

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5607094号
(P5607094)

(45) 発行日 平成26年10月15日(2014.10.15)

(24) 登録日 平成26年9月5日(2014.9.5)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		D
GO 1 N 33/532	(2006.01)	GO 1 N 33/532		B

請求項の数 10 外国語出願 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2012-55452 (P2012-55452)	(73) 特許権者	506352201
(22) 出願日	平成24年3月13日 (2012.3.13)		スフィンゴテック・ゲーエムペーハー
(62) 分割の表示	特願2007-508840 (P2007-508840) の分割		ドイツ・16556・ボルグスドルフ・ト ウルベンヴェーク・6
原出願日	平成17年4月20日 (2005.4.20)	(74) 代理人	100108453
(65) 公開番号	特開2012-112978 (P2012-112978A)		弁理士 村山 靖彦
(43) 公開日	平成24年6月14日 (2012.6.14)	(74) 代理人	100064908
審査請求日	平成24年4月12日 (2012.4.12)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	04009284.3	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成16年4月20日 (2004.4.20)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(72) 発明者	アンドレアス・ベルグマン
			ドイツ・12351・ベルリン・パウムロ イフェルヴェーク・47

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医療診断におけるタキキニンの前駆体および／またはその断片の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロタキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片、その前駆体、または前記の組み合わせを検出することを含む、疾患を検出するために、プロタキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片、その前駆体、または前記の組み合わせの存在または濃度を測定する方法であって、

前記成分の存在または濃度をex vivo体液サンプル中で測定し、

前記検出を、プロタキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10) もしくはその断片に特異的に結合する少なくとも1つの抗体またはその組み合わせを用いて実施し、

前記疾患が、アルツハイマー病、髄膜炎、敗血症、頭蓋大脳外傷、脳梗塞、肺炎、冠状動脈性心臓病、局所感染および癌からなる群から選択される、方法。

【請求項2】

配列番号1、2、5または8から選択されるスプライシングバリエント、または、2つもしくは複数のバリエントの混合物を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

配列番号3、4、6、7、9または10の1つまたは複数から選択される断片を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

更なるアミノ酸もしくは変更したアミノ酸、または免疫応答性を誘導するのに適した断片/成分、またはその配列を特定の抗体による検出のために適するようにする断片/成分を

10

20

含むプロタキキニンの誘導体を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

プロタキキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片、その前駆体、もしくは前記の組合せを検出するのに適したマーカー、またはプロタキキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片、その前駆体、もしくは前記の組合せに特異的に結合する化合物と組み合わせて実施する、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

ヒト個体または動物個体に由来する、血液、血漿および髄液を含む群から選択されるex vivo体液のサンプルにおける、プロタキキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片、その前駆体、または前記の組み合わせの濃度を測定することを含む、請求項1から5

10

【請求項7】

少なくとも1つの抗体が、検出可能なマーカーで標識されている、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

マーカーが発光マーカーである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

ex vivo体液における、プロタキキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片、その前駆体、または前記の組み合わせの濃度の測定を介して疾患を診断するためのキットであって、

20

前記疾患が、アルツハイマー病、髄膜炎、敗血症、頭蓋大脳外傷、脳梗塞、肺炎、冠状動脈性心臓病、局所感染および癌からなる群から選択され、

プロタキキニン1-37 (A-ペプチド：配列番号10)、その断片もしくは前記の組合せに特異的に結合する抗体またはその組み合わせを含む、キット。

【請求項10】

体液が、血液、血漿または髄液を含む群から選択される、請求項9に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療診断における、プロタキキニンおよび/またはその断片および/またはそのスプライシングバリエーションの使用に関し、前記断片が、プロタキキニンおよび/またはそれらの組み合わせを含む。以下の本明細書においては、全てのこれらの分子、断片、それらの組み合わせ等は、例えばプレプロタキキニンおよびアミノ酸配列番号1-10を含むプロタキキニンと称する。

30

【0002】

プロタキキニンは、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病および/または痛みの状態を含む中枢神経系の病気/疾患、神経疾患、内分泌疾患、大脳疾患、筋肉疾患、局所性疾患、全身性疾患、慢性疾患、炎症性疾患、細菌感染症およびウイルス感染症を含む感染疾患、髄膜炎、敗血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、鎌状赤血球貧血、虚血、筋萎縮性側索硬化症、リウマチ性関節炎を含む関節炎、気管支炎、痛覚過敏症、喘息、細菌中毒を含む中毒、免疫疾患、頭蓋大脳外傷を含む多発性/外傷、腫瘍/癌、脳梗塞、ストレス、アトピー性皮膚炎、HIV、ハンチントン病、熱傷、繊維筋痛症、統合失調症、ヒルシュスブルグ病、アレルギー、家族性自律神経失調症（ライリー・デイ症候群）、造血障害、膠芽細胞腫および星細胞腫を含むグリオーマ、血液脳関門疾患を含む様々な病気を診断するのに使用することができる。

40

【0003】

本発明の用語プロタキキニンは、また、プロタキキニンまたは前記の意味でのPTKの断片に対して、少なくとも75%の相同性、好ましくは少なくとも80%の相同性、より好ましくは少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列を含む。

【0004】

50

本発明は、更には、プロタキニンおよび/またはその断片および/またはそのスプライシングバリエーションに対する抗体、ならびに、そのようなコンポーネントを含むキットに関する。

【背景技術】

【0005】

1931年に、11個のペプチドからなるサブスタンスPが、Von EulerおよびGraddum (Von Euler and Gaddum, 1931) によって単離された。その粉末状のコンシステンシーにより、サブスタンスPと名付けられた (Gaddum and Schild, 1931)。サブスタンスP (SP) は、ニューロキニンA (NKA)、ニューロペプチドK (NPK) およびニューロペプチド (NP) のような、他のタキキニンの遺伝子配列も含むプレプロタキニンA-遺伝子 (PPT-A) によってコードされている (Carter and Krause, 1990)。ニューロキニンBは、PPT II または PPT-B 遺伝子によってコードされている。サブスタンスPは、中枢神経系 (CNS) だけでなく末梢神経系 (PNS) でも発現している (Otsuka and Yoshioka, 1993)。

10

【0006】

タキキニンは、様々な機能を有している。タキキニンは、血管拡張特性を有し、消化管および尿生殖路だけでなく、気管支においても、平滑筋の収縮および弛緩を担っている。更にその上、タキキニンは、損傷または痛み状態によって引き起こされる防御の反射において主要な役割を果たしている。これらには、例えば、心臓血管の緊張の増加、血管拡張およびNO-生合成の誘導がある。サブスタンスPは、異なる炎症細胞に影響を与え、痛みを伝達するための神経伝達物質として働き、血管形成の調整機能を有する。非-サブスタンスP-タキキニンである、ニューロキニンA、ニューロペプチド およびニューロペプチドKは、エンドクリン機能の調節因子として機能するようである。

20

【0007】

体液におけるサブスタンスPのレベルは、幾つかの病気において変化する。敗血症患者の血漿においては、サブスタンスP濃度の顕著な増加が、リウマチ性関節炎の患者の血漿および滑液のように見出された (Joyce, Yood and Carraway, 1993)。

【0008】

サブスタンスPは、また、クローン病および潰瘍性大腸炎のような、炎症性消化管疾患においても機能するようである。

【0009】

サブスタンスPのm-RNA発現は、HIV-感染マクロファージにおいて顕著に増大し、このことは、HIV感染におけるタキキニンの効果を示す。

30

【0010】

アルツハイマー患者 (遅発性) および筋萎縮性側索硬化症の患者の髄液においては、サブスタンスPの顕著な増加が観察される。

【0011】

パーキンソン病において、被殻でのドーパミンの減少程度に依存した淡蒼球内節のサブスタンスPの低下または増加が、観察された。

【0012】

遺伝的に引き継ぐ神経変性疾患である、ハンチントン病の患者は、脳において、プレプロタキニンを含むニューロンの選択的な低下が示された。

40

【0013】

脳虚血 (血流の一過的な阻害および脳梗塞) の患者の血清においては、サブスタンスPの濃度の顕著な増加を求めることができた。

【0014】

カルチノイド腫瘍を有する患者は、循環血液におけるサブスタンスPおよびニューロキニンAの濃度増加だけでなく、尿におけるタキキニン様代謝産物の免疫反応性の顕著な増加が示された。サブスタンスPおよびニューロキニンAは、また、他の疾患である偏頭痛において、グリオーマの発達において、機能を有するようであり、気管支における分泌および気管支の循環に強い影響を与える。このことは、サブスタンスPおよびニューロキニンA

50

が、喘息におけるメディエーターとしての役割を有するかもしれないことを示唆するものである。

【 0 0 1 5 】

慢性的気管支炎に罹患した喫煙者においては、肺上皮細胞のPPA-A-mRNA濃度が10倍増加することを見出すことができた。

【 0 0 1 6 】

繊維筋痛症およびうつ病においては、血清および髄液中のサブスタンスP濃度が増加し、鎌状赤血球貧血の患者の血清でもサブスタンスP濃度が、特に痛みの期間に、増加した。

【 0 0 1 7 】

サブスタンスPの増加した濃度を、病気の重篤度と相関するアトピー性皮膚炎の患者で測定する。

【 0 0 1 8 】

サブスタンスPおよびニューロキニンAのようなタキキニンは、炎症性サイトカイン応答の調節機能を有する。

【 0 0 1 9 】

タキキニンの生合成は、プレプロホルモンとして開始される。生合成の間に、シグナルペプチドと呼ばれる疎水性のN末端配列の分離、および、小胞体のルーメンでのタンパク質のホールディングに続き、プロペプチドが、ゴルジ体の小胞へと移動し、細胞膜へと輸送される。輸送の間に、プロペプチドは、通常的二塩基性のアミノ酸配列で、プロホルモン-転換酵素により、成熟ホルモンへとプロセッシングを受ける。異なる刺激を介して、ペプチドは、細胞外空間またはプラズマへと分泌される。成熟ペプチドは、タンパク質分解による分泌後に、迅速に不活性化される。サブスタンスPおよびニューロキニンAは、*in vivo*で、2分未満という極端に低い血中半減期を有する。ニューロペプチドKは、血漿において、0.9分の半減期（ニューロペプチド への分解）および6分の半減期（更なる分解）という二相性の分解を示す。

タキキニンであるサブスタンスP、ニューロキニンA、ニューロペプチドKおよびニューロペプチド は、プレプロタキキニンA-遺伝子（PPT-A）によってコードされている。PPT-A遺伝子転写産物の選択的なスプライシングにより、4つの異なるmRNA分子： PPT-A、PPT-A、 PPT-Aおよび PPT-Aがもたらされる。4つの全てのmRNA分子は、サブスタンスPの配列を含む。 PPT-A mRNAのみが、PPTA-遺伝子の7つの全てのエキソン、すなわち、4つの全てのタキキニンを含む。エキソン6は、 PPT-A mRNAでは欠如しており、エキソン4および6は、 PPT-A mRNAでは欠如している。それゆえ、これら2つのタイプのmRNAのみが、サブスタンスPの完全な配列をコードしている。エキソン4は、 PPT-A mRNAでは欠如しており、それ故、ニューロペプチドKは、このmRNAから転写されることはできない。4つの全てのスプライシングバリエーションによるサブスタンスPの産生により、PPT-A遺伝子が発現する場合、サブスタンスPも産生することが示唆される。 PPT-A mRNAの発現は、大部分は脳で生じるのに対して、 PPT-Aおよび PPT-A mRNA分子は、大部分は抹消組織で発現する。

