



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105339798 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201480036335. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 04. 25

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2014-0038989 2014. 04. 02 KR

10-2014-0038988 2014. 04. 02 KR

61/816, 343 2013. 04. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/003643 2014. 04. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/175693 KO 2014. 10. 30

(71) 申请人 韩国科学技术研究院

地址 韩国首尔

(72) 发明人 金泳秀 金东辰 金惠渊 曹秀民

金泰松 金贤真 李世真

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

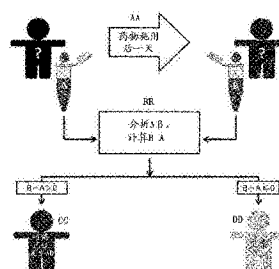
权利要求书4页 说明书14页 附图3页

(54) 发明名称

利用蛋白质聚集物的解离来诊断与异常蛋白质聚集或错误折叠相关之疾病的诊断试剂盒

(57) 摘要

本公开内容涉及一种诊断试剂盒,其能够基于对解离前后之聚集蛋白质的浓度分析,准确诊断与蛋白质的异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症,包括由β-淀粉样蛋白聚集引起的病症或疾病(例如阿尔茨海默病)以及由其他蛋白质聚集引起的病症或疾病。



AA... 药物注射一天

BB... 根据 Aβ 分析和 B-A 值进行分类

CC... AD 发生的可能性

DD... 正常

1. 通过测量施用蛋白质单体化组合物前后血浆中的蛋白质浓度来诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒。

2. 用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其包括:

(a) 检测单元 1,其测量施用蛋白质单体化组合物之前血浆中的蛋白质浓度;

(b) 检测单元 2,其测量施用所述蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度;

(c) 计算单元,其使用 [ 等式 1 ] 计算所述检测单元 1 所测量的浓度和所述检测单元 2 所测量的浓度的差值,

[ 等式 1 ]

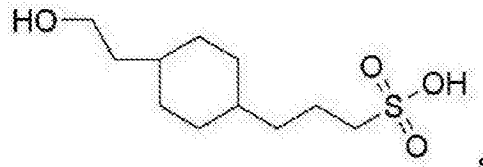
施用蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度 - 施用蛋白质单体化组合物之前血浆中的蛋白质浓度。

3. 根据权利要求 1 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中施用所述蛋白质单体化组合物之后血浆中的所述蛋白质是已经由脑中的  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块的解离和单体化形成的。

4. 根据权利要求 1 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述蛋白质是  $\beta$ -淀粉样蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述蛋白质单体化组合物包含如 [ 化学式 1 ] 所示的 EPPS 作为活性成分:

[ 化学式 1 ]



6. 根据权利要求 1 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症选自帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、多聚谷氨酰胺扩增疾病、脊髓小脑共济失调、脊髓和延髓肌肉萎缩、tau 蛋白病变、肌张力障碍、丝氨酸蛋白酶抑制剂不足、肝硬化、II 型糖尿病、原发性系统性淀粉样变、继发性系统性淀粉样变、额颞痴呆、老年系统性淀粉样变、家族性淀粉样多神经病、遗传性脑淀粉样血管病、血液透析相关淀粉样变、年龄相关性黄斑变性、阿尔茨海默病、放射治疗诱发性痴呆、轴突损伤、急性皮层扩散性抑郁、 $\alpha$ -触核蛋白病、脑缺血、持续性局灶性脑缺血、周围神经再生、后癫痫持续状态模型、脊髓损伤、散发性肌萎缩性侧索硬化和朊病毒病,例如克罗伊茨费尔特-雅各布氏病、海绵状脑病和传染性海绵状脑病。

7. 根据权利要求 2 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述检测单元 2 在施用所述蛋白质单体化组合物之后 20 至 450 小时测量血浆中的蛋白质浓度。

8. 根据权利要求 2 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,如果所述计算单元计算出的值是正 (+) 值,则诊断为与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

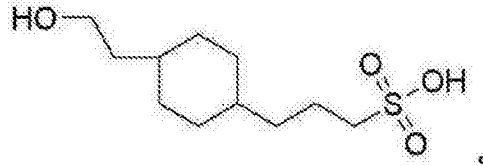
9. 根据权利要求 2 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症

的诊断试剂盒,其中施用所述蛋白质单体化组合物之后血浆中的所述蛋白质是已经由脑中的  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块的解离和单体化形成的。

10. 根据权利要求 2 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述蛋白质是  $\beta$ -淀粉样蛋白。

11. 根据权利要求 2 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述蛋白质单体化组合物包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分:

[化学式 1]



12. 根据权利要求 2 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症选自帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、多聚谷氨酰胺扩增疾病、脊髓小脑共济失调、脊髓和延髓肌肉萎缩、tau 蛋白病变、肌张力障碍、丝氨酸蛋白酶抑制剂不足、肝硬化、II 型糖尿病、原发性系统性淀粉样变、继发性系统性淀粉样变、额颞痴呆、老年系统性淀粉样变、家族性淀粉样多神经病、遗传性脑淀粉样血管病、血液透析相关淀粉样变、年龄相关性黄斑变性、阿尔茨海默病、放射治疗诱发性痴呆、轴突损伤、急性皮层扩散性抑郁、 $\alpha$ -触核蛋白病、脑缺血、持续性局灶性脑缺血、周围神经再生、后癫痫持续状态模型、脊髓损伤、散发性肌萎缩性侧索硬化和朊病毒病,例如克罗伊茨费尔特-雅各布氏病、海绵状脑病和传染性海绵状脑病。

13. 基于全血中蛋白质单体浓度的降低诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,所述试剂盒测量未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度、用所述蛋白质单体化组合物处理之后血浆中的蛋白质单体浓度以及用所述蛋白质单体化组合物处理之后全血中的蛋白质单体浓度。

14. 用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其包括:

(A) 检测单元 1', 其测量未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度;

(B) 检测单元 2', 其测量用所述蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度;

(C) 检测单元 3', 其测量用所述蛋白质单体化组合物处理的全血中的蛋白质单体浓度;

(D) 计算单元,使用 [等式 2] 计算所述检测单元 2' 所测量的浓度和所述检测单元 3' 所测量的浓度的比率或使用 [等式 3] 计算所述检测单元 1' 所测量的浓度和所述检测单元 2' 所测量的浓度的比率:

[等式 2]

用蛋白质单体化组合物处理的全血中的蛋白质单体浓度 / 用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度;

[等式 3]

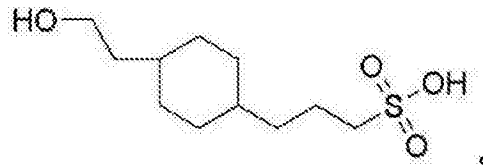
未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度 / 用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度。

15. 根据权利要求 13 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中所述单体化蛋白质是已经由  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚物、寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合至其他蛋白质的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体、结合至其他蛋白质的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物、结合至脂肪的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合至碳水化合物的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合至核酸的  $\beta$ -淀粉样蛋白以及结合至血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体的解离形成的。

16. 根据权利要求 13 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中所述蛋白质是  $\beta$ -淀粉样蛋白。

17. 根据权利要求 13 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中所述蛋白质单体化组合物包含如 [ 化学式 1 ] 所示的 EPPS 作为活性成分:

[ 化学式 1 ]



18. 根据权利要求 13 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症选自帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、多聚谷氨酰胺扩增疾病、脊髓小脑共济失调、脊髓和延髓肌肉萎缩、tau 蛋白病变、肌张力障碍、丝氨酸蛋白酶抑制剂不足、肝硬化、II 型糖尿病、原发性系统性淀粉样变、继发性系统性淀粉样变、额颞痴呆、老年系统性淀粉样变、家族性淀粉样多神经病、遗传性脑淀粉样血管病、血液透析相关淀粉样变、年龄相关性黄斑变性、阿尔茨海默病、放射治疗诱发性痴呆、轴突损伤、急性皮层扩散性抑郁、 $\alpha$ -触核蛋白病、脑缺血、持续性局灶性脑缺血、周围神经再生、后癫痫持续状态模型、脊髓损伤、散发性肌萎缩性侧索硬化和朊病毒病, 例如克罗伊茨费尔特-雅各布氏病、海绵状脑病和传染性海绵状脑病。

