in calculating the above formula is a fluorescence signal. However, any detectable signal can be used. The total signal is represented by F_n which is a combination of the signal received from the disease and the non-disease related conformations. This is a signal which would be calculated from portion No. 1 which is not treated per the assay described above. The variable F_d is the signal which is obtained by treating portion No. 2 of the sample. This signal is a combination of the signal received from treated protein in the non-disease conformation plus treated protein in the disease conformation.

It has been recognized that there is a difference in signal obtained by treating a sample which includes no disease related conformation of the protein. The difference

WO 02/10335

PCT/US01/22648

should be accounted for to obtain an accurate reading. The difference in signal obtained between the native sample and the treated sample is, of course, a combination of the difference in signal obtained by treating the disease related conformation and the non-disease conformation. The increase in the signal obtained by treating the disease conformation, i.e.,
5 the difference between the signal of the untreated disease conformation and the signal received from the treated disease conformation can be calculated by subtracting the signal received from treating the entire sample from the signal received from calculating the increase in signal obtained from the untreated non-disease conformation and the treated non-disease conformation. Using these equations it is possible to produce the final equation
10 which provides the concentration of protein in the disease conformation present in the original sample (see Example 8).

ANTIBODY FRAGMENTS GENERATED

Using the present methods, three recombinant antibody fragments (Fabs) were
15 isolated that bind tightly to denatured BoPrPSc but not to the native conformation of the same protein in CDI-formatted ELISA. All three Fabs were generated against the 96-105 region of bovine prion protein. Clones "O" and "S" recognized only bovine PrP, while clone "P" bound SHa, Mo, Ov, and Hu, as well as bovine PrPSc. The "O" and "P" recombinant antibody fragments (Fabs) were isolated from a mouse cDNA and cloned into a vector that
20 expresses human-mouse (HuM) chimeric Fabs in *E. coli*. The purified Fabs were then labeled with Europium and used in the conformation dependent immunoassay (CDI) to measure bovine, sheep, and deer PrPSc. The transgenic mice expressing bovine PrPSc will be used in the future for calibration of the CDI sensitivity with respect of the infectious units.

The selection of antibodies and resultant assays can be performed directly in
25 samples or indirectly in the brains of animals inoculated with a sample containing prions.

Although there are known procedures for producing antibodies from any given antigen, practice has shown that it is particularly difficult to produce antibodies which bind to certain proteins e.g., PrPC. The difficulty with obtaining antibodies to PrPC (and to PrPSc) relates, in part, to its structural qualities. By following procedures described herein
30 antibodies which bind ungulate PrPC have been obtained and others may follow the procedures described here to obtain other antibodies to PrPC and to other proteins (e.g. PrPC proteins from other species) for which it is difficult to generate antibodies.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

To produce antibodies of the invention it is preferable to begin with inoculating a host mammal with an inoculum from the desired ungulate PrPC. The host mammal may be any mammal and is preferably a host mammal of the type defined herein such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig or hamster, and is most preferably a mouse. The host animal is inoculated with prion proteins which are endogenous to a ungulate species. For example a mouse is inoculated with a bovine PrPC peptide. Using a normal host mammal in this manner it is possible to elicit the generation of some antibodies. However, since the host animal includes a prion protein gene and is inoculated with PrPC from a genetically diverse species, the antibodies will, if at all, only be generated for epitopes which differ between epitopes of the prion protein of the host animal and epitopes of the PrPC from the genetically diverse species. This substantially limits the amount of antibodies which might be generated and decreases the ability to find an antibody which selectively binds to an ungulate PrPC. Thus, in attempting to generate antibodies which differentiate between prion proteins of different species it is preferable to begin the antibody production process using a mammal with an intact endogenous PrP gene.

Antibodies can also be generated in animals which have an ablated prion protein gene, i.e., a null PrP gene abbreviated as Prnp0/0. This allows antibodies to be generated against areas of an ungulate PrPC that are conserved between the host animal and the ungulate PrP genes. Accordingly, the invention is also described in connection with the use of such "null" mammals and more specifically described in connection with "null mice."

A null mouse can be created by inserting a segment of DNA into a normal mouse PrP gene and/or removing a portion of the gene to provide a disrupted PrP gene. The disrupted gene is injected into a mouse embryo and replaces the endogenous PrP gene via homologous recombination.

The null mouse is injected with ungulate PrP peptides to stimulate the formation of antibodies. Injections of adjuvants can be used in conjunction with the peptides to maximize the generation of antibodies. The mouse is then sacrificed and bone marrow and spleen cells are removed. The cells are lysed, RNA is extracted and reversed transcribed to cDNA. Antibody heavy and light chains (or parts thereof) are then amplified by PCR. The amplified cDNA library may be used as is, or further manipulated to create a range of variants and thereby increase the size of the library.

An IgG antibody phage display library is constructed by inserting the amplified cDNA encoding IgG heavy chain and the amplified cDNA encoding a light chain

WO 02/10335

PCT/US01/22648

into a phage display vector (e.g., a pComb3 vector) such that one vector contains a cDNA insert encoding a heavy chain fragment in a first expression cassette of the vector, and a cDNA insert encoding a light chain fragment in a second expression cassette of the vector.

Ligated vectors are packaged by a phage display vector such as filamentous phage M13 using methods well known in the art. The packaged library is used to infect a culture of *E. coli*, to amplify the number of phage particles. After the phage are extruded from the cells, the phage particles are isolated and used in a panning procedure. The library created is panned against a composition containing the appropriate prions. Antibody fragments which selectively bind to PrPSc e.g., bovine PrPSc are then isolated.

Obtaining Antibodies - Generalized Procedure

Antibodies of the invention can be obtained by a variety of techniques. One particular embodiment provides a method for generating antibodies using a library of proteins (i.e., antibodies or portions thereof) on the surface of phage. The library is brought into contact with a composition which includes PrP proteins, and in particular is a naturally occurring composition which includes PrPC. The phage which bind to PrPC are identified and the antibody or portion thereof which binds the PrPC protein is isolated. It is desirable to determine the sequence of the genetic material encoding the antibody or portion thereof. Further, the sequence can be amplified and inserted, by itself or with other genetic material, into an appropriate vector and cell line for the production of additional antibodies. For example, a sequence encoding a variable region which binds an epitope of PrPC hidden in PrPSc can be fused with a sequence which encodes an ungulate (e.g., bovine) constant region of an antibody to produce a constant/variable construct. This construct can be amplified and inserted into a suitable vector and transfected into a suitable cell line for the production of antibodies. Procedures such as this are described within U.S. Patent 4,816,567, issued March 28, 1989 to Cabilly, et al which is incorporated herein by reference to disclose and describe such procedures. Further, see Bobrzeka et al. (1980) Immunology Letters, 2, pages 151-155 and Konieczny et al. (1981) Haematologia 14 (1), pages 85-91, also incorporated herein by reference.

When the genetic material encoding an antibody or portion thereof which binds a PrPC protein is isolated, it is possible to use that genetic material to produce other antibodies or portions thereof which have a greater affinity for binding PrPC proteins. This is done by site directed mutagenesis technology or by random mutagenesis and selection.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Specifically, individual codons or groups of codons within the sequence can be removed or replaced with codons which encode different amino acids. Large numbers of different sequences can be generated, amplified and used to express variations of the antibody or portions thereof on the surface of additional phage. These phage can then be used to test for the binding affinity of the antibody to PrP proteins.

The phage library can be created in a variety of different ways. In accordance with one procedure, a host animal such as a mouse or rat is immunized with PrPC protein. The immunization may be carried out with an adjuvant to optimize for larger amounts and types of antibodies. After allowing for sufficient time for the generation of antibodies, cells responsible for antibody production are extracted from the inoculated host mammal. RNA is isolated from the extracted cells and subjected to reverse transcription in order to produce a cDNA library. The extracted cDNA is amplified by the use of primers and inserted into an appropriate phage display vector. The vector allows the expression of antibodies or portions thereof on the phage surface. It is also possible to subject the cDNA to site directed mutagenesis prior to insertion into the display vector. Specifically, codons can be removed or replaced with codons expressing different amino acids in order to create a larger library (i.e., a library of many variants) which is then expressed on the surface of the phage. Thereafter, as described above, the phage are brought into contact with the sample and phage which bind to PrP protein are isolated.

Isolation of RNA encoding prion-specific antibodies

Combinatorial antibody library technology, e.g., antigen based selection from antibody libraries expressed on the surface of M13 filamentous phage, offers a new approach to the generation of monoclonal antibodies and possesses a number of advantages relative to hybridoma methodologies which are particularly pertinent to the present invention (Huse, W. D., L. Sastry et al. (1989) Science 246:1275-1281.; Barbas, C. F., III, A. S. Fang, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.; Burton, D. R. and C. F. Barbas, III (1994) Adv. Immunol. 57:191-280).

The present invention provides methods utilizing such technology to provide PrP-specific monoclonal antibodies from phage antibody libraries prepared from BovPrP-immunized Pmp0/0 mice. The invention provides the first monoclonal antibodies recognizing BovPrP in situ and demonstrates the application of combinatorial libraries for cloning specific antibodies from null mice. The present invention circumvents problems of

WO 02/10335

PCT/US01/22648

tolerance and more efficiently generates panels of monoclonal antibodies capable of recognizing diverse epitopes on Bov PrP and other PrPs in part using null mice. Prnp0/0 mice will develop IgG serum titers against Mo, Bov and human PrP following immunization with relatively small quantities of purified respective PrP 27-30 in adjuvant. After allowing
5 sufficient time to generate antibodies, the immunized Prnp0/0 mice are sacrificed for hybridoma production in the conventional manner. Fusions derived from these mice secrete PrPC specific antibody. The general methodologies involved in creating large combinatorial libraries using phage display technology are described and disclosed in U.S. Patent 5,223,409 issued June 29, 1993, which patent is incorporated herein by reference to disclose and
10 describe phage display methodology.

In general, the phage display anti-PrP antibody libraries are prepared by first isolating a pool of RNA that contains RNA encoding anti-PrP antibodies. To accomplish this, an animal (e.g., a mouse, rat, or hamster) is immunized with protein or peptide of interest. However, normal animals do not produce antibodies to prions at detectable or
15 satisfactorily high levels. This problem is avoided by immunizing animals in which the (PrP) gene has been ablated on both alleles. Such mice are designated Prnp0/0 and methods for making such mice are disclosed in Bueler et al. (1992) Nature 356:577-582 and in Weismann Publication WO 93/10227, published May 27, 1993. Inoculation of null animals with PrPC or a peptide of PrPC results in production of IgG serum titers against the prion
20 (Prusiner et al. PNAS 1993). In one preferred embodiment, the animal selected for immunization is a Prnp0/0 mouse described by Büeler and Weismann. Generally, the amount of protein necessary to elicit a serum antibody response in a "null" animal is from about 0.01 mg/kg to about 500 mg/kg.

The PrP protein is generally administered to the animal by injection,
25 preferably by intravenous injection, more preferably by intraperitoneal injection. The animals are injected once, with at generally 1 to 4 subsequent booster injections, preferably at least 3 booster injections. After immunization, the reactivity of the animal's antisera with the prion can be tested using standard immunological assays, such as ELISA or Western blot, according to methods well known in the art (see, for example, Harlow and Lane, 1988,
30 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Animals having prion-binding antisera may be boosted with an additional injection of PrPC.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Serum antibody levels are predictive of antibody secretion, and therefore of levels of specific mRNA in lymphocytes, particularly plasma cells. Detection of serum antibodies, particularly relatively high levels of serum antibodies, is thus correlated to a high level of lymphocytes such as plasma cells producing mRNA encoding those serum antibodies. Thus, plasma cells isolated from the PrPC immunized mice will contain a high proportion of lymphocytes (e.g., plasma cells) producing prion-specific antibody, particularly when the plasma cells are isolated from the mice within a short time period after the final injection boost (e.g., about 2 to 5 days, preferably 3 days). Immunization of the mice and the subsequent injection boosters thus serve to increase the total percentage of anti-PrPC antibody-producing plasma cells present in the total population of the mouse's plasma cells. Moreover, because the anti-PrPC antibodies are being produced at or near peak serum levels, then anti-PrP antibody-producing plasma cells are producing anti-PrPC antibodies, and thus mRNA encoding these antibodies at or near peak levels.

