

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4405919号  
(P4405919)

(45) 発行日 平成22年1月27日 (2010. 1. 27)

(24) 登録日 平成21年11月13日 (2009. 11. 13)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/68</b>	<b>(2006. 01)</b>	GO 1 N 33/68	
<b>GO 1 N 27/62</b>	<b>(2006. 01)</b>	GO 1 N 27/62	V
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006. 01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>CO 7 K 14/47</b>	<b>(2006. 01)</b>	CO 7 K 14/47	Z N A
<b>C 1 2 Q 1/37</b>	<b>(2006. 01)</b>	C 1 2 Q 1/37	

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2004-530120 (P2004-530120)  
 (86) (22) 出願日 平成15年8月11日 (2003. 8. 11)  
 (65) 公表番号 特表2005-536729 (P2005-536729A)  
 (43) 公表日 平成17年12月2日 (2005. 12. 2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/008879  
 (87) 国際公開番号 W02004/019043  
 (87) 国際公開日 平成16年3月4日 (2004. 3. 4)  
 審査請求日 平成18年2月28日 (2006. 2. 28)  
 (31) 優先権主張番号 02018283. 8  
 (32) 優先日 平成14年8月23日 (2002. 8. 23)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 02026643. 3  
 (32) 優先日 平成14年11月29日 (2002. 11. 29)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 507113188  
 バイエル・シェーリング・ファルマ・アク  
 チェンゲゼルシャフト  
 Bayer Schering Phar  
 ma Aktiengesellscha  
 ft  
 ドイツ連邦共和国デー-13353ベルリ  
 ン、ミューラーシュトラッセ178番  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦  
 (74) 代理人 100138900  
 弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の診断のためのバイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者からの試料における配列番号7のポリペプチドの検出を含む、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法。

【請求項2】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17を含むポリペプチドから選ばれるか、または、ヒトシスタチンC、ヒト - 2 - ミクログロブリン、ヒトミオグロビンの7.7 k D aホモログ、神経分泌タンパク質VGF、ヒトシスタチンCの少なくとも5アミノ酸のフラグメント、ヒト - 2 - ミクログロブリンの少なくとも5アミノ酸のフラグメント、ヒトミオグロビンの7.7 k D aホモログの少なくとも5アミノ酸のフラグメント、神経分泌タンパク質VGFの少なくとも5アミノ酸のフラグメントから選ばれる、少なくとも1つのさらなるポリペプチドが検出される、請求項1に記載のアルツハイマー病の状態を判定する方法。

【請求項3】

請求項1または2のいずれかに記載の方法を、同一の被験者から採取した少なくとも2つの別個の試料について行うことを特徴とする、アルツハイマー病の進行を調べる方法。

【請求項4】

前記ポリペプチドの検出がSELDI-TOFMSによるものである、請求項1~3

のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

特定の抗体または前記ポリペプチドを認識する抗体を該ポリペプチドの検出に用いる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記検出が、前記被験者の、C S Fを含む試料におけるものである、請求項 1 ~ 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は診断の分野に属する。より具体的には、本発明は、アルツハイマー病に特異的なマーカーポリペプチドの検出による、被験者におけるアルツハイマー病の状態の判定の分野に属する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病

アルツハイマー病は、65歳以上の人の痴呆全体の50~60%を占める増加傾向にある神経変性の形態である。病態としては、アルツハイマー病の神経変性は、神経死とニューロンのシナプスの損失による皮質辺縁(corticolimbic)構造の顕著な萎縮と、神経原線維変化(NFT)の形成、および脳内のアミロイド 1-42(A 42)凝集体の堆積物を含む老人斑の形成によって特徴付けられる[Francis PT 1999]。認識低下の進行が最初の兆候から死に至るまで約7年間継続する。発症期の前に、継続的なアミロイド班の堆積および神経原線維変化の前発症期が15~30年間あるとされている。疾患が発症し進行する年齢は、原因となる遺伝子の突然変異および遺伝的な罹患因子により大きく左右される。個人的な遺伝的危険因子に加え、いくつかの環境危険因子もあり得る。早期に発症する家族性アルツハイマー病に関係することが知られている遺伝因子は、プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2(PS2)およびアミロイド前駆体タンパク質(APP)遺伝子の突然変異、およびアポリポタンパク質E4対立遺伝子の存在である。但し、大部分(95%)のアルツハイマー病は、孤発性であり、異質性である。

【0003】

現在、アルツハイマー病の臨床診断は、疾患の後期、即ち脳の構造的変化と並行して認識力が有意に低下したときでのみ確定することができる。臨床診断には、入念な、病歴；生理学的および神経学的検査；アルツハイマー病に見せかけ得る医学的な疾患状態を排除するための血液、尿および脳脊髄液(CSF)検査、精神状態と認知力を判定するための詳細な精神鑑定、および脳のコンピューター断層撮影スキャンまたは磁気共鳴画像診断が必要である。専門施設での診断の精度は約80~85%である。これらの検査は、費用がかかる上、時間を要し、特に患者には不自由を強いるということから、CSF、血液または尿等の体液中で測定することができ、アルツハイマー病の診断に関して高い陽性適中率を有する、あるいはアルツハイマー病と他の形態の痴呆とを区別するのを助ける、容易に利用できる特異的な診断用生物分子マーカーの必要性が高まっている。さらに、疾患の進行に感受性のある信頼性のあるマーカーは、アルツハイマー病における新しい原因指向型且つ疾患修飾型の治療方法の評価と開発に必要な条件である代替のパラメーターとなり得る。

【0004】

CSFは脳のすぐ周囲に存在するので、そのタンパク質組成における変化は、タンパク質発現パターンの具体的な変化に関連する病理学的状態に最も正確に反映し得る。最近の10年間で、アルツハイマー病患者の脳脊髄液(CSF)における数多くの生物学的異常、特にアミロイド前駆体タンパク質のA 42フラグメントのレベルの変化、および高リン酸化tauタンパク質のレベルの変化、が報告されている。しかし、これらマーカーの感受性および特異性は、低いかまたは中程度でしかない[The Ronald and Nancy Reaga

10

20

30

40

50

n Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group, 1998, Robles A 1998, Teunissen CE et al., 2002 ]。

【 0 0 0 5 】

従って、( i ) アルツハイマー病をできるだけ早期に検出し；( i i ) 疾患を他のタイプの痴呆または神経変性疾患と区別することが可能で；( i i i ) 例えば臨床薬の開発において、代替のパラメーターとして、治療効果を監視し、薬物治療をできるだけ早期に開始して記憶の喪失と疾患の進行を遅らせるための、十分な感受性と特異性を有する新規のバイオマーカーが必要とされる。

【 0 0 0 6 】

プロテインチップ法

S E L D I - T O F M S ( Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation time of flight mass spectrometry ) と称するプロテインチップ法が近年開発され、複合的生物学的混合物のタンパク質のプロファイリングが容易になった [ Davies HA 2000, Fung ET 2001, Merchant M 2000 ]。

