

(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2004-532633

(P2004-532633A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 115 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-588182 (P2002-588182)  
 (86) (22) 出願日 平成14年5月8日 (2002.5.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月10日 (2003.11.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2002/001665  
 (87) 国際公開番号 W02002/090974  
 (87) 国際公開日 平成14年11月14日 (2002.11.14)  
 (31) 優先権主張番号 101 22 543.1  
 (32) 優先日 平成13年5月9日 (2001.5.9)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 503361835  
 ビオ・ビジョン・アーゲー  
 ドイツ連邦共和国、デー-30625 ハ  
 ノーバー、フェオドルーリュネン-シュト  
 ラーセ 5  
 (74) 代理人 100058479  
 弁理士 鈴江 武彦  
 (74) 代理人 100091351  
 弁理士 河野 哲  
 (74) 代理人 100088683  
 弁理士 中村 誠  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊  
 (74) 代理人 100075672  
 弁理士 峰 隆司

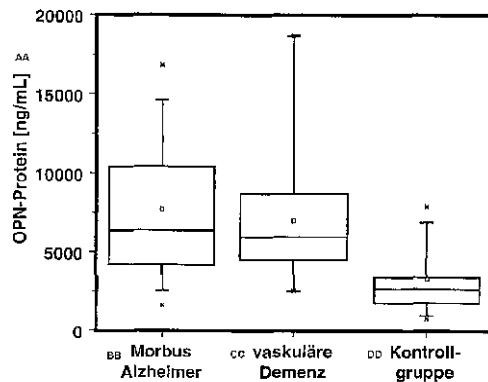
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 進行性の慢性痴呆疾患の検出方法、これに適したペプチド及び検出試薬

(57) 【要約】

【課題】 進行性の慢性痴呆疾患の検出方法、所属するペプチド及び検出試薬

【解決手段】 本発明は定義されたペプチド、及び対照グループの前記ペプチドの濃度に対して相対的な、進行性の慢性痴呆疾患を患う患者の体液中の前記ペプチドの定量分析に関する。本発明によるペプチドは対応する遺伝子を有するタンパク質前駆体から由来していて、これは特別な方法でプロセッシングされ、場合により翻訳後修飾され、特にリン酸化されている。このペプチドの濃度又はこのペプチドに属するプロセッシングされていないタンパク質の濃度上昇は、進行性の慢性痴呆疾患を示す。この進行性の慢性痴呆疾患の検出は、このペプチド及び/又はタンパク質の同定によってだけ行うか又は組み合わせて行う。本発明はさらに進行性の慢性痴呆疾患の進行制御のため、及び予後のため、特に「Mini Mental Scores」の補足又は代用として、ならびに進行性の慢性痴呆疾患、例えばアルツハイマー病の治療法の開発のための使用に関する。



AA...OPN-PROTEIN  
 BB...ALZHEIMER'S DISEASE  
 CC...VASCULAR DEMENTIA  
 DD...CONTROL GROUP

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体の生物学的試料中の少なくとも 1 種のマーカーペプチドを同定することにより、進行性の慢性痴呆疾患、又はこのような疾患に対する素因を検出する方法において、前記のマーカーペプチドが遺伝子バンク登録番号 X 1 3 6 9 4 の配列又はこの配列と相同の配列から誘導されるペプチドである、進行性の慢性痴呆疾患、又はこのような疾患に対する素因を検出する方法。

## 【請求項 2】

少なくとも 1 種のペプチドの相対的濃度を、対照試料中の同じペプチドの濃度と比較することにより決定し、その際、

10

a) それぞれのマーカーペプチドに対して特異的な、試料中の濃度変化を、対照試料に対して相対的に確認し、かつ

b) このマーカーペプチドの有意の濃度変化を、b) に記載した方法で慢性痴呆疾患についての陽性の検出結果として評価する

ことを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記のペプチドが、

a) D R O P N - ペプチドであるか、又は

b) 登録番号 X 1 3 6 9 4 に一致するペプチドであるか、又は

c) a) 又は b) に記載されたペプチドの天然に存在する対立遺伝子の誘導体であるか、又は

20

d) D R O P N - 突然変異体であり、この場合、この D R O P N - 突然変異体は、対応する突然変異していない D R O P N - 配列と有利に最大で 2 個のアミノ酸が異なっているか、又は

e) b) 又は c) に記載されたペプチドの一つの突然変異体であり、この場合、このアミノ酸配列は b) 又は c) に記載されアミノ酸配列と最大で 30% 相違しているか、又は

f) a) ~ e) に対応するが、化学的に修飾されたか、又は翻訳後に修飾されたペプチドである

ことを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

30

感度及び / 又は特異性を高めるために、他の診断方法と組み合わせて実施することを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5】

進行性の慢性痴呆疾患が、アルツハイマー病又はそれに類縁する神経学的疾患、特にレーヴィ小体痴呆又は血管性痴呆であることを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

少なくとも 1 種の同定された D R O P N - ペプチドが選択され、その際に、このペプチドは修飾されていない形、化学的に修飾された形又は翻訳後に修飾されて、有利にリン酸化されたペプチドとして、又は N 末端にピログルタミン酸基を有する形で存在することを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか一項記載の方法。

40

## 【請求項 7】

ペプチド濃度が疾患の陽性の検出のために、それぞれのペプチドに対して特異的な方向で、対照試料中のそれぞれのペプチドの濃度に対して相対的に向上しているか又は低下していることを特徴とする、請求項 1 から 6 までのいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 8】

疾患の重度の測定のために用いる、特に「Mini-Mental State Examination」(MMSE)の実施に代わる方法として又は補足する方法として用いるか、又は神経学的疾患の前段階、特に「mild cognitive impairment」(MCI)の診断のため又は疾患の進行の予後のために用いることを特徴とす

50

る、請求項 1 から 7 までのいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

生物学的試料は、脳脊髄液、血清、血漿、尿、滑液、痰、便、涙又は組織ホモジェネートであることを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

1 種又は数種のペプチドの同定を質量分析による測定方法を用いて、有利に M A L D I (マトリックス支援レーザー脱離及び単離) 質量分析法を用いて実施することを特徴とする、請求項 1 から 9 までのいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

この質量分析測定による同定が、2627・2715 / 1009・4716 / 4032  
 10  
 ・7594 / 4465・0079 / 3718・6368 / 1737・8030 / 1900  
 ・8664 / 956・4087 / 895・4148 / 7653・6003 / 4662  
 ・0953 / 2093・9304 / 899・3985 / 1087・4835 / 152  
 2・7991 / 1635・8832 / 1763・9781 / 1911・0466 / 322  
 2・6521 / 3435・7634 / 1650・8941 / 1797・9625 / 310  
 9・5680 / 2796・4042 / 1112・5826 / 844・3563 / 25  
 26・2238 / 2528・2031 又は 3718・6368 ダルトンの理論的なモノア  
 イソトピック質量ピークの少なくとも 1 つ及び / 又は 7738 / 7818 / 7898 / 7  
 978 および 8058 ダルトンの実験的に測定された質量の 1 つを含むことを特徴とする  
 20  
 、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

ペプチドの同定を免疫学的試験、分子生物学的試験、物理学的試験又は化学的試験を用いて行うことを特徴とする、請求項 1 から 9 までのいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

免疫学的試験が E L I S A ( E n z y m e L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y )、放射線免疫アッセイ又はウェスタンブロットであることを特徴とする、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

1 種又は数種のペプチドの同定を、本発明による使用したペプチドに結合する抗体、抗体フラグメント、ファージ粒子、P N A 又はアフィニティマトリックスを用いて実施すること  
 30  
 を特徴とする、請求項 12 記載の方法。

【請求項 15】

同定の前に試料をクロマトグラフィーにより、有利に逆相クロマトグラフィーにより、さらに有利に高解像度逆相クロマトグラフィーにより分別することを特徴とする、請求項 1 から 14 までのいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

同定の前に試料を沈殿反応又は液相分離によって分別することを特徴とする、請求項 1 から 14 までのいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

a) D R O P N - ペプチドであるか、又は  
 40  
 b) 天然由来の O P N - タンパク質の D R O P N - 誘導体、特に X 1 3 6 9 4 の誘導体であるか、又は  
 c) O P N - 対立遺伝子の D R O P N - 誘導体であるか、又は  
 d) D R O P N - 突然変異体であり、その際、D R O P N - 突然変異体は有利に、突然変異していない対応する D R O P N - 配列と最大で 2 個のアミノ酸が相違するか、又は  
 e) a) から d) に対応する、化学的に修飾されたか又は翻訳後に修飾されたペプチドである、ペプチド。

【請求項 18】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を検出するための抗体を獲得するため及び / 又は診断試薬を開発するための請求項 17 記載の少なくとも 1 種の D R O P  
 50

N - ペプチドの使用。

【請求項 19】

請求項 17 記載の D R O P N - ペプチドと結合する抗体。

【請求項 20】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の診断のための、オステオポンチンに対する抗体又は請求項 19 記載の抗体の使用。

【請求項 21】

所属するタンパク質及びペプチドの間接的測定及び/又は定量化のための、D R O P N - ペプチド又は O P N - タンパク質に相当する核酸の使用。

【請求項 22】

O P N - 核酸の検出をノーザンブロット、逆転写酵素 P C R 又は定量的 P C R を使用して行う、請求項 21 記載の方法の使用。

10

【請求項 23】

神経学的疾患、特に進行性の慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病のための治療法の有効性を測定するための、請求項 1 から 16 まで、請求項 18 又は請求項 20 から 22 までのいずれか一項記載の方法の使用。

【請求項 24】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の治療又は臨床研究に適している患者を層別するための、請求項 1 から 16 まで、又は請求項 20 から 22 までのいずれか一項記載の方法の使用。

20

【請求項 25】

D R O P N - ペプチドに相当する、核酸。

【請求項 26】

O P N - 特異的アンチセンス核酸として、又は O P N - 特異的リボザイムとして、又は O P N - 特異的トリプレックス核酸として適している、核酸。

【請求項 27】

請求項 1 から 16 のいずれか一項記載の方法に使用した O P N - ペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト。

【請求項 28】

請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法に使用したペプチド、又は請求項 25 から 27 のいずれか一項記載の物質において、ペプチド、核酸、アゴニスト及びアンタゴニストが、血液 - 脳 - 隔壁及び/又は血液 - 髄液 - 隔壁を通過することができるように、これらが製剤学的方法により調製されているか又は化学的又は生物学的に修飾されている、請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法に使用したペプチド、又は請求項 25 から 27 のいずれか一項記載の物質。

30

【請求項 29】

請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法に使用したペプチド、又は請求項 25 から 27 のいずれか一項記載の物質において、これらの物質が、特別な投与経路のために最適化されているように、特に血液循環路内、胃腸管内、尿生殖路内、リンパ系内、クモ膜下腔内に投与するため、吸入のため、又は組織、例えば筋肉組織、脂肪組織、脳などへの直接的注射のために最適化されているように、製剤学的方法により調製するか又は化学的又は生物学的に修飾されている、請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法に使用したペプチド、又は請求項 25 から 27 のいずれか一項記載の物質。

40

【請求項 30】

請求項 1 ~ 16 までのいずれか一項記載の少なくとも 1 種のペプチド又は請求項 25 から 27 までのいずれか一項記載の核酸、アゴニスト又はアンタゴニストの、医薬品又は医薬品作用物質としての使用。

【請求項 31】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防又は治療するための医薬品を製造するための、請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の少なくとも 1 種のペプ

50

チド、又は請求項 25 から 27 までのいずれか一項記載の核酸、アンタゴニスト又はアゴニストの使用。

【請求項 32】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防又は治療するための医薬品を製造するための、OPN-タンパク質の発現を調節する、少なくとも1種の物質の使用。

【請求項 33】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防又は治療するための医薬品を製造するための、請求項 1 ~ 16 までのいずれか一項記載の方法において使用された少なくとも1種のペプチドと結合する物質、特に抗体、抗体フラグメント、PNA又は親和性マトリックスの使用。

10

【請求項 34】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の治療のための、請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法において使用された少なくとも1種のペプチド、又は請求項 25 から 27 までのいずれか一項記載の核酸、アンタゴニスト又はアゴニストの使用。

【請求項 35】

神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を患う患者において、請求項 1 から 6 までのいずれか一項記載の方法において使用されたペプチド又は請求項 25 記載の核酸の濃度を治療的に調節する方法。

20

【請求項 36】

OPN-ペプチド、DROPN-ペプチド又はOPN-核酸の濃度を低下させる、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

OPN-タンパク質、DROPN-ペプチド又はOPN-核酸の濃度を向上させる、請求項 35 記載の方法。

【請求項 38】

患者に、

- a) OPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドと結合する抗体を投与するか、又は
- b) OPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドの発現を抑制するために、アンチセンス-核酸、トリプレックス-核酸又はリボザイムを投与するか、又は
- c) OPN-タンパク質のプロセッシングを阻害する物質を投与するか、又は
- d) 請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法に使用されたOPN-ペプチドのアンタゴニストを投与する、請求項 36 記載の方法。

30

【請求項 39】

患者に、

- a) OPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドを投与するか、又は
- b) OPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドをコードする核酸を投与するか、又は
- c) OPN-タンパク質のプロセッシングを促進する物質を投与するか、又は
- d) 請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法で使用されたOPN-ペプチドのアゴニストを投与する、請求項 37 記載の方法。

40

【請求項 40】

請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法で使用された少なくとも1種のペプチドの発現を抑制するかまたは増大させることができる物質を同定するためのスクリーニング方法。

【請求項 41】

請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法で使用された少なくとも1種のペプチドと結合するレセプター又はインヒビターを同定するためのスクリーニング方法。

【請求項 42】

請求項 1 から 16 までのいずれか一項記載の方法で使用された少なくとも1種のペプチド

50

と結合するアゴニスト又はアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、進行性の慢性痴呆疾患またはこのような疾患の素因 (veranlagung) の検出方法、特に痴呆の重度を測定するための「Mini Mental Scores」の決定法の代用法又は補足法に関する。このために患者の体液中の、又は他の試料中の所定のペプチド濃度が測定される。さらに、本発明は、進行性の慢性痴呆疾患の存在及び/又は程度を決定するために探し出されたペプチドにも関する。

【0002】

さらに、本発明は検出試薬、例えば抗体及び核酸などにも関し、これらの検出試薬によってこのペプチドもしくは相応する核酸を検出することができる。さらに、本発明は、OPN、OPN-ペプチド、OPN-抗体、OPN-核酸、OPN-タンパク質-アンタゴニスト又はOPN-タンパク質-アゴニスト、OPN-ペプチド-アゴニスト又はOPN-ペプチド-アンタゴニストを内容とする、神経学的疾患、特にアルツハイマー病の治療及び予防のための薬剤学的使用にも関する。さらに、本発明は、神経学的疾患、特にアルツハイマー病の調査のための臨床的研究に關与するのに適している、前記の疾患を示す患者を調査する方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

痴呆疾患は先進国において平均余命の向上によって増加する問題である。痴呆疾患は大部分は治癒不能であり、患者の長期間続く介護が必要となる。この患者のほぼ半数が入院による看護がなされている。痴呆症状を伴うような疾患を含めて60以上の痴呆疾患が公知である。

【0004】

しかしながら、この中でも約65%はアルツハイマー病 (Alzheimersche Krankheit, AD, Alzheimer's Disease) に該当し、従ってこの診断及びこの治療は重要性が高い。アルツハイマー病の他に、特に次の非アルツハイマー病が公知である：血管性痴呆、レーヴィ小体痴呆、ピンスヴァンガー痴呆ならびに他の疾患の付随作用としての痴呆性疾患、例えばパーキンソン病、ハンチントン病、ピック病、ゲルストマン-シュトロイスラー-シャインガー病、クロイツフェルト-ヤコブ病などである。

【0005】

アルツハイマー病は神経変性疾患であり、この神経変性疾患は次の症状により特徴付けられる：精神的能力の低下、錯乱状態及び自己存続機能及び自己看護機能の低下。特に、著しく制限された短期記憶はアルツハイマー病に特徴的であり、患者のかなり過去の記憶、例えば自己の幼少時の記憶はこの疾患によってあまり侵害されない。形態学的には脳内の変化が生じ、この変化は特にアミロイド沈着及び神経細胞の変性の形で表される。この形態学的変化は、患者の死後に組織学的に診断することができ、この疾患の今日まで唯一確かな証明である。この組織病理学的診断は、「Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease」(CERAD)が規定した基準に基づいている。アルツハイマー病の診断のためには、現時点で次の基準に基づく診断システムが使用される：「International Classification of Diseases, 10th revision」(ICD-10)、「American Psychiatric Association」の「Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition」(DSM-IV)及び「National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association」NINCDS-ADRDAにより作成された「Work Group criteria」。

10

20

30

40

50

## 【0006】

これらのシステムは、アルツハイマー病の診断を下すために一連の神経心理学的試験を使用するが、しかしながらこれらは客観的に測定可能な臨床パラメーターではない。特に重要なのはこの疾患の重度の現在の状態を把握することであり、これは例えば「Mini Mental Scores」の決定により行うことができる。この「Mini Mental Score」は心理学的試験の「Mini Mental State Examination」を用いて測定される。それにより、特に、この疾患の進行及び状況により行われる治療の有効性を観察することが可能となっている。しかしながら、Clark et al は例えばアルツハイマー病の進行を測定するために、この「Mini Mental Scores」の決定は証明の確かさにおいて限定的であることを示した、それというのもこのスコアの高さには著しい測定不正確性及び著しい変化が生じるためである[1]。従って、進行性の慢性痴呆疾患、例えばアルツハイマー病の疾患の進行を決定するために、「Mini Mental Score」を補足するか又はそれに代わることができる信頼できる臨床的に測定可能なパラメータを準備することが医学的にも、ひいては経済的にも重要である。

10

## 【0007】

現在のところ、アルツハイマー病を治療するための根元的治療法は提供されていない。この疾患は単に症候的、例えば神経伝達物質、例えばアセチルコリンの投与により治療されている。さらに、可能な治療戦略は、現在のところ酸化防止剤、ラジカルスカベンジャー、カルシウムチャンネルブロッカー、抗炎症性物質、セクレターゼインヒビター、抗アミロイド抗体などの投与ならびにアミロイド-ペプチドに対する免疫化が試されている。しかしながら、今までこの疾患の根元的治療は可能となっていない。

20

## 【発明の目的】

## 【0008】

本発明の根底をなす課題は、アルツハイマー病診断時に先行技術の欠点を回避し、かつ早期でかつ高い信頼性で適用可能な、慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の診断方法を提供することであった。

## 【0009】

この診断によって初めてアルツハイマー病の新規の治療法が可能となる。

## 【発明の概要】

30

## 【0010】

定義：

登録番号 X 1 3 6 9 4 に一致する OPN - タンパク質又はペプチド：

核酸配列 X 1 3 6 9 4 から誘導されるペプチドは OPN - タンパク質ともいわれ、OPN - タンパク質の全ての天然由来の対立遺伝子、突然変異体及び多形ならびに組織特異的に発現された OPN - 変異体が含まれる。特に、疾患に基づき又は神経学的疾患の結果として、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病によって生じる OPN - 変異体も含まれる。シグナル配列を含むかもしくは含まない OPN - タンパク質、OPN - タンパク質のまだプロセッシングされていないプロ-フォーム、ならびに既にプロセッシングされた OPN - タンパク質、可溶性 OPN - タンパク質及び膜に位置する OPN - タンパク質が含まれ、その場合、この膜に位置する OPN - タンパク質は膜内外アミノ酸配列を介して細胞膜又は器官膜と結合することができ、同様に、翻訳後修飾によって、例えばグリコシル-ホスファチジル-イノシトール(GPI) - アンカーを介しても結合することができる。さらに、OPN - 配列の変異体は、択一的スプライシング、択一的翻訳開始点及び翻訳停止点、RNA - エディティング、択一的翻訳後修飾により、ならびに他の天然由来のメカニズムによって生じる OPN - タンパク質変異体も含める。

40

## 【0011】

DROPN - ペプチド：

以後、OPN - ペプチド及び OPN - ペプチド - 変異体を DROPN (「Dementia Related Osteopontin」) ペプチドと表す。DROPN - ペプチ

50

ドは冒頭に記載したOPN配列X13694から誘導される。また、DROPN-ペプチドはオステオポンチンについての他の遺伝子バンク登録物、例えばAF052124、J04765、M83246、NM\_000582、U20758又は将来的には場合によりさらに付加される他のOPN登録物からも誘導することができる。この場合に、OPN-タンパク質-配列は場合により番号X13694の遺伝子バンク登録物の配列とは異なることも可能であり、例えば現在のところ遺伝子バンク登録物のAF052124、J04765及びNM\_000582がこの場合である。OPN配列登録物は「遺伝子バンク」とは異なる配列データバンクにも存在することがある。従って、DROPN-ペプチド及びOPN-タンパク質は、配列データバンクの「Gene Bank」の受入番号X13694の登録物に相当するOPN-タンパク質の配列と正確に一致する必要はない。さらに、DROPN-ペプチドは2個の点突然変異されたアミノ酸、2個の欠失されたアミノ酸又は2個の付加的に内部に挿入されたアミノ酸、ならびにN末端及び/又はC末端の延長部を含むこともできる。この場合にはしかしながらOPN-タンパク質配列からなる少なくとも8個のアミノ酸が含まれなければならない。N末端又はC末端の延長部として、OPN-タンパク質中のこの配列位置でのOPN-タンパク質配列中に存在するようなアミノ酸だけが挙げられる。さらに、天然由来のOPN-多形から及び天然由来のOPN-突然変異から誘導されるペプチドは、OPN-タンパク質配列(X13694)と少なくとも70%の一致を示す場合にDROPN-ペプチドと言われる。DROPN-ペプチドは翻訳後修飾を有する、例えばリン酸化又はN末端のピログルタミン酸-残基を有し、及び/又は化学的に修飾された形、有利にペプチド-酸化物として存在することもできる。例えばDROPN-10はリン酸化されていないペプチドとしても、リン酸化されたペプチドとしても同定された。DROPN-10は、例えば、リン酸基なしで又は1個、2個、3個、4個又は5個のリン酸基を有している。

10

20

30

40

#### 【0012】

化学的に修飾された又は翻訳後修飾されたペプチド：

化学的に修飾された又は翻訳後修飾されたペプチドは、D-アミノ酸からならびにL-アミノ酸から、同様にD-アミノ酸とL-アミノ酸との混合物からなることもでき、かつ天然由来であるか又は組み換えにより製造されるか又は化学的に合成することもできる。さらに、このペプチド中には非通常のアミノ酸、つまり20種の標準アミノ酸には属さないアミノ酸を含有することもできる。非通常のアミノ酸の例としては特に次のものである：アルファ-アミノ酪酸、ベータ-アミノ酪酸、ベータ-アラニン、ベータ-アミノイソ酪酸、ノルバリン、ホモセリン、ノルロイシン、ガンマ-アミノ酪酸、チオプロリン、4-ヒドロキシプロリン、アルファ-アミノアジピン酸、ジアミノ酪酸、4-アミノ安息香酸、ホモシステイン、アルファ-アミノペニシラン酸、ヒスタミン、オルニチン、グリシン-プロリンジペプチド、ヒドロキシリシン、プロリン-ヒドロキシプロリンジペプチド、シスタチオニン、エチオニン、セレノ-システイン。翻訳後修飾又は化学的修飾としては、特にアミノ酸配列の次の構造による修飾である：ペプチド配列中のシステインに遊離システインの結合、メチル基、アセチル基、ファルネシル基、ビオチニル基、ステアリル基、パルミチル基、リポイル基、C-マンノシル基、リン基及びスルフェート基、グリコシル化、アミノ化、脱アミノ化、プログルタミン酸、シトルリンなどが可能である。

#### 【0013】

核酸：

核酸として、DNA、RNA及びDNA-RNA-ハイブリッド分子は天然に由来するものか又は合成又は組み換えにより製造されたものであると見なされる。さらに、化学的に修飾された核酸、生体内で高い安定性を示す修飾されたヌクレオチド、例えばホスホロチオエートも含める。このように安定化された核酸は、リボザイム技術、アンチセンス技術及びトリプレックス核酸技術の適用時にも既に使用される。

#### 【0014】

有意性

有意の概念は統計的な有意性の概念の使用の範囲内で用いられる。この特許明細書におい

50

て、90%以下、有利に95%以下、さらに有利に99%以下の誤り確率が有意と定義される。

【0015】

感度：

感度としては、疾患に関する診断において陽性の診断結果が得られた病気の患者、つまり診断が疾患であると示した患者の割合であると定義される。

【0016】

特異性：

特異性としては、疾患に関する診断において陰性の診断結果が得られた健康な患者、つまり診断が疾患ではないと示した患者の割合であると定義される。

10

【0017】

意外にも、アルツハイマー病を患う患者の体液試料中で、特に脳脊髄液中では、特定のペプチドの濃度が、対照試料中のその濃度に比較して相対的に高く変化しているため、アルツハイマー病の検出が可能であることが見出された。対照グループ中の濃度と比較したこのペプチドの濃度の変化は、アルツハイマー病の疾患の存在を示し、従って高い感度及び高い特異性での疾患の検出に適している。従って、患者を通常のOPN - 又はDROPN - ペプチド濃度に調節する目的でOPN - タンパク質又はDROPN - ペプチド濃度を調節することは、治療的に使用することもできる。

【0018】

前記課題の解決のために、本発明は、個体の生物学的試料中の、遺伝子バンク登録番号X13694の配列から誘導される1種又は数種のDROPN - ペプチド又はOPN - ペプチドの同定により、神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病又はこのような疾患の素質を検出する方法に関する。これらのDROPN - ペプチド又はOPN - ペプチドが疾患との因果関係があることから出発することができるため、本発明はアルツハイマー病又はそれに類似の神経学的疾患の治療のためのその使用も対象とする。

20

【0019】

前記課題の解決のために、本発明は、患者の生物学的試料中の少なくとも1種のマーカーペプチドを検出することで、神経学的疾患、特に進行性の慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を検出する方法を提供する。

【0020】

このために医学的診断において多様な解決策が可能でありかつ通常である：

一つは、一般的にマーカーペプチドの存在に関して調査することができ、このマーカーペプチドの存在又は不在が疾患の診断を可能とする。

30

【0021】

他の通常の診断ストラテジーの場合には、まず最初に対象の場合と診断すべき疾患を患う患者の場合に通常存在するこのマーカーペプチド濃度を測定し、この測定値を用いて頻繁に「カット - オフ - ポイント」と呼ばれる、健康と見なされるグループと、病気であると見なされるグループとを隔てる限界値を算定する。病気の個体においてそれぞれのマーカーペプチドの濃度が低下した場合に、それぞれのマーカーペプチドのこの測定値はカット - オフ - ポイントを下回る全ての個体は疾患であると診断される。病気の個体においてそれぞれのマーカーペプチドの濃度が上昇した場合に、それぞれのマーカーペプチドのこの測定値はカット - オフ - ポイントを上回る全ての個体は疾患であると診断される。それぞれのマーカーペプチドについて個々に測定されたカット - オフ - ポイントは、つまり健康な個体と病気の個体との明らかな区別を可能にする。

40

【0022】

他の診断ストラテジーの場合には、対照試料中のマーカーペプチドの濃度と比較して、患者の試料中のマーカーペプチドのそれぞれのマーカーペプチドに対して特異的な濃度上昇又は濃度低下を測定し、マーカーペプチドの有意の濃度変化をこの疾患の陽性の検出結果として評価する。この場合に、所定のDROPN - ペプチドに対して根本的に、アルツハイマー病患者の場合にだけペプチド濃度の上昇が起きるか、又はこのDROPN - ペプチ

50

ドに対して根本的にアルツハイマー病患者の場合にだけペプチド濃度の減少が起きることが出来る。定義されたDROPN-ペプチドについて、対照グループと比較して、個々のアルツハイマー病患者の場合に高いDROPN-ペプチド濃度が、及び他のアルツハイマー病患者の場合に低いDROPN-ペプチド濃度が同時に生じることはできない。

【0023】

本発明による有利なマーカーは、配列表において記載されており、配列番号1~31に相当するDROPN-1~DROPN-31として挙げられている。DROPN-ペプチドの配列は、図1及び表1にも記載されている。DROPN-ペプチドのそれぞれの配列番号の分類は、表1に記載されている。

【0024】

本発明による方法は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の場合にその濃度が変化し、かつこの疾患が早期段階で既に、例えば「Minimal Cognitive Impairments」(MCI)の存在でも示されるか、又は高い疾患リスクを早期に示すことができる特異的バイオマーカーを検出する方法である。これは、この疾患の診断のために確かな臨床的マーカーを適用するために重要である。

【0025】

有利に、試料中のDROPN-ペプチドの濃度も、複数の所定のDROPN-ペプチドが出現する特徴パターンも同様に、この疾患の重度と関連していることができる。従って、この新規のマーカーは、アルツハイマー病の治療法の開発及びそれに付随する制御を可能にする、それというのもこの経過及び場合により治療法に基づき生じる治療成果又は疾患の進行の抑制を測定できるためである。アルツハイマー病の有効な治療法は、現在のところ不可能であり、アルツハイマー病疾患の確実な検出方法の提供の緊急性を強調されている、それというのもこの疾患の確実な検出が治療法の開発の前提条件であるためである。

【0026】

DROPN-ペプチドの検出は、さらに、アルツハイマー病の新規の治療方法を開発するための臨床研究の範囲内で、高い特異性で、アルツハイマー病を患うが他の疾患を患っていない患者だけを選択することを可能にする。このことは、有効な研究結果を得るために重要である。誤ってアルツハイマー病患者として診断された患者は、アルツハイマー病治療の研究結果の質に不利な影響を及ぼす。さらに、DROPN-ペプチドの検出は、患者の層別を可能にし、それにより、所定のアルツハイマー病治療戦略又は臨床的研究にとって特に適切であるアルツハイマー病患者のサブグループを適切に選択できる。

