



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106574930 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201580040000.7

(22)申请日 2015.05.19

(30)优先权数据

2014-106560 2014.05.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/064386 2015.05.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/178398 JA 2015.11.26

(71)申请人 株式会社岛津制作所

地址 日本京都府

申请人 国立研究开发法人国立长寿医疗研究中心

(72)发明人 金子直树 柳泽胜彦

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

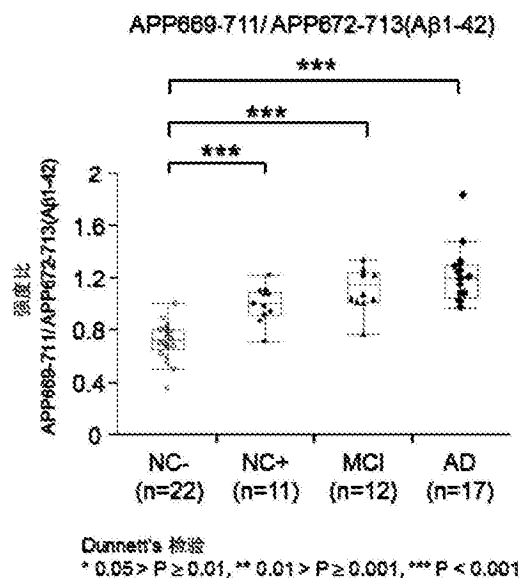
序列表3页 附图23页

(54)发明名称

评价脑内的淀粉样蛋白 β 肽蓄积状态的替代性生物标记物和其分析方法

(57)摘要

提供:以生物体来源试样中的淀粉样前体蛋白(APP)来源的肽作为指标的评价脑内的A β 蓄积状态的生物标记物和其分析方法。测定来自于受试对象的生物体来源试样,求出选自由APP669-711/APP672-713(A β 1-42);APP672-709(A β 1-38)/APP672-713(A β 1-42);APP674-711(A β 3-40)/APP672-713(A β 1-42);APP672-710(A β 1-39)/APP672-713(A β 1-42);APP672-711(A β 1-40)/APP672-713(A β 1-42);和APP672-711(Ox A β 1-40)/APP672-713(A β 1-42)组成的组中的至少一者的比,对于受试对象的前述各比,以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的前述各比作为基准水平,前述各比高于基准水平的情况下,判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。



1. 一种判断脑内的A β 蓄积状态的分析方法,其包括如下工序:
测定工序,将来自于受试对象的生物体来源试样供至包含
APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 和
选自由APP669-711 (序列号7)、APP672-709 (A β 1-38) (序列号1)、APP674-711 (A β 3-40)
(序列号2)、APP672-710 (A β 1-39) (序列号3)、APP672-711 (A β 1-40) (序列号4)、和OxAPP672-
711 (OxA β 1-40) (序列号5) 组成的组中的至少一者
的标记物的检测,得到所述生物体来源试样中的、
APP672-713 (A β 1-42) 与
选自由APP669-711、APP672-709 (A β 1-38)、APP674-711 (A β 3-40)、APP672-710 (A β 1-
39)、APP672-711 (A β 1-40)、和OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 组成的组中的所述至少一者的各测
定水平;
算出工序,求出选自由
APP669-711水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
APP669-711/APP672-713 (A β 1-42);
APP672-709 (A β 1-38) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
APP672-709 (A β 1-38)/APP672-713 (A β 1-42);
APP674-711 (A β 3-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
APP674-711 (A β 3-40)/APP672-713 (A β 1-42);
APP672-710 (A β 1-39) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
APP672-710 (A β 1-39)/APP672-713 (A β 1-42);
APP672-711 (A β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
APP672-711 (A β 1-40)/APP672-713 (A β 1-42); 和
OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
OxAPP672-711 (OxA β 1-40)/APP672-713 (A β 1-42)
组成的组中的至少一者的比; 以及,
评价工序,以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的所述各比作为基准水平,受
试对象的所述各比高于所述各比的基准水平的情况下,判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大
于所述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。
2. 根据权利要求1所述的判断脑内的A β 蓄积状态的分析方法,其中,所述生物体来源试
样选自由血液、脑脊髓液、尿、体分泌液、粪便、唾液和痰组成的组。
3. 一种判断脑内的A β 蓄积状态的标记物,其选自由生物体来源试样中的APP669-711
(序列号7) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
APP672-709 (A β 1-38) (序列号1) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
APP674-711 (A β 3-40) (序列号2) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
APP672-710 (A β 1-39) (序列号3) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
APP672-711 (A β 1-40) (序列号4) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,和
OxAPP672-711 (OxA β 1-40) (序列号5) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合组成的
组。
4. 一种判断脑内的A β 蓄积状态的分析方法,其包括如下工序:

测定工序,将来自于受试对象的血液试样供至包含APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的标记物的检测,得到所述血液试样中的APP672-713 (A β 1-42) 的测定水平;以及,

评价工序,以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的APP672-713 (A β 1-42) 的水平作为基准水平,受试对象的所述APP672-713 (A β 1-42) 的测定水平低于所述基准水平的情况下,判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于所述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。

5. 一种根据脑内的A β 蓄积状态判断医学介入的有效性的方法,其进行如下工序:

测定工序,在对受试对象所进行的医学介入的前后,

将来自于受试对象的生物体来源试样供至包含

APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 和

选自由APP669-711 (序列号7)、APP672-709 (A β 1-38) (序列号1)、APP674-711 (A β 3-40) (序列号2)、APP672-710 (A β 1-39) (序列号3)、APP672-711 (A β 1-40) (序列号4)、和OxAPP672-711 (Ox A β 1-40) (序列号5) 组成的组中的至少一者

的标记物的检测,得到所述生物体来源试样中的、

APP672-713 (A β 1-42) 与

选自由APP669-711、APP672-709 (A β 1-38)、APP674-711 (A β 3-40)、APP672-710 (A β 1-39)、APP672-711 (A β 1-40)、和OxAPP672-711 (Ox A β 1-40) 组成的组中的所述至少一者

的各测定水平;以及,

算出工序,求出选自由APP669-711水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

APP669-711/APP672-713 (A β 1-42);

APP672-709 (A β 1-38) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42);

APP674-711 (A β 3-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42);

APP672-710 (A β 1-39) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42);

APP672-711 (A β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42); 和

OxAPP672-711 (Ox A β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

OxAPP672-711 (Ox A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)

组成的组中的至少一者的比,

进行医学介入前的受试对象的所述各比与医学介入后的受试对象的所述各比的比较,从而根据脑内的A β 蓄积状态判断所述医学介入的有效性。

评价脑内的淀粉样蛋白 β 肽蓄积状态的替代性生物标记物及其分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于脑神经科学领域和临床医学领域,涉及评价脑内的淀粉样蛋白/ β 肽(A β)蓄积状态的替代性生物标记物及其分析方法。更详细而言,本发明涉及:以通过淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein;APP)被分解而产生的A β 和A β 样肽的生物体来源试样中水平作为指标的评价脑内A β 蓄积状态的替代性生物标记物及其分析方法。本发明的生物标记物涉及阿尔茨海默病,是用于发病前诊断、发病预防介入(优先治疗药给予等)对象者的筛选和治疗药/预防药的药效评价等的标记物。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease;AD)是痴呆症的主要原因,占痴呆症整体的50-60%。推定世界的痴呆症患者数(2001年2400万人以上)在2040年达到8100万人(非专利文献1)。认为阿尔茨海默病的发病与A β 有较强相关。A β 是由单次跨膜蛋白且由770个残基的氨基酸构成的淀粉样前体蛋白(APP)通过 β 分泌酶和 γ 分泌酶接受蛋白质分解而产生的(参照图1)。由于伴随着A β 的纤维化的聚集而出现老年斑时,以此为引发而微管相关蛋白(tau protein)在神经细胞内聚集蓄积,导致神经功能不全、神经细胞死亡。作为其结果,认为引起认知能力极度降低。一直以来熟知的是,A β 主要由40mer(A β 1-40)和42mer(A β 1-42)构成,还已知向脑脊髓液(CSF)、血液中移动。进而近年来,报道了,与A β 1-40和A β 1-42的长度不同的A β 样的肽还存在于CSF中(非专利文献2)。

[0003] 阿尔茨海默病潜在性地发病并缓慢地进行。阿尔茨海默病的诊断根据用于考察临床症状的ADAS-cog、MMSE、DemTect、SKT、或画钟试验那样的认知功能检查、核磁共振图像诊断(MR1)、正电子发射断层成像法(PET)等的图像所见的确认等而进行。MR1是能够检测脑的变性萎缩的图像诊断法,但脑的萎缩在阿尔茨海默病中不是特异性的。另一方面,作为使特异性地检测A β 沉积的配体分子(PiB:Pittsburgh compound-B)的停留可见化的图像诊断法,有PiB-PET。发现:硫代黄素T-类似体(11C)PiB在具有轻度认知障碍(Mild Cognitive Impairment;MCI)或轻度阿尔茨海默病的患者的脑的特定区域反映逐渐蓄积的A β 并停留,作为A β 沉积的检测方法,成为最佳的工具。根据阿尔茨海默病的尸体检验病理所见,可知,轻度的认知功能降低的病例中大量老年斑也已经蓄积。由此推测:A β 的聚集·沉积可能从痴呆症外向化的很早以前就开始了,报道了根据PiB-PET的所见也证实其的结果。然而,PET检查需要大量的设备,而且一次检查费用也昂贵,不适合作为国民能够广泛就诊的方法。

[0004] 血液、脑脊髓液(CSF)的生物标记物是能够以分子水平检测疾病的发病、进行的有用的指标。报道了,阿尔茨海默病中,CSF中的A β 1-42的浓度、A β 1-42/A β 1-40的浓度比的降低、总Tau值或磷酸化Tau值的上升是有用的诊断标记物(专利文献1:日本特开2010-19864号公报、非专利文献3)。然而,CSF的采集的侵袭性高,不适合作为国民能够广泛就诊的方法。

[0005] 因此,作为血液检查,期待血中存在的A β 1-42是否能够作为阿尔茨海默病诊断标

记物,但报道了,与CSF中的A β 1-42的行为不同,血中A β 1-42浓度与阿尔茨海默病发病的相关性低(非专利文献3)。对于其原因尚未阐明。

[0006] 另外,专利文献2:日本特开2013-63976号公报中公开了,不识别可溶性A β 单体而仅与可溶性A β 低聚物特异性结合的单克隆抗体,公开了使用前述抗体的阿尔茨海默病的诊断法。同一公报的[0104]中公开了如下方法:受试者试样中的A β 低聚物相对于A β 单体的比和正常人相比高的情况下,判定受试者为阿尔茨海默病候选。

[0007] 非专利文献4中公开了,通过组合免疫沉降法与质谱装置,人血浆中存在有22种来自于APP的A β 和A β 样肽。另外,还公开了对这些A β 和A β 样肽进行定量的方法。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特开2010-19864号公报

[0011] 专利文献2:日本特开2013-63976号公报

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Blennow K,de Leon MJ,Zetterberg H.:Alzheimer's disease.Lancet.2006 Jul 29;368(9533):387-403

[0014] 非专利文献2:Portelius E,Westman-Brinkmalm A,Zetterberg H,Blennow K.:Determination of beta-amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry.J Proteome Res.2006Apr;5(4):1010-6

[0015] 非专利文献3:Hampel H,Shen Y,Walsh DM,Aisen P,Shaw LM,Zetterberg H,Trojanowski JQ,Blennow K.:Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease.Exp Neurol.2010Jun;223(2):334-46

[0016] 非专利文献4:Kaneko N,Yamamoto R,Sato TA,Tanaka K.:Identification and quantification of amyloid beta-related peptides in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry..Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.2014;90(3):104-17

发明内容

[0017] 发明要解决的问题

[0018] 已知的是,在阿尔茨海默病(AD)患者中,在认知功能降低外向化的以前大量的A β 沉积。PiB-PET对于A β 蓄积的检测是有效的,但检查费用昂贵且检查的所需时间也长,因此,不是大量老年人能够容易就诊的诊断方法。因此,在临床症状外向化前,需要能够检测A β 蓄积增加的简便的分析方法。

[0019] 如上述那样,一般来说,以血液、脑脊髓液(CSF)中存在的生物标记物作为指标的检查方法是能够以分子水平简便地检测疾病的发病、进行的有效的方法。上述专利文献1和非专利文献3中报道了,阿尔茨海默病中,CSF中的A β 1-42的浓度、A β 1-42/A β 1-40的浓度比的降低、总Tau值或磷酸化Tau值的上升是有用的诊断标记物。然而,另一方面,非专利文献3中报道了,与CSF A β 1-42不同,血中A β 1-42浓度与AD发病的相关性低。

[0020] 关于血液中的A β 的迄今为止的报道中,仅对于血液中的A β 1-40和A β 1-42这2种的浓度与AD的相关性进行了考察。然而,利用组合了免疫沉降法与质谱装置的方法发现了,在

CSF中除了A β 1-40和A β 1-42以外,在A β 1-40的N末端侧、C末端侧被切断的短的A β 也存在。血液中,与CSF中相比,利用免疫沉降法和质谱装置检测微量地存在的A β 在技术上是困难的,但通过免疫沉降法的改良,表明人的血浆中存在有22种来自于APP的A β 和A β 样肽,也开发了该肽的定量方法(非专利文献4)。

[0021] 因此,本发明的目的在于,提供:以生物体来源试样中的淀粉样前体蛋白(APP)来源的肽作为指标的评价脑内的A β 蓄积状态的生物标记物和其分析方法。特别是,本发明的目的在于,提供:以血液试样中的淀粉样前体蛋白(APP)来源的A β 和A β 样肽作为指标的评价脑内的A β 蓄积状态的生物标记物和其分析方法。更详细而言,本发明的目的在于,提供:关于阿尔茨海默病,用于发病前诊断、发病预防介入(优先治疗药给予等)对象者的筛选和治疗药・预防药的药效评价等的标记物和其分析方法。

[0022] 用于解决问题的方案

[0023] 本发明人等深入研究,结果发现:特定的APP来源的A β 和A β 样肽达成上述目的,至此完成了本发明。

[0024] 本说明书中,作为淀粉样蛋白 $\cdot\beta$ 肽的简称,使用“A β ”。即,“A β ”包含A β 1-40和A β 1-42。有时将通过淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein;APP)被切断而产生的除了前述A β 以外的肽称为A β 样肽。有时将通过淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein;APP)被切断而产生的A β 和A β 样肽称为“APP衍生型肽”。

[0025] 本发明包括以下的方案。

[0026] (1)一种判断脑内的A β 蓄积状态的分析方法,其包括如下工序:

[0027] 测定工序,将来自于受试对象的生物体来源试样供至包含

[0028] APP672-713(A β 1-42)(序列号6)和

[0029] 选自由APP669-711(序列号7)、APP672-709(A β 1-38)(序列号1)、APP674-711(A β 3-40)(序列号2)、APP672-710(A β 1-39)(序列号3)、APP672-711(A β 1-40)(序列号4)、和OxAPP672-711(OxA β 1-40)(序列号5)组成的组中的至少一者

