

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



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

PCT

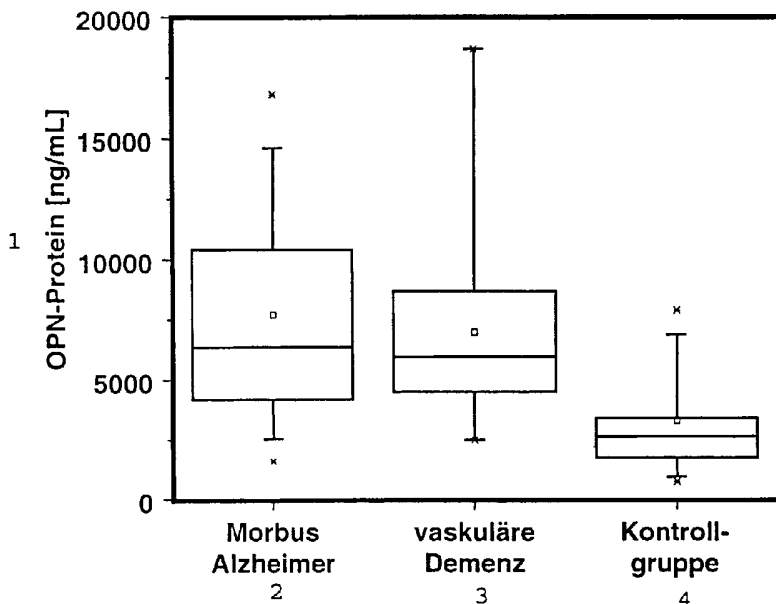
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090974 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/00** (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BIOVISION AG** [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 5,
30625 Hannover (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01665
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. Mai 2002 (08.05.2002) (72) **Erfinder; und**
(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **LAMPING, Nor-**
bert [DE/DE]; Siegesstrasse 8, 30175 Hannover (DE).
ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Von-Escherte-Strasse 6,
30539 Hannover (DE). **HEINE, Gabriele** [DE/DE]; Wald-
strasse 22, 30163 Hannover (DE). **JÜRGENS, Michael**
[DE/DE]; Waldstrasse 22, 30163 Hannover (DE). **HESS,**
Rüdiger [DE/DE]; Bollnäser Strasse 2, 30629 Hannover
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 22 543.1 9. Mai 2001 (09.05.2001) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

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

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM NACHWEIS EINER PROGREDIENTEN, CHRONISCH-DEMENZIELLEN ERKRAN-
KUNG, ZUGEHÖRIGE PEPTIDE UND NACHWEISREAGENZIE



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

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

(57) **Zusammenfassung:** Die

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

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/090974 A2



(DE). SELLE, Hartmut [DE/DE]; Eickenriede 15, 30459 Hannover (DE).

(74) **Anwalt:** GRAMM, LINS & PARTNER GBR; LÄUFER, Martina, Freundallee 13, 30173 Hannover (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, 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.

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

TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

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

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

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

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

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

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

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

30

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

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 usw. vorkommen.

5

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch folgende Symptome auszeichnet: Abnahme der geistigen Fähigkeiten, Konfusion und herabgesetzte Selbsterhaltungs- 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 sichere Nachweis der Erkrankung. Diese histopathologischen Diagnosen beruhen auf Kriterien, die das "Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease" (CERAD) festgelegt hat. Zur Diagnose von Morbus Alzheimer werden derzeit folgende kriterienbasierte Diagnosesysteme verwendet: Die "International classification of Diseases, 10th revision" (ICD-10), das „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition“ (DSM-IV) der „American Psychiatric Association“, und die vom "National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association" NINCDS-ADRDA aufgestellten "Work Group criteria".

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

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

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

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

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

Definitionen:

OPN-Proteine oder Peptide entsprechend der Accession Nr. X13694:

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

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

DROPN-Peptide:

Nachfolgend werden OPN-Peptide und OPN-Peptid-Varianten als DROPN- ("Dementia Related Osteopontin") Peptide bezeichnet. DROPN-Peptide leiten sich von der eingangs genannten OPN-Sequenz X13694 ab. Alternativ können DROPN-Peptide auch von anderen Gene Bank Einträgen für Osteopontin, wie z.B. AF052124, J04765, M83248, NM_000582, U20758 oder weiteren OPN-Einträgen, die in der Zukunft eventuell noch hinzukommen werden, abgeleitet werden. Dabei ist es möglich, dass sich die OPN-Protein-Sequenzen eventuell von der Sequenz des Gene Bank Eintrags mit der Nummer X13694 unterscheiden, wie es derzeit schon für die Gene Bank Einträge AF052124, J04765 und NM_000582 der Fall ist. OPN-Sequenzeinträge können auch in anderen, von "Gene Bank" verschiedenen Sequenzdatenbanken vorhanden sein. Folglich müssen DROPN-Peptide und OPN-Proteine nicht exakt mit der Sequenz des OPN-Proteins entsprechend dem Eintrag in der Sequenzdatenbank "Gene Bank" mit der Accession No. X13694 übereinstimmen. Außerdem können DROPN-Peptide zwei punktmutierte, zwei deletierte oder zwei zusätzlich intern eingefügte Aminosäuren, sowie N-terminale und/oder C-terminale Verlängerungen beinhalten. Dabei müssen sie jedoch mindestens 8 Aminosäuren aus der OPN-Proteinsequenz beibehalten. Als N- oder C-terminale Verlängerung kommen nur solche Aminosäuren in Frage, die in der OPN-Proteinsequenz an dieser Sequenzposition im OPN-Protein vorkommen. Außerdem werden Peptide, die sich aus natürlich vorkommenden OPN-Polymorphismen und aus natürlich vorkommenden OPN-Mutanten ableiten, als DROPN-Peptide bezeichnet, sofern sie mindestens 70 % Übereinstimmung mit der

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

Chemisch oder posttranslational modifizierte Peptide:

Ein chemisch oder posttranslational modifiziertes Peptid kann sowohl aus D- als auch aus L-Aminosäuren, sowie aus Kombinationen von D- und L-Aminosäuren bestehen und können sowohl natürlich vorkommen, rekombinant hergestellt werden oder chemisch synthetisiert werden. Außerdem können in diesen Peptiden ungewöhnliche Aminosäuren, d.h. Aminosäuren, die nicht zu den 20 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, alpha-Aminoadipinsäure, Diaminobuttersäure, 4-Aminobenzoessäure, 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, Glykosillierungen, 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:

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

10 Sensitivität:

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

15 Spezifität:

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

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

30

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

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

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

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

15

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

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

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

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

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

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

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

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

Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung ist die galenische Formulierung
25 oder chemische Modifizierung der beschriebenen Peptide und Nukleinsäuren in
einer Art und Weise, die es ihnen ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke und/oder die
Blut-Liquor-Schranke effizienter zu passieren. Dadurch eignen sie sich dann
besonders zur therapeutischen Anwendung. Um dieses zu erreichen können z.B.
DROPN-Peptide, OPN-Proteine, Nukleinsäuren, Agonisten oder Antagonisten
30 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 begünstigen, bzw. umgekehrt den Übertritt aus den Subarachnoidalraum heraus erschweren.

