



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102612653 A

(43) 申请公布日 2012.07.25

(21) 申请号 201080052274.5

G01N 33/577(2006.01)

(22) 申请日 2010.09.17

G01N 33/68(2006.01)

(30) 优先权数据

61/243,604 2009.09.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.05.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/063664 2010.09.17

(87) PCT申请的公布数据

W02011/033046 EN 2011.03.24

(71) 申请人 前体生物药物股份公司

地址 德国哈雷

(72) 发明人 M·克兰施米特 C·格特利希

H-U·德穆特

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路

(51) Int. Cl.

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 37 页

序列表 1 页 附图 4 页

(54) 发明名称

检测淀粉样蛋白 β 肽的新测定

(57) 摘要

本发明涉及一种检测 A β 肽,特别是血浆中的 A β 肽的新方法,并且涉及 A β 肽在诊断阿尔茨海默病中的用途。

1. 一种检测生物学样品中的 A β 靶肽的方法,所述方法包括以下步骤:
 - i) 使生物学样品与至少两种不同的捕获抗体接触,
 - ii) 检测所得的免疫复合物,
 - iii) 破坏所述免疫复合物,以及
 - iv) 定量所捕获的 A β 肽。
2. 权利要求 1 的方法,其中在存在内部标准样品的条件下进行所述方法。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述内部标准样品选自血浆样品、脑脊液样品、尿样品、淋巴样品、唾液样品、汗液样品、胸膜液样品、滑液样品、房水样品、泪液样品、胆汁样品、胰分泌物样品。
4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述内部标准样品为内部标准血浆样品 (ITS)。
5. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述方法包括将生物学样品的 A β 靶肽浓度以内部标准样品中测定的相应 A β 靶肽的浓度进行标准化的另一步骤,获得每个生物学样品的相对 A β 靶肽水平,所述 A β 靶肽浓度如 A β (1-40) 或 A β (1-42) 浓度。
6. 权利要求 1-5 中任一项的方法,其中所述 A β 靶肽为 A β (1-40),包括其功能性等同物。
7. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中所述 A β 靶肽为 SEQ ID NO:1 的 A β (1-40),包括其功能性等同物。
8. 权利要求 1-5 中任一项的方法,其中所述 A β 靶肽为 A β (1-42),包括其功能性等同物。
9. 权利要求 1-5 或 8 中任一项的方法,其中所述 A β 靶肽为 SEQ ID NO:2 的 A β (2-42),包括其功能性等同物。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述生物学样品选自血液、血清、尿、脑脊液 (CSF)、血浆、淋巴、唾液、汗液、胸膜液、滑液、泪液、胆汁和胰分泌物。
11. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述生物学样品为血浆。
12. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少两种不同的捕获抗体各自对所述 A β 靶肽上的不同表位具有特异性。
13. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述捕获抗体选自
 - 3D6,表位 :1-5,
 - pAb-EL16,表位 :1-7,
 - 2H4,表位 :1-8,
 - 1E11,表位 :1-8,
 20. 1,表位 :1-10,
 - 兔抗 A β 多克隆抗体,表位 :1-14 (Abcam),
 - AB10,表位 :1-16,
 - 82E1,表位 :1-16,
 - pAb1-42,表位 :1-11,
 - NAB228,表位 :1-11,
 - DE2,表位 :1-16,
 - DE2B4,表位 :1-17,

6E10, 表位 :1-17,
10D5, 表位 :3-7,
W0-2, 表位 :4-10,
1A3, 表位 5-9,
pAb-EL21, 表位 5-11,
310-03, 表位 5-16,
鸡抗人 A β 多克隆抗体, 表位 12-28 (Abcam),
鸡抗人 A β 多克隆抗体, 表位 25-35 (Abcam),
兔抗人 A β 多克隆抗体, 表位 :N 端 (ABR),
兔抗人 A β 多克隆抗体 (Anaspec),
12C3, 表位 10-16,
16C9, 表位 10-16,
19B8, 表位 9-10,
pAb-EL26, 表位 :11-26,
BAM90. 1, 表位 :13-28,
兔抗 β -淀粉样蛋白 (pan) 多克隆抗体, 表位 :15-30 (MBL),
22D12, 表位 :18-21,
266, 表位 :16-24,
pAb-EL17 ; 表位 :15-24,
4G8, 表位 :17-24,
兔抗 A β 多克隆抗体, 表位 :22-35 (Abcam)
G2-10 ; 表位 :31-40,
兔抗 A β , aa 32-40 多克隆抗体 (GenScript Corporation),
EP1876Y, 表位 :x-40,
G2-11, 表位 :33-42,
16C11, 表位 :33-42,
21F12, 表位 :34-42,
1A10, 表位 :35-40, 以及
D-17 山羊抗 A β 抗体, 表位 :C 端。

14. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述捕获抗体选自 3D6、BAN50、82E1、6E10、W0-2、266、BAM90. 1、4G8、G2-10、1A10、BA27、11A5-B10、12F4 以及 21F12。

15. 前述权利要求中任一项的方法, 其中将以下抗体对用作捕获抗体 :

4G8 和 11A5-B10,
3D6 和 4G8,
6E10 和 4G8,
82E1 和 4G8,
4G8 和 12F4,
4G8 和 21F12,
3D6 和 21F12,

6E10 和 21F12,
BAN50 和 4G8,
3D6 和 11A5-B10,
3D6 和 1A10,
3D6 和 BA27,
6E10 和 11A5-B10,
6E10 和 1A10,
6E10 和 BA27,
4G8 和 11A5-B10,
4G8 和 1A10,
4G8 和 BA27,
4G8 和 12F4, 以及
4G8 和 21F12。

16. 前述权利要求中任一项的方法, 其中通过使用与各捕获抗体特异性反应的二抗来检测所述复合物。

17. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述二抗为抗小鼠抗体或抗兔抗体。

18. 权利要求 16 或 17 的方法, 其中所述二抗是标记的。

19. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述二抗固定化在磁珠上。

20. 前述权利要求中任一项的方法, 其中利用磁性分离器将携带所述免疫复合物的所述磁珠从所述生物学样品分离。

21. 前述权利要求中任一项的方法, 其中在存在 50%(v/v) 甲醇 / 0.5%(v/v) 甲酸的条件
下破坏所述免疫复合物。

22. 前述权利要求中任一项的方法, 其中定量所检测的免疫复合物。

23. 前述权利要求中任一项的方法, 其中通过选自夹心 ELISA、淀粉样蛋白 β 1-40 HTRF[®] 测定、Alphascreen[™] 测定、多重测定系统、质谱分析法和蛋白印迹分析的定量方法定量所捕获的 A β 肽。

24. 前述权利要求中任一项的方法, 其中通过夹心 ELISA 的定量方法定量所捕获的 A β 肽。

25. 权利要求 24 的方法, 其中所述夹心 ELISA 包括对 A β (1-40) 的完整 N 端具有特异性的一抗; 以及对 A β (1-40) 在氨基酸 40 结束的 C 端具有特异性的检测抗体。

26. 权利要求 24 的方法, 其中所述夹心 ELISA 包括对 A β (1-42) 的完整 N 端具有特异性的一抗; 以及对 A β (1-42) 在氨基酸 42 结束的 C 端具有特异性的检测抗体。

27. 权利要求 24 的方法, 其中所述夹心 ELISA 包括对 A β (1-40) 的 C 端具有特异性的一抗; 以及对 A β (1-40) 以 Asp-Ala-Glu 开始的完整 N 端具有特异性的检测抗体。

28. 权利要求 24 的方法, 其中所述夹心 ELISA 包括对 A β (1-42) 的 C 端具有特异性的一抗; 以及对 A β (1-42) 以 Asp-Ala-Glu 开始的完整 N 端具有特异性的检测抗体。

29. 权利要求 25-28 中任一项的方法, 其中所述一抗是固定化的。

30. 权利要求 25-28 中任一项的方法, 其中所述检测抗体是标记的。

31. 权利要求 24 的方法, 其中使用用于定量 A β (1-40) 的 ELISA 试剂盒。

32. 权利要求 31 的方法,其中所述 ELISA 试剂盒选自淀粉样蛋白- β (1-40) (N) ELISA (IBL, JP27714); A β [1-40] 人 ELISA 试剂盒 (Invitrogen); 人淀粉样蛋白 β (淀粉样蛋白- β), aa 1-40 ELISA 试剂盒 (Wako Chemicals USA, Inc.); 以及淀粉样蛋白 β 1-40 ELISA 试剂盒 (The Genetics Company)。

33. 权利要求 24 的方法,其中使用用于定量 A β (1-42) 的 ELISA 试剂盒。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述 ELISA 试剂盒选自淀粉样蛋白- β (1-42) (N) ELISA (IBL, JP27712); A β [1-42] 人 ELISA 试剂盒 (Invitrogen)、人淀粉样蛋白 β (淀粉样蛋白- β), aa 1-42 ELISA 试剂盒 (Wako Chemicals USA, Inc.)、淀粉样蛋白 β 1-40 ELISA 试剂盒 (The Genetics Company)、**INNOTEST®** β -淀粉样蛋白 (1-42) (Innogenetics)。

35. 前述权利要求中任一项的方法,其中进行一个或多个心理测试以表征作为所述生物学样品的供体的个体的神经变性疾病状态。

36. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述心理测试选自 DemTect 测试、简易精神状态测试、画钟测试、ADAS-Cog、Blended 测试、CANTAB、Cognistat、NPI、BEHAVE-AD、CERAD、CSDD、GDS 以及 7 分钟筛选量表。

37. 前述权利要求中任一项的检测 A β 靶肽的方法用于诊断阿尔茨海默病的用途。

38. 权利要求 37 的用途,用于阿尔茨海默病的鉴别诊断。

39. 权利要求 37 或 38 的用途,用于阿尔茨海默病的早期诊断。

40. 权利要求 38 或 39 的用途,用于轻度认知障碍的诊断。

41. 一种用于诊断阿尔茨海默病的体外方法,其中使用权利要求 1-36 中任一项所述的用于检测 A β 靶肽的方法。

42. A β 靶肽在诊断阿尔茨海默病中的用途。

43. 权利要求 42 的用途,用于阿尔茨海默病的鉴别诊断。

44. 权利要求 40 或 41 的用途,用于阿尔茨海默病的早期诊断。

45. 权利要求 43 或 44 的用途,用于轻度认知障碍的诊断。

46. 权利要求 37-45 中任一项的方法,其中所述 A β 靶肽为 A β (1-40),包括其功能性等同物。

检测淀粉样蛋白 β 肽的新测定

[0001] 本发明大体涉及使用 A β (1-40) 作为生物标记 (biomarker) 来检测和诊断阿尔茨海默病, 并且还涉及检测生物学样品中的 A β (1-40) 的新方法。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病是痴呆的最常见形式, 并且具有在所有痴呆病症中约 65-70% 的流行程度。由增加的预期寿命所致, 这种疾病在诸如日本和中国的高度发达的工业化国家以及美国和欧洲已成为特别的问题。阿尔茨海默病患者的数量估计从 2001 年的 2.4×10^7 增加至 2040 年的 8.1×10^7 (Ferri et al., 2005)。目前, 全世界用于 AD 患者的治疗和护理的费用总计每年约 2.5×10^{11} 美元。

[0003] 该疾病的发展相对缓慢, 并且在首发症状发生后阿尔茨海默病通常会持续 10-12 年。目前, 进行 AD 的可靠和早期诊断并将其与痴呆的其他形式区分是非常困难的。具有超过 90% 可靠性的良好诊断仅在该疾病的较晚阶段是可能的。在此之前, 仅可能作出阿尔茨海默病是可能或很可能的预测; 这里诊断依赖于使用 Knopman et al., 2001; Waldemar et al., 2007 或 Dubois et al., 2007 的某些标准。但是神经变性在注意到首发临床症状之前 20-30 年开始 (Blennow et al., 2006; Jellinger KA, 2007)。临床期的发生通常特征在于所谓的“轻度认知障碍”(MCI), 其中患者会表现出可测量的认知缺陷, 所述认知缺陷不足以使得能够以明确的方式诊断痴呆疾病 (Petersen et al., 1999; Chetkow et al., 2008)。许多患有 MCI 的患者会具有神经病理变化, 所述神经病理变化对于 AD 是典型的, 并且意味着 AD 的较早阶段是可能的, 但不确定 (Scheff et al., 2006; Markesbery et al., 2006; Bouwman et al., 2007)。但是有许多 MCI 病例不会发展为阿尔茨海默病; 在这些病例中, 其他因素导致认知缺陷 (Saito et al., 2007; Jicha et al., 2006 和 Petersen et al., 2006)。虽然一些 MCI 患者不会表现出他们的疾病状况的任何恶化或者甚至一些改善, 但是对于大多数 MCI 病例, 认知缺陷会持续至临床痴呆。这种转化的年增长率为约 10-19% (Gauthier et al., 2006; Fischer et al., 2007)。目前有临床方法、神经心理学方法和成像方法的组合, 其能够区分轻度认知障碍的各种亚型 (Devanand et al., 2007; Rossi et al., 2007; Whitwell et al., 2007; Panza et al., 2007)。但是, 关于痴呆的进一步发展, 这些亚型之间没有显著差异 (Fischer et al., 2007)。因此, 开发方法以使能够在早期, 优选在阿尔茨海默病发作或 MCI 期间明确和可靠地诊断阿尔茨海默病是至关重要的。

[0004] 现有技术生物标记

[0005] 阿尔茨海默病的生物标记已在现有技术中描述。除了公知的心理测试, 例如 ADAS-cog、MMSE、DemTect、SKT 或 Clock Drawing 测试, 据认为生物标记提高首次诊断以及监控疾病发展的诊断灵敏度和特异性。关于开发 AD/MCI 的生物标记的目前状态, 据建议使未来的疾病与其他诊断标准关联 (Whitwell et al., 2007; Panza et al., 2007; Hyman SE, 2007)。据认为生物标记在未来支持或代替传统的神经心理测试。普遍相信作为开发抗阿尔茨海默病剂的替代标记, 它们会非常重要 (Blennow K, 2004; Blennow K, 2005; Hampel et al., 2006; Lewczuk et al., 2006; Irizarry MC, 2004)。

[0006] 结构生物标记

[0007] “磁共振成像”(MRI)是允许检测脑中的变性萎缩的成像方法(Barnes Jet al., 2007;Vemuri et al., 2008)。因此,内侧颞叶萎缩(MTA)对老年患者脑中海马区的变性敏感;通过MRI可以使其非常清楚可见,但并不是阿尔茨海默病特异性的。轻度MTA在其他痴呆中没有更频繁地遇到(Barkhof et al., 2007),但是其的确与MCI相关(Mevel et al., 2007)。因为这个原因,不可能仅从MRI数据确定神经变性是否为阿尔茨海默病或阿尔茨海默病早期。另一成像方法为正电子成像术(PET),其使得淀粉样蛋白沉积上的检测分子(PIB)的积累可视。已检测到硫黄素T-类似物(¹¹C)PIB在分别患有MCI或轻度阿尔茨海默病的患者的脑的某些区域中积累(Kemppainen et al., 2007;Klunk et al., 2004;Rowe et al., 2007)。但是,其在未表现出痴呆的症状的个体中也可检测(Pike et al., 2007)。反过来,这可能表明通过PET检测淀粉样蛋白沉积允许检测阿尔茨海默病的临床前阶段;如果这种现象在进一步研究中被证实。除了最常用的方法MRI和PET,已知有阿尔茨海默病其他结构生物标记:CBF-SPECT、CMRg1-PET(葡萄糖代谢质子能谱学(H-1MRS)、高场强功能MRI、基于体素的形态计量法、内侧基底颞叶的增强活化(通过fMRI检测)、用于检测小胶质细胞的(R)-[(¹¹C)]PK11195PET(Huanget al., 2007;Kantarci et al., 2007;Petrella et al., 2007;Hamalainen et al., 2007;Kircher et al., 2007;Kropholler et al., 2007)。