[0030] 的标记物的检测,得到前述生物体来源试样中的、

[0031] APP672-713(A β 1-42)与

[0032] 选自由APP669-711、APP672-709(A β 1-38)、APP674-711(A β 3-40)、APP672-710(A β 1-39)、APP672-711(A β 1-40)、和OxAPP672-711(OxA β 1-40)组成的组中的前述至少一者的各测定水平;

[0033] 算出工序,求出选自由

[0034] APP669-711水平相对于APP672-713(A β 1-42)水平的比:

[0035] APP669-711/APP672-713(A β 1-42);

[0036] APP672-709(A β 1-38)水平相对于APP672-713(A β 1-42)水平的比:

[0037] APP672-709(A β 1-38)/APP672-713(A β 1-42);

[0038] APP674-711(A β 3-40)水平相对于APP672-713(A β 1-42)水平的比:

[0039] APP674-711(A β 3-40)/APP672-713(A β 1-42);

[0040] APP672-710(A β 1-39)水平相对于APP672-713(A β 1-42)水平的比:

[0041] APP672-710(A β 1-39)/APP672-713(A β 1-42);

[0042] APP672-711(A β 1-40)水平相对于APP672-713(A β 1-42)水平的比:

- [0043] APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42) ; 和
- [0044] O_xAPP672-711 (O_xA β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0045] O_xAPP672-711 (O_xA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)
- [0046] 组成的组中的至少一者的比; 以及,
- [0047] 评价工序, 以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的前述各比作为基准水平, 受试对象的前述各比高于前述各比的基准水平的情况下, 判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。
- [0048] (2) 根据上述(1)所述的判断脑内的A β 蓄积状态的分析方法, 其中, 前述生物体来源试样选自血液、脑脊髓液、尿、体分泌液、粪便、唾液和痰组成的组。
- [0049] (3) 一种判断脑内的A β 蓄积状态的标记物, 其选自生物体来源试样中的APP669-711 (序列号7) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
- [0050] APP672-709 (A β 1-38) (序列号1) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
- [0051] APP674-711 (A β 3-40) (序列号2) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
- [0052] APP672-710 (A β 1-39) (序列号3) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合,
- [0053] APP672-711 (A β 1-40) (序列号4) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合, 和
- [0054] O_xAPP672-711 (O_xA β 1-40) (序列号5) 与APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的组合组成的组。
- [0055] (4) 一种判断脑内的A β 蓄积状态的分析方法, 其包括如下工序:
- [0056] 测定工序, 将来自于受试对象的血液试样供至包含APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的标记物的检测, 得到前述血液试样中的APP672-713 (A β 1-42) 的测定水平; 以及,
- [0057] 评价工序, 以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的APP672-713 (A β 1-42) 的水平作为基准水平, 受试对象的前述APP672-713 (A β 1-42) 的测定水平低于前述基准水平的情况下, 判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。
- [0058] (5) 一种根据脑内的A β 蓄积状态判断医学介入的有效性的方法, 其进行如下工序:
- [0059] 测定工序, 在对受试对象所进行的医学介入的前后,
- [0060] 将来自于受试对象的生物体来源试样供至包含
- [0061] APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 和
- [0062] 选自APP669-711 (序列号7)、APP672-709 (A β 1-38) (序列号1)、APP674-711 (A β 3-40) (序列号2)、APP672-710 (A β 1-39) (序列号3)、APP672-711 (A β 1-40) (序列号4)、和O_xAPP672-711 (O_xA β 1-40) (序列号5) 组成的组中的至少一者
- [0063] 的标记物的检测, 得到前述生物体来源试样中的、
- [0064] APP672-713 (A β 1-42) 与
- [0065] 选自APP669-711、APP672-709 (A β 1-38)、APP674-711 (A β 3-40)、APP672-710 (A β 1-39)、APP672-711 (A β 1-40)、和O_xAPP672-711 (O_xA β 1-40) 组成的组中的前述至少一者
- [0066] 的各测定水平; 以及,
- [0067] 算出工序, 求出选自APP669-711水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0068] APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) ;
- [0069] APP672-709 (A β 1-38) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:

- [0070] APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42) ;
- [0071] APP674-711 (A β 3-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0072] APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42) ;
- [0073] APP672-710 (A β 1-39) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0074] APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42) ;
- [0075] APP672-711 (A β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0076] APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42) ;和
- [0077] OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0078] OxAPP672-711 (OxA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)
- [0079] 组成的组中的至少一者的比,
- [0080] 进行医学介入前的受试对象的前述各比与医学介入后的受试对象的前述各比的比较,从而根据脑内的A β 蓄积状态判断前述医学介入的有效性。
- [0081] 本发明中,标记物的水平基本是指浓度,也可以为本领域技术人员依据浓度而使用的其他单位。受试对象包括人、和除了人以外的哺乳动物(大鼠、狗、猫等)。另外,本发明中,生物体来源试样不返回至原来的受试对象(例如受试者)而被废弃。医学介入包括治疗药、预防药的给予、饮食疗法、运动疗法、学习疗法、外科手术等。
- [0082] 发明的效果
- [0083] 根据本发明,提供:由生物体来源试样中的APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 与选自由APP669-711 (序列号7)、APP672-709 (A β 1-38) (序列号1)、APP674-711 (A β 3-40) (序列号2)、APP672-710 (A β 1-39) (序列号3)、APP672-711 (A β 1-40) (序列号4)、和OxAPP672-711 (OxA β 1-40) (序列号5) 组成的组中的至少一者的组合构成的、判断受试对象的脑内的A β 蓄积状态的标记物。另外,提供前述标记物的分析方法。
- [0084] 通过进行受试对象的生物体来源试样中的前述标记物的分析,可以进行受试对象的脑内的A β 蓄积为基准水平以下或脑内的A β 为过剩蓄积的状态的判断。本发明不仅可以用于脑内的A β 过剩蓄积且还出现认知功能障碍的阿尔茨海默病进行阶段的检测,还可以用于脑内的A β 过剩蓄积但未出现认知功能障碍的阿尔茨海默病早期阶段的检测。
- [0085] 根据本发明,作为前述生物体来源试样,不仅可以使血液,还可以使用脑脊髓液(CSF)、尿、体分泌液、粪便、唾液和痰。因此,在确立了阿尔茨海默病的预防法以及优先治疗法的阶段,一般的健康诊断、综合性健康检查等中,通过对认知功能正常者也分析脑内A β 的蓄积状态,对阿尔茨海默病发病前诊断是有效的。
- [0086] 如果在对受试对象所进行的医学介入的前后应用本发明,则可以进行阿尔茨海默病的治疗药、预防药的药效评价、或其他处置的有效性评价。另外,本发明对于阿尔茨海默病患者的经过观察也是有用的。

附图说明

- [0087] 图1为示意性示出基于淀粉样前体蛋白(APP)的分解的、A β 和p3肽的生成路径的图。
- [0088] 图2为示出实施例1中、对于APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC-、NC+、MC1、AD) 中的APP672-713 (A β 1-42) 相对于内标S1L-A β 1-38的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0089] 图3的(A)和图3的(B)分别为示出对于APP672-713(A β 1-42)/SIL-A β 1-38、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的受试者工作特征(Receiver Operatorating Characteristic;ROC)曲线。

[0090] 图4的(C)和图4的(D)分别为对于APP672-713(A β 1-42)/SIL-A β 1-38、各组(AD、PiB+)相对于NC-组的ROC曲线。

[0091] 图5为示出实施例1中、各组(NC-、NC+、MC1、AD)中的APP672-709(A β 1-38)相对于APP672-713(A β 1-42)的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0092] 图6的(A)和图6的(B)分别为对于APP672-709(A β 1-38)/APP672-713(A β 1-42)、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的ROC曲线。

[0093] 图7的(C)和图7的(D)分别为对于APP672-709(A β 1-38)/APP672-713(A β 1-42)、各组(AD、PiB+)相对于NC-组的ROC曲线。

[0094] 图8为示出实施例1中、各组(NC-、NC+、MC1、AD)中的APP674-711(A β 3-40)相对于APP672-713(A β 1-42)的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0095] 图9的(A)和图9的(B)分别为对于APP674-711(A β 3-40)/APP672-713(A β 1-42)、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的ROC曲线。

[0096] 图10的(C)和图10的(D)分别为对于APP674-711(A β 3-40)/APP672-713(A β 1-42)、各组(AD、PiB+)相对于NC-组的ROC曲线。

[0097] 图11为示出实施例1中、各组(NC-、NC+、MC1、AD)中的APP672-710(A β 1-39)相对于APP672-713(A β 1-42)的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0098] 图12的(A)和图12的(B)分别为对于APP672-710(A β 1-39)/APP672-713(A β 1-42)、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的ROC曲线。

[0099] 图13的(C)和图13的(D)分别为对于APP672-710(A β 1-39)/APP672-713(A β 1-42)、各组(AD、PiB+)相对于NC-组的ROC曲线。

[0100] 图14为示出实施例1中、各组(NC-、NC+、MC1、AD)中的APP672-711(A β 1-40)相对于APP672-713(A β 1-42)的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0101] 图15的(A)和图15的(B)分别为对于APP672-711(A β 1-40)/APP672-713(A β 1-42)、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的ROC曲线。

[0102] 图16的(C)和图16的(D)分别为对于APP672-711(A β 1-40)/APP672-713(A β 1-42)、各组(AD、PiB+)相对于NC-组的ROC曲线。

[0103] 图17为示出实施例1中、各组(NC-、NC+、MC1、AD)中的OxAPP672-711(OxA β 1-40)相对于APP672-713(A β 1-42)的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0104] 图18的(A)和图18的(B)分别为对于OxAPP672-711(OxA β 1-40)/APP672-713(A β 1-42)、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的ROC曲线。

[0105] 图19的(C)和图19的(D)分别为对于OxAPP672-711(OxA β 1-40)/APP672-713(A β 1-42)、各组(AD、PiB+)相对于NC-组的ROC曲线。

[0106] 图20为示出实施例1中、各组(NC-、NC+、MC1、AD)中的APP669-711相对于APP672-713(A β 1-42)的强度比(Intensity ratio)的箱须图。

[0107] 图21的(A)和图21的(B)分别为对于APP669-711/APP672-713(A β 1-42)、各组(NC+、MC1)相对于NC-组的ROC曲线。

[0108] 图22的(C)和图22的(D)分别为对于APP669-711/APP672-713 (A β 1-42)、各组 (AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0109] 图23为实施例1中全部62个病例中的脑皮质区域的PiB累积平均值 (mcSUVR: mean cortical Standard Uptake Value Ratio) 与APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 的散点图。将概率椭圆 ($p=0.95$) 用曲线表示。

具体实施方式

[0110] [1. 受试对象]

[0111] 本发明中, 受试对象包括人、和除了人以外的哺乳动物 (大鼠、狗、猫等)。以下, 对于人的情况进行主要说明, 但除了人以外的哺乳动物的情况也是同样的。

[0112] 本发明的方法中, 无论迄今为止的病历如何, 包括被认为是正常人的人, 任何人都可以作为受试者。被认为是正常人的人的情况下, 一般的健康诊断、综合性健康检查等中, 优选通过血液检查可以判断脑内A β 的蓄积状态, 对阿尔茨海默病的早期发现/诊断是特别有效的。另外, 通过用于考察临床症状的ADAS-cog、MMSE、DemTect、SKT、或画钟试验那样的认知功能检查、核磁共振图像诊断 (MRI)、正电子发射断层成像法 (PET) 等的图像所见的确认等, 怀疑有阿尔茨海默病候选的受试者的情况下, 通过本发明的方法, 可以作为阿尔茨海默病诊断的辅助。

[0113] [2. 生物体来源试样]

[0114] 本发明的标记物可以在受试者的生物体来源试样中进行检测和分析。因此, 本发明的方法中, 分析受试者的生物体来源试样中的标记物的水平。

[0115] 生物体来源试样可以从血液、脑脊髓液 (CSF)、尿、体分泌液、唾液、和痰等体液; 和粪便中选择。其中, 一般的健康诊断、综合性健康检查等中的阿尔茨海默病的诊断和发病前诊断中, 优选血液。

[0116] 血液试样是可以直接供至标记物水平的测定工序的试样, 包括全血、血浆和血清等。血液试样可以通过对从受试对象采集的全血进行适当处理来调制。作为从所采集的全血进行血液试样的调制时所进行的处理, 没有特别限定, 可以进行临床医学上允许的任意处理。例如可以进行离心分离等。另外, 供至测定工序的血液试样在该调制工序的中途阶段或调制工序的后阶段, 适当进行冷冻等低温下的保存。需要说明的是, 本发明中血液试样等生物体来源试样不返回至原来的受试者而被废弃。

[0117] [3. 标记物]

[0118] 本发明的标记物由生物体来源试样中的APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 与选自由APP669-711 (序列号7)、APP672-709 (A β 1-38) (序列号1)、APP674-711 (A β 3-40) (序列号2)、APP672-710 (A β 1-39) (序列号3)、APP672-711 (A β 1-40) (序列号4)、和OxAPP672-711 (Ox A β 1-40) (序列号5) 组成的组中的至少一者的组合构成。这些标记物在来自于脑内的A β 蓄积为阴性的认知功能正常者的血浆试样中的水平与来自于脑内的A β 过剩地蓄积的受试者的血浆试样中的水平之间确认到显著的差异。

[0119] APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) :

[0120] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

[0121] APP669-711 (序列号7) :

[0122] VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

[0123] APP672-709 (A β 1-38) (序列号1) :

[0124] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG

[0125] APP674-711 (A β 3-40) (序列号2) :

[0126] EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

[0127] APP672-710 (A β 1-39) (序列号3) :

[0128] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV

[0129] APP672-711 (A β 1-40) (序列号4) :

[0130] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

[0131] OxAPP672-711 (Ox A β 1-40) (序列号5) :

[0132] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (Met 706被氧化)

[0133] 淀粉样前体蛋白 (APP) 是单次跨膜蛋白且由770个残基的氨基酸构成的。淀粉样前体蛋白 (APP) 通过 β 分泌酶和 γ 分泌酶接受蛋白质分解,通过蛋白质分解而产生淀粉样蛋白 $\cdot\beta$ 肽 (A β)。APP672-713和A β 1-42表示相同的肽 (序列号6)。另外,APP672-711和A β 1-40表示相同的肽 (序列号4)。

[0134] 将APP衍生型肽的氨基酸序列示于表1,将其理论平均质量示于表2。以这些肽作为对象进行用于判断脑内的A β 蓄积状态的标记物的分析。

[0135] [表1]

序 列 号	APP衍生型肽	序列	
		VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	669 713
[0136]	1 APP672-709(A β 1-38)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	
	2 APP674-711(A β 3-40)	EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
	3 APP672-710(A β 1-39)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV	
	4 APP672-711(A β 1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
	5 OxAPP672-711 (Ox A β 1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
	6 APP672-713(A β 1-42)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	
	7 APP669-711	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	

[0137] [表2]