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

15

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

OPN-Biologie

25

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

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

25

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

30

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Vorzugsweise Ausführungsformen der Erfindung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Geeignete Peptide

Die Peptide können in posttranslationalen oder chemischen Modifikationsformen vorliegen, was sich u.a. auf ihre Massen und damit die massenspektrometrische
5 Identifizierung und auch auf das Elutionsverhalten bei der Chromatographie, wie z.B. bei Reverse Phase Chromatographie auswirkt. Insbesondere können die Peptide phosphoryliert, glykosiliert, sulfatiert, amidiert, oxidiert oder mit N-terminaler Pryoglutaminsäure-Gruppe usw. in der zu untersuchenden Probe vorliegen.

- 10 Die Peptide werden insbesondere als OPN-Peptide, bzw. DROPN-Peptide angesehen, wenn maximal 30 % ihrer Sequenz von der Sequenz des OPN-Proteins abweicht. Dabei sind Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und N-terminale und/oder C-terminale Verlängerungen zulässig, solange nicht mehr als 30 % Abweichung von der OPN-Proteinsequenz auftritt.

15

Es ist davon auszugehen, dass die Konzentrationsänderungen der Markerpeptide (DROPN- und OPN-Peptide) mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Stadium der neurologischen Erkrankung, insbesondere der progredienten, chronisch demenziellen Erkrankung, insbesondere Morbus Alzheimer, korrelieren.

- 20 In Weiterbildung der Erfindung ist daher vorgesehen, die Bestimmung der Markerpeptide auch zur Ermittlung des Schweregrades und des Stadiums der Erkrankung heranzuziehen, insbesondere als Ersatz oder als Ergänzung zur Durchführung einer "Mini-Mental State Examination" (MMSE). In Weiterbildung der Erfindung ist außerdem vorgesehen, die Bestimmung der Markerpeptide zur
25 Ermittlung von Vorstufen neurologischer Erkrankungen, insbesondere von "Mild Cognitive Impairment" (MCI), oder zur Prognose des Verlaufs der Erkrankung heran zu ziehen.

- Bei den eventuell verwendeten Kontrollproben kann es sich um eine Poolprobe aus
30 verschiedenen Kontrollen handeln. Auch die zu untersuchende Probe kann eine Poolprobe sein, wobei bei positivem Ergebnis Einzeluntersuchungen angestellt werden.

Geeignete biologische Proben

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

Daher ist in einer weiteren Ausführungsform dieser Erfindung vorgesehen, das zur Vorbereitung der zu untersuchenden Probe Gewebehomogenate hergestellt werden, z.B. aus menschlichen 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 DROPN-Peptide zur Herstellung von Diagnostika

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

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

Nachweismethoden für DROPN-Peptide

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

Physikalische Nachweismethoden

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

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

Trichloressigsäure, Aceton, Ethanol usw. Die so gewonnenen Fraktionen werden dann einzeln dem jeweiligen Nachweisverfahren unterzogen, z.B. der massenspektrometrischen Untersuchung. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Flüssigkeitsphasenextraktion. Dazu wird die

5 Probe z.B. mit einem Gemisch aus einem organischen Lösungsmittel wie etwa Polyethylenglykol (PEG) und einer wässrigen Salzlösung gemischt. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften reichern sich dann bestimmte Inhaltsstoffe der Probe in der organischen und andere in der wässrigen Phase an und können so voneinander getrennt und anschließend weiter analysiert werden.

10

Reverse Phase Chromatographie

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung umfasst die Verwendung von Reverse Phase Chromatographie, insbesondere einer C18 Reverse Phase Chromatographiesäule unter Verwendung von Laufmitteln

15 bestehend aus Trifluoressigsäure und Acetonitril, zur Trennung von Peptiden in humaner Liquorflüssigkeit. Es werden z.B. jeweils Fraktionen gesammelt, die je 1/100 des verwendeten Volumens an Laufmittel beinhalten. Die so gewonnenen Fraktionen werden mit Hilfe eines Massenspektrometers, vorzugsweise mit Hilfe eines MALDI-Massenspektrometers (Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation)

20 unter Verwendung einer Matixlösung, bestehend aus z.B. aus L(-) Fucose und alpha-Cyano-4-hydroxymizinsäure, gelöst in einem Gemisch aus Acetonitril, Wasser, Trifluoressigsäure und Aceton, analysiert und so das Vorliegen bestimmter Massen festgestellt und die Signalintensität quantifiziert. Diese Massen entsprechen den Massen der erfindungsgemäßen Peptide DROPN-1 bis DROPN-31.

25

Massenspektrometrie

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung des oder der Peptide mit Hilfe einer massenspektrometrischen Bestimmung, vorzugsweise einer MALDI- (Matrix-assisted-laser-desorption-and-ionisation-)

30 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 Da 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: DROPN-1 = 2627,2715 / DROPN-2 ≥ 1009,4716 / DROPN-3 = 4032,7594 / DROPN-4 = 4465,0079 / DROPN-5 = 3718,6368 / DROPN-6 = 1737,8030 / DROPN-7 = 1900,8664 / DROPN-8 ≥ 956,4087 / DROPN-9 ≥ 895,4148 / DROPN-10 = 7653,6003 / DROPN-11 = 4662,0953 / DROPN-12 = 2093,9304 / DROPN-13 ≥ 899,3985 / DROPN-14 ≥ 1087,4835 / DROPN-15 = 1522,7991 / DROPN-16 = 1635,8832 / DROPN-17 = 1763,9781 / DROPN-18 = 1911,0466 / DROPN-19 = 3222,6521 / DROPN-20 = 3435,7634 / DROPN-21 = 1650,8941 / DROPN-22 = 1797,9625 / DROPN-23 = 3109,5680 / DROPN-24 = 2796,4042 / DROPN-25 ≥ 1112,5826, DROPN-26 ≥ 844,3563 / DROPN-27 = 2526,2238 / DROPN-28 = 2528,2031 / DROPN-29 = 3718,6368 / DROPN-30 = 4149,7995 und DROPN-31 = 4036,7154 Dalton. Das Symbol ≥ (ist größer oder gleich) ist hierbei so zu verstehen, dass nicht beliebig größere Massen für die betroffenen DROPN-Peptide möglich sind, sondern lediglich die Massen, die sich aufgrund der möglicherweise zusätzlich an den Enden dieser Peptide befindlichen Aminosäuren ergeben. An den Enden dieser Peptide können nicht beliebige Aminosäuren zusätzlich vorhanden sein, sondern nur solche, die sich aufgrund der Sequenz des OPN-Proteins an dieser Sequenzposition befinden können.

Massenspektrometrische Bestimmung der Sequenz der DROPN-Peptide

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

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

Molekularbiologische Nachweistechiken

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

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

gewonnen wurden, verglichen. Zur Quantifizierung können Methoden wie z.B. reverse Transkriptase 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
5 bekannten Weise angewendet werden. Aus den Ergebnissen kann das Vorliegen einer chronisch demenziellen Erkrankung, vorzugsweise Morbus Alzheimer und/oder deren Schweregrad abgeleitet werden.