19. 根据权利要求 14 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中所述检测单元 1' 测量未用单体化组合物处理或用载剂处理之后 23 至 25 小时从全血中分离的血浆中的蛋白质浓度。

20. 根据权利要求 14 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中所述检测单元 2' 和所述检测单元 3' 测量用所述蛋白质单体化组合物处理之后 23 至 25 小时的蛋白质浓度。

21. 根据权利要求 14 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 如果所述计算单元所计算的值小于 1.0, 则诊断为与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

22. 根据权利要求 14 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其中所述单体化蛋白质是已经由  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚物、寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合至其他蛋白质的  $\beta$ -淀粉样蛋白单

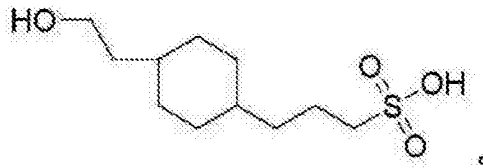
体、结合至其他蛋白质的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物、结合至脂肪的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合至碳水化合物化合物的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合至核酸的  $\beta$ -淀粉样蛋白以及结合至血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体的解离形成的。

23. 根据权利要求 19 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述载剂是磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。

24. 根据权利要求 14 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述蛋白质是  $\beta$ -淀粉样蛋白。

25. 根据权利要求 14 所述的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中所述蛋白质单体化组合物包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分:

[化学式 1]



26. 根据权利要求 14 的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其中与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症选自帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、多聚谷氨酰胺扩增疾病、脊髓小脑共济失调、脊髓和延髓肌肉萎缩、tau 蛋白病变、肌张力障碍、丝氨酸蛋白酶抑制剂不足、肝硬化、II 型糖尿病、原发性系统性淀粉样变、继发性系统性淀粉样变、额颞痴呆、老年系统性淀粉样变、家族性淀粉样多神经病、遗传性脑淀粉样血管病、血液透析相关淀粉样变、年龄相关性黄斑变性、阿尔茨海默病、放射治疗诱发性痴呆、轴突损伤、急性皮层扩散性抑郁、 $\alpha$ -触核蛋白病、脑缺血、持续性局灶性脑缺血、周围神经再生、后癫痫持续状态模型、脊髓损伤、散发性肌萎缩性侧索硬化和朊病毒病,例如克罗伊茨费尔特-雅各布氏病、海绵状脑病和传染性海绵状脑病。

## 利用蛋白质聚集物的解离来诊断与异常蛋白质聚集或错误折叠相关之疾病的诊断试剂盒

### 技术领域

[0001] 本公开内容涉及一种血液诊断试剂盒,其能够基于对解离前后之聚集蛋白质的浓度分析,准确诊断与蛋白质的异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症,包括由  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集引起的病症或疾病(例如阿尔茨海默病)以及由其他蛋白质聚集引起的病症或疾病。

### 背景技术

[0002] 神经元功能障碍和损伤可能是由有毒且易于聚集的蛋白质诱导的,许多神经系统病症都可以由这些病征体现。所述病症包括如肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、朊病毒病、多聚谷氨酰胺扩增疾病、脊髓小脑共济失调、脊髓和延髓肌肉萎缩、海绵状脑病、tau 蛋白病变(tauopathy)、亨廷顿病或肌张力障碍。

[0003] 引起这些疾病的有毒且易于聚集的蛋白质以及编码这些蛋白质的基因已经被鉴定。正常的代谢酶循环利用蛋白质,这产生了不间断的合成和降解循环。这些基因中的突变导致了错误折叠之蛋白质的异常累积和降解。已知这些错误折叠的蛋白质会导致神经元包含体(neuronal inclusion)和斑块(plaque),其可指示神经元损伤。因此,对细胞机理的理解以及对降低、抑制和改善这些错误折叠之蛋白质所需的分子工具的鉴定是很重要的。此外,理解蛋白质错误折叠和聚集对神经元存活的影响使得能够开发出对这些病症合理且有效的治疗。

[0004] 阿尔茨海默病,一种最常见的形式的痴呆(dementia),是由神经元和突触的损伤引起的神经退行性病症,其归因于在脑中正常存在的  $\beta$ -淀粉样蛋白和 tau 蛋白的异常聚集导致分别形成淀粉样蛋白斑块(A $\beta$  plaque)和神经纤维缠结(neurofibrillary tangle)。

[0005] 阿尔茨海默病是增龄性死亡的第三大原因,排在其之前的是脑血管疾病和癌症。已知由于该疾病的平均持续时间超过 10 年,因此,阿尔茨海默病给看护者造成了很大的负担,包括心理方面、经济方面和社会方面的负担。

[0006]  $\beta$ -淀粉样蛋白(特别是在阿尔茨海默患者的脑中发现的)是分泌酶(secretase)代谢产生的肽。取决于疾病的进展状况, $\beta$ -淀粉样蛋白以单体(monomer)、寡聚物(oligomer)、前原纤维(proto-fibril)、原纤维(fibril)或斑块(plaque)形式存在。其中,已知呈现活跃的动态变化的寡聚物和前原纤维是损伤脑细胞的主要原因。

[0007] 临床试验显示,在阿尔茨海默病症状发生之前的 10 至 15 年,脑中已出现  $\beta$ -淀粉样蛋白的异常聚集(Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM, "Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease", Nature. 2009 ;461 :916-22)。由于  $\beta$ -淀粉样蛋白能够以小的单体、二聚体或三聚体形式通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)中存在的 RAGE 和 LRP 而被运输通过血脑屏障,因此,血液中  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度变化可直接与阿尔茨海默病的进展相关。

[0008] 对基于血液中的  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度诊断阿尔茨海默病存在反对意见。有报道称,  $\beta$ -淀粉样蛋白随着阿尔茨海默病的进展而增加 (van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. "Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study." *Lancet Neurol.* 2006 ;8 : 655-660, 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 ;8 :1185-1190), 但是也有相反的报道称, 血液中的  $\beta$ -淀粉样蛋白随着阿尔茨海默病的进展而减少 (Sundstrom J, Ingelsson E, Ronnema E, Arnlov J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H. et al. "Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study." *Arch Neurol.* 2008 ;8 :256-263)。此外, 还有报道指出, 血液中  $\beta$ -淀粉样蛋白的变化与阿尔茨海默病导致的认知能力降低无关 (Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K. "Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment." *Neurobiol Aging.* 2010 ;8 :357-367, Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gach HM, Sweet RA, Chang YF, Tracy R, DeKosky ST. "Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the cardiovascular health study." *Neurology.* 2008 ;8 :1664-1671)。这些研究结果的差异看起来是由于难以准确测定血液中  $\beta$ -淀粉样蛋白的水平造成的。

[0009] 目前, 阿尔茨海默病的确定性诊断仅能通过死亡后的尸体解剖来进行。虽然可以通过基于身体检查、神经学检查或生理学检查间接检查症状、对脑脊液中  $\beta$ -淀粉样蛋白进行测量、最准确地通过脑成像监测脑的结构和功能变化以及鉴定  $\beta$ -淀粉样蛋白的斑块来诊断阿尔茨海默病的进展, 但是这些方法都是非常侵入性的并且花费高昂。由于这些不利因素, 使得难以准确诊断阿尔茨海默病。

## 发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本公开内容涉及提供血液诊断试剂盒, 其能够基于对解离前后之聚集蛋白质的浓度分析准确诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症, 包括由  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集引起的病症或疾病 (例如阿尔茨海默病) 以及由其他蛋白质聚集引起的病症或疾病。

[0012] 技术方案

[0013] 一方面, 本公开内容提供了用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的血液诊断试剂盒, 其测量施用蛋白质单体化组合物前后血浆中的蛋白质浓度。

[0014] 特别地, 根据本公开内容的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒可包括: (a) 检测单元 1, 其测量施用用于在体内使异常聚集或错误折叠之蛋白质单体化的组合物之前血浆中的蛋白质浓度; (b) 检测单元 2, 其测量施用所述蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度; (c) 计算单元, 其使用 [ 等式 1 ] 计算检测单元 1 所测量的浓度和检测单元 2 所测量的浓度之差:

[0015] [ 等式 1]

[0016] 施用蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度 (B) - 施用蛋白质单体化组合物之前血浆中的蛋白质浓度 (A)。

[0017] 检测单元 2 可测量施用蛋白质单体化组合物之后 20 至 450 小时血浆中的蛋白质浓度。

[0018] 蛋白质可以是  $\beta$ -淀粉样蛋白。

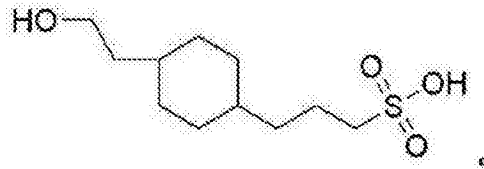
[0019] 施用蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质可以是已经由脑中的  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块的解离并且运输至血液中形成的。

[0020] 用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 如果计算单元计算的值为正 (+) 值, 则可诊断为与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

[0021] 蛋白质单体化组合物可包含如 [ 化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分:

[0022] [ 化学式 1]

[0023]



[0024] 蛋白质单体化组合物可将  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块解离成单体。

[0025] 另一方面, 本公开内容提供了基于全血中蛋白质单体浓度的降低诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒, 其测量未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中蛋白质单体浓度、用蛋白质单体化组合物处理之后血浆中的蛋白质单体浓度以及用蛋白质单体化组合物处理之后全血中的蛋白质单体浓度。

[0026] 特别地, 用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒可包括: (A) 检测单元 1', 其测量未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度; (B) 检测单元 2', 其测量用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度; (C) 检测单元 3', 其测量用蛋白质单体化组合物处理的全血中的蛋白质单体浓度; 以及 (D) 计算单元, 其使用 [ 等式 2] 计算检测单元 2' 所测量的浓度和检测单元 3' 所测量的浓度的比率或使用 [ 等式 3] 计算检测单元 1' 所测量的浓度和检测单元 2' 所测量的浓度的比率:

[0027] [ 等式 2]

[0028] 用蛋白质单体化组合物处理的全血中的蛋白质单体浓度 / 用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度;

[0029] [ 等式 3]

[0030] 未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度 / 用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度。

[0031] 检测单元 1' 可测量未用单体化组合物处理或用载剂处理之后 23 至 25 小时的从全血分离的血浆中的蛋白质浓度。

[0032] 检测单元 2' 和检测单元 3' 可测量用蛋白质单体化组合物处理之后 23 至 25 小时

的蛋白质浓度。

[0033] 蛋白质可以是  $\beta$ -淀粉样蛋白。

[0034] 单体化蛋白质可以是已经由  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚物、寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合至其他蛋白质的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体、结合至其他蛋白质的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物、结合至脂肪的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合至碳水化合物的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合至核酸的  $\beta$ -淀粉样蛋白以及结合至血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体的解离形成的。

[0035] 用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,如果计算单元计算的值小于 1.0,则可诊断为与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

[0036] 载剂可以是磷酸盐缓冲盐水 (phosphate-buffered saline, PBS)。

[0037] 蛋白质单体化组合物可以包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分。

[0038] 有益效果

[0039] 根据本公开内容的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒,其能够通过使用检测单元 1 和 2 测量施用蛋白质单体化组合物前后的蛋白质浓度(特别是通过间接测量解离蛋白质聚集物之后血浆中的蛋白质聚集物浓度),来诊断和预测与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症,包括由  $\beta$ -淀粉样蛋白的聚集引起的病症或疾病(例如阿尔茨海默病)以及由其他蛋白质的聚集引起的病症或疾病。

[0040] 根据本公开内容的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的另一种诊断试剂盒,其可通过使用检测单元 1'、2' 和 3' 测量血浆和全血中的蛋白质浓度来诊断和预测与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症,包括由  $\beta$ -淀粉样蛋白的聚集引起的病症或疾病(例如阿尔茨海默病)以及由其他蛋白质的聚集引起的病症或疾病,所述诊断或预测基于以下事实:随着单体化的蛋白质被移除,全血中的蛋白质浓度降低,全血和血浆中的聚集蛋白质被解离为单体或小分子质量的多聚物,这导致蛋白质浓度升高,并且全血和血浆中结合至其他蛋白质、脂肪、碳水化合物、核酸和血细胞的蛋白质也被解离。

[0041] 当前可用的诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的方法是侵入性的,并且只有在疾病或病症已经进入特定阶段时才可以使使用。由于在与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的症状被观察到的很久之前,蛋白质的聚集就已发生,因此,设计的用于抑制蛋白质聚集的药物不容易达到其效果。因此,有必要在症状发生之前检测脑中蛋白质聚集。据此,根据本公开内容的诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒将非常有用,因为其允许准确地诊断蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症,所述试剂盒侵入性较低并且使用常规的诊断样品,例如血浆、血清或血液。

## 附图说明

[0042] 图 1 显示了如何使用根据本公开内容的示例性实施方案的检测单元 1 和 2 通过测量在施用蛋白质单体化组合物前后血浆中的蛋白质浓度,来诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

[0043] 图 2 显示了正常的脑和由与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症引起的蛋白质已经聚集的脑。

[0044] 图 3a 显示了施用根据本公开内容的一个示例性实施方案的蛋白质单体化组合物之前以及施用之后 24 小时血浆中的  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 的浓度。

[0045] 图 3b 显示了施用根据本公开内容的一个示例性实施方案的蛋白质单体化组合物之前以及施用之后 1 天、5 天、19 天和 33 天的血浆中的  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 的浓度。

[0046] 图 4 显示了如何使用根据本公开内容的另一个示例性实施方案的检测单元 1'、2' 和 3' 测量用蛋白质单体化组合物处理的血浆和全血中的蛋白质单体浓度, 来诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

[0047] 图 5 显示了施用根据本公开内容的一个示例性实施方案的蛋白质单体化组合物或 PBS 之后 24 小时血浆或全血中  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 的浓度。

[0048] 图 6 显示了施用本公开内容的示例性实施方案的蛋白质单体化组合物或 PBS 之后 24 小时血浆或全血中  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 的浓度, 使用与图 5 不同的小鼠进行测量。

[0049] 最佳方式

[0050] 本公开内容涉及诊断试剂盒, 其能够基于解离前后之聚集蛋白质的浓度分析来准确诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症, 包括由  $\beta$ -淀粉样蛋白的聚集引起的病症或疾病 (例如阿尔茨海默病) 以及由其他蛋白质的聚集引起的病症或疾病。

[0051] 与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症可以选自帕金森病、亨廷顿病 (Huntington's disease)、肌萎缩性侧索硬化 (Amyotrophic lateral sclerosis)、多聚谷氨酰胺扩增疾病 (polyglutamine expansion disease)、脊髓小脑共济失调 (spinocerebellar ataxia)、脊髓和延髓肌肉萎缩 (spinal and bulbar muscular atrophy)、tau 蛋白病变 (tauopathy)、肌张力障碍 (dystonia)、丝氨酸蛋白酶抑制剂不足 (Serpine deficiency)、肝硬化 (cirrhosis)、II 型糖尿病、原发性系统性淀粉样变、继发性系统性淀粉样变、额颞痴呆 (Frontotemporal dementia)、老年系统性淀粉样变、家族性淀粉样多神经病 (familial amyloid polyneuropathy)、遗传性脑淀粉样血管病 (hereditary cerebral amyloid angiopathy)、血液透析相关淀粉样变、年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)、阿尔茨海默病、放射治疗诱发性痴呆 (radiotherapy-induced dementia)、轴突损伤 (axon injury)、急性皮层扩散性抑郁 (acute cortical spreading depression)、 $\alpha$ -触核蛋白病 (alpha-synucleinopathy)、脑缺血 (brain ischemia)、持续性局灶性脑缺血 (permanent focal cerebral ischemia)、周围神经再生 (peripheral nerve regeneration)、后癫痫持续状态模型 (post status epilepticus model)、脊髓损伤 (spinal cord injury)、散发性肌萎缩性侧索硬化 (Sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 和朊病毒病, 例如克罗伊茨费尔特-雅各布氏病、海绵状脑病 (Spongiform encephalopathy) 和传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy)。