	序 列 号	理论 平均 质量
	1	4132.6
[0138]	2	4144.7
	3	4231.8
	4	4330.9
	5	4346.9
	6	4515.1
	7	4689.4

[0139] 表1~2中,

[0140] APP-derived peptides:APP衍生型肽

[0141] Theoretical average mass:理论平均质量

[0142] 表1~2中,序列号17的OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 表示序列号16的APP672-711 (A β 1-40) 在Met 706被氧化而得到的肽。

[0143] 阿尔茨海默病中,存在有家族性阿尔茨海默病。本发明的标记物可以引起一般已知的家族性阿尔茨海默病的氨基酸序列突变。

[0144] 家族性阿尔茨海默病中,例如已知有如下的突变序列。

[0145] Swedish突变:APP670~671的氨基酸KM突变为NL

[0146] Italian突变:APP673的氨基酸A突变为V

[0147] Leuven突变:APP682的氨基酸E突变为K

[0148] Icelandic突变:APP673的氨基酸A突变为T

[0149] British突变:APP677的氨基酸H突变为R

[0150] Tottori突变:APP678的氨基酸D突变为N

[0151] Italian突变:APP673的氨基酸A突变为V

[0152] Arctic突变:APP693的氨基酸E突变为G

[0153] Iowa突变:APP694的氨基酸D突变为N

[0154] Dutch突变:APP693的氨基酸E突变为Q

[0155] [4. 标记物的分析]

[0156] 本说明书中,从阿尔茨海默病的进行程度的观点,如下进行分类。

[0157] NC-:脑内A β 的蓄积为阴性、且未表现出认知功能障碍的人

[0158] NC+:脑内A β 的蓄积为阳性、但未表现出认知功能障碍的人

[0159] MC1:脑内A β 的蓄积为阳性、且表现出轻度认知功能障碍的人

- [0160] AD:脑内A β 的蓄积为阳性、且表现出认知功能障碍的人
- [0161] PiB+:合并了NC+与MC1与AD的组的组
- [0162] 无论认知功能障碍的有无,均判定为脑内A β 的蓄积为阳性的人
- [0163] 通常,关于脑内A β 的蓄积状态的判断,以PiB-PET图像为基础通过大脑皮质与白质的PiB累积量的比较来进行判定。
- [0164] 本发明的标记物的分析方法包括如下工序:
- [0165] 测定工序,将来自于受试对象的生物体来源试样供至包含APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 和选自由APP669-711 (序列号7)、APP672-709 (A β 1-38) (序列号1)、APP674-711 (A β 3-40) (序列号2)、APP672-710 (A β 1-39) (序列号3)、APP672-711 (A β 1-40) (序列号4)、和OxAPP672-711 (OxA β 1-40) (序列号5) 组成的组中的至少一者的标记物的检测,得到前述生物体来源试样中的、APP672-713 (A β 1-42) 与选自由APP669-711、APP672-709 (A β 1-38)、APP674-711 (A β 3-40)、APP672-710 (A β 1-39)、APP672-711 (A β 1-40)、和OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 组成的组中的至少一者的各测定水平;
- [0166] 算出工序,求出选自由APP669-711水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0167] APP669-711/APP672-713 (A β 1-42);
- [0168] APP672-709 (A β 1-38) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0169] APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42);
- [0170] APP674-711 (A β 3-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0171] APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42);
- [0172] APP672-710 (A β 1-39) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0173] APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42);
- [0174] APP672-711 (A β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0175] APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42); 和
- [0176] OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 水平相对于APP672-713 (A β 1-42) 水平的比:
- [0177] OxAPP672-711 (OxA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)
- [0178] 组成的组中的至少一者的比;以及,
- [0179] 评价工序,以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的前述各比作为基准水平,对于受试对象的前述各比高于前述各比的基准水平的情况下,判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。由此,可以判断脑内的A β 蓄积状态、或作为判断的辅助。
- [0180] 另外,本发明的标记物的分析方法包括如下工序:
- [0181] 测定工序,将来自于受试对象的血液试样供至包含APP672-713 (A β 1-42) (序列号6) 的标记物的检测,得到前述血液试样中的APP672-713 (A β 1-42) 的测定水平;和,
- [0182] 评价工序,以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的APP672-713 (A β 1-42) 的水平作为基准水平,对于受试对象的前述APP672-713 (A β 1-42) 的测定水平低于前述基准水平的情况下,判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。
- [0183] 由此,可以判断脑内的A β 蓄积状态、或作为判断的辅助。
- [0184] 标记物的水平基本上是指浓度,也可以为本领域技术人员依据浓度而使用的其他

单位、例如质谱中的检测离子强度。本发明的生物体来源试样中的标记物的浓度分析通过测定值与基准值的比较来进行。为了更准确的分析,比较的测定值与基准值优选为基于在相同条件(前处理条件、保存条件等)下准备的生物体来源试样的值。作为前述标记物的基准水平,可以使用对于脑内的A β 蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的测定值。或者,作为前述标记物的基准水平,也可以使用对于脑内的A β 蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的确立了的浓度基准值。

[0185] 标记物的测定优选通过基于生物体分子特异性亲和性的检查来进行。基于生物体分子特异的亲和性的检查为对于本领域技术人员来说熟知的方法,没有特别限定,优选免疫分析。具体而言,包括:免疫印迹、放射免疫分析、ELISA(酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay))(包括夹心免疫法、竞争法和直接吸附法)、免疫沉降法、沉降反应、免疫扩散法、免疫聚集测定、补体结合反应分析、免疫放射定量法、荧光免疫分析、蛋白A免疫分析等包含竞争和非竞争分析体系的免疫分析。免疫分析中,检测生物体来源试样中的与上述标记物结合的抗体。

[0186] 本发明中,也可以利用使用具有能够识别来自于淀粉样前体蛋白(APP)的肽的抗原结合部位的免疫球蛋白、以及包含能够识别来自于淀粉样前体蛋白(APP)的肽的抗原结合部位的免疫球蛋白片段制作的抗体固定化载体来进行标记物的测定。通过使用前述抗体固定化载体的免疫沉降法,可以利用质谱装置进行试样中肽的检测(Immunoprecipitation-Mass Spectrometry;IP-MS)。

[0187] 如实施例的项所示那样,将来自于受试对象的血液试样供至包含APP672-713(A β 1-42)(序列号6)的标记物的检测,得到前述血液试样中的APP672-713(A β 1-42)的测定水平,对于受试对象的前述APP672-713(A β 1-42)的测定水平,以脑内A β 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的APP672-713(A β 1-42)的水平作为基准水平,低于前述基准水平的情况下,可以判断为受试对象脑内A β 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内A β 的蓄积量。

[0188] 实施例

[0189] 以下示出实施例,对本发明进行具体说明,但本发明不受这些实施例的限制。以下中,%所示的者的量只要没有特别说明,在该者为受试者的情况下以重量基准表示,为液体的情况下以体积基准表示。

[0190] [实验例1]

[0191] (1) 使用临床样品的、基于本发明标记物的阿尔茨海默病诊断的性能评价

[0192] 国立长寿医疗研究中心中,准备分类为NC-、NC+、MC1、AD的组的病例的血浆样品。

[0193] NC-:脑内A β 的蓄积为阴性、且未表现出认知功能障碍的人

[0194] NC+:脑内A β 的蓄积为阳性、但未表现出认知功能障碍的人

[0195] MC1:脑内A β 的蓄积为阳性、且表现出轻度认知功能障碍的人

[0196] AD:脑内A β 的蓄积为阳性、且表现出认知功能障碍的人

[0197] PiB+:合并了NC+与MC1与AD的组的组

[0198] 无论认知功能障碍的有无,均判定脑内的A β 为阳性的人

[0199] 为了对于脑内A β 的蓄积的阳性和阴性进行判断,获取受试者的脑的PiB-PET图像。大脑皮质的PiB累积量大于非特异性的白质的PiB累积量、或者为等等的受试者判定为阳性。仅利用向白质的非特异性的累积,皮质中基本没有累积的受试者判定为阴性。认知功能

障碍依据2011年发表的NIA-AA诊断基准进行判断。

[0200] 将各组的特征和病例数示于表3。

[0201] [表3]

[0202] 临床样品的概要

	组	n	PIB-PET	痴呆症
	NC-	22	-	-
[0203]	NC+	11	+	-
	MCI	12	+	+
	AD	17	+	++

[0204] 考虑用于阿尔茨海默病的早期诊断时,认为,与NC-组相比,由虽然未表现出认知功能障碍但是判断为脑内的A β 蓄积为阳性的NC+组可见测定水平变动的血中标记物对诊断是有效的。即,发现具有能够判断脑内的A β 蓄积的阳性和阴性的诊断性能的血中标记物变得重要。从该观点出发,关于标记物分析,将与NC-组相比,在与其他组之间是否有测定水平差作为评价基准。

[0205] (2) 抗体固定化珠的制作

[0206] 将以A β 的第3-8残基作为表位的抗A β 抗体(6E10:Covance) 250 μ g通过无花果蛋白酶琼脂糖珠(Ficin agarose beads) (Thermo) 1250 μ L (33%悬浮液) 消化,将以A β 的第18-22残基作为表位的抗A β 抗体(4G8:Covance) 100 μ g通过赖氨酰肽链内切酶(LysC) 500ng消化,将各自的消化物利用排阻色谱进行分离・分取。将经过分级的样品通过还原和非还原SDS-PAGE确认,将相当于F(ab')₂的部分汇集。将该6E10和4G8的F(ab')₂级分分别用30mM的浓度的半胱胺(cysteamine)还原,从而得到F(ab')。接着,准备氨基磁珠(Dynabeads M-270 Amine:Invitrogen) 5 μ L(珠量150 μ g),使SM(PEG)₂₄的NHS基与和其表面结合的氨基在室温下反应30分钟,从而使PEG与珠共价键合。使同时各加入了6E10F(ab')和4G8F(ab') 0.25 μ g的物质与和磁珠结合的SM(PEG)₂₄在室温下反应2小时,使马来酰亚胺基与巯基共价键合。最后,使0.4mM L-半胱氨酸在室温下反应30分钟,从而进行马来酰亚胺基的封闭。制作好的抗体固定化珠在4℃下保存直至使用。

[0207] (3) 内标肽的准备

[0208] 作为内标肽,使用AnaSpec(San Jose,CA,USA)的稳定同位素标记的A β 1-38(称为S1L-A β 1-38)。S1L-A β 1-38的Phe和Ile的碳原子被¹³C置换。将S1L-A β 1-38的干燥品用50mM NaOH溶解后,利用设有COSMOS1L(R) 5Diol-120-11[7.5mm I.D.x 600mm]柱(column)(Nacalai Tesque,Kyoto)的Prominence HPLC System(Shimadzu Corp,Kyoto,Japan)进行排阻色谱(SEC)。在流动相:40mM Tris-HCl、pH8.0、流速:1mL/min、柱温:25℃、检测波长:214/280nm的设定下进行。经过分取的级分的一部分在非还原状态下供至15-20%Tricine-SDS-PAGE,利用Silver Staining kit(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)将谱带染色。将确认为单体的部分用包含1mg/mL牛血清白蛋白(bovineserum albumin)的40mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH8.0稀释后,进行分别注入,在-80℃下保存。取出一部分,使用人淀粉样蛋白(Human Amyloid) β (1-38)(FL) Assay Kit(Immuno-Biological Laboratories;Gunma, Japan)测定S1L-A β 1-38的浓度。

[0209] (4) 血浆中A β 和A β 样肽的测定

[0210] 对于全部62个病例,使用抗体固定化珠,作为内标肽使用SIL-AB1-38,进行1P-MS。

[0211] 免疫沉降法如下实施。

[0212] 在人血浆250 μ L中混合包含10pM SIL-AB1-38的结合缓冲液(0.2% (w/v) 正十二烷基- β -D-麦芽糖苷(n-Dodecyl- β -D-maltoside) (DDM)、0.2% (w/v) 正壬基- β -D-硫代麦芽糖苷(n-Nonyl- β -D-thiomaltoside) (NTM)、800mM GlcNAc、100mM Tris-HCl、300mM NaCl、pH7.4) 250 μ L。该血浆样品中所含的沉淀物使用Ultrafree-MC、DV 0.65 μ m、离心过滤装置(centrifugal filter devices)进行离心除去。将蛋白G+琼脂糖(Protein G Plus Agarose) (50%悬浮液(slurry);Pierce, Rockford, IL) 500 μ L用H₂O 400 μ L清洗1次后,用清洗缓冲液(0.1% (w/v) DDM, 0.1% (w/v) NTM, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.4) 400 μ L清洗3次。使该Protein G Plus Agarose与原先的血浆样品混合,在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。从血浆样品除去Protein G Plus Agarose后,用OTG-甘氨酸(glycine)缓冲液(1% 正辛基- β -D-硫代葡萄糖苷(n-Octyl- β -D-thioglucoside) (OTG), 50mM glycine, pH2.8) 清洗2次,用清洗缓冲液100 μ L清洗3次,使所得抗体固定化珠150 μ g与血浆样品混合,在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时,从而捕捉A β 和A β 样肽。之后,用清洗缓冲液500 μ L清洗1次,用100 μ L清洗4次后,用50mM乙酸铵20 μ L清洗2次。进而,用H₂O 20 μ L清洗1次后,用包含5mM盐酸的70%乙腈2.5 μ L,使被抗体固定化珠捕捉的A β 和A β 样肽溶出。将溶出液各0.5 μ L滴加至 μ Focus MALDI plateTM 900 μ m上的4孔。将0.5 μ L的基质溶液(0.5mg/mL CHCA, 0.2% (w/v) MDPNA)混合后,用Linear TOF MS进行测定。

[0213] 血浆中A β 和A β 样肽的测定值使用的是,将由利用Linear TOF测定的4孔得到的各A β 和A β 样肽相对于内标肽(SIL-AB1-38)的峰强度比进行平均化而得到的值。为了校正MS峰强度的信号变动,设置如下的基准。由1次的免疫沉降获取4个质谱,结果,对于1个肽可以得到4个峰强度比。脱离某个肽中的4个峰强度比的中央值的0.7~1.3倍之间的峰强度比视为脱离值,不用于平均化的数据处理。某个肽的平均化中使用的峰强度比的数据数最大为4个,未达到检测限的情况下(S/N<3)或出现脱离值的情况下,数据数减少。如果平均化中使用的峰强度比的数据数小于3个的情况下,此时的免疫沉降中,该峰的强度比定义为无法检测(N/D)。

[0214] 图2为示出对于APP672-713 (AB1-42)、各组中的APP672-713 (AB1-42) 相对于内标SIL-AB1-38的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图3的(A)、图3的(B)、图4的(C)和图4的(D)分别为对于APP672-713 (AB1-42)/SIL-AB1-38、各组(NC+、MC1、AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0215] 箱须图中,各组中,箱所示的范围表示全部样品中浓度顺序为25~75%中的样品的强度比分布范围(四分位数范围),箱的上下所示的横线表示处于从箱的上端和下端至四分位数范围的1.5倍的范围内的样品的各自最大值和最小值,箱中的横棒表示强度比的中央值。

