

(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2004-531250

(P2004-531250A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl. ⁷	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 38/00	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	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 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 194 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-579794 (P2002-579794)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月8日 (2002.4.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年10月2日 (2003.10.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2002/001376
 (87) 国際公開番号 W02002/082075
 (87) 国際公開日 平成14年10月17日 (2002.10.17)
 (31) 優先権主張番号 101 17 431.4
 (32) 優先日 平成13年4月6日 (2001.4.6)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

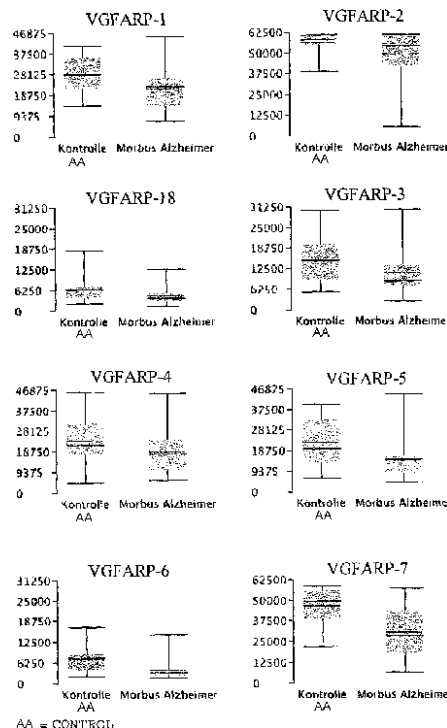
(71) 出願人 503361835
 ビオ・ビジョン・アーゲー
 ドイツ連邦共和国、デー-30625 ハ
 ノーバー、フェオドルーリェネン-シュト
 ラーセ 5
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100075672
 弁理士 峰 隆司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性痴呆疾患の検出方法、関連ペプチドおよび検出試薬

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病に罹患している患者からの生物学的サンプル中で定義されたペプチドおよびそれらの濃度を、対照群中の前記ペプチドの濃度と比較する定量方法に関する。本発明はさらに、治療を目的とする前記ペプチドの使用に関する。本発明によるペプチドは、対応する遺伝子を備えるタンパク質前駆体から発生し、特殊な方法で処理されて、翻訳後方法で修飾されている。これらのペプチドの濃度変化はアルツハイマー病の存在を示唆する。濃度変化の方向は、これらのペプチド各々に特異的である。アルツハイマー病はこれらのペプチドを個別にまたは組み合わせて同定することによって検出される。本発明はさらにまた、アルツハイマー病の経過を管理するため、その予後診断のため、およびアルツハイマー病に有効な治療薬を開発するためにも使用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つのマーカペプチドの相対濃度を測定して対照サンプル中の該マーカペプチドの濃度と比較することにより、慢性痴呆疾患または慢性痴呆疾患の素因の存在を検出する方法において：

- a) マーカペプチドとして日本 DNA データバンク (D D B J) からの受託番号 Y 1 2 6 6 1 を備える配列から誘導したペプチドが使用されことと；
- b) サンプル中の特定マーカペプチドに対して特異的な濃度変化を対照サンプルと比較して確認されることと；
- c) b) に挙げた方法における該マーカペプチドの有意な濃度変化が、慢性痴呆疾患についての陽性検出結果であると評価されることとを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

少なくとも 1 つのマーカペプチドの相対濃度を測定して対照サンプル中の該マーカペプチドの濃度と比較することにより、慢性痴呆疾患または慢性痴呆疾患の素因の存在を検出する方法において：

- a) マーカペプチドとしてジーンバンク (G e n e B a n k) 受託番号 N M _ 0 0 3 3 7 8 を備える配列から誘導したペプチドが使用されることと；
- b) サンプル中の特定マーカペプチドに対して特異的な濃度変化が対照サンプルと比較して確認されることと；
- c) b) に挙げた方法における該マーカペプチドの有意な濃度変化が、慢性痴呆疾患についての陽性検出結果であると評価されることとを特徴とする方法。

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、前記少なくとも 1 つのペプチドが、

- a) V G F A R P ペプチドであるか、または
- b) D D B J の受託番号 Y 1 2 6 6 1 に対応するペプチドであるか、または
- c) G e n e B a n k 受託番号 N M _ 0 0 3 3 7 8 に対応するペプチドであるか、または
- d) a) ~ c) に挙げたペプチドの自然に発生する対立遺伝子誘導体であるか、または
- e) 対応する非突然変異 V G F A R P 配列とは最高 2 アミノ酸が相違する V G F A R P 突然変異体であるか、または
- f) アミノ酸配列が b) もしくは c) に挙げたアミノ酸配列とは最高 2 0 % 相違する、b) ~ c) に挙げたペプチドの突然変異体であるか、または
- g) 化学修飾もしくは翻訳後修飾された、a) ~ f) に対応するペプチドであることを特徴とする方法。

30

【請求項 4】

請求項 1、2 または 3 に記載の慢性痴呆疾患を検出する方法において、それらの感度および/または特異性を上昇させるために、慢性痴呆疾患のための他の診断方法と組み合わせて実施されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法において、前記痴呆疾患がアルツハイマー病または関連神経疾患、特にレヴィー小体痴呆もしくは血管性痴呆であることを特徴とする方法。

40

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の方法において、少なくとも 1 つの同定された V G F A R P ペプチドが選択されるが、このとき該ペプチドは、好ましくは酸化ペプチドとしての翻訳後修飾形もしくは化学修飾形と共に、非修飾形で存在することを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 何れか 1 項に記載の方法において、前記疾患の陽性検出のために、前記ペプチド濃度は、対照サンプル中の特定ペプチドの濃度に比較して特定方向に上昇または低下していることを特徴とする方法。

50

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 何れか 1 項に記載の方法において、疾患の重症度の測定、経過の予後診断のため、または神経疾患の前段階、特に「軽度認識障害 (M C I) 」の診断に援用されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 何れか 1 項に記載の方法において、前記生物学的サンプルが脳脊髄液、血清、血漿、尿、滑液、便、涙液、喀痰または組織ホモジネートであることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 の何れか 1 項に記載の方法において、前記ペプチドの同定が質量分析測定法を用いて実施されることを特徴とする方法。 10

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、前記同定が、3666, 8278 / 3950, 9875 / 3567, 7594 / 3595, 7907 / 3879, 9504 / 3401, 6852 / 3614, 8077 / 3685, 8448 / 3302, 6167 / 3173, 5741 / 3955, 9889 / 1336, 6735 / 2503, 1827 / 727, 3501 / 851, 4137 / 730, 3246 / 3745, 7343 / 1235, 5782 / 833, 4395 / 7518, 2744 / 2031, 8981 / 2418, 0419 / 4806, 0408 / 3456, 5513 / 4806, 0408 / 4058, 7043 / 5776, 6294 / 6618, 0363 / 1380, 7249 / 946, 4468 / 862, 3192 / 961, 4063 / 3903, 0180 / 3787, 9911 / 920, 4828 の少なくとも 1 つの理論単一同位体質量ピークの質量分析測定を含んでいることを特徴とする方法。 20

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 の何れか 1 項に記載の方法において、前記ペプチドの同定が免疫学的、分子生物学的、物理的または化学的試験を用いて行われることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、前記免疫学的試験が E L I S A (酵素免疫吸着法)、ラジオイムノアッセイもしくはウェスタンブロット法であることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の方法において、前記ペプチドの同定が、1 つのペプチドもしくは 1 つのペプチドフラグメントに付された抗体、抗体フラグメント、P N A s もしくは親和性マトリックスを用いて行われることを特徴とする方法。 30

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法において、前記サンプルが、同定の前に好ましくは逆相クロマトグラフィーを用いて、さらに好ましくは高分解能逆相クロマトグラフィーを用いて、クロマトグラフィーにより分別されることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法において、前記サンプルが、同定の前に沈降反応または液相分離法によって分別されることを特徴とする方法。 40

【請求項 17】

下記の a) ~ e) からなる群から選択される少なくとも一つのペプチド：

- a) V G F A R P ペプチド；
- b) V G F タンパク質の V G F A R P 誘導体、特に N M _ 0 0 3 3 7 8 もしくは Y 1 2 6 6 1 の誘導体；
- c) V G F 対立遺伝子の V G F A R P 誘導体；
- d) 好ましくは対応する非突然変異 V G F A R P 配列とは最高 2 アミノ酸が相違する V G F A R P 突然変異体である；および
- e) 化学修飾もしくは翻訳後修飾された、a) ~ f) に対応するペプチド。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のペプチドの少なくとも 1 つの使用であって、神経疾患、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、抗体を入手するため、または診断用試薬を開発するための使用。

【請求項 19】

請求項 17 に記載のペプチドに結合する抗体。

【請求項 20】

VGF に対する抗体または請求項 19 に記載の抗体の使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を診断するための使用。

【請求項 21】

関連するタンパク質およびペプチドを間接的に測定および同定するために適合された、VGFARP ペプチドまたは VGF タンパク質に対応する核酸の使用。 10

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法の使用において、前記 VGF 核酸がノーザンブロット法、逆転写酵素 PCR または定量 PCR を使用して検出される方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 16 または請求項 20 ~ 22 の何れか 1 項に記載の方法の使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、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使用。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 16 または請求項 20 ~ 22 の何れか 1 項に記載の方法の使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の治療または臨床試験に適合する患者を階層化するための使用。 20

【請求項 25】

VGFARP ペプチドに対応する核酸。

【請求項 26】

VGF 特異的アンチセンス核酸として、VGF 特異的リボザイムとして、または VGF 特異的トリプレックス核酸として適合された核酸。

【請求項 27】

請求項 3 に列記した VGF ペプチドの合成アゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項 28】

ペプチド、核酸、アゴニストおよびアンタゴニストが血液脳関門および/または血液髄液関門を通過できるような方法で製剤学的に調製されている、または化学修飾もしくは生物学修飾されている、請求項 3 記載のペプチドまたは請求項 25 ~ 27 記載の物質。 30

【請求項 29】

請求項 3 に列記したペプチドまたは請求項 25 ~ 27 記載の物質であって、該ペプチドまたは前記物質は特別な投与経路、特に血液循環内、消化管内、尿生殖管内、リンパ系内、クモ膜下腔内への投与、吸入、または例えば筋組織、脂肪組織、脳等のような組織内への直接注射のために最適化されるように、製剤学的に調製され、または化学修飾もしくは生物学的修飾を施されているペプチドまたは物質。

【請求項 30】

請求項 3 記載のペプチドまたは請求項 25 ~ 27 の何れか 1 項に記載の核酸、ペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストのうちの少なくとも 1 つの使用であって、薬剤または薬剤有効成分としての使用。 40

【請求項 31】

請求項 3 記載のペプチドまたは請求項 25 ~ 27 の何れか 1 項に記載の核酸、ペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストのうちの少なくとも 1 つの使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防または治療するための医薬品を製造における使用。

【請求項 32】

神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防または治療するための医薬品 50

を製造するための例えばNGF、BDNFまたはNT-3のようなVGFタンパク質の発現を修飾する物質のうちの少なくとも1つの使用。

【請求項33】

個々のVGF遺伝子変種、特にNM_003378もしくはY12661の転写または発現を選択的に阻害または刺激する少なくとも1つの物質の使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防または治療するための医薬品を製造するための使用。

【請求項34】

請求項3記載のペプチドに結合する少なくとも1つの物質、特に抗体、抗体フラグメント、PNAsまたは親和性マトリックスの使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を予防または治療するための医薬品を製造するための使用。

10

【請求項35】

請求項3記載のペプチドまたは請求項25~27の何れか1項に記載の核酸、ペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストのうちの少なくとも1つの使用であって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を治療するための使用。

【請求項36】

神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を有する患者のために、請求項3に記載のペプチドまたは請求項25記載の核酸のうち少なくとも1つの濃度を治療的に調節する方法。

【請求項37】

請求項36に記載の方法であって、前記VGFペプチドまたは核酸の濃度を低下させるように著節する方法。

20

【請求項38】

請求項36に記載の方法であって、VGFタンパク質またはVGFARPペプチドの濃度を上昇させるように調節する方法。

【請求項39】

請求項37に記載の方法であって、患者に対して、

- a) VGFタンパク質、VGFARPペプチド、NGF、BDNFもしくはNT-3に対して生じた抗体が投与されるか、または
- b) VGFタンパク質、VGFARPペプチド、NGF、BDNFもしくはNT-3の発現を低下させるために、アンチセンス核酸、トリプレックス核酸もしくはリボザイムが投与されるか、または
- c) VGFタンパク質のプロセッシングを阻害する物質が投与されるか、または
- d) 請求項3に列記したVGFペプチドのアンタゴニストが投与される方法。

30

【請求項40】

請求項38に記載の方法であって、患者に対して、

- a) VGFタンパク質、VGFARPペプチド、NGF、BDNFもしくはNT-3が投与されるか、または
- b) VGFタンパク質、VGFARPペプチド、NGF、BDNFもしくはNT-3をコードする核酸が投与されるか、または
- c) VGFタンパク質のプロセッシングを促進する物質が投与されるか、または
- d) 請求項3に列記したVGFペプチドのアゴニストが投与される方法。

40

【請求項41】

請求項3に列記したペプチドの少なくとも1つの発現を抑制または増強す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42】

請求項3に列記したペプチドの少なくとも1つに結合する受容体または阻害剤を同定するためのスクリーニング方法。

【請求項43】

請求項3に列記したペプチドの少なくとも1つのアゴニストまたはアンタゴニストを同定

50

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、慢性痴呆疾患、または慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病または例えばレヴィー小体痴呆もしくは血管性痴呆のような関連神経疾患に関する素因の存在を検出する方法に関する。さらに本発明は、これらの疾患の存在を検出するため、これらの疾患および疾患の重症度の経過を管理するために見いだされたペプチドに関する。さらに本発明は、例えば抗体や核酸およびその均等物のような検出試薬であって、これらのペプチドないし対応する核酸を検出できる検出試薬に関する。さらに本発明は、神経疾患、特にアルツハイマー病を治療または予防するための、VGF、VGFペプチド、VGF抗体、VGF核酸、VGFタンパク質アンタゴニスト、VGFタンパク質アゴニスト、VGFペプチドアゴニストまたはVGFペプチドアンタゴニストを含む薬学的用途に関する。さらに本発明は、神経疾患、特にアルツハイマー病を有し、従って該疾患の臨床試験に組み込むのに適合した患者を確定するための方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

本発明におけるペプチドは、「神経内分泌特異的タンパク質VGF」とも称されるタンパク質VGFのフラグメントに関する。文献では、略語VGFはタンパク質である「ワクシニア成長因子(vaccinia growth factor)」もしくは「ワクシニアウイルス成長因子(vaccinia virus growth factor)および「血管透過性因子(Vascular Permeability Factor)」についても使用されるが、これらのタンパク質は本発明の対象であるVGFタンパク質には対応していない。

20

【0003】

痴呆疾患は、先進国では平均余命が長いためにますます大きな問題となっている。痴呆疾患はその大部分は治療不能であり、患者の長期間に及ぶ介護を必要とする。これらの患者のほぼ半数は入院介護を受けている。痴呆症状を伴う疾患を含めると、60種を超える痴呆疾患が知られている。

【0004】

しかし、それらのうち約65%はアルツハイマー病(Alzheimer's Disease、アルツハイマー疾患、AD)に分類されるので、この疾患を診断および治療することには重要な価値がある。アルツハイマー病以外に、特に次のような非アルツハイマー病が知られている：血管性痴呆、レヴィー小体痴呆、ピンスヴァンガー痴呆、並びに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・ヤコブ病等のような他の疾患の随伴症状として発生する痴呆疾患。

30

【0005】

アルツハイマー病は、知的能力の低下、意識混濁および自己保存能力や自立能力の低下症状が顕著な神経変性疾患である。アルツハイマー病では、特に短期的記憶の強度の制限が特徴的であり、例えば自分の子供時代について記憶のような患者の昔の記憶が侵害されることは遥かに少ない。形態学的には脳の変化が発生するが、これらは特にアミロイドアミロイド沈着および神経細胞変性の形で現れる。これらの形態学的変化は、患者の死後に組織学的に診断することができ、これまではこの疾患の唯一の確実な検出法であった。これらの組織病理的診断は、「アルツハイマー病登録簿を確立するためのコンソーシウム(CERAD)」が確定した基準に基づいて行われている。アルツハイマー病の診断には、現在は次の基準に基づく診断システムが使用されている：「国際疾病分類第10版(ICD-10)」、「米国精神医学会」発行の「精神障害の診断および統計マニュアル、第4版(DSM-IV)」、および「米国国立神経伝達傷害卒中研究所(NINCDS-ADRDA)」が定めた「作業部会基準」。

40

50

【0006】

これらのシステムは、アルツハイマー病の診断を行うことができるように一連の神経精神的検査を使用するが、客観的に測定可能な臨床検査パラメータは存在しない。

【0007】

このためアルツハイマー病の診断は困難であるが、それは他の痴呆疾患と同様にこの疾患が緩慢に始まり、脳内の神経細胞の緩徐に進行する破壊が付随するためである。

【0008】

現在、アルツハイマー病を治療するために利用できる原因療法はない。この疾患は、例えばアセチルコリンのような神経伝達物質の投与のように、対症的にしか治療されていない。その他に可能性がある治療戦略として、現在は抗酸化物質、ラジカル・スカベンジャー（遊離基捕捉剤）、カルシウムチャネル遮断薬、抗炎症薬、セクレターゼ阻害薬、抗アミロイド抗体等の投与、並びにアミロイド-ペプチドに対する免疫が試みられている。しかし、現在至るまで、この疾患の原因療法はまだ可能にはなっていない。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、現在の技術水準におけるアルツハイマー病の診断における短所を回避して、慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を検出するための短時間でかつ高信頼性の方法を使用できるようにすることである。さらに本発明のもう1つの課題は、従来アルツハイマー病を治療するための満足できる治療アプローチがなかったため、アルツハイマー病を治療するための新規治療法を利用できるようにすることである。

20

【用語の定義】

【0010】

<受託番号NM__003378およびY12661に対応するVGFタンパク質もしくはペプチド>:

核酸配列NM__003378およびY12661から誘導されるペプチドはVGFタンパク質とも称され、VGFタンパク質のすべての自然に発生する対立遺伝子、突然変異体および多形体並びに組織特異的に発現したVGF変種を含んでいる。特に、疾患を原因として、または神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の結果として発生するVGF変種も含まれている。さらにまたシグナル配列を備えたものおよび備えていないものを含むVGFタンパク質、未だプロセッシングされていないVGFタンパク質のプロ体、並びに既にプロセッシングされたVGFタンパク質、溶解性VGFタンパク質および膜安定性VGFタンパク質も含まれる。膜安定性VGFタンパク質は、膜貫通型アミノ酸配列を介して細胞膜もしくはオルガネラ膜と結合されていても、翻訳後修飾を介して例えばグリコシル-ホスファチジル-イノシトール(GPI)アンカーと結合されていてもよい。さらに選択的スプライシング、選択的翻訳開始点および翻訳終止点、RNA編集、選択的翻訳後修飾によって、並びに自然に発生するメカニズムによって発生した他のVGFタンパク質変種であるVGF配列の変形も含まれている。

30

【0011】

<VGFARPペプチド>:

下記では、VGFペプチドおよびVGFペプチド変種を、VGFARP(「VGFアルツハイマー関連ペプチド」)ペプチドと称する。VGFARPペプチドは、最初に挙げたVGF配列(NM__003378およびY12661)および自然に発生し得るその他のVGFタンパク質変種のどちらからも誘導することができる。さらにまた、VGFARPペプチドは2つの点突然変異した、2つの欠失した内部アミノ酸または2つの追加の内部挿入アミノ酸、並びにN末端および/またはC末端延長部を含有してよい。しかし、このときVGFARPペプチドは、VGFタンパク質配列からの少なくとも8アミノ酸を含有していなければならない。N末端またはC末端延長部としては、VGFタンパク質配列においてVGFタンパク質のこの配列位置に存在するアミノ酸だけが考慮の対象となる。さらに、自然に発生するVGF多形および自然に発生するVGF突然変異体からのペプチ

40

50

ドもまた、VGFARPペプチドと称される。VGFARPペプチドは、例えばグリコシル化およびリン酸化のような翻訳後修飾とともに、およびノまたは好ましくは酸化ペプチドとしての化学修飾形で存在してよい。例えば、VGFARP-12は非酸化ペプチドとしても酸化ペプチドとしても同定された。

【0012】

<化学修飾もしくは翻訳後修飾されたペプチド> :

化学修飾もしくは翻訳後修飾されたペプチドは、D-アミノ酸またはL-アミノ酸から構成されてもよく、またD-アミノ酸とL-アミノ酸との組み合わせから構成されてもよい。さらに、これらのペプチドには、珍しいアミノ酸、すなわち20種の標準アミノ酸に属さないアミノ酸が含まれていてもよい。珍しいアミノ酸の例としては特に、 γ -アミノ酪酸、 β -アミノ酪酸、 β -アラニン、 β -アミノイソ酪酸、ノルバリン、ホモセリン、ノルロイシン、 γ -アミノ酪酸、チオプロリン、4-ヒドロキシプロリン、 β -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、 β -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、セレノシステインがある。翻訳後修飾または化学修飾としては、特に次の構造、即ち、ペプチド配列中のシステインへの遊離システインの結合部、メチル基、アセチル基、ファルネシル基、ビオチニル基、ステアロイル基、パルミチル基、リポイル基、C-マンノシル基、リン基、サルフェート基、グリコシル化物、アミド化物、脱アミド物、ピログルタミン酸、シトルリン等によるアミノ酸配列の修飾が考えられる。

10

20

【0013】

<核酸> :

核酸は、自然起源からのものも、合成もしくは組換えで作製されたものも含むDNA、RNAおよびDNA-RNAハイブリッド分子であると見なされる。さらに含まれるのは、例えばホスホチオエートのような高い*in vivo* (生体内)安定性を備えた修飾ヌクレオチドを含有する化学修飾された核酸である。このような安定化された核酸は、リボザイム技術、アンチセンス技術およびトリプレックス核酸技術を使用する場合に既に利用されている。

【0014】

<有意性> :

有意という概念は、統計学における有意性の概念の意味で使用する。本特許出願明細書では、90%、好ましくは95%、より好ましくは99%未満の確率値を有意であると定義する。

30

【0015】

<感度> :

感度とは、疾患の診断において陽性診断結果が得られる、すなわち診断がその疾患の存在を正確に示唆する罹患患者の比率であると定義する。

【0016】

<特異性> :

特異性とは、疾患の診断において陰性診断結果が得られる、すなわち疾患が全く存在しないことを診断が正確に示唆する健常者の比率であると定義する。

40

【発明の概要】

【0017】

驚くべきことに、アルツハイマー病に罹患した患者の体液サンプル中でのみ、特に脳脊髄液中では、一定のペプチドの濃度が対照サンプル中のペプチド濃度に比較して変化するので、このためアルツハイマー病の検出が可能であることが見いだされた。対照群における濃度と比較したこれらのペプチドの変化は、アルツハイマー病の存在を示唆するので、したがって高い感度および特異性でこの疾患を検出するために適している。したがって患者を正常なVGF値もしくはVGFARP値へ調節する目的でVGFタンパク質またはVGFARPペプチド濃度を調節することを治療的に使用できる。

50

【0018】

課題を解決するために、本発明はジーンバンク (Gene Bank) 受託番号 NM__003378 もしくは日本 DNA データバンク (DDBJ) の受託番号 Y12661 を備える配列から誘導された 1 つ以上の VGF ペプチドを、個人の 1 つの生物学的サンプル中で同定することによって、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病またはこのような疾患の素因を検出する方法を含んでいる。これらの VGF ペプチドは当該疾患とおそらく因果関係があるので、本発明はアルツハイマー病もしくは関連神経疾患の治療のためのこれらのペプチドの使用も含んでいる。これらのペプチドまたはペプチドフラグメントは「VGF 由来アルツハイマー病関連ペプチド」(VGF ARP) と称され、VGF ARP - 1 から VGF ARP - 38 までナンバリングされている。2 つの VGF タンパク質変種である NM__003378 および Y12661 は、アミノ酸配列の 13 位しか相違しておらず、これら 2 つの VGF タンパク質からアルツハイマー病と対照群との区別を可能にする VGF ペプチドが同定された。VGF ARP ペプチドである VGF ARP - 11 および - 32 は、受託番号 Y12661 を備える VGF 変種に由来し、また VGF ARP ペプチドである VGF ARP - 25、- 30、- 31、- 36 および - 37 は、受託番号 NM__003378 を備える VGF 変種に由来する。残り全部の VGF ARP ペプチドは、それらのアミノ酸配列に基づくとどちらの VGF 変種にも由来する可能性がある。これまでに既に 2 つの相違する VGF 変種に由来する VGF ARP ペプチドが同定されたので、これらもしくはその他の VGF 変種に由来するまた別の VGF ARP ペプチドが存在すると考えることができる。これらの VGF ARP ペプチドもまた同様に本発明の対象である。

10

20

【0019】

課題を解決するために、本発明は患者の生物学的サンプル中の少なくとも 1 つのマーカープепチドを測定し、これを対照サンプル中の該マーカープепチドの濃度と比較してアルツハイマー病を検出する方法を提供するが、このとき下記のポイントが満たされなければならない：1. マーカープепチドとして、少なくとも 1 つの VGF ARP ペプチドまたは受託番号 NM__003378 もしくは Y12661 もしくは相同配列を備える核酸から誘導される 1 つのペプチドが使用される；2. 患者のサンプル中における特定マーカープепチドに対して特異的な該マーカープепチドの対照サンプル中の該マーカープепチドの濃度に比較した濃度上昇または濃度低下が発生する；3. 上記の方法における該マーカープепチドの有意な濃度変化が、神経疾患、主としてアルツハイマー病に対する陽性検出結果であると評価される。

30

【0020】

このとき、一定の VGF ARP ペプチドの 1 つについて、基本的にアルツハイマー病患者では該ペプチド濃度の上昇しか発生しないか、またはこの VGF ARP ペプチドについて、基本的にアルツハイマー病患者では該ペプチド濃度の低下しか発生しない可能性がある。定義された 1 つの VGF ARP ペプチドについて、対照群に比較して 1 人の個別アルツハイマー病患者では上昇し、別のアルツハイマー病患者では低下した VGF ARP ペプチド濃度が同時に発生することはあり得ない。ほぼすべての疾患の医学的診断におけると同様に、基本的に偽陽性もしくは偽陰性の結果が出る、すなわち少数例では誤診が発生する可能性があるが、それはアルツハイマー病患者における VGF ARP ペプチドは対照群サンプルにおける VGF ARP ペプチド濃度と 100% の確率で相違するのではないためである。しかし、この問題は検査を複数回実施することで取り除ける。

40

【0021】

本発明においては、VGF 配列のフラグメントであると解釈できるペプチドを VGF ARP ペプチドと称する。これらには VGF 由来の相同ペプチドが含まれる。これらには、これらのペプチドの自然に発生する対立遺伝子誘導体および好ましくは 3 つ以上の VGF が相違していないアミノ酸を備える相同突然変異体、特に点突然変異体が含まれる。本発明による好ましいマーカール配列表に挙げられており、配列番号 1 ~ 35 に対応して VGF ARP - 1 ~ VGF ARP - 38 と指定されている。VGF ARP ペプチドの配列は、図

50

1 および表 1 に表示した。各々の配列番号に従った V G F A R P ペプチドの分類は表 1 に示した。

【 0 0 2 2 】

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においてその濃度が変化しており、極めて早期にある疾患および疾患リスクの上昇を早期に示唆する特異的バイオマーカーを確認する方法である。これは、当該疾患を診断するための信頼できる臨床マーカーを利用できるようにするために重要である。

【 0 0 2 3 】

主として、サンプル中の V G F A R P ペプチドの濃度、さらに一定の複数の V G F A R P ペプチドの発生の特徴的なパターンも、疾患の重症度と相関している可能性がある。したがって、これらの新規マーカーは、経過および場合によっては治療に基づいて始まった治療成果または疾患の進行低下を確認することができるので、アルツハイマー病を治療するための療法の開発および付随する管理を可能にする。アルツハイマー病の効果的治療法は現時点では不可能であり、治療法を開発するための前提条件は疾患を確実に検出できることであるので、アルツハイマー病の確実な検出方法を提供することが緊急に必要である。

10

【 0 0 2 4 】

さらに V G F A R P ペプチドを検出できれば、アルツハイマー病を治療するための新規療法を開発するための臨床試験においてアルツハイマー病に罹患しているが、他の疾患には罹患していない患者だけを高度の特異性で選択することが可能になる。これは、試験結果の高度の信頼性を獲得するために重要である。間違ってもアルツハイマー病と診断された患者を含むことは、アルツハイマー病の治療法に関する試験の結果の質にマイナスの影響を及ぼす。さらに V G F A R P ペプチドを検出できれば、患者の階層化が可能になり、それによって一定のアルツハイマー病治療戦略または臨床試験のために特に適合するアルツハイマー病患者のサブグループを適切に選択することができる。

20

【 0 0 2 5 】

アルツハイマー病患者では、V G F A R P ペプチドの濃度が健常者に比較して著明に変化している。そこで、本発明の別の態様は、アルツハイマー病患者における V G F A R P 濃度を正常濃度にするのである。この方法はアルツハイマー病または関連神経疾患の治療のために使用できる。V G F タンパク質もしくは V G F A R P ペプチドの濃度が上昇している場合、これらの物質の濃度は、例えば V G F タンパク質もしくは V G F A R P ペプチドに特異的な抗体または V G F に特異的なアンチセンス核酸、リボザイムもしくはトリプレックス核酸または V G F A R P ペプチドアンタゴニスト、V G F 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。治療のためには V G F タンパク質の内因性の発現または V G F タンパク質から V G F A R P 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。V G F タンパク質もしくは V G F A R P ペプチドの不足が疾患の原因である場合は、V G F タンパク質、V G F A R P ペプチド、V G F A R P ペプチドアゴニストまたは V G F タンパク質アゴニストの治療的投与を行うこともできる。V G F タンパク質もしくは V G F A R P ペプチドの内因性の産生は、例えば N G F、B N D F もしくは N T - 3 のような物質またはその他の適切な物質の治療的投与によって上昇させることができるが、それはこれらの物質が V G F の発現を上昇させるためである。例えば P C 1、P C 2 もしくは P C 3 のようなプロホルモンコンバターゼのような、V G F タンパク質から V G F A R P ペプチドへのプロセッシングを促進する物質もまた治療的に使用できる。当然ながら、様々な治療戦略の組み合わせも可能であり、状況によっては有意義である。

30

40

【 0 0 2 6 】

したがって本発明は、神経疾患、特にアルツハイマー病を治療する目的で V G F タンパク質および V G F A R P ペプチドの濃度を直接的または間接的に調節するために、V G F タンパク質、V G F A R P ペプチド、V G F A R P ペプチドアゴニストおよびアンタゴニスト、V G F タンパクアゴニストおよびアンタゴニスト、抗 V G F タンパク質抗体、抗 V G F A R P ペプチド抗体、N G F、B N D F、N T - 3、抗 N G F 抗体、抗 B N D F 抗体、

50

抗NT-3抗体および上記のタンパク質の受容体に対する抗体の使用を含んでいる。抗体の代わりに、抗体フラグメント、抗体融合タンパク質、またはVGFタンパク質、VGFARPペプチド、NGF、BDNFもしくはNT-3に選択的に結合するその他の物質を使用することもできる。上記のタンパク質およびペプチドの代わりに、上記のタンパク質の融合タンパク質を使用することもできる。さらに、本発明は上記のタンパク質およ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およびリボザイムの使用を含んでいる。さらにまた本発明は、上記のタンパク質の活性を調節するアゴニストおよびアンタゴニストを含んでいる。

【0027】

本発明のさらにまた別の実施形態は、上記のペプチドおよび核酸が血液脳関門および/または血液髄液関門を効果的に通過することを可能にする方法による、それらの製剤学的処方または化学的修飾である。それによってそれらは特に治療的使用のために適合する。これを達成するために、例えばVGFペプチド、VGFタンパク質、核酸、アゴニストまたはアンタゴニストがクモ膜下腔への通過に好都合であるように、例えば脂肪親和性になるようにそれらを修飾することができる。これは疎水性分子成分を挿入することによって、または例えばリポソームのような疎水性物質中にこれらの物質を「封入」することによって達成できる。さらに、これらのペプチド、タンパク質、核酸、アゴニストまたはアンタゴニストに例えばペプチド配列を付着させて、クモ膜下腔内への通過を好都合に、或るいは逆にクモ膜下腔からの通過を困難にさせることもできる。

【0028】

さらにまた、本発明は例えば静脈内注射、経口投与物質、吸入可能な気体もしくはエアロゾルとして、またはクモ膜下腔内または筋肉、脂肪、脳等のような組織への直接注射の形態での投与のような様々な経路を通しての、上記の治療薬の投与も含んでいる。それによって、これらの治療薬のバイオアベイラビリティおよび有効性の上昇を達成できる。例えば、経口投与されるペプチドまたはタンパク質は酸抵抗性カプセルによって、胃におけるタンパク質分解性分解から防御できる。強度の疎水性物質は、適切な製剤学的調製により親水性にして、例えば静脈内注射に適合するようにすることができる。

【0029】

本発明のまた別の実施形態は、VGFARPペプチドまたはVGFタンパク質へ選択的に結合する受容体を同定するための、これらの分子の使用である。これらの受容体も、神経疾患、特にアルツハイマー病の治療に適合するアゴニストまたはアンタゴニストの投与によって調節することができる。

【0030】

本発明において新たに同定された多数のVGFペプチドを使用すると、*in vivo*でVGFタンパク質のプロセッシングが行われるVGFタンパク質の位置を初めて検出することができる。これらのプロセッシング部位は、NM_003378のVGFタンパク質配列と関連付けると下記の配列位置である：371/372、418/419、479/480、480/481、481/482、482/483および483/484。Y12661のVGFタンパク質配列と関連付けると、次のプロセッシング部位である：371/372、419/420、480/481、483/484、484/485および485/486。実験により同定されたすべてのプロセッシング位置は、二塩基位置、すなわち正電荷アミノ酸側鎖（アルギニン=R、リシン=K）を備える連続するアミノ酸である。このような配列モチーフは、例えばプロホルモンコンバーターゼによって認識されて切断されるが、このとき追加して両方の塩基性アミノ酸がエンドプロテアーゼ活性により除去される。プロホルモンコンバーターゼという名称が意味するように、プロホルモンコンバーターゼはプロホルモンをホルモンに転換させ、それによって新規の生物活性物質（ペプチド・ホルモン）が発生する。それらのプロ形態から、この方法で発生する生物活性ペプチドの例は、プロNGF/NGF、プロBDNF/BDNF等である[1]。したがって、本発明によるVGFARPペプチドは神経疾患、好ましくはアルツハイマー病と関連する治療薬のための攻撃点として適切なペプチド・ホルモンである。したがってVGFAR

