

(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2005-511063

(P2005-511063A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(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	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-549919 (P2003-549919)
 (86) (22) 出願日 平成14年11月27日 (2002.11.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年5月20日 (2004.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2002/004360
 (87) 国際公開番号 W02003/048775
 (87) 国際公開日 平成15年6月12日 (2003.6.12)
 (31) 優先権主張番号 101 58 180.7
 (32) 優先日 平成13年11月28日 (2001.11.28)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

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

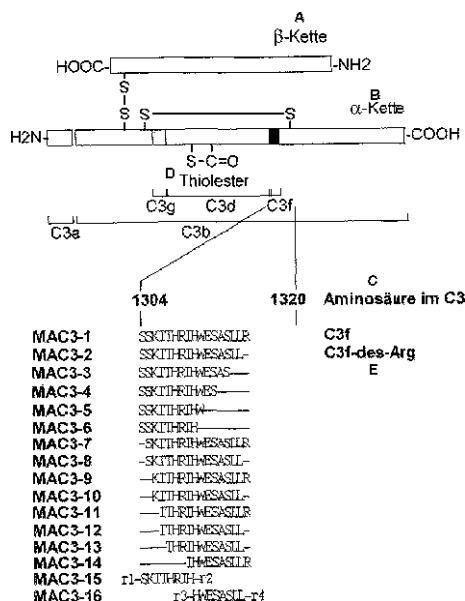
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病を検出する方法およびアルツハイマー病と他の痴呆疾患とを区別する方法、関連のペプチドおよびその使用

(57) 【要約】

【課題】 アルツハイマー病を検出する方法およびアルツハイマー病と他の痴呆疾患とを区別する方法、関連のペプチドおよびその使用

【解決手段】 本発明は、定義されたペプチドおよび、健康であるかまたは他の痴呆疾患を患う患者の対照グループの濃度と比較したアルツハイマー病を患う患者の体液中の前記ペプチドの定量的測定に関する。本発明のペプチドは、対応する遺伝子を有するタンパク質前駆体の補体 C 3 の C 3 f - フラグメントから由来し、特別な様式および方法でプロセッシングされ、場合により翻訳後修飾または化学的修飾されている。本発明のペプチドは、それぞれのペプチドに対して特異的に、対照グループと比較して患者中のその濃度が変化する。健康なヒトの濃度と比較してこのペプチドの濃度の特異的および明らかな変化が、アルツハイマー病による疾患を示す。本発明は、更に、進行のコントロールのためおよび診断薬および治療薬の開発のための使用でもある。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体の生物学的試料中の、少なくとも 1 種の M A C 3 - マーカーペプチドまたは S w i s s P r o t 登録番号 P 0 1 0 2 4 を有する配列またはそれと相同の配列から誘導されているペプチドを測定することにより、アルツハイマー病またはアルツハイマー病の体質を検出する方法。

【請求項 2】

患者の生物学的試料中の少なくとも 1 種のマーカーペプチドの濃度を測定してアルツハイマー病またはアルツハイマー病の体質を検出する方法において、

a) マーカーペプチドとして少なくとも 1 種の M A C 3 - ペプチドまたは S w i s s P r o t 登録番号 P 0 1 0 2 4 を有する配列またはこれと相同の配列から誘導されたマーカーペプチドを使用し、

b) 試料中のそれぞれのマーカーペプチドに対して特異的な濃度上昇または濃度低下を確認し、

c) b) に記載した方法でのマーカーペプチドの明らかな濃度変化を、アルツハイマー病に対する陽性の検出結果として評価する

ことを特徴とする、アルツハイマー病またはアルツハイマー病の体質を検出する方法。

【請求項 3】

試料中のペプチドが翻訳後修飾の形または化学的修飾された形、有利にペプチド - オキシドの形で存在し、かつこの形で検出することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

生物学的試料は、脳脊髄液、血清、血漿、尿、滑液、便、涙、リンパ液または組織試料または細胞試料であるかまたはこれらから処理により得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

M A C 3 - ペプチドの、測定を質量分析試験または生物学的活性試験または分子生物学的試験または免疫学的試験を用いて、有利に M A C 3 - ペプチドと結合するファージ粒子、P N A、抗体、アフィニティマトリックスまたは E L I S A - 試験を用いて行うことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

試料を測定の前にクロマトグラフィーにより分別しかつ / または沈殿反応を行いかつ / または液相分離を行い、その際に得られたフラクションを引き続き分離して試験することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

a) 前記の方法を診断の感度および / または特異性の向上のために他の診断方法と組み合わせるか、または

b) マーカーペプチドの濃度を疾患の重度の尺度として使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

M A C 3 - ペプチドは、

a) 配列 I D 1 ~ 配列 I D 1 6 に記載のペプチドであるか、または

b) このペプチドの天然由来の補体 C 3 対立遺伝子の誘導体であるか、または

c) 補体 C 3 - 配列の対応する部分と比較して有利に 2 個より多くのアミノ酸芽異なっていない M A C 3 - 突然変異体であり、

生物学的試料から単離するか、組み替えにより製造するかまたは化学的に合成することによる、翻訳後修飾されたかまたは化学的に修飾されたペプチドを含めた M A C 3 - ペプチドを獲得する方法。

【請求項 9】

配列 I D 3 ~ 配列 I D 1 6 に記載のペプチド、または配列 I D 1 ~ 配列 I D 1 6 に一致

10

20

30

40

50

するペプチドと相同のペプチド、特に天然由来の補体 C 3 対立遺伝子の誘導体または点突然変異された、または翻訳後修飾された、酵素的または化学的に修飾された、有利に酸化された M A C 3 - ペプチドまたは前記のペプチドに対応するペプチドミメティック。

【請求項 1 0】

アルツハイマー病の診断試薬または治療薬の製造または開発、特に診断試薬としての抗体の獲得のための、請求項 9 記載のペプチドのいずれか 1 つまたは S w i s s P r o t 登録番号 P 0 1 0 2 4 を有するペプチドと相同のペプチドの使用。

【請求項 1 1】

M A C 3 - ペプチドに結合する抗体。

【請求項 1 2】

アルツハイマー病の診断の目的で、関連のペプチドおよびペプチドフラグメントの相対的濃度を間接的に測定するための、配列 I D 1 ~ 配列 I D 1 6 に記載されたペプチドまたは N C B I 登録番号 X M _ 0 0 9 0 1 0 を有する配列に対応する核酸の使用。

【請求項 1 3】

M A C 3 - ペプチドをコードする核酸または M A C 3 - ペプチドをコードする核酸に対して相補的な核酸。

【請求項 1 4】

M A C 3 - ペプチドまたは相応するペプチドミメティックを含有するか、または M A C 3 - ペプチドに対する抗体を含有するか、または M A C 3 - ペプチドをコードする核酸を含有するか、または M A C 3 - ペプチドをコードする核酸に対して相補性を有する核酸を含有する医薬品または診断薬。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 記載の物質と、少なくとも 1 種の薬理学的に適合性の他の物質、有利に溶剤、充填剤、保存剤、着色剤または矯味剤とを含有する医薬品または診断薬。

【請求項 1 6】

M A C 3 - ペプチドと結合しかつ固定化された形態かまたは標識された形態で存在するかまたは固定化または標識付けが可能である形態で存在する少なくとも 1 種の抗体を有する、アルツハイマー病またはアルツハイマー病の体質を検出するためのテストキット。

【請求項 1 7】

少なくとも 1 種の M A C 3 - ペプチドからなる標準を更に含有していることを特徴とする、請求項 1 6 記載のテストキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0 0 0 1】

本発明は、アルツハイマー病を検出する方法、特にアルツハイマー病と他の痴呆疾患とを区別することができる方法に関する。このために患者の体液中のまたは他の試料中の所定のペプチド濃度が測定される。さらに、本発明は、この疾患の存在および/または重度を決定するために見出されたペプチド、抗体、核酸など、並びに診断および治療のためのその使用に関する。

【0 0 0 2】

痴呆疾患は、平均余命が向上するような人口統計の推移に基づいて、次第に増加する問題である、それというのもこの痴呆疾患は年齢の向上と共にその発症量も増加するためである。痴呆疾患は、大部分は治癒不能であり、患者を長期間続けて介護することが必要となる。

【0 0 0 3】

この患者のほぼ半数が入院による看護がなされている。痴呆症状を伴うような疾患を含めて 6 0 以上の痴呆疾患が公知である。アルツハイマー病は痴呆疾患のグループの中で最も頻度の高い疾患である [1]。アルツハイマー病の診断および治療は、従って特に相対的意義が高い。アルツハイマー病は神経変性疾患であり、この神経変性疾患は次の症状により特徴付けられる：精神的能力の低下、短期および長期の記憶障害、錯乱状態および自

10

20

30

40

50

己存続機能および自己看護機能の低下。精神的能力の悪化は、年齢が原因の精神的能力の悪化に対して付加的に生じる [1]。

【 0 0 0 4 】

従って、アルツハイマー病の診断は困難である、それというのもこのアルツハイマー病は他の痴呆疾患と同様に潜行的に生じ、脳内の神経細胞の破壊が次第に進行して、それに付随して精神的能力の低下と結びつくためである。多様な他の痴呆疾患、例えば血管性痴呆は、極めて類似の症状を示し、これはアルツハイマー病と他の痴呆疾患との診断による区別を極めて困難にしている。

【 0 0 0 5 】

痴呆疾患を認識する広範囲な方法は、「MMSEスコア (MMSE Score)」(簡易精神状態試験 (Mini-Mental Status Examination; MMSE)) の測定である [2]。しかしながら、この試験は多様な痴呆疾患を確実に区別することができない。臨床的に測定可能な実験室パラメーターとして、タンパク質 - タウおよび - アミロイドの 42 個のアミノ酸サイズのイソ型の濃度の測定を考慮することができ、その際にアルツハイマー病患者の脳脊髄液中にはタウが高まり、かつ - アミロイドが減少する。この 2 つのマーカーは高い選択率を示すが、わずかな特異性を示すだけである。このことはその診断値を極めて著しく制限するため、アルツハイマー病を確実に診断する診断マーカーは現在のところ提供されていないことができる [3]。

10

【 0 0 0 6 】

今までにアルツハイマー病の確実な診断も、有効な治療も不可能であったために、アルツハイマー病の検出のためおよびこの神経変性疾患と他の痴呆疾患との区別のために高い信頼性で、臨床的に測定可能なパラメーターを提供することが、重大な医学的進歩を意味する。本発明は、更にアルツハイマー病の治療のための治療法を開発するために著しく重要である、それというのも治療法の開発のためには治療すべき疾患の確実な診断が前提条件であるためである。このことは、類似の症状を有する多様な疾患が存在し、これらの疾患が恐らく多様な原因を有し、かつ従って異なる治療法が必要である場合に特に重要である。アルツハイマー病は今までに他の痴呆疾患と区別することができなかつた [3]。

20

【 発明の開示 】

【 0 0 0 7 】

本発明の根底をなす課題は、アルツハイマー病診断時に先行技術の欠点を回避し、かつ早期でかつ高い信頼性で適用可能な、アルツハイマー病と他の痴呆疾患とを診断するおよび区別する方法を提供することであった。