【0027】

アルツハイマー病患者の場合に、健康な個体と比較してDROPN-ペプチドの濃度が明らかに変化している。本発明の他の観点は、従って、アルツハイマー病患者の場合のDROPN-濃度を通常濃度にするということでもある。この方法は、アルツハイマー病又は類似する神経学的疾患の治療法に使用することができる。OPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドの濃度が高い場合には、これらの物質の濃度を、例えばOPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドに特異的な抗体又はOPN-特異的-アンチセンス-核酸、リボザイム又はトリプレックス-核酸又はDROPN-ペプチド-アンタゴニスト、OPN-タンパク質-アンタゴニストの治療的投与によって低下させることができる。治療法のために、OPN-タンパク質の生体固有の発現又はOPN-タンパク質からDROPN-ペプチドへのプロセッシングを抑制する物質を投与することもできる。OPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドの不足が疾患原因である場合には、OPN-タンパク質、DROPN-ペプチド、DROPN-ペプチド-アゴニスト又はOPN-タンパク質-アゴニストの治療的投与を行うことができる。OPN-タンパク質からDROPN-ペプチドへのプロセッシングに影響する物質も治療的に使用することができる。図1から見られるように、例えばDROPN-4及びDROPN-10は2個の塩基性アミノ酸(リシン及びアルギニンが)により相互に区別され、このようないわゆる「二塩基性配列」は、タンパク質から生物学的活性のペプチドへのプロセッシングの際に重要な役割を担うプロテアーゼの攻撃点であることが多い。もちろん、多様な治療戦略の組み合わせも可能で

10

20

30

40

50

あり、場合によっては有効である。

【0028】

本発明は、神経学的疾患、特にアルツハイマー病の治療の目的で、OPN - タンパク質及びDROPN - ペプチドの濃度を直接的又は間接的に調節するための、OPN - タンパク質、DROPN - ペプチド、DROPN - ペプチド - アゴニスト及びDROPN - アンタゴニスト、OPN - タンパク質 - アゴニスト及びOPN - タンパク質 - アンタゴニスト、アンチ - OPN - タンパク質 - 抗体及びアンチ - DROPN - ペプチド - 抗体の使用でもある。抗体とは別に、抗体フラグメント、抗体融合タンパク質、又は他のOPN - タンパク質又はDROPN - ペプチドに選択的に結合する他の物質を使用することもできる。前記のタンパク質及びペプチドとは別に、前記のタンパク質及びペプチドの融合タンパク質を使用することもできる。さらに、本発明は、前記のタンパク質及びペプチドの発現を調節するアンチセンス - 核酸、トリプレックス - 核酸及びリボザイムを使用することでもある。さらに、本発明は、前記のタンパク質の活性を調節するアゴニスト及びアンタゴニストでもある。

10

【0029】

本発明の他の実施形態は、医薬調製物又は血液 - 脳 - 隔壁及びノ又は血液 - 髄液 - 隔壁を有効に通過することができるように記載されたペプチド及び核酸を化学的に修飾することである。それにより、これらは特に治療的用途に適している。これを達成するために、例えばDROPN - ペプチド、OPN - タンパク質、核酸、アゴニスト又はアンタゴニストは、これらが例えば親油性になり、クモ膜下腔内へ侵入しやすくなるように修飾される。これは、疎水性分子成分の導入によるか、又はこの物質を疎水性の物質、例えばリボソーム中に「パッケージング」することにより達成することができる。さらに、例えば、クモ膜下腔内へ侵入しやすくするか、もしくは反対にクモ膜下腔から外に出にくくするペプチド配列をこのペプチド、タンパク質、核酸、アゴニスト又はアンタゴニストに接合することもできる。

20

【0030】

本発明は、前記の治療薬の、多様な経路、例えば静脈内注射として、経口投与可能な物質として、吸入可能なガス又はエアゾールとしての投与、又はクモ膜下腔内への直接的注射の形又は筋肉、脂肪脳などの組織への直接的注射の形での投与でもある。それにより、生物学的利用性を高め、かつこの治療薬の有効性を高めることができる。例えば、経口投与したペプチド又はタンパク質は、耐酸性カプセルにより胃中でのタンパク質分解から保護できる。著しく疎水性の物質は、適当な製剤学的処理によってより親水性にすることができ、従って例えば静脈内注射用により適するようにすることができる。

30

【0031】

本発明の他の実施形態は、DROPN - ペプチド又はOPN - タンパク質と選択的に結合するレセプターを同定するための、DROPN - ペプチド又はOPN - タンパク質の使用である。このレセプターも、アゴニスト又はアンタゴニストの投与によって調節することができ、このことは神経学的疾患、特にアルツハイマー病の治療のために有効である。

【0032】

OPN - 生物学

OPNは破骨細胞及び骨細胞により合成され[2]、骨中に取り込まれる。免疫組織学的にはオステオポンチンは発達する骨のミネラル化区域中で検出される[3]。さらに、これは多様な生物学的液体、例えば尿及び乳中にも存在し、かつ活性化T - 細胞[4, 5]ならびに転移腫瘍細胞、皮膚及び大動脈の弾性繊維、筋細胞、血管内皮細胞、マクロファージ及びグリア細胞[6]によって発現される。脳脊髄液中でのOPNの検出は今まで記載されておらず、従って、髄液中のOPNの濃度及び存在に関する知識は新規である。

40

牛乳からのウシのOPNは28箇所のリン酸化(セリンに27箇所及びトレオニンに1箇所)、3箇所のO - グリコシル化を有し、かつN - グリコシル化は有していない[7]。骨から単離されたラットのOPNは、13箇所のリン酸化(セリンに12箇所及びトレオ

50

ニンに1箇所)を有し及びさらにスルフェート基を含有する[8]。組み換えOPNはチロシンで自己リン酸化されていることができる。牛乳からのウシのOPN中の及び骨からのラットのOPN中のリン酸基の数の差異は、恐らく異なる組織から由来することが原因であり、種からのものではない、それというのもこのリン酸化箇所は今まで配列決定されたOPNバリエーションにおいて極めて強く保存されているためである[7]。Sorensen et alはさらに、リン酸化がほぼ100%までであり、つまりリン酸化されている全ての箇所は、常に完全に100%までリン酸化されていることを確認している[7]。脳脊髄液中のOPNが今回初めて検出され、これは文献中には今まで記載されていなかった。興味深いことに、この場合に、脳脊髄液中に同じ配列を有するが異なる数のリン酸化を有するDROPN-ペプチドが同じ試料中に出現し、このことは異なる体液中のOPNについての今までの知識では期待できず、新規の種類であることが示された。さらに、今までオステオポンチン-タンパク質だけが生物学的試料中に検出され、オステオポンチンペプチドフラグメントは検出されていなかった。骨の補修の際に、ネズミの場合に高いオステオポンチンmRNA-濃度が出現する[9]。年齢とオステオポンチン-発現との関係は明確ではない、それというのも、異なる研究の結果は高齢の試験動物を若年の試験動物と比較した場合、高いOPN-発現も低いOPN-発現も記載されているためである[2、9、10]。

10

#### 【0033】

OPNの機能の一つは、恐らくカルシウム沈着プロセスの範囲内で結晶成長の調節であり、この場合にOPNはカルシウムの結晶化に関して増進するようにも、阻害するようにも作用できる。アテローム性動脈硬化症の場合には、該当する血管壁のカルシウム沈着の他に、細胞外マトリックスの補修が生じる。オステオポンチンは有利にカルシウム沈着した範囲内で免疫組織学的に検出可能であり[11]、かつこの場合にマクロファージ及び平滑筋細胞により発現される。オステオポンチンは血管のカルシウム沈着の調節に利用されていると考えられる[11]。恐らく、オステオポンチンが作用する方向は、翻訳後修飾、特にそのリン酸化に関するオステオポンチンの微細環境及び状態に依存する[7]。Ek-Rylander et alは、例えば脱リンしたOPNがもはや破骨細胞-付着を促進しないことを明らかにした[12]。OPNの脱リンは、ヒドロキシアパタイト-結晶形性に関するOPNの阻害的活性を低下させ、このことはOPNのリン酸化の機能的意味を示している[13]。OPNは尿中の結晶成長を阻害し、尿結石の発生を予防する。しかしながら、本発明者の結果は、上記の結果とは異なり、リン酸化されたDROPN-ペプチドも、対応するリン酸化されていないDROPN-ペプチドも、同じようにその濃度上昇によって痴呆-マーカーとして使用できることが示された。本発明によるこのマーカーは、従って、その構造的修飾に関するOPNフラグメントにとって期待されたような相応するものではないようなフラグメントである。オステオポンチンはさらに細胞-細胞-相互作用及び細胞-マトリックス-相互作用を媒介し、それにより免疫細胞、骨細胞及び腫瘍細胞から生物内の異なる箇所への指向性の移行(ホーミング)が制御される。さらに、オステオポンチンはCD44、広範囲に発現されるトランスメンブレンタンパク質と相互作用する[4、5]オステオポンチンの他に、ビトロネクチン及びヒアルロン酸はCD44の他のリガンドである。CD44-オステオポンチン-相互作用は細胞の走化性を引き起こし、CD44-ヒアルロン酸-相互作用は同型細胞集合を引き起こす。生体内ではオステオポンチンの星状膠細胞に関する走化活性が検出できた[14]。オステオポンチン欠乏マウスは、創傷治癒及び免疫応答の制御における障害を示した[15]。さらに、マクロファージがヒト腫瘍細胞付近及び壊死性腫瘍領域内で、ならびに脳の虚血領域内で大量のオステオポンチン-タンパク質及びmRNAを発現し、従ってオステオポンチンは創傷治癒の際のマトリックス再編成において重要な機能を有していることを示すことができた。

20

30

40

#### 【0034】

オステオポンチンは血管平滑筋細胞及び内皮細胞の付着及び移行を促進する。グリオームの場合にはVEGF(血管内皮増殖因子「Vascular Endothelial

50

Growth Factor」)を介して特にオステオポンチン及びそのレセプターのアルファ V ベータ 3 - インテグリンが誘導され、それによりおそらく血管形成が誘導されている。進行性の慢性痴呆疾患ではない卒中発作の場合には、OPN mRNAの上昇を見ることができた [ 16 ]。

【 0035】

本発明による方法により検出された痴呆は、有利に進行性の慢性痴呆疾患、例えばアルツハイマー病である。今までに、本発明によるペプチド及びペプチドフラグメントの濃度変化は多様な痴呆疾患、例えばアルツハイマー病又は血管性痴呆の場合に検出することができた。このことから、本発明によるペプチドはアルツハイマー病及びその類縁する神経学的疾患の検出のため及び治療のために用いることができると推測することができる。この方法の実施形態は、早期の時点、例えば「Minimal Cognitive Impairment」(MCI)で、すでに痴呆性疾患が測定される。

10

【 0036】

この同定は有利に、遺伝子バンク登録番号 X 1 3 6 9 4 の OPN - タンパク質の所定のペプチドフラグメントに関する、つまり OPN - タンパク質の部分配列を含むか又は OPN - タンパク質自体を含むペプチドに関して集中する。このペプチド(ペプチドフラグメント)は「痴呆に関連するオステオポンチン」(DROPN) - ペプチドとして表され、以後 DROPN - 1 ~ DROPN - 31 と表す。OPN - タンパク質と DROPN - 1 ~ DROPN - 31 との関係は図 1 に示されている。このペプチドの測定された配列は配列表中に記載されている。この OPN - フラグメントは自然に天然で生じ、いままでに文献には記載されていなかった。このフラグメントは、プロテアーゼ、例えばトリプシンの添加により試験管内でのタンパク質分解により生じるような、文献にしばしば記載されているペプチドとは異なっている。このフラグメントは従って新規の今までに公知でない物質である。このペプチドを、まず最初に逆相クロマトグラフィーによって生物学的試料から濃縮し、精製し、引き続き質量分析法を用いて付随する他のペプチドと分離し、その結果この DROPN - ペプチドを引き続き配列決定することができた。

20

【表 1】

I文字表記-アミノ酸コードでのペプチドの配列を次に記載する:

DROP N 番号	OPN- 配列 (X13694)	モノアイソトピック 理論的分子量 (Da)	配列
1	19-42	2627,2715	VKQADSGSSEEKQLYNKYPDAVAT
2	27 <sub>+r1</sub> -34 <sub>+r2</sub>	* ≥ 1009,4716	r1-SEEKQLYN-r2
3	208-243	4032,7594	AQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAE THSHKQS
4	208-246	4465,0079	AQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAE THSHKQSRLY
5	211-243	3718,6368	LNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHS HKQS
6	231-245	1737,8030	DDQSAETHSHKQSRL
7	231-246	1900,8664	DDQSAETHSHKQSRLY
8	222 <sub>+r3</sub> -229 <sub>+r4</sub>	≥ 956,4087	r3-KDSYETSQ-r4
9	234 <sub>+r5</sub> -241 <sub>+r6</sub>	≥ 895,4148	r5-SAETHSHK-r6
10	249-314	** 7653,6003	KANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEF HSHEDMLVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSA SSEVN
11	249-288	4662,0953	KANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEF HSHEDMLVVD
12	267-283	2093,9304	SKVSREFHSHEFHSHED
13	254 <sub>+r7</sub> -261 <sub>+r8</sub>	≥ 899,3985	r7-SNEHSDVI-r8
14	271 <sub>+r9</sub> -278 <sub>+r10</sub>	≥ 1087,4835	r9-REFHSHEF-r10
15	285-297	1522,7991	LVVDPKSKEEDKH
16	285-298	1635,8832	LVVDPKSKEEDKHL
17	285-299	1763,9781	LVVDPKSKEEDKHLK
18	285-300	1911,0466	LVVDPKSKEEDKHLKF
19	285-312	3222,6521	LVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSE
20	285-314	3435,7634	LVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN
21	286-299	1650,8941	VVDPKSKEEDKHLK
22	286-300	1797,9625	VVDPKSKEEDKHLKF
23	286-312	3109,5680	VVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSE
24	289-312	2796,4042	PKSKEEDKHLKFRISHELDSASSE
25	290 <sub>+r11</sub> -297 <sub>+r12</sub>	≥ 1112,5826	r11-KSKEEDKHL-r12
26	303 <sub>+r13</sub> -310 <sub>+r14</sub>	≥ 844,3563	r13-SHELDSAS-r14
27	19-41	2526,2238	VKQADSGSSEEKQLYNKYPDAVA
28	20-42	2528,2031	KQADSGSSEEKQLYNKYPDAVAT
29	211-243	*** 3718,6368	LNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHS HKQS
30	251-285	4149,7995	NDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFH HEDML
31	251-284	4036,7154	NDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFH HEDM

10

20

30

40

50

## 【0037】

\* r1はアミノ酸26～19のOPN-タンパク質の配列又は配列の一部に相当する配列であり、その際、r1はOPN-タンパク質のアミノ酸27から出発して、0～8個のアミノ酸長さであることができる。同様に、r2もアミノ酸35～42のOPNタンパク質配列か又はその一部であり、その際、r2はOPN-アミノ酸34から出発して0～8個のアミノ酸長さであることができる。他のペプチド鎖r3～r14は前記した概要に相応して構成されていて、その際、r3は最大でOPN-221～208に、r4は最大でOPN-230～246に、r5は最大でOPN-233～208に、r6は最大でOPN-242～246に、r7は最大でOPN-253～249に、r8は最大でOPN-262～314に、r9は最大でOPN-270～249に、r10は最大でOPN-279～314に、r11は最大でOPN-289～249に、r12は最大でOPN-298～314に、r13は最大でOPN-302～249に、及びr14は最大でOPN-311～314に相当する。

## 【0038】

\*\* DROPN-10については、リン酸化されていないDROPN-10ペプチドに対してさらに、実験により1、2、3、4又は5個のリン酸基を有するペプチドが相応して高い質量に基づいて同定することができた。この場合に実験的に測定されたDROPN-10の質量は、7738/7818/7898/7978及び8058ダルトンであった。一リン酸化ペプチドのDROPN-10の場合のリン酸基の可能な位置は既に決定することができた。リン酸基1個を有するDROPN-10の場合のリン酸基の予想される位置は、OPN-配列の位置291にあるセリンであり、リン酸基2個を有するDROPN-10の場合のリン酸基の予想される位置は、セリン275及びセリン291であり、リン酸基3個を有するDROPN-10の場合のリン酸基の予想される位置は、セリン270、セリン275及びセリン291である。リン酸基4個又は5個を有するDROPN-10の場合のリン酸基の正確な位置は、現在のところ不明である。

## 【0039】

\*\*\* DROPN-29はN末端修飾としてピログルタミン酸を有する。

## 【0040】

適当なペプチド

このペプチドは翻訳後修飾の形又は化学的修飾の形で存在することができ、これは特にその質量に関して、従って質量分析による同定に関して、及びクロマトグラフィー、例えば逆相クロマトグラフィーの場合の溶出挙動に関して影響を及ぼす。特に、このペプチドはリン酸化されて、グリコシル化されて、硫酸化されて、アミノ化されて、酸化されて又はN末端のピログルタミン酸基などを有した形で調査すべき試料中に存在していることができる。

## 【0041】

このペプチドは、特に、OPN-タンパク質の配列からその配列の最大でも30%まで相違する場合にOPN-ペプチド、もしくはDROPN-ペプチドとして見なされる。この場合に、OPN-タンパク質配列から30%より多くの相違が生じない限り、点突然変異、欠失、挿入及びN末端及び/又はC末端の延長が許容される。

## 【0042】

マーカーペプチド(DROPN-ペプチド及びOPN-ペプチド)の濃度変化は疾患の重度と共に及び神経学的疾患、特に進行性の慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の期と相関することから出発することができる。従って、本発明の実施形態において、このマーカーペプチドの測定は、この疾患の重度及び期を測定するために、特に「Mini-Mental State Examination」(MMSE)の実施に代わる方法として又は補足する方法として用いられることが予想される。本発明の実施形態において、さらに、このマーカーペプチドの測定は神経学的疾患の前段階、特に「Mild Cognitive Impairment」(MCI)の測定のために、又はこの疾患の進行の予後のために用いられることが予想される。

## 【0043】

場合により使用された対照試料は、多様な対照からのプール試料であることができる。この調査すべき試料は、プール試料であることもでき、その際、陽性の結果の場合に単一試験が行われる。

## 【0044】

適切な生物学的試料

生物学的試料は有利に(ヒト)脳脊髄液(Liquor cerebrospinalis, CSF)であるか又は血清、血漿、尿、便、涙、痰、滑液などのような試料である。これらは、特に選択された検出方法(質量分析法、ELISAなど)の感度に依存する。血清、血漿及び尿は特に重要である、それというのもこれらの試料材料は標準検査の場合でも頻繁にかつ患者に多大な労力をかけずに得られるためである。ホモジェナイズした組織試料も場合により使用することができる。

10

## 【0045】

従って、本発明のもう一つの実施形態の場合には、調査すべき試料の準備のために例えばバイオプシーの範囲内で得られたヒト組織試料から組織ホモジェネートを製造することも想定される。この組織を、例えば手動ホモジェナイザー、超音波ホモジェナイザー又は電気駆動のホモジェナイザー、例えばUltraturaxを用いて破碎し、引き続き当業者に公知の方法で、例えば0.1~0.2Mの酢酸を含有する酸性の水溶液中で10分間乾燥させる。引き続き、この抽出物にそれぞれの検出方法、例えば質量分析による試験を行う。この試料は通常の方法で準備することができる、例えば場合により希釈又は濃縮及び貯蔵することができる。

20

## 【0046】

診断薬の製造のためのDROPN-ペプチドの使用

さらに本発明は、神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の診断のための少なくとも1種の本発明によるDROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質の使用、ならびにそのDROPN-ペプチド-特異的結合特性に基づきこれらの疾患の検出のための診断試薬の開発のために適している抗体又は他の抗原の獲得のためのDROPN-ペプチドの使用にも関する。同様に、本発明は、このペプチドと特異的に結合するか、又は反対にDROPN-ペプチドをその表面に提示しかつ結合パートナー、例えばOPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドのレセプターを同定することが可能となるファージ粒子の獲得のためのDROPN-ペプチドの使用にも関する。

30

## 【0047】

DROPN-ペプチドのための検出方法

本発明の範囲内で、DROPN-ペプチドの検出のために多様な方法を使用することができる。このために、DROPN-ペプチドを患者の試料中で特異的に検出できる全ての方法が適している。適当な方法は、特に物理学的方法、例えば質量分析又は液体クロマトグラフィー、分子生物学的方法、例えば逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)又は免疫学的検出技術、例えば「Enzyme linked immunosorbent assays」(ELISA)である。

## 【0048】

物理学的方法

本発明の実施形態は、本発明によるペプチドを定性的又は定量的に示すことができる物理学的方法を使用することである。この方法には、特に質量分析、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、NMR(核磁気共鳴)分析などが属する。この場合に試験すべき試料から定量的測定結果を、神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、有利にアルツハイマー病を患う患者の集団と、対照集団とから得られた測定値と比較する。この結果から、神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の存在及び/又はこの疾患の重度を導き出すことができる。

40

## 【0049】

本発明の有利な実施形態の場合には、試料中のペプチドを、同定の前にクロマトグラフィ

50

ーにより分離する、有利に逆相クロマトグラフィーにより分離する、特に有利に高分解能逆相 - 高速液体クロマトグラフィー ( R P - H P L C ) を用いて試料中のペプチドを分離する。本発明のもう一つの実施形態は、試料の分別のために、沈殿剤、例えば硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール、トリクロロ酢酸、アセトン、エタノールなどを用いて沈殿反応を実施することである。こうして得られたフラクションは個々にそれぞれの検出法にかけられ、例えば質量分析試験にかけられる。本発明の他の実施形態は液相抽出の使用である。このために、試料を、例えば有機溶剤、例えばポリエチレングリコール ( P E G ) と水性塩溶液とからなる混合物と混合する。この物理学的特性に基づき、試料の測定すべき内容物は有機相中に濃縮され、他のものは水相中に濃縮され、相互に分離し、引き続きさらに分析することができる。

10

## 【 0 0 5 0 】

逆相クロマトグラフィー

本発明の特に有利な実施形態は、ヒト脳脊髄液中のペプチドを分離するために、特に C 1 8 逆相クロマトグラフィーカラムを使用して、トリフルオロ酢酸とアセトニトリルとからなる展開剤を用いる逆相クロマトグラフィーを包含する。例えば、それぞれのフラクションを集め、これは使用する展開剤の体積のそれぞれ 1 / 1 0 0 を含む。こうして得られたフラクションを質量分析、例えば M A L D I - 質量分析 ( マトリックス - 支援レーザー脱離 - イオン化 ) を用いて、アセトニトリル、水、トリフルオロ酢酸及びアセトンからなる混合物中に溶かした、L ( - ) フコースとアルファ - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸とからなるマトリックス溶液を使用して分析し、所定の質量の存在を確認しかつシグナル強度を定量化する。この質量は、本発明によるペプチドの D R O P N - 1 ~ D R O P N - 3 1 の質量に相当する。

20

## 【 0 0 5 1 】

質量分析

本発明による有利な実施形態の場合には、1種又は数種のペプチドの同定を質量分析により測定する、有利に M A L D I ( M a t r i x - a s s i s t e d - l a s e r - d e s o r p t i o n - a n d - i o n i s a t i o n ) 質量分析で行うことができる。この場合、質量スペクトルによる測定はさらに有利に、それぞれ相応するペプチドの理論的なモノアイソトピック質量を用いて算定した少なくとも1つの次の質量シグナルを有する。この場合、実験誤差及び自然のアイソトープ分布に基づく理論的なモノアイソトピック質量の軽微な偏差が生じることがある。さらに、M A L D I - 質量測定の場合には、この測定方法に基づき、ペプチドにプロトンが加わり、それによりこの質量は 1 D a だけ高まる。次の質量は、適当なソフトウェア ( この場合に G P M A W 4 . 0 2 ) を用いて計算した同定されたペプチドの理論的なモノアイソトピック質量に相当する。この理論的なモノアイソトピック質量は、試料中で単独で又は組合わさった形で出現することがある。D R O P N - 1 = 2 6 2 7 . 2 7 1 5 / D R O P N - 2 1 0 0 9 . 4 7 1 6 / D R O P N - 3 = 4 0 3 2 . 7 5 9 4 / D R O P N - 4 = 4 4 6 5 . 0 0 7 9 / D R O P N - 5 = 3 7 1 8 . 6 3 6 8 / D R O P N - 6 = 1 7 3 7 . 8 0 3 0 / D R O P N - 7 = 1 9 0 0 . 8 6 6 4 / D R O P N - 8 9 5 6 . 4 0 8 7 / D R O P N - 9 8 9 5 . 4 1 4 8 / D R O P N - 1 0 = 7 6 5 3 . 6 0 0 3 / D R O P N - 1 1 = 4 6 6 2 . 0 9 5 3 / D R O P N - 1 2 = 2 0 9 3 . 9 3 0 4 / D R O P N - 1 3 8 9 9 . 3 9 8 5 / D R O P N - 1 4 1 0 8 7 . 4 8 3 5 / D R O P N - 1 5 = 1 5 2 2 . 7 9 9 1 / D R O P N - 1 6 = 1 6 3 5 . 8 8 3 2 / D R O P N - 1 7 = 1 7 6 3 . 9 7 8 1 / D R O P N - 1 8 = 1 9 1 1 . 0 4 6 6 / D R O P N - 1 9 = 3 2 2 2 . 6 5 2 1 / D R O P N - 2 0 = 3 4 3 5 . 7 6 3 4 / D R O P N - 2 1 = 1 6 5 0 . 8 9 4 1 / D R O P N - 2 2 = 1 7 9 7 . 9 6 2 5 / D R O P N - 2 3 = 3 1 0 9 . 5 6 8 0 / D R O P N - 2 4 = 2 7 9 6 . 4 0 4 2 / D R O P N - 2 5 1 1 1 2 . 5 8 2 6 、 D R O P N - 2 6 8 4 4 . 3 5 6 3 / D R O P N - 2 7 = 2 5 2 6 . 2 2 3 8 / D R O P N - 2 8 = 2 5 2 8 . 2 0 3 1 / D R O P N - 2 9 = 3 7 1 8 . 6 3 6 8 / D R O P N - 3 0 = 4 1 4 9 . 7 9 9 5 及び D R O P N - 3 1 = 4 0 3 6 . 7 1 5 4 ダルトン。記号 ( 大きいか又は等しい ) はこの場合、該

30

40

50

当する D R O P N - ペプチドに対して任意に大きな質量が可能であるのではなく、単にこのペプチドの末端に付加的に存在することができるアミノ酸に基づいて生じる質量であると解釈される。このペプチドの末端には任意のアミノ酸が付加的に存在できるのではなく、この配列位置の O P N - タンパク質の配列に基づき存在することができるようなアミノ酸が存在できる。

#### 【 0 0 5 2 】

##### D R O P N - ペプチドの配列の質量分析測定

この実施形態をさらに実際に適用する場合には、検出結果の他の検証は、質量に一致するペプチドの同一性を測定し、その際に O P N - タンパク質から誘導することができるペプチドシグナルをもっぱら考慮することにより可能でありかつ推奨される。この検証は、有利に質量分析法を用いて、例えば M S / M S - 分析を用いてペプチドシグナルの同定によって行われる [ 1 7 ]。

10

#### 【 0 0 5 3 】

本発明の方法により、O P N - タンパク質 ( D R O P N - ペプチド ) の新規の特異的ペプチドが同定され、その重要性も認識された。この D R O P N - ペプチド及びその誘導体は、この場合に D R O P N - 1 ~ D R O P N - 3 1 で表される。この配列は配列表に記載されている。D R O P N - ペプチドの D R O P N - 2、- 8、- 9、- 1 3、- 1 4、- 2 5 及び D R O P N - 2 6 は N 末端及び / 又は C 末端に、所属する O P N ペプチドの相応する配列に応じて付加的なアミノ酸を含有することができる。本発明は、非修飾の形、化学的に修飾した形又は翻訳後修飾した形の組み換え又は合成により製造した D R O P N - ペプチドならびに生物学的試料から単離した D R O P N - ペプチドでもある。この場合に、D R O P N - ペプチドが少なくとも 8 個のアミノ酸を有し、このアミノ酸がペプチド配列の中でその同一性及びその位置において O P N - タンパク質と一致する場合に限り、2 箇所の点突然変異ならびに他の相違も可能である。

20

#### 【 0 0 5 4 】

##### 分子生物学的検出技術

最後に、本発明は、D R O P N - ペプチドに対応する核酸、及び特に本発明による D R O P N - ペプチドに対応する核酸、及び所属する O P N - タンパク質及びペプチドの間接的測定及び定量化のためのその使用でもある。その中には、例えばコードされない配列、例えば m R N A の 5' - 又は 3' - 非翻訳領域である核酸、及び特異的ハイブリダイゼーション試験のために O P N の核酸配列との十分な配列一致を示す、従って所属するタンパク質、特に D R O P N - ペプチドの間接的な検出に適している核酸も含まれる。

30

#### 【 0 0 5 5 】

これについての実施例は、患者の組織試料、例えばバイオプシー試料を獲得し、遺伝子バンク登録番号 X 1 3 6 9 4 を有する遺伝子に一致するか又は相同の O P N - 類似物に一致する R N A - 転写物の濃度を測定することである。この場合、調査すべき試料からの定量的測定結果 ( 強度 ) を、アルツハイマー病を患う患者の集団及び対照集団の場合に得られた測定値と比較する。定量化のために、例えば逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R )、定量的リアルタイム P C R ( A B I P R I S M E <sup>( R )</sup> 7 7 0 0 S e q u e n c e D e t e c t i o n S y s t e m , A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A , U S A )、インサイトゥハイブリダイゼーション又はノーザンプロットのような方法は当業者に公知のように使用できる。この結果から慢性痴呆疾患、有利にアルツハイマー病の存在及び / 又はその重度を推論することができる。

40

#### 【 0 0 5 6 】

##### 免疫学的検出方法

本発明の他の有利な実施形態によると、D R O P N - ペプチド又は O P N - タンパク質の同定は免疫学的検出システム、有利に E L I S A ( 「 e n z y m e l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y 」 ) を使用して実施することができる。この場合に、この免疫学的検出は少なくとも 1 つの D R O P N - ペプチド又は O P N - タンパク質