[0052] 正确的折叠需要蛋白质从一系列可能但不正确构象形成一种特定的结构。多肽未能采用其正确结构对细胞功能和生存而言是一种主要的威胁。错误折叠的蛋白质可能对细胞自身是有毒的, 并可能形成可导致非常严重甚至致命后果的聚集物。因此, 已经进化出了精密的系统, 以保护细胞免受错误折叠之蛋白质的有害影响。

[0053] 在本公开内容中, “蛋白质聚集” 包括如下现象: 至少两个多肽以导致所述多肽中的任一个变为去溶剂化状态的方式彼此接触。这还可以包括多肽天然功能或活性的损失。

[0054] 在本公开内容中，“蛋白质”可以特别为  $\beta$ -淀粉样蛋白。

[0055] 以下,对本公开内容进行更详细的描述。

[0056] 1. 测量解离前后之聚集蛋白质浓度的诊断试剂盒

[0057] 本公开内容的诊断试剂盒通过测量施用蛋白质单体化组合物前后血浆中的蛋白质浓度来诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

[0058] 特别地,根据本公开内容的诊断试剂盒包括:(a) 检测单元 1,其测量施用在体内使异常聚集或错误折叠之蛋白质单体化的组合物之前的血浆中的蛋白质浓度;(b) 检测单元 2,其测量施用所述蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度;以及(c) 计算单元,其使用 [ 等式 1 ] 计算检测单元 1 所测量的浓度和检测单元 2 所测量的浓度的差值:

[0059] [ 等式 1 ]

[0060] 检测单元 1 测量施用蛋白质单体化组合物之前血浆中的蛋白质浓度 (A)。

[0061] 以及,检测单元 2 测量口服或肠胃外施用蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度 (B)。施用蛋白质单体化组合物之后进行测量的时间不是特别限定的。特别地,可以在施用之后 20 至 450 小时进行测量,更特别地,在施用之后 20 至 300 小时进行测量。

[0062] 计算单元使用 [ 等式 1 ] 计算检测单元 1 所测量的浓度 (A) 和检测单元 2 所测量的浓度 (B) 之间的差值。

[0063] [ 等式 1 ]

[0064] 施用蛋白质单体化组合物之后血浆中的蛋白质浓度 (B)- 施用蛋白质单体化组合物之前血浆中的蛋白质浓度 (A)。

[0065] 如图 1 所示,使用 [ 等式 1 ] 计算的值可以是正 (+) 值或负 (-) 值。如果使用 [ 等式 1 ] 计算的值是 0 或负 (-) 值,可诊断为是正常状态,其中未发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。而如果该值是正 (+) 值,则可诊断为高风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态。

[0066] 如果使用 [ 等式 1 ] 计算的值是正 (+) 值,意味着在施用蛋白质单体化组合物之后蛋白质的量已升高。由于这指示了脑中蛋白质聚集的进程,因此可以诊断为高风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态。

[0067] 基于施用蛋白质单体化组合物前后的血浆中蛋白质浓度来诊断或预测发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的风险的原理如下。正常脑中,蛋白质以单体形式存在(图 2,右侧)。在与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的症状发生之前的 10 至 15 年已在脑中出现蛋白质的异常聚集(寡聚物、原纤维、斑块等)(图 2,左侧)。如果施用了蛋白质单体化组合物,在正常脑中,血浆中的蛋白质浓度不会升高,因为脑中沒有可被解离成单体的寡聚物。相反,在蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的情况下,由于脑中蛋白质寡聚物被解离,血浆中的蛋白质浓度升高。

[0068] 由于脑中的蛋白质浓度不能直接测量,考虑到以下事实,间接地测量血浆中的蛋白质浓度:脑中存在的蛋白质单体或小分子质量的多聚物(如二聚体、三聚体等)可通过血脑屏障(BBB)中存在的 RAGE 和 LRP 而在脑、脑脊液和血液之间运输。

[0069] 因此,施用蛋白质单体化组合物之后血浆中存在的蛋白质可以是已经由脑中的  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维以及斑块的解离形成的。例如,施用蛋白质单体化组合物之后血浆中存在的蛋白质可以是单体和 / 或小分子质量的多聚物(如二聚体、三聚

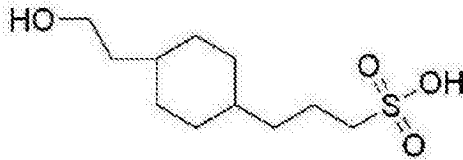
体等),其可以是已经通过 BBB 中存在的 RAGE 和 LRP 运输的。

[0070] 由于施用蛋白质单体化组合物后经过预定时间,血液中蛋白质聚集物的量会逐渐降低,因此,脑中或身体内的蛋白质聚集物的降低可使用本公开内容的诊断试剂盒来监测。

[0071] 蛋白质单体化组合物可以是包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分的组合。然而,蛋白质单体化组合物不是特定限于此,只要其能将蛋白质寡聚物解离为单体即可。使用可将蛋白质寡聚物解离为单体的其他物质也可以得到与使用 EPPS 时相同的结果。

[0072] [化学式 1]

[0073]



[0074] 从 SDS-PAGE 分析可见, [化学式 1] 所示的 EPPS 具有将  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块聚集物解离的活性,因为出现了大小为 4.3 至 4.5kD 的 A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 单体的条带。并且,电子显微镜观察确认了所述将  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块解离的活性,因为没有观察到  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物。

[0075] 当组合物用作药物时,包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分的蛋白质单体化组合物可以制成多种用于经口或肠道外施用的制剂,以用于临床目的,但不限于此。

[0076] 经口施用制剂例如包括片剂、丸剂、硬/软胶囊、液体、混悬剂、乳剂、糖浆、颗粒、酞剂等。除活性成分外,这些制剂还可含有稀释剂(例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、纤维素和/或甘氨酸)、润滑剂(例如二氧化硅、滑石、硬脂酸及其镁盐或钙盐和/或聚乙二醇)。片剂还可含有粘合剂,例如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone),如有必要还可以含有崩解剂,例如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐、泡腾混合物和/或吸收剂、着色剂、调味剂以及甜味剂。

[0077] 包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分的蛋白质单体化组合物可以经肠道外施用。经肠道外施用可以经皮下、静脉内、肌内或胸内注射实现。为制备经肠道外施用的制剂,可将如 [化学式 1] 所示的 EPPS 与水中的稳定剂或缓冲剂混合制备溶液或混悬液,其可以制成装在安瓿或小瓶中的单位剂量形式。

[0078] 组合物可进行灭菌和/或可包含佐剂,如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、调节渗透压的盐、缓冲剂等以及其他治疗有效物质。组合物可根据常规采用的混合、粒化或包衣法制备。

[0079] 当包含如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分的蛋白质单体化组合物被制备为单位剂量形式时,其可特别地包含约 0.1 至 1,500mg/kg 如 [化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分。施用剂量应当遵照医生处方进行,取决于如体重和患者年龄等因素以及疾病或病症的特定特征和严重程度。治疗成年患者所需剂量通常为约 0.1 至 1,000mg/kg/天,取决于施用频率和施用强度。当通过肌内或静脉内对成人施用时,约 0.5 至 300mg/kg/天的剂量可以是足够的。但是,对一些患者来说更大的日剂量可以是优选的。

[0080] 2. 测量血液中聚集蛋白质的解离浓度的诊断试剂盒

[0081] 当血液中的蛋白质以单体形式存在时其最容易进入脑,而预期聚集物几乎不可能

进入血液中。但是,即使当蛋白质以单体形式进入血液中,其也可能在血液中聚集。另外,其还可能结合到血液中的其他蛋白质上。因此,不可能简单地通过测量血浆中的蛋白质单体浓度来准确地测量血液中的蛋白质单体浓度。

[0082] 这使得通过简单比较血浆中的蛋白质单体浓度来区分患者与健康人十分困难。如果血液中的蛋白质可以解离为单体,并且蛋白质单体从其他蛋白质、血细胞等分离之后,出与血浆相比,全血中蛋白质单体的稳定性降低 (Slemmon JR1, Painter CL, Nadanaciva S, Catana F, Cook A, Motter R, Seubert P. "Distribution of Abeta peptide in whole blood." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 ;846(1-2) : 24-31), 这可能是由于蛋白质单体被血细胞组分代谢或吞入。据此,与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症可通过比较全血中的蛋白质单体浓度和血浆中的蛋白质单体浓度来准确诊断或预测。

