



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103547593 B

(45) 授权公告日 2016.04.20

(21) 申请号 201280018250.7

(22) 申请日 2012.04.03

(30) 优先权数据

11382107.8 2011.04.12 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.10.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/ES2012/070231 2012.04.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/140296 ES 2012.10.18

(73) 专利权人 艾拉科隆生物技术公司

地址 西班牙萨拉戈萨

(72) 发明人 曼努埃尔·萨拉萨·巴里奥

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101861521 A, 2010.10.13,

Michael Bachera et al..Peripheral and central biodistribution of <sup>111</sup>In-labeled

anti-beta-amyloid autoantibodies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.《Neuroscience Letters》.2009, 第449卷(第3期), 240-245.

Irina Perdivara et al..Determination of primary structure and microheterogeneity of a  $\beta$ -amyloid plaque-specific antibody using high-performance LC-tandem mass spectrometry.《Analytical and Bioanalytical Chemistry》.2008, 第391卷(第1期), 325-336.

审查员 马驰

权利要求书3页 说明书36页  
序列表4页 附图8页

(54) 发明名称

用于确定淀粉样肽的抗体、试剂盒和方法

(57) 摘要

本发明涉及能够使用抗A $\beta$ 17抗体检测A $\beta$ 17肽的免疫测定领域,以及使用所述抗体的试剂盒和方法。本发明还涉及用于诊断或区分神经退行性疾病的不同阶段的方法。

1. 一种特异性结合至A $\beta$ (1-17)肽的抗体,其对选自由以下组成的组中的A $\beta$ 肽并不显示显著的交叉反应性:A $\beta$ (1-15)、A $\beta$ (1-16)、A $\beta$ (1-38)、A $\beta$ (1-40)、A $\beta$ (1-42)和它们的一种或多种的组合。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述抗体是多克隆抗体。

3. 一种用于检测A $\beta$ (1-17)肽的试剂盒,包括:

(i) 第一抗体,其是如权利要求1-2中任一项所定义的抗体,和

(ii) 第二抗体,其识别不同于所述第一抗体所识别的区域的所述A $\beta$ (1-17)肽的区域。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其中所述第一抗体或所述第二抗体偶联至结合对的第一元件。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,还包含所述结合对的第二元件,其中所述结合对的所述第二元件偶联至可检测标记。

6. 第一抗体和第二抗体在制备用于确定或检测样品中A $\beta$ (1-17)肽的试剂中的应用,所述第一抗体特异性地结合至所述A $\beta$ (1-17)肽,所述第二抗体如权利要求1至5中任一项所定义并且其中所述第二抗体识别不同于所述第一抗体的区域;其中,所述确定或检测包括以下步骤:

(i) 用所述第一抗体捕获样品中存在的所述A $\beta$ (1-17)肽,

(ii) 用所述第二抗体接触步骤(i)中形成的免疫复合物,其中所述第二抗体与结合对的第一元件偶联;

(iii) 用偶联至可检测标记的结合对的第二元件接触在步骤(ii)中形成的复合物,和

(iv) 检测或确定所述可检测标记的活性或量。

7. 如权利要求6中所定义的应用,其中所述样品选自下组中:血液、血清、血浆和脑脊液。

8. 确定来自受试者的样品中A $\beta$ 17肽的水平,其中所述监测包括:

(a) 在第一时间点确定来自所述受试者的样品中血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平,和所述受试者样品中血液样品中结合至细胞的A $\beta$ 17肽的水平;

(b) 在第二时间点确定来自所述受试者的样品中血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平,和所述受试者的样品中血液样品中结合至细胞的A $\beta$ 17肽的水平,以及

(c) 比较在所述第一时间点和第二时间点血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平与血液样品中结合至细胞的A $\beta$ 17肽的水平的比率;

其中如果所述比率在第二时间点相对于第一时间点升高,则它指示在所述第一时间点和所述第二时间点之间所述受试者体内阿尔茨海默氏病的恶化。

9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默氏病。

10. 根据权利要求8或9中任一项所述的应用,其中使用如权利要求6或7中任一项所定义的方法进行所述A $\beta$ 17肽水平的水平确定。

11. 测定来自受试者的样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的药剂在制备用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的试剂中的应用,包括确定选自由以下组成的组中的一个或多个参数的值:

(a) 结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加

和值；

(b)来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

和

(c)来自所述受试者的血浆样品中游离A $\beta$ 17的水平 and 结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平之间的比率值；

其中如果所述参数中一个或多个的值相对于健康受试者体内参考样品中所述参数的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

12.测定来自受试者的样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的药剂在制备用于确定受试者是否患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的试剂中的应用,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

(a)来自所述受试者的血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值；

(b)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值；

(c)两个参数之间的比率值,其中第一参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 17肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和水平,而第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和水平；

(d)两个参数之间的比率值,其中第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平,而第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;和

(e)两个参数之间的比率值,其中第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 17肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

其中如果相对于健康受试者的参考样品中的值,参数(a)的值增加和/或参数(b)、(c)、(d)或(e)中的一个或多个的值降低,则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

13.测定来自受试者的样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的药剂在制备用于确定受试者是否患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的试剂中的应用,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

(a)结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

(b)结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值；

(c)两个参数之间的比率值,其中第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而第二参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值；

(d)两个参数之间的比率值,其中第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平,而第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

(e)两个参数之间的比率值,其中第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17

总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而第二参数对应于血浆样品中A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

其中如果相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值,(a)的值增加和/或所述参数(b)、(c)、(d)和(e)中的一个或多个的值降低,则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

14.测定来自受试者的样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的药剂在制备用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的试剂中的应用,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

(a)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

(b)血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

(c)两个参数之间的比率,其中第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平,而第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;以及

(d)血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;

其中如果所述参数中一个或多个的值相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

15.测定来自受试者的样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的药剂在制备用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的试剂中的应用,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

(a)血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与血浆样品中游离的A $\beta$ 40肽水平之间的比率值;和

(b)两个参数之间的比率,其中第一参数对应于血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平,而第二参数对应于血浆样品中游离的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽的加和水平;

其中如果所述参数中一个或多个的值相对于前驱性轻度认知障碍受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

## 用于确定淀粉样肽的抗体、试剂盒和方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫测定领域,其允许通过使用抗A $\beta$ 17抗体来检测A $\beta$ 17肽以及使用所述抗体的试剂盒和方法。本发明还涉及用于诊断或区分神经退行性疾病的不同阶段的方法。

### 背景技术

[0002] 阿尔茨海默氏病(AD)是中枢神经系统的进行性退行性疾病,其特征为进行性并且渐增的记忆力丧失,然后丧失对四肢和身体功能的控制,最终死亡。它是迄今为止造成痴呆病的最常见的原因,其影响了1至6%的65岁以上的人群,和10至20%的80岁以上的人群。

[0003] AD通过几种病理特征与其他类型的痴呆病区别开,包括在患者的脑中进行性出现在神经元之间的细胞外间隙中的老年斑。所述斑块具有淀粉样沉积物的中间核心,所述淀粉样沉积物主要由被退行性轴突和胶质细胞环绕的称为 $\beta$ 淀粉样肽(A $\beta$ )的具有40-42个氨基酸肽的纤丝(fibril)形成。这种肽是由称为 $\beta$ 淀粉样前体蛋白(BAPP)的前体蛋白的蛋白水解处理产生的。

[0004] 神经病学、语言障碍和脑卒中国家研究所(NINCDS)和阿尔茨海默氏病及相关病症协会(ADRDA)在1984年建立了最常用的NINCDS-ADRDA阿尔茨海默氏病诊断标准。根据NINCDS/ADRDA。这些标准如下所示:

[0005] • 确定性阿尔茨海默氏病:患者满足疑似阿尔茨海默氏病的标准并且通过尸体解剖或活检表现出AD的组织病理学证据。

[0006] • 疑似或前驱性阿尔茨海默氏病:已通过临床和神经心理学检查确立痴呆病。认知障碍还必须是进行性的并且在两个或更多个认知区域中存在。缺陷的发生是在40岁至90岁之间,并且最终必须不存在能够产生痴呆病综合征的其他疾病。

[0007] • 可能或非前驱性阿尔茨海默氏病:存在痴呆病综合征,具有非典型性发病、出现或发展;并且无已知的病原学;但是认为没有能够产生痴呆病的共病疾病是它的来源。

[0008] • 不可能的阿尔茨海默氏病:在病程早期,患者出现具有突然发病、局灶性神经病征兆(focal neurologic sign)或癫痫发作或步态障碍的痴呆病综合征。

[0009] 轻度认知障碍(MCI,也称为早期痴呆病或孤立的记忆障碍(isolated memory impairment))是对患有超出对他们的年龄和教育情况的预期之外的认知障碍,但并不显著干扰他们的日常活动的个体给予的诊断(Petersen RC等人,(1999)Arch.Neurol.56(3):303-8)。它被认为是自然衰老和痴呆病之间的界限或过渡阶段。尽管MCI能够以多种症状出现,但当记忆力丧失是主要症状时,则将它称作“记忆缺失性MCI”并通常将它看作阿尔茨海默氏病的风险因数(Grundman M等人,(2004).Arch.Neurol.61(1):59-66)。研究表明这些个体倾向于以每年约10%至15%的速度发展成疑似或前驱性阿尔茨海默氏病(Grundman M等人,同上)。另外,当个体在除记忆力之外的领域具有损伤时,则将其分类为非记忆缺失性单域或多域MCI并且认为这些个体更可能转化为其他痴呆病(Tabert MH等人,(2006).Arch.Gen.Psychiatry 63(8):916-24)。

[0010] MCI的诊断需要大量临床判断,并且照此包括临床观察、神经影像、血液测试和神经心理学测试的综合临床评价是最佳的以排除替代性诊断。类似的评价通常用于诊断阿尔茨海默氏病。当存在以下情况时,诊断为MCI(Morris JC等人,(2001).Arch.Neurol.58(3):397-405):

[0011] -记忆缺陷的迹象

[0012] -一般认知和功能能力的维持

[0013] -无确诊的痴呆病。

[0014] 在过去十年里,已经进行了几种尝试以通过使用血浆、血清或循环细胞来识别外周标志物。具体地,由于淀粉样斑块是阿尔兹海默氏病神经病理学的确定特征并且可以在血浆中检测到A $\beta$ ,因此它的测量是阿尔兹海默氏病令人信服的候选生物标志物。

[0015] 在临床实践中,使用基于典型临床标志存在的临床标准并且使用神经影像技术和血液分析排除其他类型痴呆病来进行AD诊断。使用这些标准,诊断可靠性是可接受的,尽管根据使用脑部尸检进行的研究,10-20%诊断为AD的患者患有不同的疾病。此外,当前的诊断方法只可以在神经退行性过程发展使得患者患有严重的痴呆病并且脑损伤扩展使得治疗措施的数量有限时进行。确定性诊断需要死后脑组织的病理检查。

[0016] 鉴于A $\beta$ 在AD患者脑中积累并且是AD病理发生的中心元素的事实,该蛋白已被认为是AD生物标志物的最合适的候选物。然而,使用A $\beta$ 作为AD的血浆生物标志物面临以下问题:血清中A $\beta$ 肽(A $\beta$ (1-40)和A $\beta$ (1-42))的浓度极低从而没有足够灵敏的测定以允许可靠地检测所述肽物质。

[0017] 多种不同的测定已用于确定生物样品中淀粉样 $\beta$ 肽的水平(参见,例如,Scheuner等人(Nature Med.,1996,2:864-870);Tamaoka A等人(J Neurol Sci.,1996,141,65-68);Suzuki,N.等人(Science,1994,264:1336-1340);W0200722015;Vanderstichele H等人(Amyloid,2000,7,245-258);Fukomoto y col.(Arch.Neurol.2003,60,958-964);Mehta等人(Arch.Neurol.57,2000,100-105);Mayeux,R.等人(Ann Neurol.1999,46,412-416);Lanz,T.A和Schachter,J.B.(J.Neuroscience Methods,2006,157:71-81)、W0200750359、W00162801、W00315617、W00246237、W00413172所述的方法)。然而,所有目前已知的基于ELISA的测定的检测下限至多不在个位数pg/mL的范围内,该检测下限足以检测患有常见AD的患者的CSF中的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42以及用于检测血浆中的所述物质,但是不适合检测患有偶发AD的患者的血浆中的A $\beta$ 42,其中所述A $\beta$ 42的血浆浓度要低得多。