[0216] 与NC-组相比,在与其他组之间,使用Dunnett's检验来检验是否有统计学的显著性差异,显示出P<0.05时,设有有显著性差异。设定检测限以下=0。其结果,60%以上的病例中检测到的A β 和A β 样肽有9种,其中,APP672-713 (AB1-42) 中,与NC-相比,NC+、MC1和AD中有统计学的显著性差异(图2)。为了评价APP672-713 (AB1-42) 的诊断性能,制成NC+、MC1、AD和PiB+组相对于NC-组的ROC曲线。ROC曲线以下的面积(AUC)为NC-vs NC+=0.789、NC-vs MC1=0.746、NC-vs AD=0.864、NC-vs PiB+=0.808,显示出较高的值(图3的(A)、图3的

(B)、图4的(C)和图4的(D))。

[0217] 如图2所示那样,对于APP672-713 (A β 1-42),强度比APP672-713 (A β 1-42) /SIL-A β 1-38与NC-相比,NC+、MCI和AD中具有统计学的显著性差异,可见减少。如图3的(A)、图3的(B)、图4的(C)和图4的(D)所示那样,AUC为NC-vs NC+=0.789、NC-vs MCI=0.746、NC-vs AD=0.864,因此,示出APP672-713 (A β 1-42) 能够判断NC-与NC+、NC-与MCI、和NC-与AD的能力较高。另外,NC-vs PiB+=0.808,因此,示出能够检测脑内的A β 蓄积为阳性的受试者的性能较高。由此,暗示了APP672-713 (A β 1-42) 为能够推测脑内A β 的蓄积状态的血中标记物,这样,有能够用作阿尔茨海默病诊断的辅助的可能性。

[0218] (5) 更详细的分析

[0219] 与NC-相比,为了可见与各组(NC+、MCI、AD)之间的更明确的差异,进一步进行以下的研究。

[0220] 图5为示出各组中的APP672-709 (A β 1-38) 相对于APP672-713 (A β 1-42) 的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图6的(A)、图6的(B)、图7的(C)和图7的(D)为对于APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0221] 图8为示出各组中的APP674-711 (A β 3-40) 相对于APP672-713 (A β 1-42) 的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图9的(A)、图9的(B)、图10的(C)和图10的(D)为对于APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0222] 图11为示出各组中的APP672-710 (A β 1-39) 相对于APP672-713 (A β 1-42) 的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图12的(A)、图12的(B)、图13的(C)和图13的(D)为对于APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0223] 图14为示出各组中的APP672-711 (A β 1-40) 相对于APP672-713 (A β 1-42) 的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图15的(A)、图15的(B)、图16的(C)和图16的(D)为对于APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0224] 图17为示出各组中的OxAPP672-711 (OxA β 1-40) 相对于APP672-713 (A β 1-42) 的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图18的(A)、图18的(B)、图19的(C)和图19的(D)为对于OxAPP672-711 (OxA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组ROC曲线。

[0225] 图20为示出各组中的APP669-711相对于APP672-713 (A β 1-42) 的强度比(Intensity ratio)的箱须图。图21的(A)、图21的(B)、图22的(C)和图22的(D)为对于APP669-711/APP672-713 (A β 1-42)、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组的ROC曲线。

[0226] 60%以上的病例中检测到的9种A β 和A β 样肽中,对除了APP672-713 (A β 1-42) 以外的8种的峰强度分别除以APP672-713 (A β 1-42) 的峰强度而得到的值(比率)进行比较分析。其结果,APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42)、APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42)、APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42)、APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)、OxAPP672-711 (OxA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42) 和APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 中,示出与NC-相比,NC+、MCI和AD统计学显著地增加(图5、8、11、14、17和20)。特别是,APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 示出伴随着阿尔茨海默病的进行而上升的倾向强(图

20)。

[0227] 为了评价APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42)、APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42)、APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42)、APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)、OxAPP672-711 (OxA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42) 和APP669-711 /APP672-713 (A β 1-42) 的诊断性能,制成NC+、MCI、AD和PiB+组相对于NC-组的ROC曲线。其结果,这些6种的比率全部中,示出高的AUC,表明能够判断NC-与NC+、NC-与MCI和NC-与AD的能力、和能够检测脑内的A β 蓄积为阳性的受试者的性能高[图6的(A)、图6的(B)、图7的(C)、和图7的(D);图9的(A)、图9的(B)、图10的(C)、和图10的(D);图12的(A)、图12的(B)、图13的(C)、和图13的(D);图15的(A)、图15的(B)、图16的(C)、和图16的(D);图18的(A)、图18的(B)、图19的(C)、和图19的(D);图21的(A)、图21的(B)、图22的(C)和图22的(D)]。

[0228] 由图21的(A)、图21的(B)、图22的(C)和图22的(D)表明,这些中,特别是,APP669-711/APP672-713 (A β 1-42)的ROC曲线中,NC+、MCI、AD相对于NC-组的AUC为0.930以上,因此,能够判断NC-与NC+、NC-与MCI和NC-与AD的能力非常高。另外,NC-vs PiB+=0.969,因此表明能够检测脑内的A β 蓄积为阳性的受试者的性能非常高。由此,暗示了这些6种的比率为能够推测脑内A β 的蓄积状态的血中标记物,这样,有能够用作阿尔茨海默病诊断的辅助的可能性。

[0229] 接着,与NC-相比,对于NC+、MCI、AD示出统计学显著地增加的APP672-709 (A β 1-38) /APP672-713 (A β 1-42)、APP674-711 (A β 3-40) /APP672-713 (A β 1-42)、APP672-710 (A β 1-39) /APP672-713 (A β 1-42)、APP672-711 (A β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42)、OxAPP672-711 (OxA β 1-40) /APP672-713 (A β 1-42) 和APP669-711/APP672-713 (A β 1-42),通过设定截断值(Cut-off point)来进行阿尔茨海默病的判断评价。图6、7、9、10、12、13、15、16、18、19、21和22中的各自的ROC曲线中,将灵敏度-(1-特异性)示出最高的值的各肽/APP672-713 (A β 1-42) 设定为截断值。将设定好的截断值、此时的特异性、各组(NC+、MCI、AD、PiB+) 相对于NC-组的灵敏度、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)和准确度示于表4。

[0230] [表4]

诊断性能评价		灵敏度	阳性 预测值, PPV	阴性 预测值, NPV	准确度
APP672-709(Aβ1-38) / APP672-713(Aβ1-42)					
截断值 = 7.895,	特异性 = 0.682				
	NC- vs NC+	1.000	0.611	1.000	0.788
	NC- vs MCI	0.833	0.588	0.882	0.735
	NC- vs AD	0.765	0.650	0.789	0.718
	NC- vs PiB+	0.850	0.829	0.714	0.790
APP674-711(Aβ3-40) / APP672-713(Aβ1-42)					
截断值 = 1.181,	特异性 = 0.909				
	NC- vs NC+	0.900	0.818	0.952	0.906
	NC- vs MCI	0.833	0.833	0.909	0.882
	NC- vs AD	1.000	0.895	1.000	0.949
	NC- vs PiB+	0.923	0.947	0.870	0.918
APP672-710(Aβ1-39) / APP672-713(Aβ1-42)					
截断值 = 1.932,	特异性 = 0.864				
	NC- vs NC+	0.909	0.769	0.950	0.879
	NC- vs MCI	0.833	0.769	0.905	0.853
	NC- vs AD	0.941	0.842	0.950	0.897
	NC- vs PiB+	0.900	0.923	0.826	0.887
APP672-711(Aβ1-40) / APP672-713(Aβ1-42)					
截断值 = 111.7,	特异性 = 0.773				
	NC- vs NC+	0.909	0.667	0.944	0.818
	NC- vs MCI	0.750	0.643	0.850	0.765
	NC- vs AD	0.647	0.688	0.739	0.718
	NC- vs PiB+	0.750	0.857	0.630	0.758
OxAPP672-711(Ox Aβ1-40) / APP672-713(Aβ1-42)					
截断值 = 3.431,	特异性 = 0.864				
	NC- vs NC+	0.818	0.750	0.905	0.848
	NC- vs MCI	0.727	0.727	0.864	0.818
	NC- vs AD	0.824	0.824	0.864	0.846
	NC- vs PiB+	0.795	0.912	0.704	0.820
APP669-711 / APP672-713(Aβ1-42)					
截断值 = 0.914,	特异性 = 0.955				
	NC- vs NC+	0.818	0.900	0.913	0.909
	NC- vs MCI	0.917	0.917	0.955	0.941
	NC- vs AD	1.000	0.944	1.000	0.974
	NC- vs PiB+	0.925	0.974	0.875	0.935

[0232] 表4中,

[0233] Cut-off point:截断值

[0234] 阳性预测值(Positive Predictive Value,PPV) = (真阳性的数量) / (真阳性的数量+假阳性的数量)

[0235] 阴性预测值(Negative Predictive Value,NPV) = (真阴性的数量) / (真阴性的数

量+假阴性的数量)

[0236] 准确度 (Accuracy) = (真阳性的数量+真阴性的数量) / 全病例数

[0237] APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 在特异性、灵敏度、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV) 和准确度全部中显示出非常高的数值, 表明能够判断NC-与NC+、MCI、AD和PiB+的能力非常高, 特别是表明对脑内的A β 蓄积的阳性判断是有效的。另外, 能够判断NC-与NC+、MCI和AD的能力非常高, 因此, 也表明能够有效用作阿尔茨海默病诊断的辅助。关于其他5种的比率, 在特异性、灵敏度、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV)、或准确度方面示出高的值, 因此, 表明能够判断NC-与NC+、MCI、AD和PiB+的能力高, 特别是表明对脑内的A β 蓄积的阳性判断是有效的可能性。另外, 能够判断NC-与NC+、MCI和AD的能力高, 因此, 还表明作为阿尔茨海默病诊断的辅助能够有效利用的可能性。

[0238] (6) 与PiB测定值的相关分析

[0239] 脑内的A β 蓄积为阿尔茨海默病的重要的病理学指标, 已知的是, 从痴呆症外向化的以前A β 的过剩蓄积开始。PiB为与A β 聚集体特异性结合的放射性药剂, 通过用PET测定其累积, 从而可以使脑内A β 的蓄积图像化。为了调查示出能够以高的精度判断脑内的A β 蓄积为阳性的受试者的能力的血浆中的APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 是否反映脑内A β 蓄积状态, 对APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 与脑皮质区域的PiB累积平均值 (mcSUVR: mean cortical Standard Uptake Value Ratio) 的相关性进行了分析。

[0240] 图23为全部62个病例中、横轴表示PiB累积平均值 (mcSUVR)、纵轴表示APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 比率的散点图。

[0241] 对于PiB累积平均值, 对皮质的PiB累积进行定量, 以小脑作为基准求出大脑的累积比。通过皮尔逊积差相关函数 (Pearson product-moment correlation coefficient) 评价由IP-MS得到的APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 比率与由PET得到的PiB累积平均值 (mcSUVR) 的相关。其结果, 相关系数 (r) 为0.687、 $p < 0.001$ (图23)。

[0242] 表明APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 比率与PiB累积平均值 (mcSUVR) 有显著强的相关。由此表明, 血浆中的APP669-711/APP672-713 (A β 1-42) 比率反映脑内的A β 蓄积状态, 示出能够用作判断脑内A β 蓄积状态的血中标记物的可能性。

[0243] 以上例证的结果, 表明本发明的标记物作为判断脑内A β 蓄积状态的血中标记物是有用的。另外, 由此示出, 能够有效用于阿尔茨海默病诊断的辅助以及发病前诊断。

序列表

<110> 株式会社岛津制作所 (SHIMADZU CORPORATION)
 国立研究开发法人国立长寿医疗研究中心 (NATIONAL CENTER FOR GERIATRICS AND GERONTOLOGY)

<120> 评价脑内的淀粉样蛋白 β 肽蓄积状态的替代性生物标记物和其分析方法

<130> G114472W0

<150> JP 2014-106560

<151> 2014-05-22

<160> 7

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> 智人 (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