【 0 0 0 7 】

プロテインチップ質量分析は、血清、精漿、乳頭液、尿または細胞抽出液中の、前立腺および膀胱の [ Adam BL 2001 ] あるいは乳癌の [ Wulfkühle JD 2001 ] 可能性のある新規のバイオマーカーを検出するために既にいくつかのグループによって用いられている。S E L D I - T O F M S を用いるバイオマーカー検索についての概説は [ Issaq HJ 2002 ] を参照のこと。

【 0 0 0 8 】

シスタチン C

脳脊髄液 ( C S F ) において 1 9 6 1 年に最初に記載された。シスタチン C (  $\beta$ -trace またはポスト- グロブリン、Acc. No. P01034 ) は全てのヒトの体液中に生理学的に関係する濃度で存在する小さなシステインプロテアーゼ阻害物質である。シスタチン C の生理学的役割は、微生物の侵入あるいは死滅した細胞または病的な細胞からのリソソームプロテイナーゼの放出から生じる細胞外システインプロテアーゼ活性の調節のようである。シスタチン C は、アルツハイマー病の脳および大脳のアミロイド 血管障害において細胞壁内で  $\beta$ -アミロイド ( AB ) と共存する [ Levy E 2001 ]。これらは、3つの部位 ( 2 つはプロモーターにおける塩基対の変化であり、1 つは単一のペプチドドメインにおいてアミノ酸置換を引き起こす ( アラニンからトレオニンへ ) ) で互いに相違する、シスタチン C の CST3 遺伝コードの 2 つの共通のハプロタイプ ( A and B ) である。最近、症例対照研究により、晩年発症型アルツハイマー病の危険性の増大が CST3 と関連していることが認められた [ Crawford FC 2000, Finckh U 2000, Beyer K 2001 ]。

【 0 0 0 9 】

遺伝性シスタチン C アミロイド血管障害 ( HCCAA ) とも称される、hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type ( HCHWA-I ) は、常染色体優性型の脳アミロイド血管障害 ( C A A ) である。脳の血管壁に蓄積したアミロイドは主に Leu68-Gln 置換の存在によって特徴付けられるシスタチン C 変異体から構成される [ Cohen 1983, Ghiso 1986 ]。この病態は、脳脊髄液中のこの主要なプロテイナーゼ阻害物質の濃度の減少と結びついており、脳におけるアミロイド蓄積につながる [ Grubb AO 1984 ]。

【 0 0 1 0 】

Leung-Tack らはまた、腎臓移植を受けた 1 人の患者から得た尿中のシスタチン C の 2 つの N 末端欠失型異性体を精製した。それらのデータによれば、( des1-4 ) シスタチン C は、ヒト末梢単核球 ( P M N ) 細胞；N 末端配列「 K P P R 」に起因し得る 2 つの機能、O<sub>2</sub> 放出および食作用、に対して阻害効果を有する。それらのデータは、炎症における可能性のある免疫調節物質としてのシスタチン C に関する潜在的に重要な役割を支持している。これまでの証拠は、細胞の機能に対するフリーラジカル介在の損傷の増大が、加齢プロセスと、年齢に関係する神経変性障害とに寄与することを示している。酸化ストレスは、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 ( A L S ) において役割を担

10

20

30

40

50

っている。ニューロンに対するフリーラジカルによる損傷は、これら疾患を発症する一義的な事象ではないかもしれないが、フリーラジカルによる損傷は、これら疾患の病理学的カスケードに關与するものとみられる。

【 0 0 1 1 】

ベータ - 2 - ミクログロブリン

ベータ - 2 - ミクログロブリン (Acc. No. P01884) は、クラス I 主要組織適合複合体 (C M H) の小さい定常領域を構成するものであり、体液中のその存在は、膜タンパク質回転率と排出との間のバランスを示す。このペプチドは、免疫応答の上昇によって特徴付けられる疾患において増加するとみられるので、体液中のその定量は、in vivoでの免疫学的状態の有用な指標である [Hoekman et al 1985]。このタンパク質の機能は不明であるが、グリア細胞の破壊を伴う疾患に関わっているようである [Ernerudh et al 1987]

10

【 0 0 1 2 】

本発明によって解決される技術的課題は、アルツハイマー病を診断するためのおよび/または被験者におけるアルツハイマー病の進行を監視するための方法を提供することである。

【 0 0 1 3 】

神経分泌タンパク質 (V G F)

V G F (ヒトVGF, Acc. -No. : 015240) は、神経細胞によって発現しプロセッシングされる分泌性ペプチド前駆体である [Canu et al. 1997]。成体ラット大脳中枢神経系における in situハイブリダイゼーション試験により、VGFmRNAが脳全体に広く分布し、海馬、内膜皮質、および新皮質において顕著に発現することが明らかになった。さらに、VGF転写および分泌は、ニューロトロフィン様 N G F および B D N F によって、および in vivoの脱分極によって選択的にアップレギュレートされる。B D N F 発現の増大は、アルツハイマー病が原因で早期に死滅すると見られる組織である海馬の歯状回と C A 3 領域において観察することができる。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 4 】

発明の記載

本発明は、健康な対照群と比較した場合、アルツハイマー病を有する被験者では特定のポリペプチドの発現量が異なるという意外な知見に基づくものである。これらの発現量の異なるポリペプチドは、例えばアルツハイマー病であると診断された被験者の脳脊髄液の試料中で検出することができる。本発明の個々のポリペプチドは、単独でまたは本発明の他のポリペプチドと組み合わせて検出および/または定量することができる。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 5 】

本発明のポリペプチドマーカーは、その各々の分子量によって定義される。実施例に記載のSAX2法によって同定される5つのマーカーは以下の分子量を示す：

マーカー 1 (M 1) : 4 8 2 4 ± 2 0 D a ;

マーカー 2 (M 2) : 7 6 9 1 ± 2 0 D a ;

マーカー 3 (M 3) : 1 1 7 8 7 ± 2 0 D a ;

マーカー 4 (M 4) : 1 1 9 8 8 ± 2 0 D a ;

マーカー 5 (M 5) : 1 3 4 1 6 ± 2 0 D a .