[0083] 其他的蛋白质可以为选自乳铁蛋白 (Lactoferrin)、丛生蛋白 (Clusterin)、 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶 ( $\alpha_1$ -antitrypsin), 载脂蛋白 A-IV (Apolipoprotein A-IV)、载脂蛋白 E 和载脂蛋白 A-I 的至少一个。

[0084] 图 4 显示了如何使用根据本公开内容的另一个示范性实施方案的检测单元 1'、2' 和 3' 测量用蛋白质单体化组合物处理的血浆和全血中的蛋白质单体浓度, 来诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

[0085] 特别地,根据本公开内容的用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的诊断试剂盒包括:(A) 检测单元 1', 其测量未用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度;(B) 检测单元 2', 其测量用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度;(C) 检测单元 3', 其测量用蛋白质单体化组合物处理的全血中的蛋白质单体浓度;和 (D) 计算单元,其使用 [ 等式 2 ] 计算检测单元 2' 所测量的浓度和检测单元 3' 所测量的浓度的比率或使用 [ 等式 3 ] 计算检测单元 1' 所测量的浓度和检测单元 2' 所测量的浓度的比率。

[0086] 检测单元 1' 测量未用单体化组合物处理或用载剂处理之后 23 至 25 小时从全血分离的血浆中的蛋白质浓度。

[0087] 检测单元 2' 测量用蛋白质单体化组合物处理后 23 至 25 小时从全血分离的血浆中的蛋白质浓度。

[0088] 并且,检测单元 3' 测量用蛋白质单体化组合物处理后 23 至 25 小时全血中的蛋白质浓度。

[0089] 计算单元使用 [ 等式 2 ] 计算检测单元 2' 所测量的浓度和检测单元 3' 所测量的浓度的比率或使用 [ 等式 3 ] 计算检测单元 1' 所测量的浓度和检测单元 2' 所测量的浓度的比率。

[0090] [ 等式 2 ]

[0091] 用蛋白质单体化组合物处理之后全血中的蛋白质单体浓度 (MB) / 用蛋白质单体化组合物处理之后血浆中的蛋白质单体浓度 (MP)

[0092] 使用 [ 等式 2 ] 计算的 MB/MP 值满足  $MB/MP < 1.0$  或者  $MB/MP \geq 1.0$ 。如果  $MB/MP < 1.0$ , 则可诊断为高风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态。而如果  $MB/MP \geq 1.0$ , 则可诊断为低风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或

病症的状态或者是正常状态,其中与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症没有发生。

[0093] 如果  $MB/MP < 1.0$ , 意味着血浆中的蛋白质单体浓度 (MP) 和全血中蛋白质单体浓度 (MB) 之间的差值 (即  $MP-MB$ ) 是大的。由于其指示了蛋白质聚集物的浓度高,可诊断为高风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态。

[0094] 如果使用蛋白质单体化组合物处理存在蛋白质聚集物和蛋白质单体的血浆,蛋白质聚集物会解离成单体,导致血浆中蛋白质单体浓度 (MP) 升高。而由于全血中蛋白质单体被血细胞、其他蛋白质等吞入或代谢,全血中的蛋白质单体浓度 (MB) 降低。因此,MP 和 MB 的差值 (即  $MP-MB$ ) 等于聚集物的浓度。此时,血液中蛋白质的量以及由此的聚集物的相对量越大,发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的风险越高。因此,因为血浆中的蛋白质单体浓度 (MP) 升高,而由于代谢和吞入作用导致全血中的蛋白质单体浓度 (MB) 降低,  $MP-MB$  变得更大,且  $MB/MP$  变得小于 1.0。

[0095] [ 等式 3]

[0096] 未使用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度 (UP)/ 使用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质单体浓度 (MP)。

[0097] 使用 [ 等式 3] 计算的  $UP/MP$  值满足  $UP/MP < 1.0$  或  $UP/MP \geq 1.0$ 。如果  $UP/MP < 1.0$ ,则可诊断为其中高风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态。而如果  $UP/MP \geq 1.0$ ,则可诊断为其中低风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态或者是正常状态,其中与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症没有发生。

[0098] 如果  $UP/MP < 1.0$ ,意味着使用单体化组合物处理之后的血浆中的蛋白质浓度 (MP) 和未使用蛋白质单体化组合物处理的血浆中的蛋白质浓度 (UP) 之间的差值 (即  $MP-UP$ ) 是大的。由于其指示了蛋白质聚集物的浓度高,则可诊断为其中高风险发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的状态。

[0099] 如果使用蛋白质单体化组合物处理存在蛋白质聚集物和蛋白质单体的血浆,蛋白质聚集物被解离成单体,导致血浆中蛋白质单体浓度 (MP) 升高。因此,MP 和 UP 的差值 (即  $MP-UP$ ) 等于聚集物的浓度。此时,血液中蛋白质的量以及由此的聚集物的相对量越大,发生与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症的风险越高。因此,由于血浆中的蛋白质单体浓度 (MP) 升高,  $MP-UP$  变得更大,且  $UP/MP$  变得小于 1.0。

[0100] 检测单元 1'、检测单元 2' 和检测单元 3' 所检测的单体化蛋白质是已经由  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚体、寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合到其他蛋白质上的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体、结合到脂肪的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合到碳水化合物的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合到核酸的  $\beta$ -淀粉样蛋白和结合到血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体解离后形成的。

[0101] 蛋白质单体化组合物可以是包含如 [ 化学式 1] 所示的 EPPS 作为活性成分的组合物。但是,蛋白质单体化组合物不特别限于此,只要其可以将蛋白质寡聚物解离为单体即可。可以预期,使用可以将蛋白质寡聚物解离为单体的其他物质也可以得到与使用 EPPS 相同的结果。

[0102] 从 SDS-PAGE 分析可见, [ 化学式 1] 所示的 EPPS 具有将  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚体、

寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块聚集物、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合到其他蛋白质上的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体以及结合到血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体解离的活性,因为出现了大小为 4.3 至 4.5kD 的 A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 单体的条带。同样地,电子显微镜观察确认了所述将  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚体、寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合到其他蛋白质上的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体、结合到脂肪的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合到碳水化合物化合物的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合到核酸的  $\beta$ -淀粉样蛋白和结合到血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体解离的活性。

### 具体实施方式

[0103] 下面,本公开内容将通过实施例来进行详细描述。然而,对本领域技术人员来说显然的是,可以在本公开内容的范围和技术精神内进行各种改变和调整,这些改变和调整都在所附权利要求范围内。

[0104] <实施例 1> 测量解离前后之聚集蛋白质的浓度的诊断试剂盒

[0105] 1. 准备小鼠

[0106] 雌性 APP/PS1 转基因小鼠用作测试动物,总共使用了 32 只小鼠 (11 只 5-6 月龄和 21 只 7.2-8.6 和 13 月龄)。使用 5-6 月龄小鼠是由于脑中  $\beta$ -淀粉样蛋白斑块聚集从 5 个月开始。

[0107] 转基因 APP/PS1 小鼠模型是从 Jackson Laboratory (USA) 购买的 B6C3-Tg (APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>) 85Dbo/Mmjax 小鼠,根据实验动物伦理委员会的使用指导进行饲养和用于实验。

[0108] 以 1,000mg/kg/ 天的剂量向 31 只小鼠的每一只施用 EPPS。

[0109] 2. 抽血和测量  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度

[0110] 施用 EPPS 前后,使用 80IU/mL 肝素处理的微型管 (Marienfeld, 德国) 从小鼠的后眼窝静脉中抽血。EPPS 施用之后的抽血于 EPPS 施用之后 1 天、5 天、19 天和 33 天进行。

[0111] 将血液收集在 Eppendorf 管中,于 4°C 下以 13,500rpm 离心 5 分钟。将与细胞级分离的血浆收集在 Eppendorf 管中,立即使用或储存于 -80°C 以备以后使用。