10

20

30

40

50

Pペプチド濃度の調節は、神経疾患、特にアルツハイマー病を治療するために使用できる。

【0031】

< V G F - 生物学 > :

本発明において同定された V G F タンパク質 (V G F ペプチドの前駆体分子) は約 6 8 k D a の大きなタンパク質として、神経内分泌細胞およびニューロン細胞中で合成されるが、それらの発現は加齢とともに低下する [2]。V G F - 遺伝子欠損マウスの試験では、重要な機能がエネルギー代謝に関係していることが明らかになった [3]。V G F - 遺伝子欠損マウスは低体重を示し、代謝過剰性かつ活動過剰性である。V G F は膵臓のインスリンを産生するランゲルハンス島細胞中でも合成される。

10

【0032】

V G F は、ラットのクロム親和性細胞系 (P C 1 2 - 細胞系) の試験でも発見されており、「神経成長因子 (N G F)」によるこの細胞の刺激は、V G F の濃度の 1 2 ~ 1 4 倍の上昇を引き起こす [4 , 5]。N G F は、抹消神経系と中枢神経系の分化を調節する重要な成長因子である。その他の V G F 発現を調節している因子は、「脳由来神経栄養因子 (B D N F) およびニューロトロピン - 3 (N T - 3) である [6]。I n v i v o では V G F - m R N A はニューロン活性、ニューロン損傷および生物リズム (生物時計) によって調節される [2 , 7 ~ 9]。

【0033】

V G F は、おそらく塩基性アミノ酸を認識するニューロン特異的に発現したエンドプロテアーゼを介してニューロン細胞の分化の増加を伴ってタンパク質分解性でプロセッシングされる。T r a n i らが証明できたように、2 0、1 8 および 1 0 k D a の質量を備える C 末端が発生する [1 0]。この V G F - プロセッシングは、後小胞体細網内で行われる。これらのペプチドは分泌小胞中に堆積し、好ましくは膜解重合後に遊離し、場合によってはニューロン伝達において重要な役割を果たすことができる [1 0]。例えば P C 1、P C 2 もしくは P C 3 のようなプロホルモンコンバーターゼは、文献からは二塩基配列部位でタンパク質前駆体分子をタンパク質分解性で分解するエンドプロテアーゼの例として知られている。しかし、我々が同定した V G F A R P ペプチドは、驚くべきことに 1 0 ~ 2 0 k D a より顕著に少ない分子量を備えたフラグメントであり、したがって T r a n i らが報告している V G F ペプチドとは相違している。さらに T r a n i らはこれらの V G F ペプチドを検出するために、V G F A R P ペプチドの配列とは相違する V G F - エピトープを認識する抗 V G F 抗体を使用している。我々は V G F A R P ペプチドをアルツハイマー病患者においても対照群患者においても検出した。我々が同定したペプチドは、V G F の新規のこれまでに報告されたことのないプロセッシング産物である。V G F A R P ペプチドの濃度は、各ペプチドに対して特異的な方法で、患者群中では対照群と比較して一貫して上昇しているか、または一貫して低下している可能性がある。これまでは、V G F タンパク質の C 末端領域由来の未知の配列を有し且つ我々が新規に同定して初めて配列決定したペプチドより著明に大きな分子量を有する、他の V G F ペプチドしか知られていなかった [1 0]。

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0034】

本発明による方法によって検出される慢性痴呆疾患は、好ましくはアルツハイマー病である。現在までに、アルツハイマー病患者において、本発明によるペプチドおよびペプチドフラグメントの濃度変化を検出することができた。その結果、本発明によるペプチドは、アルツハイマー病および関連神経疾患の検出および治療に援用できると結論付けることができる。

【0035】

同定は、主として G e n e B a n k 受託番号 N M _ 0 0 3 3 7 8、または D D B J 受託番号 Y 1 2 6 6 1 を備える V G F タンパク質の一定のペプチドフラグメント、すなわちこれらの V G F タンパク質の部分配列を含んだペプチドに集中している。これらの V G F ペ

50

プチド (VGFタンパク質フラグメント) は「VGF由来アルツハイマー病関連ペプチド (VGFARP)」と称され、VGFARP-1~VGFARP-38まで通し番号が付けられている。VGFタンパク質とVGFARP-1~VGFARP-38までの関連は図1に示した。我々が確認したこれらのペプチドの配列は、配列表に記載されている。

【0036】

我々は生物学的サンプル中において、2種類のVGFタンパク質変種由来の様々なVGFタンパク質を初めて検出した。VGFARP-1~VGFARP-38と名称を付けたこれらのペプチドは、VGFタンパク質の確定されたフラグメントである。これらのフラグメントは自然界で自然な方法で発生するが、これまでは文献には報告されていなかった。これらのフラグメントは文献中ではしばしば (例えばトリプシンのようなプロテアーゼを添加することで) *in vitro* タンパク質分解によって発生させられるペプチドとは相違している。したがって、これらは新規の従来知られていなかった物質である。これらのペプチドは、最初に逆相クロマトグラフィーを介して生物学的サンプルから濃縮し、精製し、引き続いて質量分析によって付随する他のペプチドから分離したので、その結果として、これらのVGFARPペプチドのシーケンシング (塩基配列決定) を行うことができた。

10

【表1】

表1

1文字アミノ酸コードで表示したペプチドの配列は次の通りである:

20

VGF-配列		VGFARP 番号	配列 番号	単一同位体 理論質量 (Da)	配列
Y12661	NM_003378				
23-59	23-59	1	1	3666,8278	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGS PEV
23-62	23-62	2	2	3950,9875	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGS PEVRGA
23-58	23-58	18	3	3567,7594	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGS PE
24-59	24-59	3	4	3595,7907	PPGRPEAQPPPLSSEHK EPVAGDAVPGPKDGSAP EV
24-62	24-62	4	5	3879,9504	PPGRPEAQPPPLSSEHK EPVAGDAVPGPKDGSAP EVRGA
26-59	26-59	5	6	3401,6852	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP EV
26-61	26-61	6	7	3614,8077	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP EV

30

40

【0037】

					RG
26-62	26-62	7	8	3685,8448	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP RGA
26-58	26-58	19	9	3302,6167	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP
26-57	26-57	20	10	3173,5741	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP
26-64	26-64	21	11	3955,9889	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP RGARN
49-62	49-62	10	12	1336,6735	PGPKDGSAPVARGA
90-114	90-114	22	13	2503,1827	LDRPASPPAPSGSQGP EEEEAEAL
* 50 _{r1} - 57 _{r2}	50 _{r1} -57 _{r2}	15	14	≥ 727,3501	r1-GPKDGSAP-r2
39-46	39-46	23	15	851,4137	r7-HKEPVAGD-r8
50-57	50-57	24	16	≥ 730,3246	r9-APSGSQGP-r10
-----	121-156	25	17	3745,7343	SQTHSLPAPESPEPAAP PRPQTPENGPEASDPSE EL
164-174	164-174	26	18	1235,5782	QELRDFSPSSA
133 _{r11} - 140 _{r12}	133 _{r11} - 140 _{r12}	27	19	≥ 833,4395	r11-EPAAPRP-r12
351-418	-----	11	20	7518,2744	LQEAAEERESAREEEEE EQERRGGEERVGEED AAEAAEADEAERARQ NALLFAEEDGEGAED
350-367	350-367	28	21	2031,8981	GLQEAAEERESAREEEEE A
350-370	350-370	29	22	2418,0419	GLQEAAEBRESAREEEEE AEQE
-----	373-417	30	23	4806,0408	GGEERVGEEDDEAAEAE AEAAEAERARQNALLFA EEDGEGAED
-----	373-404	31	24	3456,5513	GGEERVGEEDDEAAEAE AEAAEAERARQNALL
374-418	-----	32	25	4806,0408	GEERVGEEDDEAAEAAE AEAAEAERARQNALLFA EEDGEGAED
421-456	420-455	33	26	4058,7043	SQEETPGHRRKEAEGTE

10

20

30

40

					EGGEEEDDEEMDPQTID SL
** 421-472	420-471	12	27	5776,6294	SQEETPGHRRKEAEGTE EGGEEEDDEEMDPQTID SLIELSTKLHLPADDVV S
421-479	420-478	13	28	6618,0363	SQEETPGHRRKEAEGTE EGGEEEDDEEMDPQTID SLIELSTKLHLPADDVV SIIEVEVEE
460-472	459-471	34	29	1380,7249	STKLHLPADDVVS
355 _{+r13} - 362 _{+r14}	355 _{+r13} - 362 _{+r14}	35	30	≥ 946,4468	r13-AEERESAR-r14
481 _{+r3} - 488 _{+r4}	481 _{+r3} - 488 _{+r4}	16	31	≥ 862,3192	r3-EDEEAEEA-r4
446 _{+r5} - 453 _{+r6}	445 _{+r5} - 452 _{+r6}	17	32	≥ 961,4063	r5-EEMDPQTI-r6
----- -	485-522	36	33	3903,0180	NAPPEPVPPPRAAPAPT HVRSPQPPPPAPAPARD ELPD
----- --	485-521	37	34	3787,9911	NAPPEPVPPPRAAPAPT HVRSPQPPPPAPAPARD ELP
501 _{+r15} - 508 _{+r16}	500 _{+r15} - 507 _{+r16}	38	35	≥ 920,4828	r15-PTHVRSPQ-r16

10

20

30

40

50

【0039】

* r1はアミノ酸49~23のVGFタンパク質の配列もしくは配列の一部に対応する配列を表しており、VGFタンパク質のアミノ酸50に由来するr1は0~27アミノ酸長であってよい。これに相応してr2はアミノ酸58~64のVGFタンパク質配列もしくはその一部を表しており、VGFアミノ酸57に由来するR2は0~7アミノ酸長であってよい。その他のペプチド鎖r3~r16は上記に典型的に解説した図に相応してまとめられている。

【0040】

** VGFARP-12は酸化されていない、および単純に酸化されたペプチド(約16ダルトンの分子量の増加)として同定された。

【0041】

<適切なペプチド>:

ペプチドは、翻訳後修飾形または化学修飾形で存在している可能性があり、このような形態はそれらの質量、並びに質量分析による同定、さらに例えば逆相クロマトグラフィーにおけるようなクロマトグラフィーにおける溶出挙動に影響を及ぼす。特にこれらのペプチドは、検査されるサンプル中でグリコシル化、リン酸化、硫酸化、アミド化、酸化等がなされた状態で存在する可能性がある。例えば、非修飾ペプチドとしても酸化ペプチドとしても同定されたペプチドVGFARP-12のように、修飾ペプチドは主として酸化ペプチドとして存在している。

【0042】

これらのペプチドは、特に小数のアミノ酸がVGFタンパク質の対応する配列とは相違している場合、特に最高2アミノ酸がVGFタンパク質配列とは相違する場合に、VGFARPペプチドであると見なされる。加えて、VGFARPペプチド配列が当該VGFタンパク質のアミノ酸配列と比較して保存されている、すなわち変化していない少なくとも8アミノ酸を含有している限り、アミノ酸の点突然変異、欠失、挿入、並びにN末端および

C末端の延長が許容される。

【0043】

疾患の陽性検出のために、本発明の別の態様では、さらにこれらペプチド各々について1以上の同定されたペプチドの濃度を特異的方法で対照サンプル中の各々のペプチドの濃度と比較することにより、疾患の重症度を測定するために援用できることが予定されている。各ペプチド濃度と対照サンプル濃度との関係は、患者の重症度の決定を可能にする。

【0044】

対照サンプルとは、様々な対照からのプールサンプルである。検査対象のサンプルもまたプールサンプルであってよいが、このときに陽性結果が得られた場合には、引き続き個別検査が実施される。

【0045】

<適切な生物学的サンプル>：

生物学的サンプルは、好ましくは脳脊髄液(CSF)、または例えば血清、血漿、尿、便、涙液、滑液、喀痰等のようなサンプルであってよい。これは特に選択された検出方法(質量分析法、ELISA等)の感度に依存する。場合によっては、ホモジナイズされた組織サンプル、組織切片および生検標本もまた使用できる。したがって、本発明の別の実施形態では、検査すべきサンプルを調製するために、生検において入手された例えばヒトの組織サンプルから組織ホモジネートを作製することも予定されている。これらの組織は、例えば手動式ホモジナイザー、超音波ホモジナイザーまたは例えばウルトラトウラックス(Ultraturax)のような電動式ホモジナイザーを用いて粉碎し、引き続き

10

20

30

40

50

【0046】

<診断薬を作製するためのVGFARPペプチドの使用>：

さらに本発明は、本発明によるVGFARPペプチドまたは1つのVGFタンパク質のうちの少なくとも1つを、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病を診断するために使用することを含み、またVGFARPペプチド特異的結合特性に基づいて、これらの疾患を検出するための診断試薬を開発するために適合する抗体もしくは他の薬剤を入手するために、VGFARPペプチドを使用することを含んでいる。本発明はさらに、これらのペプチドに特異的に結合することにより、または逆にそれ自身の表面上にVGFARPペプチドを発現させることにより、例えばVGFタンパク質もしくはVGFARPペプチドの受容体のような結合パートナーの同定を可能にするような、ファージ粒子を入手するためのVGFARPペプチドの使用をも含んでいる。

【0047】

<VGFARPペプチドの検出方法>：

本発明では、VGFARPペプチドを検出するための様々な方法を使用できる。患者のサンプル内でVGFARPペプチドを特異的に検出することを可能にするすべての方法が適切である。適切な方法は、特に、例えば質量分析法もしくは液体クロマトグラフィーのような物理的方法、例えば逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)のような分子生物学的な方法、または例えば「酵素免疫吸着法(ELISA)」のような免疫学的検出方法である。

【0048】

<物理的検出方法>：

本発明の1つの実施形態は、本発明によるペプチドを定量または定性的に表示できる物理的方法の使用である。これらの方法には、特に質量分析法、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)分析等が含まれる。これらの方法では、検査すべきサンプルからの定量結果が、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、主としてアルツハイマー病に罹患している患者の集団および対象集団から入手された測定値と比較される。こ

これらの結果から神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の存在および/またはこの疾患の重症度を引き出すことができる。

【0049】

本発明の好ましい実施形態によると、サンプル中のペプチドは同定の前に、クロマトグラフィーによって、より詳細には、好ましくは逆相クロマトグラフィーによって分離されるが、特に好ましいのは高分解能の逆相高速クロマトグラフィー（RP-HPLC）を用いたサンプル中のペプチドの分離である。本発明のまた別の実施形態は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、エタノール等のような沈殿剤を使用してサンプルを分別する沈殿反応の実施である。こうして得られたフラクションは、その後、例えば質量分析法のような特定の検出方法に個別にかけられる。本発明のまた別の実施形態は、液相抽出の使用である。このために、サンプルは、例えばポリエチレングリコール（PEG）のような有機溶媒および生理食塩水の混合物と混合される。その後はそれらの物理的特性に基づいて、サンプル中の一定の内容物は有機相に、他の物質は水相に沈積するので、相互に分離し、引き続いてさらなる分析を行なうことができる。

10

【0050】

<逆相クロマトグラフィー>：

本発明の特に好ましい実施形態には、ヒト髄液中のペプチドを分離するための逆相クロマトグラフィー、特にトリフルオロ酢酸とアセトニトリルから構成された展開液を使用する、C18逆相クロマトグラフィーの使用が含まれる。例えば、その都度、使用した展開液容量の各1/100を含有するフラクションが収集される。こうして入手したフラクションは質量分析、好ましくは例えばアセトニトリル、水、トリフルオロ酢酸およびアセトンの混合液中に溶解させたL(-)フコースおよび -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸から構成されるマトリックス液を使用し、MALDI-質量分析計（マトリックス支援レーザー脱離イオン化）を用いて分析され、一定の質量の存在が確認され、有意性を定量される。これらの質量は、本発明によるペプチドVGFARP-1~VGFARP-38の質量に対応する。

20

【0051】

<質量分析法>：

本発明の好ましい実施形態によると、VGFARPペプチドの同定は質量分析測定法、好ましくはMALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化）質量分析法を用いて行うことができる。質量分析測定は、さらに好ましくは、その都度適切なペプチドの理論単一同位体質量を手掛りに計算される連続する質量信号の少なくとも1つを含んでいる。このとき実験誤差および自然アイソトープ分布を原因として、理論単一同位体質量からの軽度の偏差が発生する可能性がある。さらに測定方法に基づくMALDI質量測定では、ペプチドに1つのプロトンが添加され、それによって質量が1ダルトン上昇する。以下の質量は、我々が同定したペプチドの、適切なソフトウェア（ここではGPMAW4.02）を用いて計算した理論単一同位体質量に対応する。これらの理論単一同位体質量は、1つのサンプル中で個別に、または組み合わせて発生する可能性がある：VGFARP-1=3666, 8278/VGFARP-2=3950, 9875/VGFARP-18=3567, 7594/VGFARP-3=3595, 7907/VGFARP-4=3879, 9504/VGFARP-5=3401, 6852/VGFARP-6=3614, 8077/VGFARP-7=3685, 8448/VGFARP-19=3302, 6167/VGFARP-20=3173, 5741/VGFARP-21=3955, 9889/VGFARP-10=1336, 6735/VGFARP-22=2503, 1827/VGFARP-15=727, 3501/VGFARP-23=851, 4137/VGFARP-24=730, 3246/VGFARP-25=3745, 7343/VGFARP-26=1235, 5782/VGFARP-27=833, 4395/VGFARP-11=7518, 2744/VGFARP-28=2031, 8981/VGFARP-29=2418, 0419/VGFARP-30=4806, 0408/VGFARP-31=3456, 5513/VGFARP-32=4806, 04

30

40

50

08 / V G F A R P - 33 = 4058 , 7043 / V G F A R P - 12 = 5776 , 62
 94 / V G F A R P - 13 = 6618 , 0363 / V G F A R P - 34 = 1380 , 72
 49 / V G F A R P - 35 = 946 , 4468 / V G F A R P - 16 = 862 , 31
 92 / V G F A R P - 17 = 961 , 4063 / V G F A R P - 36 = 3903 , 01
 80 / V G F A R P - 37 = 3787 , 9911 / V G F A R P - 38 = 920 , 48
 28。

【0052】

記号 (~以上) は、当該 V G F A R P - ペプチドに対して任意の大きな質量ではなく、単に、このペプチドの末端に追加して存在するアミノ酸に基づいて生じる可能性がある質量であると理解しなければならない。これらペプチドの末端には、任意のアミノ酸が追加して存在するのではなく、V G F タンパク質の配列に基づいてこの配列位置に存在する可能性があるようなアミノ酸だけが存在する可能性がある。

10

【0053】

< V G F A R P ペプチドの配列の質量分析測定 > :

さらに、この実施形態を実際に使用する場合は、適切なペプチドの質量の同一性を確認することによって検出結果を保全することが可能であり、そうするのが賢明であるが、このときには1つのV G F タンパク質から誘導できるペプチド信号だけを考慮に入れる。この保全は好ましくは、例えばMS / MS分析のような質量分析法を用いてペプチド信号の同定を介して行う [11]。

【0054】

本発明の方法によって、V G F タンパク質の新規の特異的ペプチド (V G F A R P ペプチド) を同定し、その重要性を認識した。これらのV G F A R P ペプチドおよびそれらの誘導体を、ここではV G F A R P - 1 ~ V G F A R P - 38と称する。それらの配列は配列表に記載されている。V G F A R P ペプチドであるV G F A R P - 15、- 16、- 17、- 27、- 35およびV G F A R P - 38は、Nおよび/またはC末端において、関連するV G F タンパク質の対応する配列に相応して追加のアミノ酸を含んでいる可能性がある。本発明は、未修飾形、化学修飾形または翻訳後修飾形の、組換えまたは合成によって作製された、並びに生物学的サンプルから単離されたV G F A R P ペプチドをも含むものである。その差異、V G F A R P ペプチドが、ペプチド配列内の同一性および位置においてV G F タンパク質と一致する少なくとも8アミノ酸を有している限りにおいて、2つの

20

30

【0055】

< 分子生物学的検出法 > :

最後に、本発明はさらに、V G F A R P ペプチドに対応し、特に本発明によるV G F A R P ペプチドに対応した核酸、並びに関連するV G F タンパク質およびV G F ペプチドを間接的に測定および定量するためのそれらの使用も含んでいる。この中にはさらに、例えばmRNAの5' - もしくは3' - 非翻訳領域のような非コード化配列を示す核酸、または特異的ハイブリダイゼーション実験のために十分なV G F の核酸配列との配列対応を示す関連タンパク質、特にV G F A R P ペプチドを間接的に検出するために適した核酸も含まれる。

40

【0056】

このための1つの実施例には、例えば生検標本のような患者からの組織サンプルの入手およびそれに引き続くGeneBank受託番号NM__003378またはDDBJの受託番号Y12661を備える遺伝子に対応する、またはホモログV G F 変種に対応するRNA転写産物の濃度の測定が含まれる。このとき試験されるサンプルからの定量結果 (強度) がアルツハイマー病患者の集団および対象集団から入手された測定値と比較される。定量のためには、当業者に周知の方法で、例えば逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R)、定量リアルタイムP C R (A B I P R I S M (R) 7700配列検出システム、アプライド・バイオシステムズ [A p p l i e d B i o s y s t e m s] 社製、フォスターシティ、CA、米国)、i n s i t uハイブリダイゼーション法もしくはノ

50

ーザンプロット法のような方法を使用できる。その結果から、慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病の存在および/またはその重症度を引き出すことができる。

【0057】

<免疫学的検出法> :

本発明のさらに別の好ましい実施形態によると、VGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質の同定は免疫学的検出法、好ましくはELISA(酵素免疫吸着法)を使用して実施することができる。この免疫学的検出法は、少なくとも1つのVGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質を確認する。特異性を上昇させるために、さらに好ましくは、VGFARPペプチドの検出が同一分子内の相違す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、いわゆる「サンドイッチELISA」を使用することができる。しかし、VGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質を検出するためには、また別のシステム、例えば直接もしくは競合ELISAのようなELISAシステムを使用することもできる。さらにまた例えばRIA(ラジオイムノアッセイ)、EIA(酵素免疫測定法)、ELI-スポット法等のようなELISAに類似する別の検出法も、免疫学的検出法として適している。定量のための標準物質としては、生物学的サンプルから単離されたか、組換え作製されたか、または化学合成されたVGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質を使用することができる。1つ以上のVGFARPペプチドの同定は、例えば、一般にVGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質に対して生じた抗体を用いて実施できる。このような検出のために適した別の方法は、特にウェスタンブロッティング法、免役沈降法、ドットプロット法、プラズモン共鳴分析法(BIACORE(R)-Technologie、バイオコア・インターナショナル[Biocore International AB]社製、ウプサラ、スウェーデン)、ファージ粒子法、PNAs(ペプチド核酸法)、親和性マトリックス法(例、ABICAP-Technologie、ABIION Gesellschaft fuer Biowissenschaften und Technik mbH、ユーリッヒ、ドイツ)等である。一般に、特異的検出系を構成できるすべての物質/分子は、特異的にVGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質に結合するので、検出試薬として適している。

10

20

【0058】

<VGFARPペプチドおよび抗VGFARPペプチド抗体の入手> :

本発明の別の実施形態は、当業者にはよく知られている組換え発現系、クロマトグラフィー法および化学合成プロトコルを使用して、VGFARPペプチドを得ることである。このようにして入手したVGFARPペプチドは、特に、特定のVGFARPペプチドを定量するための標準物質として、またはVGFARPペプチド抗体を作製するための抗原として使用することができる。VGFARPペプチドを単離および入手するための当業者に周知の適切な方法には、ペプチドの組換え発現が含まれる。VGFARPペプチドを発現させるためには、特に例えば大腸菌のような細菌、サッカロミセス・セレビジエ(Saccharomyces cerevisiae)のような酵母細胞、例えばハスモンヨウ近似種(Spodoptera frugiperda、Sf-9)のような昆虫細胞、または例えば「チャイニーズハムスター卵巣(CHO)」細胞のような哺乳類細胞等の細胞系を使用できる。これらの細胞は、ATCC(アメリカンタイプカルチャーコレクション)から入手できる。VGFARPペプチドを組換え発現させるためには、例えば分子生物学的方法を用いて、プロモーターや抗菌性選択マーカー等のような適切な調節核酸配列と組み合わせて、VGFARPペプチドをコードする核酸配列が発現ベクター内に挿入される。このために適した1つのベクターは、例えばInvitrogen(インビトロゲン)社製のベクターpcDNA3.1である。このように入手したVGFARPペプチド発現ベクターは、その後、例えばエレクトロポレーション法によって適切な細胞中に挿入することができる。このように作製したVGFARPペプチドは、C末端もしくはN末端に、例えばポリ-ヒスチジン配列、ヘマグルチニン-エピトープ(HA-タグ)のようなペプチド、または例えばマルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)のようなタンパク質、または例えばGAL-4 DNA結合ドメインもし

30

40

50

くはG A L 4 - 活性化ドメインのようなタンパク質ドメインの非相同配列と融合させることができる。化学合成によるV G F A R Pペプチドの作製は、例えば様々な製造業者から入手できる全自動合成装置を使用して、メリフィールド(M e r r i f i e l d)の固相合成法によって行うことができる。

【0059】

本発明の別の実施形態は、逆相クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、等電点電気泳動法等、または例えば予備免疫沈降法、硫酸アンモニウム沈殿法、有機溶媒による抽出法等のようなその他の方法を用いた、生物学的サンプルまたは組換え発現系の細胞培地もしくは細胞溶解液からのV G F A R Pペプチドの単離である。本発明のさらに別の実施形態は、V G F A R Pペプチドを使用し
10
ての、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体の入手である。抗体の入手は、通常は当業者が精通している方法で行われる。1つの好ましい実施形態は、V G F A R Pペプチド特異的抗体の作製および入手であり、特に好ましい実施形態は、ネオエピトープ、つまりV G Fタンパク質には存在せず、V G F A R Pペプチド上にしか存在しないエピトープを認識するV G F A R Pペプチド特異的抗体の作製である。このような抗V G F A R Pペプチド抗体は、V G Fタンパク質の存在下でV G F A R Pペプチドの特異的な免疫学的検出を可能にする。ポリクローナル抗体は、例えばマウス、ラット、ウサギもしくはヤギのような実験動物の免疫によって作製することができる。モノクローナル抗体は、例えば実験動物の免疫と、引き続きハイブリドーマ技術を使用した、または例えばモルフォシス(M o r p h o S y s)社(マーティンスリード、ドイツ)のH u C A L (R)抗体バンク
20
のような抗体バンクを介してのような組換え実験の試み、またはその他の当業者にはよく知られた組換え作製方法を介して入手することができる。抗体は、例えばF a bフラグメントもしくはF a b 2フラグメント等のような抗体フラグメントの形状で使用することもできる。

【0060】

< V G F A R Pペプチド測定による治療の開発および監視 > :

また別の実施例は、神経疾患、特に慢性痴呆疾患、特にアルツハイマー病に対する開発中の療法の有効性を評価する目的での、上記のV G F A R PペプチドもしくはV G Fタンパク質の定量法もしくは定性法である。本発明はさらにまた、これらの疾患、特にアルツハイマー病に対する治療法の開発を目的とした、臨床試験のために適切な患者を識別するた
30
めにも使用できる。このときの検査すべきサンプルからの定量結果は、対照集団および患者群から入手された測定値と比較される。これらの結果から、治療薬の有効性、ないしは臨床試験に対する患者の適格性を導き出すことができる。治療および臨床試験のための有効性試験および正しい患者の選択は、治療薬の使用および開発の成功にとって極めて重要であるが、これまではアルツハイマー病に対してこれを確実に可能にする臨床的に測定可能なパラメータは利用できなかった[12]。

【0061】

< V G Fタンパク質、V G F A R Pペプチド、およびこれらの物質の発現および生物学的適合性を調節する物質の治療有効性についての精査 > :

このための実施例は、細胞系のインキュベーションと、V G Fタンパク質やV G F A R P
40
ペプチドを用いたその処理、V G Fタンパク質の発現を促進する例えばN G F、B N D FもしくはN T - 3のようなV G Fタンパク質の発現を促進する物質を用いた処理、または例えばプロホルモンコンバターゼのようなV G Fタンパク質からV G F A R Pペプチドへのプロセッシングを促進する物質を用いた処理とを含んでいる。それによって、V G Fタンパク質およびV G F A R Pペプチドの生物学的特性は神経疾患、特にアルツハイマー病と関連付けて確認することができる。融合タンパク質および融合ペプチドもまた細胞系の処理のために使用でき、例えばプロホルモンコンバターゼから構成される融合タンパク質は、細胞内部への融合タンパク質の輸送を促進するペプチド配列と融合する。例えばプロホルモンコンバターゼの考えられる融合パートナーの例は、H I V - T A T配列またはアンテナペディア配列等である。同様に、細胞系は、トランスフェクトされた細胞によって
50

VGFタンパク質もしくはVGFARPペプチドの発現を直接的もしくは間接的に引き起こすような、発現ベクターを用いてトランスフェクトすることができる。これらの発現ベクターは、特にVGFARPペプチド、VGFタンパク質、NGF、BDNF、NT-3もしくはプロホルモンコンバターゼをコードすることができる。上記のタンパク質を組み合わせたトランスフェクションもまた実施できる。あるいはまた、適切な細胞系を抗VGFタンパク質抗体もしくは抗VGFARPペプチド抗体、またはVGFの発現を抑制する核酸、例えばVGFアンチセンス核酸、VGFトリプレックス核酸、またはVGF-mRNAに向けられたリポザイムを用いて処理することもできる。抗NGF、抗BDNFもしくは抗NT-3抗体を用いての処理も、VGFタンパク質発現を抑制するために実施できよう。特に神経モデル系としてVGFとの関連で適切であると思われる細胞系は、このような試験に援用することができる。これらの試験のための読み出し系としては、特に処理された細胞の増殖率、それらの代謝活性、細胞のアポトーシス率、細胞形態の変化、細胞固有のタンパク質もしくはレポーター遺伝子の発現、または細胞死に対するマーカーとしてのサイトゾル細胞成分の遊離を確認する検査を使用できる。その他の試験系として、例えば神経疾患のためのモデルとして、特にアルツハイマー病のモデルとして通用する、特にマウスもしくはラットのような実験動物の適切な系統を使用できる。これらの実験動物は、VGFARPペプチドもしくはVGFタンパク質の濃度の調節を目的にする治療戦術の有効性を試験するために援用できる。さらに、実験動物において、例えばVGFタンパク質、VGFARPペプチド、NGF、BDNF、NT-3、プロホルモンコンバターゼ等のようなタンパク質およびペプチドも試験できる。その場合、これらのペプチドおよびタンパク質は、状況によってはそれらが血液脳関門および/または血液髄関門を良好に通過できるように製剤学的に調製することができる。製剤学的調製方法としては、特にリポソーム封入タンパク質およびペプチド、例えばHIV-TAT配列のような輸送配列と融合しているタンパク質およびペプチド等を使用できる。さらに、ペプチドおよびタンパク質は脂肪親和性の特性を獲得して、より容易に細胞内へ侵入できるように化学修飾することができる。水溶液中で難溶性であるペプチドは逆に、それらが親水性になり、例えば静脈注射可能な治療薬として使用できるように化学修飾することができる。経口投与するための感受性物質を胃中で保護するためには、耐酸性カプセルを使用できる。

10

20

【0062】

動物モデルを使用した試験における読み出しパラメータは、動物の余命期間、それらの挙動およびそれらの短期的記憶能力であってよい。実験動物のために適合する記憶テストの例は、「モリス水迷路(Morris water maze)検査」である。その他のパラメータとしては、例えば血液検査、脳血流量の測定、代謝試験のような身体機能の測定、VGFタンパク質およびVGFARPペプチドの発現率および疾患と関連して存在する他のタンパク質、並びに例えば脳のような組織での形態学および組織学的検査を援用することができる。

30

【0063】

本発明を下記では実施例を手掛りに図を参照しながら詳細に説明する。

【0064】

図1は、本発明によるペプチドと、図においてデータバンク受託番号NM__003378およびY12661と称されているVGFタンパク質の2つの既知の変種との間の整列を示している。VGFタンパク質の2つの変種において同一である配列位置は、NM__003378の配列では星印を付けて示されている。配列における相違は、アミノ酸コードによって黒い背景上の白い字で示されている。VGFARP-12、-13および-34の部分配列の終端もしくは始端の矢印は、特定配列が2列に渡って整列していることを示している。

40

【0065】

図2は、脳脊髄液からVGFARPペプチドを分離および濃縮するための、実施例2による逆相クロマトグラフィーを用いて記録されたクロマトグラムを示している。

【0066】

50

図3は、実施例2によるヒト脳脊髄液の逆相クロマトグラフィーを実施した後に、3986ダルトンの理論単一同位体質量を用いてVGFARP-7の実施例3によるMALDI質量分析測定によって発生したスペクトルを示している。VGFARP-7は、アミノ酸26~62のVGF配列(受託番号Y12661)に対応する。

【0067】

図4は、相対定量質量分析法としてのMALDIにより得られたデータを示している。サンプルは様々な量の様々な標準ペプチドと混合され、これらの標準信号の強度も代表的なサンプル信号の強度も確認された。標準物質の全信号強度は0.64 μ M(=1)の濃度での信号強度へ標準化された。各ペプチドは、信号強度対濃度の個別の典型的比率を示しており、これはこの図において曲線の傾斜に基づいて読み取ることができる。

10

【0068】

図5は、本発明によるペプチドVGFARP-13の、実施例4に従ったMS/MSフラグメントスペクトルを示している。

【0069】

上方の図形：測定の実データ。

【0070】

下方の図形：VGFARP-13の転換され、逆重畳化された質量スペクトル。

【0071】

ピークパターンはVGFARP-13に特徴的である。VGFARP-13はアミノ酸421~479のVGF配列(受託番号Y12661)に対応する。

20

【0072】

図6A~6Cは、対照群患者における信号強度とアルツハイマー病患者のサンプル中の信号強度とを比較した、統合MALDI質量分析測定による様々なVGFARPペプチドの比較を「箱ひげ図(Box-Whisker-Plots)」の形で示している。

【実施例1】

【0073】

VGFARPペプチドを測定するための脳脊髄液の入手
 髄液もしくは脳脊髄液は4つの脳室およびクモ膜下腔に含まれている液体であり、特に側室の脈絡叢内で形成される。脳脊髄液の採取はほとんどは腰椎穿刺によって、まれには後頭下穿刺または脳室穿刺によって行う。脳脊髄液を採取するために腰椎穿刺(脊椎穿刺)を行う場合は、長い中空針を用いて第3~4腰椎または第4~5腰椎棘突起間での脊髄クモ膜下腔を穿刺して髄液を入手する。引き続きサンプルを2000 \times gで10分間遠心し、上清を-80 $^{\circ}$ Cで保存する。