50

をとらえる。この特異性を高めるために、さらに有利に、いわゆる「サンドイッチELISA」を使用することができ、この場合にDROPN-ペプチドの検出は、同じ分子内の異なるエピトープを認識する2つの抗体の特異性に依存する。しかしながら、DROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質の検出のためには他のELISA-システム、例えば直接的又は拮抗的ELISAを使用することもできる。同様に他のELISA類似の検出技術、例えばRIA(ラジオイムノアッセイ、「radioimmunoassay」)、EIA(エンザイムイムノアッセイ、Enzymimmunoassay)、ELI-スポットなども免疫学的検出システムとして適している。定量化のための標準として、生物学的試料から単離された、組み換えにより製造された又は化学的に合成されたDROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質を使用することができる。1種又は数種のDROPN-ペプチドの同定は、例えば一般にDROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質に結合する抗体を用いて行うことができる。このような検出に適当な他の方法は、特にウェスタンブロット、免疫沈降法、ドット-ブロット(Dot-Blot)、プラズモン共鳴スペクトル分析(BIACORE<sup>(R)</sup> Technologie, Biacore International AB, Uppsala, Schweden)、ファージ粒子、PNAs(ペプチド核酸)、アフィニティマトリックス(例えばABICAP-Technologie, ABION Gesellschaft fuer Biowissenschaften und Technik mbH, Juelich, Deutschland)などである。一般に、特異的検出システムを構築することができる全ての物質/分子は検出試薬として適している、それというのもDROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質に特異的に結合するためである。

#### DROPN-ペプチド及びアンチ-DROPN-ペプチド抗体の獲得

本発明によるもう一つの実施形態は、当業者に公知の組み換え発現システム、クロマトグラフィー法及び化学的合成プロトコルを使用してDROPN-ペプチドを獲得することである。こうして得られたDROPN-ペプチドは、特にそれぞれのDROPN-ペプチドの定量化のための標準として又はDROPN-ペプチド-抗体の製造のための抗体として使用することができる。DROPN-ペプチドを単離しかつ獲得するための当業者に公知の適当な方法には、ペプチドの組み換え発現が属する。DROPN-ペプチドの発現のために、特に細胞システム、例えばバクテリア、例えばEscherichia coli、酵母細胞、例えばSaccharomyces cerevisiae、昆虫細胞、例えばSpodoptera frugiperda(Sf-9)細胞、又はほ乳類細胞、例えば「Chinese Hamster Ovary」(CHO)細胞を使用することができる。これらの細胞は「American Tissue Culture Collection」(ATCC)から得ることができる。DROPN-ペプチドの組み換え発現のために、例えばDROPN-ペプチドをコードする核酸配列を、適当な調節する核酸配列、例えばプロモーター、抗生物質選択マーカールなどと組み合わせて、分子生物学的方法で発現ベクター内へ挿入する。このために適したベクターは、例えばInvitrogen社のベクターpcDNA3.1である。こうして得られたDROPN-ペプチド発現ベクターを次に適当な細胞内へ例えばエレクトロポレーションにより導入することができる。こうして製造されたDROPN-ペプチドはC末端又はN末端でペプチドの異種配列、例えばポリ-ヒスチジン配列、ヘマグルチン-エピトープ(HA-tag)、又はプロモーター、例えばマルトース結合性タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、又はタンパク質ドメイン、例えばGAL-4 DNA-結合ドメイン又はGAL4-活性化ドメインと融合することができる。DROPN-ペプチドを化学的合成によって製造することは、例えばメリフィールド-固相-合成プロトコルに従って、多様な製造元から入手可能である自動合成装置を使用して行うことができる。

#### 【0057】

本発明のもう一つの実施形態は、生物学的試料から又は組み換え発現システムの細胞媒体又は細胞溶解産物からDROPN-ペプチドを、例えば逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、等電点電気泳動

などを用いるか、又は分取免疫沈降、硫酸アンモニウム沈殿、有機溶剤を用いた抽出などの他の方法を用いて単離することである。本発明のもう一つの実施形態は、DROPN-ペプチドを使用してモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を獲得することである。抗体の獲得は、通常の当業者に公知の方法で行う。有利な実施形態は、DROPN-ペプチド特異的抗体の製造及び獲得であり、特に有利な実施形態は、ネオ-エピトープ、つまりDROPN-ペプチドにだけ存在するがOPN-タンパク質中には存在しないエピトープを認識するDROPN-ペプチド特異的抗体の製造である。このようなアンチ-DROPN-ペプチド-抗体はOPN-タンパク質の存在でDROPN-ペプチドを特異的に免疫学的に検出することができる。ポリクローナル抗体は実験動物、例えばマウス、ラット、ウサギ又はヤギの免疫化によって製造することができる。モノクローナル抗体は、例えば試験動物、例えばマウス又はラットを免疫化し、引き続きハイブリドーマ技術を使用して、又は組み換え試験バッチ、例えば抗体バンク、例えばHuCALO<sup>(R)</sup>-抗体バンク(MorphoSys社, Martinsried, Deutschland)を用いて、又は他の当業者に公知の組み換え製造方法を用いて得ることができる。抗体は抗体フラグメントの形で、例えばFab-フラグメント又はFab2-フラグメントなどの形で使用することができる。

10

#### 【0058】

#### DROPN-ペプチド決定による治療法開発及び監視

もう一つの適用例は、神経学的疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病に対する開発途中にある治療法の有効性を評価するための前記したDROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質の定量的又は定性的測定である。本発明は、この疾患、特にアルツハイマー病の治療法の開発のための臨床的研究にとって適当な患者を同定するためにも使用することができる。この場合には、試験すべき試料からの定量的測定結果と、対照集団及び患者のグループで得られた測定値とを比較する。この結果から、治療法の有効性、もしくは臨床的研究に対する患者の適性を導き出すことができる。この有効性試験ならびに治療法及び臨床的研究にとって適した患者の選択は、効果的な使用及び治療法の開発のために特に重要であり、今までアルツハイマー病については信頼することができる臨床的に測定可能なパラメータは提供されていない[18]。

20

#### 【0059】

OPN-タンパク質、DROPN-ペプチド及びこれらの物質の発現及び生物学的利用性を調節する抗原の治療的有効性の試験

30

これについての実施例は、セルラインを培養し、これをOPN-タンパク質、DROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質の発現を促進する物質を用いて処理するか、又はOPN-タンパク質からDROPN-ペプチドへのプロセッシングを促進する物質、例えば「二塩基性配列モチーフ」を認識するプロテアーゼを用いて処理することである。それにより、神経学的疾患、特にアルツハイマー病との関連でOPN-タンパク質及びDROPN-ペプチドの生物学的特性を測定することができる。融合タンパク質及び融合ペプチド、例えばセルライン中への融合タンパク質の輸送を促進するペプチド配列を有する融合タンパク質もセルラインの処理のために使用することができる。可能な融合パラメータの例は、HIV-TAT-配列又はアンテナペディア-配列などである。同様にセルラインを発現ベクターでトランスフェクションし、この発現ベクターはトランスフェクションされた細胞によってOPN-タンパク質又はDROPN-ペプチドの直接的又は間接的発現を引き起こすこの発現ベクターは特にDROPN-ペプチド又はOPN-タンパク質をコードすることができる。同時にDROPN-ペプチド及び/又はOPN-タンパク質を用いたトランスフェクションも実施することもできる。また、適当なセルラインを、アンチ-OPN-タンパク質-抗体又はアンチ-DROPN-ペプチド-抗体又はOPN-タンパク質の発現を抑制する核酸、例えばOPN-アンチセンス-核酸、OPN-トリプレックス-核酸又はOPN-mRNAに結合するリボザイムで処理することもできる。特別に、神経学的モデルシステムとしてOPNとの関係で適していると考えられるセルラインを、このような試験に用いることもできる。この試験のための読み出し装置として、特に処理

40

50

された細胞の増殖速度、その物質交換活性、細胞のアポトーシス速度、細胞モルホロジーの変化、細胞独自のタンパク質又はレポーター遺伝子の発現又は細胞死のためのマーカーとしてのサイトソル性細胞成分の放出を測定する試験を使用することができる。他の試験システムとして、神経学的疾患用のモデルとして、特にアルツハイマー病用のモデルとして適している実験動物、例えばマウス又はラットの適当な株を使用し、この実験動物は、DROPN - ペプチド又はOPN - タンパク質の濃度の調節を目的とする治療ストラテジーの有効性を調査するために用いられる。さらに、この実験動物中では、タンパク質及びペプチド、例えばOPN - タンパク質又はDROPN - ペプチドも調査され、この場合に、このペプチド及びタンパク質は場合により、血液 - 脳 - 隔壁及び/又は血液 - 髄液 - 隔壁を有効に通過できるように調剤学的に調製することができる。製剤学的調整方法として、特にリポソーム - パッケージングタンパク質及びペプチド、トランスポートペプチド、例えばHIV - TAT - 配列などと共有結合で融合したか、又は共有結合でなく会合したタンパク質及びペプチドを使用することができる。さらに、ペプチド及びタンパク質は、親水性の特性を維持し、従って細胞内へ容易に侵入できるように化学的に修飾されていることもできる。水溶液中に難溶性であるペプチドは逆に親水性にされるように修飾され、かつ例えば静脈内に注射可能な治療薬として使用することもできる。経口投与すべき敏感な物質を胃内で保護するために耐酸性のカプセルを使用することもできる。

10

#### 【0060】

動物モデルを用いた試験の場合の読み出しパラメーターは、動物の生存時間、その挙動、その短期記憶能力及び学習能力である。実験動物用に適している記憶試験の例は、「Morris water maze test」である。他のパラメーターとして、身体機能、例えば血液試験の測定、脳障害の測定、物質代謝試験、OPN - タンパク質及びDROPN - ペプチド及びこの疾患と関連する他のタンパク質の発現速度、ならびに組織、例えば脳の形態学的及び組織学的試験を使用することができる。

20

#### 【実施例】

#### 【0061】

本発明を次に実施例を用いて詳細に説明する。

#### 【0062】

この場合に図面も参照される。

#### 【0063】

図1は本発明によるOPN - タンパク質と、そのOPN - タンパク質とのアライメントを示すペプチドの理論的なモノアイソトピック質量(ダルトンで表示)はソフトウェアGPMAW4.02を用いて算出した。これは: DROPN - 1 = 2627.2715 / DROPN - 2 = 1009.4716 / DROPN - 3 = 4032.7594 / DROPN - 4 = 4465.0079 / DROPN - 5 = 3718.6368 / DROPN - 6 = 1737.8030 / DROPN - 7 = 1900.8664 / DROPN - 8 = 956.4087 / DROPN - 9 = 895.4148 / DROPN - 10 = 7653.6003 / DROPN - 11 = 4662.0953 / DROPN - 12 = 2093.9304 / DROPN - 13 = 899.3985 / DROPN - 14 = 1087.4835 / DROPN - 15 = 1522.7991 / DROPN - 16 = 1635.8832 / DROPN - 17 = 1763.9781 / DROPN - 18 = 1911.0466 / DROPN - 19 = 3222.6521 / DROPN - 20 = 3435.7634 / DROPN - 21 = 1650.8941 / DROPN - 22 = 1797.9625 / DROPN - 23 = 3109.5680 / DROPN - 24 = 2796.4042 / DROPN - 25 = 1112.5826 / DROPN - 26 = 844.3563 / DROPN - 27 = 2526.2238 / DROPN - 28 = 2528.2031 / DROPN - 29 = 3718.6368 / DROPN - 30 = 4149.7995 及び DROPN - 31 = 4036.7154ダルトンである。質量分析計で実際に同定された質量は、自然のアイソトープ分布に基づき、ならびに最大500ppmのわずかな測定誤差に基づき、理論的なモノアイソトピック質量から変動する。さらに、全てのペプチドの測定された質量は、使用したMALDI - 測定法

30

40

50

に基づき、1プロトンの質量 (= 1ダルトン) だけ高くなっている。さらに、1 ~ 5 個のリン酸基を有する D R O P N - 1 0 ペプチド - 変異体に対して、実験的に同定することができ、かつ決定することができた。この場合に、実験的に決定された D R O P N - 1 0 についての質量は : 7 7 3 8 / 7 8 1 8 / 7 8 9 8 / 7 9 7 8 及び 8 0 5 8 ダルトンであり、この場合 D R O P N - 1 0 の質量は順番にリン酸基の質量分だけそれぞれ高くなる。

【 0 0 6 4 】

図 2 は、脳脊髄液からの D R O P N - ペプチドの分離及び濃縮のための、実施例 2 による逆相クロマトグラフィーを用いた溶出プロフィールを示す。

【 0 0 6 5 】

図 3 は、実施例 2 によるヒトの脳脊髄液から逆相クロマトグラフィーを行った後に、D R O P N - 1 0 の実施例 3 による M A L D I - 質量分析測定により得られたスペクトルを示す。D R O P N - 1 0 はアミノ酸 2 4 9 ~ 3 1 4 の O P N - 配列に一致する。図 3 A はリン酸化されていない形の D R O P N - 1 0 の M A L D I - 質量分析図を示す。D R O P N - 1 0 の質量 - ピークは矢印でマークしてある。図 3 B は 1 個のリン酸基を含有する D R O P N - 1 0 変異体の M A L D I - 質量分析図を示す。D R O P N - 1 0 + 1 x ホスフェートの質量 - ピークは矢印でマークしてある。

【 0 0 6 6 】

図 4 は相対的に定量化する M S 法として M A L D I により得られたデータを示す。試料は多様な量の異なる標準ペプチドを混ぜ、標準シグナルならびに代表的な試料シグナルの強度を測定した。標準の全てのシグナル - 強度は濃度 0 . 6 4  $\mu$  M (= 1 ) の場合のシグナル強度に規格化した。各ペプチドは、シグナル強度と濃度との間で個々の典型的な関係を示し、これについてはこの図中で曲線の上昇によって読み取ることができる。

【 0 0 6 7 】

図 5 は本発明によるリン酸基を有するペプチドの D R O P N - 1 0 実施例 4 による M S / M S - フラグメントスペクトルを示す。

【 0 0 6 8 】

上側のトレース : 測定の生データ。

【 0 0 6 9 】

下側のトレース : 1 個のリン酸基を有する D R O P N - 1 0 の、変換し、デコンボリューションした質量分析。

【 0 0 7 0 】

このピークパターンは 1 個のリン酸基を有する D R O P N - 1 0 に対して特徴的であった。D R O P N - 1 0 はアミノ酸 2 4 9 ~ 3 1 4 の O P N - 配列に一致する。

【 0 0 7 1 】

図 6 は、対照患者と比較した、アルツハイマー病患者の D R O P N - 5、D R O P N - 1 0 及び D R O P N - 2 0 の濃度の定量的比較のための「箱ヒゲ図」を表し、その際、D R O P N - 1 0 については、リン酸基を有していないか、1 個、2 個、3 個及び 4 個のリン酸基を有するペプチドについての箱ヒゲ図を示した。これらの図は、積分した M A L D I - 質量分析法による信号強度の比較を「箱ヒゲ図」の形で示した。

【 0 0 7 2 】

図 7 は、「サンドイッチ E L I S A」で測定した脳脊髄液中の O P N - タンパク質の濃度に対して箱形図 ( B o x p l o t ) として表した測定結果を示す。この図の右側の部分はアルツハイマー病の患者の試料の結果を示し、この図の中央の部分は血管痴呆の患者の試料の結果を示し、この図の左側の部分是对照グループの結果を示す。

【 0 0 7 3 】

( 実施例 1 ) D R O P N - ペプチドの測定のための脳脊髄液の取得  
 髄液又は脳脊髄液 ( L i q u o r c e r e b r o s p i n a l i s ) は 4 つの脳室中及びクモ膜下腔中に含まれる液体であり、この液体は特に側脳室の脈絡叢中に形成される。脳脊髄液の採取はたいていは腰椎穿刺により、まれに後頭下穿刺又は脳室穿刺により行う。脳脊髄液の採取のための腰椎穿刺 ( 脊髄穿刺 ) の場合に、脊髄クモ膜下腔の穿刺時に第

10

20

30

40

50

3と第4腰痛の間又は第4と第5腰椎の間に長い中空針を穿刺し、髄液を得る。引き続きこの試料を10分間2000×gで遠心分離し、上澄液をマイナス80℃で貯蔵する。

#### 【0074】

(実施例2) DROPN - ペプチドの質量分析測定のための脳脊髄液(CSF)中のペプチドの分離

CSF中のOPN - ペプチドを質量分析により検出するために、この実施例ではペプチド内容物の分離が必要である。この試料の前処理は、本発明によるペプチドを濃縮し、測定に障害となり得る成分を分離するために用いられる。分離方法としては、逆相クロマトグラフィーが実施される。この場合に、多様なRP - クロマトグラフィー樹脂及び溶離剤が同様に適している。次に、Vydac社のサイズ4mm×250mmのC18逆相クロマトグラフィーを用いたOPN - ペプチドの分離を例示する。次の組成の展開剤を使用した：展開剤A：トリフルオロ酢酸0.06%(v/v)、展開剤B：トリフルオロ酢酸0.05%(v/v)、アセトニトリル80%(v/v)。このクロマトグラフィーを33でAgilent Technologies社のFlusszele Microを備えたAgilent Technologies社のHP - ChemStation 1100を使用して行った。試料としてヒトの脳脊髄液を使用した。髄液440μlを水で1650μlに希釈し、pHを2~3に調節し、この試料を10分間18000×gで遠心分離し、引き続きこうして準備した試料1500μlをクロマトグラフィーカラムで分離した。このクロマトグラフィー条件は次のようであった：0分の時点で展開剤B5%、1~45分の時点で展開剤B濃度を50%まで連続的に上昇させる、45~49分の時点で展開剤B濃度を100%まで連続的に上昇させる、引き続き53分の時点まで緩衝液Bを100%で保持する。クロマトグラフィーの開始後10分にそれぞれ0.5mlまでの96のフラクションの採取を開始した。ここに記載した試験条件下で製造した脳脊髄液試料のこのクロマトグラムを図2に示した。

10

20

#### 【0075】

(実施例3) MALDI - 質量分析法を用いたペプチドの質量の測定

質量分析のために、MALDI - TOF - 質量分析計(マトリックス支援レーザー脱離 - イオン化法)においてペプチドの陽イオンスペクトルをプロットした。適当なMALDI - TOF - 質量分析計は、PerSeptive Biosystems Framingham(Voyager - DE, Voyager - DE PRO oder Voyager - DE STR)又はBruker Daltonik Bremen(BIFLEX)により製造した。試料の調製のために、試料を、一般に有機酸からなるマトリックス物質と混合する。ペプチド用に適している典型的なマトリックス物質は、3,5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシクエン酸、 - シアノ - 4 - ヒドロキシクエン酸及び2,5 - ジヒドロキシ安息香酸である。本発明によるDROPN - ペプチドの測定のために、凍結乾燥し、逆相クロマトグラフィーにより得られた当量の相応する500μlのヒト脳脊髄液を使用した。このクロマトグラフィー処理した試料をマトリックス溶液15μl中に溶かした。このマトリックス溶液は、例えばアセトニトリル、水、トリフルオロ酢酸及びアセトンからなる体積比49:49:1:1の溶剤混合物中に溶かした - シアノ - 4 - ヒドロキシクエン酸10g/l及びL(-)フコース10g/lを有する。この溶液から0.3μlをMALDI - キャリアプレート上に移し、乾燥した試料をPerSeptive BiosystemsのMALDI - 質量分析計Voyager - DE STRで分析した。この測定は「Delayed Extraction」<sup>TM</sup>を用いて「Linear Mode」で行った。本発明によるDROPN - ペプチドのなかの一つを測定する例を図3に示した。

30

40

#### 【0076】

MALDI - TOF - 質量分析は、ペプチド、例えば本発明によるDROPN - ペプチドの定量化のために、このペプチドが質量分析計の動的測定範囲内にあり、それにより検出器飽和が避けられる濃度で存在する場合に使用することができる。脳脊髄液中の本発明によるDROPN - ペプチドの測定に対して、マトリックス1μl当たり33.3μlの髄

50

液当量濃度の場合がこれに該当する。各ペプチドに対して、質量シグナルと濃度との間の特異的な割合が存在し、このことはMALDI-質量分析が有利にペプチドの相対的定量化のために使用できることを意味している。この状況は図4に示されている。試料を多様な量の異なる標準ペプチドと混ぜる場合に、標準シグナルならびに試料シグナルの強度を測定することができる。例えば図4は相対的に定量化するMS法としてのMALDI-測定を示す。標準の全てのシグナル-強度は濃度 $0.64\mu\text{M}$ ( $=1$ )の場合のシグナル強度に規格化した。各ペプチドは、シグナル強度と濃度との間で個々の典型的な関係を示し、これについては曲線の上昇によって読み取ることができる。

#### 【0077】

(実施例4) DROPN-ペプチドの質量分析による同定

10

本発明によるDROPN-ペプチドの定量化のために、実施例2による脳脊髄液の逆相クロマトグラフィーにより得られたフラクション中のペプチドの分析すべき質量シグナルが実際に本発明によるDROPN-ペプチドであることが保証されなければならない。

#### 【0078】

そのフラクション中の本発明によるペプチドの同定はnanoSpray-MS/MSで行う[17]。この場合に、質量分析器中のDROPN-ペプチド-イオンはその固有の $m/z$ (質量/電荷)値を用いて当業者に公知の方法で質量分析器中で選択される。この選択されたイオンは、引き続き衝突ガス、例えばヘリウム又は窒素を用いた衝突エネルギーの供給により断片化され、生じたDROPN-ペプチドの断片が質量分析器の組み込まれた分析ユニット内で検出され、相応する $m/z$ -値が決定される(タンデム-質量分析の原理)[19]。このペプチドの断片化挙動が、例えば50ppmの質量精度の場合に、OPN-タンパク質の配列が登録されている配列データバンク内をコンピュータを用いて検索する方法[20]を使用して、本発明によるDROPN-ペプチドの明確な同定を可能にする。特別な場合には、質量分析による分析は、Applied Biosystems-Sciex社, USAのQuadrupole-TOF-Instrumentモデル「QStar-Pulsar」を用いて行った。例示的なMS/MSフラグメントスペクトルは図5に示してある。

20

#### 【0079】

(実施例5) 患者の試料と比較する対照試料中の相対的濃度の比較のためのDROPN-ペプチドの質量分析による定量化

30

222の臨床的試料、つまり82の対照試料とアルツハイマー病を患う患者の130の試料について、実施例1及び2による試料準備の後に続いて、実施例3による本発明によるDROPN-ペプチドのMALDI-質量分析を実施した。例示的なMALDI-シグナル強度は、「箱ひげ図」の形で図6A~6Cに視覚化した。図6中に示した「箱ひげ図」は、アルツハイマー病患者の29~45試料ならびに13~44の対照試料を用いて試験ごとにそれぞれ実施した質量値に基づく。全体で4回の試験を実施した。図示した「箱ひげ図」は、対照における多様なDROPN-ペプチドの積分したMALDI-質量分析によるシグナル強度と、アルツハイマー病患者の試料中のMALDI-シグナル強度との比較を可能にする。この場合、「箱部」、つまり図6A~6Cのグラフ中の角柱部は、それぞれのMALDI-シグナル強度の50%が存在するMALDI-シグナル強度の領域であり、この「箱部」から上方及び下方へ伸びている線状部(「ひげ部」)は、それぞれ、最大のシグナル強度を示す測定値の25%が存在する領域(上方の4分位値)を示すか、もしくは最低のシグナル強度を示す測定値の25%が存在する領域(下方の4分位値)を示す。角柱部中の実線は中央値を表し、角柱部中の点線は平均値を表す。

40

#### 【0080】

(実施例6) 患者の試料及び対照試料のヒトの脳脊髄液中の、「酵素結合免疫吸着検定法」(ELISA)を用いたOPN-タンパク質の定量化。

#### 【0081】

進行性の慢性痴呆疾患を患う患者の20の脳脊髄液試料及び対照の個体の12の試料を、インキュベーション緩衝液( $\text{NaCl } 140\text{mM}$ 、 $\text{KCl } 2.7\text{mM}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$

50

1.2 mM、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM、ウシ血清アルブミン 1%、Tween 20 0.05%)で1:50に希釈し、こうして希釈した試料100  $\mu\text{l}$ を、これをアンチ-ヒト-OPN-抗体O17(ウサギ免疫グロブリンG)で被覆したELISA-プレートに二倍値で載せ、37で1時間インキュベーションした。洗浄緩衝液(リン酸塩緩衝液中Tween 20 0.05%)200  $\mu\text{l}$ でそれぞれ7回洗浄した後、酵素のホースラディッシュペルオキシダーゼで共有結合している二次抗体を100  $\mu\text{l}$ (キャピティ毎)をインキュベーション緩衝液中で1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で4でインキュベートし、引き続き洗浄緩衝液で新たに9回洗浄し、基質として基質緩衝液( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM、クエン酸 20 mM、pH 5.0)中のテトラメチルベンジジン(TMB、Sigma) 0.2 mg/mlの溶液を添加し、室温で30分間空気遮断下でインキュベーションした。キャピティ当たり停止溶液(0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )100  $\mu\text{l}$ を添加することにより酵素反応を停止させ、引き続きTECAN社のモデルSUNRISEの分光光度計で450 nmでの吸光を測定した。組み換えOPNを用いて製造した公知の濃度の標準列を、平行してELISAで測定し、これを定量化のために使用した。ELISAにとって使用した全ての試薬はIBL Hamburg社から入手した。標準の公知の濃度を用いて算定した脳脊髄液試料中のOPN-濃度を図7の箱型図の形で記載した。各箱部は中央線として統計的中央値を用いたデータ点の50%を包含する。箱部の上側及び下側の線はデータ個体群の $\pm 25\%$ についての限界を示す。上側の箱部の上方にある線は「Upper Quartile UQ」として表され、下側の箱の下側の線は「Lower Quartile LQ」として表される。四分位数間距離「Interquartile Distance (IQD)」は下方の四分位数から上方の四分位数までの距離を表す。箱部の上側及び下側に接続した線は、最小値までの距離、もしくは最大値までの距離を表す。このことから、異常値として認識されるデータ点が識別される。データ点の値が $W > UQ + 1.5 * IQD$ 又は $W < LQ - 1.5 * IQD$ である場合がこのケースである。

10

20

**【0082】**

この明細書中の見出しは、テキストの構造化のために決められているにすぎない。この見出しは、記載した内容を制限したり又は限定することにはならない。全ての実施例は、発明思想を詳細に説明するものであるが、本発明の範囲を限定するものではない。

**【参考文献】****【0083】**

30

## 参考文献

1. Clark, C.M., L. Sheppard, G.G. Fillenbaum, D. Galasko, J.C. Morris, E. Koss, R. Mohs, and A. Heyman. 1999. Variability In annual Mini-Mental State Examination score in patients with probable Alzheimer disease: a clinical perspective of data from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Arch Neurol.* 56:857-62. 10
2. Ikeda, T., Y. Nagai, A. Yamaguchi, S. Yokose, and S. Yoshiki. 1995. Age-related reduction in bone matrix protein mRNA expression in rat bone tissues: application of histomorphometry to in situ hybridization. *Bone.* 16:17-23.
3. McKee, M.D., A. Nanci, W.J. Landis, Y. Gotoh, L.C. Gerstenfeld, and M.J. Glimcher. 1990. Developmental appearance and ultrastructural immunolocalization of a major 66 kDa phosphoprotein in embryonic and post-natal chicken bone. *Anat Rec.* 228:77-92.
4. Weber, G.F., S. Ashkar, M.J. Glimcher, and H. Cantor. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science.* 271:509-12. 20
5. Weber, G.F., and H. Cantor. 1996. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:241-8.
6. Gunnensen, J.M., V. Spirkoska, P.E. Smith, R.A. Danks, and S.S. Tan. 2000. Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression. *Glia.* 32:146-54.
7. Sørensen, E.S., P. Hojrup, and T.E. Petersen. 1995. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci.* 4:2040-9. 30
8. Nagata, T., R. Todescan, H.A. Goldberg, Q. Zhang, and J. Sodek. 1989. Sulphation of secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 165:234-40.
9. Liang, C.T., J. Barnes, J.G. Sedor, H.A. Quartuccio, M. Bolander, J.J. Jeffrey, and G.A. Rodan. 1992. Impaired bone activity in aged rats: alterations at the cellular and molecular levels. *Bone.* 13:435-41. 40
10. Tanaka, H., R. Quarto, S. Williams, J. Barnes, and C.T. Liang. 1994. In vivo and in vitro effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on femoral mRNA expression in old rats. *Bone.* 15:647-53.

11. Kwon, H.M., B.K. Hong, T.S. Kang, K. Kwon, H.K. Kim, Y. Jang, D. Chol, H.Y. Park, S.M. Kang, S.Y. Cho, and H.S. Kim. 2000. Expression of osteopontin in calcified coronary atherosclerotic plaques. *J Korean Med Sci.* 15:485-93.

12. Ek-Rylander, B., M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard, and G. Andersson. 1994. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 269:14853-6.

13. Hunter, G.K., C.L. Kyle, and H.A. Goldberg. 1994. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 300:723-8.

14. Wang, X., C. Loudon, T.L. Yue, J.A. Ellison, F.C. Barone, H.A. Solleveld, and G.Z. Feuerstein. 1998. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci.* 18:2075-83.

15. Llaw, L., D.E. Birk, C.B. Ballas, J.S. Whitsitt, J.M. Davidson, and B.L. Hogan. 1998. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest.* 101:1468-78.

16. Ellison, J.A., J.J. Velier, P. Spera, Z.L. Jonak, X. Wang, F.C. Barone, and G.Z. Feuerstein. 1998. Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke.* 29:1698-706; discussion 1707.

17. Wilm, M., and M. Mann. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 68:1-8.

18. Engelborghs, S., and P.P. De Deyn. 2001. Biological and genetic markers of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Med Okayama.* 55:55-63.

