

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-112978

(P2012-112978A)

(43) 公開日 平成24年6月14日(2012.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532	B

審査請求 有 請求項の数 30 O L 外国語出願 (全 78 頁)

(21) 出願番号	特願2012-55452 (P2012-55452)	(71) 出願人	506352201
(22) 出願日	平成24年3月13日 (2012. 3. 13)		スフィンゴテック・ゲーエムベーハー
(62) 分割の表示	特願2007-508840 (P2007-508840)		ドイツ・1 6 5 5 6・ボルグスドルフ・ト
	の分割		ウルベンヴェーク・6
原出願日	平成17年4月20日 (2005. 4. 20)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	04009284.3		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成16年4月20日 (2004. 4. 20)	(74) 代理人	100064908
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(72) 発明者	アンドレアス・ベルグマン
			ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・バウムロ
			イフェルヴェーク・47

最終頁に続く

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

(57) 【要約】

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

【解決手段】この目的は、プロタキキニンが、体液、組織および他の生体材料におけるタキキニン、特にサブスタンスPの測定のためのツールとして使用することができるという驚くべき知見によって達成された。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロタキニン、そのスプライシングバリエント、その断片、その誘導体、または前記化合物の組み合わせの、医療診断のための使用。

【請求項2】

ex vivo体液サンプル、好ましくは血液、血漿または髄液における、前記成分の存在または濃度を測定する、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

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

10

【請求項4】

配列番号3、4、6、7、9または10の1つまたは複数から選択される断片を使用する、請求項1に記載の使用。

【請求項5】

更なるアミノ酸もしくは変更したアミノ酸、または免疫応答性を誘導するのに適した断片/成分、またはその配列を特定の抗体による検出のために適するようにする断片/成分を含むプロタキニンの誘導体を使用する、請求項1に記載の使用。

【請求項6】

使用する化合物が、少なくとも75%の、好ましくは少なくとも80%の、より好ましくは少なくとも90%の相同性を示す、請求項1から5のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項7】

請求項1から6のいずれか一項に記載の化合物を検出するのに適したマーカー、または請求項1から6のいずれか一項に記載の化合物に特異的に結合する化合物と組み合わせた、請求項1から6のいずれか一項に記載の使用。

【請求項8】

ヒト個体または動物個体に由来する体液、組織または他の生体材料のサンプルにおける、請求項1から7のいずれか一項に記載の化合物または組み合わせの濃度を測定することを、請求項1から7のいずれか一項に記載の使用。

【請求項9】

濃度の測定を、請求項1から7のいずれか一項に記載の各化合物に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を使用することによって実施する、請求項8に記載の使用。

30

【請求項10】

少なくとも1つの抗体が、検出可能なマーカーで標識されている、請求項9に記載の使用。

【請求項11】

マーカーが発光マーカーである、請求項10に記載の使用。

【請求項12】

前記使用が、配列番号1-10のいずれか、またはそれらの断片に特異的に結合する1つまたは複数の抗体を含む、請求項8から11のいずれか一項に記載の使用。

【請求項13】

前記使用が、プロタキニン1-37(A-ペプチド)、その断片またはその前駆体に特異的に結合する1つまたは複数の抗体を含む、請求項8から11のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項14】

検出する病気が、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病および/または痛みの状態を含む中枢神経系の病気/疾患、神経疾患、内分泌疾患、大脳疾患、筋肉疾患、局所性疾患、全身性疾患、慢性疾患、炎症性疾患、細菌感染症およびウイルス感染症を含む感染疾患、髄膜炎、敗血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、鎌状赤血球貧血、虚血、筋萎縮性側索硬化症、リウマチ性関節炎を含む関節炎、気管支炎、痛覚過敏症、喘息、細菌中毒を含む中毒、免疫疾患、頭蓋大脳外傷を含む多発性/外傷、腫瘍/癌、脳梗塞、ストレス、アトピー性皮膚炎、HIV、ハンチントン病、熱傷、繊維筋痛症、統合失調症、ヒルシユスブル

50

ング病、アレルギー、家族性自律神経失調症（ライリー・デイ症候群）、造血障害、膠芽細胞腫および星細胞腫を含むグリオーマ、血液脳関門疾患を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の使用。

【請求項15】

検出する化合物が、プロタキニン1-37（A-ペプチド）、その断片もしくは前駆体、またはそれらの組み合わせである、請求項1から14のいずれか一項に記載の使用。

【請求項16】

抗体または抗体の組み合わせが、プロタキニン1-37（A-ペプチド）、その断片もしくは前駆体、またはそれらの組み合わせに特異的に結合する抗体である、請求項1から15のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項17】

請求項1から7のいずれか一項に記載の1つもしくは複数の化合物、またはその断片に結合する抗体。

【請求項18】

抗体が、配列番号1-10のいずれか、またはその断片に特異的である、請求項17に記載の特異的抗体。

【請求項19】

抗体が、プロタキニン1-37（A-ペプチド）、その断片もしくは前駆体、またはそれらの組み合わせに特異的である、請求項17に記載の抗体。

【請求項20】

医療研究、試験および/または検証におけるマーカー/手段としての、請求項1から7のいずれか一項に記載の化合物/請求項17から19のいずれか一項に記載の抗体の使用。

20

【請求項21】

体液、組織および/または他の生体材料における、請求項1から7のいずれか一項に記載の化合物/請求項17から19のいずれか一項に記載の抗体の濃度を測定することを含む、*in vivo*診断方法。

【請求項22】

-請求項21に記載の化合物の検出のための特異的抗体、または特異的抗体の組み合わせを使用すること、

30

-各サンプルにおける化合物または組み合わせの濃度を測定すること、

-濃度から、病気または疾患の存在および/または経過および/または重篤度および/または予後を推定すること、

-病気または疾患の存在および/または経過および/または重篤度および/または予後を求めるための更なる臨床データを加えること、

を含む、請求項21に記載の診断方法。

【請求項23】

各化合物に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を表面に固定化し、化合物の他の部位に特異的に結合する二次抗体を化合物の検出のために使用する、請求項21または22に記載の方法。

【請求項24】

抗体が、検出可能なマーカーで標識されている、請求項24に記載の方法。

40

【請求項25】

抗体が、発光マーカーで標識されている、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

化合物が、プロタキニン1-37（A-ペプチド）、その断片もしくは前駆体、またはそれらの組み合わせである、請求項21から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

抗体または抗体の組み合わせが、プロタキニン1-37（A-ペプチド）、その断片もしくは前駆体、またはそれらの組み合わせに特異的に結合する抗体である、請求項21から26のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 28】

体液、組織および/または他の生体材料における、請求項1から6のいずれか一項に記載の分子のレベルを測定し、それにより、各サンプルにおけるタキキニン/複数のタキキニンのレベルを推定することを含む、体液、組織および/または他の生体材料における、タキキニン/複数のタキキニンのレベルを測定するための、請求項21から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

タキキニンがサブスタンスPである、請求項21から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

- 検出可能なマーカーを含む、請求項17から19のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗体、または

- 請求項17から19のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗体および検出可能なマーカー、

を含む、免疫学的アッセイのためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【0002】

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

【0003】

本発明の用語プロタキキニンは、また、プロタキキニンまたは前記の意味でのPTKの断片に対して、少なくとも75%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0004】

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

【背景技術】

【0005】

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

10

20

30

40

50

なく末梢神経系（PNS）でも発現している（Otsuka and Yoshioka, 1993）。

【0006】

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

10

【0007】

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

【0008】

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

【0009】

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

20

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

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

30

【0013】

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

【0014】

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

40

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

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

50

【0018】

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

【0019】

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

10

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

20

【0020】

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

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0021】

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

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

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

40

【0023】

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

【0024】

それゆえ、サブスタンスPのようなタキキニンの*in vivo*での低い安定性が原因で、バイオマーカーとしての使用は、最適なサンプルロジスティック下でさえ、極端に制限される

50

。なぜならば、ペプチドの分解の影響により、極端に、生合成およびタキキニン遊離の影響が希薄化するからである。

【0025】

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

【課題を解決するための手段】

【0026】

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

10

【0027】

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

【0028】

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

20

【0029】

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

【0030】

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

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

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

40

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

本発明による合成ペプチドを使用して抗原を産生し、動物へと注入して、プロタキキニ

50

ンに対する抗体を産生することができる。当業者によって既知の異なる方法を、本目的を達成するのに使用することができる。好ましい実施態様においては、Limulus polyphemusに由来するヘモシアニンを、ウサギの免疫のために使用した。

【0035】

本発明の好ましい実施態様においては、プロタキキニンの10個のアミノ酸配列（配列番号1-10）を合成し、より好ましくは、プロタキキニンAの異なる4つのペプチド配列（PSP1からPSP4、図4a参照）を合成した：ペプチドPSP1およびPSP2は、A-ペプチドの配列を含む。PSP3は、活性なニューロペプチドK(NPK)の配列の最初の部分を含み、PSP4は、また、NPKだけでなくニューロペプチド（NP）の配列の部分、および、ニューロキニンA(NKA)の完全な配列を含む。アミノ末端のシステイン残基を、それぞれのペプチドに付加した。ペ

10

【0036】

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

【0037】

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

20

【0038】

実施態様においては、PSP1に対する抗体は、発光マーカーを用いて標識した。より更に好ましい実施態様における発明には、体液、組織または他の生体材料におけるプロタキキニンの検出のための産生抗体の使用、および、プロタキキニンを特異的に検出する抗体を特定量含むキットを含む。

【0039】

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

【0040】

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

30

【0041】

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

【0042】

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

40

【0043】

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

【0044】

それゆえ、プロタキキニンは、診断目的のためには、サブスタンスPの様な成熟タンパ

50

ク質よりも、より安定である。

【0045】

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

【0046】

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

10

20

【0047】

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

【0048】

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

【0049】

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

30

【0050】

本発明は、更に、病気または疾患における、好ましくは、アルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病および/または痛みの状態を含む中枢神経系の病気、局所性疾患、全身性疾患、慢性疾患、炎症性疾患、細菌感染症およびウイルス感染症を含む感染疾患、髄膜炎、敗血症、クローン病、潰瘍性大腸炎、鎌状赤血球貧血、虚血、筋萎縮性側索硬化症、リウマチ性関節炎を含む関節炎、気管支炎、痛覚過敏症、喘息、細菌中毒を含む中毒、免疫疾患、頭蓋大脳外傷を含む多発性/外傷、腫瘍、脳梗塞、ストレス、アトピー性皮膚炎、HIV、ハンチントン病、熱傷、繊維筋痛症、統合失調症、ヒルシュスブルング病、アレルギー、家族性自律神経失調症(ライリー・デイ症候群)、造血障害、膠芽細胞腫および星細胞腫を含むグリオーマ、血液脳関門疾患を含む病気または疾患における、体液、組織および他の生体材料中でのプロタキキニン濃度の顕著な変化を開示する。

40

【0051】

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

【0052】

本発明の更なる好ましい実施態様は、肺炎、局部感染(膿瘍)、敗血症、外傷および多

50

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

10

【0053】

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

【0054】

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

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

20

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1は、*in vivo*でのニューロペプチドの生合成を示す。

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

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

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

30

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

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

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

【図5】図5は、健康なコントロール個体、敗血症患者、アルツハイマー病患者の血漿、および健康なコントロールの髄液における、抗体組み合わせI-IIIの免疫反応性を示す。

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

40

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

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

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

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

50

【図 1 1】図11は、全身性炎症のシュミレーションを示す。エンドトキシン適用後のA-ペプチド、TNF- α 、IL-6およびPCT濃度。

【実施例】

【0056】

(実施例 1 : 抗体の産生)

(a) 免疫原

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

10

【0057】

(b) 抗体

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

【0058】

(実施例 2 : 抗体の精製)

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

20

【0059】

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

30

【0060】

ゲル物質を、25mlのそれぞれの抗血清プールを用いて混合し、緩やかに攪拌することによって室温で一晩インキュベートした。血清-ゲル混合物を、ポリカーボネートカラムに加え、余分な血清を除去した。その後、カラムを250mlのPBSを用いて洗浄し、非結合の血清タンパク質を除去した。非結合抗体の脱離は、50mMクエン酸(pH2.2)を用いたカラムの溶出によって実施した。溶出液を1mlのフラクションに回収した。各フラクションのタンパク質濃度を、Perbio(Bonn, Germany)のBCA-タンパク質アッセイキットを使用して求め、>1mg/mlのタンパク質含量を有するフラクションをまとめた。アフィニティ精製した抗体を、PBSを用いた透析により再緩衝化した。タンパク質含量を再度測定し、抗体を4℃で保存した。

40

【0061】

(実施例 3 : 抗体の固定化/標識化)

ペプチドPSP2、3および4に対する精製抗体を、ポリスチロールチューブ (Startube、12 mm x 75mm、Greiner、Germany) に固定した。この方法のために、抗体溶液を、PBSを用いてタンパク質濃度が6.7 μ g/mlになるように希釈し、各チューブ当り300 μ lをピペッティングした (チューブ当り2 μ gの抗体に対応)。これらを室温で20時間インキュベートし、その後、それぞれを4mlのPBSで3回洗浄した。更なる使用まで、チューブを4℃で保存した。PSP1に対する抗体 (PBS中で1mg/ml) を、発光マーカであるアクリジニウムエステル-

50

N-ヒドロキシ-スクシンイミド(アセトニトリル中で1mg/ml、In Vent、Hennigsdorf、Germany)を用いて標識した。標識の手順のために、200 µlの抗体を、4 µlのアクリジニウムエステルを用いて混合し、20分間インキュベートし、フリーのアクリジニウムエステル結合を、40 µlの50mMグリシン溶液を加えることによって飽和させた。標識した調製物を、Bio Sil 400-ゲルろ過カラム (BioRad、Munich、Germany)を用いたHPLCによってフリーのアクリジニウムエステルと分離した。PBSを、溶媒として使用した。

【0062】

(実施例4：プロタキニン免疫反応性の測定)

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

10

【0063】

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

20

【0064】

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

30

【0065】

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

40

【0066】

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

【0067】

【表 1】

表 1 : 異なる抗体組み合わせを用いたPTK/-断片の相対的免疫反応性の測定

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

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

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

【 0 0 6 8 】

(実施例 5 : A-ペプチドの定量測定のためのイムノアッセイ)

1. コンポーネント

PSP2-抗体でコーティングしたチューブおよび発光マーカで標識したPSP1-抗体を、イムノアッセイにおいて使用した。これらのコンポーネントの産生は、実施例3に示す。

【 0 0 6 9 】

2. 手法

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

【 0 0 7 0 】

3. キャリブレーション

A-ペプチドの濃度および免疫反応性が測定することができるために、ペプチドをJerini

(Berlin, Germany)によって合成した。予め重量を測定したペプチドを、免疫アッセイのためのキャリブレーターとして使用した。図6において、A-ペプチドの標準グラフを示す。A-ペプチドアッセイの分析的な感度は、約4pg/mlである。

【0071】

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

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

【0072】

(実施例7：アルツハイマー病患者においけるA-ペプチド含量)

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

【0073】

(実施例8：脳脊髄液(CSF)におけるA-ペプチド濃度)

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

【0074】

(実施例9：血液脳関門の障害におけるA-ペプチド濃度)

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

【0075】

結果：

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

【0076】

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

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

【0077】

(実施例11：全身性炎症のAペプチドおよびシュミレーション)

標準的なエンドトキシンである大腸菌の0113:H10:kを、4ng/体重kgの濃度で、ボランティアのテスト患者へと静脈内注入した。血液サンプルを、異なる時に採取した(DANDONA et al., 1994によるプロトコル)。エンドトキシンを用いて治療したテスト患者における、様々な炎症パラメーター(IL-6、TNF、PCT)だけでなくA-ペプチドの測定によって

10

20

30

40

50

、血液中の物質の濃度の時間依存的な経過が示された（図11参照）。第一に、予期されたように、エンドトキシンの注入後約1時間してから、TNF の増加が生じた。その後すぐに、サイトトキシンIL-6の増加が続いた（エンドトキシンの注入後約1.5時間）。3時間後、TNF およびIL-6の濃度が減少する一方で、驚くべきことに、A-ペプチド濃度の増加が生じ、その濃度は、約7時間後に開始レベルに戻った。PCTは、5時間後に濃度増加を示し、更なる経過の間に、安定的に増加した。それゆえ、A-ペプチドの分泌は、エンドトキシンの単独の注入によって誘導することができ、TNF /IL-6とPCTとの間の免疫カスケードにおける1つの事象である。

【 0 0 7 8 】

[参考文献]