30

【実施例2】

【0074】

VGFARPペプチドの質量分析測定を行うための脳脊髄液(CSF)中のペプチドの分離

CSF中のVGFARPペプチドを質量分析測定により検出するためには、本実施例においてペプチド性内容物を分離することが必要である。このサンプル前処理は、本発明によるペプチドを濃縮するため、および測定を妨害する可能性のある成分から分離するために役立つ。分離方法として逆相クロマトグラフィーを実施する。この場合、様々なRPクロマトグラフィー樹脂および溶離剤は同等に適合する。下記では例として、バイダック(Vydac)社製の4mm \times 250mmサイズのC18逆相クロマトグラフィーカラムを使用したVGFARPペプチドの分離を説明する。次の組成の展開剤を使用した：展開剤A：0.06%(v/v)トリフルオロ酢酸、展開剤B：0.05%(v/v)トリフルオロ酢酸、80%(v/v)アセトニトリル。クロマトグラフィーはアジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies)社製のマイクロフローセルを備えたアジレント・テクノロジーズ社製HP-ChemStation1100を使用して33 $^{\circ}$ Cで実施した。サンプルにはヒト脳脊髄液を使用した。髄液440 μ Lに水を添加して1650 μ Lへ希釈し、pHを2~3へ調整し、サンプルを18000 \times gで10分間遠心し、最

40

50

後にこのように前調製したサンプル1500 μ Lをクロマトグラフィーカラムに添加した。クロマトグラフィー条件は次の通りであった：時点0分までは5%展開剤Bを使用し、時点1~45分までは展開剤Bの濃度を50%まで持続的に増加させ、時点45~49分までは展開剤Bの濃度を持続的に100%まで増加させ、引き続き時点53分までは一定の100%緩衝液Bを使用する。クロマトグラフィー開始10分後に、各0.5mLずつの96フラクションの収集を開始する。ここに記載した試験条件下で作製した脳脊髄液サンプルのクロマトグラムは図2に示した。

【実施例3】

【0075】

MALDI質量分析を用いたペプチドの質量の確認

質量分析のためにはMALDI(マトリックス支援レーザー吸着イオン化)-TOF-質量分析計においてペプチドの典型的陽イオンスペクトルを作成する。適切なMALDI-TOF-質量分析計は、パーセプティブ・バイオシステムズ(PerSeptive Biosystems、フラミンガム)社(Voyager-DE、Voyager-DE PROもしくはVoyager-DE STR)またはブルーカー・ダルトニック(Bruker Daltonik、ブレーメン)(BIFLEX)社によって製造されている。サンプルを調製するためには、サンプルを典型的には有機酸から構成されるマトリックス物質と混合する。ペプチドのため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-ヒドロキシケイ皮酸、-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸および2,5-ジヒドロキシ安息香酸である。本発明によるVGFA RPペプチドを測定するためには、凍結乾燥させた500 μ Lヒト脳脊髄液に対応する逆相クロマトグラフィー後に得られる等量を使用する。クロマトグラフィーにかけたサンプルを15 μ Lのマトリックス液に溶解させる。このマトリックス液は例えば49:49:1:1の容積比のアセトニトリル、水、トリフルオロ酢酸およびアセトンから構成される混合溶媒中に溶解させた10g/Lの-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸および10g/L L(-)フコースを含有している。この溶液から0.3 μ LをMALDI担体板に移し、乾燥させたサンプルをパーセプティブ・バイオシステムズ製のMALDI質量分析計Voyager-DE STR内で分析する。測定は「ディレイド・エクストラクション(遅延引き出し)」(TM)を用いる「リニアモード」で行われる。本発明によるVGFA RPペプチドを測定するための実施例は図3に示した。

【0076】

MALDI-TOF質量分析法は、例えば本発明によるVGFA RPペプチドのようなペプチドがそれによって検出器飽和が回避される質量分析計の動的測定範囲内にある濃度で存在する場合は、これらのペプチドを定量するために使用できる。これはマトリックス液1 μ L当たり33.3 μ Lの髄液当量濃度において脳脊髄液中の本発明によるVGFA RPペプチドを測定する場合に該当する。各ペプチドに対して測定信号と濃度との間に特異的比率があるが、これはMALDI質量分析法を主としてペプチドの相対定量に援用できることを意味する。この実態は図4に示した。サンプルを相違する量の様々な標準ペプチドと混合すると、これらの標準信号の強度もサンプル信号の強度も確認することができる。例えば図4は相対定量MS法としてのMALDI測定を示している。標準物質の全信号強度は0.64 μ Mの濃度(=1)で標準化した。各ペプチドは曲線の傾斜に基づいて読み取ることができる信号強度対濃度の個別の典型的な比率を示している。

【実施例4】

【0077】

VGFA RPペプチドの質量分析法による同定

本発明によるVGFA RPペプチドを定量するためには、実施例2にしたがって脳脊髄液の逆相クロマトグラフィーによって入手したフラクション内のペプチドの分析対象の質量信号が実際に本発明によるVGFA RPペプチドであることを確認しなければならない。

【0078】

これらのフラクションでの本発明によるペプチドの同定は、例えばナノスプレーMS/M

10

20

30

40

50

Sを用いて行われる[11]。質量分析計内のVGFARPペプチドイオンは、特異的 m/z （質量/負荷）に基づいて質量分析計内で当業者によく知られた方法で選択される。この選択されたイオンは、引き続いて例えばヘリウムもしくは窒素のような衝撃ガスを用いた衝突エネルギーを供給することによってフラグメント化され、結果として生じたVGFARPペプチド/フラグメントが統合分析装置内の質量分析計で検出され、対応する m/z 値が測定される（タンデム・質量分析計の原理）[13]。ペプチドのフラグメント化挙動は、例えば50ppmの質量精度においてその中にVGFタンパク質の配列が登録された配列データバンクにおけるコンピュータ支援検索方法[14]を使用する本発明によるVGFARPペプチドの著明な同定を可能にする。この特殊な例では、アプライド・バイオシステムズ・サイエックス（Applied Biosystems - Sciex、米国）社製の四重極TOF装置のモデル「キュースター・パルサ（QStar - Pulsar）」を用いて質量分析を実施した。典型的なMS/MSフラグメントスペクトルを図5に示した。

10

【実施例5】**【0079】**

患者サンプル中の相対濃度と対照サンプル中の相対濃度とを比較するためのVGFARPペプチドの質量分析による同定

222例の臨床サンプル、すなわち対照サンプル82例およびアルツハイマー病に罹患している患者のサンプル130例に対して、実施例1および2にしたがったサンプル前調製後に実施例3にしたがって本発明によるVGFARPペプチドの流動式MALDI測定を実施した。典型的MALDI信号強度は、図6A~6Cに「箱ひげ図（Box - Whisker - Plots）」の形で描出した。図6に示した「箱ひげ図」は、アルツハイマー病の29~45例のサンプル、ないしは13~44例の対照サンプル各々について各実験が実施された測定値に基づいている。表示した「箱ひげ図」は、対照サンプル中の様々なVGFARPペプチドの統合MALDI質量分析法による信号強度とアルツハイマー病患者のサンプルにおけるMALDI信号強度との比較を可能にする。このとき、「箱」、即ち図6A~6Cのグラフ中の柱は各々がその中に各MALDI信号強度の50%が存在するMALDI信号強度の範囲を含んでおり、「箱」から出て上方および下方を指している線（「ひげ」）は、各々が最高信号強度（上方四分位）を示している測定値の25%が存在する、ないしは各々が最低信号強度（下方四分位）を示している測定値の25%が存在する範囲を示している。柱を横断している線は中央値を示し、柱内の破線は平均値を示している。

20

30

【0080】

本文書の見出しは単に本文を構造化するためだけに決定した。これらは、記載された実情を限定するまたは制限することを目的に決定したものではない。すべての実施例は本発明の考えを詳細に特徴付けることを意図しているが、本発明の範囲を限定することを意図してはいない。

【参考文献】**【0081】**

1. Marcinkiewicz, M., N.G. Seidah, and M. Chretien. 1996. Implications of the subtilisin/kexin-like precursor convertases in the development and function of nervous tissues. *Acta Neurobiol Exp.* 56:287-98.

2. Salton, S.R., G.L. Ferri, S. Hahm, S.E. Snyder, A.J. Wilson, R. Possenti, and A. Levi. 2000. VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* 21:199-219.

3. Hahm, S., T.M. Mizuno, T.J. Wu, J.P. Wisor, C.A. Priest, C.A. Kozak, C.N. Boozer, B. Peng, R.C. McEvoy, P. Good, K.A. Kelley, J.S. Takahashi, J.E. Pintar, J.L. Roberts, C.V. Mobbs, and S.R. Salton. 1999. Targeted deletion of the *Vgf* gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance [see comments]. *Neuron.* 23:537-48.

4. Levi, A., J.D. Eldridge, and B.M. Paterson. 1985. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science.* 229:393-5.

5. Salton, S.R. 1991. Nucleotide sequence and regulatory studies of VGF, a nervous system-specific mRNA that is rapidly and relatively selectively induced by nerve growth factor. *J Neurochem.* 57:991-6.

6. Eagleson, K.L., L.D. Fairfull, S.R. Salton, and P. Levitt. 2001. Regional differences in neurotrophin availability regulate selective expression of VGF in the developing limbic cortex. *J Neurosci.* 21:9315-24.

7. Snyder, S.E., J.E. Pintar, and S.R. Salton. 1998. Developmental expression of VGF mRNA in the prenatal and postnatal rat. *J Comp Neurol.* 394:64-90.

8. Snyder, S.E., H.W. Cheng, K.D. Murray, P.J. Isackson, T.H. McNeill, and S.R. Salton. 1998. The messenger RNA encoding VGF, a neuronal peptide precursor, is rapidly regulated in

10

20

30

40

the rat central nervous system by neuronal activity, seizure and lesion. *Neuroscience*. 82:7-19.

9. Wisor, J.P., and J.S. Takahashi. 1997. Regulation of the vgf gene in the golden hamster suprachiasmatic nucleus by light and by the circadian clock. *J Comp Neurol*. 378:229-38.

10. Trani, E., T. Ciotti, A.M. Rinaldi, N. Canu, G.L. Ferri, A. Levi, and R. Possenti. 1995. Tissue-specific processing of the neuroendocrine protein VGF. *J Neurochem*. 65:2441-9. 10

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

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

13. Papayannopoulos, I.A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev*:49-73. 20

14. 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.

【図面の簡単な説明】 30

【0082】

【図1A】VGFARPペプチドとデータバンク受託番号NM_003378およびY12661に対応する2つの既知のVGFタンパク質とを整理させた図である。

【図1B】VGFARPペプチドとデータバンク受託番号NM_003378およびY12661に対応する2つの既知のVGFタンパク質とを整理させた図である(続き)。

【図2】脳脊髄液からVGFARPペプチドを分離および濃縮するための逆相クロマトグラフィーの図である。

【図3】VGFARP-7の実施例での質量分析測定(MALDI)の図である。

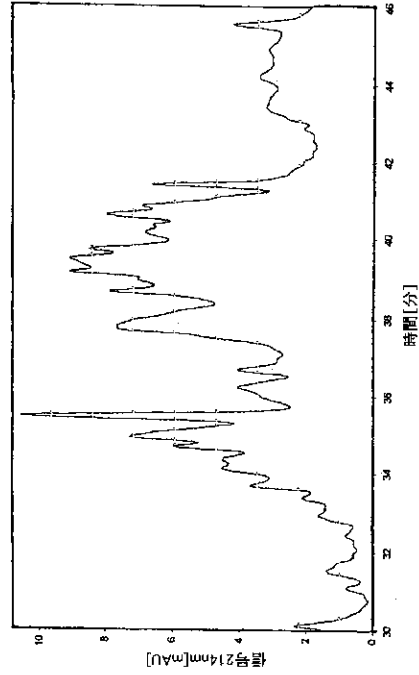
【図4】相対定量質量分析法としてのMALDIの図である。

【図5】ペプチドVGFARP-13の実施例でのMS/MSフラグメントスペクトルの図である。 40

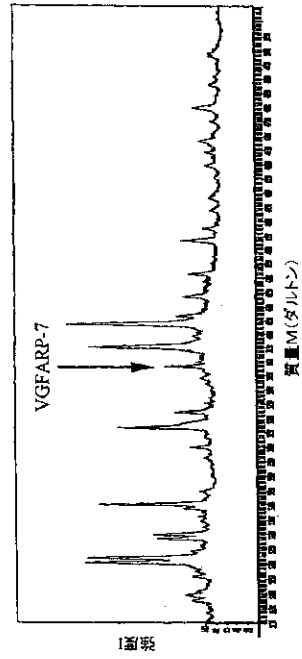
【図6A】アルツハイマー病患者および対照群患者におけるVGFARP-1、VGFARP-2、VGFARP-18、VGFARP-3、VGFARP-4、VGFARP-5、VGFARP-6、およびVGFARP-7の濃度を定量的に比較するための「箱ひげ図(Box-Whisker-Plots)」である。

【図6B】アルツハイマー病患者および対照群患者におけるVGFARP-19、VGFARP-20、VGFARP-21、VGFARP-10、VGFARP-22、VGFARP-28、VGFARP-29、VGFARP-30/32、およびVGFARP-31の濃度を定量的に比較するための「箱ひげ図(Box-Whisker-Plots)」である。 50

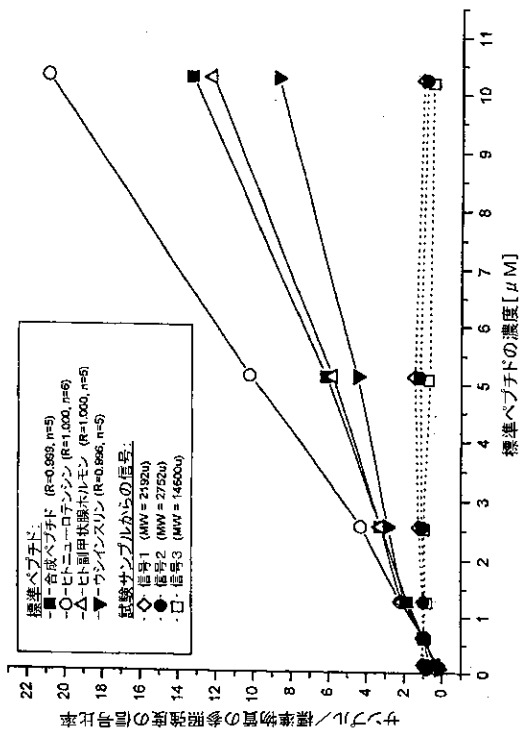
【 図 2 】



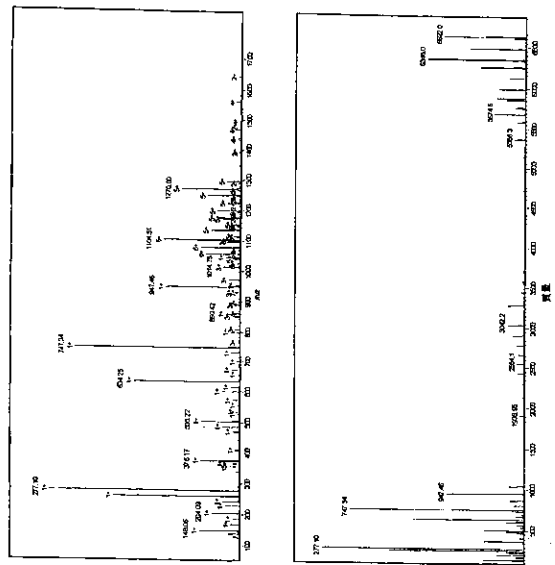
【 図 3 】



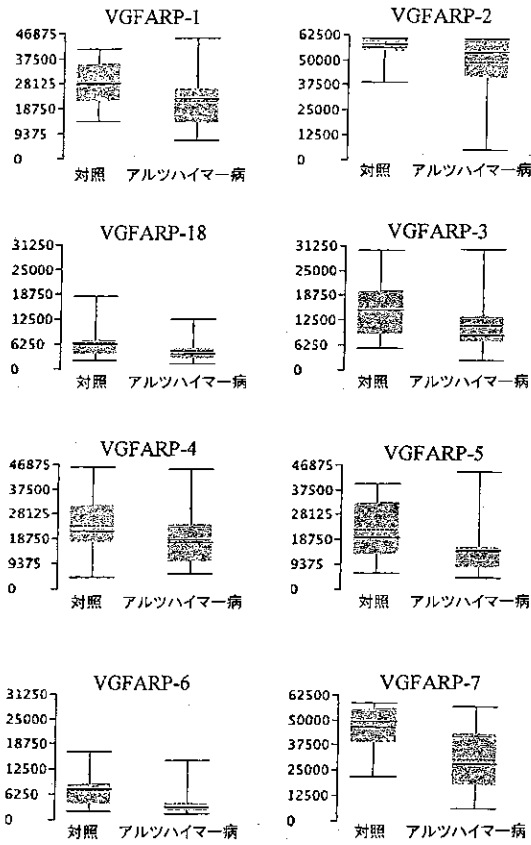
【 図 4 】



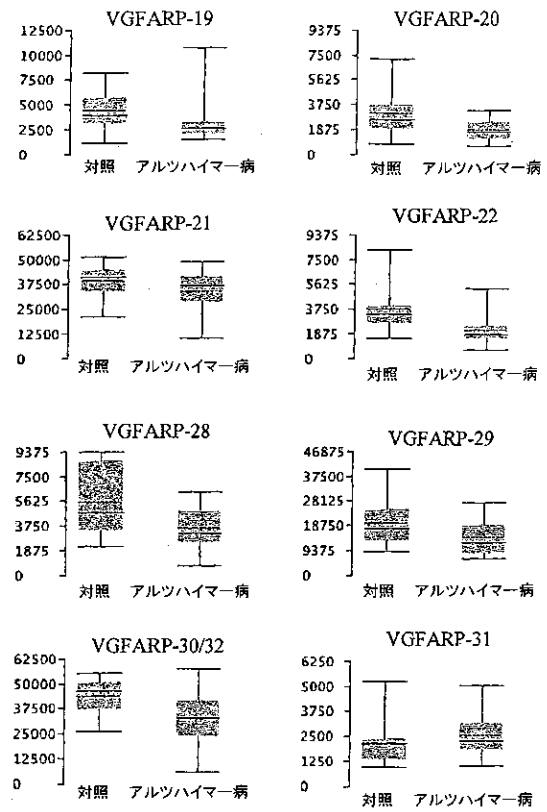
【 図 5 】



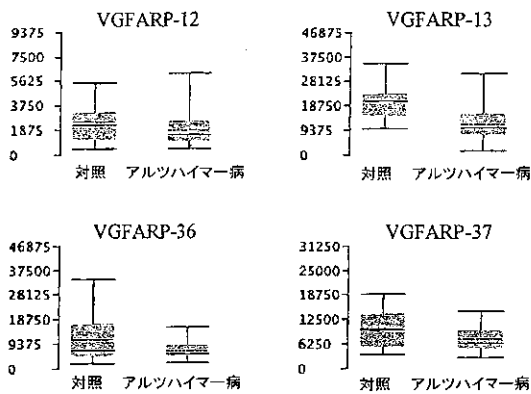
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【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
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

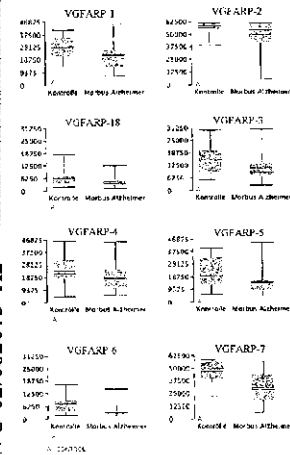
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/082075 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 53/08 (71) Anmelder *globalis Bestimmungsgesellschaften mit Ausnahme von* (52) BIOVISION AG [DE/DE]; Peador-Lymer-Strasse 5, 30625 Hannover (DE).
- (21) Internationales Akteuzeichen: PCT/DE02/01576
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. April 2002 (08.04.2002) (72) Erfinder: und (75) Erfinder/Anmelder *(nur für US):* LAMPING, Norbert [DE/DE]; Siegesstrasse 8, 30775 Hannover (DE); ZICHT, 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, 30763 Hannover (DE); HESS, Rüdiger [DE/DE]; Bülthausen-Strasse 2, 30629 Hannover (DE); SELLE, Hartmut [DE/DE]; Eickenriede 15, 30459 Hannover (DE); KELLMANN, Markus [DE/DE]; Heinrich-Stammes-Strasse 3, 30771 Hannover (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101.17.9.51.4 6. April 2001 (06.04.2001) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

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

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS CHRONISCH-DEMENTIELLER ERKRANKUNGEN, ZUGEHÖRIGE PEPTIDE UND NACHWEISREAGENZTEN



(57) Abstract: The invention relates to defined peptides and the quantitative determination thereof in biological samples from patients suffering from Alzheimer's disease, in relation to the concentration thereof in a control group. The invention also relates to the use of said peptides for therapeutic purposes. The inventive peptides come from a protein precursor having the corresponding gene and are processed in a specific manner and modified in a post-translational manner. Changes in the concentrations of said peptides indicate Alzheimer's disease, and the direction of the change in concentration is specific for each peptide. Alzheimer's disease is detected by identifying the peptides individually or in groups. The invention can also be used to control the course of Alzheimer's disease, for the prognosis thereof and for the development of therapeutic agents to combat the same.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft definierte Peptide und deren quantitative Bestimmung in biologischen Proben von Patienten, die an Morbus Alzheimer erkrankt sind, relativ zu deren Konzentration in einer Kontrollgruppe. Ausserdem betrifft die Erfindung die Verwendung der Peptide zu therapeutischen Zwecken. Die erfindungsgemässen Peptide entstammen aus einem Proteinvorläufer mit dem entsprechenden Gen und sind in spezifischer Art und Weise sukzessive und posttranslational modifiziert. Änderungen der Konzentrationen dieser Peptide zeigen eine Morbus Alzheimer Erkrankung an. Dabei ist die Richtung der Konzentrationsänderung für jedes dieser Peptide spezifisch. Der Nachweis von Morbus Alzheimer erfolgt durch eine Identifizierung der Peptide einzeln oder in Kombinationen. Die Erfindung findet darüber hinaus Verwendung zur Verlaufskontrolle von Morbus Alzheimer, zur Prognose und zur Entwicklung von Therapeutika gegen Morbus Alzheimer.



WO 02/082075 A2

WO 02/082075 A2 

- (74) Anwalt: LÄUFER, Martin; Gramm, Lins & Partner
Göhr, Freudenthaler 13, 30173 Hannover (DE); OAPI Patent (BI, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NI, NK, TD, ZG).
- (81) Bestimmungsstaaten *national*: AF, 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, GR, HT, 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.
- Erklärungen gemäß Regel 4.17:**
Insichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten.
Prüfererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv), nur für US
- Veröffentlicht:**
— *ohne internationalen Recherchausschnitt und erneut zu veröffentlichen nach Fehlen des Berichts*
- (84) Bestimmungsstaaten *regional*: ARIPO-Parat (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, ND, NI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), europäisches 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); *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.*

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 1 -

**Verfahren zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen,
zugehörige Peptide und Nachweisreagenzien**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer chronischen, demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine chronisch-demenzielle Erkrankung, insbesondere von Morbus Alzheimer oder verwandten neurologischen Erkrankungen, z.B. Lewy-Body Demenz oder vaskuläre Demenz. Weiterhin betrifft die Erfindung Peptide, die für den Nachweis des Vorhandenseins dieser Erkrankungen, zur Verlaufskontrolle der Erkrankungen und des Grades der Erkrankungen aufgefunden wurden. Außerdem betrifft die Erfindung Nachweisreagenzien wie Antikörper und Nucleinsäuren und dergleichen, über die diese Peptide, bzw. die entsprechenden Nucleinsäuren nachgewiesen werden können. Weiterhin betrifft die Erfindung pharmazeutische Anwendungen, die VGF, VGF-Peptide, VGF-Antikörper, VGF-Nucleinsäuren, VGF-Protein-Antagonisten, VGF-Protein-Agonisten, VGF-Peptid-Agonisten oder VGF-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.

Bei den Peptiden handelt es sich um Fragmente des Proteins VGF, das auch als „neuroendocrine specific protein VGF“ bezeichnet wird. In der Literatur wird die Abkürzung VGF auch für das Protein „vaccinia growth factor“ oder für „vaccinia virus growth factor“ und für „Vascular Permeability Factor“ verwendet, wobei diese Proteine nicht dem VGF-Protein entsprechen, das Gegenstand dieser Erfindung ist.

30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 2 -

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.

10 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-

15 Demenzen bekannt: die vaskuläre Demenz, die Lewy-Body Demenz, die Binswanger-Demenz sowie Demenzielle Erkrankungen, die als Begleiteffekt anderer Krankheiten, wie Parkinsonscher Krankheit, Huntington-Disease, Pick's-Disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinger-Krankheit, Kreuzfeldt-Jakob-Krankheit

20 usw. vorkommen.

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch folgende Symptome auszeichnet: Abnahme der geistigen Fähigkeiten, Konfusion und herabgesetzte Selbsterhaltungs-

25 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

30 sichere Nachweis der Erkrankung. Diese histopathologischen

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 3 -

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
5 „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
10 criteria".

Diese Systeme verwenden eine Reihe von neuropsychologischen Tests, um eine Morbus Alzheimer Diagnose treffen zu können, nicht jedoch objektiv messbare klinische Parameter.

15

Die Diagnose von Morbus Alzheimer ist auch deshalb schwierig, da sie, ebenso wie andere demenzielle Erkrankungen, schleichend einsetzt und mit langsam fortschreitender Zerstörung von Nervenzellen im Gehirn verbunden ist.

20

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
25 dieser Erkrankung möglich.
30

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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

4 -
zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere
von Morbus Alzheimer, zur Verfügung zu stellen. Außerdem liegt
die Aufgabe zugrunde, eine neue Therapie zur Behandlung von
Morbus Alzheimer zur Verfügung zu stellen, da bisher nur unbe-
5 friedigende Therapieansätze zur Behandlung von Morbus Alzhei-
mer zur Verfügung stehen.

Definitionen:

10

VGF-Proteine oder Peptide entsprechend den Accession Nr.
NM_0033378 und Y12661.

Die von den Nukleinsäuresequenzen NM_0033378 und Y12661 abge-
leiteten Peptide werden auch als VGF-Proteine bezeichnet und
15 schließen alle natürlich vorkommenden Allele, Mutanten und Po-
lymorphismen von VGF-Proteinen sowie gewebespezifisch expre-
mierte VGF-Varianten ein. Insbesondere sind auch VGF-Varianten
eingeschlossen die aufgrund von Erkrankungen oder als Folge
von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch demen-
20 zeillen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer auftreten.
Eingeschlossen sind sowohl VGF-Proteine mit, als auch ohne Si-
gnalsequenz, Pro-Formen von VGF-Proteinen die noch nicht pro-
zessiert sind, sowie bereits prozessierte VGF-Proteine, lösli-
che VGF-Proteine und membranständige VGF-Proteine, wobei die
25 membranständigen VGF-Proteine sowohl über transmembranäre Ami-
nosäuresequenzen mit einer Zell- oder Organellmembran verbun-
den sein können, als auch über eine posttranslationale Modifi-
kation, z.B. einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker.
Ferner sind eingeschlossen Variationen der VGF-Sequenz, die
30 durch alternatives Splicing, durch alternative Translations-
start- und -endpunkte, durch RNA-Editing, durch alternative
posttranslationale Modifizierungen, sowie weitere durch in der
Natur vorkommende Mechanismen entstandene VGF-Protein-
Varianten.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 5 -

VGFP-~~Peptide~~.

Nachfolgend werden VGF-Peptide und VGF-Peptid-Varianten als VGFP- ("VGF Alzheimer related peptide") Peptide bezeichnet.

5 VGFP-Peptide können sich von beiden eingangs genannten VGF-Sequenzen (NM_003378 und Y1266) sowie von weiteren VGF-Protein-Varianten, die möglicherweise in der Natur vorkommen, ableiten. Außerdem können VGFP-Peptide zwei punktmutierte, zwei deletierte oder zwei zusätzlich intern eingefügte Ami-

10 nosäuren, sowie N-terminale und/oder C-terminale Verlängerungen beinhalten. Dabei müssen sie jedoch mindestens 8 Aminosäuren aus der VGF-Proteinsequenz beibehalten. Als N- oder C-terminale Verlängerung kommen nur solche Aminosäuren in Frage, die in der VGF-Proteinsequenz an dieser Sequenzposition im

15 VGFP-Protein vorkommen. Außerdem werden Peptide, die sich aus natürlich vorkommenden VGF-Polymorphismen und aus natürlich vorkommenden VGF-Mutanten ableiten, als VGFP-Peptide bezeichnet. VGFP-Peptide können auch mit posttranslationalen

20 Modifikationen, wie z.B. Glykosilierungen und Phosphorylierungen und/oder in chemisch modifizierter Form, vorzugsweise als Peptid-Oxide, vorliegen. Zum Beispiel wurde VGFP-12 sowohl als nicht oxidiertes, als auch als oxidiertes Peptid identifiziert.

25 Chemisch oder posttranslational modifizierte Peptide.

Ein chemisch oder posttranslational modifiziertes Peptid kann sowohl aus D- als auch aus L-Aminosäuren, sowie aus Kombinationen von D- und L-Aminosäuren bestehen. Außerdem können in diesen Peptiden ungewöhnliche Aminosäuren, d.h. Aminosäuren,

30 die nicht zu den 20 Standardaminoäuren 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,

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 6 -

alpha-Aminoadipinsäure, Diaminobuttersäure, 4-Aminobenzoesäure, Homocystein, alpha-Aminopenicillansäure, Histamin, Ornithin, Glycin-Prolin Dipeptid, Hydroxylysin, Prolin-Hydroxyprolin Dipeptid, Cystathionin, Ethionin, Seleno-

5 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-, Biotinyl-, Stearoyl-, Palmityl-, Lipoyl-, C-Mannosyl-, Phosphor- und Sulfatgruppen, Glycosilierungen, Amidierungen, Deamidierungen, Pyroglutaminsäure, Citrullin, usw. möglich.

Nukleinsäuren:

Als Nukleinsäuren werden DNA, RNA und DNA-RNA-Hybridmoleküle

15 sowohl natürlichen Ursprungs, als auch synthetisch oder rekombinant hergestellt angesehen. Ferner eingeschlossen sind chemisch modifizierte Nukleinsäuren, die modifizierte Nukleotide mit hoher in vivo Stabilität, wie z.B. Phosphorothioate, enthalten. Solche stabilisierten Nukleinsäuren finden bereits bei

20 der Anwendung von Ribozym-, Antisense- und Triplexnukleinsäure-Techniken Verwendung.

Signifikanz:

Der Begriff signifikant wird im Sinne der Verwendung des Begriffs der Signifikanz in der Statistik verwendet. In dieser

25 Patentanmeldung wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 90 %, vorzugsweise 95 % weiter vorzugsweise 99 % als signifikant definiert.

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.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 7 -

Spezifität:

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

Überraschenderweise wurde gefunden, dass nur 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 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 VGF-Protein oder VGFARP-Peptid Konzentration, mit dem Ziel der Einstellung des Patienten auf normale VGF- oder VGFARP-Werte kann somit
20 therapeutisch angewendet werden.

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 VGF-Peptide, welche von der Sequenz mit der Gene Bank Accession No. NM_003378 oder der Accession No. Y12661 der DNA Data Bank of Japan abgeleitet sind in einer biologischen Probe eines Individuums. Da diese VGF-Peptide mit der Erkrankung vermutlich in einem ursächlichen Zusammenhang stehen, beinhaltet die vorliegende Erfindung auch die Verwendung dieser Peptide zur Therapie von Morbus Alzheimer oder verwandter neurologischer Erkrankungen. Diese Peptide oder Peptidfragmente werden als "VGF derived Alzheimer related

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 8 -

peptide" (VGFARP) bezeichnet und sind nummeriert mit VGFARP-1 bis VGFARP-38. Die beiden VGF-Protein-Varianten NM_003378 und Y12661 unterscheiden sich nur an 13 Positionen ihrer Aminosäuresequenz und von beiden VGF-Proteinen wurden VGF-Peptide identifiziert, die eine Unterscheidung zwischen Morbus Alzheimer und der Kontrollgruppe ermöglichen. Die VGFARP Peptide VGFARP-11 und -32 stammen von der VGF-Variante mit der Accession Nr. Y12661, die VGFARP-Peptide VGFARP-25, -30, -31, -36 und -37 stammen von der VGF-Variante mit der Accession Nr. NM_003378. Alle übrigen VGFARP-Peptide können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz von beiden VGF-Varianten abstammen. Da bisher schon VGFARP-Peptide, abstammend von zwei verschiedenen VGF-Varianten identifiziert wurden, ist davon auszugehen, dass noch weitere VGFARP-Peptide existieren, die von diesen oder anderen VGF-Varianten abstammen. Diese VGFARP-Peptide sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Zur Lösung der Aufgabe gibt die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Morbus Alzheimer unter Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Markerpeptids in einer biologischen Probe eines Patienten, verglichen mit der Konzentration des Markerpeptids in einer Kontrollprobe an, bei dem folgende Punkte erfüllt sein müssen: 1. Als Markerpeptid wird wenigstens ein VGFARP-Peptid oder ein Peptid, das von den Nukleinsäuren mit den Accession Nummern NM_003378 oder Y12661 oder homologen Sequenzen abgeleitet ist verwendet. 2. Es tritt 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 auf. 3. Eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der vorgenannten Weise wird als positives Nachweisergebnis für eine neurologische Erkrankung, vorzugsweise Morbus Alzheimer, gewertet.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 9 -

Dabei kann für ein bestimmtes VGFARP-Peptid grundsätzlich entweder nur ein Anstieg der Peptidkonzentration bei Morbus Alzheimer Patienten auftreten, oder es kann für dieses VGFARP-Peptid grundsätzlich nur eine Verminderung der Peptidkonzentration bei Morbus Alzheimer Patienten auftreten. Für ein definiertes VGFARP-Peptid kann nicht gleichzeitig bei einem individuellen Morbus Alzheimer Patienten eine erhöhte und bei einem anderen Morbus Alzheimer Patienten eine, relativ zur Kontrollgruppe verminderte VGFARP-Peptidkonzentration auftreten. Wie bei nahezu allen medizinischen Diagnosen von Erkrankungen sind falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse grundsätzlich möglich, d.h., dass in wenigen Einzelfällen eine falsche Diagnose erfolgt, da sich die Konzentration der VGFARP-Peptide bei Morbus Alzheimer Patienten nicht mit hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit von der Konzentration der VGFARP-Peptide bei Kontrollproben unterscheidet. Dieses Problem kann jedoch durch Mehrfachkontrollen behoben werden.