30

【 0 0 0 8 】

意外にも、アルツハイマー病を患う患者の体液試料、特に脳脊髄液中にだけ、所定のペプチドの濃度が対照値とは相違し、アルツハイマー病の検出並びにアルツハイマー病患者と他の痴呆疾患を患う患者および健康な個体との区別を可能にすることが見出された。例えば対照試料を用いて測定することができる対照値と比較したこのペプチドの濃度の変化は、アルツハイマー病の疾患の存在を示し、従って高い感度および高い特異性での疾患の選択的な検出に適している。

【 0 0 0 9 】

このペプチドは、前駆体分子の補体 C 3 の断片であり、特に補体 C 3 から由来する、17 個のアミノ酸長さの定義されたペプチドであり、これは C 3 f と称されている [4]。更に、C 末端のアミノ酸のアルギニンが分解されている他の C 3 f - ペプチド (C 3 f - d e s - A r g) は、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中に、アルツハイマー病ではないかまたは健康な人のそれぞれのペプチドの濃度とは異なる濃度で検出することができた。

40

【 0 0 1 0 】

他の C 3 f - ペプチドの新規の、今まで公知でない変異体は、ヒトの血液濾液および血漿中で検出および同定でき、従ってアルツハイマー病患者の診断目的のために使用することができる。

【 0 0 1 1 】

50

文献中には、C3fの記号ばかりか、C3Fの記号も記載されているが、その際、C3FはC3fと同じではない。C3Fはむしろ「C3-fast」、補体C3-ポリモルフィズムを表し、これはこのC3-変異体の完全な前駆体分子が、ゲル電気泳動の電場中でより早く前へ動くことを表す。

【0012】

以後、C3f-ペプチドおよびこのペプチドから誘導されるC3f-ペプチド-変異体を「アルツハイマー補体C3-ペプチド」(MAC3-ペプチド)と表示する。C3fの配列は、配列表の配列ID 1の配列と同一であり、並びにMAC3-1の配列と同一である。MAC3-ペプチドは少なくとも8個、多くとも17個のアミノ酸を有し、これは配列ID 1に一致するC3fの配列中の相当する配列位置でのアミノ酸と同一である。さらに、MAC3-ペプチドは2個の点突然変異されたアミノ酸、2個の欠失されたアミノ酸または2個の付加的に内部に挿入されたアミノ酸、ならびに配列ID 1に相当するN末端および/またはC末端の延長部を含むこともできる。しかしながら、この場合に、このペプチドは相応する配列位置での配列ID 1からの配列からなる少なくとも8個のアミノ酸を有していなければならない。更に、C3f-ペプチドおよびC3f-ペプチドフラグメントもMAC3-ペプチドと表示され、これは天然由来の補体C3-ポリモルフィズムおよび天然由来のC3-突然変異体から誘導される。

10

【0013】

前記の課題を解決するために、本発明は、患者の生物学的試料中に少なくとも1種のマーカーペプチドの濃度を測定してアルツハイマー病を検出する方法において、マーカーペプチドとして少なくとも1種のMAC3-ペプチドを使用して、試料中でそれぞれのマーカーペプチドに対してマーカーペプチドの特異的な濃度上昇または濃度低下を確認し、前記の方法においてマーカーペプチドの濃度変化がアルツハイマー病疾患用の陽性の検出結果として評価されることを内容とする。

20

【0014】

この場合に、それぞれのMAC3-ペプチドに対して根本的に、アルツハイマー病患者の場合にだけペプチド濃度の上昇が起こるか、またはこのMAC3-ペプチドに対して根本的にアルツハイマー病患者の場合にだけペプチド濃度の減少が起こることができる。定義されたMAC3-ペプチドについて、個々のアルツハイマー病患者の場合に高いMAC3-ペプチド濃度が、および他のアルツハイマー病患者の場合に低いMAC3-ペプチド濃度が同時に生じることはできない。疾患のほとんど全ての医学的診断の場合と同様に、しかしながら、個々の事例において誤った診断が行われることもある、それというの、MAC3-ペプチドの濃度は、それぞれ個々のアルツハイマー病患者の場合に、100%の確立で対照の場合のMAC3-ペプチドの濃度と異なるというわけではないためである。

30

【0015】

本発明の範囲内で、補体C3f-配列のフラグメントとして解釈することができるペプチドまたはC3f-ペプチド自体が、MAC3-ペプチドと表示される。このペプチドは補体C3f-フラグメントから誘導された相同のペプチドおよびペプチドフラグメントを包含する。このペプチドは、このペプチドの天然由来の対立遺伝子の誘導体および相同の突然変異体、特に有利に補体C3とは2個より多くのアミノ酸が異ならない点突然変異した突然変異体を包含する。本発明による有利なマーカーは配列表に記載されていて、配列ID 1~16に対応してMAC3-1~MAC3-16と番号付けされていて、その際に、MAC3-1は配列ID 1に対応し、MAC3-2は配列ID 2に対応し、MAC3-3は配列ID 3に次々と対応している。

40

【0016】

本願明細書において相同の配列とした場合には、少なくとも70%の相同性を有する配列を意味している。配列間の相同性を決定するために、コンピュータープログラム、例えばGAP[5]、PLASTP、BLASTN、FASTA[6]を含めたGCGプログラムバケット(米国、ウィスコンシン州、マディソン、ウィスコンシン州大学、遺伝学

50

コンピュータグループ (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)) を用いることができるかまたは相同性の決定のために公知の Smith Waterman - アルゴリズムを利用することができる。アミノ酸配列 - 比較のための有利なパラメータは、の Needleman and Wunsch アルゴリズム [7]、比較マトリックス BLOSUM62 [8]、12 のギャップ値 (Gap Penalty)、4 のギャップ長さ値 (Gap Length Penalty) および 0 の相同性 - 閾値 (Threshold of Similarity) を包含する。この G A P - プログラムは前記のパラメータの使用のためにも適している。前記のパラメータは、アミノ酸配列 - 比較のためのデフォルトパラメータ (default parameters) であり、その際に、末端でのギャップは相同性 - 値を低下させない。極めて短い配列を対照配列と比較する場合には、さらに、期待値を 1 0 0 0 0 0 (expectation value) にまで高め、場合によりワードサイズ (word size) を 2 にまで小さくする必要はある。他の例示されたアルゴリズム、ギャップ - オープニング - 値 (gap opening penalties)、ギャップ - エクステンション - 値 (gap extension penalties)、比較マトリックス (Programm- Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997 に挙げられたものを含めて) を使用することもできる。この選択は実施すべき比較に依存し、さらに、配列パートナーの間の比較 (この場合に G A P またはベストフィットが有利である) かまたは配列と大規模な配列 - データバンクとの間の比較 (この場合に F A S T A または B L A S T が有利である) かどうかに依存して実施される。例えば、前記のアルゴリズムを用いて測定された 7 0 % の一致は、7 0 % の相同性と表す。本願明細書において、相同の配列とは、基本的に、少なくとも 7 0 % の一致を示す全ての配列であると解釈され、この場合にこの一致は上記の記載に応じて計算される。これはアミノ酸配列並びに核酸配列にも適用される。

【 0 0 1 7 】

このマーカーペプチドは翻訳後修飾の形でおよび / または酵素によりおよび / または化学的に修飾された形で、有利にペプチド - オキシドの形で存在することができ、およびこの形で検出することができる。化学的に修飾されたまたは翻訳後修飾された補体 C 3 - ペプチドまたは M A C 3 - ペプチドは、D - アミノ酸からならびに L - アミノ酸から、同様に D - アミノ酸と L - アミノ酸との混合物からなることもでき、かつ天然由来であるかまたは組み換えによりまたは酵素を用いて製造されるかまたは化学的に合成することもできる。さらに、このペプチド中には異常なアミノ酸、つまり 2 0 種の標準アミノ酸には属さないアミノ酸を含有することもできる。この異常なアミノ酸および翻訳後修飾、例えばリン基およびスルフェート基、グリコシル化、アミノ化、脱アミノ化、プログルタミン酸などの多数の例は、文献およびデータバンクに記載されている [9]。

【 0 0 1 8 】

更に、本発明の範囲内で、唯一のまたは複数のアミノ酸または全体のペプチドがペプチドミメティックからなる構造により置き換えられていてもよい。ペプチドミメティックの概念は、本願明細書において可能な最も広い定義の形で使用されている。ペプチドミメティックは、非ペプチド構造構成要素を含有する物質であり、天然の母分子の生物学的作用を模倣するかまたは拮抗することができる。先行技術では、従来のペプチド構造の代用としてペプチドミメティックを利用することの可能性に関して行われた多数の研究が公知である。

【 0 0 1 9 】

核酸として、D N A、R N A および D N A - R N A - ハイブリッド分子は天然に由来するものかまたは合成により、酵素によりまたは組み換えにより製造されたものであると見なされる。さらに、核酸、生体内で高い安定性を示す修飾されたヌクレオチド、例えばホスホロチオエートも含める。このように安定化された核酸は、リボザイム技術、アンチセンス - R N A i (R N A 仲介干渉 (RNA-mediated interference)) 技術およびトリプレックス核酸技術の適用時にも既に使用される。

【 0 0 2 0 】

本発明による方法は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の場合にその濃度が変化し

、かつこの疾患が早期段階で既におよび疾患リスクを早期に示すことができる特異的バイオマーカーを検出する方法である。これは、この疾患の診断のために確かな臨床的マーカーを適用するために重要である。

【0021】

有利に、試料中のMAC3 - ペプチドの濃度も、複数の所定のMAC3 - ペプチドが出現する特徴パターンも同様に、この疾患の重度と関連していることができる。従って、この新規のマーカーは、アルツハイマー病の治療法の開発およびそれに付随する制御を可能にする、それというのもこの経過および場合により治療法に基づき生じる治療成果または疾患の進行の抑制を測定できるためである。アルツハイマー病の有効な治療法は、現在のところ不可能であり、アルツハイマー病疾患の確実な検出方法の提供の緊急性を強調されている、それというのもこの疾患の確実な検出が治療法の開発の前提条件であるためである。

10

【0022】

MAC3 - ペプチドの検出は、さらに、アルツハイマー病の新規の治療方法を開発するための臨床研究の範囲内で、高い特異性で、アルツハイマー病を患うが他の疾患を患っていない患者だけを選択することを可能にする。前記のことは、有効な研究結果を得るために重要である、それというのも、アルツハイマー病患者と間違えて診断された患者がアルツハイマー病治療研究の結果の品質に不利に影響を及ぼすためである。

【0023】

補体C3生物学

この補体系は、特異的または非特異的な免疫防御システムにおいて中心的な役割があり、30個より多いタンパク質からなり、これはいくつかのプロテアーゼであり、他にはこのプロテアーゼの基質である。この相補系の機能は連鎖反応の種類に基づき、この連鎖反応の開始時に物質、例えば細菌の細胞膜が相補系の成分を活性化し、これが補体因子を活性化し、更に次々と補体因子を活性化する。この補体活性化は、健全な自分の細胞の溶解も引き起こすことがあり、これは補体活性化部位付近で偶然に認められた。このプロセスは「バスタンダー」作用とも言われ、広範囲の組織破壊を引き起こしかねない。補体カスケードの進行においてこの補体タンパク質のタンパク質分解により放出されるいくつかのペプチドは、特にアナフィラトキシンのC3aおよびC5aは多岐にわたって免疫細胞を刺激して、局所的炎症反応を引き起こす[10]。このアナフィラトキシンC3aは例えば、細胞毒、血管拡張および細胞刺激特性を示す。アナフィラトキシンC3aの他に、一連の他の補体C3 - 分解生成物、例えばC3b、C3c、C3d、C3g、C3eおよびC3fが公知である(図1)。これらのC3 - ペプチドの中から、全てではないがいくつかの生物学的機能が公知である。