10

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

20

【図 1】

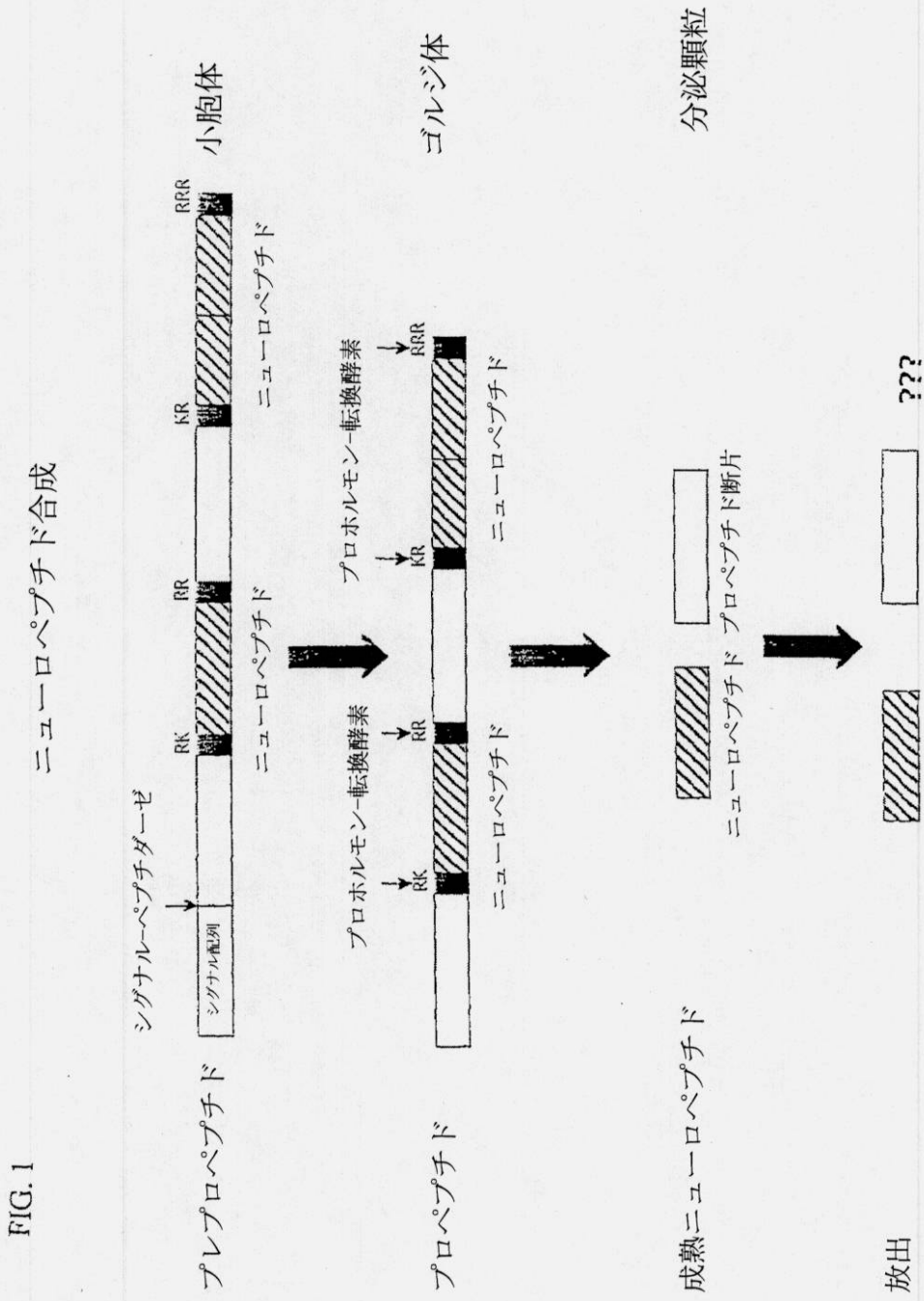
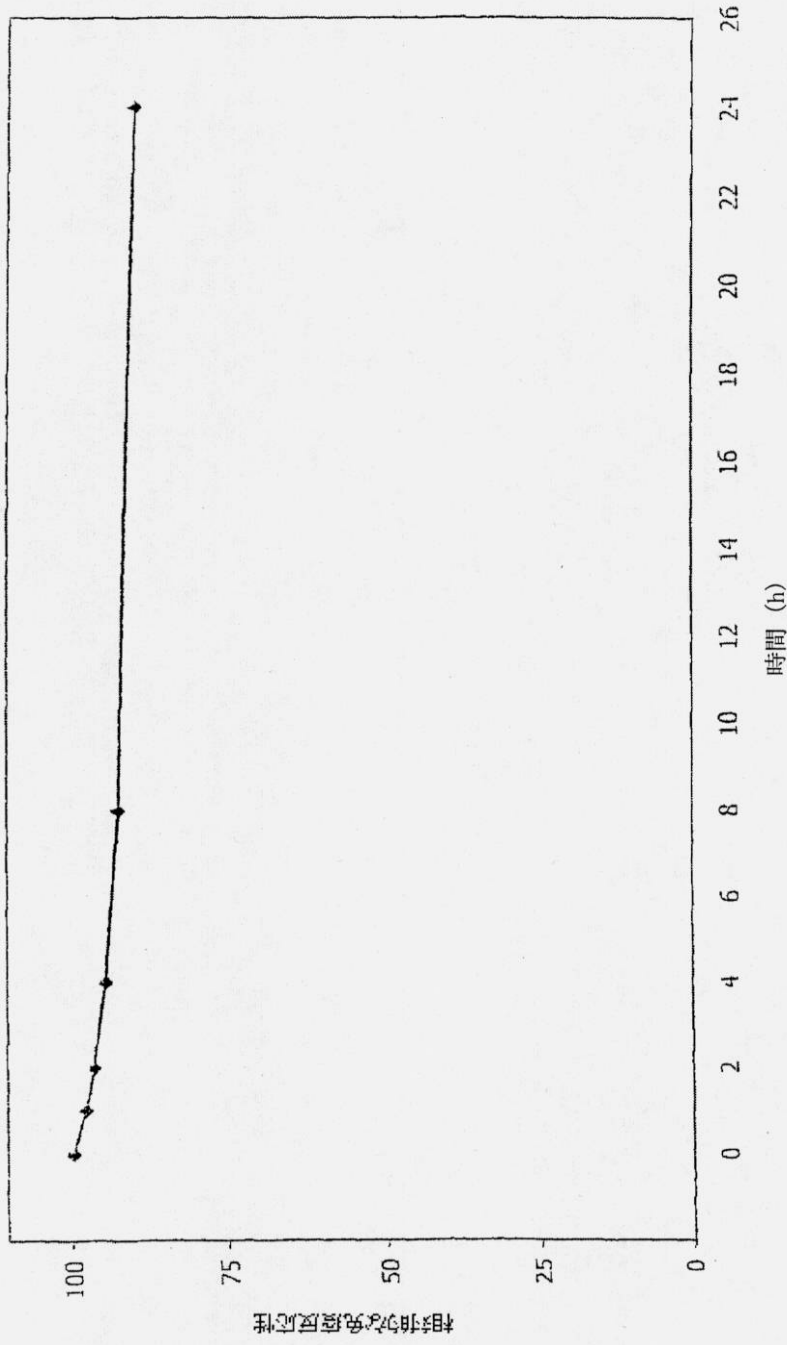


FIG. 1

【 図 2 】

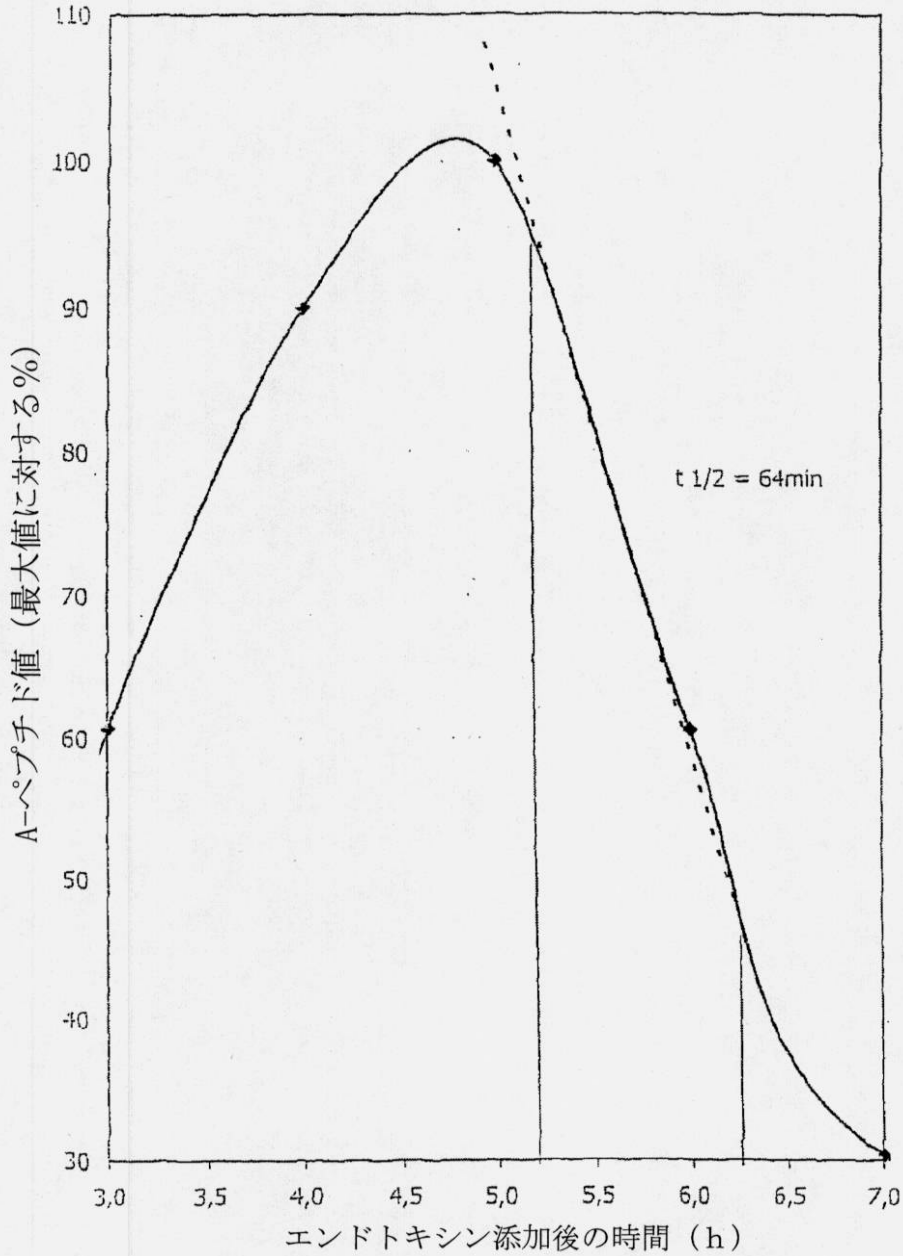
プロタキキニン断片のex vivo安定性 (EDTA-血漿)



【図3】

FIG. 3

A-ペプチド含有PTK断片の半減期の測定
(in vivo)



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

濃度の最も顕著な減少の範囲の傾き

FIG. 4A

α PPT-A (AS 1-92、配列番号1) のスプライシングバリエーション

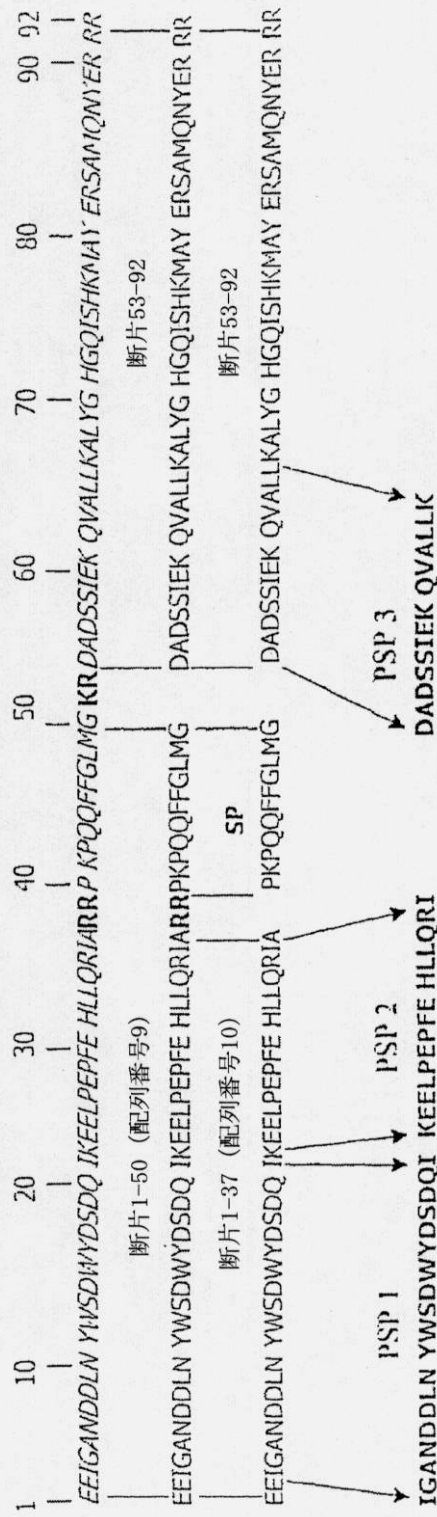


FIG. 4B

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

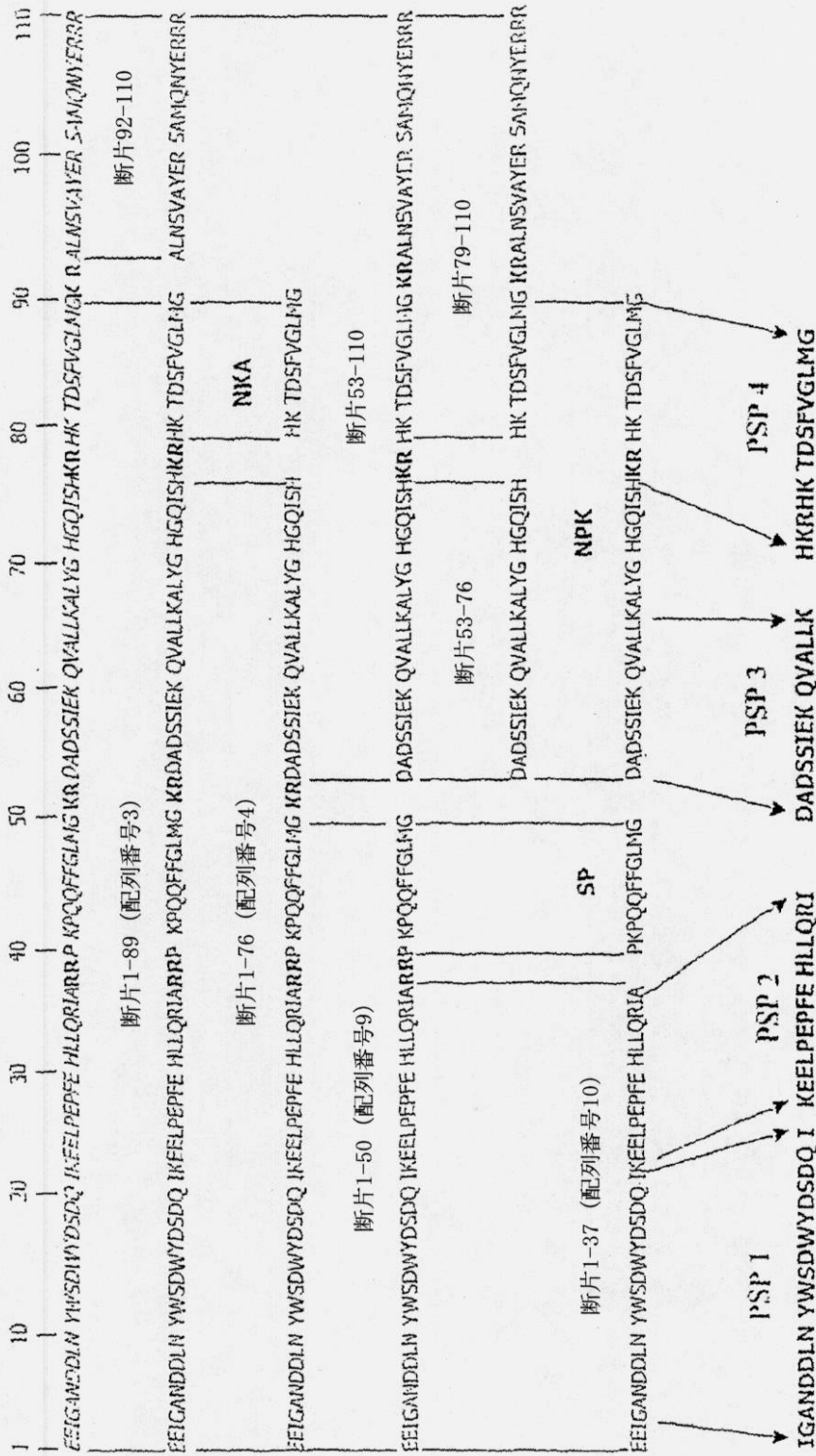
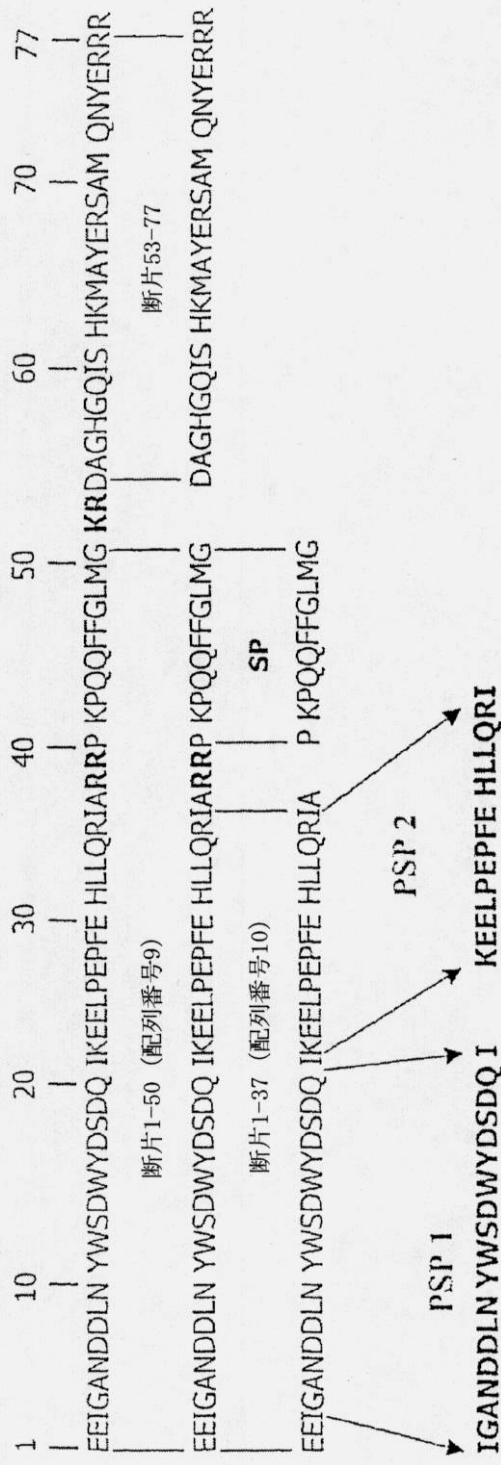