[0008] CSF 生物标记

[0009] 老年斑是阿尔茨海默病的病理特征之一。这些斑块大部分由A β (1-42)肽组成(Attens J, 2005)。在一些研究中可以显示MCI患者的CSF中低水平的A β (1-42)特异性地与阿尔茨海默病的发展相关(Blennow and Hampel, 2003;Hansson et al., 2006and 2007)。在CSF中的减少可能是由于脑中增加的A β (1-42)聚集(Fagan et al., 2006;Prince et al., 2004;Strozyk et al., 2003)。另一可能的解释是半可溶性A β (1-42)寡聚体的出现(Walsh et al., 2005),其会导致CSF中较低水平的检测。特别是在阿尔茨海默病的早期,会检测到降低的A β (1-42)浓度,同时可以分别检测到CSF中增加的Tau蛋白和磷酸化Tau蛋白的量(Ewers et al., 2007;Lewczuk et al., 2004)。为了提供更好的生物标记的可预测性,通常试图使用Tau/A β (1-42)比例,并且使其与没有痴呆的老年人(Fagan et al., 2007;Gustafson et al., 2007;Hansson et al., 2007;Li et al., 2007;Stomrud et al., 2007)以及MCI患者(Hampel et al., 2004;Maccioni et al., 2006; **Schönknecht** et al., 2007)的认知缺陷的预测相关。在AD患者中检测到脑的A β (1-42)的死前CSF水平、Tau、磷酸化Tau-Thr231与死后组织病理学变化之间的进一步相关性(Clark et al., 2003;Buerger et al., 2006)。然而,在其他研究中,没有检测到CSF生物标记与A β (1-42)之间、伴APOE ϵ 4-等位基因的总Tau与磷酸化Tau之间、尸体解剖后斑块与缠结负荷之间的相关性(Engelborghs et al., 2007;Buerger et al., 2007)。在多中心研究中检测到有趣的方面。看来升高的总Tau和磷酸化Tau(181)的水平与降低的A β (1-42)/A β (1-40)比例相关,但是不与单独的A β (1-42)水平相关(Wiltfang et al., 2007)。但是在其他CNS疾病,如克雅病、脑梗死和脑血管性痴呆中也检测到升高的CSF水平,所述疾病全部与神经元丢失有关(Buerger et al., 2006(2);Bibl et al., 2008)。另一可能的生物标记是作为MCI的指示的CSF中BACE1活性的增加(Zhong et al., 2007)。还讨论增加的BACE1活性会导致增加的A β 产生以及因此增加的该肽的聚集。据认为阿尔茨海默病伴

随着神经炎症过程。因此 CSF 中的抗小胶质细胞抗体是 AD 中这些炎症过程的可能的生物标记 (McRea et al., 2007)。

[0010] 尽管有许多生物标记, 据认为它们使得能够明确诊断阿尔茨海默病, 但是目前没有可用的确保可靠和明确诊断这种疾病的单一生物标记。因此, 阿尔茨海默病领域中的大部分研究使用测定各种生物标记与临床诊断的结果的比较来确定阿尔茨海默病的阶段和严重程度。相比之下, 生物标记与阿尔茨海默病的病理原因之间的相关性会提供明显更可靠的该疾病的诊断。

[0011] 这样的可能的方法可以是重复分析明确鉴定和定义的神病理理性痴呆疾病的免疫沉淀的 CSF 样品, 以明确 A β (1-40) 和 A β (1-42) 实际上是否是合适的神经化学痴呆标记 (Jellinger et al., 2008)。为了发现新的目前未知的阿尔茨海默病生物标记, 通常通过比较蛋白质组学分析来分析 CSF 样品来获得 AD 诊断的灵敏度增加, 并且还使得能够与其他变性痴呆病症区分 (Finehout et al., 2007; Castano et al., 2006; Zhang et al., 2005; Simonsen et al., 2007; Lescuyer et al., 2004; Abdi et al., 2006)。蛋白质组学分析后, 必须详细分析潜在的新生物标记的适用性和与病理原因的相关性。通过蛋白质组学分析发现的生物标记典型实例是作为多发性硬化的生物标记的截短的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C。后来证实这种生物标记为存储人工产物 (Irani et al., 2006; Hansson et al., 2007(2))。

[0012] 血浆生物标记

[0013] 除了常用的血浆生物标记, 即 A β 肽, 其他炎症性血浆标记用于痴呆 (Ravaglia et al., 2007; Engelhart et al., 2004), 特别是阿尔茨海默病 (Motta et al., 2007) 的早期诊断。这些炎症性标记对于阿尔茨海默病诊断的适用性和特异性仍在讨论。通过来自 AD 患者和健康对照的血浆的比较蛋白质组学分析还发现其他可能的生物标记 (German et al., 2007; Ray et al., 2007)。对于任何上述生物标记, 目前为止没有令人信服的或合适的的数据是可用的。

[0014] 与 CSF 中淀粉样蛋白 β 的分析相反, 到目前为止获得的关于血浆中合适的 A β 生物标记的结果并不可靠或明确。在一些研究中发现血浆中降低的 A β (1-42)/A β (1-40) 比例与增加的认知正常者分别转化为 MCI 或阿尔茨海默病患者之间的相关性 (Graff-Radford et al., 2007; van Oijen et al., 2006; Sundelof et al., 2008)。但是其他研究检测到 A β (1-42) 血浆水平的降低更可能是 MCI 转化为 AD 的标记 (Song et al., 2007), 而且不适合作为神经变性目的的标记, 这是阿尔茨海默病所遇到的 (Pesaresi et al., 2006)。然而大部分研究未显示健康对照与患有散发性阿尔茨海默病的患者之间 A β 血浆水平的差异 (Fukumoto et al., 2003; Kosaka et al., 1997; Scheuner et al., 1996; Sobow et al., 2005; Tamaoka et al., 1996; Vanderstichele et al., 2000)。一些研究还显示血浆中 A β 的水平与脑中的水平无关 (Fagan et al., 2006; Freeman et al., 2007), 其也与 CSF 中的水平无关 (Mehta et al., 2001; Vanderstichele et al., 2000)。在最近的研究中, 检测到 A β (1-40) 和 A β (1-42) 在 CSF 与血浆之间的相关性, 但是仅在健康对照中。这种相关性在 MCI 和 AD 中没有检测到, 这通过由于脑中 A β 沉积破坏 CSF 与血浆 A β 之间的平衡来解释 (Giedraitis et al., 2007)。通常, 假设血浆 A β (1-42) 水平不是 MCI 或 AD 的可靠生物标记 (Blasko et al., 2008; Mehta et

al., 2000; Brettschneider et al., 2005), 而认为血浆 A β (1-38)/A β (1-40) 比例的降低是血管性痴呆的生物标记, 并且接近 CSF 标记的可预测性 (Bibl et al., 2007)。

[0015] EP2020602 和 US20020182660 公开检测血浆样品中特定全长 A β 肽如 A β (1-40) 和 A β (1-42) 的方法。该方法采用两种不同的捕获抗体, 但是不包括免疫沉淀步骤。

[0016] EP1944314 公开检测抗 A β 肽的自身抗体的方法, 例如抗 A β (21-37) 或 A β (4-10) 的自身抗体。在所述方法中, 为了结合并检测各自的自身抗体, 将包含 A β 肽的氨基酸序列的多肽固定化在载体上。

[0017] 因此, 显然需要生物标记, 其可靠并且实现阿尔茨海默病阶段的早期发生的明确可预测性以及区分阿尔茨海默病与其他痴呆疾病。还需要从血浆提供所述生物标记, 与 CSF 相比血浆可容易地从患者获得。此外, 需要提供检测所述生物标记的方法, 其使得可靠和明确地测定所述生物标记。

[0018] 然而, 这样的方法, 特别是用血浆 A β 作为生物标记, 是极难建立的, 因为 A β 肽是非常疏水的。所有目前已知和描述的测定系统和方法仅达到令人非常不满意的分析灵敏度, 并且遇到关于分析物与基质 (即血浆) 之间非常复杂的相关作用的大问题。这解释了上文所述多个研究中非常矛盾的结果。这还导致科学界相信血浆中特定 A β 肽的水平不适合作为 AD 的生物标记。

[0019] ELISA 或 ELISA 类型系统 (Multiplex) 通常用于血浆中的 A β 的定量。这类研究的验证参数通常仅被不令人满意地分析或者完全被无视。例如, 像回收率的关键项目未分析或未在各出版物中提及。然而回收率是正确测定存在于血浆中的那些 A β 肽的水平的决定性参数。因此存在于不同研究中的血浆中的 A β 肽水平的差异可能是由回收率的不正确测定所导致的。ELISA 或多重系统的另一重要参数是其线性度。例如, 在 Hansson et al., 2008 中, 计算的 1 : 20 稀释的血浆 A β (1-42) 浓度的水平比相同样品的 1 : 2 稀释中的高 3 倍 (Hansson et al., 2008)。单独这个实例表明目前已知几个研究中的相同血浆样品的不同稀释是不可比的。此外, 这类方法完全不适合建立可靠的诊断测定。在一个研究中使用不同稀释会导致假象并最终导致完全错误的结果。只要没有血浆 A β 分析的标准化方案和方法, 这类研究在未来还会矛盾并且不适合用作诊断方法。

[0020] 因此, 本发明的目的是提供新方法, 其允许高可靠性地特别是在血浆中检测 A β 。

[0021] 此外, 本发明提供诊断标记, 其可以用可靠的方法来测定, 并且可以用于可靠和明确地预测阿尔茨海默病。

[0022] 本发明还提供可靠的方法, 其特别适合用于多患者研究, 其中生物学样品在不同测量周期中分析。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明的目的是通过提供检测生物学样品中的淀粉样蛋白 β 肽 (Abeta 或 A β) 的方法来解决的。所述方法的特征在于在免疫沉淀步骤中使生物学样品与至少两种不同的捕获抗体接触。分离、破坏所得的复合物, 随后在 A β 特异性 ELISA 中分析捕获的 A β 肽。优选地, 这种 A β 特异性 ELISA 为夹心 ELISA。

[0025] 酶 β -和 γ -分泌酶顺序切割后, A β 肽从淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 释放。 γ -分泌酶切割导致产生上述 A β (1-40) 和 A β (1-42) 肽, 其不同之处在于它们的 C 端, 以及表现出不同的聚集、纤维形成和神经毒性潜能。

[0026] 因此本发明提供测定 A β (1-40) 和 A β (1-42) 肽水平的方法。同样设想检测 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的功能性等同物。本发明的方法特别适合测定 A β (1-40) 和 / 或其功能性等同物的水平。

[0027] 因此, 根据上述方法的优选实施方案, 待测定的 A β 肽选自 A β (1-40) (SEQ ID No:1)、A β (1-42) (SEQ ID No:2) 及它们的功能性等同物。

[0028] 在一特别优选的实施方案中, 待检测的 A β 肽为 A β (1-40) (SEQ ID No:2)。

[0029] 根据另一优选实施方案, 所述生物学样品选自血液、血清、尿、脑脊液 (CSF)、血浆、淋巴、唾液、汗液、胸膜液、滑液、泪液、胆汁和胰分泌物。在一特别优选的实施方案中, 所述生物学样品为血浆。

[0030] 所述生物学样品可以本领域技术人员公知的方式获得自患者。特别地, 血液样品可以从对象获得, 并且所述血液样品可以通过常规方法分离为血清和血浆。从其获得所述生物学样品的对象疑似患有阿尔茨海默病, 有发展阿尔茨海默病的风险和 / 或有任何其他种类的痴呆的风险或患有任何其他种类的痴呆。

[0031] 特别地, 是疑似患有轻度认知障碍 (MCI) 和 / 或处于阿尔茨海默病早期的对象。

[0032] 本发明的方法相对于本领域已知的方法具有几个优势, 即本发明的方法可以用来在早期检测阿尔茨海默病, 以及在疾病发生和发展的早期区分阿尔茨海默病和其他类型的痴呆。一种可能的早期是轻度认知障碍 (MCI)。不可能用本领域目前已知的方法进行早期阿尔茨海默病的明确和可靠的诊断, 特别地, 不可能在所述早期区分阿尔茨海默病的发生和其他形式的痴呆。这特别应用于患有 MCI 的患者。

[0033] 相比之下, 本发明提供的方法适合阿尔茨海默病的鉴别诊断。特别地, 本发明提供一种方法, 其中可以在获得自任何上述对象的生物学样品中以高度重复的方式检测 A β 肽。本发明的方法的高重复性是通过在初始免疫沉淀步骤中使用至少两种不同的捕获抗体来实现的。优选地, 所述至少两种不同的捕获抗体针对 A β 靶肽的不同表位。

[0034] 在本发明的方法中特别优选使用 A β (1-40)。

[0035] 在另一优选实施方案中, 所述生物学样品为血浆。

[0036] 上述“A β 靶肽”涵盖 A β (1-40) 和 A β (1-42), 包括它们的所有功能性等同物。

[0037] 本发明必须克服的具体问题是待使用的生物标记在阿尔茨海默病早期, 例如轻度认知障碍期间改变。本发明的发明者已显示可以可靠的方式测定 A β 肽, 特别是 A β (1-40), 并且还首次明确实际上 A β (1-40) 特别适合早发性阿尔茨海默病的诊断。

[0038] 此外, 本发明明确 A β (1-40) 水平是早期阿尔茨海默病发生的初始和早期标记, 因为其血浆水平在阿尔茨海默病早期升高, 并且在归类于轻度认知障碍的人中特别高。只有用本发明才可能显示 A β (1-40) 的高血浆浓度与阿尔茨海默病的阳性临床诊断相关。这与现有技术中较早的观点相反, 所述观点认为 A β (1-40) 不是合适的 AD 标记, 因为显示关联性的尝试被统计上不显著的数据终结, 并且未建立任何统计上显著的相关性。

[0039] 本发明的这些令人惊讶的结果是通过使用本发明的方法来获得的, 所述方法将新的二价捕获系统用于初始免疫沉淀步骤。这种二价捕获系统定义为两种抗体分子或两种以上抗体分子, 识别所述 A β 肽的至少两个不同表位。因此, 已证实 A β (1-40) 的显著增加是阿尔茨海默病发展中的早期事件。根据一优选实施方案, 所述至少两种不同捕获抗体各自对所述 A β 肽, 特别是所述 A β (1-40) 肽的不同表位具有特异性。

[0040] 所述免疫沉淀步骤因为几个原因是有利的：其减少基质影响，即其消除杂质（每个生物学样品中通常包含杂质）从而使得本发明的方法更灵敏。此外，所述免疫沉淀步骤引起所述 A β 肽的预富集，这导致随后使用的检测抗体的提高的亲和性。

[0041] 定义

[0042] 在本申请的意义上，“捕获抗体”旨在涵盖结合靶 A β 肽的那些抗体。

[0043] 优选地，所述捕获抗体高亲和性地结合所述 A β 肽。在本发明的上下文中，高亲和性表示这样的亲和性，其具有 10^{-7} M 或更好的 K_D 值，优选 10^{-8} M 或更好的 K_D 值，或者甚至更优选 10^{-9} M- 10^{-12} M 的 K_D 值。

[0044] 术语“抗体”以其最广泛的含义使用，并且具体涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、从至少两个完整抗体形成的多特异性抗体（例如双特异性抗体）以及抗体片段（只要它们表现出期望的生物学活性）。抗体可以是例如 IgM、IgG（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）、IgD、IgA 或 IgE。然而，优选所述抗体不是 IgM 抗体。所述“期望的生物学活性”是结合 A β 肽。

[0045] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，通常是所述完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；单链抗体分子；以及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0046] 如本文所用，术语“单克隆抗体”指获得自一群基本上均质的抗体的抗体，即该群包含的各个抗体除了少量可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体针对单一抗原位点是高度特异性的。此外，与通常包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的“多克隆抗体”制品相反，每种单克隆抗体只对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体通常的有利之处是它们通过杂交瘤培养合成，未被其它免疫球蛋白污染。“单克隆”表示抗体的特征，其获得自基本上均质的抗体群体，并且不应理解为需要通过任何特定方法来产生抗体。例如，本发明中使用的单克隆抗体可以通过由 Köhler et al., Nature, 256:495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法制备，或者可以通过一般公知的重组 DNA 方法制备。“单克隆抗体”还可以分离自噬菌体抗体文库，使用例如 Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 所述的技术。

[0047] 本文中的单克隆抗体具体包括嵌合抗体（免疫球蛋白），其中一部分重链和/或轻链与来源于特定物种的抗体或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或者同源，而链的剩余部分与来源于另一物种的抗体或者属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或者同源；以及这类抗体的片段，只要它们表现出期望的生物学活性。

[0048] “人源化”形式的非人（例如，小鼠）抗体是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或它们的片段（如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或者抗体的其它抗原结合子序列），其含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体的大部分是人免疫球蛋白（受体抗体），其中来自受体的互补决定区（CDR）的残基由具有期望的特异性、亲和性和能力（capacity）的非人物种（供体抗体）如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基代替。在一些情况下，人免疫球蛋白的 Fv 构架区（FR）残基由相应的非人残基代替。此外，人源化抗体可以包含这样的残基，其在受体抗体或者引入的 CDR 或构架序列中均未发现。