35

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 2

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val

1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu

20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val

35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 3

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
 35

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 4

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

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 6

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> 7

<211> 43

<212> PRT

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 7

Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His

1 5 10 15

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly

20 25 30

Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

35 40

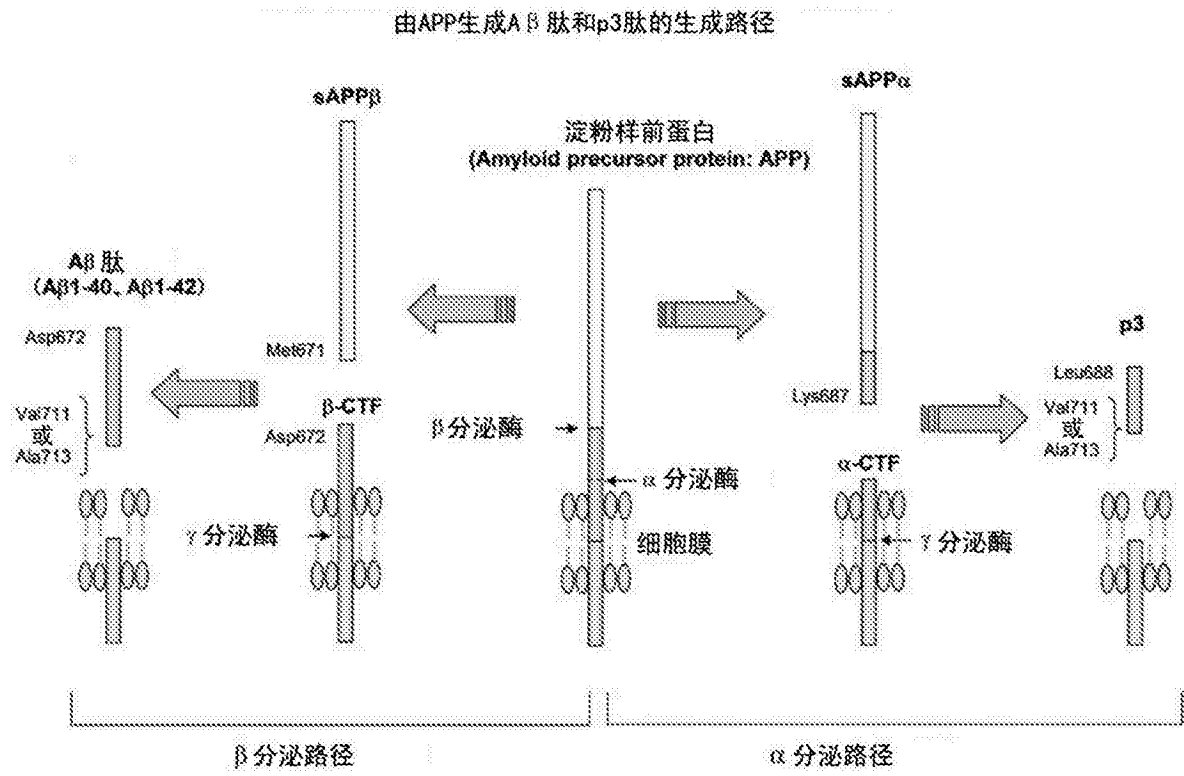


图1

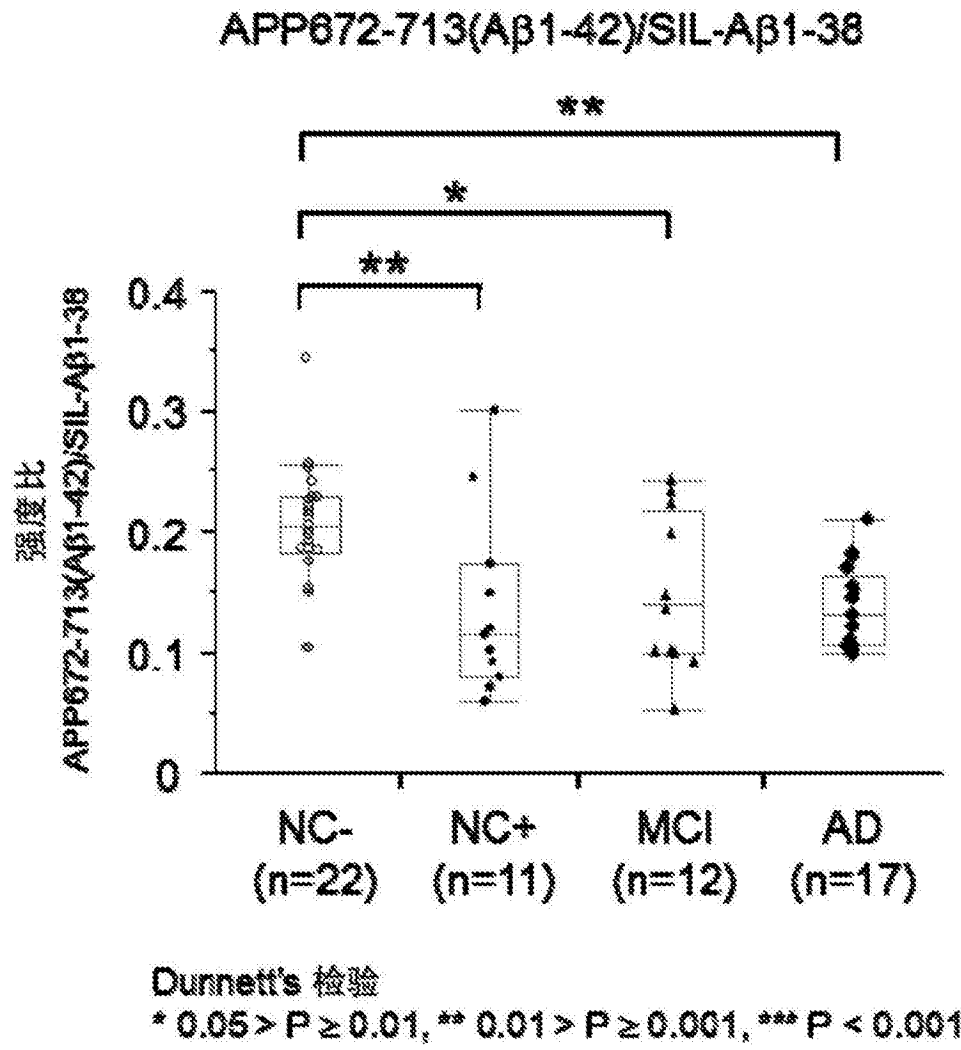
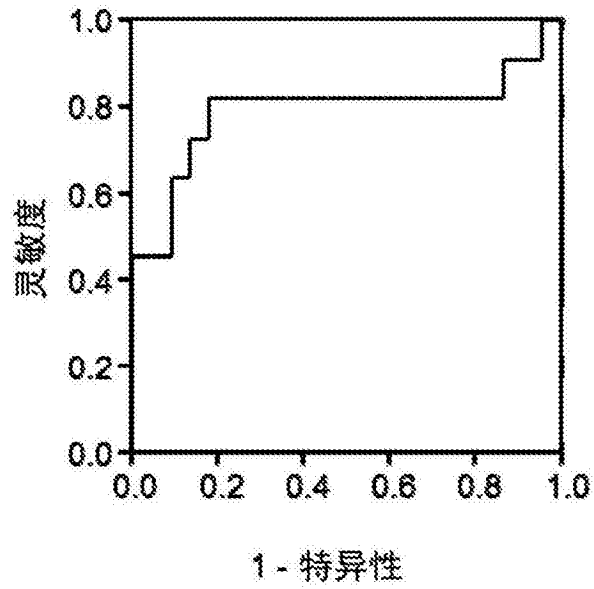
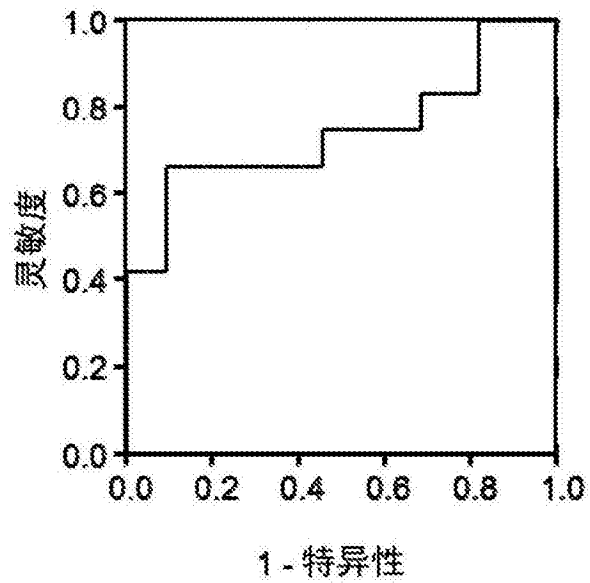


图2

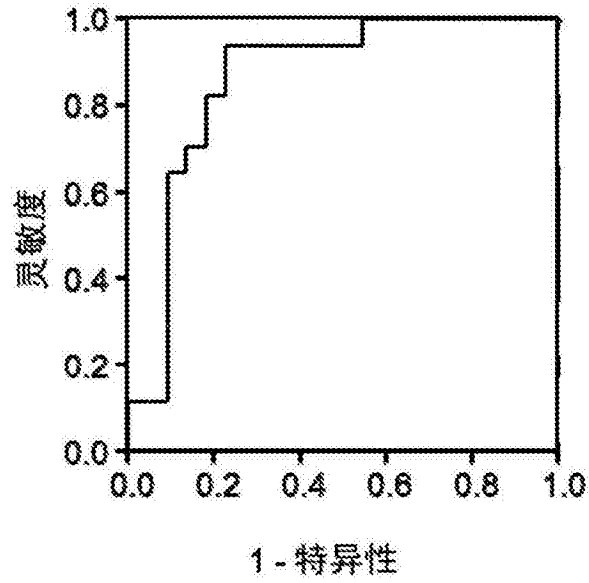
(A) APP672-713 (A β 1-42) / SIL-A β 1-38

NC- vs NC+, AUC=0.789

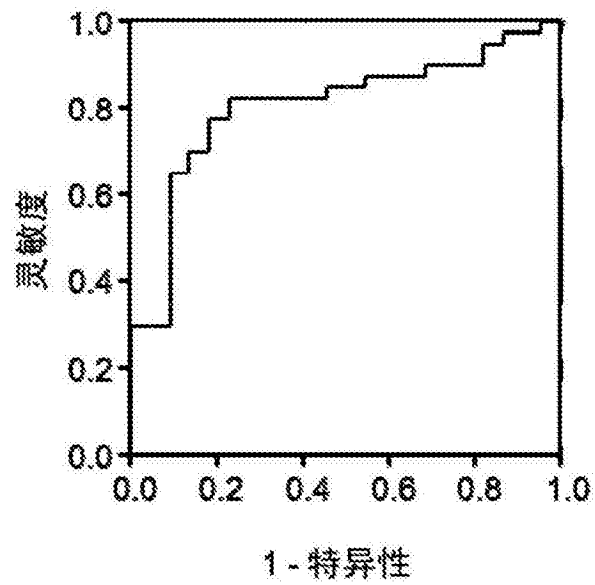
(B) APP672-713 (A β 1-42) / SIL-A β 1-38

NC- vs MCI, AUC=0.746

图3

(C) APP672-713 (A β 1-42) / SIL-A β 1-38

NC- vs AD, AUC=0.864

(D) APP672-713 (A β 1-42) / SIL-A β 1-38

NC- vs PIB+, AUC=0.808

图4

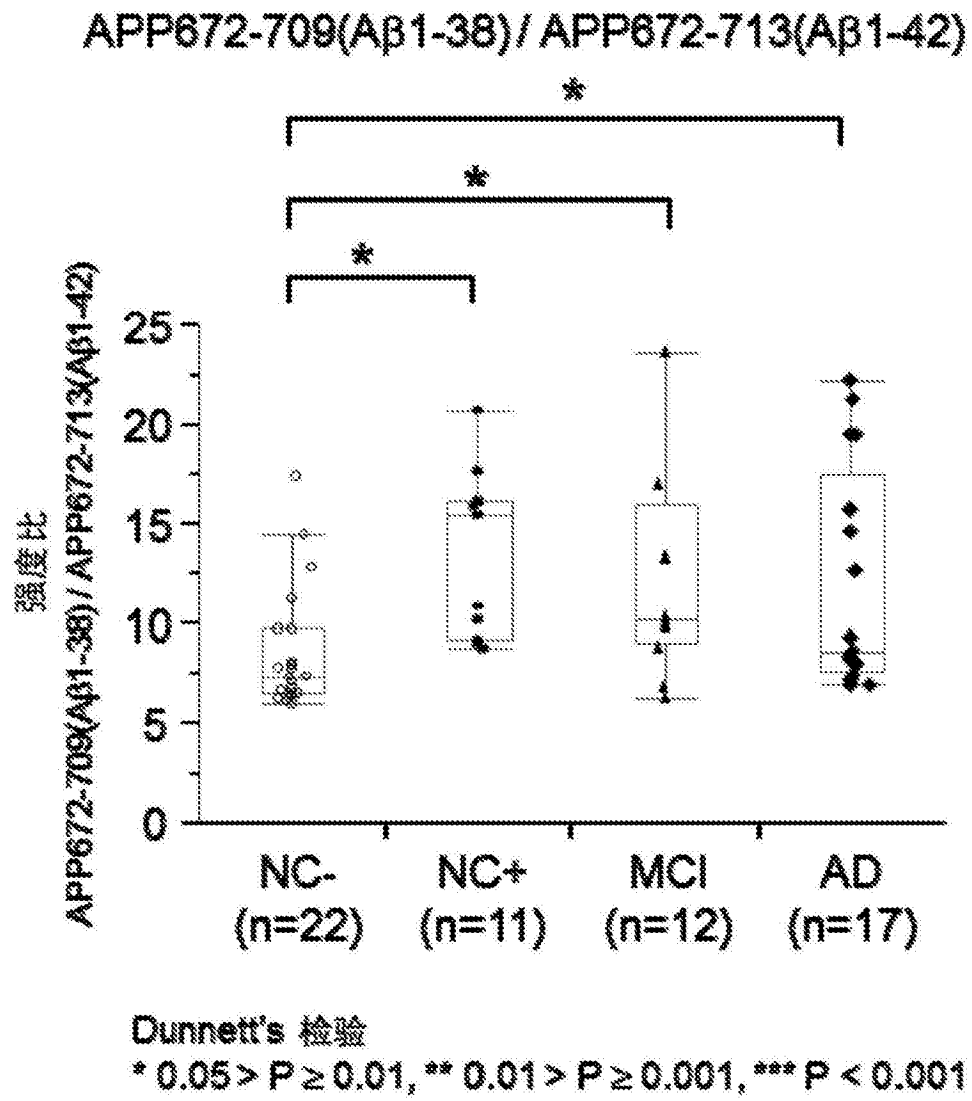
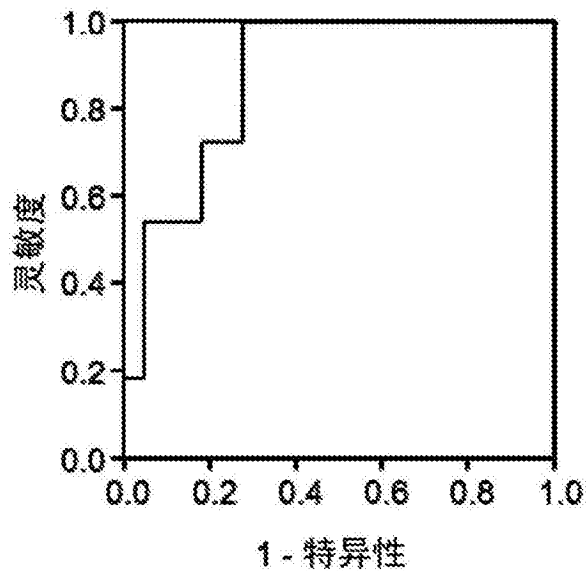
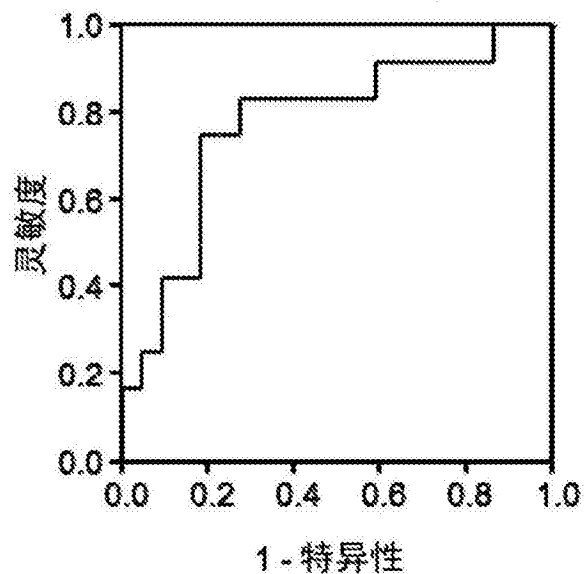


图5

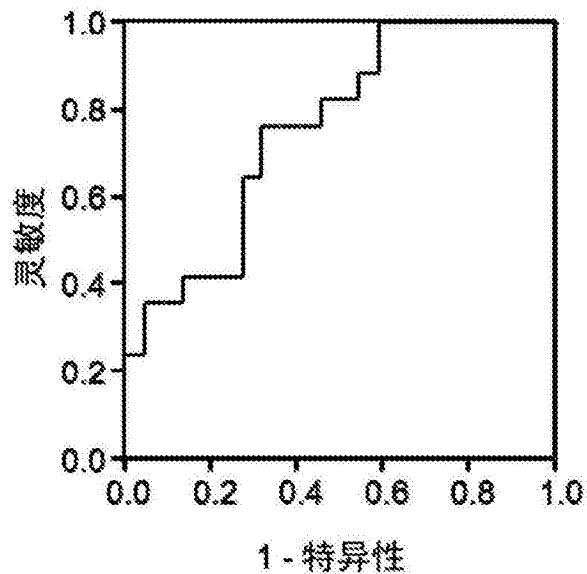
(A) APP672-709 ($A\beta$ 1-38) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs NC+, AUC=0.876