20

30

【0024】

C3bから、まず最初に因子Iにより17個のアミノ酸長さの小さなペプチドC3fが分離し、引き続き複数の他のC3 - ペプチド、特にC3dgが分離する。C3dgは次に更にC3dとC3gとに分解される。このようにしてC3bは不活性化される[11]。このC3d - ペプチドは、無傷のC3 - 分子においてチオールエステル基が存在し、かつ従って補体を活性化する物質と共有結合するC3 - ペプチドである。学問的な研究は、C3fが現在のところC3aと類似する生物学的作用を媒介することが示されている。C3fとC3aは平滑筋組織の収縮を引き起こし、かつ血管透過性を高める[11]。更に、C3aおよびC3fの場合ではC末端のアミノ酸がアルギニンであり、かつこのアミノ酸の分解により生物学活性がC3aから並びにC3fから変化する。生じたこの生成物はC3a - des - ArgもしくはC3f - des - Argと言われる。恐らく、C3fおよびC3aは、少なくとも部分的に、同じレセプターを使用していて、このことは類似の生物学的作用を説明することができる[11]。

40

【0025】

C3は主に肝臓によって合成されるが、局所的に単球細胞およびマクロファージによっても合成される。細菌性髄膜炎の進行、つまり脳内での細菌感染の場合に、脳脊髄液中で

50

の C 3 濃度は約 20 倍に高まる。アルツハイマー病の場合にも、同様に髄液中の C 3 濃度は上昇するが、2 倍程度であり、一方で脳内の他の炎症反応の場合には、例えば無菌製髄膜炎の場合には脳脊髄液中の C 3 濃度は変化しない。補体タンパク質およびそのレセプターは特に小グリア細胞、星状細胞およびニューロンによって合成される。mRNA および補体タンパク質 C 1 ~ C 9 のタンパク質の量は、アルツハイマー病患者の脳内では、健康な人の脳と比べて比較的高い。C 3 および C 4 の濃度は、脳内では 2 倍高く、肝臓内での変化のない濃度は、健康な人と比較して、最もわずかしか変化していない。多様な他の補体タンパク質は、健康な人と比較して、アルツハイマー病患者の脳内では著しく高まる：C 1 q mRNA は 23 倍に高まり、C 1 r は 5 倍に、C 7 は 6 倍に、C 9 は 22 倍に高まる [12]。従って、補体 C 3 タンパク質のフラグメントがアルツハイマー病に対するマーカーとして適している、他の補体タンパク質のフラグメントがアルツハイマー病に対するマーカーとして適していないことは、意外でありかつ予測されなかった。

10

【 0026 】

アルツハイマー病患者の脳内で「ブランク」および「絡まり」の形で存在する堆積物は、恐らくベータ - アミロイドおよびタウ - タンパク質からなる。これらの主成分の他に、しかしながら多数の他のタンパク質が免疫組織学的にこの堆積物中で同定されている。これらのタンパク質には、特に 1 - アンチ - キモトリプシン、シナプトフィジン、システイン C、Heme - オキシゲナーゼ、多様なアポリポタンパク質、例えば Apo E 4、Apo J および Apo A 1、IL - 6、AMY - 抗原、プリオン - タンパク質、ベータ - スペクトリン、アルファ - 2 - マクログロブリン、ラクトフェリンおよび多様な補体タンパク質、例えば C 1 q、C 3 および C 4 d が属する。タンパク質の他に、更にこの堆積物は、糖構造体、例えばヘパラン硫酸も含有する。この堆積物は、従ってタンパク質と他の物質とからなる複合構造体である。既に 1982 年に、Eikelenboomらは、アルツハイマー病患者の脳内のこの堆積物が、特に補体 C 3 を含有し、かつベータ - アミロイドが恐らく補体カスケードを活性化することを発見し、これは以後の研究において実験的に示すことができた [13]。

20

【 0027 】

多様な体液、例えば血液濾液、結晶または脳脊髄液中に、補体 C 3 ペプチド C 3 f 並びに C 3 f の多様な部分配列が検出された。ペプチド MAC 3 - 3 ~ MAC 3 - 16 は C 3 f ペプチドフラグメントであり、このペプチドフラグメントは文献中にはいままでに記載されておらず、従って物質として新規である。MAC 3 - 1 および MAC 3 - 2 は、文献から既に公知である [4 , 11]。しかしながら、今までにこのペプチドの MAC 3 - 1 ~ MAC 3 - 16 は、神経変性疾患との関連で検討されたことはなく、従って、アルツハイマー病の検出のための診断マーカーとしてのその使用は新規である。従って、このことは特に、前駆体分子の補体 C 3 が多数の公知でかつ正確に定義されたペプチドにおいてプロセッシングされることが知られていて、かつ前駆体分子の補体 C 3 から唯一 C 3 f - ペプチドおよび今まで公知でない C 3 f - ペプチドフラグメントがアルツハイマー病の診断のために使用でき、他方で他の補体 C 3 ペプチドは適当なマーカーとして同定されないことが予期できずかつ当業者に予想できなかったケースである。

30

【表 1】

MAC3- ペプチド 番号	C3-配列位置 (A. S.)	モノイソトープ 理論分子量 (Da)	ペプチド配列
1	1304-1320	2020,0966	SSKITHRIHWESASLLR
2	1304-1319	1863,9955	SSKITHRIHWESASLL
3	1304-1317	1637,8274	SSKITHRIHWESAS
4	1304-1315	1479,7583	SSKITHRIHWES
5	1304-1313	1263,6836	SSKITHRIHW
6	1304-1312	1077,6043	SSKITHRIH
7	1305-1320	1933,0646	SKITHRIHWESASLLR
8	1305-1319	1776,9635	SKITHRIHWESASLL
9	1306-1320	1846,0326	KITHRIHWESASLLR
10	1306-1319	1689,9315	KITHRIHWESASLL
11	1307-1320	1717,9376	ITHRIHWESASLLR
12	1307-1319	1561,8365	ITHRIHWESASLL
13	1308-1319	1448,7524	THRIHWESASLL
14	1311-1320	1210,6459	IHWESASLLR
15 *	1305 _{+r1} ⁻ 1311 _{+r2}	≥ 990,5723	r1-SKITHRIH-r2
16	1312 _{+r3} ⁻ 1319 _{+r4}	≥ 941,4607	r3-HWESASLL-r4

10

20

30

【0028】

* r1はアミノ酸のセリンを表すかまたはこの配列箇所にはアミノ酸は存在せず、r2はアミノ酸1313~1320の補体C3の配列または配列の一部に相当する配列を表し、その際、r2はC3前駆体のアミノ酸1312から出発し0~8個のアミノ酸長さであることができる。相応して、r3はアミノ酸1304~1311のC3前駆体配列またはその一部を表し、その際、r3はC3アミノ酸1312から出発し、0~8個のアミノ酸長さであることができる。r4はアミノ酸のアルギニンに相当するか、またはペプチド配列のこの位置には他のアミノ酸は存在しない。

40

【0029】

本発明によるこのMAC3-ペプチドは翻訳後修飾の形または化学的修飾の形で存在することができる。これは特にその質量に関して、従って質量分析による同定に関して、およびクロマトグラフィー、例えば逆相クロマトグラフィーの場合の溶出挙動に関して影響を及ぼす。特に、このペプチドは酸化されて、リン酸化されて、グリコシル化されて、硫酸化されて、アミノ化されて、試験すべき試料中に存在していることができる。天然由来の、補体C3-多形またはC3-突然変異体から誘導された、C3f-ペプチドおよびC3f-ペプチドフラグメントは、同様にMAC3-ペプチドとして表される。少なくとも8個のアミノ酸がC3f-配列(配列ID 1)と一致することを決定するために、配列の

50

相同性を決定するために使用するのと同じコンピュータプログラムおよびアルゴリズムを使用する [5 - 8]。

【 0 0 3 0 】

このペプチドは、最大で2つのアミノ酸がC3 - 前駆体分子の相当する配列と異なる場合に、特にMAC3 - ペプチドと見なされる。その際に、ペプチド配列が8 ~ 17個のアミノ酸長さであり、少なくとも8個のアミノ酸はC3 - 前駆体配列に相対的に保存されていて、かつ最大で2つのアミノ酸がC3 f - 配列とは異なる限りにおいて、点突然変異、欠失、アミノ酸の挿入およびN末端および/またはC末端の延長が許容される。

【 0 0 3 1 】

疾患の陽性の証明のために、同定された1種以上のMAC3 - ペプチドの濃度が、それぞれのペプチドについて特異的に高い濃度のまたは特異的に低い濃度の個々のそれぞれのペプチドに対して変化していることが想定される。それぞれのペプチドの濃度は、アルツハイマー病の重度の決定のために使用することができ、特に「簡易精神状態試験 (Mini-Mental Status Examination)」 (MMSE) の実施に代わる方法としてまたは補足する方法として用いることができる。

【 0 0 3 2 】

場合により使用された対照試料は、多様な対照からのプール試料であることができる。この調査すべきアルツハイマー試料は、プール試料であることもでき、その際、陽性の結果の場合に単一試験が行われる。対照試料中の個々のMAC3 - ペプチドの測定の結果から、それぞれ個々のMAC3 - ペプチドについての対照値を決定することができる。アルツハイマー病患者とアルツハイマー病ではない患者との区別のための将来的測定の場合には、次いで、この診断を行うために測定された測定値と対照値を比較することができる。

【 0 0 3 3 】

この体液試料は、有利に (ヒトの) 脳脊髄液 (髄液、CSF) または他の生物学的材料、例えば血清、血漿、尿、便、涙、滑液、リンパ液などの試料であることができる。これらは、特に選択された検出方法 (質量分析法、ELISAなど) の感度に依存する。同様に、細胞試料または組織試料も場合により使用することができる。従って、本発明のもう一つの実施形態の場合には、調査すべき試料の準備のために、例えばバイオプシーの範囲内で得られたヒト組織試料または血液細胞から、細胞または組織ホモジェネートを製造することも想定される。この組織を、例えば手動ホモジェナイザー、超音波ホモジェナイザーまたは電気駆動のホモジェナイザー、例えばUltrasaxを用いて破碎し、引き続き当業者に公知の方法で、例えば0.1 ~ 0.2 Mの酢酸を含有する酸性の水溶液中で10分間乾燥させる。引き続き、この抽出物にそれぞれの検出方法、例えば質量分析による試験を行う。この試料は通常の方法で準備することができる、例えば場合により希釈または濃縮および貯蔵することができる。