[0049] 进行这些修饰以进一步精制和优化抗体的性能。通常，人源化抗体包含基本

上所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,并且所有或基本上所有 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人源化抗体最优还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区 (Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节参见 Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., Nature. 332:323-329 (1988): 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)。人源化抗体包括 Primatized™ 抗体,其中所述抗体的抗原结合区来源于通过用所关注的抗原免疫恒河猴所产生的抗体或“骆驼化”抗体。

[0050] “单链 Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常地,Fv 多肽还包含 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使得 sFv 形成抗原结合所期望的结构。关于 sFv 的综述参见 Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

[0051] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在相同多肽链中与轻链可变结构域 (V_D) 连接的重链可变结构域 (V_H) ($V_H - V_D$)。通过使用过短而不允许相同链上两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体更全面地描述于 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。

[0052] “分离的”抗体是已经鉴定并从其天然环境的组分中分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素以及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至:(1) 如通过劳里 (Lowry) 方法所测定的,以重量计大于 95%,并且最优以重量计大于 99%;(2) 通过使用旋杯测序仪足以获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度;或者 (3) 通过还原或非还原条件 SDS-PAGE 使用考马斯蓝或优选银染的均一性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为不存在抗体天然环境的至少一种成分。然而,通常分离的抗体通过至少一个纯化步骤来制备。

[0053] 如本文所用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这些名称均包括后代。因此,词语“转化子”和“转化的细胞”包括初始的对象细胞以及从其衍生的培养物而不论转移的数目。还应当理解,由于有意或无意的突变,所有后代的 DNA 含量可以不完全相同。本发明包括经筛选与原始转化的细胞具有相同功能或生物学活性的突变体后代。在使用不同名称的情况下,从上下文可明了。

[0054] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换使用,并且定义为表示由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0055] 如本文所用,术语“一 (a)”、“一 (an)”和“所述 (the)”定义为表示“一或多”,并且包括复数形式,除非在上下文中是不适合的。

[0056] “淀粉样蛋白 β 、A β 或 β -淀粉样蛋白”是本领域公认的术语,并且指淀粉样蛋白 β 蛋白和肽、淀粉样蛋白 β 前体蛋白 (APP) 以及其修饰、片段和任何功能性等同物。特别地,如本文所用,淀粉样蛋白 β 表示通过 APP 的蛋白酶剪切所产生的任何片段,但特别是涉及或与淀粉样蛋白病理学相关的那些片段,包括但不限于 A β 1-38、A β 1-40、A β 1-42。

[0057] “功能性等同物”涵盖 A β (1-40) 和 / 或 A β (1-42) 的所有这些突变体或变体,其

可以天然存在于已选择接受如本发明所述的检测方法或诊断方法的患者组中。更特别地,在本文的上下文中“功能性等同物”表示 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的功能性等同物是其突变体或变体,并且已证实在阿尔茨海默病中积累。与 A β (1-40) 和 / 或 A β (1-42) 相比,所述功能性等同物具有不超过 30 个突变,优选不超过 20 个突变,更优选不超过 10 个突变,特别优选不超过 5 个突变,并且最优选 2 个或仅 1 个突变。功能性等同物还涵盖突变的变体,例如其包括以氨基酸 Asp-Ala-Glu 开始并分别以 Gly-Val-Val 和 Val-Ile Ala 结束的所有 A β 肽。

[0058] 在本文的上下文中特别有用的 A β (1-40) 和 A β (1-42) 等同物是由 Irie et al., 2005 所述的那些等同物,即 A β 的鸟取、佛兰德、荷兰、意大利、北极和爱荷华突变。功能性等同物还涵盖来源于在 β - 或 γ - 分泌酶切割位点旁边含有突变的淀粉样蛋白前体蛋白的 A β 肽,如瑞典、奥地利、法国、德国、佛罗里达、伦敦、印第安纳和澳大利亚变异 (Irie et al., 2005)。

[0059] “夹心 ELISA”通常包括使用两种抗体,每种能够结合至待检测的蛋白的不同免疫原性部分或表位。在夹心测定中,通过固定化在固体支持物上的第一抗体结合测试样品分析物,然后第二抗体结合至分析物,因此形成不溶的由三部分组成的复合物。所述第二抗体本身可以用可检测的部分标记(直接夹心测定),或者可以利用用可检测的部分标记的抗免疫球蛋白抗体来测量(间接夹心测定)。例如,夹心测定的一种优选类型是 ELISA 测定,在这种情况下所述可检测的部分是酶。

附图说明

[0060] 图 1 :

[0061] 二价免疫沉淀系统提高捕获效率

[0062] (A) 通过使用不同抗体组合从 Cyp18 溶液和人血浆回收 A β 1-40

[0063] (B) 二价捕获系统的示意图(阴影 :4G8 抗体,灰色 :x-40 抗体,黑色 :缀合至磁珠的抗小鼠抗体)。

[0064] 图 2 :

[0065] DemTect 测试, DemTect 量表的 AD 患者和健康对象中的分类差异结果的平均值(平均值 \pm SD)。

[0066] 图 3 :

[0067] 简易精神状态测试,简易精神状态测试的 AD 患者和健康对象中的分类差异结果的平均值(平均值 \pm SD)。

[0068] 图 4 :

[0069] 画钟测试,画钟测试的 AD 患者和健康对象中的分类差异结果的平均值(平均值 \pm SD)。

[0070] 图 5 :

[0071] A β (1-40) 浓度分别对 DemTect (A) 和 MMSE (B) 的分数的图。

[0072] 图 6 :

[0073] 相对血浆 A β (1-40) 水平,标准化至内部血浆标准品 (ITS),平均值和 SEM。

[0074] 序列

[0075] A β 1-42 (SEQ ID NO. 1) :

[0076] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala

[0077] A β 1-40 (SEQ ID NO. 2) :

[0078] Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

[0079] 发明详述

[0080] 本发明提供检测和测定生物学样品中的 A β 肽的方法。所述方法的特征在于在免疫沉淀步骤中使生物学样品与至少两种不同的捕获抗体接触。将所得的复合物分离,破坏,随后将捕获的 A β 肽在 A β 特异性 ELISA 中分析。优选地,这种 A β 特异性 ELISA 为夹心 ELISA。

[0081] 如上文所提到的,用于初始捕获步骤的至少两种抗体应当选择对所述 A β 肽的不同表位具有不同特异性的抗体。

[0082] 本发明的方法包括以下步骤:

[0083] i) 在免疫沉淀步骤中使生物学样品与至少两种不同捕获抗体接触。

[0084] 使所述生物学样品与上述至少两种不同的捕获抗体接触之后,所述至少两种不同的捕获抗体与所述 A β 肽之间会形成免疫复合物。这个步骤的作用不是特异性分离全长 A β (1-40) 和 / 或 A β (1-42),而是捕获和分离所有 A β 种类,特别是在位置 40 和 / 或位置 42 结束的 A β 种类。

[0085] ii) 然后通过二抗检测该复合物。适合地,所述二抗固定化在磁珠上。利用磁性分离器可以容易地将所述免疫复合物与磁珠一起从体液(血浆 / 血清 CSF 等)分离。

[0086] iii) 将所述免疫复合物从珠洗脱。适合地,通过将携带所述免疫复合物的珠在包含 50% 甲醇 / 0.5% 甲酸的溶液中于室温下温育 1h 来进行洗脱步骤。由此,所有分子间的相互作用被破坏,并且分离自所述生物学样品的所有 A β 肽分子从所述溶液中的珠释放。

[0087] iv) 将释放的分离的 A β 肽在随后的步骤中定量,例如通过特异性检测全长 A β (1-40) 和 / 或 A β (1-42) 的夹心 ELISA。

[0088] 在多患者诊断研究中,例如当必须分析超过 100 个生物学样品时,必须在几周或几个月的时间中进行几个测量周期。由于这段延长的时间和在不同时间点进行的不同测量周期,不同测量周期之间的批间变化可能高概率地发生。批间变化可以在某些步骤发生,例如在免疫沉淀步骤期间(例如因为沉淀抗体的不同批次),或者 A β (1-40) ELISA (由于 ELISA 试剂盒的不同批次)。由于这些批间变化,生物学样品中测定 A β 靶肽的量在不同测量周期之间可能不可比,而且包括在所述多患者研究中获得的所有生物学样品的 A β 靶肽量的统计分析以及区分 AD 患者和健康个体变得不可能。

[0089] 为了避免所述批间变化并使来自不同测量周期的结果可比和对于统计分析可行,本发明的方法优选在存在内部标准样品的条件下进行。这样的内部标准品例如内部血浆标准 - 样品 (ITS),其应当获得自良好定义的对照对象,优选健康对象。诸如 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的 A β 靶肽的浓度在每个 ITS 样品中是恒定的。因此,在不同测量周期中发现的

ITS 样品中 A β 靶肽浓度的变化反映批间变化性。

[0090] 根据本发明的优选实施方案,每个测量周期中包括一个或多个 ITS 样品。测定诸如血浆样品的生物样品中的 A β 肽水平之后,将所述生物样品的 A β 靶肽浓度如 A β (1-40) 或 A β (1-42) 浓度标准化至 ITS 样品中测定的相应 A β 靶肽的浓度,获得每个测试样品的相对 A β 靶肽水平。

[0091] 在另一优选实施方案中,本发明的方法包括另一步骤,将所述生物样品的 A β 靶肽浓度如 A β (1-40) 或 A β (1-42) 浓度标准化至 ITS 样品中测定的相应 A β 靶肽的浓度,导致每个生物样品的相对 A β 靶肽水平。

[0092] 结果,在不同测量周期(时间点、抗体批次、ELISA 批次)中测定的生物样品中的相对 A β 靶肽水平的比较比未标准化的 A β 靶肽水平的比较更可靠。

[0093] 在本发明的方法中,ITS 的使用特别优选用于测定 A β (1-40) 和 / 或 A β (1-42) 的浓度,最优选用于 A β (1-40) 的浓度。

[0094] 本发明的方法不限于血浆样品。如果在本发明的方法中应当使用其他体液(脑脊液、尿、淋巴、唾液、汗液、胸膜液、滑液、房水、泪液、胆汁、胰分泌物),这些液体必须取自良好定义的对照对象,优选健康对象,如本文中对血浆样品所证实的。然后这些液体用作内部标准品。

[0095] 因此,本发明的内部标准样品优选选自血浆样品、脑脊液样品、尿样品、淋巴样品、唾液样品、汗液样品、胸膜液样品、滑液样品、房水样品、泪液样品、胆汁样品、胰分泌物样品。最优选地,所述内部标准样品为血浆样品。

[0096] 适合地,验证了本发明的方法,其中作为生物样品供体的对象关于神经变性疾病的状态已被良好表征。所述表征可以利用常规心理测试来进行,例如 DemTect、简易精神状态测试、画钟测试、ADAS-Cog(阿尔茨海默病评价量表-认知)、Blended 测试、CANTAB(剑桥神经心理自动化成套测试)、Cognistat(精神行为认知状态检查)、神经精神症状问卷(NPI)、阿尔茨海默病病理行为评分表(BEHAVE-AD)、CERAD(美国阿尔茨海默病联合登记协作组织)临床和神经心理学测试、康奈尔痴呆抑郁量表(CSDD)、老年抑郁量表(GDS)以及7分钟筛选量表。

[0097] 在本文的上下文中合适的用于免疫沉淀的可能的抗体如下,虽然本发明并不限于这些具体的工作实例:

[0098] 3D6,表位:1-5(Elan Pharmaceuticals, Innogenetics)

[0099] pAb-EL16,表位:1-7

[0100] 2H4,表位:1-8(Covance)

[0101] 1E11,表位:1-8(Covance)

[0102] 20.1,表位:1-10(Covance, Santa Cruz Biotechnology)

[0103] 兔抗 A β 多克隆抗体,表位:1-14(Abcam)

[0104] AB 10,表位:1-16(Chemicon/Upstate-part of Millipore)

[0105] 82E1,表位:1-16(ABL)

[0106] pAb1-42,表位:1-11

[0107] NAB228,表位:1-11(Covance, Sigma-Aldrich, Cell Signaling, Santa Cruz Biotechnology, Zymed/Invitrogen)

- [0108] DE2, 表位 :1-16 (Chemicon/Upstate-part of Millipore)
- [0109] DE2B4, 表位 :1-17 (Novus Biologicals, Abcam, Accurate, AbD Serotec)
- [0110] 6E10, 表位 :1-17 (Signet Covance, Sigma-Aldrich)
- [0111] 10D5, 表位 :3-7 (Elan Pharmaceuticals)
- [0112] W0-2, 表位 :4-10 (The Genetics Company)
- [0113] 1A3, 表位 5-9 (Abbiotec)
- [0114] pAb-EL21, 表位 5-11
- [0115] 310-03, 表位 5-16 (Abcam, Santa Cruz Biotechnology)
- [0116] 鸡抗人 A β 多克隆抗体, 表位 12-28 (Abcam)
- [0117] 鸡抗人 A β 多克隆抗体, 表位 25-35 (Abcam)
- [0118] 兔抗人 A β 多克隆抗体, 表位 :N 端 (ABR)
- [0119] 兔抗人 A β 多克隆抗体 (Anaspec)
- [0120] 12C3, 表位 10-16 (Abbiotec, Santa Cruz Biotechnology)
- [0121] 16C9, 表位 10-16 (Abbiotec, Santa Cruz Biotechnology)
- [0122] 19B8, 表位 9-10 (Abbiotec, Santa Cruz Biotechnology)
- [0123] pAb-EL26, 表位 :11-26
- [0124] BAM90. 1, 表位 :13-28 (Sigma-Aldrich)
- [0125] 兔抗 β -淀粉样蛋白 (pan) 多克隆抗体, 表位 :15-30 (MBL)
- [0126] 22D 12, 表位 :18-21 (Santa Cruz Biotechnology)
- [0127] 266, 表位 :16-24 (Elan Pharmaceuticals)
- [0128] pAb-EL17 ; 表位 :15-24
- [0129] 4G8, 表位 :17-24 (Covance)
- [0130] 兔抗 A β 多克隆抗体, 表位 :22-35 (Abcam)
- [0131] G2-10 ; 表位 :31-40 (The Genetics Company)
- [0132] 兔抗 A β , aa 32-40 多克隆抗体 (GenScript Corporation)
- [0133] EP 1876Y, 表位 :x-40 (Novus Biologicals)
- [0134] G2-11, 表位 :33-42 (The Genetics Company)
- [0135] 16C 11, 表位 :33-42 (Santa Cruz Biotechnology)
- [0136] 21F 12, 表位 :34-42 (Elan Pharmaceuticals, Innogenetics)
- [0137] 1A10, 表位 :35-40 (1BL)
- [0138] D-17 山羊抗 A β 抗体, 表位 :C 端 (Santa Cruz Biotechnology)
- [0139] 用于免疫沉淀的特别优选的抗体是 :3D6 (Elan)、BAN50 (Takeda)、82E1 (1BL)、6E 10 (Covance)、W0-2 (The Genectics Company)、266 (Elan)、BAM90. 1 (Sigma)、4G8 (Covance)、G2-10 (The Genetics Company)、1A 10 (1BL)、BA27 (Takeda)、11A5-B10 (Millipore)、12F4 (Millipore)、21F12 (Elan)。
- [0140] 用于免疫沉淀的特别优选的抗体对是 :
- [0141] 4G8 和 11A5-B10、3D6 和 4G8、6E10 和 4G8、82E1 和 4G8、4G8 和 12F4、4G8 和 21F12、3D6 和 21F12、6E10 和 21F12、BAN50 和 4G8、3D6 和 11A5-B10、3D6 和 1A10、3D6 和 BA27、6E10 和 11A5-B10、6E10 和 1A10、6E10 和 BA27、4G8 和 11A5-B10、4G8 和 1A10、4G8 和 BA27、4G8 和

12F4、4G8 和 21F12。

[0142] 除了上文指明的抗体,适合免疫沉淀的所有其他淀粉样蛋白 β 特异性抗体(单克隆和多克隆)均可以用于本发明的方法(其他合适的抗体可以例如来自 www.alzforum.org)。对于良好的捕获效率决定性的并且因此构成本发明的关键元素的是使用具有不同表位的两种、三种或更多种不同抗体。使用超过一种抗体类型用于 A β 肽的免疫沉淀提供合作的和令人惊讶的协同结合效应(亲和力),这最终允许实现极高的捕获效率(参见图 1)。