【 0 0 2 0 】

PTK-A断片1-37は、本発明において中心的な役割を果たし、本明細書においてはA-ペプチドと称する。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 2 1 】

【 非特許文献 1 】 DANDONA P., NIX D., WILSON M.V., ALJADA A., LOVE J., ASSICOT M., BOHUON C., (1994), Procalcitonon increase after endotoxin infection in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79: 1605-1608

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

10

20

30

40

50

【0022】

サブスタンスPおよび他のタキキニンは、異なる体液、組織および他の生体材料で検出することができる。

【0023】

しかしながら、血液中でのタキキニンの短い半減期は、今までのところ、タキキニン（特に、サブスタンスP）の通常の診断での使用を妨げてきた。タキキニンの短い半減期が原因で、診断の際に、タキキニン分解が問題となるレベルに達する前に、サンプルを摂取すること、血漿を得ること、サンプルを研究室へ運び込むこと、および、必要なテストを含む研究室での診断を実施することは不可能である。

【0024】

それゆえ、サブスタンスPのようなタキキニンのin vivoでの低い安定性が原因で、バイオマーカーとしての使用は、最適なサンプルロジスティック下でさえ、極端に制限される。なぜならば、ペプチドの分解の影響により、極端に、生合成およびタキキニン遊離の影響が希薄化するからである。

【0025】

本発明の目的は、タキキニンの欠点である半減期を克服し、体液、組織および他の生体材料におけるタキキニンの検出および測定のための方法、使用およびキットを開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0026】

この目的は、プロタキキニンが、体液、組織および他の生体材料におけるタキキニン、特にサブスタンスPの測定のためのツールとして使用することができるという驚くべき知見によって達成された。プロタキキニンの存在は、異なる体液/組織または生体材料において、サブスタンスPのような成熟タキキニンの存在と相関している。

【0027】

更にその上、プロタキキニン、そのスプライシングバリエーション、断片および/または組み合わせの安定性は、ex vivoにおいて、驚くほど高く、その安定性により、プロタキキニンは完全に一般的な目的に適する。

【0028】

同じことは、サブスタンスP、ニューロキニンAおよびニューロペプチドKのin vivoでの半減期よりも顕著に高いプロタキキニンのin vivoでの半減期にも当てはまり、このことにより、プロタキキニンは、サブスタンスP/プロタキキニン濃度および遊離速度の検出で使用するのに適する。

【0029】

本発明のプロタキキニンと成熟ペプチドの間との関係により、サブスタンスP、ニューロキニンA、ニューロペプチドKおよびニューロペプチドのような成熟タンパク質が関与する全ての病気および/または疾患についての診断ツールとして、プロタキキニンは適する。

【0030】

それゆえ、プロタキキニンは、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病および/または痛みを含む中枢神経系の病気、局所性疾患、全身性疾患、慢性疾患、炎症性疾患、細菌感染症およびウイルス感染症を含む感染疾患、敗血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、髄膜炎、鎌状赤血球貧血、虚血、筋萎縮性側索硬化症、関節炎、リウマチ性関節炎、気管支炎、痛覚過敏症、喘息、細菌中毒を含む中毒、免疫疾患、頭蓋大脳外傷、腫瘍、脳梗塞、ストレス、アトピー性皮膚炎、HIV、ハンチントン病、熱傷、繊維筋痛症、統合失調症、ヒルシュスプルング病、アレルギー、家族性自律神経失調症（ライリー・デイ症候群）、造血障害、膠芽細胞腫および星細胞腫を含むグリオーマを含む様々な病気を診断するのに使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

10

20

30

40

50

更にその上、本発明は、1つの実施態様においては、成熟タンパク質が関与する病気/疾患を含む前記した病気/疾患のための早期診断、病気の重篤度の診断、治療単位の調節および予後のための、前記したプロタキキニンの使用に関する。

【0032】

臨床データは、病気/疾患の測定を支持するために、追加的に考慮することができる。

【0033】

本発明は、更なる実施態様においては、プロタキキニンおよびその断片の産生に関する。更に、本発明によるプロタキキニンと少なくとも75%の相同性を、好ましくは少なくとも80%の相同性を、より好ましくは少なくとも90%の相同性を示すアミノ酸配列を使用することができる。

10

【0034】

本発明による合成ペプチドを使用して抗原を産生し、動物へと注入して、プロタキキニンに対する抗体を産生することができる。当業者によって既知の異なる方法を、本目的を達成するのに使用することができる。好ましい実施態様においては、Limulus polyphemusに由来するヘモシアニンを、ウサギの免疫のために使用した。

【0035】

本発明の好ましい実施態様においては、プロタキキニンの10個のアミノ酸配列（配列番号1-10）を合成し、より好ましくは、プロタキキニンAの異なる4つのペプチド配列（PSP1からPSP4、図4a参照）を合成した：ペプチドPSP1およびPSP2は、A-ペプチドの配列を含む。PSP3は、活性なニューロペプチドK(NPK)の配列の最初の部分を含み、PSP4は、また、NP Kだけでなくニューロペプチド（NP）の配列の部分、および、ニューロキニンA(NKA)の完全な配列を含む。アミノ末端のシステイン残基を、それぞれのペプチドに付加した。ペプチドは、Limulus polyphemusに由来するヘモシアニンにコンジュゲートし、既知の方法に従って、PSP1-PSP4に対する抗体をウサギで産生させた。

20

【0036】

抗体は、既知の方法により精製され、本発明の好ましい実施態様においては、本発明の精製は、好ましくはリガンド特異的アフィニティクロマトグラフィー（Pierceの方法に従って、アミノ末端システイン残基を介して、Pierce(Boston, USA)のSul-foLink-Gelへペプチドをカップリングすることによる）によって達成される。

【0037】

好ましい実施態様においては、抗体は、マーカを用いて標識し、検出可能とすることができる。使用されるマーカは、好ましくは、発光マーカであり、より更に好ましい実施態様においては、PSP1に対する抗体は、発光マーカを用いて標識した。

30

【0038】

より更に好ましい実施態様における発明には、体液、組織または他の生体材料におけるプロタキキニンの検出のための産生抗体の使用、および、プロタキキニンを特異的に検出する抗体を特定量含むキットを含む。

【0039】

それぞれの分子への抗体の結合を検出する方法は、また、当業者に知られている。本発明の1つの実施態様においては、標的（プロタキキニンを含む）への抗体の結合は、発光による検出である。

40

【0040】

本発明の好ましい実施態様には、PSP1からPSP4に対して産生した抗体の使用を開示する：異なる抗体の組み合わせ（表1）を、コントロール個体、アルツハイマー病の患者および敗血症の患者の血漿および髄液におけるプロタキキニンの検出のために使用した。抗体により検出されるプロタキキニン-断片を表1に示す。

【0041】

本発明により、更に、体液、組織および他の生体材料におけるプロタキキニンの存在および安定性、ならびに、健康なコントロールおよび様々な病気の患者でのプロタキキニン濃度の差異の測定が可能となる。

50

【0042】

1つの実施態様においては、本発明は、血漿における、プロタキキニンの発見された長期間のex vivo安定性に基づく(図2)。血漿においては、プロタキキニンは、驚くべきことに、24時間を超える半減期を有する。より少ないペプチダーゼしかCSF (cerebro-spinal fluid: 脳脊髄液) に存在しないので、プロタキキニンは、血漿よりもCSF中でより更に安定であると予測される。

【0043】

本発明の更なる実施態様では、PTK/A-ペプチドのin vivoでの半減期が、サブスタンスP(1-2分)、ニューロキニンA(<2分)およびニューロペプチドK(6分)と比較して、驚くべきことに、60分を超えることが見出された(図3)。

10

【0044】

それゆえ、プロタキキニンは、診断目的のためには、サブスタンスPの様な成熟タンパク質よりも、より安定である。

【0045】

本発明は、更に、体液、組織または他の生体材料、特に血液および髄液中での、病気/疾患の状態におけるサブスタンスPの様な成熟タキキニンとプロタキキニンとの相関関係を使用する。

【0046】

本発明の1つの実施態様においては、コントロール血漿、敗血症/血漿、アルツハイマー病/血漿、および健康なコントロールの髄液における、表1の3つの抗体組み合わせとの、プロタキキニンの免疫反応性レベルを示す(実施例4も参照せよ)。血漿におけるプロタキキニンレベルの増加は、健康なコントロール個体の血漿と比較して、病気の患者において観察された(抗体組み合わせI、黒い棒グラフ)(図5)。抗体組み合わせIは、A-ペプチド(断片1-37)、ならびに、A-ペプチドを含むペプチド(4つ全てのスプライシングバリエーション(PPT-A、PPT-A、PPT-AおよびPPT-A)に存在する)を検出した。抗体組み合わせIIは、スプライシングバリエーションPPT-AおよびPPT-Aのみ検出し、組み合わせIIIは、PPT-AおよびPPT-Aのみ検出した。抗体組み合わせIを使用すると、敗血症およびアルツハイマー病の患者の血漿におけるA-ペプチド濃度が顕著に、それぞれ2倍および12倍増加した(図5参照)。抗体組み合わせIIおよびIIIは、また、アルツハイマー病の患者の血漿におけるプロタキキニンレベルの2.5倍増加を示し、敗血症の患者の血漿においては約2.8倍の増加を示した。健康なコントロールの髄液においては(図5の最も右の棒グラフ)、抗体組み合わせIはシグナルを示し、抗体組み合わせIIおよびIIIは、顕著なシグナルを示さなかった。

20

30

【0047】

これらの結果は、アルツハイマー病、敗血症、脳梗塞、脳虚血、感染、痛みの兆候、肺病および腫瘍におけるサブスタンスPの結果と一致する。

【0048】

本発明は、健康なコントロール個体および病気のヒトの体液、組織および他の生体材料におけるプロタキキニンのレベルを開示する。

【0049】

好ましい実施態様においては、本発明は、健康な個体の血漿における、A-ペプチド濃度の分布を開示する(図7)。90%は、35pg/mlより低い免疫応答性を示し、中央値は13.3pg/mlであった。

40

【0050】

本発明は、更に、病気または疾患における、好ましくは、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病および/または痛みの状態を含む中枢神経系の病気、局所性疾患、全身性疾患、慢性疾患、炎症性疾患、細菌感染症およびウイルス感染症を含む感染疾患、髄膜炎、敗血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、鎌状赤血球貧血、虚血、筋萎縮性側索硬化症、リウマチ性関節炎を含む関節炎、気管支炎、痛覚過敏症、喘息、細菌中毒を含む中毒、免疫疾患、頭蓋大脳外傷を含む多発性/外傷、腫瘍、脳梗塞、ストレス、アトピー性皮膚炎、H

50

IV、ハンチントン病、熱傷、繊維筋痛症、統合失調症、ヒルシユスブルグ病、アレルギー、家族性自律神経失調症（ライリー・デイ症候群）、造血障害、膠芽細胞腫および星細胞腫を含むグリオーマ、血液脳関門疾患を含む病気または疾患における、体液、組織および他の生体材料中でのプロタキニン濃度の顕著な変化を開示する。

【0051】

本発明の好ましい実施態様は、サブスタンスPの結果と一致した、年齢が同じ健康なコントロール個体と比較した場合の、アルツハイマー病の患者におけるA-ペプチドの顕著な2倍もの増加という驚くべき知見に基づく。本発明の対応する実施態様は、プロタキニン、その前駆体または断片、特にA-ペプチドに特異的な抗体を用いた、身体のサンプル、特に血液、血漿または髄液をテストするためのキットおよび診断方法に属する。