40

【 0 0 1 6 】

表 1 は、S E L D I - T O F M S によって測定された、ポリペプチド マーカー M 1 ~ M 5 の観察された分子量、ポリペプチド マーカー M 1 ~ M 5 の観察されたフラグメントのアミノ酸配列、およびポリペプチド マーカー M 1 ~ M 5 が由来するタンパク質を示す。

【表 1】

マーカー	SELDI で観測された分子量	アミノ酸配列	タンパク質名
M1	4823.5 Da±1.7	VGEEDEEAAEAEAEAEER	VGf4.8
M2	7691.4 Da±4.9	XXAD(L/I)AGHG(Q/K)EV(L/I)(L/I)R HGTVV(L/I)TA(L/I)GG(L/I)(L/I)K	ヒトミオグロビン 新規変異体
M3	11786.9 Da±7.6	VNHVTLSPK	ヒト ベータ-2- ミクログロブリン
M4	11988.4 Da±5.9	VEHSDLSFSK IEKVEHSDLSFSK SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK	
M5	13416.4 Da±9.4	ASNDMYHSR ALDFAVGEYNK RALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR QIVAGVNYFLDVELGR LVGGPMDASVEEEGVR KQIVAGVNYFLDVELGR TQPNLDNCPFHDQPPHLK TQPNLDNCPFHDQPPHLKR SSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVR	ヒトシスタチンC

10

20

## 【0017】

本発明の発現量の異なるポリペプチドは、例えば、アルツハイマー病であると診断された被験者の脳脊髄液の試料中で検出することができる。さらに、具体的な態様に依存して、本発明のポリペプチドマーカーの量を測定するための試料元は血液、精子または尿であ

30

## 【0018】

図1に示されるように、陰性の診断結果（健常対照）と比較して、M1の発現量はアルツハイマー病患者のCSFにおいて低く（ $p < 0.05$ ）、マーカーM2～M5の発現量はアルツハイマー病患者のCSFにおいて高い（ $p < 0.05$ ）。

## 【0019】

健常対照の被験者の本発明のポリペプチドのレベルとの比較における本発明の1またはいくつかのポリペプチドのレベルの変化によって、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定するおよび/またはその進行を監視することができ、アルツハイマー病処置の有効性を監視することができ、そして医薬品開発のための有用な情報となる。さらに、これ

40

## 【0020】

アルツハイマー病であると診断され監視される好ましい被験者はヒトである。但し、本発明のアルツハイマー病の診断は、他の哺乳類においても可能である。必要ならば、本発明のペプチドマーカーのオルソログを用いることができる。

## 【0021】

本発明はさらに、被験者の体液から採取した試料中の特定のポリペプチドの量を検出および/または定量することによる、ヒトの被験者におけるアルツハイマー病を検出するための、およびヒトの被験者におけるアルツハイマー病の進行を判定するための質量分析法

50

(MS)の使用に関する。本発明の好ましい態様では、試料は被験者の脳脊髄液(CSF)から採取する。

【0022】

本発明のポリペプチドの検出および/または定量は、好ましくは、本発明のポリペプチドのM/z比に対応する特定の質量電荷数比(M/z)にてMSにより検出されるシグナルを数値化することによって達成する。好ましくは、本発明のポリペプチドに近いM/z比もまた測定する。

【0023】

本発明のポリペプチドの検出および/または定量はまた、特定のマーカまたはそのポリペプチドフラグメントに対して惹起した特異的な抗体を用いるイムノアッセイを用いることにより行うことができる。精製されたマーカまたはそのフラグメントを用いるか、または合成あるいは当分野で周知の任意の適当な方法[Coligan 1991]を用いて組換えにより発現させたマーカの特定のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いることにより製造することができる。そのような技術には、ファージまたは適当なベクター中の組換え抗体のライブラリーから抗体を選択することによる抗体調製、並びにウサギまたはマウスを免疫することによるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製[Huse 1989, Ward 1989]が含まれるがこれに限定されない。抗体を用意したら、任意の数多くの標準的な免疫学的結合分析を用いてマーカを検出および/または定量することができる[米国特許第4,366,241号;同第4,376,110号;同第4,517,288号;および同第4,837,168号]。有用な分析法としては、例えば、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、例えば酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンブロット分析またはスロットもしくはドットブロット分析等が挙げられる。一般的なイムノアッセイの概説としては、Coligan 1991を参照のこと。一般に、被験者から得た試料をマーカに特異的に結合する抗体と接触させることができる。体液混合物試料から特定のマーカを捕捉するための有力な技術は、ガラスまたはプラスチック、例えばマイクロタイタープレート、スティック、ビーズ、またはマイクロビーズのような固体の支持体に固定化された抗体を使用するものである。あるいは、マーカを、SELDI-ベースのイムノアッセイについて記載されているように、プローブ基質またはプロテインチップアレイに固定化した特異的な抗体によって体液試料から捕捉することもできる[Xiao2001]。試料を抗体とインキュベーションした後、結合しなかった物質を特定の条件下で洗浄し、形成した抗体-マーカ複合体を適当な検出試薬を用いて検出することができる。SELDIプロテインチップアレイ法を用いる態様では、固定化抗体によって選択的に豊富化されたマーカを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法によって検出し定量することができる。

【0024】

1.

本発明は、具体的には、

i) 分子量  $4824 \pm 20$  Da のポリペプチド、  
 ii) 分子量  $7691 \pm 20$  Da のポリペプチド、  
 iii) 分子量  $11787 \pm 20$  Da のポリペプチド、  
 iv) 分子量  $11988 \pm 20$  Da のポリペプチド、および  
 v) 分子量  $13416 \pm 20$  Da のポリペプチド  
 からなるポリペプチドの群に含まれる少なくとも一つのポリペプチドの検出を含んでなる、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法に関する。

【0025】

本発明はさらに、分子量が各々  $4824 \pm 20$  Da、 $7691 \pm 20$  Da、 $11787 \pm 20$  Da、 $11988 \pm 20$  Da、 $13416 \pm 20$  Da、 $4769 \pm 20$  Da、 $6958 \pm 20$  Da、 $6991 \pm 20$  Da、 $13412 \pm 20$  Da、 $13787 \pm 20$  Da、 $17276 \pm 20$  Da、 $40437 \pm 20$  Da、 $6895 \pm 20$  Da、 $6928 \pm 20$  Da、 $7691 \pm 20$  Da、 $7769 \pm 20$  Da、 $7934 \pm 20$  Da、 $5082 \pm 20$  D

a、6267 ± 20 Da、6518 ± 20 Da、7274 ± 20 Daおよび8209 ± 20 Daであるポリペプチドの群に含まれる少なくとも1つのポリペプチドの検出を含む、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法に関する。

【0026】

1つのそのようなポリペプチドの検出は、ほとんどの場合、アルツハイマー病を信頼性を持って診断するのに十分であるが、本発明の2またはそれ以上のポリペプチドの検出は本方法の感受性と信頼性を高めることができる。好ましくは、前記ポリペプチドの1、2、3、4、5、10、最も好ましくは前記ポリペプチドの全部を同じ試料から検出する。この検出はまた、好ましくは健康な被験者と比較してアルツハイマー病を有する被験者において発現量が異なる他のポリペプチドの検出と同時にを行うことができる。「アルツハイマー病の状態を判定すること」とは、被験者または患者におけるアルツハイマー病の存在を診断すること、被験者または患者におけるその疾患の進行を判定すること、および/またはアルツハイマー病が進行する患者の傾向を調べることで理解される。

10

【0027】

2.

本発明はさらに、前記ペプチドの群のうち、2、または3、または4、または5のポリペプチドが検出される、上記1の方法に関する。本発明はさらに、前記ペプチドの群のうち、2、または3、または4、または5、または10またはすべてのポリペプチドが検出される、上記1の方法に関する。

【0028】

3.