[0143] 步骤 ii) 中的二抗是特异性针对捕获抗体的宿主抗体类型的。优选的二抗为抗小鼠抗体和抗兔抗体。

[0144] 步骤 iii) 中将复合物与磁珠温育之后,可以将珠用洗涤缓冲液洗涤(参见本发明的实施例)。含有防止非特异性结合的去污剂或其他添加剂的洗涤缓冲液可以用于这个步骤。洗涤缓冲液的非限制性实例是:

[0145] -含有 10mg/ml 亲环蛋白 18(Cyp 18) 和 0.05% 吐温 -20 的 D-PBS,

[0146] -PBS+0.05% 吐温 -20,

[0147] -TBS+0.05% 吐温 -20,

[0148] -PBS+1%(w/v)BSA+0.05% 吐温 -20,

[0149] -TBS+1%(w/v)BSA+0.05% 吐温 -20, 以及

[0150] -Pierce ELISA 阻断剂(含有吐温 -20)。

[0151] 步骤 iv) 中将免疫复合物从珠洗脱之后,将溶液在稀释缓冲液中稀释。可以防止与表面和固定化的第一 ELISA 抗体的非特异性相互作用的任何稀释缓冲液可以用于这个步骤。稀释缓冲液的非限制性实例是:

[0152] -EIA 缓冲液 (IBL 1-40(N)ELISA 试剂盒的稀释缓冲液),

[0153] -PBS+1%(w/v)BSA+0.05% 吐温 -20,

[0154] -TBS+1%(w/v)BSA+0.05% 吐温 -20, 以及

[0155] -Pierce ELISA 阻断剂(含有吐温 -20)。

[0156] 能够定量全长 A β (1-40) 的 ELISA 试剂盒可商购。本发明的方法中用于定量 A β (1-40) 的合适的 ELISA 试剂盒例如:淀粉样蛋白 - β (1-40) (N)ELISA (IBL, JP27714); A β [1-40] 人 ELISA 试剂盒 (Invitrogen); 人淀粉样蛋白 β (淀粉样蛋白 - β), aa 1-40ELISA 试剂盒 (Wako Chemicals USA, Inc.); 淀粉样蛋白 β 1-40ELISA 试剂盒 (The Genetics Company)。

[0157] 能够定量全长 A β (1-42) 的 ELISA 试剂盒也可商购。本发明的方法中用于定量 A β (1-42) 的合适的 ELISA 试剂盒例如:淀粉样蛋白 - β (1-42) (N)ELISA (IBL, JP27712); A β [1-42] 人 ELISA 试剂盒 (Invitrogen)、人淀粉样蛋白 β (淀粉样蛋白 - β), aa 1-42ELISA 试剂盒 (Wako Chemicals USA, Inc.)、淀粉样蛋白 β 1-40ELISA 试剂盒 (The Genetics Company)、INNOTEST® β - 淀粉样蛋白 (1-42) (Innogenetics)。

[0158] 本发明的方法不限于上述示例性的可商购的 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的 ELISA 试剂盒。用于全长 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的许多其他夹心 ELISA 在现有技术中可以获得或者可以由技术人员开发。所有这些全长 A β 1-40 或 A β 1-42 夹心 ELISA 应当也包括在本发明的方法中,并且通常应当包含合适的捕获和检测抗体对,所述抗体对分别对 A β (1-40) 和 / 或 A β (1-42) 的完整 N 端具有特异性以及对在氨基酸 40 或 42 结束的 C 端具有特异性。

[0159] 这样的全长 A β (1-40) 夹心 ELISA 可以包含特异性识别 A β (1-40) 的 C 端的第一固定化抗体, 以及特异性识别 A β (1-40) 的完整 N 端的第二标记检测抗体。

[0160] 全长 A β (1-42) 夹心 ELISA 可以包含特异性识别 A β (1-42) 的 C 端的第一固定化抗体, 以及特异性识别 A β (1-42) 的完整 N 端的第二标记检测抗体。

[0161] 全长 A β (1-40) 夹心 ELISA 还可以包含特异性识别 A β (1-40) 的完整 N 端的第一固定化抗体, 以及特异性识别 A β (1-40) 的 C 端的第二标记检测抗体。

[0162] 全长 A β (1-42) 夹心 ELISA 还可以包含特异性识别 A β (1-42) 的完整 N 端的第一固定化抗体, 以及特异性识别 A β (1-42) 的 C 端的第二标记检测抗体。

[0163] 用于本发明的方法的合适的 A β (1-40/42) N 端特异性抗体例如 3D6 (Elan)、W0-2 (The Genetics Company)、82E 1 (IBL)、BAN-50 (Takeda)。许多其他 A β (1-40/42) N 端特异性抗体在现有技术中可以获得或者可以由技术人员开发。所有这些 A β (1-40/42) N 端特异性抗体也包括在本发明的方法中。

[0164] 合适的 A β (1-40) C 端特异性抗体例如 G2-10 (The Genetics Company); 11A5-B10 (Millipore); 1A10 (IBL); BA27 (Takeda); EP1876Y (Novus Biologicals)。许多其他 A β (1-40) C 端特异性抗体在现有技术中可以获得或者可以由技术人员开发。所有这些 A β (1-40) C 端特异性抗体也包括在本发明的方法中。

[0165] 合适的 A β (1-42) C 端特异性抗体例如 G2-11 (The Genetics Company); 12F4 (Millipore); 抗人 A β (38-42) 兔 IgG (IBL); 21F12 (Elan); BC05 (Takeda); 16C11 (Santa Cruz Biotechnology)。许多其他 A β (1-42) C 端特异性抗体在现有技术中可以获得或者可以由技术人员开发。所有这些 A β (1-42) C 端特异性抗体也包括在本发明的方法中。

[0166] 根据优选的实施方案, 所述检测抗体是标记的。

[0167] 为了诊断应用, 所述检测抗体通常用可检测的部分标记。许多标记可用, 其一般可以分为以下类别:

[0168] (a) 放射性同位素, 如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 。所述抗体可以利用如 Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Gütigen et al., Ed., Wiley-Interscience. New York, New York. Pubs., (1991) 所述的技术, 用放射性同位素标记, 放射性可以利用闪烁计数来测量。

[0169] (b) 可以利用荧光标记, 如稀土金属螯合物 (钆螯合物) 或者荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺 (Lissamine)、藻红素和德克萨斯红 (Texas Red)。可以利用例如上文的 Current Protocols in Immunology 所公开的技术将荧光标记缀合至抗体。荧光可以使用荧光计定量。

[0170] (c) 各种酶-底物标记可用。酶一般催化生色底物的化学改变, 这可以利用各种技术测量。例如, 酶可催化底物的颜色改变, 这可以通过分光光度计测量。或者, 酶可改变底物的荧光或化学发光。定量荧光变化的技术如上文所述。化学发光底物通过化学反应变成电子激发的, 然后可以发出可测量的光 (例如利用化学发光计测量) 或者将能量供给荧光接受体。酶标记的实例包括萤光素酶 (例如, 萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶; 美国专利第 4, 737, 456 号)、萤光素、2, 3-二氢 2, 3-二氮杂萘二酮 (2, 3-dihydrophthalazinedione)、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶 (HRPO)、碱性磷酸酶、0-半乳糖苷

酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶（例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）、杂环氧化酶（如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶）、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。将酶缀合至抗体的技术描述于 O' Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166 (1981)。

[0171] 酶-底物组合的实例包括例如：

[0172] (i) 辣根过氧化物酶 (HRPO) 与作为底物的过氧化氢酶, 其中过氧化氢酶氧化染料前体 (例如邻苯二胺 (OPD) 或 3, 3', 5, 5' - 四甲基盐酸联苯胺 (TMB))；

[0173] (ii) 碱性磷酸酶 (AP) 与作为生色底物的磷酸对硝基苯酯；以及

[0174] (iii) β -D-半乳糖苷酶 (β -D-Gal) 与生色底物 (例如对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶) 或荧光底物 4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷酶 (4-methylumbelliferyl- β -D-galactosidase)。

[0175] 许多其它酶-底物组合对于本领域技术人员是可用的。

[0176] (d) 用于检测抗体的另一可能的标记是短核苷酸序列。然后通过 RT-PCR 系统 (Imperacer™, Chimera Biotech) 来测定浓度。

[0177] 有时, 将标记与抗体间接缀合。技术人员应当知道实现这个目的的各种技术。例如, 可以将抗体与生物素缀合, 并且可以将任何上述三大类的标记与抗生物素蛋白缀合, 或者反之亦然。生物素选择性地结合至抗生物素蛋白, 并且因此可以将该标记以这种间接方式与抗体缀合。或者, 为了实现标记与抗体的间接缀合, 将抗体与小的半抗原 (例如地高辛) 缀合, 并且将上述不同类型标记中的一种与抗半抗原抗体 (例如抗地高辛抗体) 缀合。因此, 可以实现标记与抗体的间接缀合。

[0178] 本发明的抗体可用于任何已知的测定方法, 如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定以及免疫沉淀测定。Zola, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press. Inc., 1987)。

[0179] 竞争性结合测定依赖于标记的标准品与测试样品分析物竞争结合有限量的抗体的能力。测试样品中的 A β 肽的量与结合至抗体的标准品的量成反比。为了便于测定结合的标准品的量, 抗体在竞争之前或之后一般是不溶的, 从而结合至抗体的标准品和分析物可以方便地与保持未结合的标准品和分析物分离。

[0180] 为了分析人中的 A β (1-40) 浓度, 可以使用所有以下体液: 血液、脑脊液 (CSF)、尿、淋巴、唾液、汗液、胸膜液、滑液、房水、泪液、胆汁、胰分泌物。

[0181] 新方法由本发明者利用血液样品建立 (参见本发明的实施例)。然而本发明不应理解为仅限于血液样品。利用 CSF、脑提取物和尿样品, 以及所有其他人体液, 例如上文所提到的, 也可以相同方式采用所述方法。特别优选血浆样品。

[0182] 为了进行免疫组织化学分析, 组织样品可以是新鲜或冷冻的, 或者可以包埋在石蜡中并用诸如福尔马林的防腐剂固定。

[0183] 在步骤 iv) 中, 本发明的方法并不限于夹心 ELISA 作为定量方法。本发明的方法还涵盖免疫沉淀步骤后用于定量 A β 靶肽, 特别是 A β (1-40) 的任何其他方法。用于定量例如 A β (1-40) 的合适的方法是：

[0184] 1. 淀粉样蛋白 β 1-40 HTRF®测定 (CisBio Bioassays)：

[0185] 该测定原理是基于 TR-FRET,这是时间分辨荧光与福斯特共振能量转移的组合。与通常的夹心 ELISA 相似,A β (1-40) 由两种抗体结合;但是,这里所述抗体未结合在表面上,相互作用发生在溶液中。两种抗体均用荧光团标记。当这两种荧光团通过生物分子相互作用而在一起时,激发期间供体荧光团捕获的一部分能量通过 FRET 转移至受体荧光团,结果受体荧光团被激发。测量受体荧光团的荧光。测量信号与 FRET 的量相关,并且因此与溶液中的 A β (1-40) 的量相关。

[0186] 相似地,基于可比的原理,可以使用来自 Lilly 的 AlphascreenTM 测定。

[0187] 2. 多重测定系统

[0188] 多重测定系统可获得自几个制造商,并且在本领域中是公知和广泛使用的。用于本发明的方法的合适的实例是 INNO-BIA 血浆 A β 形式测定 (Innogenetics)。这个测定是良好标准化的多参数的基于珠的免疫测定,用于同时定量血浆中的人 β 淀粉样蛋白形式 A β (1-42) 和 A β (1-40) 或者 A β (X-42) 和 A β (X-40),利用 xMAP[®] 技术 (xMAP 是 Luminex Corp. 的注册商标)。

[0189] 这个测定系统能够平行定量多达 100 个不同分析物。这种方法的基础是称为微球或珠的小球形聚苯乙烯颗粒。与 ELISA 和蛋白印迹类似,这些珠用作生物化学检测的固相。这些珠是颜色编码的,从而可以区分 100 种不同珠类别。每种珠类别具有固定化在微球表面上的一种特异性抗体 (例如抗 A β (1-40))。如果 A β (1-40) 浓度升高,这类珠会结合更多肽分子。分析物的结合的检测是通过第二抗 A β (1-40) 抗体来进行的,所述抗体用发射绿光的另一荧光染料标记。将样品处理成与 FACS 分析可比。将微球通过流体聚集来成单数并通过基于激光的检测系统分析,这可以在绿色荧光的基础上定量并通过珠的特定着色来鉴定结合的分析物。因此,可以测定一个样品中的多种分析物的浓度。

[0190] 3. 通过质谱分析法定量

[0191] - 为了定量 A β (1-40), 还使用 SELDI-TOF 质谱分析法 (Simonsen et al., 2007 (2))。

[0192] - 利用免疫沉淀和 MALDI-TOF 质谱分析法定量分析 A β 肽。¹⁵N 标记的标准 A β 肽用于校准。(Gelfanova et al., 2007)。

[0193] 4. 蛋白印迹分析

[0194] 2D- 凝胶电泳加上蛋白印迹分析可以是定量 A β 肽的合适方法 (Sergeant et al., 2003; Casas et al., 2004)。

[0195] 诊断试剂盒

[0196] 便利地,本发明的抗体可以在试剂盒中提供,所述试剂盒即预定量的试剂与进行诊断测定的说明书的包装组合。当抗体用酶标记时,试剂盒包含酶所需的底物和辅因子 (例如提供可检测的生色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包含其它添加剂,如稳定剂、缓冲液 (例如封闭缓冲液或裂解缓冲液) 等。各种试剂的相对量可以广泛变化以提供充分优化测定灵敏度的试剂溶液的浓度。特别地,试剂可以干粉,通常是冻干粉末的形式提供,其包含溶解时提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0197] 本发明的诊断试剂盒特别有利于检测和诊断淀粉样蛋白相关疾病和疾病状况,优选阿尔茨海默病。

[0198] 用途

[0199] 本发明的方法首次使得可以可靠的方式检测和定量 A β 肽,特别是 A β (1-40),或者其功能性等同物。特别地,本发明提供 A β (1-40) 作为血浆生物标记,其适合阿尔茨海默病的鉴别诊断,特别是在该疾病的早期。

[0200] 因此,在一实施方案中,本发明涉及使用检测 A β 靶肽的方法诊断阿尔茨海默病,特别是阿尔茨海默病的鉴别诊断,特别是在该疾病的早期。优选地,阿尔茨海默病的早期是轻度认知障碍。

[0201] 在另一实施方案中,本发明涉及使用 A β 靶肽诊断阿尔茨海默病,特别是阿尔茨海默病的鉴别诊断,特别是在该疾病的早期。优选地,阿尔茨海默病的早期是轻度认知障碍。

[0202] 特别地,优选使用本发明的方法检测和定量应当用于诊断阿尔茨海默病的 A β 靶肽。

[0203] 在一优选实施方案中,所述 A β 靶肽为 A β (1-40) 或其功能性等同物。

[0204] 本发明通过以下实施例来进一步描述,然而这不应当理解为以任何方式限制本发明;本发明仅通过随本文附上的权利要求界定其范围。

实施例

[0205] 1. 材料和方法

[0206] 1.1 患者和健康对照

[0207] 招募患有临床诊断的 AD 的患者和健康对照。在研究前检查中,通过几个心理测试 (DemTect、简易精神状态测试、画钟测试) 来测试本研究的所有参与者的神经心理功能。

[0208] DemTect 测试

[0209] DemTect 量表是对痴呆的简短筛选测试,其包含五个短的分测试 (10 个单词列表重复、数字变换编码、语义词语流畅性任务、倒背数字广度、延迟的单词列表回忆) (Kessler et al., 2000)。将原始分数转化以给出不依赖于年龄和教育的分数,分类为“疑似痴呆”(分数 ≤ 8)、“轻度认知障碍”(分数 9-12) 和“适合年龄”(分数 13-18)。

[0210] MMSE

[0211] 简易精神状态检查 (MMSE) 或 Folstein 测试是用来评价认知的简短的 30 分问卷测试。其通常用于医学以筛选痴呆。在约 10 分钟的时间跨度中,其对各种功能采样,包括算术、记忆和方向。其由 Folstein et al., 1975 引入,并且广泛使用,具有小的修改。

[0212] MMSE 包括许多领域的简单问题和难题:测试的时间和地点、重复单词的列表、算术、语言使用和理解、以及基本运动技能。例如,一个问题要求复制两个五边形的图 (参见表 1)。27 分 (30 分中) 以上的任何分数是有效正常的。低于该分数,20-26 分表示轻度痴呆;10-19 分中度痴呆,而低于 10 分严重痴呆。正常值还针对教育程度和年龄进行修正。低至非常低的分数与痴呆的存在密切相关,尽管其他精神病症也可以导致 MMST 测试上的异常发现。