【 0 0 3 4 】

MAC3 - ペプチドの使用

さらに本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の診断のための少なくとも1種の本発明によるMAC3 - ペプチドの使用、ならびにそのMAC3 - ペプチド - 特異的結合特性に基づきこの疾患の検出のための診断試薬の開発のために適している抗体または他の抗原の獲得のためのMAC3 - ペプチドの使用にも関する。同様に、本発明は、このペプチドと特異的に結合するか、または反対にMAC3 - ペプチドをその表面に提示しかつMAC3 - ペプチドの結合パートナーを同定することが可能となるファージ粒子の獲得のためのMAC3 - ペプチドの使用にも関する。

【 0 0 3 5 】

MAC3 - ペプチドのための検出方法

本発明の範囲内で、MAC3 - ペプチドの検出のために多様な方法を使用することができる。このために、MAC3 - ペプチドを患者の試料中で特異的に検出できる全ての方法が適している。適当な方法は、特に物理学的方法、例えば質量分析または液体クロマトグラフィー、分子生物学的方法、例えば逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

または免疫学的検出技術、例えば「酵素リンク免疫吸収アッセイ (Enzyme linked immunosorbent assays)」（ELISA）である。

【0036】

物理学的検出方法

本発明の実施形態は、本発明によるペプチドを定性的または定量的に示すことができる物理学的方法を使用することである。この方法には、特に質量分析、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーおよびNMR（各磁気共鳴）分光分析などが属する。このために、定量的測定結果は、神経変性疾患、有利にアルツハイマー病を患う患者の集団から得られた試験すべき試料から得られる。この結果から疾患の存在および/またはこの疾患の重度の確率を導き出すことができる。

10

【0037】

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

20

【0038】

逆相クロマトグラフィー

本発明の特に有利な実施形態は、ヒト脳脊髄液中のペプチドを分離するために、特にC18逆相クロマトグラフィーカラムを使用して、トリフルオロ酢酸とアセトニトリルとからなる展開剤を用いる逆相クロマトグラフィーを包含する。例えば、それぞれのフラクションを集め、これは使用する展開剤の体積のそれぞれ1/100を含む。こうして得られたフラクションを質量分析、例えばMALDI-質量分析（「マトリックス-支援レーザー脱離-イオン化 (Matrix-assisted-laser-desorption-and-ionisation)」）を用いて

30

【0039】

質量分析

本発明による有利な実施形態の場合には、MAC3-ペプチドの同定を質量分析により測定する、有利にMALDI質量分析で行うことができる。この場合、質量スペクトルによる測定はさらに有利に、それぞれ相応するペプチドの理論的なモノアイソトピック質量を用いて算定した少なくとも1つの次の質量シグナルを有する。この場合、実験誤差および自然のアイソトープ分布に基づく理論的なモノアイソトピック質量の軽微な偏差が生じることがある。さらに、MALDI-質量測定の場合には、この測定方法に基づき、ペプチドにプロトンが加わり、それによりこの質量は1ダルトンだけ高まる。次の質量は、適当なソフトウェア（この場合にGPMW 4.02）を用いて計算した同定されたペプチドの理論的なモノアイソトピック質量に相当する。この理論的なモノアイソトピック質量は、試料中で単独でまたは組合わさった形で出現することがある：MAC3-1 = 20200.1 / MAC3-2 = 1863.9 / MAC3-3 = 1637.8 / MAC3-4 = 1479.7 / MAC3-5 = 1263.6 / MAC3-6 = 1077.6 / MAC3-7 = 1933.0 / MAC3-8 = 1776.9 / MAC3-9 = 1846.0 / MAC3-10 = 1689.9 / MAC3-11 = 1717.9 / MAC3-12 = 1561

40

50

. 8 / M A C 3 - 1 3 = 1 4 4 8 . 7 / M A C 3 - 1 4 = 1 2 1 0 . 6 / M A C 3 - 1 5
 9 9 0 . 5 および M A C 3 - 1 6 9 4 1 . 4 ダルトン。更に、実験的に測定された質
 量 2 0 3 8 および / または 2 0 5 4 が出現することがある。この両方の実験的に測定され
 た質量は、1 箇所または 2 箇所酸化されたペプチドの形の M A C 3 - 1 である。記号 (
 大きいかまたは等しい) は、該当する M A C 3 - ペプチドに対して任意に大きな質量が可
 能であるのではなく、単にこのペプチドの末端に付加的に存在することができるアミノ酸
 に基づいて生じる質量であると解釈される。このペプチドは全体で最大 1 7 個のアミノ酸
 長さであることができる。このペプチドの末端には任意のアミノ酸が付加的に存在でき
 るのではなく、この配列位置の補体 C 3 前駆体分子の配列に基づき存在することができ
 るようなアミノ酸が存在できる。

10

【 0 0 4 0 】

M A C 3 - ペプチドの配列の質量分析測定

この実施形態をさらに実際に適用する場合には、検出結果の他の検証は、質量に一致す
 るペプチドの同一性を測定し、その際に補体 C 3 f - ペプチドから誘導することができ
 るペプチドシグナルをもっぱら考慮することにより可能でありかつ推奨される。この検証は
 、有利に質量分析法を用いて、例えば M S / M S - 分析を用いてペプチドシグナルの同定
 によって行われる [1 4] 。

【 0 0 4 1 】

本発明による方法により、初めて補体 C 3 f - ペプチドの特異的ペプチドフラグメント
 、並びに C 3 f - ペプチド自体 (M A C 3 - 1 に相当) が同定され、かつその重要性が認
 識された。この C 3 f - ペプチドおよびその誘導体は、本願明細書では M A C 3 - 1 ~ M
 A C 3 - 1 6 と表す。この配列は、配列表において配列 I D 1 ~ 配列 I D 1 6 で記載した
 。この配列 I D 1 5 および 1 6 で記載した M A C 3 - ペプチド (M A C 3 - 1 5 および M
 A C 3 - 1 6) は、N 末端および / または C 末端に、補体 C 3 f - ペプチド (配列 I D 1
 、 M A C 3 - 1) の対応する配列に応じた付加的なアミノ酸を有することができる。本発
 明は、非修飾の形、化学的に修飾した形または翻訳後修飾した形の組み換えまたは合成に
 より製造した M A C 3 - ペプチドならびに生物学的試料から単離した M A C 3 - ペプチド
 も包含する。この場合に、M A C 3 - ペプチドが少なくとも 8 個のアミノ酸を有し、この
 アミノ酸がペプチド配列の中でその同一性およびその位置において補体 C 3 f - ペプチド
 と一致する場合に限り、2 箇所の点突然変異ならびに他の相違も可能である。

20

30

【 0 0 4 2 】

分子生物学的検出技術

最後に、本発明は、補体 C 3 - フラグメントに相当する核酸、および特に本発明による
 M A C 3 - ペプチドに相当する核酸、および所属するタンパク質分子の間接的測定および
 定量化のためのその使用でもある。その中には、例えばコードされない配列、例えば m R
 N A の 5 ' - または 3 ' - 非翻訳領域である核酸、または特異的ハイブリダイゼーション
 試験のために補体 C 3 の核酸配列との十分な配列一致を示す、従って所属するタンパク質
 、特に M A C 3 - ペプチドの間接的な検出に適している核酸も含まれる。

【 0 0 4 3 】

これについての実施例は、患者の組織試料を獲得し、引き続き、補体 C 3 の遺伝子に一
 致するかまたは相同の遺伝子に一致する R N A 転写物の濃度を測定することである。この
 場合、調査すべき試料からの定量的測定結果 (強度) を、アルツハイマー病を患う患者の
 集団および対照集団の場合に得られた測定値と比較する。定量化のために、例えば逆転写
 酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) またはノーザンプロットのような当業者に公
 知の方法を使用することができる。この結果からアルツハイマー病の疾患の存在および /
 またはその重度の確率を推論することができる。

40

【 0 0 4 4 】

免疫学的検出方法

本発明の他の有利な実施形態によると、M A C 3 - ペプチドの同定は免疫学的検出シス
 テム、有利に E L I S A (enzyme linked immunosorbent assay) を使用して実施するこ

50

とができる。この場合、この免疫学的検出は少なくとも1つのMAC3 - ペプチドを捉える。この特異性を高めるために、さらに有利に、いわゆる「サンドウィッチ - ELISA」を使用することができ、この場合にMAC3 - ペプチドの検出は、同じ分子内の異なるエピトープを認識する2つの抗体の特異性に依存する。しかしながら、MAC3 - ペプチドの検出のために他の免疫学的方法、例えば直接的または競合的免疫学的方法を使用することもできる。同様に、他のELISA類似の検出技術、例えばRIA（ラジオイムノアッセイ（radio immuno assays））、ELI - Spot、ルミネッセンス - 、化学ルミネッセンス - 、電気化学ルミネッセンス - 、蛍光 - またはバイオルミネッセンス - 免疫アッセイ法などが、MAC3 - ペプチドの免疫学的検出システムとして適している。定量化のための標準として、生物学的試料から単離された、組み換えにより製造されたまたは化学的に合成されたMAC3 - ペプチドを使用することができる。1種または数種のMAC3 - ペプチドの同定は、例えば一般に、ペプチドまたはペプチドフラグメントに結合する抗体を用いて、つまりペプチドに特異的な抗体を用いて行うことができる。ペプチド検出にとって適当な他の検出方法は、特にウェスタンブロット、免疫沈降法、ドット - ブロット（Dot - Blot）、プラズモン共鳴スペクトル分析（BIACORE（登録商標））、ファージ粒子、PNA（ペプチド核酸）、アフィニティマトリックスなどである。一般に、特異的検出システムを構築することができる全ての物質 / 分子が検出試薬として適している。

10

【0045】

これら全ての免疫アッセイ法の場合には、MAC3 - ペプチドに対して特異的な結合パートナーを適当なキャリア上に固定化するのが有利である。キャリアとして全ての公知のキャリア、例えばプラスチック小管、微量滴定プレート、粒子、マイクロ粒子、タンパク質チップなどを使用することができる。

20

【0046】

結合パートナーをこのキャリアに直接固定化するかまたは固相を吸着または共有結合させて固定化することができる。他の方法は、MAC3 - ペプチドに対する結合パートナーを個々に一对の結合ペアを介して、例えばビオチン / アビジン、ビオチン / ストレプトアビジン、抗原 / 抗体などを介して固定化することにある。これらの方法は当業者に公知である。

【0047】

本発明の他の対象は、少なくとも1つの結合パートナー、有利にMAC3 - ペプチドに対して結合する抗体を有するアルツハイマー病またはアルツハイマー病の体質を検出するためのテストキットである。この結合パートナーは、適当な固相またはキャリアに固定化された形で結合して存在するかまたは固定化が可能である形で提供することができる。例えば、間接的結合としてビオチン / アビジン - 相互作用を利用する場合には、結合パートナーはビオチン化されていることができる。

30

【0048】

この結合パートナーは、しかしながら同様にテストキット中では標識された形で存在するか、または標識化が可能である形で存在することができる。間接的標識は、結合パートナーの相互作用、例えばアビジン / ビオチンもしくはストレプトアビジン / ビオチンまたはジゴキシン / アンチ - ジゴキシン - 抗体を介して挿入することができる。これらの方法は当業者に公知である。

40

【0049】

さらに、テストキット中では、固定化されたかまたは標識された結合パートナーの他に、少なくとも1種のMAC3 - ペプチドからなる標準を含有することができる。通常では、標準として異なる公知のMAC3 - ペプチド濃度を有する複数の溶液が提供される。