FIG. 4D

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



【 図 5 】

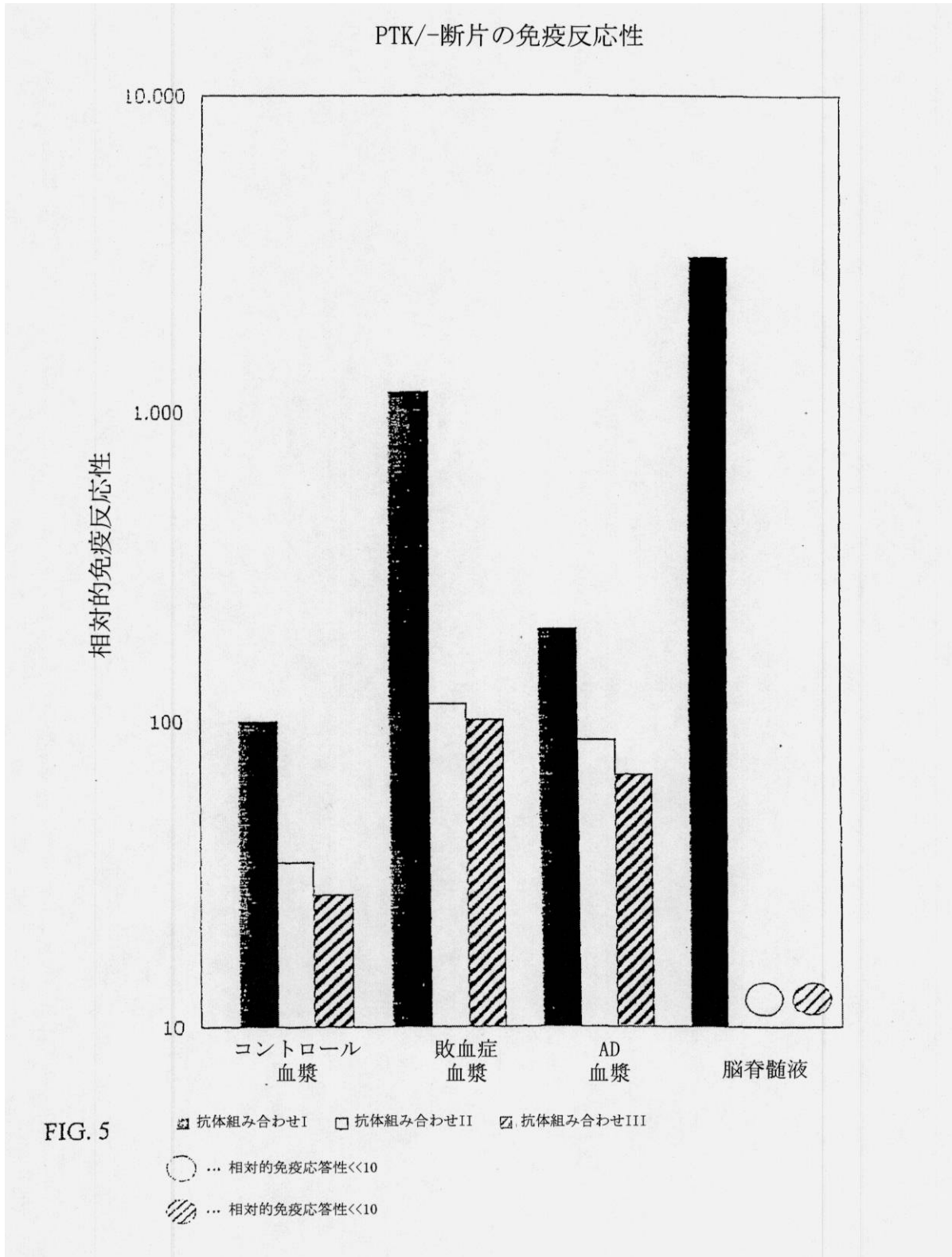
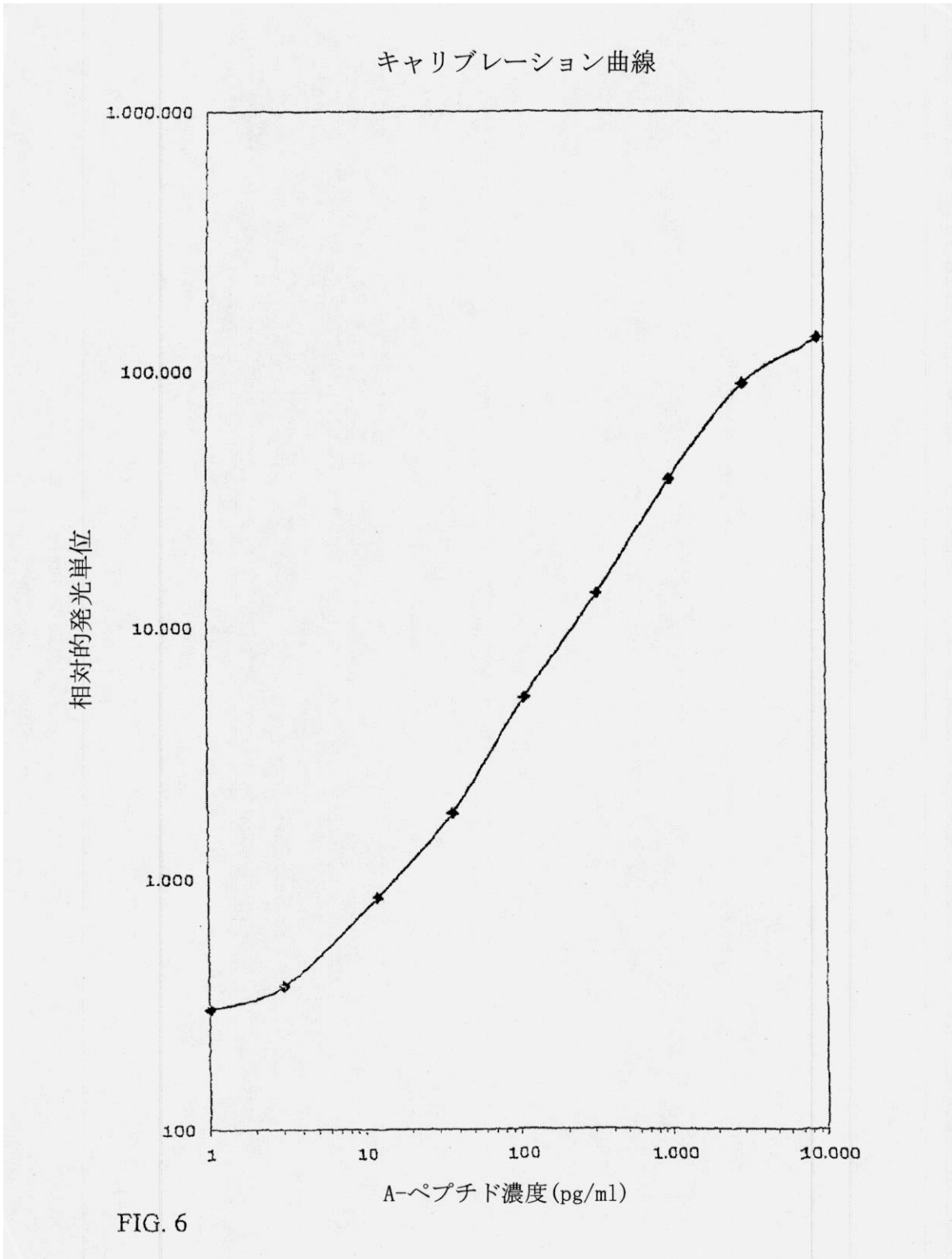


FIG. 5

【 図 6 】



【 図 7 】

コントロールの血漿におけるA-ペプチド濃度の頻度分布

(n = 100)

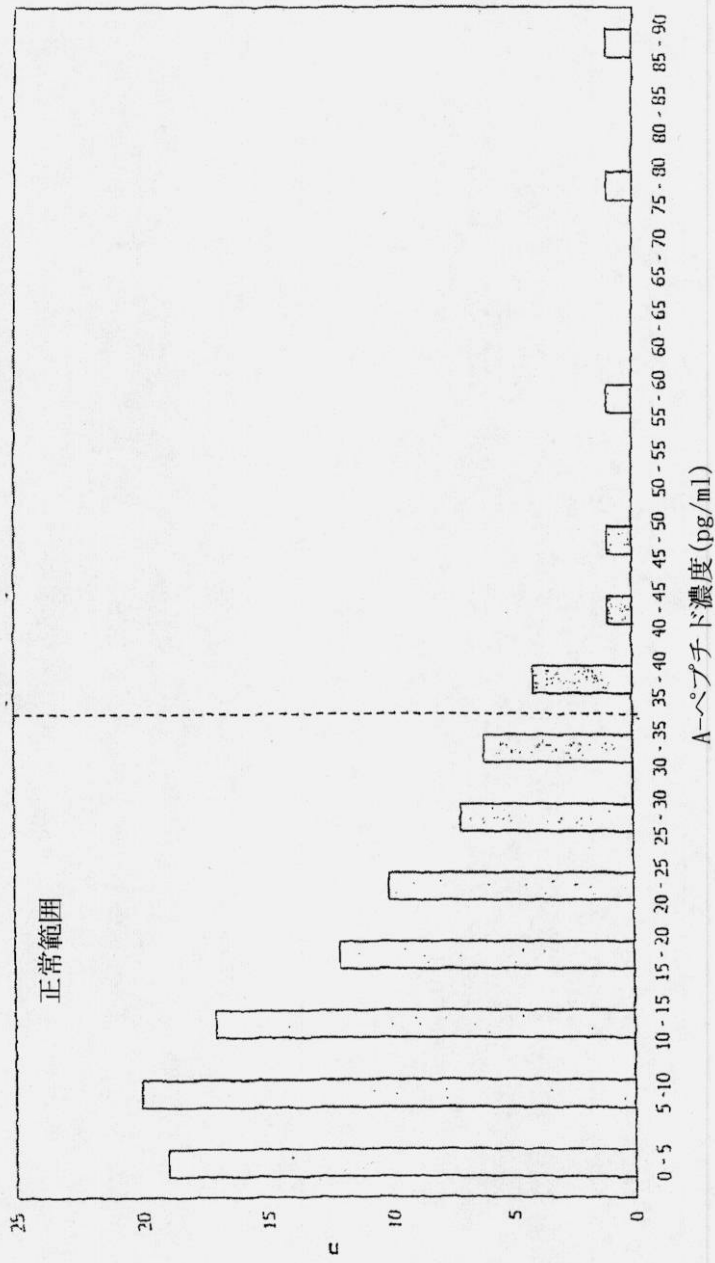
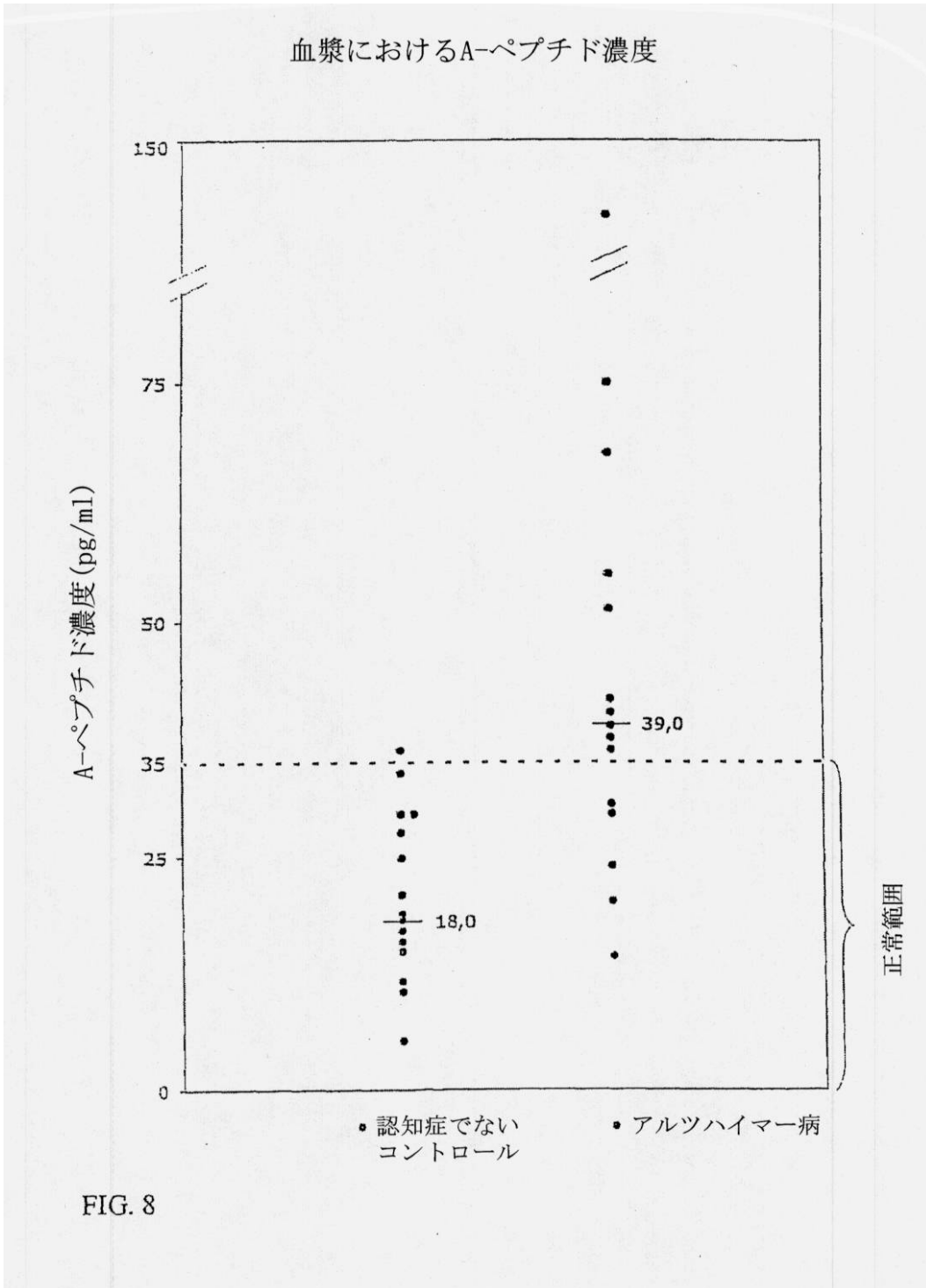


FIG. 7

【 図 8 】



【 図 9 】

脳疾患の患者におけるA-βペプチド濃度の分布

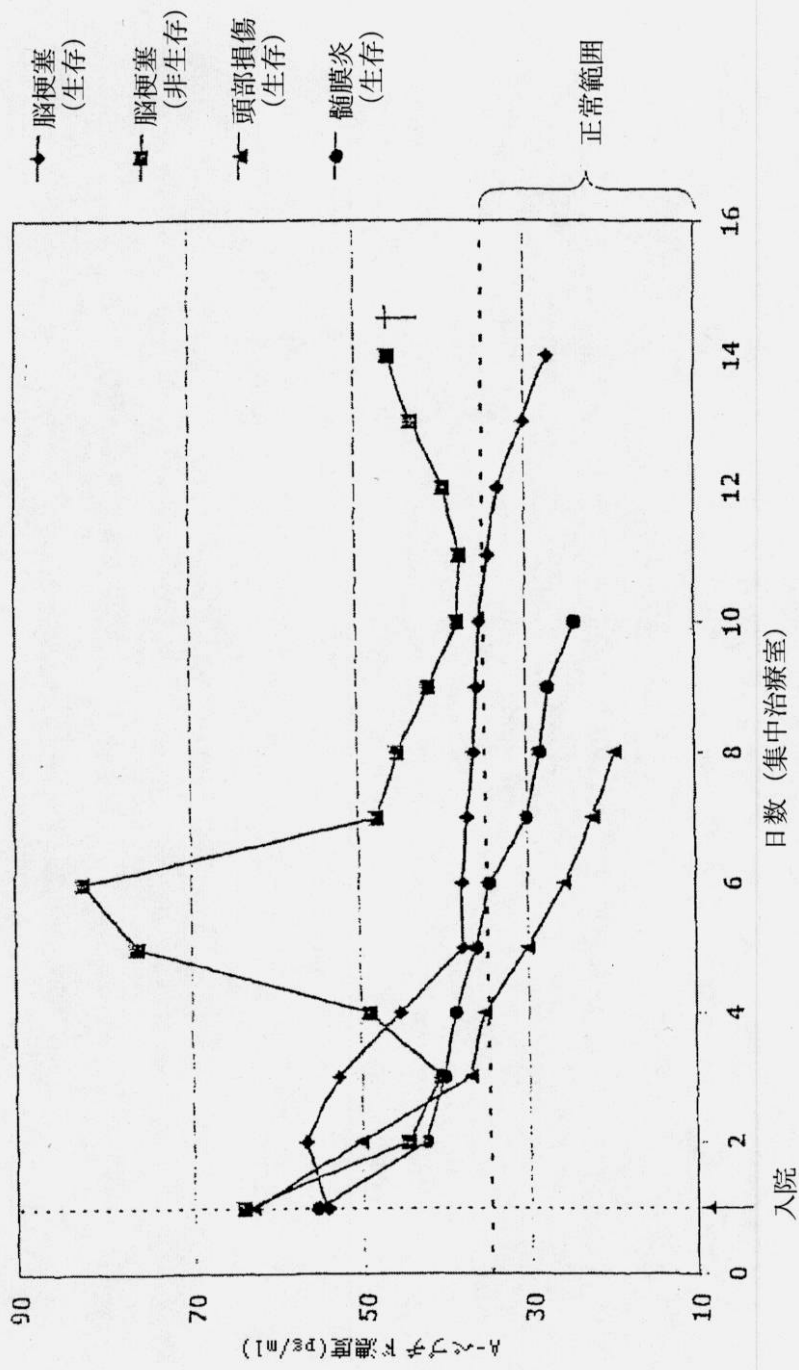


FIG. 9

【図 10】

異なる病気におけるA-ペプチド

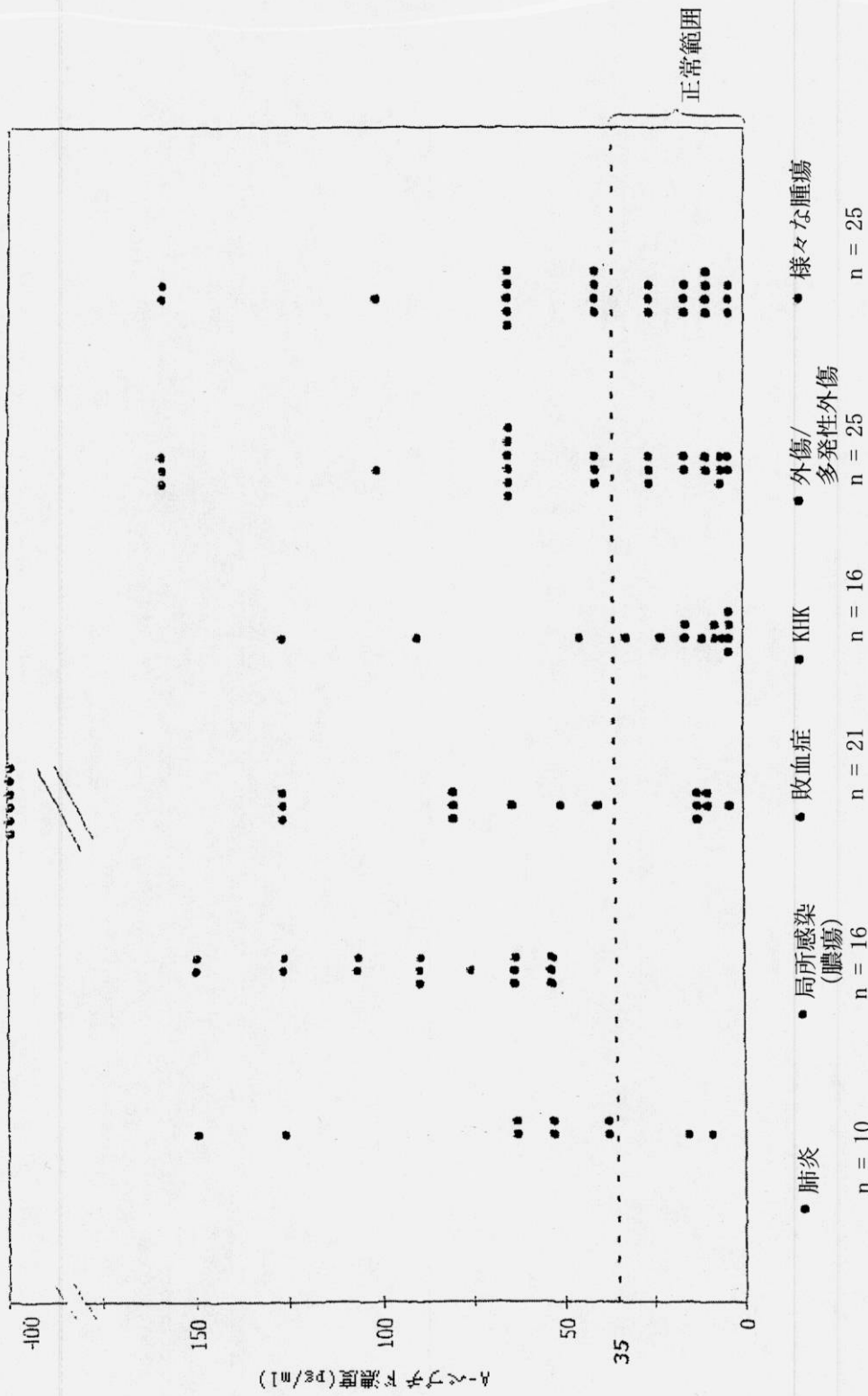


FIG. 10

フロントページの続き

(72)発明者 アンドレア・エルンスト

ドイツ・16761・ヘンニヒスドルフ・ファルケンセール・シュトラッセ・4

【外国語明細書】

Use of precursors of tachykinins and/or their fragments in medical diagnostic

DESCRIPTION

The present invention relates to the use of protachykinin and/or its fragments and/or its splice variants, fragments comprising protachykinin and/or combinations thereof in medical diagnostics. In the following text all these molecules, fragments, combinations thereof etc. are referred to as protachykinin comprising for example also preprotachykinin and the amino acid sequence IDs 1-10.