Immunologische Nachweismethoden

10 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Identifizierung der DROPN-Peptide oder der OPN-Proteine unter Verwendung eines immunologischen Nachweissystems, vorzugsweise eines ELISAs ("enzyme linked immuno sorbent assay") durchgeführt werden. Dabei erfasst dieser immunologische Nachweis wenigstens ein DROPN-Peptid oder OPN-Protein. Zur Erhöhung der
15 Spezifität kann weiterhin bevorzugt ein sogenannter "Sandwich-ELISA" verwendet werden, bei dem der Nachweis der DROPN-Peptide von der Spezifität von zwei Antikörpern, die unterschiedliche Epitope innerhalb des selben Moleküls erkennen, abhängig ist. Zum Nachweis von DROPN-Peptiden oder OPN-Proteinen können jedoch auch andere ELISA-Systeme, z.B. direkte oder kompetitive ELISA
20 Verwendung finden. Auch weitere, ELISA-ähnliche Nachweistechiken, wie z.B. RIA ("radio immuno assay"), EIA (Enzymimmunoassay), ELI-Spot usw. sind geeignet als immunologische Nachweissysteme. Als Standard für die Quantifizierung können aus biologischen Proben isolierte, rekombinant hergestellte oder chemisch synthetisierte DROPN-Peptide oder OPN-Proteine verwendet werden. Die
25 Identifizierung des oder der DROPN-Peptide kann z.B. allgemein mit Hilfe eines auf das DROPN-Peptid oder OPN-Protein gerichteten Antikörpers, erfolgen. Weitere für solche Nachweise geeignete Methoden sind unter anderem Westernblotting, Immunpräzipitation, Dot-Blots, Plasmonresonanzspektrometrie (BIAcore®-Technologie, Biacore International AB, Uppsala, Schweden), Phagenpartikel, PNAs
30 (Peptide Nucleic Acids), Affinitätsmatrizen (z.B. ABICAP-Technologie, ABION Gesellschaft für Biowissenschaften und Technik mbH, Jülich, Deutschland) usw. Generell sind alle Substanzen/Moleküle als Nachweisagencien geeignet, die es erlauben, ein spezifisches Nachweissystem aufzubauen, da sie spezifisch ein DROPN-Peptid oder OPN-Protein binden.

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

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

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

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

Therapieentwicklung und Überwachung durch DROPN-Peptid Bestimmungen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Read-out Parameter bei Versuchen mit Tiermodellen können die Überlebensdauer

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

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

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

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

Die Abbildung 1 zeigt ein Alignment der erfindungsgemäßen OPN-Peptide mit ihrem dem OPN-Protein. Die theoretischen, monoisotopischen Massen der Peptide, angegeben in Dalton, wurden berechnet mit der Software GPMW 4.02. Es sind:
30 DROPN-1 = 2627,2715 / DROPN-2 $\geq$ 1009,4716 / DROPN-3 = 4032,7594 / DROPN-4 = 4465,0079 / DROPN-5 = 3718,6368 / DROPN-6 = 1737,8030 / DROPN-7 = 1900,8664 / DROPN-8 $\geq$ 956,4087 / DROPN-9 $\geq$ 895,4148 / DROPN-10 = 7653,6003 / DROPN-11 = 4662,0953 / DROPN-12 = 2093,9304 / DROPN-13 $\geq$

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

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

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

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

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 DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe.

Obere Spur: Rohdaten der Messung.

- 10 Untere Spur: Konvertiertes, dekonvolutiertes Massenspektrum von DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe.

Das Peak-Muster ist charakteristisch für DROPN-10 mit einer Phosphatgruppe. DROPN-10 entspricht der OPN-Sequenz von Aminosäure 249-314.

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

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

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

Liquor oder Liquor cerebrospinalis (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) ist die in den
5 vier Hirnventrikeln und im Subarachnoidalraum enthaltene Flüssigkeit, die vor allem
in den Plexus choroidei der Seitenventrikel gebildet wird. Die Entnahme von Liquor
cerebrospinalis erfolgt meist durch Lumbalpunktion, seltener durch
Subokzipitalpunktion oder Ventrikelpunktion. Bei der Lumbalpunktion
(Spinalpunktion) zur Entnahme von Liquor cerebrospinalis wird bei der Punktion der
10 spinale Subarachnoidalraum zwischen dem 3. und 4. oder dem 4. und 5.
Lendenwirbeldornfortsatz 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.

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

Zum massenspektrometrischen Nachweis von OPN-Peptiden in CSF ist in diesem
Beispiel eine Trennung der peptidischen Inhaltsstoffe notwendig. Diese
20 Probenvorbehandlung dient der Anreicherung der erfindungsgemäßen Peptide und
zur Abtrennung von Komponenten, die die Messung stören können. Als
Trennverfahren wird eine Reverse Phase Chromatographie durchgeführt. Hierbei
eignen sich verschiedene RP-Chromatographie-Harze und Eluationsmittel
gleichermaßen. Im Folgenden ist beispielhaft die Trennung von OPN-Peptiden unter
25 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
30 einer Flusszelle Micro der Firma Agilent Technologies. Als Probe wurde humaner
Liquor cerebrospinalis verwendet. 440 µl Liquor wurden mit Wasser auf 1650 µl
verdünnt, der pH auf 2-3 eingestellt, die Probe für 10 Minuten bei 18000x g
zentrifugiert und schließlich 1500 µl der so vorbereiteten Probe auf die
Chromatographiesäule aufgetragen. Die Chromatographiebedingungen waren wie

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

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

Zur Massenanalyse werden typische Positiv-Ionen-Spektren von Peptiden in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Matrix- unterstützte Laserdesorptions-Ionisation) erstellt. Geeignete MALDI-TOF-Massenspektrometer werden von PerSeptive Biosystems Framingham (Voyager-DE, Voyager-DE PRO oder Voyager-DE STR) oder von Bruker Daltonik Bremen (BIFLEX) hergestellt. Zur Präparation der Proben werden sie mit einer Matrixsubstanz vermischt, die typischerweise aus einer organischen Säure besteht. Typische Matrix-Substanzen, die sich für Peptide eignen, sind die 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, die α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure und die 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Zur Messung der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide wird ein lyophilisiertes, nach Reverse Phase Chromatographie gewonnenes Äquivalent entsprechend 500 μ l humanem Liquor cerebrospinalis, verwendet. Die chromatographierte Probe wird in 15 μ l 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 Lösungsmittelgemisch 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" TM. Ein Beispiel für eine Messung eines der erfindungsgemäßen DROPN-Peptide zeigt Abbildung 3.