本発明はさらに、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、および/または配列番号16の配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの検出を含む、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法に関する。本発明はさらに、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、および/または配列番号17の配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの検出を含む、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法に関する。1つのそのようなポリペプチドの検出は、ほとんどの場合、アルツハイマー病を信頼性を持って診断するのに十分であるが、本発明の2またはそれ以上のポリペプチドの検出は本方法の感受性と信頼性を高め得る。好ましくは、前記ポリペプチドの1、2、3、4、5、10または全部を同じ試料から検出する。この検出はまた、好ましくは健康な被験者と比較してアルツハイマー病を有する被験者において発現量が異なる他のポリペプチドの検出と同時にを行うことができる。

20

30

【0029】

4.

本発明はさらに、以下からなる群に含まれる少なくとも1つのポリペプチドの検出を含む、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法に関する：

40

i) ヒトシスタチンC;

ii) ヒト - 2 - ミクログロブリン、

iii) ヒトミオグロビン (新規変異体)

iv) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、ヒトシスタチンCフラグメント

v) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、ヒト - 2 - ミクログロブリンフラグメント

vi) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、ヒトミオグロビン (新規変異体) フラグメント。

【0030】

本発明はさらに、以下からなる群に含まれる少なくとも1つのポリペプチドの検出を含む

50

む、被験者におけるアルツハイマー病の状態を判定する方法に関する：

i) ヒトシスタチンC、

ii) ヒト  $\beta$ -2-ミクログロブリン、

iii) ヒトミオグロビン(新規変異体)

iv) 神経分泌タンパク質VGF

v) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、ヒトシスタチンCフラグメント

vi) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、ヒト  $\beta$ -2-ミクログロブリンフラグメント

vii) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、ヒトミオグロビン(新規変異体)フラグメントおよび

viii) 少なくとも5、8、10または20アミノ酸の、神経分泌タンパク質VGFフラグメント。

【0031】

1つのそのようなポリペプチドの検出は、ほとんどの場合、アルツハイマー病を信頼性を持って診断するのに十分であるが、本発明の2またはそれ以上のポリペプチドの検出は本方法の感受性と信頼性を高め得る。好ましくは、前記ポリペプチドの1、2、3、4、5または6を同じ試料から検出する。より好ましくは、好ましくは、前記ポリペプチドの1、2、3、4、5、6または全部を同じ試料から検出する。この検出はまた、好ましくは健康な被験者と比較してアルツハイマー病を有する被験者において発現量が異なる他のポリペプチドの検出と同時にを行うことができる。

【0032】

5.

本発明はさらに、同一の被験者から得られた2つの別個の試料をについて上記1~4のいずれかの方法を行うことを特徴とする、アルツハイマー病の進行を調べる方法に関する。この目的のために、種々の時点で被験者から採取した試料を分析する。各々のポリペプチドの量の変化によってその被験者におけるアルツハイマー病の進行についての結論付けが可能になる。

【0033】

6.

本発明はさらに、前記ポリペプチドの検出がSELDI-TOFMSによるものである、上記1~5のいずれかの方法に関する。他の、適当な質量分析法および代替りの他の検出方法を用いることができる。より具体的には、本発明は、該ポリペプチドの検出がハイドロホビックH50、WCX2、またはIMAC表面をイオン化の後に支持体として用いる、SELDI-TOFMSによるものである。イオン化のための支持体の違いにより、目的の特定のタンパク質に対して異なる感受性が得られる。

【0034】

7.

本発明はさらに、特異的な抗体または前記ポリペプチドを認識する抗体を該ポリペプチドの検出に用いる、上記1~5のいずれかの方法に関する。

【0035】

8.

本発明はさらに、前記被験者のCSFを含む試料における検出である上記1~7の方法に関する。被験者から採取する試料は、採取後に即処理するか、まず凍結し、後で分析することができる。試料はまた、血液、血清、血漿、尿、精漿、乳頭液または細胞抽出液等のその他の体液から構成されていてもよいし、これを含含有していてもよい。

【0036】

9.

本発明はさらに、分子量 $4824 \pm 20$ Daのポリペプチド、分子量 $7691 \pm 20$ Daのポリペプチド、分子量 $11787 \pm 20$ Daのポリペプチド、分子量 $11988 \pm 20$ Daのポリペプチド、分子量 $13416 \pm 20$ Daのポリペプチドを含むキットに関する

10

20

30

40

50

る。本発明はさらに、分子量  $4824 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $7691 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $11787 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $11988 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $13416 \pm 20$  Da のポリペプチドを含むキットに関する。本発明はさらに、分子量  $4824 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $7691 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $11787 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $11988 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $13416 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $4769 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $6958 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $6991 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $13412 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $13787 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $17276 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $40437 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $6895 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $6928 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $7691 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $7769 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $7934 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $5082 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $6267 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $6518 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $7274 \pm 20$  Da のポリペプチド、分子量  $8209 \pm 20$  Da のポリペプチドを含むキットに関する。このようなキットは、種々の目的に、例えば、上記方法のいずれかにおいて標準として使用するために、適用することができる。このキットは、前記ポリペプチドの 2、5、10 または全部を含むことができる。

10

【0037】

10 .

20

本発明はさらに、少なくとも 5 アミノ酸のヒトシスタチン C フラグメント、少なくとも 5 アミノ酸のヒト - 2 - ミクログロブリンフラグメント、少なくとも 5 アミノ酸のヒトミオグロビンフラグメントを含むキットに関する。このキットは、種々の目的に、例えば、上記方法のいずれかにおいて標準として使用するために、適用することができる。本発明はさらに、少なくとも 5、10 または 20 アミノ酸のヒトシスタチン C フラグメント、少なくとも 5、10 または 20 アミノ酸のヒト - 2 - ミクログロブリンフラグメント、少なくとも 5、10 または 20 アミノ酸のヒトミオグロビンフラグメントおよび少なくとも 5、10 または 20 アミノ酸の神経分泌タンパク質 VGF のフラグメントを含むキットに関する。これらのキットは、種々の目的に、例えば、上記方法のいずれかにおいて標準として使用するために、適用することができる。

30

【実施例】

【0038】

以下の 1 またはいくつかの実施例によって本発明をさらに説明する。これらの実施例は、本発明の範囲を実施例の範囲に限定するものと決して理解してはならない。

【0039】

実施例 1：患者の評価および CSF 採取

ヒトの被験者におけるアルツハイマー病の診断は、National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NTNCDS-ADRD) の診断基準に従った。アルツハイマー病群は 9 人の患者からなる ( $75 \pm 7$  歳、男性 6 人、女性 3 人)。健常者の対照群は 10 人で構成される ( $78 \pm 14$  歳、男性 2 人、女性 8 人、病歴なし、精神病あるいは神経系疾患の症状・兆候なし)。

40

【0040】

試験の前に、各患者とその介護人に対しインフォームド・コンセントを行った。実験は現地の倫理委員会により承認された。腰椎穿刺の後、CSF 試料を採取後ベッドの横ですぐに  $0.5$  mL ずつドライアイス上で凍結し、分析まで  $-80$  で保存した。

【0041】

実施例 2：CSF の SAX2 チップ上でのプロテインチップ SELDI 解析

SAX2 プロテインチップアレイ (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, USA) を  $5 \mu$  L の結合緩衝液 ( $100$  mM 酢酸ナトリウム  $\text{pH} = 4.0$ ) で 5 分間平衡化した。緩衝液を