10

【0052】

本発明の更なる好ましい実施態様は、肺炎、局部感染（膿瘍）、敗血症、外傷および多発性外傷、および様々な腫瘍（図10）、中毒、全身性炎症（図11）、ならびに血液脳関門の機能（図9）における免疫反応性を含む、A-ペプチドの顕著な増加を開示する。健康な個体の髄液には、ml当たり150から450 μ gのタンパク質が含まれ、そのタンパク質の83%は血清で合成され、17%のみが脳で合成される。プロスタグランジン-D-シクターゼは、これまでに測定したところ33という、血清に対する髄液の最も高い比率を示す。好ましい実施態様では、驚くべきことに、A-ペプチド免疫反応性について、髄液に対する血清の比率が80を超え、驚くべきことに他のタンパク質よりも顕著に高いことが示された。A-ペプチドの濃度が、血漿中よりも髄液で高いので、血漿でのA-ペプチドの増加は、血液脳関門の機能の損傷または損失を示す：髄液は、血漿へと出て行き、血漿でのプロタキニン濃度の増加をもたらす。A-ペプチドまたはA-ペプチド免疫反応性の測定は、それゆえ、血液脳関門の機能のための有力な血漿マーカーである。

20

【0053】

それゆえ、本発明は、また、プロタキニンに対する抗体を用いた、または、使用した、前記で示した病気/疾患のためのキットおよび診断方法を提供する。

【0054】

本発明は、病気の検出、進行制御および予後のための、プロタキニンおよび/または抗体の使用を開示する。

本発明の好ましい実施態様は、図9における髄膜炎、頭蓋大脳外傷および脳梗塞のような病気の進行の間において（回復または転帰まで）、血液中のA-ペプチド濃度を測定することである。病気の状態においては、患者は、A-ペプチドの顕著な増加レベル（35pg/mlを超える）を示し、このレベルは、回復の間は減少するが、脳梗塞の患者の転帰までは顕著に常に増加する。

30

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1は、in vivoでのニューロペプチドの生合成を示す。

【図2】図2は、プロタキニン-断片のex vivo安定性を示す（EDTA-血漿）。室温でのプロタキニンの半減期は、24時間を超える。

【図3】図3は、エンドトキシン適用後の、プロタキニン-断片のin vivoでの測定を示す。PTK/A-ペプチドの半減期は、in vivoで60分を超える。

40

【図4A】図4Aは、-PPT-A（AS 1-92、配列番号1）のスプライシングバリエーションを示す。

【図4B】図4Bは、-PPT-A（AS 1-110、配列番号2）のスプライシングバリエーションを示す。

【図4C】図4Cは、-PPT-A（AS 1-95、配列番号5）のスプライシングバリエーションを示す。

【図4D】図4Dは、-PPT-A（AS 1-77、配列番号8）のスプライシングバリエーションを示す。

【図5】図5は、健康なコントロール個体、敗血症患者、アルツハイマー病患者の血漿、

50

および健康なコントロールの髄液における、抗体組み合わせI-IIIの免疫反応性を示す。

【図6】図6は、A-ペプチド濃度(pg/ml)に依存した発光(相対的な発光単位)の標準曲線を示す。

【図7】図7は、健康なコントロール個体の血漿におけるA-ペプチドの分布グラフを示す。

【図8】図8は、アルツハイマー病患者および認知症でない歳を合わせたコントロールの血漿におけるA-ペプチド濃度を示す。

【図9】図9は、脳疾患を有する患者の経緯を示し、病院への入院から14日までの、または転帰までの、脳梗塞(回復または転帰)、髄膜炎、頭蓋大脳外傷におけるA-ペプチドの濃度を示す。

【図10】図10は、異なる病気:肺炎、局所感染(膿瘍)、敗血症、冠状動脈性心臓病、外傷および多発性外傷、様々な腫瘍における、A-ペプチド濃度を示す。

【図11】図11は、全身性炎症のシュミレーションを示す。エンドトキシン適用後のA-ペプチド、TNF- α 、IL-6およびPCT濃度。

【実施例】

【0056】

(実施例1:抗体の産生)

(a)免疫原

プロタキニンAの4つの異なるペプチド配列(PSP1からPSP4;図1を参照せよ)を選択し、Jerini(Berlin, Germany)によって合成した。ペプチドPSP1および2は、A-ペプチドの配列を含む。PSP3は、活性なニューロペプチドK(NPK)の最初の配列の最初の部分を含み、PSP4は、また、NPKだけでなくニューロペプチド(NP)の配列の部分、およびニューロキニンA(NKA)の完全な配列を示す。それぞれのペプチドは、アミノ末端にシステイン残基を有して提供される(Cys0)。

【0057】

(b)抗体

免疫のために、それぞれのペプチドを、BioGenes(Berlin, Germany)によるLimulus polyphemusに由来するヘモシアニンとコンジュゲートさせ、抗体を、ウサギにおいて、PTK-ペプチド-コンジュゲートPSP1からPSP4に対して産生させた。

【0058】

(実施例2:抗体の精製)

抗体を、リガンド特異的アフィニティ精製によって精製した。この工程のために、Cys(0)-ペプチドPSP1からPSP4を、Pierce(Boston, USA)によって供給されたSulfoLink-Gelへと結合した。結合は、供給者のプロトコールに従って行った。

【0059】

要約すると、ポリカーボネートカラム(15mm x 80mm)を、5mlのアフィニティマトリクスで満たした。カラムをPBS(リン酸緩衝生理食塩水)(136mM NaCl、1.5mM KH₂PO₄、20.4mM Na₂HPO₄ * 2H₂O、2.7mM KCl、pH7.2)を用いて平衡化した後、5mgのそれぞれのペプチドをPBSで溶かしてカラムにアプライし、ゲル物質を緩やかに攪拌することによって均一にした。室温での15分間のインキュベーションおよびゲル物質の堆積後、カラムを5回3mlのPBSを用いて洗浄した。フリーの結合部位を飽和させるために5mlの50mM L-システイン溶液をカラムに加え、均一になったゲル物質を、再度15分間室温でインキュベートした。ゲル物質が堆積後、それぞれのカラムを、5mlの1M NaCl溶液で6回洗浄し、その後、PBSを用いて洗浄した。

【0060】

ゲル物質を、25mlのそれぞれの抗血清プールを用いて混合し、緩やかに攪拌することによって室温で一晩インキュベートした。血清-ゲル混合物を、ポリカーボネートカラムに加え、余分な血清を除去した。その後、カラムを250mlのPBSを用いて洗浄し、非結合の血清タンパク質を除去した。非結合抗体の脱離は、50mMクエン酸(pH2.2)を用いたカラムの溶出によって実施した。溶出液を1mlのフラクションに回収した。各フラクションのタン

10

20

30

40

50

パク質濃度を、Perbio(Bonn, Germany)のBCA-タンパク質アッセイキットを使用して求め、>1mg/mlのタンパク質含量を有するフラクションをまとめた。アフィニティ精製した抗体を、PBSを用いた透析により再緩衝化した。タンパク質含量を再度測定し、抗体を4 で保存した。

【0061】

(実施例3：抗体の固定化/標識化)

ペプチドPSP2、3および4に対する精製抗体を、ポリスチロールチューブ(Startube、12 mm×75mm、Greiner、Germany)に固定した。この方法のために、抗体溶液を、PBSを用いてタンパク質濃度が6.7 μg/mlになるように希釈し、各チューブ当り300 μlをピペティングした(チューブ当り2 μgの抗体に対応)。これらを室温で20時間インキュベートし、その後、それぞれを4mlのPBSで3回洗浄した。更なる使用まで、チューブを4 で保存した。PSP1に対する抗体(PBS中で1mg/ml)を、発光マーカであるアクリジニウムエステル-N-ヒドロキシ-スクシンイミド(アセトニトリル中で1mg/ml、In Vent、Hennigsdorf、Germany)を用いて標識した。標識の手順のために、200 μlの抗体を、4 μlのアクリジニウムエステルを用いて混合し、20分間インキュベートし、フリーのアクリジニウムエステル結合を、40 μlの50mMグリシン溶液を加えることによって飽和させた。標識した調製物を、Bio Sil 400-ゲルろ過カラム(BioRad、Munich、Germany)を用いたHPLCによってフリーのアクリジニウムエステルと分離した。PBSを、溶媒として使用した。

【0062】

(実施例4：プロタキニン免疫反応性の測定)

3つの異なる抗体組み合わせを使用して、5人の各コントロール、敗血症患者およびアルツハイマー患者の血漿、ならびに、5人の認知症でないコントロール患者の髄液において、プロタキニン免疫反応性を測定した。コーティングしたチューブ当り100 μlのサンプルをピペティングし、12.5ngの標識抗体(200 μlのPBSバッファー、10mM EDTA中)をそれぞれのチューブに加えた。チューブを4 で20時間インキュベートした。その後、非結合のトレーサー抗体を、1ml PBSを用いて5回洗浄することによって除去した。チューブに結合した、標識抗体は、ルミノメーター(Berthold LB 952T/16)内で発光を検出することによって定量した。

【0063】

異なる抗体組み合わせによって検出されるPTK断片(図4a)を、以下の表および図4bに示す。3つの抗体組み合わせを用いて測定した相対的な免疫応答性を、図5に示す。抗体組み合わせIは、4つ全てのスプライシングバリエーション(PPT-A、PPT-A、PPT-AおよびPPT-A)に含まれるA-ペプチド(断片1-37)を検出する。抗体組み合わせIIは、スプライシングバリエーションPPT-AおよびPPT-Aのみを検出し、組み合わせIIIは、PPT-AおよびPPT-Aのみを検出する。

【0064】

コントロール、敗血症患者およびアルツハイマー病患者の血漿においては、3つ全ての抗体組み合わせで、プロタキニン配列を検出することができた。抗体組み合わせIを用いた / / / の検出についてのコントロールデータの平均値を、結果間のより良好な比較のために、100%とし、残るデータの平均値は、そのコントロールデータに基づいて計算した(表1参照)。A-ペプチド、および、全ての配列を含むPTK-断片が、髄液において、群を抜いて高い濃度を示し、健康なコントロールの血漿に比べて30倍高いシグナルを示すことが示された。A-ペプチドの免疫反応性は、敗血症患者の血漿においても明確に増加した。ここで、そのシグナルは、コントロール個体の血漿に比べて約12倍高かった。アルツハイマー病患者は、2倍に増加したシグナルを示した。

【0065】

抗体組み合わせIIおよびIIIを用いた場合に、スプライシングバリエーション / および / は、髄液で検出可能なシグナルを示さなかった。このことは、PTKが、完全にプロセッシングを受けたタンパク質として存在することを示す。血漿においては、しかしながら、組み合わせIIおよびIIIを用いた場合に、スプライシングバリエーション / および / を検

10

20

30

40

50

出すことができたが、これらは、 / / / (抗体組み合わせI) についてのシグナルより低かった。

【0066】

抗体組み合わせIによるPTK-断片の検出は、敗血症患者およびアルツハイマー病患者サンプルにおいて、それぞれコントロールサンプルに対して比率11.6および2.0であった。抗体組み合わせIIおよびIIIの敗血症サンプルの比率は、抗体組み合わせIの11.6よりかなり低くなった。それゆえ、抗体組み合わせIは、健康なコントロールとの差異についての、少なくとも敗血症についての、より良好な方法である。(3つ全ての抗体組み合わせを用いた場合のアルツハイマーサンプルの比率が2程度であるので、抗体組み合わせの選択は、コントロールおよびアルツハイマー病患者の差異について関係しないようである。)