【0050】

MAC3 - ペプチドおよびアンチ - MAC3 - ペプチド抗体の獲得

本発明によるもう一つの実施形態は、当業者に公知の組み換え発現システム、クロマトグラフィー法および化学的合成プロトコルを使用してMAC3 - ペプチドを獲得すること

50

である。こうして得られたMAC3-ペプチドは、特にそれぞれのMAC3-ペプチドの定量化のための標準としてまたはMAC3-ペプチドに特異的な抗体の製造のための抗体として使用することができる。MAC3-ペプチドを単離しかつ獲得するための当業者に公知の適当な方法には、ペプチドの組み換え発現が属する。MAC3-ペプチドの発現のために、特に細胞システム、例えばバクテリア、例えば*Escherichia coli*、酵母細胞、例えば*Saccharomyces cerevisiae*、昆虫細胞、例えば*Spodoptera frugiperda* (Sf-9)細胞、またはほ乳類細胞、例えば「チャニーズハムスター卵巣(Chinese Hamster Ovary)」(CHO)細胞を使用することができる。これらの細胞は「アメリカ組織培養コレクション(American Tissue Culture Collection)」(ATCC)から得ることができる。MAC3-ペプチドの組み換え発現のために、例えばMAC3-ペプチドをコードする核酸配列を、適当な調節する核酸配列、例えばプロモータ、抗生物質選択マーカーなどと組み合わせて、分子生物学的方法で発現ベクター内へ挿入する。このために適したベクターは、例えばInvitrogen社のベクターpcDNA3.1である。こうして得られたMAC3-ペプチド発現ベクターを次に適当な細胞内へ例えばエレクトロポレーションにより導入することができる。MAC3-ペプチドを化学合成によって製造することは、例えばメリフィールド-固相-合成プロトコルに従って、多様な製造元から入手可能である自動合成装置を使用して行うことができる。本発明のもう一つの実施形態は、生物学的試料からまたは組み換え発現システムの細胞媒体または細胞溶解産物からMAC3-ペプチドを、例えば逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、等電点電気泳動などを用いるか、または分取免疫沈降、硫酸アンモニウム沈殿、有機溶剤などを用いた抽出などの他の方法を用いて単離することである。本発明のもう一つの実施形態は、MAC3-ペプチドを使用してモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を獲得することである。抗体の獲得は、通常の当業者に公知の方法で行う。有利な実施形態は、MAC3-ペプチドにだけ存在するが、しかしながら完全な補体C3-前駆体分子中には出現しないneo-エピトープを認識するMAC3-ペプチドに特異的な抗体を製造および獲得することである。このようなアンチ-MAC3-ペプチド-抗体は補体C3-前駆体分子の存在でMAC3-ペプチドを特異的に免疫学的に検出することができる。

10

20

30

【0051】

MAC3-ペプチド決定による治療法開発および監視

もう一つの適用例は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病に対する開発途中にある治療法の有効性を評価するための前記したペプチドの定量的測定である。この場合には、試験すべき試料からの定量的測定結果と、対照集団および患者のグループで得られた測定値とを比較する。

【0052】

この結果から治療法の有効性を導き出すことができる。この有効性試験は、治療法の有効な開発のために特に重要であり、今までにはアルツハイマー病に対して信頼することができる臨床的に測定可能なパラメータは提供されていなかった[3]。

【0053】

この方法を使用して、アルツハイマー病の脳脊髄液中に対照グループに対して相対的にそれぞれのペプチドに特異的に陽性または陰性に变化する濃度で存在する限定的にプロセッシングされかつ限定的に翻訳後修飾された、補体C3f-分子のアミノ酸配列から誘導されたペプチド、並びにC3fペプチド自体が同定された。

40

【0054】

MAC3-ペプチドの治療的適用の開発

アルツハイマー病患者の場合に、健康なヒトと比較してMAC3-ペプチドの濃度が明らかに变化している。本発明の他の観点は、従って、アルツハイマー病患者の場合のMAC3-濃度を通常濃度にするということでもある。この方法は、アルツハイマー病または類似する神経学的疾患の治療法に使用することができる。補体C3-ペプチドまたはMAC3

50

- ペプチドの濃度が高められた場合に、この物質の濃度を、例えばアンチ - 補体 C 3 またはアンチ - M A C 3 - ペプチド抗体または補体 C 3 - 特異的アンチセンス核酸、リボザイム、RNAi - 核酸分子またはトリプレックス - 核酸または M A C 3 - ペプチド - アンタゴニストまたは補体 C 3 - アンタゴニストの治療的投与により低減することができる。治療法のために、補体 C 3 の生体固有の発現または補体 C 3 から M A C 3 - 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。補体 C 3 または M A C 3 - ペプチドの欠乏が疾患の原因である場合には、補体 C 3、M A C 3 - ペプチド、M A C 3 - ペプチド - アゴニストまたは補体 C 3 - アゴニストの治療的投与を行うこともできる。補体 C 3 から M A C 3 - ペプチドへのプロセッシングに影響する物質も治療的に使用することができる。もちろん、多様な治療ストラテジーの組み合わせも場合によっては有効であり、可能である。

10

【0055】

従って、本発明は、神経学的疾患、特にアルツハイマー病の治療の目的で、補体 C 3 - ペプチドおよび M A C 3 - ペプチドの濃度を直接的または間接的に変化させるために、補体 C 3 - ペプチド、M A C 3 - ペプチド、M A C 3 - ペプチド - アゴニストおよび M A C 3 - ペプチド - アンタゴニスト、補体 C 3 - ペプチド - アゴニストおよび補体 C 3 - ペプチド - アンタゴニスト、アンチ - 補体 C 3 抗体およびアンチ - M A C 3 - ペプチド抗体を使用をも包含する。抗体とは別に、抗体フラグメント、抗体融合タンパク質、または他の補体 C 3 - ペプチドまたは M A C 3 - ペプチドに選択的に結合する他の物質を使用することもできる。前記のタンパク質およびペプチドとは別に、前記のタンパク質およびペプチドの融合タンパク質を使用することもできる。さらに、本発明は、前記のタンパク質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、RNAi - 核酸分子、リボザイムおよび他の核酸を使用することでもある。さらに、本発明は、前記のタンパク質の活性を調節するアゴニストおよびアンタゴニストでもある。

20

【0056】

本発明の他の実施形態は、医薬調製物または血液 - 脳 - 隔壁および / または血液 - 髄液 - 隔壁を有効に通過することができるように記載されたペプチドおよび核酸を化学的に修飾することである。それにより、これらは特に治療的用途に適している。これを達成するために、例えば M A C 3 - ペプチド、補体 C 3 - ペプチド、ペプチドミメティック、核酸、アゴニストまたはアンタゴニストを、例えば親油性にしてクモ膜下腔内、脳室内並びに脳組織内へ侵入しやすくなるように修飾することができる。これは、疎水性分子成分の導入によるか、またはこの物質を疎水性の物質、例えばリポソーム中に「パッケージング」することにより達成することができる。さらに、例えば、クモ膜下腔内へ侵入しやすくするか、もしくは反対にクモ膜下腔から外に出にくくするペプチド配列をこの M A C 3 - ペプチドまたは補体 C 3 - ペプチド、核酸、アゴニストまたはアンタゴニストに接合することもできる。

30

【0057】

本発明は、前記の治療薬の、多様な経路、例えば静脈内注射として、経口投与可能な物質として、吸入可能なガスまたはエアゾールとしての投与、またはクモ膜下腔、脳室内への直接的注射の形または筋肉、脂肪、脳などの組織への直接的注射の形での投与でもある。それにより、生物学的利用性および有効性を高めることができ、並びに治療薬の局所的濃度を高めることができる。例えば、経口投与したペプチドまたはタンパク質は、耐酸性カプセルにより胃中でのタンパク質分解から保護できる。著しく疎水性の物質は、適当な製剤学的処理によってより親水性にし、従って例えば静脈内注射用により適するようにすることができる。さらに可能な投与形態は、特に作用物質のポリマーおよびゲル中へのパッケージングなどである（米国、コロラド州、フォート・コリンズのアトリックス・ラブリクス社（Atrix Labs, Fort Collins, CO, USA）、米国、フロリダ州、デイビーのアンドリクス・ファーマシューティカル社（Andrx Pharmaceuticals, Davie, FL USA））。

40

【0058】

本発明の他の実施形態は、M A C 3 - ペプチドまたは補体 C 3 - ペプチドと選択的に結

50

合するレセプターを同定するための、M A C 3 - ペプチドまたは補体 C 3 - ペプチドの使用である。このレセプターも、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、このことは神経学的疾患、特にアルツハイマー病の治療のために有効である。補体 C 3 - ペプチド、M A C 3 - ペプチドおよびこれらの物質の発現および生物学的利用能を変性する作用物質の治療作用の試験のための実施例は、セルラインの培養を包含する。このセルラインは補体 C 3 - ペプチドまたは M A C 3 - ペプチドでまたはペプチドミメティックでまたは補体 C 3 - ペプチドの発現を促進する物質または補体 C 3 - ペプチドから M A C 3 - ペプチドへのプロセッシングを促進する物質で処理することができる。それにより、神経学的疾患、特にアルツハイマー病との関連で補体 C 3 - ペプチドおよび M A C 3 - ペプチドの生物学的特性を測定することができる。融合タンパク質および融合ペ
10
プチド、例えばセルライン中への融合タンパク質の輸送を促進するペプチド配列を有する融合タンパク質もセルラインの処理のために使用することができる。可能な融合パラメーターの例は、H I V - T A T - 配列またはアンテナペディア - 配列、ヘルペスシンプレックス V P 2 2 - 配列などである。同様にセルラインを発現ベクターでトランスフェクションし、この発現ベクターはトランスフェクションされた細胞によって補体 C 3 - ペプチドまたは M A C 3 - ペプチドの直接的または間接的発現を引き起こすこの発現ベクターは特に M A C 3 - ペプチドまたは補体 C 3 - ペプチドをコードすることができる。同時に多様な M A C 3 - ペプチドおよび / または補体 C 3 - ペプチドを用いたトランスフェクションも実施することもできる。また、適当なセルラインをアンチ - 補体 C 3 - ペプチド - 抗体またはアンチ - M A C 3 - ペプチド - 抗体または補体 C 3 - ペプチドの発現を抑制する核
20
酸、例えば補体 C 3 - アンチセンス - 核酸、補体 C 3 - トリプレックス - 核酸、補体 C 3 - R N A i - 核酸または補体 C 3 - m R N A に対して結合するリボザイムで処理することができる。特別に、神経学的モデルシステムとして補体 C 3 との関係で適していると考えられるセルラインを、このような試験に用いることもできる。この試験のための「読み出し」装置として、特に処理された細胞の増殖速度、その物質交換活性、細胞のアポトーシス速度、細胞モルホロジーの変化、細胞独自のタンパク質またはレポーター遺伝子の発現または細胞死のためのマーカーとしてのサイトソル性細胞成分の放出を測定する試験を使用することができる。