50

ハンカチーフで注意深く除き、2.5 µLの結合緩衝液をウェルに加えた。粗製のCSF 試料(2.5 µL)をウェルに加え、ロッキングプラットフォーム上、調湿チャンパー内で室温にて20分間インキュベーションした。CSFを取り出し、ウェルを10 µLの結合緩衝液で5分間洗浄した。次いで、アレイを15 mL容の円錐エッペンドルフに入れ、結合緩衝液で5分間2回洗浄した。最後に、チップを蒸留水で2回リンスした。過剰の水を除去し、表面が湿っている間、50% (v o l / v o l)のアセトニトリルおよび0.5% (v o l / v o l)トリフルオロ酢酸中のシナピン酸(SPA)(2 mg/mL)0.5 µLを各ウェルに2回加え、乾燥した。次いで、アレイをプロテインチップリーダーシステム、P B S I I シリーズ(Ciphergen Biosystems)で読み取った。レーザービームを真空中試料に照射した。これによりタンパク質がマトリックスに吸収されイオン化されると同時にプロテインチップアレイ表面から脱離する。イオン化されたタンパク質を検出し、それらの分子量を飛行時間型(TOF)質量分析法により測定した。正イオンモードで収集したTOFマスペクトルは、レーザー出力を閾値よりも若干(閾値より10~15%高い)高くセットし、取得する高質量を40 kDaにセットし、1~15 kDaに最適化して、スポット中平均65のレーザー照射を用いて作成した。スペクトルを収集し、Ciphergen Proteinchip(バージョン3.0)ソフトウェアを用いて解析した。SPAマトリックス(1:1、v o l / v o l)に希釈した「all-in-1」ペプチド分子量標準(Ciphergen biosystems, Inc.)を用いてレーザーの外部校正を行い、ウェルに直接適用した。タンパク質プロファイルの比較を、同じ実験に含まれる全てのスペクトルの全イオン電流に対する標準化の後に行った。並行処理した、同じプロテインチップアレイの(アッセイ内チップ内再現性)の、2つの異なるチップの(アッセイ内チップ間再現性)、4つの異なるウェル上で同じCSF試料の別のアリコート进行分析することにより、そしてさらに実験を再現する(アッセイ間再現性)ことにより、再現性を試験した。

10

20

#### 【0042】

10人の対照と比較した9人の患者から得られたCSF試料の分析結果は、2つの群の間で5つのピークの発現量が有意( $p < 0.05$ )に異なっていることが明らかになった。発現量の異なる5つのタンパク質に関するおよその平均のSELDI質量は、4.82 kDa、7.7 kDa、11.8 kDa、12.0 kDa、13.4 kDa ( $p < 0.05$ )であった(表1、図1参照)。

#### 【0043】

実施例3：強陰イオン交換クロマトグラフィー(SAX)精製

これらのピークに対応するタンパク質を同定するために、粗製のCSFの分画をSAXスピンカラムにより行った。溶出画分をSELDI-TOF MSにより解析した。

#### 【0044】

SAXスピンカラム(ロット番号：SAX2-001116-01, Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, USA)を、平衡緩衝液(20 mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩(Tris-HCl)、5 mM NaCl、pH 9.0)中、4 にて一晩再水和した。カラムを室温に温め、気泡を除いた。重力にしたがってカラムマトリックスに平衡緩衝液を流した。平衡緩衝液(0.5 mL)をカラムに加え、樹脂に2回通した。2 mLのCSFを平衡緩衝液で希釈した(1:1、v o l / v o l)。タンパク質試料の画分0.8 mLをカラムに加え、カラムから1滴も出なくなるまで重力にしたがって通した。次いで、カラムを150 × g で1分間遠心した。次いで、樹脂を同体積の平衡緩衝液で洗浄した。全試料を樹脂に充填するために、この工程を数回繰り返した。結合したタンパク質の溶出は、pHを下げることによって行った。溶出緩衝液Aは、20 mM トリス-HCl、5 mM NaCl (pH 8.0)からなり；溶出緩衝液B = 20 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0)；溶出緩衝液C = 20 mM リン酸ナトリウム(pH 6.0)；溶出緩衝液D = 20 mM リン酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム(pH 5.0)；溶出緩衝液E = 20 mM リン酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム(pH 4.0)；溶出緩衝液F = 20 mM リン酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム(pH 3.4)；溶出緩衝液G = 30%アセトニトリル(溶出緩衝液F中)である。溶出緩衝液2 × 75 µLを加え、15

30

40

50

0 × g で 1 分間遠心することにより溶出を行った。回収した各画分 ( 1 5 0 μ L ) を speed-vac にて 1 0 μ L まで濃縮した。タンパク質のプロファイルを、SAX2 プロテインチップアレイを用いる SELDI-TOF MS により解析した。チップを 2 0 m M トリス - HCl、5 m M NaCl ( pH = 9 . 0 ) からなる結合緩衝液で平衡化した。各濃縮画分の 0 . 5 μ L のアリコートスポット毎に 2 . 5 μ L の結合緩衝液に直接加え、前に記載したとおりに処理した。画分の残りを以下に記載するようにトリストリシングル上加えた。

【 0 0 4 5 】

発現量が異なる 1 3 . 4 k D a のピークを緩衝液 A ( 2 0 m M Tris - HCl、5 m M NaCl pH 8 . 0 ) および緩衝液 B ( 2 0 m M リン酸ナトリウム pH 7 . 0 ) で溶出した。1 1 . 8 k D a および 1 2 . 0 k D a の発現量が異なるピークは、緩衝液 C ( 2 0 m M リン酸ナトリウム pH 6 . 0 ) および緩衝液 D ( 2 0 m M リン酸ナトリウム およびクエン酸ナトリウム pH 5 . 0 ) で溶出した画分中に認められた。7 . 7 k D a の集団は、緩衝液 D ( 2 0 m M リン酸ナトリウム およびクエン酸ナトリウム pH 5 . 0 ) および緩衝液 E ( 2 0 m M リン酸ナトリウム およびクエン酸ナトリウム pH 4 . 0 ) で溶出された。

10

【 0 0 4 6 】

溶出した各画分を 1 6 . 5 % のトリストリシンドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルに加え、電気泳動した ( SDS PAGE ) 。クーマシーブルーで着色した後、ゲル上に認められたバンドをもって SELDI 解析によって得られた結果とした。7 . 7 k D a、1 1 . 8 k D a および 1 2 . 0 k D a の集団に対応するバンドを切り出した。タンパク質を実施例 6 に記載のとおり抽出し、QTOF によって同定した。7 . 7 k D a のピークの MS 解析は、既知のいずれのタンパク質とも一致しなかったが、ミオグロビンの新規の変異体あるいはホモログを示し得る。

20

ペプチド配列は、以下の通りである

XXAD ( L / I ) AGHG ( Q / K ) EV ( L / I ) ( L / I ) R および  
HGTW ( L / I ) TA ( L / I ) GG ( L / I ) ( L / I ) K

【 0 0 4 7 】

1 1 . 8 k D a および 1 2 . 0 k D a のピークの MS 解析によってそれら両方についてベータ - 2 - ミクログロブリンと同定された。