[0213] 画钟测试

[0214] 时钟评分是基于 Shulmann et al., 1986 所用的量表的修改。所有圆是预先绘制的,并且给对象的指令是“设置时间 11 点 10 分”。评分系统 (参见表 2) 范围为 1 分-6 分,较高的分数反映更大量的错误和更多障碍。这个评分系统源于经验并且在临床实践的基础

上进行修改。必要时,其留给单独的判断相当大的空间,但是其足够简单以具有高水平的评分者间可信度。我们的研究适合分析三个主要组分。这些包括画钟测试与认知功能的其他度量的横向比较;画钟测试随时间的纵向描述,以及画钟测试的恶化与制度化的决定之间的关系。


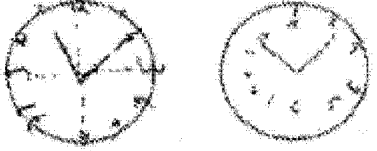
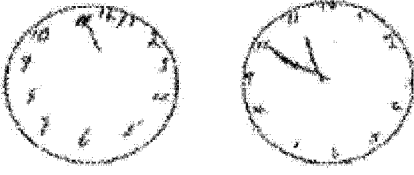

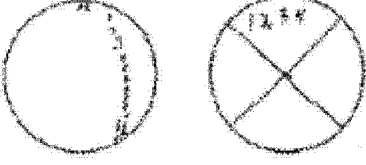
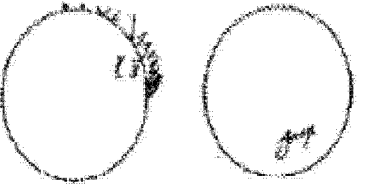
[0215] 表 1:典型的简易精神状态检查

[0216]

部分	问题	最大分数	评分
1) 方向	a) 你可以告诉我今天的(日期)/(月)/(年)吗? 今天是星期几? 你可以告诉我是哪个(季节)吗?	5	
	b) 我们在哪个城镇/城市? 哪个(县)/(国家)? 我们在哪个(建筑)和在哪(层)?	5	
2) 登记	我要测试你的记忆。(命名三种常见物体:“球、汽车、人”) 你可以重复我说的单词吗? (每单词 1 分) (重复最多 6 次尝试直至所有三个均记住)	3	
3) 注意力和计算	a) 从 100 持续减去 7 并给出每个答案。5 个答案后停止。 (93-86-79-72-65) b) 倒拼单词“World” (D L R O W)	5	
4) 回忆	较早我要你说的哪三个单词? (如果在登记测试期间未记住所有这些物体,跳过这个测试)	3	
5) 语言命名重复	命名以下物体(显示手表)和(显示铅笔)	2	
	重复以下内容:“no ifs, ands or buts”	1	
6) 阅读	(显示卡片或书写:“闭上你的眼睛”)阅读这个句子并按照我说的做	1	
书写	现在你可以写个短句给我吗?	1	
7) 三个阶段的命令	(呈上纸) 将这张纸拿在你的左(或右)手中,将其对半折叠,并且放在地上。	3	
8) 构建	请你复制这张图? 	1	
总分		30	

[0217] 表 2:典型的画钟测试

[0218]

<p>1. 完美</p>	
<p>[0219]</p>	
<p>2. 较小视觉空间错误 实例</p> <ul style="list-style-type: none"> - 轻度受损的时间间隔 - 将时间画在圆外 - 写数字时转页, 从而一些数字看来上下颠倒 - 画线(辐条)以指示间隔 	
<p>3. 当时间空间组织完美或仅表现出微小偏差时, 11 点 10 分的不准确表示 实例</p> <ul style="list-style-type: none"> - 分针指向 10 - 写下“11 点 10 分” - 不能进行时间的任何指示 	
<p>4. 时间的中度视觉空间混乱, 从而 11 点 10 分的准确指示是不可能的 实例</p> <ul style="list-style-type: none"> - 中等差的间距 - 省略数字 - 持续言语-重复圆或继续超过 12 至 13、14、15 等 - 左右颠倒-逆时针画的数字 - 书写困难-不能准确写下数字 	
<p>5. 如 4 所述的混乱的严重水平</p>	
<p>6. 时钟的不合理表示, 排除严重抑郁或其他精神病状态 实例</p> <ul style="list-style-type: none"> - 完全不尝试 - 完全没有时钟的外观 - 写下单词或名字 	

[0220] 1. 2 血液样品

[0221] 1. 2. 1 测试样品

[0222] 研究前检查后, 本研究 2 周后开始, 从所有参与者抽血。

[0223] 将用于测定 AD 生物标记的所有血液样品分别收集入三个聚丙烯管：

[0224] 1. 含有钾-EDTA (Sarstedt Monovette, 02. 1066. 001), 用于 EDTA 血浆

[0225] 2. 含有 Li-肝素 (Sartstedt Monovette, 02. 1065. 001), 用于肝素血浆

[0226] 3. 空白 (Sarstedt Monovette, 02. 1063. 001), 用于血清

[0227] 所有样品通过静脉穿刺或者通过从插入前臂静脉的留置导管反复抽血来收集。根据所选的时间方案收集血液 (如上文的 1. 1 章所述)。将血液在 4° C 下以 1550g (3000rpm) 离心 10min 以提供血浆。将每个独立样品的血浆或血清吸出, 装入一个 5ml 聚丙烯冷冻管 (Carl-Roth, E295. 1) 中, 并且在 -80° C 下冷冻储存。将样品在抽血后一小时内离心。

[0228] 1. 2. 2 建立内部 EDTA 血浆标准 - 对照 (ITS) 的样品

[0229] 通过静脉穿刺或者通过从插入前臂静脉的留置导管反复抽血来从良好定义的对照者采集血液样品 (45ml), 将其装入含有钾 -EDTA (Sarstedt Monovette, 02. 1066. 001) 的 5 个聚丙烯管, 用于 EDTA 血浆。将所有 5 个管在 4° C 下以 1550g (3000rpm) 离心 10min 以提供血浆。将血浆转移至 2ml 聚丙烯管 (Eppendorf, 0030120. 094), 1ml 等分。将这个内部血浆标准品的等分试样储存在 -80° C 下。将样品在抽血后一小时内离心。将对照血浆标记为“内部 EDTA 血浆标准 - 对照” (ITS)。如果在本发明的方法中应当使用其他体液 (脑脊液、尿、淋巴、唾液、汗液、胸膜液、滑液、房水、泪液、胆汁、胰分泌物), 这些液体必须取自良好定义的对照者, 如本文中对血浆样品所证实的。

[0230] 1. 3 实验室方法

[0231] 1. 3. 1 测试样品

[0232] 免疫沉淀

[0233] 将 EDTA 血浆样品 (含有 4ml 血浆) (其中本发明不限于 EDTA 血浆; 还可以使用例如肝素血浆或血清) 解冻并在 2ml 聚丙烯管 (Eppendorf, 0030120. 094) 中等分为 1ml。将一片蛋白酶抑制剂 (Roche, Complete mini Protease inhibitor cocktail, 11836153001) 溶于 1ml D-PBS (Invitrogen, 14190-094)。将 25 μ l 蛋白酶抑制剂溶液加入 1ml EDTA 血浆。每个样品除了一管, 将所有等分试样再次冷冻并储存在 -80° C 下。向这些剩余的血浆样品管加入 10 μ l 的 10% 吐温 -20。向每管加入 2. 5 μ g 抗淀粉样蛋白 β (17-24) 抗体 4G8 (Millipore, MAB1561)、2. 5 μ g 抗淀粉样蛋白 β (x-42) 抗体 12F4 (Millipore, 05-831) 和 2. 5 μ g 抗淀粉样蛋白 β (x-40) 抗体 11A5-B10 (Millipore, 05-799)。

[0234] 将所有血浆管在 4° C 下于架空摇床中温育过夜。为了固定淀粉样蛋白 β - 抗体复合物, 100 μ l 抗小鼠磁珠 (Invitrogen, 112-02D) 用于每个 1ml 血浆样品。除了缀合在磁珠上的这些特别的抗小鼠抗体, 可以使用所有其他抗小鼠抗体或抗宿主抗体 (宿主: 上文所列的一抗的来源)。这些抗体可以通过不同的缀合方法固定化在几种基质 (柱基质或珠基质) 上, 非限制性实例为生物素 - 链霉亲和素相互作用、甲苯磺酰基 - 活化表面、环氧 - 活化表面、胺 - 表面或羧酸表面。使用之前, 将 100 μ l 珠从原瓶转移入 2ml 管, 并且用 1ml PBS 洗涤 3 次。洗涤之后, 将珠重悬于 200 μ l PBS 中。将血浆管以 2000xg 短暂 (30sec) 离心。将上清转移入含有抗小鼠磁珠的管。将管在 4° C 下于架空摇床中温育过夜。

[0235] - 第二天将管放入磁性分离器以允许将珠吸引至管壁。约 1 分钟后小心地去除上清, 并且将珠用含有 10mg/ml 亲环蛋白 18 和 0. 05% 吐温 -20 的 500 μ l D-PBS 洗涤两次。

[0236] 洗脱捕获的淀粉样蛋白 β

[0237] 最后的洗涤步骤后, 将溶液吸出, 将管从磁性分离器取出, 将 100 μ l 的 50% (v/v) 甲醇 / 0, 5% (v/v) 甲酸加入每个管, 并且通过轻微震动将珠重悬。将所有管在室温下温育 1 小时。然后将管再次放入磁性分离器, 并且将来自每个管的 40 μ l 与 440 μ l E1A 缓冲液

(1BL 1-40(N)ELISA 试剂盒的稀释缓冲液)混合。将稀释的样品的 pH 用 16 μ l 的 400mM Na₂HPO₄、400mMKH₂PO₄pH8.0 调整至 E1A 缓冲液的 pH。

[0238] 洗脱的淀粉样蛋白 β 肽的定量

[0239] 利用 1BL 1-40(N)ELISA 试剂盒 (1BL, JP27714) 进行肽浓度的测定。

[0240] 除了上文所述的 Aβ (1-40)ELISA, 可以使用能够检测全长 Aβ 1-40 的所有其他可商购的 ELISA 试剂盒。

[0241] 将稀释的样品施用于 ELISA 板 (100 μ l/ 空, 重复测定)。ELISA 标准品取自试剂盒, 根据制造商的说明书方案溶解和稀释。施用所有样品和浓度标准品后, 将 ELISA 板在 4° C 下温育 18h。第二天根据制造商的说明书方案进行 ELISA。

[0242] 终止比色反应后, 利用酶标仪 (TECAN Sunrise) 在 450nm 下测定每个孔中的吸光度, 通过 550nm 下的吸光度修正。

[0243] 通过绘制修正的 450nm 下的吸光度对相应的标准肽浓度来进行标准曲线的测定。利用 Origin 7.0 (Microcal) 将曲线与四参数方程 (方程 1) 拟合。

$$[0244] \quad \text{方程 1: } y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A2$$

[0245] y 表示测量的吸光度, 而 x 表示相应的浓度, A1- 下渐近线, A2- 上渐近线。

[0246] 基于相应的吸光值利用方程 2 计算每个样品的 ELISA 的 Aβ (1-40) 浓度。

$$[0247] \quad \text{方程 2: } x = x_0 \cdot \sqrt[p]{\frac{A1 - y}{y - A2}}$$

[0248] 为了测定血浆样品中的浓度, 将计算的浓度通过 E1A 缓冲液稀释 (包括 pH 调整) 系数 12.4 以及免疫沉淀的浓缩效应 (1ml 至 100 μ l) 的系数 0.1 来修正。测定的血浆 Aβ (1-40) 浓度表示为 pg/ml。

[0249] 统计分析

[0250] 利用学生 t- 测试检测 Aβ (1-40) 的血浆浓度与阿尔茨海默病阳性临床诊断的存在的相关性。

[0251] 1.3.2 内部 EDTA 血浆标准 - 对照 (ITS) 样品

[0252] 免疫沉淀

[0253] ITS 的免疫沉淀一般按照与上文所述用于测试样品相同的方法进行。

[0254] 将 ITS 样品 (含有 1ml EDTA 血浆) (肝素血浆、血清也是可能的) 和测试样品同时解冻。将一片蛋白酶抑制剂 (Roche, Complete mini Protease inhibitor cocktail, 11836153001) 溶于 1ml D-PBS (Invitrogen, 14190-094)。将 25 μ l 蛋白酶抑制剂溶液加入 1ml ITS 样品。根据测试样品的方法和操作, 向 ITS 血浆样品加入 10 μ l 的 10% 吐温 -20、2.5 μ g 抗淀粉样蛋白 β (17-24) 抗体 4G8 (Millipore, MAB1561)、2.5 μ g 抗淀粉样蛋白 β (x-42) 抗体 12F4 (Millipore, 05-831) 和 2.5 μ g 抗淀粉样蛋白 β (x-40) 抗体 11A5-B10 (Millipore, 05-799)。

[0255] 所有随后的步骤按照与上文所述用于测试样品相同的方法进行。洗脱捕获的淀粉样蛋白 β

[0256] 将 ITS 样品按照与上文所述用于测试样品相同的方法处理。

[0257] 洗脱的淀粉样蛋白 β 肽的定量

[0258] ITS 样品中洗脱的淀粉样蛋白 β 肽的定量按照与上文所述用于测试样品相同的方法进行。

[0259] 统计分析

[0260] 在一个测量内, ITS 样品和测试血浆样品的 A β (1-40) 浓度一起在一个 ELISA 板上测定。此后, 根据方程 3 将测定的测试样品的血浆 A β (1-40) 浓度标准化至测定的 ITS 样品的浓度:

$$[0261] \quad \text{方程 3: 相对 A}\beta\text{(1-40)水平} = \frac{\text{测试样品中的血浆 A}\beta\text{(1-40)浓度}}{\text{ITS 样品中的血浆 A}\beta\text{(1-40)浓度}}$$

[0262] 2. 结果

[0263] 2.1 人口学特征

[0264] 总的来说, 45 个人参与本研究, 30 个健康对照和 15 个 AD 患者 (AD 患者在下文中称为“患者”)。为了观察可能的年龄对血浆 A β 的影响, 在广泛的年龄范围中选择对照者, 并且将他们亚分类为三组。I 组包含 18-30 岁的个体, II 组是 31-45 岁的个体, 而 III 组个体为 46-65 岁。人口学特征如表 3 所示。

[0265] 表 3 人口学特征

[0266]

	健康对照			AD 患者
	I 组(18-30)	II 组(31-45)	III 组(46-65)	
数量	10	10	10	15
基线的年龄 (平均值 \pm SDEV),	25.8 \pm 2.9	38.4 \pm 4.7	54 \pm 6.9	79.13 \pm 7.09
身高, cm (平均值 \pm SDEV)	175.5 \pm 11.6	175.1 \pm 7.2	167.5 \pm 10.9	168.4 \pm 10.34
体重, kg (平均值 \pm SDEV)	71.33 \pm 11.8	71.36 \pm 13.5	75.81 \pm 13.3	72.00 \pm 12.31
性别(%女性)	50	50	50	40

[0267] 2.2 心理测试

[0268] 如上文所述, 为了评价神经心理功能, 所有参与者已进行 DemTect、简易精神状态测试和画钟测试。这些测试在研究前以及研究开始后 3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月进行。

[0269] DemTect 测试

[0270] 将原始分数转化以给出年龄和教育独立的分数, 分类为“怀疑痴呆”(分数 \leq 8)、“轻度认知障碍”(分数 9-12) 和“适合年龄”(分数 13-18)。所有访问的测试结果如表 2 所示。

[0271] 三组健康个体与患者相比有明显差异。特别地,可以看到 AD 患者的平均得分低于健康对照的平均得分的一半。患者的平均值未随时间变化,因此在图 2 中仅给出一次。

[0272] 简易精神状态测试

[0273] 在 MMS 测试中,27 分(30 分中)以上的任何分数是有效正常的。低于该分数,20-26 分表示轻度痴呆;10-19 分中度痴呆,而低于 10 分严重痴呆。正常值还针对教育程度和年龄进行修正。低至非常低的分数与痴呆的存在紧密相关,尽管其他精神病症也可以导致 MMST 测试上的异常发现。测试结果如图 3 所示。相同的健康对照和 AD 患者参与这个测试。