Protachykinin can be used to diagnose a variety of diseases comprising diseases/disorders of the central nervous system, comprising Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression and/or conditions of pain, neurological, endocrinological, cerebral, muscular, local, systemic, chronic, inflammatory diseases, infectious diseases comprising bacterial and viral infections, meningitis, sepsis, Crohn's disease, colitis ulcerosa, sickle cell anemia, ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, arthritis comprising rheumatoid arthritis, bronchitis, hyperalgesia, asthma, intoxication comprising bacterial intoxication, immunological disorders, poly/-trauma comprising cranio-cerebral trauma, tumors/ cancer, stroke, stress, atopis dermatitis, HIV, Huntington's disease, burns, fibromyalgy, schizophrenia, Hirschsprung's disease, allergies, familial dysautonomnia (Riley Day syndrome), hematopoietic disorders, gliomas comprising glioblastomas and astrocytomas, disorders of the blood brain barrier.

The term protachykinin of the present invention comprises also amino acid sequences showing at least 75 % homology, preferred at least 80 % homology, more preferred at least 90 % homology to protachykinin or fragments of PTK in the above sense.

The invention further relates to antibodies raised against protachykinin and/ or its fragments and/or its splice variants and kits involving such components.

Background of the invention

In 1931, the undecapeptide substance P was isolated by Von Euler and Gaddum (Von Euler and Gaddum, 1931). It was named Substance P because of its powdery consistency (Gaddum and Schild, 1934). Substance P (SP) is encoded by the preprotachykinin A-gene (PPT-A) which also comprises the gene sequences of other tachykinins like Neurokinin A (NKA), Neuropeptide K (NPK) and Neuropeptide γ (NP γ) (Carter and Krause, 1990). Neurokinin B is encoded by the PPT II or PPT-B gene. Substance P is expressed in the central nervous system (CNS) as well as in the peripheral nervous system (PNS) (Otsuka and Yoshioka, 1993).

Tachykinins have a variety of functions. They have vasodilatory properties, are responsible for the contraction and relaxation of the smooth muscles in the gastrointestinal and urogenital tract as well as in the bronchi. Furthermore, tachykinins play a major role in reflexes of defense caused by injuries or conditions of pain. These are, for example, the increase in cardiovascular tonus, vasodilation and triggering the NO-biosynthesis. Substance P has an influence on different inflammatory cells, serves as a neurotransmitter for transmitting pain and has regulatory function in blood formation. The non-Substance P-tachykinin Neurokinin A, Neuropeptide γ as well as Neuropeptide K are likely to play a role as regulators of endocrine functions.

The level of Substance P in body fluids is altered in several diseases. In plasma of sepsis patients a significant increase of the concentration of Substance P was shown well as in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (Joyce, Yood and Carraway, 1993).

Substance P also seems to play a role in inflammatory intestinal diseases like Crohn's disease and colitis ulcerosa.

Substance P m-RNA expression is significantly increased in HIV-infected macrophages, which indicates an effect of that tachykinin in HIV infections.

In the liquor of Alzheimer's patients (late-onset) and patients suffering from amyotrophic lateral sclerosis a significant increase of Substance P is observed.

In Parkinson's disease a reduction or an increase of Substance P in the medial globus pallidus was observed depending on the degree of dopamine reduction in the putamen.

Patients suffering from Chorea Huntington, a genetically dependent neurodegenerative disease, showed a selective loss of preprotachykinin containing neurons in the brain.

In the serum of patients with cerebral ischemia (transient inhibition of blood flow as well as stroke), a significant increase in concentrations of Substance P could be determined.

Patients having carcinoid tumors showed an increased concentration of Substance P and Neurokinin A in the blood circulation as well as a significant increase in immune reactivity of tachykinin-like metabolites in urine. Substance P and Neurokinin A possibly also play a role in migraine, other subsistence disorders, in the development of glioma and they have a strong influence on the secretion in the bronchial tubes and on the bronchial circulation, which suggests that they might play a possible role as mediators in asthma.

In smokers suffering from a chronic bronchitis a ten-fold increase of PPT-A-mRNA concentration in lung epithelial cells could be shown.

In fibromyalgia and depression the concentration of Substance P in serum and liquor is increased, as well as in serum of patients suffering from sickle cell anemia is increased, especially in phases of pain.

Increased concentrations of Substance P are measured in patients suffering from atopic dermatitis that correlate with the severity of the disease.

Tachykinins like Substance P and Neurokinin A furthermore play a role in the regulation of proinflammatory cytokine responses.

The biosynthesis of the tachykinins starts as preprohormone. During biosynthesis after separation of the hydrophobic N-terminal sequence by so-called signal peptidasis and folding of the proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum, the propeptides migrate into the vesicles of the Golgi Apparatus and are transported to the cell membrane. During transport the propeptides are processed to mature hormones by prohormone-convertases at usually dibasic amino acid sequences. Via different stimuli the peptides are secreted into the extracellular space or into the plasma. The mature peptides are rapidly inactivated after secretion by proteolysis. Substance P and Neurokinin A *in vivo* have an extremely low half-life of less than 2 minutes in blood. Neuropeptide K shows a bi-phasic degradation with a half-life of 0.9 minutes (degradation to Neuropeptide γ) and 6 minutes in plasma (further degradation).

The tachykinin Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide K and Neuropeptide γ are encoded by the preprotachykinin A-gene (PPT-A). Alternative splicing of the PPT-A gene transcript results in 4 different mRNA molecules: α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A and δ PPT-A. All four mRNA molecules contain the sequence of Substance P. Only β PPT-A mRNA contains all 7 exons of the PPTA-gene and thus encodes all 4 tachykinins. Exon 6 is missing in the α PPT-A mRNA and exons 4 and 6 are missing in the δ PPT-A mRNA. Thus, only those two types of mRNA

encode the complete sequence of Substance P. Exon 4 is missing in γ PPT-A mRNA, thus Neuropeptide K cannot be transcribed from this mRNA. The production of Substance P by all 4 splice variants suggests that when the PPT-A gene is expressed, also Substance P is produced. The expression of α PPT-A mRNA occurs predominantly in the brain, while β PPT-A and γ PPT-A mRNA molecules are predominantly expressed in peripheral tissue.

The PTK-A fragment 1-37 plays a central role in this invention and is called A-peptide herein.

Detailed description of the invention

Substance P and other tachykinins can be detected in different body fluids, tissues and other biomaterials.

The short half-life of tachykinins in blood, however, so far has hindered the use of tachykinins, especially of Substance P, in routine diagnostics. Due to the short half-life of tachykinins, it is not possible in clinical routine to take the samples, obtain the plasma, transport the sample into the laboratory and do the diagnostics in the laboratory including the required tests before tachykinin degradation reach a critical level.

Thus due to the low *in vivo* stability of tachykinins like Substance P, the use as a biomarker is extremely limited even under optimized sample logistics, as the influence of the degradation of the peptides extremely dilutes the influence of biosynthesis and tachykinin release.

The object of the invention was to overcome the disadvantageous half-life of the tachykinins and to develop a method, use and a kit for the detection and determination of tachykinin in body fluids, tissues and other biomaterials.

This object has been achieved by the surprising finding that protachykinin can be used as a tool for the determination of tachykinins in body fluids, tissues and other biomaterials, particularly Substance P. This presence of the protachykinins correlates with the presence of the mature tachykinins like Substance P in the different body fluids/ tissues or biomaterials.

Furthermore, the stability of protachykinin, its splice variants, fragments and/or combinations thereof *ex vivo* is surprisingly high and renders the protachykinins fully suitable for routine purposes.

The same applies for the *in vivo* half-life of protachykinin that is significantly higher than those of Substance P, Neurokinin A and Neuropeptide K, which renders them suitable to be used in the detection of Substance P/ protachykinin concentration and release rate.

This linkage between the protachykinins of the present invention and the mature peptides makes them suitable as diagnostic tools for all diseases and/or disorders, where the mature proteins like Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide K and Neuropeptide γ play a role.

Protachykinin can therefore be used for diagnostics for a variety of diseases comprising diseases of the central nervous system, comprising Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression and/or conditions of pain, local, systemic, chronic, inflammatory diseases, infectious diseases comprising bacterial and viral infections, sepsis, Crohn's disease, colitis ulcerosa, meningitis, sickle cell anemia, ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, arthritis, rheumatoid arthritis, bronchitis, hyperalgesia, asthma, intoxication comprising bacterial intoxication, immunological disorders, cranio-cerebral trauma, tumors, stroke, stress, atopis dermatitis, HIV, Huntington's disease, burns, fibromyalgy, schizophrenia, Hirschsprung's disease, allergies, familial dysautonomnia (Riley Day syndrome), hematopoietic disorders, gliomas comprising glioblastomas and astrocytomas.

Furthermore, the present invention in one embodiment relates to the use of the above-mentioned protachykinins for early diagnosis, diagnosis of the degree of severity of the disease, course control and prognosis for the above mentioned diseases/ disorders and/ or comprising those diseases/ disorders where the mature protein plays a role.

Clinical data may additionally be taken into consideration to support the determination of the disease/disorder.

The present invention in a further embodiment relates to the production of protachykinin and fragments. It is further possible to use amino acid sequences showing at least 75 % homology, preferred at least 80 % homology, more preferred at least 90 % homology to protachykinin according to the present invention.

The synthetic peptides in accordance with the present invention were used to produce antigens and injected into animals to raise antibodies against the protachykinin. Different methods can be used to achieve this object known by the person skilled in the art. In a preferred embodiment hemocyanin from *Limulus polyphemus* was used for the immunisation of rabbits.

In a preferred embodiment of the invention 10 amino acid sequences (sequence IDs 1-10) of protachykinins were synthesized, more preferred four different peptide sequences (PSP1 to PSP4, see Fig. 4a) of protachykinin A were synthesized: The peptides PSP1 and PSP2 comprise the sequence for the A-peptide. PSP3 contains the first part of the sequence of active Neuropeptide K (NPK) and PSP4 also comprises parts of the sequence of NPK as well as Neuropeptide γ (NP γ) and the complete sequence of Neurokinin A (NKA). An aminoterminal cystein residue was added to each peptide. The peptides were conjugated to a hemocyanin from *Limulus polyphemus* and antibodies were produced to PSP1 - PSP4 in rabbits according to known methods.

Antibodies were purified according to known methods, in a preferred embodiment of the invention, this was achieved preferably by ligand specific affinity chromatography by coupling the peptides via the amino terminal cystein residue to SulfoLink-Gel of Pierce (Boston, USA) according to the methods of Pierce.

In a preferred embodiment the antibodies were tagged with a marker to enable detection. The marker used is preferably a luminescent marker and in a yet more preferred embodiment, the antibodies against PSP1 were tagged with a luminescent marker.

The invention in a yet further embodiment involves the use of the generated antibodies for detection of protachykinin in body fluids, tissues or other biomaterials, as well as a kit containing a certain quantity of such an antibody specific to detect protachykinin.

Methods for the detection of binding of the antibody to the respective molecule are also known by the person skilled in the art. In one embodiment of the invention, the binding of the antibody to the target (which contains protachykinin) is detected by luminescence.

A preferred embodiment of the invention discloses the use of antibodies generated against PSP1 to PSP4: Different antibody combinations (Table 1) were used for the detection of protachykinin in control individuals, in patients with Alzheimer's disease and in sepsis patients in plasma and liquor. The protachykinin-fragments detected by the antibodies are shown in Table 1.

The invention further permits the determination of the presence and stability of protachykinin in body fluids, tissue and other biomaterials and the difference in protachykinin concentration in healthy controls and patients of various diseases.

In one embodiment the invention is based on and uses the discovered long term stability of protachykinin *ex vivo* in plasma (Fig. 2). In plasma protachykinin surprisingly has a half-life of more than 24 h. As less peptidases are present in CSF, protachykinin is expected to be even more stable in CSF (cerebro-spinal fluid) than in plasma.

A further embodiment of the invention discloses the *in vivo* half-life of PTK/ A-peptide surprisingly being more than 60 mins. (Fig. 3), as compared to the half-lives of Substance P (1-2 mins), Neurokinin A (< 2 mins.) and Neuropeptide K (6 mins.).

Thus protachykinin is by far more suitable for diagnostic purposes than the mature proteins like Substance P.

The invention further uses the correlation of protachykinin and mature tachykinins like Substance P in the state of disease/disorder in body fluids, tissues or other biomaterials, blood and liquor in particular.

In one embodiment of the invention the level of immune reactivity of protachykinin with the three antibody combinations of table 1 of control plasma, sepsis/ plasma, Alzheimer's disease/ plasma and liquor of healthy control individuals is shown (see also example 4). An increase in protachykinin level in plasma is observed in diseased patients (antibody combination I, black column) as compared to plasma of healthy control individuals (Fig. 5). Antibody combination I detects the A-peptide (fragment 1-37) and A-peptide containing peptides, that is present in all four splice variants (α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A and δ PPT-A). Antibody combination II detects only splice variants α PPT-A and β PPT-A and combination III only β PPT-A and γ PPT-A. Using antibody combination I, the A-peptide concentration in plasma of sepsis and Alzheimer's patients is significantly increased, 2-fold and 12-fold, respectively (see Fig. 5). Antibody combinations II and III also show a 2,5-fold increase of protachykinin level in the plasma of Alz-

heimer's patients and about 2,8-fold increase in plasma of sepsis patients. In liquor of healthy controls (far right columns of Fig. 5), antibody combination I shows a signal, antibody combinations II and III do not show a significant signal.

These results are consistent with those of Substance P in Alzheimer's patients, sepsis, stroke, cerebral ischemia, infection, symptoms of pain, lung disorders and tumors.

The invention discloses the level of protachykinin in body fluids, tissue and other biomaterials of healthy control individuals and diseased persons.

In a preferred embodiment the invention discloses the distribution of A-peptide concentrations in plasma of healthy individuals (Fig. 7). 90 % show an immune reactivity below 35 pg/ml, the median was 13,3 pg/ml.

The invention further discloses a significant change of protachykinin concentration in body fluids, tissues and other biomaterials in disease or disorder, preferentially comprising diseases of the central nervous system, comprising Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression and/or conditions of pain, local, systemic, chronic, inflammatory diseases, infectious diseases comprising bacterial and viral infections, meningitis, sepsis, Crohn's disease, colitis ulcerosa, sickle cell anemia, ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, arthritis comprising rheumatoid arthritis, bronchitis; hyperalgesia, asthma, intoxication comprising bacterial intoxication, immunological disorders, poly/-trauma comprising cranio-cerebral trauma, tumors, stroke, stress, atopis dermatitis, HIV, Huntington's disease, burns, fibromyalgy, schizophrenia, Hirschsprung's disease, allergies, familial dysautonomnia (Riley Day syndrome), hematopoietic disorders, gliomas comprising glioblastomas and astrocytomas, disorders of the blood brain barrier.

A preferred embodiment of the invention is based on the surprising finding of a significant 2-fold increase in A-peptide concentration in Alzheimer's patients as

compared to age-matched healthy control individuals, as is consistent with the results of Substance P. The corresponding embodiment of the invention resides in a diagnostic method and kit for testing body samples, in particular blood, plasma or liquor with an antibody specific for protachykinin, its precursors or fragments, in particular A-peptide.

A further preferred embodiment of the invention discloses a significant increase of A-peptide containing immune reactivity in pneumonia, local infection (abscesses), sepsis, trauma and polytrauma patients and diverse tumors (Fig. 10), intoxication, systemic inflammation (Fig. 11) and functioning of the blood brain barrier (Fig. 9). The liquor of healthy individuals contains 150 to 450 μg of protein per ml, 83% of the proteins are synthesized in the serum, and only 17 % in the brain. Prostaglandin-D-synthetase shows the highest quotient liquor to serum of 33 so far determined. A preferred embodiment surprisingly shows that the A-peptide immune reactivity has a quotient of serum to liquor of more than 80 and thus surprisingly is significantly higher than of other proteins. As the concentration of A-peptide is higher in liquor than in plasma, an increase of A-peptide in plasma indicates the damage or loss of function of the blood brain barrier: the liquor diffuses into plasma leading to an increase in protachykinin concentration in plasma. The determination of A-peptide or A-peptide immune reactivity is thus a potent plasma marker for the functioning of the blood brain barrier.

Thus the invention also provides a diagnosis method and kit for the above mentioned diseases/disorders, both having or using an antibody for protachykinin.

The invention discloses the use of protachykinin and/ or its antibodies for detection, course control and prognosis of disease.

A preferred embodiment of the invention determines the A-peptide concentration in blood during the course of diseases like meningitis, cranio-cerebral trauma and stroke (until reconvalescence or exitus) in Fig. 9. In a diseased state patients show

a significantly increased level of A-peptide (above 35 pg/ml) that decreases during convalescence, but remains constantly significantly increased until exitus of patient's having a stroke.

Description of the Figures

Fig. 1 shows the biosynthesis of neuropeptides *in vivo*.

Fig. 2 shows the stability of protachykinin-fragments *ex vivo* (EDTA-plasma). The half-life of protachykinin at room temperature is more than 24 h.

Fig.3 shows the determination of protachykinin-fragments *in vivo* after application of endotoxin. The half-life of PTK/ A-peptide is more than 60 mins. *in vivo*.