The above correlation between serum levels of antigen-specific antibodies, the number of lymphocytes producing those antigen-specific antibodies, and the amount of total mRNA encoding the antigen-specific antibodies provides a means for isolating a pool of mRNA that is enriched for the mRNA encoding antigen-specific antibodies of interest. Lymphocytes, including plasma cells are isolated from spleen and/or bone marrow from the prion-immunized animals according to methods well known in the art (see, for example, Huse, W. D., L. Sastry et al. (1989) (see comments) Science 246:1275-1281). Preferably the lymphocytes are isolated about 2 to 5 days, preferably about 3 days after the final immunization boost. The total RNA is extracted from these cells. Methods for RNA isolation from mammalian cells are well known in the art (see, for example, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Production of cDNA encoding antibodies from lymphocyte mRNA

cDNA can be produced from the isolated RNA using reverse transcriptase according to methods well known in the art (see, for example, Sambrook et al., supra). cDNA encoding antibody heavy chains or light chains can be amplified using the polymerase chain reaction (PCR). The 3' primers used to amplify heavy chain or light chain-encoding cDNAs are based upon the known nucleotide sequences common to heavy chain or light chain antibodies of a specific antibody subclass. For example, one set of primers based upon

WO 02/10335

PCT/US01/22648

the constant region of the IgG1 heavy chain-encoding gene can be used to amplify heavy chains of the IgG1 subclass, while another set of primers based upon the constant portion of the light chain-encoding gene is used to amplify the light chain repertoire. The 5' primers are consensus sequences based upon examination of a large number of variable sequences in the data base. In this manner, DNA encoding all antibodies of a specific antibody class or subclass can be amplified regardless of antigen-specificity of the antibodies encoded by the amplified DNA. The entire gene encoding the heavy chain or the light chain can be amplified. Alternatively, only a portion of the heavy or light chain encoding gene may be amplified, with the proviso that the product of PCR amplification encodes a heavy or light chain gene product that can associate with its corresponding heavy or light chain and function in antigen binding, i.e., bind selectively to a prion protein. Preferably, the phage display product is an Fab or Fv antibody fragment.

The antibody encoding cDNA selected for amplification may encode any isotype and preferably encode a subclass of IgG. Exemplary mouse IgG subclasses include IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. The selection of the specific antibody subclass-encoding cDNA for amplification will vary according to a variety of factors, including, for example, the animal's serum antibody response to the antigen. Preferably, the antibody subclass-encoding cDNA selected for PCR amplification is that antibody subclass for which the animal produced the highest titer of antibody. For example, if the titers of serum IgG1 are higher than any other subclass of IgG detected in the serum antibody response, then cDNA encoding IgG1 is amplified from the cDNA pool.

Preferably, the heavy and light chains are amplified from the plasma cell cDNA to produce two separate amplified cDNA pools: 1) a cDNA pool containing heavy chain cDNA amplimer products, where the heavy chain is of a specific antibody subclass; and 2) a cDNA pool containing light chain cDNA amplimer products.

Antibodies From Transgenic Animals

In addition to obtaining genetic material which encodes antibodies by infecting an animal with an antigen and thereafter extracting cells (and their DNA) responsible for antibody production, it is possible to obtain the genetic material by producing a transgenic animal for producing antibodies. The described technology and transgenic animal technology can be used to produce, e.g., chimeric mouse/bovine or fully bovine antibodies. The technology for producing chimeric or wholly foreign immunoglobins

WO 02/10335

PCT/US01/22648

involves obtaining from cells of transgenic animals which have had inserted into their germ line a genetic material encoding all or part of an immunoglobulin which binds to the desired antigen. Wholly bovine antibodies can be produced from transgenic mice which have had inserted into their genome genetic material encoding bovine antibodies. Similar technology
 5 for producing such antibodies from transgenic animals is described within PCT Publication No. WO 90/04036, published April 19, 1990. Further, see Goodhardt et al. (June 1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:4229-4233, and Bucchine et al. (March 26, 1987) Nature 326:409-411, all of which are incorporated herein by reference to disclose and describe methods of producing antibodies from transgenic animals.

10 The invention is largely described herein with respect to null mice i.e., FVB mice with both alleles of the PrP gene ablated. However, other host animals can be used and preferred host animals are mice and hamsters, with mice being most preferred in that there exists considerable knowledge on the production of transgenic animals. Possible host animals include those belonging to a genus selected from Mus (e.g. mice) Rattus (e.g. rats)
 15 Oryctolagus (e.g. rabbits) and Mesocricetus (e.g. hamsters) and Cavia (e.g., guinea pigs). In general mammals with a normal full grown adult body weight of less than 1 kg which are easy to breed and maintain can be used.

Vectors for use with phage display antibody libraries

20 The heavy chain-encoding cDNAs and the light chain-encoding cDNAs are then preferably inserted into separate expression cassettes of an appropriate vector. Preferably the vector contains a nucleotide sequence encoding and capable of expressing a fusion polypeptide comprising, in the direction of amino- to carboxy-terminus, 1) a prokaryotic secretion signal domain, 2) an insertion site for DNA encoding a heterologous polypeptide (e.g., either the heavy or light chain-encoding cDNA) and in the expression
 25 cassette for the heavy chain cDNA 3) a filamentous phage membrane anchor domain.

The vector includes prokaryotic or mammalian DNA expression control sequences for expressing the fusion polypeptide, preferably prokaryotic control sequences. The DNA expression control sequences can include any expression signal for expressing a
 30 structural gene product, and can include 5' and 3' elements operatively linked to the expression cassette for expression of the heterologous polypeptide. The 5' control sequence defines a promoter for initiating transcription, and a ribosome binding site operatively linked at the 5' terminus of the upstream translatable sequence. The vector additionally includes an

WO 02/10335

PCT/US01/22648

origin of replication for maintenance and replication in a prokaryotic cell, preferably a gram negative cell such as *E. coli*. The vector can also include genes whose expression confers a selective advantage, such as drug resistance, to a prokaryotic or eukaryotic cell transformed with the vector.

5 The filamentous phage membrane anchor is preferably a domain of the cpIII or cpVIII coat protein capable of associating with the matrix of a filamentous phage particle, thereby incorporating the fusion polypeptide onto the phage surface. The secretion signal is a leader peptide domain of a protein that targets the protein to the periplasmic membrane of gram negative bacteria. Such leader sequences for gram negative bacteria (such as *E. coli*)
10 are well known in the art (see, for example, Oliver, In Neidhard, F.C. (ed.) (1987) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1:56-69).

Filamentous phage membrane anchors for use in the phage display vector

15 Preferred membrane anchors for the vector are obtainable from filamentous phage M13, f1, fd, and equivalent filamentous phage. Preferred membrane anchor domains are found in the coat proteins encoded by gene III and gene VIII. The membrane anchor domain of a filamentous phage coat protein is a portion of the carboxy terminal region of the coat protein, and includes a region of hydrophobic amino acid residues for spanning a lipid
20 bilayer membrane and a region of charged amino acid residues normally found at the cytoplasmic face of the membrane and extending away from the membrane. In the phage f1, gene VIII coat protein's membrane spanning region comprises the carboxy-terminal 11 residues from 41 to 52 (Ohkawa et al (1981) *J. Biol. Chem.* 256:9951-9958). An exemplary membrane anchor would consist of residues 26 to 40 to cpVIII. Thus, the amino acid residue
25 sequence of a preferred membrane anchor domain is derived from the M13 filamentous phage gene VIII coat protein (also designated cpVIII or CP 8). Gene VIII coat protein is present on a mature filamentous phage over the majority of the phage particle with typically about 2500 to 3000 copies of the coat protein.

The amino acid residue sequence of another preferred membrane anchor
30 domain is derived from the M13 filamentous phage gene III coat protein (also designate cpIII). Gene III coat protein is present on a mature filamentous phage at one end of the phage particle with typically about 4 to 6 copies of the coat protein. Detailed descriptions of the structure of filamentous phage particles, their coat proteins, and particles assembly are

WO 02/10335

PCT/US01/22648

found in the reviews by Rached et al. (1986) *Microbiol. Rev.* 50:401-427 and Model et al. (1988) In: *The Bacteriophages*: Vol. 2, R. Calendar, ed., Plenum Publishing Co., pgs. 375-456.

Preferably, the filamentous phage membrane anchor-encoding DNA is inserted 3' of the cDNA insert in the library vector such that the phage membrane anchor-encoding DNA can be easily excised and the vector religated without disrupting the rest of the expression cassettes of the vector. Removal of the phage membrane anchor-encoding DNA from the vector, and expression of this vector in an appropriate host cell, results in the production of soluble antibody (Fab) fragments. The soluble Fab fragments retain the antigen-binding properties of the phage-bound Fab, and thus can be used in assays and therapies in the manner that whole (non-fragmented) antibodies are used.

The vector for use with the present invention must be capable of expressing a heterodimeric receptor (such as an antibody or antibody Fab). That is, the vector must be capable of independently containing and expressing two separate cDNA inserts (e.g., the heavy chain cDNA and the light chain cDNA). Each expression cassette can include the elements described above, except that the filamentous phage anchor membrane-encoding DNA is present only in the expression cassette for the heavy chain cDNA. Thus, when the antibody or Fab is expressed on the surface of the phage, only the heavy chain polypeptide is anchored to the phage surface. The light chain is not directly bound to the phage surface, but is indirectly bound to the phage via its association with the free portion of the heavy chain polypeptide (i.e., the portion of the heavy chain that is not bound to the phage surface).

Preferably, the vector contains a sequence of nucleotides that allow for directional ligation, i.e., a polylinker. The polylinker is a region of the DNA expression vector that operatively links the upstream and downstream translatable DNA sequence for replication and transport, and provides a site or means for directional ligation of a DNA sequence into the vector. Typically, a directional polylinker is a sequence of nucleotides that defines two or more restriction endonuclease recognition sequences. Upon restriction enzyme cleavage, the two sites yield cohesive termini to which a translatable DNA sequence can be ligated to the DNA expression vector. Preferably, the two cohesive termini are non-complementary and thereby permit directional insertion of the cDNA into the cassette. Polylinkers can provide one or multiple directional cloning sites, and may or may not be translated during expression of the inserted cDNA.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

In a particular embodiment, the expression vector is capable of manipulating in the form of a filamentous phage particle. Such DNA expression vectors additionally contain a nucleotide sequence that defines a filamentous phage origin of replication such that the vector, upon presentation of the appropriate genetic complement, can replicate as a filamentous phage in single stranded replicative form, and can be packaged into filamentous phage particles. This feature provides the ability of the DNA expression vector to be packaged into phage particles for subsequent isolation of individual phage particles (e.g., by infection of and replication in isolated bacterial colonies).

A filamentous phage origin of replication is a region of the phage genome that defines sites for initiation of replication, termination of replication, and packaging of the replicative form produced by replications (see, for example, Rasched et al. (1986) Microbiol. Rev. 50:401-427; Horiuchi (1986) J. Mol. Biol. 188:215-223). A preferred filamentous phage origin of replication for use in the present invention is an M13, f1, or fd phage origin of replication (Short et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:7583-7600). Preferred DNA expression vectors are the expression vectors

pCOMB8, pCKAB8, pCOMB2-8, pCOMB3, pCKAB3, pCOMB2-3, pCOMB2-3' and pCOMB3H.