[0018] 到目前为止,仅显示检测下限低于个位数pg/mL的A $\beta$ 肽测定对应于W0200646644和W02009015696中所述的测定。

[0019] W0200646644描述了电化学发光(ECL)夹心测定,其中mAb21F12(其识别A $\beta$ 42的氨基酸33-42)偶联至磁珠,然后用于捕获含有A $\beta$ 42的样品中的A $\beta$ 42肽并进一步与偶联至钌复合物的3D6mAb接触。然后当施加电能时,通过钌复合物所发出的光来检测所结合的3D6抗体的量。使用这种测定,发明人能够检测低至0.5pg/mL的A $\beta$ 42标准品。然而,当使用相同测定来比较来自AD患者和健康对照的血浆样品中的A $\beta$ 42时,在两组患者之间未观察到显著差异,这使得该发明人得出由于降解作用血清中完整A $\beta$ 42的量非常低的结论并且转向使用提供ng/mL范围的更低灵敏度水平的21F12mAb的竞争性ELISA测定。

[0020] W02009015696描述了高灵敏度ELISA夹心测定,其中检测抗体与对所述抗体显示

出特异性的生物素标记的试剂接触。所述试剂与偶联至过氧化物酶的链霉亲和素接触。然后,通过使用TMB的比色法或使用QuantaBlue的荧光法检测过氧化物酶活性。

[0021] W02006053251描述了用于确定样品中淀粉样 $\beta$ 肽物质的方法,包括将样品与变性剂接触,从样品-变性剂混合物中提取肽集合(peptide pool),将淀粉样 $\beta$ 肽物质与所述集合分离并确定淀粉样 $\beta$ 肽物质的量。该方法需要在所述确定之前分离肽的步骤,这导致处理时间增长和成本提高。

[0022] 通过检测患者脑或CSF中存在的生物标志物的水平来诊断AD是现有技术中已知的方法。已表征了不同的生物标志物,它们的确定是在CSF中进行的。CSF直接反映了中枢神经系统的细胞外间隙的组成,并因此提供了更高浓度作为生物标志物。然而,CSF只可以通过腰椎穿刺获得,这不是患有痴呆病的患者容易接受的常规诊断方法,更不用说患有记忆力失调的患者。因此,需要可以在可以从身体中无创伤地取得的样品中检测的AD生物标志物。

[0023] 在现有技术中描述的并且可以在血浆中检测的适合的AD生物标志物包括(i)源自淀粉样斑块的标志物、(ii)抗A $\beta$ 或 $\beta$ APP的自身抗体、(iii)炎症标志物(如IL-6)、其受体或gp130、C-反应性蛋白或氧化性应激(异前列腺烷)、(iv)脂类代谢标志物(apoE、氧化固醇)和(v)血管病标志物(高半胱氨酸、脂蛋白b Clq(Scheuner D等人,(1996)Nature Med 2, 864-870)。

[0024] 然而,鉴于A $\beta$ 在AD患者脑中积累并且是AD发病的中心元素的事实,该蛋白已被认为是AD生物标志物的最合适的候选物。然而,使用A $\beta$ 作为AD的血浆生物标志物面临以下问题:血清中A $\beta$ 肽(A $\beta$ (1-40)和A $\beta$ (1-42))的浓度极低从而没有足够灵敏的测定以允许可靠地检测所述肽物质。

[0025] 此外,已描述了用于检测A $\beta$ 肽以及用于免疫测定的几种抗体。例如,单克隆抗A $\beta$ (1-17)(6E10)是针对A $\beta$ 肽的N端区域并且对抗肽A $\beta$ (1-17)产生的抗体(Kim KS等人, Neurosci. Res. Comm. 7; 1988)并且识别包含所述区域的A $\beta$ 肽或者是对抗肽A $\beta$ (1-28)产生的单克隆抗体(Pierce)。

[0026] 然而,在本领域中需要改善的免疫学测定和试剂盒用来检测源自A $\beta$ 的肽,其克服了本领域中已知的方法和试剂盒的问题,具体地,它们足够灵敏以通过可靠的方式检测患有偶发性AD的患者的血浆中的A $\beta$ 肽。还需要鉴别针对AD早期诊断的生物标志物,它是灵敏并且特异性的,并且它能够区分由于年龄所造成的认知障碍和与该过程的早期症状有关的那些,以及区分由于AD和由于其他退行性病症造成的改变。根据Growdon等人(Neurobiol. Aging, 1998, 19: 109-116),AD的理想标志物应满足以下要求:

[0027] -它应检测神经病理学的基本特征

[0028] -它应在神经病理学确认的病历中有效

[0029] -它应对AD检测显示出至少80%的灵敏度

[0030] -它应对区分AD和其他类型的痴呆病显示出至少80%的特异性,和

[0031] -它应当可靠地、可重复地、无创地,简单地实施并且应是廉价的。

## 发明内容

[0032] 在一个方面,本发明涉及特异性结合至A $\beta$ (1-17)肽的抗体。

[0033] 在第二个方面,本发明涉及用于检测A $\beta$ (1-17)肽的试剂盒,包括:

- [0034] (i)第一抗体,它是如权利要求1至3中任一项所定义的抗体,和
- [0035] (ii)第二抗体,其识别不同于被所述第一抗体识别的区域的A $\beta$ (1-17)肽的区域。
- [0036] 在第三个方面,本发明涉及用于确定或检测样品中A $\beta$ (1-17)肽的方法,包括以下步骤:
- [0037] (i)用与A $\beta$ (1-17)肽特异性结合的第一抗体捕获样品中存在的所述肽,
- [0038] (ii)用第二抗体接触步骤(i)中形成的免疫复合物,其中所述第二抗体如权利要求1至4中任一项所定义并且其中所述第二抗体识别不同于所述第一抗体的区域并且与结合对的第一元件偶联;
- [0039] (iii)用偶联至可检测标记的结合对的第二元件接触在步骤(ii)中形成的复合物,和
- [0040] (iv)检测或确定所述可检测标记的活性或量。
- [0041] 在另一个方面,本发明涉及用于监测受试者体内神经退行性疾病的方法,包括:
- [0042] (a)在第一时间点确定来自所述受试者的样品中血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平和结合至所述受试者的样品中的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平;
- [0043] (b)在第二时间点确定来自所述受试者的样品中血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,以及
- [0044] (c)比较在所述第一和第二时间点血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的比率;
- [0045] 其中如果相对于第一时间点,在第二时间点所述比率升高,则它指示在所述第一和所述第二时间点之间受试者体内阿尔茨海默氏病的恶化。
- [0046] 在另一个方面,本发明涉及用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的方法,包括确定选自由以下组成的组中的一个或多个参数的值:
- [0047] (a)结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽的加和值;
- [0048] (b)来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;
- [0049] (c)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;
- [0050] (d)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;
- [0051] (e)来自所述受试者的血浆样品中游离的A $\beta$ 17水平与结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;
- [0052] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于健康受试者体内参考样品中所述参数的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。
- [0053] 在另一个方面,本发明涉及用于确定受试者是否患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:
- [0054] (a)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;
- [0055] (b)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者

的血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0056] (c)来自所述受试者的血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值；

[0057] (d)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值；

[0058] (e)两个参数之间的比率值，其中所述第一参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 17肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的加和水平，而所述第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 42肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽的加和水平；

[0059] (f)两个参数之间的比率值，其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平，而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值；以及

[0060] (g)两个参数之间的比率值，其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 17肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值，而所述第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0061] 其中如果相对于健康受试者的参考样品中的值，参数(a)、(b)或(c)中的一个或多个的值增加和/或参数(d)、(e)、(f)或(g)中的一个或多个的值降低，则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

[0062] 在另一个方面，本发明涉及用于确定受试者是否患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的方法，包括确定选自下组的一个或多个参数的值：

[0063] (a)结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0064] (b)结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值；

[0065] (c)两个参数之间的比率值，其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值，而所述第二参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0066] (d)两个参数之间的比率值，其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平，而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0067] (e)两个参数之间的比率值，其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值，而所述第二参数对应于血浆样品中A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0068] 其中如果相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值，(a)的值增加和/或所述参数(b)、(c)、(d)和(e)中的一个或多个的值降低，则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

[0069] 在另一个方面，本发明涉及用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的方

法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0070] (a)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0071] (b)血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0072] (c)血浆样品中总A $\beta$ 42肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0073] (d)血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0074] (e)血浆样品中总A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平的加和值;

[0075] (f)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;以及

[0076] (g)血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;

[0077] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0078] 在另一个方面,本发明涉及用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0079] (a)血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与血浆样品中游离A $\beta$ 40肽水平之间的比率值;和

[0080] (b)两个参数之间的比率,其中所述第一参数对应于血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平,而所述第二参数对应于血浆样品中游离A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽的加和水平;

[0081] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于前驱性轻度认知障碍受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

#### 附图说明

[0082] 图1:使用多克隆抗A $\beta$ (1-17)抗体和吸附至薄膜的不同的A $\beta$ 肽进行的斑点印迹测定的结果。所述测定中使用的第二抗体是山羊抗兔抗体-HRP。通过SNAP技术在1分钟和3分钟曝光下用ECL显影斑点印迹。

[0083] 图2显示了CSF样品(2A)和血浆样品(2B)的质谱分析,其中用箭头指示A $\beta$ 17峰。

[0084] 图3显示了在不同患者组中一些标志物的平均值。FP:血浆中游离的A $\beta$ ;TP:血浆中的总A $\beta$ ;CB:结合至细胞的A $\beta$ ;PIB:血液中的集合(血浆中的总A $\beta$ +结合至细胞的A $\beta$ )。(A)针对不同组在夹心ELISA中获得的A $\beta$ 标志物的浓度(以pg/mL为单位):CS>65(大于65岁的健康受试者)、可能MCI(患有具有可能或非前驱性AD的轻度认知障碍的受试者)、疑似MCI(患有具有疑似或前驱性AD的轻度认知障碍的受试者)和轻度AD(患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者)。(B)和(C):表示针对在不同组上几种标志物在ELISA中获得的吸光值的图。

[0085] 图4显示了在不同患者组中一些标志物的平均值。FP:血浆中游离的A $\beta$ ;TP:血浆中的总A $\beta$ ;CB:结合至细胞的A $\beta$ ;PIB:血液中的集合(血浆中的总A $\beta$ +结合至细胞的A $\beta$ )。(A)针对不同组在夹心ELISA中获得的A $\beta$ 标志物浓度(以pg/mL为单位)的比率:CS>65(大于65岁的健康受试者)、可能MCI(可能或非前驱性轻度认知障碍)、疑似MCI(疑似或前驱性轻度认知

障碍)和轻度AD(轻度阿尔茨海默氏病)。(B)表示针对在不同组上的几种标志物在ELISA中获得的吸光值的图。

[0086] 图5显示了在不同患者组中一些标志物的平均值。FP:血浆中游离的A $\beta$ ;TP:血浆中的总A $\beta$ ;CB:结合至细胞的A $\beta$ ;PIB:血液中的集合(血浆中的总A $\beta$ +结合至细胞的A $\beta$ )。(A)针对不同组在夹心ELISA中获得的A $\beta$ 标志物浓度(以pg/mL为单位)的比率:CS>65(大于65岁的健康受试者)、可能MCI(可能或非前驱性轻度认知障碍)、疑似MCI(疑似或前驱性轻度认知障碍)和轻度AD(轻度阿尔茨海默氏病)。(B)表示针对在不同组上的几种标志物在ELISA中获得的吸光值的图。

[0087] 图6显示了用于区分不同组的血浆中游离的A $\beta$ 17(FP)和结合至细胞的A $\beta$ 17(CB)之间的比率。(A)针对不同组在夹心ELISA中获得的A $\beta$ 标志物的浓度(以pg/mL为单位):CS>65(大于65岁的健康受试者)、可能MCI(可能或非前驱性轻度认知障碍)、疑似MCI(疑似或前驱性轻度认知障碍)和轻度AD(轻度阿尔茨海默氏病)。(B)表示针对在不同组上的所述标志物在ELISA中获得的吸光值的图。

### 具体实施方式

[0088] 本发明人已产生了对A $\beta$ 17肽具有高度特异性的抗体,其并不识别其他A $\beta$ 种类。例如,图1显示所述抗体以特异性方式识别A $\beta$ 17而对其他A $\beta$ 种类(如A $\beta$ 15、A $\beta$ 16、A $\beta$ 38、A $\beta$ 40或A $\beta$ 42)不显示任何显著的交叉反应性。他们还设计了用于检测A $\beta$ 17肽的试剂盒,其允许对任何受试者的任何样品中的所述分子种类进行可靠的定量,具体地是怀疑患有AD的受试者的血浆中。同样地,本发明人显示有可能通过测量不同参数的水平区别不同组的受试者:健康受试者、前驱性AD受试者、非前驱性轻度认知障碍受试者和轻度AD受试者。