【 0 0 5 9 】

他の試験システムとして、神経学的疾患用のモデルとして、特にアルツハイマー病用の
30
モデルとして適している実験動物、例えばマウス、ラットまたは他の種の適当な株を使用することができる。これらの実験動物は、M A C 3 - ペプチドまたは補体 C 3 - ペプチドの濃度の変化を目標とする治療ストラテジーの効果を調査するために使用することができる。その際、これらのペプチドおよびタンパク質は場合により、血液 - 脳 - 隔壁および / または血液 - 髄液 - 隔壁をより良好に通過できるように製剤学的に調製されていてもよい。製剤学的調製方法として、特にリポソーム - パッケージングタンパク質およびペプチド、トランスポートペプチド、例えば H I V - T A T - 配列などと共有結合で融合したかまたは共有結合でなく会合したタンパク質およびペプチドを使用することができる。さらに、ペプチドおよびタンパク質は、親水性の特性を維持し、従って細胞内へ容易に侵入できるように化学的に修飾されていることもできる。水溶液中に難溶性であるペプチドは親水性
40
になるように修飾され、かつ例えば静脈内に注射可能な治療薬として使用することもできる。経口投与すべき敏感な物質を胃内で保護するために耐酸性のカプセルを使用することもできる。

【 0 0 6 0 】

動物モデルを用いた試験の場合の「読み出し」パラメーターは、動物の生存時間、その挙動、その短期記憶能力、学習能力などである。実験動物、例えばラット用に適している記憶試験の例は、「モリス水迷路試験 (Morris water maze test)」である。他のパラメーターとして、身体機能、例えば血液試験の測定、脳障害の測定、物質代謝試験、補体 C 3 - ペプチドおよび M A C 3 - ペプチドおよびこの疾患と関連する他のタンパク質の発現、ならびに組織、例えば脳の形態学および組織学的試験を使用することができる。
50

【0061】

補体C3 - ペプチドおよびMAC3 - ペプチドの機能を調査するための他の方法として、分子生物学的方法を使用して、補体C3 - ペプチドまたはMAC3 - ペプチドを産生しないか、または減少された量または高めた量で産生する実験動物、例えば遺伝的に定義された動物、またはトランスジェニック動物を得ることができる。この場合に、この発現は局所的に、例えば脳内でも、試験動物の全身において変更することができる。試験動物としては特にC.エレガンス(Caenorhabditis elegans)、キイロショウジョウバエ(Drosophila)、ゼブラフィッシュ、マウス、ラットなどが適している。

【0062】

本発明を次に実施例を用いて詳細に説明する。この場合に図面も参照される。

10

【0063】

図1は、相互に整列させた形で示した同定されたMAC3 - ペプチドの位置を示す補体C3タンパク質の概略図を表す。ペプチドの理論的なモノアイソトピック質量(ダルトンで表示)はソフトウェアGPMW4.02を用いて算出した。MAC3 - 1 = 2020.1 / MAC3 - 2 = 1863.9 / MAC3 - 3 = 1637.8 / MAC3 - 4 = 1479.7 / MAC3 - 5 = 1263.6 / MAC3 - 6 = 1077.6 / MAC3 - 7 = 1933.0 / MAC3 - 8 = 1776.9 / MAC3 - 9 = 1846.0 / MAC3 - 10 = 1689.9 / MAC3 - 11 = 1717.9 / MAC3 - 12 = 1561.8 / MAC3 - 13 = 1448.7 / MAC3 - 14 = 1210.6 / MAC3 - 15 = 990.5およびMAC3 - 16 = 941.4ダルトンである。質量分析計で実際に同定された質量は、自然のアイソトープ分布に基づき、ならびにわずかな測定誤差に基づき、理論的なモノアイソトピック質量から変動する。この測定精度は1000~4000ダルトンの質量範囲内でペプチドに対して500ppmであり、この場合に4000ダルトンよりも大きな質量を有するペプチドに対する測定の誤差は段階的に増加する。さらに、全てのペプチドの測定された質量は、使用した測定法に基づき、1プロトンの質量(=1ダルトン)だけ高くなっている。さらに、このペプチドMAC3 - 1は、1個または2個の付加的に共有結合した酸素原子を有するペプチド - 変異体の形で同定することができ、その際にそれぞれの酸素原子に相当する約16ダルトンはペプチドの質量に加算される。この場合に実験的に測定したMAC3 - 1の質量は、2038および2054ダルトンであり、この場合にMAC3 - 1の質量はそれぞれの配列において酸素原子の質量分が高くなっている。

20

30

【0064】

図2は、脳脊髄液からのMAC3 - ペプチドの分離および濃縮のための、実施例2による逆相クロマトグラフィーにかけた試料の溶出プロフィールを示す。MAC3 - 1ペプチドが溶出する位置は矢印によりマークされている。

【0065】

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行った後に、実施例3によるMAC3 - 1のMALDI - 質量分析測定により得られたスペクトルを示す。MAC3 - 1は、補体C3に由来するC3f - ペプチドの配列に一致し、矢印によりマークされている。

40

【0066】

図4は、本発明によるペプチドのMAC3 - 1の実施例4によるMS/MS - フラグメントスペクトルを示す。図4Aはこの測定の生データを示し、図4BはMAC3 - 1の変換した、デコンボリューションした質量分析を示す。図4B中のピーク形状は、MAC3 - 1に対して特徴的である。MAC3 - 1は補体C3タンパク質のC3f - ペプチドに一致する(配列ID 1)。

【0067】

図5は相対的に定量化するMS法としてMALDIにより得られたデータを示す。試料は多様な量の異なる標準ペプチドを混ぜ、標準シグナルならびに代表的な試料シグナルの強度を測定した。標準の全てのシグナル - 強度は濃度0.64μM(=1)の場合のシグ

50

ナル強度に規格化した。各ペプチドは、シグナル強度と濃度との間で個々の典型的な関係を示し、これについてはこの図中で曲線の上昇によって読み取ることができる。

【0068】

図6は、2箇所酸化された形(図6AおよびB)、1箇所酸化された形(図6CおよびD)、酸化されていない形(図6EおよびF)および2価の電荷を有するイオンとして(図6GおよびH)の、ペプチドMAC3-1についての箱ヒゲ図を示す。図6A~F中にはそれぞれ1価の電荷を有するイオンが分析されている。それぞれのMAC3-1変異体は、アルツハイマー病患者と健康な対照との間の比較において(図6A、C、EおよびG)およびアルツハイマー病患者とアルツハイマーではない患者との比較において(図6B、D、FおよびH)示されている。

10

【0069】

図7~11は、箱ヒゲ図の形での、健康な対照と、アルツハイマー病患者とを比較した場合(図A)のおよびアルツハイマー病ではない患者と、アルツハイマー病患者とを比較した場合(図B)の、MAC3-2、MAC3-7、MAC3-8、MAC3-9およびMAC3-13の積分されたMALDI-質量分析によるシグナル強度の比較を示す。

【0070】

実施例1: MAC3-ペプチドの測定のための脳脊髄液の採取

髄液または脳脊髄液(Liquor cerebrospinalis)は4つの脳室中およびクモ膜下腔中に含まれる液体であり、この液体は特に側脳室の脈絡叢中に形成される。脳脊髄液の採取はたいていは腰椎穿刺により、まれに後頭下穿刺または脳室穿刺により行う。脳脊髄液の採取のための腰椎穿刺(脊髄穿刺)の場合に、脊髄クモ膜下腔の穿刺時に第3と第4腰痛の間または第4と第5腰椎の間に長い中空針を穿刺し、髄液を得る。引き続きこの試料を10分間2000×gで遠心分離し、上澄液をマイナス70℃で貯蔵する。

20

【0071】

実施例2: MAC3-ペプチドの質量分析測定のための脳脊髄液(CSF)中のペプチドの分離

CSF中のMAC3-ペプチドを質量分析により検出するために、この実施例ではペプチド内容物の分離が必要である。この試料の前処理は、本発明によるペプチドを濃縮し、測定に障害となり得る成分を分離するために用いられる。分離方法としては、逆相クロマトグラフィーが実施される。この場合には、多様なRP-クロマトグラフィー樹脂および展開剤が同程度に適している。次に、例えばVydac社の4mm×250mmのサイズのC18逆相クロマトグラフィーカラムを使用してMAC3-ペプチドを分離する。次の組成の展開剤を使用した: 展開剤A: トリフルオロ酢酸0.06%(v/v)、展開剤B: トリフルオロ酢酸0.05%(v/v)、アセトニトリル80%(v/v)。このクロマトグラフィーを33℃でアジレント・テクノロジーズ社(Agilent Technologies)のFlusszell Microを備えたアジレント・テクノロジーズ社(Agilent Technologies)のHP-ChemStation 1100を使用して行った。試料としてヒトの脳脊髄液を使用した。髄液440μlを水で1650μlに希釈し、pHを2~3に調節し、この試料を10分間18000×gで遠心分離し、引き続きこうして準備した試料1500μlをクロマトグラフィーカラムで分離した。このクロマトグラフィー条件は次のようであった: 0分の時点で展開剤B5%、1~45分の時点で展開剤B濃度を50%まで連続的に上昇させる、45~49分の時点で展開剤B濃度を100%まで連続的に上昇させる、引き続き53分の時点まで緩衝液Bを100%で保持する。クロマトグラフィーの開始後10分にそれぞれ0.5mlまでの96のフラクションの採取を開始した。ここに記載した試験条件下で製造した脳脊髄液試料のこのクロマトグラムを図2に示した。

30

40

【0072】

実施例3: MALDI-質量分析を用いたペプチドの質量の測定

質量分析のために、MALDI-TOF-質量分析計(マトリックス支援レーザー脱離-イオン化法)においてペプチドの陽イオンスペクトルをプロットした。適当なMALDI

50

I - T O F - 質量分析計は、フレーミングハムのパーセプティブ・バイオシステムズ社 (PerSeptive Biosystems Framingham) (V o y a g e r - D E , V o y a g e r - D E P R O、またはV o y a g e r - D E S T R) またはブレメンのブルッカー・ダルトニック社 (Bruker Daltonik Bremen) (B I F L E X) により製造した。試料の調製のために、試料を、一般に有機酸からなるマトリックス物質と混合する。ペプチド用に適している典型的なマトリックス物質は、3, 5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸、 - 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 M A C 3 - ペプチドの測定のために、乾燥し、逆相クロマトグラフィーにより得られた当量の相応する 400 μ l のヒト脳脊髄液を使用した。このクロマトグラフィー処理された試料をマトリックス - 溶液 15 μ l 中に溶かした。このマトリックス溶液は、例えばアセトニトリル、水、トリフルオロ酢酸およびアセトンからなる体積比 49 : 49 : 1 : 1 の溶剤混合物中に溶かした - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸 10 g / l および L (-) フコース 10 g / l を有する。この溶液から 0.3 μ l を M A L D I - キャリアプレート上に移し、乾燥した試料をパーセプティブ・バイオシステムズ社 (PerSeptive Biosystems) の M A L D I - 質量分析計 V o y a g e r - D E S T R で分析した。この測定は「D e l a y e d E x t r a c t i o n (登録商標)」を用いて「リニアモード (Linear Mode)」で行った。本発明による M A C 3 - ペプチドの 1 つの測定についての例として、図 3 は M A C 3 - 1 のスペクトルを図示する。ペプチド M A C 3 - 1 に相当するピークは矢印によりマーキングされている。