19. Papayannopoulos, I.A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev.* 49-73.

20. Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 20:3551-67.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1A】

DROPN - ペプチドと、そのOPN - タンパク質とのアライメントを示す図である。

【図1B】

図1Aの続きである。

【図2】

脳脊髄液からDROPN - ペプチドを分離しかつ濃縮するための逆相クロマトグラフィーの結果を示すチャートである。

【図3】

D R O P N - 1 0 の例の質量分析測定 ( M A L D I ) の結果を示すチャートである。

【 図 4 】

相対的に定量化する質量分析法としての M A L D I の結果を示すグラフである。

【 図 5 】

リン酸基を有するペプチドの D R O P N - 1 0 の例の M S / M S - フラグメントスペクトルを示すチャートである。

【 図 6 A 】

対照患者と比較したアルツハイマー病患者の D R O P N - 5、D R O P N - 1 0 及び D R O P N - 2 0 の濃度の定量的比較のための「箱ヒゲ図 ( 「 B o x - W h i s k e r - P l o t s 」 ) 」である。

【 図 6 B 】

図 6 A の続きである。

【 図 6 C 】

図 6 B の続きである。

【 図 7 】 「 サンドイッチ E L I S A 」を用いた脳脊髄液中の O P N - タンパク質濃度の測定。

【 図 1 A 】

```

OPN-タンパク質 1  MRFAVICFLGLGTCALPVKQADSGSSEKQLYNKYPDAVAATWLN
.....VKQADSGSSEKQLYNKYPDAVAT.....
DROPN-1
.....VKQADSGSSEKQLYNKYPDAVA.....
DROPN-27
.....KQADSGSSEKQLYNKYPDAVAT.....
DROPN-28
.....r1-SEKQLYLN-r2.....
DROPN-2

OPN-タンパク質 47  DFSQKQNLAPQNAVSEETNDFKQETLFSKSNESHMDMDDDDDDDHVDSDQSIDSNDSDDVDD

OPN-タンパク質 114  TDDSKQSHSHSDSDDELVTDFPYDLDAEVEVTFVFPVVPVYDYGREDSSVYVGLRSLKSKKFRFPDIQ

OPN-タンパク質 181  YFDATDEDITSIMSESEELNGAYKALFVAQDLNAPSDWDNRGKDSYETSQILDQSAETHSHKQSLYK
.....AQLNAPSDWDRGKDSYETSQILDQSAETHSHKQS.....
DROPN-3
.....AQLNAPSDWDRGKDSYETSQILDQSAETHSHKQSLY.....
DROPN-4
.....QDLNAPSDWDRGKDSYETSQILDQSAETHSHKQS.....
DROPN-29
.....LNAPSDWDRGKDSYETSQILDQSAETHSHKQS.....
DROPN-5
.....DQSAETHSHKQSL.....
DROPN-6
.....r3-KDSYETSQ-r4.....
DROPN-7
.....r5-SAEETHSHK-r6.....
DROPN-8
DROPN-9

```

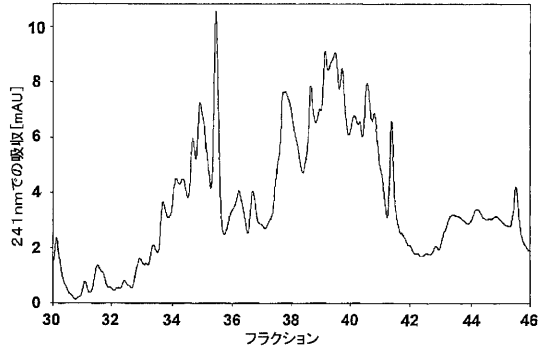
【 図 1 B 】

```

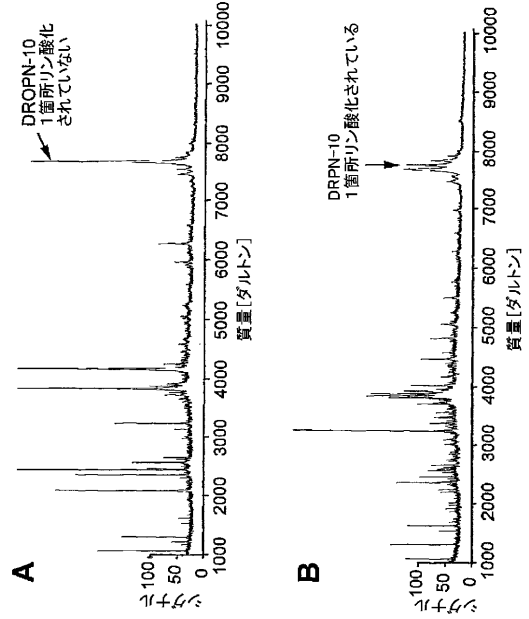
OPN-タンパク質 248  RKANDESNEHSDVIDSQELSKVSRFHFHSHEDMLVDPKSKEDKHLKFRISHIELDASSEVYN
.....KANDSNESHSDVIDSQELSKVSRFHFHSHEDMLVDPKSKEDKHLKFRISHIELDASSEVYN.....
DROPN-10
.....KANDSNESHSDVIDSQELSKVSRFHFHSHEDMLVDPKSKEDKHLKFRISHIELDASSEVYN.....
DROPN-11
.....NDESNEHSDVIDSQELSKVSRFHFHSHEDML.....
DROPN-30
.....NDESNEHSDVIDSQELSKVSRFHFHSHEDML.....
DROPN-31
.....SKVSRFHFHSHED.....
DROPN-12
.....r7-SNEHSDVI-r8.....
DROPN-13
.....r9-REFHSHDF-r10.....
DROPN-14
.....LVDPKSKEDKHL.....
DROPN-15
.....LVDPKSKEDKHL.....
DROPN-16
.....LVDPKSKEDKHLK.....
DROPN-17
.....LVDPKSKEDKHLK.....
DROPN-18
.....LVDPKSKEDKHLK.....
DROPN-19
.....LVDPKSKEDKHLKFRISHIELDASSE.....
DROPN-20
.....LVDPKSKEDKHLKFRISHIELDASSEVYN.....
DROPN-21
.....VDPKSKEDKHLK.....
DROPN-22
.....VDPKSKEDKHLK.....
DROPN-23
.....VDPKSKEDKHLKFRISHIELDASSE.....
DROPN-24
.....PKSKEDKHLKFRISHIELDASSE.....
DROPN-25
.....r11-KSKEDKHL-r12.....
DROPN-26
.....r13-SHIELDAS-r14

```

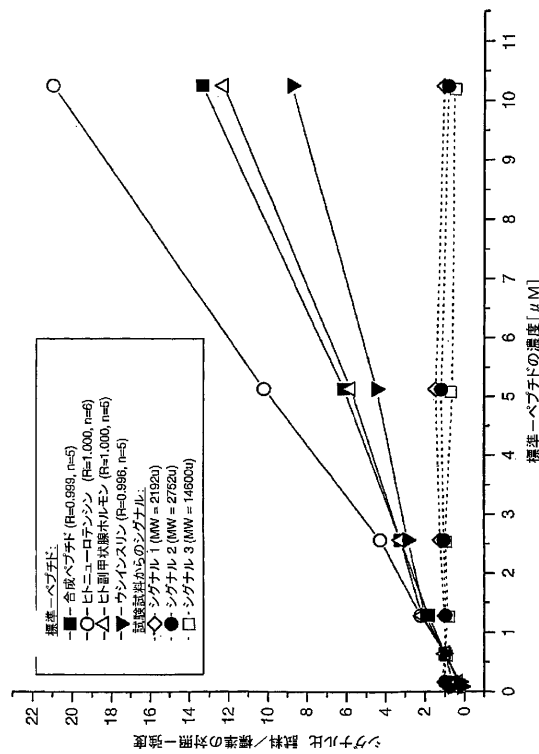
【 図 2 】



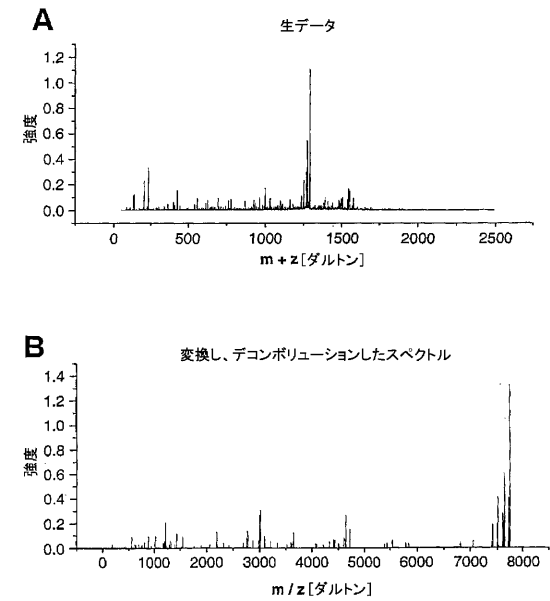
【 図 3 】



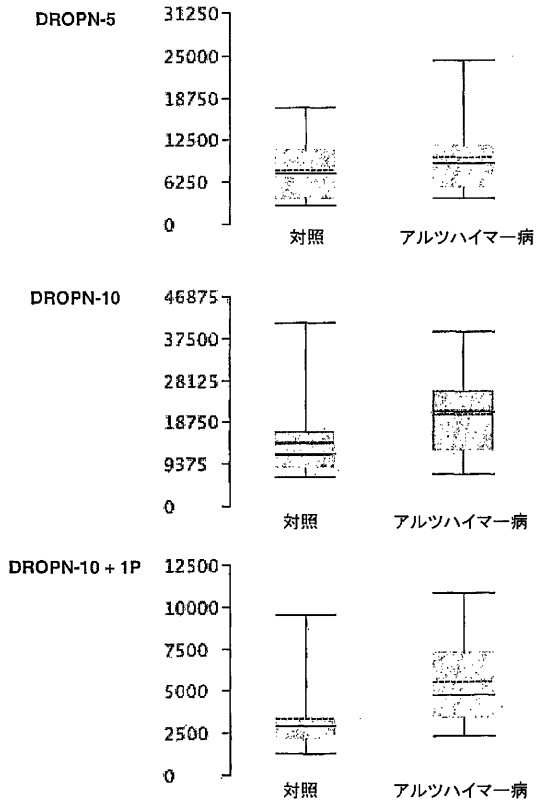
【 図 4 】



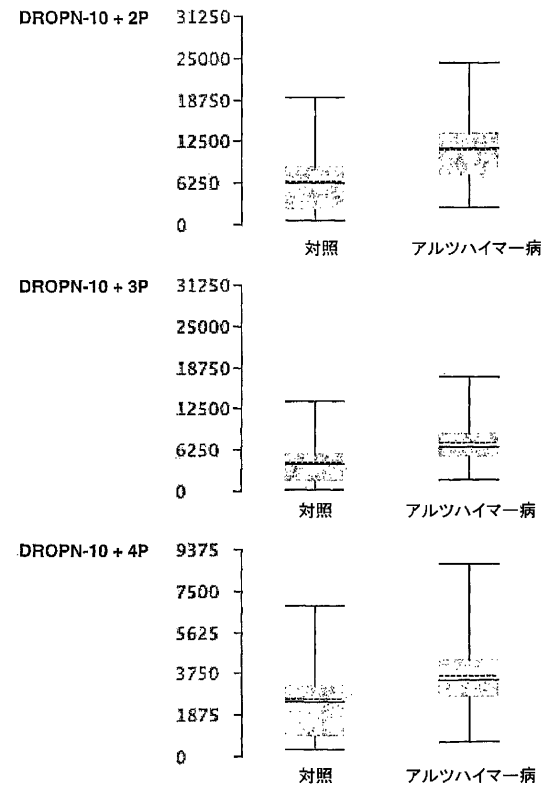
【 図 5 】



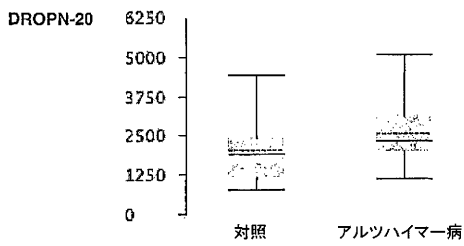
【 図 6 A 】



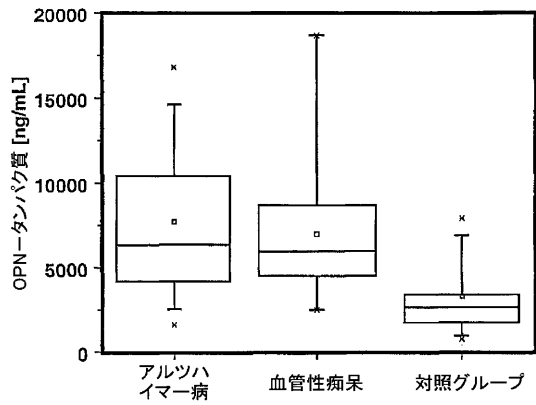
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 7 】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/090974 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/00 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BIOVISION AG [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 5,  
30625 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01665

(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Mai 2002 (08.05.2002) (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LAMPING, Nor-  
bert [DE/DE]; Siegesstrasse 8, 30175 Hannover (DE);  
ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Von-Fischer-Strasse 6,  
30559 Hannover (DE); HEINE, Gabriele [DE/DE]; Wald-  
strasse 22, 30163 Hannover (DE); JÜRGENS, Michael  
[DE/DE]; Waldstrasse 22, 30163 Hannover (DE); HESS,  
Rüdiger [DE/DE]; Bellhäuser Strasse 2, 30629 Hannover

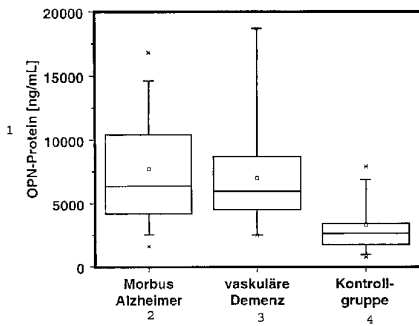
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PROGREDIENT CHRONIC DEMENTIA, AND CORRESPONDING PEPTIDES AND DETECTION REAGENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINER PROGREDIENTEN, CHRONISCH-DEMENTIELLEN ERKRANKUNG, ZUGEHÖRIGE PEPTIDE UND NACHWEISREAGENZEN



WO 02/090974 A2



1. PROTEINE OPN (ng/ml)
2. ALZHEIMER'S DISEASE
3. VASCULAR DEMENTIA
4. CONTROL GROUP

(57) Abstract: The invention relates to defined peptides and the quantitative determination thereof in body fluids of patients suffering from prodromal chronic dementia, in relation to the concentration of said peptides in a control group. The inventive peptides come from a protein precursor having the corresponding gene, are processed in a specific manner, and are optionally post-translationally modified, especially phosphorylated. An increase in the concentrations of these peptides or the corresponding non-processed protein indicates prodromal chronic dementia. Prodromal chronic dementia is detected by identifying the peptides and/or the protein individually or in combinations. The invention also relates to the use of said peptides for controlling the course of prodromal chronic dementia and for the prognosis of prodromal chronic dementia, especially for complementing or replacing mini-mental scores, and for developing therapeutic agents to combat prodromal chronic dementia such as Alzheimer's disease.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft definierte Peptide und deren quantitative Bestimmung in Körperflüssigkeiten von Patienten, die an prodromalen, chronisch-dementiellen Erkrankungen leiden, relativ zu deren Konzentration in einer Kontrollgruppe. Die erfindungsgemässen Peptide entstammen aus einem Proteinvorläufer mit dem korrespondierenden

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/090974 A2 

- (DI), SELLE, Hartmut [DI/DI]; Lickenriede 15, 30459 Hannover (DI).
- (74) **Anwalt:** GRAMM, LINS & PARTNER GBR; LÄUTER, Marina, Freundallee 13, 30173 Hannover (DI).
- (81) **Bestimmungsstaaten (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, GF, GH, GM, GR, HT, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SH, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DL, DK, ES, FR, GB, GR, HU, 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).
- Erklärungen gemäß Regel 4.17:**  
 — hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten  
 — Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Veröffentlicht:**  
 ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Gen und sind in spezifischer Art und Weise prozessiert und ggf. posttranslational modifiziert, insbesondere phosphoryliert. Ein Anstieg der Konzentrationen dieser Peptide oder des zugehörigen nicht prozessierten Proteins zeigt eine progrediente, chronisch demenzielle Erkrankung an. Der Nachweis der progredienten, chronisch demenziellen Erkrankung erfolgt durch eine Identifizierung der Peptide und/oder des Proteins einzeln oder in Kombinationen. Die Erfindung findet darüber hinaus Verwendung zur Verlaufskontrolle von progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankungen und zu ihrer Prognose, insbesondere zur Ergänzung oder als Ersatz des "Mini-Mental Scores", sowie zur Entwicklung von Therapeutika gegen progrediente, chronisch-demenzielle Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer.

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

**Verfahren zum Nachweis einer progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung, zugehörige Peptide und Nachweisreagenzien**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis progredienter, chronisch-demenzieller Erkrankungen oder einer Veranlagung für solche Erkrankungen, insbesondere eine alternative oder ergänzende Methode zur Bestimmung des "Mini-Mental Scores" durch die Ermittlung der Schwere der Demenz. Dazu wird die Konzentration bestimmter Peptide in Körperflüssigkeiten oder anderen Proben des Patienten ermittelt. Weiterhin betrifft die Erfindung Peptide, die zur Bestimmung des Vorhandenseins und/oder des Grades der progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung aufgefunden wurden.

Außerdem betrifft die Erfindung Nachweisreagenzien wie Antikörper und Nukleinsäuren und dergleichen, über die diese Peptide, bzw. die entsprechenden Nukleinsäuren nachgewiesen werden können. Weiterhin betrifft die Erfindung pharmazeutische Anwendungen, die OPN, OPN-Peptide, OPN-Antikörper, OPN-Nukleinsäuren, OPN-Protein-Antagonisten, oder OPN-Protein-Agonisten, OPN-Peptid-Agonisten oder OPN-Peptid-Antagonisten beinhalten, zur Therapie oder Prophylaxe von neurologischen Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer. Weiterhin betrifft die Erfindung Methoden zur Ermittlung von Patienten mit neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, die geeignet sind, an klinischen Studien zur Untersuchung dieser Erkrankungen teil zu nehmen.

Demenzielle Erkrankungen stellen in den Industrieländern aufgrund der höheren durchschnittlichen Lebenserwartung ein zunehmendes Problem dar. Demenzielle Erkrankungen sind größtenteils nicht heilbar und machen eine langanhaltende Pflege der Erkrankten erforderlich. Etwa die Hälfte dieser Patienten wird stationär gepflegt. Es sind mehr als 60 demenzielle Erkrankungen bekannt, einschließlich solcher Erkrankungen, die demenzielle Erscheinungen mit sich bringen.

Hiervon entfallen jedoch ca. 65 % auf Morbus Alzheimer (Alzheimersche Krankheit, AD, Alzheimer's Disease), deren Diagnose und Therapie deshalb ein hoher Stellenwert zukommt. Neben Morbus Alzheimer sind unter anderem folgende nicht-Alzheimer-Demenzen bekannt: die vaskuläre Demenz, die Lewy-Body Demenz, die

WO 02/090974

2

PCT/DE02/01665

Binswanger-Demenz sowie Demenzielle Erkrankungen, die als Begleiteffekt anderer Krankheiten, wie Parkinsonscher Krankheit, Huntington-Desease, Pick's-Disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinger-Krankheit, Kreuzfeldt-Jakob-Krankheit usw. vorkommen.

5

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch folgende Symptome auszeichnet: Abnahme der geistigen Fähigkeiten, Konfusion und herabgesetzte Selbsterhaltungs- und Selbstbetreuungs-fähigkeit. Insbesondere ein stark eingeschränktes Kurzzeitgedächtnis ist charakteristisch für Morbus Alzheimer, während lange zurückliegende Erinnerungen des Patienten, z.B. an die eigene Kindheit, durch die Erkrankung weit weniger beeinträchtigt werden. Morphologisch kommt es zu Veränderungen im Gehirn, die sich u.a. in Form von Amyloidablagerungen und degenerierten Nervenzellen äußern. Die morphologischen Veränderungen können nach dem Tode des Patienten histologisch diagnostiziert werden und sind bis heute der einzige sichere Nachweis der Erkrankung. Diese histopathologischen Diagnosen beruhen auf Kriterien, die das "Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease" (CERAD) festgelegt hat. Zur Diagnose von Morbus Alzheimer werden derzeit folgende kriterienbasierte Diagnosesysteme verwendet: Die "International classification of Diseases, 10th revision" (ICD-10), das „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition" (DSM-IV) der „American Psychiatric Association", und die vom "National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association" NINCDS-ADRDA aufgestellten "Work Group criteria".

25

Diese Systeme verwenden eine Reihe von neuropsychologischen Tests, um eine Morbus Alzheimer Diagnose treffen zu können, nicht jedoch objektiv messbare klinische Parameter. Es ist von besonderem Interesse die aktuelle Ausprägung des Schweregrad der Erkrankung zu erfassen, was z.B. durch Bestimmung des „Mini-Mental Scores" erfolgen kann. Der „Mini-Mental Score" wird mit Hilfe einer „Mini-Mental State Examination" (MMSE), eines psychologischen Tests, ermittelt. Dadurch wird u.a. ermöglicht, den Verlauf der Erkrankung und die Wirksamkeit eventueller Therapien zu beobachten. Clark et al konnten jedoch zeigen, das z.B. zur Ermittlung des Verlaufs von Morbus Alzheimer die Bestimmung des „Mini-Mental Scores" nur begrenzt aussagekräftig ist, da große Messungenauigkeiten und

30

WO 02/090974

3

PCT/DE02/01665

große Variationen in der Höhe des Scores auftreten [1]. Daher ist die Bereitstellung eines verlässlichen, klinisch messbaren Parameters, der den „Mini-Mental Score“ ergänzen oder ersetzen kann zur Bestimmung des Krankheitsverlaufs von progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, von großer medizinischer und damit auch wirtschaftlicher Bedeutung.

Derzeit steht keine ursächliche Therapie zur Behandlung von Morbus Alzheimer zur Verfügung. Die Erkrankung wird lediglich symptomatisch z.B. durch die Gabe von Neurotransmittern wie Acetylcholin behandelt. Als weitere möglichen Therapiestrategien werden derzeit die Gabe von Antioxidantien, von Radikalfängern, von Calciumkanalblockern, von anti-inflammatorischen Substanzen, von Secretaseinhibitoren, von anti-Amyloid-Antikörpern usw. sowie die Immunisierung gegen Amyloid-Peptide erprobt. Es ist bisher aber noch keine ursächliche Therapie dieser Erkrankung möglich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Nachteile bei der Morbus Alzheimer Diagnose im Stand der Technik zu vermeiden und ein frühzeitig und zuverlässig anwendbares Verfahren zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer, zur Verfügung zu stellen.

Erst diese Diagnostik ermöglicht neue Therapien zur Behandlung von Morbus Alzheimer.

#### 25 Definitionen:

OPN-Proteine oder Peptide entsprechend der Accession Nr. X13694:  
Das von der Nukleinsäuresequenz X13694 abgeleitete Peptid wird auch als OPN-Protein bezeichnet und schließt alle natürlich vorkommenden Allele, Mutanten und Polymorphismen von OPN-Proteinen sowie gewebespezifisch exprimierte OPN-Varianten ein. Insbesondere sind auch OPN-Varianten eingeschlossen die aufgrund von Erkrankungen oder als Folge von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer auftreten. Eingeschlossen sind sowohl OPN-Proteine mit, als auch ohne Signalsequenz, Pro-

WO 02/090974

4

PCT/DE02/01665

Formen von OPN-Proteinen die noch nicht prozessiert sind, sowie bereits prozessierte OPN-Proteine, lösliche OPN-Proteine und membranständige OPN-Proteine, wobei die membranständigen OPN-Proteine sowohl über transmembranäre Aminosäuresequenzen mit einer Zell- oder Organellmembran verbunden sein können, als auch über eine postranslationale Modifikation, z.B. einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker. Ferner sind eingeschlossen Variationen der OPN-Sequenz, die durch alternatives Splicing, durch alternative Translationsstart- und -endpunkte, durch RNA-Editing, durch alternative postranslationale Modifizierungen, sowie weitere durch in der Natur vorkommende Mechanismen entstandene OPN-Protein-Varianten.

DROPN-Peptide:

Nachfolgend werden OPN-Peptide und OPN-Peptid-Varianten als DROPN- ("Dementia Related Osteopontin") Peptide bezeichnet. DROPN-Peptide leiten sich von der eingangs genannten OPN-Sequenz X13694 ab. Alternativ können DROPN-Peptide auch von anderen Gene Bank Einträgen für Osteopontin, wie z.B. AF052124, J04765, M83248, NM\_000582, U20758 oder weiteren OPN-Einträgen, die in der Zukunft eventuell noch hinzukommen werden, abgeleitet werden. Dabei ist es möglich, dass sich die OPN-Protein-Sequenzen eventuell von der Sequenz des Gene Bank Eintrags mit der Nummer X13694 unterscheiden, wie es derzeit schon für die Gene Bank Einträge AF052124, J04765 und NM\_000582 der Fall ist. OPN-Sequenzeinträge können auch in anderen, von "Gene Bank" verschiedenen Sequenzdatenbanken vorhanden sein. Folglich müssen DROPN-Peptide und OPN-Proteine nicht exakt mit der Sequenz des OPN-Proteins entsprechend dem Eintrag in der Sequenzdatenbank "Gene Bank" mit der Accession No. X13694 übereinstimmen. Außerdem können DROPN-Peptide zwei punktmutierte, zwei deletierte oder zwei zusätzlich intern eingefügte Aminosäuren, sowie N-terminale und/oder C-terminale Verlängerungen beinhalten. Dabei müssen sie jedoch mindestens 8 Aminosäuren aus der OPN-Proteinsequenz beibehalten. Als N- oder C-terminale Verlängerung kommen nur solche Aminosäuren in Frage, die in der OPN-Proteinsequenz an dieser Sequenzposition im OPN-Protein vorkommen. Außerdem werden Peptide, die sich aus natürlich vorkommenden OPN-Polymorphismen und aus natürlich vorkommenden OPN-Mutanten ableiten, als DROPN-Peptide bezeichnet, sofern sie mindestens 70 % Übereinstimmung mit der

WO 02/090974

5

PCT/DE02/01665

OPN-Proteinsequenz (X13694) aufweisen. DROPN-Peptide können auch mit posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen oder N-terminalen Pyroglutaminsäure-Resten und/oder in chemisch modifizierter Form, vorzugsweise als Peptid-Oxide, vorliegen. Zum Beispiel wurde DROPN-10 sowohl als nicht phosphoryliertes, als auch als phosphoryliertes Peptid identifiziert. DROPN-10 tritt z.B. ohne Phosphatgruppe und mit ein, zwei, drei, vier oder fünf Phosphatgruppen auf.

Chemisch oder posttranslational modifizierte Peptide:

10 Ein chemisch oder posttranslational modifiziertes Peptid kann sowohl aus D- als auch aus L-Aminosäuren, sowie aus Kombinationen von D- und L-Aminosäuren bestehen und können sowohl natürlich vorkommen, rekombinant hergestellt werden oder chemisch synthetisiert werden. Außerdem können in diesen Peptiden ungewöhnliche Aminosäuren, d.h. Aminosäuren, die nicht zu den 20  
15 Standardaminoacids gehören, enthalten sein. Als Beispiele für ungewöhnliche Aminosäuren sind unter anderem: alpha-Aminobuttersäure, beta-Aminobuttersäure, beta-Alanin, beta-Aminoisobuttersäure, Norvalin, Homoserin, Norleucin, gamma-Aminobuttersäure, Thioprolin, 4-Hydroxyprolin, alpha-Aminoacidsäure, Diaminobuttersäure, 4-Aminobenzoessäure, Homocystein, alpha-  
20 Aminopenicillansäure, Histamin, Ornithin, Glycin-Prolin Dipeptid, Hydroxylysin, Prolin-Hydroxyprolin Dipeptid, Cystathionin, Ethionin, Seleno-Cystein. Als posttranslationale oder chemische Modifikationen sind unter anderem Modifizierungen der Aminosäuresequenzen durch folgende Strukturen: Bindung von freiem Cystein an ein Cystein in der Peptidsequenz, Methyl-, Acetyl-, Farnesyl-,  
25 Biotinyl-, Stearoyl-, Palmitoyl-, Lipoyl-, C-Mannosyl-, Phosphor- und Sulfatgruppen, Glykosilierungen, Amidierungen, Deamidierungen, Pyroglutaminsäure, Citrullin, usw. möglich.

Nukleinsäuren:

30 Als Nukleinsäuren werden DNA, RNA und DNA-RNA-Hybridmoleküle sowohl natürlichen Ursprungs, als auch synthetisch oder rekombinant hergestellt angesehen. Ferner eingeschlossen sind chemisch modifizierte Nukleinsäuren, die modifizierte Nucleotide mit hoher in vivo Stabilität, wie z.B. Phosphorothioaten,

WO 02/090974

6

PCT/DE02/01665

enthalten. Solche stabilisierten Nukleinsäuren finden bereits bei der Anwendung von Ribozym-, Antisense- und Triplexnukleinsäure-Techniken Verwendung.

Signifikanz:

- 5 Der Begriff signifikant wird im Sinne der Verwendung des Begriffs der Signifikanz in der Statistik verwendet. In dieser Patentanmeldung wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 90 %, vorzugsweise 95 % weiter vorzugsweise 99 % als signifikant definiert.

10 Sensitivität:

Als Sensitivität wird der Anteil an erkrankten Patienten definiert, die bei einer Diagnose auf die Erkrankung ein positives Diagnoseergebnis erhalten, d.h. die Diagnose zeigt die Erkrankung korrekt an.

15 Spezifität:

Als Spezifität wird der Anteil an gesunden Patienten definiert, die bei einer Diagnose auf die Erkrankung ein negatives Diagnoseergebnis erhalten, d.h. die Diagnose zeigt korrekt an, dass keine Erkrankung vorliegt.