[0274] 在图 3 中以与图 2 相似的方式显示,三组健康个体与患者相比有明显差异。

[0275] 画钟测试

[0276] 画钟测试的评分系统范围为 1 分-6 分,较高的分数反映更大量的错误和更多障碍。这个评分系统源于经验并且在临床实践的基础上进行修改。必要地,其留给单独的判断相当大的余地,但是其足够简单以具有高水平的评分者间信度。再次地,与上文两个测试中相同的健康对照组和 AD 患者参与。

[0277] 本研究适合分析以下三个主要组分。这些包括画钟测试与认知功能的其他度量的横向比较;画钟测试随时间的纵向描述,以及画钟测试的恶化与制度化的决定之间的关系。

[0278] 测试结果如图 4 所示。

[0279] 三组健康个体与患者相比有明显差异。结果以与图 2 和 3 相似的方式显示于图 4。

[0280] 2.3 血浆 A β (1-40) 浓度,未标准化的

[0281] 如上文所述,在 T0+9 个月系列的 EDTA 血浆中测定 A β (1-40) 浓度。T0+9 系列的其他样品用来优化和建立新的免疫沉淀方法。总的来说,用 10 个 AD 样品和 26 个对照样品测试最终优化的方法。测定的血浆 A β (1-40) 浓度如表 4 所示。

[0282] 表 4 所有分析的样品(T0+9 个月系列)的血浆 A β (1-40) 浓度

[0283] 计算所有四组的平均浓度值和平均值的标准误差。学生 t- 测试已比较 AD 组与每个单一的对照组。

[0284]

AD组		对照组18-30		对照组31-45		对照组46-65	
个体	A β (1-40) (pg/ml)	个体	A β (1-40) (pg/ml)	个体	A β (1-40) (pg/ml)	个体	A β (1-40) (pg/ml)
Nr. 10	366.86	Nr. 09	320.46	Nr. 13	291.76	Nr. 02	337.81
Nr. 11	364.57	Nr. 27	302.80	Nr. 15	296.74	Nr. 08	257.64
Nr. 14	424.75	Nr. 32	237.59	Nr. 17	320.36	Nr. 12	287.10
Nr. 16	347.81	Nr. 36	239.33	Nr. 18	331.72	Nr. 19	317.78
Nr. 20	403.27	Nr. 37	326.98	Nr. 25	297.93	Nr. 21	288.38
Nr. 22	262.96	Nr. 40	330.16	Nr. 28	250.21	Nr. 23	426.33
Nr. 26	463.03	Nr. 41	280.66	Nr. 29	268.31	Nr. 24	356.83
Nr. 30	423.09	Nr. 42	359.67	Nr. 31	349.74	Nr. 33	277.00
Nr. 39	402.74	Nr. 44	319.90	Nr. 38	245.71		
Nr. 45	391.88						
平均值	385.10	平均值	301.95	平均值	294.72	平均值	318.61
SEM	17.27	SEM	13.91	SEM	11.88	SEM	19.27
T-测试AD组vs. 对照组		0.00180		0.00058		0.02059	

[0285] 对于所有对照组,均获得健康志愿者与 AD 组之间的显著差异。当仔细检查一组内的个别浓度时,两个个体是引人注目的。AD 个体 Nr. 22 表现出健康对照典型的 A β (1-40) 浓度。其不适合进入 AD 组。如果比较研究前心理测试的个人结果(参见下文的图 2-4 和表 4),显然个体 No. 22 具有目前为止归类为 AD 组的所有分析的参与者的最高得分。DemTect 得分在‘适合年龄’的范围中,并且 MMSE 得分在 MCI 个体范围的上限。相比之下,对照个体

No. 23 表现出 AD 组典型的 A β (1-40) 浓度。研究前心理测试 (参见下文的图 2-4 和表 5) 提供 No. 23 具有目前为止归类为对照组的所有分析的参与者的最低得分。显然升高的血浆 A β (1-40) 水平是阿尔茨海默病发生的第一指征。

[0286] 表 5 所有分析的个体的心理测试 (研究前)

	DemTect	简易精神状态	画钟
AD组			
Nr. 10	1	12	6
Nr. 11	5	18	5
Nr. 14	6	22	4
Nr. 16	1	11	5
Nr. 20	10	19	2
Nr. 22	16	26	2
Nr. 26	8	25	6
Nr. 30	0	0	6
Nr. 39	4	21	5
Nr. 45	9	25	1
对照组18-30			
Nr. 09	16	30	1
Nr. 27	18	30	1
Nr. 32	18	30	1
Nr. 36	18	30	1
Nr. 37	17	30	1
Nr. 40	18	30	1
Nr. 41	18	30	1
Nr. 42	18	29	1
Nr. 44	18	30	1
对照组31-45			
Nr. 13	17	29	1
Nr. 15	18	29	1
Nr. 17	18	29	1
Nr. 18	18	28	1
Nr. 25	17	30	1
Nr. 28	18	30	1
Nr. 29	18	30	1
Nr. 31	18	30	1
Nr. 38	18	30	1
对照组46-65			
Nr. 02	17	29	1
Nr. 08	18	30	1
Nr. 12	18	30	1
Nr. 19	18	28	1
Nr. 21	18	29	1
Nr. 23	14	28	2
Nr. 24	16	29	1
Nr. 33	17	29	1

[0287]

[0288] 基于心理测试和血浆分析发现,不可以认为 AD 个体 No. 22 是正确分类的。在对照个体 No. 23 的情况下,可能的早期阿尔茨海默病是可信的。因此,将数据统计分析,包括或排除这两个个体 (下文的表 6)。

[0289] 表 6 :分析的 AD 个体 vs. 对照的统计分析 (I-III 组一起)

[0290]

	AD 组(所有分析的样品)	所有对照(所有分析的样品)	AD组(除了 No. 22)	所有对照(除了 No. 23)
平均值	385.10 pg/ml	304.57 pg/ml	398.67 pg/ml	299.70 pg/ml
中值	397.31 pg/ml	300.36 pg/ml	402.74 pg/ml	297.93 pg/ml
SDEV	54.61	43.54	35.85	36.50
SEM	17.27	8.54	11.94	7.30
T-测试	p = 5.14E-05		p = 6.09E-08	

[0291] 为了使得能够早期临床诊断,优选在尚未有进一步的症状的阶段,待使用的生物标记在阿尔茨海默病的早期,例如轻度认知障碍(MCI)期间已改变是重要的。如果发病早期治疗对于延长个体的生命和生活质量是必需的,这特别重要。

[0292] 为了确定 A β (1-40) 水平是否适合作为 AD 的发病早期标记,在进一步的实验中评价 A β (1-40) 的血浆浓度与 DemTect 和 MMSE 得分的关联(图 5)。

[0293] 如从上文本发明者的研究的结果所预期的,分别在与高 DemTect 和 MMSE 得分对应的对照个体中观察到最低的 A β (1-40) 浓度。在归类为轻度认知障碍的人中观察到最高浓度。表明中度或严重痴呆的得分的进一步下降还表现出血浆 A β (1-40) 水平的降低,其位于有效正常和 MCI 之间。这个发现表明显著升高的血浆 A β (1-40) 水平是早期阿尔茨海默病发生的初始和早期标记,在这个时间点没有或仅轻微的认知功能下降是可观察到的。

[0294] 2.4 血浆 A β (1-40) 浓度,包括 ITS 样品后标准化的

[0295] 相对 A β (1-40) 浓度的比较在 EDTA 血浆样品的第二系列的测量(T0+6 个月)中进行。在第一步中,将来自对照个体和 AD 患者的测试样品一起在一个 ELISA 板上分析。将测定的血浆 A β (1-40) 水平标准化至在这个测量周期内分析的来自对照个体的所有样品的平均值。A β 水平的标准化根据方程 4 进行:

[0296] 方程 4: 相对 A β (1-40)水平 =
$$\frac{\text{AD 测试样品中的血浆 A}\beta(1-40)\text{浓度}}{\text{对照样品中的平均血浆 A}\beta(1-40)\text{浓度}}$$

[0297] 在两个不同测量周期中分析总计 10 个对照和 10 个 AD 样品。相对 A β (1-40) 浓度如表 7 所示。

[0298] 表 7:20 个分析样品(T0+6 个月系列)的相对血浆 A β (1-40) 浓度

AD 组		对照组	
个体	相对 A β (1-40)水平	个体	相对 A β (1-40)水平
Nr. 11	1.22	Nr. 6	1.16
Nr. 14	1.27	Nr. 7	1.09
Nr. 16	1.11	Nr. 8	0.84
Nr. 20	1.72	Nr. 9	1.02
Nr. 22	0.92	Nr. 12	0.90
Nr. 26	1.44	Nr. 13	1.05
Nr. 30	1.55	Nr. 15	0.93
Nr. 39	1.47	Nr. 17	0.95
Nr. 43	1.13	Nr. 18	1.01
Nr. 45	1.36	Nr. 19	1.05
平均值	1.32	平均值	1.00
T-测试 AD 组 vs.对照组			9.3e-4

[0299] 如表 7 所示,在每个测量周期内使用内部标准品提高可靠性,并且使得在不同测量周期中测定的 A β 肽水平的值之间能够更好地比较。然而,在双盲研究中,不可能区分 AD 和对照样品。因此,使用在每个测量周期中共分析的内部血浆标准品 (ITS) 是比较来自不同测量周期的 A β 肽值的唯一方法。

[0301] 因此,在 ITS 的存在下分析 T0+6 个月样品的血浆 A β (1-40) 水平。所有值均标准化至 ITS 的 A β (1-40) 浓度。结果如图 6 所示。如图 6 所示,所有分析的 AD 样品的相对 A β (1-40) 水平的平均值为 1.31,而所有分析的来自健康对照个体的样品的相对 A β (1-40) 水平的平均值为 0.94。这些值与表 7 中的平均值的比较表现出很好的一致性,与健康个体相比,在 AD 患者中血浆 A β (1-40) 水平升高约 32%。这些数据表明,在每个测量周期内使用与未知血浆样品一起分析的内部血浆标准品提高在不同测量周期中测定的 A β (1-40) 水平的可靠性和可比性。

[0302] 3. 讨论

[0303] 本发明者可以证实 A β (1-40) 的高血浆浓度与阿尔茨海默病的阳性临床诊断相关。虽然较早的研究 (van Oijen et al., 2006; Mayeux et al., 2003; Mehta et al., 2000,) 试图证实这种相关性。但是统计显著性并不令人信服,这导致认为 A β (1-40) 不适合作为 AD 的标记,因为不可以建立统计上的显著相关性,并且由于缺少合适的测定方法。在本研究中,通过双抗体测定方法直接测定 A β (1-40) 浓度。在 Rotterdam 研究 (van Oijen et al., 2006) 中,所有样品的平均浓度值为 192.0pg/ml。Mayeux 和同事发现在基线 AD 中 153.6pg/ml,而非痴呆老年人中 133.3pg/ml, Mehta 和同事在患有散发性 AD 的患者和健康对照中分别获得 272pg/ml 和 219pg/ml。在本研究中,发明者分别获得 385pg/ml (AD 患者) 和 304pg/ml (健康对照) 的平均血浆 A β (1-40) 浓度。检测的血浆 A β (1-40) 的升高是使用新的二价捕获系统的结果。如上文所详细解释的,在这个系统中,一个 A β 肽分子由识别两个不同表位的两个抗体分子结合。第一 (捕获) 抗体与 A β (1-40) 的氨基酸 17-24 相互作用。第二捕获抗原结合至 A β (1-40) 的 C 端。在一优选实施方案中,两种抗体均由磁珠上的一种抗小鼠抗体固定。不希望被这种假设束缚,认为可以实现两种捕获抗体与人血浆中的 A β 肽之间的协同结合。已证实特别强和特异性的这种结合提供从诸如血浆的给定样

品中捕获所有 A β (1-40) 肽分子, 并且还确保去除会干扰通过 ELISA 定量的其他血浆蛋白。在本研究中 AD 患者和对照之间的显著差异变得明显, 其中给定样品的 A β (1-40) 肽分子可以定量方式检测。

[0304] 在预测阿尔茨海默病的常规方法中, 优选在 CSF 或血浆中测定 A β (1-42) 水平。这个水平在 AD 患者中降低, 因为脑中 A β 肽的聚集升高。令人惊讶的是 A β (1-40) 浓度反而升高。Kim 和同事已发现体内 A β (1-40) 的强抗淀粉样病变效果 (Kim et al., 2007)。他们可以证实提高 Tg2576 或 BRI-A β 42A 小鼠脑中的 A β (1-40) 水平保护免受淀粉样蛋白病理。此外, 这种影响的程度相当意外: BRI-A β 40/Tg2576 小鼠的前脑中 A β (1-40) 水平的约 2 倍升高对 A β 沉积具有终身抑制作用, 与同窝 Tg2576 中的 A β 沉积相比, 范围从在 11 个月的约 80% 的降低至在 20 个月的约 50%。几个其他研究已支持这个发现 (Deng et al., 2006; Mucke et al., 2000, McGowan et al., 2005)。可以想象 AD 患者的血浆或 CSF 中 A β (1-40) 水平的升高是由脑中增加的生产所引起的, 这是升高的 A β 肽聚集倾向的结果以抑制这种意外反应。

[0305] 仅通过应用本发明的新方法变为可能的血浆 A β (1-40) 浓度与神经心理学测试的相关性已证实: A β (1-40) 水平的显著升高是阿尔茨海默病发展的早期事件。从而, 血浆 A β (1-40) 的水平现在可以用作诊断阿尔茨海默病的发生的标记。

[0306] 如本文所证实的, 在每个测量周期内使用与未知血浆样品一起分析的内部血浆标准品进一步提高在不同测量周期中测定的 A β (1-40) 水平的可靠性和可比性。

[0307] 参考文献

[0308] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29; 368(9533):387-403

[0309] Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczesniak MG. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 Dec 17; 366(9503):2112-7

[0310] Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Rekin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001 May 8; 56(9):1143-53

[0311] Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheitens P, Taraska P, Winblad B; EFNS. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol*. 2007 Jan; 14(1):26.

[0312] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky S T, Barberger-Gateau P, Cummings J, DeIacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheitens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007 Aug; 6(8):734-46.

[0313] Jellinger KA. Alzheimer's disease. In: Gilman S, editor. *Neurobiology of*

Disease. Amsterdam:Elsevier Academic Press;2007. p. 69-82

[0314] Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999 Mar ;56(3):303-8

[0315] Chertkow H, Massoud F, Nasreddine Z, Belleville S, Joanette Y, Bocti C, Drolet V, Kirk J, Freedman M, Bergman H. Diagnosis and treatment of dementia: 3. Mild cognitive impairment and cognitive impairment without dementia. *CMAJ*. 2008 May 6 ;178(10):1273-85

[0316] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006 Oct ;27(10):1372-84

[0317] Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2006 Jan ;63(1):38-46.