30

【 0 0 4 8 】

1 3 . 4 k D a の集団はトリストリシングル上で認められなかったため、粗製の CSF 試料を用いてトリスグリシン SDS - PAGE 電気泳動を行った。ベータ - 2 - ミクログロブリンに対応するバンドがこの染色ゲル上で容易に認められた。ベータ - 2 - ミクログロブリンのすぐ上で凝集しているこのタンパク質は、SELDI プロファイルで認められるすぐ隣の豊富なタンパク質、即ち 1 3 . 4 k D a のピークに対応すると結論付けた。このバンドをゲルから切り出し、MALDI 解析の前にトリプシンにより消化した。ペプチド質量フィンガープリント解析により、シスタチン C の同定が可能になった。この解析によって得られるシーケンスカバー率は 6 0 % であった。

【 0 0 4 9 】

実施例 4 : 一次元電気泳動 / トリスグリシングル

2 0 μ L の CSF を 1 0 μ L 変性 Laemmli 緩衝液と混合した [ Laemmli 1970 ] 。試料を 9 5 に 5 分間加熱し、Laemmli の方法にしたがって 1 5 % T ( T = 全アクリルアミド濃度 ) の SDS - ポリアクリルアミドゲルに加えた。ゲルを、クーマシーブリリアントブルー R - 2 5 0 ( 0 . 1 % w / v ) とメタノール ( 5 0 % v / v ) を含有する溶液中で 3 0 分間染色した。メタノール ( 4 0 % v / v ) と酢酸 ( 1 0 % v / v ) を含有する溶液中で脱色を行った。

40

【 0 0 5 0 】

実施例 5 : 一次元電気泳動 : トリストリシングル

トリストリシングル SDS - PAGE 電気泳動を、Schagger および von Jagow [ 1987 ]

50

にしたがって16.5% Tゲル(Biorad, Hercules, CA)を用いて行った。陽極緩衝液を、0.2M Tris-HCl、pH 8.9で構成し、陰極緩衝液を0.1M Tris-HCl、0.1M トリシン、0.1% SDS、pH 8.25で構成した。試料を、10 $\mu$ Lの50mM トリス-HCl、4% (w/v) SDS、12% (w/v) スクロース、5% (v/v)  $\beta$ -メルカプトメタノールおよび微量のプロモフェノールブルー(pH 6.8)中に希釈した。95 $^{\circ}$ Cで5分間変性した後、試料をゲルに加えた。ゲルを80Vで3時間泳動した。電気泳動の後、ゲルを40%メタノール、10%酢酸で30分間固定した。次いで、ゲルをコロイダルブルーG250で一晩染色し、30%メタノール中で脱色した。同定するバンドを迅速にカットし、エッペンドルフ中に移し、さらに解析するまで4 $^{\circ}$ Cに維持した。ポリペプチド分子量(MW)標準：トリオースリン酸イソメラーゼMW 26,625；ミオグロビンMW 16,950； $\beta$ -ラクトアルブミンMW 14,437；アプロチニンMW 6,512；インスリンb鎖酸化型MW 3,496およびバシトラシンMW 1,423(Biorad)を泳動することにより、明白な分子量の測定を行った。

#### 【0051】

実施例6：タンパク質消化およびペプチド抽出[Bienvenu1999]

目的のタンパク質を含有するゲルのフラグメントを、以前に公開された手順[Shevchenko 1996, Hellman 1994, Rosenfeld 1992]を用いてそのタンパク質をトリプシン消化するため切り出し、以下のように修飾した。まず、ゲルの切片を、50mM炭酸水素アンモニウム、30% (v/v)アセトニトリル100 $\mu$ Lで15分間、室温で脱色した。変性溶液を除去し、50mM炭酸水素アンモニウム中の25 $\mu$ Lの10nM DL-ジチオスレイトール(DTT)に置き換え、56 $^{\circ}$ Cにて35分間インキュベーションした。次いでDTT溶液を50mM炭酸水素アンモニウム中の55mMヨードアセトアミド25 $\mu$ Lに置き換え、暗所にて室温で45分間インキュベーションした。ゲル切片を、50mM炭酸水素アンモニウム100 $\mu$ Lで10分間洗浄し、50mM炭酸水素アンモニウムおよび30% (v/v)アセトニトリル100 $\mu$ Lで10分間洗浄した。

#### 【0052】

次いで、ゲル切片をHetovac真空遠心(HETO, Allerod, Denmark)にて30分間乾燥した。乾燥したゲル切片を、トリプシンを6.25ng/ $\mu$ L含有する50mM炭酸水素アンモニウム5~20 $\mu$ L中で、4 $^{\circ}$ Cにて45分間再水和した。37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした後、ゲル切片を高真空遠心下で乾燥した後、蒸留水を20 $\mu$ L添加することにより再水和し、最後に再びspeed-vacにて30分間乾燥した。ペプチドの抽出は、0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)20 $\mu$ Lで時々振りながら室温にて20分間行った。ペプチドを含有するTFA溶液をポリプロピレンチューブに移した。2回目の溶出を、50% (v/v)アセトニトリル中の0.1% (v/v)TFA20 $\mu$ Lを用い、時々振りながら、室温にて20分間行った。2回目のTFA溶液を1回目のものと一緒にプールした。減圧下の蒸発により、プールした抽出液の体積を1~2 $\mu$ Lまで減少させた。対照の抽出(ブランク)は、タンパク質を含まないゲル数片を用いて行った。

#### 【0053】

実施例7：ペプチド質量フィンガープリンティング解析によるタンパク質の同定

試料1.5 $\mu$ LをMALDI100ウェルターゲットプレートに加えた。同体積のマトリックス(50% (v/v)アセトニトリル、0.1% (v/v)TFA中、10mg/mLの $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)を、先に加えた消化物に加えた。試料を、真空容器を用いてできるだけ素早く乾燥した。液体の溶液からの質量測定は、337nm窒素レーザーを備えたMALDI-TOF質量分析器Voyager<sup>TM</sup> Elite and Super STR(PerSeptive Biosystems, Framingham MA, USA)を用いて行った。分析器を、加速電圧20kV、100~140nsの遅延抽出パラメーターおよび850Daの低質量ゲートにて反射モードで用いた。分子イオン発生のためにレーザー出力を閾値よりも若干高く(閾値よりも10~15%高い)セットした。スペクトルを10~256の継続的レーザー照射の加算によって得た。最も高い60個のピークの質量をスペクトルから抽出し、SmartIdent

10

20

30

40

50

ペプチド質量フィンガープリントツール [Gras1999] を用いるタンパク質同定に用いた。リサーチは S W I S S - P R O T および T r E M B L データベースに対して行った。ヒトに対してクエリを行い、質量の一致の最小数を 4 とし、トリプシンの自己消化産物を用いた内部校正後の質量の最大許容度を 50 ppm とし、最大で 1 つのトリプシンペプチドの間違った開裂を許容し、許容できる変化はシステインのヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化とメチオニンの人工的酸化であった。