Im Sinne dieser Erfindung werden Peptide, die als Fragmente der VGF-Sequenz aufgefasst werden können, als VGFARP-Peptide bezeichnet. Sie umfassen von VGF abgeleitete homologe Peptide. Sie umfassen Abkömmlinge natürlich vorkommender Allele dieser Peptide und homologe Mutanten, insbesondere punktmutierte Mutanten mit vorzugsweise nicht mehr als zwei von VGF abweichenden Aminosäuren. Bevorzugte Marker nach der Erfindung sind im Sequenzprotokoll angegeben und sind mit VGFARP-1 bis VGFARP-38, entsprechend Seq. ID 1 bis 35 benannt. Die Sequenzen der VGFARP-Peptide sind in Abbildung 1 und in Tabelle 1 dargestellt. Die Zuordnung der VGFARP-Peptide zu ihrer jeweiligen Seq. ID No. ist in Tabelle 1 dargestellt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um ein Verfahren, bei welchem spezifische Biomarker erfasst werden,

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 10 -

die bei neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere bei Morbus Alzheimer, in ihrer Konzentration verändert sind und die die Krankheit auch bereits in einem sehr frühen Stadium und eine erhöhte Erkrankungsrisiko frühzeitig anzeigen. Dies ist
5 wichtig, um einen verlässlichen klinischen Marker zur Diagnose dieser Erkrankungen zur Verfügung zu stellen.

Vorzugsweise kann die Konzentration der VGFARP-Peptide in der Probe, aber auch das charakteristische Muster des Auftretens
10 mehrerer bestimmter VGFARP-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 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
15 Alzheimer Erkrankung unterstreicht, da ein sicherer Nachweis der Erkrankung eine Voraussetzung zur Entwicklung einer Therapie ist.

Der Nachweis von VGFARP-Peptiden ermöglicht es außerdem, im Rahmen von klinischen Studien zur Entwicklung von neuen Therapien zur Behandlung von Morbus Alzheimer mit hoher Spezifität
25 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 VGFARP-Peptiden die Stratifizierung von Patienten, wodurch Subgruppen von Morbus Alzheimer Patienten gezielt ausgewählt werden können, die für bestimmte Morbus
30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 11 -

Alzheimer Therapiestrategien oder klinische Studien besonders geeignet sind.

Bei Morbus Alzheimer Patienten sind die Konzentrationen von
5 VGFARP-Peptiden deutlich verändert, relativ zu gesunden Personen. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist es daher, die VGFARP-Konzentrationen bei Morbus Alzheimer Patienten auf normale Konzentrationen zu bringen. Dieses Verfahren kann zur Therapie von Morbus Alzheimer oder verwandten neurologischen
10 Erkrankungen eingesetzt werden. Bei erhöhten VGF-Protein oder VGFARP-Peptid Konzentrationen können die Konzentrationen dieser Stoffe durch therapeutische Gabe von z.B. VGF-Protein oder VGFARP-Peptid spezifischen Antikörpern oder VGF-spezifischen Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder Triplex-Nukleinsäuren
15 oder VGFARP-Peptid-Antagonisten, VGF-Protein-Antagonisten gesenkt werden. Zur Therapie können auch Substanzen verabreicht werden, die die körpereigene Expression von VGF-Protein oder die Prozessierung von VGF Protein zu VGFARP-Peptiden unterdrücken. Liegt ein Mangel an VGF-Protein oder VGFARP-Peptiden
20 als Erkrankungsursache vor, so können therapeutische Gaben von VGF-Protein, VGFARP-Peptiden, VGFARP-Peptid-Agonisten oder VGF-Protein-Agonisten vorgenommen werden. Die körpereigene Produktion von VGF-Protein oder VGFARP-Peptiden kann durch die therapeutische Gabe von Substanzen wie z.B. NGF, BDNF oder NT-
25 3 oder anderen geeigneten Stoffen erhöht werden, da diese Stoffe die VGF-Expression erhöhen. Auch Substanzen, die die Prozessierung von VGF-Protein zu VGFARP-Peptiden fördern, wie z.B. Prohormonkonvertasen wie z.B. PC1, PC2 oder PC3, können therapeutisch eingesetzt werden. Natürlich ist auch die Kombi-
30 nation von verschiedenen Therapiestrategien möglich und unter Umständen sinnvoll.

Die Erfindung umfasst daher auch die Verwendung von VGF-Proteinen, VGFARP-Peptiden, VGFARP-Peptid-Agonisten und -Anta-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 12 -

gonisten, VGF-Protein-Agonisten und -Antagonisten, anti-VGF-Protein Antikörpern, anti-VGFARP-Peptid Antikörpern, NGF, BDNF, NT-3, anti-NGF Antikörpern, anti-BDNF Antikörpern, anti-NT-3 Antikörpern und Antikörpern gegen Rezeptoren der genannten Proteine zur direkten oder indirekten Modullierung der Konzentration an VGF-Proteinen und VGFARP-Peptiden zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer. Alternativ zu Antikörpern können auch Antikörperfragmente, Antikörperfusionsproteine, oder andere selektiv an VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 bindende Substanzen Verwendung finden. Alternativ zu den genannten Proteinen und Peptiden können auch Fusionsproteine der genannten Proteine 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.

20 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. VGF-Peptide, VGF-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 Antagonisten angefügt werden, die den Übertritt in den Subarachnoidalraum

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 13 -

begünstigen, bzw. umgekehrt den Übertritt aus den Subarachnoidalraum heraus erschweren.

Die Erfindung umfasst auch die Verabreichung der genannten
5 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 Mus-
kel, Fett, Gehirn usw. Dadurch kann eine erhöht biologische
10 Verfügbarkeit und Wirksamkeit dieser Therapeutika erreicht
werden. Z.B. können Peptide oder Proteine, die oral verab-
reicht werden durch säureresistente Kapseln vor proteolyti-
schen Abbau im Magen geschützt werden. Stark hydrophobe Sub-
stanzen können durch geeignete galenische Aufbereitungen hy-
15 drophiler und somit besser geeignet für z.B. intravenöse In-
jektionen werden usw.

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

25 Aufgrund der zahlreichen, im Rahmen dieser Erfindung neu iden-
tifizierten VGF-Peptide, können erstmals Positionen im VGF-
Protein experimentell nachgewiesen werden, an denen eine Pro-
zessierung des VGF-Proteins in vivo statt findet. Bei diesen
Prozessierungsstellen handelt es sich, bezogen auf die VGF-
30 Proteinsequenz von NM_003378 um folgende Sequenzpositionen:
371/372, 418/419, 479/480, 480/481, 481/482, 482/483 und
483/484. Bezogen auf die VGF-Proteinsequenz von Y12661 handelt
es sich um folgende Prozessierungsstellen: 371/372, 419/420,
480/481, 483/484, 484/485 und 485/486. Alle experimentell

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 14 -

identifizierten Forzessierungspositionen stellen dibasische Positionen, d.h. direkt aufeinander folgende Aminosäuren mit positiv geladenen Aminosäureseitenketten (Arginin = R, Lysin = K) dar. Solche Sequenzmotive werden z.B. von Prohormonkonvertasen erkannt und geschnitten, wobei zusätzlich die beiden basischen Aminosäuren endoproteolytisch entfernt werden. Wie der Name der Prohormonkonvertasen schon andeutet, konvertieren Prohormonkonvertasen Prohormone zu Hormonen, wodurch neue biologisch aktive Stoffe (Peptid-Hormone) entstehen. Beispiele für biologische aktive Peptide, die auf diese Weise aus ihren Pro-Formen generiert werden sind proNGF/NGF, proBDNF/BDNF usw. [1]. Folglich stellen die erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide Peptidhormone dar, die im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, vorzugsweise Morbus Alzheimer, als Angriffspunkte für Therapeutika geeignet sind. Die Modulierung der VGFARP-Peptid Konzentrationen kann somit zur Therapie von neurologischen Erkrankungen, vorzugsweise Morbus Alzheimer Verwendung finden.

20 VGF-Biologie

Die im Rahmen dieser Erfindung identifizierten VGF-Proteine (Vorläufermoleküle zu VGF-Peptiden) werden als ca. 68 kDa große Proteine selektiv in neuroendokrinen und neuronalen Zellen synthetisiert, wobei ihre Expression mit zunehmenden Alter abnimmt [2]. Bei der Untersuchung von VGF-Gen defizienten Mäusen stellte sich heraus, dass wichtige Funktion im Energiestoffwechsel betroffen sind [3]. VGF-Gen defiziente Mäuse weisen eine geringe Körpergröße auf, sind hypermetabolisch und hyperaktiv. VGF wird auch in den insulinproduzierenden Inselzellen der Bauchspeicheldrüse synthetisiert.

VGF wurde bei der Untersuchung einer Pheochromozytom-Zelllinie der Ratte (PC12-Zelllinie) entdeckt und die Stimulierung die-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 15 -

ser Zelllinie mit „Nerven Wachstumsfaktor“ (NGF) bewirkt eine 12- bis 14-fache Steigerung der Konzentration von VGF [4, 5]. NGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der die Differenzierung des peripheren und zentralen Nervensystems reguliert. Weitere

5 Faktoren, die die VGF-Expression regulieren sind der „Brain-derived Neurotrophic Factor“ (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) [6]. *In vivo* wird VGF-mRNA durch neuronale Aktivität, neuronale Verletzungen und durch den biologischen Rhythmus (circadian clock) reguliert [2, 7-9].

10

VGF wird mit zunehmender Differenzierung neuronaler Zellen über neuronalspezifisch exprimierte Endoproteasen, die vermutlich basische Aminosäuren erkennen, proteolytisch prozessiert. Wie Trani et al. zeigen konnten entstehen C-terminale VGF-

15 Peptide mit den Massen 20, 18 und 10 kDa [10]. Diese VGF-Prozessierung findet im Postendoplasmatischen Retikulum statt. Diese Peptide werden in sekretorischen Vesikeln angereichert, vorzugsweise nach Membran-Depolymerisation freigesetzt und könnten eventuell eine Rolle in der neuronalen Kommunikation

20 spielen [10]. Prohormonkonvertasen wie z.B. die PC1, PC2 oder PC3 sind aus der Literatur als Beispiele für Endoproteasen, die Protein-Vorläufermoleküle an dibasischen Sequenzstellen proteolytisch spalten bekannt. Die von uns identifizierten VGFARP-Peptide stellen jedoch überraschenderweise Fragmente

25 mit deutlich geringerem Molekulargewicht als 10 bis 20 kDa dar und sind daher verschieden zu den von Trani et al. beschriebenen VGF-Peptiden. Außerdem verwendeten Trani et al. zum Nachweis dieser VGF-Peptide anti-VGF Antikörper, die VGF-Epitope erkennen, die verschieden zu den Sequenzen der VGFARP-Peptide

30 sind. VGFARP-Peptide haben wir sowohl in Morbus Alzheimer Patienten, als auch in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Die von uns identifizierten Peptide stellen neue, bisher nicht beschriebene Prozessierungs-Produkte von VGF dar. Die Konzentrationen der VGFARP-Peptide können in einer für jedes Peptid

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 16 -

spezifischen Weise in der Patientengruppe relativ zur Kontrollgruppe entweder einheitlich erhöht oder aber einheitlich erniedrigt sein. Bisher waren ausschließlich andere VGF-Peptide unbekannter Sequenz, abstammend vom C-terminalen Bereich des VGF-Proteins und mit deutlich höherem Molekulargewicht als die von uns neu identifizierten und erstmalig sequenzierten Peptide bekannt [10].

Vorzugsweise Ausführungsformen der Erfindung

10

Vorzugsweise ist die durch das erfindungsgemäße Verfahren nachgewiesene chronisch-demenzielle Erkrankung Morbus Alzheimer. Bislang konnte die Veränderung der Konzentration der erfindungsgemäßen Peptide und Peptidfragmente bei Morbus Alzheimer Patienten nachgewiesen werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die erfindungsgemäßen Peptide zum Nachweis und zur Therapie von Morbus Alzheimer und verwandten neurologischen Erkrankungen herangezogen werden können.

20

Die Identifizierung konzentriert sich vorzugsweise auf bestimmte Peptidfragmente der VGF-Proteine mit der GeneBank Accession No. NM_003378, oder der DDBJ Accession No. Y12661 d.h. auf Peptide, die Teilsequenzen dieser VGF-Proteine umfassen. Diese VGF-Peptide (VGF-Proteinfragmente) werden als "VGF derived Alzheimer related peptide" (VGFARP) bezeichnet und sind durchnumeriert mit VGFARP-1 bis VGFARP-38. Der Zusammenhang zwischen den VGF-Proteinen und VGFARP-1 bis VGFARP-38 ist in Abbildung 1 dargestellt. Die von uns ermittelten Sequenzen der Peptide sind im Sequenzprotokoll angegeben.

30

Wir haben in biologischen Proben verschiedene VGF-Peptide, abstammend von zwei VGF-Protein-Varianten, erstmals nachgewiesen. Diese mit VGFARP-1 bis VGFARP-38 bezeichneten Peptide stellen definierte Fragmente von VGF-Proteinen dar. Diese

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 17 -

Fragmente entstehen auf natürliche Weise in der Natur und wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Diese Fragmente sind verschieden zu Peptiden, die in der Literatur oft durch in vitro Proteolyse (durch Zugabe von Proteasen wie z.B. Trypsin) erzeugt 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 VGFARP-Peptide anschließend sequenziert werden konnten.

TABELLE 1

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

VGF-Sequenz		VGFARP Nr.	Seq. ID	Monoisotop theoret. Masse (Da)	Sequenz
Y12661	NM_003378				
23-59	23-59	1	1	3666,8278	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGSAP PEV
23-62	23-62	2	2	3950,9875	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGSAP PEVRGA
23-58	23-58	18	3	3567,7594	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGSAP PE
24-59	24-59	3	4	3595,7907	PPGRPEAQPPPLSSEHK EPVAGDAVPGPKDGSAP EV
24-62	24-62	4	5	3879,9504	PPGRPEAQPPPLSSEHK EPVAGDAVPGPKDGSAP EVRGA
26-59	26-59	5	6	3401,6852	GRPEAQPPPLSSEHK VAGDAVPGPKDGSAP PEV
26-61	26-61	6	7	3614,8077	GRPEAQPPPLSSEHK VAGDAVPGPKDGSAP PEV

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 18 -

26-62	26-62	7	8	3685,8448	RG GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP EVRGA
26-58	26-58	19	9	3302,6167	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP E
26-57	26-57	20	10	3173,5741	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP
26-64	26-64	21	11	3955,9889	GRPEAQPPPLSSEHKEP VAGDAVPGPKDGSAP EVRGARN
49-62	49-62	10	12	1336,6735	PGPKDGSAP EVRGA
90-114	90-114	22	13	2503,1827	LDRPASPPAFSGSQQP EEEEAEAL
* 50. _{r1} - 57. _{r2}	50. _{r1} -57. _{r2}	15	14	≥ 727,3501	r1-GPKDGSAP-r2
39-46	39-46	23	15	851,4137	r7-HKEPVAGD-r8
50-57	50-57	24	16	≥ 730,3246	r9-APSGSQQP-r10
-----	121-156	25	17	3745,7343	SQTHSLPAEPSEPEPAP FRPQTPENGPEASDPSE EL
164-174	164-174	26	18	1235,5782	QELRDFSPSSA
133. _{r1} - 140. _{r2}	133. _{r1} - 140. _{r2}	27	19	≥ 833,4395	r11-EPAAPRP-r12
351-418	-----	11	20	7518,2744	LQEAAREERESAREEEEA EQERRGGEEVGEEDDEE AAEAABEADEAERARQ NALLFAEEDGEAGAED
350-367	350-367	28	21	2031,8981	GLQEAAREERESAREEEEA A
350-370	350-370	29	22	2418,0419	GLQEAAREERESAREEEEA AEQE
-----	373-417	30	23	4806,0408	GGEERVGEEDDEAAEA AEAEAEERARQNALLFA EEDGEAGAED
-----	373-404	31	24	3456,5513	GGEERVGEEDDEAAEA AEAEAEERARQNALL
374-418	-----	32	25	4806,0408	GGEERVGEEDDEAAEA AEAEAEERARQNALLFA EEDGEAGAED
421-456	420-455	33	26	4058,7043	EQEETPGHRKEAEGTE

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 19 -

					EGGEEEDDEEMDPQTID SL
** 421-472	420-471	12	27	5776,6294	SQBETPGHRRKEAEGTE EGGEEEDDEEMDPQTID SLIELSTKLHLPADDVV S
421-479	420-478	13	28	6618,0363	SQBETPGHRRKEAEGTE EGGEEEDDEEMDPQTID SLIELSTKLHLPADDVV SLIEEVEE
460-472	459-471	34	29	1380,7249	STKLHLPADDVVS
355 _{r13} ^{r13} - 362 _{r14} ^{r14}	355 _{r13} ^{r13} - 362 _{r14} ^{r14}	35	30	≥ 946,4468	r13-APRRRSAR-r14
481 _{r13} ^{r13} - 488 _{r14} ^{r14}	481 _{r13} ^{r13} - 488 _{r14} ^{r14}	16	31	≥ 862,3192	r3-EDEBAEA-r4
446 _{r15} ^{r15} - 453 _{r16} ^{r16}	445 _{r15} ^{r15} - 452 _{r16} ^{r16}	17	32	≥ 961,4063	r5-EEMDPQTI-r6
-----	485-522	36	33	3903,0180	NAPPEPVPPFRAAPAF HVRSPQPPFPAPAPARD ELPD
-----	485-521	37	34	3787,9911	NAPPEPVPPFRAAPAF HVRSPQPPFPAPAPARD ELP
501 _{r15} ^{r15} - 508 _{r16} ^{r16}	500 _{r15} ^{r15} - 507 _{r16} ^{r16}	38	35	≥ 920,4828	r15-PTHVRSQ-r16

* r1 stellt eine Sequenz, die der Sequenz oder Teilen der Sequenz des VGF-Proteins von Aminosäure 49-23 entspricht dar, wobei r1, ausgehend von Aminosäure 50 des VGF-Proteins, zwischen 0 und 27 Aminosäuren lang sein kann. Entsprechend stellt r2 die VGF-Proteinsequenz von Aminosäure 58 bis 64 oder Teile davon dar, wobei r2, ausgehend von VGF-Aminosäure 57 zwischen 0 und 7 Aminosäuren lang sein kann. Die weiteren Peptid-Ketten r3 bis r16 sind entsprechend dem oben exemplarisch erläuterten Schema zusammengesetzt.

** VGFARP-12 wurde als nicht oxidiertes und als einfach oxidiertes Peptid (Zunahme des Molekulargewichts um ca. 16 Dal-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 20 -

ton) identifiziert.

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 glykosiliert, phosphoryliert, sulfatiert, amidiert, oxidiert usw. in der zu untersuchenden Probe vorliegen. Vorzugweise liegen modifizierte Peptide als Peptidoxid vor, wie z.B. das Peptid VGFARP-12, das sowohl als nicht modifiziertes Peptid, als auch als Peptidoxid identifiziert wurde.

Die Peptide werden insbesondere auch dann als VGFARP-Peptide angesehen, wenn einzelne Aminosäuren von der entsprechenden Sequenz des VGF-Proteins abweichen, insbesondere wenn maximal 2 Aminosäuren von der VGF-Proteinsequenz abweichen. Dabei sind Punktmutationen, Deletionen, interne Einfügungen von Aminosäuren, sowie N- und C-terminale Verlängerungen zulässig, solange die VGFARP-Peptidsequenz mindestens 8 Aminosäuren enthält, die relativ zur Aminosäuresequenz des zugehörigen VGF-Proteins konserviert, d.h. unverändert, sind.

Für einen positiven Nachweis der Erkrankung ist in Weiterbildung der Erfindung ferner vorgesehen, dass die Konzentration des oder der identifizierten Peptide für jedes dieser Peptide in spezifischer Weise relativ zur Konzentration des jeweiligen Peptides in einer Kontrollprobe erhöht oder erniedrigt ist. Das Verhältnis der Konzentrationen der jeweiligen Peptide zur Konzentration der Kontrollprobe kann zur Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung herangezogen werden.

Bei der Kontrollprobe kann es sich um eine Poolprobe aus ver-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 21 -

schiedenen Kontrollen handeln. Auch die zu untersuchende Probe kann eine Poolprobe sein, wobei bei positivem Ergebnis anschließend Einzeluntersuchungen durchgeführt werden.

5 Geeignete biologische Proben

Die biologische Probe kann vorzugweise Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinalflüssigkeit, CSF) sein oder eine Probe wie Serum, Plasma, Urin, Stuhl, Tränenflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Sputum usw. Dies hängt u.a. von der Empfindlichkeit des gewählten Nachweisverfahrens (Massenspektrometrie, ELISA etc.) ab. Auch homogenisierte Gewebeproben, Gewebeschnitte und Biopsiepräparate können gegebenenfalls 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 Gewebeproben, 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 VGFARP-Peptide zur Herstellung von Diagnostika

Weiterhin umfasst die Erfindung die Verwendung wenigstens eines der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide oder eines VGF-Proteins zur Diagnose von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer, sowie die Verwendung von VGFARP-Peptiden zur Gewinnung von Antikörpern oder von anderen Agenzien, welche

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 22 -

aufgrund ihrer VGFARP-Peptid-spezifischen Bindungseigenschaften zur Entwicklung von Diagnosereagenzien zum Nachweis dieser Erkrankungen geeignet sind. Die Erfindung umfaßt auch die Verwendung von VGFARP-Peptiden zur Gewinnung von Phagenpartikeln, die spezifisch diese Peptide binden, oder die umgekehrt VGFARP-Peptide auf ihre Oberfläche präsentieren und so die Identifizierung von Bindungspartnern wie z.B. Rezeptoren von VGF-Proteinen oder VGFARP-Peptiden ermöglichen.

10 Nachweismethoden für VGFARP-Peptide

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

20

Physikalische Nachweismethoden

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 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 Erkrankung, insbesondere einer chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere

30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 23 -

Morbus Alzheimer und/oder der Schweregrad dieser Erkrankung abgeleitet werden.

Gemäß bevorzugter Ausführungsform dieser Erfindung werden die
5 Peptide in der Probe vor der Identifizierung chromatographisch
getrennt, und zwar vorzugsweise mit Reverse Phase Chromatogra-
phie, besonders bevorzugt ist eine Trennung der Peptide in der
Probe mit hochauflösender Reverse Phase High-Performance-
Flüssigchromatografie (RP-HPLC). Eine weitere Ausführungsform
10 dieser Erfindung ist die Durchführung von Fällungsreaktionen
zur Fraktionierung der Probe unter Verwendung von Fällungsmit-
teln wie z.B. Ammoniumsulfat, Polyethylenglykol, Trichlores-
sigsäure, Aceton, Ethanol usw. Die so gewonnenen Fraktionen
werden dann einzeln dem jeweiligen Nachweisverfahren unterzo-
15 gen, z.B. der massenspektrometrischen Untersuchung. Eine wei-
tere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von
Flüssigkeitsphasenextraktion. Dazu wird die Probe z.B. mit ei-
nem Gemisch aus einem organischen Lösungsmittel wie etwa Po-
lyethylenglykol (PEG) und einer wässrigen Salzlösung gemischt.
20 Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften reichern sich dann
bestimmte Inhaltsstoffe der Probe in der organischen und ande-
re in der wässrigen Phase an und können so voneinander ge-
trennt und anschließend weiter analysiert werden.

25 Reverse Phase Chromatographie

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung um-
fasst die Verwendung von Reverse Phase Chromatographie, insbe-
sondere einer C18 Reverse Phase Chromatographiesäule unter
Verwendung von Laufmitteln bestehend aus Trifluoressigsäure
30 und Acetonitril, zur Trennung von Peptiden in humaner Liquor-
flüssigkeit. 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 Massen-
spektrometers, vorzugsweise mit Hilfe eines MALDI-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 24 -

Massenspektrometers (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation) unter Verwendung einer Matrixlösung, bestehend aus z.B. aus L(-) Fucose und alpha-Cyano-4-hydroxycimtsäure, 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 VGFARP-1 bis VGFARP-38.

10 **Massenspektrometrie**

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung der VGFARP-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 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 Dalton erhöht. Folgende Massen entsprechen den theoretischen, monoisotopischen Massen der von uns identifizierten Peptide; berechnet mit geeigneter Software, hier GPMW 4.02. Diese theoretischen, monoisotopischen Massen können einzeln oder in Kombinationen in einer Probe auftreten: VGFARP-1 = 3666,8278 / VGFARP-2 = 3950,9875 / VGFARP-18 = 3567,7594 / VGFARP-3 = 3595,7907 / VGFARP-4 = 3879,9504 / VGFARP-5 = 3401,6852 / VGFARP-6 = 3614,8077 / VGFARP-7 = 3685,8448 / VGFARP-19 = 3302,6167 / VGFARP-20 = 3173,5741 / VGFARP-21 = 3955,9889 / VGFARP-10 = 1336,6735 / VGFARP-22 = 2503,1827 / VGFARP-15 = ≥ 727,3501 / VGFARP-23 = > 851,4137 / VGFARP-24 = ≥ 730,3246 /

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 25 -

VGFARP-25 = 3745,7343 / VGFARP-26 = 1235,5782 / VGFARP-27 = \geq
833,4395 / VGFARP-11 = 7518,2744 / VGFARP-28 = 2031,8981 /
VGFARP-29 = 2418,0419 / VGFARP-30 = 4806,0408 / VGFARP-31 =
3456,5513 / VGFARP-32 = 4806,0408 / VGFARP-33 = 4058,7043 /
5 VGFARP-12 = 5776,6294 / VGFARP-13 = 6618,0363 / VGFARP-34 =
1380,7249 / VGFARP-35 = \geq 946,4468 / VGFARP-16 = \geq 862,3192 /
VGFARP-17 = \geq 961,4063 / VGFARP-36 = 3903,0180 / VGFARP-37 =
3787,9911 / VGFARP-38 = \geq 920,4828

Das Symbol \geq (ist größer oder gleich) ist so zu verstehen, dass
10 nicht beliebig größere Massen für die betroffenen VGFARP-
Peptide möglich sind, sondern lediglich die Massen, die sich
aufgrund der möglicherweise zusätzlich an den Enden dieser
Peptide befindlichen Aminosäuren ergeben können. An den Enden
dieser Peptide können nicht beliebige Aminosäuren zusätzlich
15 vorhanden sein, sondern nur solche, die sich aufgrund der Se-
quenz des VGF-Proteins an dieser Sequenzposition befinden kön-
nen.

Massenspektrometrische Bestimmung der Sequenz der VGFARP-

20 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
25 Peptidsignale berücksichtigt werden, die von einem VGF-Protein
abgeleitet werden können. Diese Absicherung erfolgt über eine
Identifizierung der Peptidsignale vorzugsweise mit massenspek-
trometrischen Verfahren, z.B. einer MS/MS-Analyse [11].

30 Durch das erfindungsgemäße Verfahren wurden neue, spezifische
Peptide von VGF-Proteinen (VGFARP-Peptide) identifiziert und in
ihrer Bedeutung erkannt. Diese VGFARP-Peptide und ihre Abköm-
mlinge werden hier mit VGFARP-1 bis VGFARP-38 bezeichnet. Ihre

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 26 -

Sequenzen sind im Sequenzprotokoll angegeben. Die VGFARP-Peptide VGFARP-15, 16, -17, -27, -35, und VGFARP-38 können am N- und/oder C-Terminus zusätzliche Aminosäuren entsprechend der korrespondierenden Sequenz des zugehörigen VGF-Proteins
5 beinhalten. Die Erfindung umfasst auch die rekombinant oder synthetisch hergestellten, sowie aus biologischen Proben isolierten VGFARP-Peptide in unmodifizierter, chemisch modifizierter oder posttranslational modifizierter Form. Dabei sind zwei Punktmutationen sowie andere Abweichungen möglich, solange das VGFARP-Peptid mindestens 8 Aminosäuren aufweist, die in ihrer Identität und ihrer Position innerhalb der Peptidsequenz mit einem VGF-Protein übereinstimmen.

Molekularbiologische Nachweistechiken

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

Ein Ausführungsbeispiel hierfür umfasst die Gewinnung von Gewebeproben, z.B. von Biopsiepräparaten, von Patienten und die
30 nachfolgende Bestimmung der Konzentration eines RNA-Transkriptes korrespondierend zum Gen mit der GeneBank Accession No. NM_03378 oder der Accession No. Y12661 der „DNA Data Bank of Japan“, DDBJ oder korrespondierend zu homologen VGF-Varianten. Dabei werden quantitative Messergebnisse (Intensi-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 27 -

läten) 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 Polymerease 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

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung der VGFARP-Peptide oder der VGF-Proteine unter Verwendung eines immunologischen Nachweissystems, vorzugsweise eines ELISAs („enzyme linked immunosorbent assay“) durchgeführt werden. Dabei erfasst dieser immunologische Nachweis wenigstens ein VGFARP-Peptid oder VGF-Protein. Zur Erhöhung der Spezifität kann weiterhin bevorzugt ein sogenannter „Sandwich-ELISA“ verwendet werden, bei dem der Nachweis der VGFARP-Peptide von der Spezifität von zwei Antikörpern, die unterschiedliche Epitope innerhalb des selben Moleküls erkennen, abhängig ist. Zum Nachweis von VGFARP-Peptiden oder VGF-Proteinen können jedoch auch andere ELISA-Systeme, z.B. direkte oder kompetitive ELISA 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 VGFARP-Peptide oder VGF-Proteine verwendet werden. Die Identifizierung des oder der VGFARP-Peptide kann z.B. all-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 28 -

gemein mit Hilfe eines auf das VGFARP-Peptid oder VGF-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 (Peptide Nucleic Acids), Affinitätsmatrizen (z.B. ABICAP-Technologie, ABION Gesellschaft für Biowissenschaften und Technik mbH, Jülich, Deutschland) usw. Generell sind alle Substanzen/Moleküle als Nachweisagenten geeignet, die es erlauben, ein spezifisches Nachweissystem aufzubauen, da sie spezifisch ein VGFARP-Peptid oder VGF-Protein binden.

Gewinnung von VGFARP-Peptiden und von anti-VGFARP-Peptid Antikörpern

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Gewinnung von VGFARP-Peptiden unter Verwendung von rekombinanten Expressionssystemen, Chromatographiemethoden und chemischen Syntheseprotokollen, die dem Fachmann bekannt sind. Die so gewonnenen VGFARP-Peptide können unter anderem als Standards zur Quantifizierung der jeweiligen VGFARP-Peptide oder als Antigen zur Herstellung von VGFARP-Peptid-Antikörpern Verwendung finden. Zu den dem Fachmann bekannten und geeigneten Methoden zur Isolierung und Gewinnung von VGFARP-Peptiden gehören die rekombinante Expression von Peptiden. Zur Expression der VGFARP-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 „Chinese Hamster Ovary“ (CHO) Zellen verwendet werden. Diese Zellen sind von der „American Tissue Culture Collection“ (ATCC) erhältlich. Zur rekombinanten Expression von VGFARP-Peptiden werden z.B. Nukleinsäuresequenzen, die für VGFARP-Peptide kodieren in Kombination mit geeigneten regulatorischen Nukleinsäuresequenzen wie z.B. Promoto-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 29 -

ren, 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 VGFARP-Peptid Expressionsvektoren können dann in geeignete Zellen, z.B. durch Elektroporation, eingefügt werden. Die so hergestellten VGFARP-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 VGFARP-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 VGFARP-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 monoklonaler oder polyklonaler Antikörper unter Verwendung von VGFARP-Peptiden. Die Gewinnung der Antikörper geschieht in üblicher, dem Fachmann vertrauter Weise. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Herstellung und Gewinnung von VGFARP-Peptid spezifischen Antikörpern, eine insbesondere bevorzugte Ausführungsform ist die Herstellung von VGFARP-Peptid spezifischen Antikörpern die neo-Epitope erkennen, das heißt Epitope, die nur auf VGFARP-Peptiden vorhanden sind, die jedoch nicht in einem VGF-Protein. Solche anti-VGFARP-Peptid Antikörper ermög-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 30 -

lichen den spezifischen immunologischen Nachweis von VGFARP-Peptiden in Gegenwart von VGF-Protein. Polyklonale Antikörper können durch Immunisierungen von Versuchstieren wie z.B. Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Ziegen hergestellt werden. Mono-

5 klonale Antikörper können z.B. durch Immunisierungen von Versuchstieren 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 bekannte, rekombinante Herstellungsverfahren gewonnen werden.

10 Antikörper können auch in Form von Antikörperfragmente wie z.B. Fab-Fragmente oder Fab2-Fragmente usw. Verwendung finden.

Therapieentwicklung und Überwachung durch VGFARP-Peptid Bestimmungen

15 Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die quantitative oder qualitative Bestimmung der oben genannten VGFARP-Peptide oder VGF-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 geeigneten Patienten für klinische Studien zur Entwicklung von Therapien für diese Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, verwendet werden. Dabei werden quantitative

20 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.

30 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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 31 -

zuverlässig ermöglicht [12].

**Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit von VGF-Proteinen,
VGFARP-Peptiden und von Agenzien, die die Expression und die
5 biologische Verfügbarkeit dieser Substanzen modulieren**

Ein Ausführungsbeispiel hierfür umfasst die Kultivierung von
Zelllinien, und ihre Behandlung mit VGF-Proteinen, VGFARP-
Peptiden oder mit Substanzen, die die Expression von VGF-
Protein fördern, wie z.B. NGF, BDNF oder NT-3, oder die Pro-
10 zessierung von VGF-Protein zu VGFARP-Peptiden fördern, wie
z.B. Prohormonkonvertasen. Dadurch können biologische Eigen-
schaften von VGF-Protein und VGFARP-Peptiden im Zusammenhang
mit neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzhei-
mer, ermittelt werden. Auch Fusionsproteine und Fusionspeptide
15 können zur Behandlung der Zelllinien verwendet werden, z.B.
Fusionsproteine bestehend aus Prohormonkonvertasen fusioniert
mit Peptidsequenzen, die einen Transport des Fusionsproteins
ins Zellinnere fördern. Beispiele für mögliche Fusionspartner
von z.B. Prohormonkonvertasen sind HIV-TAT-Sequenzen oder An-
20 tennapedia-Sequenzen usw. Ebenso können Zelllinien mit Expres-
sionsvektoren transfiziert werden, die direkt oder indirekt
eine Expression von VGF-Protein oder VGFARP-Peptiden durch die
transfizierten Zellen bewirken. Diese Expressionsvektoren kön-
nen u.a. für VGFARP-Peptide, VGF-Proteine, NGF, BDNF, NT-3
25 oder für Prohormonkonvertasen kodieren. Auch die Transfektion
von Kombinationen der genannten Proteine können durchgeführt
werden. Alternativ können geeignete Zelllinien mit anti-VGF-
Protein- oder anti-VGFARP-Peptid-Antikörpern oder mit Nuklein-
säuren, die die Expression von VGF unterdrücken, wie z.B. VGF-
30 Antisense-Nukleinsäuren, VGF-Triplex-Nukleinsäuren oder gegen
VGF-mRNA gerichteten Ribozymen, behandelt werden. Auch die Be-
handlung mit anti-NGF, anti-BDNF oder anti-NT-3 Antikörpern
könnte zur Unterdrückung der VGF-Protein Expression durchge-
führt werden. Insbesondere Zelllinien, die als neurologische

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 32 -

Modellsysteme im Zusammenhang mit VGF 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 Apoptoserate der Zellen, Änderungen der Zellmorphologie, der Expression von zelleigenen Proteinen oder Reporter Genen oder die die Freisetzung von zytosolischen Zellbestandteilen als Marker für Zellssterben ermitteln. Als weitere Testsysteme können geeignete Stämme von Versuchstieren, z.B. von Mäusen oder Ratten, die als Modell für neurologische Erkrankungen, insbesondere als Modell für Morbus Alzheimer, gelten, verwendet werden. Diese Versuchstiere können zur Untersuchung der Wirksamkeit von Therapie Strategien die die Modulation der Konzentration von VGFARP-Peptiden oder von VGF-Proteinen zum Ziel haben, herangezogen werden. Außerdem können in Versuchstieren auch Proteine und Peptide wie z.B. VGF-Protein, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF, NT-3, Prohormonkonvertasen usw. 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 fusioniert mit Transportsequenzen, wie z.B. einer 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 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.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 33 -

Read-out Parameter bei Versuchen mit Tiermodellen können die Überlebensdauer der Tiere, ihr Verhalten und ihre Kurzzeitgedächtnisleistung 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, Stoffwechselltest, die Expressionsrate von VGF Protein und VGFARP-Peptiden und anderen mit der Erkrankung im Zusammenhang stehenden Proteinen, sowie morphologische und histologische Untersuchungen an Geweben, wie z.B. dem Gehirn herangezogen werden.

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

- Abbildung 1: Alignment der VGFARP-Peptide mit den beiden bekannten VGF-Proteinen entsprechend den Datenbank Accession No. NM_003378 und Y12661
- Abbildung 2: Reverse Phase Chromatographie zur Separation und Anreicherung der VGFARP-Peptide aus Liquor cerebrospinalis
- Abbildung 3: Massenspektrometrische Messung (MALDI) am Beispiel von VGFARP-7
- Abbildung 4: MALDI als relativ quantifizierende massenspektroskopische Methode
- Abbildung 5: MS/MS-Fragmentspektrum am Beispiel des Peptids VGFARP-13

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 34 -

Abbildung 6a - C: „Box-Whisker-Plots“ zum quantitativen Vergleich der Konzentrationen von VGFARP-1, VGFARP-2, VGFARP-18, VGFARP-3, VGFARP-4, VGFARP-5, VGFARP-6, VGFARP-7, VGFARP-19, VGFARP-20, VGFARP-21, VGFARP-10, VGFARP-22, VGFARP-28, VGFARP-29, VGFARP-30/32, VGFARP-31, VGFARP-12, VGFARP-13, VGFARP-36 und VGFARP-37 in Morbus Alzheimer Patienten verglichen mit Kontrollpatienten.

10

Die Abbildung 1 zeigt ein Alignment der erfindungsgemäßen Peptide mit zwei bekannten Varianten des VGF-Proteins, die in der Abbildung mit ihren Datenbank Accession No. NM_003378 und Y12661 bezeichnet sind. Sequenzpositionen, die in beiden Varianten der VGF-Proteine identisch sind, sind in der Sequenz von NM_003378 mit einem Stern dargestellt. Unterschiede in den Sequenzen sind durch den Aminosäurecode in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund dargestellt. Der Pfeil am Ende oder am Anfang von Teilsequenzen von VGFARP-12, -13 und 34 zeigt an, das die jeweilige Sequenz sich über zwei Zeilen im Alignment erstreckt.

Die Abbildung 2 zeigt ein Chromatogramm, aufgenommen mit Reverse Phase Chromatographie gemäß Beispiel 2, zur Separation und Anreicherung der VGF-Peptide aus Liquor cerebrospinalis.

25 ■

Die Abbildung 3 zeigt ein Spektrum, das durch MALDI-massenspektrometrische Messung gemäß Beispiel 3 von VGFARP-7 entstanden ist, mit einer theoretischen, monoisotopischen Masse von 3686 Dalton, nach erfolgter Reverse Phase Chromatographie von humanem Liquor cerebrospinalis gemäß Beispiel 2. VGFARP-7 entspricht der VGF-Sequenz (Accession No. Y12661) von Aminosäure 26-62.

30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 35 -

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 Standard-Signale, als auch repräsentativer Probensignale ermittelt. 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 in diesem Diagramm anhand der Steigung der Kurve ablesbar ist.

■

Die Abbildung 5 zeigt ein MS/MS-Fragmentspektrum gemäß Beispiel 4 des erfindungsgemäßen Peptids VGFARP-13.

15 Obere Spur: Rohdaten der Messung.
Untere Spur: Konvertiertes, dekonvolutes Massenspektrum von VGFARP-13.

20 Das Peak-Muster ist charakteristisch für VGFARP-13. VGFARP-13 entspricht der VGF-Sequenz (Accession No. Y12661) von Aminosäure 421-479.

25 Die Abbildungen 6A bis 6C zeigen in Form von „Box-Whisker-Plots“ einen Vergleich der integrierten MALDI-massenspektrometrischen Signalintensitäten verschiedener VGFARP-Peptide in Kontrollen, verglichen mit den Signalintensitäten in Proben von Morbus Alzheimer Patienten.

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

Liquor oder Liquor cerebrospinalis (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) ist die in den vier Hirnventrikeln und im Suba-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 36 -

rachnoidalraum enthaltene Flüssigkeit, die vor allem in den Plexus choroidi 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.

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

Zum massenspektrometrischen Nachweis von VGF-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 Eluatonsmittel gleichermaßen. Im Folgenden ist beispielhaft die Trennung von VGF-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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 37 -

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.

15 **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-hydroxymizinsäure, die α-Cyano-4-hydroxymizinsäure und die 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Zur Messung der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide wird ein lyophilisiertes, nach Reverse Phase Chromatographie gewonnenes Äquivalent entsprechend 500 µl humanem Liquor cerebrospinalis, verwendet. Die chromatographierte Probe wird in 15 µl einer Matrix-Lösung gelöst. Diese Matrix-Lösung enthält z.B. 10 g/l α-Cyano-4-hydroxymizinsäure und 10 g/l L(-)Fucose gelöst in einem Lö-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 38 -

sungsmittelgemisch bestehend aus Acetonitril, Wasser, Trifluoressigsäure und Aceton im Volumenverhältnis 49:49:1:1. Von dieser Lösung werden 0,3 μ 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 VGFARP-Peptide zeigt Abbildung 3.

10 Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann zur Quantifizierung von Peptiden wie z.B. der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide eingesetzt werden, wenn diese Peptide in einer Konzentration vorliegen, die sich im dynamischen Messbereich des Massenspektrometers befindet, wodurch Detektorsättigung vermieden wird.

15 Dieses ist für die Messung der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide in Liquor cerebrospinalis bei einer Liquor-Äquivalentkonzentration von 33,3 μ l pro μ l Matrixlösung der Fall. Für jedes Peptid gibt es ein spezifisches Verhältnis zwischen Messsignal und Konzentration, was bedeutet, dass die

20 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,

25 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 μ M (= 1) normiert. Jedes Peptid zeigt ein individuelles, typisches Verhältnis von Signalstärke zu Konzentration, was anhand

30 der Steigung der Kurve ablesbar ist.

Beispiel 4: Massenspektrometrische Identifizierung von VGFARP-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 39 -

Peptiden

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

Die Identifikation der erfindungsgemäßen Peptide, in diesen Fraktionen erfolgt z.B. mit nanoSpray-MS/MS [11]. Dabei wird ein VGFARP-Peptid-Ion im Massenspektrometer anhand seines spezifischen m/z (Masse/Ladung) Wertes in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise im Massenspektrometer selektioniert. Dieses selektierte Ion wird anschließend durch Zuführung von Kollisionsenergie mit einem Stoßgas, z.B. Helium oder Stickstoff, fragmentiert und die resultierenden VGFARP-Peptid Bruchstücke im Massenspektrometer in einer integrierten Analyseinheit detektiert und korrespondierende m/z-Werte bestimmt (Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie) [13]. Das Fragmentierungsverhalten von Peptiden ermöglicht bei einer Massengenauigkeit von z.B. 50ppm eine eindeutige Identifizierung der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide unter Verwendung von computer-gestützten Suchverfahren [14] in Sequenzdatenbanken, in die die Sequenz eines VGF-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.

30

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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 40 -

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 VGFARP-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 VGFARP-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.

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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 41 -

charakterisieren, sollen jedoch den Äquivalenzbereich der Erfindung nicht eingrenzen.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 42 -

Literatur

1. Marcinkiewicz, M., N.G. Seidah, and M. Chrétien. 1996. Implications of the subtilisin/kexin-like precursor convertases in the development and function of nervous tissues. *Acta Neurobiol Exp.* 56:287-98.
2. Salton, S.R., G.L. Ferri, S. Hahm, S.E. Snyder, A.J. Wilson, R. Possenti, and A. Levi. 2000. VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* 21:199-219.
3. Hahm, S., T.M. Mizuno, T.J. Wu, J.P. Wisor, C.A. Priest, C.A. Kozak, C.N. Boozer, B. Peng, R.C. McEvoy, P. Good, K.A. Kelley, J.S. Takahashi, J.E. Pintar, J.L. Roberts, C.V. Mobbs, and S.R. Salton. 1999. Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance [see comments]. *Neuron.* 23:537-48.
4. Levi, A., J.D. Eldridge, and B.M. Paterson. 1985. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science.* 229:393-5.
5. Salton, S.R. 1991. Nucleotide sequence and regulatory studies of VGF, a nervous system-specific mRNA that is rapidly and relatively selectively induced by nerve growth factor. *J Neurochem.* 57:991-6.
6. Eagleson, K.L., L.D. Fairfull, S.R. Salton, and P. Levitt. 2001. Regional differences in neurotrophin availability regulate selective expression of VGF in the developing limbic cortex. *J Neurosci.* 21:9315-24.
7. Snyder, S.E., J.E. Pintar, and S.R. Salton. 1998. Developmental expression of VGF mRNA in the prenatal and postnatal rat. *J Comp Neurol.* 394:64-90.
8. Snyder, S.E., H.W. Cheng, K.D. Murray, P.J. Isackson, T.H. McNeill, and S.R. Salton. 1998. The messenger RNA encoding VGF, a neuronal peptide precursor, is rapidly regulated in

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 43 -

- the rat central nervous system by neuronal activity, seizure and lesion. *Neuroscience*. 82:7-19.
9. Wisor, J.P., and J.S. Takahashi. 1997. Regulation of the *vgf* gene in the golden hamster suprachiasmatic nucleus by light and by the circadian clock. *J Comp Neurol*. 378:229-38.
- 5 10. Trani, E., T. Ciotti, A.M. Rinaldi, N. Canu, G.L. Ferri, A. Levi, and R. Possenti. 1995. Tissue-specific processing of the neuroendocrine protein VGF. *J Neurochem*. 65:2441-9.
- 10 11. Wilm, M., and M. Mann. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem*. 68:1-8.
12. Engelborghs, S., and P.P. De Deyn. 2001. Biological and genetic markers of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Med Okayama*. 55:55-63.
- 15 13. Papayannopoulos, I.A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev*:49-73.
14. 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.
- 20

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

SEQUENCE LISTING

<110> BioVision AG
BioVision AG

<120> Verfahren zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen
, zugehörige Peptide und Nachweisreagenzien

<130> VGF-PCT

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu
1 5 10 15

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly
20 25 30

Ser Ala Pro Glu Val
35

<210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu
1 5 10 15

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly
20 25 30

Ser Ala Pro Glu Val Arg Gly Ala
35 40

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

<210> 3
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 3

Ala Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu
 1 5 10 15

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly
 20 25 30

Ser Ala Pro Glu
 35

<210> 4
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 4

Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His
 1 5 10 15

Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser
 20 25 30

Ala Pro Glu Val
 35

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 5

Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His
 1 5 10 15

Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser
 20 25 30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

Ala Pro Glu Val Arg Gly Ala
35

<210> 6
<211> 34
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

Glu Val

<210> 7
<211> 36
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 7

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

Glu Val Arg Gly
35

<210> 8
<211> 37
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 8

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
 20 25 30

Glu Val Arg Gly Ala
 35

<210> 9
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 9

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
 1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
 20 25 30

Glu

<210> 10
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 10

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
 1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
 20 25 30

<210> 11
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 11

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

<400> 15

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp
1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Ala Pro Ser Gly Ser Gln Gln Gly
1 5

<210> 17

<211> 36

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

Ser Gln Thr His Ser Leu Pro Ala Pro Glu Ser Pro Glu Pro Ala Ala
1 5 10 15Pro Pro Arg Pro Gln Thr Pro Glu Asn Gly Pro Glu Ala Ser Asp Pro
20 25 30Ser Glu Glu Leu
35

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 18

Gln Glu Leu Arg Asp Phe Ser Pro Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

<400> 19

Glu Pro Ala Ala Pro Pro Arg Pro
 1 5

<210> 20

<211> 68

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

Leu Gln Glu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Glu Gln Glu Arg Arg Gly Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp
 20 25 30

Glu Glu Ala Ala Glu Ala Ala Glu Ala Glu Ala Asp Glu Ala Glu Arg
 35 40 45

Ala Arg Gln Asn Ala Leu Leu Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala
 50 55 60

Gly Ala Glu Asp
 65

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

Gly Leu Gln Glu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

<213> homo sapiens

<400> 22

Gly Leu Gln Glu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Gln Glu
 20

<210> 23

<211> 45

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Gly Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ala Glu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Cln Asn Ala Leu Leu
 20 25 30

Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala Gly Ala Glu Asp
 35 40 45

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Gly Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ala Glu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Glu Asn Ala Leu Leu
 20 25 30

<210> 25

<211> 45

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ala Asp Glu Ala Glu Arg Ala Arg Gln Asn Ala Leu Leu
 20 25 30

Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala Gly Ala Glu Asp
 35 40 45

<210> 26
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 26

Ser Gln Glu Glu Thr Pro Gly His Arg Arg Lys Glu Ala Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Gly Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr
 20 25 30

Ile Asp Ser Leu
 35

<210> 27
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 27

Ser Gln Glu Glu Thr Pro Gly His Arg Arg Lys Glu Ala Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Gly Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr
 20 25 30

Ile Asp Ser Leu Ile Glu Leu Ser Thr Lys Leu His Leu Pro Ala Asp
 35 40 45

Asp Val Val Ser

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

50

<210> 28
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 28

Ser Gln Glu Glu Thr Pro Gly His Arg Arg Lys Glu Ala Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Gly Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr
 20 25 30

Ile Asp Ser Leu Thr Glu Leu Ser Thr Lys Leu His Leu Pro Ala Asp
 35 40 45

Asp Val Val Ser Ile Ile Glu Glu Val Glu Glu
 50 55

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 29

Ser Thr Lys Leu His Leu Pro Ala Asp Asp Val Val Ser
 1 5 10

<210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 30

Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg
 1 5

<210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

<400> 31

Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala
 1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 32

Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr Ile
 1 5

<210> 33

<211> 38

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 33

Asa Ala Pro Pro Glu Pro Val Pro Pro Pro Arg Ala Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Thr His Val Arg Ser Pro Gln Pro Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 20 25 30

Arg Asp Glu Leu Pro Asp
 35

<210> 34

<211> 37

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 34

Asn Ala Pro Pro Glu Pro Val Pro Pro Pro Arg Ala Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Thr His Val Arg Ser Pro Gln Pro Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 20 25 30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

Arg Asp Glu Leu Pro
35

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35

Pro Thr His Val Arg Ser Pro Gln
1 5

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 56 -

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer chronisch-demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine chronisch-demenzielle Erkrankung durch Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Markerpeptids, verglichen mit der Konzentration des Markerpeptids in einer Kontrollprobe, dadurch gekennzeichnet dass:
- 5
- a) als Markerpeptid wenigstens ein Peptid, abgeleitet von der Sequenz mit der Accession No. Y12661 aus der DNA Data Bank of Japan verwendet wird, und
- 10
- b) eine für das jeweilige Markerpeptid spezifische Konzentrationsänderung in der Probe relativ zu einer Kontrollprobe festgestellt wird, und
- 15
- c) eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der unter b) genannten Weise als positives Nachweisergebnis für die chronisch-demenzielle Erkrankung gewertet wird.
- 20
2. Verfahren zum Nachweis einer chronisch-demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine chronisch-demenzielle Erkrankung durch Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Markerpeptids, verglichen mit der Konzentration des Markerpeptids in einer Kontrollprobe, dadurch gekennzeichnet dass:
- 25
- a) als Markerpeptid wenigstens ein Peptid, abgeleitet von der Sequenz mit der Gene Bank Accession No. NM_003378 verwendet wird, und
- 30
- b) eine für das jeweilige Markerpeptid spezifische Konzentrationsänderung in der Probe relativ zu einer Kontrollprobe festgestellt wird, und
- c) eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der unter b) genannten Weise als positives Nachweisergebnis für die chronisch-demenzielle Erkrankung ge-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 57 -

wertet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,
dass wenigstens ein Peptid
- 5 a) Ein VGFARP-Peptid ist, oder
b) ein Peptid entsprechend der Accession No. Y12661 der
DDBJ-Datenbank ist, oder
c) ein Peptid entsprechend der Gene Bank Accession No.
NM_0033378 ist, oder
- 10 d) ein Abkömmling eines natürlich vorkommenden Alles der un-
ter a) bis c) genannten Peptide ist, oder
e) eine VGFARP-Mutante ist, wobei die VGFARP-Mutante vor-
zugsweise in maximal 2, Aminosäuren von der entsprechen-
den nicht mutierten VGFARP-Sequenz abweicht, oder
- 15 f) eine Mutante einer der unter b) oder c) genannten Peptide
ist, wobei die Aminosäuresequenz maximal 20 % von den un-
ter b) oder c) genannten Aminosäuresequenz abweicht, oder
g) ein chemisch modifiziertes, oder posttranslational modifi-
ziertes Peptid entsprechen a) bis f) ist
- 20
4. Verfahren zum Nachweis einer chronisch-demenziellen Erkran-
kung gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass
es in Kombination mit anderen Diagnoseverfahren für chronisch-
demenzielle Erkrankungen zur Erhöhung von deren Sensitivität
25 und/oder Spezifität durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekenn-
zeichnet, dass die demenzielle Erkrankung Morbus Alzheimer
oder eine verwandte neurologische Erkrankung, insbesondere Le-
30 wy-Body Demenz oder vaskuläre Demenz ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekenn-
zeichnet, dass wenigstens ein identifiziertes VGFARP-Peptid
ausgewählt wird, wobei das Peptid in nicht modifizierter Form,

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 58 -

mit posttranslationalen Modifikationen oder in chemisch modifizierter Form, vorzugsweise als Peptid-Oxid vorliegt.

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.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Bestimmung der Schwere der Erkrankung, zur Prognose des Verlaufs, oder zur Diagnose von Vorstufen neurologischer Erkrankungen, insbesondere von "mild cognitive impairment" (MCI) herangezogen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe Liquor cerebrospinalis, Serum, Plasma, Urin, Synovialflüssigkeit, Stuhl, Tränenflüssigkeit, Sputum oder ein Gewebehomogenat ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Peptide mit Hilfe einer massenspektrometrischen Bestimmung vorgenommen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung die massenspektrometrische Bestimmung wenigstens einen der theoretischen, monoisotopischen Massenpeaks von 3666,8278 / 3950,9875 / 3567,7594 / 3595,7907 / 3879,9504 / 3401,6852 / 3614,8077 / 3685,8448 / 3302,6167 / 3173,5741 / 3955,9889 / 1336,6735 / 2503,1827 / \geq 727,3501 / \geq 851,4137 / \geq 730,3246 / 3745,7243 / 1235,5782 / $>$ 833,4395 / 7518,2744 / 2031,8981 / 2418,0419 / 4806,0408 / 3456,5513 / 4806,0408 / 4058,7043 / 5776,6294 / 6618,0363 / 1380,7249 / \geq 946,4468 / \geq

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 59 -

862,3192 / \geq 961,4063 / 3903,0180 / 3787,9911 / \geq 920,4828 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 der Peptide mit Hilfe eines auf ein Peptid oder ein Peptidfragment gerichteten Antikörpers, Antikörperfragments, Phagenpartikels, PNAs oder einer Affinitätsmatrize geschieht.
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.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe vor der Identifizierung durch Fällungsreaktionen oder Flüssigphasentrennungen fraktioniert wird.
17. Ein Peptid, dass
- a) ein VGFARP-Peptid ist, oder
 - b) ein VGFARP-Abkömmling eines VGF-Proteins ist, insbesondere ein Abkömmling von NM_003378 oder Y12661, oder
 - c) ein VGFARP-Abkömmling eines VGF-Allels ist, oder

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 60 -

- d) eine VGFARP-Mutante ist, wobei die VGFARP-Mutante vorzugsweise in maximal 2. Aminosäuren von der entsprechenden nicht mutierten VGFARP-Sequenz abweicht, oder
- e) ein chemisch, oder posttranslational modifiziertes Peptid
- 5 entsprechend a) bis f) ist .
18. Verwendung wenigstens eines der Peptide gemäß Anspruch 17 zur Gewinnung von Antikörpern und zur Entwicklung von Diagnoseagentien zum Nachweis neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von
- 10 Morbus Alzheimer.
19. Antikörper, die die Peptide gemäß Anspruch 17 binden.
- 15 20. Verwendung von Antikörpern gegen VGF oder von Antikörpern gemäß Anspruch 19 zur Diagnose neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
- 20 21. Verwendung von Nukleinsäuren, die zu VGFARP-Peptiden oder zu VGF-Proteinen korrespondieren zur indirekten Bestimmung und Quantifizierung der zugehörigen Proteine und Peptide geeignet sind.
- 25 22. Verwendung eines Verfahrens entsprechend Anspruch 21, bei dem der Nachweis der VGF-Nukleinsäuren unter Verwendung von Northernblots, von Reverse Transkriptase PCR oder von quantitativer PCR erfolgt.
- 30 23. Verwendung eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 bis 16 oder gemäß Anspruch 20 bis 22 zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Therapie für eine neurologische Erkrankung, insbesondere einer chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere bei Morbus Alzheimer.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 61 -

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.
25. Nukleinsäuren, die zu VGFARP-Peptiden korrespondieren.
26. Nukleinsäuren, die als VGF-spezifische Antisense-Nukleinsäuren oder als VGF-spezifische Ribozyme, oder als VGF-spezifische Triplex-Nukleinsäuren geeignet sind.
27. Synthetische Agonisten oder Antagonisten der in Anspruch 3 genannten VGF-Peptide.
28. Peptide gemäß den in Anspruch 3 genannten Peptiden, oder Stoffe gemäß Anspruch 25 bis 27 wobei diese Peptide, Nukleinsäure, 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.
29. Peptide gemäß den in Anspruch 3 genannten 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.
30. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 3 angegebenen Peptide oder der Nukleinsäuren, Peptide, Agonisten oder Anta-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 62 -

gonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 als Arzneimittel oder Arzneimittel-Wirkstoff.

31. Verwendung von wenigstens eines der in Anspruch 3 angegebenen Peptide oder von Nukleinsäuren, Peptiden, 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.
32. Verwendung wenigstens einer Substanz, die die Expression von VGF-Proteinen moduliert, z.B. NGF, BDNF oder NT-3, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
33. Verwendung wenigstens einer Substanz, die selektiv die Transkription oder Expression einer einzelnen VGF-Gen-Variante, insbesondere NM_003378 oder Y12661, inhibiert oder stimuliert zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
34. Verwendung einer Substanz, die wenigstens an eines der in Anspruch 3 angegebenen 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.
35. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide oder der Nukleinsäuren, Peptide, Antagonisten oder Agonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 zur Therapie von neurologi-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 63 -

schen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer.

36. Verfahren zur therapeutischen Modulierung der Konzentration von mindestens einem der in Anspruch 3 genannten Peptide oder von Nukleinsäuren gemäß Anspruch 25 in einem Patienten mit einer neurologischen Erkrankung, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer.

37. Verfahren entsprechend Anspruch 36, bei dem eine Verminderung der Konzentrationen an VGF-Peptiden oder Nukleinsäuren angestrebt wird.

38. Verfahren entsprechend Anspruch 36, bei dem eine Erhöhung der Konzentrationen an VGF-Proteinen oder an VGFARP-Peptide angestrebt wird.

39. Verfahren entsprechend Anspruch 37, bei dem einem Patienten

- a) Antikörper, die gegen VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 gerichtet sind, verabreicht werden, oder
- b) Antisense-Nukleinsäuren, Triplex-Nukleinsäuren oder Ribozyme verabreicht werden um die Expression von VGF-Proteinen, VGFARP-Peptiden, NGF, BDNF oder NT-3 zu vermindern, oder
- c) Substanzen, die die Prozessierung von VGF-Proteinen inhibieren, verabreicht werden, oder
- d) Antagonisten der in Anspruch 3 genannten VGF-Peptide verabreicht werden

40. Verfahren entsprechend Anspruch 38, bei dem einem Patienten

- a) VGF Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 verabreicht wird, oder
- b) Nukleinsäuren verabreicht werden, die für VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 zu kodieren, oder

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 64 -

- c) Substanzen verabreicht werden, die die Prozessierung von VGF-Proteinen fördern, oder
- d) Agonisten der in Anspruch 3 genannten VGF-Peptide verabreicht werden

5

41. Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die in der Lage sind die Expression mindestens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide zu vermindern oder zu verstärken.

10

42. Screeningverfahren zur Identifizierung von Rezeptoren, oder Inhibitoren die mindestens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide binden.

15

43. Screeningverfahren zur Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten mindestens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide.

WO 02/082075

3/9

PCT/DE02/01376

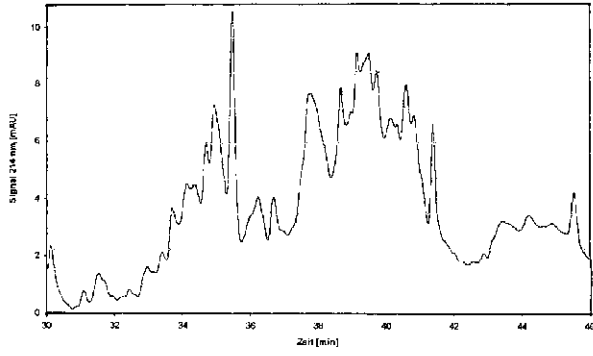


Abbildung 2:

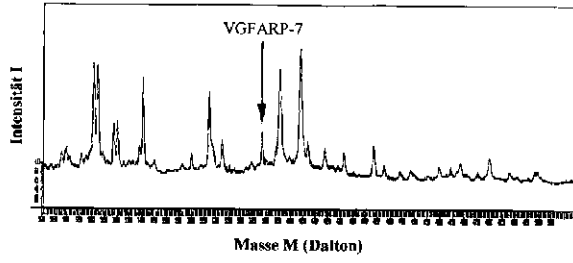


Abbildung 3

WO 02/082075

5/9

PCT/DE02/01376

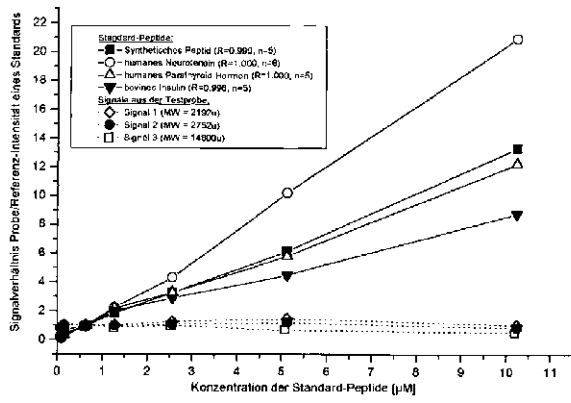


Abbildung 4:

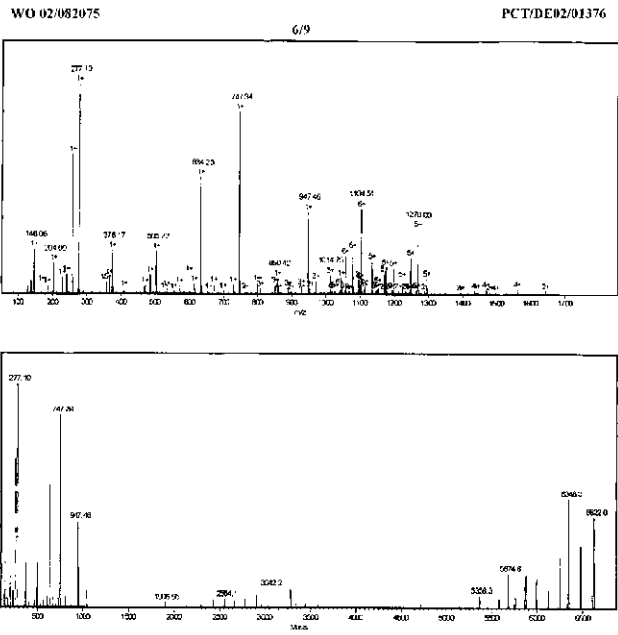


Abbildung 5

WO 02/082075

7/9

PCT/DE02/01376

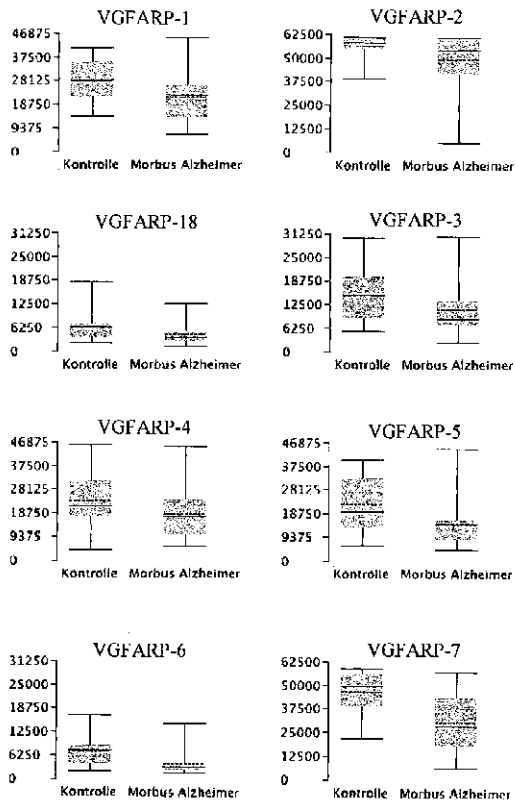


Abbildung 6A:

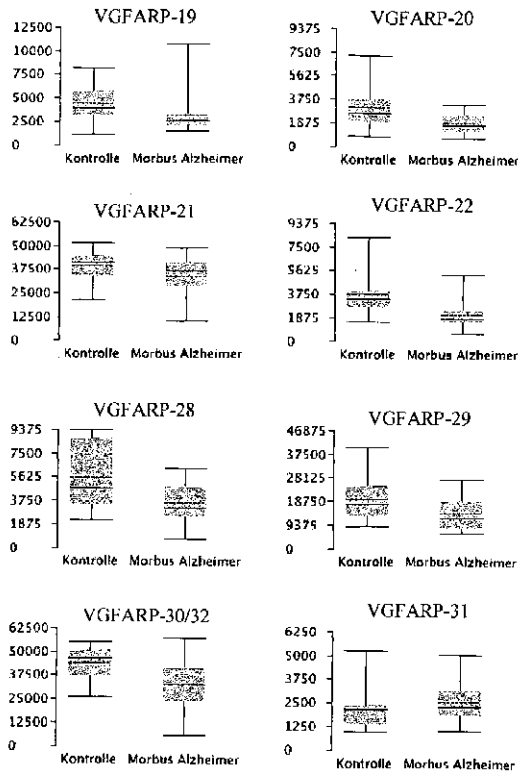


Abbildung 6B:

WO 02/082075

9/9

PCT/DE02/01376

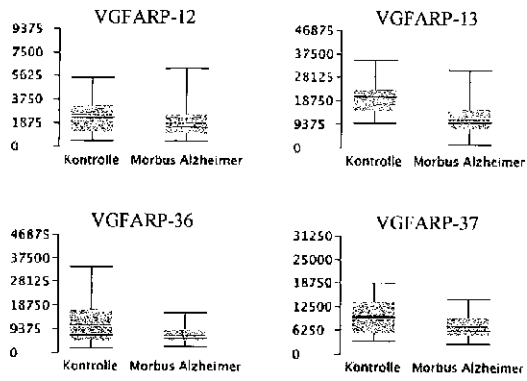


Abbildung 6C:

【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

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/082075 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/08 Hannover (DE); KELLMANN, Markus (DE/DE); Heinrich-Stammes-Strasse 3, 30171 Hannover (DE)
- (21) Internationales Akteuzichen: PCT/DE02/01376
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. April 2002 (08.04.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 10117/431-2 6. April 2001 (06.04.2001) DE
- (71) Anmelder für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von U.S.A.: BIOVISION AG [DE/DE]; Leidor Lyson Strasse 3, 30625 Hannover (DE)
- (72) Erfinder: und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für U.S.): LAMPING, Norbert [DE/DE]; Siegesstrasse 8, 30175 Hannover (DE); ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Von-Fischer-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]; Beckenriede 15, 30159 Hannover (DE)
- (74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Grimm, Lins & Partner GmbH, Frennstraße 15, 30173 Hannover (DE)
- (81) Bestimmungsstaaten *national*: AF, 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, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, OM, 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.
- (84) Bestimmungsstaaten *regional*: ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), östereuropäisches Patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IT, MC, NL, PT, SE, SI), OAPI-Patent (BF, BI, CI, CG, CF, 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 iii für alle Bestimmungsstaaten)
Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/082075 A2

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

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS CHRONISCHER DEMENZIELLER ERKRANKUNGEN, ZUGEHÖRIGEN PEPTIDE UND NACHWEISREAGENZEN

(57) Abstract: The invention relates to defined peptides and the quantitative determination thereof in biological samples from patients suffering from Alzheimer's disease, in relation to the concentration thereof in a control group. The invention also relates to the use of said peptides for therapeutic purposes. The inventive peptides come from a protein precursor having the corresponding gene and are processed in a specific manner and modified in a post-translational manner. Changes in the concentrations of said peptides indicate Alzheimer's disease, and the direction of the change in concentration is specific for each peptide. Alzheimer's disease is detected by identifying the peptides, individually or in groups. The invention can also be used to control the course of Alzheimer's disease, for the prognosis thereof and for the development of therapeutic agents to combat the same.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft definierte Peptide und deren quantitative Bestimmung in biologischen Proben von Patienten, die an Morbus Alzheimer erkrankt sind, relativ zu deren Konzentration in einer Kontrollgruppe. Ausserdem betrifft die Erfindung die Verwendung der Peptide zu therapeutischen Zwecken. Die erfindungsgemässen Peptide entstammen aus einem Proteinprecursor mit dem korrespondierenden Gen und sind in spezifischer Art und Weise prozessiert und posttranslational modifiziert. Änderungen der Konzentration dieser Peptide zeigen eine Morbus Alzheimer Erkrankung an. Dabei ist die Richtung der Konzentrationsänderung für jedes dieser Peptide spezifisch. Der Nachweis von Morbus Alzheimer erfolgt durch eine Identifizierung der Peptide einzeln oder in Kombinationen. Die Erfindung findet darüber hinaus Verwendung zur Verlaufskontrolle von Morbus Alzheimer, zur Prognose und zur Entwicklung von Therapeutika gegen Morbus Alzheimer.