[0112] 用试剂盒的检测单元 1 和 2 来测量施用 EPPS 前后收集的血浆中  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度。通过计算单元使用 [ 等式 1 ] 由所测量的浓度计算 B-A。三次测量的平均值如表 1-5 所示。

[0113] [ 表 1 ]

[0114]

分类	年幼的 (5-6个月)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A	52.15	20.43	191.3	124.7	108.0	102.3	89.53	94.18	146.8	22.67	98.54
(第1天)	1	0	98	31	65	26	5	6	02	4	7

[0115] [ 表 2 ]

[0116]

分类	年老的 (7.2个月或更大)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A (第1天)	78.80	12.44	15.38	7.373	182.8	10.13	13.36	7.373	11.06	41.43	20.27
	2	2	5		67	8	4		0	4	6
分类	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A (第1天)	4.147	16.12	194.5	18.89	6.119	345.9	19.81	156.2	180.5	140.5	
		9	80	4		79	6	94	94	59	

[0117] [表 3]

[0118]

分类	年老的 (7.2个月或更大)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A (第5天)	93.53	76.04	170.9	86.12	108.9	311.8	134.9	170.6	207.6	163.9	51.58
	1	9	79	2	16	20	65	56	92	86	4
分类	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A (第5天)	55.11	88.44	105.4	130.0	118.0	70.10	185.3	66.25	214.5	209.7	
	5	1	20	96	07	5	15	9	49	11	

[0119] [表 4]

[0120]

分类	年老的 (7.2个月或更大)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A (第19天)	298.5	70.59	86.10	129.0	57.48	53.29	43.82	101.2	82.44	52.80	-
	04	6	8	25	7	4	6	21	4	9	
分类	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A (第19天)	-	131.5	88.69	61.72	27.07	32.70	22.40	20.51	59.40	136.8	
		69	5	5	0	8	6	5	9	14	

[0121] [表 5]

[0122]

分类	年老的 (7.2个月或更大)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A (第33天)	114.3 3	148.1 54	21.59 9	71.41 0	4.797	24.24 0	11.07 9	42.62 1	31.96 9	23.50 9	-
分类	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A (第33天)	-	39.23 7	23.44 8	33.90 2	41.59 6	59.54 5	31.76 2	51.29 2	78.10 1	60.17 9	

[0123] 由表 1-5 可见,所有小鼠在 EPPS 施用之后 24 小时 (1 天) 由  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度测量所计算的 B-A 的值都是正 (+) 值,表明在施用 EPPS 之后血液中  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度升高。由于使用根据本公开内容的试剂盒确认了在  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物形成的小鼠模型中施用 EPPS 之后血浆中  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度升高,可见,本公开内容的诊断试剂盒可以用于更准确地诊断或预测阿尔茨海默病、痴呆等。

[0124] 由图 3a 可见,在 5-6 月龄 (年幼的) 和 7.2 月龄 (年老的) 小鼠中施用 EPPS 之后,观察到  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 浓度的显著升高。

[0125] 施用 EPPS 之后 19 天开始, B-A 的值开始降低,尽管根据个体不同会存在一些差异。这是因为,由于在预定时间之后通过药物清除了脑中的蛋白质聚集物,从脑运输至血液中的蛋白质聚集物的量也降低了。相应地,施用 EPPS 之后随时间升高的血液中蛋白质聚集物的量在预定时间之后降低,表明脑中的蛋白质聚集物也降低了。因此,可通过长期的药物施用和血液检测来监测脑中的蛋白质聚集物的降低。

[0126] 由图 3b 中可见,7.2 月龄 (年老的) 小鼠  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 的浓度显示出显著升高后降低。这就是说,脑中的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物的解离和运输至血液可以使用所述诊断试剂盒来观测。此外,还可观测预定时间之后血液中  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度的降低。由此可见,血液诊断试剂盒不仅能够诊断疾病,还可以监测脑中蛋白质聚集物的降低。

[0127] < 实施例 2> 测量血液中聚集蛋白质解离浓度的诊断试剂盒

[0128] 使用 APP/PS1/Tau 转基因小鼠的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体浓度的测量以及阿尔茨海默病的诊断

[0129] 1. 准备小鼠

[0130] 使用 5 月龄雌性 APP/PS1/Tau 转基因小鼠作为测试动物。

[0131] 转基因 APP/PS1/Tau 小鼠模型是购自 Jackson Laboratory (USA) 的 B6; 129-Psen1tm1MpmTg (APP<sup>Swe</sup>, tauP301L) 1Lfa/Mmjax 小鼠,根据实验动物伦理委员会的指导进行饲养和用于实验。

[0132] 2. 血浆和全血处理

[0133] 用含有 Roche Complete Mini (蛋白酶抑制剂) 溶液的经 K2 EDTA 处理的真空管收集血液并离心。将与细胞级分离的血浆收集在 Eppendorf 管中并制成 0.1mL 样品,立即使用或储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  以备以后使用。用 Eppendorf 管收集全血,用 EPPS 处理并将血浆与细胞级分离,将其制成 0.1ml 样品,立即用于测量  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度或储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  以备以后使用。

[0134] 3. 样品处理和  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度的测量

[0135] 血浆用水（对照组）或 EPPS (EPPS 组) 处理。

[0136] 对于 EPPS 组, 用  $5 \mu\text{L}$  的  $400\text{mM}$  EPPS 处理  $15 \mu\text{L}$  血浆, 从而使 EPPS 终浓度为  $100\text{mM}$ 。对于对照组, 用  $5 \mu\text{L}$  PBS 处理  $15 \mu\text{L}$  血浆, 使得血浆浓度与 EPPS 组的浓度相同。每个对照组和 EPPS 组在  $4^\circ\text{C}$  下搅拌 24 小时。

[0137] 用 EPPS 处理之后对全血进行分析。

[0138] 用  $5 \mu\text{L}$   $500\text{mM}$  EPPS 处理  $15 \mu\text{L}$  全血, 从而使 EPPS 终浓度为  $100\text{mM}$ 。在  $4^\circ\text{C}$  下搅拌 24 小时后离心, 收集血浆来测量  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度。

[0139] 使用检测单元 1 和 2 测量每份血浆中  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度, 使用测量单元利用 [等式 2] 计算 MB/MP。三次测量的平均值如表 6 所示。

[0140] 表 6 显示了对照组的血浆单体浓度 (UP A $\beta$ )、EPPS 组的全血单体浓度 (MP A $\beta$ ) 和 EPPS 组的全血单体浓度 (MB A $\beta$ ), 以及 UP/MP 和 MB/MP 值。

[0141] [表 6]

[0142]

分类	UP A $\beta$	MP A $\beta$	MB A $\beta$	UP/MP	MB/MP
浓度	45.52 $\pm$ 17.10	49.53 $\pm$ 19.92	30.00 $\pm$ 5.32	0.92	0.61
P 值 (MP 的 成对 t 检验)	0.00675	-	0.00004	-	-

[0143] 由表 6 可见, 由于 EPPS 组的全血中单体浓度 (MP A $\beta$ ) 高于对照组血浆中单体浓度 (UP A $\beta$ ), 确认了  $\beta$ -淀粉样蛋白被 EPPS 解离成了单体。EPPS 组的全血中单体浓度 (MB A $\beta$ ) 低于 UP A $\beta$  (图 5)。

[0144] 此外, 因为由对照组血浆中的单体浓度 (UP A $\beta$ ) 和 EPPS 组血浆中的单体浓度 (MP A $\beta$ ) 计算出的 UP/MP 值小于 1.0 (为 0.92), 并且由 EPPS 组的全血中的单体浓度 (MP A $\beta$ ) 和 EPPS 组全血中的单体浓度 (MB A $\beta$ ) 计算出的 MB/MP 值小于 1.0 (为 0.61), 可以诊断为处于发生阿尔茨海默病或痴呆风险中的状态。因为使用根据本公开内容的试剂盒确认了在形成  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物的小鼠模型中施用 EPPS 之后全血中  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度降低, 可见, 本公开内容的诊断试剂盒可以用于更准确地诊断或预测阿尔茨海默病、痴呆等。

[0145] 进一步对 UP A $\beta$ 、MP A $\beta$  和 MB A $\beta$  进行解释, UP A $\beta$  代表的是含有各种形式的  $\beta$ -淀粉样蛋白 (如,  $\beta$ -淀粉样蛋白二聚物、寡聚物、前原纤维、原纤维和斑块、 $\beta$ -淀粉样蛋白 40/42 聚集物、结合到其他蛋白质上的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体、结合到其他蛋白质上的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物、结合到脂肪的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合到碳水化合物的  $\beta$ -淀粉样蛋白、结合到核酸的  $\beta$ -淀粉样蛋白和结合到血细胞的  $\beta$ -淀粉样蛋白单体) 的血浆, MP A $\beta$  代表的是含有已与 UP A $\beta$  分离并被解离的  $\beta$ -淀粉样蛋白的血浆, MB A $\beta$  代表的是包含在用 EPPS 处理了全血之后被分离的  $\beta$ -淀粉样蛋白的血浆。据此, UP A $\beta$  = [混杂 A $\beta$ ], MP A $\beta$  = [总 A $\beta$  单体], MP A $\beta$  - MB A $\beta$  = [聚集物 A $\beta$ ].