[0318] Bouwman FH, Schoonenboom SN, van der Flier WM, van Elk EJ, Kok A, Barkhof F, Blankenstein MA, Scheitens P. CSF biomarkers and medial temporal lobe atrophy predict dementia in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2007 Jul ;28(7):1070-4

[0319] Saito Y, Murayama S. Neuropathology of mild cognitive impairment. *Neuropathology*. 2007 Dec ;27(6):578-84

[0320] Jicha GA, Parisi JE, Dickson DW, Johnson K, Cha R, Ivnik RJ, Tangalos EG, Boeve BF, Knopman DS, Braak H, Petersen RC. Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. *Arch Neurol*. 2006 May ;63(5):674-81

[0321] Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Johnson KA, Knopman DS, Boeve BF, Jicha GA, Ivnik RJ, Smith GE, Tangalos EG, Braak H, Kokmen E. Neuropathologic features of amnesic mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2006 May ;63(5):665-72

[0322] Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H, Ganguli M, Hampel H, Scheitens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B; International Psychogeriatric Association Expert Conference on mild cognitive impairment. Mild cognitive impairment. *Lancet*. 2006 Apr 15 ;367(9518):1262-70

[0323] Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, Weissgram S, Hoenigschnabl S, Geipi E, Krampfl W, Tragl KH. Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia. *Neurology*. 2007 Jan 23 ;68(4):288-91

[0324] Devanand DP, Pradhaban G, Liu X, Khandji A, De Santi S, Segal S, Rusinek H, Peitton GH, Honig LS, Mayeux R, Stern Y, Tabert MH, de Leon MJ. Hippocampal and entorhinal atrophy in mild cognitive impairment: prediction of Alzheimer disease. *Neurology*. 2007 Mar 13 ;68(11):828-36

- [0325] Rossi R, GeroIdi C, Bresciani L, Testa C, Binetti G, Zanetti O, Frisoni GB. Clinical and neuropsychological features associated with structural imaging patterns in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007 ;23(3):175-83
- [0326] Whitwell JL, Petersen RC, Negash S, Weigand SD, Kantarci K, Ivnik RJ, Knopman DS, Boeve BF, Smith GE, Jack CR Jr. Patterns of atrophy differ among specific subtypes of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2007 Aug ; 64(8):1130-8
- [0327] Panza F, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso A, Solfrizzi V. Heterogeneity of mild cognitive impairment and other pre-dementia syndromes in progression to dementia. *Neurobiol Aging*. 2007 Oct ;28(10):1631-2; discussion 1633-4
- [0328] Hyman SE. Can neuroscience be integrated into the DSM-V? *Nat Rev Neurosci*. 2007 Sep ;8(9):725-32
- [0329] Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*. 2004 Apr ;1(2):213-25
- [0330] Blennow K. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: use in early diagnosis and evaluation of drug treatment. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005 Sep ;5(5):661-72
- [0331] Hampel H, Buerger K. Biomarkers in blood and cerebrospinal fluid. In: Herzog K, Morris C, Perani D, editors. *The Dementias: Early Diagnosis and Evaluation*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 73-107
- [0332] Lewczuk P, Kornhuber J, Wiltfang J. The German Competence Network Dementias: standard operating procedures for the neurochemical dementia diagnostics. *J Neural Transm*. 2006 Aug ;113(8):1075-80 Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx*. 2004 Apr ;1(2):226-34
- [0333] Barnes J, Foster J, Fox NC. Structural magnetic resonance imaging-derived biomarkers for Alzheimer's disease. *Biomarkers Med*. 2007 ;1:79-92
- [0334] Vemuri P, Gunter JL, Senjem ML, Whitwell JL, Kantarci K, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR Jr. Alzheimer's disease diagnosis in individual subjects using structural MR images: validation studies. *Neuroimage*. 2008 Feb 1 ; 39(3):1186-97
- [0335] Barkhof F, Polvikoski TM, van Straaten EC, Kalaria RN, Sulkava R, Aronen HJ, Niinistö L, Rastás S, Oinas M, Scheitens P, Erkinjuntti T. The significance of medial temporal lobe atrophy: a postmortem MRI study in the very old. *Neurology*. 2007 Oct 9 ;69(15):1521-7
- [0336] Mevel K, Desgranges B, Baron JC, Landeau B, De la Sayette V, Viader F, Eustache F, Chételat G. Detecting hippocampal hypometabolism in Mild Cognitive Impairment using automatic voxel-based approaches. *Neuroimage*. 2007 Aug

1;37(1):18-25

[0337] Kempainen NM, Aalto S, Wilson IA, **Nägren** K, Heilin S, Brück A, Oikonen V, **Kailajärvi** M, Scheinin M, Viitanen M, Parkkioja R, Rinne JO. PET amyloid ligand [11C] PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology*. 2007 May 8;68(19):1603-6

[0338] Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, **Bergström** M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, **Långström** B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004 Mar;55(3):306-19

[0339] Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, Cowie TF, Dickinson KL, Maruff P, Darby D, Smith C, Woodward M, Merory J, Tochon-Danguy H, O'Keefe G, Klunk WE, Mathis CA, Price JC, Masters CL, Villiemagne VL. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology*. 2007 May 15;68(20):1718-25

[0340] Pike KE, Savage G, Villiemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, Mathis CA, Klunk WE, Masters CL, Rowe CC. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Nov;130(Pt 11):2837-44

[0341] Huang C, Eideberg D, Habeck C, Moeller J, Svensson L, Tarabula T, Julin P. Imaging markers of mild cognitive impairment: multivariate analysis of CBF SPECT. *Neurobiol Aging*. 2007 Jul;28(7):1062-9

[0342] Kantarci K, Weigand SD, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Gunter J, Reyes D, Shiung M, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Jack CR Jr. Longitudinal 1H MRS changes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep;28(9):1330-9

[0343] Petrella JR, Wang L, Krishnan S, Slavin MJ, Prince SE, Tran TT, Doraiswamy PM. Cortical deactivation in mild cognitive impairment: high-field-strength functional MR imaging. *RadioLOGY*. 2007 Oct;245(1):224-35

[0344] **Hämäläinen** A, Tervo S, Grau-Olivares M, Niskanen E, Pennanen C, Huuskonen J, Kivipelto M, **Hänninen** T, Tapiola M, Vanhanen M, Hallikainen M, Heikala EL, Nissinen A, Vanninen R, Soininen H. Voxel-based morphometry to detect brain atrophy in progressive mild cognitive impairment. *Neuroimage*. 2007 Oct 1;37(4):1122-31

[0345] Kircher TT, Weis S, Freymann K, Erb M, Jessen F, Grodd W, Heun R, Leube DT. Hippocampal activation in patients with mild cognitive impairment is necessary for successful memory encoding. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007 Aug;78(8):812-8

[0346] Kropffier MA, Boellaard R, van Berckel BN, Schuitmaker A, Kloet RW, Lubberink MJ, Jonker C, Scheitens P, Lammertsma AA. Evaluation of reference regions for (R)-[11C]PK11195 studies in Alzheimer's disease and mild cognitive

impairment. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Dec;27(12):1965-74

[0347] Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. *Acta Neuropathol.* 2005 Oct;110(4):345-59

[0348] Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003 Oct;2(10):605-13

[0349] Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol.* 2006 Mar;5(3):228-34

[0350] Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, Blennow K. Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007;23(5):316-20

[0351] Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC, Holtzman DM. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Aβ₄₂ in humans. *Ann Neurol.* 2006 Mar;59(3):512-9

[0352] Prince JA, Zetterberg H, Andreasen N, Marcusson J, Blennow K. APOE ε4 allele is associated with reduced cerebrospinal fluid levels of Aβ₄₂. *Neurology.* 2004 Jun 8;62(11):2116-8

[0353] Strozzyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Aβ₄₂ levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology.* 2003 Feb 25;60(4):652-6

[0354] Walsh DM, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisny MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ, Selkoe DJ. The role of cell-derived oligomers of Aβ in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans.* 2005 Nov;33(Pt 5):1087-90

[0355] Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheitens P, Schröder J, Zinkowski RP, Bouwman FH, Schönknecht P, Schoonenboom NS, Andreasen N, Wallin A, DeBernardis JF, Kerkman DJ, Heindel B, Blennow K, Hampel H. Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology.* 2007 Dec 11;69(24):2205-12

[0356] Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/β-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol.* 2007 Mar;64(3):343-9.

[0357] Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, Zetterberg H, Blennow K. Cerebrospinal fluid β-amyloid 1-42

[0358] concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007 May;78(5):461-4

- [0359] Li G, Sokall, Quinn JF, Leverenz JB, Brodey M, Schellenberg GD, Kaye JA, Raskind MA, Zhang J, Peskind ER, Montine TJ. CSF tau/Abeta 42 ratio for increased risk of mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurology*. 2007 Aug 14; 69(7):631-9
- [0360] Stomrud E, Hansson O, Blennow K, Minthon L, Londos E. Cerebrospinal fluid biomarkers predict decline in subjective cognitive function over 3 years in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007; 24(2):118-24
- [0361] Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, Shen Y, Dodel R, Du Y, Farlow M, **Möller** HJ, Blennow K, Buerger K. Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry*. 2004 Jul; 9(7):705-10
- [0362] Maccioni RB, Lavados M, Guillón M, Mujica C, Bosch R, Fariás G, Fuentes P. Anomalously phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects. *Neurobiol Aging*. 2006 Feb; 27(2):237-44
- [0363] **Schönknecht** P, Pantel J, Kaiset E, Thomann P, **Schröder** J. Increased tau protein differentiates mild cognitive impairment from geriatric depression and predicts conversion to dementia. *Neurosci Lett*. 2007 Apr 6; 416(1):39-42
- [0364] Clark CM, Xie S, Chittams J, Ewbank D, Peskind E, Galasko D, Morris JC, McKeel DW Jr, Furlow M, Weitlauf SL, Quinn J, Kaye J, Knopman D, Arai H, Doody RS, DeCnvl C, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol*. 2003 Dec; 60(12):1696-702
- [0365] Buerger K, Ewets M, **Pirttilä** T, Zinkowski R, Alaftuzoff I, Teipel SJ, DeBerbardis J, Kerkman D, McCulloch C, Soininen H, Hampel H. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2006 Nov; 129(Pt 11):3035-41
- [0366] Engelborghs S, Sleegers K, Cras P, Brouwers N, Serneels S, De Leenheir E, Martin JJ, Vanmechelen E, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. No association of CSF biomarkers with APOE epsilon4, plaque and tangle burden in definite Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Sep; 130(Pt 9):2320-6
- [0367] Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, Hampel H, Kessler H, **Frölich** L, **Schröder** J, Peters O, Jessen F, Luckhaus C, Perneczky R, Jahn H, Fiszer M, Maler JM, Zimmermann R, Bruckmoser R, Kornhuber J, LeWczuk P. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem*. 2007 May; 101(4):1055-9
- [0368] Buerger K, Alaftuzoff I, Ewers M, **Pirttilä** T, Zinkowski R, Hampel H. No correlation between CSF tau protein phosphorylated at threonine 181 with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Oct; 130(Pt 10):e82

- [0369] Buerger K, Otto M, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, DeBernardis J, Kerkman D, Schröder J, Schönknecht P, Cepek L, McCulloch C, Möller HJ, Wiltfang J, Kretzschmar H, Hampel H. Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*. 2006 Jan ;27(1) : 10-5
- [0370] Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Schneider M, Lewczuk P, Welge V, Gross M, Falkai P, Kornhuber J, Willfang J. Cerebrospinal fluid neurochemical phenotypes in vascular dementias :original data and mini-review. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2008 ;25(3) :256-65
- [0371] Zhong Z, Ewers M, Teipel S, Bürger K, Wallin A, Blennow K, He P, McAllister C, Hampel H, Shen Y. Levels of beta-secretase (BACE 1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jun ;64(6) :718-26
- [0372] McRae A, Martins RN, Fonte J, Kraftsik R, Hirt L, Miklossy J. Cerebrospinal fluid antimicroglial antibodies in Alzheimer disease: a putative marker of an ongoing inflammatory process. *Exp Gerontol*. 2007 Apr ;42(4) :355-63
- [0373] Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: ' ALzheimer ASsociated gene ' --a new blood biomarker? *J Cell Mol Med* 2008 Aug ;12(4) :1094-117
- [0374] Finehout EJ, Franck Z, Choe LH, Relkin N, Lee KH. Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer' s disease. *Ann Neurol*. 2007 Feb ;61(2) :120-9
- [0375] Castaño EM, Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Beach T. Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer' s disease and non-demented elderly subjects. *Neurol Res*. 2006 Mar ;28(2) :155-63
- [0376] Zhang J, Goodlett DR, Quinn JF, Peskind E, Kaye JA, Zhou Y, Pan C, Yi E, Eng J, Wang Q, Aebersold RH, Montine TJ. Quantitative proteomics of cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 2005 Apr ;7(2) :125-33
- [0377] Simonsen AH, McGuire J, Hansson O, Zetterberg H, Podust VN, Davies HA, Waldemar G, Minthon L, Blennow K. Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2007 Mar ;64(3) :366-70
- [0378] Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, Burgess JA, Hughes-Frutiger S, Burkhard PR, Sanchez JC, Hochstrasser DF. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics*. 2004 Aug ;4(8) :2234-41
- [0379] Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, Nixon R, Nutt J, Chung K, Zabetian C, Samii A, Lin M, Hattan S, Pan C, Wang Y, Jin J, Zhu D, Li GJ, Liu Y, Waichunas D, Montine TJ, Zhang J. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients

with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis.* 2006 Aug ;9(3):293-348

[0380] Irani DN, Anderson C, Gundry R, Cotter R, Moore S, Kerr DA, McArthur JC, Sacktor N, Pardo CA, Jones M, Calabresi PA, Nath A. Cleavage of cystatin C in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2006 Feb;59(2):237-47

[0381] Hansson SF, Simonsen AH, Zetterberg H, Andersen O, Haghighi S, Fagerberg I, Andréasson U, Westman-Brinkmalm A, Wallin A, Rüttschi U, Blennow K. Cystatin C in cerebrospinal fluid and multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2007 Aug ;62(2):193-6

[0382] Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Montesi F, Tumini E, Mariani E, Licastro F, Patterson C. Blood inflammatory markers and risk of dementia: The Conselice Study of Brain Aging. *Neurobiol Aging.* 2007 Dec;28(12):1810-20

[0383] Engelhart MJ, Geerlings ML, Meijer J, Kiliaan A, Ruitenberg A, van Swieten JC, Stijnen T, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Arch Neurol.* 2004 May;61(5):668-72

[0384] Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguarnera L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. *Immunol Lett.* 2007 Nov 30;114(1):46-51

[0385] German DC, Gurnani P, Nandi A, Garner HR, Fisher W, Diaz-Arrastia R, O'Suilleabhain P, Rosenblatt KP. Serum biomarkers for Alzheimer's disease: proteomic discovery. *Biomed Pharmacother.* 2007 Aug ;61():383-9

[0386] Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1359-62

[0387] Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG. Association of low plasma Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2007 Mar ;64(3):354-62

[0388] van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. Plasma Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol.* 2006 Aug ;5(8):655-60

[0389] **Sundelöf** J, Giedraitis V, Irizarry MC, **Sundström** J, Ingelsson E, **Rönnemaa** E, **Arnlov** J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H, Ingelsson M, Lannfelt L, Kilander L. Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Arch Neurol.* 2008 Feb;65(2):256-63

[0390] Song MS, Mook-Jung I, Lee HJ, Min JY, Park MH. Serum anti-amyloid-beta

antibodies and Alzheimer's disease in elderly Korean patients. *J Int Med Res.* 2007 May-Jun; 35(3):301-6

[0391] Pesaresi M, Lovati C, Bertora P, Mailland E, Galimberti D, Scarpini E, Quadri P, Forloni G, Mariani C. Plasma levels of beta-amyloid(1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2006 Jun; 27(6):904-5

[0392] Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol.* 2003 Jul; 60(7):958-64

[0393] Kosaka T, Imagawa M, Seki K, Arai H, Sasaki H, Tsuji S, Asami-Odaka A, Fukushima T, Imai K, Iwatsubo T. The beta APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid-beta protein ending at A beta42(43). *Neurology.* 1997 Mar; 48(3):741-5

[0394] Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* 1996 Aug; 2(8):864-70

[0395] Sobów T, Flirski M, Kloszewska I, Liberski PP. Plasma levels of alpha beta peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2005; 65(2):117-24

[0396] Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa K, Oguni E, Komatsuzaki Y, Shoji S. Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1996 Sep 15; 141(1-2):65-8

[0397] Vanderstichele H, Van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Minthon L, Wallin A, Blennow K, Vanmechelen E. Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid.* 2000 Dec; 7(4):245-58 Abdullah L, Paris D, Luis C, Quadros A, Parrish J, Valdes L, Keegan AP, Mathura V, Crawford F, Mullan M. The influence of diagnosis, intra- and inter-person variability on serum and plasma Abeta levels. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 27; 428(2-3):53-8

[0398] Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC. Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Apr; 66(4):264-71

[0399] Mehta PD, Pirttila T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP. Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett.* 2001 May 18; 304(1-2):102-6

[0400] Giedraitis V, Sundelöf J, Irizarry MC, Gärevik N, Hyman BT, Wahlund LO, Ingelsson M, Lannfelt L. The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid

beta levels is disrupted in Alzheimer ' s disease. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 12 ; 427(3) :127-31

[0401] Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer ' s disease :prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging.* 2008 Jan ;29(1) :1-11

[0402] Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2000 Jan ;57(1) :100-5

[0403] Brettschneider S, Morgenthaler NG, TG ;Teipel SJ, Fischer-Schulz C, Bürger K, Dodel R, Du Y, Möller HJ, Bergmann A, Hampel H. Decreased serum amyloid beta(1-42) autoantibody levels in Alzheimer ' s disease, determined by a newly developed immunoprecipitation assay with radiolabeled amyloid beta(1-42) peptide. *Biol Psychiatry.* 2005 Apr 1 ;57(7) :813-6

[0404] Bibl M, Esselmann H, Mollenhauer B, Weniger G, Welge V, Liess M, Lewczuk P, Otto M, Schulz JB, Trenkwalder C, Kornhuber J, Wiltfang J. Blood-based neurochemical diagnosis of vascular dementia :a pilot study. *J Neurochem.* 2007 Oct ; 103(2) :467-74

[0405] Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K. Evaluation of plasma Aβ(40) and Aβ(42) as predictors of conversion to Alzheimer ' s disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2008 May 16. [Epub ahead of print]

[0406] Kessler J, Calabrese P, Kalbe E, Berger F. Ein neues Screening-Verfahren zur Unterstützung der Demenzdiagnostik. *Psycho* 26 343-347 (2000)

[0407] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov ;12(3) :189-98

[0408] Shulman KI, Shedletsky R, Silver IL. The challenge of time: Clock-drawing and cognitive function in the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* 1, 135-140 (1986)

[0409] Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer ' s disease. *J Biosci Bioeng.* 2005 May ;99(5) :437-47

[0410] Simonsen AH, Hansson SF, Ruetschi U, McGuire J, Podust VN, Davies HA, Mehta P, Waldemar G, Zetterberg H, Andreasen N, Wallin A, Blennow K. Amyloid beta(1-40) quantification in CSF: comparison between chromatographic and immunochemical methods. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007 ;23(4) :246-50

[0411] Casas C, Sergeant N, Létier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdeux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici

B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol.* 2004 Oct; 165(4):1289-300

[0412] Gelfanova V, Higgs RE, Dean RA, Holtzman DM, Farlow MR, Siemers ER, Boodhoo A, Qian YW, He X, Jin Z, Fisher DL, Cox KL, Hale JE. Quantitative analysis of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation and MALDI-Tof mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2007 Jun; 6(2):149-58.