#### [0089] 本发明的抗体

[0090] 在第一个方面,本发明涉及特异性结合至A $\beta$ (1-17)肽(SEQ ID NO:1)的抗体,下文称为本发明的抗体。

[0091] 如本文所使用的术语“特异性结合”是指结合至A $\beta$ 17肽而不与其他A $\beta$ 肽具有任何显著交叉反应的抗体。在具体的实施方式中,对A $\beta$ 17肽的特异性高于50%,高于60%,高于70%,高于80%或高于90%。更优选地,所述抗体对A $\beta$ 17肽的特异性高于95%。如从图1中可见的,本发明人已测定了抗A $\beta$ 17抗体的特异性并且他们已显示所述抗体对A $\beta$ 17肽具有高度特异性并且对其他A $\beta$ 肽(A $\beta$ 15、A $\beta$ 16、A $\beta$ 38、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42)不显示出显著的交叉反应性。因此,在具体的实施方式中,本发明所述的抗体对选自由以下组成的组中的A $\beta$ 肽不显示出显著的交叉反应性:A $\beta$ 15、A $\beta$ 16、A $\beta$ 38、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42和它们一个或多个的组合。

[0092] 实际上,对根据本发明的抗体类型没有限制,只要含有对A $\beta$ 17具有特异性的至少一个抗原结合位点。因此,适合的抗体分子包括:

[0093] -“完整的”抗体,其包含抗原结合可变区以及轻链恒定域(CL)和重链恒定域CH1、CH2和CH3,

[0094] -“Fab”片段,通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化产生,并且其包含单抗原结合位点以及CL和CH1区,

[0095] -“F(ab')<sub>2</sub>”片段,通过完整抗体的胰蛋白酶消化产生,并且其含有两个抗原结合位点,

[0096] -“Fab”片段,其含有轻链恒定域和重链第一恒定域(CH1)并且其仅具有一个抗原结合位点。Fab’片段通过在重链CH1域的羧基端添加一些残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而不同于Fab片段。

[0097] -“Fv”是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由处于紧密、非共价结合的一个重链和一个轻链可变域的二聚体组成。它处于这种构象:每个可变域的三个高变区(CDR)相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。总体而言,六个高变区赋予抗体抗原结合特异性。然而,甚至单个可变域(或仅包含对抗原具有特异性的三个高变区的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管比整个结合位点的亲和力低。

[0098] -单链Fv或“scFv”抗体片段包含抗体的结构域VL和VH,其中这些结构域以单多肽链形式存在。优选地,VL和VH区通过多肽接头连接,从而使得scFv形成用于抗原结合的所需结构。

[0099] -“双链抗体”包含连接到通过肽接头连接的相同多肽链(VH-VL)上的轻链可变域(VL)的重链可变域(VH),所述肽接头太短从而不能在相同链上的两个结构域之间配对。这迫使与另一条链的互补域配对并促进二聚体分子与两个功能性抗原结合位点组装。

[0100] -“双特异性抗体”(BAb)为单个二价抗体(或其免疫治疗有效片段),其具有两个不同特异性的抗原结合位点。可以通过化学法或通过本领域中已知的基因工程方法将两个抗原位点偶联在一起。

[0101] 还可以使用本领域中已知的常规方法来修饰所有这些抗体片段,例如,通过单独或组合地使用氨基酸缺失、插入、取代、添加和/或重组(和/或本领域中已知的任何其他修饰(例如,翻译后修饰和化学修饰,如糖基化和磷酸化))。将这些修饰引入到免疫球蛋白链的氨基酸序列背后的DNA序列中的方法对于本领域技术人员是熟知的;参见,例如,Sambrook等人;“分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)”;  
Cold Spring Harbor Laboratory Press,第二版(1989)和第三版(2001)。

[0102] 适合于本发明的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体。为了生产多克隆抗体,可以通过用与具有免疫原性的AB17片段对应的肽注射使多种宿主(包括山羊、兔、大鼠、小鼠、绵羊、狗、骆驼、单峰驼、美洲驼、人、鸟类等)免疫。根据宿主种类,可以使用多种佐剂来提高免疫应答。这些佐剂包括(但不限于)弗氏佐剂、矿物凝胶(如氢氧化铝)和表面活性物质,如溶血卵磷脂、聚阴离子、肽、油乳剂、KLH和二硝基酚。在人中使用的佐剂中,BCG(卡介苗)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)是特别优选的。在优选的实施方式中,用于产生本发明所述的抗体的佐剂是弗氏完全佐剂、弗氏不完全辅剂和Imject明矾。

[0103] 将抗原结合至在有待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质可能是有用的。使用双官能试剂或衍生试剂(例如,马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐或SOCl<sub>2</sub>),用于与所述肽结合的蛋白质为,但不限于,钥孔血蓝素(KLH)、蓝色载体(Blue Carrier,分离自似鲍岩螺(*Concholepas concholepas*)的血蓝蛋白)、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。在优选的实施方式中,用于结合的蛋白质为KLH。在优选的实施方式中,所述肽与KLH之间的结合是通过交联剂NHS-PEG<sub>4</sub>-马来酰亚胺进行的,并且所述肽在N端具有半胱氨酸以进行肽与KLH的结合。

[0104] 为了生产单克隆抗体,可以使用常规技术。例如,可以使用由Kohler等人,Nature,

256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法,使用Ausubel,F.M.等人(分子生物学现代实验指南(Current Protocols in Molecular Biology),John Wiley&Sons Inc;ring-bound edition,2003)在单元11.4至11.11中详细描述的程序制备单克隆抗体。可替代地,可以通过重组DNA程序从使用McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990)中所述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体。Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。随后的出版物描述了通过链改组生产高亲和力(nM范围)人抗体(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992))以及组合感染和体内重组作为用于构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse等人,Nucl.Acids.Res.,21:2265-2266(1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的常规单克隆抗体杂交瘤技术的可行的替代方案。

[0105] 可以在出血并除去纤维蛋白凝块后,将多克隆抗体直接用作由免疫的宿主获得的抗血清。单克隆抗体可以直接用作杂交瘤培养物的上清液或用作在适合宿主的腹膜腔中植入杂交瘤后的腹水液。可替代地,可以在使用前通过传统方法(如使用源自A $\beta$ 17的肽的亲合纯化、非变性凝胶纯化、HPLC或RP-HPLC、尺寸排阻、在蛋白A柱上纯化或这些技术的任意组合)来纯化多克隆或单克隆免疫球蛋白分子。

[0106] 在优选的实施方式中,本发明所述的抗体为多克隆抗体。在优选的实施方式中,用于产生本发明所述抗体的方法包括以下步骤:

[0107] -第一次给药:使用弗氏完全佐剂作为佐剂,用100 $\mu$ g肽使兔子免疫。

[0108] -第二次给药:使用弗氏不完全佐剂作为佐剂,用100 $\mu$ g肽使兔子免疫。

[0109] -第三次给药:使用明矾作为佐剂,用100 $\mu$ g肽使兔子免疫。

[0110] -3次之后的给药,用200 $\mu$ g肽,交替地使用佐剂:弗氏不完全佐剂-明矾-弗氏不完全佐剂。

[0111] 在优选的实施方式中,用于产生本发明所述的抗体的A $\beta$ 肽或免疫原的区域选自由以下组成的组中:对应于序列VHHQKL(SEQ ID NO:2)的肽A $\beta$ (12-17)和对应于序列EVHHQKL(SEQ ID NO:3)的肽A $\beta$ (11-17)。

[0112] 本发明的试剂盒

[0113] 在第二方面,本发明涉及用于检测或确定A $\beta$ (1-17)肽的试剂盒(在下文中称为本发明的试剂盒),其包括:

[0114] (i)第一抗体,它是对根据本发明的A $\beta$ (1-17)具有特异性的抗体,和

[0115] (ii)第二抗体,其识别不同于被所述第一抗体识别的区域的A $\beta$ (1-17)肽的区域。

[0116] 术语“淀粉样 $\beta$ 肽”在本文中与A $\beta$ 、淀粉样 $\beta$ 蛋白质、“A $\beta$ ”、“ $\beta$ AP”或“A $\beta$ 肽”可互换使用,是指作为在阿尔茨海默氏病(AD)、唐氏综合征和荷兰型遗传性脑出血伴淀粉样变性(HCHWA-D)的患者脑中发现的老年斑和血管淀粉样沉积物(淀粉样血管病)的主要化学组分的肽家族。无论处于何种形式,淀粉样 $\beta$ 肽是 $\beta$ -淀粉样前体蛋白(APP)的片段,其包含通过 $\beta$ -和 $\gamma$ -分泌酶或通过 $\beta$ -和 $\alpha$ -分泌酶顺序地蛋白水解切割淀粉样前体蛋白所产生的不同数目的氨基酸。

[0117] 淀粉样 $\beta$ 肽一般表示为“A $\beta$ (x-y)”,其中x代表淀粉样 $\beta$ 肽的氨基末端的氨基酸数,y代表羧基末端的氨基酸数。如本文所使用的“A $\beta$ (1-17)”或“A $\beta$ 17”涉及对应于淀粉样前体蛋白的氨基酸672至688(SEQ ID NO:1)的17个氨基酸肽,并且它是通过 $\beta$ -和 $\alpha$ -分泌酶顺序地

蛋白水解切割淀粉样前体蛋白(SEQ ID NO:4)产生的。

[0118] 在本发明的背景下，“捕获抗体”是用于从样品中回收抗体特异性结合的所有分子种类的抗体。实际上，对于可以用作捕获抗体的抗体类型没有限制，只要它含有对A $\beta$ 17具有特异性的至少一个抗原结合位点。原则上，对A $\beta$ 17肽具有特异性的任何抗体可以用作捕获抗体。捕获抗体结合至与第二抗体不同的区域。在优选的实施方式中，捕获抗体针对A $\beta$ 17肽的N端区域的表位。在又更优选的实施方式中，捕获抗体可以靶向的表位包括位于A $\beta$ 17的氨基酸1至10内的表位。在另一个优选的实施方式中，所述捕获抗体为单克隆抗体。在又更优选的实施方式中，捕获抗体识别与A $\beta$ 肽的氨基酸1-16对应的区域。在又更优选的实施方式中，用作捕获抗体的单克隆抗体为6E10mAb，如在Kim, K.S. (Neuroscience Res. Comm. 1988, 2:121-130)中所述的。

[0119] 本发明的试剂盒的第二组分对应于本发明所述的抗体，这先前已在本发明中进行描述。在本发明的背景下，“检测抗体”是将用于检测已被捕获抗体保留的抗原的量的抗体。第一抗体识别不同于第二抗体的区域，这是因为它必须结合至未被捕获抗体覆盖的抗原区域。

[0120] 所述第一抗体和第二抗体可以在本发明的试剂盒中不区别地用作捕获和检测抗体。

[0121] 两种抗体之一(第一抗体或第二抗体)可以偶联至结合对的第一元件，从而允许检测结合至被捕获抗体捕获的抗原的抗体。将偶联的抗体将用作检测抗体并且可以是第一抗体或第二抗体。

[0122] 在具体的实施方式中，所述试剂盒还包含特异性结合至A $\beta$ 40和/或A $\beta$ 42的抗体或抗体组合。因此，在具体的实施方式中，所述试剂盒将用于A $\beta$ 17肽和A $\beta$ 40和/或A $\beta$ 42肽的检测。

[0123] 如本文所使用的“A $\beta$ 42”涉及对应于氨基酸672至713(SEQ ID NO:5)的42个氨基酸的肽并且它是通过 $\beta$ -和 $\gamma$ -分泌酶顺序地蛋白水解切割淀粉样前体蛋白(SEQ ID NO:4)产生的。

[0124] 如本文所使用的“A $\beta$ 40”涉及对应于氨基酸672至711(SEQ ID NO:6)的40个氨基酸的肽并且它是通过 $\beta$ -和 $\gamma$ -分泌酶顺序地蛋白水解切割淀粉样前体蛋白(SEQ ID NO:7)产生的。

[0125] 在优选的实施方式中，视情况将所述第一或第二抗体偶联至结合对的第一元件。如果情况是这样，则试剂盒中还包含偶联至可检测标记的结合对的第二元件。在具体的实施方式中，如果偶联至结合对的第二元件的可检测标记是酶标记，则所述试剂盒还包含可以通过所述酶转化为可检测产物的底物。