【0067】

【表1】

表1：異なる抗体組み合わせを用いたPTK/-断片の相対的免疫反応性の測定

抗体組み合わせ	I (PSP2 /PSP1)		II (PSP3 /PSP1)		III (PSP4 /PSP1)	
	$\alpha/\beta/\gamma/\delta$		α/β		β/γ	
検出スプライシングバリエーション	$\alpha/\beta/\gamma/\delta$		α/β		β/γ	
検出可能なPTK-断片	AS 1-37 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)		AS 1-92(α)		AS 1-89 (β)	
	AS 1-50 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)		AS 1-76 (β)		AS 1-110 (β)	
	AS 1-92 (α)		AS 1-89 (β)		AS 1-74(γ)	
	AS 1-76 (β)		AS 1-110 (β)		AS 1-95(γ)	
	AS 1-89 (β)					
	AS 1-110 (β)					
	AS 1-61(γ)					
	AS 1-74(γ)					
	AS 1-95(γ)					
	AS 1-77(δ)					
サンプル	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient
コントロールサンプル	100	1.0	45.6	1.0	36.4	1.0
敗血症 血漿	1160	11.6	114	2.5	101	2.8
アルツハイマー病 血漿	200	2.0	86.5	1.8	67	1.8
髄液	3096	30.96	6	0.1	5.5	0.15

rel. IR : 相対的免疫反応性 (抗体組み合わせIのコントロール血漿の値 (100%と計算) に対する%値)。全ての値は、平均値である (n=5)。

Quotient : 各抗体組み合わせについて、患者の各値 (%) と対応するコントロール値 (%) の比率

【0068】

(実施例5 : A-ペプチドの定量測定のためのイムノアッセイ)

1. コンポーネント

PSP2-抗体でコーティングしたチューブおよび発光マーカーで標識したPSP1-抗体を、イ

10

20

30

40

50

ムノアッセイにおいて使用した。これらのコンポーネントの産生は、実施例3に示す。

【0069】

2. 手法

100 μ lのサンプルを、抗体でコーティングした各チューブにピペティングし、12.5ngの標識抗体(200 μ l PBSバッファー、10mM EDTA中)を加えた。チューブを、20時間4でインキュベートし、その後、トレーサー抗体を、1mlのPBSを用いて5回洗浄することによって除去した。チューブに結合した標識抗体は、ルミノメーター(Berthold LB 952T/16)内で発光を測定することによって定量した。

【0070】

3. キャリブレーション

A-ペプチドの濃度および免疫反応性が測定することができるために、ペプチドをJerini (Berlin, Germany)によって合成した。予め重量を測定したペプチドを、イムノアッセイのためのキャリブレーターとして使用した。図6において、A-ペプチドの標準グラフを示す。A-ペプチドアッセイの分析的な感度は、約4pg/mlである。

【0071】

(実施例6: 恐らく健康である個体(コントロール)の血漿中のA-ペプチド濃度)

健康な個体の血漿中のA-ペプチド濃度の分布グラフを、図7に示す。100のコントロールサンプルのうちの90%が、35pg/mlより低いA-ペプチド免疫反応性を示した。中央値は、13.3pg/mlであった。

【0072】

(実施例7: アルツハイマー病患者においけるA-ペプチド含量)

アルツハイマー病に罹患した患者、および認知症でない歳を合わせたコントロールの血漿におけるA-ペプチド免疫反応性は、顕著に異なった(図8)。この場合におけるコントロールの中央値は、18.0pg/mlであり、アルツハイマー病患者の中央値は、その2倍、すなわち39.0pg/mlであった。

【0073】

(実施例8: 脳脊髄液(CSF)におけるA-ペプチド濃度)

コントロールサンプルの髄液(n=30)におけるA-ペプチド濃度を測定したところ、中央値が1085pg/mlであった。CSF-中央値は、健康なコントロール個体の血漿の中央値よりも約80倍顕著に増加していた。

【0074】

(実施例9: 血液脳関門の障害におけるA-ペプチド濃度)

髄膜炎、頭蓋大脳外傷および脳梗塞(回復または転帰を含む)のような脳障害に罹患した患者の病気の経過における、循環血液中のA-ペプチド含量を測定した(図9)。A-ペプチドレベルは、病院への患者の入院時に、非常に高かった(通常のレベルである約35pg/mlを超えていた)。髄膜炎、脳梗塞または頭蓋大脳外傷の回復期の患者は、A-ペプチド濃度の安定した減少を示し、通常のレベルよりも下がった。結果的に死をもたらした脳梗塞は、経過全体で、A-ペプチド濃度の顕著な増加を示した。A-ペプチドの濃度は、転帰まで、通常レベルへと減少しなかった。

【0075】

結果:

A-ペプチド濃度の測定は、血液脳関門の機能のための血漿マーカーとして使用することができる。髄液におけるA-ペプチド濃度は、循環血液に比較して約80倍増加するので、血漿中のA-ペプチドの測定によって求めた髄液タンパク質の血液の輸送は、血液脳関門の機能の歪みについてのシグナルである。A-ペプチド濃度の経過によって、患者の状態についての有用な説明、および病気の経過についての予後が可能となる。

【0076】

(実施例10: 肺炎、局所感染、敗血症、冠状動脈性心臓病、外傷または多発性外傷および様々な腫瘍に罹患した患者の循環血液におけるA-ペプチド濃度の測定)

肺炎、局所感染(膿瘍)のような炎症性疾患に罹患した患者だけでなく敗血症に罹患し

10

20

30

40

50

た患者も、それぞれの場合の80%、100%および72%が、部分的には、顕著に高い値を示した(>35pg/ml) (図10)。これらの結果と対照的に、冠状動脈性心臓病に罹患した16人の患者のうち3人のみが、コントロールよりも高い値を示した。外傷および多発性外傷に罹患した患者だけでなく、様々な腫瘍疾患に罹患した患者も、コントロール個体と比較して、50%が高いA-ペプチド濃度を示した。

【0077】

(実施例11：全身性炎症のAペプチドおよびシミュレーション)

標準的なエンドトキシンである大腸菌の0113:H10:kを、4ng/体重kgの濃度で、ボランティアのテスト患者へと静脈内注入した。血液サンプルを、異なる時に採取した(DANDONA et al., 1994によるプロトコール)。エンドトキシンを用いて治療したテスト患者における、様々な炎症パラメーター(IL-6、TNF、PCT)だけでなくA-ペプチドの測定によって、血液中の物質の濃度の時間依存的な経過が示された(図11参照)。第一に、予期されたように、エンドトキシンの注入後約1時間してから、TNFの増加が生じた。その後すぐに、サイトキシンIL-6の増加が続いた(エンドトキシンの注入後約1.5時間)。3時間後、TNFおよびIL-6の濃度が減少する一方で、驚くべきことに、A-ペプチド濃度の増加が生じ、その濃度は、約7時間後に開始レベルに戻った。PCTは、5時間後に濃度増加を示し、更なる経過の間に、安定的に増加した。それゆえ、A-ペプチドの分泌は、エンドトキシンの単独の注入によって誘導することができ、TNF / IL-6とPCTとの間の免疫カスケードにおける1つの事象である。

【0078】

[参考文献]

DANDONA P., NIX D., WILSON M. V., ALJADA A., LOVE J., ASSICOT M., BOHUON C., (1994), Procalcitonon increase after endotoxin injection in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79: 1605-1608