WO 02/082075 A2 **Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchebericht und neu zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigen**Fassung:** 19. Dezember 2002**(15) Informationen zur Berichtigung:**

siehe PCT Gazette Nr. 51/2002 vom 19. Dezember 2002, Section II

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 1 -

**Verfahren zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen,
zugehörige Peptide und Nachweisreagenzien**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer chronischen, demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine chronisch-demenzielle Erkrankung, insbesondere von Morbus Alzheimer oder verwandten neurologischen Erkrankungen, z.B. 10 Lewy-Body Demenz oder vaskuläre Demenz. Weiterhin betrifft die Erfindung Peptide, die für den Nachweis des Vorhandenseins dieser Erkrankungen, zur Verlaufskontrolle der Erkrankungen und des Grades der Erkrankungen aufgefunden wurden. Außerdem 15 betrifft die Erfindung Nachweisreagenzien wie Antikörper und Nucleinsäuren und dergleichen, über die diese Peptide, bzw. die entsprechenden Nucleinsäuren nachgewiesen werden können. Weiterhin betrifft die Erfindung pharmazeutische Anwendungen, die VGF, VGF-Peptide, VGF-Antikörper, VGF-Nucleinsäuren, VGF-Protein-Antagonisten, VGF-Protein-Agonisten, VGF-Peptid- 20 Agonisten oder VGF-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, 25 an klinischen Studien zur Untersuchung dieser Erkrankungen teil zu nehmen.

Bei den Peptiden handelt es sich um Fragmente des Proteins VGF, das auch als „neuroendocrine specific protein VGF“ bezeichnet wird. In der Literatur wird die Abkürzung VGF auch 30 für das Protein „vaccinia growth factor“ oder für „vaccinia virus growth factor“ und für „Vascular Permeability Factor“ verwendet, wobei diese Proteine nicht dem VGF-Protein entsprechen, das Gegenstand dieser Erfindung ist.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 2 -

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.

10 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-
15 Demenzen bekannt: die vaskuläre Demenz, die Lewy-Body Demenz, die Binswanger-Demenz sowie Demenzielle Erkrankungen, die als Begleiteffekt anderer Krankheiten, wie Parkinsonscher Krankheit, Huntington-Disease, Pick's-Disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinger-Krankheit, Kreuzfeldt-Jakob-Krankheit
20 usw. vorkommen.

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch folgende Symptome auszeichnet: Abnahme der geistigen Fähigkeiten, Konfusion und herabgesetzte Selbsterhaltungs-
25 und Selbstbetreuungsfähigkeit. 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
30 sichere Nachweis der Erkrankung. Diese histopathologischen

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 3 -

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
5 „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
10 criteria".

Diese Systeme verwenden eine Reihe von neuropsychologischen Tests, um eine Morbus Alzheimer Diagnose treffen zu können, nicht jedoch objektiv messbare klinische Parameter.

15 Die Diagnose von Morbus Alzheimer ist auch deshalb schwierig, da sie, ebenso wie andere demenzielle Erkrankungen, schleichend einsetzt und mit langsam fortschreitender Zerstörung von Nervenzellen im Gehirn verbunden ist.

20 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
30 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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 4 -

zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer, zur Verfügung zu stellen. Außerdem liegt die Aufgabe zugrunde, eine neue Therapie zur Behandlung von Morbus Alzheimer zur Verfügung zu stellen, da bisher nur unfriedigende Therapieansätze zur Behandlung von Morbus Alzheimer zur Verfügung stehen.

Definitionen:

10

VGF-Proteine oder Peptide entsprechend den Accession Nr. NM_003378 und Y12661.

Die von den Nukleinsäuresequenzen NM_003378 und Y12661 abgeleiteten Peptide werden auch als VGF-Proteine bezeichnet und schließen alle natürlich vorkommenden Allele, Mutanten und Polymorphismen von VGF-Proteinen sowie gewebespezifisch exprimierte VGF-Varianten ein. Insbesondere sind auch VGF-Varianten eingeschlossen die aufgrund von Erkrankungen oder als Folge von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer auftreten. Eingeschlossen sind sowohl VGF-Proteine mit, als auch ohne Signalsequenz, Pro-Formen von VGF-Proteinen die noch nicht prozessiert sind, sowie bereits prozessierte VGF-Proteine, lösliche VGF-Proteine und membranständige VGF-Proteine, wobei die membranständigen VGF-Proteine sowohl über transmembranäre Aminosäuresequenzen mit einer Zell- oder Organellmembran verbunden sein können, als auch über eine posttranslationale Modifikation, z.B. einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker. Ferner sind eingeschlossen Variationen der VGF-Sequenz, die durch alternatives Splicing, durch alternative Translationsstart- und -endpunkte, durch RNA-Editing, durch alternative posttranslationale Modifizierungen, sowie weitere durch in der Natur vorkommende Mechanismen entstandene VGF-Proteinvarianten.

20
25
30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 5 -

VGFARP-Peptide:

Nachfolgend werden VGF-Peptide und VGF-Peptid-Varianten als VGFARP- ("VGF Alzheimer related peptide") Peptide bezeichnet.

5 VGFARP-Peptide können sich von beiden eingangs genannten VGF-Sequenzen (NM_003378 und Y1266) sowie von weiteren VGF-Protein-Varianten, die möglicherweise in der Natur vorkommen, ableiten. Außerdem können VGFARP-Peptide zwei punktmutierte, zwei deletierte oder zwei zusätzlich intern eingefügte Amino-

10 nosäuren, sowie N-terminale und/oder C-terminale Verlängerungen beinhalten. Dabei müssen sie jedoch mindestens 8 Aminosäuren aus der VGF-Proteinsequenz beibehalten. Als N- oder C-terminale Verlängerung kommen nur solche Aminosäuren in Frage, die in der VGF-Proteinsequenz an dieser Sequenzposition im

15 VGF-Protein vorkommen. Außerdem werden Peptide, die sich aus natürlich vorkommenden VGF-Polymorphismen und aus natürlich vorkommenden VGF-Mutanten ableiten, als VGFARP-Peptide bezeichnet. VGFARP-Peptide können auch mit posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Glykosilierungen und Phosphorylierun-

20 ge und/oder in chemisch modifizierter Form, vorzugsweise als Peptid-Oxide, vorliegen. Zum Beispiel wurde VGFARP-12 sowohl als nicht oxidiertes, als auch als oxidiertes Peptid identifiziert.

25 Chemisch oder posttranslational modifizierte Peptide:

Ein chemisch oder posttranslational modifiziertes Peptid kann sowohl aus D- als auch aus L-Aminosäuren, sowie aus Kombinationen von D- und L-Aminosäuren bestehen. Außerdem können in diesen Peptiden ungewöhnliche Aminosäuren, d.h. Aminosäuren,

30 die nicht zu den 20 Standardamino-säuren 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,

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 6 -

alpha-Aminoadipinsäure, Diaminobuttersäure, 4-Aminobenzoesäure, Homocystein, alpha-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-, Biotinyl-, Stearoyl-, Palmityl-, Lipoyl-, C-Mannosyl-, Phosphor- und Sulfatgruppen, Glycosilierungen, Amidierungen, Deamidierungen, Pyroglutaminsäure, Citrullin, usw. möglich.

Nukleinsäuren:

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 Nukleotide mit hoher in vivo Stabilität, wie z.B. Phosphorthioaten, enthalten. Solche stabilisierten Nukleinsäuren finden bereits bei der Anwendung von Ribozym-, Antisense- und Triplexnukleinsäure-Techniken Verwendung.

Signifikanz:

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.

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.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 7 -

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.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass nur 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 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 VGF-Protein oder VGFARP-Peptid Konzentration, mit dem Ziel der Einstellung des Patienten auf normale VGF- oder VGFARP-Werte kann somit therapeutisch angewendet werden.

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 VGF-Peptide, welche von der Sequenz mit der Gene Bank Accession No. NM_003378 oder der Accession No. Y12661 der DNA Data Bank of Japan abgeleitet sind in einer biologischen Probe eines Individuums. Da diese VGF-Peptide mit der Erkrankung vermutlich in einem ursächlichen Zusammenhang stehen, beinhaltet die vorliegende Erfindung auch die Verwendung dieser Peptide zur Therapie von Morbus Alzheimer oder verwandter neurologischer Erkrankungen. Diese Peptide oder Peptidfragmente werden als "VGF derived Alzheimer related

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 8 -

peptide" (VGFARP) bezeichnet und sind nummeriert mit VGFARP-1 bis VGFARP-38. Die beiden VGF-Protein-Varianten NM_003378 und Y12661 unterscheiden sich nur an 13 Positionen ihrer Aminosäuresequenz und von beiden VGF-Proteinen wurden VGF-Peptide identifiziert, die eine Unterscheidung zwischen Morbus Alzheimer und der Kontrollgruppe ermöglichen. Die VGFARP-Peptide VGFARP-11 und -32 stammen von der VGF-Variante mit der Accession Nr. Y12661, die VGFARP-Peptide VGFARP-25, -30, -31, -36 und -37 stammen von der VGF-Variante mit der Accession Nr. NM_003378. Alle übrigen VGFARP-Peptide können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz von beiden VGF-Varianten abstammen. Da bisher schon VGFARP-Peptide, abstammend von zwei verschiedenen VGF-Varianten identifiziert wurden, ist davon auszugehen, dass noch weitere VGFARP Peptide existieren, die von diesen oder anderen VGF-Varianten abstammen. Diese VGFARP-Peptide sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Zur Lösung der Aufgabe gibt die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Morbus Alzheimer unter Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Markerpeptids in einer biologischen Probe eines Patienten, verglichen mit der Konzentration des Markerpeptids in einer Kontrollprobe an, bei dem folgende Punkte erfüllt sein müssen: 1. Als Markerpeptid wird wenigstens ein VGFARP-Peptid oder ein Peptid, das von den Nukleinsäuren mit den Accession Nummern NM_003378 oder Y12661 oder homologen Sequenzen abgeleitet ist verwendet. 2. Es tritt 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 auf. 3. Eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der vorgenannten Weise wird als positives Nachweisergebnis für eine neurologische Erkrankung, vorzugsweise Morbus Alzheimer, gewertet.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 9 -

Dabei kann für ein bestimmtes VGFARP-Peptid grundsätzlich entweder nur ein Anstieg der Peptidkonzentration bei Morbus Alzheimer Patienten auftreten, oder es kann für dieses VGFARP-Peptid grundsätzlich nur eine Verminderung der Peptidkonzentration bei Morbus Alzheimer Patienten auftreten. Für ein definiertes VGFARP-Peptid kann nicht gleichzeitig bei einem individuellen Morbus Alzheimer Patienten eine erhöhte und bei einem anderen Morbus Alzheimer Patienten eine, relativ zur Kontrollgruppe verminderte VGFARP-Peptidkonzentration auftreten. Wie bei nahezu allen medizinischen Diagnosen von Erkrankungen sind falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse grundsätzlich möglich, d.h., dass in wenigen Einzelfällen eine falsche Diagnose erfolgt, da sich die Konzentration der VGFARP-Peptide bei Morbus Alzheimer Patienten nicht mit hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit von der Konzentration der VGFARP-Peptide bei Kontrollproben unterscheidet. Dieses Problem kann jedoch durch Mehrfachkontrollen behoben werden.

Im Sinne dieser Erfindung werden Peptide, die als Fragmente der VGF-Sequenz aufgefasst werden können, als VGFARP-Peptide bezeichnet. Sie umfassen vom VGF abgeleitete homologe Peptide. Sie umfassen Abkömmlinge natürlich vorkommender Allele dieser Peptide und homologe Mutanten, insbesondere punktmutierte Mutanten mit vorzugsweise nicht mehr als zwei von VGF abweichenden Aminosäuren. Bevorzugte Marker nach der Erfindung sind im Sequenzprotokoll angegeben und sind mit VGFARP-1 bis VGFARP-38, entsprechend Seq. ID 1 bis 35 benannt. Die Sequenzen der VGFARP-Peptide sind in Abbildung 1 und in Tabelle 1 dargestellt. Die Zuordnung der VGFARP-Peptide zu ihrer jeweiligen Seq. ID No. ist in Tabelle 1 dargestellt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um ein Verfahren, bei welchem spezifische Biomarker erfasst werden,

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 10 -

die bei neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere bei Morbus Alzheimer, in ihrer Konzentration verändert sind und die die Krankheit auch bereits in einem sehr frühen Stadium und eine erhöhte Erkrankungsrisiko frühzeitig anzeigen. Dies ist
5 wichtig, um einen verlässlichen klinischen Marker zur Diagnose dieser Erkrankungen zur Verfügung zu stellen.

Vorzugsweise kann die Konzentration der VGFPARF-Peptide in der Probe, aber auch das charakteristische Muster des Auftretens
10 mehrerer bestimmter VGFPARF-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 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
15 der Erkrankung eine Voraussetzung zur Entwicklung einer Therapie ist.

Der Nachweis von VGFPARF-Peptiden ermöglicht es außerdem, im Rahmen von klinischen Studien zur Entwicklung von neuen Therapien zur Behandlung von Morbus Alzheimer mit hoher Spezifität
25 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 VGFPARF-Peptiden die Stratifizierung von Patienten, wodurch Subgruppen von Morbus Alzheimer Patienten gezielt ausgewählt werden können, die für bestimmte Morbus
30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 11 -

Alzheimer Therapiestrategien oder klinische Studien besonders geeignet sind.

Bei Morbus Alzheimer Patienten sind die Konzentrationen von
5 VGFARP-Peptiden deutlich verändert, relativ zu gesunden Personen. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist es daher, die
VGFARP-Konzentrationen bei Morbus Alzheimer Patienten auf normale Konzentrationen zu bringen. Dieses Verfahren kann zur
Therapie von Morbus Alzheimer oder verwandten neurologischen
10 Erkrankungen eingesetzt werden. Bei erhöhten VGF-Protein oder VGFARP-Peptid Konzentrationen können die Konzentrationen dieser Stoffe durch therapeutische Gabe von z.B. VGF-Protein oder VGFARP-Peptid spezifischen Antikörpern oder VGF-spezifischen Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder Triplex-Nukleinsäuren
15 oder VGFARP-Peptid-Antagonisten, VGF-Protein-Antagonisten gesenkt werden. Zur Therapie können auch Substanzen verabreicht werden, die die körpereigene Expression von VGF-Protein oder die Prozessierung von VGF-Protein zu VGFARP-Peptiden unterdrücken. Liegt ein Mangel an VGF-Protein oder VGFARP-Peptiden
20 als Erkrankungsursache vor, so können therapeutische Gaben von VGF-Protein, VGFARP-Peptiden, VGFARP-Peptid-Agonisten oder VGF-Protein-Agonisten vorgenommen werden. Die körpereigene Produktion von VGF-Protein oder VGFARP-Peptiden kann durch die therapeutische Gabe von Substanzen wie z.B. NGF, BDNF oder NT-
25 3 oder anderen geeigneten Stoffen erhöht werden, da diese Stoffe die VGF-Expression erhöhen. Auch Substanzen, die die Prozessierung von VGF-Protein zu VGFARP-Peptiden fördern, wie z.B. Prohormonkonvertasen wie z.B. PC1, PC2 oder PC3, können therapeutisch eingesetzt werden. Natürlich ist auch die Kombi-
30 nation von verschiedenen Therapiestrategien möglich und unter Umständen sinnvoll.

Die Erfindung umfasst daher auch die Verwendung von VGF-Proteinen, VGFARP-Peptiden, VGFARP-Peptid-Agonisten und -Anta-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

12 -

gonisten, VGF-Protein-Agonisten und -Antagonisten, anti-VGF-Protein Antikörpern, anti-VGFARP-Peptid Antikörpern, NGF, BDNF, NT-3, anti-KGF Antikörpern, anti-BDNF Antikörpern, anti-NT-3 Antikörpern und Antikörpern gegen Rezeptoren der genannten Proteine zur direkten oder indirekten Modifizierung der Konzentration an VGF-Proteinen und VGFARP-Peptiden zur Behandlung von neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer. Alternativ zu Antikörpern können auch Antikörperfragmente, Antikörperfusionsproteine, oder andere selektiv an VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 bindende Substanzen Verwendung finden. Alternativ zu den genannten Proteinen und Peptiden können auch Fusionsproteine der genannten Proteine 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.

20 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. VGF-Peptide, VGF-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, Proteine, Nukleinsäuren, Agonisten oder Antagonisten angefügt werden, die den Übertritt in den Subarachnoidalraum

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 13 -

begünstigen, bzw. umgekehrt den Übertritt aus den Subarachnoidalraum heraus erschweren.

Die Erfindung umfasst auch die Verabreichung der genannten
5 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 Mus-
kel, Fett, Gehirn usw. Dadurch kann eine erhöht biologische
10 Verfügbarkeit und Wirksamkeit dieser Therapeutika erreicht
werden. Z.B. können Peptide oder Proteine, die oral verab-
reicht werden durch säureresistente Kapseln vor porteolyti-
schen Abbau im Magen geschützt werden. Stark hydrophobe Sub-
stanzen können durch geeignete galenische Aufbereitungen hy-
15 drophiler und somit besser geeignet für z.B. intravenöse In-
jektionen werden usw.

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

25 Aufgrund der zahlreichen, im Rahmen dieser Erfindung neu iden-
tifizierten VGF-Peptide, können erstmals Positionen im VGF-
Protein experimentell nachgewiesen werden, an denen eine Pro-
zessierung des VGF-Proteins in vivo statt findet. Bei diesen
Prozessierungsstellen handelt es sich, bezogen auf die VGF-
30 Proteinsequenz von NM_003378 um folgende Sequenzpositionen:
371/372, 418/419, 479/480, 480/481, 481/482, 482/483 und
483/484. Bezogen auf die VGF-Proteinsequenz von Y12661 handelt
es sich um folgende Prozessierungsstellen: 371/372, 419/420,
480/481, 483/484, 484/485 und 485/486. Alle experimentell

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 14 -

identifizierten Porzessierungspositionen stellen dibasische Positionen, d.h. direkt aufeinander folgende Aminosäuren mit positiv geladenen Aminosäuresseitenketten (Arginin = R, Lysin = K) dar. Solche Sequenzmotive werden z.B. von Prohormonkonvertasen erkannt und geschnitten, wobei zusätzlich die beiden basischen Aminosäuren endoproteolytisch entfernt werden. Wie der Name der Prohormonkonvertasen schon andeutet, konvertieren Prohormonkonvertasen Prohormone zu Hormonen, wodurch neue biologisch aktive Stoffe (Peptid-Hormone) entstehen. Beispiele für biologische aktive Peptide, die auf diese Weise aus ihren Pro-Formen generiert werden sind proNGF/NGF, proBDNF/BDNF usw. [1]. Folglich stellen die erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide Peptidhormone dar, die im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, vorzugsweise Morbus Alzheimer, als Angriffspunkte für Therapeutika geeignet sind. Die Modullierung der VGFARP-Peptid Konzentrationen kann somit zur Therapie von neurologischen Erkrankungen, vorzugsweise Morbus Alzheimer Verwendung finden.

20 VGF-Biologie

Die im Rahmen dieser Erfindung identifizierten VGF-Proteine (Vorläufermoleküle zu VGF-Peptiden) werden als ca. 68 kDa große Proteine selektiv in neuroendokrinen und neuronalen Zellen synthetisiert, wobei ihre Expression mit zunehmenden Alter abnimmt [2]. Bei der Untersuchung von VGF-Gen defizienten Mäusen stellte sich heraus, dass wichtige Funktion im Energiestoffwechsel betroffen sind [3]. VGF-Gen defiziente Mäuse weisen eine geringe Körpergröße auf, sind hypermetabolisch und hyperaktiv. VGF wird auch in den insulinproduzierenden Inselzellen der Bauchspeicheldrüse synthetisiert.

VGF wurde bei der Untersuchung einer Pheochromozytom-Zelllinie der Ratte (PC12-Zelllinie) entdeckt und die Stimulierung die-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 15 -

ser Zelllinie mit „Nerven Wachstumsfaktor“ (NGF) bewirkt eine 12- bis 14-fache Steigerung der Konzentration von VGF [4, 5]. NGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der die Differenzierung des peripheren und zentralen Nervensystems reguliert. Weitere
5 Faktoren, die die VGF-Expression regulieren sind der „Brain-Derived Neurotrophic Factor“ (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) [6]. *In vivo* wird VGF-mRNA durch neuronale Aktivität, neuronale Verletzungen und durch den biologischen Rhythmus (circadian clock) reguliert [2, 7-9].

10

VGF wird mit zunehmender Differenzierung neuronaler Zellen über neuronalspezifisch exprimierte Endoproteasen, die vermutlich basische Aminosäuren erkennen, proteolytisch prozessiert. Wie Trani et al. zeigen konnten entstehen C-terminale VGF-
15 Peptide mit den Massen 20, 18 und 10 kDa [10]. Diese VGF-Prozessierung findet im Postendoplasmatischen Retikulum statt. Diese Peptide werden in sekretorischen Vesikeln angereichert, vorzugsweise nach Membran-Depolymerisation freigesetzt und könnten eventuell eine Rolle in der neuronalen Kommunikation
20 spielen [10]. Prohormonkonvertasen wie z.B. die PC1, PC2 oder PC3 sind aus der Literatur als Beispiele für Endoproteasen, die Protein-Vorläufermoleküle an dibasischen Sequenzstellen proteolytisch spalten bekannt. Die von uns identifizierten VGFARP-Peptide stellen jedoch überraschenderweise Fragmente
25 mit deutlich geringerem Molekulargewicht als 10 bis 20 kDa dar und sind daher verschieden zu den von Trani et al. beschriebenen VGF-Peptiden. Außerdem verwendeten Trani et al. zum Nachweis dieser VGF-Peptide anti-VGF Antikörper, die VGF-Epitope erkennen, die verschieden zu den Sequenzen der VGFARP-Peptide
30 sind. VGFARP-Peptide haben wir sowohl in Morbus Alzheimer Patienten, als auch in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Die von uns identifizierten Peptide stellen neue, bisher nicht beschriebene Prozessierungs-Produkte von VGF dar. Die Konzentrationen der VGFARP-Peptide können in einer für jedes Peptid

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 16 -

spezifischen Weise in der Patientengruppe relativ zur Kontrollgruppe entweder einheitlich erhöht oder aber einheitlich erniedrigt sein. Bisher waren ausschließlich andere VGF-Peptide unbekannter Sequenz, abstammend vom C-terminalen Bereich des VGF-Proteins und mit deutlich höherem Molekulargewicht als die von uns neu identifizierten und erstmalig sequenzierten Peptide bekannt [10].

Vorzugsweise Ausführungsformen der Erfindung

10

Vorzugsweise ist die durch das erfindungsgemäße Verfahren nachgewiesene chronisch-demenzielle Erkrankung Morbus Alzheimer. Bislang konnte die Veränderung der Konzentration der erfindungsgemäßen Peptide und Peptidfragmente bei Morbus Alzheimer Patienten nachgewiesen werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die erfindungsgemäßen Peptide zum Nachweis und zur Therapie von Morbus Alzheimer und verwandten neurologischen Erkrankungen herangezogen werden können.

20

Die Identifizierung konzentriert sich vorzugsweise auf bestimmte Peptidfragmente der VGF-Proteine mit der GeneBank Accession No. NM_003378, oder der DDBJ Accession No. Y12661 d.h. auf Peptide, die Teilsequenzen dieser VGF-Proteine umfassen. Diese VGF-Peptide (VGF-Proteinfragmente) werden als "VGF derived Alzheimer related peptide" (VGFARP) bezeichnet und sind durchnumeriert mit VGFARP-1 bis VGFARP-38. Der Zusammenhang zwischen den VGF-Proteinen und VGFARP-1 bis VGFARP-38 ist in Abbildung 1 dargestellt. Die von uns ermittelten Sequenzen der Peptide sind im Sequenzprotokoll angegeben.

30

Wir haben in biologischen Proben verschiedene VGF-Peptide, abstammend von zwei VGF-Protein-Varianten, erstmals nachgewiesen. Diese mit VGFARP-1 bis VGFARP-38 bezeichneten Peptide stellen definierte Fragmente von VGF-Proteinen dar. Diese

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 17 -

Fragmente entstehen auf natürliche Weise in der Natur und wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Diese Fragmente sind verschieden zu Peptiden, die in der Literatur oft durch in vitro Proteolyse (durch Zugabe von Proteasen wie z.B. Trypsin) erzeugt 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 VGFARP-Peptide anschließend sequenziert werden konnten.

TABELLE 1

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

VGF-Sequenz		VGFARP Nr.	Seq. ID	Monoisotop theoret. Masse (Da)	Sequenz
Y12661	NM_003378				
23-59	23-59	1	1	3666,8278	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGSAP EV
23-62	23-62	2	2	3950,9875	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGSAP EVRGA
23-58	23-58	18	3	3567,7594	APPGRPEAQPPPLSSEH KEPVAGDAVPGPKDGSAP PE
24-59	24-59	3	4	3595,7907	PPGRPEAQPPPLSSEHK EPVAGDAVPGPKDGSAP EV
24-62	24-62	4	5	3879,9504	PPGRPEAQPPPLSSEHK EPVAGDAVPGPKDGSAP EVRGA
26-59	26-59	5	6	3401,6852	GRPEAQPPPLSSEHK VAGDAVPGPKDGSAP EV
26-61	26-61	6	7	3614,8077	GRPEAQPPPLSSEHK VAGDAVPGPKDGSAP EV

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 18 -

					RG
26-62	26-62	7	8	3685,8448	GRPEAQPPPLSSEHKKEF VAGDAVPGPKDGSAPV RGA
26-58	26-58	19	9	3302,6167	GRPEAQPPPLSSEHKKEF VAGDAVPGPKDGSAPV
26-57	26-57	20	10	3173,5741	GRPEAQPPPLSSEHKKEF VAGDAVPGPKDGSAPV
26-64	26-64	21	11	3955,9889	GRPEAQPPPLSSEHKKEF VAGDAVPGPKDGSAPV RGARN
49-62	49-62	10	12	1336,6735	PGPKDGSAPVIRGA
90-114	90-114	22	13	2503,1827	LDRPASPPAPSGSQQGF EENAEAL
* 50 ₁₁₁ - 57 ₁₂₂	50 ₁₁₁ -57 ₁₂₂	15	14	≥ 727,3501	r1-GPKDGSAP-r2
39-46	39-46	23	15	851,4137	r7-HKEPVAGD-r8
50-57	50-57	24	16	≥ 730,3246	r9-APSGSQQGF-r10
-----	121-156	25	17	3745,7343	SQTHSLPAPSEPEPAF FRPQIPENGREASDPSE EL
164-174	164-174	26	18	1235,5782	QELRDFSPSSA
133 ₁₁₁ - 140 ₁₁₂	133 ₁₁₁ - 140 ₁₁₂	27	19	≥ 833,4395	r11-EPAAPRP-r12
351-418	-----	11	20	7518,2744	LQEAABERESAREEBEA EQERRGGERVGEEDDEE AAEAABEADEABERARQ NALLFAEEDGEAGAE
350-367	350-367	28	21	2031,8981	GLQEAABERESAREEBE A
350-370	350-370	29	22	2418,0419	GLQEAABERESAREEBE AEQE
-----	373-417	30	23	4806,0408	GGERRVGEEDDEEAABE AEAEAEARARQNALLFA BEEDGEAGAE
-----	373-404	31	24	3456,5513	GGERRVGEEDDEEAABE AEAEAEARARQNALL
374-418	-----	32	25	4806,0408	GGERRVGEEDDEEAABE AEAEAEARARQNALLFA BEEDGEAGAE
421-456	420-455	33	26	4058,7043	SQSETPGHRKEABEGTE

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 19 -

					EGGEEEDDEEMDPQTIID SL
** 421-472	420-471	12	27	5776,6294	SQEETFGHRRKKAEGTE EGGEEEDDEEMDPQTIID SLIQLSTKJHLPAADV S
421-479	420-478	13	28	6618,0363	SQEETFGHRRKKAEGTE EGGEEEDDEEMDPQTIID SLIQLSTKJHLPAADV SIEEVEE
460-472	459-471	34	29	1380,7249	STKLHLPAADVVS
355 _{r12} - 362 _{r14}	355 _{r12} - 362 _{r14}	35	30	≥ 946,4468	r13-AZERESAR-r14
481 _{r23} - 488 _{r74}	481 _{r23} - 488 _{r74}	16	31	≥ 862,3192	r3-EDZEAEEA-r4
446 _{r25} - 453 _{r26}	445 _{r25} - 452 _{r26}	17	32	≥ 961,4063	r5-EEMDPQTI-r6
-----	485-522	36	33	3903,0180	NAPPEPVPPRAAPAF HVRSPQPPFPAPAPAD ELPD
-----	485-521	37	34	3787,9911	NAPPEPVPPRAAPAF HVRSPQPPFPAPAPAD ELP
501 _{r15} - 508 _{r16}	500 _{r15} - 507 _{r16}	38	35	≥ 920,4828	r15-FTHVRSFQ-r16

* r1 stellt eine Sequenz, die der Sequenz oder Teilen der Sequenz des VGF-Proteins von Aminosäure 49-23 entspricht dar, wobei r1, ausgehend von Aminosäure 50 des VGF-Proteins, zwischen 0 und 27 Aminosäuren lang sein kann. Entsprechend stellt r2 die VGF-Proteinsequenz von Aminosäure 58 bis 64 oder Teile davon dar, wobei r2, ausgehend von VGF-Aminosäure 57 zwischen 0 und 7 Aminosäuren lang sein kann. Die weiteren Peptid-Ketten r3 bis r16 sind entsprechend der oben exemplarisch erläuterten Schema zusammengesetzt.

** VGFARP-12 wurde als nicht oxidiertes und als einfach oxidiertes Peptid (Zunahme des Molekulargewichts um ca. 16 Dal-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 20 -

ton) identifiziert.

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 glykosiliert, phosphoryliert, sulfatiert, amidiert, oxidiert usw. in der zu untersuchenden Probe vorliegen. Vorzugsweise liegen modifizierte Peptide als Peptidoxid vor, wie z.B. das Peptid VGFARP-12, das sowohl als nicht modifiziertes Peptid, als auch als Peptidoxid identifiziert wurde.
- 15 Die Peptide werden insbesondere auch dann als VGFARP-Peptide angesehen, wenn einzelne Aminosäuren von der entsprechenden Sequenz des VGF-Proteins abweichen, insbesondere wenn maximal 2 Aminosäuren von der VGF Proteinsequenz abweichen. Dabei sind Punktmutationen, Deletionen, interne Einfügungen von Aminosäuren, sowie N- und C-terminale Verlängerungen zulässig, solange die VGFARP-Peptidsequenz mindestens 8 Aminosäuren enthält, die relativ zur Aminosäuresequenz des zugehörigen VGF Proteins konserviert, d.h. unverändert, sind.
- 25 Für einen positiven Nachweis der Erkrankung ist in Weiterbildung der Erfindung ferner vorgesehen, dass die Konzentration des oder der identifizierten Peptide für jedes dieser Peptide in spezifischer Weise relativ zur Konzentration des jeweiligen Peptides in einer Kontrollprobe erhöht oder erniedrigt ist.
- 30 Das Verhältnis der Konzentrationen der jeweiligen Peptide zur Konzentration der Kontrollprobe kann zur Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung herangezogen werden.

Bei der Kontrollprobe kann es sich um eine Poolprobe aus ver-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 21 -

schiedenen Kontrollen handeln. Auch die zu untersuchende Probe kann eine Poolprobe sein, wobei bei positivem Ergebnis anschließend Einzeluntersuchungen durchgeführt werden.

5 Geeignete biologische Proben

Die biologische Probe kann vorzugsweise Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinalflüssigkeit, CSF) sein oder eine Probe wie Serum, Plasma, Urin, Stuhl, Tränenflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Sputum usw. Dies hängt u.a. von der Empfindlichkeit des gewählten Nachweisverfahrens (Massenspektrometrie, ELISA etc.) ab. Auch homogenisierte Gewebeprobe, Gewebeschnitte und Biopsiepräparate können gegebenenfalls 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 VGFARP-Peptide zur Herstellung von Diagnostika

Weiterhin umfasst die Erfindung die Verwendung wenigstens eines der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide oder eines VGF-Proteins zur Diagnose von neurologischen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer, sowie die Verwendung von VGFARP-Peptiden zur Gewinnung von Antikörpern oder von anderen Agenzien, welche

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 22 -

aufgrund ihrer VGFARP-Peptid-spezifischen Bindungseigenschaften zur Entwicklung von Diagnosereagenzien zum Nachweis dieser Erkrankungen geeignet sind. Die Erfindung umfaßt auch die Verwendung von VGFARP-Peptiden zur Gewinnung von Phagenpartikeln, die spezifisch diese Peptide binden, oder die umgekehrt VGFARP-Peptide auf ihre Oberfläche präsentieren und so die Identifizierung von Bindungspartnern wie z.B. Rezeptoren von VGF-Proteinen oder VGFARP-Peptiden ermöglichen.

10 Nachweismethoden für VGFARP-Peptide

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

20

Physikalische Nachweismethoden

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 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 Erkrankung, insbesondere einer chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere

30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 23 -

Morbus Alzheimer und/oder der Schweregrad dieser Erkrankung abgeleitet werden.