【 0 0 5 4 】

実施例 8 : ペプチド断片解析によるタンパク質同定

ナノ LC ( LC = 液体クロマトグラフィー ) 分離の前に、ペプチド含有溶液の体積を 0 . 1 % ( v / v ) ギ酸溶液を添加して 7  $\mu$  L に調整した。試料を Triathlon オートサンブラー ( Spack, Emmen, Holland ) にセットした。各実験につき、ペプチド含有溶液 5  $\mu$  L を内径 75  $\mu$  m の C 1 8 逆相カラム ( YMS-ODS-AQ200, Michrom Bioresource, Auburn, CA ) に注入した。ペプチドを、SunFlow ポンプ ( SunChrom, Friderichsdorf, Germany ) を用いて 0 . 1 % ギ酸の存在下アセトニトリル ( A C N ) グラジェントで溶出した。ポンプの下流の流速を 200 p l / 分から 0 . 4 p l / 分に減少させるために流路スプリッターを用いた。四重極飛行時間型 ( Q - T O F ) 質量分析計 ( Micromass, Wythenshawe, England ) を用いてペプチドを解析した。2700 V の電圧をナノエレクトロスプレーキャピラリー ( New Objective, Woburn, MA, USA ) にかけた。アルゴンを衝突ガスとして用いた。衝突エネルギーを前駆体イオン質量の関数として固定した。MS / MS スペクトルを MS と MS / MS モード間の自動切り替えにより得た。得られた MS / MS データを、ProteinLynx ソフトウェア ( Micromass, Wythenshawe, England ) により、互換性のあるフォーマット ( D T A ファイル ) に変換し、S W I S S - P R O T、T r E M B L、N C B I n r および E S T データベースに対し慣用の検索エンジンを用いて解析した。MS / MS データをマニュアルで解釈する場合は、配列のみの検索により同定を行った。

【 0 0 5 5 】

マーカー M 5 はシスタチン C のフラグメントであり、マーカー M 3 および M 4 はベータ - 2 - ミクログロブリンの異性体であり、M 2 はミオグロビンの新規の変異体またはホモログであることが分かった。マーカー M 1 は神経分泌タンパク質 V G F のフラグメントであることが分かった。

【 0 0 5 6 】

実施例 9 : 統計的解析

当業者に周知の標準的な統計的手法を用いて P 値を算出した。0 . 0 5 未満の P 値を統計的有意とした。

【 0 0 5 7 】

実施例 10 : 4 . 8 k D a フラグメントの単離 ( マーカー M 1 )

対照の患者から得られた C S F 試料は、30 k D a を超える分子量のタンパク質を除去するために Centricon 30 濾過装置 ( Millipore Corp. , Bedford, MA ) を用いて分画した。塩および 3 k D a 未満の分子量のポリペプチドを Centricon 3 ( Millipore Corp. , Bedford, MA ) を用いて除去した。次いで、Centricon 3 を超高純度蒸留水で洗浄した。その洗浄画分に、4 . 8 2 k D a の主要な成分が認められた。まず、この液体の画分を 10 m M 溶液で洗浄し、1 , 4 - ジチオエリトロールで 5 6 にて 1 時間還元した後、5 4 m M ヨードアセトアミドで室温にて 4 5 分間アルキル化した。最後に、ポリペプチドを 6 m g / L トリプシンで 3 7 にて一晩消化した。この液体画分を、以前に記載したようにナノ LC および Q - T O F で解析した。

【 0 0 5 8 】

実施例 11 : S E L D I - T O F 解析のための異なる表面材料

S E L D I - T O F を用いて、A D 患者から得た 10 の C S F 試料と 10 人の対照の解析を 3 種類の異なる表面 ( ハイドロホピック H 5 0、W C X 2、および I M A C 表面 ( C i p h e r g e n B i o s y s t e m s, F r e m o n t, C a l i f o r n i a, U S A, r e s p. ) ) で行った。H 5 0 上で発現量の異なる 7 つのピークが認められ、W C X 2 上で 5 つマーカーが、I M A C 表面上で 5 つ

のマーカ-が認められた。マーカ-をH50チップ上で用いる診断テストにより、特異性と感受性は、それぞれ100%、70%であることが判明した。H50およびWCX2上で認められたマーカ-の組み合わせにより、100%の特異性と80%の感受性が得られた。最後に、H50、WCX2およびIMAC上で認められたマーカ-の組み合わせは、100%の特異性と90%の感受性が得られた。

#### 【0059】

異なる表面材料を用いるSELDI-TOFによって測定した、発現量の異なるポリペプチドの平均質量は、以下の通りであった。

表面ハイドロホピックH50：7ピーク

マーカ-1： 4769 ± s.d. Da

10

マーカ-2： 6958 ± s.d. Da

マーカ-3： 6991 ± s.d. Da

マーカ-4： 13412 ± s.d. Da

マーカ-5： 13787 ± s.d. Da

マーカ-6： 17276 ± s.d. Da

マーカ-7： 40437 ± s.d. Da

表面IMACCu：5ピーク

マーカ-1： 6895 ± s.d. Da

20

マーカ-2： 6928 ± s.d. Da

マーカ-3： 7691 ± s.d. Da

マーカ-4： 7769 ± s.d. Da

マーカ-5： 7934 ± s.d. Da

表面WCX2：5ピーク

マーカ-1： 5082 ± s.d. Da

マーカ-2： 6267 ± s.d. Da

マーカ-3： 6518 ± s.d. Da

マーカ-4： 7274 ± s.d. Da

マーカ-5： 8209 ± s.d. Da

30

#### 【0060】

上記の各マーカ-についての標準偏差 (s. d.) は20 Daであった。但し、上記の各マーカ-についての標準偏差が40 Da、または10 Da、または5 Daとなることもある。

#### 【0061】

参考文献

Adam, B. L. ら、2001, *Proteomics* 1 (10) : 1264-1270

Asgeirsson B, Haebel S, Thorsteinsson L, Helgason E, Gudmundsson KO, Gudmundsson G, Roepstorff P. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: monitoring the presence of the Leu68Gln cystatin C variant in cerebrospinal fluid and monocyte cultures by MS. *Biochem J.* 1998, 329, 497-503.

40

Beyer K, Lao JI, Gomez M, Riutort N, Latorre P, Mate JL, Ariza A. Alzheimer's disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neuroscience Letters.* 2001, 315, 17-20.

Canu N, Possenti R, Ricco AS, Rocchi M, Levi A. Cloning, structural organization analysis, and chromosomal assignment of the human gene for the neurosecretory protein VGF. *Genomics* 1997, 45 (2) , 443-446.

50

Cohen DH, Feiner H, Jensson O, Frangione B. Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA-I) is related to the gastroentero-pancreatic neuroendocrine protein. *J Exp. Med.* 1983, 158, 623-628.