Fig. 4 a shows the splice variants of α -PPT-A (AS 1-92, Sequence ID 1).

Fig. 4b shows splice variants of β -PPT-A (AS 1-110, Sequence ID 2).

Fig. 4 c shows splice variants of γ -PPT-A (AS 1-95, Sequence ID 5).

Fig. 4 d shows splice variants of δ -PPT-A (AS 1-77, Sequence ID 8).

Fig. 5 shows immune reactivity of antibody combinations I-III in plasma of healthy control individuals, sepsis, Alzheimer's patients and liquor of healthy controls.

Fig. 6 shows standard curve of luminescence (relative luminescence units) in dependence of A-peptide concentrations (pg/ml).

Fig. 7 shows the distribution curve of A-peptide concentrations in plasma of healthy control individuals (pg/ml).

Fig. 8 shows the A-peptide concentration in plasma of Alzheimer's patients and non-demented age-matched controls.

Fig.9 shows the course of patients with cerebral disorders, showing the concentration of A-peptide in stroke (reconvalescence and exitus), meningitis and cranio-cerebral trauma during course of disease from admission to hospital to day 14 or exitus.

Fig. 10 shows the A-peptide concentrations in different diseases: pneumonia, local infection (abscess), sepsis, coronary heart disease, trauma and poly-trauma, diverse tumors.

Fig. 11 shows the simulation of systemic inflammation. A-peptide-, TNF-alpha-, IL-6- and PCT- concentrations after application of endotoxin.

Example 1

Production of Antibodies

(a) Immunogen

Four different peptide sequences (PSP1 to PSP4), see Fig. 1) of protachykinin A were selected and synthesized by Jerini (Berlin, Germany). The peptides PSP 1 and 2 comprise the sequence of the A-peptide. PSP3 comprises the first part of the first sequence of the active neuropeptides K (NPK) and PSP4 also shows parts of the sequence of NPK as well as of neuropeptide γ (NP γ) and the complete sequence of neurokinin A (NKA). Each peptide was provided with an aminoterminal cystein residue (Cys0).

(b) Antibodies

For the immunization the respective peptide was conjugated with the haemocyanine from *Limulus polyphemus* by BioGenes (Berlin, Germany) antibodies were produced against the PTK-peptide-conjugate PSP1 to PSP4 in rabbits.

Example 2

Purification of the antibodies

The antibodies were purified by a ligand specific affinity purification. For that step the Cys(0)-peptides PSP1 to PSP4 were linked to SulfoLink-Gel supplied by Pierce (Boston, USA). The binding occurred according to the protocol of the provider.

In summary, polycarbonate columns (15 mm x 80 mm) were filled with 5 ml affinity matrix. After equilibration of the columns with PBS (phosphate buffered saline) (136 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 20.4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.7 mM KCl, pH 7.2) 5 mg of the respective peptide were dissolved in PBS applied to the closed columns and the gel material was homogenized by gentle rotation. After 15 min of incubation at room temperature and settling of the gel material, the columns were washed 5 times with 3ml PBS. To saturate free binding positions 5 ml of a 50 mM L-cysteine solution were added to the material of the column and the gel material after homogenization was again incubated for 15 min at room temperature. After settling of the gel material each column was washed 6 times with 5 ml of a 1 M NaCl solution followed by washing with PBS.

The gel material was mixed with 25 ml of the respective pools of antiserum and incubated over night at room temperature by gentle rotation. The serum-gel mixture was added to polycarbonate columns and surplus serum was removed. The columns were then washed with 250 ml PBS to remove unbound serum proteins. The desorption of unbound antibodies was done by elution of the column with 50 mM citric acid (pH 2.2). The eluate was captured in fractions of 1 ml. The protein concentration of each fraction was determined using the BCA-protein assay kit of

Perbio (Bonn, Germany) and the fractions with a protein content > 1 mg/ml were combined. The affinity purified antibodies were rebuffered in PBS via dialysis. The protein content was determined again and the antibodies were stored at 4 °C.

Example 3

Immobilization /tagging of the antibodies

The purified antibodies against the peptide PSP2, 3 and 4 were immobilized on polystyrol tubes (startubes, 12 mm x 75 mm, Greiner, Germany). For that procedure the antibody solutions were diluted to a protein concentration of 6.7 µg/ml with PBS and 300 µl per tube were pipetted (corresponds to 2 µg antibody per tube). These were incubated for 20 hours at room temperature and then washed 3 times with 4 ml PBS, respectively. Until further use the tubes were stored at 4 °C. The antibody against PSP1 (1mg/ml in PBS) was tagged with the luminescent marker Acridiniumester-N-Hydroxy-Succinimid (1 mg/ml in acetonitrile, InVent, Hennigsdorf, Germany). For the tagging procedure 200 µl of antibody were mixed with 4 µl acridinium ester, incubated for 20 minutes and free acridinium ester bonds were saturated by adding 40 µl of a 50 mM glycine solution. The tagging preparation was separated from free acridinium ester by HPLC in a BioSil 400-gel filtration-column (BioRad, Munich, Germany). PBS was used as a solvent.

Example 4

Determination of the protachykinin immune reactivity

The protachykinin immune reactivity was determined in plasma using three different combinations of antibodies of 5 controls each, sepsis and Alzheimer patients as well as in the liquor of 5 non-demented control patients. 100 µl samples were pipetted per coated tube and 12.5 ng of the tagged antibodies (in 200 µl PBS buffer, 10 mM EDTA) were added to each tube. The tubes were incubated at 4 °C for 20 hours. Subsequently, unbound tracer antibody was removed by washing 5

times with 1 ml PBS each. Tagged antibody bound to the tube was quantified by detecting the luminescence in a luminometer (Berthold LB 952T/16).

The PTK fragments detected by the different combinations of antibodies (Fig. 4a) are shown in the Table below and in Fig. 4b. The measured relative immune reactivities with 3 antibody combinations are shown in Fig. 5. Antibody combination I detects the A-peptide (Fragment 1-37) that is comprised in all 4 splicing variants (α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A and δ PPT-A). Antibody combination II detects only splicing variants α PPT-A and β PPT-A and combination III only β PPT-A and γ PPT-A.

In the plasma of controls, sepsis and Alzheimer patients protachykinin sequences comprising all three antibody combinations could be detected. The average value of the control data for the detection of $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ the antibody combination I was calibrated to 100 % for a better comparison between the results and the average values of the remaining data were referred to that (see Table 1). It is shown that the A-peptide and the PTK-fragments comprising all the sequences show by far the highest concentration in liquor and show a 30-fold higher signal than in the plasma of healthy controls. The immune reactivity of A-peptide is clearly increased also in plasma of sepsis patients. Here, the signal is about 12 times higher than in the plasma of control individuals. Alzheimer's patients show a signal increased by factor 2.

The splice variants α/β and β/γ in combination with the antibody combinations II and III do not show a detectable signal in liquor. This indicates that PTK is present as the fully processed protein. In plasma, however, splice variants α/β and β/γ with the combinations II and III could be detected, these, however, were running below the signals for $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ (antibody combination I).

The detection of PTK-fragments by the antibody combination I show a quotient of 11.6 and 2.0 in sepsis and Alzheimer samples, respectively, with reference to the

control samples. The quotient of the sepsis samples of the antibody combinations II and III is considerably lower than 11.6 of the antibody combination I. Thus, this combination is a better method for the differentiation of healthy controls, at least for sepsis patients. (The choice of antibody combinations does not seem to be relevant for the differentiation of controls and Alzheimer patients, as the quotient for the Alzheimer samples in combination with all three antibody combinations is in the range of 2.)

Table 1: Measurement of the relative immune reactivity of PTK -/fragments in combination with different antibody combinations

Antibody combination	I (PSP2 /PSP1)		II (PSP3 /PSP1)		III (PSP4 /PSP1)	
Detected splice variants	$\alpha/\beta/\gamma/\delta$		α/β		β/γ	
Detectable PTK-fragments	AS 1-37 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)		AS 1-92(α)		AS 1-89 (β)	
	AS 1-50 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)		AS 1-76 (β)		AS 1-110 (β)	
	AS 1-92 (α)		AS 1-89 (β)		AS 1-74(γ)	
	AS 1 - 76 (β)		AS 1-110 (β)		AS 1-95(γ)	
	AS 1-89 (β)					
	AS 1-110 (β)					
	AS 1-61(γ)					
	AS 1-74(γ)					
	AS 1-95(γ)					
	AS 1-77(δ)					
Sample	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient	rel. IR	quotient
Control sample	100	1.0	45.6	1.0	36.4	1.0
Sepsis plasma	1160	11.6	114	2.5	101	2.8
Alzheimer disease plasma	200	2.0	86.5	1.8	67	1.8
Liquor	3096	30.96	6	0.1	5.5	0.15

- rel. IR relative immune reactivity (values in % in response to the control plasma value of antibody combination I which was calibrated to 100 %). All values are average values (n = 5).
- Quotient ratio of the respective value of the patient (in %) and the corresponding control value (in %) of the respective antibody combination

Example 5

Immunoassay for the quantitative determination of A-peptide

1. Components

Tubes coated with PSP2-antibody and PSP1-antibody tagged with a luminescent marker were used in the immunoassay. The production of these components is described in example 3.

2. Procedure

100 μ l of sample were pipetted in each tube coated with antibody and 12.5 ng of the tagged antibody (in 200 μ l PBS buffer, 10 mM EDTA) were added. The tubes were incubated for 20 hours at 4 °C and subsequently tracer antibody was removed by washing 5 times with 1 ml PBS. Tagged antibody bound to the tube was quantified by measuring the luminescence in a luminometer (Berthold LB 952T/16).

3. Calibration

To be able to determine the concentrations and the immune reactivities, of A-peptide, the peptide was synthesized by Jerini (Berlin, Germany). The weighed out peptide was used as a calibrator for the immunoassay. In Fig. 6 the standard graph of A-peptide is shown. The analytical sensitivity of A-peptide assays is about 4 pg/ml.

Example 6***A-peptide concentrations in plasma of supposedly healthy individuals (controls)***

The distribution graph of the A-peptide concentration in plasma of healthy individuals was shown in Fig. 7. 90 % of the 100 control samples show an A-peptide immune reactivity below 35 pg/ml. The median was 13.3 pg/ml.

Example 7***A-peptide content in Alzheimer's disease***

The A-peptide immune reactivity in plasma of patients suffering from Alzheimer's disease and non-demented age-matched controls differ significantly (Fig. 8). The median of the controls in this case is 18.0 pg/ml, the median of Alzheimer's patients is increased by factor 2, i. e. it is 39.0 pg/ml.

Example 8***A-peptide concentrations in cerebrospinal fluid (CSF)***

The A-peptide concentration in liquor of control samples (n = 30) was determined and a median of 1085 pg/ml was determined. The CSF-median is increased significantly by a factor of about 80 above the median of plasma of healthy control individuals.

Example 9***A-peptide concentration in impairments of the blood-brain barrier***

The A-peptide content in the circulation in the course of disease of patients suffering from cerebral disorders like meningitis, cranio-cerebral trauma as well as stroke (including recovery or exitus) was determined (Fig. 9). It was shown that the A-peptide level was at a very high level (above the normal level of about 35 pg/ml) at admission of the patients to the hospital. Convalescent patients having meningitis, stroke or cranio-cerebral trauma, showed a steady decrease of A-peptide concentration down to normal level. A stroke with consequent death

shows significantly increased A-peptide concentrations during the whole course. The concentration of A-peptide does not decrease to normal level until exitus.

Consequence: The determination of A-peptide concentration can be used as a plasma marker for the functioning of the blood-brain barrier. As the A-peptide concentration in liquor is about 80-fold increased, as compared to the circulation, the transfer of liquor proteins into blood by the measurement of A-peptide in plasma is a signal for a present distortion of function of the blood-brain barrier. The course of A-peptide concentration allows a meaningful statement about the condition of the patient and a prognosis about the course of the disease.

Example 10

Determination of A-peptide concentration in the circulation of patients suffering from pneumonia, local infections, sepsis, coronary heart diseases, trauma or polytrauma and different tumors

Patients suffering from inflammatory diseases, like pneumonia, local infects (abscesses) as well as sepsis, showed in parts significantly higher values (> 35 pg/ml) in 80 %, 100 % and 72 %, respectively of the cases (Fig. 10). In contrast to these results only 3 of 16 patients suffering from coronary heart diseases had a higher value than in the controls. Patients suffering from trauma and polytrauma as well as patients suffering from different tumor diseases showed an increased A-peptide concentration in 50 % of the cases as compared to the control individuals.

Example 11

A-peptide and simulation of systemic inflammation

The standard endotoxin 0113:H10:k of *E. coli* was intravenously injected into voluntary test persons at a concentration of 4 ng/kg body weight. Blood samples were taken at different times (protocol following DANDONA et al., 1994). The determination of different parameters of inflammations (IL-6, $\text{TNF}\alpha$, PCT) as well as the A-peptide in the test persons treated with endotoxin, showed a time-dependent course of concentrations of the substances in blood (see Fig. 11). First,

an increase of $\text{TNF}\alpha$ after about 1 hour after injection of the endotoxin occurs as expected. Shortly thereafter an increase of cytokines IL-6 follows (about 1.5 hours after injection of the endotoxin). After 3 hours the concentrations of $\text{TNF}\alpha$ and IL-6 are decreasing, while now, surprisingly, an increase of A-peptide concentration occurs, which reaches the starting level after only about 7 hours. PCT shows an increase of concentration after 5 hours and steadily increases during further course. Thus the secretion of A-peptide is inducible by sole injection of endotoxin and is one event in the immune cascade between $\text{TNF}\alpha$ /IL-6 and PCT.

Literature

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

SEQUENCE LISTING

<110> Organization Name : SphingoTec GmbH
 Street : Tulpenweg 6
 City : Borgsdorf
 Postal Code : 16556
 Country : German

Application Project

<120> Title : Use of precursors of tachykinins and/or their fragments in medical diagnostic

Sequence

<210> SEQ ID NO: 1
 <211> Length : 92
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20 25 30
 Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35 40 45
 Met Gly Lys Arg Asp Ala Asp Ser Ser Ile Glu Lys Gln Val Ala Leu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Leu Tyr Gly His Gly Gln Ile Ser His Lys Met Ala Tyr
 65 70 75 80
 Glu Arg Ser Ala Met Gln Asn Tyr Glu Arg Arg Arg
 85 90

<210> SEQ ID NO: 2
 <211> Length : 110
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

```

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1           5           10           15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20           25           30
Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35           40           45
Met Gly Lys Arg Asp Ala Asp Ser Ser Ile Glu Lys Gln Val Ala Leu
 50           55           60
Leu Lys Ala Leu Tyr Gly His Gly Gln Ile Ser His Lys Arg His Lys
 65           70           75           80
Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met Gly Lys Arg Ala Leu Asn Ser Val
 85           90           95
Ala Tyr Glu Arg Ser Ala Met Gln Asn Tyr Glu Arg Arg Arg
 100          105          110

```

<210> SEQ ID NO: 3
 <211> Length : 89
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

```

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1           5           10           15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20           25           30
Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35           40           45
Met Gly Lys Arg Asp Ala Asp Ser Ser Ile Gly Lys Gln Val Ala Leu
 50           55           60
Leu Lys Ala Leu Tyr Gly His Gly Gln Ile Ser His Lys Arg His Lys
 65           70           75           80
Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met Gly
 85

```

<210> SEQ ID NO: 4
 <211> Length : 76
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

```

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
  1           5           10           15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
          20           25           30
Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
          35           40           45
Met Gly Lys Arg Asp Ala Asp Ser Ser Ile Glu Lys Gln Val Ala Leu
          50           55           60
Leu Lys Ala Leu Tyr Gly His Gly Gln Ile Ser His
          65           70           75

```

<210> SEQ ID NO: 5
 <211> Length : 95
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

```

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
  1           5           10           15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe glu His Leu
          20           25           30
Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
          35           40           45
Met Gly Lys Arg Asp Ala Gly His Gly Gln Ile Ser His Lys Arg His
          50           55           60
Lys Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met Gly Lys Arg Ala Leu Asn Ser
          65           70           75           80
Val Ala Tyr Glu Arg Ser Ala Met Gln Asn Tyr Glu Arg Arg Arg
          85           90           95

```

<210> SEQ ID NO: 6
 <211> Length : 74
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20 25 30
 Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35 40 45
 Met Gly Lys Arg Asp Ala Gly His Gly Gln Ile Ser His Lys Arg His
 50 55 60
 Lys Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met Gly
 65 70

<210> SEQ ID NO: 7
 <211> Length : 60
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Gln Ily Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20 25 30
 Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35 40 45
 Met Gly Lys Arg Asp Ala Gly His Gly Gln Ile Ser His
 50 55 60

<210> SEQ ID NO: 8
 <211> Length : 77
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

```

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1           5           10           15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20           25           30
Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35           40           45
Met Gly Lys Arg Asp Ala Gly His Gly Gln Ile Ser His Lys Met Ala
 50           55           60
Tyr Glu Arg Ser Ala Met Gln Asn Tyr Glu Arg Arg Arg
 65           70           75

```

<210> SEQ ID NO: 9
 <211> Length : 50
 <212> Type : PRT
 <213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

```

Glu glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
 1           5           10           15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
 20           25           30
Leu Gln Arg Ile Ala Arg Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu
 35           40           45
Met Gly
 50

```

<210> SEQ ID NO: 10
<211> Length : 37
<212> Type : PRT
<213> Organism Name : Artificial Sequence

<400> Sequence :

Glu Glu Ile Gly Ala Asn Asp Asp LEu Asn Tyr Trp Ser Asp Trp Tyr
1 5 10 15
Asp Ser Asp Gln Ile Lys Glu Glu Leu Pro Glu Pro Phe Glu His Leu
20 25 30
Leu Gln Arg Ile Ala
35

1. Use of protachykinin, a splice variant thereof, a fragment thereof, a derivative thereof or a combination of said compounds for medical diagnostic.
2. Use according to claim 1 wherein the presence or concentration of the components mentioned in an *ex vivo* body fluid sample, preferably in blood, plasma or liquor is determined.
3. Use according to claim 1, wherein a splice variant selected from the sequence IDs 1, 2, 5 or 8 or a mixture of two or more variants is used.
4. Use according to claim 1 wherein a fragment selected from one or more of the sequence IDs 3, 4, 6, 7, 9 or 10 is used.
5. Use according to claim 1 wherein a derivative of protachykinin is used which comprises additional or altered amino acids or fragments/components suitable to raise immune responses or fragments/components that render the sequences suitable for the detection by specific antibodies.
6. Use according to claims 1-5 wherein the compounds used show a homology of at least 75%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%.
7. Use according to claims 1-6 in combination with a marker, being suitable to detect any of the compounds mentioned in one of claims 1-6 or a compound that specifically binds to any of these compounds.
8. Use in accordance with one of claims 1-7 comprising determining the concentration of any of the compounds or combinations mentioned in one of claims 1-7 in a sample of a body fluid, tissue or other biomaterial from an individual, human being or animal.