[0126] 结合对适合的第一和第二元件包括，但不限于：

[0127] • 半抗原或抗原/抗体，例如，地高辛和抗地高辛抗体，

[0128] • 生物素或生物素类似物(例如，氨基生物素、亚氨基生物素或脱硫生物素)/抗生物素蛋白或链霉亲和素，

[0129] • 糖/卵磷脂，

[0130] • 酶和辅因子，

[0131] • 叶酸/叶酸盐，

- [0132] • 选择性结合至蛋白的双链寡核苷酸/转录因子,
- [0133] • 核酸或核酸类似物/互补核酸,和
- [0134] • 受体/配体,例如,甾类激素受体/甾类激素。
- [0135] 将理解术语结合对的“第一”和“第二”元件是相对的并且可以将上述元件中的每一个看作所述结合对的第一或第二元件。在优选的实施方式中,结合对的第一元件是生物素或其功能等效变体并且结合对的第二元件是抗生物素蛋白、链霉亲和素或其功能等效变体。在优选的实施方式中,结合对的第二元件为链霉亲和素。
- [0136] 适合的可检测标记包括,但不限于,荧光部分(例如,荧光素、罗丹明、藻红蛋白、香豆素、噁嗪、试卤灵、花青及其衍生物)、发光部分(例如,由Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA提供的Qdot™纳米颗粒)。如果所述可检测标记是酶,则该酶必须能够产生可检测信号,例如,当加入活化剂、底物、放大试剂等时。适合作为本发明的可检测标记的酶及其相应的底物包括:
- [0137] • 碱性磷酸酶:
- [0138] ○发色底物:基于磷酸对硝基苯基酯(p-NPP)、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯/四唑鎓氮蓝(BCIP/NBT)、坚牢红(FastRed)/萘酚-AS-TA磷酸酯的底物
- [0139] ○发荧光底物:4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-methylumbelliferyl phosphate)(4-MUP)、2-(5'-氯-2'-磷酸基氧基苯基)-6-氯-4-(3H)-喹唑啉酮(CPPCQ)、3,6-荧光素二磷酸酯(3,6-FDP)、坚牢蓝BB,坚牢红TR或坚牢红紫LB重氮鎓盐
- [0140] • 过氧化物酶:
- [0141] ○发色底物,基于2,2-连氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺(OPT)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、邻联茴香胺、5-氨基水杨酸、3-二甲基氨基苯甲酸(DMAB)和3-甲基-2-苯并噻唑啉脒(MBTH)、3-氨基-9-乙基咪唑(AEC)和3,3'-二氨基联苯胺四氯化氢(DAB)。
- [0142] ○发荧光底物:4-羟基-3-甲氧基苯基乙酸、还原型吩噁嗪和还原型苯并噻嗪,其包括 **Amplex®** Red试剂、Amplex UltraRed和还原型二羟基氧杂蒽。
- [0143] • 糖苷酶:
- [0144] ○发色底物:用于β-D-半乳糖苷酶的邻硝基苯基-β-D-半乳糖苷(o-NPG)、对硝基苯基-β-D-半乳糖苷和4-甲基伞形苯基-β-D-半乳糖苷(4-methylumbelliphenyl-β-D-galactoside, MUG)。
- [0145] ○发荧光底物:试卤灵β-D-吡喃半乳糖苷、荧光素二半乳糖苷(FDG)、荧光素二葡萄糖苷酸、4-甲基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷、羧基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷和氟化香豆素β-D-吡喃半乳糖苷。
- [0146] • 氧化还原酶(荧光素酶):
- [0147] ○发光底物:萤光素。
- [0148] 在具体的实施方式中,可检测标记是荧光分子、发光分子或酶。在优选的实施方式中,可检测标记是辣根过氧化物酶并且检测试剂是TMB。
- [0149] 在优选的实施方式中,试剂盒还包含固体载体。如本文所使用的,术语“载体”或“表面”是指多孔或无孔的水不溶性材料的固相,所述水不溶性材料可以具有多种形状中的任一种,如条带、杆、颗粒,包括乳胶颗粒、磁性颗粒、微粒、珠粒、薄膜、微量滴定孔和塑料

管。原则上,任何材料均适合作为固体载体,只要它能够结合足够量的捕获抗体。因此,根据所需的测定形式性能特性来确定固相材料的选择。适合用作固体载体的材料包括聚合物材料,具体地为纤维素材料和源于纤维素的材料,如含纤维纸,例如,滤纸、色谱纸、玻璃纤维纸等;合成的或修饰的天然发生的聚合物,如硝化纤维素、醋酸纤维素、聚(氯乙烯)、聚丙烯酰胺、交联葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚(对苯二甲酸亚乙基酯)、尼龙、聚乙烯丁酸酯等;它们自己单独使用或与其他材料结合使用;玻璃,像例如,作为生物玻璃、陶瓷、金属等可供使用的玻璃。优选苯乙烯和羧化苯乙烯的非交联聚合物或用其他活性基团(如氨基、羟基、卤素等)官能化的苯乙烯。在一些情况下,将使用取代的苯乙烯与二烯(如丁二烯)的共聚物。

[0150] 在具体的实施方式中,将未偶联至结合对的第一元件的抗体预结合至固体载体,其可以是第一或第二抗体。可以在试剂盒中单独提供所述固体载体和第一或第二抗体,或者可替代地,可以递送已用所述抗体预涂覆的载体。在这种情况下,已在所述抗体结合后用封闭溶液处理所述载体。如果所述载体是预涂覆的,则优选地用浓海藻糖溶液处理所述载体并使其干燥,在这种情况下干燥的海藻糖在所述载体上形成晕圈。含有干燥海藻糖的这些载体是特别稳定的并且当在4°C下保持在黑暗中时可以储存多达两年。

[0151] 试剂盒的其他成分可以包括:

[0152] • 从患者回收待分析样品的方法。

[0153] • 制备目标肽的标准曲线所需的缓冲液和溶液。

[0154] • 测定期间用于清洗和封闭所述固体载体的缓冲液和溶液

[0155] • 用于用涂覆抗体涂覆所述固体载体的缓冲液和溶液

[0156] • 用于由可检测标记发展带颜色的或发荧光的信号的试剂。

[0157] • 用于终止由可检测标记形成带颜色的或发荧光的产物的试剂(例如,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

[0158] • 用于维持所述肽处于展开状态的方法(例如,浓盐酸胍)。

[0159] • 含有Aβ17肽以及另外地Aβ40和/或Aβ42肽或其组合的母液的样品。

[0160] 可以在结合待检测的靶多肽之前或一旦肽/蛋白质结合至所述抗体时将抗体固定至固体载体中。在任何情况下,如果使用固体载体,则在加入含有待确定的靶多肽的样品之前封闭所述载体上的过量的蛋白结合位点是方便的。优选地,在每次结合反应后使用用于清洗所述复合物的相同缓冲液(例如,50mM Tris-HCl, pH8, PBS或TBS,可选地包含吐温20)来封闭或淬灭所述载体上的肽结合位点,所述相同缓冲液补充有浓度约0.05%至10%,优选1至5%,更优选地约3%的大分子化合物(例如,牛血清白蛋白、脱脂奶粉、蛋白质印迹封闭试剂、酪蛋白、乳白蛋白、卵白蛋白)。如果包含固定的捕获抗体的载体必须储存一段时间,则优选地用浓海藻糖溶液处理所述载体并使其干燥,在这种情况下干燥的海藻糖在所述载体上形成晕圈。含有干燥海藻糖的这些载体是特别稳定的并且当在4°C下保持在黑暗中时可以储存多达两年。

[0161] 本发明的试剂盒允许以高灵敏度和特异性检测或确定被所述试剂盒的第一和第二抗体成分特异性识别的一种或多种肽。因此,在另一方面,本发明涉及本发明的试剂盒用于检测样品中Aβ17肽的用途。在具体的实施方式中,所述试剂盒用于可选地检测样品中的Aβ40和/或Aβ42肽及其组合。

[0162] 鉴于本发明的试剂盒提供高灵敏度和特异性确定任何样品中Aβ17肽的浓度的能

力,它可以用于任何疾病的诊断,其中任何细胞液或组织中任何这种肽的浓度是不同的,具体地,退行性疾病,并且更具体地,神经退行性疾病。可以基于出现A $\beta$ 17的改变水平或者A $\beta$ 40或A $\beta$ 42的改变水平进行诊断的退行性疾病的非限制性实例包括:

[0163] • 骨退行性病症,如骨质减少症、骨软化、骨质疏松症、骨髓瘤、骨营养不良、佩吉特病、成骨不全、骨硬化、骨发育不全症、体液性高钙血症骨髓瘤(humoral hypercalcemic myeloma)、多发性骨髓瘤和转移后骨质疏松症。

[0164] • 软骨退行性病症,如Gorham-Stout综合征;关节炎疾病;骨关节炎;类风湿性关节炎;牛皮癣关节炎;类风湿病;和脆骨病。

[0165] • 肌肉退行性疾病,如肌营养不良、肌肉萎缩、充血性阻塞性肺病、肌肉消耗综合征、肌少症、恶病质。

[0166] • 心脏退行性疾病,包括由于缺血造成的心脏细胞死亡、由于移植排斥造成的组织和器官死亡、由于自毒作用造成的听力丧失。

[0167] • 视网膜退行性病症,如色素性视网膜炎

[0168] • 神经系统退行性疾病,如亚历山大病、Alper病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、共济失调毛细血管扩张、Batten病、牛海绵状脑病(BSE)、Canavan病、科凯恩综合征、皮质基底节退化症、克罗伊茨费尔特-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)、亨廷顿病、HIV相关性痴呆病、肯尼迪氏病、克拉伯病、Lewy体痴呆症、马查多-约瑟夫病(3型脊髓小脑性共济失调)、多发性硬化、多系统萎缩症、神经螺旋体病、帕金森病、佩-梅二氏病、皮克氏病、原生性脊髓侧索硬化、朊病毒病、雷夫叙姆病病、Sandhoff病、希尔德病、精神分裂症、Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten病(也称为Batten病)、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩、Steele-Richardson-Olszewski病、脊髓痨。在优选的实施方式中,使用本发明的试剂盒诊断的神经退行性病症为阿尔兹海默氏病。

[0169] 用于确定或检测A $\beta$ 17肽的方法

[0170] 本发明的试剂盒允许执行用于确定或检测样品中A $\beta$ 17肽的方法。因此,在另一方面,本发明涉及用于确定或检测样品中A $\beta$ (1-17)肽的方法,在下文中称为用于本发明检测的方法,其包括以下步骤:

[0171] (i)用第一抗体捕获样品中存在的A $\beta$ (1-17)肽,所述第一抗体特异性地结合至所述肽,

[0172] (ii)用第二抗体接触步骤(i)中形成的免疫复合物,其中所述第二抗体如权利要求1至4中任一项所定义的并且其中所述第二抗体识别不同于所述第一抗体的区域并且与结合对的第一元件偶联;

[0173] (iii)用偶联了可检测标记的结合对的第二元件接触在步骤(ii)中形成的复合物,和

[0174] (iv)检测或确定所述可检测标记的活性或量。

[0175] 如在本发明中所理解的,“样品”包括组织培养物、血浆、血清、唾液、精液、痰液、脑脊液(CSF)、眼泪、粘液、汗液、乳汁、脑或外周组织提取液等中的任一种。在优选的实施方式中,所述样品选自下组:血液、血清、血浆和CSF。在更优选的实施方式中,所述样品是血浆样品。

[0176] 在优选的实施方式中,所检测的肽对应于所述肽的非低聚物形式,更优选地,A $\beta$ 17

的单体形式。

[0177] 已在本文中针对本发明的试剂盒详细描述了所述方法的每个步骤中使用的试剂和抗体。

[0178] 在根据本发明所述方法的第一步骤中,含有AB17肽的样品与第一抗体接触从而形成第一免疫复合物。在优选的实施方式中,所述第一抗体为单克隆抗体。在更优选的实施方式中,所述单克隆抗体为6E10抗体。

[0179] 在已执行所述第一结合步骤后,可以清洗所述复合物以除去在原始样品中发现的并不结合至捕获抗体的任何过量的蛋白质/肽。可以在本发明背景中使用的优选的清洗缓冲液包括pH接近于生理情况的任何缓冲液(例如,50mM Tris-HCl),可选地包含盐(例如,150mM NaCl)并且可选地包含低浓度的清洁剂(例如,0.05%的吐温-20)。

[0180] 在第二步骤中,然后将捕获抗体和样品中AB肽之间形成的复合物与第二抗体接触以形成“夹心型”免疫复合物。所述第一抗体和第二抗体将结合至AB17肽的不同区域,使得它们之间没有干扰。

[0181] 本发明方法的第一和第二步骤可以互换并且可以通过所述第二抗体(本发明所述的抗体)进行AB17肽的捕获。然后,将所述复合物与所述第一抗体接触,所述第一抗体将在与所述第二抗体不同的区域结合。两个抗体之一将偶联至结合对的第一元件,其将对应于在捕获步骤中不使用的抗体。