10

【0073】

M A L D I - T O F - 質量分析は、ペプチド、例えば本発明による M A C 3 - ペプチドの定量化のために、このペプチドが質量分析計の動的測定範囲内にあり、それにより検出器飽和が避けられる濃度で存在する場合に使用することができる。脳脊髄液中の本発明による M A C 3 - ペプチドの測定に対して、マトリックス溶液 1 μ l 当たり 33.3 μ l の髄液当量濃度の場合がこれに該当する。各ペプチドに対して、質量シグナルと濃度との間の特異的な割合が存在し、このことは M A L D I - 質量分析が有利にペプチドの相対的定量化のために使用できることを意味している。この状況は図 5 に示されている。試料を多様な量の異なる標準ペプチドと混ぜる場合に、標準シグナルならびに試料シグナルの強度を測定することができる。例えば図 5 は相対的に定量化する MS 法としての M A L D I - 測定を示す。標準の全てのシグナル強度は、0.64 μ mol の濃度の場合のそのシグナル強度 (= 1) に規格化した。各ペプチドは、シグナル強度と濃度との間で個々の典型的な関係を示し、これについては曲線の上昇によって読み取ることができる。

20

30

【0074】

実施例 4 : M A C 3 - ペプチドの質量分析による同定

本発明による M A C 3 - ペプチドの定量化のために、実施例 2 による脳脊髄液の逆相クロマトグラフィーにより得られたフラクション中のペプチドの分析すべき質量シグナルが実際に本発明による M A C 3 - ペプチドであることが保証されなければならない。そのフラクション中の本発明によるペプチドの同定は n a n o S p r a y - M S / M S で行う [14]。この場合に、質量分析器中の M A C 3 - ペプチド - イオンはその固有の m / z (質量 / 電荷) 値を用いて当業者に公知の方法で質量分析器中で選択される。この選択されたイオンは、引き続き衝突ガス、例えばアルゴンまたは窒素を用いた衝突エネルギーの供給により断片化され、生じた M A C 3 - ペプチドの断片が質量分析器の組み込まれた分析ユニット内で検出され、相応する m / z - 値が決定される (タンデム - 質量分析の原理) [15]。ペプチドのこの断片化挙動は、使用した機器の 50 ppm の質量精度で、前駆体分子の補体 C 3 の配列が登録されている配列データバンク中のコンピュータアシストされた検索方法 [16] を使用して、本発明による M A C 3 - ペプチドの明らかな同定が可能である。分子量が約 16 ダルトン分 (これは酸素原子の質量に相当する) だけプラス方向へシフトすることを考慮して、この方法を用いて酸化したペプチドも同定することができる。それに従って、他の化学的に修飾されたかまたは翻訳後修飾されたペプチドも同定される。特別な場合には、質量分析による分析は、アプライド・バイオシステムズ - サイ

40

50

エクス社 (Applied Biosystems-Sciex)、米国の4極TOFインストルメント (Quadrupole-TOF-Instrument) モデル「QStar-Pulsar」を用いて行った。MAC3-1の例示的なMS/MSフラグメントスペクトルは図4に図示されている。

【0075】

実施例5：対照試料と患者の試料とのMAC3-ペプチドの相対的濃度の比較のための質量スペクトルによるMAC3-ペプチドの定量化

対照試料およびアルツハイマー病を患う患者の試料に対して、実施例1および2による試料準備の後に引き続き、実施例3による本発明によるMAC3-ペプチドのMALDI-質量分析を実施した。例示的なMALDI-シグナル強度は、「箱ひげ図」の形で図6~11に視覚化した。図示した「箱ひげ図」は、対照 (健康な被験者、アルツハイマー病ではない患者) における多様なMAC3-ペプチドの積分したMALDI-質量分析によるシグナル強度と、アルツハイマー病患者の試料中のMALDI-シグナル強度との比較を可能にする。この場合、「箱」、つまり図6~11のグラフ中の角柱部は、それぞれのMALDI-シグナル強度の50%が存在する領域 (第2および第3の4分位値) であり、この「箱」から上方および下方へ伸びている線状部 (「ひげ」) は、それぞれ、最大のシグナル強度を示す測定値の25%が存在する領域 (上方の4分位値) を示すか、もしくは最低のシグナル強度を示す測定値の25%が存在する領域 (下方の4分位値) を示す。角柱部中の実線は中央値を表し、角柱部中の点線は平均値を表す。

10

【参考文献】

【0076】

20

参考文献

1. Beers, M.H., and R. Berkow. 1999. Delirium and dementia. // The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Ed. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, USA. Seite 1389-1400.
2. Beers, M.H., and R. Berkow. 1999. Neurologic approach to the patient. // The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Ed. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, USA. Seite 1345.
3. Engelborghs, S., and P.P. De Deyn. 2001. Biological and genetic markers of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Med Okayama*. 55:55-63.
4. Harrison, R.A., T.C. Farries, F.D. Northrop, P.J. Lachmann, and A.E. Davis. 1988. Structure of C3f, a small peptide specifically released during inactivation of the third component of complement. *Complement*. 5:27-32. 10
5. Devereux, J., P. Haeberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res*. 12:387-95.
6. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-10.
7. Needleman, S.B., and C.D. Wunsch. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*. 48:443-53.
8. Henikoff, S., and J.G. Henikoff. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:10915-9. 20
9. Garavelli, J.S., Z. Hou, N. Pattabiraman, and R.M. Stephens. 2001. The RESID Database of protein structure modifications and the NRL-3D Sequence-Structure Database. *Nucleic Acids Res*. 29:199-201.
10. Beers, M.H., and R. Berkow. 1999. Biology of the immune system. // The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Ed. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, USA. Seite 1002-1023.
11. Ganu, V.S., H.J. Muller-Eberhard, and T.E. Hugli. 1989. Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: the heptadeca-peptide C3f was synthesized and characterized. *Mol Immunol*. 26:939-48. 30
12. Yasojima, K., C. Schwab, E.G. McGeer, and P.L. McGeer. 1999. Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*. 154:927-36.
13. Eikelenboom, P., and F.C. Stam. 1982. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*. 57:239-42.
14. Wilm, M., and M. Mann. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem*. 68:1-8.
15. Papayannopoulos, I.A. 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev*. 49-73. 40
16. 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.

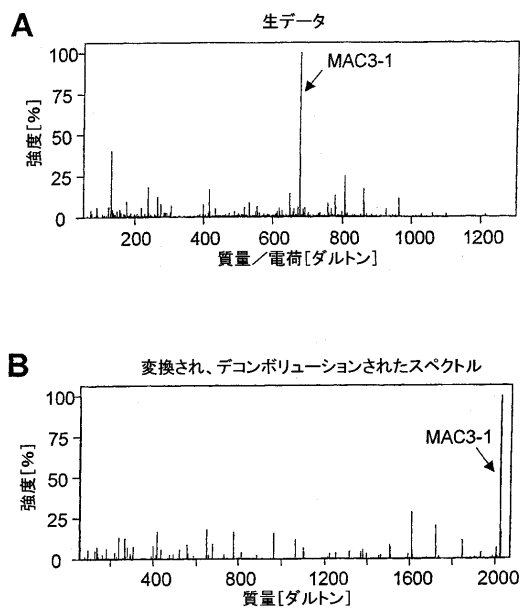
【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 7 】

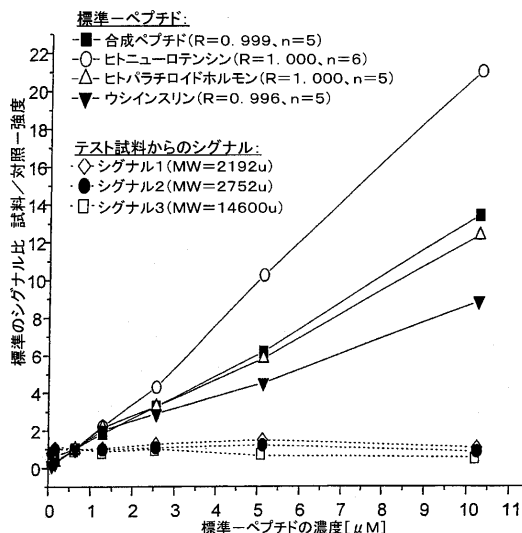
【 図 1 】 同定された M A C 3 - ペプチドの位置を示す補体 C 3 タンパク質の概略図。

50

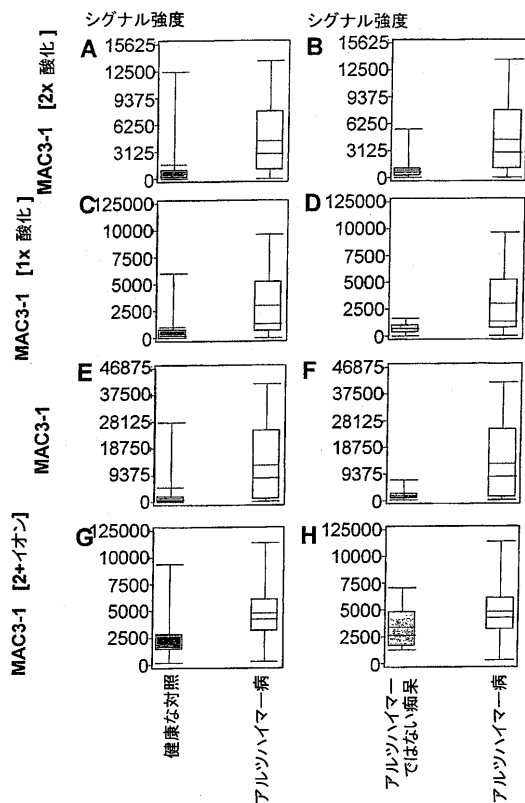
【 図 4 】



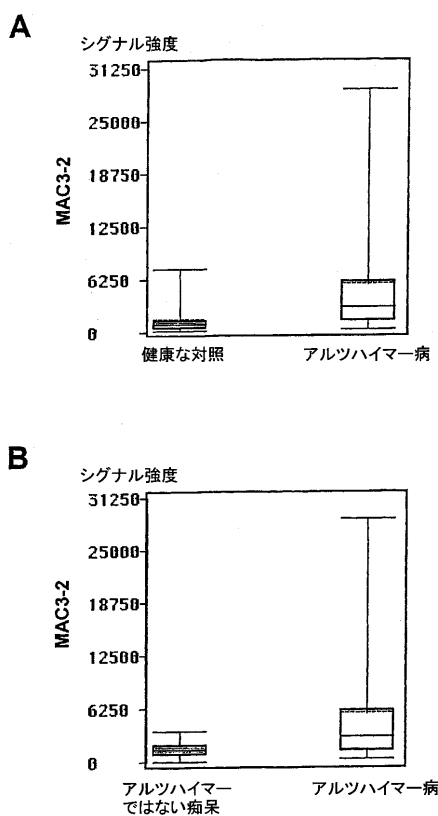
【 図 5 】



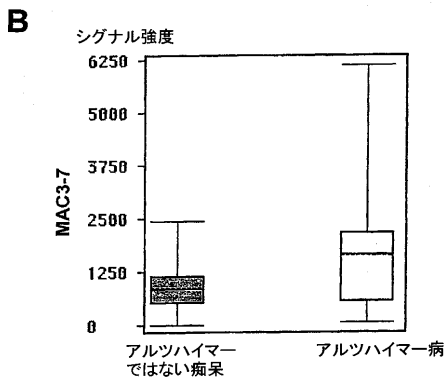
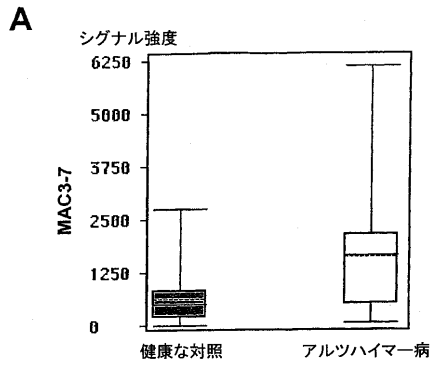
【 図 6 】