9. Use according to claim 8 wherein the determination of the concentration is done by using at least one antibody binding specifically to the respective compound mentioned in one of claims 1-7.
10. Use of claim 9 wherein the at least one antibody is tagged with a detectable marker.
11. Use of claim 10 wherein the marker is a luminescent marker.
12. Use according to one of claims 8-11 wherein said use involves one or more of those antibodies specifically binding to any of sequence IDs 1-10 or fragments thereof.
13. Use according to one of claims 8-11 wherein said use involves one or more of those antibodies specifically binding to protachykinin 1-37 (A-peptide), its fragments thereof or precursors thereof.
14. Use according to one of claims 1-13 wherein the diseases to be detected comprise disease/disorders of the central nervous system, comprising Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression and/or conditions of pain, neurological, endocrinological, cerebral, muscular, local, systemic, chronic, inflammatory diseases, infectious diseases comprising bacterial and viral infections, meningitis, sepsis, Crohn's disease, colitis ulcerosa, sickle cell anemia, ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, arthritis comprising rheumatoid arthritis, bronchitis, hyperalgesia, asthma, intoxication comprising bacterial intoxication, immunological disorders, poly/-trauma comprising cranio-cerebral trauma, tumors/cancer, stroke, stress, atopis dermatitis, HIV, Huntington's disease, burns, fibromyalgy, schizophrenia, Hirschsprung's disease, allergies, familial dysautonnmia (Riley Day syndrome), hematopoietic disorders, gli-

mas comprising glioblastomas and astrocytomas, disorders of the blood brain barrier.

15. Use according to one of claims 1-14 wherein the compound to be detected is protachykinin 1-37 (A-peptide), its fragments or precursors or combinations thereof.
16. Use according to claims 1-15 wherein the antibody or combinations of antibodies are antibodies specifically binding to protachykinin 1-37 (A-peptide), its fragments or precursors or combinations thereof.
17. Antibody that binds to any one or more of the compounds mentioned in claims 1-7 or fragments thereof.
18. A specific antibody according to claim 17 wherein the antibody is specific to any of sequence IDs 1-10 or fragments thereof.
19. Antibody according to claim 17 wherein the antibody is specific to protachykinin 1-37 (A-peptide), its fragments or precursors or combinations thereof.
20. Use of the compounds/antibodies comprised in any of claims 1-7 and 17-19 as marker's/tool's in medical research, testing and/or validation.
21. Method of *in vivo* diagnosis comprising the determination of the concentration of any of the compounds/antibodies mentioned in claims 1-7 and 17-19 in body fluids, tissues and/or other biomaterials.
22. Method of diagnosis according to claim 21 comprising:
 - using a specific antibody or a combination of specific antibodies for the detection of the compounds comprised in claim 21,

- determining the concentration of any of the compounds or combinations in the respective sample,
 - deducing from the concentration the presence, and/or course and/or severity and/or prognosis of a disease or disorder,
 - including further clinical data to determine presence, and/or course and/or severity and/or prognosis of disease or disorders.
23. Method according to claims 21 and 22 whereas at least one antibody specifically binding to the respective compound is immobilized onto a surface and a second antibody specifically binding at another part of the compound is used for detection of the compound.
24. Method according to claim 24 wherein the antibody is tagged with a detectable marker.
25. Method according to claim 24 wherein the antibody is tagged with a luminescent marker.
26. Method according to any of claims 21-25 wherein the compound is protachykinin 1-37 (A-peptide), its fragments or precursors or combinations thereof.
27. Method according to claims 21-26 whereas the antibody or combinations of antibodies are antibodies specifically binding to protachykinin 1-37 (A-peptide), its fragments or precursors or combinations thereof.
28. Method according to any of claims 21-27 to determine the level of tachykinin/-s in body fluids, tissues and/or other biomaterials, comprising the determination of the level of molecules comprised in claim 1-6 in body fluids, tissues, and/or other biomaterials, thereby deducing the level of tachykinin/-s in the respective sample.

29. Method according to any of claims 21-28 wherein the tachykinin is Substance P.

30. A kit for an immunological assay comprising:

- at least one antibody according to any of claims 17-19, comprising a detectable marker,

or

- at least one antibody according to any of claims 17-19 and a detectable marker.

1 Abstract

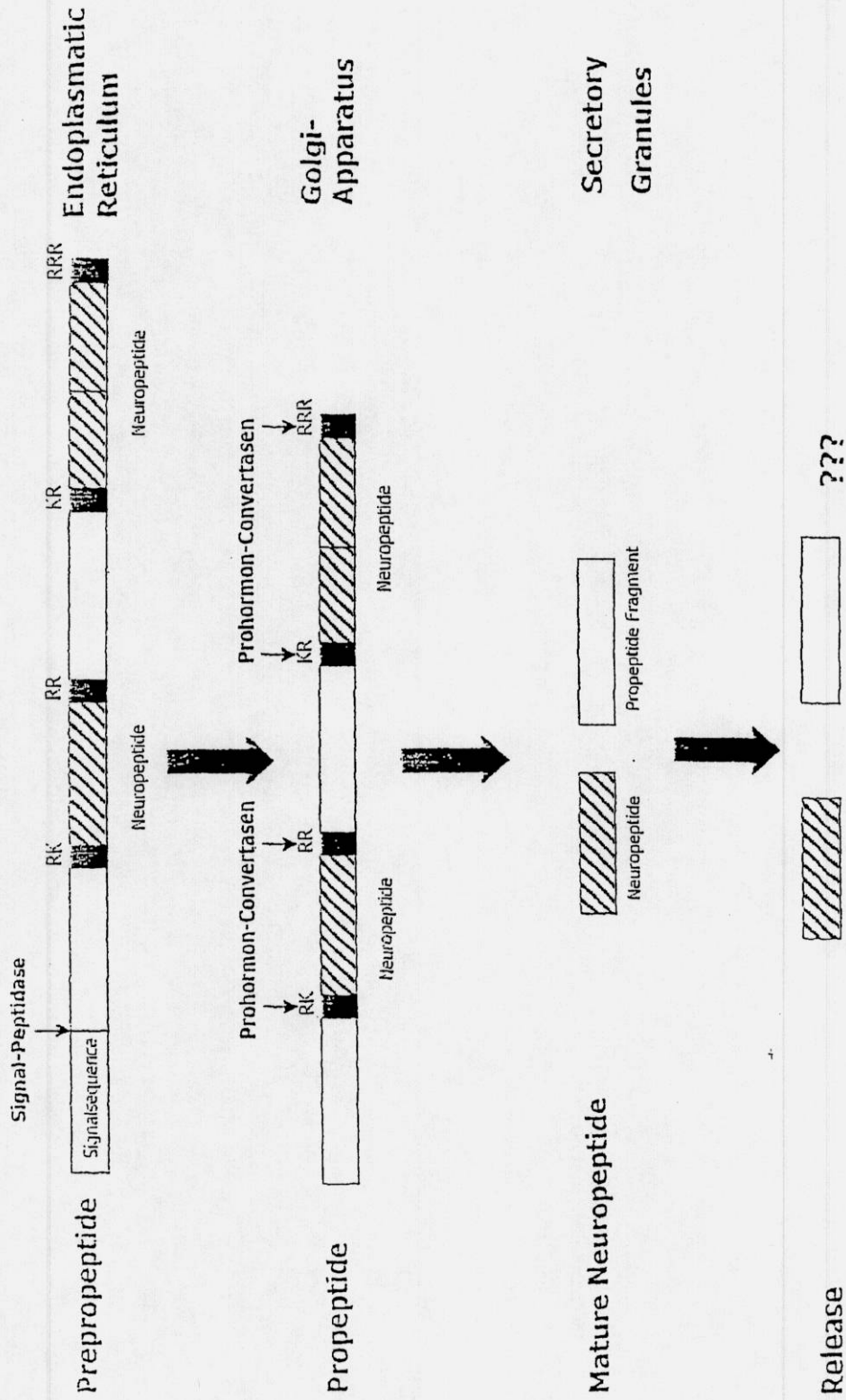
The invention relates to the diagnosis components in human or animal body fluids, tissues and/or biomaterials. More specifically the invention relates to the use of protachykinin and/or its fragments isolated from body fluids, tissues or other biomaterials as a marker peptide for medical diagnostics as well as for the diagnostic detection of the course prognosis and course control of diseases/disorders of the central nervous system, comprising Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression and/or conditions of pain, neurological, endocrinological, cerebral, muscular, local, systemic, chronic, inflammatory diseases, infectious diseases comprising bacterial and viral infections, meningitis, sepsis, Crohn's disease, colitis ulcerosa, sickle cell anemia, ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, arthritis comprising rheumatoid arthritis, bronchitis, hyperalgesia, asthma, intoxication comprising bacterial intoxication, immunological disorders, poly/-trauma comprising cranio-cerebral trauma, tumors/cancer, stroke, stress, atopis dermatitis, HIV, Huntington's disease, burns, schizophrenia, Hirschsprung's disease, allergies, familial dysautonmia (Riley Day syndrome), hematopoietic disorders, gliomas comprising glioblastomas and astrocytomas, disorders of the blood brain barrier. The invention further provides antibodies for binding to certain proteins and their fragments, more specifically protachykinin and its fragments. In accordance with the invention, a kit useful for the above-mentioned diagnosis is also provided.

2 Representative Drawing

None

FIG. 1

Neuropeptide synthesis



Stability of Protachykinin fragments *ex vivo* (EDTA-Plasma)

FIG. 2

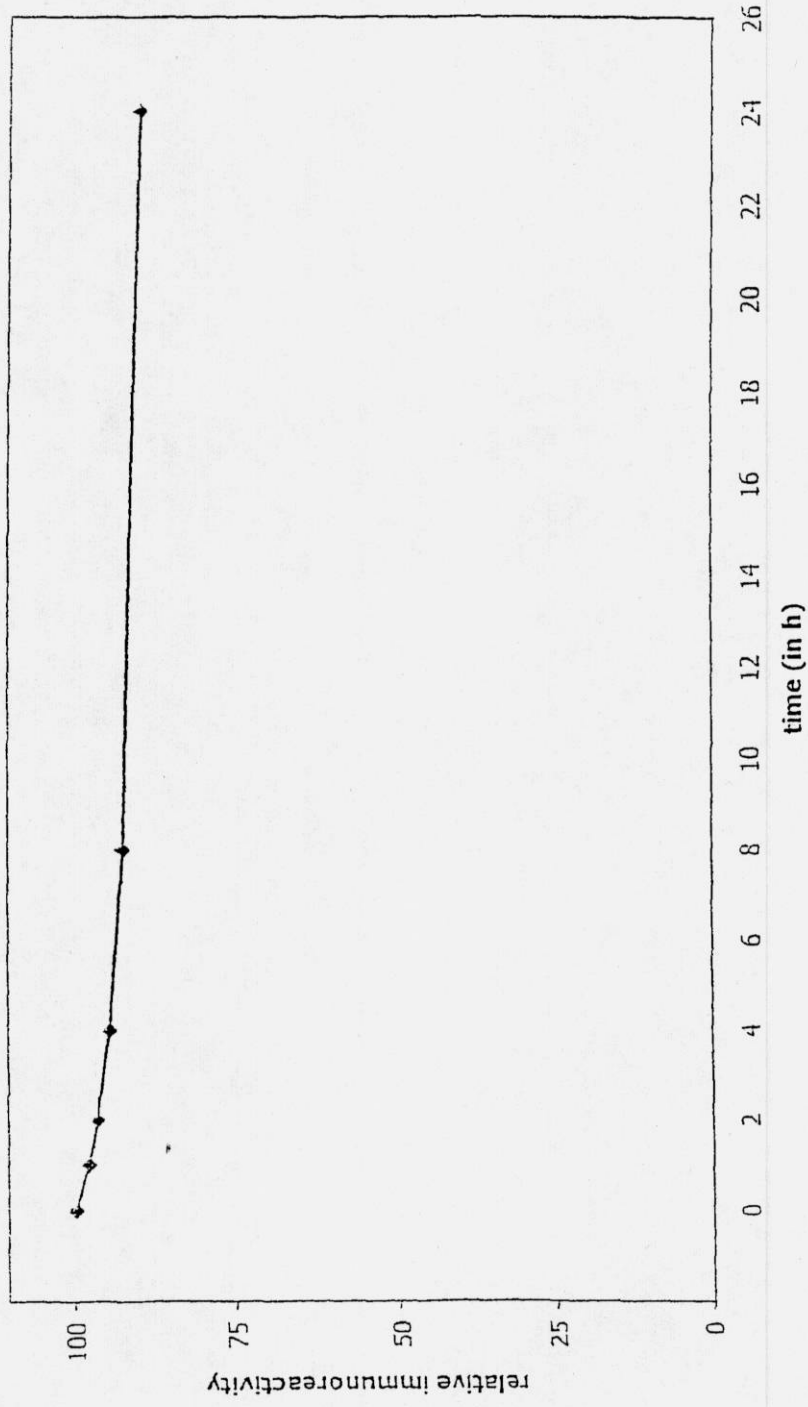
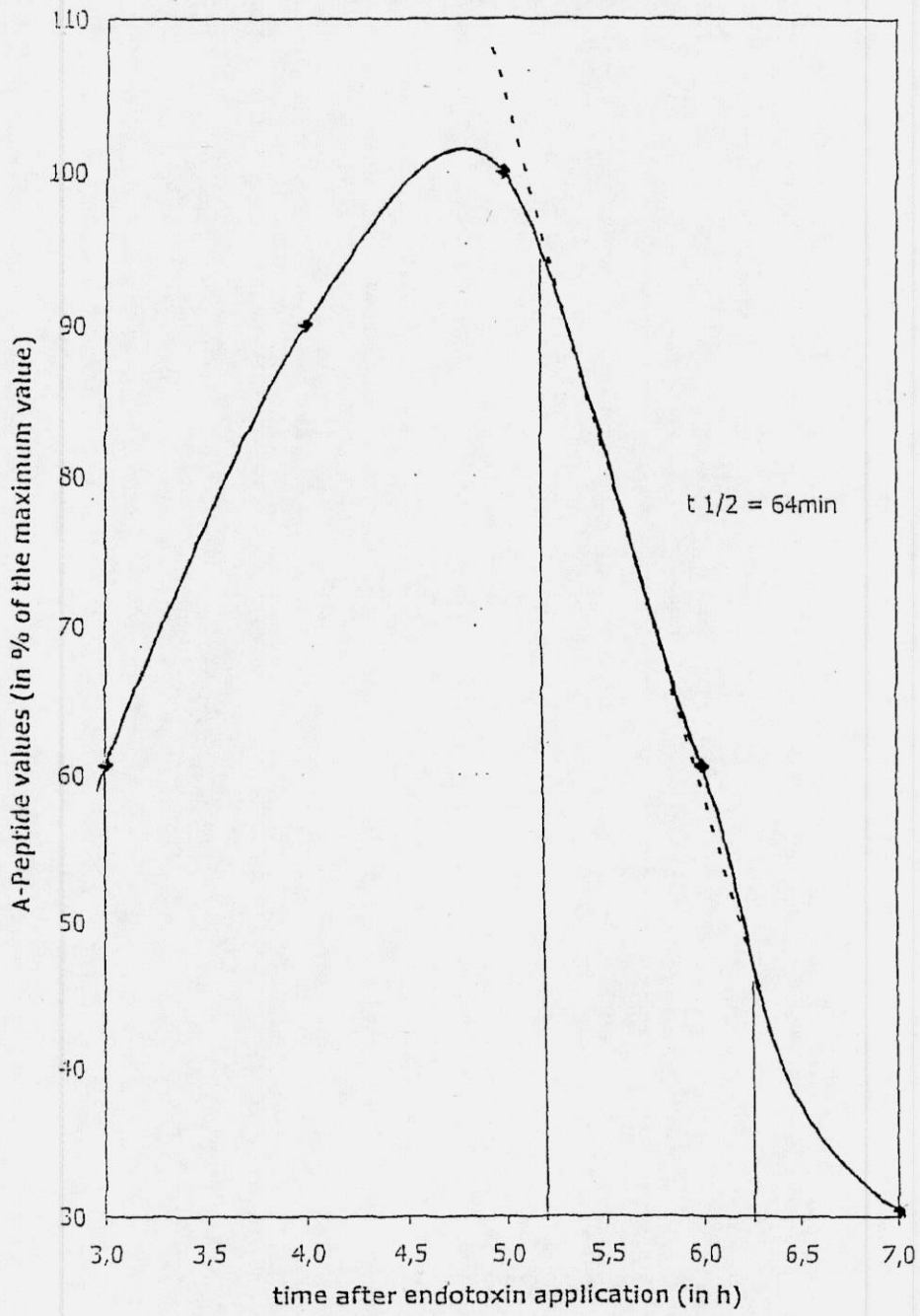


FIG. 3

Measurement of the half-life of A-Peptide-containing PTK fragments (*in vivo*)



Use of A-Peptide values from the endotoxin study (only values in the A-Peptide-Peak range)

slope in the range of the highest decrease of concentration

FIG. 4A

Splicing variant α PPT-A (AS 1-92, S.-ID 1)

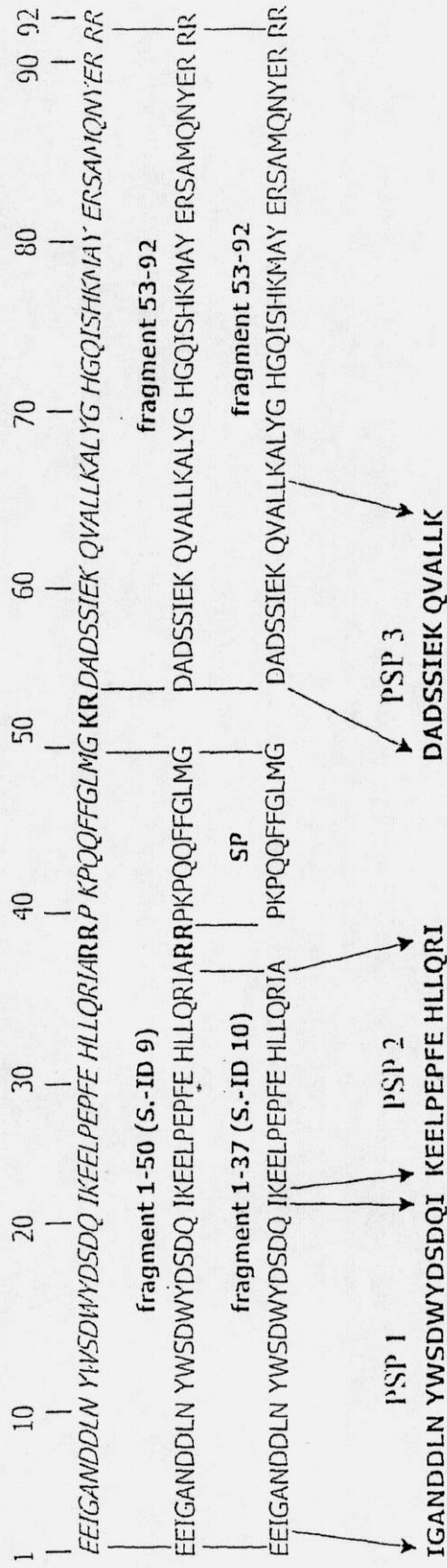


FIG. 4B

Splicing variant |PPT-A (AS 1-110, S.-ID 2)