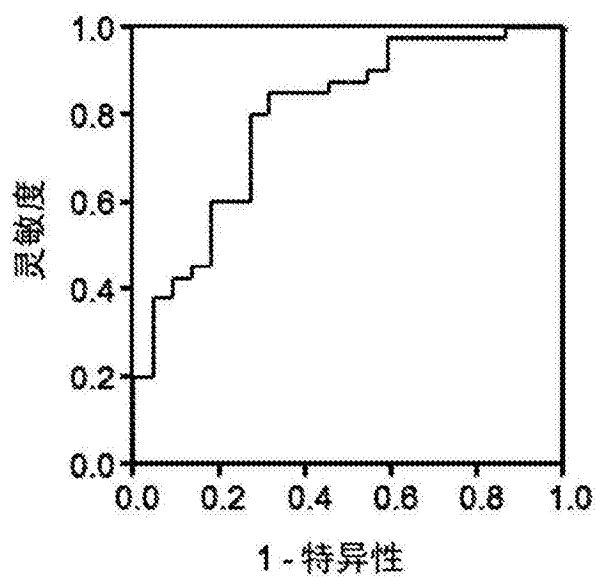
(B) APP672-709 ($A\beta$ 1-38) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs MCI, AUC=0.777

图6

(C) APP672-709 ($A\beta$ 1-38) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs AD, AUC=0.757

(D) APP672-709 ($A\beta$ 1-38) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs PIB+, AUC=0.795

图7

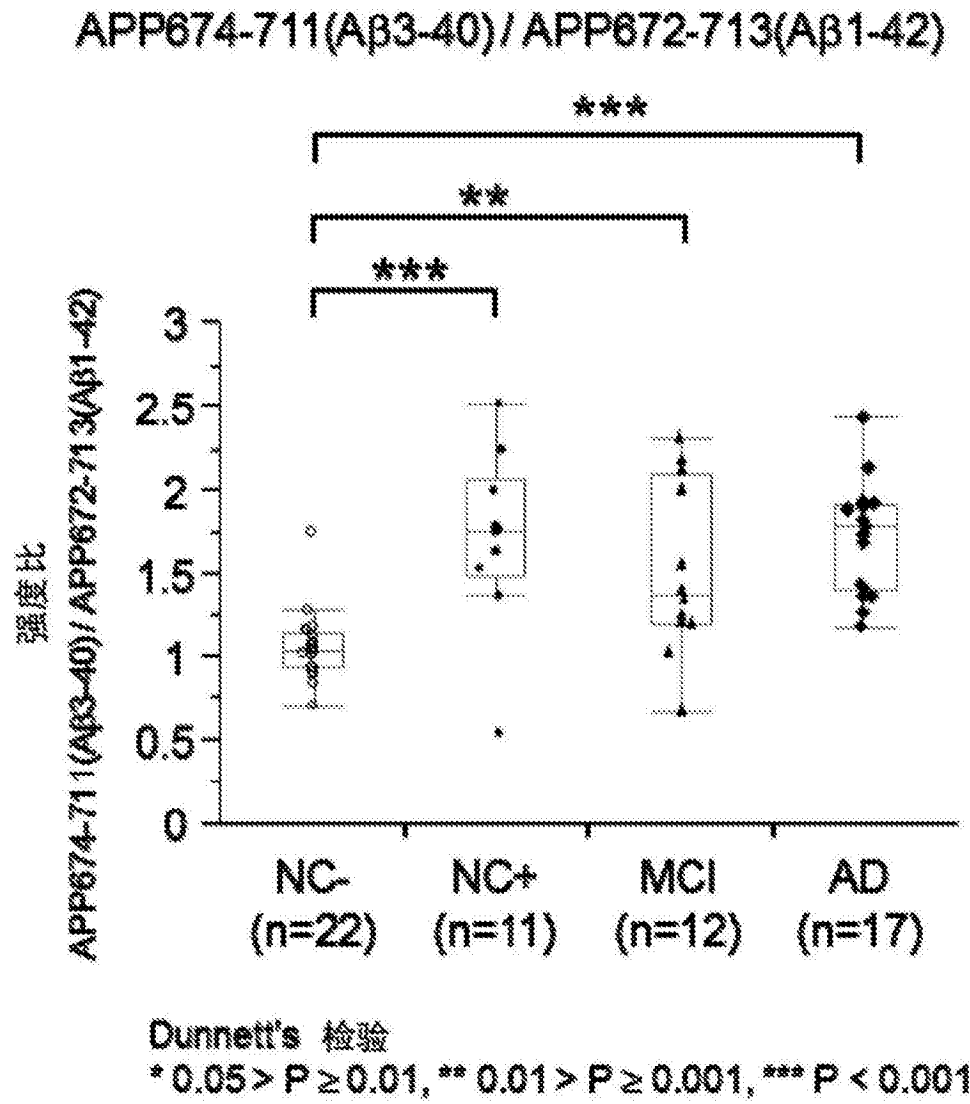
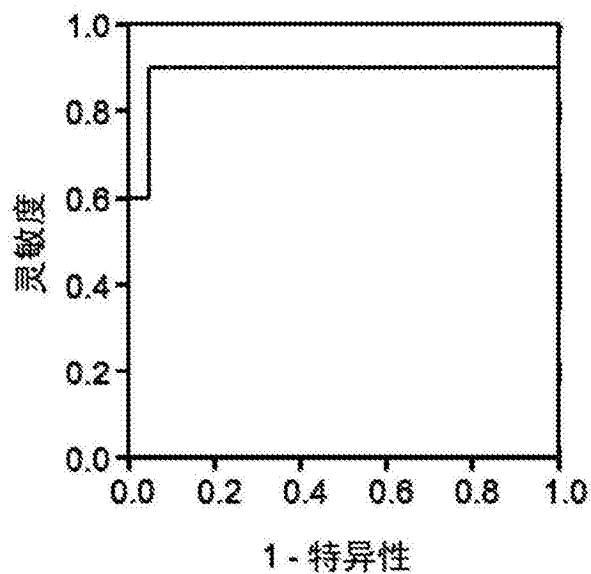
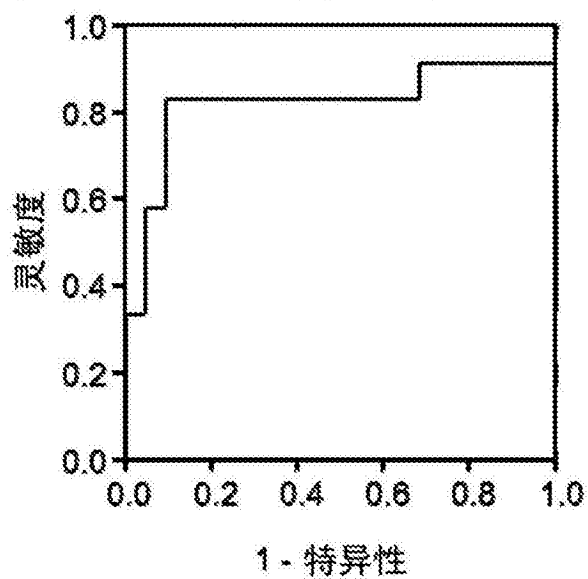


图8

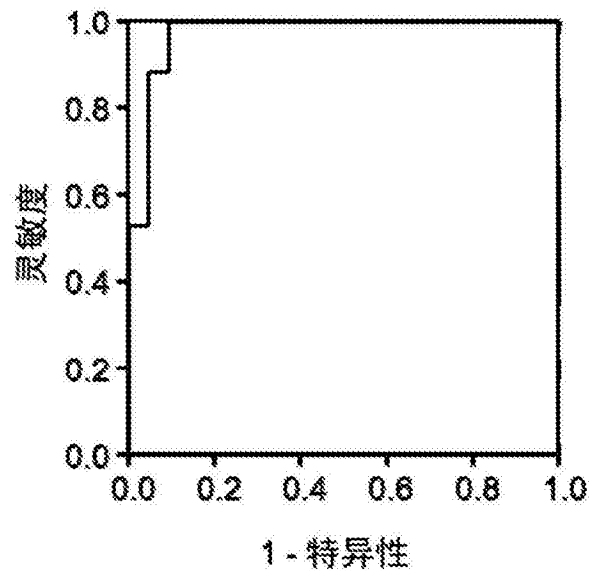
(A) APP674-711 ($A\beta$ 3-40) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs NC+, AUC=0.886

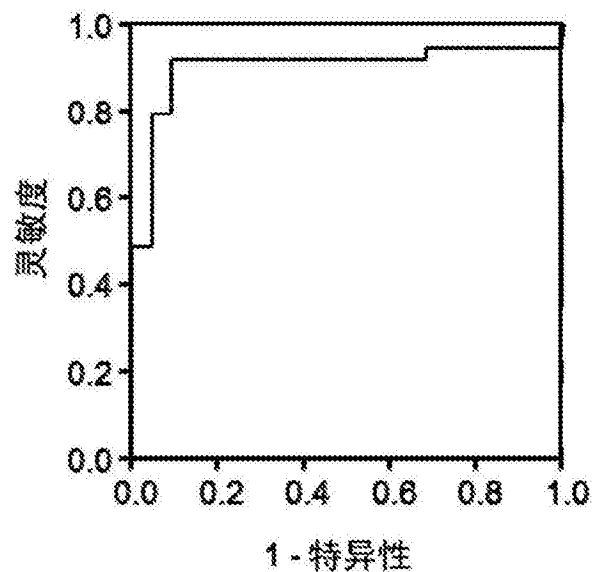
(B) APP674-711 ($A\beta$ 3-40) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs MCI, AUC=0.826

图9

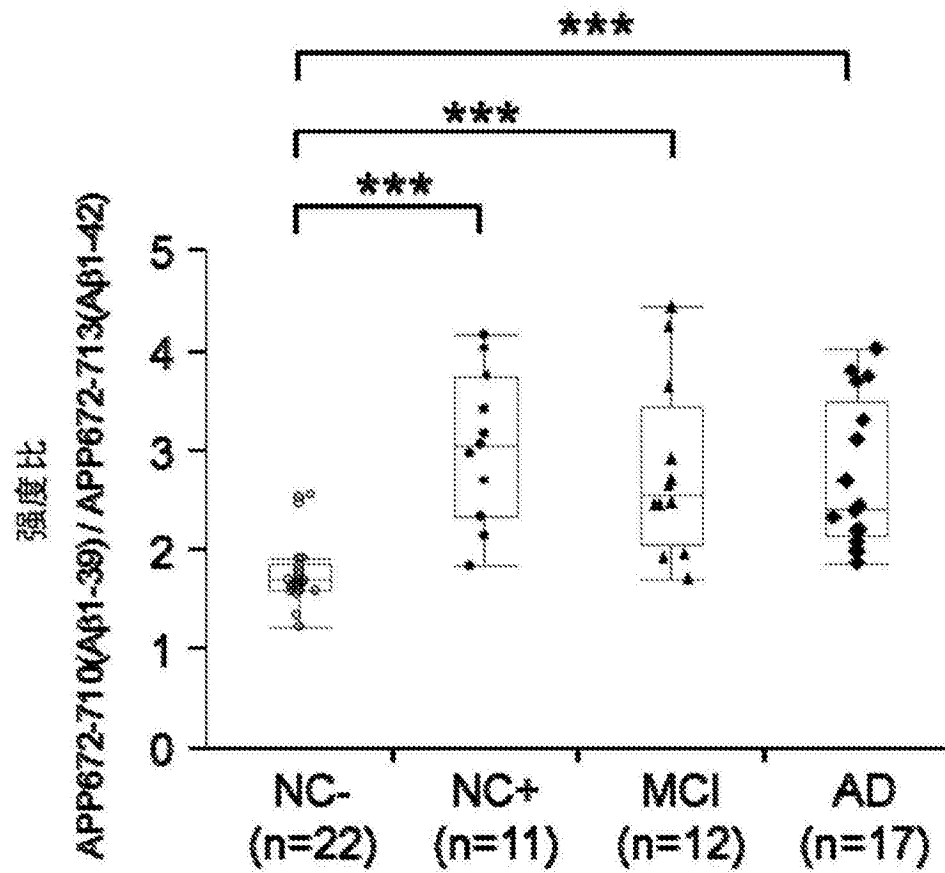
(C) APP674-711 ($A\beta_{3-40}$) / APP672-713 ($A\beta_{1-42}$)

NC- vs AD, AUC=0.973

(D) APP674-711 ($A\beta_{3-40}$) / APP672-713 ($A\beta_{1-42}$)

NC- vs PIB+, AUC=0.906

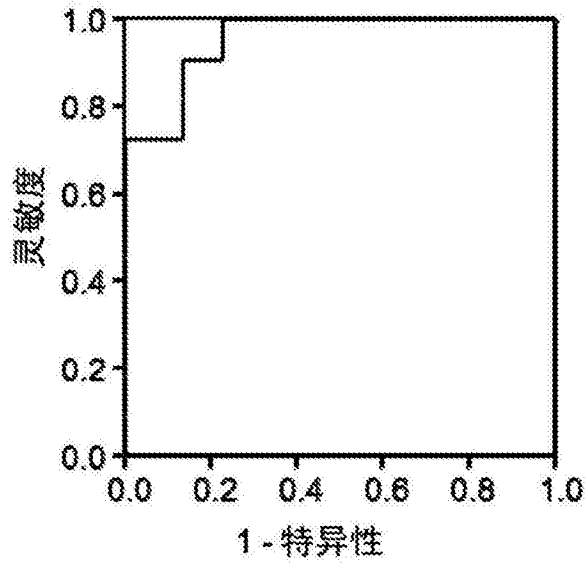
图10

APP672-710(A β 1-39)/APP672-713(A β 1-42)

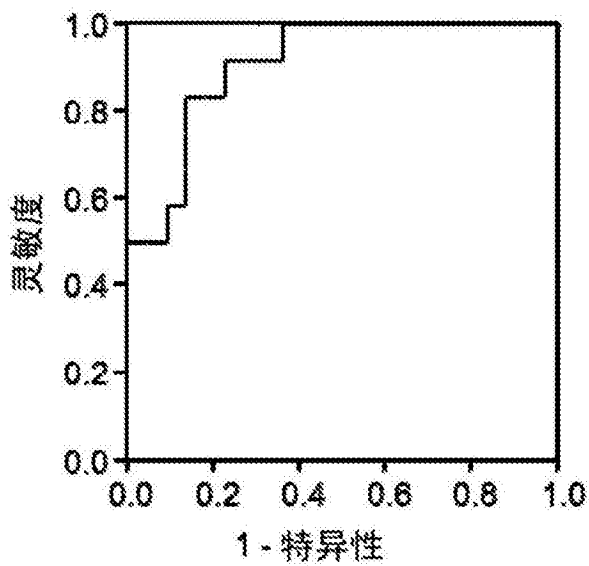
Dunnett's 检验

* $0.05 > P \geq 0.01$, ** $0.01 > P \geq 0.001$, *** $P < 0.001$

图11

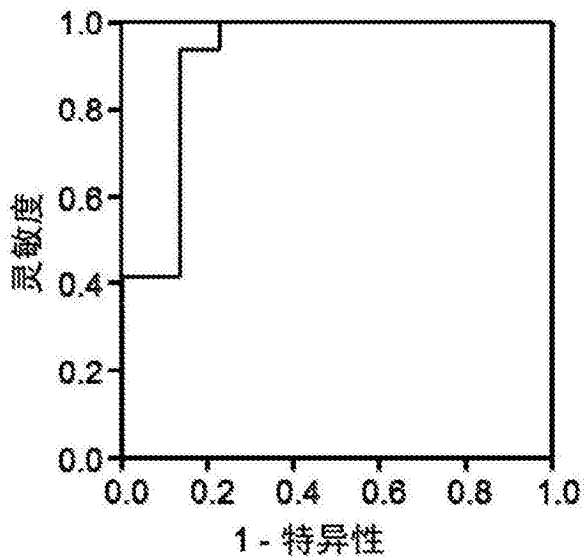
(A) APP672-710 ($A\beta$ 1-39) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs NC+, AUC=0.955