10

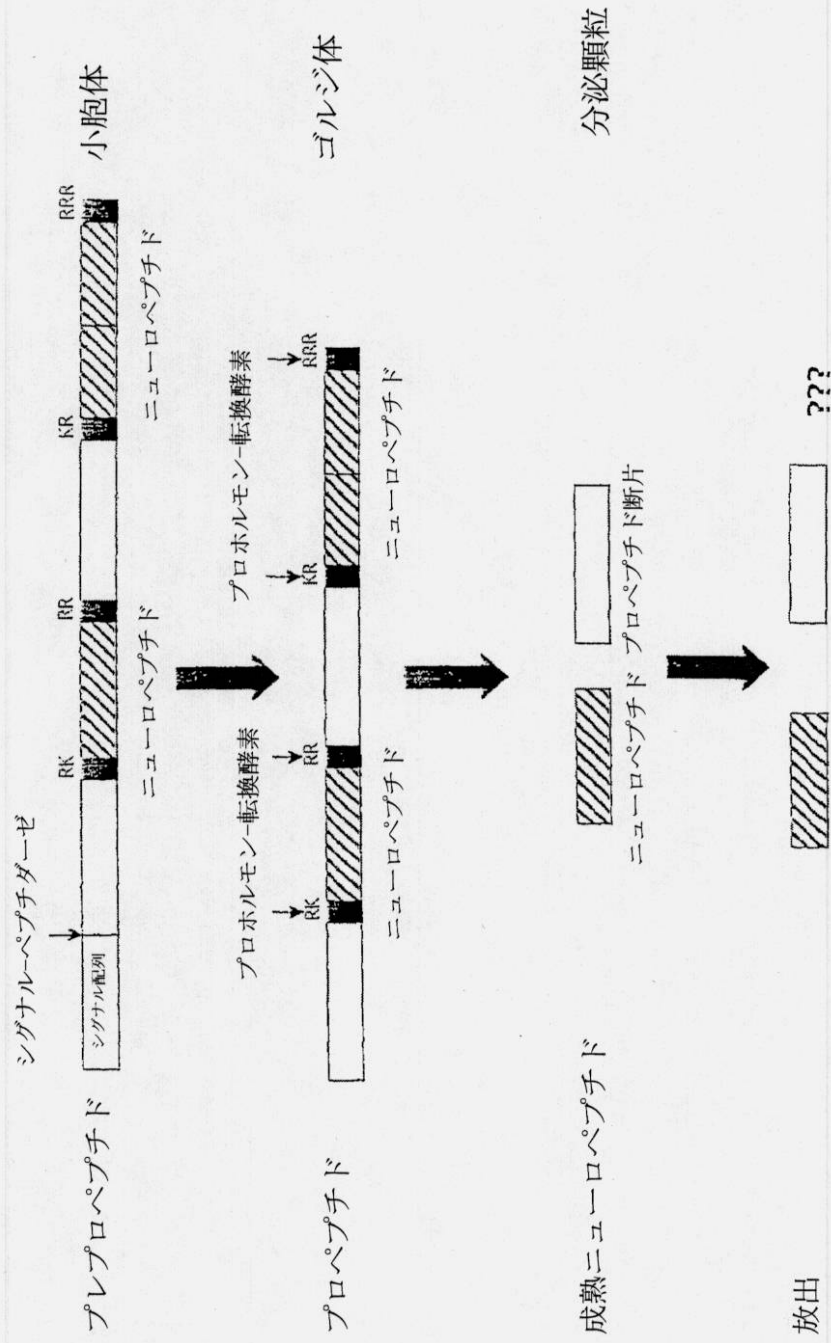
20

30

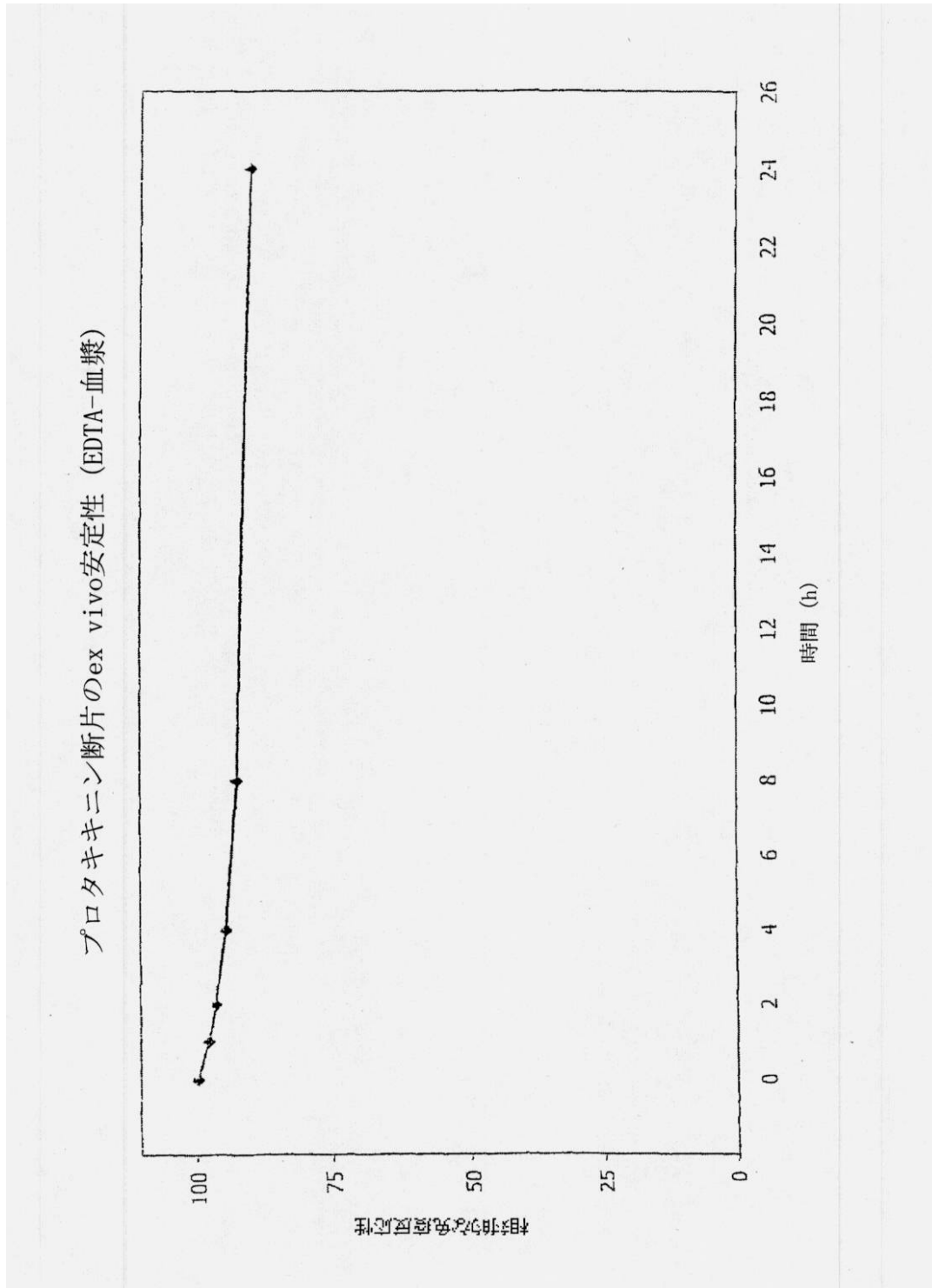
【 図 1 】

FIG. 1

ニューロペプチド合成



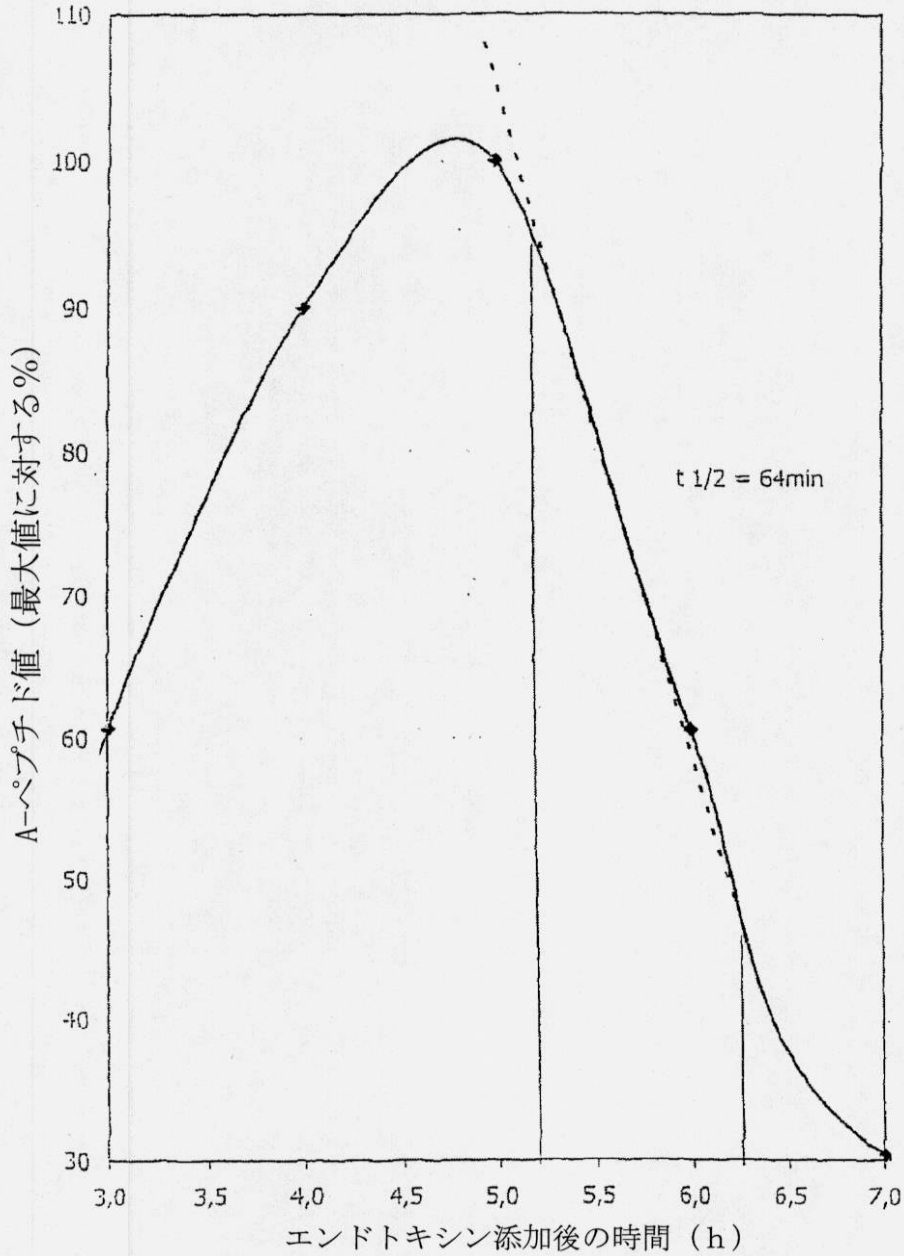
【図2】



【図3】

FIG. 3

A-ペプチド含有PTK断片の半減期の測定
(in vivo)



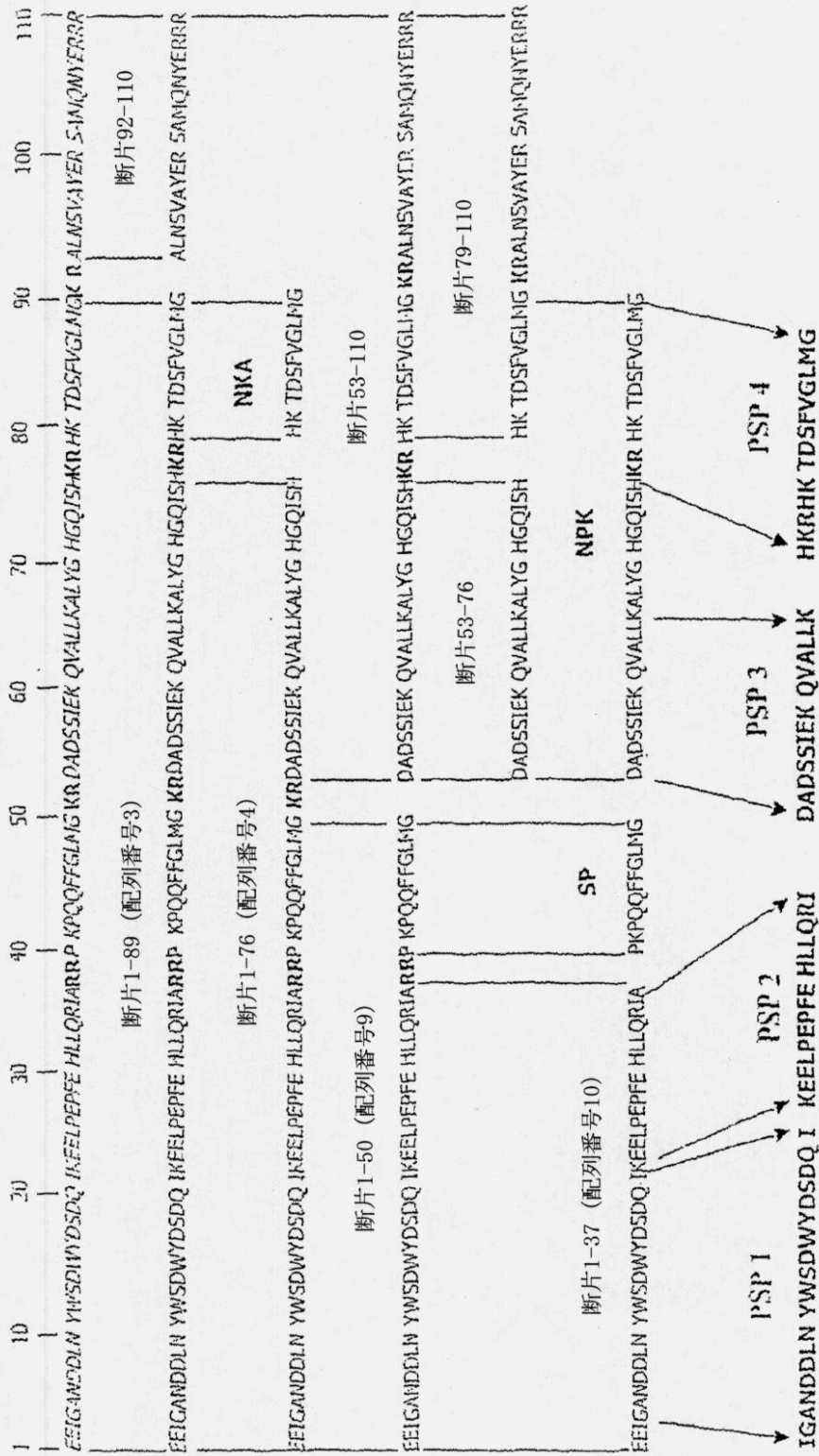
エンドトキシン研究に由来するA-ペプチド値の使用
(A-ペプチド-ピーク範囲の値のみ)