The pComb3H vector is a modified form of pComb3 in which (i) heavy and light chains are expressed from a single Lac promoter as opposed to individual promoters and (ii) heavy and light chains have two different leader sequences (pg1B and ompA) as opposed to the same leader sequence (pHB). Reference for pComb3H Yang, et al (1995) J. Mol. Biol., 254:392-403. The principles of pComb3H are basically the same as for pComb3.

Production of the phage display antibody library

After the heavy chain and light chain cDNAs are cloned into the expression vector, the entire library is packaged using an appropriate filamentous phage. The phage are then used to infect a phage-susceptible bacterial culture (such as a strain of E. coli) and the phage allowed to replicate and lyse the cells, and the lysate isolated from the bacterial cell debris. The phage lysate contains the filamentous phage expressing on its surface the cloned heavy and light chains isolated from the immunized animal. In general, the heavy and light chains are present on the phage surface as Fab antibody fragments, with the heavy chain of the Fab being anchored to the phage surface via the filamentous phage membrane anchor portion of the fusion polypeptide. The light chain is associated with the heavy chain so as to

WO 02/10335

PCT/US01/22648

form an antigen binding site. Method of producing chimeric antibodies are described within U.S. Patent 4,816,567, issued March 28, 1989 to Cabilly, et al. which is incorporated herein by reference to disclose and describe such procedures. Further, See Bobrzeczka et al. (1980) Immunology Letters, 2, pages 151-155 and Konieczny, et al (1981) Haematologia 14 (1) pages 85-91 also incorporated herein by reference.

Selection of PrPC-antigen specific Fabs from the phage display antibody library

Phage expressing an antibody or Fab that specifically binds a PrPC epitope that is unavailable in PrPSc can be isolated using any of a variety of protocols for identification and isolation of monoclonal and/or polyclonal antibodies. Such methods include immunoaffinity purification (e.g., binding of the phage to a column having bound antigen) and antibody panning methods (e.g., repeated rounds of phage binding to antigen bound to a solid support for selection of phage of high binding affinity to the antigen). Preferably, the phage is selected by panning using techniques that are well known in the art.

An exemplary panning protocol is performed in two cycles. First round of panning is performed against C-terminus biotinylated synthetic peptides corresponding to the bovine residues 90-145. The peptides are immobilized on a substrate to facilitate isolation of all the antibodies, e.g., attached to ELISA plates previously coated to high density with Streptavidin. Following binding of the peptides and isolation of bound clones, the selected phage are panned against a PrPC protein (e.g., a native ungulate PrPC or a chimeric mouse/ungulate PrPC). Selected Fabs are expressed in E. coli and purified as described (Williamson, R. A., D. Peretz et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7279-7282; Peretz, D., R. A. Williamson, et al. (1997) J. Mol. Biol. 273:614-622).

After identification and isolation of phage expressing anti-PrPC antibodies, the phage can be used to infect a bacterial culture, and single phage isolates identified. Each separate phage isolate can be again screened using one or more of the methods described above. In order to further confirm the affinity of the phage for the antigen, and/or to determine the relative affinities of the phage for the antigen, the DNA encoding the antibodies or Fabs can be isolated from the phage, and the nucleotide sequence of the heavy and light chains contained in the vector determined using methods well known in the art (see, for example, Sambrook et al., supra).

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Isolation of soluble Fabs from phage selected from the phage display antibody library

Soluble antibodies or Fabs can be produced from a modified display by excising the DNA encoding the filamentous phage anchor membrane protein that is associated with the expression cassette for the heavy chain of the antibody. Preferably, the DNA encoding the anchor membrane is flanked by convenient restriction sites that allow excision of the anchor membrane sequence without disruption of the remainder of the heavy chain expression cassette or disruption of any other portion of the expression vector. The modified vector without the anchor membrane sequence then allows for production of soluble heavy chain as well as soluble light chain following packaging and infection of bacterial cells with the modified vector.

Alternatively, where the vector contains the appropriate mammalian expression sequences the modified vector can be used to transform a eukaryotic cell (e.g., a mammalian or yeast cell, preferably a mammalian cell (e.g., Chinese hamster ovary (CHO) cells)) for expression of the Fab. Where the modified vector does not provide for eukaryotic expression, preferably the vector allows for excision of both the heavy and light chain expression cassettes as a single DNA fragments for subcloning into an appropriate vector. Numerous vectors for expression of proteins in prokaryotic and/or eukaryotic cells are commercially available and/or well known in the art (see, for example Sambrook et al., supra).

Specifics of a PrP Gene and PrP Proteins

The genetic material which makes up the PrP gene is known for a number of different species of animals (see Gabriel et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9097-9101). Further, there is considerable homology between the PrP genes in different mammals. Although there is considerable genetic homology with respect to PrP genes, the differences are significant in some instances. More specifically, due to small differences in the protein encoded by the PrP gene of different mammals, a prion which will infect one mammal (e.g. a human) will not normally infect a different mammal (e.g. a mouse). Due to this "species barrier", it is not generally possible to use normal animals, (i.e., animal which have not had their genetic material related to PrP proteins manipulated) such as mice to determine whether a particular sample contains prions which would normally infect a different species of animal such as a human. The present invention provides methods for using modified, transgenic animals having ungulate PrP genes or chimeric ungulate PrP gene

WO 02/10335

PCT/US01/22648

to detect prions in samples from ungulates. The antibodies of the present invention provide the means by which these ungulate prions can be detected in assays.

The major component of purified infectious prions, designated PrP 27-30, is the proteinase K resistant core of a larger native protein PrP^{Sc} which is the disease causing form of the ubiquitous cellular protein PrP^C. PrP^{Sc} is found only in scrapie infected cells, whereas PrP^C is present in both infected and uninfected cells implicating PrP^{Sc} as the major, if not the sole, component of infectious prion particles. Since both PrP^C and PrP^{Sc} are encoded by the same single copy gene, great effort has been directed toward unraveling the mechanism by which PrP^{Sc} is derived from PrP^C. Central to this goal has been the characterization of physical and chemical differences between these two molecules. Properties distinguishing PrP^{Sc} from PrP^C include low solubility (Meyer et al.(1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3693-7), poor antigenicity (Kascsak et al.(1987), "Mouse Polyclonal and Monoclonal Antibody to Scrapie-Associated Fibril Proteins." J. Virol. 61(12):3688-3693; Serban et al.(1990), Neurology 40:110-117) protease resistance (Oesch et al.(1985), Cell 40:735-746) and polymerization of PrP 27-30 into rod-shaped aggregates which are very similar, on the ultrastructural and histochemical levels, to the PrP amyloid plaques seen in scrapie diseased brains (Prusiner, et al (1983) Cell). By using proteinase K it is possible to denature PrP^C but not PrP^{Sc}. To date, attempts to identify any post-translational chemical modifications in PrP^C that lead to its conversion to PrP^{Sc} have proven fruitless (Stahl, et al (1993) Biochemistry). Consequently, it has been proposed that PrP^C and PrP^{Sc} are in fact conformational isomers of the same molecule.

Conformational description of PrP using conventional techniques has been hindered by problems of solubility and the difficulty in producing sufficient quantities of pure protein. However, PrP^C and PrP^{Sc} are conformationally distinct. Theoretical calculations based upon the amino acid sequences of PrPs from several species have predicted four putative helical motifs in the molecule. Experimental spectroscopic data would indicate that in PrP^C these regions adopt α -helical arrangements, with virtually no β -sheet (Pan, K.M. et al (1993) PNAS 90:10962:6). In dramatic contrast, in the same study it was found that PrP^{Sc} and PrP 27-30 possess significant β -sheet content, which is typical of amyloid proteins. Moreover, studies with extended synthetic peptides, corresponding to PrP amino acid residues 90-145, have demonstrated that these truncated molecules may be converted to either α -helical or β -sheet structures by altering their solution conditions. The

WO 02/10335

PCT/US01/22648

transition of PrPC to PrPSc requires the adoption of β -sheet structure by regions that were previously α -helical.

It is not entirely clear as to why antibodies of the type described in the above cited publications will bind to PrPC but not to PrPSc. Without being bound to any particular theory it is suggested that such may take place because epitopes which are exposed when the protein is in the PrPC conformation are altered, unexposed or partially hidden in the PrPSc configuration -- where the protein is relatively insoluble and more compactly folded together. It is pointed out that stating that an antibody binds to PrPC but not to PrPSc is not correct in absolute terms (but correct in commonly accepted terms) because some minimal binding to PrPSc may occur. For purposes of the invention an indication that no binding occurs means that the equilibrium or affinity constant K_a is 106 l/mole or less. Further, binding will be recognized as existing when the K_a is at 107 l/mole or greater preferably 108 l/mole or greater. The binding affinity of 107 l/mole or more may be due to (1) a single monoclonal antibody (i.e., large numbers of one kind of antibodies) (2) a plurality of different monoclonal antibodies (e.g., large numbers of each of five different monoclonal antibodies) or (3) large numbers of polyclonal antibodies. It is also possible to use combinations or (1)-(3).

Antibody/Antigen Binding Forces

The forces which hold an antigen and antibody together are in essence no different from non-specific interactions which occur between any two unrelated proteins i.e., other macromolecules such as human serum albumin and human transferrin. These intermolecular forces may be classified into four general areas which are (1) electrostatic; (2) hydrogen bonding; (3) hydrophobic; and (4) Van der Waals. Electrostatic forces are due to the attraction between oppositely charged ionic groups on two protein side-chains. The force of attraction (F) is inversely proportional to the square of the distance (d) between the charges. Hydrogen bonding forces are provided by the formation of reversible hydrogen bridges between hydrophilic groups such as -OH, -NH₂ and -COOH. These forces are largely dependent upon close positioning of two molecules carrying these groups. Hydrophobic forces operate in the same way that oil droplets in water merge to form a single large drop. Accordingly, non-polar, hydrophobic groups such as the side-chains on valine, leucine and phenylalanine tend to associate in an aqueous environment. Lastly, Van der

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Waals are forces created between molecules which depend on interaction between the external electron clouds.

Further information regarding each of the different types of forces can be obtained from "Essential Immunology" edited by I.M. Roitt (6th Edition) Blackwell Scientific Publications, 1988. With respect to the present invention useful antibodies exhibit all of these forces. It is by obtaining an accumulation of these forces in larger amounts that it is possible to obtain an antibody which has a high degree of affinity or binding strength to the PrP protein and in particular an antibody which has a high degree of binding strength to ungulate PrPC.

Measuring Antibody/Antigen Binding Strength

The binding affinity between an antibody and an antigen can be measured which measurement is an accumulation of a measurement of all of the forces described above. Standard procedures for carrying out such measurements exist and can be directly applied to measure the affinity of antibodies of the invention for PrP proteins including ungulate PrPC.

One standard method for measuring antibody/antigen binding affinity is through the use of a dialysis sac which is a container comprised of a material which is permeable to the antigen but impermeable to the antibody. Antigens which are bound completely or partially to antibodies are placed within the dialysis sac in a solvent such as in water. The sac is then placed within a larger container which does not contain antibodies or antigen but contains only the solvent e.g., the water. Since only the antigen can diffuse through the dialysis membrane the concentration of the antigen within the dialysis sac and the concentration of the antigen within the outer larger container will attempt to reach an equilibrium. After placing the dialysis sac into the larger container and allowing for time to pass towards reaching an equilibrium it is possible to measure the concentration of the antigen within the dialysis sac and within the surrounding container and then determine the differences in concentration. This makes it possible to calculate the amount of antigen which remains bound to antibody in the dialysis sac and the amount which disassociates from the antibody and diffuses into the surrounding container. By constantly renewing the solvent (e.g., the water) within the surrounding container so as to remove any antigen which is diffused therein it is possible to totally disassociate the antibody from antigen within the dialysis sac. If the surrounding solvent is not renewed the system will reach an equilibrium

WO 02/10335

PCT/US01/22648

and it is possible to calculate the equilibrium constant (K) of the reaction i.e., the association and disassociation between the antibody and antigen. The equilibrium constant (K) is calculated as an amount equal to the concentration of antibody bound to antigen within the dialysis sac divided by the concentration of free antibody combining sites times the concentration of free antigen. The equilibrium constant or "K" value is generally measured in terms of liters per mole. The K value is a measure of the difference in free energy (ΔG) between the antigen and antibody in the free state as compared with the complexed form of the antigen and antibody. When using the phage display methodology described below the antibodies obtained have an affinity or K value of 10^7 mole/liter or more.