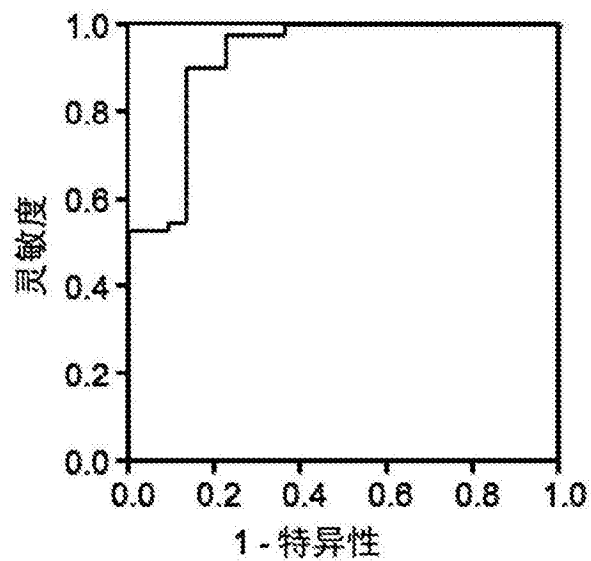
(B) APP672-710 ($A\beta$ 1-39) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs MCI, AUC=0.909

图12

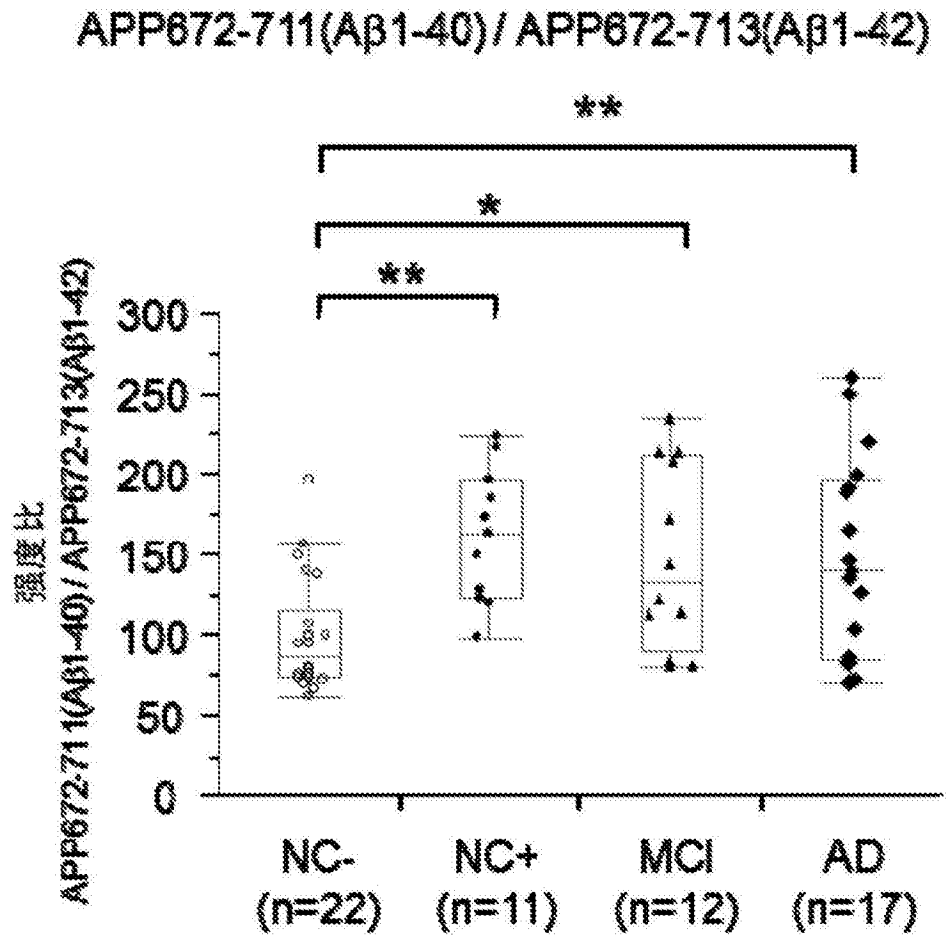
(C) APP672-710 ($A\beta$ 1-39) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs AD, AUC=0.914

(D) APP672-710 ($A\beta$ 1-39) / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs PIB+, AUC=0.924

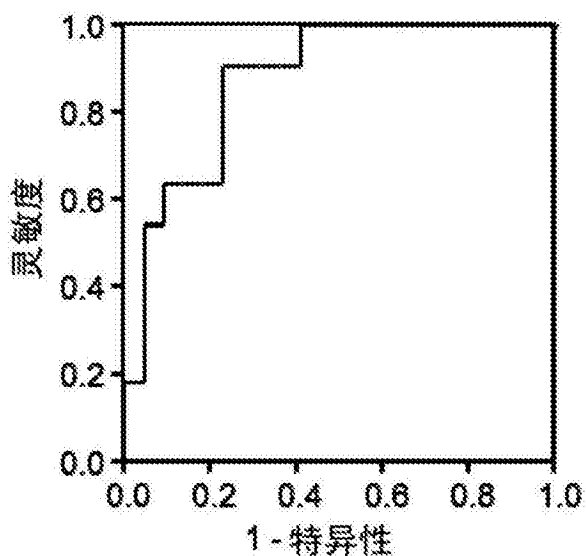
图13



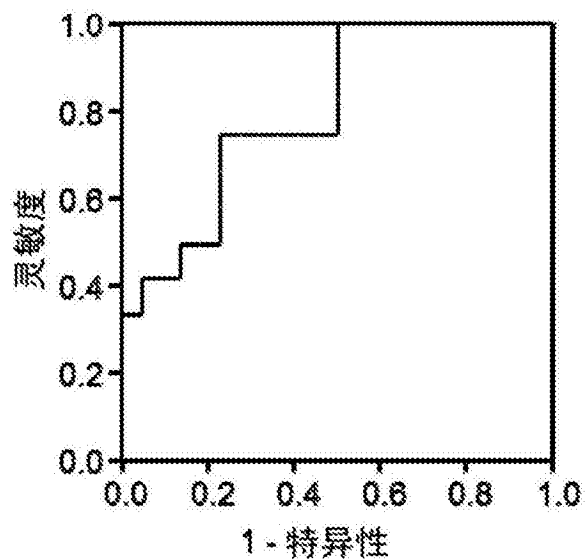
Dunnett's 检验

* $0.05 > P \geq 0.01$, ** $0.01 > P \geq 0.001$, *** $P < 0.001$

图14

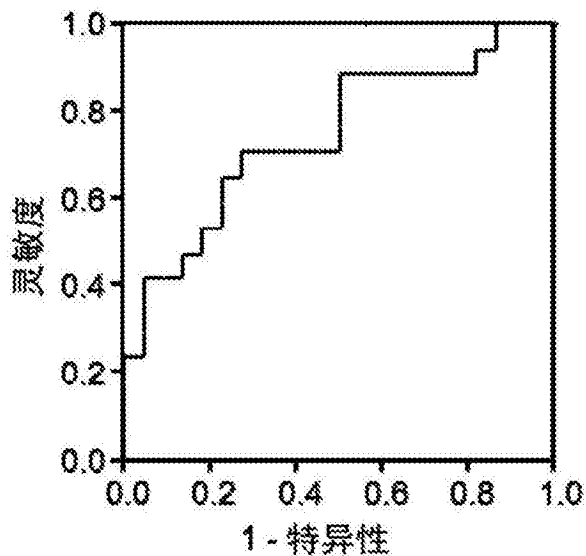
(A) APP672-711 (A β 1-40) / APP672-713 (A β 1-42)

NC- vs NC+, AUC=0.876

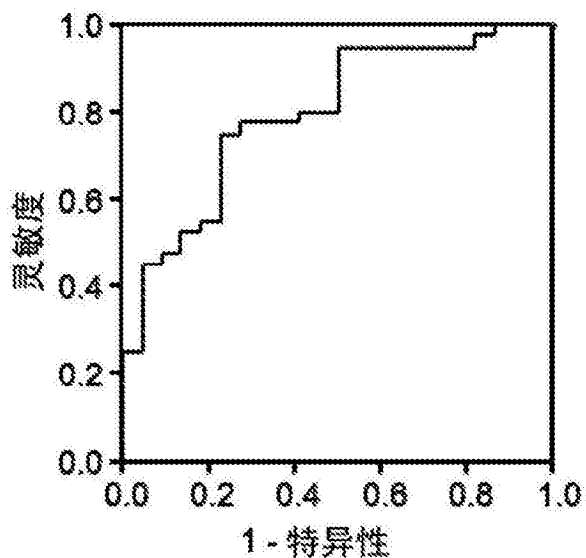
(B) APP672-711 (A β 1-40) / APP672-713 (A β 1-42)

NC- vs MCI, AUC=0.803

图15

(C) APP672-711 ($A\beta 1-40$) / APP672-713 ($A\beta 1-42$)

NC- vs AD, AUC=0.743

(D) APP672-711 ($A\beta 1-40$) / APP672-713 ($A\beta 1-42$)

NC- vs PIB+, AUC=0.798

图16

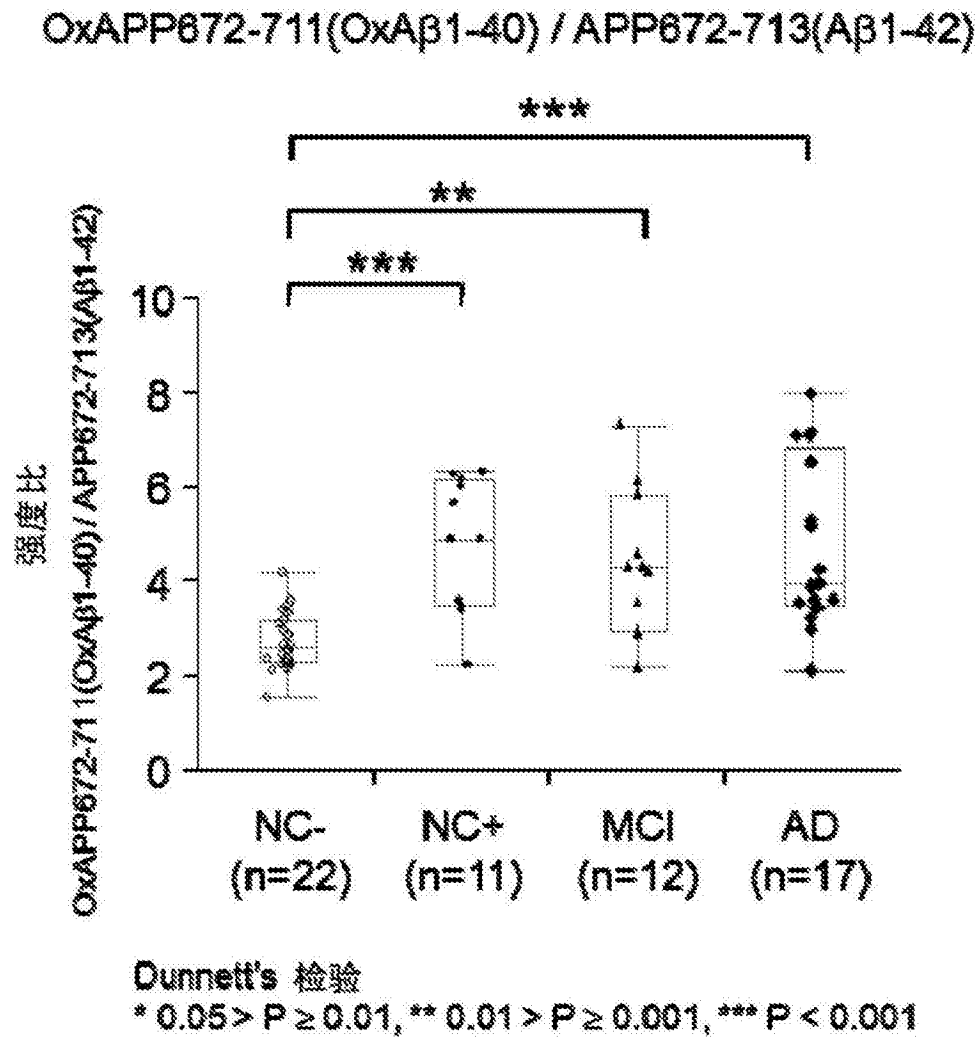
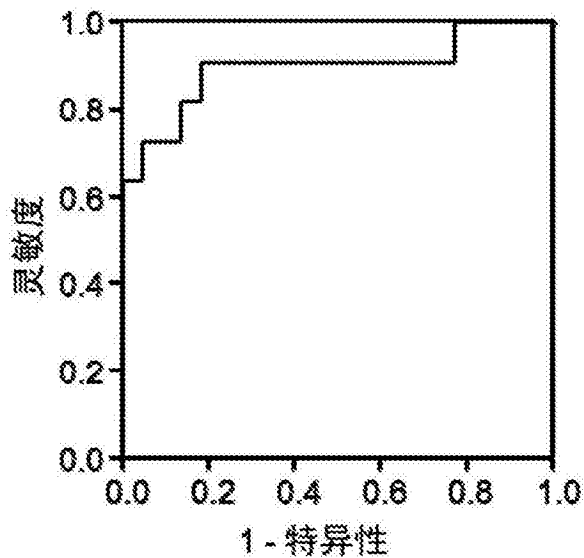
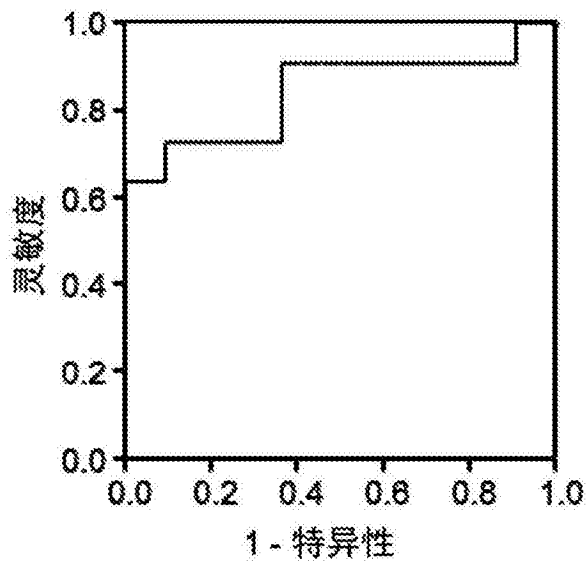