濃度の最も顕著な減少の範囲の傾き

【 図 4 B 】

FIG. 4B

β PPT-A (AS 1-110、配列番号2) のスプライシングバリエーション



【 図 4 C 】

FIG. 4C

γ PPT-A (AS 1-95、配列番号5) のスプライシングバリアント

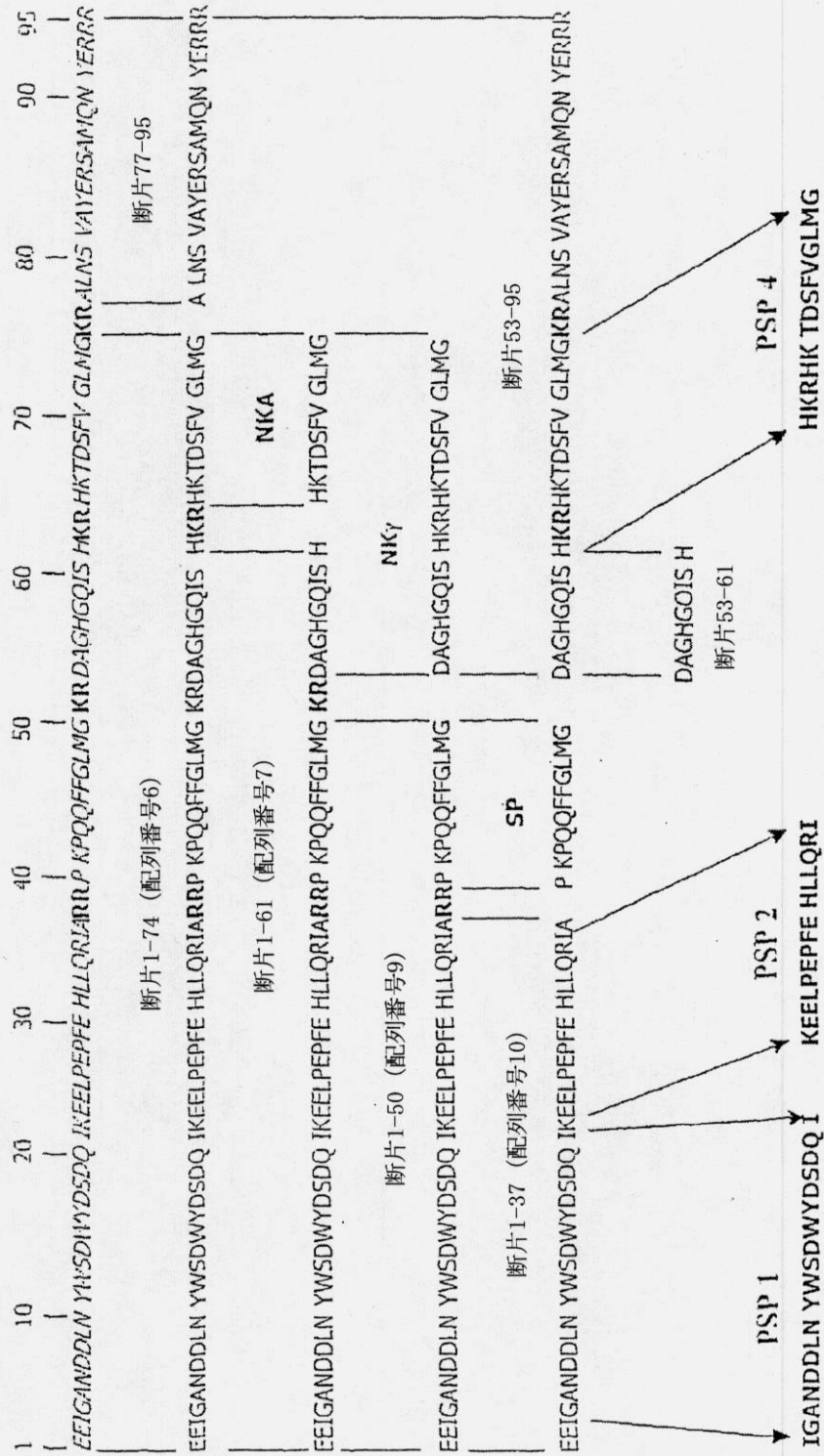
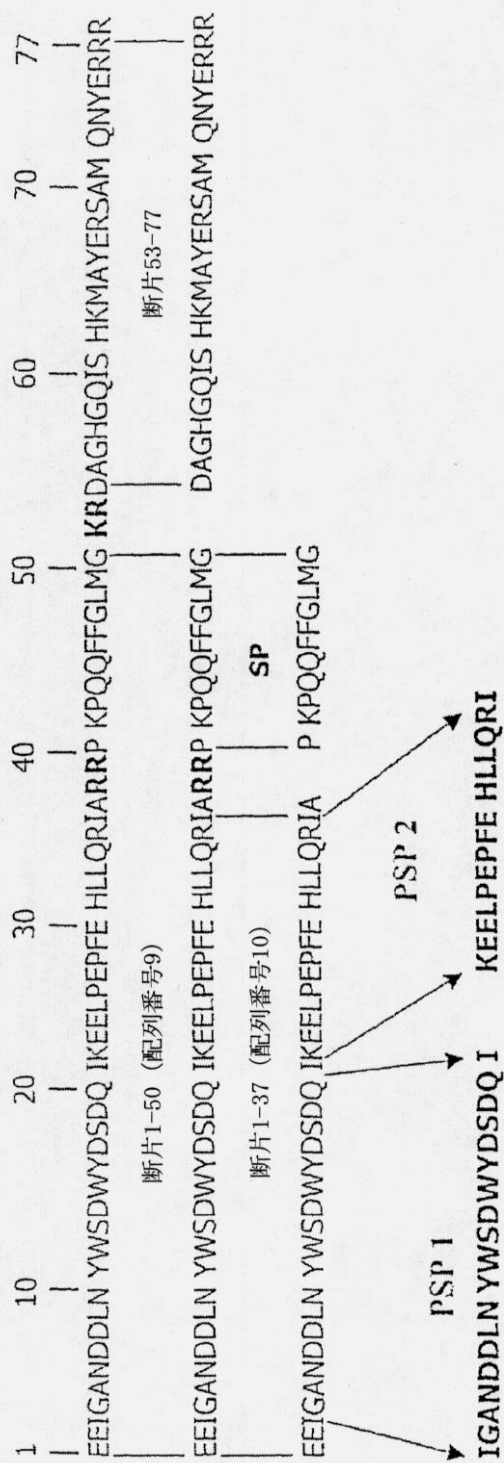
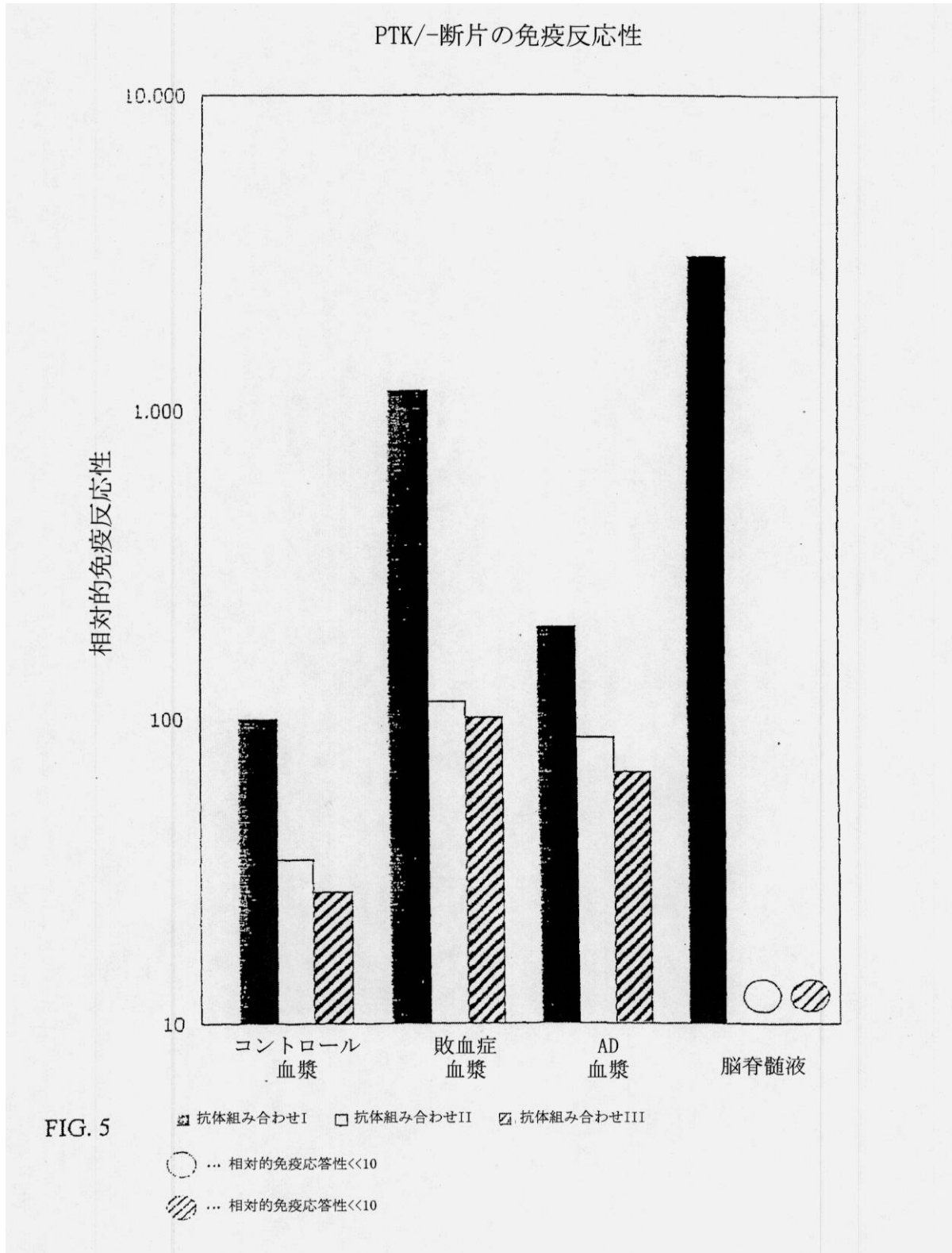