[0182] 在进行了第二步骤之后,可以使用如之前所描述的基本相同的缓冲液和程序清洗所述免疫复合物以消除非特异性结合的抗体。

[0183] 在第三步骤中,本发明所述的方法涉及将在捕获抗体-抗原和与结合对的第一元件偶联的检测抗体之间形成的复合物与偶联至可检测标记的结合对的第二元件接触。在优选的实施方式中,结合对的第一元件是生物素而结合对的第二元件是抗生物素蛋白、链霉亲和素或其功能等效变体。

[0184] 在根据本发明所述方法的第四步骤中,所述方法涉及检测可检测的标记。将理解可检测标记的检测和/或定量取决于标记的性质并且是本领域中已知的技术。当完整的底物或可检测标记含有发光或染料成分时,可以通过在UV透照器上目视观察或通过使用基于UV的电荷耦合装置(CCD)相机检测系统、基于激光的凝胶扫描仪、基于氙弧的CCD相机检测系统、与UV透照器结合的Polaroid相机、以及用于检测发光的多种其他装置进行检测。当所述可检测标记为酶时,根据本发明所述方法的第四步骤涉及将用所述标记物(例如,用可检测标记标记的捕获肽、检测抗体和试剂)标记的免疫复合物暴露于用作可检测标记的酶的激活剂、底物或放大试剂。能够产生可检测信号的熟知的可检测标记包括酶标记的抗体。针对这个目的熟知的示例性酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和糖苷酶,包括 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 $\beta$ -葡糖醛酸酶。举例来说,可以用辣根过氧化物酶标记特异性结合至检测抗体的试剂。当形成捕获部分-检测抗体-试剂复合物时,则可以使用用作可检测标记的酶的任何广泛熟知的底物进行检测。在优选的实施方式中,所述可检测标记是荧光分子、发光分子或酶。

[0185] 在具体的实施方式中,用于本发明检测的方法还包括AB40和/或AB42肽的检测。

[0186] 用于监测神经退行性疾病发展的方法

[0187] 在另一方面,本发明涉及用于监测受试者体内神经退行性疾病的方法,在下文中

称为用于本发明监测的方法,其包括在第一时间点确定样品中血浆中游离A $\beta$ 17肽的水平和结合至所述受试者的样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平并且将这些水平与第二时间点的所述水平进行比较;其中如果相对于第一时间点,在第二时间点血浆中游离A $\beta$ 17肽和结合至细胞的A $\beta$ 17肽的比率增加,则它指示受试者体内阿尔茨海默氏病的恶化。

[0188] 如本文所使用的术语“神经退行性疾病”是指其中由于细胞死亡所造成的神经元细胞损失的病症或失调,其导致认知功能退化或导致可以通过以下表征的损害、功能障碍或并发症:神经异常、神经退行性异常、生理异常、心理异常或行为异常。可以用本发明所述方法诊断的适合的神经退行性疾病包括,但不限于,老化相关的黄斑变性、克罗伊茨费尔德-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)、阿尔茨海默氏病、具有淀粉样变性的脑血管病、血管性痴呆、放射治疗引起的痴呆、轴突损伤、急性皮层扩散性抑制、 $\alpha$ -共核蛋白病、脑缺血、亨廷顿病、永久性局灶性脑缺血、周围神经再生、癫痫持续状态后模型(post-status epilepticus model)、脊髓损伤、散发性肌萎缩侧索硬化症和传染性海绵状脑病。

[0189] 在优选的实施方式中,根据本发明所述方法监测的神经退行性疾病为阿尔茨海默氏病或其前驱性形式,包括轻度认知障碍、具有疑似阿尔茨海默氏病的轻度认知障碍或具有可能阿尔茨海默氏病的轻度认知障碍。

[0190] 用于本发明监测的方法对于评价受试者体内阿尔茨海默氏病的发展。因此,本发明人显示血浆中游离A $\beta$ 17肽的水平/结合至细胞的A $\beta$ 17肽的水平的比率增加指示AD恶化。

[0191] 在具体的实施方式中,用于本发明监测的方法包括以下步骤:

[0192] (a)在第一时间点,确定血浆中游离A $\beta$ 17肽的浓度和结合至受试者样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平;(FP A $\beta$ 17/CB A $\beta$ 17),

[0193] (b)在第二时间点,确定血浆中游离A $\beta$ 17肽的浓度和结合至相同受试者的样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平;

[0194] 根据受试者,由技术人员确定所选的时间点。

[0195] (c)比较第一时间点和第二时间点之间血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平/结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平的比率,和

[0196] (d)如果在第二时间点相对于第一时间点,所述参数的比率较高,则它指示受试者体内阿尔茨海默氏病的恶化。

[0197] 如本文所使用的术语“阿尔兹海默氏病的恶化”是指相对于所测量的第一时间点的阶段,疾病向晚期发展。技术人员还将通过分析其他指示特征来识别并确认疾病的发展是否恶化。在晚期出现并指示疾病发展的特征和症候为,但不限于,淀粉样斑块和神经纤维缠结的出现以及认知功能的较快速减退。在优选的实施方式中,如果相对于第一时间点,在第二时间点血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平/结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平的比率增加,则它指示了受试者认知障碍的更高等级。因此,血浆中发现的游离A $\beta$ 17肽的较高水平指示较高的认知障碍。

[0198] 可以在本发明中使用适合于确定肽的任何方法。举例来说,可以使用选自以下的一种或多种技术来确定淀粉样 $\beta$ 肽的浓度:蛋白质印迹、免测沉淀法、酶联免疫吸附测定(ELISA)、表面等离子共振、沉淀素反应、凝胶扩散免疫扩散测定、放射免疫测定(RIA)、荧光激活细胞分选术(FACS)、二维凝胶电泳、毛细管电泳、质谱法(MS)、基质辅助激光解析/离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF)、表面增强激光解吸/离子化-飞行时间(SELDI-TOF)、高效液

相色谱法(HPLC)、快速蛋白质液相色谱(FPLC)、多维液相色谱(LC)紧接着串联质谱(MS/MS)、薄层色谱法、蛋白质芯片表达分析和激光密度法。在具体的实施方式中,通过ELISA确定所述参数的水平的确定。在优选的实施方式中,在ELISA中使用的抗体之一是本发明所述的抗体,其针对A $\beta$ 17肽的C端区域。

[0199] 如本文所使用的术语“血浆中游离的A $\beta$ 17肽”(在下文中称为FPAB17)是指不与生物样品的任何成分相结合并且易于获得用于结合至特异性抗体的淀粉样 $\beta$ 肽的水平。可以通过常规免疫学技术,通过将生物样品与对所述肽具有特异性的抗体接触来确定这种肽。在优选的实施方式中,确定了血浆中游离的淀粉样肽的水平。

[0200] 如本文所使用的术语“结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平”(在下文中称为CBAB17)是指非共价结合至生物样品中存在的细胞表面并且不可用于结合至加入到所述样品中的抗体并因此是免疫学可检测的淀粉样 $\beta$ 肽。通常,如果所述生物样品是血液,则所述淀粉样 $\beta$ 肽结合至红细胞、白血球(包括嗜中性白细胞、嗜酸性白细胞、嗜碱性白细胞、淋巴细胞和单核细胞)和血小板。可以确定结合至给定样品中细胞的淀粉样 $\beta$ 肽的量,并且在本发明所述的方法中可以单独使用或与淀粉样 $\beta$ 肽相关的其他参数结合使用该值。为此目的,首先需要从生物样品中分离细胞部分。这可以使用技术人员已知的任何技术来进行,如离心、沉淀、过滤等。一旦分离了生物样品的细胞部份,则将细胞与蛋白增溶剂接触。

[0201] 可以确定结合至给定样品中细胞的淀粉样 $\beta$ 肽的量,并且在本发明所述的方法中可以单独使用或与淀粉样 $\beta$ 肽相关的其他参数结合使用该值。为此目的,首先需要从生物样品中分离细胞部分。这可以使用技术人员已知的任何技术来进行,如离心、沉淀、过滤等。一旦分离了生物样品的细胞部份,则将细胞与蛋白增溶剂接触。

[0202] 在优选的实施方式中,受试者的样品选自下组:血液、血清、血浆和CSF。在更优选的实施方式中,所述样品是血浆样品。

[0203] 用于确定受试者是否患有阿尔茨海默氏病或患有早期阿尔茨海默氏病的方法

[0204] 本发明人已确定直接地或通过它们在它们之间应用某些计算来确定的某些集合的淀粉样 $\beta$ 肽的水平可以用于确定患者是否患有轻度阿尔茨海默氏病,用于确定受试者是否患有前驱性阿尔茨海默氏病,用于区分患有非前驱性轻度认知障碍的受试者和患有前驱性阿尔茨海默氏病的受试者,用于区分患有非前驱性轻度认知障碍的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者,或者用于区分患有前驱性阿尔茨海默氏病的受试者与患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者。

[0205] 因此,在另一方面,本发明涉及用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的方法,包括确定选自由以下组成的组中的一个或多个参数的值:

[0206] (a)结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0207] (b)来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0208] (c)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0209] (d)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;和

[0210] (e)来自所述受试者的血浆样品中游离的A $\beta$ 17水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;

[0211] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于健康受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0212] 因此,用于区分健康受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的待测参数如下所示:

[0213] (a)CB A $\beta$ 17+CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42

[0214] (b)(CB A $\beta$ 17+CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42)+(TP A $\beta$ 17+TP A $\beta$ 40+TP A $\beta$ 42)

[0215] (c)TP A $\beta$ 42+CB A $\beta$ 42

[0216] (d)(TP A $\beta$ 40+TP A $\beta$ 42)+(TP A $\beta$ 40+TP A $\beta$ 42)

[0217] (e)FP A $\beta$ 17/CB A $\beta$ 17

[0218] 用于确定受试者是否患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的方法,其包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0219] (a)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0220] (b)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0221] (c)来自所述受试者的血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;

[0222] (d)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值;

[0223] (e)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 17肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的加和水平,而所述第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 42肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽的加和水平;

[0224] (f)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;和

[0225] (g)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 17肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而所述第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0226] 其中如果相对于健康受试者的参考样品中的值,参数(a)、(b)或(c)中的一个或多个的值增加和/或参数(d)、(e)、(f)或(g)中的一个或多个的值降低,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0227] 因此,用于区分健康受试者和患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者的待测参数如下所示:

[0228] (a)TP A $\beta$ 42+CB A $\beta$ 42

[0229] (b)(TP A $\beta$ 40+TP A $\beta$ 42)+(CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42)

[0230] (c)FP A $\beta$ 17/CB A $\beta$ 17

[0231] (d)  $CB\ A\beta 17 / CB\ A\beta 42$

[0232] (e)  $(TP\ A\beta 17 + CB\ A\beta 17) / (TP\ A\beta 42 + CB\ A\beta 42)$

[0233] (f)  $CB\ A\beta 17 / (CB\ A\beta 40 + CB\ A\beta 42)$

[0234] (g)  $(TP\ A\beta 17 + CB\ A\beta 17) / (TP\ A\beta 40 + TP\ A\beta 42) + (CB\ A\beta 40 + CB\ A\beta 42)$

[0235] 在另一个方面,本发明涉及用于区分患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者的方法,其包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0236] (a) 结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0237] (b) 结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值;

[0238] (c) 两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而所述第二参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0239] (d) 两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0240] (e) 两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而所述第二参数对应于血浆样品中A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0241] 其中如果相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值,(a)的值增加和/或所述参数(b)、(c)、(d)和(e)中的一个或多个的值降低,则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

[0242] 因此,允许区分患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者的待测参数如下所示:

[0243] (a)  $CB\ A\beta 17 + CB\ A\beta 40 + CB\ A\beta 42$

[0244] (b)  $CB\ A\beta 17 / CB\ A\beta 42$

[0245] (c)  $(TP\ A\beta 17 + CB\ A\beta 17) / (TP\ A\beta 42 + CB\ A\beta 42)$

[0246] (d)  $CB\ A\beta 17 / (CB\ A\beta 40 + CB\ A\beta 42)$

[0247] (e)  $(TP\ A\beta 17 + CB\ A\beta 17) / (TP\ A\beta 40 + TP\ A\beta 42) + (CB\ A\beta 40 + CB\ A\beta 42)$

[0248] 在另一个方面,本发明涉及用于区分患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0249] (a) 结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0250] (b) 血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽的水平加和值;

[0251] (c) 血浆样品中总A $\beta$ 42肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0252] (d)血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0253] (e)血浆样品中总A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平的加和值;

[0254] (f)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;和

[0255] (g)血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;

[0256] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0257] 因此,用于区分患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者与患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的待测参数如下所示:

[0258] (a)CB A $\beta$ 17+CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42

[0259] (b)(TP A $\beta$ 17+TP A $\beta$ 40+TP A $\beta$ 42)+(CB A $\beta$ 17+CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42)

[0260] (c)TP A $\beta$ 42+CB A $\beta$ 42

[0261] (d)(TP A $\beta$ 40+TP A $\beta$ 42)+(CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42)

[0262] (e)TP A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 40

[0263] (f)CB A $\beta$ 17/(CB A $\beta$ 40+CB A $\beta$ 42)

[0264] (g)FP A $\beta$ 17/CB A $\beta$ 17

[0265] 在另一个方面,本发明涉及用于区分患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0266] (a)血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与血浆样品中游离的A $\beta$ 40肽水平之间的比率值;和

[0267] (b)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于血浆样品中游离的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽的水平;

[0268] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0269] 因此,用于区分患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者与患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的待测参数如下所示:

[0270] (a)FP A $\beta$ 17/FP A $\beta$ 40

[0271] (b)FP A $\beta$ 17/FP A $\beta$ 40+FP A $\beta$ 42

[0272] 如本文所使用的术语“诊断”包括评价受试者对疾病的敏感度,确定受试者目前是否患有疾病,以及患有疾病的受试者的预后。如本领域技术人员应当理解的,这种评价通常不可能对于100%的待诊断的受试者都是正确的,尽管它优选是正确的。然而,该术语要求可以将受试者的统计学显著部分鉴别为患有疾病或易患该疾病。如果一个部分是统计学显著的,则本领域技术人员可以使用几种熟知的统计评价工具来简单地确定它,例如,置信区间的确定、p值的确定、Student t-检验、曼-惠特尼检验等。在Dowdy和Wearden,《研究用统计

学》(Statistics for Research), John Wiley&Sons, New York 1983 中提供了详细说明。优选的置信区间为至少50%, 至少60%, 至少70%, 至少80%, 至少90%, 至少95%。p值优选地为0.2、0.1或0.05。

[0273] 如本文所使用的, 术语“受试者”涉及分类为哺乳动物的所有动物, 并且包括(但不限于)家畜和农场动物、灵长类和人, 例如, 人类、非人灵长类、母牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物。优选地, 所述受试者是指任何年龄或种族的男性或女性人类。

[0274] 术语“阿尔茨海默氏病”(或“老年性痴呆”)是指与特定退行性脑病有关的精神衰退, 其特征在于老年斑、神经炎缠结和进行性神经元损失, 其临床表现为进行性记忆缺失、精神混乱、出现行为问题、生活不能自理、身体逐渐衰退并且最终死亡。

[0275] 在本发明的背景中, 表述“轻度阿尔茨海默氏病”是指阿尔茨海默氏病的早期, 其中受试者经历:

[0276] • 针对近期事件的记忆力丧失。

[0277] • 问题解决、复杂任务和声音判断具有困难。

[0278] • 个性改变。

[0279] • 组织和表达想法困难。

[0280] • 迷路或将财物放错地方。

[0281] 使用NINCDS-ADRDA标准(CDR=1, MMSE在16至24分之间并且在Scheltens量表中内侧颞叶萎缩(Medial temporal atrophy)(通过MRI确定)>3分)来鉴别患有轻度阿尔茨海默氏病的患者。

[0282] 术语“轻度认知障碍”或MCI是指自然衰老和早期阿尔茨海默氏病之间的认知障碍的过渡阶段。如果患者满足Mayo Clinic标准(CDR=0.5, 它们显示在Scheltens量表中大于3分的内侧颞叶萎缩(通过MRI确定), 它们在使用18-氟脱氧葡萄糖的正电子发射断层成像术(PET-FDG)中显示出顶骨和/或颞叶代谢减退模式(指示为AD)), 则通常将患者鉴别为患有MCI。

[0283] 表述“前驱性阿尔茨海默氏病”(也称为“具有疑似阿尔茨海默氏病的MCI”)是指表现出MCI并且认为表现出转化为阿尔茨海默氏病的高风险的患者。用于鉴别患者为疑似AD的标准为通过NINCDS-ADRDA标准(McKhann G. 等人, 1984, Neurology, 34:939-44)所定义的那些, 即通过临床和神经心理学检查确定的痴呆病、在两个或更多个认知区域中存在的进行性认知障碍、在40至90岁之间缺陷发生以及没有能够产生痴呆综合征的其他疾病。

[0284] 表述“非前驱性阿尔茨海默氏病”(也称为“具有可能阿尔茨海默氏病的MCI”)是指表现出MCI并且认为表现出发展阿尔茨海默氏病的低风险的患者。用于鉴别患者为可能AD的标准为通过NINCDS-ADRDA标准(McKhann G. 等人, 1984, Neurology, 34:939-44)所定义的那些, 即具有非典型发病、表现或发展并且无已知病原学的痴呆综合征, 但是不能认为能够产生痴呆病的共病疾病是其来源。

[0285] 如本发明中所使用的术语“健康受试者”是指健康状况良好的受试者。在优选的实施方式中, 所述受试者大于65岁。它相对于未患有神经退行性疾病或没有任何神经退行性疾病病史的受试者。优选地, 健康受试者是表现出无记忆障碍、在神经心理学测试中表现正常并且在MRI中无结构变化的患者。健康受试者可以是健康的并且未患其他疾病, 或者他们可以患有除了MCI和AD以外的疾病。

[0286] 术语“区分健康受试者和患有前驱性阿尔茨海默氏病的受试者”是指区分不具有阿尔茨海默氏病(AD)症状的受试者和患有前驱性阿尔茨海默氏病的受试者的能力。

[0287] 术语“区分健康受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者”是指区分不具有阿尔茨海默氏病(AD)症状的受试者和处于AD早期的受试者(轻度阿尔茨海默氏病)的能力。

[0288] 术语“区分患有非前驱性MCI受试者和患有前驱性阿尔茨海默氏病的受试者”是指区分具有非前驱性MCI症状的受试者和患有前驱性阿尔茨海默氏病的受试者的能力。

[0289] 术语“区分患有非前驱性MCI的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者”是指区分具有非前驱性MCI症状的受试者和处于AD早期的受试者(轻度阿尔茨海默氏病)的能力。

[0290] 术语“区分患有前驱性AD的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者”是指区分具有前驱性AD症状的受试者和处于AD早期的受试者(轻度阿尔茨海默氏病)的能力。

[0291] 术语“血浆”是指全血的液体成分。根据所使用的分离方法,血浆可以完全没有细胞组分,或者可以含有不同量的血小板和/或少量的其他细胞组分。

[0292] 如本文所使用的术语“结合至细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40或A $\beta$ 42肽的水平”(在下文中分别称为CB A $\beta$ 17、CB A $\beta$ 40或CB A $\beta$ 42)是指非共价连接至存在于生物样品中的细胞表面并且不可用于结合至加入到所述样品中的抗体并因此是免疫学可检测的淀粉样 $\beta$ 肽。通常,如果所述生物样品是血液,则所述淀粉样 $\beta$ 肽结合至红细胞、白血球(包括嗜中性白细胞、嗜酸性白细胞、嗜碱性白细胞、淋巴细胞和单核细胞)和血小板。可以确定结合至给定样品中的细胞的淀粉样 $\beta$ 肽的量,并且在本发明所述的方法中可以单独使用或与淀粉样 $\beta$ 肽相关的其他参数结合使用该值。出于此目的,首先需要从生物样品中分离细胞部分。这可以使用技术人员已知的任何技术来进行,如离心、沉淀、过滤等。一旦分离了生物样品的细胞部份,则将细胞与蛋白增溶剂接触。

[0293] 可以确定结合至给定样品中的细胞的淀粉样 $\beta$ 肽的量,并且在本发明所述的方法中可以单独使用或与淀粉样 $\beta$ 肽相关的其他参数结合使用该值。出于此目的,首先需要从生物样品中分离细胞部分。这可以使用技术人员已知的任何技术来进行,如离心、沉淀、过滤等。一旦分离了生物样品的细胞部份,则将细胞与蛋白增溶剂接触。

[0294] 适合的蛋白增溶剂包括如以下所定义的清洁剂、离液剂和还原剂,并且通常以足够的浓度在缓冲溶液中提供。以下描述了适合的试剂、缓冲溶液和缓冲溶液中试剂的浓度。基本如以下在用于释放连接至生物样品成分(蛋白质和脂质)的淀粉样肽的方法中所说明的实施接触步骤。在优选的实施方式中,蛋白增溶剂为清洁剂。在又更优选的实施方式中,所述清洁剂是吐温20。用作蛋白增溶剂的吐温20的适合浓度如上定义,即0.004-0.02%之间,更优选0.005-0.01%(w/v)。

[0295] 优选地在低温下进行接触步骤以抑制样品中存在的蛋白水解活性。适合的温度为约0-10°C,优选约3-5°C,例如,约4°C。

[0296] 通常,通过将生物样品中的细胞部分用包含蛋白增溶剂的溶液再悬浮来进行接触步骤。可以通过温和地上下移液,通过搅拌,优选地通过振荡,更优选地通过高速振荡,最优选地通过涡旋至少5秒,优选地至少10秒,更优选地至少15秒(例如,15-50秒)来进行所述再悬浮。所述混合、搅拌、振荡、高速振荡或涡旋的有利速度包括至少250rpm的速度,优选至少500rpm,更优选至少1,000rpm,最优选约2,000-2,500rpm的速度。

[0297] 接触步骤是在足以实现淀粉样β肽与存在于生物样品中的细胞部分地或优选地完全分离的条件下进行的。本领域普通技术人员可以通过监测在接触步骤之前并且在发生接触步骤后在不同时间点逐步地可检测的淀粉样β肽的量来充分确定所述条件。

[0298] 如本文所使用的术语“血浆中总AB肽”(在下文中称为TP AB17、TPAB40或TP AB42)是指“在血浆中游离的AB肽”加上“结合至大分子组分的淀粉样β肽”。如本文所使用的术语“结合至大分子组分的淀粉样β肽”是指非共价结合或连接至在所研究的生物样品中发现的分子的淀粉样β肽。这种肽通常不易用于免疫学检测,并因此需要对生物样品进行预处理以实现肽与所述组分的分离。在这些条件下,连接到大分子组分的淀粉样β肽将从所述组分释放并将可使用特异性抗体进行免疫学检测。由于生物样品已含有一定量的游离淀粉样β肽,因此将样品与蛋白增溶剂接触后游离淀粉样肽的总量将是初始存在的游离淀粉样β肽水平和当用蛋白增溶剂处理时释放的淀粉样β肽水平的总和。在需要确定连接到生物样品中存在的大分子成分的淀粉样β肽水平的情况下,这通常可以通过确定在用蛋白增溶剂处理前游离淀粉样β肽的水平和在用蛋白增溶剂处理后游离淀粉样β肽的水平并用第二个值减去第一个值来完成。出于本发明的目的,它通常足以确定游离淀粉样β肽的总水平,其包括初始的游离淀粉样β肽水平和在用蛋白增溶剂处理后从大分子组分释放的淀粉样β肽的水平。因此,当处理样品以将淀粉样肽从大分子组分分离时,通常所确定的参数对应于样品中存在的游离肽和连接到大分子组分的肽的总和。

[0299] 可以结合淀粉样β肽并且有助于连接至大分子组分的淀粉样β肽集合的样品的大分子组分包括蛋白质和脂质。在所述方法在血液或血浆样品中执行的具体情况下,所述大分子组分包括,但不限于,血蛋白和血脂。示例性血蛋白包括白蛋白、免疫球蛋白G、免疫球蛋白E、免疫球蛋白M、免疫球蛋白A、纤维蛋白原(纤维蛋白及其降解产物)、α-1抗胰蛋白酶、前白蛋白、α-1酸性糖蛋白、α-1胎蛋白、α-2亲血球蛋白、巨球蛋白、血浆铜蓝蛋白、转移、C3/C4B2微球蛋白、β脂蛋白、α,β和γ球蛋白、C-反应蛋白(CRP)、凝血酶原、甲状腺素-结合蛋白、甲状腺素运载蛋白等。示例性的血脂包括游离脂肪酸、胆固醇、甘油三酯、磷脂、鞘脂等。

[0300] 可以通过在足以引起所述淀粉样β肽从所述大分子组分中释放的条件下将生物样品的无细胞样品与蛋白增溶剂接触来确定连接至大分子组分的淀粉样β肽的量。

[0301] 在本文中接触一词是指将样品加入到足够量的包含蛋白增溶剂的溶液中使得混合物中所述蛋白增溶剂的浓度足以有效地溶解结合至样品中的蛋白和细胞上的淀粉样β肽。优选地,在处于缓冲溶液中的溶液中发现所述蛋白增溶剂,使得所述蛋白增溶剂的加入不会导致样品pH的显著改变。