Gemäß bevorzugter Ausführungsform dieser Erfindung werden die
5 Peptide in der Probe vor der Identifizierung chromatographisch
getrennt, und zwar vorzugsweise mit Reverse Phase Chromatogra-
phie, besonders bevorzugt ist eine Trennung der Peptide in der
Probe mit hochauflösender Reverse Phase High-Performance-
Flüssigchromatografie (RP-HPLC). Eine weitere Ausführungsform
10 dieser Erfindung ist die Durchführung von Fällungsreaktionen
zur Fraktionierung der Probe unter Verwendung von Fällungsmit-
teln wie z.B. Ammoniumsulfat, Polyethylenglykol, Trichlores-
sigsäure, Aceton, Ethanol usw. Die so gewonnenen Fraktionen
werden dann einzeln dem jeweiligen Nachweisverfahren unterzo-
15 gen, z.B. der massenspektrometrischen Untersuchung. Eine wei-
tere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von
Flüssigkeitsphasenextraktion. Dazu wird die Probe z.B. mit ei-
nem Gemisch aus einem organischen Lösungsmittel wie etwa Po-
lyethylenglykol (PEG) und einer wässrigen Salzlösung gemischt.
20 Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften reichern sich dann
bestimmte Inhaltsstoffe der Probe in der organischen und ande-
re in der wässrigen Phase an und können so voneinander ge-
trennt und anschließend weiter analysiert werden.

25 Reverse Phase Chromatographie

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung um-
fasst die Verwendung von Reverse Phase Chromatographie, insbe-
sondere einer C18 Reverse Phase Chromatographiesäule unter
Verwendung von Laufmitteln bestehend aus Trifluoressigsäure
30 und Acetonitril, zur Trennung von Peptiden in humaner Liquor-
flüssigkeit. 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 Massen-
spektrometers, vorzugsweise mit Hilfe eines MALDI-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 24 -

Massenspektrometers (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation) unter Verwendung einer Matixlösung, bestehend aus z.B. aus L(-) Fucose und alpha-Cyano-4-hydroxycimtsäure, 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 VGFARP-1 bis VGFARP-38.

10 Massenspektrometrie

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung der VGFARP-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 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 Dalton erhöht. Folgende Massen entsprechen den theoretischen, monoisotopischen Massen der von uns identifizierten Peptide; berechnet mit geeigneter Software, hier GPMW 4.02. Diese theoretischen, monoisotopischen Massen können einzeln oder in Kombinationen in einer Probe auftreten: VGFARP-1 = 3666,8278 / VGFARP-2 = 3950,9875 / VGFARP-18 = 3567,7594 / VGFARP-3 = 3595,7907 / VGFARP-4 = 3879,9504 / VGFARP-5 = 3401,6852 / VGFARP-6 = 3614,8077 / VGFARP-7 = 3685,8448 / VGFARP-19 = 3302,6167 / VGFARP-20 = 3173,5741/ VGFARP-21 = 3955,9889 / VGFARP-10 = 1336,6735 / VGFARP-22 = 2503,1827/ VGFARP-15 = 2727,3501/ VGFARP-23 = ≥ 851,4137 / VGFARP-24 = ≥ 730,3246 /

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 25 -

VGFP-25 = 3745,7343 / VGFP-26 = 1235,5782 / VGFP-27 = \geq
833,4395 / VGFP-11 = 7518,2744 / VGFP-28 = 2031,8981 /
VGFP-29 = 2418,0419 / VGFP-30 = 4806,0408 / VGFP-31 =
3456,5513 / VGFP-32 = 4806,0408 / VGFP-33 = 4058,7043 /
5 VGFP-12 = 5776,6294 / VGFP-13 = 6618,0363 / VGFP-34 =
1380,7249 / VGFP-35 = \geq 946,4468 / VGFP-16 = \geq 862,3192 /
VGFP-17 = \geq 961,4063 / VGFP-36 = 3903,0180 / VGFP-37 =
3787,9911 / VGFP-38 = \geq 920,4828

Das Symbol \geq (ist größer oder gleich) ist so zu verstehen, dass
10 nicht beliebig größere Massen für die betroffenen VGFP-
Peptide möglich sind, sondern lediglich die Massen, die sich
aufgrund der möglicherweise zusätzlich an den Enden dieser
Peptide befindlichen Aminosäuren ergeben können. An den Enden
dieser Peptide können nicht beliebige Aminosäuren zusätzlich
15 vorhanden sein, sondern nur solche, die sich aufgrund der Se-
quenz des VGFP-Proteins an dieser Sequenzposition befinden kön-
nen.

Massenspektrometrische Bestimmung der Sequenz der VGFP-

20 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
25 Peptidsignale berücksichtigt werden, die von einem VGFP-Protein
abgeleitet werden können. Diese Absicherung erfolgt über eine
Identifizierung der Peptidsignale vorzugsweise mit massenspek-
trometrischen Verfahren, z.B. einer MS/MS-Analyse [11].

30 Durch das erfindungsgemäße Verfahren wurden neue, spezifische
Peptide von VGFP-Proteinen (VGFP-Peptide) identifiziert und in
ihrer Bedeutung erkannt. Diese VGFP-Peptide und ihre Abköm-
mlinge werden hier mit VGFP-1 bis VGFP-38 bezeichnet. Ihre

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 26 -

Sequenzen sind im Sequenzprotokoll angegeben. Die VGFARP-Peptide VGFARP-15, 16, -17, -27, -35, und VGFARP-38 können am N- und/oder C-Terminus zusätzliche Aminosäuren entsprechend der korrespondierenden Sequenz des zugehörigen VGF-Proteins
5 beinhalten. Die Erfindung umfasst auch die rekombinant oder synthetisch hergestellten, sowie aus biologischen Proben isolierten VGFARP-Peptide in unmodifizierter, chemisch modifizierter oder posttranslational modifizierter Form. Dabei sind zwei Punktmutationen sowie andere Abweichungen möglich, solange das VGFARP-Peptid mindestens 8 Aminosäuren aufweist, die in ihrer Identität und ihrer Position innerhalb der Peptidsequenz mit einem VGF-Protein übereinstimmen.
10

Molekularbiologische Nachweistechiken

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

Ein Ausführungsbeispiel hierfür umfasst die Gewinnung von Gewebeprobe, z.B. von Biopsiepräparaten, von Patienten und die
30 nachfolgende Bestimmung der Konzentration eines RNA-Transkriptes korrespondierend zum Gen mit der GeneBank Accession No. NM_03378 oder der Accession No. Y12661 der „DNA Data Bank of Japan“, DDBJ oder korrespondierend zu homologen VGF-Varianten. Dabei werden quantitative Messergebnisse (Intensi-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 27 -

täten) 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 Kettonreaktion (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

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung der VGFARP-Peptide oder der VGF-Proteine unter Verwendung eines immunologischen Nachweissystems, vorzugsweise eines ELISAs („enzyme linked immunosorbent assay“) durchgeführt werden. Dabei erfasst dieser immunologische Nachweis wenigstens ein VGFARP-Peptid oder VGF-Protein. Zur Erhöhung der Spezifität kann weiterhin bevorzugt ein sogenannter „Sandwich-ELISA“ verwendet werden, bei dem der Nachweis der VGFARP-Peptide von der Spezifität von zwei Antikörpern, die unterschiedliche Epitope innerhalb des selben Moleküls erkennen, abhängig ist. Zum Nachweis von VGFARP-Peptiden oder VGF-Proteinen können jedoch auch andere ELISA-Systeme, z.B. direkte oder kompetitive ELISA 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 VGFARP-Peptide oder VGF-Proteine verwendet werden. Die Identifizierung des oder der VGFARP-Peptide kann z.B. all-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 28 -

gemein mit Hilfe eines auf das VGFARP-Peptid oder VGF-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, FNAs (Peptide Nucleic Acids), Affinitätsmatrizen (z.B. ABICAF-Technologie, ABION Gesellschaft für Biowissenschaften und Technik mbH, Jülich, Deutschland) usw. Generell sind alle Substanzen/Moleküle als Nachweisagente geeignet, die es erlauben, ein spezifisches Nachweissystem aufzubauen, da sie spezifisch ein VGFARP-Peptid oder VGF-Protein binden.

Gewinnung von VGFARP-Peptiden und von anti-VGFARP-Peptid Antikörpern

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Gewinnung von VGFARP-Peptiden unter Verwendung von rekombinanten Expressionssystemen, Chromatographiemethoden und chemischen Syntheseprotokollen, die dem Fachmann bekannt sind. Die so gewonnenen VGFARP-Peptide können unter anderem als Standards zur Quantifizierung der jeweiligen VGFARP-Peptide oder als Antigen zur Herstellung von VGFARP-Peptid-Antikörpern Verwendung finden. Zu den dem Fachmann bekannten und geeigneten Methoden zur Isolierung und Gewinnung von VGFARP-Peptiden gehören die rekombinante Expression von Peptiden. Zur Expression der VGFARP-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 „Chinese Hamster Ovary“ (CHO) Zellen verwendet werden. Diese Zellen sind von der „American Tissue Culture Collection“ (ATCC) erhältlich. Zur rekombinanten Expression von VGFARP-Peptiden werden z.B. Nukleinsäuresequenzen, die für VGFARP-Peptide kodieren in Kombination mit geeigneten regulatorischen Nukleinsäuresequenzen wie z.B. Promoto-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 29 -

ren, 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 VGFARP-Peptid Expressionsvektoren können dann in geeignete Zellen, z.B. durch Elektroporation, eingefügt werden. Die so hergestellten VGFARP-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 VGFARP-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 VGFARP-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 monoklonaler oder polyklonaler Antikörper unter Verwendung von VGFARP-Peptiden. Die Gewinnung der Antikörper geschieht in üblicher, dem Fachmann vertrauter Weise. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Herstellung und Gewinnung von VGFARP-Peptid spezifischen Antikörpern, eine insbesondere bevorzugte Ausführungsform ist die Herstellung von VGFARP-Peptid spezifischen Antikörpern die neo-Epitope erkennen, das heißt Epitope, die nur auf VGFARP-Peptiden vorhanden sind, die jedoch nicht in einem VGF-Protein. Solche anti-VGFARP-Peptid Antikörper ermög-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 30 -

lichen den spezifischen immunologischen Nachweis von VGFARP-Peptiden in Gegenwart von VGF-Protein. Polyklonale Antikörper können durch Immunisierungen von Versuchstieren wie z.B. Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Ziegen hergestellt werden. Mono-

5 klonale Antikörper können z.B. durch Immunisierungen von Versuchstieren 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 bekannte, rekombinante Herstellungsverfahren gewonnen werden.

10 Antikörper können auch in Form von Antikörperfragmente wie z.B. Fab-Fragmente oder Fab2-Fragmente usw. Verwendung finden.

Therapieentwicklung und Überwachung durch VGFARP-Peptid Bestimmungen

15 Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die quantitative oder qualitative Bestimmung der oben genannten VGFARP-Peptide oder VGF-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 geeigneten Patienten für klinische Studien zur Entwicklung von Therapien für diese Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, verwendet werden. Dabei werden quantitative

20 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.

25 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

30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 31 -

zuverlässig ermöglicht [12].

Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit von VGF-Proteinen, VGFARP-Peptiden und von Agenzien, die die Expression und die biologische Verfügbarkeit dieser Substanzen modulieren

5 Ein Ausführungsbeispiel hierfür umfasst die Kultivierung von Zelllinien, und ihre Behandlung mit VGF-Proteinen, VGFARP-Peptiden oder mit Substanzen, die die Expression von VGF-Protein fördern, wie z.B. NGF, BDNF oder NT-3, oder die Pro-

10 zessierung von VGF-Protein zu VGFARP-Peptiden fördern, wie z.B. Prohormonkonvertasen. Dadurch können biologische Eigenschaften von VGF-Protein und VGFARP-Peptiden im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, ermittelt werden. Auch Fusionsproteine und Fusionspeptide

15 können zur Behandlung der Zelllinien verwendet werden, z.B. Fusionsproteine bestehend aus Prohormonkonvertasen fusioniert mit Peptidsequenzen, die einen Transport des Fusionsproteins ins Zellinnere fördern. Beispiele für mögliche Fusionspartner von z.B. Prohormonkonvertasen sind HIV-TAT-Sequenzen oder Antennapedia-Sequenzen usw. Ebenso können Zelllinien mit Expressionvektoren transfiziert werden, die direkt oder indirekt eine Expression von VGF-Protein oder VGFARP-Peptiden durch die transfizierten Zellen bewirken. Diese Expressionsvektoren können u.a. für VGFARP-Peptide, VGF-Proteine, NGF, BDNF, NT-3

20 oder für Prohormonkonvertasen kodieren. Auch die Transfektion von Kombinationen der genannten Proteine können durchgeführt werden. Alternativ können geeignete Zelllinien mit anti-VGF-Protein- oder anti-VGFARP-Peptid-Antikörpern oder mit Nukleinsäuren, die die Expression von VGF unterdrücken, wie z.B. VGF-Antisense-Nukleinsäuren, VGF-Triplex-Nukleinsäuren oder gegen

30 VGF-mRNA gerichteten Ribozymen, behandelt werden. Auch die Behandlung mit anti-NGF, anti-BDNF oder anti-NT-3 Antikörpern könnte zur Unterdrückung der VGF-Protein Expression durchgeführt werden. Insbesondere Zelllinien, die als neurologische

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 32 -

Modellsysteme im Zusammenhang mit VGF als geeignet erscheinen, können von solcher 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 Apoptoserate der Zellen, Änderungen der Zellmorphologie, der Expression von zelleigenen Proteinen oder Reportergenen oder die Freisetzung von zytosolischen Zellbestandteilen als Marker für Zellssterben ermitteln. Als weitere Testsysteme können geeignete Stämme von Versuchstieren, z.B. von Mäusen oder 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 VGFARP-Peptiden oder von VGF-Proteinen zum Ziel haben, herangezogen werden. Außerdem können in Versuchstieren auch Proteine und Peptide wie z.B. VGF-Protein, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF, NT-3, Prohormonkonvertasen usw. 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 fusioniert mit Transportsequenzen, wie z.B. einer 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 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.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 33 -

Read-out Parameter bei Versuchen mit Tiermodellen können die Überlebensdauer der Tiere, ihr Verhalten und ihre Kurzzeitgedächtnisleistung 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. Blutttests, die Messung von Gehirnströmen, Stoffwechselltest, die Expressionsrate von VGF-Protein und VGFARP-Peptiden und anderen mit der Erkrankung im Zusammenhang stehenden Proteinen, sowie morphologische und histologische Untersuchungen an Geweben, wie z.B. dem Gehirn herangezogen werden.

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

- Abbildung 1: Alignment der VGFARP-Peptide mit den beiden bekannten VGF-Proteinen entsprechend den Datenbank Accession No. NM_003378 und Y12661
- Abbildung 2: Reverse Phase Chromatographie zur Separation und Anreicherung der VGFARP-Peptide aus Liquor cerebrospinalis
- Abbildung 3: Massenspektrometrische Messung (MALDI) am Beispiel von VGFARP-7
- Abbildung 4: MALDI als relativ quantifizierende massenspektroskopische Methode
- Abbildung 5: MS/MS-Fragmentspektrum am Beispiel des Peptids VGFARP-13

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 34 -

Abbildung 6a - C: „Box-Whisker-Plots“ zum quantitativen Vergleich der Konzentrationen von VGFARP-1, VGFARP-2, VGFARP-18, VGFARP-3, VGFARP-4, VGFARP-5, VGFARP-6, VGFARP-7, VGFARP-19, VGFARP-20, VGFARP-21, VGFARP-10, VGFARP-22, VGFARP-28, VGFARP-29, VGFARP-30/32, VGFARP-31, VGFARP-12, VGFARP-13, VGFARP-36 und VGFARP-37 in Morbus Alzheimer Patienten verglichen mit Kontrollpatienten.

10

Die Abbildung 1 zeigt ein Alignment der erfindungsgemäßen Peptide mit zwei bekannten Varianten des VGF-Proteins, die in der Abbildung mit ihren Datenbank Accession No. NM_003378 und Y12661 bezeichnet sind. Sequenzpositionen, die in beiden Varianten der VGF-Proteine identisch sind, sind in der Sequenz von NM_003378 mit einem Stern dargestellt. Unterschiede in den Sequenzen sind durch den Aminosäurecode in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund dargestellt. Der Pfeil am Ende oder am Anfang von Teilsequenzen von VGFARP-12, -13 und 34 zeigt an, das die jeweilige Sequenz sich über zwei Zeilen im Alignment erstreckt.

Die Abbildung 2 zeigt ein Chromatogramm, aufgenommen mit Reverse Phase Chromatographie gemäß Beispiel 2, zur Separation und Anreicherung der VGF-Peptide aus Liquor cerebrospinalis.

25

Die Abbildung 3 zeigt ein Spektrum, das durch MALDI-massenspektrometrische Messung gemäß Beispiel 3 von VGFARP-7 entstanden ist, mit einer theoretischen, monoisotopischen Masse von 3686 Dalton, nach erfolgter Reverse Phase Chromatographie von humanem Liquor cerebrospinalis gemäß Beispiel 2. VGFARP-7 entspricht der VGF-Sequenz (Accession No. Y12661) von Aminosäure 26-62.

30

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 35 -

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 auch repräsentativer Probensignale ermittelt. 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 in diesem Diagramm anhand der Steigung der Kurve ablesbar ist.

■

Die Abbildung 5 zeigt ein MS/MS-Fragmentspektrum gemäß Beispiel 4 des erfindungsgemäßen Peptids VGFARP-13.

15 Obere Spur: Rohdaten der Messung.
Untere Spur: Konvertiertes, dekonvolutes Massenspektrum von VGFARP-13.

20 Das Peak-Muster ist charakteristisch für VGFARP-13. VGFARP-13 entspricht der VGF-Sequenz (Accession No. Y12661) von Aminosäure 421-479.

25 Die Abbildungen 6A bis 6C zeigen in Form von „Box-Whisker-Plots“ einen Vergleich der integrierten MALDI-massenspektrometrischen Signalintensitäten verschiedener VGFARP-Peptide in Kontrollen, verglichen mit den Signalintensitäten in Proben von Morbus Alzheimer Patienten.

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

Liquor oder Liquor cerebrospinalis (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) ist die in den vier Hirnventrikeln und im Suba-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 36 -

rachnoidalraum enthaltene Flüssigkeit, die vor allem in den Plexus choroidae 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. Lendenwirbelkörperfortsatz mit einer langen Hohnadel punktiert und so Liquor gewonnen. Anschließend wird die Probe 10 Minuten bei 2000x g zentrifugiert und der Überstand bei minus 80°C gelagert.

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

Zum massenspektrometrischen Nachweis von VGF-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 Eluatiionsmittel gleichermaßen. Im Folgenden ist beispielhaft die Trennung von VGF-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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 37 -

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.

15 **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 Laserdesorption-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-hydroxyzimtsäure, die α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure und die 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Zur Messung der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide wird ein lyophilisiertes, nach Reverse Phase Chromatographie gewonnenes Äquivalent entsprechend 500 µl humanem Liquor cerebrospinalis, verwendet. Die chromatographierte Probe wird in 15 µl einer Matrix-Lösung gelöst. Diese Matrix-Lösung enthält z.B. 10 g/l α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure und 10 g/l L(-)Fucose gelöst in einem Lö-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 38 -

- sungsmittelgemisch bestehend aus Acetonitril, Wasser, Trifluoressigsäure und Aceton im Volumenverhältnis 49:49:1:1. Von dieser Lösung werden 0,3 µl auf eine MALDI-Trägerplatte transferiert und die getrocknete Probe im MALDI-Massenspektrometer
- 5 Voyager-DE STR von PerSeptive Biosystems analysiert. Die Messung erfolgt im "Linear Mode" mit "Delayed Extraction"™. Ein Beispiel für eine Messung eines der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide zeigt Abbildung 3.
- 10 Die MALDI-TOP-Massenspektrometrie kann zur Quantifizierung von Peptiden wie z.B. der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide eingesetzt werden, wenn diese Peptide in einer Konzentration vorliegen, die sich im dynamischen Messbereich des Massenspektrometers befindet, wodurch Detektorsättigung vermieden wird.
- 15 Dieses ist für die Messung der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide in Liquor cerebrospinalis 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
- 20 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 Standard-Signale,
- 25 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
- 30 der Steigung der Kurve ablesbar ist.

Beispiel 4: Massenspektrometrische Identifizierung von VGFARP-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 39 -

Peptiden

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

Die Identifikation der erfindungsgemäßen Peptide, in diesen Fraktionen erfolgt z.B. mit nanoSpray-MS/MS [11]. Dabei wird ein VGFARP-Peptid-Ion im Massenspektrometer anhand seines spezifischen m/z (Masse/Ladung) Wertes in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise im Massenspektrometer selektioniert. Dieses selektierte Ion wird anschließend durch Zuführung von Kollisionsenergie mit einem Stoßgas, z.B. Helium oder Stickstoff, fragmentiert und die resultierenden VGFARP-Peptid Bruchstücke im Massenspektrometer in einer integrierten Analyseeinheit detektiert und korrespondierende m/z-Werte bestimmt (Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie) [13]. Das Fragmentierungsverhalten von Peptiden ermöglicht bei einer Massengenauigkeit von z.B. 50ppm eine eindeutige Identifizierung der erfindungsgemäßen VGFARP-Peptide unter Verwendung von computer-gestützten Suchverfahren [14] in Sequenzdatenbanken, in die die Sequenz eines VGF-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 Fragmentenspektren sind in Abbildung 5 gezeigt.

30

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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 40 -

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 VGFARP-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 VGFARP-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.

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

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 41 -

charakterisieren, sollen jedoch den Äquivalenzbereich der Erfindung nicht eingrenzen.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 42 -

Literatur

1. Marcinkiewicz, M., N.G. Seidah, and M. Chretien. 1996. Implications of the subtilisin/kexin-like precursor convertases in the development and function of nervous tissues. *Acta Neurobiol Exp.* 56:287-98.
2. Salton, S.R., G.L. Ferri, S. Hahn, S.E. Snyder, A.J. Wilson, R. Possenti, and A. Levi. 2000. VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* 21:199-219.
3. Hahn, S., T.M. Mizuno, T.J. Wu, J.P. Wisor, C.A. Priest, C.A. Kozak, C.M. Boozer, B. Peng, R.C. McEvoy, P. Good, K.A. Kelley, J.S. Takahashi, J.E. Pintar, J.L. Roberts, C.V. Mobbs, and S.R. Salton. 1999. Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance [see comments]. *Neuron.* 23:537-48.
4. Levi, A., J.D. Eldridge, and B.M. Paterson. 1985. Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science.* 229:393-5.
5. Salton, S.R. 1991. Nucleotide sequence and regulatory studies of VGF, a nervous system-specific mRNA that is rapidly and relatively selectively induced by nerve growth factor. *J Neurochem.* 57:991-6.
6. Eagleson, K.L., L.D. Fairfull, S.R. Salton, and P. Levitt. 2001. Regional differences in neurotrophin availability regulate selective expression of VGF in the developing limbic cortex. *J Neurosci.* 21:9315-24.
7. Snyder, S.E., J.E. Pintar, and S.R. Salton. 1998. Developmental expression of VGF mRNA in the prenatal and postnatal rat. *J Comp Neurol.* 394:64-90.
8. Snyder, S.E., H.W. Cheng, K.D. Murray, P.J. Isackson, T.H. McNeill, and S.R. Salton. 1998. The messenger RNA encoding VGF, a neuronal peptide precursor, is rapidly regulated in

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 43 -

the rat central nervous system by neuronal activity, seizure and lesion. *Neuroscience*. 82:7-19.

9. Wisor, J.P., and J.S. Takahashi. 1997. Regulation of the *vgf* gene in the golden hamster suprachiasmatic nucleus by light and by the circadian clock. *J Comp Neurol*. 379:229-38.
10. Trani, E., T. Ciotti, A.M. Rinaldi, N. Canu, G.L. Ferri, A. Levi, and R. Possenti. 1995. Tissue-specific processing of the neuroendocrine protein VGF. *J Neurochem*. 65:2441-9.
11. Wilm, M., and M. Mann. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem*. 68:1-8.
12. Engelborghs, S., and P.P. De Deyn. 2001. Biological and genetic markers of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Med Okayama*. 55:55-63.
13. Papayannopoulos, I.A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev*:49-73.
14. 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.

WO 02/062075

44

PCT/DE02/01376

SEQUENCE LISTING

<110> BioVision AG
BioVision AG

<120> Verfahren zum Nachweis chronisch-demenzieller Erkrankungen,
, zu-gehörige Peptide und Nachweisreagenzien

<130> VGF-PCT

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu
1 5 10 13

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly
20 25 30

Ser Ala Pro Glu Val
35

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu
1 5 10 15

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly
20 25 30

Ser Ala Pro Glu Val Arg Gly Ala
35 40

WO 02/082075

45

PCT/DE02/01376

<210> 3
<211> 36
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3

Ala Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu
1 5 10 15

His Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly
20 25 30

Ser Ala Pro Glu
35

<210> 4
<211> 36
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His
1 5 10 15

Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser
20 25 30

Ala Pro Glu Val
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

Pro Pro Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His
1 5 10 15

Lys Glu Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser
20 25 30

WO 02/082075

46

PCT/DE02/01376

Ala Pro Glu Val Arg Gly Ala
35

<210> 6
<211> 34
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 6

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

Glu Val

<210> 7
<211> 36
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 7

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

Glu Val Arg Gly
35

<210> 8
<211> 37
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 8

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

WO 02/082075

47

PCT/DE02/01376

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

Glu Val Arg Gly Ala
35

<210> 9
<211> 33
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 9

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

Glu

<210> 10
<211> 32
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 10

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
20 25 30

<210> 11
<211> 39
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 11

Gly Arg Pro Glu Ala Gln Pro Pro Pro Leu Ser Ser Glu His Lys Glu

WO 02/082075 48 PCT/DE02/01376

1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
 20 25 30

Glu Val Arg Gly Ala Arg Asn
 35

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 12

Pro Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro Glu Val Arg Gly Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 13

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

Pro Gln Glu Glu Ala Ala Glu Ala Leu
 20 25

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 14

Gly Pro Lys Asp Gly Ser Ala Pro
 1 5

<210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

WO 02/082075

49

PCT/DE02/01376

<400> 15

His Tyr Glu Pro Val Ala Gly Asp
1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Ala Pro Ser Gly Ser Gln Gln Gly
1 5

<210> 17

<211> 36

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

Ser Gln Thr His Ser Leu Pro Ala Pro Glu Ser Pro Glu Pro Ala Ala
1 5 10 15Pro Pro Arg Pro Gln Thr Pro Glu Asn Gly Pro Glu Ala Ser Asp Pro
20 25 30Ser Glu Glu Leu
35

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 18

Gln Glu Leu Arg Asp Phe Ser Pro Ser Ser Ala
1 5 10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

WO 02/082075

50

PCT/DE02/01376

<400> 19

Glu Pro Ala Ala Pro Pro Arg Pro
 1 5

<210> 20

<211> 68

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

Leu Gln Glu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Glu Gln Glu Arg Arg Gly Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp
 20 25 30

Glu Glu Ala Ala Glu Ala Ala Glu Ala Glu Ala Asp Glu Ala Glu Arg
 35 40 45

Ala Arg Gln Asn Ala Leu Leu Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala
 50 55 60

Gly Ala Glu Asp
 65

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

Gly Leu Gln Glu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

WO 02/082075

51

PCT/DE02/01376

<213> homo sapiens

<400> 22

Gly Leu Gln Glu Ala Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Gln Glu
 20

<210> 23

<211> 45

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Gly Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ala Glu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Gln Asn Ala Leu Leu
 20 25 30

Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala Gly Ala Glu Asp
 35 40 45

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Gly Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ala Glu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Gln Asn Ala Leu Leu
 20 25 30

<210> 25

<211> 45

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

WO 02/082075

52

PCT/DE02/01376

Gly Glu Glu Arg Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ala Asp Glu Ala Glu Arg Ala Arg Gln Asn Ala Leu Leu
 20 25 30

Phe Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Ala Gly Ala Glu Asp
 35 40 45

<210> 26
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 26

Ser Gln Glu Glu Thr Pro Gly His Arg Arg Lys Glu Ala Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Gly Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr
 20 25 30

Ile Asp Ser Leu
 35

<210> 27
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 27

Ser Gln Glu Glu Thr Pro Gly His Arg Arg Lys Glu Ala Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Gly Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr
 20 25 30

Ile Asp Ser Leu Ile Glu Leu Ser Thr Lys Leu His Leu Pro Ala Asp
 35 40 45

Asp Val Val Ser

WO 02/082075

-53-

PCT/DE02/01376

50

<210> 28
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 28

Ser Glu Glu Glu Thr Pro Gly His Arg Arg Lys Glu Ala Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Gly Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Met Asp Pro Glu Thr
 20 25 30

Ile Asp Ser Leu Ile Glu Leu Ser Thr Lys Leu His Leu Pro Ala Asp
 35 40 45

Asp Val Val Ser Ile Ile Glu Glu Val Glu Glu
 50 55

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 29

Ser Thr Lys Leu His Leu Pro Ala Asp Asp Val Val Ser
 1 5 10

<210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 30

Ala Glu Glu Arg Glu Ser Ala Arg
 1 5

<210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

WO 02/082075

54

PCT/DE02/01376

<400> 31

Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 32

Glu Glu Met Asp Pro Gln Thr Ile
1 5

<210> 33
<211> 38
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 33

Asn Ala Pro Pro Glu Pro Val Pro Pro Pro Arg Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr His Val Arg Ser Pro Gln Pro Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala
20 25 30

Arg Asp Glu Leu Pro Asp
35

<210> 34
<211> 37
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 34

Asn Ala Pro Pro Glu Pro Val Pro Pro Pro Arg Ala Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr His Val Arg Ser Pro Gln Pro Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala
20 25 30

WO 02/082075

55

PCT/DE02/01376

Arg Asp Glu Leu Pro
35

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35

Pro Thr His Val Arg Ser Pro Gln
1 5

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 56 -

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer chronisch-demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine chronisch-demenzielle Erkrankung durch Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Markerpeptids, verglichen mit der Konzentration des Markerpeptids in einer Kontrollprobe, dadurch gekennzeichnet dass:
- 5
- a) als Markerpeptid wenigstens ein Peptid, abgeleitet von der Sequenz mit der Accession No. Y12661 aus der DNA Data Bank of Japan verwendet wird, und
- 10
- b) eine für das jeweilige Markerpeptid spezifische Konzentrationsänderung in der Probe relativ zu einer Kontrollprobe festgestellt wird, und
- 15
- c) eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der unter b) genannten Weise als positives Nachweisergebnis für die chronisch-demenzielle Erkrankung gewertet wird.
- 20
2. Verfahren zum Nachweis einer chronisch-demenziellen Erkrankung oder einer Veranlagung für eine chronisch-demenzielle Erkrankung durch Bestimmung der relativen Konzentration wenigstens eines Markerpeptids, verglichen mit der Konzentration des Markerpeptids in einer Kontrollprobe, dadurch gekennzeichnet dass:
- 25
- a) als Markerpeptid wenigstens ein Peptid, abgeleitet von der Sequenz mit der Gene Bank Accession No. NM_003378 verwendet wird, und
- 30
- b) eine für das jeweilige Markerpeptid spezifische Konzentrationsänderung in der Probe relativ zu einer Kontrollprobe festgestellt wird, und
- c) eine signifikante Konzentrationsänderung des Markerpeptids in der unter b) genannten Weise als positives Nachweisergebnis für die chronisch-demenzielle Erkrankung ge-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 57 -

wertet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Peptid
- 5 a) Ein VGFARP-Peptid ist, oder
b) ein Peptid entsprechend der Accession No. Y12661 der DDBJ-Datenbank ist, oder
c) ein Peptid entsprechend der Gene Bank Accession No. NM_003378 ist, oder
- 10 d) ein Abkömmling eines natürlich vorkommenden Alles der unter a) bis c) genannter Peptide ist, oder
e) eine VGFARP-Mutante ist, wobei die VGFARP-Mutante vorzugsweise in maximal 2, Aminosäuren von der entsprechenden nicht mutierten VGFARP-Sequenz abweicht, oder
- 15 f) eine Mutante einer der unter b) oder c) genannten Peptide ist, wobei die Aminosäuresequenz maximal 20 % von den unter b) oder c) genannten Aminosäuresequenz abweicht, oder
g) ein chemisch modifiziertes, oder posttranslational modifiziertes Peptid entsprechen a) bis f) ist
- 20
4. Verfahren zum Nachweis einer chronisch-demenziellen Erkrankung gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass es in Kombination mit anderen Diagnoseverfahren für chronisch-demenzielle Erkrankungen zur Erhöhung von deren Sensitivität
- 25 und/oder Spezifität durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die demenzielle Erkrankung Morbus Alzheimer oder eine verwandte neurologische Erkrankung, insbesondere Lewy-Body Demenz oder vaskuläre Demenz ist.
- 30
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein identifiziertes VGFARP-Peptid ausgewählt wird, wobei das Peptid in nicht modifizierter Form,

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 58 -

mit posttranslationalen Modifikationen oder in chemisch modifizierter Form, vorzugsweise als Peptid-Oxid vorliegt.

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.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Bestimmung der Schwere der Erkrankung, zur Prognose des Verlaufs, oder zur Diagnose von Vorstufen neurologischer Erkrankungen, insbesondere von "mild cognitive impairment" (MCI) herangezogen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe Liquor cerebrospinalis, Serum, Plasma, Urin, Synovialflüssigkeit, Stuhl, Tränenflüssigkeit, Sputum oder ein Gewebehomogenat ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Peptide mit Hilfe einer massenspektrometrischen Bestimmung vorgenommen wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung die massenspektrometrische Bestimmung wenigstens einen der theoretischen, monoisotopischen Massenpeaks von 3666,8278 / 3950,9875 / 3567,7594 / 3595,7907 / 3879,9504 / 3401,6852 / 3614,8077 / 3685,8448 / 3302,6167 / 3173,5741 / 3955,9889 / 1336,6735 / 2503,1827 / \geq 727,3501 / \geq 851,4137 / \geq 730,3246 / 3745,7343 / 1235,5782 / \geq 833,4395 / 7518,2744 / 2031,8981 / 2418,0419 / 4806,0408 / 3456,5513 / 4806,0408 / 4058,7043 / 5776,6294 / 6618,0363 / 1380,7249 / \geq 946,4468 / \geq

WO 02/082075

PCT/DE0201376

- 59 -

862,3192 / \geq 961,4063 / 3903,0180 / 3787,9911 / \geq 920,4828 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 der Peptide mit Hilfe eines auf ein Peptid oder ein Peptidfragment gerichteten Antikörpers, Antikörperfragments, Phagenpartikels, FNAs oder einer Affinitätsmatrize geschieht.
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.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe vor der Identifizierung durch Fällungsreaktionen oder Flüssigphasentrennungen fraktioniert wird.
17. Ein Peptid, dass
- ein VGFARP-Peptid ist, oder
 - ein VGFARP-Abkömmling eines VGF-Proteins ist, insbesondere ein Abkömmling von NM_003378 oder Y12661, oder
 - ein VGFARP-Abkömmling eines VGF-Allels ist, oder

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 60 -

- d) eine VGFARP-Mutante ist, wobei die VGFARP-Mutante vorzugsweise in maximal 2, Aminosäuren von der entsprechenden nicht mutierten VGFARP-Sequenz abweicht, oder
- e) ein chemisch, oder postranslational modifiziertes Peptid
- 5 entsprechend a) bis f) ist
18. Verwendung wenigstens eines der Peptide gemäß Anspruch 17 zur Gewinnung von Antikörpern und zur Entwicklung von Diagnoseagentien zum Nachweis neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von
- 10 Morbus Alzheimer.
19. Antikörper, die die Peptide gemäß Anspruch 17 binden.
- 15 20. Verwendung von Antikörpern gegen VGF oder von Antikörpern gemäß Anspruch 19 zur Diagnose neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
- 20 21. Verwendung von Nukleinsäuren, die zu VGFARP-Peptiden oder zu VGF-Proteinen korrespondieren zur indirekten Bestimmung und Quantifizierung der zugehörigen Proteine und Peptide geeignet sind.
- 25 22. Verwendung eines Verfahrens entsprechend Anspruch 21, bei dem der Nachweis der VGF-Nukleinsäuren unter Verwendung von Northernblots, von Reverse Transkriptase PCR oder von quantitativer PCR erfolgt.
- 30 23. Verwendung eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 bis 16 oder gemäß Anspruch 20 bis 22 zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Therapie für eine neurologische Erkrankung, insbesondere einer chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere bei Morbus Alzheimer.