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

Beispiel 4: Massenspektrometrische Identifizierung von DROPN-Peptiden

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

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

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

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

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

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

5 Patienten- und Kontrollproben

20 Liquor Cerebrospinalis Proben von an progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankungen leidenden Patienten und 12 Proben von Kontrollpersonen wurden 1:50 mit Inkubationspuffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 1 % Rinder-Serum-Albumin, 0.05 % Tween 20) verdünnt und 100 μl der so verdünnten Proben in Doppelwerten in ELISA-Platten gegeben, die mit dem Anti-Human-OPN Antikörper O17 (Kaninchen Immunglobulin G) beschichtet waren, und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach 7-maligen Waschen mit je 200 μl Waschpuffer (0.05 % Tween 20 in Phosphatpuffer) wurden 100 μl je Kavität des sekundären Antikörpers, der mit dem Enzym Merettichperoxidase kovalent gekoppelt ist (Klon 10A16, monoklonaler Maus Immunglobulin G Antikörper) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Inkubationspuffer für 5,5 h bei 4°C inkubiert, anschließend erneut 9 mal mit Waschpuffer gewaschen und als Substrat eine Lösung von 0,2 mg/ml Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) in Substratpuffer (50 mM Na_2HPO_4 , 20 mM Zitronensäure, pH 5,0) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Durch Zugabe von 100 μl Stopplösung (0,5 M H_2SO_4) je Kavität wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und anschließend die Absorption bei 450 nm in einem Spektrophotometer der Firma TECAN, Modell SUNRISE gemessen. Eine Standardreihe bekannter Konzentrationen, hergestellt mit rekombinantem OPN wurde parallel in dem ELISA bestimmt und zur Quantifizierung herangezogen. Alle für den ELISA verwendeten Reagenzien wurden von der Firma IBL Hamburg bezogen. Die anhand der bekannten Konzentrationen der Standards berechneten OPN-Konzentrationen in den Liquor Cerebrospinalis Proben sind in Form von Box-Plots in Abbildung 7 dargestellt. Jede Box umschließt 50% der Datenpunkte mit dem statistischen Medianwert als Mittellinie. Die obere und untere Linie der Box geben die Limits für $\pm 25\%$ der Datenpopulation an. Die Linie oberhalb des oberen Kästchens wird als "Upper Quartile UQ", die untere Linie des unteren Kästchens als "Lower Quartile LQ" bezeichnet. Der Interquartilabstand "Interquartile Distance (IQD)" gibt den Abstand von unterer und oberer Quartile an. Die Linien, die

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

5

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

10

Literatur

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

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

Patentansprüche

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

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

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

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

21. Verwendung von Nukleinsäuren, die zu DROPN-Peptiden oder zu OPN-Proteinen korrespondieren zur indirekten Bestimmung und/oder Quantifizierung der zugehörigen Proteine und Peptide.
- 5 22. Verwendung eines Verfahrens entsprechend Anspruch 21, bei dem der Nachweis der OPN-Nukleinsäuren unter Verwendung von Northernblots, von Reverse Transkriptase PCR oder von quantitativer PCR erfolgt.
- 10 23. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, 18, oder 20 bis 22, zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Therapie für eine neurologische Erkrankung, insbesondere bei einer progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung, insbesondere bei Morbus Alzheimer.
- 15 24. Verwendung eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 bis 16 oder gemäß Anspruch 20 bis 22 zur Stratifizierung von Patienten die für Therapien oder klinische Studien neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer geeignet sind.
- 20 25. Nukleinsäuren, die zu DROPN-Peptiden korrespondieren.
26. Nukleinsäuren, die als OPN-spezifische Antisense-Nukleinsäuren oder als OPN-spezifische Ribozyme, oder als OPN-spezifische Triplex-Nukleinsäuren geeignet sind.
- 25 27. Agonisten oder Antagonisten der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten OPN-Peptide.
- 30 28. Peptide gemäß den in dem Verfahren nach Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptiden, oder Stoffe gemäß Anspruch 25 bis 27 wobei diese Peptide, Nukleinsäuren, 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 dem Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptiden, oder Stoffe gemäß Anspruch 25 bis 27, wobei diese Stoffe in einer Art und Weise galenisch aufbereitet oder chemisch oder biologisch modifiziert sind, dass sie für spezielle Applikationswege optimiert sind, insbesondere für die Gabe in den Blutkreislauf, den Gastrointestinaltrakt, den Urogenitaltrakt, das lymphatische System, in den Subarachnoidalraum, zur Inhalation oder zur direkten Injektion in Gewebe wie z.B. Muskelgewebe, Fettgewebe, Gehirn usw.

30. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder der Nukleinsäuren, Agonisten oder Antagonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 als Arzneimittel oder Arzneimittel-Wirkstoff.

31. Verwendung von wenigstens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder von Nukleinsäuren, Antagonisten oder Agonisten gemäß Anspruch 25 bis 27 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.

32. Verwendung wenigstens einer Substanz, die die Expression von OPN-Proteinen moduliert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.

33. Verwendung einer Substanz, die wenigstens an eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide bindet, insbesondere von Antikörpern, Antikörperfragmenten, PNAs oder Affinitätsmatrizen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder Behandlung neurologischer Erkrankungen, insbesondere chronisch-demenzieller Erkrankungen, insbesondere von Morbus Alzheimer.

34. Verwendung wenigstens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide oder der Nukleinsäuren, Antagonisten oder Agonisten gemäß

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

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

- c) Substanzen verabreicht werden, die die Prozessierung von OPN-Proteinen fördern, oder
- d) Agonisten der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten OPN-Peptide verabreicht werden

5

40. Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die in der Lage sind die Expression mindestens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide zu vermindern oder zu verstärken.

10

41. Screeningverfahren zur Identifizierung von Rezeptoren, oder Inhibitoren die mindestens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide binden.

42. Screeningverfahren zur Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten, mindestens eines der in Anspruch 1 bis 16 verwendeten Peptide.

OPN-Protein 1 MRIAVICFCLLGITCAIPVKQADSGSSEKQLYNKYPDAVATWLN
DROPN-1 VKQADSGSSEKQLYNKYPDAVAT
DROPN-27 VKQADSGSSEKQLYNKYPDAVA
DROPN-28 KQADSGSSEKQLYNKYPDAVAT
DROPN-2 r1-SEEKQLYN-r2
OPN-Protein 47 DPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDDEDDHVDSDSIDSNDSDDVDD
OPN-Protein 114 TDDSHQSDSHHSDSEDELVTDFPTDLPA TEVTPVPTVDYDGRGDSVVYGLRSKSKKFRRPDIQ
OPN-Protein 181 YPDATDEDTITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQ LDDQSAETHSHKQSRLYK
DROPN-3 A QDLNAPSDWDSRGKDSYETSQ LDDQSAETHSHKQSRLYK
DROPN-4 A QDLNAPSDWDSRGKDSYETSQ LDDQSAETHSHKQSRLY.
DROPN-29 QDLNAPSDWDSRGKDSYETSQ LDDQSAETHSHKQSRLY.
DROPN-5 LNAPSDWDSRGKDSYETSQ LDDQSAETHSHKQSRLY.
DROPN-6 DDQSAETHSHKQSRLY.
DROPN-7 DDQSAETHSHKQSRLY.
DROPN-8 r3-KDSYETSQ-r4
DROPN-9 r5-SAETHSHK-r6

Abbildung 1A:

OPN-Protein 248 RKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSEVN

DROPN-10 .KANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSEVN

DROPN-11 .KANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVVD

DROPN-30 ...NDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDML

DROPN-31 ...NDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDM

DROPN-12 SKVSREFHSHEFHSHED

DROPN-13 ...r7-SNEHSDVI-r8

DROPN-14 r9-REFHSHEF-r10

DROPN-15 LVVDPKSKEEDKH

DROPN-16 LVVDPKSKEEDKHL

DROPN-17 LVVDPKSKEEDKHLK

DROPN-18 LVVDPKSKEEDKHLKF

DROPN-19 LVVDPKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSE

DROPN-20 LVVDPKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSEVN

DROPN-21 VVDPKSKEEDKHLK

DROPN-22 VVDPKSKEEDKHLKF

DROPN-23 VVDPKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSE

DROPN-24 PKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSE

DROPN-25 r11-KSKEEDKH-r12

DROPN-26 r13-SHEIELDSAS-r14

Abbildung 1B:

3/10

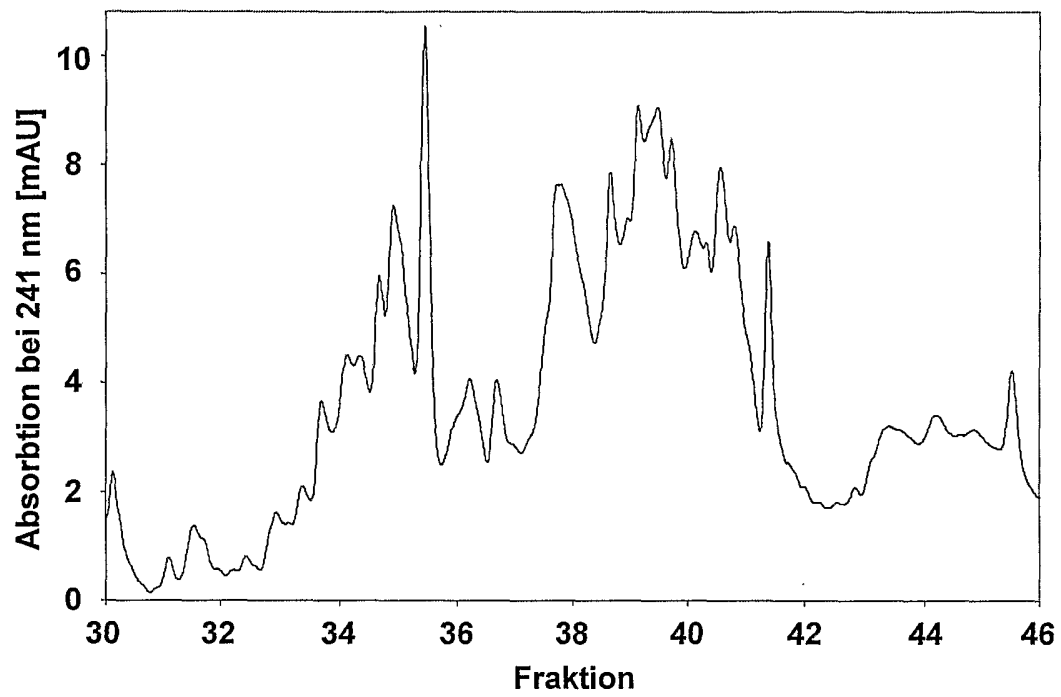
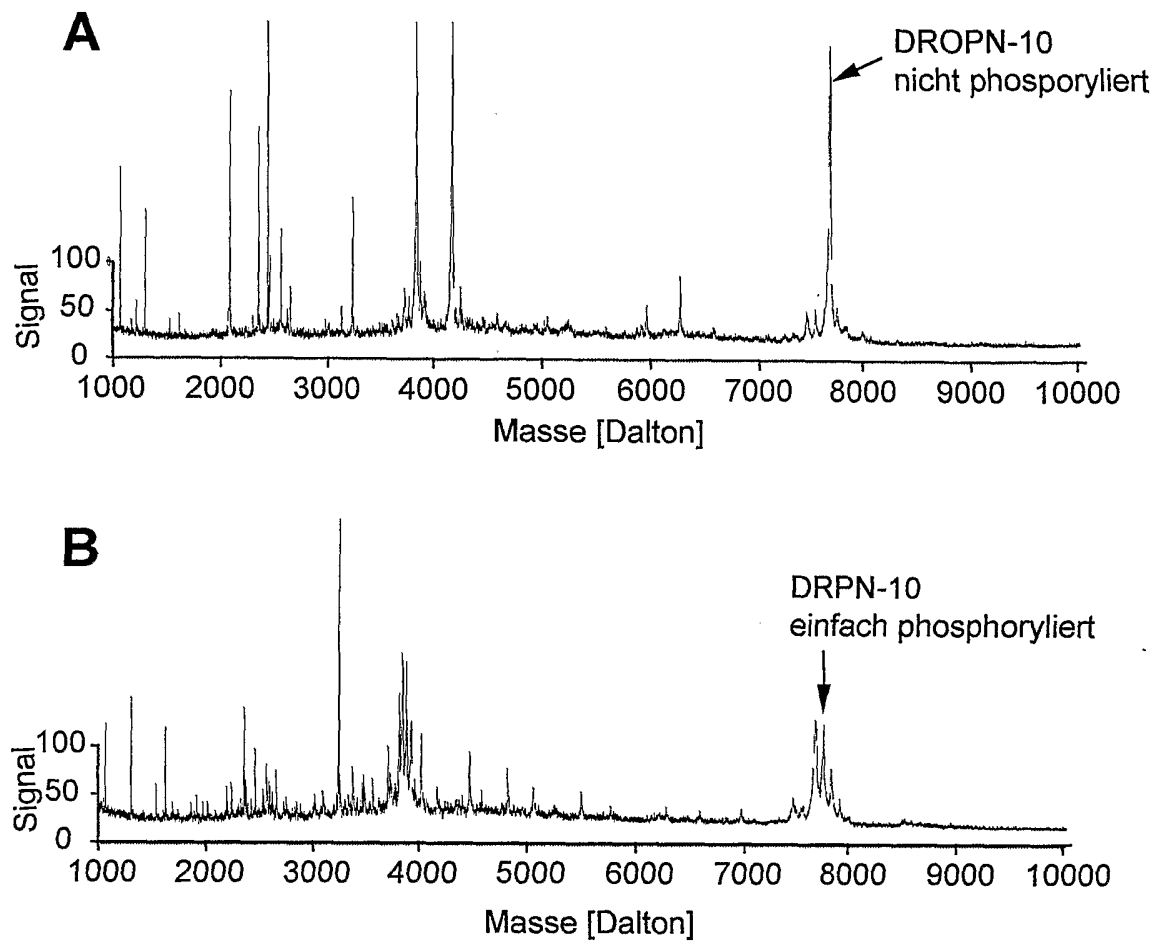


Abbildung 2:

4/10

**Abbildung 3:**

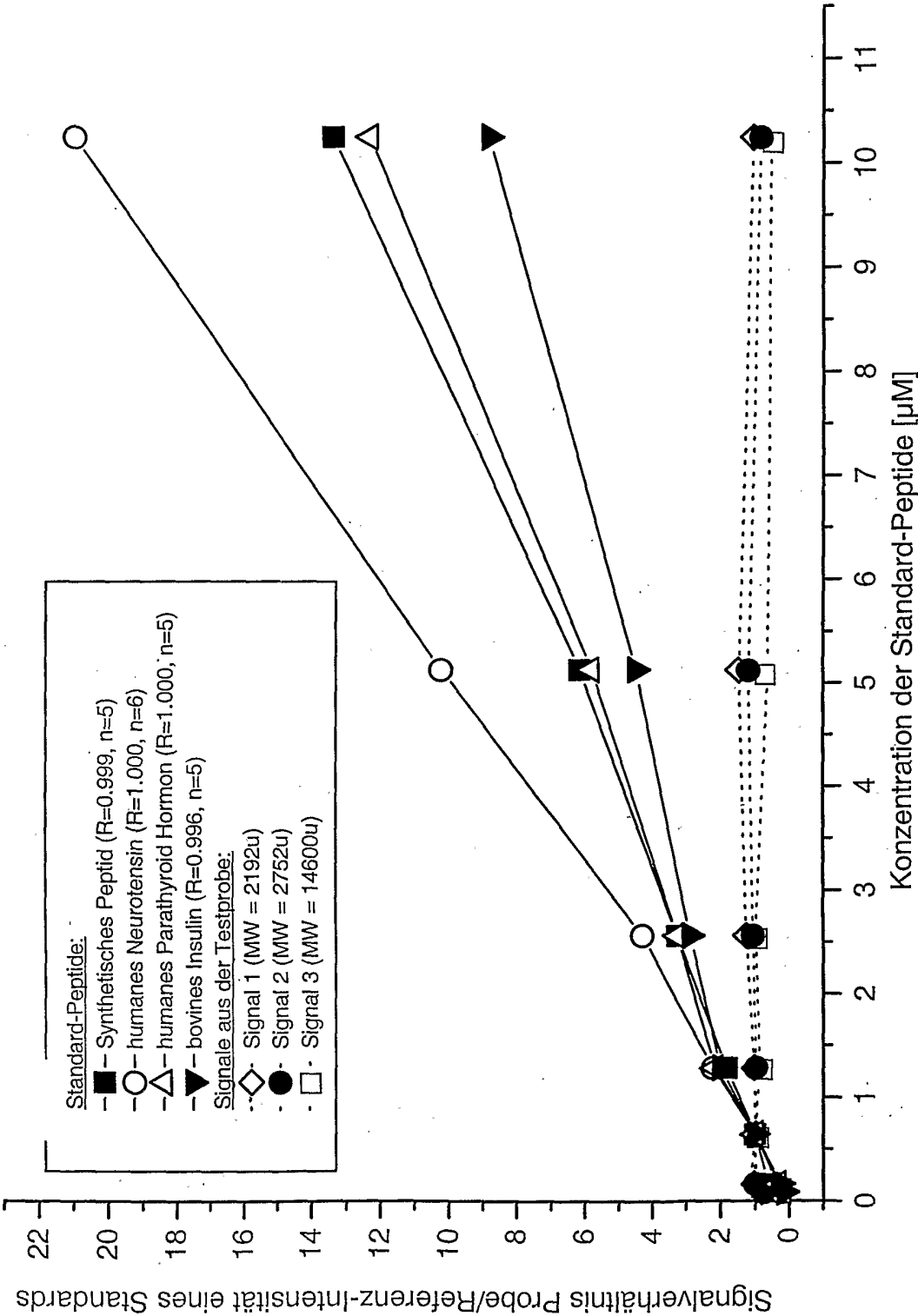


Abbildung 4:

6/10

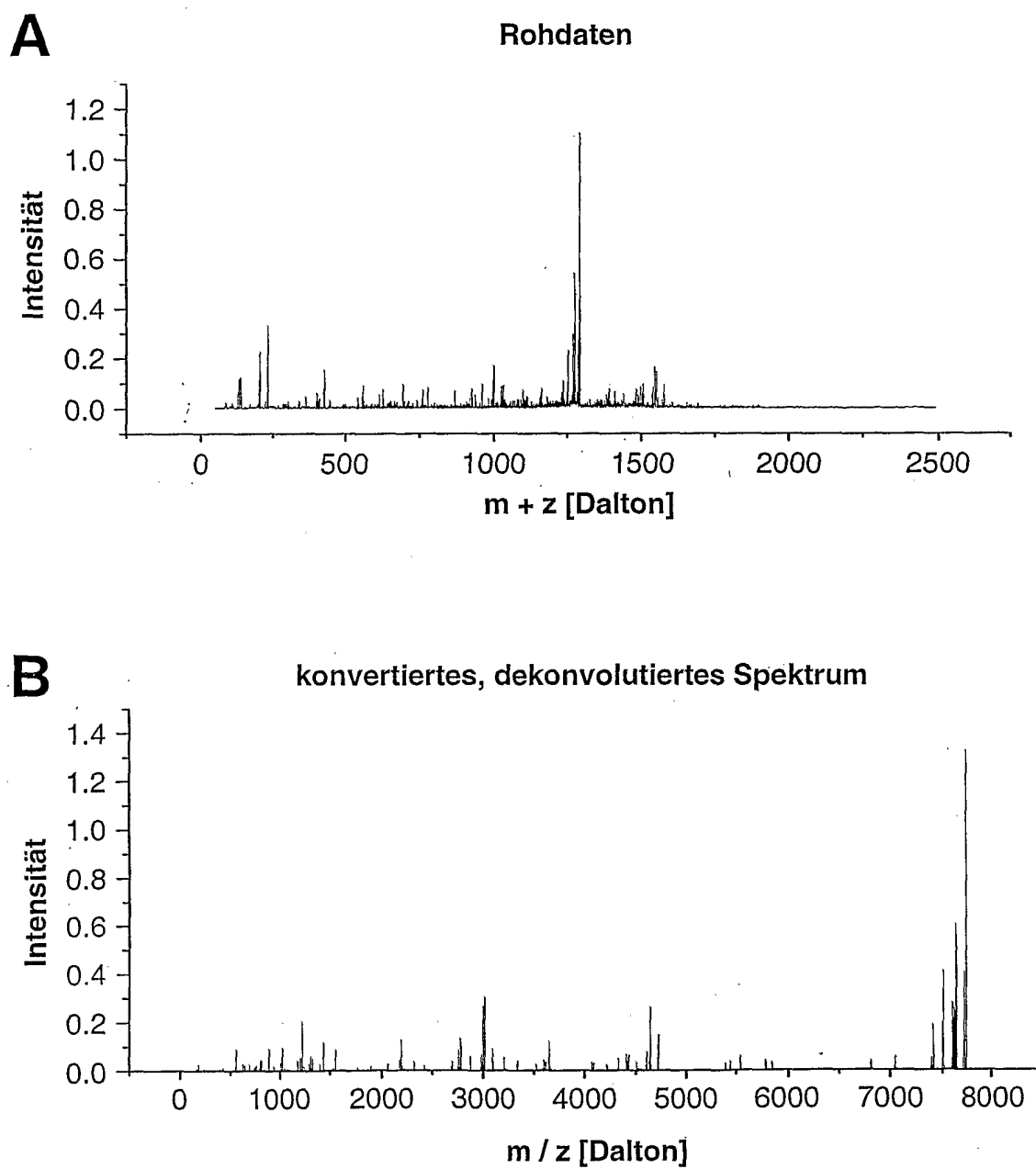


Abbildung 5:

7/10

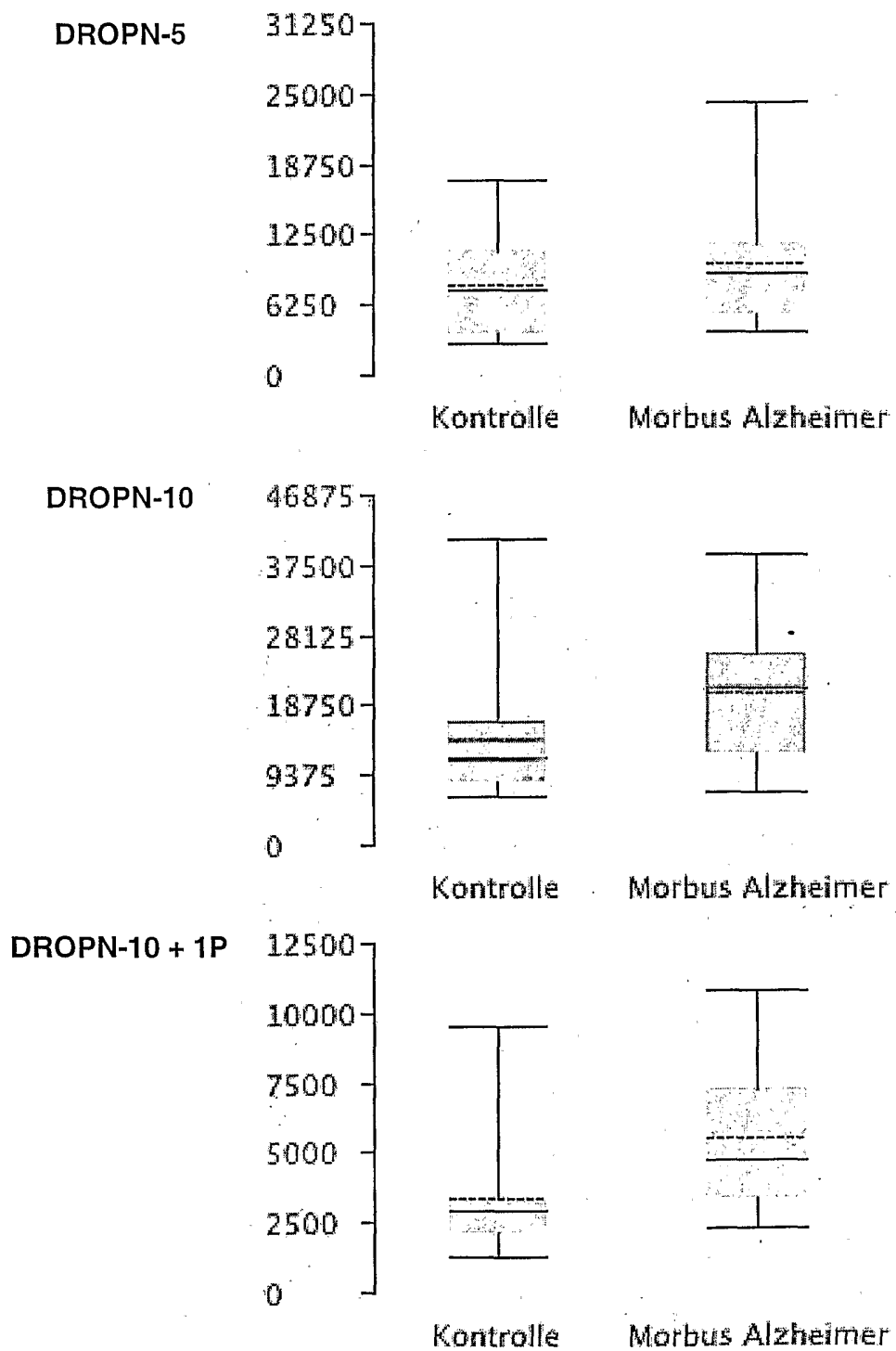


Abbildung 6A:

8/10

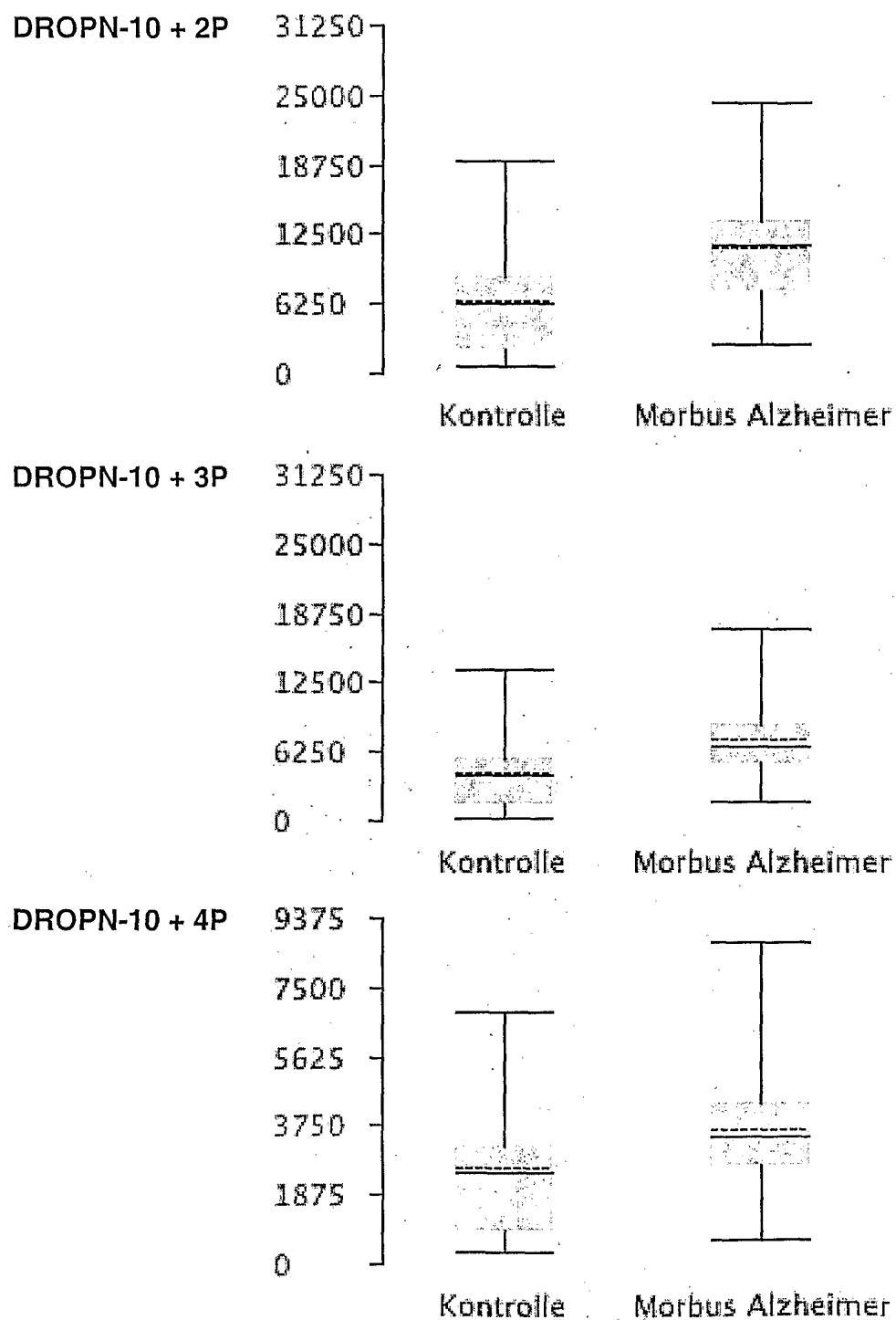


Abbildung 6B:

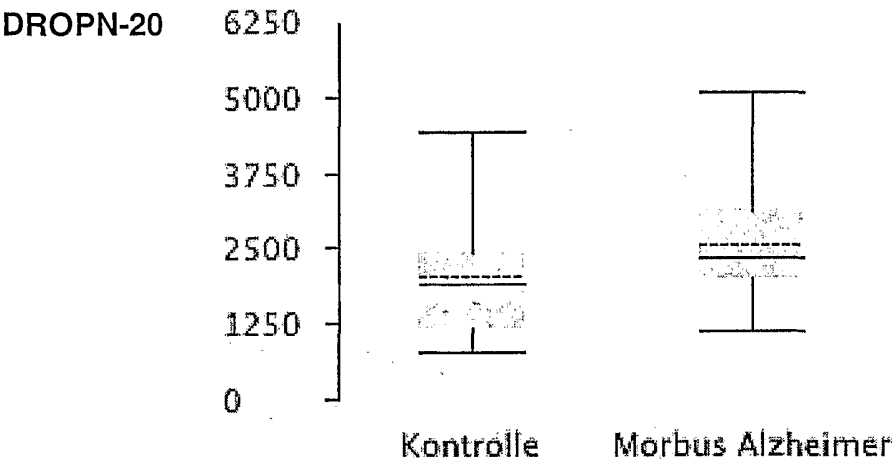


Abbildung 6C:

10/10

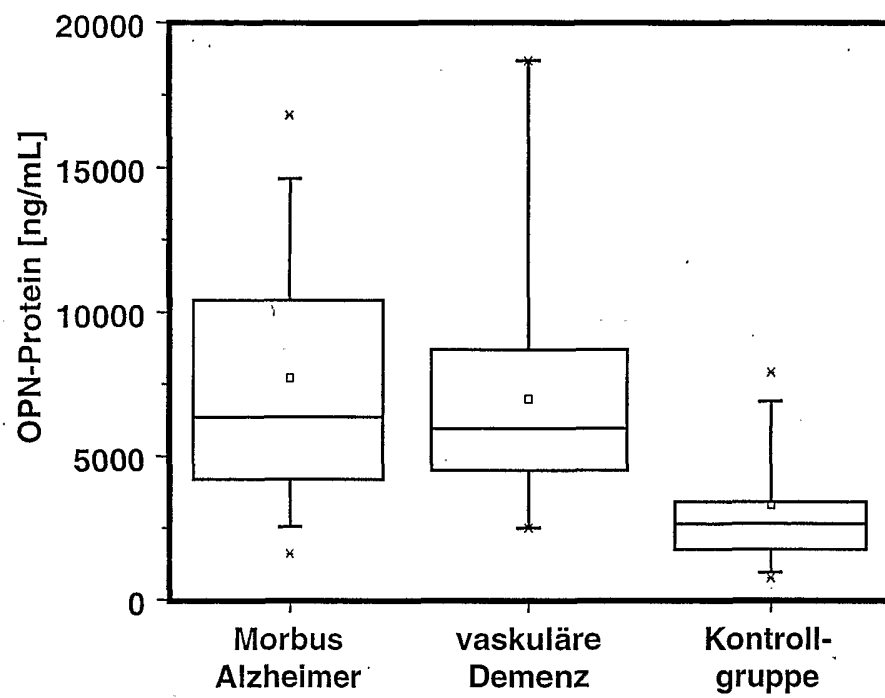


Abbildung 7:

Sequenzprotokoll (erstellt mit PatentIn 3.1)

SEQUENCE LISTING

5

<110> BioVision AG

10

<120> Verfahren zum Nachweis einer progredienten, chronisch-demenziellen Erkrankung zugehörige Peptide und Nachweisreagenzien

15

<130> OPN-PCT

20

<160> 31

25

<170> PatentIn version 3.1

30

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

35

<213> homo sapiens

40

<400> 1

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

45

Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr
20

50

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 2

10

Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn

1 5

15 <210> 3

<211> 36

<212> PRT

20

<213> homo sapiens

25 <400> 3

Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp

1 5 10 15

30

Ser Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser

20 25 30

35 His Lys Gln Ser
35

<210> 4

40

<211> 39

<212> PRT

45 <213> homo sapiens

<400> 4

50

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

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

10 His Lys Gln Ser Arg Leu Tyr
35

<210> 5

15 <211> 33

<212> PRT

20 <213> homo sapiens

<400> 5

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

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

Ser

35

<210> 6

<211> 15

40

<212> PRT

<213> homo sapiens

45

<400> 6

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

<210> 7

5 <211> 16

<212> PRT

10 <213> homo sapiens

<400> 7

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

20 <210> 8

<211> 8

<212> PRT

25 <213> homo sapiens

30 <400> 8

Lys Asp Ser Tyr Glu Thr Ser Gln
1 5

35 <210> 9

<211> 8

<212> PRT

40 <213> homo sapiens

45 <400> 9

Ser Ala Glu Thr His Ser His Lys
1 5

50

<210> 10

<211> 66

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 10

Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln

1 5 10 15

15

Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser

20 25 30

20

His Glu Asp Met Leu Val Val Asp Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys

35 40 45

25

His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu

50 55 60

Val Asn

30 65

<210> 11

35 <211> 40

<212> PRT

<213> homo sapiens

40

<400> 11

45 Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln

1 5 10 15

Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe His Ser

50 20 25 30

His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
35 40

5

<210> 12

<211> 17

10

<212> PRT

<213> homo sapiens

15

<400> 12

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

Asp

25

<210> 13

<211> 8

30

<212> PRT

<213> homo sapiens

35

<400> 13

Ser Asn Glu His Ser Asp Val Ile
40 1 5

<210> 14

45

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

50

<400> 14

5 Arg Glu Phe His Ser His Glu Phe
1 5

<210> 15

10

<211> 13

<212> PRT

15 <213> homo sapiens

<400> 15

20

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

<210> 16

25

<211> 14

<212> PRT

30

<213> homo sapiens

<400> 16

35

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

40

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

45

<213> homo sapiens

50

<400> 17

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

5

<210> 18

<211> 16

10

<212> PRT

<213> homo sapiens

15

<400> 18

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

20

<210> 19

25 <211> 28

<212> PRT

<213> homo sapiens

30

<400> 19

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

35

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

40

<210> 20

45 <211> 30

<212> PRT

<213> homo sapiens

50

<400> 20

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

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

<210> 21

15 <211> 14

<212> PRT

20 <213> homo sapiens

<400> 21

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

30 <210> 22

<211> 15

<212> PRT

35 <213> homo sapiens

40 <400> 22

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

45 <210> 23

<211> 27

50 <212> PRT

<213> homo sapiens

5 <400> 23

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

10

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

15 <210> 24

<211> 24

<212> PRT

20

<213> homo sapiens

25 <400> 24

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

30

Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu
20

35 <210> 25

<211> 9

<212> PRT

40

<213> homo sapiens

45 <400> 25

Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu
1 5

50

<210> 26

<211> 8

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 26

Ser His Glu Leu Asp Ser Ala Ser

1 5

15

<210> 27

<211> 23

20

<212> PRT

<213> homo sapiens

25

<400> 27

Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn

30 1 5 10 15

Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala

20

35

<210> 28

<211> 23

40

<212> PRT

<213> homo sapiens

45

<400> 28

Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu Tyr Asn Lys

50 1 5 10 15

Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr
20

5

<210> 29

<211> 33

10

<212> PRT

<213> homo sapiens

15

<400> 29

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

20

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

25

Ser

30

<210> 30

<211> 35

35

<212> PRT

<213> homo sapiens

40

<400> 30

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

45

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

50

Asp Met Leu
35

5 <210> 31

<211> 34

<212> PRT

10

<213> homo sapiens

15 <400> 31

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

20

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

25 Asp Met