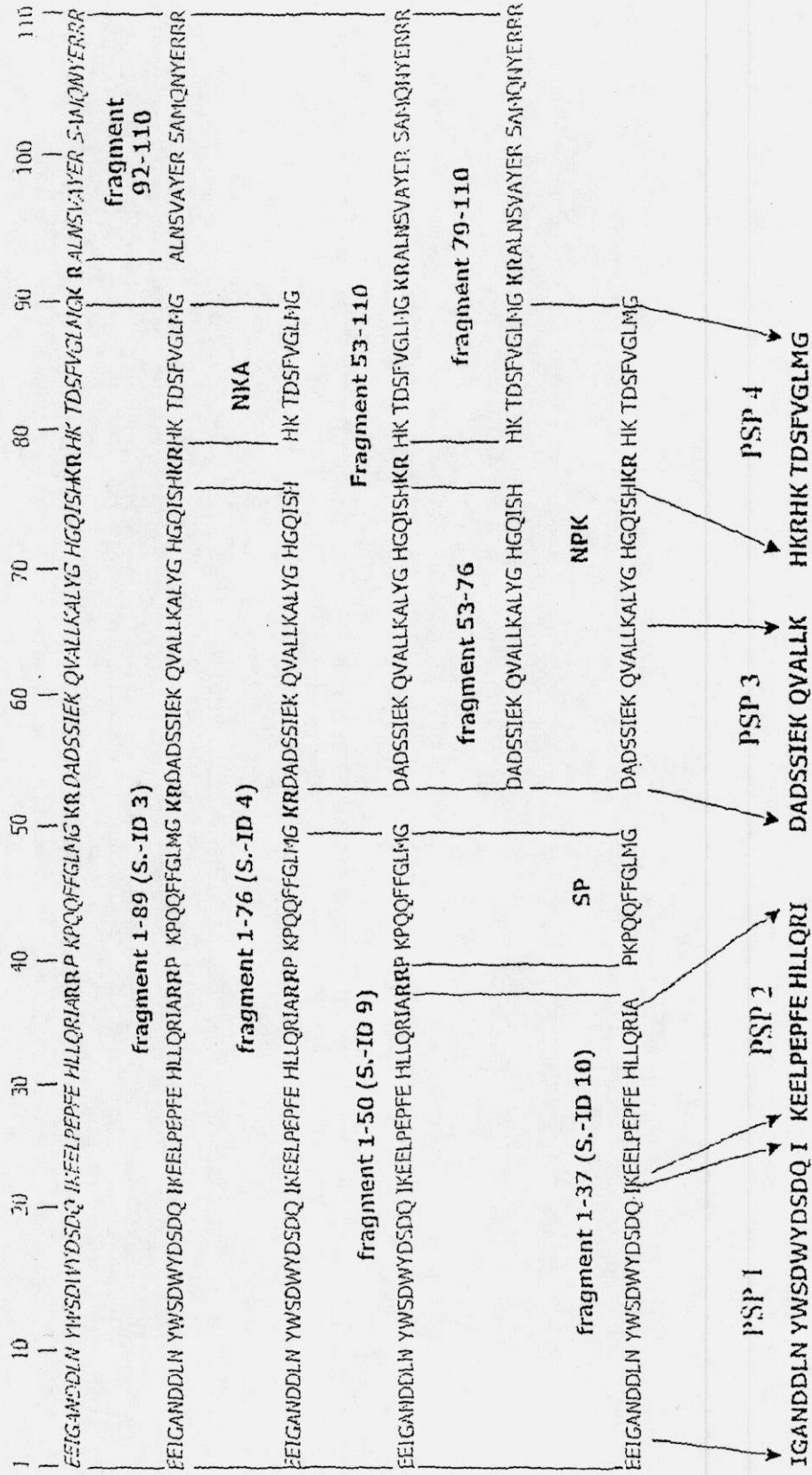


FIG. 4C

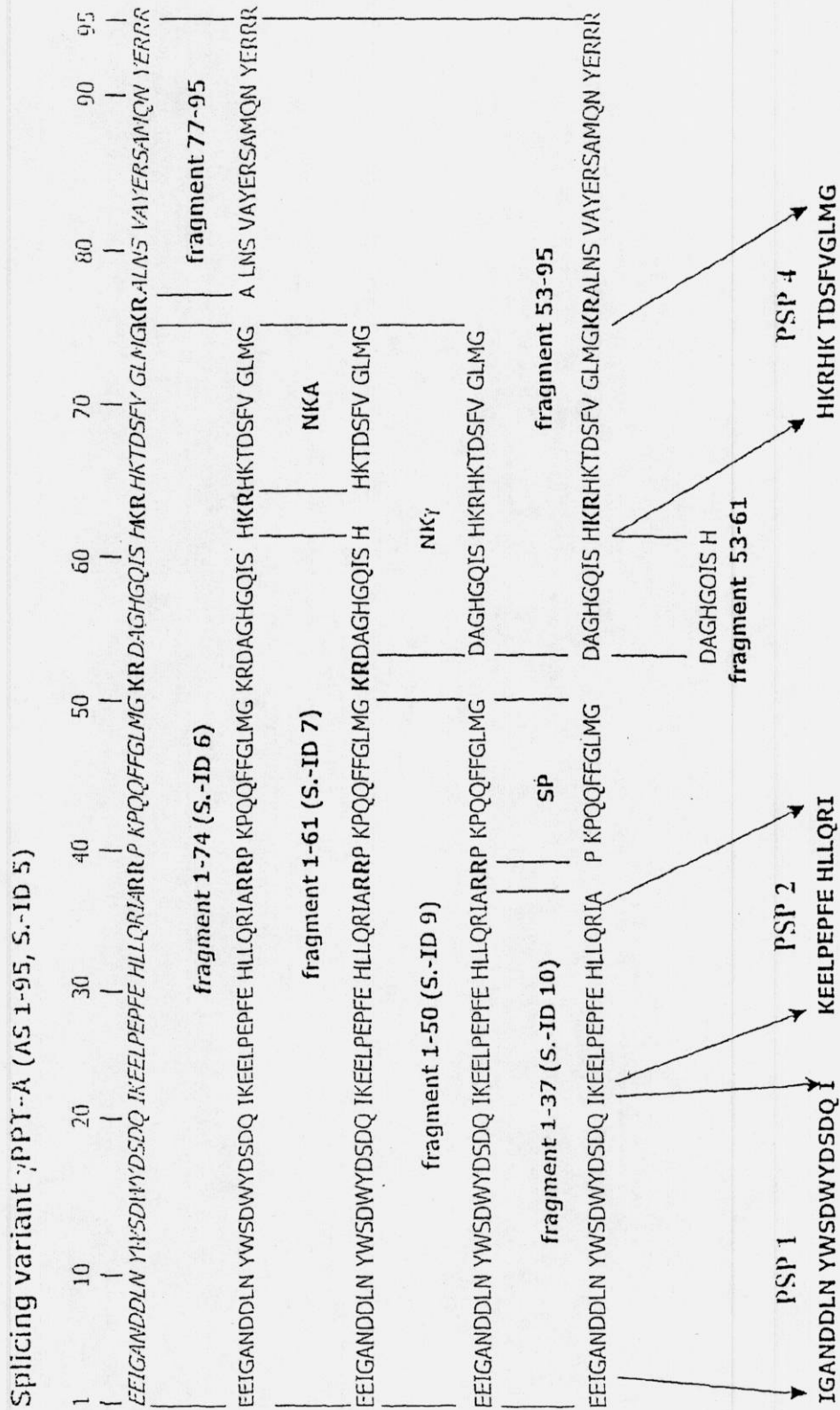
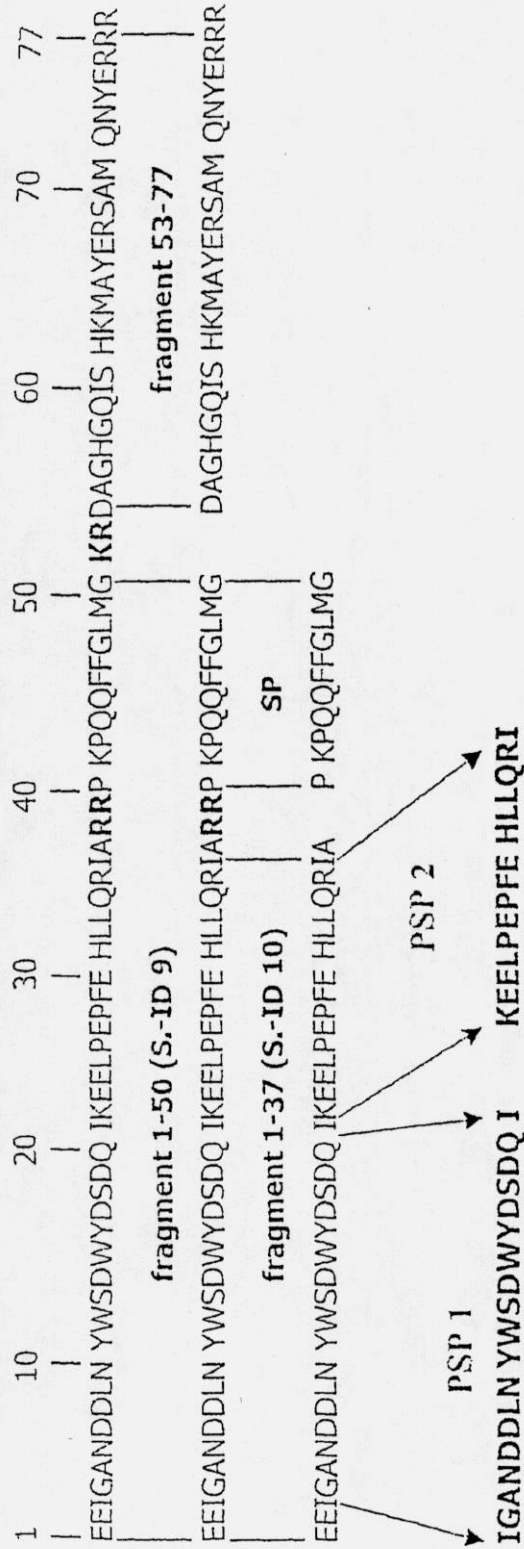


FIG. 4D

Spliing variant δ PPT-A (AS 1-77, S.-ID 8)