- 20 Überraschenderweise wurde gefunden, dass in Körperflüssigkeitsproben von an Morbus Alzheimer leidenden Patienten, insbesondere in Liquor cerebrospinalis, die Konzentration bestimmter Peptide relativ zu ihrer Konzentration in Kontrollproben stark verändert ist und so einen Nachweis von Morbus Alzheimer ermöglicht. Veränderungen der Konzentration dieser Peptide relativ zu ihrer Konzentration in
- 25 Kontrollgruppen zeigen das Vorliegen einer Morbus Alzheimer Erkrankung an und sind daher zum Nachweis dieser Erkrankung bei hoher Sensitivität und Spezifität geeignet. Die Modulierung der OPN-Protein oder DROPN-Peptid Konzentration, mit dem Ziel der Einstellung des Patienten auf normale OPN- oder DROPN-Peptid-Konzentrationen kann somit therapeutisch angewendet werden.

30

Zur Lösung der Aufgabe umfasst die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis einer neurologischen, insbesondere einer chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere von Morbus Alzheimer oder einer Veranlagung für eine solche Erkrankung durch Identifizierung eines oder mehrerer DROPN-Peptide oder von

WO 02/090974

7

PCT/DE02/01665

OPN-Peptiden, welche von der Sequenz mit der Gene Bank Accession No. X13694 abgeleitet sind in einer biologischen Probe eines Individuums. Da davon ausgegangen werden kann, dass diese DROPN-Peptide oder OPN-Peptide mit der Erkrankung in einem ursächlichen Zusammenhang stehen, beinhaltet die vorliegende Erfindung auch ihre Verwendung zur Therapie von Morbus Alzheimer oder verwandter neurologischer Erkrankungen.

Zur Lösung der Aufgabe gibt die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis einer neurologischen Erkrankung, insbesondere einer progredienten, chronisch demenziellen Erkrankung, insbesondere Morbus Alzheimer, unter Bestimmung wenigstens eines Markerpeptids in einer biologischen Probe eines Patienten an.

Dazu sind verschiedene Lösungsansätze in der medizinischen Diagnostik möglich und üblich:

15

Zum einen kann generell auf das Vorhandensein eines Markerpeptids untersucht werden und die Abwesenheit, bzw. Anwesenheit dieses Markerpeptids ermöglicht dann eine Diagnose der Erkrankung.

Bei einer anderen üblichen Diagnosestrategie werden zunächst die üblicherweise vorhandenen Konzentrationen des Markerpeptids bei Kontrollen und bei Patienten, die an der zu diagnostizierenden Erkrankung leiden, bestimmt und anhand dieser Messwerte ein Grenzwert, häufig auch "cut-off Punkt" genannt, ermittelt, der die Gruppe der als gesund betrachteten von der Gruppe der als krank betrachteten trennt. Ist die Konzentration des jeweiligen Markerpeptids bei erkrankten Personen vermindert, so werden alle Personen, deren Messwert für das jeweilige Markerpeptid unter dem cut-off Punkt liegt als erkrankt diagnostiziert. Ist die Konzentration des jeweiligen Markerpeptids bei erkrankten Personen erhöht, so werden alle Personen, deren Messwert für das jeweilige Markerpeptid über dem cut-off Punkt liegt als erkrankt diagnostiziert. Der für jedes Markerpeptid individuell ermittelte cut-off Punkt ermöglicht also eine eindeutige Unterscheidung von gesunden und kranken Personen.

WO 02/090974

8

PCT/DE02/01665

- Bei einer weiteren Diagnosestrategie wird eine für das jeweilige Markerpeptid spezifische Konzentrationserhöhung oder Konzentrationsverminderung des Markerpeptids in der Probe des Patienten relativ zu der Konzentration des markerpeptids in der Kontrollprobe ermittelt und eine signifikante
- 5 Konzentrationsänderung des Markerpeptids als positives Nachweisergebnis für die Erkrankung gewertet. Dabei kann für ein bestimmtes DROPN-Peptid grundsätzlich entweder nur ein Anstieg der Peptidkonzentration bei Morbus Alzheimer Patienten auftreten, oder es kann für dieses DROPN-Peptid grundsätzlich nur eine Verminderung der Peptidkonzentration bei Morbus Alzheimer Patienten auftreten.
- 10 Für ein definiertes DROPN-Peptid kann nicht gleichzeitig bei einem individuellen Morbus Alzheimer Patienten eine erhöhte und bei einem anderen Morbus Alzheimer Patienten eine, relativ zur Kontrollgruppe verminderte DROPN-Peptidkonzentration auftreten.
- 15 Bevorzugte Marker nach der Erfindung sind im Sequenzprotokoll angegeben und sind mit DROPN-1 bis DROPN-31, entsprechend Seq. ID 1 bis 31 benannt. Die Sequenzen der DROPN-Peptide sind in Abbildung 1 und in Tabelle 1 dargestellt. Die Zuordnung der DROPN-Peptide zu ihrer jeweiligen Seq. ID No. ist in Tabelle 1 dargestellt.
- 20 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um ein Verfahren, bei welchem spezifische Biomarker erfasst werden, die bei neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere bei Morbus Alzheimer, in Ihrer Konzentration verändert sind und die die Krankheit auch bereits in einem frühen Stadium, z.B. bei Vorliegen
- 25 eines „Minimal Cognitive Impairments“ (MCI) anzeigen, oder die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko frühzeitig anzeigen. Dies ist wichtig, um einen verlässlichen klinischen Marker zur Diagnose dieser Erkrankungen zur Verfügung zu stellen.
- Vorzugsweise kann die Konzentration der DROPN-Peptide in der Probe, aber auch
- 30 das charakteristische Muster des Auftretens mehrerer bestimmter DROPN-Peptide, mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert werden. Diese neuen Marker ermöglichen daher die Entwicklung und die begleitende Kontrolle von Therapien zur Behandlung von Morbus Alzheimer, da der Verlauf und ein eventuell aufgrund einer Therapie einsetzender Heilungserfolg oder ein vermindertes Fortschreiten der

WO 02/090974

9

PCT/DE02/01665

Erkrankung ermittelt werden können. Eine effektive Therapie von Morbus Alzheimer ist derzeit nicht möglich, was die Dringlichkeit der Bereitstellung einer sicheren Nachweismethode für eine Morbus Alzheimer Erkrankung unterstreicht, da ein sicherer Nachweis der Erkrankung eine Voraussetzung zur Entwicklung einer Therapie ist.

Der Nachweis von DROPN-Peptiden ermöglicht es außerdem, im Rahmen von klinischen Studien zur Entwicklung von neuen Therapien zur Behandlung von Morbus Alzheimer mit hoher Spezifität nur solche Patienten auszuwählen, die an Morbus Alzheimer erkrankt sind und nicht an anderen Erkrankungen. Dieses ist wichtig, um aussagekräftige Studienergebnisse zu erhalten. Fälschlicherweise als Morbus Alzheimer Patienten diagnostizierte Patienten beeinflussen die Qualität der Ergebnisse einer Morbus Alzheimer Therapie-Studie negativ. Außerdem ermöglicht der Nachweis von DROPN-Peptiden die Stratifizierung von Patienten, wodurch Subgruppen von Morbus Alzheimer Patienten gezielt ausgewählt werden können, die für bestimmte Morbus Alzheimer Therapiestrategien oder klinische Studien besonders geeignet sind.

Bei Morbus Alzheimer Patienten sind die Konzentrationen von DROPN-Peptiden deutlich verändert, verglichen mit gesunden Personen. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist es daher, die DROPN-Konzentrationen bei Morbus Alzheimer Patienten auf normale Konzentrationen zu bringen. Dieses Verfahren kann zur Therapie von Morbus Alzheimer oder verwandten neurologischen Erkrankungen eingesetzt werden. Bei erhöhten OPN-Protein oder DROPN-Peptid Konzentrationen können die Konzentrationen dieser Stoffe durch therapeutische Gabe von z.B. OPN-Protein oder DROPN-Peptid spezifischen Antikörpern oder OPN-spezifischen Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder Triplex-Nukleinsäuren oder DROPN-Peptid-Antagonisten, OPN-Protein-Antagonisten gesenkt werden. Zur Therapie können auch Substanzen verabreicht werden, die die körpereigene Expression von OPN-Protein oder die Prozessierung von OPN-Protein zu DROPN-Peptiden unterdrücken. Liegt ein Mangel an OPN-Protein oder DROPN-Peptiden als Erkrankungsursache vor, so können therapeutische Gaben von OPN-Protein, DROPN-Peptiden, DROPN-Peptid-Agonisten oder OPN-Protein-Agonisten vorgenommen werden. Auch Substanzen, die die Prozessierung von OPN-Protein

WO 02/090974

10

PCT/DE02/01665

zu DROPN-Peptiden beeinflussen, können therapeutisch eingesetzt werden. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, sind z.B. DROPN-4 und DROPN-10 durch zwei basische Aminosäuren (Lysin und Arginin) voneinander getrennt und solche sogenannten "di-basischen Sequenzen" sind häufig Angriffspunkte von Proteasen, die bei der Prozessierung von Proteinen zu biologisch aktiven Peptiden eine Rolle spielen. Natürlich ist auch die Kombination von verschiedenen Therapiestrategien möglich und unter Umständen sinnvoll.

Die Erfindung umfasst daher auch die Verwendung von OPN-Proteinen, DROPN-Peptiden, DROPN-Peptid-Agonisten und DROPN-Antagonisten, OPN-Protein-Agonisten und OPN-Protein-Antagonisten, anti-OPN-Protein Antikörper und anti-DROPN-Peptid Antikörper zur direkten oder indirekten Modulierung der Konzentration an OPN-Proteinen und DROPN-Peptiden zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer. Alternativ zu Antikörpern können auch Antikörperfragmente, Antikörperfusionsproteine, oder andere selektiv an OPN-Proteine oder DROPN-Peptide bindende Substanzen Verwendung finden. Alternativ zu den genannten Proteinen und Peptiden können auch Fusionsproteine der genannten Proteine und Peptide Verwendung finden. Weiterhin umfasst die Erfindung auch die Verwendung von Antisense-Nukleinsäuren, Triplex-Nukleinsäuren und Ribozymen, die die Expression der genannten Proteine und Peptide modulieren. Außerdem umfasst die Erfindung Agonisten und Antagonisten, die die Aktivität der genannten Proteine modulieren.

Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung ist die galenische Formulierung oder chemische Modifizierung der beschriebenen Peptide und Nukleinsäuren in einer Art und Weise, die es ihnen ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke und/oder die Blut-Liquor-Schranke effizienter zu passieren. Dadurch eignen sie sich dann besonders zur therapeutischen Anwendung. Um dieses zu erreichen können z.B. DROPN-Peptide, OPN-Proteine, Nukleinsäuren, Agonisten oder Antagonisten derart modifiziert werden, dass sie z.B. lipophiler werden was den Übertritt in den Subarachnoidalraum begünstigt. Dieses kann durch Einfügung von hydrophoben Molekülbestandteilen oder auch durch die „Verpackung“ der Stoffe in hydrophobe Agentien, z.B. Liposomen erreicht werden. Außerdem können z.B. Peptidsequenzen an diese Peptide, Protein, Nukleinsäuren, Agonisten oder

WO 02/090974

11

PCT/DE02/01665

Antagonisten angefügt werden, die den Übertritt in den Subarachnoidalraum begünstigen, bzw. umgekehrt den Übertritt aus den Subarachnoidalraum heraus erschweren.

- 5 Die Erfindung umfasst auch die Verabreichung der genannten Therapeutika über verschieden Wege, wie z.B. als intravenöse Injektion, als oral applizierbare Substanz, als inhalierbares Gas oder Aerosol, oder die Verabreichung in Form von direkten Injektion in den Subarachnoidalraum, oder in Gewebe wie Muskel, Fett, Gehirn usw. Dadurch kann eine erhöht biologische Verfügbarkeit und Wirksamkeit dieser Therapeutika erreicht werden. Zum Beispiel können Peptide oder Proteine, die oral verabreicht werden durch säureresistente Kapseln vor proteolytischen Abbau im Magen geschützt werden. Stark hydrophobe Substanzen können durch geeignete galenische Aufbereitungen hydrophiler und somit besser geeignet für z.B. intravenöse Injektionen werden usw.

15

- Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von DROPN-Peptiden oder von OPN-Proteinen zur Identifizierung von Rezeptoren, die diese Moleküle selektiv binden. Auch diese Rezeptoren können durch Gabe von Agonisten oder Antagonisten moduliert werden, was zur Therapie von neurologischen Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer, zweckmäßig ist.

20

#### **OPN-Biologie**

25

- OPN wird von Osteoklasten und Osteozyten synthetisiert [2] und im Knochen eingebaut. Immunhistologisch ist Osteopontin in der mineralisierenden Zone sich entwickelnder Knochen nachgewiesen worden [3]. Außerdem ist es in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten wie z.B. Urin und Milch vorhanden und wird von aktivierten T-Zellen [4, 5] sowie von metastasierenden Tumorzellen, elastischen Fasern der Haut und der Aorta, Myozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Gliazellen [6] expremiert. Ein Nachweis von OPN im Liquor Cerebrospinalis wurde bisher nicht beschrieben und das Wissen um die Konzentration und das Vorhandensein von OPN im Liquor ist daher neu.

30

WO 02/090974

12

PCT/DE02/01665

Bovines OPN aus der Milch hat 28 Phosphorylierungen (27x an Serin und 1x an Threonin), drei O-Glykosilierungen und keine N-Glykosilierungen [7]. Ratten OPN isoliert aus Knochen hat 13 Phosphorylierungen (12x an Serin und 1x an Threonin) und enthält außerdem Sulfatgruppen [8]. Rekombinantes OPN kann sich an Tyrosin autophosphorylieren. Die Unterschiede in der Anzahl der Phosphatgruppen in bovinem OPN aus der Milch und Ratten-OPN aus dem Knochen sind vermutlich in ihrer unterschiedlichen Gewebeherkunft begründet und nicht aus der Spezies, da die Phosphorylierungsstellen in allen bisher sequenzierten OPN Varianten sehr stark konserviert sind [7]. Sørensen et al haben außerdem festgestellt, dass die Phosphorylierung nahezu 100-%ig ist, d.h. alle Stellen die phosphoryliert sind, sind immer komplett zu 100 % phosphoryliert [7]. Wir haben erstmals OPN im Liquor Cerebrospinalis nachgewiesen, was in der Literatur bisher noch nie beschrieben wurde. Interessanterweise haben wir dabei gezeigt, dass im Liquor Cerebrospinalis DRONP-Peptide mit gleicher Sequenz aber unterschiedlicher Anzahl an Phosphorylierungen innerhalb der gleichen Probe auftreten, was, nach den bisherigen Erkenntnissen zu OPN in anderen Körperflüssigkeiten, nicht zu erwarten war und neuartig ist. Außerdem wurde bisher nur das Osteopontin-Protein in biologischen Proben nachgewiesen, nicht jedoch Osteopontin-Peptidfragmente. Beim Knochenumbau treten bei Ratten erhöhte Osteopontin mRNA-Konzentrationen auf [9]. Der Zusammenhang von Alter und Osteopontin-Expression ist nicht eindeutig, da Ergebnisse verschiedener Arbeiten sowohl eine erhöhte, als auch eine verminderte OPN-Expression bei älteren verglichen mit jüngeren Versuchstieren beschreiben [2, 9, 10].

Eine der Funktionen von OPN ist vermutlich die Regulation des Kristallwachstums im Rahmen von Kalzifizierungsprozessen, wobei OPN sowohl verstärkend, als auch inhibierend auf die Kalzium-Kristallisation einwirken kann. Bei Atherosklerose tritt neben einer Kalzifizierung der betroffenen Gefäßwände auch ein Umbau der extrazellulären Matrix auf. Osteopontin ist bevorzugt in den kalzifizierten Bereichen immunhistologisch nachweisbar [11] und wird hier von Makrophagen und glatten Muskelzellen expremiert. Osteopontin könnte möglicherweise der Regulation der vaskulären Kalzifizierung dienen [11]. Vermutlich ist die Richtung, in der Osteopontin wirkt, von der Mikroumgebung und dem Status von Osteopontin

bezüglich seiner posttranslationalen Modifikationen, insbesondere seiner Phosphorylierung, abhängig [7]. Ek-Rylander et al konnten z.B. zeigen, dass dephosphoryliertes OPN nicht mehr die Osteoklast-Adhäsion unterstützt [12]. Dephosphorylierung von OPN vermindert die inhibitorische Aktivität von OPN

5 bezüglich der Hydroxyapatit-Kristallbildung, was eine funktionale Bedeutung der Phosphorylierung von OPN anzeigt [13]. OPN inhibiert das Kristallwachstum im Urin und beugt so der Entstehung von Blasensteinen vor. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, abweichend von den oben beschriebenen Ergebnissen, dass sowohl phosphorylierte DROPN-Peptide als auch die entsprechenden nicht

10 phosphorylierten DROPN-Peptide in gleicher Art und Weise durch ihre Erhöhte Konzentration als Demenz-Marker verwendet werden können. Bei den erfindungsgemäßen Markern handelt es sich daher um solche Fragmente, die nicht dem entsprechen, was für OPN-Fragmente bezüglich ihrer strukturellen Modifikation zu erwarten war. Osteopontin vermittelt außerdem vermutlich Zell-Zell- und Zell-

15 Matrix Interaktion, wodurch die gerichtete Wanderung von Immunzellen, Osteozyten und Tumorzellen ("homing") zu verschiedenen Orten im Organismus gesteuert wird. Dazu interagiert Osteopontin mit CD44, einem ubiquitär exprimierten Transmembranprotein [4, 5]. Neben Osteopontin sind Vitronektin und Hyaluronsäure weitere Liganden von CD44. CD44-Osteopontin-Interaktion führt zu

20 zellulärer Chemotaxis, während CD44-Hyaluronsäure-Interaktion zu homotypischer Zellaggregation führt. In vitro konnte eine Chemotaktische Aktivität von Osteopontin auf Astrozyten nachgewiesen werden [14]. Osteopontin defiziente Mäuse weisen Störungen in der Wundheilung und in der Regulation der Immunantwort auf [15]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in der Nähe von humanen

25 Tumoren und in nekrotischen Tumorbereichen, sowie in ischämischen Bereichen des Gehirns [14] große Mengen Osteopontin Protein und mRNA exprimieren und Osteopontin daher vermutlich eine wichtige Funktion in der Matrixreorganisation bei der Wundheilung hat.

30 Osteopontin fördert die Adhäsion und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen. In Gliomen wird über VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor") unter anderem Osteopontin und sein Rezeptor Alpha V Beta 3-Integrin induziert, wodurch möglicherweise Angiogenese induziert wird. Beim Schlaganfall,

der keine progrediente, chronisch-demenzielle Erkrankung darstellt, konnte ein Anstieg der OPN mRNA gezeigt werden [16].

#### 5 Vorzugsweise Ausführungsformen der Erfindung

Vorzugsweise ist die durch das erfindungsgemäße Verfahren nachgewiesene Demenz eine progrediente, chronisch-demenzielle Erkrankung wie z.B. Morbus Alzheimer. Bislang konnte die Veränderung der Konzentration der erfindungsgemäßen Peptide und Peptidfragmente bei verschiedenen dementiellen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer oder vaskuläre Demenz nachgewiesen werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die erfindungsgemäßen Peptide auch zum Nachweis und zur Therapie von Morbus Alzheimer und verwandten neurologischen Erkrankungen herangezogen werden können. Eine Ausführungsform dieses Verfahrens ist die Ermittlung demenzielle Erkrankungen bereits zu einem frühen Zeitpunkt beispielsweise „Minimal Cognitive Impairment“ (MCI).

Die Identifizierung konzentriert sich vorzugsweise auf bestimmte Peptidfragmente des OPN-Proteins mit der GeneBank Accession No. X13694, d.h. auf Peptide, die Teilsequenzen des OPN-Proteins umfassen oder aber auf das OPN-Protein selbst. Diese Peptide (Peptidfragmente) werden als "Dementia related Osteopontin" (DROPN) -Peptide bezeichnet und werden nachfolgend mit DROPN-1 bis DROPN-31 bezeichnet. Der Zusammenhang zwischen OPN-Protein und DROPN-1 bis DROPN-31 ist in Abbildung 1 dargestellt. Die von uns ermittelten Sequenzen der Peptide sind im Sequenzprotokoll angegeben. Diese OPN-Fragmente entstehen auf natürliche Weise in der Natur und wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Diese Fragmente sind verschieden zu Peptiden, wie sie in der Literatur, entstanden durch in vitro Proteolyse durch Zugabe von Proteasen wie z.B. Trypsin, oft beschrieben werden. Sie stellen somit neue, bisher unbekannte Stoffe dar. Diese Peptide wurden zunächst über Reverse Phase Chromatographie aus biologischen Proben angereichert und gereinigt und anschließend massenspektrometrisch von begleitenden anderen Peptiden getrennt, so dass diese DROPN-Peptide anschließend sequenziert werden konnten.

Die Sequenzen der Peptide im Einbuchstaben-Aminosäurecode sind wie folgt:

DROP N Nr.	OPN-Sequenz (X13694)	Monoisotop. theoret. Masse(Da)	Sequenz
1	19-42	2627,2715	VKQADSGSSEEKQLYNKYPDAVAT
2	27 <sub>r1</sub> -34 <sub>r2</sub>	* ≥ 1009,4716	r1-SEEKQLYN-r2
3	208-243	4032,7594	AQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQS
4	208-246	4465,0079	AQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSRLY
5	211-243	3718,6368	LNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQS
6	231-245	1737,8030	DDQSAETHSHKQSRL
7	231-246	1900,8664	DDQSAETHSHKQSRLY
8	222 <sub>r3</sub> -229 <sub>r4</sub>	≥ 956,4087	r3-KDSYETSQ-r4
9	234 <sub>r5</sub> -241 <sub>r6</sub>	≥ 895,4148	r5-SAETHSHK-r6
10	249-314	** 7653,6003	KANDESNEHSDVIDSQELSKVSRFHSHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN
11	249-288	4662,0953	KANDESNEHSDVIDSQELSKVSRFHSHEFHSHEDMLVVD
12	267-283	2093,9304	SKVSRFHSHEFHSHED
13	254 <sub>r7</sub> -261 <sub>r8</sub>	≥ 899,3985	r7-SNEHSDVI-r8
14	271 <sub>r9</sub> -278 <sub>r10</sub>	≥ 1087,4835	r9-REFHSHEF-r10
15	285-297	1522,7991	LVVDPKSKEEDKH
16	285-298	1635,8832	LVVDPKSKEEDKHL
17	285-299	1763,9781	LVVDPKSKEEDKHLK
18	285-300	1911,0466	LVVDPKSKEEDKHLKF
19	285-312	3222,6521	LVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSE
20	285-314	3435,7634	LVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN
21	286-299	1650,8941	VVDPKSKEEDKHLK
22	286-300	1797,9625	VVDPKSKEEDKHLKF
23	286-312	3109,5680	VVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSE
24	289-312	2796,4042	PKSKEEDKHLKFRISHELDSASSE
25	290 <sub>r11</sub> -297 <sub>r12</sub>	≥ 1112,5826	r11-KSKEEDKHL-r12
26	303 <sub>r13</sub> -310 <sub>r14</sub>	≥ 844,3563	r13-SHELDSAS-r14

WO 02/090974

16

PCT/DE02/01665

27	19-41	2526,2238	VKQADSGSSEEKQLYNKYPPDAVA
28	20-42	2528,2031	KQADSGSSEEKQLYNKYPPDAVAT
29	211-243	*** 3718,6368	LNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHS HKQS
30	251-285	4149,7995	NDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHHS HEDML
31	251-284	4036,7154	NDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHHS HEDM

\* r1 stellt eine Sequenz, die der Sequenz oder Teilen der Sequenz des OPN-Proteins von Aminosäure 26 bis 19 entspricht dar, wobei r1, ausgehend von Aminosäure 27 des OPN-Proteins, zwischen 0 und 8 Aminosäuren lang sein kann.

- 5 Entsprechend stellt r2 die OPN-Proteinsequenz von Aminosäure 35 bis 42 oder Teile davon dar, wobei r2, ausgehend von OPN-Aminosäure 34 zwischen 0 und 8 Aminosäuren lang sein kann. Die weiteren Peptid-Ketten r3 bis r14 sind entsprechend dem oben erläuterten Schema zusammengesetzt, wobei r3 maximal OPN-221-208, r4 maximal OPN-230-246, r5 maximal OPN-233-208, r6 maximal
- 10 OPN-242-246, r7 maximal OPN-253-249, r8 maximal OPN-262-314, r9 maximal OPN-270-249, r10 maximal OPN-279-314, r11 maximal OPN-289-249, r12 maximal OPN-298-314, r13 maximal OPN-302-249 und r14 maximal OPN-311-314 entspricht.

- \*\* Für DROPN-10 konnten wir zusätzlich zum nicht phosphoryliertem DROPN-10
- 15 Peptid experimentell Peptide mit 1, 2, 3, 4 oder 5 Phosphatgruppen aufgrund ihrer entsprechend erhöhten Massen identifizieren. Die dabei experimentell bestimmten Massen für DROPN-10 betragen: 7738 / 7818 / 7898 / 7978 und 8058 Dalton. Eine der möglichen Positionen der Phosphatgruppe in dem mono-phosphoryliertem Peptid DROPN-10 konnte bereits bestimmt werden. Die vermutliche Position der
- 20 Phosphatgruppe bei DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe ist Serin an Position 291 der OPN-Sequenz, die vermutlichen Positionen der Phosphatgruppen beim DROPN-10 mit zwei Phosphatgruppen sind Serin 275 und Serin 291, die vermutlichen Positionen der Phosphatgruppen beim DROPN-10 mit drei Phosphatgruppen sind Serin 270, Serin 275 und Serin 291. Die genauen Positionen
- 25 der Phosphatgruppen in DROPN-10 mit vier oder fünf Phosphatgruppen ist derzeit noch nicht bekannt.

\*\*\* DROPN-29 hat als N-terminale Modifikation eine Pyroglutaminsäure.

**Geeignete Peptide**

- Die Peptide können in posttranslationalen oder chemischen Modifikationsformen vorliegen, was sich u.a. auf ihre Massen und damit die massenspektrometrische Identifizierung und auch auf das Elutionsverhalten bei der Chromatographie, wie z.B. bei Reverse Phase Chromatographie auswirkt. Insbesondere können die Peptide phosphoryliert, glykosyliert, sulfatiert, amidiert, oxidiert oder mit N-terminaler Pyroglutaminsäure-Gruppe usw. in der zu untersuchenden Probe vorliegen.
- 10 Die Peptide werden insbesondere als OPN-Peptide, bzw. DROPN-Peptide angesehen, wenn maximal 30 % ihrer Sequenz von der Sequenz des OPN-Proteins abweicht. Dabei sind Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und N-terminale und/oder C-terminale Verlängerungen zulässig, solange nicht mehr als 30 % Abweichung von der OPN-Proteinsequenz auftritt.
- 15 Es ist davon auszugehen, dass die Konzentrationsänderungen der Markerpeptide (DROPN- und OPN-Peptide) mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Stadium der neurologischen Erkrankung, insbesondere der progredienten, chronisch demenziellen Erkrankung, insbesondere Morbus Alzheimer, korrelieren.
- 20 In Weiterbildung der Erfindung ist daher vorgesehen, die Bestimmung der Markerpeptide auch zur Ermittlung des Schweregrades und des Stadiums der Erkrankung heranzuziehen, insbesondere als Ersatz oder als Ergänzung zur Durchführung einer "Mini-Mental State Examination" (MMSE). In Weiterbildung der Erfindung ist außerdem vorgesehen, die Bestimmung der Markerpeptide zur Ermittlung von Vorstufen neurologischer Erkrankungen, insbesondere von "Mild Cognitive Impairment" (MCI), oder zur Prognose des Verlaufs der Erkrankung heranzuziehen.
- 30 Bei den eventuell verwendeten Kontrollproben kann es sich um eine Poolprobe aus verschiedenen Kontrollen handeln. Auch die zu untersuchende Probe kann eine Poolprobe sein, wobei bei positivem Ergebnis Einzeluntersuchungen angestellt werden.

**Geeignete biologische Proben**

Die biologische Probe kann vorzugsweise (humaner) Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinalflüssigkeit, CSF) sein oder eine Probe wie Serum, Plasma, Urin, Stuhl, Tränenflüssigkeit, Sputum, Synovialflüssigkeit usw. Dies hängt u.a. von der Empfindlichkeit des gewählten Nachweisverfahrens (Massenspektrometrie, ELISA etc.) ab. Serum, Plasma und Urin sind insbesondere daher von Interesse, da dieses Probenmaterial bei Standarduntersuchungen häufig und ohne großen Aufwand bei Patienten gewonnen wird. Auch homogenisierte Gewebeprobe können ggf. verwendet werden.

Daher ist in einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung vorgesehen, das zur Vorbereitung der zu untersuchenden Probe Gewebehomogenate hergestellt werden, z.B. aus menschlichen Gewebeprobe, die im Rahmen von Biopsien erhalten wurden. Diese Gewebe können z.B. mit manuellen Homogenisatoren, mit Ultraschall Homogenisatoren oder mit elektrisch betriebenen Homogenisatoren wie z.B. Ultraturrax zerkleinert werden, und anschließend in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise in sauren, wässrigen Lösungen mit z.B. 0,1 bis 0,2 M Essigsäure für 10 Minuten gekocht werden. Anschließend werden die Extrakte dem jeweiligen Nachweisverfahren, z.B. einer massenspektrometrischen Untersuchung, unterzogen. Die Proben können in der üblichen Weise vorbereitet, z.B. gegebenenfalls verdünnt oder aufkonzentriert, und gelagert werden.

**Verwendung der DROPN-Peptide zur Herstellung von Diagnostika**

Weiterhin umfasst die Erfindung die Verwendung wenigstens eines der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide oder eines OPN-Proteins zur Diagnose von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer, sowie die Verwendung von DROPN-Peptiden zur Gewinnung von Antikörpern oder von anderen Agenzien, welche aufgrund ihrer DROPN-Peptid-spezifischen Bindungseigenschaften zur Entwicklung von Diagnosereagenzien zum Nachweis dieser Erkrankungen geeignet sind. Die Erfindung umfasst auch die Verwendung von DROPN-Peptiden zur Gewinnung von Phagenpartikeln, die spezifisch diese Peptide binden, oder die umgekehrt DROPN-Peptide auf ihre Oberfläche präsentieren und so die

Identifizierung von Bindungspartnern wie z.B. Rezeptoren von OPN-Proteinen oder DROPN-Peptiden ermöglichen.