Antibody Avidity

As indicated above the term "affinity" describes the binding of an antibody to a single antigen determinate. However, in most practical circumstances one is concerned with the interaction of an antibody with a multivalent antigen. The term "avidity" is used to express this binding. Factors which contribute to avidity are complex and include the heterogeneity of the antibodies in a given serum which are directed against each determinate on the antigen and the heterogeneity of the determinants themselves. The multivalence of most antigens leads to an interesting "bonus" effect in which the binding of two antigen molecules by an antibody is always greater, usually many fold greater, than the arithmetic sum of the individual antibody links. Thus, it can be understood that the measured avidity between an antiserum and a multivalent antigen will be somewhat greater than the affinity between an antibody and a single antigen determinate.

The Conformation-Dependent Assay (CDI)

The Conformation-Dependent Assay; or ACIDI@ allows the direct measurement of the amount of PrPSc in brain homogenates without prior digestion with proteinase K to eliminate PrPC. The assay is conformation-sensitive and can detect relatively low levels of PrPSc in brain homogenates in which PrPC is present in a 100-fold excess. By selective precipitation of PrPSc prior to differential immunoassay, PrPSc can be measured in the presence of a 3,000-fold excess of PrPC. Currently, the assay can quantify less than 1 ng/ml of PrPSc in brain homogenate with a dynamic range of 5 orders of magnitude (Safar, J., H. Wille et al. (1998), Nat. Med, 4(10):1157-1165). Since the prion titer in brain homogenates of clinically ill CJD patients is equal to or lower than 10^6 ID₅₀

WO 02/10335

PCT/US01/22648

units/ml of 5% brain homogenate (unpublished data), the differential immunoassay can detect prion titers as low as 1 ID50 unit/ml.

The CDI allows one to distinguish multiple strains of prions by plotting the ratio of denatured/native PrP as a function of PrPSc concentration before and after limited proteinase K digestion. In contrast, only one strain (DY) (Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994), J. Virol. 68:7859-7868) can be distinguished from the other seven strains by Western blotting after limited proteolysis. Moreover, their relatively increased protease sensitivity of PrPSc in DY prions can lead to an underestimation of its level by immunoblotting (Scott, M. R., D. Groth, et al. (1997), J. Virol. 71:9032-9044).

Specifically, the antibodies to ungulate residues 90-120 (epitope I) allow the CDI to detect prions in cows, deer, elk, sheep and other ungulates. The high-affinity antibody reacting within epitope I of the denatured bovine PrP allow the CDI assay to detect, for example, the presence of bovine prions in a test sample. This epitope is critical not only for absolute, but also for conformational sensitivity of CDI. Conformational sensitivity of CDI is crucial for specificity of the assay and the ability to distinguish PrPSc from PrPC.

Pathogenic mutations and polymorphisms

There are a number of known pathogenic mutations in the human PrP gene. Further, there are known polymorphisms in the human, sheep and bovine PrP genes. The antibodies of the present invention may be geared to recognize specific alleles of the PrP gene. Alternatively polymorphisms or mutations known to be pathogenic in one species (e.g. human) can be added to a peptide from an ungulate PrP. The following is a list of such mutations and polymorphisms:

| Pathogenic bovine mutations | Human Polymorphisms | Sheep Polymorphisms | Bovine Polymorphisms |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 2 octarepeat insert | Codon 129 Met/Val | Codon 171 Arg/Glu | 5 or 6 octarepeats |
| 4 octarepeat insert | Codon 219 Glu/Lys | Codon 136 Ala/Val | |
| 5 octarepeat insert | | | |
| 6 octarepeat insert | | | |
| 7 octarepeat insert | | | |
| 8 octarepeat insert | | | |
| 9 octarepeat insert | | | |
| Codon 102 Pro-Leu | | | |

WO 02/10335

PCT/US01/22648

Codon 105 Pro-Leu
 Codon 117 Ala-Val
 Codon 145 Stop
 Codon 178 Asp-Asn
 Codon 180 Val-Ile
 Codon 198 Phe-Ser
 Codon 200 Glu-Lys
 Codon 210 Val-Ile
 Codon 217 Asn-Arg
 Codon 232 Met-Ala

The DNA sequence of the sheep and cow PrP genes have been determined allowing, in each case, the prediction of the complete amino acid sequence of their respective PrP proteins. The normal amino acid sequence which occurs in the vast majority of
 5 individuals is referred to as the wild-type PrP sequence. This wild-type sequence is subject to certain characteristic polymorphic variations. In the case of sheep PrP the gene displays two amino acid polymorphisms at residues 171 and 136, while bovine PrP has either five or six repeats of an eight amino acid motif sequence in the amino terminal region of the mature prion protein. While none of these polymorphisms are of themselves pathogenic, they
 10 appear to influence prion diseases. Distinct from these normal variations of the wild-type PrP proteins, certain mutations of the human PrP gene which alter either specific amino acid residues of PrP or the number of octarepeats have been identified which segregate with inherited human prion diseases.

In order to provide further meaning to the above chart demonstrating the
 15 mutations and polymorphisms, one can refer to the published sequences of PrP genes. For example, a chicken, bovine, sheep, rat and mouse PrP gene are disclosed and published within Gabriel et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9097-9101. The sequence for the Syrian hamster is published in Basler et al. (1986) Cell 46:417-428. The PrP gene of sheep is published by Goldmann et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2476-2480. The PrP
 20 gene sequence for bovine is published in Goldmann et al. (1991) J. Gen. Virol. 72:201-204. The sequence for chicken PrP gene is published in Harris et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7664-7668. The PrP gene sequence for mink is published in Kretzschmar et al. (1992) J. Gen. Virol. 73:2757-2761. The human PrP gene sequence is published in Kretzschmar et al. (1986) DNA 5:315-324. The PrP gene sequence for mouse is published
 25 in Loch et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6372-6376. The PrP gene sequence for

WO 02/10335

PCT/US01/22648

sheep is published in Westaway et al. (1994) Genes Dev. 8:959-969. These publications are all incorporated herein by reference to disclose and describe the PrP gene and PrP amino acid sequences.

5 **Standardized Prion Preparation**

Standardized prion preparations may be produced in order to test assays of the invention and thereby improve the reliability of the assay. Although the preparation can be obtained from any animal it is preferably obtained from a host animal which has brain material containing prions of a test animal. For example, a transgenic mouse containing a
10 bovine prion protein gene can produce bovine prions and the brain of such a mouse can be used to create a standardized bovine prion preparation. Further, in that the preparation is to be a "standard" it is preferably obtained from a battery (e.g., 100; 1,000, or more animals) of substantial identical animals. For example, 100 mice all containing a very high copy number of bovine PrP genes (all polymorphisms and mutations) would spontaneously develop
15 disease and the brain tissue from each could be combined to make a useful standardized prion preparation. Standardized prion preparations are described and disclosed in U.S. Patent 5,908,969 issued June 1, 1999 and U.S. Patent 6,020,537 issued February 1, 2000, both of which are incorporated herein in their entirety.

Standardized prion preparations can be produced using any of modified host
20 mammals of the type described above. For example, standardized prion preparations can be produced using mice, rats, rabbits, hamsters, or guinea pigs which are genetically modified so that they are susceptible to infection with prions which prions would generally only infect genetically diverse species such as a cow, sheep, deer or horse and which modified host mammals will develop clinical signs of CNS dysfunction within a period of time of 350 days
25 or less after inoculation with prions. The most preferred host mammal is a mouse in part because they are inexpensive to use and because a greater amount of experience has been obtained with respect to production of transgenic mice than with respect to the production of other types of host animals. Details regarding making standardized prion preparation are described in U.S. Patents 6,008,435 and 6,020,537, both of which are incorporated herein by
30 reference.

Once an appropriate type of host is chosen, such as a mouse, the next step is to choose the appropriate type of genetic manipulation to be utilized to produce a standardized prion formulation. For example, the mice may be mice which are genetically

WO 02/10335

PCT/US01/22648

modified by the insertion of a chimeric gene of the invention. Within this group the mice might be modified by including high copy numbers of the chimeric gene and/or by the inclusion of multiple promoters in order to increase the level of expression of the chimeric gene. Alternatively, hybrid mice of the invention could be used wherein mice which have the endogenous PrP gene ablated are crossed with mice which have a bovine PrP gene inserted into their genome. There are, of course, various subcategories of such hybrid mice. For example, the bovine PrP gene may be inserted in a high copy number and/or used with multiple promoters to enhance expression. In yet another alternative the mice could be produced by inserting multiple different PrP genes into the genome so as to create mice which are susceptible to infection with a variety of different prions, i.e., which generally infect two or more types of test animals. For example, a mouse could be created which included a chimeric gene including part of the sequence of a cow, a separate chimeric gene which included part of the sequence of a deer, and still another chimeric gene which included part of the sequence of a sheep. If all three different types of chimeric genes were inserted into the genome of the mouse the mouse would be susceptible to infection with prions which generally only infect a cow, deer and sheep.

After choosing the appropriate mammal (e.g., a mouse) and the appropriate mode of genetic modification (e.g., inserting a chimeric PrP gene such as MBo2M) the next step is to produce a large number of such mammals which are substantially identical in terms of genetic material related to prions. More specifically, each of the mice produced will include an identical chimeric gene present in the genome in substantially the same copy number. The mice should be sufficiently identical genetically in terms of genetic material related to prions that 95% or more of the mice will develop clinical signs of CNS dysfunction within 350 days or less after inoculation and all of the mice will develop such CNS dysfunction at approximately the same time e.g., within 30 days of each other.

Once a large group e.g., 50 or more, more preferably 100 or more, still more preferably 500 or more of such mice are produced. The next step is to inoculate the mice with prions which generally only infect a genetically diverse mammal e.g., prions from an ungulate such as a sheep, cow, deer or horse. The amounts given to different groups of mammals could be varied. After inoculating the mammals with the prions the mammals are observed until the mammals exhibit symptoms of prion infection e.g., clinical signs of CNS dysfunction. After exhibiting the symptoms of prion infection the brain or at least a portion

WO 02/10335

PCT/US01/22648

of the brain tissue of each of the mammals is extracted. The extracted brain tissue is homogenized which provides the standardized prion preparation.

As an alternative to inoculating the group of transgenic mice with prions from a genetically diverse animal it is possible to produce mice which spontaneously develop prion related diseases. This can be done, for example, by including extremely high copy numbers of a cow PrP gene into a mouse genome. When the copy number is raised to, for example, 100 or more copies, the mouse will spontaneously develop clinical signs of CNS dysfunction and have, within its brain tissue, prions which are capable of infecting humans. The brains of these animals or portions of the brain tissue of these animals can be extracted and homogenized to produce a standardized prion preparation.