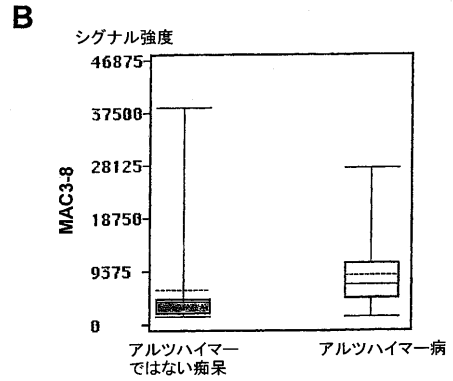
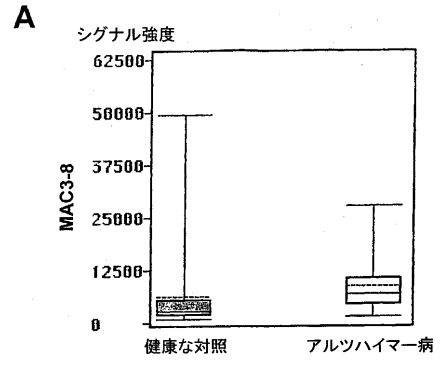
【 図 7 】



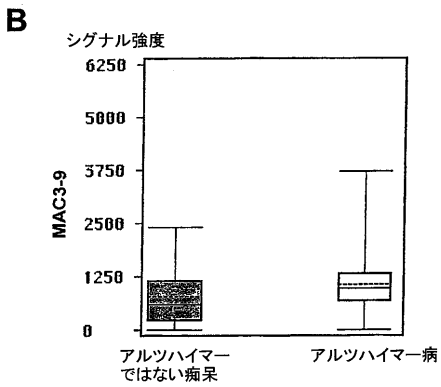
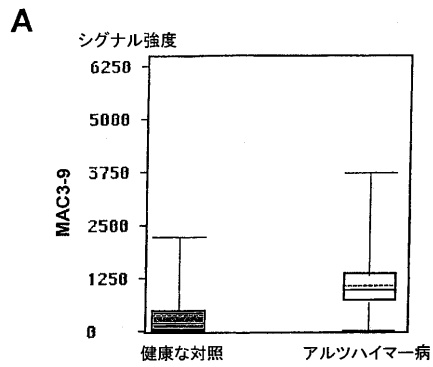
【 図 8 】



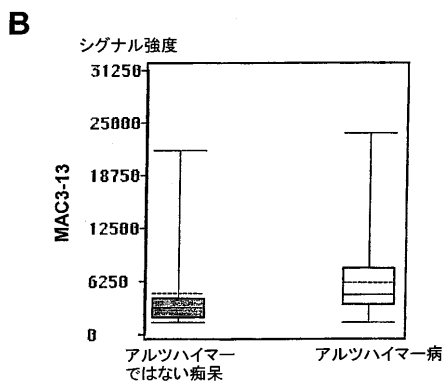
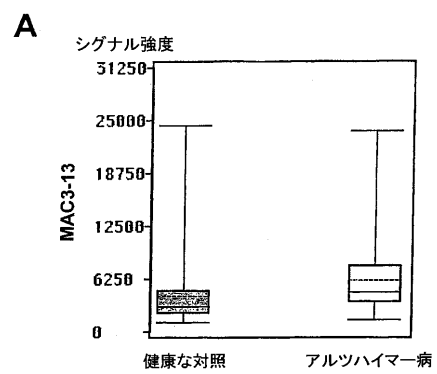
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【配列表】

2005511063000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DE 02/04360
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C07K16/00 C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02 088174 A (SYN X PHARMA INC) 7 November 2002 (2002-11-07) Seq Id No 1, Ansprüche 1, 2, 10 - 14, 17 - 22, 29 - 32, S. 18, Zeilen 3 - 31 ---	8-17
P,X	WO 02 088711 A (SYN X PHARMA INC) 7 November 2002 (2002-11-07) Seq Id No 1, Ansprüche 1, 2, 10 - 14, 17 - 22, 29 - 32, S. 17, Zeilen 3 - 31 ---	8-17
P,X	WO 02 088729 A (SYN X PHARMA INC) 7 November 2002 (2002-11-07) Seq Id No 1, Ansprüche 1, 2, 10 - 14, 17 - 22, 29 - 32, S. 17, Zeilen 3 - 31 ---	8-17
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 21 October 2003		Date of mailing of the international search report 10/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5318 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoesel, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/DE 02/04360

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GANU V S ET AL: "FACTOR C3F IS A SPASMOGENIC FRAGMENT RELEASED FROM C3B BY FACTORS I AND H THE HEPTADECAPA-PEPTIDE C3F WAS SYNTHESIZED AND CHARACTERIZED" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 26, no. 10, 1989, pages 939-948, XP009019520 ISSN: 0161-5890 Zusammenfassung, S. 940, Sp. 1, Zeile 8 - S. 942, Sp. 2, Zeile 41 page 20	8-17
X	AKIYAMA HARUHIKO ET AL: "Inflammation and Alzheimer's disease" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 21, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 383-421, XP002244292 ISSN: 0197-4580 Zusammenfassung, S. 384 - S. 387, Punkte 2.1 - 2.1.3 und 2.1.6, S. 40, Punkt 5	1-7
P,A	WYSS-CORAY TONY ET AL: "Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 16, 6 August 2002 (2002-08-06), pages 10837-10842, XP002258596 August 6, 2002 ISSN: 0027-8424 abstract	10,14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 02/04360

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 02088174	A	07-11-2002	US	2002161182 A1	31-10-2002
			WO	02088174 A2	07-11-2002
WO 02088711	A	07-11-2002	US	2002161181 A1	31-10-2002
			WO	02088711 A2	07-11-2002
WO 02088729	A	07-11-2002	US	2002160529 A1	31-10-2002
			WO	02088729 A2	07-11-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/04360

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 C07K16/00 C07K14/47		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 02 088174 A (SYN X PHARMA INC) 7. November 2002 (2002-11-07) Seq Id No 1, Ansprüche 1, 2, 10 - 14, 17 - 22, 29 - 32, S. 18, Zeilen 3 - 31 ---	8-17
P, X	WO 02 088711 A (SYN X PHARMA INC) 7. November 2002 (2002-11-07) Seq Id No 1, Ansprüche 1, 2, 10 - 14, 17 - 22, 29 - 32, S. 17, Zeilen 3 - 31 ---	8-17
P, X	WO 02 088729 A (SYN X PHARMA INC) 7. November 2002 (2002-11-07) Seq Id No 1, Ansprüche 1, 2, 10 - 14, 17 - 22, 29 - 32, S. 17, Zeilen 3 - 31 ---	8-17
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegebe ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 21. Oktober 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 10/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Hoesel, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/04360

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>GANU V S ET AL: "FACTOR C3F IS A SPASMOGENIC FRAGMENT RELEASED FROM C3B BY FACTORS I AND H THE HEPTADECAPA-PEPTIDE C3F WAS SYNTHESIZED AND CHARACTERIZED"</p> <p>MOLECULAR IMMUNOLOGY, Bd. 26, Nr. 10, 1989, Seiten 939-948, XPO09019520 ISSN: 0161-5890 Zusammenfassung, S. 940, Sp. 1, Zeile 8 - S. 942, Sp. 2, Zeile 41 Seite 20</p> <p style="text-align: center;">---</p>	8-17
X	<p>AKIYAMA HARUHIKO ET AL: "Inflammation and Alzheimer's disease"</p> <p>NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, Bd. 21, Nr. 3, Mai 2000 (2000-05), Seiten 383-421, XPO02244292 ISSN: 0197-4580 Zusammenfassung, S. 384 - S. 387, Punkte 2.1 - 2.1.3 und 2.1.6, S. 40, Punkt 5</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-7
P,A	<p>WYSS-CORAY TONY ET AL: "Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 16, 6. August 2002 (2002-08-06), Seiten 10837-10842, XPO02258596 August 6, 2002 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	10,14,15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/04360

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02088174 A	07-11-2002	US 2002161182 A1 WO 02088174 A2	31-10-2002 07-11-2002
WO 02088711 A	07-11-2002	US 2002161181 A1 WO 02088711 A2	31-10-2002 07-11-2002
WO 02088729 A	07-11-2002	US 2002160529 A1 WO 02088729 A2	31-10-2002 07-11-2002

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 H 0 4 5
A 6 1 P 25/28	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 7/08	

(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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, 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 ラムピング、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 ズヒト、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 - エシエルテ - シュトラッセ 6

(72) 発明者 セツレ、ハルトムト

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

(72) 発明者 ユルゲンス、ミヒャエル

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 6 2 9 ハノーバー、ビリ - ブルメ - アレー 2 0

(72) 発明者 ハイネ、ガブリエレ

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 6 2 9 ハノーバー、ビリ - ブルメ - アレー 2 0

(72) 発明者 ヘス、リュディガー

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

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA12 FA10 HA12 HA15

4B063 QA19 QQ53 QQ79 QR55 QS12 QS34

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA18 BA23 CA17

MA01 NA14 ZA162

4C085 AA13 CC32 DD88 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA16

4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 BA17 CA40 DA86 EA20 EA21 EA50

专利名称(译)	检测阿尔茨海默病的方法和区分阿尔茨海默病与其他痴呆疾病的方法，相关肽及其用途		
公开(公告)号	JP2005511063A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003549919	申请日	2002-11-27
[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	ラムピングノルベルト ズヒトハンスディーター セツレハルトムト ユルゲンスミヒャエル ハイネガブリエレ ヘスリュディガー		
发明人	ラムピング、ノルベルト ズヒト、ハンス-ディーター セツレ、ハルトムト ユルゲンス、ミヒャエル ハイネ、ガブリエレ ヘス、リュディガー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/68 G01N30/88 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 C07K14/472 G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 C07K14/47 C12Q1/68.A G01N30/88.J G01N33/53.D A61K37/02 C07K7/06 C07K7/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA12 4B024/FA10 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QS12 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C085/AA13 4C085/CC32 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA16 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA50		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	10158180 2001-11-28 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在健康或患有其他痴呆疾病的对照组的患者中，与阿尔茨海默氏病患者的体液中所确定的肽及其定量测定有关的浓度。本发明的肽源自具有相应基因的补体C3蛋白前体的C3f片段，并以特定方式被修饰，并且任选地被翻译后或化学修饰。当与对照组相比时，患者中所述肽的浓度以对每种肽特异的方式发生改变。相对于健康人而言，所述肽的浓度相对于其浓度的特异性和显著的改变表明了关于阿尔茨海默氏病的分化。本发明还涉及所述肽作为进展控制以及在诊断和治疗剂开发中的用途。