[0302] 如本文所使用的术语“蛋白增溶剂”是指能够改变多肽的二级、三级和/或四级结构而保持一级结构不变的组合物的任何化合物。借助于这些性质,蛋白增溶剂能够提高蛋白质在样品中的溶解度并防止蛋白质的分子间和分子内聚集。适合在本发明中使用的蛋白增溶剂包括,但不限于,清洁剂、离液剂、还原剂或其混合物。

[0303] 如本文所使用的术语“清洁剂”一般是用作表面活性剂的同义词,并且是指当加入到液体中时与不存在所述清洁剂的相同液体相比降低所述液体表面张力的两亲性表面活性剂。清洁剂还能够防止蛋白质聚集并且防止非特异性相互作用或污染物与感兴趣的蛋白质的结合。适合在本发明中使用的清洁剂包括,但不限于,非离子型(中性)、阴离子型、阳离子型或两性离子型清洁剂。

[0304] 非离子或中性清洁剂的实例包括,但不限于,吐温(Tween)系列的清洁剂,如 Tween® 20、Tween® 21、Tween® 40、Tween® 60、Tween® 61、Tween® 65、Tween® 80、Tween® 81、Tween® 85, Span® 系列的清洁剂,如 Span® 20; Tergitol 系列的清洁剂,如 Tergitol 型 15-S-12; Brij® 系列的清洁剂,如 Brij® 35、Brij® 56、Brij® 72、Brij® 76、Brij® 92V、Brij® 97、Brij® 58P; Triton® 系列的清洁剂,如 Triton® X-100、Triton® X-114、Triton® CF-21、Triton® CF-32、Triton® DF-12、Triton® DF-16、Triton® GR-5M、Triton® X-102、Triton® X-15、Triton® X-151、Triton® X-207、Triton® X-165、Triton® X-305、Triton® X-405、Triton® X-45、Triton® X-705-70,或所述清洁剂中至少一种的非离子型保守变体。

[0305] 阴离子型清洁剂的实例包括,但不限于,胆酸及其衍生物、牛磺胆酸、Triton X-200、Triton W-30、Triton-30、Triton-770、磺基琥珀酸二辛酯、N,N-二甲基十二烷胺N-氧化物、1-烷基磺酸钠、N-月桂酰肌氨酸或脂肪酸盐。

[0306] 阳离子型清洁剂的实例包括,但不限于,单甲基脂肪胺和二甲基脂肪胺、烷基三甲胺盐、二烷基二甲基胺盐、烷基胺乙酸盐、三烷基胺乙酸盐、烷基二甲基苯甲基胺盐、二烷基甲基苯甲基胺盐、烷基吡啶鎓卤化物和烷基(烷基取代的)吡啶鎓盐、烷基硫基甲基吡啶鎓盐、烷基酰胺甲基吡啶鎓盐、烷基喹啉鎓盐、烷基异喹啉鎓盐、N,N-烷基甲基吡咯烷酮鎓盐、1,1-二烷基哌啶鎓盐、4,4-二烷基硫吗啉鎓盐、4,4-二烷基硫吗啉鎓-1-氧化物盐、甲基双(烷基乙基)-2-烷基咪唑啉鎓甲基硫酸盐(和其他盐)、甲基双(烷基酰胺基乙基)-2-羟乙基胺甲基硫酸盐(和其他盐)、烷基酰胺基丙基-二甲基苯甲基胺盐、羧基烷基-烷基二甲基胺盐、烷基胺氧化物、烷基二甲基胺氧化物、聚(乙烯基甲基吡啶鎓)盐、聚(乙烯基吡啶)盐、聚乙烯亚胺、三烷基磷碳酸氢盐(和其他盐)、三烷基甲基磷盐、烷基乙基甲基铈盐和烷基二甲基氧化铈盐。

[0307] 两性离子型清洁剂的实例包括,但不限于,3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基铵]-1-丙烷磺酸盐(CHAPS); 3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基铵]-2-羟基-1-丙磺酸盐(CHAPSO); N-(烷基C10-C16)-N,N-二甲基甘氨酸甜菜碱(EMPIGENBB); 辛酰硫代甜菜碱(SB3-10); 3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰氨基丙基)铵]丙磺酸盐(酰胺基硫代甜菜碱-14; ASB-14); N-十四烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐(3-14清洁剂; ZWITTERGENT); N-十二烷基-N,N'-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐; N-十八烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐; N-癸基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐; Mirataine CB; Mirataine BB; Mirataine CBR; Mirataine ACS; Miracare2MHT 和 Miracare2MCA。

[0308] 在优选的实施方式中,蛋白增溶剂为清洁剂。在又更优选的实施方式中,所述清洁剂是吐温20。在又更优选的实施方式中,以0.5%的浓度使用吐温20。

[0309] 如本文所使用的“离液剂”涉及破坏蛋白质之间和蛋白质内的氢键和疏水性相互作用的化合物或化合物的混合物。当以高浓度使用时,离液剂破坏蛋白质二级结构并且使得在其他情况下不溶的蛋白质成为溶液。适合的离液剂包括,但不限于,脲、异硫氰酸胍、硫氰酸钠(NaSCN)、盐酸胍、氯化胍、硫氰酸胍、四氯乙酸锂、高氯酸钠、四氯乙酸铷、碘化钾或三氟乙酸铯。

[0310] 如本文所使用的术语“还原剂”是指维持巯基处于还原状态并且还原分子内或分子间二硫键的任何化合物或材料。举例来说,适合于本发明所述方法的还原剂包括巯基或膦还原剂两者。巯基还原剂的实例包括二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)和 $\beta$ -巯基乙醇。膦还原剂的实例包括三丁基膦(TBP)和三羧乙基膦(TCEP)。

[0311] 通常,首先处理生物样品以除去细胞部分。然后,将不含细胞的样品与蛋白增溶剂接触。在优选的实施方式中,使用包含蛋白增溶剂的缓冲液稀释样品。通常,在包含吐温20的缓冲溶液中将样品稀释5倍。

[0312] 如本文所使用的,“缓冲溶液”是在能够中和酸和碱而不会显著改变溶液原始酸度或碱度的溶液中的任何物质或化合物的混合物。在本发明方法中使用的适合的缓冲溶液包括,但不限于,Tris缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、硼酸盐缓冲溶液、碳酸盐缓冲溶液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液等。优选地,所述缓冲溶液是磷酸盐缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水或PBS。

[0313] 包含加入到生物样品中的蛋白增溶剂的溶液的量并不重要,只要能够实现淀粉样 $\beta$ 肽的充分分离。举例来说,可以在包含蛋白增溶剂的溶液中以至少1/2(v/v)、1/3(v/v)、1/4(v/v)、1/5(v/v)、1/6(v/v)、1/7(v/v)、1/8(v/v)、1/9(v/v)、1/10(v/v)、1/20(v/v)、1/50(v/v)、1/60(v/v)、1/80(v/v)、1/90(v/v)、1/100(v/v)或以上的稀释度稀释生物流体。技术人员将理解可以使用所述稀释率和所述蛋白增溶剂浓度的任何组合,只要蛋白增溶剂的最终浓度足以实现所需的效果。例如,含有蛋白增溶剂的溶液可以包含范围0.001%至0.5%(w/v)的浓度的所述所选的蛋白增溶剂。在含有蛋白增溶剂的所述溶液中稀释后,所述生物流体通常含有小于0.1%(w/v),优选地小于0.6%(w/v),更优选地不超过0.5%(w/v),最优选地不超过0.45%(w/v)并且甚至最优选地0.5%的所述表面活性剂。

[0314] 适合在本发明中使用的缓冲液系统包括Tris-HCl缓冲液,其包含盐(如NaCl或KCl)和可选地BSA。具体的缓冲液系统包括,但不限于:

[0315] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0316] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20,1MGuHCl;

[0317] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M KCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0318] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M KCl,0.05%BSA,0.05%吐温20,1MGuHCl;

[0319] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温80;

[0320] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M KCl,0.05%BSA,0.05%吐温80;

[0321] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl;0.05%BSA,0.05%Triton X-100

[0322] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M KCl,0.05%BSA,0.05%Triton X-100;

[0323] 50mM Tris-HCl pH8;0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0324] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.1%BSA,0.05%吐温20;

[0325] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.1%吐温20;

[0326] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.1%BSA,0.1%吐温20;

[0327] 50mM Tris-HCl pH8,1M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0328] 50mM Tris-HCl pH8,1.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0329] 50mM Tris-HCl pH8,2M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0330] 50mM Tris-HCl pH8,2.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0331] 50mM Tris-HCl pH8,3M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0332] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20,10%DMSO;

[0333] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20,0.5MGuHCl;

[0334] 50mM Tris-HCl pH6,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0335] 50mM Tris-HCl pH7,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0336] 50mM Tris-HCl pH9,0.5M NaCl,0.05%BSA,0.05%吐温20;

[0337] 50mM Tris-HCl pH8,0.5M NaCl,0.05%BSA。

[0338] 例如,当吐温20用作蛋白增溶剂时,优选的浓度为0.004-0.02%,更优选地为0.005-0.01%(w/v)。

[0339] 优选地在低温下进行接触步骤以抑制样品中存在的蛋白水解活性。适合的温度为约0-10°C,优选地约3-5°C,例如,约4°C。

[0340] 一旦生物流体已与包含蛋白增溶剂的溶液接触,则可以将两流体混合。可以通过搅拌,优选地通过振荡,更优选地通过高速振荡,最优选地通过涡旋至少5秒,优选地至少10秒,更优选地至少15秒(例如,15-50秒)来进行混合。所述混合、搅拌、振荡、高速振荡或涡旋的有利速度包括至少250rpm的速度,优选至少500rpm,更优选至少1,000rpm,最优选约2,000-2,500rpm的速度。

[0341] 接触步骤是在足以实现淀粉样β肽与存在于生物样品中的蛋白质和脂质部分地或优选地完全解离的条件下进行的。本领域的普通技术人员可以通过监测在接触步骤之前以及在发生接触步骤后逐步地在不同时间点可检测的淀粉样β肽的量来充分确定所述条件。可以如实验部分的实例中所述来确定时间过程实验。

[0342] 技术人员应当理解的是当通过用含有蛋白增溶剂的缓冲液稀释生物样品来确定淀粉样β肽的水平时,将需要修正通过免疫确定获得的游离淀粉样β肽的水平以考虑先前应用于生物样品的稀释因子。

[0343] 如本文所使用的术语“在血浆中游离的Aβ17、Aβ40或Aβ42肽”(在下文中分别称为FP Aβ17、FP Aβ40或FP Aβ42)是指未连接至生物样品的任何组分并且易于得到以结合至特异性抗体的淀粉样β肽的水平。可以通过常规免疫学技术,通过将生物样品与对所述肽具有特异性的抗体接触来确定这种肽。在优选的实施方式中,确定了血浆中游离的淀粉样肽的水平。

[0344] 如本文所使用的术语“参考值”是指用于比较并且已在未患神经退行性疾病或无任何神经退行性疾病病史的受试者体内确定的参数值。优选地,从中获得不同参数以及计算参数的参考值的受试者是表现出无记忆障碍、在神经心理学测试中表现正常并且在MRI中无结构变化的患者。

[0345] 具体地,选择允许高于85%的灵敏度和高于75%的特异性的参考值。在另一个优选的实施方式中,选择参考值以获得高于70%的灵敏度和高于70%的特异性。优选地,参考值允许获得准确度或精确度为至少80%的预测。

[0346] 一旦确定了参数值,则当相对于参考值,参数的值或计算参数的值存在变化时,进行受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的确定。

[0347] 可以在本发明中使用适合于肽确定的任何方法。举例来说,可以使用选自以下的一种或多种技术来确定淀粉样β肽的浓度:蛋白质印迹、免疫沉淀法、酶联免疫吸附测定(ELISA)、表面等离子体共振、沉淀素反应、凝胶扩散免疫扩散测定、放射免疫测定(RIA)、荧

光激活细胞分选术(FACS)、二维凝胶电泳、毛细管电泳、质谱法(MS)、基质辅助激光解析/电离化-飞行时间质谱(MALDI-TOF)、表面增强激光解吸/离子化-飞行时间(SELDI-TOF)、高效液相色谱法(HPLC)、快速蛋白质液相色谱(FPLC)、多维液相色谱(LC)紧接着串联质谱(MS/MS)、薄层色谱法、蛋白质芯片表达分析和激光密度法。