[0413] Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Wattez A, David JP, Vanmechelen E, Sergheraert C, Delacourte A. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem.* 2003 Jun; 85(6):1581-91

[0414] Deng Y, Tarassishin L, Kallhoff V, Peethumnongsin E, Wu L, Li YM, Zheng H. Deletion of presenilin 1 hydrophilic loop sequence leads to impaired gamma-secretase activity and exacerbated amyloid pathology. *J Neurosci.* 2006 Apr 5; 26(14):3845-54.

[0415] Kim J, Onstead L, Randle S, Price R, Smithson L, Zwizinski C, Dickson DW, Golde T, McGowan E. Abeta 40 inhibits amyloid deposition in vivo. *J Neurosci.* 2007 Jan 17; 27(3):627-33.

[0416] Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 2003 Nov 11; 61(9):1185-90

[0417] McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy MP, Beard J, Das P, Jansen K, Delucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T. Abeta 42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron.* 2005 Jul 21; 47(2):191-9.

[0418] Mehta PD, Pirtila T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2000 Jan; 57(1):100-5.

[0419] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogua L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 2000 Jun 1; 20(11):4050-8.

[0420] Simonsen AH, Hansson SF, Ruetschi U, McGuire J, Podust VN, Davies HA, Mehta P, Waldemar G, Zetterberg H, Andreasen N, Wallin A, Blennow K. Amyloid beta 1-40 quantification in CSF: comparison between chromatographic and immunochemical methods. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007; 23(4):246-50.

[0421] van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM.

[0422] Plasma Abeta(1-40)and Abeta(1-42)and the risk of dementia:a prospective case-cohort study.Lancet Neurol.2006 Aug;5(8):655-60.

[0001]

序列表

<110> 前体生物药物股份公司

<120> 新测定

<130> PBD00075/WO

<150> US 61/243,604

<151> 2009-09-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

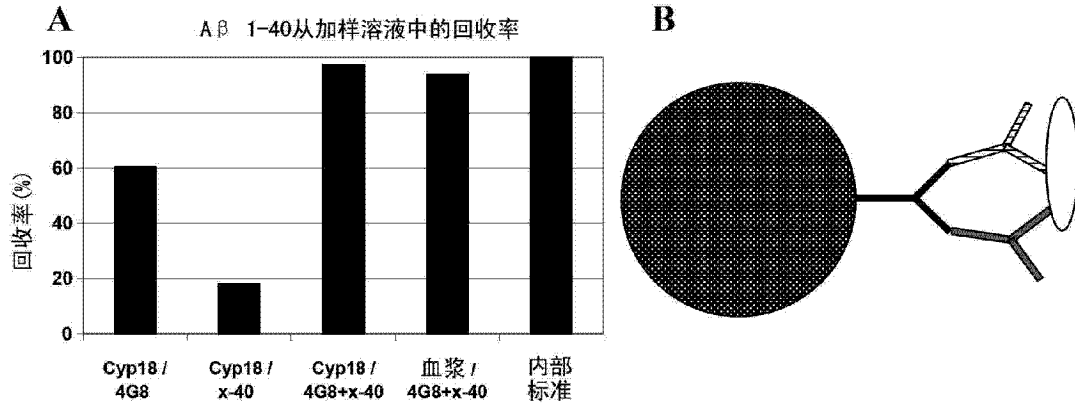


图 1

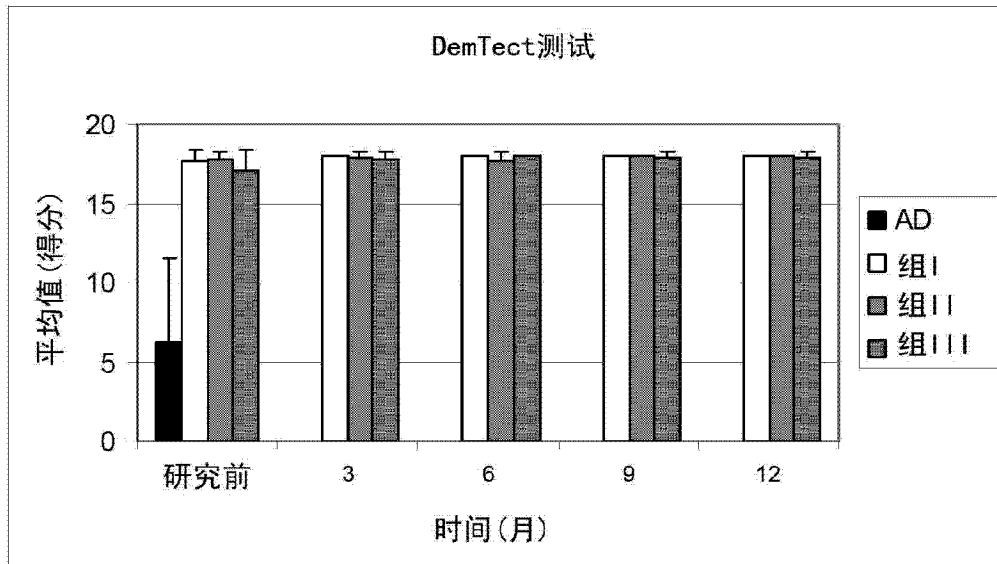


图 2

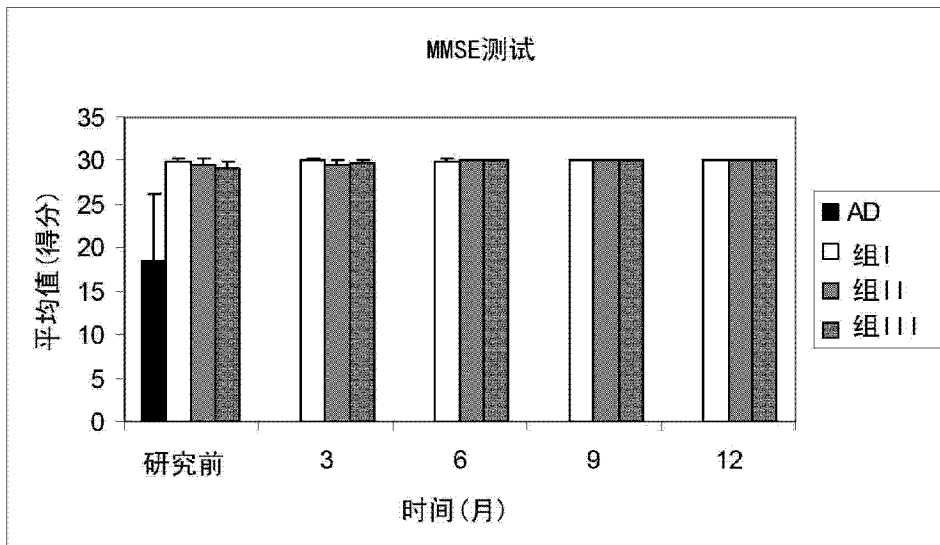


图 3

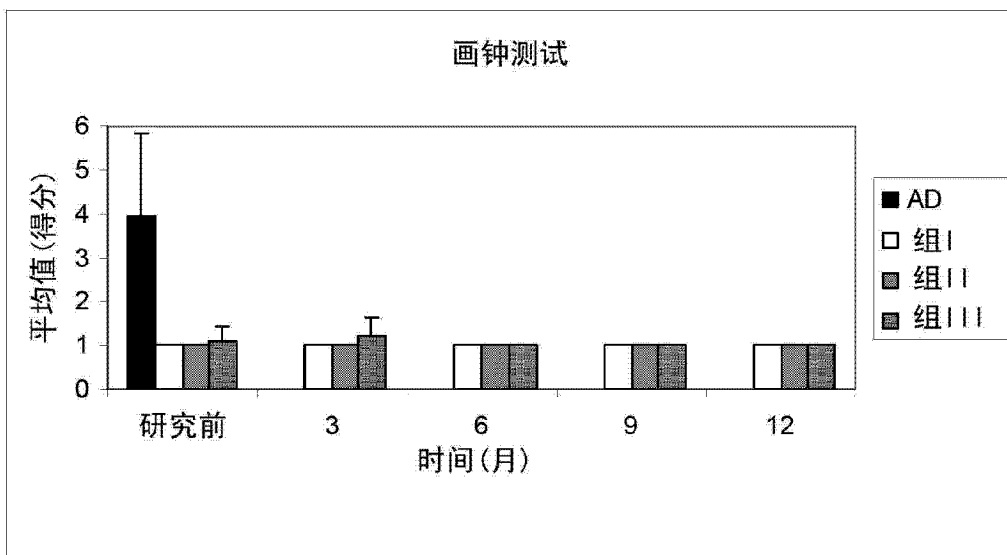
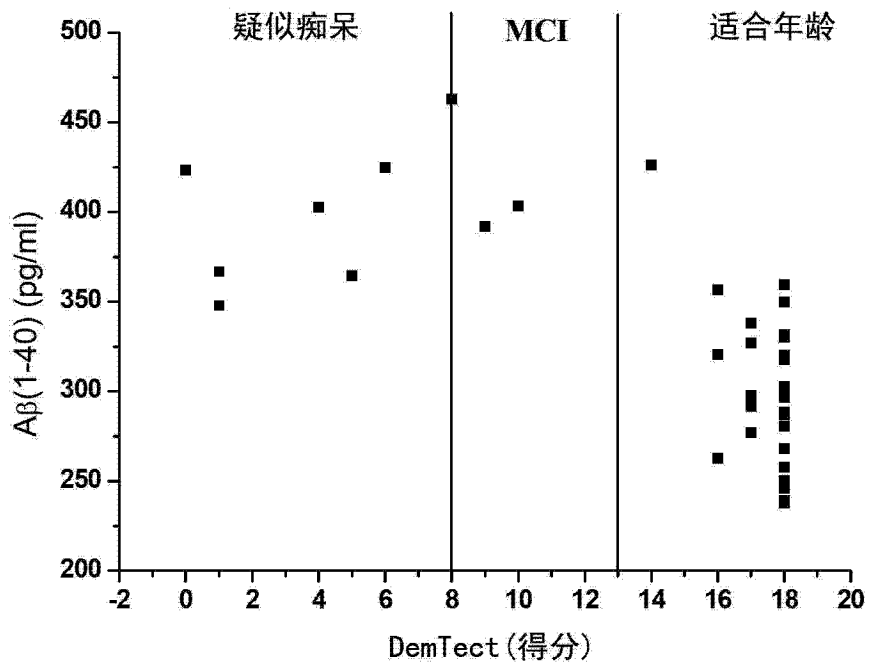


图 4

A



B

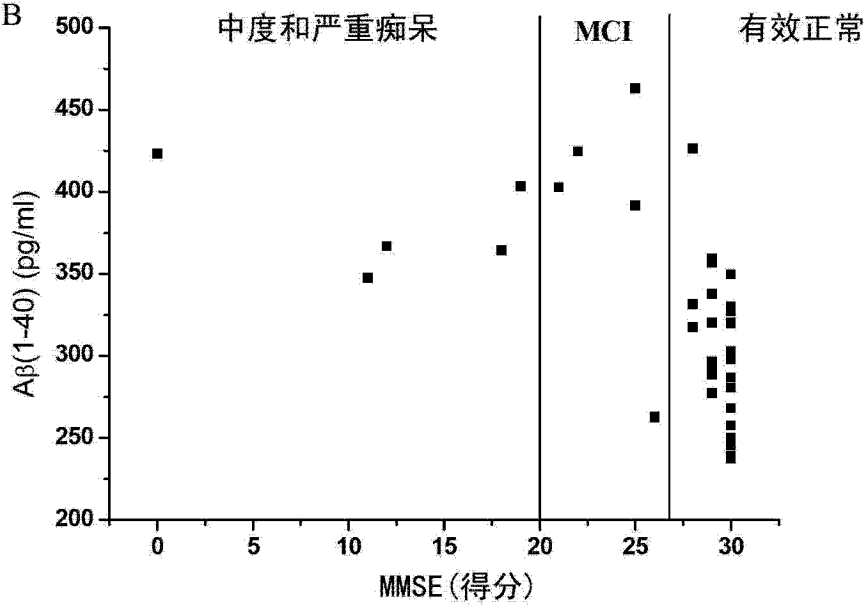


图 5

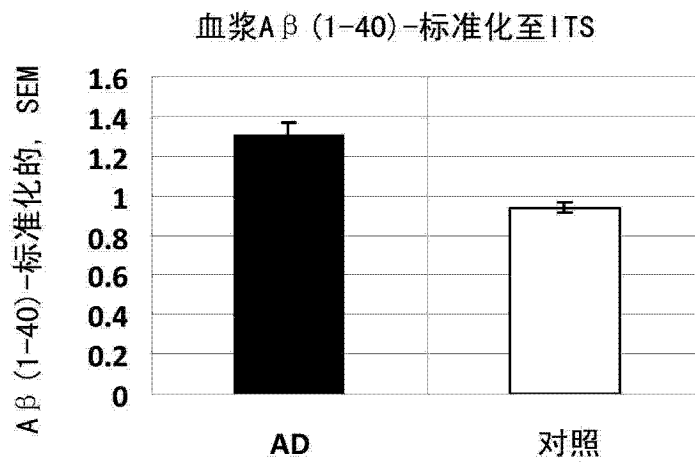


图 6

专利名称(译)	检测淀粉样蛋白β肽的新测定		
公开(公告)号	CN102612653A	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201080052274.5	申请日	2010-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	前体生物药物股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	前体生物药物股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	前体生物药物股份公司		
[标]发明人	M 克兰施米特 C 格特利希 H U德穆特		
发明人	M·克兰施米特 C·格特利希 H-U·德穆特		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
优先权	61/243604 2009-09-18 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测Aβ肽，特别是血浆中的Aβ肽的新方法，并且涉及Aβ肽在诊断阿尔茨海默病中的用途。

部分	问题	最大分数	评分
1) 方向	a) 你可以告诉我今天的(日期)(月)(年)吗? 今天是星期几? 你可以告诉我我是哪个(季节)吗? b) 我们在哪个城镇/城市? 哪个(县)(国家)? 我们在哪个(建筑)和在哪(层)?	5	
2) 登记	我要测试你的记忆。(命名三种常见物体:“球、汽车、人”) 你可以重复我说的单词吗? (每单词 1分) (重复最多 6 次尝试直至所有三个均记住)	3	
3) 注意力和计算	a) 从 100 持续减去 7 并给出每个答案。5 个答案后停止。 (93-86-79-72-65) b) 倒排单词 “World” (D L R O W)	5	
4) 回忆	较早我要你说的哪三个单词? (如果在登记测试期间未记住所有这些物体, 跳过这个测试)	3	
5) 语言命名重复	命名以下物体(显示手表)和(显示铅笔) 重复以下内容: “no ifs, ands or buts”	2	
6) 阅读	(显示卡片或书写: “闭上你的眼睛”)阅读这个句子并按照我说的做	1	
书写	现在你可以写个短句给我吗?	1	
7) 三个阶段命令	(呈上纸) 将这张纸拿在你的左(或右)手中, 将其对半折叠, 并且放在地上。	3	
8) 构建	请你复制这张图? 	1	
总分		30	