## [0146] &lt; 实施例 3 &gt; 测量血液中聚集蛋白质的解离浓度的诊断试剂盒

[0147] 使用 APP/PS1 转基因小鼠测量  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚物浓度

## [0148] 1. 准备小鼠

[0149] 使用 9 月龄雌性 APP/PS1 转基因小鼠作为测试动物。

[0150] 转基因 APP/PS1 小鼠模型是购自 Jackson Laboratory (USA) 的 B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/Mmjax 小鼠, 根据实验动物伦理委员会的指导进行饲养和用于实验。

[0151] 以与实施例 1 相同方式进行样品处理和  $\beta$ -淀粉样蛋白的浓度测量。

[0152] 表 7 显示了对照组血浆中的单体浓度 (UP A $\beta$ ), EPPS 组血浆中的单体浓度 (MP A $\beta$ ) 和 EPPS 组全血中的单体浓度 (MB A $\beta$ ), 以及 UP/MP 和 MB/MP 值。3 次测量的平均值如表 7 所示。

[0153] [表 7]

[0154]

分类	UP A $\beta$	MP A $\beta$	MB A $\beta$	UP/MP	MB/MP
浓度	151.35 $\pm$ 20.35	151.58 $\pm$ 24.03	118.92 $\pm$ 10.22	0.99	0.79
P 值 (MP 的 成对 t 检验)	0.480	-	0.015	-	-

[0155] 由表 7 可见, EPPS 组全血中单体浓度 (MB A $\beta$ ) 低于 UP A $\beta$  (图 6)。因为由对照组血浆中单体浓度 (UP A $\beta$ ) 和 EPPS 组血浆中单体浓度 (MP A $\beta$ ) 计算得到的 UP/MP 值小于 1.0 (为 0.99), 并且由 EPPS 组血浆中单体浓度 (MP A $\beta$ ) 和 EPPS 组全血中单体浓度 (MB A $\beta$ ) 计算得到的 MB/MP 值小于 1.0 (为 0.79), 可以诊断为处于阿尔茨海默病或痴呆的风险状态。

[0156] 因为使用根据本公开内容的试剂盒确认了在形成  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集物的小鼠模型中施用 EPPS 之后全血中  $\beta$ -淀粉样蛋白浓度降低, 可见, 本公开内容的诊断试剂盒可以用于更准确地诊断或预测阿尔茨海默病、痴呆等。

[0157] [工业实用性]

[0158] 本公开内容的诊断试剂盒可用于诊断与蛋白质异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症。