FIG. 4D

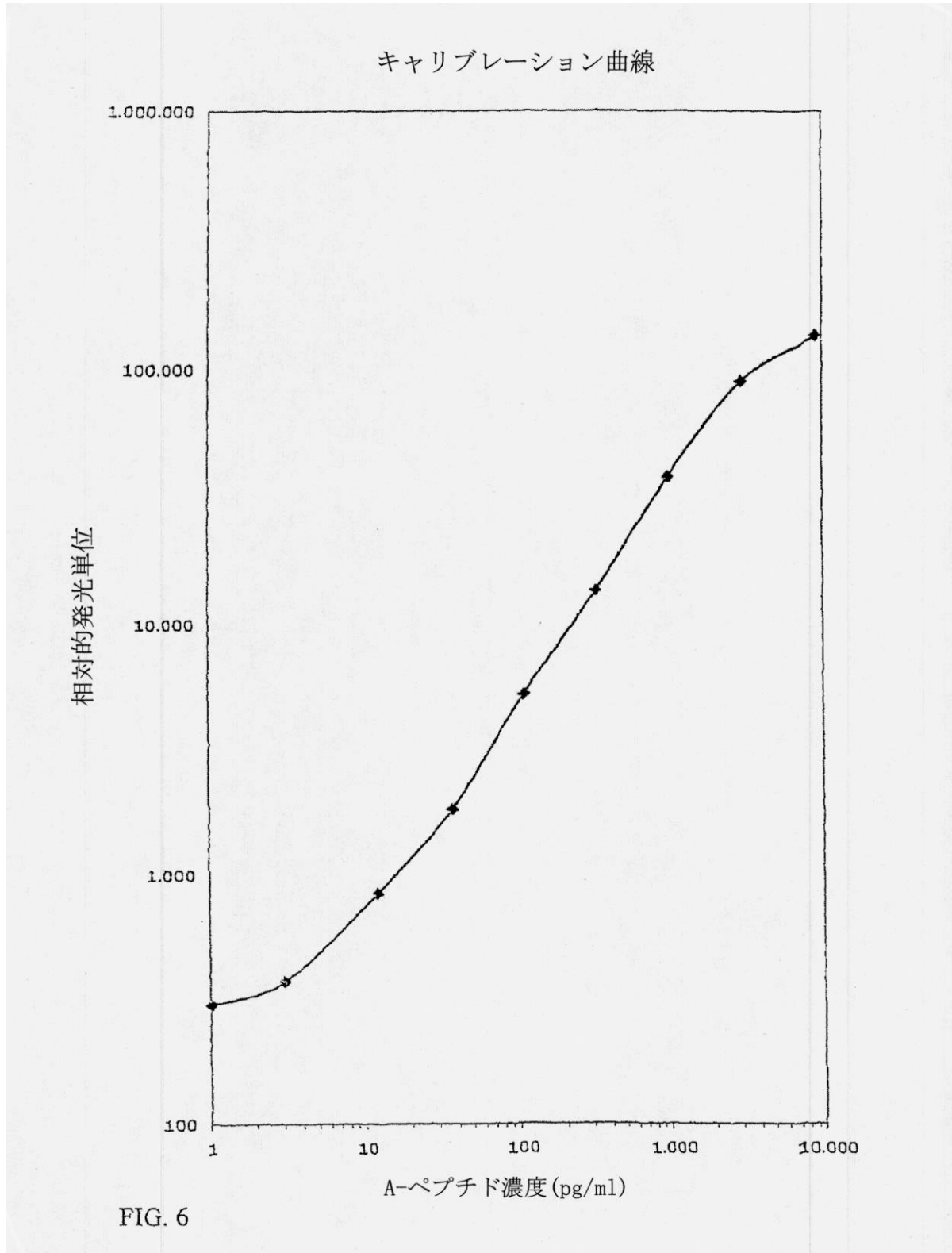
δ PPT-A (AS 1-77、配列番号8) のスプライシングバリエーション



【図5】



【図6】



【図7】

コントロールの血漿におけるA-ペプチド濃度の頻度分布

(n = 100)