Current Protocols in Immunology, Eds. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, and Strober W. , John Wiley & Sons Inc. 1991

Crawford U, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology.* 2000, 55, 763-768. 10

Davies, H. A. 2000. The ProteinChip (R) System from Ciphergen: A new technique for rapid, micro-scale protein biology. *J. Molecular Medicine*, 78 (7) : B29 Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, Growdon JH, Rebeck GW. Elevation of Cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *Am. J Pathol.* 2001, 159, 1061-1068.

Ernerudh J, Olsson T, Berlin G, von Schenck H. Cerebrospinal fluid immunoglobulins and beta 2-microglobulin in lymphoproliferative and other neoplastic diseases of the central nervous system. *Arch Neurol.* 1987, 44 (9) , 915-20. 20

Finckh U, Von der Kammer H, Velden J, Michel T, Andresen B, Deng A, Zhang J, Muller-Thomsen T, Zuchowski K, Menzer G, Mann U, Papassotiropoulos A, Heun R, Zurde I J, Holst F, Benussi L, Stoppe G, Reiss J, Miserez AR, Staehelin HB, Rebeck W, Hyman BT, Binetti G, Hock C, Growdon JH, Nitsch RM. Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 2000, 57, 1579-1583.

Francis, P. T. 5、 J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1999, 66 (2) : 137-147 Fung , ET 5、 Protein biochips for differential profiling. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(1) : 65-69 30

Ghiso J, Jensson O, Frangione B. Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C) . *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83 (9) : 2974-8.

Ghiso J, Pons-Estel B, Frangione B. Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 136 (2) : 548-54. 40

Gras R, Miller M, Gasteiger E, Gay S, Binz PA, Bienvenut WV, Hoogland C, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF, Appel R. Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterised multi-level scoring algorithm and an optimised peak detection. *electrocataphoresis* 1999, 20 : 3535-3550

Grubb AO, Jensson O, Gudmundsson G, Amason A, Lofberg H, Malm J. Abnormal metabolism of g-trace alkaline microprotein. The basic defect in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *N. Engl. J Med* 1984, 311, 1547-1549. 50

- Hellman U, Wernstedt C, Gonez, J, Heldin CH. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 1995, 224, 451-5.
- Hoekman K, Van Nieuwkoop JA, Willemze R. The significance of beta-2 microglobulin in clinical medicine. *Neth JMed.* 1985; 28 (12) : 551-7.
- Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. 1989, *Science* 246:1275-1281. 10
- Issaq HJ, VeenstraTD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics : protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 292 (3) : 587-592
- Kalman J, Marki-Zay J, Juhasz A, Santha A, Dux L, Janka Z. Serum and Cerebrospinal fluid cystatin C levels in vascular and Alzheimer's dementia. *Acta Neurol. Scand.* 2000, 101, 279-282. 20
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15; 227 (259) : 680-5.
- Leung-Tack J, Tavera C, Gensac MC, Martinez J, Colle A. Modulation of phagocytosis-associated respiratory burst by human cystatin C: role of the N-terminal tetrapeptide Lys-Pro-Pro-Arg. *Exp. Cell Research.* 1990, 188, 16-22.
- Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Codepositio of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer's disease patients. *J. Neuropathol Exp Neurol* 2001, 60, 94-104 30
- Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *electrocataphoresis*, 2000, 21 : 1164-1167
- Popovic T, Brzin J, Ritonja A, Turk V. Different forms of human Cystatin C. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1990, 371, 575-580.
- Raymackers J, Daniels A, DeBrabandere V, Missiaen C, Dauwe M, Verhaert P, Vanmechelen E, Meheus L. Identification of two dimensionally separated human cerebrospinal fluid proteins by N-terminal sequencing, matrix-assisted laser-desorption/ionization-mass spectrometry, nanoliquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry, and tandem mass spectrometry. *electrocataphoresis*, 2000, 21, 2266-2283. 40
- The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus Report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". *Neurobiology of Aging*, 1988, 19 (2) : 109-116. 50

Robles A. Some Remarks on biological markers of Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 1998, 19 (2) : 153-157

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one-or two-dimensional gel electrocataphoresis. *Anal. Biochem.* 1992, 203, 173-9.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, 68, 850-8. 10

Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HWM, De Bruijn C. *Neurobiology of Aging*, 2002, 23 : 485-508

米国特許第4, 366, 241号

米国特許第4, 376, 110号

米国特許第4, 517, 288号

米国特許第4, 837, 168号

Ward ES et al. , Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 1989, 341, 544-546 20

Wei L, Berman Y, Castano EM, Cadene M, Beavis RC, Devi L, Levy E. Instability of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 11806-11814.

Wulfskuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF . New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 2001, 1 (10) : 1205-1215 30

Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, Clements MA, Davis JW, Schellhammer PF, Dalmaso EA , Wright GL. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. 2001, *Cancer Research* 61 (16) : 6029-6033

【図面の簡単な説明】

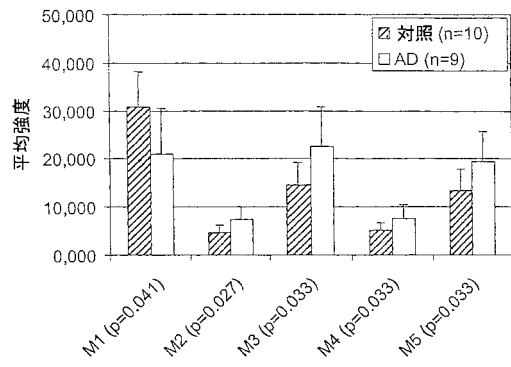
【 0 0 6 2 】

【図 1】 対照群と比較して疾患群において発現量が異なる、表 1 の 5 つのマーカーペプチドの平均強度。

【 図 1 】

- 1/1 -

Fig 1:



【 配列表 】

0004405919000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100087114  
弁理士 齋藤 みの里
- (72)発明者 エツカン・ヤルキノグル  
ドイツ連邦共和国デー - 4 2 1 1 5 ヴッパータール、リュッケルトヴェーク 2 6 番
- (72)発明者 ゲルハルト・ケーニッヒ  
アメリカ合衆国 0 2 4 7 6 マサチューセッツ州アーリントン、リンデン・ストリート 1 0 番
- (72)発明者 デニ・フランソワ・オーストラセ  
スイス、ツェーハー - 1 2 4 5 コロンジュ - ベルリヴ、シュマン・ドゥ・ラ・サヴォニエール
- (72)発明者 ジャン - シャルル・サンチェス  
スイス、ツェーハー - 1 2 0 8 ジェニーヴァ、シュマン・フランク - トマ 4 2 番
- (72)発明者 オディール・カレット  
フランス、エフ - 5 9 1 0 0 ルーベ、リュ・ドゥ・ラ・デュケニエール 7 1 番

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 2 5 1 3 8 (WO, A 1)  
国際公開第 0 1 / 0 6 3 2 9 4 (WO, A 1)  
国際公開第 0 1 / 0 7 5 4 5 4 (WO, A 1)  
CLINICAL NEUROSCIENCE AND NEUROPATHOLOGY, 2 0 0 2 年 4 月, Vol.13, No.5, p.611-615

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/48-98

G01N 27/62