#### **Nachweismethoden für DROPN-Peptide**

- 5 Im Rahmen der Erfindung können verschiedene Methoden zum Nachweis der DROPN-Peptide verwendet werden. Dazu sind alle Methoden geeignet, die es ermöglichen, DROPN-Peptide spezifisch in einer Probe eines Patienten nachzuweisen. Geeignete Methoden sind unter anderem physikalische Methoden wie z.B. Massenspektrometrie oder Flüssigkeits-Chromatographie, 10 molekularbiologische Methoden wie z.B. Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) oder immunologische Nachweistechiken, wie z.B. „Enzyme linked immunosorbent assays“ (ELISA).

#### **Physikalische Nachweismethoden**

- 15 Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung physikalischer Methoden, welche die erfindungsgemäßen Peptide qualitativ oder quantitativ anzeigen können. Zu diesen Methoden gehören unter anderem Massenspektrometrie, Flüssigkeitschromatographie, Dünnschichtchromatographie, NMR (Nuclear-Magnetic-Resonance) Spektroskopie usw. Dabei werden quantitative 20 Messergebnisse aus einer zu untersuchenden Probe mit den Messwerten, die bei einem Kollektiv an neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, vorzugsweise Morbus Alzheimer, leidenden Patienten und einem Kontrollkollektiv gewonnen wurden, verglichen. Aus diesen Ergebnissen kann das Vorliegen einer neurologischen Erkrankungen, insbesondere einer 25 chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere Morbus Alzheimer und/oder der Schweregrad dieser Erkrankung abgeleitet werden.

- Gemäß bevorzugter Ausführungsform dieser Erfindung werden die Peptide in der Probe vor der identifizierung chromatographisch getrennt, und zwar vorzugsweise mit Reverse Phase Chromatographie, besonders bevorzugt ist eine Trennung der 30 Peptide in der Probe mit hochauflösender Reverse Phase High-Performance-Flüssigchromatografie (RP-HPLC). Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung ist die Durchführung von Fällungsreaktionen zur Fraktionierung der Probe unter Verwendung von Fällungsmitteln wie z.B. Ammoniumsulfat, Polyethylenglykol,

WO 02/090974

20

PCT/DE02/01665

Trichloressigsäure, Aceton, Ethanol usw. Die so gewonnenen Fraktionen werden dann einzeln dem jeweiligen Nachweisverfahren unterzogen, z.B. der massenspektrometrischen Untersuchung. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Flüssigkeitsphasenextraktion. Dazu wird die Probe z.B. mit einem Gemisch aus einem organischen Lösungsmittel wie etwa Polyethylenglykol (PEG) und einer wässrigen Salzlösung gemischt. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften reichern sich dann bestimmte Inhaltsstoffe der Probe in der organischen und andere in der wässrigen Phase an und können so voneinander getrennt und anschließend weiter analysiert werden.

10

**Reverse Phase Chromatographie**

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung umfasst die Verwendung von Reverse Phase Chromatographie, insbesondere einer C18 Reverse Phase Chromatographiesäule unter Verwendung von Laufmitteln bestehend aus Trifluoressigsäure und Acetonitril, zur Trennung von Peptiden in humaner Liquorflüssigkeit. Es werden z.B. jeweils Fraktionen gesammelt, die je 1/100 des verwendeten Volumens an Laufmittel beinhalten. Die so gewonnenen Fraktionen werden mit Hilfe eines Massenspektrometers, vorzugsweise mit Hilfe eines MALDI-Massenspektrometers (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation) unter Verwendung einer Matixlösung, bestehend aus z.B. aus L(-) Fucose und alpha-Cyano-4-hydroxymizinsäure, gelöst in einem Gemisch aus Acetonitril, Wasser, Trifluoressigsäure und Aceton, analysiert und so das Vorliegen bestimmter Massen festgestellt und die Signalintensität quantifiziert. Diese Massen entsprechen den Massen der erfindungsgemäßen Peptide DROPN-1 bis DROPN-31.

25

**Massenspektrometrie**

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung des oder der Peptide mit Hilfe einer massenspektrometrischen Bestimmung, vorzugsweise einer MALDI- (Matrix-assisted-laser-desorption-and-ionisation-) Massenspektrometrie, vorgenommen werden. Dabei umfasst die massenspektrometrische Bestimmung weiter vorzugsweise wenigstens eines der folgenden Massensignale, jeweils berechnet anhand der theoretischen, monoisotopischen Masse des entsprechenden Peptids. Dabei können leichte Abweichungen von der theoretischen, monoisotopischen Masse aufgrund des

30

experimentellen Fehlers und der natürlichen Isotopenverteilung auftreten. Außerdem wird bei MALDI-Massenbestimmungen aufgrund der Messmethodik den Peptiden ein Proton hinzugefügt, wodurch sich die Masse um 1 Da erhöht. Folgende Massen entsprechen den theoretischen, monoisotopischen Massen der von uns identifizierten Peptide, berechnet mit geeigneter Software, hier GPMAW 4.02. Diese theoretischen, monoisotopischen Massen können einzeln, oder in Kombinationen in einer Probe auftreten: DROPN-1 = 2627,2715 / DROPN-2  $\geq$  1009,4716 / DROPN-3 = 4032,7594 / DROPN-4 = 4465,0079 / DROPN-5 = 3718,6368 / DROPN-6 = 1737,8030 / DROPN-7 = 1900,8664 / DROPN-8  $\geq$  956,4087 / DROPN-9  $\geq$  895,4148 / DROPN-10 = 7653,6003 / DROPN-11 = 4662,0953 / DROPN-12 = 2093,9304 / DROPN-13  $\geq$  899,3985 / DROPN-14  $\geq$  1087,4835 / DROPN-15 = 1522,7991 / DROPN-16 = 1635,8832 / DROPN-17 = 1763,9781 / DROPN-18 = 1911,0466 / DROPN-19 = 3222,6521 / DROPN-20 = 3435,7634 / DROPN-21 = 1650,8941 / DROPN-22 = 1797,9625 / DROPN-23 = 3109,5680 / DROPN-24 = 2796,4042 / DROPN-25  $\geq$  1112,5826, DROPN-26  $\geq$  844,3563 / DROPN-27 = 2526,2238 / DROPN-28 = 2528,2031 / DROPN-29 = 3718,6368 / DROPN-30 = 4149,7995 und DROPN-31 = 4036,7154 Dalton. Das Symbol  $\geq$  (ist größer oder gleich) ist hierbei so zu verstehen, dass nicht beliebig größere Massen für die betroffenen DROPN-Peptide möglich sind, sondern lediglich die Massen, die sich aufgrund der möglicherweise zusätzlich an den Enden dieser Peptide befindlichen Aminosäuren ergeben. An den Enden dieser Peptide können nicht beliebige Aminosäuren zusätzlich vorhanden sein, sondern nur solche, die sich aufgrund der Sequenz des OPN-Proteins an dieser Sequenzposition befinden können.

25

**Massenspektrometrische Bestimmung der Sequenz der DROPN-Peptide**

Bei der weiteren praktischen Anwendung dieser Ausführungsform ist eine weitere Absicherung des Nachweisergebnisses dadurch möglich und empfehlenswert, dass die Identität der den Massen entsprechenden Peptide ermittelt wird, wobei ausschließlich Peptidsignale berücksichtigt werden, die von einem OPN-Protein abgeleitet werden können. Diese Absicherung erfolgt über eine Identifizierung der Peptidsignale vorzugsweise mit massenspektrometrischen Verfahren, z.B. einer MS/MS-Analyse [17].

30

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wurden neue, spezifische Peptide von OPN-Proteinen (DROPN-Peptide) identifiziert und in ihrer Bedeutung erkannt. Diese DROPN-Peptide und ihre Abkömmlinge werden hier mit DROPN-1 bis DROPN-31  
5 bezeichnet. Ihre Sequenzen sind im Sequenzprotokoll angegeben. Die DROPN-Peptide DROPN-2, -8, -9, -13, -14, -25 und DROPN-26 können am N- und/oder C-Terminus zusätzliche Aminosäuren entsprechend der korrespondierenden Sequenz des zugehörigen OPN-Proteins beinhalten. Die Erfindung umfasst auch die rekombinant oder synthetisch hergestellten, sowie aus biologischen Proben  
10 isolierten DROPN-Peptide in unmodifizierter, chemisch modifizierter oder posttranslational modifizierter Form. Dabei sind zwei Punktmutationen sowie andere Abweichungen möglich, solange das DROPN-Peptid mindestens 8 Aminosäuren aufweist, die in ihrer Identität und ihrer Position innerhalb der Peptidsequenz mit einem OPN-Protein übereinstimmen.

15

#### **Molekularbiologische Nachweistechiken**

Schließlich umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuren, die zu DROPN-Peptiden korrespondieren, und insbesondere solche, die zu den erfindungsgemäßen DROPN-Peptiden korrespondieren, und deren Verwendung zur indirekten  
20 Bestimmung und Quantifizierung der zugehörigen OPN-Proteine und -Peptide. Darin eingeschlossen sind auch Nukleinsäuren, die z.B. nicht codierende Sequenzen, wie etwa 5'- oder 3'-untranslatierte Bereiche der mRNA darstellen, und Nukleinsäuren, die eine für spezifische Hybridisierungsexperimente ausreichende Sequenzübereinstimmung mit der Nukleinsäuresequenz von OPN aufweisen, und  
25 die daher zum indirekten Nachweis der zugehörigen Proteine, insbesondere der DROPN-Peptide geeignet sind.

Ein Ausführungsbeispiel hierfür umfasst die Gewinnung von Gewebeproben, z.B. von Biopsiepräparaten, von Patienten und die nachfolgende Bestimmung der  
30 Konzentration eines RNA-Transkriptes korrespondierend zum Gen mit der GeneBank Accession No. X13694 oder korrespondierend zu homologen OPN-Varianten. Dabei werden quantitative Messergebnisse (Intensitäten) aus einer zu untersuchenden Probe mit den Messwerten, die bei einem Kollektiv an einer Morbus Alzheimer Erkrankung leidender Patienten und einem Kontrollkollektiv

gewonnen wurden, verglichen. Zur Quantifizierung können Methoden wie z.B. reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), quantitative real-time PCR (ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in situ Hybridisierungen oder Northernblots in einer dem Fachmann bekannten Weise angewendet werden. Aus den Ergebnissen kann das Vorliegen einer chronisch demenziellen Erkrankung, vorzugsweise Morbus Alzheimer und/oder deren Schweregrad abgeleitet werden.

#### **Immunologische Nachweismethoden**

10 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung der DROPN-Peptide oder der OPN-Proteine unter Verwendung eines immunologischen Nachweissystems, vorzugsweise eines ELISAs ("enzyme linked immuno sorbent assay") durchgeführt werden. Dabei erfasst dieser immunologische Nachweis wenigstens ein DROPN-Peptid oder OPN-Protein. Zur Erhöhung der

15 Spezifität kann weiterhin bevorzugt ein sogenannter "Sandwich-ELISA" verwendet werden, bei dem der Nachweis der DROPN-Peptide von der Spezifität von zwei Antikörpern, die unterschiedliche Epitope innerhalb des selben Moleküls erkennen, abhängig ist. Zum Nachweis von DROPN-Peptiden oder OPN-Proteinen können jedoch auch andere ELISA-Systeme, z.B. direkte oder kompetitive ELISA

20 Verwendung finden. Auch weitere, ELISA-ähnliche Nachweistechiken, wie z.B. RIA ("radio immuno assay"), EIA (Enzymimmunoassay), ELI-Spot usw. sind geeignet als immunologische Nachweissysteme. Als Standard für die Quantifizierung können aus biologischen Proben isolierte, rekombinant hergestellte oder chemisch synthetisierte DROPN-Peptide oder OPN-Proteine verwendet werden. Die

25 Identifizierung des oder der DROPN-Peptide kann z.B. allgemein mit Hilfe eines auf das DROPN-Peptid oder OPN-Protein gerichteten Antikörpers, erfolgen. Weitere für solche Nachweise geeignete Methoden sind unter anderem Westernblotting, Immunpräzipitation, Dot-Blots, Plasmonresonanzspektrometrie (BIAcore®-Technologie, Biacore International AB, Uppsala, Schweden), Phagenpartikel, PNAs

30 (Peptide Nucleic Acids), Affinitätsmatrizen (z.B. ABICAP-Technologie, ABION Gesellschaft für Biowissenschaften und Technik mbH, Jülich, Deutschland) usw. Generell sind alle Substanzen/Moleküle als Nachweisagenzien geeignet, die es erlauben, ein spezifisches Nachweissystem aufzubauen, da sie spezifisch ein DROPN-Peptid oder OPN-Protein binden.

**Gewinnung von DROPN-Peptiden und von anti-DROPN-Peptid Antikörpern**

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Gewinnung von DROPN-Peptiden unter Verwendung von rekombinanten Expressionssystemen, Chromatographiemethoden und chemischen Syntheseprotokollen, die dem Fachmann bekannt sind. Die so gewonnenen DROPN-Peptide können unter anderem als Standards zur Quantifizierung der jeweiligen DROPN-Peptide oder als Antigen zur Herstellung von DROPN-Peptid-Antikörpern Verwendung finden. Zu den dem Fachmann bekanntesten und geeigneten Methoden zur Isolierung und Gewinnung von DROPN-Peptiden gehören die rekombinante Expression von Peptiden. Zur Expression der DROPN-Peptide können unter anderem Zellsysteme wie z.B. Bakterien wie *Escherichia coli*, Hefezellen wie *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzellen wie z.B. *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) Zellen, oder Säugerzellen wie "Chinesische Hamster Ovary" (CHO) Zellen verwendet werden. Diese Zellen sind von der "American Tissue Culture Collection" (ATCC) erhältlich. Zur rekombinanten Expression von DROPN-Peptiden werden z.B. Nukleinsäuresequenzen, die für DROPN-Peptide kodieren in Kombination mit geeigneten regulatorischen Nukleinsäuresequenzen wie z.B. Promotoren, antibiotischen Selektionsmarkern usw. mit molekularbiologischen Methoden in einen Expressionsvektor eingefügt. Ein dazu geeigneter Vektor ist z.B. der Vektor pcDNA3.1 von der Firma Invitrogen. Die so gewonnenen DROPN-Peptid Expressionsvektoren können dann in geeignete Zellen, z.B. durch Elektroporation, eingefügt werden. Die so hergestellten DROPN-Peptide können C- oder N-terminal mit heterologen Sequenzen von Peptiden wie Poly-Histidinsequenzen, Hemagglutinin-Epitopen (HA-tag), oder Proteinen wie z.B. Maltosebindenden Proteinen, Glutathion-S-Transferase (GST), oder Proteindomänen wie der GAL-4 DNA-Bindungsdomäne oder der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert sein. Die Herstellung der DROPN-Peptide durch chemische Synthese kann z.B. nach dem Merrifield-Festphasen-Syntheseprotokoll unter Verwendung von Syntheseautomaten, die von verschiedenen Herstellern erhältlich sind, erfolgen.

Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung ist die Isolierung von DROPN-Peptiden aus biologischen Proben oder aus Zellkulturmedien oder Zelllysaten von rekombinanten Expressionssystemen z.B. mit Reverse Phase Chromatographie,

Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Isoelektrischer Fokussierung, usw. oder mit anderen Methoden wie präparativer Immunpräzipitation, Ammoniumsulfatfällung, Extraktion mit organischen Lösungsmitteln usw. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Gewinnung 5 monoklonaler oder polyklonaler Antikörper unter Verwendung von DROPN-Peptiden. Die Gewinnung der Antikörper geschieht in üblicher, dem Fachmann vertrauter Weise. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Herstellung und Gewinnung von DROPN-Peptid spezifischen Antikörpern, eine insbesondere bevorzugte Ausführungsform ist die Herstellung von DROPN-Peptid spezifischen 10 Antikörpern die neo-Epitope erkennen, das heißt Epitope, die nur auf DROPN-Peptiden vorhanden sind, nicht jedoch in einem OPN-Protein. Solche anti-DROPN-Peptid Antikörper ermöglichen den spezifischen immunologischen Nachweis von DROPN-Peptiden in Gegenwart von OPN-Protein. Polyklonale Antikörper können durch Immunisierungen von Versuchstieren wie z.B. Mäusen, Ratten, Kaninchen 15 oder Ziegen hergestellt werden. Monoklonale Antikörper können z.B. durch Immunisierungen von Versuchstieren wie z.B. Mäusen oder Ratten und anschließender Anwendung von Hybridomatechniken oder aber über rekombinante Versuchsansätze wie z.B. über Antikörperbanken wie die HuCAL® -Antikörperbank der Firma MorphoSys, Martinsried, Deutschland, oder andere dem Fachmann 20 bekannte, rekombinante Herstellungsverfahren gewonnen werden. Antikörper können auch in Form von Antikörperfragmente wie z.B. Fab-Fragmente oder Fab2-Fragmente usw. Verwendung finden.

#### **Therapieentwicklung und Überwachung durch DROPN-Peptid Bestimmungen**

25 Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die quantitative oder qualitative Bestimmung der oben genannten DROPN-Peptide oder OPN-Proteine zur Abschätzung der Wirksamkeit einer sich in der Entwicklung befindlichen Therapie gegen neurologische Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzielle Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer. Die Erfindung kann auch zur Identifizierung von 30 geeigneten Patienten für klinische Studien zur Entwicklung von Therapien für diese Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, verwendet werden. Dabei werden quantitative Messergebnisse aus einer zu untersuchenden Probe mit den Messwerten, die bei einem Kontrollkollektiv und einer Gruppe von Patienten gewonnen wurden, verglichen. Aus diesen Ergebnissen kann die Wirksamkeit eines

Therapeutikums, bzw. die Eignung des Patienten für eine klinische Studie, abgeleitet werden. Die Wirksamkeitsprüfung und die Auswahl der richtigen Patienten für Therapien und für klinische Studien ist für eine erfolgreiche Anwendung und Entwicklung eines Therapeutikums von herausragender Bedeutung und bisher steht für Morbus Alzheimer kein klinisch messbarer Parameter zur Verfügung, der dieses zuverlässig ermöglicht [18].

**Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit von OPN-Proteinen, DROPN-Peptiden und von Agenzien, die die Expression und die biologische Verfügbarkeit dieser Substanzen modulieren**

Ein Ausführungsbeispiel hierfür umfasst die Kultivierung von Zelllinien, und ihre Behandlung mit OPN-Proteinen, DROPN-Peptiden oder mit Substanzen, die die Expression von OPN-Protein fördern, oder die Prozessierung von OPN-Protein zu DROPN-Peptiden fördern, wie z.B. Proteasen, die "dibasische Sequenzmotive" erkennen. Dadurch können biologische Eigenschaften von OPN-Proteinen und DROPN-Peptiden im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, ermittelt werden. Auch Fusionsproteine und Fusionspeptide können zur Behandlung der Zelllinien verwendet werden, z.B. Fusionsproteine mit Peptidsequenzen, die einen Transport des Fusionsproteins ins Zellinnere fördern. Beispiele für mögliche Fusionspartner sind HIV-TAT-Sequenzen oder Antennapedia-Sequenzen usw. Ebenso können Zelllinien mit Expressionsvektoren transfiziert werden, die direkt oder indirekt eine Expression von OPN-Proteinen oder DROPN-Peptiden durch die transfizierten Zellen bewirken. Diese Expressionsvektoren können u.a. für DROPN-Peptide oder OPN-Proteine kodieren. Auch gleichzeitige Transfektionen mit verschiedenen DROPN-Peptiden und/oder OPN-Proteinen können durchgeführt werden. Alternativ können geeignete Zelllinien mit anti-OPN-Protein- oder anti-DROPN-Peptid-Antikörpern oder mit Nukleinsäuren, die die Expression von OPN-Proteinen unterdrücken, wie z.B. OPN-Antisense-Nukleinsäuren, OPN-Triplex-Nukleinsäuren oder gegen OPN-mRNA gerichteten Ribozymen, behandelt werden. Insbesondere Zelllinien, die als neurologische Modellsysteme im Zusammenhang mit OPN als geeignet erscheinen, können zu solchen Untersuchungen herangezogen werden. Als read-out Systeme für diese Untersuchungen können unter anderem Tests verwendet werden, die die Proliferationsrate der behandelten Zellen, ihre Stoffwechselaktivität, die

WO 02/090974

27

PCT/DE02/01665

Apoptoserate der Zellen, Änderungen der Zellmorphologie, der Expression von zelleigenen Proteinen oder Reporter genen oder die Freisetzung von zytosolischen Zellbestandteilen als Marker für Zellsterben ermitteln. Als weitere Testsysteme können geeignete Stämme von Versuchstieren, z.B. von Mäusen oder

5 Ratten, die als Modell für neurologische Erkrankungen, insbesondere als Modell für Morbus Alzheimer, gelten, verwendet werden. Diese Versuchstiere können zur Untersuchung der Wirksamkeit von Therapiestrategien die die Modulation der Konzentration von DROPN-Peptiden oder von OPN-Proteinen zum Ziel haben, herangezogen werden. Außerdem können in Versuchstieren auch Proteine und

10 Peptide wie z.B. OPN-Proteine oder DROPN-Peptide untersucht werden, wobei diese Peptide und Proteine unter Umständen so galenisch aufbereitet werden können, dass sie die Blut-Hirn-Schranke und/oder die Blut-Liquor-Schranke besser passieren können. Als galenische Aufbereitungsmethode können unter anderem liposomen-verpackte Proteine und Peptide, Proteine und Peptide kovalent fusioniert

15 oder nicht kovalent assoziiert mit Transportpeptiden, wie z.B. der HIV-TAT-Sequenz usw. verwendet werden. Außerdem können Peptide und Proteine chemisch derart modifiziert werden, dass sie lipophilere Eigenschaften erhalten und daher leichter in Zellen eindringen können. Peptide, die in wässrigen Lösungen nur schwer löslich sind können umgekehrt chemisch derart modifiziert werden, dass sie hydrophiler

20 werden und dann als z.B. intravenös injizierbares Therapeutikum verwendet werden können. Säureresistente Kapseln können verwendet werden, um empfindliche Substanzen, die oral verabreicht werden sollen, im Magen zu schützen.

Read-out Parameter bei Versuchen mit Tiermodellen können die Überlebensdauer

25 der Tiere, ihr Verhalten, ihre Kurzzeitgedächtnisleistung und ihre Lernfähigkeit sein. Ein Beispiel für einen Gedächtnistest, der für Versuchstiere geeignet ist, ist der "Morris water maze test". Als weitere Parameter kann die Bestimmung von Körperfunktion, wie z.B. Bluttests, die Messung von Gehirnströmen, Stoffwechselfests, die Expressionsrate von OPN-Proteinen und DROPN-Peptiden

30 und anderen mit der Erkrankung im Zusammenhang stehenden Proteinen, sowie morphologische und histologische Untersuchungen an Geweben, wie z.B. dem Gehirn herangezogen werden.

WO 02/090974

28

PCT/DE02/01665

**Die Erfindung wird im folgenden anhand von Beispielen näher illustriert. Dabei wird auch Bezug auf die Abbildungen genommen.**

- Abbildung 1: Alignment der DROPN-Peptide mit ihrem dem OPN-Protein  
5
- Abbildung 2: Reverse Phase Chromatographie zur Separation und Anreicherung der DROPN-Peptide aus Liquor cerebrospinalis
- 10 Abbildung 3: Massenspektrometrische Messung (MALDI) am Beispiel von DROPN-10
- Abbildung 4: MALDI als relativ quantifizierende massenspektroskopische Methode  
15
- Abbildung 5: MS/MS-Fragmentspektrum am Beispiel des Peptids DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe.
- Abbildung 6A-C: „Box-Whisker-Plots“ zum quantitativen Vergleich der Konzentrationen von DROPN-5, DROPN-10 und DROPN-20 in Morbus Alzheimer Patienten verglichen mit Kontrollpatienten.  
20
- Abbildung 7: Bestimmung der Konzentration des OPN-Proteins in Liquor Cerebrospinalis unter Verwendung eines „Sandwich-ELISAs“.  
25

Die Abbildung 1 zeigt ein Alignment der erfindungsgemäßen OPN-Peptide mit ihrem dem OPN-Protein. Die theoretischen, monoisotopischen Massen der Peptide, angegeben in Dalton, wurden berechnet mit der Software GPMW 4.02. Es sind:  
30  
 DROPN-1 = 2627,2715 / DROPN-2  $\geq$  1009,4716 / DROPN-3 = 4032,7594 /  
 DROPN-4 = 4465,0079 / DROPN-5 = 3718,6368 / DROPN-6 = 1737,8030 /  
 DROPN-7 = 1900,8664 / DROPN-8  $\geq$  956,4087 / DROPN-9  $\geq$  895,4148 / DROPN-  
 10 = 7653,8003 / DROPN-11 = 4662,0953 / DROPN-12 = 2093,9304 / DROPN-13  $\geq$

899,3985 / DROPN-14  $\geq$  1087,4835 / DROPN-15 = 1522,7991 / DROPN-16 =  
1635,8832 / DROPN-17 = 1763,9781 / DROPN-18 = 1911,0466 / DROPN-19 =  
3222,6521 / DROPN-20 = 3435,7634 / DROPN-21 = 1650,8941 / DROPN-22 =  
1797,9625 / DROPN-23 = 3109,5680 / DROPN-24 = 2796,4042 / DROPN-25  $\geq$   
5 1112,5826 / DROPN-26  $\geq$  844,3563 / DROPN-27 = 2526,2238 / DROPN-28 =  
2528,2031 / DROPN-29 = 3718,6368 / DROPN-30 = 4149,7995 und DROPN-31 =  
4036,7154 Dalton. Die im Massenspektrometer tatsächlich identifizierten Massen  
weichen aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung, sowie einer geringen  
Messungenaugigkeit von maximal 500 ppm von diesen theoretischen,  
10 monoisotopischen Massen ab. Außerdem ist die gemessene Masse aller Peptide  
zusätzlich, aufgrund der verwendeten MALDI-Messmethode um die Masse eines  
Protons (=1 Dalton) erhöht. Zusätzlich konnten für DROPN-10 Peptid-Varianten mit  
1 bis 5 Phosphatgruppen experimentell identifiziert und bestimmt werden. Die dabei  
experimentell bestimmten Massen für DROPN-10 betragen: 7738 / 7818 / 7898 /  
15 7978 und 8058 Dalton, wobei die Masse von DROPN-10 sequenziell jeweils um die  
Masse einer Phosphatgruppe erhöht ist.

Die Abbildung 2 zeigt ein Elutionsprofil einer mit Reverse Phase Chromatographie  
gemäß Beispiel 2, zur Separation und Anreicherung der DROPN-Peptide aus Liquor  
20 cerebrospinalis.

Die Abbildung 3 zeigt ein Spektrum, das durch MALDI-massenspektrometrische  
Messung gemäß Beispiel 3 von DROPN-10 entstanden ist, nach erfolgter Reverse  
Phase Chromatographie von humanem Liquor cerebrospinalis gemäß Beispiel 2.  
25 DROPN-10 entspricht der OPN-Sequenz von Aminosäure 249-314. Abbildung 3A  
zeigt das MALDI-Massenspektrum von DROPN-10 in seiner nicht phosphorylierten  
Form. Der Massen-Peak von DROPN-10 ist durch einen Pfeil markiert. Abbildung  
3B zeigt das MALDI-Massenspektrum einer DROPN-10 Variante, die eine  
Phosphatgruppe enthält. Der Massen-Peak von DROPN-10 + 1x Phosphat ist durch  
30 einen Pfeil markiert.

Die Abbildung 4 zeigt durch MALDI als relativ quantifizierende MS-Methode  
erzeugte Daten. Eine Probe wurde mit unterschiedlichen Mengen verschiedener  
Standard-Peptide versetzt und die Intensität sowohl dieser Standardsignale, als

WO 02/090974

30

PCT/DE02/01665

auch repräsentativer Probensignale ermittelt. Alle Signal-Intensitäten der Standards wurden auf ihre Signalintensität bei einer Konzentration von  $0,64 \mu\text{M}$  ( $= 1$ ) normiert. Jedes Peptid zeigt ein individuelles, typisches Verhältnis von Signalstärke zu Konzentration, was in diesem Diagramm anhand der Steigung der Kurve ablesbar ist.

Die Abbildung 5 zeigt ein MS/MS-Fragmentspektrum gemäß Beispiel 4 des erfindungsgemäßen Peptids DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe.

Obere Spur: Rohdaten der Messung.  
10 Untere Spur: Konvertiertes, dekonvolviertes Massenspektrum von DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe.  
Das Peak-Muster ist charakteristisch für DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe. DROPN-10 entspricht der OPN-Sequenz von Aminosäure 249-314.

15 Die Abbildung 6 zeigt „Box-Whisker-Plots“ zum quantitativen Vergleich der Konzentrationen von DROPN-5, DROPN-10 und DROPN-20 in Morbus Alzheimer Patienten verglichen mit Kontrollpatienten, wobei für DROPN-10 Box-Whisker-Plots für das nicht phosphorylierte, für das einfach, zweifach, dreifach und vierfach phosphorylierte Peptid gezeigt sind. Die Abbildungen zeigen in Form von „Box-Whisker-Plots“ einen Vergleich der integrierten MALDI-massenspektrometrischen  
20 Signalintensitäten.

Die Abbildung 7 zeigt die Messergebnisse für die Konzentrationen des OPN-Proteins in Liquor cerebrospinalis, bestimmt mit einem "Sandwich-ELISA",  
25 dargestellt als Boxplot. Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proben von Patienten mit Morbus Alzheimer, der mittlere Teil der Abbildung zeigt die Ergebnisse mit Proben von Patienten mit vaskulärer Demenz und der linke Teil der Abbildung zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe.