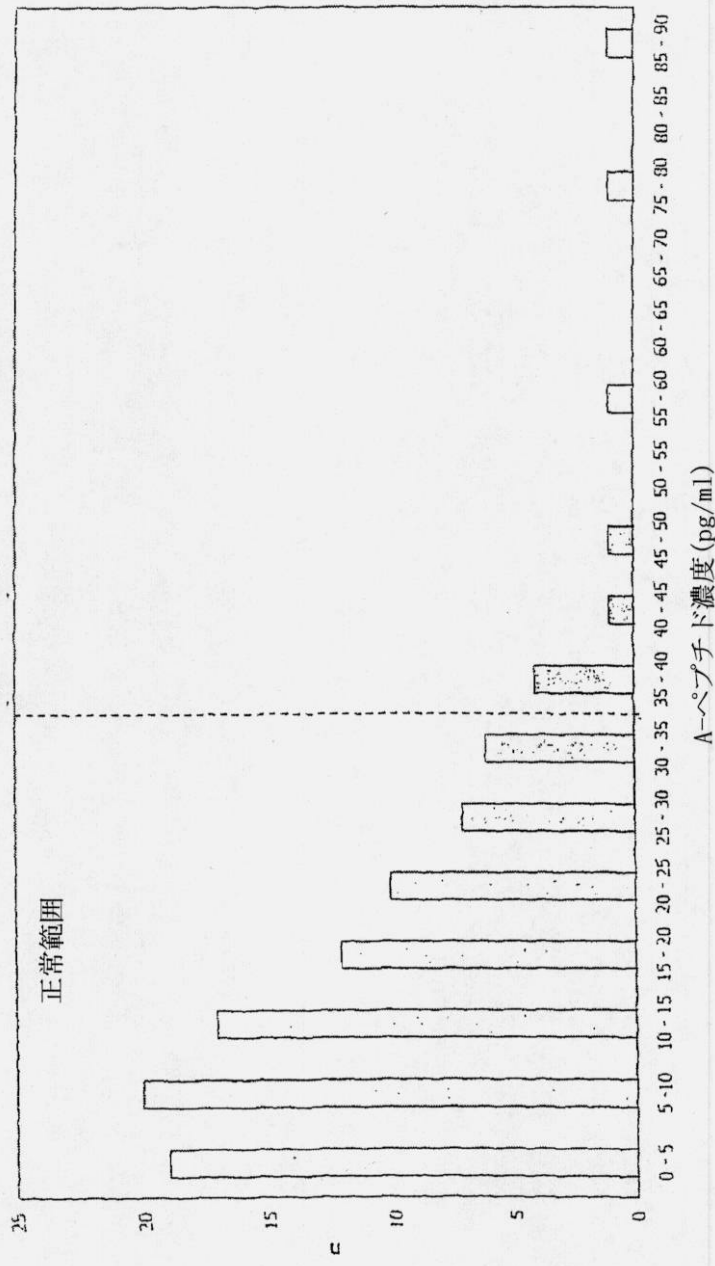


FIG. 7

【図8】

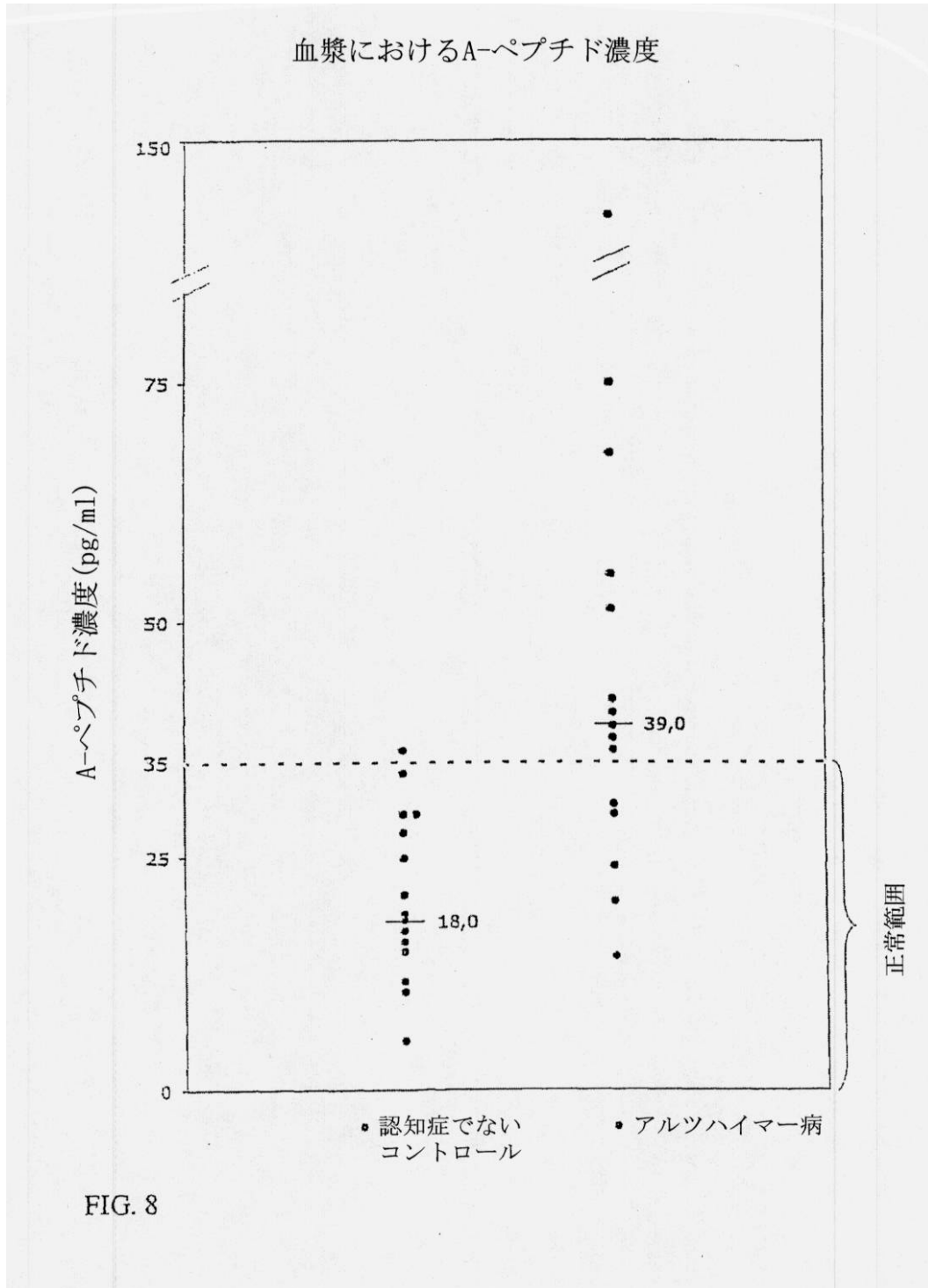


FIG. 8

【 図 9 】

脳疾患の患者におけるA-βペプチド濃度の分布

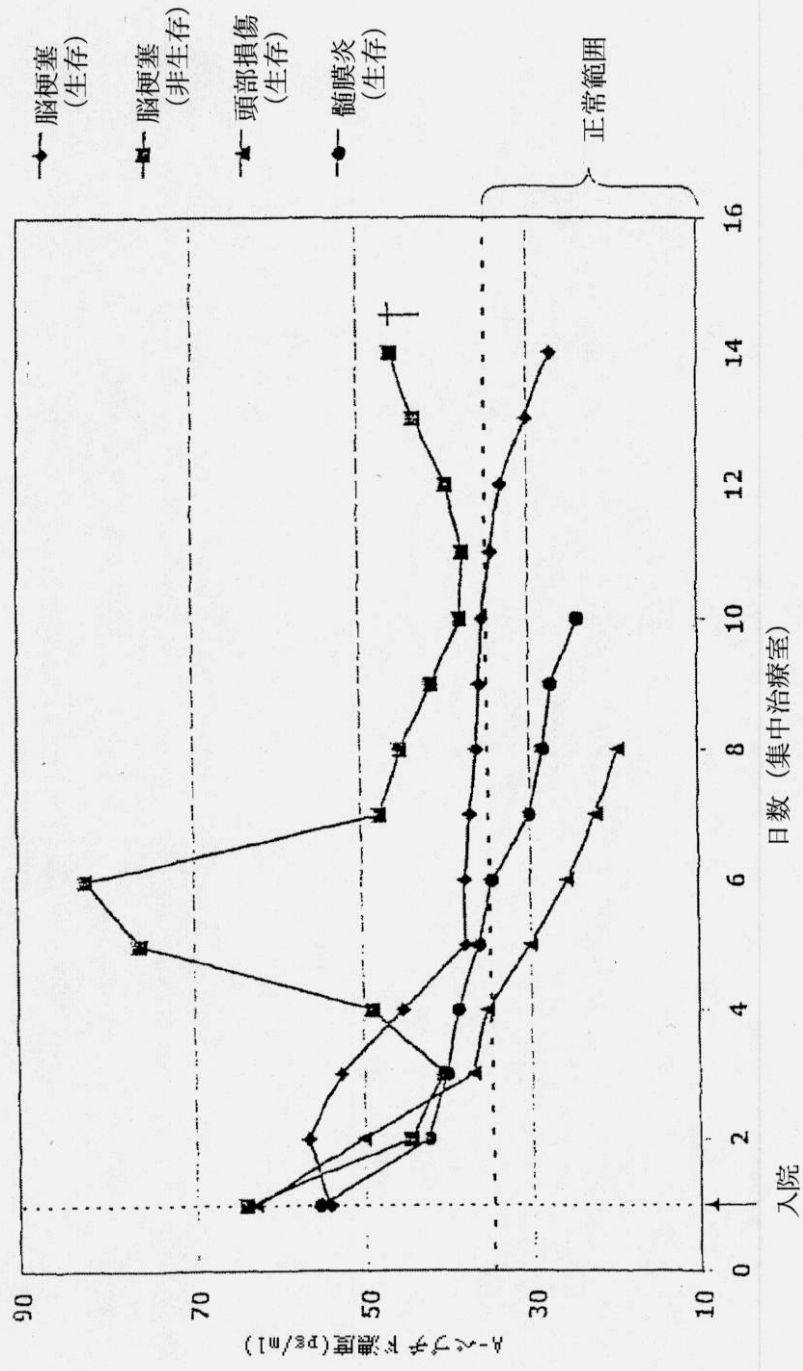


FIG. 9

【 図 10 】

異なる病気におけるA-ペプチド

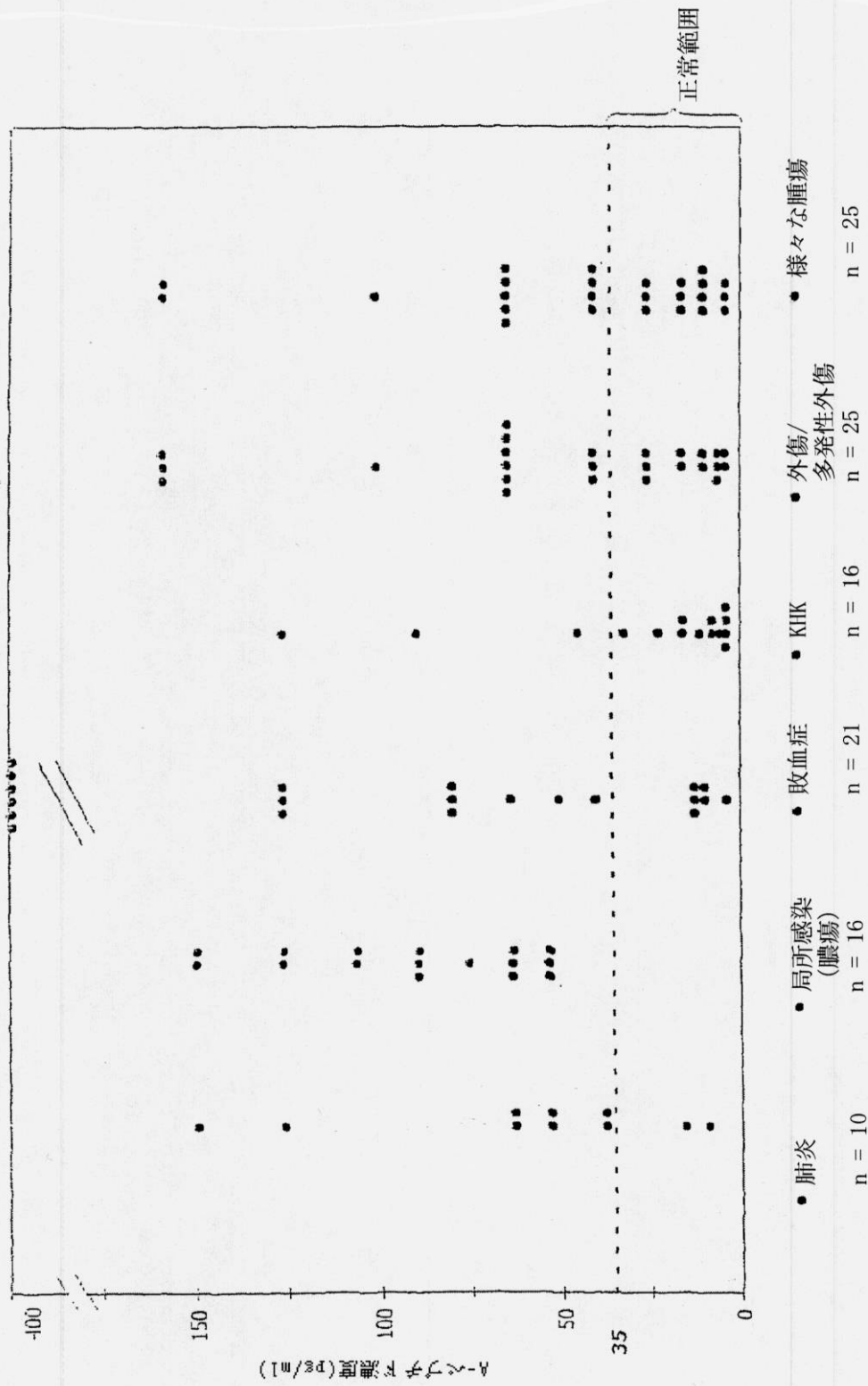
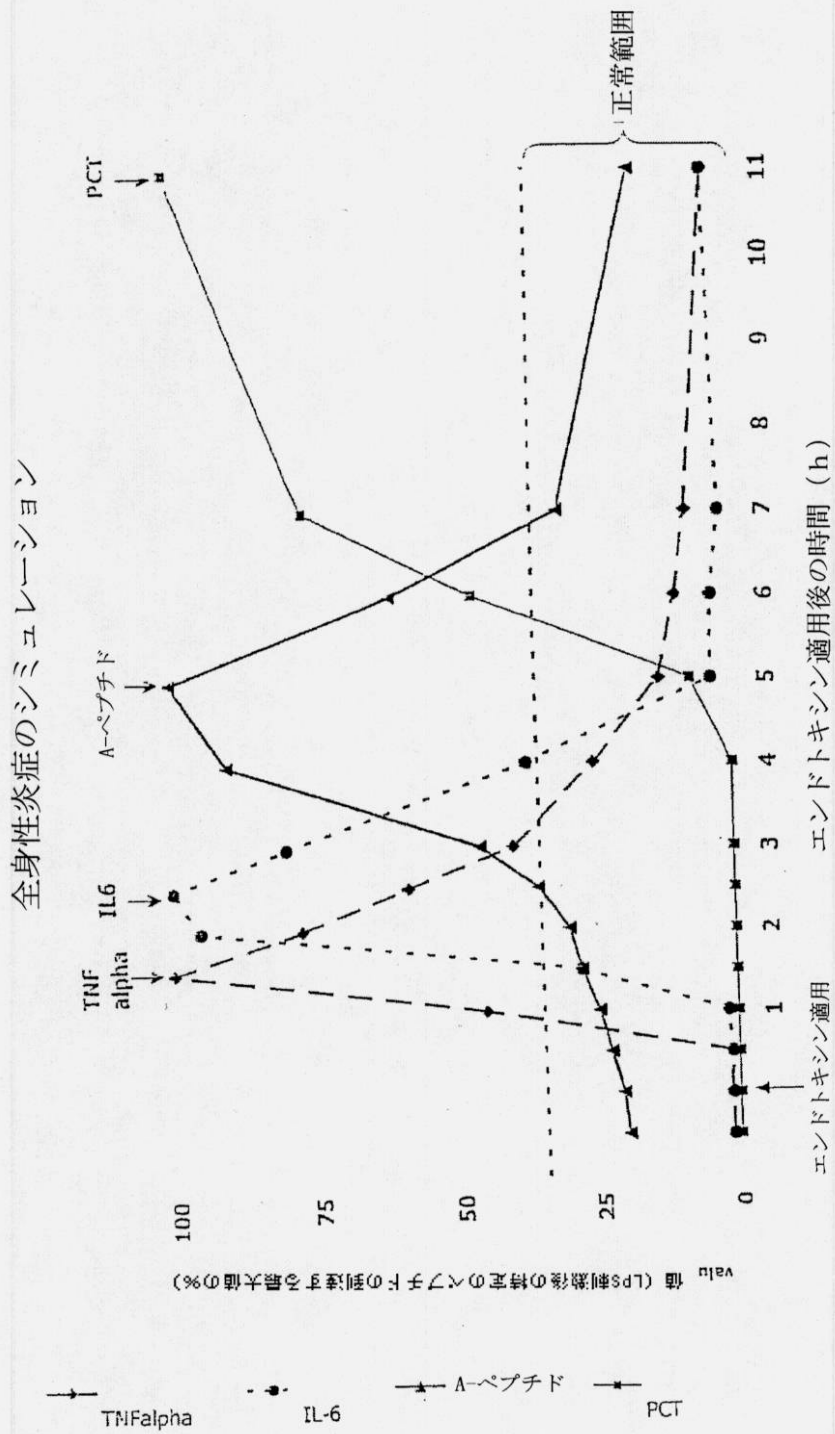


FIG. 10

【 図 1 1 】

FIG. 11



【 配列表 】

0005607094000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 アンドレア・エルンスト

ドイツ・16761・ヘンニヒスドルフ・ファルケンセーレ・シュトラッセ・4

審査官 吉田 将志

(56)参考文献 国際公開第02/103016(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

专利名称(译)	速激肽前体和/或其片段在医学诊断中的用途		
公开(公告)号	JP5607094B2	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	JP2012055452	申请日	2012-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	鞘脂技术游戏的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	鞘脂科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	鞘脂科技有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルグマン アンドレアエルンスト		
发明人	アンドレアス・ベルグマン アンドレア・エルンスト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/6872 G01N2410/06 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/532.B		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	2004009284 2004-04-20 EP		
其他公开文献	JP2012112978A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：克服速激肽的不利半衰期，并开发一种方法，用途和试剂盒，用于检测和测量体液，组织和其他生物材料中的速激肽。解决方案：这一目标是通过令人惊讶的发现实现的，即protachykinin可用作测量体液，组织和其他生物材料中速激肽的工具，尤其是物质P。

抗体組み合わせ	I (PSP2 /PSP1)		II (PSP3 /PSP1)		III (PSP4 /PSP1)	
	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient
検出スライシング バリエーション	$\alpha/\beta/\gamma/\delta$		α/β		β/γ	
検出可能な PTK-断片	AS 1-37 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)		AS 1-92(α)		AS 1-89 (β)	
	AS 1-50 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)		AS 1-76 (β)		AS 1-110 (β)	
	AS 1-92 (α)		AS 1-89 (β)		AS 1-74(γ)	
	AS 1 - 76 (β)		AS 1-110 (β)		AS 1-95(γ)	
	AS 1-89 (β)					
	AS 1-110 (β)					
	AS 1-61(γ)					
	AS 1-74(γ)					
AS 1-95(γ)						
AS 1-77(δ)						
サンプル	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient
コントロールサンプ	100	1.0	45.6	1.0	36.4	1.0
敗血症 血漿	1160	11.6	114	2.5	101	2.8
アルツハイマー病 血漿	200	2.0	86.5	1.8	67	1.8
髄液	3096	30.96	6	0.1	5.5	0.15