The standardized prion preparations can be used directly or can be diluted and titrated in a manner so as to provide for a variety of different positive controls. More specifically, various known amounts of such standardized preparation can be used to inoculate a first set of transgenic control mice. A second set of substantially identical mice are inoculated with a material to be tested i.e., a material which may contain prions. A third group of substantially identical mice are not injected with any material. The three groups are then observed. The third group, should, of course not become ill in that the mice are not injected with any material. If such mice do become ill the assay is not accurate probably due to the result of producing mice which spontaneously develop disease. If the first group, injected with a standardized preparation, do not become ill the assay is also inaccurate because the mice have not been correctly created so as to become ill when inoculated with prions which generally only infect a genetically diverse mammal. However, if the first group does become ill and the third group does not become ill the assay can be presumed to be accurate. Thus, if the second group does not become ill the test material does not contain prions and if the second group does become ill the test material does contain prions.

By using standardized prion preparations of the invention it is possible to create extremely dilute compositions containing the prions. For example, a composition containing one part per million or less or even one part per billion or less can be created. Such a composition can be used to test the sensitivity of the antibodies, assays and methods of the invention in detecting the presence of prions.

Prion preparations are desirable in that they will include a constant amount of prions and are extracted from an isogenic background. Accordingly, contaminants in the preparations will be constant and controllable. Standardized prion preparations will be

WO 02/10335

PCT/US01/22648

useful in the carrying out of bioassays in order to determine the presence, if any, of prions in various pharmaceuticals, products produced by using ungulates including foods, cosmetics, etc.

5 **Useful Applications**

As indicated above and described further below in detailed examples it is possible to use the methodology of the invention to create a wide range of different antibodies. i.e., antibodies having different specific features. For example, antibodies can be created which bind only to a PrPC protein naturally occurring within a single ungulate species and not bind to a PrPC protein naturally occurring within other species. Further, the antibody can be designed so as to bind only to a non-infectious form of an ungulate prion protein (e.g., PrPC) and not bind to an infectious form (e.g., PrPSc). A single antibody or a battery of different antibodies can then be used to create an assay device. Such an assay device can be prepared using conventional technology known to those skilled in the art. The antibody can be purified and isolated using known techniques and bound to a support surface using known procedures. The resulting surface having antibody bound thereon can be used to assay a sample in vitro to determine if the sample contains one or more types of antibodies.

The antibodies are most useful in carrying out CDI assays of the type described in U.S. Patent 5,891,641. In addition, the antibodies could be used in treatments by binding to PrPC and thereby preventing it from converting to PrPSc.

Commercial Assays

One embodiment of the invention features commercial assays allowing detection of PrPSc in an ungulate sample by 1) digesting the sample with an enzyme that effectively degrades PrPC and which denatures PrPSc, or alternatively by successive treatment with an enzyme that degrades PrPC (but not PrPSc) and then an enzyme which denatures PrPSc and 2) detecting the denatured PrPSc using an antibody of the present invention. For example, a sample containing bovine PrP proteins (i.e., PrPC and PrPSc) can be subjected to denaturation by the use of proteinase K (PK) digestion. The use of such will digest PrPC but not PrPSc. Following digestion with proteinase K, the sample is further treated to denature the PrPSc, and the sample is contacted with an antibody of the present invention under suitable binding conditions. Preferably, the antibody is bound to a substrate

WO 02/10335

PCT/US01/22648

and can be positioned such that the sample can be easily contacted with the substrate material having the antibody bound thereon. If material binds to the antibodies on the substrate the presence of infectious PrPSc is confirmed.

5 In another embodiment, a sample to be tested is divided into two portions, and one is digested to denature any PrPSc in the sample without destroying the PrPC in the sample. Both portions are contacted with an antibody of the invention, which will bind to PrPC in the untreated portion and both PrPC and PrPSc in the treated portion. Levels of PrPC or PrPC + PrPSc are detected and the amount of PrPSc in the sample determine from the difference in detectable signal between the two samples.

10 In commercial embodiments of the invention it may be desirable to use antibodies of the invention in a sandwich type assay. More particularly, the antibody of the invention may be bound to a substrate support surface. The denatured sample to be tested is contacted with the support surface under conditions which allow for binding. Thereafter, unreacted sites are blocked and the surface is contacted with a generalized antibody which
15 will bind to any protein thereon. The generalized antibody is linked to a detectable label. The generalized antibody with detectable label is allowed to bind to any denatured PrPSc bound to the antibodies on the support surface. If binding occurs the label can be made to become detectable such as by generating a color thereby indicating the presence of the label which indirectly indicates the presence of PrPSc within the sample. The assay can detect
20 denatured PrPSc present in an amount of 1 part per million or less, even one part per billion or less. The PrPSc may be present in a source selected from the group consisting of (a) a pharmaceutical formulation containing a therapeutically active component extracted from an animal source, (b) food products, (c) an organ, tissue, body fluid or cells extracted from a human source, (d) an animal-based product such as injectables, orals, creams, suppositories,
25 and intrapulmonary delivery formulations, (e) a cosmetic, and (f) a pharmaceutically active compound extracted from a mammalian cell culture.

EXAMPLES

The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill
30 in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the subject invention, and are not intended to limit the scope of what is regarded as the invention. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to the numbers used (e.g., amounts, temperature, concentrations, etc.) but some experimental errors and deviations should be

WO 02/10335

PCT/US01/22648

allowed for. Unless otherwise indicated, parts are parts by weight, molecular weight is average molecular weight, temperature is in degrees centigrade, and pressure is at or near ambient.

5 **EXAMPLE 1: Identification and Isolation of Anti-bovine Antibodies**

Antibodies that recognize bovine PrPC or denatured PrP^{Sc} were produced using Prnp0/0 mice. Mice were immunized with synthetic bovine PrPC peptide coupled to KLH and corresponding to residues 96-115 of bovine PrP. Phage display libraries were constructed from spleens and bone marrow from mice showing high titers of sera against the homologous antigen. Thereafter, we panned the library against synthetic PrP peptides and recombinant PrP antigens of varying length and selected over 32 different positive clones. The selected clones were screened by CDI-formatted ELISA and specifically evaluated by Western blot of brain homogenate. The mouse was injected with bovine peptides to stimulate the formation of antibodies. The mouse is then sacrificed and bone marrow and spleen cells are removed. The cells are lysed, RNA is extracted and reversed transcribed to cDNA. Antibody heavy and light chains (or parts thereof) are then amplified by PCR. Identified light chain sequences were isolated as follows:

Clone P

20 ELVMTQTTPSSLSASLGERSVSLTCTRASQDIGNNLNWIQQKFDGTIKRLIYATSSLDGSGVFKRFGSGRSGSDYSLT
ISSLESEDFADYYCLQHDTFPLTFGGGTLKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:1)

Heavy chains isolated were as follows:

FR2
25 Clone P EVQLLEQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIEDSYIH WVKQRPEQ (SEQ ID NO:2)
Clone S EVQLLEQSGAELVREGASVKLSCTASGFNIEDYIYH WVIQRPEQ (SEQ ID NO:3)
FR2 FR3
Clone P GLEWIG RIDPEDGETKYAPKFQG KATITADTSSNTAYLHLRLTS (SEQ ID NO:4)
Clone S GLEWIG RIDPEDGETKYAPKFQD KATLTADTSSNTAYLHLRLTS (SEQ ID NO:5)
FR3 FR4
30 Clone P EDTAIYYCGR GAYYIKEDF- WQQGTTTLTVSSASTK (SEQ ID NO:6)
Clone S EDTAIYFCGR NDGLYAGQDY WQQGTTTLTVSSASTK (SEQ ID NO:7)

An IgG phage display library was constructed by inserting an amplified
35 cDNA encoding an IgG heavy chain fragment and the amplified cDNA encoding a light chain into a phage display vector (e.g., a pComb3 vector) such that one vector contained a

WO 02/10335

PCT/US01/22648

cDNA insert encoding a heavy chain fragment in a first expression cassette of the vector, and a cDNA insert encoding a light chain fragment in a second expression cassette of the vector.

Ligated vectors were packaged by filamentous phage M13 using methods well known in the art, and used to infect a culture of *E. coli*, so as to amplify the number of phage particles.

- 5 After bacterial cell lysis, the phage particles were isolated and used in a panning procedure. The library created was panned against a composition containing bovine prions. Antibody fragments which selectively bind to the bovine PrP^C were then isolated. (Barbas, C. F., III and D. R. Burton (1996) Trends Biotechnol. 14: 230-234; Williamson, R. A., D. Peretz, et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7279-7282.; Williamson, R. A., D. Peretz et al. (1998) J. Virol. 72:9413-9418). The epitopes of recombinant mouse Fab's O, P, and S were mapped using a library of synthetic decapeptides corresponding to the BoPrP (90-145) sequence and overlapping by 3 residues. All three Fab's reacted exclusively with single linear epitope within residues 96-105 of bovine PrP. However, the P antibody display broader specificity against similar sequences in other species and the common epitope
- 15 motive can be summarized as: HG(S,N)QWNKPSKPKTN (SEQ ID NOS:8 and 9). This epitope is present in all ungulate PrP sequences, including bovine, mule deer, white tail deer, rod deer, elk, camel, kudu, goat, sheep, and pig. Moreover, this epitope is also present in the sequences of PrP from other species such as ferret, cat, mink, chimp, gorilla, orangutan, presbittis, rabbit, mouse, rat, hamster, macaque, spider monkey, squirrel monkey, baboon,
- 20 and marmoset. Therefore, the P clone is expected to recognize equally well all the above listed PrP's. An antibody using clone P was isolated as Eu-(HuM)Fab P, and an antibody using clone S was isolated as Eu-(HuM)Fab S.

Example 2: Detection of Chimeric Bovine PrP in Mouse Brain Homogenates

- 25 The isolated antibodies Eu-(HuM)Fab P and Eu-(HuM)Fab S were tested for sensitivity using the conformation-dependent immunoassay (CDI) to detect chimeric MBo2M PrP. The chimeric recombinant protein rPrP(MBo2M) was diluted into 5% PrP0/0 mouse brain homogenate and the two bovine anti-PrP^C antibodies tested for their ability to detect the protein in its native PrP^C form. Briefly, the brains of Prnp0/0 mice which do not
- 30 express PrP protein were homogenized on ice by 3x30 sec strokes of PowerGen homogenizer (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) in PBS (pH 7.4). Resulting 10% (w/v) homogenates were spun for 5 min at 500 g in a table top centrifuge. The supernatant was mixed 1:1 with 4% Sarcosyl in PBS (pH 7.4). The purified recombinant PrP(MBo2M) was

WO 02/10335

PCT/US01/22648

diluted into the homogenate and each sample was divided in two aliquots: (1) untreated and designated native; (2) mixed with final 4M Gdn HCl and heated for 5 min at 80-100 °C and designated denatured. Both samples were diluted 20-fold by H₂O and aliquots loaded on polystyrene plate activated for 1 hr with 0.2% glutaraldehyde in PBS. The plates, incubated overnight at 5 °C, were blocked with TBS (pH 7.8) containing 0.5% BSA (w/v) and 6% Sorbitol (w/v).

The samples were washed three times with TBS (pH 7.8) containing 0.05% (v/v) of Tween 20 and incubated for 2 hrs with Europium-labeled chimeric recombinant Fab P and S. The plates were developed after additional washing in enhancement solution provided by the Europium label supplier (Wallac Inc., Turku, Finland) and signal was evaluated with Discovery (Packard Inc.) time-resolved fluorescence spectroscopy. The PrP concentration was calculated as described (Safar, J., H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165) and plotted for various antibody concentrations (Figure 3). The data points and bars represent average concentration ± SEM obtained from three independent experiments at an antibody concentration 1 µg/ml. The Europium density in both recombinant antibodies is 4.3 Eu/Fab.