**Beispiel 1: Gewinnung von Liquor cerebrospinalis zur Bestimmung von DROPN-Peptiden**

Liquor oder Liquor cerebrospinalis (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) ist die in den vier Hirnventrikeln und im Subarachnoidalraum enthaltene Flüssigkeit, die vor allem in den Plexus choroidei der Seitenventrikel gebildet wird. Die Entnahme von Liquor cerebrospinalis erfolgt meist durch Lumbalpunktion, seltener durch Subokzipitalpunktion oder Ventrikelpunktion. Bei der Lumbalpunktion (Spinalpunktion) zur Entnahme von Liquor cerebrospinalis wird bei der Punktion der spinale Subarachnoidalraum zwischen dem 3. und 4. oder dem 4. und 5. Lendenwirbeldornfortsatz mit einer langen Hohlnadel punktiert und so Liquor gewonnen. Anschließend wird die Probe 10 Minuten bei 2000x g zentrifugiert und der Überstand bei minus 80°C gelagert.

**15 Beispiel 2. Trennung von Peptiden in Liquor cerebrospinalis (CSF) zur massenspektrometrischen Messung von DROPN-Peptiden**

Zum massenspektrometrischen Nachweis von OPN-Peptiden in CSF ist in diesem Beispiel eine Trennung der peptidischen Inhaltsstoffe notwendig. Diese Probenvorbehandlung dient der Anreicherung der erfindungsgemäßen Peptide und zur Abtrennung von Komponenten, die die Messung stören können. Als Trennverfahren wird eine Reverse Phase Chromatographie durchgeführt. Hierbei eignen sich verschiedene RP-Chromatographie-Harze und Eluationsmittel gleichermaßen. Im Folgenden ist beispielhaft die Trennung von OPN-Peptiden unter Verwendung einer C18 Reverse Phase Chromatographiesäule mit der Größe 4 mm x 250 mm der Firma Vydac. Es wurden Laufmittel folgender Zusammensetzung verwendet: Laufmittel A: 0,06 % (v/v) Trifluoressigsäure, Laufmittel B: 0,05 % (v/v) Trifluoressigsäure, 80 % (v/v) Acetonitril. Die Chromatographie erfolgte bei 33 °C unter Verwendung einer HP-ChemStation 1100 der Firma Agilent Technologies mit einer Flusszelle Micro der Firma Agilent Technologies. Als Probe wurde humaner Liquor cerebrospinalis verwendet. 440 µl Liquor wurden mit Wasser auf 1650 µl verdünnt, der pH auf 2-3 eingestellt, die Probe für 10 Minuten bei 18000x g zentrifugiert und schließlich 1500 µl der so vorbereiteten Probe auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Die Chromatographiebedingungen waren wie

folgt: 5 % Laufmittel B zum Zeitpunkt 0 min., vom Zeitpunkt 1 bis 45 min kontinuierliche Steigerung der Laufmittel B Konzentration auf 50 %, von Zeitpunkt 45 bis 49 min kontinuierliche Steigerung der Laufmittel B Konzentration auf 100 % und anschließend bis zum Zeitpunkt 53 min konstant 100 % Puffer B. 10 Minuten nach Beginn der Chromatographie wird mit dem Sammeln von 96 Fraktionen zu je 0,5 ml begonnen. Das Chromatogramm einer Liquor cerebrospinalis Probe, hergestellt unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen, ist in Abbildung 2 dargestellt.

10 **Beispiel 3: Ermittlung der Massen von Peptiden mit Hilfe von MALDI-Massenspektrometrie**

Zur Massenanalyse werden typische Positiv-Ionen-Spektren von Peptiden in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Matrix- unterstützte Laserdesorptions-Ionisation) erstellt. Geeignete MALDI-TOF-Massenspektrometer werden von PerSeptive Biosystems Framingham (Voyager-DE, Voyager-DE PRO oder Voyager-DE STR) oder von Bruker Daltonik Bremen (BIFLEX) hergestellt. Zur Präparation der Proben werden sie mit einer Matrixsubstanz vermischt, die typischerweise aus einer organischen Säure besteht. Typische Matrix-Substanzen, die sich für Peptide eignen, sind die 3,5-Dimethoxy-4-hydroxizimtsäure, die  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxizimtsäure und die 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Zur Messung der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide wird ein lyophilisiertes, nach Reverse Phase Chromatographie gewonnenes Äquivalent entsprechend 500  $\mu$ l humanem Liquor cerebrospinalis, verwendet. Die chromatographierte Probe wird in 15  $\mu$ l einer Matrix-Lösung gelöst. Diese Matrix-Lösung enthält z.B. 10 g/l  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxizimtsäure und 10 g/l L(-)-Fucose gelöst in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Acetonitril, Wasser, Trifluoressigsäure und Aceton im Volumenverhältnis 49:49:1:1. Von dieser Lösung werden 0,3  $\mu$ l auf eine MALDI-Trägerplatte transferiert und die getrocknete Probe im MALDI-Massenspektrometer Voyager-DE STR von PerSeptive Biosystems analysiert. Die Messung erfolgt im "Linear Mode" mit "Delayed Extraction"™. Ein Beispiel für eine Messung eines der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide zeigt Abbildung 3.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann zur Quantifizierung von Peptiden wie z.B. der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide eingesetzt werden, wenn diese Peptide in einer Konzentration vorliegen, die sich im dynamischen Messbereich des Massenspektrometers befindet, wodurch Detektorsättigung vermieden wird. Dieses ist für die Messung der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide in Liquor cerebrosinalis bei einer Liquor-Äquivalentkonzentration von 33,3 µl pro µl Matrixlösung der Fall. Für jedes Peptid gibt es ein spezifisches Verhältnis zwischen Messsignal und Konzentration, was bedeutet, dass die MALDI-Massenspektrometrie vorzugsweise zur relativen Quantifizierung von Peptiden herangezogen werden kann. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4 dargestellt. Wird eine Probe mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Standard-Peptide versetzt, so kann die Intensität sowohl dieser Standardsignale, als auch der Probensignale ermittelt werden. Beispielhaft zeigt Abbildung 4 eine MALDI-Messung als relativ quantifizierende MS-Methode. Alle Signal-Intensitäten der Standards wurden auf ihre Signalintensität bei einer Konzentration von 0,64 µM (= 1) normiert. Jedes Peptid zeigt ein individuelles, typisches Verhältnis von Signalstärke zu Konzentration, was anhand der Steigung der Kurve ablesbar ist.

#### Beispiel 4: Massenspektrometrische Identifizierung von DROPN-Peptiden

20

Zur Quantifizierung der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide muss sichergestellt werden, dass es sich bei den zu analysierenden Massensignalen von Peptiden in den Fraktionen, gewonnen durch Reverse Phase Chromatographie von Liquor cerebrosinalis, gemäß Beispiel 2, tatsächlich um die erfindungsgemäßen DROPN-Peptide handelt.

25

Die Identifikation der erfindungsgemäßen Peptide, in diesen Fraktionen erfolgt z.B. mit nanoSpray-MS/MS [17]. Dabei wird ein DROPN-Peptid-Ion im Massenspektrometer anhand seines spezifischen m/z (Masse/Ladung) Wertes in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise im Massenspektrometer selektiert. Dieses selektierte Ion wird anschließend durch Zuführung von Kollisionsenergie mit einem Stoßgas, z.B. Helium oder Stickstoff, fragmentiert und die resultierenden DROPN-Peptid Bruchstücke im Massenspektrometer in einer integrierten Analyseneinheit detektiert und korrespondierende m/z-Werte bestimmt

30

(Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie) [19]. Das Fragmentierungsverhalten von Peptiden ermöglicht bei einer Massengenauigkeit von z.B. 50ppm eine eindeutige Identifizierung der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide unter Verwendung von computergestützten Suchverfahren [20] in Sequenzdatenbanken, in die die Sequenz eines OPN-Proteins eingetragen wurde. In diesem speziellen Fall erfolgte die massenspektrometrische Analyse mit einem Quadrupol-TOF-Instrument, Modell "QStar-Pulsar" der Firma Applied Biosystems-Sciex, USA. Beispielhafte MS/MS Fragmentspektren sind in Abbildung 5 gezeigt.

10 **Beispiel 5: Massenspektrometrische Quantifizierung von DROPN-Peptiden zum Vergleich ihrer relativen Konzentration in Kontrollproben verglichen mit Patientenproben**

Für 222 klinische Proben, d.h. 82 Kontrollproben und 130 Proben von Patienten, die an Morbus Alzheimer erkrankt sind, wurde nach einer Probenvorbereitung gemäß Beispiel 1 und 2 eine nachgeschaltete MALDI-Messung der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide gemäß Beispiel 3 durchgeführt. Exemplarische MALDI-Signalintensitäten sind in Form von "Box-Whisker-Plots" in den Abbildungen 6A bis 6C visualisiert. Die in Abbildung 6 dargestellten "Box-Whisker-Plots" beruhen auf Messwerten, die jeweils anhand von 29 bis 45 Proben von Morbus Alzheimer Patienten, bzw. 13 bis 44 Kontrollproben je Experiment durchgeführt wurden. Insgesamt wurden 4 Experimente durchgeführt. Die dargestellten "Box-Whisker-Plots" ermöglichen den Vergleich der integrierten MALDI-massenspektrometrischen Signalintensitäten verschiedener DROPN-Peptide in Kontrollen, mit den MALDI-Signalintensitäten in Proben von Morbus Alzheimer Patienten. Dabei umfasst die "Box", d.h. die Säulen in den Diagrammen in den Abbildungen 6A bis 6C jeweils den Bereich der MALDI-Signalintensitäten, in dem sich 50 % der jeweiligen MALDI-Signalintensitäten befinden, die von der "Box" ausgehenden nach oben und nach unten weisenden Linien ("Whisker") geben den Bereich an, in dem sich jeweils die 25 % der Messwerte befinden, die die höchsten Signalintensitäten aufweisen (oberes Quartil), bzw. in dem sich die 25 % der Messwerte befinden, die die niedrigsten Signalintensitäten aufweisen (unteres Quartil). Die durchgezogene Linie in den Säulen gibt den Medianwert und die gestrichelte Linie in den Säulen gibt den Mittelwert an.

**Beispiel 6: Quantifizierung des OPN-Proteins mit einem "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) in humanem Liquor Cerebrospinalis von Patienten- und Kontrollproben**

20 Liquor Cerebrospinalis Proben von an progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankungen leidenden Patienten und 12 Proben von Kontrollpersonen wurden 1:50 mit Inkubationspuffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 % Rinder-Serum-Albumin, 0.05 % Tween 20) verdünnt und 100  $\mu\text{l}$  der so verdünnten Proben in Doppelwerten in ELISA-Platten gegeben, die mit dem Anti-Human-OPN Antikörper O17 (Kaninchen Immunglobulin G) beschichtet waren, und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach 7-maligen Waschen mit je 200 $\mu\text{l}$  Waschpuffer (0.05 % Tween 20 in Phosphatpuffer) wurden 100  $\mu\text{l}$  je Kavität des sekundären Antikörpers, der mit dem Enzym Meretlichperoxidase kovalent gekoppelt ist (Klon 10A16, monoklonaler Maus Immunglobulin G Antikörper) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Inkubationspuffer für 5,5 h bei 4°C inkubiert, anschließend erneut 9 mal mit Waschpuffer gewaschen und als Substrat eine Lösung von 0,2 mg/ml Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) in Substratpuffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM Zitronensäure, pH 5,0) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung (0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) je Kavität wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und anschließend die Absorption bei 450 nm in einem Spektrophotometer der Firma TECAN, Modell SUNRISE gemessen. Eine Standardreihe bekannter Konzentrationen, hergestellt mit rekombinantem OPN wurde parallel in dem ELISA bestimmt und zur Quantifizierung herangezogen. Alle für den ELISA verwendeten Reagenzien wurden von der Firma IBL Hamburg bezogen. Die anhand der bekannten Konzentrationen der Standards berechneten OPN-Konzentrationen in den Liquor Cerebrospinalis Proben sind in Form von Box-Plots in Abbildung 7 dargestellt. Jede Box umschließt 50% der Datenpunkte mit dem statistischen Medianwert als Mittellinie. Die obere und untere Linie der Box geben die Limits für  $\pm 25\%$  der Datenpopulation an. Die Linie oberhalb des oberen Kästchens wird als "Upper Quartile UQ", die untere Linie des unteren Kästchens als "Lower Quartile LQ" bezeichnet. Der Interquartilabstand "Interquartile Distance (IQD)" gibt den Abstand von unterer und oberer Quartile an. Die Linien, die

WO 02/090974

36

PCT/DE02/01665

sich oben und unten an die Box anschließen geben den Abstand bis zum Minimalwert, bzw. Maximalwert an. Hiervon ausgenommen werden Datenpunkte, die als Ausreißer erkannt werden. Das ist der Fall, wenn der Wert eines Datenpunktes  $W > UQ + 1.5 * IQD$  oder  $W < LQ - 1.5 * IQD$ .

5

Die Überschriften in diesem Dokument sind lediglich zur Strukturierung des Textes bestimmt. Sie sind nicht dazu bestimmt, die beschriebenen Sachverhalte zu limitieren oder ein zu schränken. Alle Beispiele sollen den Erfindungsgedanken näher charakterisieren, sollen jedoch den Äquivalenzbereich der Erfindung nicht eingrenzen.

10

**Literatur**

1. Clark, C.M., L. Sheppard, G.G. Fillenbaum, D. Galasko, J.C. Morris, E. Koss, R. Mohs, and A. Heyman. 1999. Variability in annual Mini-Mental State Examination score in patients with probable Alzheimer disease: a clinical perspective of data from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Arch Neurol.* 56:857-62.
2. Ikeda, T., Y. Nagai, A. Yamaguchi, S. Yokose, and S. Yoshiki. 1995. Age-related reduction in bone matrix protein mRNA expression in rat bone tissues: application of histomorphometry to in situ hybridization. *Bone.* 16:17-23.
3. McKee, M.D., A. Nanci, W.J. Landis, Y. Gotoh, L.C. Gerstenfeld, and M.J. Glimcher. 1990. Developmental appearance and ultrastructural immunolocalization of a major 66 kDa phosphoprotein in embryonic and post-natal chicken bone. *Anat Rec.* 228:77-92.
4. Weber, G.F., S. Ashkar, M.J. Glimcher, and H. Cantor. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science.* 271:509-12.
5. Weber, G.F., and H. Cantor. 1996. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:241-8.
6. Gunnarsen, J.M., V. Spirkoska, P.E. Smith, R.A. Danks, and S.S. Tan. 2000. Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression. *Glia.* 32:146-54.
7. Sørensen, E.S., P. Hojrup, and T.E. Petersen. 1995. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci.* 4:2040-9.
8. Nagata, T., R. Todescan, H.A. Goldberg, Q. Zhang, and J. Sodek. 1989. Sulphation of secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 165:234-40.
9. Liang, C.T., J. Barnes, J.G. Seedor, H.A. Quartuccio, M. Bolander, J.J. Jeffrey, and G.A. Rodan. 1992. Impaired bone activity in aged rats: alterations at the cellular and molecular levels. *Bone.* 13:435-41.
10. Tanaka, H., R. Quarto, S. Williams, J. Barnes, and C.T. Liang. 1994. In vivo and in vitro effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on femoral mRNA expression in old rats. *Bone.* 15:647-53.

11. Kwon, H.M., B.K. Hong, T.S. Kang, K. Kwon, H.K. Kim, Y. Jang, D. Choi, H.Y. Park, S.M. Kang, S.Y. Cho, and H.S. Kim. 2000. Expression of osteopontin in calcified coronary atherosclerotic plaques. *J Korean Med Sci.* 15:485-93.
- 5 12. Ek-Rylander, B., M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard, and G. Andersson. 1994. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 269:14853-6.
- 10 13. Hunter, G.K., C.L. Kyle, and H.A. Goldberg. 1994. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 300:723-8.
14. Wang, X., C. Loudon, T.L. Yue, J.A. Ellison, F.C. Barone, H.A. Solleveld, and G.Z. Feuerstein. 1998. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci.* 18:2075-83.
- 15 15. Liaw, L., D.E. Birk, C.B. Ballas, J.S. Whitsitt, J.M. Davidson, and B.L. Hogan. 1998. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest.* 101:1468-78.
16. Ellison, J.A., J.J. Velier, P. Spera, Z.L. Jonak, X. Wang, F.C. Barone, and G.Z. Feuerstein. 1998. Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke.* 29:1698-706; discussion 1707.
- 20 17. Wilm, M., and M. Mann. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 68:1-8.
18. Engelborghs, S., and P.P. De Deyn. 2001. Biological and genetic markers of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Med Okayama.* 55:55-63.
- 25 19. Papayannopoulos, I.A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev.* 49-73.
20. Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, and J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 20:3551-67.
- 30

**Patentansprüche**

- 5 1. Verfahren zum Nachweis einer progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine solche Erkrankung durch Identifizierung wenigstens eines Markerpeptids in einer biologischen Probe eines Individuums, wobei das Markerpeptid ein Peptid ist, welches von der Sequenz mit der Gene Bank Accession No. X13694 oder einer hierzu homologen Sequenz abgeleitet ist.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Peptids, verglichen mit der Konzentration des gleichen Peptids in einer Kontrollprobe, wobei
- 15 a) eine für das jeweilige Markerpeptid spezifische Konzentrationsänderung in der Probe relativ zu einer Kontrollprobe festgestellt wird, und
- b) eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der unter b) genannten Weise als positives Nachweisergebnis für die chronisch-demenzielle Erkrankung gewertet wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid
- a) ein DROPN-Peptid ist, oder
- b) ein Peptid entsprechend der Accession No. X13694 ist, oder
- 25 c) ein Abkömmling eines natürlich vorkommenden Alles der unter a) oder b) genannten Peptide ist, oder
- d) eine DROPN-Mutante ist, wobei die DROPN-Mutante vorzugsweise in maximal 2, Aminosäuren von der entsprechenden nicht mutierten DROPN-Sequenz abweicht, oder
- 30 e) eine Mutante einer der unter b) oder c) genannten Peptide ist, wobei die Aminosäuresequenz maximal 30 % von den unter b) oder c) genannten Aminosäuresequenz abweicht, oder
- f) ein chemisch modifiziertes, oder posttranslational modifiziertes Peptid entsprechend a) bis e) ist

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es in Kombination mit anderen Diagnoseverfahren zur Erhöhung von deren Sensitivität und/oder Spezifität durchgeführt wird.
- 5
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die progrediente, chronisch-demenzielle Erkrankung Morbus Alzheimer oder eine verwandte neurologische Erkrankung, insbesondere Lewy-Body Demenz oder vaskuläre Demenz ist.
- 10
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein identifiziertes DROPN-Peptid ausgewählt wird, wobei das Peptid in nicht modifizierter Form, in chemisch modifizierter Form oder mit posttranslationalen Modifikationen, vorzugsweise als phosphoryliertes Peptid, oder mit einer N-terminalen Pyroglutaminsäure-Gruppe vorliegt.
- 15
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptid-Konzentration für einen positiven Nachweis der Erkrankung für jedes der Peptide in spezifischer Richtung relativ zur Konzentration des jeweiligen Peptides in einer Kontrollprobe erhöht oder erniedrigt ist.
- 20
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Bestimmung der Schwere der Erkrankung herangezogen wird, insbesondere als Ersatz oder als Ergänzung zur Durchführung einer "Mini-Mental State Examination" (MMSE), oder zur Diagnose von Vorstufen neurologischer Erkrankungen, insbesondere von "mild cognitive impairment" (MCI), oder zur Prognose des Verlaufs der Erkrankung.
- 25
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe Liquor cerebrospinalis, Serum, Plasma, Urin, Synovialflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Tränenflüssigkeit oder ein Gewebehomogenat ist.
- 30

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung des oder der Peptide mit Hilfe einer massenspektrometrischen Bestimmung, vorzugsweise einer MALDI (matrix-assisted laser desorption and ionisation) Massenspektrometrie, vorgenommen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung die massenspektrometrische Bestimmung wenigstens einen der theoretischen, monoisotopischen Massenpeaks von 2627,2715 /  $\geq$  1009,4716 / 4032,7594 / 4465,0079 / 3718,6368 / 1737,8030 / 1900,8664 /  $\geq$  956,4087 /  $\geq$  895,4148 / 7653,6003 / 4662,0953 / 2093,9304 /  $\geq$  899,3985 /  $\geq$  1087,4835 / 1522,7991 / 1635,8832 / 1763,9781 / 1911,0466 / 3222,6521 / 3435,7634 / 1650,8941 / 1797,9625 / 3109,5680 / 2796,4042 /  $\geq$  1112,5826 /  $\geq$  844,3563 / 2526,2238 / 2528,2031 oder von 3718,6368 Dalton und/oder einen der experimentell bestimmten Massen von 7738 / 7818 / 7898 / 7978 und 8058 Dalton umfasst.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Peptide mit Hilfe eines immunologischen, molekularbiologischen, physikalischen oder chemischen Tests vorgenommen wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der immunologische Test ein ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), ein Radioimmunoassay oder ein Westernblot ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung des oder der Peptide mit Hilfe eines auf ein erfindungsgemäß verwendetes Peptid gerichteten Antikörpers, Antikörperfragments, Phagenpartikels, PNAs oder einer Affinitätsmatrize geschieht.

- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe vor der Identifizierung chromatografisch fraktioniert wird, vorzugsweise mit Reverse Phase Chromatographie, weiter vorzugsweise mit hochauflösender Reverse Phase Chromatographie.
- 10 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe vor der Identifizierung durch Fällungsreaktionen oder Flüssigphasentrennungen fraktioniert wird.
- 15 17. Ein Peptid, dass  
a) ein DROPN-Peptid ist, oder  
b) ein DROPN-Abkömmling eines natürlich vorkommenden OPN-Proteins ist, insbesondere ein Abkömmling von X13694, oder  
c) ein DROPN-Abkömmling eines OPN-Allels ist, oder  
d) eine DROPN-Mutante ist, wobei die DROPN-Mutante vorzugsweise in maximal 2, Aminosäuren von der entsprechenden nicht mutierten DROPN-Sequenz abweicht, oder  
20 e) ein chemisch, oder postranslational modifiziertes Peptid entsprechend a) bis d) ist
- 25 18. Verwendung wenigstens eines der DROPN-Peptide nach Anspruch 17 zur Gewinnung von Antikörpern und/oder zur Entwicklung von Diagnosereagentien zum Nachweis neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer
- 30 19. Antikörper, die die DROPN-Peptide nach Anspruch 17 binden.
20. Verwendung von Antikörpern gegen Osteopontin oder von Antikörpern nach Anspruch 19 zur Diagnose neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer

21. Verwendung von Nucleinsäuren, die zu DROPN-Peptiden oder zu OPN-Proteinen korrespondieren zur indirekten Bestimmung und/oder Quantifizierung der zugehörigen Proteine und Peptide.
- 5 22. Verwendung eines Verfahrens entsprechend Anspruch 21, bei dem der Nachweis der OPN-Nucleinsäuren unter Verwendung von Northernblots, von Reverse Transkriptase PCR oder von quantitativer PCR erfolgt.
- 10 23. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, 18, oder 20 bis 22, zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Therapie für eine neurologische Erkrankung, insbesondere bei einer progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere bei Morbus Alzheimer.
- 15 24. Verwendung eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 bis 16 oder gemäß Anspruch 20 bis 22 zur Stratifizierung von Patienten die für Therapien oder klinische Studien neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer geeignet sind.
- 20 25. Nucleinsäuren, die zu DROPN-Peptiden korrespondieren.
26. Nucleinsäuren, die als OPN-spezifische Antisense-Nucleinsäuren oder als OPN-spezifische Ribozyme, oder als OPN-spezifische Triplex-Nucleinsäuren geeignet sind.
- 25 27. Agonisten oder Antagonisten der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten OPN-Peptide.
- 30 28. Peptide gemäß den in dem Verfahren nach Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptiden, oder Stoffe gemäß Anspruch 25 bis 27 wobei diese Peptide, Nucleinsäuren, Agonisten und Antagonisten in einer Art und Weise galenisch aufbereitet oder chemisch oder biologisch modifiziert sind, dass sie die Blut-Hirn-Schranke und/oder die Blut-Liquor-Schranke passieren können.

- 5 29. Peptide gemäß den in dem Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptiden, oder Stoffe gemäß Anspruch 25 bis 27, wobei diese Stoffe in einer Art und Weise galenisch aufbereitet oder chemisch oder biologisch modifiziert sind, dass sie für spezielle Applikationswege optimiert sind, insbesondere für die Gabe in den Blutkreislauf, den Gastrointestinaltrakt, den Urogenitaltrakt, das lymphatische System, in den Subarachnoidalraum, zur Inhalation oder zur direkten Injektion in Gewebe wie z.B. Muskelgewebe, Fettgewebe, Gehirn usw.
- 10 30. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder der Nukleinsäuren, Agonisten oder Antagonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 als Arzneimittel oder Arzneimittel-Wirkstoff.
- 15 31. Verwendung von wenigstens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder von Nukleinsäuren, Antagonisten oder Agonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
- 20 32. Verwendung wenigstens einer Substanz, die die Expression von OPN-Proteinen moduliert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
- 25 33. Verwendung einer Substanz, die wenigstens an eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide bindet, insbesondere von Antikörpern, Antikörperfragmenten, PNAs oder Affinitätsmatrizen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
- 30 34. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder der Nukleinsäuren, Antagonisten oder Agonisten gemäß

Anspruch 25 bis 27 zur Therapie von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer.

- 5 35. Verfahren zur therapeutischen Modulation der Konzentration von mindestens einem der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder von Nukleinsäuren gemäß Anspruch 25 in einem Patienten mit einer neurologischen Erkrankung, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer.
- 10 36. Verfahren entsprechend Anspruch 35, bei dem eine Verminderung der Konzentrationen an OPN-Peptiden DROPN-Peptiden oder OPN-Nukleinsäuren angestrebt wird.
- 15 37. Verfahren entsprechend Anspruch 35, bei dem eine Erhöhung der Konzentrationen an OPN-Proteinen, DROPN-Peptiden oder OPN-Nukleinsäuren angestrebt wird.
- 20 38. Verfahren entsprechend Anspruch 36, bei dem einem Patienten
- a) Antikörper, die gegen OPN-Proteine oder DROPN-Peptide gerichtet sind, verabreicht werden, oder
  - b) Antisense-Nukleinsäuren, Triplex-Nukleinsäuren oder Ribozyme verabreicht werden um die Expression von OPN-Proteinen oder DROPN-Peptiden zu vermindern, oder
  - 25 c) Substanzen, die die Prozessierung von OPN-Proteinen inhibieren, verabreicht werden, oder
  - d) Antagonisten der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten OPN-Peptide verabreicht werden
- 30 39. Verfahren entsprechend Anspruch 37, bei dem einem Patienten
- a) OPN-Proteine oder DROPN-Peptide verabreicht werden, oder
  - b) Nukleinsäuren verabreicht werden, die für OPN-Proteine oder DROPN-Peptide kodieren, oder

- c) Substanzen verabreicht werden, die die Prozessierung von OPN-Proteinen fördern, oder
  - d) Agonisten der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten OPN-Peptide verabreicht werden
- 5
40. Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die in der Lage sind die Expression mindestens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide zu vermindern oder zu verstärken.
- 10
41. Screeningverfahren zur Identifizierung von Rezeptoren, oder Inhibitoren die mindestens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide binden.
42. Screeningverfahren zur Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten, mindestens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide.

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

1/10

OPN-Protein 1 MRIAVICFLIGITCAIFVKQADSGSSEKQLYNKYPDAVATWLNIP  
 DROFN-1 .....VKQADSGSSEKQLYNKYPDAVAT.....  
 DROFN-27 .....VKQADSGSSEKQLYNKYPDAVA.....  
 DROFN-28 .....KQADSGSSEKQLYNKYPDAVAT.....  
 DROFN-2 .....r1-SEKQLYN-r2.....

OPN-Protein 47 DPSQKQNLIAFQNAVSSSEENDFKQETLPSKSNESHDMDEDDDDHVDVDSQSDSIDSNDSDDYDD

OPN-Protein 114 TDDSHQSDSHSHSDESDLVTDFTDLDLPAEVEFTFVFTVYVYDGRGDSVYVYGLRSKSKKFRPPDIQ

OPN-Protein 181 YPDAIWDITSHMSEBELNGAYKATPYAQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQDDQSAETHSHKQSRLYK  
 DROFN-3 .....AQLNAPSDWDSRGKDSYETSQDDQSAETHSHKQS.....  
 DROFN-4 .....AQLNAPSDWDSRGKDSYETSQDDQSAETHSHKQSRLY.....  
 DROFN-29 .....QDLNAPSDWDSRGKDSYETSQDDQSAETHSHKQS.....  
 DROFN-5 .....LNAPSDWDSRGKDSYETSQDDQSAETHSHKQS.....  
 DROFN-6 .....DQSAETHSHKQSRLL.....  
 DROFN-7 .....DDQSAETHSHKQSRLL.....  
 DROFN-8 .....r3-KDSYETSQ-r4.....  
 DROFN-9 .....r5-SAEETHSHK-r6.....

Abbildung 1A:

OPN-Protein 248 KKANDESNEHSDVIDSQELSKVSRPFHSHEDMLVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-10 .KANDESNEHSDVIDSQELSKVSRPFHSHEDMLVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-11 .KANDESNEHSDVIDSQELSKVSRPFHSHEDMLVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-30 ...NDESNEHSDVIDSQELSKVSRPFHSHEDMLVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-31 ...NDESNEHSDVIDSQELSKVSRPFHSHEDMLVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-12 ...NDESNEHSDVIDSQELSKVSRPFHSHEDMLVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-13 ...r7-SNEHSDVI-r8...  
 DROFN-14 ...r9-REFSHEF-r10...  
 DROFN-15 ...LVVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-16 ...LVVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-17 ...LVVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-18 ...LVVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-19 ...LVVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-20 ...LVVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-21 ...VVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-22 ...VVDPKSKEDKHLK...  
 DROFN-23 ...VVDPKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-24 ...PKSKEDKHLKPRISHELDASSEVNV  
 DROFN-25 ...r11-KSKEDKH-r12...  
 DROFN-26 ...r13-SHELDAS-r14...