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 61 -

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.
- 5 25. Nukleinsäuren, die zu VGFARF-Peptiden korrespondieren.
26. Nukleinsäuren, die als VGF-spezifische Antisense-Nukleinsäuren oder als VGF-spezifische Ribozyme, oder als VGF-spezifische Triplex-Nukleinsäuren geeignet sind.
- 10 27. Synthetische Agonisten oder Antagonisten der in Anspruch 3 genannten VGF-Peptide.
- 15 28. Peptide gemäß den in Anspruch 3 genannten Peptiden, oder Stoffe gemäß Anspruch 25 bis 27 wobei diese Peptide, Nukleinsäure, 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.
- 20 29. Peptide gemäß den in Anspruch 3 genannten 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.
- 30 30. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 3 angegebenen Peptide oder der Nukleinsäuren, Peptide, Agonisten oder Anta-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 62 -

gonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 als Arzneimittel oder Arzneimittel-Wirkstoff.

31. Verwendung von wenigstens eines der in Anspruch 3 angegebenen Peptide oder von Nucleinsäuren, Peptiden, 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.
32. Verwendung wenigstens einer Substanz, die die Expression von VGF-Proteinen moduliert, z.B. NGF, BDNF oder NT-3, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
33. Verwendung wenigstens einer Substanz, die selektiv die Transkription oder Expression einer einzelnen VGF-Gen-Variante, insbesondere NM_003378 oder Y12661, inhibiert oder stimuliert zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.
34. Verwendung einer Substanz, die wenigstens an eines der in Anspruch 3 angegebenen 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.
35. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide oder der Nucleinsäuren, Peptide, Antagonisten oder Agonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 zur Therapie von neurologi-

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 63 -

schen Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer.

36. Verfahren zur therapeutischen Modulierung der Konzentration von mindestens einem der in Anspruch 3 genannten Peptide oder von Nukleinsäuren gemäß Anspruch 25 in einem Patienten mit einer neurologischen Erkrankung, insbesondere chronisch-demenziellen Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer.

37. Verfahren entsprechend Anspruch 36, bei dem eine Verminderung der Konzentrationen an VGF-Peptiden oder Nukleinsäuren angestrebt wird.

38. Verfahren entsprechend Anspruch 36, bei dem eine Erhöhung der Konzentrationen an VGF-Proteinen oder an VGFARP-Peptide angestrebt wird.

39. Verfahren entsprechend Anspruch 37, bei dem einem Patienten

- a) Antikörper, die gegen VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 gerichtet sind, verabreicht werden, oder
- b) Antisense-Nukleinsäuren, Triplex-Nukleinsäuren oder Ribozyme verabreicht werden um die Expression von VGF-Proteinen, VGFARP-Peptiden, NGF, BDNF oder NT-3 zu vermindern, oder
- c) Substanzen, die die Prozessierung von VGF-Proteinen inhibieren, verabreicht werden, oder
- d) Antagonisten der in Anspruch 3 genannten VGF-Peptide verabreicht werden

40. Verfahren entsprechend Anspruch 38, bei dem einem Patienten

- a) VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 verabreicht wird, oder
- b) Nukleinsäuren verabreicht werden, die für VGF-Proteine, VGFARP-Peptide, NGF, BDNF oder NT-3 zu kodieren, oder

WO 02/082075

PCT/DE02/01376

- 64 -

- c) Substanzen verabreicht werden, die die Prozessierung von VGF-Proteinen fördern, oder
- d) Agonisten der in Anspruch 3 genannten VGF-Peptide verabreicht werden

5

41. Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die in der Lage sind die Expression mindestens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide zu vermindern oder zu verstärken.

10

42. Screeningverfahren zur Identifizierung von Rezeptoren, oder Inhibitoren die mindestens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide binden.

15

43. Screeningverfahren zur Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten mindestens eines der in Anspruch 3 genannten Peptide.

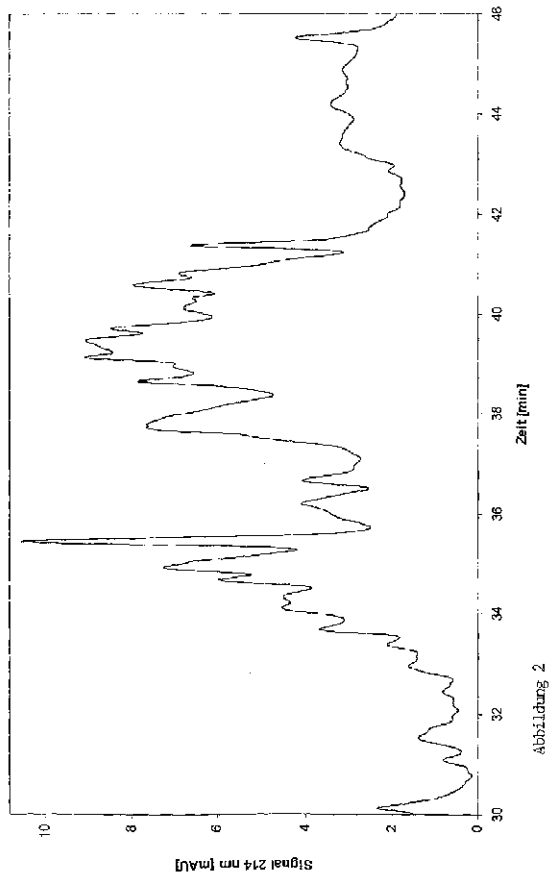


Abbildung 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

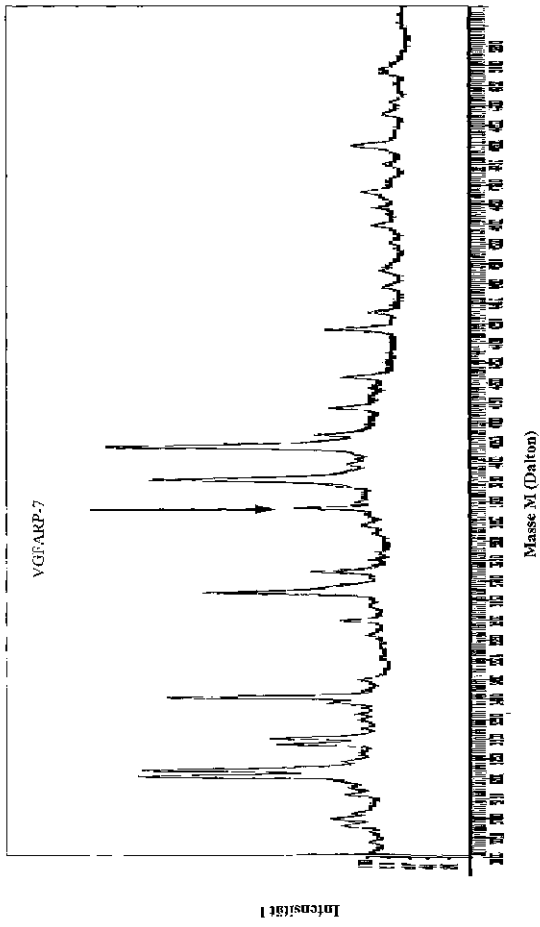


Abbildung 3

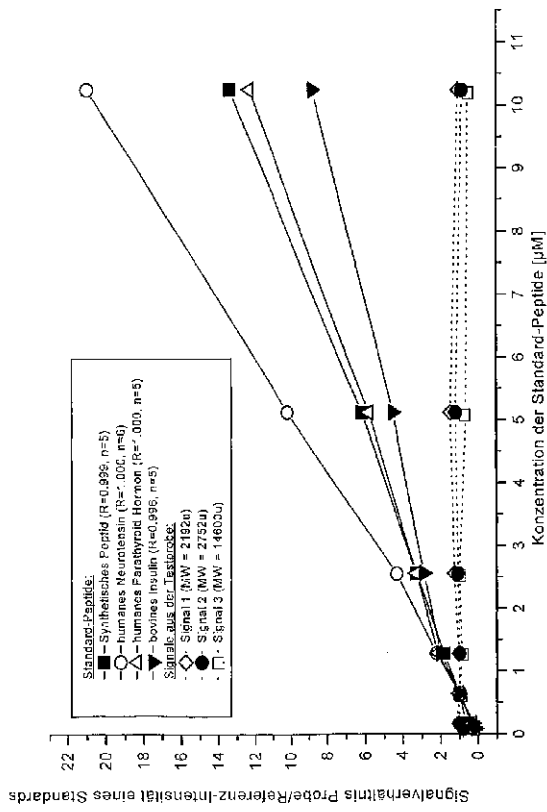


Abbildung 4:

WO 02/082075

6/10

PCT/DE02/01376

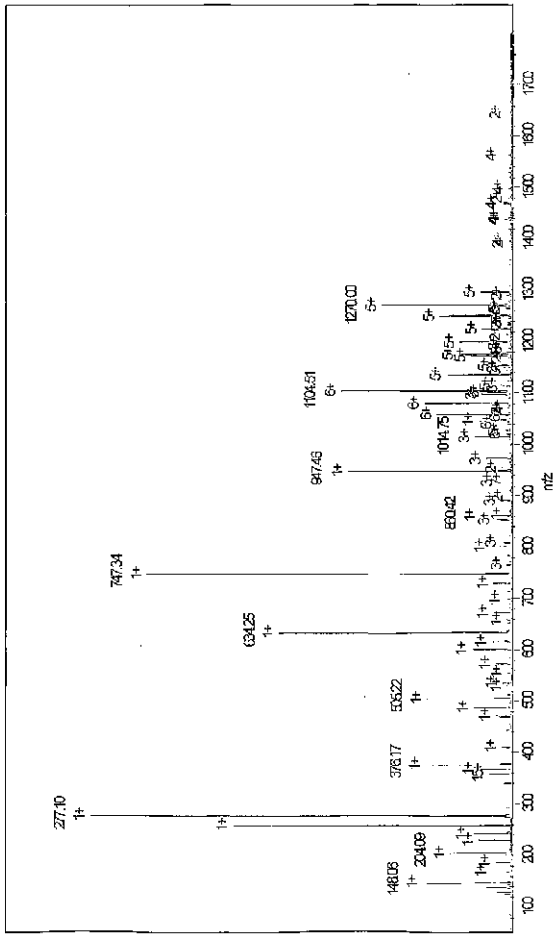
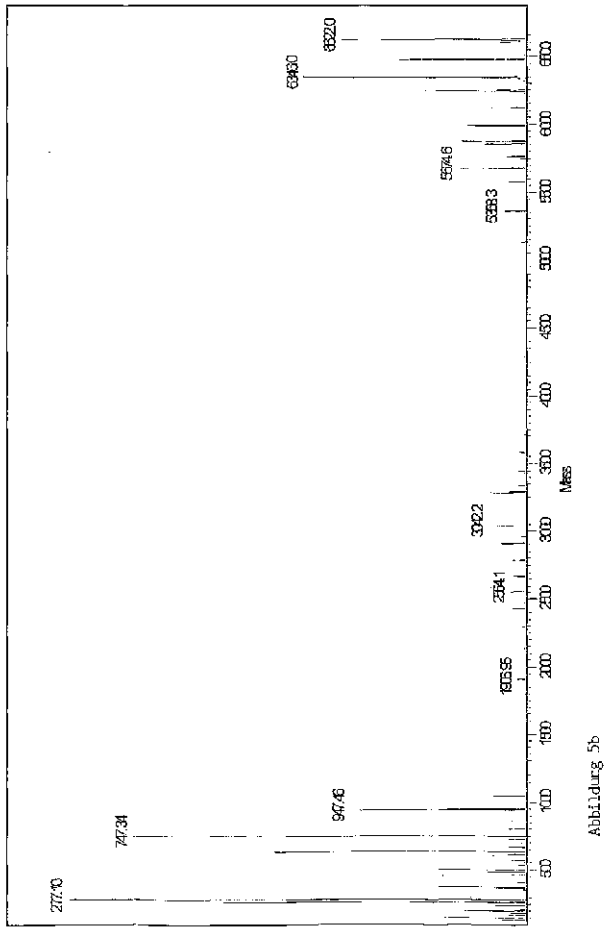


Abbildung 5a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/082075

8/10

PCT/DE02/01376

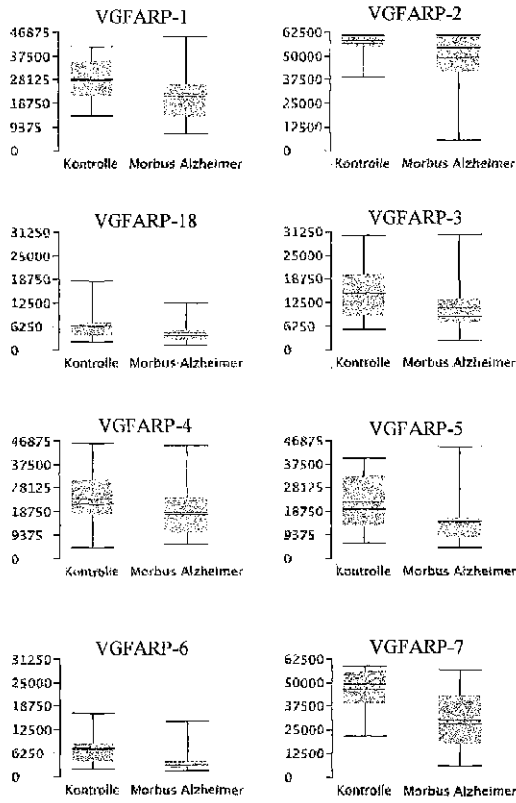


Abbildung 6A:

WO 02/082875

9/111

PCT/DE02/01376

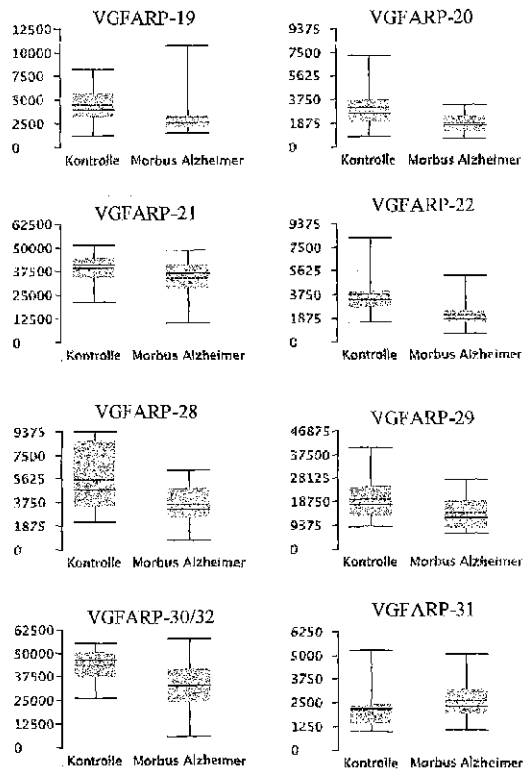


Abbildung 6B:

WO 02/082075

10/10

PCT/DE02/01376

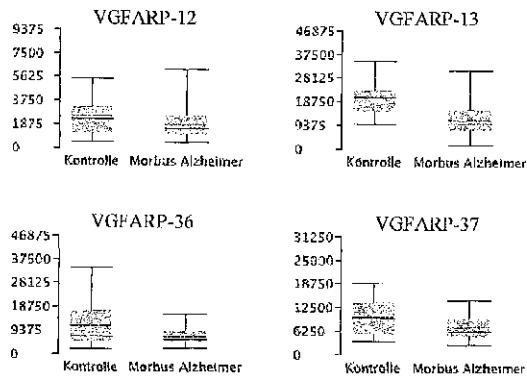


Abbildung 6C:

【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
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

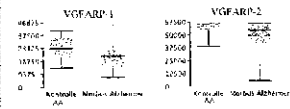
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/082075 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/68 (71) Anmelder *globalis Basisminggesellschaften mit Ausnahme von* C07K 14/475 (52): BIOVISION AG (DE/DE); Peador-Lynen-Strasse 5, 30625 Hannover (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE92/01376 (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. April 2002 (08.04.2002) (75) Erfinder/Anmelder *(one for USA)*: LAMPING, Norbert (DE/DE); Siegesstrasse 8, 30175 Hannover (DE); ZI CHT, 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); Beiläcker-Strasse 2, 30629 Hannover (DE); SELLEF, Hartmut (DE/DE); Eichenriede 15, 30159 Hannover (DE); KELLMANN, Markus (DE/DE); Heim-zeh-Stamm-Strasse 3, 30171 Hannover (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 10117431.2 (6. April 2001 (06.04.2001)) DE

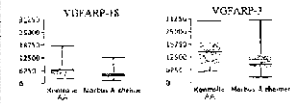
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

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

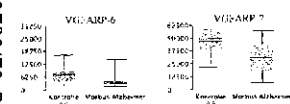
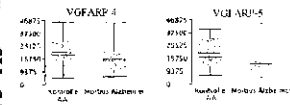
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS CHRONISCH-DEMENTIELLER ERKRANKUNGEN, ZUGEHÖRIGE PEPTIDE UND NACHWEISREAGENZILIEN



(57) Abstract: The invention relates to defined peptides and the quantitative determination thereof in biological samples from patients suffering from Alzheimer's disease, in relation to the concentration thereof in a control group. The invention also relates to the use of said peptides for therapeutic purposes. The inventive peptides come from a protein precursor having the corresponding gene and are processed in a specific manner and modified in a post-translational manner. Changes in the concentrations of said peptides indicate Alzheimer's disease, and the direction of the change in concentration is specific for each peptide. Alzheimer's disease is detected by identifying the peptides individually or in groups. The invention can also be used to control the course of Alzheimer's disease, for the prognosis thereof and for the development of therapeutic agents to combat the same.



(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft definierte Peptide und deren quantitative Bestimmung in biologischen Proben von Patienten, die an Morbus Alzheimer erkrankt sind, relativ zu deren Konzentration in einer Kontrollgruppe. Ausserdem betrifft die Erfindung die Verwendung der Peptide zu therapeutischen Zwecken. Die erfindungsgemässen Peptide entstehen aus einem Proteinvorstufen mit dem vorsequenzierten Gen und sind in spezifischer Art und Weise prozessiert und posttranslational modifiziert. Änderungen der Konzentrationen dieser Peptide zeigen eine Morbus Alzheimer Erkrankung an. Dabei ist die Richtung der Konzentrationsänderung für jedes dieser Peptide spezifisch. Der Nachweis von Morbus Alzheimer erfolgt durch eine Identifizierung der Peptide einzeln oder in Kombinationen. Die Erfindung findet darüber hinaus Verwendung zur Verlaufskontrolle von Morbus Alzheimer, zur Prognose und zur Entwicklung von Therapeutika gegen Morbus Alzheimer.



WO 02/082075 A3

WO 02/082075 A3



(74) Anwalt: LÄUFER, Martinus; Gramm, Lins & Partner
Göhr, Freudenthaler 13, 30173 Hannover (DE)

Erklärungsbescheinigung (Regel 4.17 Ziffer c) nur für US

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AI, AM, AU, AU, AZ, BA, BH, 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, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Veröffentlicht:

*mit internationalem Recherchebericht
vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
einereifen*

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

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Rechercheberichts: 21. August 2003

(15) Informationen zur Berichtigung:

Frühere Berichtigung:
siehe PCT-Gazette Nr. 51/2002 vom 19. Dezember 2002,
Seite(n) 11

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

*Zur Erleichterung der Berücksichtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer b) für alle
Bestimmungsstaaten*

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

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No. PCT/DE 02/01376
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N3/68 C07K14/475		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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 used, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	WO 01 07074 A (AMGEN INC ;YAN HAI (US)) 1 February 2001 (2001-02-01) the whole document ---	17-19, 21-43
X	US 5 180 820 A (LOTTSPPEICH FRIEDRICH ET AL.) 19 January 1993 (1993-01-19) abstract, col. 3, lines 5 - 22, col. 10, lines 59 - 68, items 5.9.2 and 5.10, cols. 26 - 30 --- --/--	27-36, 38, 40
<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:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or obvious or considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*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</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
22 May 2003		20/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2000, Tx: 31 651 4 pp nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Hoesel, H

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/DE 02/01376

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PURCELL W M ET AL: "RAT BRAIN MAST CELLS: AN IN VITRO PARADIGM FOR ASSESSING THE TOXIC EFFECTS OF NEUROTROPHIC THERAPEUTICS" NEUROTOXICOLOGY, TOX PRESS, RADFIELD. AR, IN, vol. 17, no. 3/4, 21 September 1996 (1996-09-21), pages 845-850, XP008005508 ISSN: 0161-813X abstract -----	27-36, 38, 40
X	ROSSI A ET AL: "EXPRESSION IN MURINE AND HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINES OF VGF, A TISSUE SPECIFIC PROTEIN" INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 10, no. 6, December 1992 (1992-12), pages 527-534, XP000953020 ISSN: 0736-5748 p. 525, lines 14 - 30 -----	17-19, 21, 22, 26, 27
X	MIYATAKE Y ET AL: "THE SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY FOR VGF EXPRESSION DUE TO NGF IS DIFFERENT FROM THAT DUE TO BFGF IN PC12H CELL" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 30, no. 2, June 1993 (1993-06), pages 231-236, XP000953021 ISSN: 1039-9712 abstract -----	17-19

From PCT Gazette (continuation of second sheet) (July 1992)

DE02/01376

Although Claims 36-40 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 compound or composition.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 27-40 (in part)

BDNF as synthetic agonist or expression modulator and its use for therapy of Alzheimer's disease.

2. Claims 27-40 (in part)

NGF as synthetic agonist or expression modulator and its use for therapy of Alzheimer's disease.

3. Claims 27-40 (in part)

NT-3 as synthetic agonist or expression modulator and its use for therapy of Alzheimer's disease.

Continuation of I.2

Claims: 27-32, 35-40

The current Claims 27-32 and 35-40 relate to products that are defined only in functional terms by a desirable characteristic or property, namely the ability to act as a VGF (ant)agonist or modulator. However, this does not

allow any unambiguous conclusion to be drawn as to the structure of the desired agonists or modulators.

The current claims therefore relate to 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 VGF antibodies and VGF nucleic acid derivatives as well as the neurotrophins indicated in Claim 32.

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

ation on patent family members

International Application No.
PCT/DE 02/01376

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0107074	A	01-02-2001	AU 6110300 A 13-02-2001
			CA 2378845 A1 01-02-2001
			EP 1196188 A1 17-04-2002
			JP 2003095428 T 12-02-2003
			WO 0107074 A1 01-02-2001
US 5180820	A	19-01-1993	AT 148921 T 15-02-1997
			AT 153074 T 15-05-1997
			AU 647412 B2 24-03-1994
			AU 6337390 A 08-04-1991
			AU 643705 B2 25-11-1993
			AU 6404990 A 08-04-1991
			CA 2040412 A1 01-03-1991
			CA 2040437 A1 01-03-1991
			CN 1052141 A 12-06-1991
			CN 1052142 A 12-06-1991
			CZ 9004229 A3 16-06-1999
			CZ 286015 B6 15-12-1999
			CZ 9004230 A3 15-09-1999
			DD 299196 A5 02-04-1992
			DD 299197 A5 02-04-1992
			DE 69029934 D1 27-03-1997
			DE 69029934 T2 24-07-1997
			DE 69030719 D1 19-06-1997
			DE 69030719 T2 25-09-1997
			DK 440777 T3 21-04-1997
			EP 0440777 A1 14-08-1991
			EP 0441947 A1 21-08-1991
			ES 2098271 T3 01-05-1997
			ES 2100891 T3 01-07-1997
			FI 105342 B1 31-07-2000
			FI 105343 B1 31-07-2000
			GR 90100647 A , B 30-12-1991
			GR 90100653 A , B 30-12-1991
			HK 1006578 A1 05-03-1999
			HK 1006579 A1 05-03-1999
			IE 903128 A1 13-03-1991
			IE 903129 A1 13-03-1991
			IL 95511 A 31-10-2000
JP 2783450 B2 06-08-1998			
JP 5328974 A 14-12-1993			
JP 5161493 A 29-06-1993			
KR 188189 B1 01-06-1999			
KR 196203 B1 15-06-1999			
LT 1546 A , B 25-07-1995			
LT 1818 A , B 25-09-1995			
LV 10725 A 20-06-1995			
LV 10725 B 20-12-1995			
LV 10792 A 20-08-1995			
LV 10792 B 20-12-1995			
NO 911688 A 31-05-1991			
NO 911689 A 25-06-1991			
NZ 235086 A 26-10-1993			
PT 95152 A , B 22-05-1991			
PT 95153 A , B 22-05-1991			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Abkürzungen PCT/DE 02/01376
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 6D1N33/68 C07K14/475		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiere-Mittelprotokoll (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole): IPK 7 6D1N C07K		
Recherchiere aber nicht zum Mindestmaß gefundene 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		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag Anspruch Nr.
X	WO 01 07074 A (AMGEN INC ;YAN HAI (US)) 1. Februar 2001 (2001-02-01) das ganze Dokument	17-19, 21-43
X	US 5 180 820 A (LOTTSPREICH FRIEDRICH ET AL) 19. Januar 1993 (1993-01-19) abstract, col. 3, lines 5 - 22, col. 10, lines 59 - 68, items 5.9.2 and 5.10, cols. 26 - 30	27-36, 38,40
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind die Fortsetzung von Feld C zu übernehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als beschreibend beansprucht anzunehmen ist *B* dieses Dokument, das jedoch nicht an oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *C* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zu erhalten oder zu lassen, oder durch die eine Veröffentlichungsgattung für ein anderes im Rechtsbereich nicht genannter Veröffentlichung bereitgestellt wird, oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben) *D* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *E* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *F* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der eine Verbindung nicht besteht, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der für zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *G* Veröffentlichung, die besondere Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf nichtdefinierter Tätigkeit beruhend betrachtet werden *H* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf der Erfindung selbst beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *I* Veröffentlichung, die Mitglied eines von Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts
22. Mai 2003		20/05/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde: Europäisches Patentamt, P.O. Box 1501, 60001 Frankfurt am Main, Germany Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter: Hoesel, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktienzeichen PCT/DE 02/01376
C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	PURCELL W M ET AL: "RAT BRAIN MAST CELLS: AN IN VITRO PARADIGM FOR ASSESSING THE TOXIC EFFECTS OF NEUROTROPHIC THERAPEUTICS" NEUROTOXICOLOGY, TOX PRESS, RADFIELD, AR, IN, Bd. 17, Nr. 3/4, 21. September 1996 (1996-09-21), Seiten 846-850, XP008005508 ISSN: 0161-811X Zusammenfassung	27-36, 38,40
X	ROSSI A ET AL: "EXPRESSION IN MURINE AND HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINES OF VGF, A TISSUE SPECIFIC PROTEIN" INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE, PERGAMON, OXFORD, GB, Bd. 10, Nr. 6, Dezember 1992 (1992-12), Seiten 527-534, XP000953020 ISSN: 0736-5748 p. 525, lines 14 - 30	17-19, 21,22, 26,27
X	MIYATAKE Y ET AL: "THE SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY FOR VGF EXPRESSION DUE TO NGF IS DIFFERENT FROM THAT DUE TO BDNF IN PC12H CELL" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, Bd. 30, Nr. 2, Juni 1993 (1993-06), Seiten 231-236, XP000953021 ISSN: 1039-9712 Zusammenfassung	17-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationale Aktenzeichen:
PCT/DE 02/01376

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)(c) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich:
Obwohl die Ansprüche 30 und 36 - 40 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. 27 - 32, 35 - 40
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden könnte, nämlich:
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechende Satz 2 und 3 der Regel 6.4(a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Rechercheurbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierten Ansprüche.
2. 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. 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. 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: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs: Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="271 392 821 459">1. Ansprüche: 27 - 40 (teils) BDNF als synthetischer Agonist/Expressionsmodulator, sowie dessen Verwendung zur Therapie von Morbus Alzheimer<li data-bbox="271 492 821 560">2. Ansprüche: 27 - 40 (teils) NGF als synthetischer Agonist/Expressionsmodulator, sowie dessen Verwendung zur Therapie von Morbus Alzheimer<li data-bbox="271 593 821 660">3. Ansprüche: 27 - 40 (teils) NT-3 als synthetischer Agonist/Expressionsmodulator, sowie dessen Verwendung zur Therapie von Morbus Alzheimer	

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld I.2	
Ansprüche Nr.: 27 - 32, 35 - 40	
<p>Die geltenden Patentansprüche 27 - 32, 35 - 40 beziehen sich auf Produkte, die lediglich funktionell durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Fähigkeit, als VGF(ant)agonist, oder -modulator zu agieren, definiert sind. Diese jedoch erlaubt keinerlei eindeutigen Rückschluss über die Struktur der gewünschten Agonisten/Modulatoren.</p>	
<p>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, Produkte anhand des 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 VGF-Antikörper und VGF-Nukleinsäurederivate sowie die in Anspruch 32 genannten Neurotrophine</p>	
<p>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		Internationale Anmeldungen		
Angaben zu Veröffentlichung		PCT/DE 02/01376		
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Jahr der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 0107074	A	01-02-2001	AU 6110300 A	13-02-2001
			CA 2378845 A1	01-02-2001
			EP 1196188 A1	17-04-2002
			JP 2003505428 T	12-02-2003
			WO 0107074 A1	01-02-2001
US 5180820	A	19-01-1993	AT 148921 T	15-02-1997
			AT 153074 T	15-05-1997
			AJ 647412 B2	24-03-1994
			AU 6337390 A	08-04-1991
			AU 643705 B2	25-11-1993
			AU 6404990 A	08-04-1991
			CA 2040412 A1	01-03-1991
			CA 2040437 A1	01-03-1991
			CN 1052141 A	12-06-1991
			CN 1052142 A	12-06-1991
			CZ 9004229 A3	16-06-1999
			CZ 286015 B6	15-12-1999
			CZ 9004230 A3	15-09-1999
			DD 299196 A5	02-04-1992
			DD 299197 A5	02-04-1992
			DE 69029934 D1	27-03-1997
			DE 69029934 T2	24-07-1997
			DE 69030719 D1	19-06-1997
			DE 69030719 T2	25-09-1997
			DK 440777 T3	21-04-1997
			EP 0440777 A1	14-08-1991
			EP 0441947 A1	21-08-1991
			ES 2098271 T3	01-05-1997
			ES 2100891 T3	01-07-1997
			FI 105342 B1	31-07-2000
			FI 105343 B1	31-07-2000
			GR 90100647 A ,B	30-12-1991
			GR 90100653 A ,B	30-12-1991
			HK 1006578 A1	05-03-1999
			HK 1006579 A1	05-03-1999
			IE 903128 A1	13-03-1991
			IE 903129 A1	13-03-1991
			IL 95511 A	31-10-2000
JP 2783450 B2	06-08-1998			
JP 5328974 A	14-12-1993			
JP 5161493 A	29-06-1993			
KR 188189 B1	01-06-1999			
KR 196203 B1	15-06-1999			
LT 1546 A ,B	25-07-1995			
LT 1818 A ,B	25-09-1995			
LV 10725 A	20-06-1995			
LV 10725 B	20-12-1995			
LV 10792 A	20-08-1995			
LV 10792 B	20-12-1995			
NO 911688 A	31-05-1991			
NO 911689 A	25-06-1991			
NZ 235086 A	26-10-1993			
PT 95152 A ,B	22-05-1991			
PT 95153 A ,B	22-05-1991			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/28	C 0 7 K 14/475	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/475	C 0 7 K 16/22	
C 0 7 K 16/22	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	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	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 ランピング、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 ユルゲーンス、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、バルドシュトラッセ 2 2

(72) 発明者 ハイネ、ガブリエル

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

(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、アイッケンリーデ 1 5

(72) 発明者 ケルマン、マルクス

ドイツ連邦共和国、デー - 2 7 2 1 1 バスム、ヒンデンブルクシュトラッセ 1 8

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CA26 CB01 CB03 CB04 CB08 DA12 DA13 DA14

DA36 DA77 FB03 FB05 FB06 FB08

4B024 AA01 CA01 DA02 HA01 HA11

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34

QS36 QX02

4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA07 BA19 BA23 CA18 NA14

ZA02 ZA15 ZA16

4C085 AA14 BB11 CC23 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA15 ZA16

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA76 EA20 EA50

FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004531250A5	公开(公告)日	2005-08-04
申请号	JP2002579794	申请日	2002-04-08
[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	ランピングノルベルト ツフトハンスディーター ユルゲーンスマヒャエル ハイネガブリエレ ヘスリュウディガー ゼレハルトムート ケルマンマルクス		
发明人	ランピング、ノルベルト ツフト、ハンス-ディーター ユルゲーン、ミヒャエル ハイネ、ガブリエレ ヘス、リュウディガー ゼレ、ハルトムート ケルマン、マルクス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 C07K14/475 C07K16/22 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/28 G01N33/6896 G01N2500/02 G01N2500/20 G01N2800/2814		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 C07K14/475 C07K16/22 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB08 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA07 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	10117431 2001-04-06 DE		
其他公开文献	JP2004531250A		

摘要(译)

本发明涉及在患有阿尔茨海默氏病的患者的生物样品中相对于对照组中确定的肽及其定量测定。本发明还涉及所述肽用于治疗目的用途。本发明的肽来自具有相应基因的蛋白质前体，并以特定方式加工并以翻译后方式修饰。所述肽浓度的变化指示阿尔茨海默氏病，并且每种肽的浓度变化方向是明确的。通过单独或分组鉴定肽来检测阿尔茨海默氏病。本发明还可以用于控制阿尔茨海默氏病的病程，用于其预后以及用于开发用于对抗该疾病的治疗剂。