Example 3: Sensitivity of detection of Bovine PrP^{Sc} in Mouse Brain Homogenates

Bovine PrP^{Sc} was detected in BSE-infected Tg(BoPrP) mouse brain homogenates using Eu-(HuM)Fab P. Samples containing serial dilutions of BSE-infected 5% (w/v) brain homogenate in 2% Sarcosyl (w/v), prepared as described in Example 2, were treated with 5 µg/ml of Proteinase K and concentrated with 0.3% (w/v) NaPTA and 1.7 mM MgCl₂ prior to CDI. Following PTA precipitation, each sample was divided into two aliquots: (1) untreated and designated native; (2) mixed with final 4M Gdn HCl and heated for 5 min at 80-100°C and designated denatured. Both samples were diluted 20-fold by H₂O and aliquots loaded on polystyrene plate activated for 1 hr with 0.2% glutaraldehyde in PBS. The plates, incubated overnight at 5 °C, were blocked with TBS (pH 7.8), containing 0.5% BSA (w/v) and 6% Sorbitol (w/v). They were then washed three times with TBS (pH 7.8) containing 0.05% (v/v) of Tween 20 and incubated for 2 hrs with Europium-labeled chimeric recombinant Fab P and S. The plates were developed after an additional 7 washing steps in enhancement solution provided by the Europium label supplier (Wallac Inc., Turku, Finland). The signal was evaluated with Discovery (Packard Inc.) time-resolved fluorescence spectroscopy and the PrP concentration was calculated as described (Safar, J.,

WO 02/10335

PCT/US01/22648

H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165). The native and denatured aliquots from each sample were crosslinked to glutaraldehyde-activated ELISA plates and both aliquots were incubated with Europium labeled (HuM)Fab P antibody. After washing, the signal was evaluated with Discovery (Packard Inc.) time-resolved fluorescence spectroscopy.

- 5 The results are expressed as a ratio (Figure 4) or difference (Figure 5) of the signals from denatured (TRFD) and native (TRFN) aliquots of each sample. The dynamic range of the detection of BoPrPsc was found to be 100,000-fold.

Example 4 Sensitivity of Detection of Bovine PrPSc in Cow Brain Homogenates

- 10 Bovine PrPSc was also detected in homogenates of BSE-infected cows using Eu-(HuM)Fab P. Brains of BSE-infected and normal cows were homogenized on ice by 3 x 30 second strokes of PowerGen homogenizer (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) in PBS (pH 7.4). Resulting 10% (w/v) homogenates were spun for 5 min at 500 g at table top centrifuge. The supernatant was mixed 1:1 with 4% Sarcosyl in PBS (pH 7.4). The 6 BSE-infected
- 15 brain homogenates were serially diluted into normal cow brain homogenate and each aliquot was first treated with 5 µg/ml of Proteinase K for 1 hrs at 37°C. After blocking the reaction with 0.5 mM PMSF and Aprotinin and Leupeptin (2 µg/ml each), the samples were precipitated with NaPTA and MgCl₂ as described (Safar, J., H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165) and each sample was divided into two aliquots: (1) untreated and
- 20 designated native; (2) mixed with final 4M Gdn HCl and heated for 5 min at 80-100 °C and designated denatured. Both samples were diluted 20-fold by H₂O and aliquots loaded on polystyrene plate activated for 1 hr with 0.2% glutaraldehyde in PBS. The plates, incubated overnight at 5 °C, were blocked with TBS (pH 7.8) containing 0.5% BSA (w/v) and 6% Sorbitol (w/v).
- 25 The samples were washed three times with TBS (pH 7.8) containing 0.05% (v/v) of Tween 20 and incubated for 2 hrs with Europium-labeled recombinant chimeric Fab P. The plates were developed after additional washing steps in enhancement solution provided by the Europium label supplier (Wallac Inc., Turku, Finland). The signal was evaluated with Discovery (Packard Inc.) time-resolved fluorescence spectroscopy and the
- 30 PrP concentration was calculated as described (Safar, J., H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165). Bovine PrPSc was detected in the brain homogenates of BSE-infected British cows using Eu-(HuM) Fab P. Dynamic range of the detection of BoPrPSc is 10,000-fold in samples containing serial dilutions of BSE-infected 5% (w/v) brain

WO 02/10335

PCT/US01/22648

homogenate in 2 % Sacrosyl (w/v) were treated with 5µg/ml of Proteinase K and concentrated with 0.3% (w/v) NaPTA and 1.7 mM MgCL₂ prior to CDI. The native and denatured aliquots from each sample were incubated and evaluated with Discovery (Packard Inc.) time resolved fluorescence spectroscopy from denatured (TRFD) and native (TRFN) aliquots of each sample. The results are expressed as a ratio (Figure 6) or difference (Figure 7) of the signals from denatured (TRFD) and native (TRFN) aliquots of each sample.

Example 5: Strain Sensitivity of Antibody Against Bovine PrP^{Sc} in Infected Cow Brain Homogenates

Difference in Eu-(HuM)Fab P detection due to differences in BSE strain characteristics was determined using homogenates from 32 different British cows infected with BSE. Brains of 32 BSE-infected cows and 7 normal U.S. control cows were homogenized on ice by 3x30 sec strokes of PowerGen homogenizer (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) in PBS (pH 7.4). Resulting 10% (w/v) homogenates was spun for 5 min at 500 g at table top centrifuge. The supernatant was mixed 1:1 with 4% Sarcosyl in PBS (pH 7.4). The BSE-infected brain homogenate was serially diluted into uninoculated Tg(Bo) mice homogenate and each aliquot was first treated with 5 µg/ml of Proteinase K for 1 hrs at 37 °C. After blocking the reaction with 0.5 mM PMSF and Aprotinin and Leupeptin (2 µg/ml each), the samples were precipitated with NaPTA and MgCl₂ as described (Safar, J., H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165) and each sample was divided into two aliquots: (1) untreated and designated native; (2) mixed with final 4M Gdn HCl and heated for 5 min at 80-100 °C and designated denatured. Both samples were diluted 20-fold by H₂O and aliquots loaded on polystyrene plate activated for 1 hr with 0.2% glutaraldehyde in PBS. The plates, incubated overnight at 5 °C, were blocked with TBS (pH 7.8) containing 0.5% BSA (w/v) and 6% Sorbitol (w/v).

The samples were then washed three times with TBS (pH 7.8) containing 0.05% (v/v) of Tween 20 and incubated for 2 hrs with Europium-labeled recombinant chimeric Fab P. The plates were developed after additional washing steps in enhancement solution provided by the Europium label supplier (Wallac Inc., Turku, Finland). The signal was evaluated with Discovery (Packard Inc.) time-resolved fluorescence spectroscopy and the PrP concentration was calculated as described (Safar, J., H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165). Concentration of PrP 27-30 plotted against denatured/native ratio determined by CDI in 32 British cows infected by BSE and 12 U.S. controls (Figure 8). The

WO 02/10335

PCT/US01/22648

data are expressed as average SEM. The concentration of PrP 27-30 was calculated as described previously (Safar, J., H. Willie, et al. (1998) Nat. Med, 4(10):1157-1165).

Example 6: Cross-species Sensitivity of Eu-(HuM)Fab P

5 The Eu-(HuM)Fab P antibody was then tested for its ability to detect prion in a variety of ungulate species, including mule deer, elk, and white-tail deer. The brain homogenates of chronic wasting diseases (CWD)-infected mule deer, elk, white-tail deer, and normal controls were treated as in Example 4 to determine the ability of Eu-(HuM)Fab P antibody to recognize prions in these different species. The results of CDI testing for 10 PrPSc is shown in Figures 9 and 10. The results are expressed as a ratio (Figure 9) or difference (Figure 10) of the time-resolved fluorescence (TRF) signals from denatured (TRFD) and native (TRFN) aliquots of each sample.

Example 7: Detection of Prions in Deer Infected with CWD

15 Deer PrPSc was detected in homogenates of CWD-infected deer using Eu-(HuM)Fab P. Samples containing serial dilutions of CWD-infected 5% (w/v) brain homogenate in 2% Sacrosyl (w/v) were treated with 5µg/ml of Proteinase K and concentrated with 0.3% (w/v) NaPTA and 1.7mM MgCL2 prior to CDI. The native and denatured aliquots from each sample were crosslinked to glutaraldehyde-activated ELISA 20 plate and both aliquots were incubated with Europium labeled (HuM)Fab P antibody. After 7 washing steps, the signal was evaluated with Discovery (Packard Inc.) time-resolved fluorescence spectroscopy. The results are expressed as a ratio (Fig. 11) or difference (Fig. 12) of the signals from denatured (TRFD) and native TRFN) aliquots of each sample.

25 **Example 8**

The assay method is demonstrated on the following example with scrapie-infected Syrian hamster brain homogenate. This is done in a manner similar to the method as would be applied to a cow or any ungulate brain. The homogenate is diluted 4-fold into PrnP0/0 mouse brain homogenate:

30 a) Each plate is calibrated with an inner standard consisting from five dilution points of denatured SHaPrP90-231. The time-resolved fluorescence (TRF) of total PrP is developed with Eu-labeled 3F4 IgG and the time-resolved fluorescence values are plotted as a function of PrP concentration. The data are fit within a linear or polynomial

WO 02/10335

PCT/US01/22648

equation using the least square method and best function is selected for the calculation of denatured PrP:

$$\text{PrP } [\mu\text{g/ml}] = -0.22935 + 0.00026567 * [\text{TRF}] + 0.000000012255 * [\text{TRF}]^2 \quad (1)$$

- b) On the rest of the plate, native and denatured aliquots of scrapie-infected Syrian hamster brain homogenate, diluted 4-fold, and crosslinked to the plastic support were incubated with Eu-labeled 3F4 IgG. The total PrP content is calculated according to the above formula from the fluorescence signal of denatured sample:

| scrapie infected brain homogenate concentration [%] | native TRF [cpm] | denatured TRF [cpm] | PrPC+Sc [$\mu\text{g/ml}$] |
|---|------------------|---------------------|------------------------------|
| 5 | 4214 | 109814 | 43.7 |
| 1.25 | 1381 | 30804 | 9.1 |
| 0.3125 | 1070 | 11240 | 2.9 |

- c) The ratio of the fluorescence signals between denatured and native samples is calculated:

| scrapie infected brain homogenate concentration [%] | native TRF [cpm] | denatured TRF [cpm] | denatured/native ratio |
|---|------------------|---------------------|------------------------|
| 5 | 4214 | 109814 | 26.1 |
| 1.25 | 1381 | 30804 | 22.3 |
| 0.3125 | 1070 | 11240 | 10.5 |

The normal value of PrPC determined from normal hamster brain homogenate is 2.2; the values over 2.2 are considered abnormal and indicate the presence of PrPSc.

- d) The excess of fluorescence signal over that expected for α -helical PrP in the transition from native to denatured state is a measure of the amount of PrPSc and is calculated according the formulae provided:

$$\Delta F\beta_{n-d} = F_d - (F_n * f_{\alpha n-d}) \quad (2)$$

WO 02/10335

PCT/US01/22648

where $f =$ is the maximum value of the factor for the fluorescence signal in the transition from native to denatured state of PrPC; F_d is the fluorescence of denatured sample; and F_n is the fluorescence of native sample. The amount of PrPSc is then calculated from

5 $\Delta F \beta_{n-d}$ and equation (1):

| scrapie infected brain homogenate concentration (%) | $\Delta TRF \beta_{n-d}$ [cpm] | PrPSc [$\mu\text{g/ml}$] |
|---|--------------------------------|----------------------------|
| 5 | 100543.2 | 38.9 |
| 1.25 | 27765.8 | 8.1 |
| 0.3125 | 8886 | 2.2 |

The positive value calculated for the β -sheet form of prion protein indicates the presence of PrPSc.

10 While the present invention has been described with reference to the specific embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective,
 15 spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

CLAIMS

1. An antibody characterized by its ability to preferentially bind to a native ungulate PrPC in situ.

5 2. The antibody of claim 1, wherein the antibody specifically binds to a native PrPC of an ungulate selected from the group consisting of a cow, a deer, a sheep, an elk, a horse, a kudu, a goat, a camel and pig.

3. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds to denatured ungulate PrPSc with a binding affinity K_a of 10^7 l/mol or more and a binding affinity to native ungulate PrPSc is K_a of 10^6 l/mol or less.

4. The antibody of claim 3, wherein the antibody binds to denatured ungulate PrPSc with a binding affinity K_a of 10^8 l/mole or more and does not bind native ungulate PrPSc in situ.

5. The antibody of claim 1, wherein the antibody is characterized by specific binding to a PrPC of a single ungulate species and not binding to native PrPSc in situ of the single ungulate species.

20 6. The antibody of claim 1, wherein the antibody is characterized by an ability to bind to PrPC of a plurality of ungulate species and not bind to native PrPSc in situ of the plurality of ungulate species.

25 7. An antibody which specifically binds to native ungulate PrPC, said antibody produced by the process comprising the steps of:

synthesizing a library of antibodies on phage;

panning the library against a sample by bringing the phage into contact with a composition comprising ungulate PrP proteins;

30 isolating phage which bind native ungulate PrPC.

8. The antibody of claim 7, wherein the process further comprises:

analyzing the isolated phage to determine a sequence encoding an amino acid

WO 02/10335

PCT/US01/22648

sequence to which the PrPC binds.

9. The antibody of claim 7, wherein the library of antibodies on phage are prepared by:
- 5 immunizing a host mammal with PrP protein to create an immune response;
extracting cells from the host mammal which cells are responsible for production of
antibodies;
isolating RNA from the cells of the host mammal;
reverse transcribing the RNA to produce cDNA;
10 amplifying the cDNA using a primer;
inserting the cDNA into a phage display vector such that antibodies are expressed on
the phage; and
panning antibodies against an antigen dispersed in a liposome.
- 15 10. The antibody of claim 9, wherein the antigen dispersed in a liposome is a peptide
encoding an epitope of PrPC that is not available on PrPSc.
11. A method of detecting ungulate PrPSc in a source comprising:
treating an ungulate sample suspected of containing PrPSc with an enzyme to remove
20 PrPC in the sample;
further treating the sample to denature any PrPSc in the sample;
contacting the sample suspected of containing PrPSc with a diagnostically effective
amount of an antibody which specifically binds to denatured PrPSc in the sample; and
determining whether the antibody binds specifically to any material in the sample.
25
12. The method of claim 11, wherein the ungulate is a cow.
13. An assay, comprising:
a support surface; and
30 an antibody bound to the surface of the support, the antibody characterized by an
ability to bind denatured ungulate PrPSc with a binding affinity of 10⁷ l/mole or more.
14. The assay of claim 13, wherein the antibody is characterized by an ability to bind

WO 02/10335

PCT/US01/22648

50% or more denatured ungulate PrPSc in a liquid flowable sample.

15. The assay of claim 13, wherein a plurality of different antibodies are bound to the support surface and each antibody has a K_a of 10^7 l/mole or more relative to PrPSc.

5

16. A method of detecting prions in an ungulate, comprising:

extracting tissue from an ungulate;

dividing the sample into a first portion and a second portion;

contacting the first portion with the antibody which preferentially binds to native

10 ungulate PrPC in situ to determine a first PrP level;

treating the second portion to denature PrPSc present in the second portion; and

contacting the denatured second portion with an antibody which preferentially binds to native ungulate PrPC in situ to determine a second PrP level;

15 wherein the presence of PrPSc in said sample is detected by subtracting the first level from the second level and considering an effect on the treating on the second PrP level.

17. The method of claim 16, wherein the tissue is brain tissue and is extracted from a cow.

20 18. A method for determining the presence of PrPSc in a sample derived from an ungulate, the method comprising:

contacting a first portion of the sample with an antibody which preferentially binds native PrPC in situ;

25 treating a second portion of the sample to increase binding affinity of any PrPSc to the antibody;

contacting the treated second portion of the sample with the antibody to determine a second concentration;

30 adjusting the second concentration to provide an adjusted concentration which adjustment compensates for increased affinity of any PrPC in the sample for the antibody resulting from the treating; and

comparing the first concentration with the adjusted concentration to determine the presence of PrPSc in the sample.

WO 02/10335

PCT/US01/22648

19. The method of claim 18, wherein the sample is obtained from an animal not exhibiting symptoms of disease.

20. The method of claim 18, wherein the first concentration and the second
5 concentration are determined using time-resolved, dissociation-enhanced fluorescence.

21. The method of claim 20, wherein the PrPSc is present in the sample in a concentration of 1×10^3 particles/ml or less.

22. The method of claim 18, wherein treating comprises subjecting said sample to a treatment selected from the group consisting of heat, pressure, and chemical denaturation, sufficient to convert at least 2% of any PrPSc in the sample to a form which binds the
10 antibody.

23. A method for determining the presence of PrPSc in a sample, the method comprising:
treating a sample to convert any PrPSc in the sample into a binding conformation having an affinity for an antibody which binds ungulate PrPC in situ;
contacting the treated sample with the antibody to determine a concentration;
20 adjusting the concentration to provide an adjusted concentration which compensates for increased affinity of any PrPC in the sample to the antibody resulting from the treating;
and
comparing said adjusted first concentration to a known concentration selected from the group consisting of a control concentration and a predetermined standard concentration
25 to determine the presence of PrPSc.

24. The method of claim 23, wherein the concentration is determined using flow cytometry.

25. The method of claim 23, wherein the adjusted concentration is compared to a known concentration determined from a treated non-infected control sample.

26. The method of claim 23, wherein the adjusted concentration is compared to a

WO 02/10335

PCT/US01/22648

known concentration predetermined from a treated sample from a non-infected population.

27. The method of claim 23, wherein the PrPSc is present in the sample in a concentration of 1×10^3 protein molecules or less per ml and wherein the PrPC is present in the sample in a concentration of 1×10^6 protein molecules or more per ml.
- 5

WO 02/10335

PCT/US01/22648

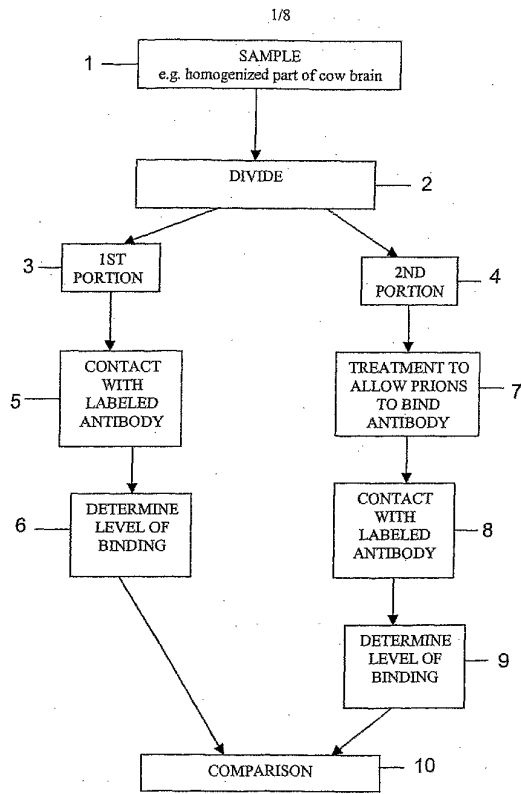


FIG. 1

WO 02/10335

PCT/US01/22648

2/8

Mo Met Ala Asn Leu --- Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr
Bo Val Lys Ser His Ile Ser Ile Val Ala

Mo Met Trp Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
Bo Ser

Mo --- Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
Bo

Mo Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly --- Thr Trp Gly Gln Pro His
Bo Gly Gly

Mo Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His
Bo Gly

Mo Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln ---
Bo Gly Pro His

Mo --- --- --- --- Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys
Bo Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly

Mo Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
Bo Met

Mo Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
Bo

Mo Met Ser Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr
Bo Leu Ser Tyr

Mo Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
Bo His

Mo Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
Bo

Mo Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
Bo Val Glu

Mo Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
Bo Ile

Mo Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg
Bo Gln ---

Mo Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile Leu Leu
Bo - Gly Ala Val Ile

Mo Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
Bo

FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/10335

PCT/US01/22648

3/8

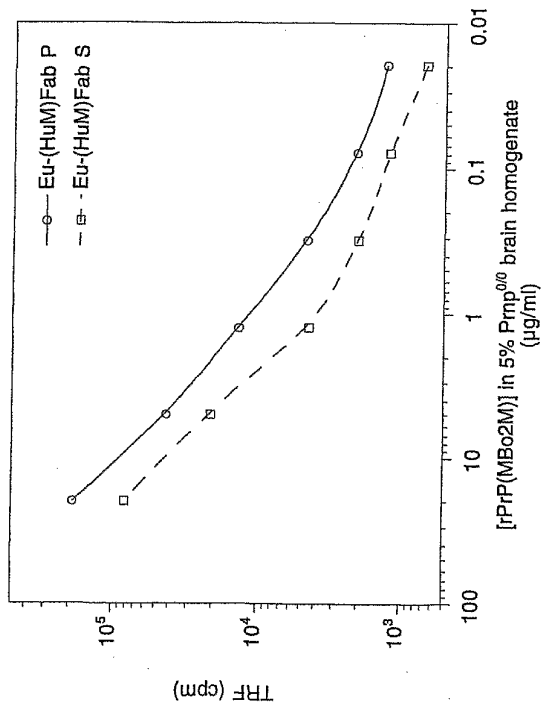


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/10335

PCT/US01/22648

4/8

FIG. 4

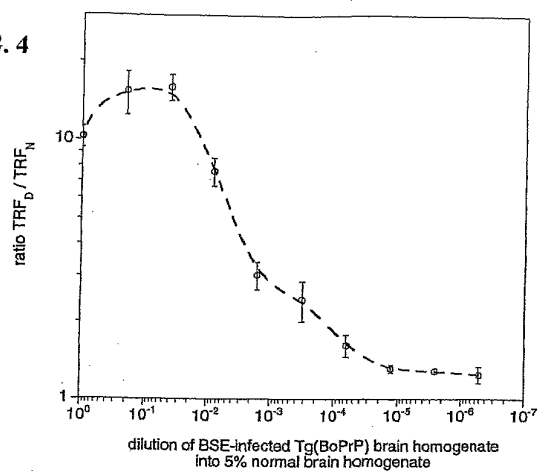
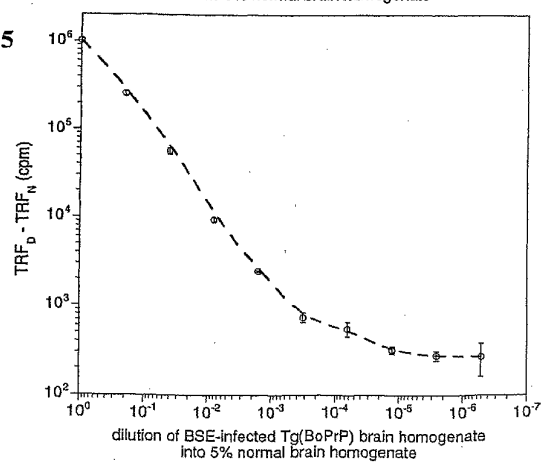