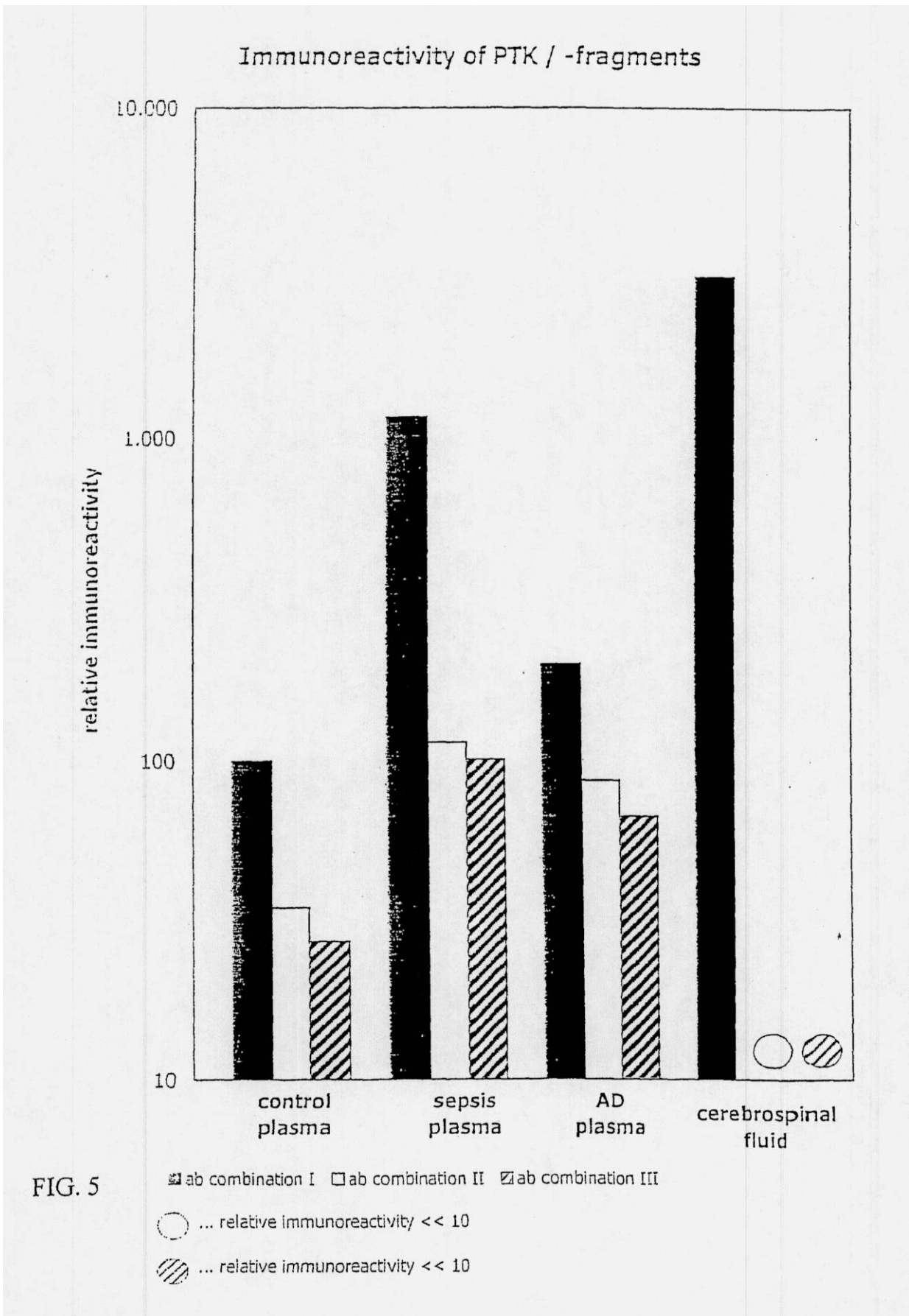


FIG. 5

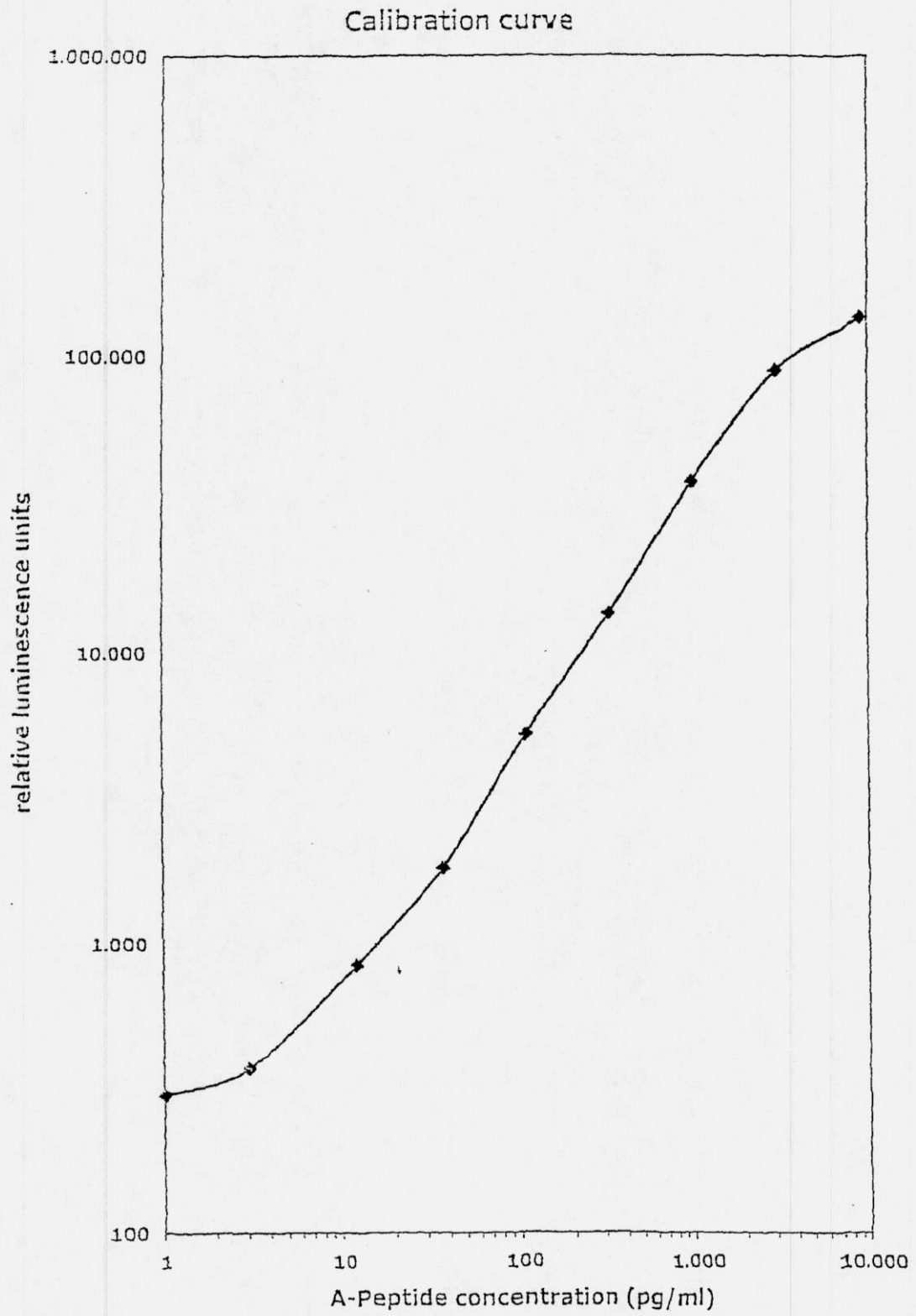


FIG. 6

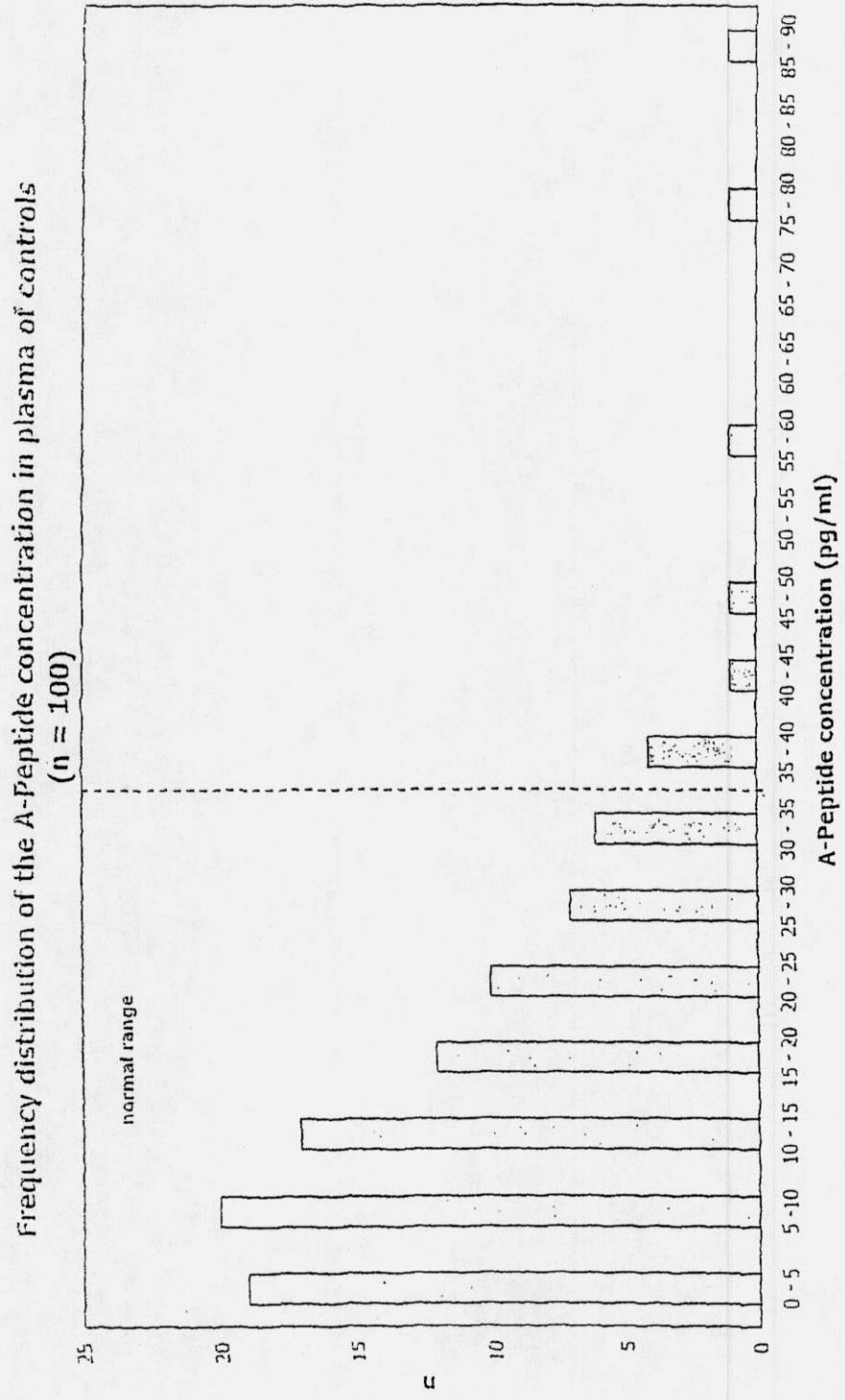


FIG. 7

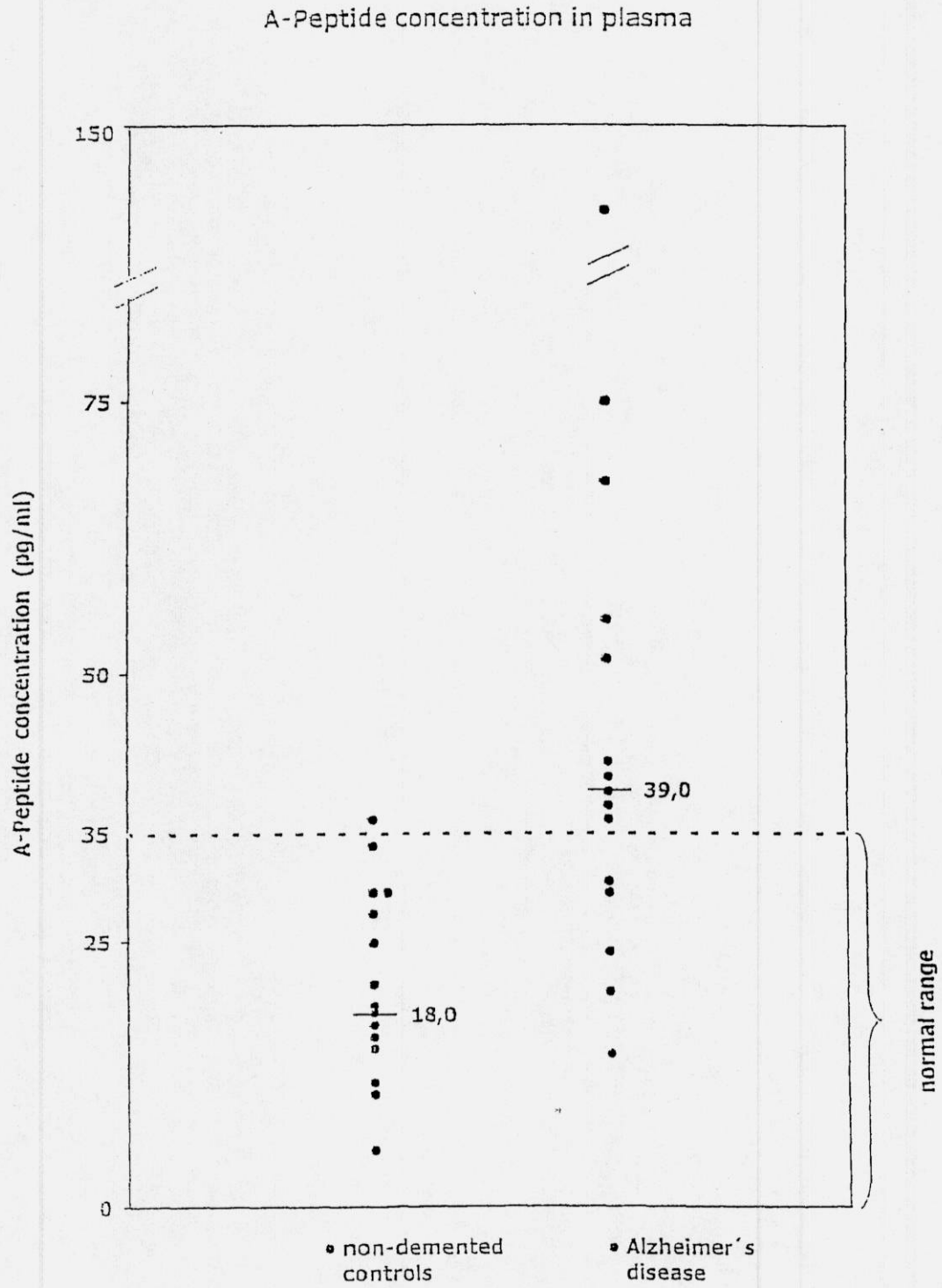


FIG. 8

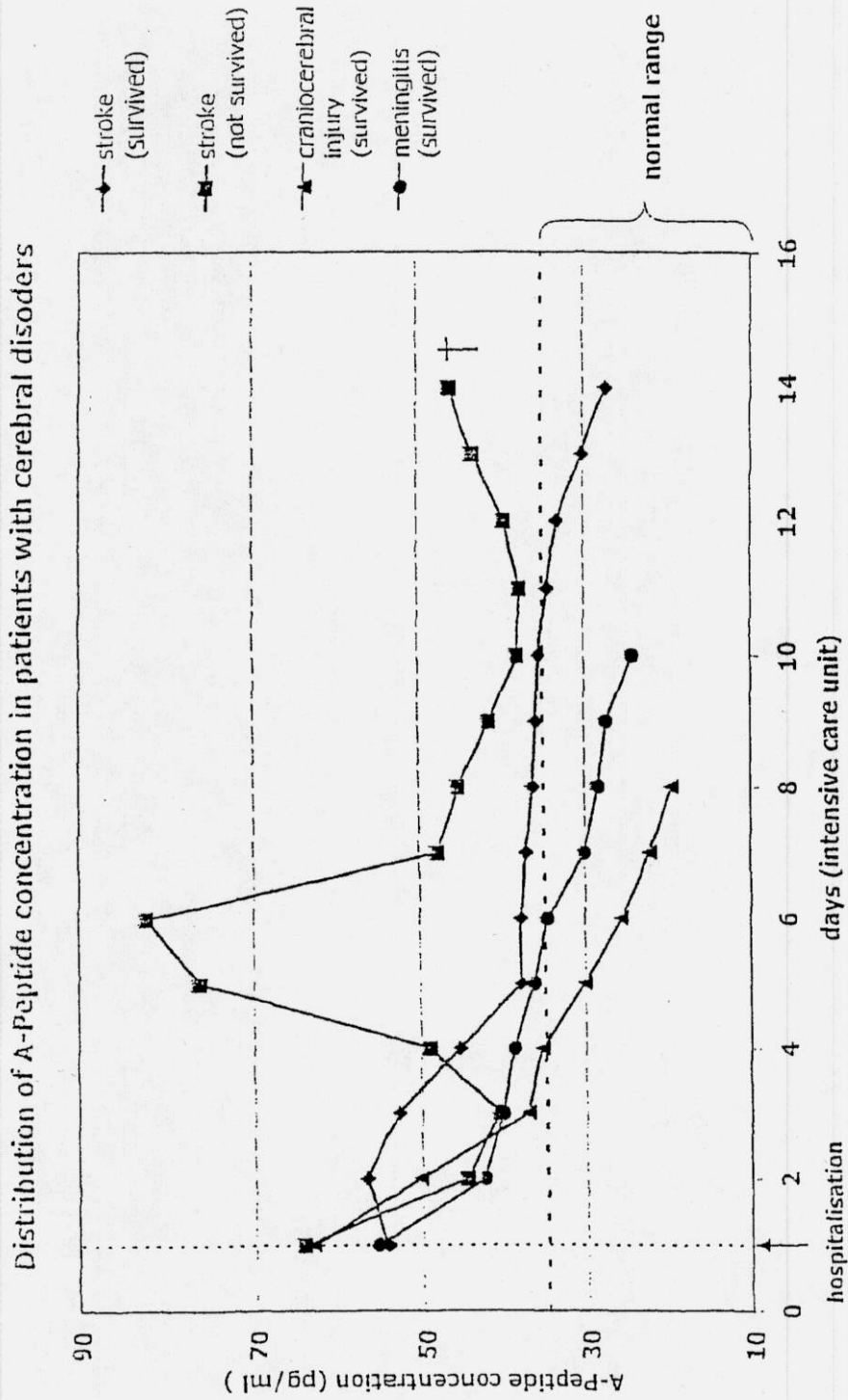


FIG. 9

A-Peptide concentration in different diseases

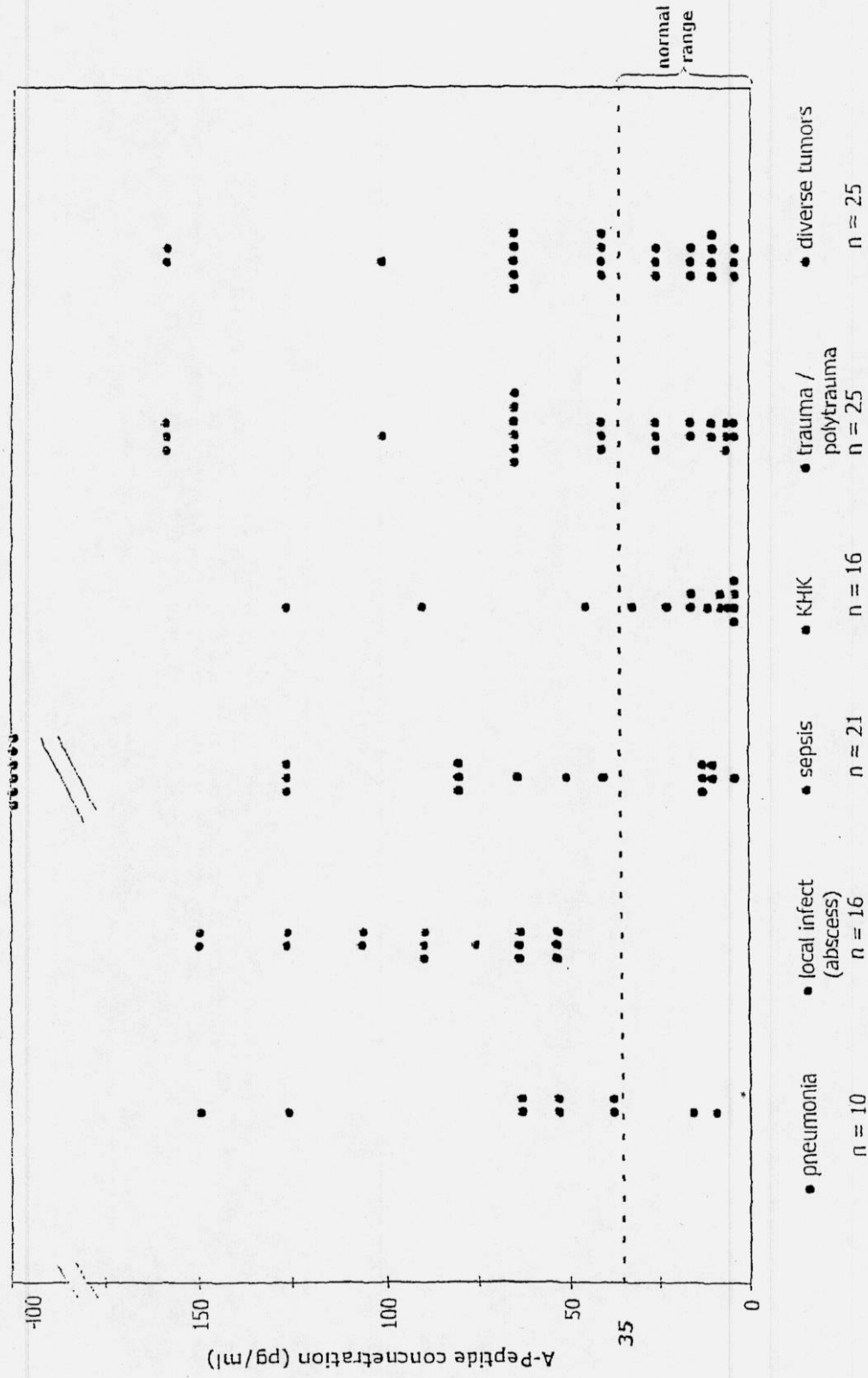
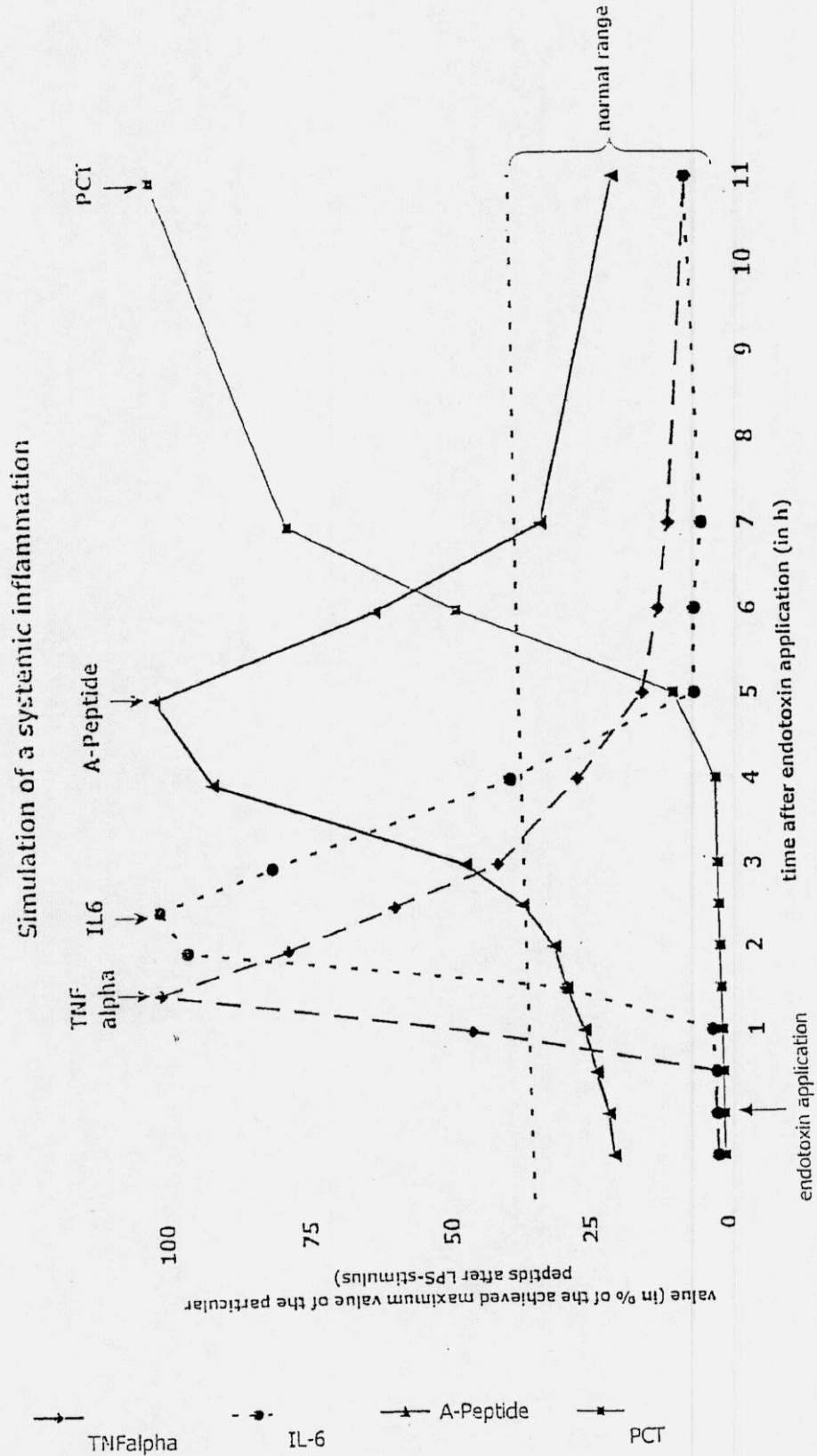


FIG. 10

FIG. 11



专利名称(译)	速激肽前体和/或其片段在医学诊断中的用途		
公开(公告)号	JP2012112978A	公开(公告)日	2012-06-14
申请号	JP2012055452	申请日	2012-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	鞘脂技术游戏的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	鞘脂科技有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルグマン アンドレアエルンスト		
发明人	アンドレアス・ベルグマン アンドレア・エルンスト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/6872 G01N2410/06 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/532.B		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2004009284 2004-04-20 EP		
其他公开文献	JP5607094B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

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

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