Abbildung 1B:

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

3/10

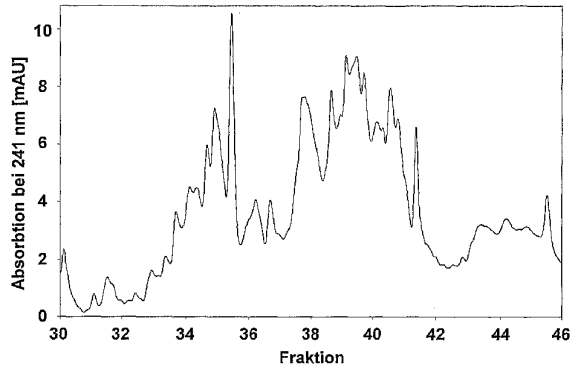


Abbildung 2:

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

4/10

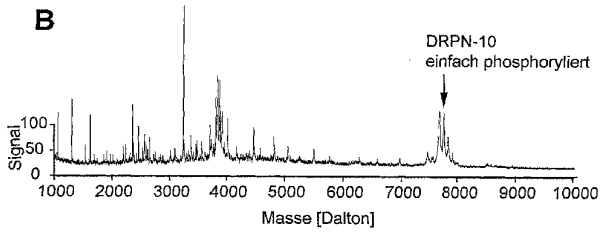
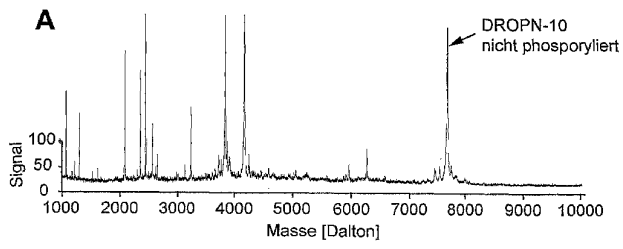
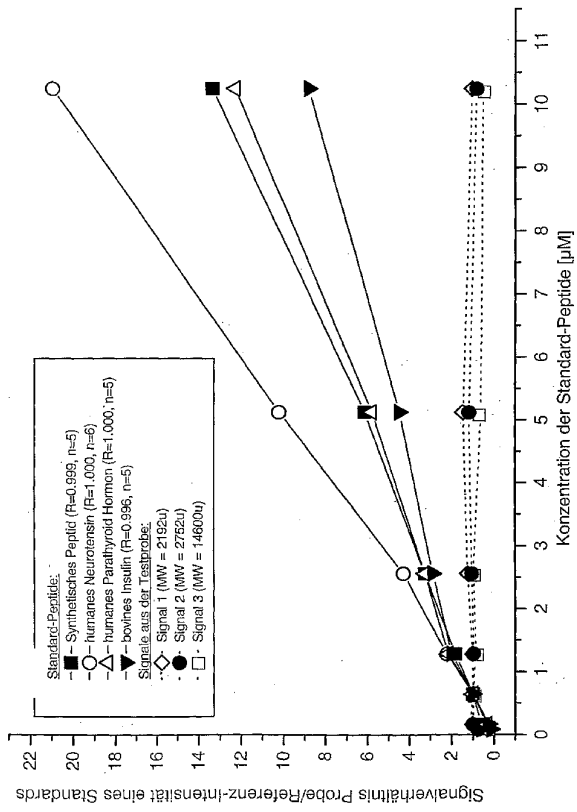


Abbildung 3:



WO 02/090974

PCT/DE02/01665

6/10

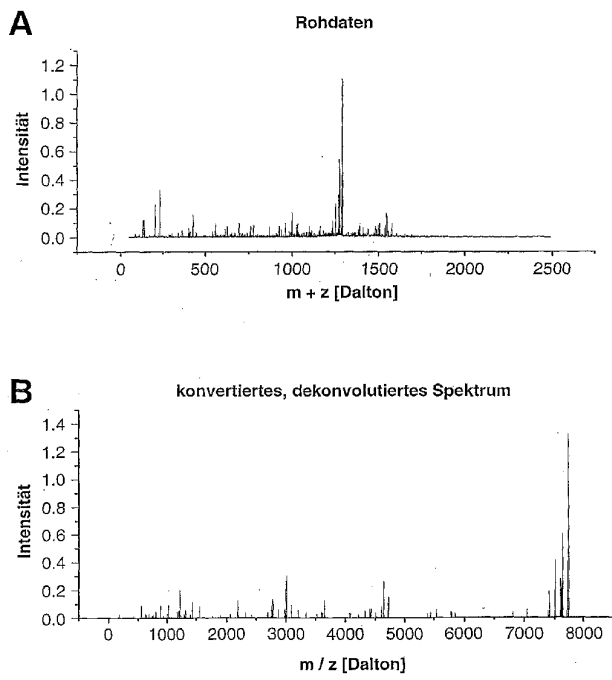


Abbildung 5:

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

7/10

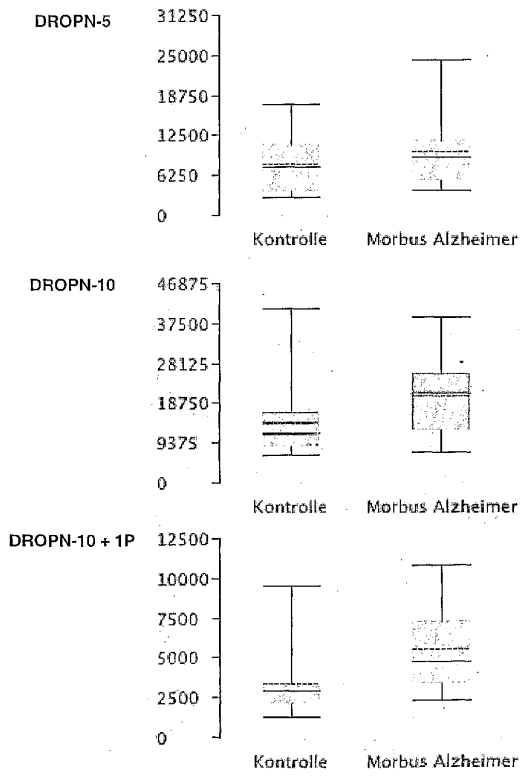


Abbildung 6A:

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

8/10

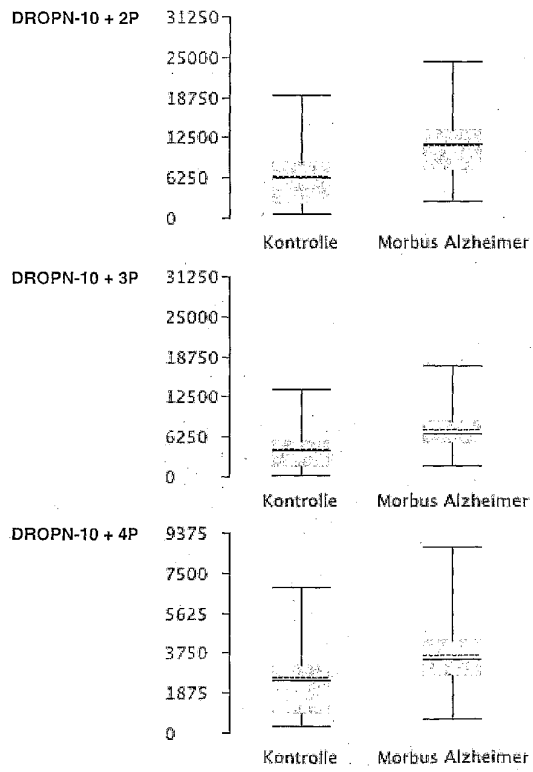


Abbildung 6B:

WO 02/090974

9/10

PCT/DE02/01665

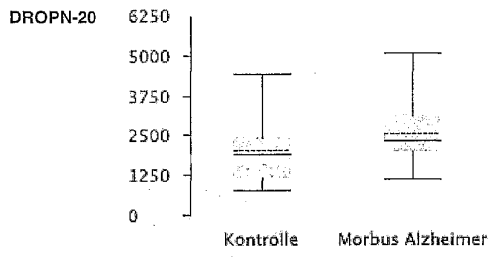


Abbildung 6C:

WO 02/090974

PCT/DE02/01665

10/10

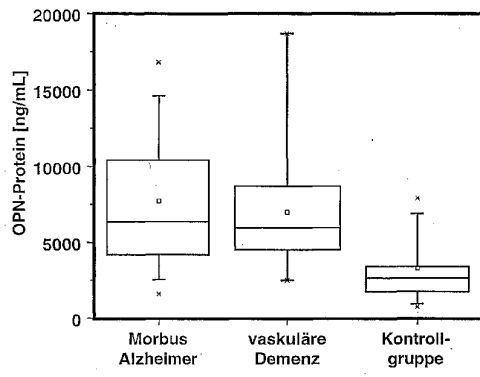


Abbildung 7:

WO 02/090974

1/13

PCT/DE02/01665

Sequenzprotokoll (erstellt mit PatentIn 3.1)

## SEQUENCE LISTING

5

&lt;110&gt; BioVision AG

10

&lt;120&gt; Verfahren zum Nachweis einer progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung zugehörige Peptide und Nachweisreagenzien

15

&lt;130&gt; OPN-PCT

20

&lt;160&gt; 31

25

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

30

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

35

&lt;213&gt; homo sapiens

40

&lt;400&gt; 1

Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn  
1 5 10 15

45

Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr  
20

50

&lt;210&gt; 2

WO 02/090974

2/13

PCT/DE02/01665

<211> 8  
<212> PRT  
5 <213> homo sapiens  
  
<400> 2  
10 Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn  
1 5  
  
15 <210> 3  
<211> 36  
<212> PRT  
20 <213> homo sapiens  
  
25 <400> 3  
Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp  
1 5 10 15  
  
30 Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser  
20 25 30  
  
35 His Lys Gln Ser  
35  
  
<210> 4  
40 <211> 39  
<212> PRT  
45 <213> homo sapiens  
  
<400> 4  
50

WO 02/090974

3/13

PCT/DE02/01665

Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp  
 1 5 10 15

5 Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser  
 20 25 30

10 His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr  
 35

<210> 5

15 <211> 33

<212> PRT

20 <213> homo sapiens

<400> 5

25 Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser Tyr Glu  
 1 5 10 15

30 Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His Lys Gln  
 20 25 30

Ser

35

<210> 6

40 <211> 15

<212> PRT

<213> homo sapiens

45

<400> 6

50 Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His Lys Gln Ser Arg Leu  
 1 5 10 15

WO 02/090974

4/13

PCT/DE02/01665

<210> 7  
5 <211> 16  
<212> PRT  
10 <213> homo sapiens  
  
<400> 7  
15 Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr  
1 5 10 15  
  
<210> 8  
20 <211> 8  
<212> PRT  
25 <213> homo sapiens  
  
<400> 8  
30 Lys Asp Ser Tyr Glu Thr Ser Gln  
1 5  
  
35 <210> 9  
<211> 8  
<212> PRT  
40 <213> homo sapiens  
  
<400> 9  
45 Ser Ala Glu Thr His Ser His Lys  
1 5  
50

WO 02/090974

5/13

PCT/DE02/01665

<210> 10  
 <211> 66  
 5 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
  
 10 <400> 10  
 Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln  
 1 5 10 15  
 15 Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser  
 20 25 30  
 20 His Glu Asp Met Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys  
 35 40 45  
 25 His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu  
 50 55 60  
 Val Asn  
 30 65  
  
 <210> 11  
 35 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
  
 40 <400> 11  
 45 Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln  
 1 5 10 15  
 50 Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser  
 20 25 30

WO 02/090974

6/13

PCT/DE02/01665

5 His Glu Asp Met Leu Val Val Asp  
35 40

<210> 12

10 <211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

15 <400> 12

20 Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu  
1 5 10 15

Asp

25 <210> 13

<211> 8

30 <212> PRT

<213> homo sapiens

35 <400> 13

40 Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile  
1 5

<210> 14

45 <211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

50

WO 02/090974

7/13

PCT/DE02/01665

&lt;400&gt; 14

5 Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe  
1 5

&lt;210&gt; 15

10

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

15

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 15

20

Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His  
1 5 10

25

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

30

&lt;213&gt; homo sapiens

35

&lt;400&gt; 16

Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu  
1 5 10

40

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 15

45

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

50

WO 02/090974

8/13

PCT/DE02/01665

<400> 17  
Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys  
1           5           10           15  
5  
<210> 18  
<211> 16  
10 <212> PRT  
<213> homo sapiens  
15  
<400> 18  
Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe  
20 1           5           10           15  
25 <210> 19  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> homo sapiens  
30  
<400> 19  
35 Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe  
1           5           10           15  
40 Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu  
          20           25  
45 <210> 20  
<211> 30  
<212> PRT  
50 <213> homo sapiens

WO 02/090974

9/13

PCT/DE02/01665

&lt;400&gt; 20

5 Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe  
1 5 10 15

10 Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn  
20 25 30

&lt;210&gt; 21

15 &lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

20 &lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 21

25 Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys  
1 5 10

30 &lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

35 &lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 22

40 Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe  
1 5 10 15

45 &lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

50

WO 02/090974

10/13

PCT/DE02/01665

<213> homo sapiens

5 <400> 23

Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg  
1 5 10 15

10

Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu  
20 25

15 <210> 24

<211> 24

<212> PRT

20

<213> homo sapiens

25 <400> 24

Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His  
1 5 10 15

30

Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu  
20

35 <210> 25

<211> 9

<212> PRT

40

<213> homo sapiens

45 <400> 25

Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu  
1 5

50

WO 02/090974

11/13

PCT/DE02/01665

<210> 26  
<211> 8  
5 <212> PRT  
<213> homo sapiens  
10  
<400> 26  
Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser  
1 5  
15  
<210> 27  
<211> 23  
20 <212> PRT  
<213> homo sapiens  
25  
<400> 27  
Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn  
30 1 5 10 15  
Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala  
35 20  
<210> 28  
<211> 23  
40 <212> PRT  
<213> homo sapiens  
45  
<400> 28  
Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn Lys  
50 1 5 10 15

WO 02/090974

12/13

PCT/DE02/01665

5 Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr  
20

<210> 29

10 <211> 33  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

15 <400> 29

20 Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser Tyr Glu  
1 5 10 15

25 Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His Lys Gln  
20 25 30

Ser

30 <210> 30  
<211> 35

35 <212> PRT  
<213> homo sapiens

40 <400> 30

45 Asn Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu  
1 5 10 15

Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu  
20 25 30

50

WO 02/090974

13/13

PCT/DE02/01665

Asp Met Leu  
35

5 <210> 31

<211> 34

<212> PRT

10 <213> homo sapiens

15 <400> 31

Asn Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu  
1 5 10 15

20 Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu  
20 25 30

25 Asp Met

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

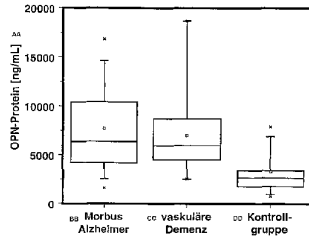
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/090974 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/68, C07K 14/52, 16/24, C12Q 1/68, C12N 15/19, A61K 38/19
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LAMPING, Norbert [DE/DE]; Siegesstrasse 8, 30175 Hannover (DE); ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Von-Escherte-Strasse 6, 30539 Hannover (DE); HEINE, Gabriele [DE/DE]; Waldstrasse 22, 30163 Hannover (DE); JÜRGENS, Michael [DE/DE]; Waldstrasse 22, 30163 Hannover (DE); HESS, Rüdiger [DE/DE]; Bollhäuser Strasse 2, 30629 Hannover (DE); SELLE, Hartmut [DE/DE]; Eickenriede 15, 30459 Hannover (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01665
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Mai 2002 (08.05.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 22 543.1 9. Mai 2001 (09.05.2001) DE
- (74) Anwalt: GRAMM, LINS & PARTNER GBR; LÄUFER, Martin, Freundallee 13, 30173 Hannover (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DL, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PROGRESSION OF CHRONIC DEMENTIA, AND ASSOCIATED PEPTIDES AND DETECTION REAGENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINES PROGRESSIONS-PEPTIDES, CHRONISCH-DEMENTIELLEN ERKRANKUNG, ZUGEHÖRIGE PEPTIDE UND NACHWEISREAGENZEN



AA: OPN-PROTEIN  
BB: ALZHEIMERS DEMENTIE  
CC: VASKULÄRE DEMENTIE  
DD: KONTROLLGRUPPE

(57) Abstract: The invention relates to defined peptides and the quantitative determination thereof in body fluids of patients suffering from prodromal chronic dementia, in relation to the concentration of said peptides in a control group. The inventive peptides come from a protein precursor having the corresponding gene, are processed in a specific manner, and are optionally post-translationally modified, especially phosphorylated. An increase in the concentrations of these peptides or the corresponding non-processed protein indicates prodromal chronic dementia. Prodromal chronic dementia is detected by identifying the peptides and/or the protein individually or in combinations. The invention also relates to the use of said peptides for controlling the course of prodromal chronic dementia and for the prognosis of prodromal chronic dementia, especially for complementing or replacing mini-mental scores, and for developing therapeutic agents to combat prodromal chronic dementia such as Alzheimer's disease.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/090974 A3

WO 02/090974 A3 

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, MY, NZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Veröffentlicht:**

- *mit internationalem Recherchenbericht*
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), earasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches 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).

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:** 8. Mai 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten*
- *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft definierte Peptide und deren quantitative Bestimmung in Körperflüssigkeiten von Patienten, die an progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankungen leiden, relativ zu deren Konzentration in einer Kontrollgruppe. Die erfindungsgemäßen Peptide entstammen aus einem Proteinvorläufer mit dem korrespondierenden Gen und sind in spezifischer Art und Weise prozessiert und ggf. posttranslational modifiziert, insbesondere phosphoryliert. Ein Anstieg der Konzentrationen dieser Peptide oder des zugehörigen nicht prozessierten Proteins zeigt eine progrediente, chronisch-demenzielle Erkrankung an. Der Nachweis der progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung erfolgt durch eine Identifizierung der Peptide und/oder des Proteins einzeln oder in Kombinationen. Die Erfindung findet darüber hinaus Verwendung zur Verlaufskontrolle von progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankungen und zu ihrer Prognose, insbesondere zur Ergänzung oder als Ersatz des "Mini-Mental Scores", sowie zur Entwicklung von Therapeutika gegen progrediente, chronisch-demenzielle Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No. PCT/DE 02/01665
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 C07K14/52 C07K16/24 C12Q1/68 C12N15/19 A61K38/19		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N 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) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01 75165 A (MCCONLOGUE LISA C ; MESSERSMITH ELIZABETH (US); HUA TAN (US); BARD) 11 October 2001 (2001-10-11) S. 8, Z. 15 - S. 9, Z. 26, S. 12, Z. 15 - 22, Beispiel 5, Ansprüche 26, 39, 41, 54	1-10, 12-16
P, X	WO 01 71358 A (BARRY SIMON ; HORGAN CARMEL (GB); GLAXO GROUP LTD (GB); LUDBROOK ST) 27 September 2001 (2001-09-27) S. 32, Z. 4 - Ende der S. 34, Ansprüche 1 - 36 -/-	17-19, 21, 22, 25-36, 38, 40-42
<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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to assist in the understanding of 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		Date of mailing of the international search report
24 February 2003		03/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo.nl, Fac. (+31-70) 340-2010		Authorized officer Hoesel, H

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/DE 02/01665
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 63241 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;ASHKAR SAMY (US); CANTOR HARVEY (US);) 26 October 2000 (2000-10-26) Zusammenfassung, S. 9, Z. 16 - S. 11, Z. 20, S. 17, Z. 7 - 14, S. 24, Z. 12 - S. 26, Z. 12, S. 32, Z. 18 - S. 37, Z. 6, S. 42, Z. 1 - S. 45, Z. 11, S. 51, Z. 28 - 30 -----	17-19, 25-42
X	KIEFER ET AL: "The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 17, no. 8, 1989, page 3306 XP002108335 ISSN: 0305-1048 the whole document -----	17-19, 21,22, 25-27
X	WO 98 08379 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 5 March 1998 (1998-03-05) the whole document -----	17-22, 25-27, 40-42
E	WO 02 092122 A (FEGER GEORG ;PAPOIAN RUBEN (CH); BOSCHERT URSULA (CH); BERNASCONI) 21 November 2002 (2002-11-21)  S. 31, Z. 14 - S. 32, Z. 16, S. 41, Z. 13 - S. 42, Z. 21, S. 43, Z. 5 - S. 44, Z. 36, Beispiele 2, 3, 6 - 9, 11, Ansprüche 1 - 22, -----	17,21, 22, 25-32, 34,35, 37,39
E	WO 02 081522 A (YOKOSAKI YASUYUKI ;KON SHIGEYUKI (JP); NODA MASAKI (JP); SAEKI YUKI) 17 October 2002 (2002-10-17) Zusammenfassung, S. 21, Z. 19 und 21, S. 37, Z. 7 - 12, Ansprüche 1, 6, 7, 8, 10, 27, 31 -----	17-20, 27-30

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DE 02/01665

**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)(e) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claims 34-39 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT PCT/ISA/210**
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE 02/01665
--

## FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

Continuation of I.2

Claims: 27, 30, 32, 34, 38 and 39

The current Claims 27, 30, 32, 34, 38 and 39 relate to a product functionally defined by a desirable characteristic or property, such as OPN (ant)agonists and OPN processing modulators.

The claims therefore encompass all products, etc., that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning OPN peptides, OPN antibodies, OPN (antisense) nucleic acids.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP 02/01665

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0175165 A	11-10-2001	AU 5302001 A WO 0175165 A2 US 2002147998 A1	15-10-2001 11-10-2001 10-10-2002
WO 0171358 A	27-09-2001	AU 4256901 A EP 1269196 A1 WO 0171358 A1	03-10-2001 02-01-2003 27-09-2001
WO 0063241 A	26-10-2000	AU 4357500 A BR 0009791 A EP 1175223 A2 WO 0063241 A2	02-11-2000 08-01-2002 30-01-2002 26-10-2000
WO 9808379 A	05-03-1998	WO 9808379 A1	05-03-1998
WO 02092122 A	21-11-2002	WO 02092122 A2	21-11-2002
WO 02081522 A	17-10-2002	WO 02081522 A1	17-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Interne <sup>no</sup> als Aktenzeichen PCT/DE 02/01665
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 C07K14/52 C07K16/24 C12Q1/68 C12N15/19 A61K38/19		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Fischbezeichnung Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 G01N C07K		
Fischbezeichnung aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag, Anspruch Nr.
P, X	WO 01 75165 A (MCCONLOGUE LISA C ;MESSERSMITH ELIZABETH (US); HUA TAN (US); BARD) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) S. 8, Z. 15 - S. 9, Z. 26, S. 12, Z. 15 - 22, Beispiel 5, Ansprüche 26, 39, 41, 54 ---	1-10, 12-16
P, X	WO 01 71358 A (BARRY SIMON ;HORGAN CARMEL (GB); GLAXO GROUP LTD (GB); LUDBROOK ST) 27. September 2001 (2001-09-27)  S. 32, Z. 4 - Ende der S. 34, Ansprüche 1 - 36 ---	17-19, 21, 22, 25-36, 38, 40-42
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Welchen Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Field C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		
*B* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft oder unklar zu machen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben)		
*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Demonstration, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
*S* Solche Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht korreliert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie beizugehen ist		
*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden		
*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann relevant ist		
*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
24. Februar 2003		03/03/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäische Patentamt, P.B. 5518 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 546-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 546-3016		Bewilligter Stellenleiter  Hoesel, H

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1995)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 02/01665

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	WO 00 63241 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;ASHKAR SAMY (US); CANTOR HARVEY (US);) 26. Oktober 2000 (2000-10-26) Zusammenfassung, S. 9, Z. 16 - S. 11, Z. 20, S. 17, Z. 7 - 14, S. 24, Z. 12 - S. 26, Z. 12, S. 32, Z. 18 - S. 37, Z. 6, S. 42, Z. 1 - S. 45, Z. 11, S. 51, Z. 28 - 30 ----	17-19, 25-42
X	KIEFER ET AL: "The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 17, Nr. 8, 1989, Seite 3306 XP002108335 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument ----	17-19, 21,22, 25-27
X	WO 98 08379 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 5. März 1998 (1998-03-05) das ganze Dokument ----	17-22, 25-27, 40-42
E	WO 02 092122 A (FEGER GEORG ;PAPOIAN RUBEN (CH); BOSCHERT URSULA (CH); BERNASCONI) 21. November 2002 (2002-11-21)  S. 31, Z. 14 - S. 32, Z. 16, S. 41, Z. 13 - S. 42, Z. 21, S. 43, Z. 5 - S. 44, Z. 36, Beispiele 2, 3, 6 - 9, 11, Ansprüche 1 - 22, ----	17,21, 22, 25-32, 34,35, 37,39
E	WO 02 081522 A (YUKOSAKI YASUYUKI ;KON SHIGEYUKI (JP); NODA MASAKI (JP); SAEKI YUK) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Zusammenfassung, S. 21, Z. 19 und 21, S. 37, Z. 7 - 12, Ansprüche 1, 6, 7, 8, 10, 27, 31 ----	17-20, 27-30

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1999)

<b>INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT</b>	Int. nationales Aktenzeichen PCT/DE 02/01665
<b>Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)</b>	
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich	Obwohl die Ansprüche 34-39 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.
2. <input checked="" type="checkbox"/> Ansprüche Nr. 27, 30, 32, 34, 38, 39 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich	siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.	
<b>Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)</b>	
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:	
1. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.	
2. <input type="checkbox"/> Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.	
3. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____	
4. <input type="checkbox"/> Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:	
<b>Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs</b>	<input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. <input type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02 01665

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p data-bbox="247 347 446 369">Fortsetzung von Feld I.2</p> <p data-bbox="247 380 518 403">Ansprüche Nr.: 27,30,32,34,38,39</p> <p data-bbox="247 425 821 504">Die geltenden Patentansprüche 27, 30, 32, 34, 38, 39 beziehen sich auf Produkte die lediglich funktionell durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft charakterisiert sind, wie OPN-(Ant-)agonisten und OPN-Prozessierungs-Modulatoren.</p> <p data-bbox="247 504 837 750">Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend OPN-Peptide, OPN-Antikörper, OPN-(Antisense)-Nukleinsäuren.</p> <p data-bbox="247 750 837 940">Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.</p>	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat  
s Aktenzeichen  
PCT/DE 02/01665

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0175165 A	11-10-2001	AU 5302001 A	15-10-2001
		WO 0175165 A2	11-10-2001
		US 2002147998 A1	10-10-2002
WO 0171358 A	27-09-2001	AU 4256901 A	03-10-2001
		EP 1269196 A1	02-01-2003
		WO 0171358 A1	27-09-2001
WO 0063241 A	26-10-2000	AU 4357500 A	02-11-2000
		BR 0009791 A	08-01-2002
		EP 1175223 A2	30-01-2002
		WO 0063241 A2	26-10-2000
WO 9808379 A	05-03-1998	WO 9808379 A1	05-03-1998
WO 02092122 A	21-11-2002	WO 02092122 A2	21-11-2002
WO 02081522 A	17-10-2002	WO 02081522 A1	17-10-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 27/62	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/483	Z
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/68	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74) 代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74) 代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72) 発明者 ランピン、ノルベルト

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 1 7 5 ハノーバー、ズィーゲスシュトラッセ 8

(72) 発明者 ツフト、ハンス - ディーター

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 5 3 9、ハノーバー、フォン - エッセルテ - シュトラッセ 6

(72) 発明者 ゼレ、ハルトムート

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 4 5 9 ハノーバー、アイケンリーデ 1 5

(72) 発明者 ユルゲーンズ、ミヒャエル

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 1 6 3 ハノーバー、バルトシュトラッセ 2 2

(72) 発明者 ハイネ、ガブリエレ

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 1 6 3 ハノーバー、バルトシュトラッセ 2 2

(72) 発明者 ヘス、リュウディガー

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 6 2 9 ハノーバー、ボルネゼル・シュトラッセ 2

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB51 FB01 FB03 FB06 FB08 JA01

4B024 AA01 AA11 CA04 CA06 CA09 HA12 HA15

4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA01 BA17 BA18 BA19 BA35

BA44 CA53 MA13 MA52 MA59 MA66 NA14 ZA022 ZA152 ZA162

ZA222

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA13 MA52 MA59 MA66

NA14 ZA02 ZA15 ZA16 ZA22  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA21 EA50 FA72  
FA74

专利名称(译)	用于检测进行性慢性痴呆疾病的方法，合适的肽和检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004532633A</a>	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2002588182	申请日	2002-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	比奥视觉AG		
申请(专利权)人(译)	毕视觉AG		
[标]发明人	ランピンノルベルト ツフトハンスディーター ゼレハルトムート ユルゲーンスマヒャエル ハイネガブリエレ ヘスリュージェイガー		
发明人	ランピン、ノルベルト ツフト、ハンス-ディーター ゼレ、ハルトムート ユルゲーン、ミヒャエル ハイネ、ガブリエレ ヘス、リュージェイガー		
IPC分类号	G01N27/62 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/18 C12N15/09 C12N15/19 C12Q1/68 G01N30 /88 G01N33/15 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K14/52 G01N33/6896 G01N2500/00 G01N2800/2814		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K31/7105 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25 /16 A61P25/28 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A G01N27/62.V G01N30/88.J G01N33/15.Z G01N33 /483.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/68 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB51 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/JA01 4B024 /AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063 /QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/MA13 4C084 /MA52 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084 /ZA222 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA13 4C086/MA52 4C086/MA59 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086 /ZA22 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	10122543 2001-05-09 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及患有慢性痴呆的患者的体液中的确定的肽及其定量测定，其与对照组中所述肽的浓度有关。本发明的肽来自具有相应基因的蛋白质前体，以特定方式加工，并且任选地被翻译后修饰，尤其是磷酸化。这些肽或相应的未加工蛋白质的浓度增加表明患有严重的慢性痴呆。通过单独或组合鉴定肽和/或蛋白质，可以检测到严重的慢性痴呆。本发明还涉及所述肽在控制进行性慢性痴呆

的病程中和在进行性慢性痴呆的预后中的用途，特别是用于补充或替代小精神评分，以及用于开发用于治疗进展性慢性痴呆的治疗剂，例如阿尔茨海默氏病。疾病。