FIG. 5



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/10335

PCT/US01/22648

5/8

FIG. 6

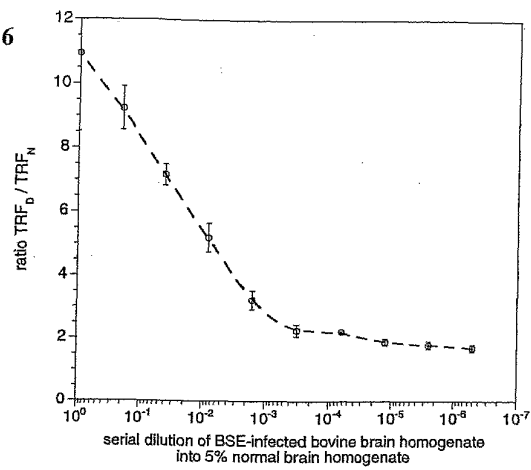
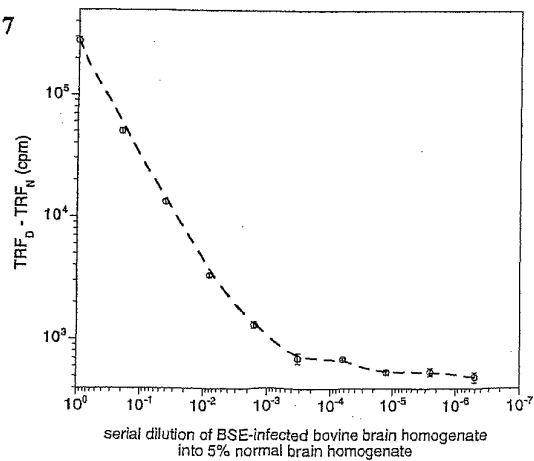


FIG. 7



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/10335

PCT/US01/22648

6/8

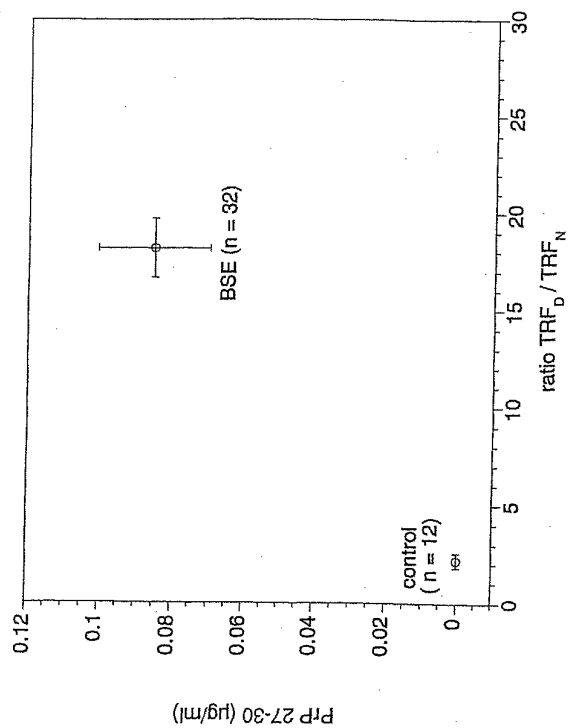
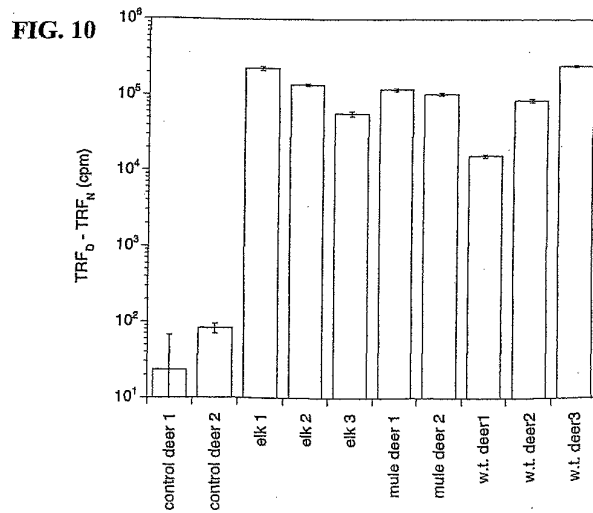
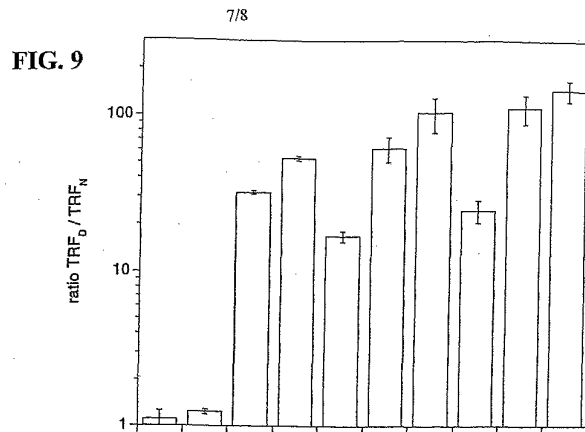


FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/10335

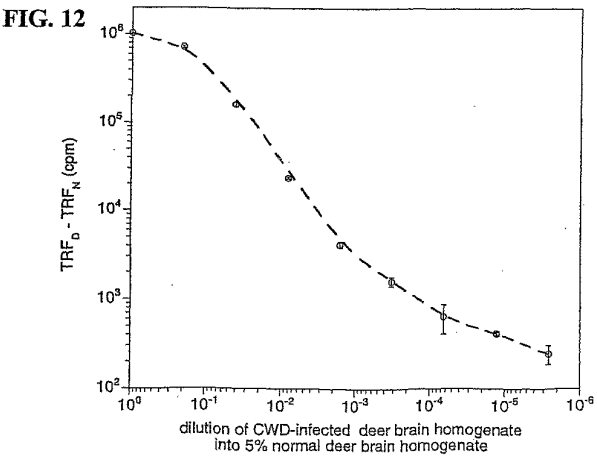
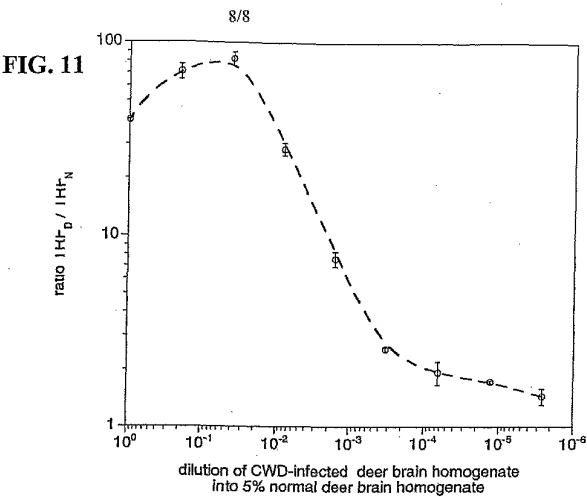
PCT/US01/22648



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/10335

PCT/US01/22648



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/010335 A3

(51) International Patent Classification:

G01N 33/00

(72) Inventors; and

(21) International Application Number: PCT/US01/22648

(75) Inventors/Applicants (for US only): PRUSINER, Stanley, B. (US/US); 2615 Divisadero Street, San Francisco, CA 94123 (US); SAFAR, Jiri (CZ/US); 3322 Sugar Berry Lane, Walnut Creek, CA 94598 (US); WILLIAMSON, Anthony, R. (GB/US); 12567-166 Ruelle Alliance, San Diego, CA 92130 (US); BURTON, Dennis, R. (GB/US); 6044 Beaumont Avenue, La Jolla, CA 92037 (US).

(22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/627,218 27 July 2000 (27.07.2000) US

(74) Agent: BOZICEVIC, Karl; Bozicevic, Field & Francis LLP, Suite 200, 200 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025 (US).

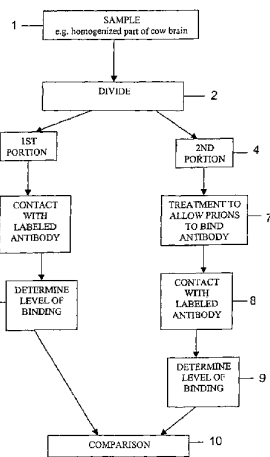
(71) Applicants (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607-5200 (US); SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, THE [US/US]; 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GL, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES SPECIFIC FOR UNGUULATE PrP

WO 02/010335 A3



(57) Abstract: The present invention provides antibodies that specifically bind with a high degree of binding affinity to a native ungulate PrP^C in situ and/or a denatured ungulate PrP^{Sc}, but not to a native ungulate PrP^{Sc} in situ. Preferred antibodies bind native bovine PrP^C and treated PrP^{Sc} but not native bovine PrP^{Sc} in situ and can be used in an assay to determine if a sample is infected with infectious prions, i.e. pathogenic PrP^{Sc}.

WO 02/010335 A3



SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:

— with international search report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:

10 July 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 01/22648 |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/00 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 99 42829 A (COHEN FRED E ;SAFAR JIRI G (US); UNIV CALIFORNIA (US); PRUSINER ST) 26 August 1999 (1999-08-26) page 11, lines 15-18; pages 31-33; examples; claims | 1, 3, 4, 6, 11-27 |
| X | SAFAR J ET AL: "Eight prion strains have PrPsc molecules with different conformations" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 1157-1165, XP002230960 ISSN: 1078-8956 the whole document | 1, 3, 4, 6, 13-15, 23-27 |
| -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 10 March 2003 | | Date of mailing of the international search report 27/03/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2580 HV Hilversum Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Renggli, J |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/22648

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | PERETZ DAVID ET AL: "A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 273, no. 3, 31 October 1997 (1997-10-31), pages 614-622, XP002234132 ISSN: 0022-2836 abstract; page 616, chapter "Identification of epitopes"; discussion; figure 6 | 1,3,4,6, 13-15 |
| Y | PRUSINER S B ET AL: "IMMUNOLOGIC AND MOLECULAR BIOLOGIC STUDIES OF PRION PROTEINS IN BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 167, 1 March 1993 (1993-03-01), pages 602-613, XP002036867 ISSN: 0022-1899 abstract | 2,5,7-10 |
| Y | PRUSINER S B ET AL: "GENETICS OF PRIONS" ANNUAL REVIEW OF GENETICS, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 31, 1997, pages 139-175, XP002901001 ISSN: 0066-4197 page 146, paragraph 1 | 2,5,7-10 |

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

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 01/22648 |
|--|---|--|
| Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) | | |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | | |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 16 and 17 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. | |
| 2. <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: | |
| 3. <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). | |
| Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) | | |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows: | | |
| 1. <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. | |
| 2. <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. | |
| 3. <input type="checkbox"/> | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: | |
| 4. <input type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: | |
| Remark on Protest | | |
| <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. | | |
| <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/22648

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9942829 | A | 26-08-1999 | |
| | | AU 753331 B2 | 17-10-2002 |
| | | AU 2660299 A | 06-09-1999 |
| | | BR 9908059 A | 08-01-2002 |
| | | CA 2318477 A1 | 26-08-1999 |
| | | DE 1057022 T1 | 25-10-2001 |
| | | EP 1057022 A1 | 06-12-2000 |
| | | US 2003004312 A1 | 02-01-2003 |
| | | WO 9942829 A1 | 26-08-1999 |
| | | US 6221614 B1 | 24-04-2001 |
| | | US 2001001061 A1 | 10-05-2001 |
| | | US 2001005578 A1 | 28-06-2001 |
| | | US 2002001817 A1 | 03-01-2002 |
| | | US 2002041859 A1 | 11-04-2002 |

フロントページの続き

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

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100108774

弁理士 橋本 一憲

(72)発明者 プルシナー スタンレー ビー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン フランシスコ ディビサデロ ストリート 2 6 1 5

(72)発明者 サファー ジリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウォルナット クリーク シュガー ベリー レーン 3 3
2 2

(72)発明者 ウィリアムソン アンソニー アール .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ディエゴ ルエッテ アリアンテ 1 2 5 6 7 - 1 6
6

(72)発明者 パートン デニス アール .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホヤ バーモント アベニュー 6 0 4 4

F ターム(参考) 2G045 AA25 BA11 BB03 CB01 FA37 FB03 JA01

4B024 AA10 AA11 BA43 CA04 DA02 EA03 GA11 HA12

4H045 AA11 AA30 BA10 CA45 DA75 EA50 FA74