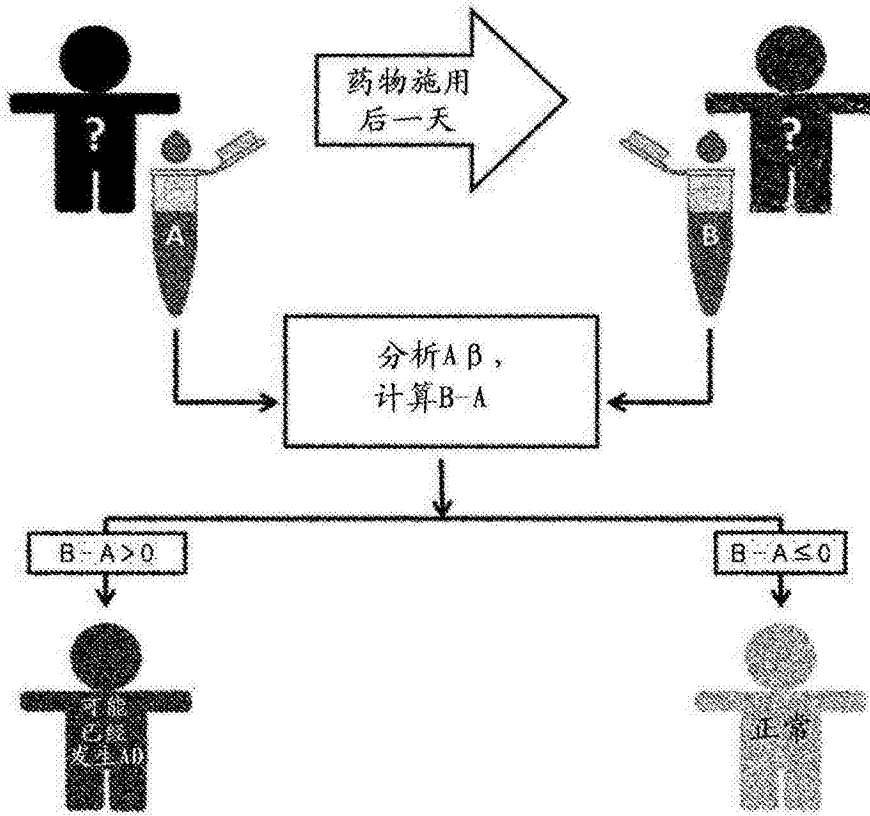


图 1

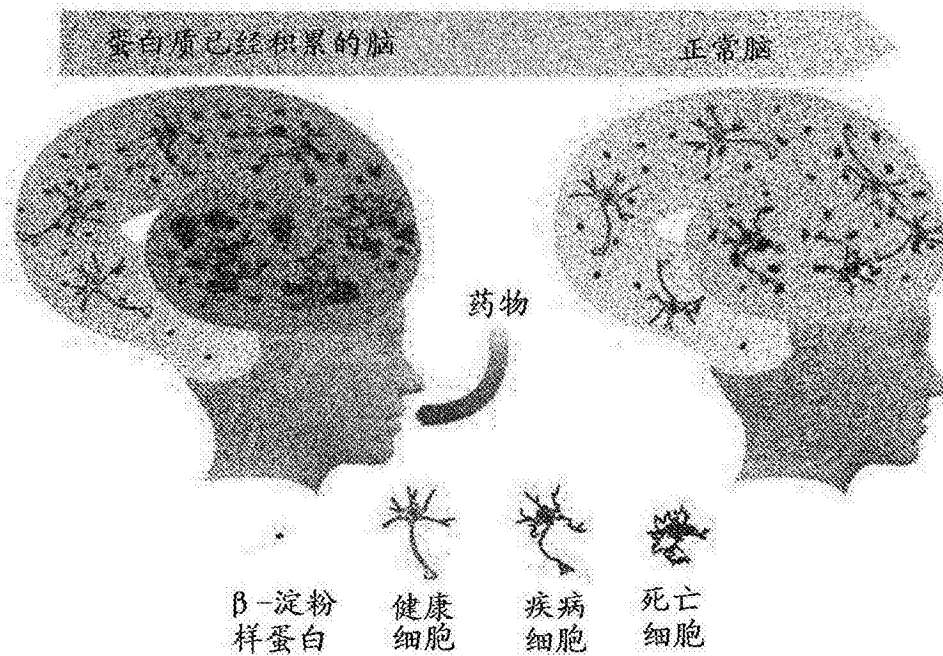


图 2

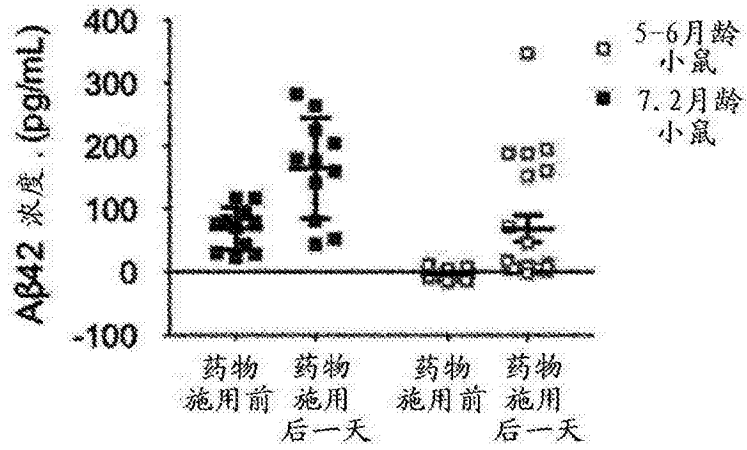


图 3a

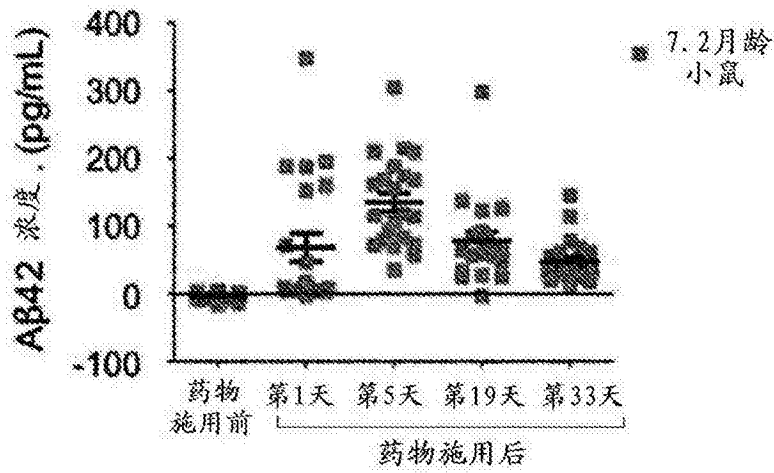


图 3b

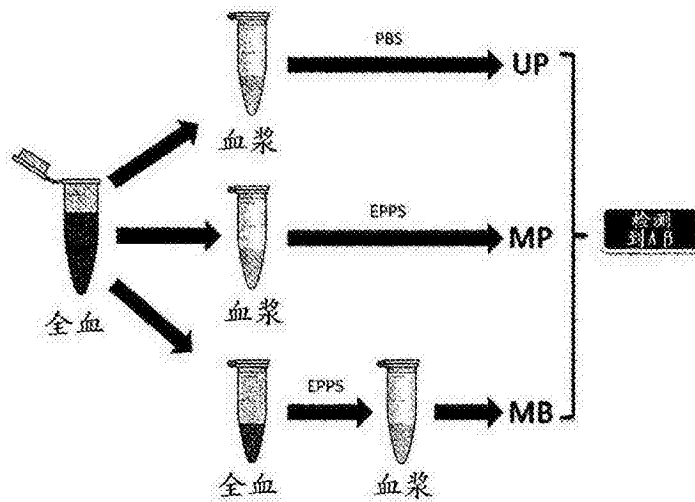


图 4

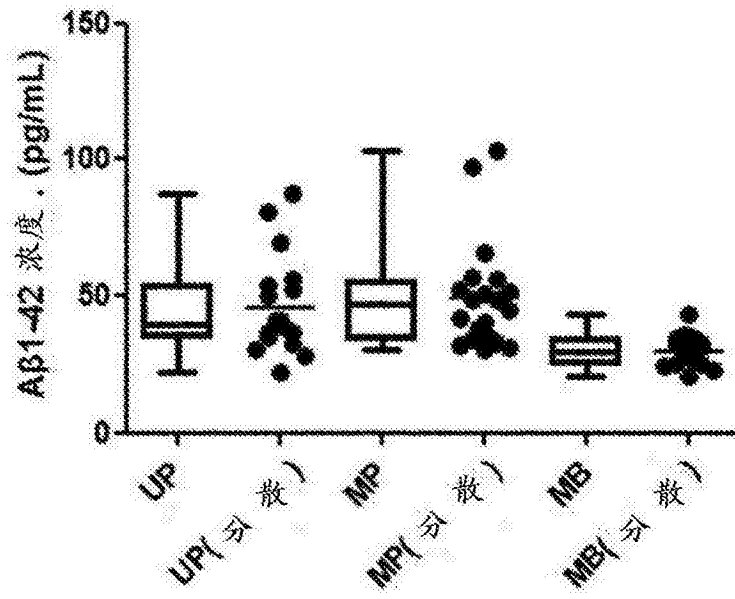


图 5

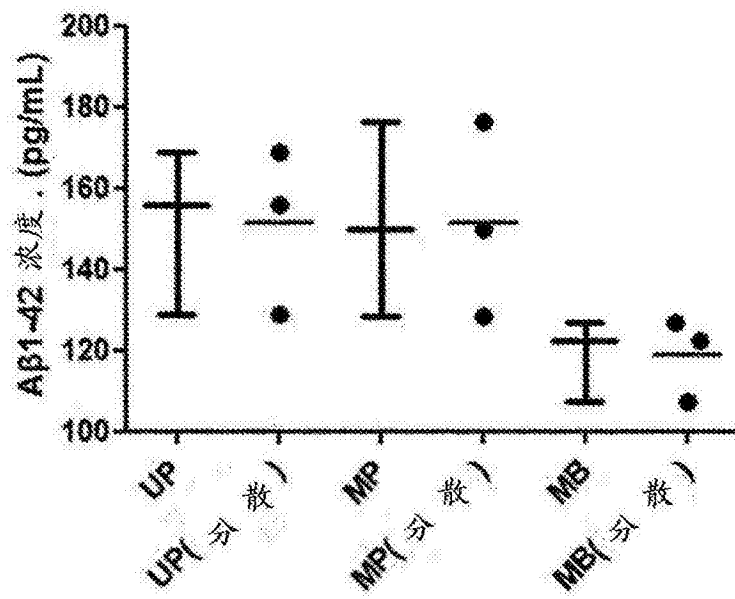
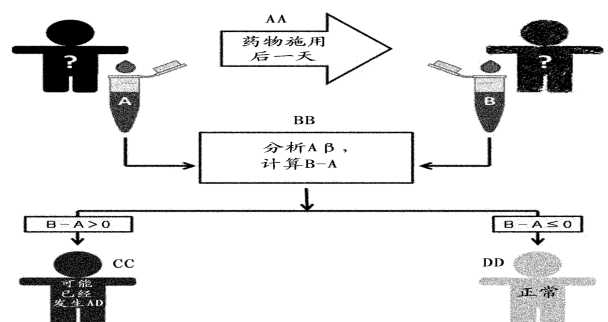


图 6

专利名称(译)	利用蛋白质聚集物的解离来诊断与异常蛋白质聚集或错误折叠相关之疾病的诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN105339798A</a>	公开(公告)日	2016-02-17
申请号	CN201480036335.7	申请日	2014-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	韩国科学技术研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国科学技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	韩国科学技术研究院		
[标]发明人	金泳秀 金东辰 金惠渊 曹秀民 金泰松 金贤真 李世真		
发明人	金泳秀 金东辰 金惠渊 曹秀民 金泰松 金贤真 李世真		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/1716 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 C12Q1/6886 G01N15/06 G01N33/49 G01N33/5091 G01N33/68 C07K14/4711 G01N33/6827 G01N33/6893		
代理人(译)	郑斌		
优先权	1020140038989 2014-04-02 KR 1020140038988 2014-04-02 KR 61/816343 2013-04-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本公开内容涉及一种诊断试剂盒，其能够基于对解离前后之聚集蛋白质的浓度分析，准确诊断与蛋白质的异常聚集或错误折叠相关之疾病或病症，包括由β-淀粉样蛋白聚集引起的病症或疾病(例如阿尔茨海默病)以及由其他蛋白质聚集引起的病症或疾病。



AA... 药物注射一天

BB... 根据 AB 分析和 B-A 值进行分类

CC... AD 发生的可能性

DD... 正常