图17

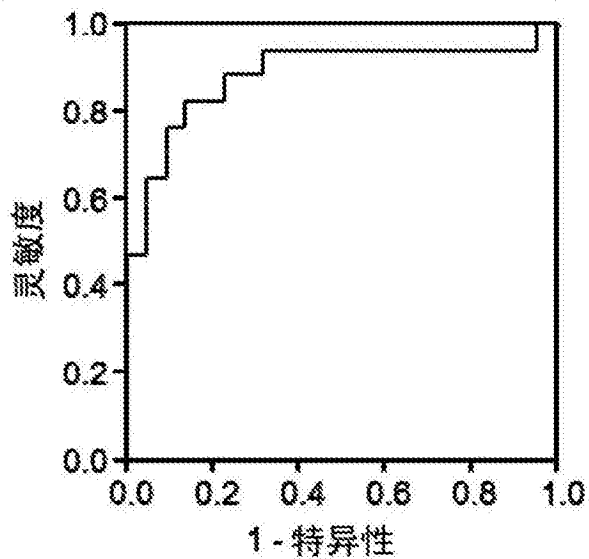
(A) OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ($\text{A}\beta$ 1-42)

NC- vs NC+, AUC=0.897

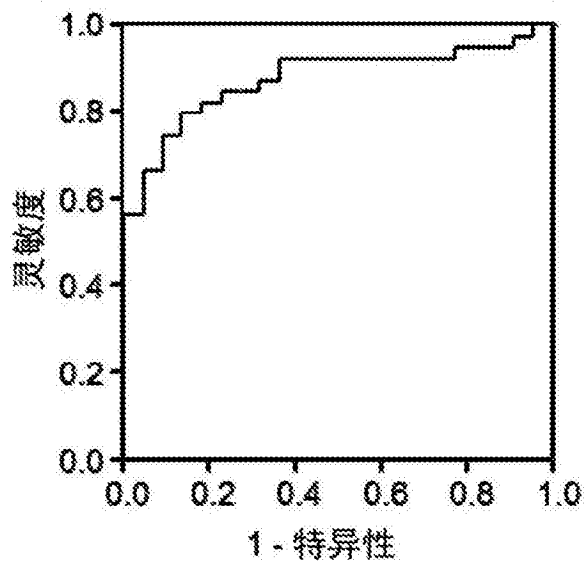
(B) OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ($\text{A}\beta$ 1-42)

NC- vs MCI, AUC=0.843

图18

(C) OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ($\text{A}\beta$ 1-42)

NC- vs AD, AUC=0.885

(D) OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ($\text{A}\beta$ 1-42)

NC- vs PIB+, AUC=0.876

图19

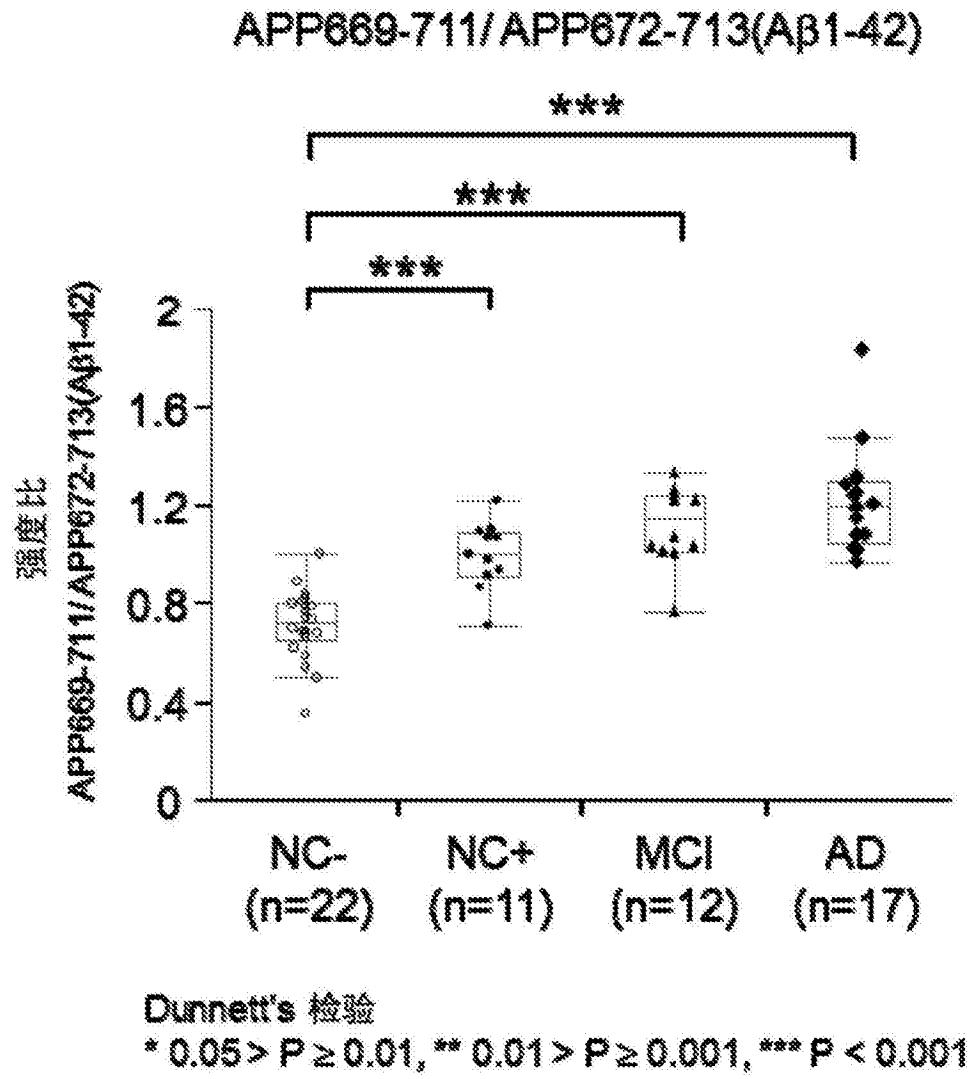
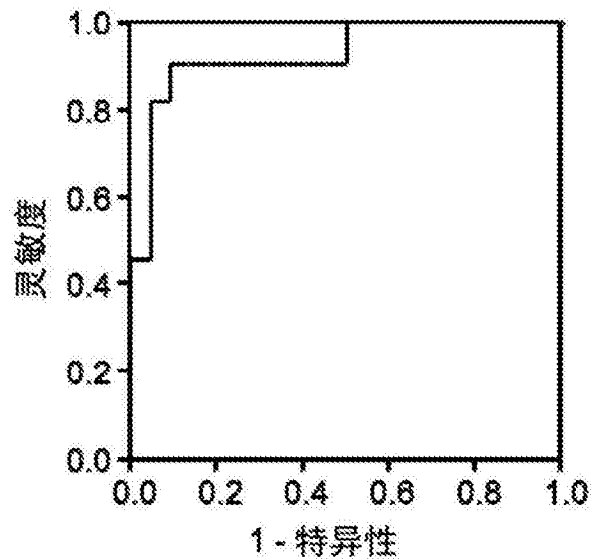
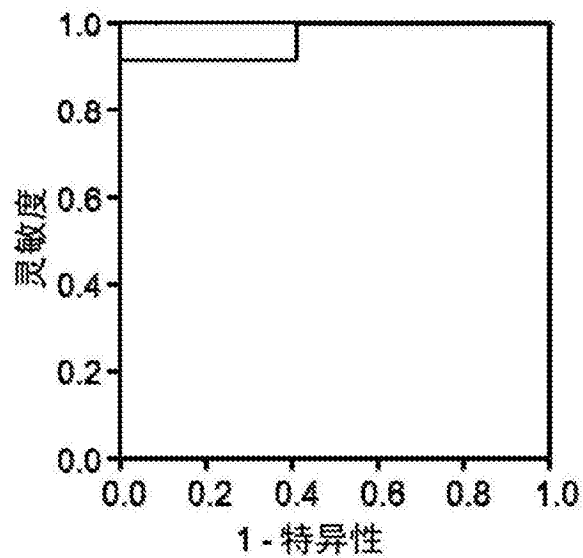


图20

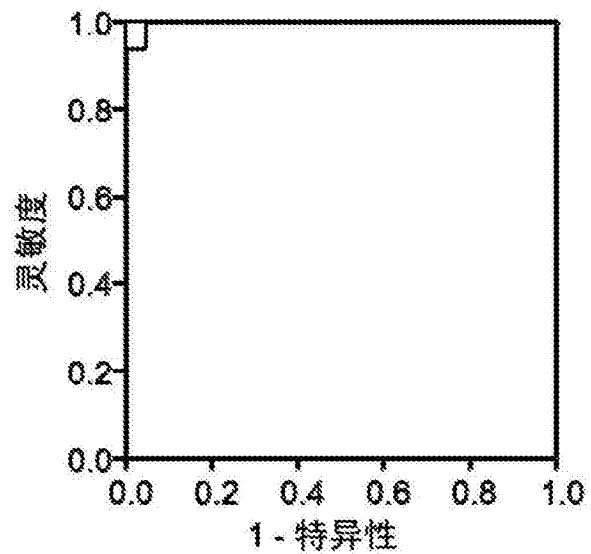
(A) APP669-711 / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs NC+, AUC=0.930

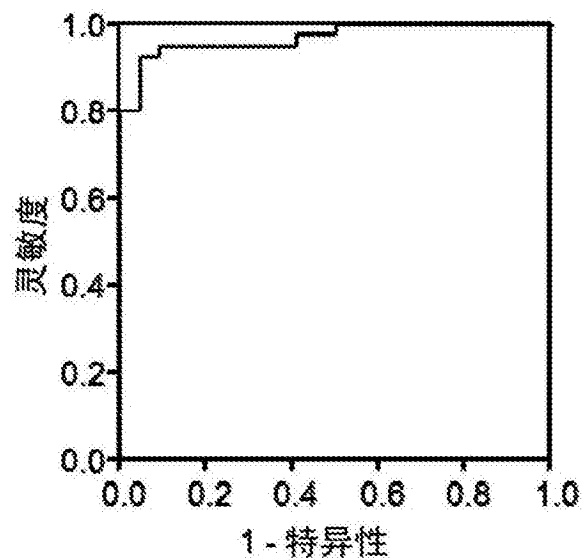
(B) APP669-711 / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs MCI, AUC=0.966

图21

(C) APP669-711 / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs AD, AUC=0.997

(D) APP669-711 / APP672-713 ($A\beta$ 1-42)

NC- vs PIB+, AUC=0.969

图22

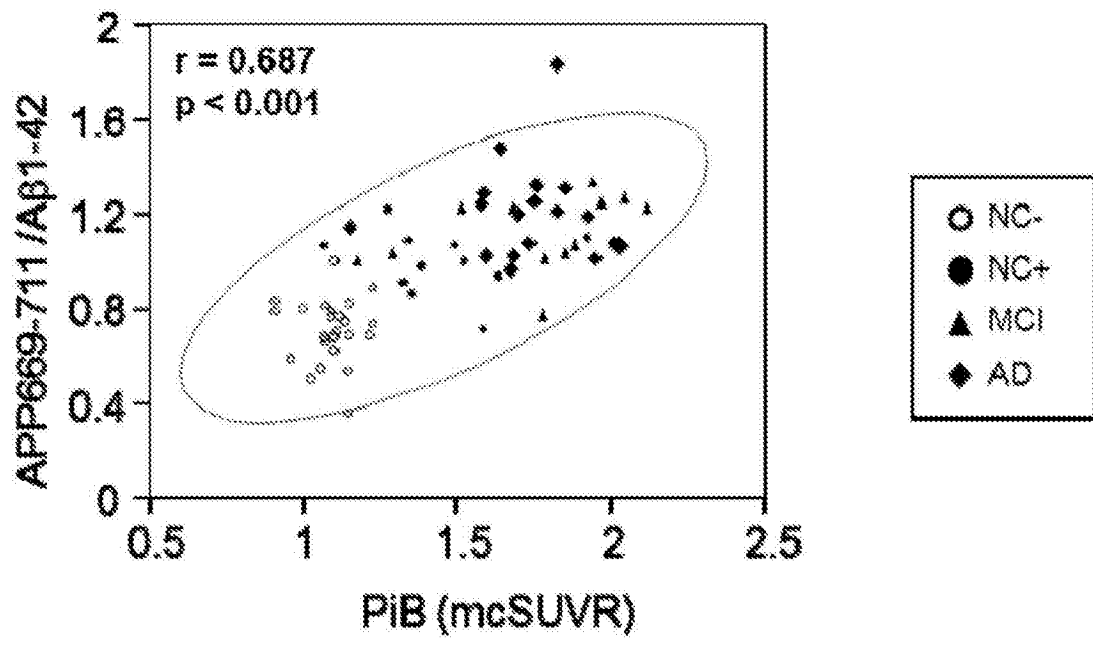


图23

专利名称(译)	评价脑内的淀粉样蛋白 β 肽蓄积状态的替代性生物标记物和其分析方法		
公开(公告)号	CN106574930A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201580040000.7	申请日	2015-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社岛津制作所 国立研究开发法人国立长寿医疗研究中心		
申请(专利权)人(译)	株式会社岛津制作所 国立研究开发法人国立长寿医疗研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社岛津制作所 国立研究开发法人国立长寿医疗研究中心		
[标]发明人	金子直树 柳泽胜彦		
发明人	金子直树 柳泽胜彦		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/52 G01N2800/56 G01N33/53 G01N33/5308		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2014106560 2014-05-22 JP		
其他公开文献	CN106574930B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供：以生物体来源试样中的淀粉样前体蛋白(APP)来源的肽作为指标的评价脑内的 $A\beta$ 蓄积状态的生物标记物和其分析方法。测定来自于受试对象的生物体来源试样，求出选自APP669-711/APP672-713($A\beta$ 1-42)；APP672-709($A\beta$ 1-38)/APP672-713($A\beta$ 1-42)；APP674-711($A\beta$ 3-40)/APP672-713($A\beta$ 1-42)；APP672-710($A\beta$ 1-39)/APP672-713($A\beta$ 1-42)；APP672-711($A\beta$ 1-40)/APP672-713($A\beta$ 1-42)；和APP672-711($Ox\beta$ 1-40)/APP672-713($A\beta$ 1-42)组成的组中的至少一者的比，对于受试对象的前述各比，以脑内 $A\beta$ 的蓄积为阴性的认知功能正常者NC-的前述各比作为基准水平，前述各比高于基准水平的情况下，判断为受试对象脑内 $A\beta$ 的蓄积量大于前述认知功能正常者NC-的脑内 $A\beta$ 的蓄积量。