[0348] 在优选的实施方式中,通过免疫方法来进行本发明方法的确定。当用于确定时,如本文所使用的“免疫方法”是指任何方法,其包括使用对靶物质具有特异性的一种或多种抗体以确定除样品中发现的其他物质以外的所述靶物质的量/浓度。适合的免疫学方法包括,单不限于,蛋白质印迹、免测沉淀法、酶联免疫吸附测定(ELISA)、表面等离子共振、放射免疫测定(RIA)。在优选的实施方式中,通过ELISA进行淀粉样β肽的确定或检测。

[0349] 技术人员将理解任何类型的抗体均适合进行根据本发明的免疫学检测方法,条件是所述抗体具有足够特异性以有效地将样品中淀粉样β肽物质与其他物质区分开。

[0350] 如本文所使用的术语“ELISA”代表酶联免疫吸附测定并且涉及以下测定:通过其将未知量的靶物质(淀粉样β肽)固定至表面,然后特异性抗体清洗通过所述表面使得它可以结合至抗原。该抗体连接至酶,并且在最后的步骤中加入酶可以将其转化为一些可检测信号的物质。不同类型的ELISA测定是已知的并且可以应用于本发明的方法,其包括直接ELISA、夹心ELISA、竞争ELISA和反向ELISA方法和装置(ELISA-R m&d)。

[0351] 直接ELISA是通过将包含淀粉样β肽的测试样品与先前已用无相互作用的蛋白或试剂(牛血清白蛋白、酪蛋白)的浓溶液涂覆的固体载体接触来进行的。一旦测试样品中存在的淀粉样β肽吸附到载体上,则在足以结合至淀粉样β肽的条件下加入对淀粉样β肽具有特异性的抗体。然后,用偶联至可检测标记或底物修饰酶的第二抗体来检测结合的抗体。然后,由可检测标记或由底物产生的信号与结合至载体的抗体的量成正比,进而直接地与样品中淀粉样β肽的量相关。

[0352] 竞争ELISA测定包括第一步骤,其中包含未知量的淀粉样β肽的测试样品与如上定义的第一抗体接触。将抗体-抗原复合物加入到抗原涂覆的孔中。一旦清洗载体以除去任何非特异性结合的复合物,则用偶联至可检测部分的第二抗体来检测第一抗体的量。在这类测定中,初始抗原浓度越高,则最终信号越弱。可替代的竞争ELISA测定是包含酶联抗原而不是酶联抗体的测定。标记的抗原与样品抗原(未标记)竞争第一抗体结合位点。使用这类测定,样品中抗原浓度导致与孔中保留的标记抗原的量逆相关,并因此导致信号更弱。

[0353] 反向ELISA方法和装置(ELISA-R m&d)使用了由具有4-12个突出尖顶部(ogive)的免疫吸附剂聚苯乙烯杆构成的新型固相;整个装置适合引入至含有所采集样品的试管中,并且通过将所述尖顶部(ogive)浸没在用试剂预填充、密封并储存直至使用的标准微孔板的微孔中来容易地进行随后的步骤(清洗、在结合物中孵育和在发色物中孵育)。

[0354] 在优选的实施方式中,所述ELISA测定是夹心ELISA测定。夹心ELISA测定包括用对淀粉样β肽具有特异性的第一抗体涂覆载体,应用含有将导致淀粉样β肽与第一抗体结合的淀粉样β肽的样品并且应用对淀粉样β肽也具有特异性的第二抗体,其中所述第二抗体通常偶联至可检测标记或偶联至底物修饰酶。通过所述标记或通过转化的底物产生的信号与样品中抗原的量成正比。

[0355] 优选地,平行地使用待确定的样品和具有已知浓度的待确定化合物的多个参考样品来执行所述方法的不同步骤。必须使用用于确定上述参数的浓度的逐渐增加的浓度来制

备Aβ17肽的标准曲线。标准曲线起到双重目的：(i)建立浓度范围，其中信号随着目标肽的浓度线性地提高，和(ii)通过在曲线中内插用所述测试或标准样品得到的信号来确定测试样品中肽的浓度以获得浓度值。鉴于本发明的测定的高灵敏度，测试样品的优选浓度为(例如)3.125;6.25;12.5;25;50;100和200pg/mL。应当理解的是用于获得标准曲线的样品浓度对于每个测试底物将是不同的。然而，熟练的执业者通过传统方法可以容易地确定所述测定的线性范围的确定。

[0356] 术语“变化”是指相对于参考值所考虑的参数值的统计学显著的增加或减少。

[0357] 如本文所使用的“统计学显著的”是指两个或更多个结果、终点或结果之间存在非随机关联的可能性的统计分析，即相对于参考值，参数值与特定患者群体相关联的一定程度的数学保证。

[0358] 可以使用p值来确定所述值变化的统计学显著性。例如，当使用p值时，当p值小于0.1，优选小于0.05，更优选小于0.01，甚至更优选小于0.005，最优选小于0.001时，参数鉴别为显示显著变化。

[0359] 通常，当与参考值相比较时，所述值高于参考值至少1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或甚至更多时，可以将所考虑的参数值指定为“升高”。另一方面，当与参考值相比较它为至少0.9倍、0.75倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、0.025倍、0.02倍、0.01倍、0.005倍或甚至更低时，可以认为参数值为“降低”。在具体的实施方式中，相对于参考值，参数值或计算参数值的变化为升高。

[0360] 本发明的其他实施方式如下所示：

[0361] [1]特异性地结合至Aβ(1-17)肽的抗体。

[0362] [2]如[1]中所定义的抗体，其对选自由以下组成的组中的Aβ肽并未显示出显著的交叉反应性：Aβ(1-15)、Aβ(1-16)、Aβ(1-38)、Aβ(1-40)、Aβ(1-42)和它们的一个或多个的组合。

[0363] [3]如[1]或[2]所定义的抗体，其是多克隆抗体。

[0364] [4]如[1]至[3]中任一项所定义的抗体，其中使用选自由SEQ IDNO:1或SEQ IDNO:2组成的组中的Aβ肽作为免疫原获得了所述抗体。

[0365] [5]用于检测Aβ(1-17)肽的试剂盒，其包括：

[0366] (i)第一抗体，其是如[1]至[3]中任一项所定义的抗体，和

[0367] (ii)第二抗体，其识别不同于被所述第一抗体识别的区域的Aβ(1-17)肽的区域。

[0368] [6]根据[5]的试剂盒，其中所述第一抗体或第二抗体偶联至结合对的第一元件。

[0369] [7]根据[6]的试剂盒，还包含所述结合对的第二元件，其中所述结合对的所述第二元件偶联至可检测标记。

[0370] [8]如[7]中所定义的试剂盒，其中如果偶联至结合对的第二元件的可检测标记是酶标记，则所述试剂盒还包含可以通过所述酶转化为可检测产物的底物。

[0371] [9]如[5]至[8]中任一项所定义的试剂盒，还包含特异性结合至Aβ40和/或Aβ42的抗体或抗体组合。

[0372] [10]如[5]至[9]中任一项所定义的试剂盒，还包含固体载体。

[0373] [11]如[10]中所定义的试剂盒，其中未偶联至结合对的第一元件的所述抗体预结合至所述固体载体。

[0374] [12]如[5]至[11]中任一项所定义的试剂盒,还包含含有AB17、AB40和/或AB42肽的样品。

[0375] [13]用于确定或检测样品中A $\beta$ (1-17)肽的方法,包括以下步骤:

[0376] (i)用第一抗体捕获样品中存在的A $\beta$ (1-17)肽,所述第一抗体特异性地结合至所述肽,

[0377] (ii)用第二抗体接触步骤(i)中形成的免疫复合物,其中所述第二抗体如[1至4中任一项所定义并且其中所述第二抗体识别不同于所述第一抗体的区域并且与结合对的第一元件偶联;

[0378] (iii)用偶联至可检测标记的结合对的第二元件接触在步骤(ii)中形成的复合物,和

[0379] (iv)检测或确定所述可检测标记的活性或量。

[0380] [14]如[13]至[17]中任一项所定义的方法,其中所述生物样品选自下组:血液、血清、血浆和CSF。

[0381] [15]如[1]至[12]中任一项所定义的试剂盒或如[13]或[14]中所定义的方法,其中所述第一抗体是单克隆抗体。

[0382] [16]如[15]中所定义的试剂盒或方法,其中所述单克隆抗体是6E10抗体。

[0383] [17]如[1]至[16]中任一项所定义的试剂盒或方法,其中所述结合对的所述第一元件是生物素而所述结合对的所述第二元件是抗生物素蛋白、链霉亲和素或其功能等效变体。

[0384] [18]如[1]至[17]中任一项所定义的试剂盒或方法,其中所述可检测标记是荧光分子、发光分子或酶。

[0385] [19]用于监测受试者体内神经退行性疾病的方法,包括:

[0386] (a)在第一时间点确定来自所述受试者的样品中血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平和结合至所述受试者样品中血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平;

[0387] (b)在第二时间点确定来自所述受试者的样品中血浆样品中游离A $\beta$ 17肽的水平和结合至所述受试者的样品中血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,以及

[0388] (c)比较在所述第一和第二时间点在血浆样品中游离A $\beta$ 17肽水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的比率;

[0389] 其中如果所述比率在第二时间点相对于第一时间点升高的话,则它指示在所述第一和所述第二时间点之间受试者体内阿尔茨海默氏病的恶化。

[0390] [20]根据[19]的方法,其中所述神经退行性疾病是阿尔茨海默氏病。

[0391] [21]根据[19]或[20]中任一项的方法,其中通过ELISA进行A $\beta$ 17肽水平的确定。

[0392] [22]根据[21]的方法,其中使用如[13]至[18]中任一项所定义的方法进行A $\beta$ 17肽水平的水平确定。

[0393] [23]用于确定受试者是否患有轻度阿尔茨海默氏病的方法,包括确定选自由以下组成的组中的一个或多个参数的值:

[0394] (a)结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、AB40和AB42肽水平的加和值;

[0395] (b)来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17、AB40和AB42总肽水平和结合至来自所述

受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0396] (c)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0397] (d)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；以及

[0398] (e)来自所述受试者的血浆样品中游离的A $\beta$ 17水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率；

[0399] 其中如果所述参数中一个或多个的值相对于健康受试者体内参考样品中所述参数的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0400] [24]用于确定受试者是否患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0401] (a)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 42肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0402] (b)来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0403] (c)来自所述受试者的血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与结合至来自所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值；

[0404] (d)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值；

[0405] (e)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 17肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的加和水平,而所述第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 42肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽的加和水平；

[0406] (f)两个参数之间的比率,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值；和

[0407] (g)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中总A $\beta$ 17肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而所述第二参数对应于血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0408] 其中如果相对于健康受试者的参考样品中的值,参数(a)、(b)或(c)中的一个或多个的值增加和/或参数(d)、(e)、(f)或(g)中的一个或多个的值降低,则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

[0409] [25]用于区分患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0410] (a)结合至来自所述受试者样品的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值；

[0411] (b)结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至所述受试者的血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率值；

[0412] (c)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样

品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而所述第二参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0413] (d)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0414] (e)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于来自所述受试者的血浆样品中A $\beta$ 17总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平的加和值,而所述第二参数对应于血浆样品中A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0415] 其中如果相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值,(a)的值增加和/或所述参数(b)、(c)、(d)和(e)中的一个或多个的值降低,则所述受试者患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI。

[0416] [26]用于区分患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0417] (a)结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0418] (b)血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42总肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0419] (c)血浆样品中总A $\beta$ 42肽和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0420] (d)血浆样品中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;

[0421] (e)血浆样品中总A $\beta$ 40肽水平和结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40肽水平的加和值;

[0422] (f)两个参数之间的比率值,其中所述第一参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平的加和值;和

[0423] (g)血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与结合至血液样品中的细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率值;

[0424] 其中如果相对于患有具有非前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者体内参考样品的值,所述参数中一个或多个的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0425] [27]用于区分患有具有前驱性阿尔茨海默氏病的MCI的受试者和患有轻度阿尔茨海默氏病的受试者的方法,包括确定选自下组的一个或多个参数的值:

[0426] (a)血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽水平与血浆样品中游离的A $\beta$ 40肽水平之间的比率值;和

[0427] (b)两个参数之间的比率,其中所述第一参数对应于血浆样品中游离的A $\beta$ 17肽的水平,而所述第二参数对应于血浆样品中游离的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽的加和水平;

[0428] 其中如果相对于前驱性轻度认知障碍受试者体内参考样品的值,所述参数中一个或多个的值增加,则所述受试者患有轻度阿尔茨海默氏病。

[0429] [28]根据[23]至[27]中任一项的方法,其中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽中一种或多种水

平的确定是通过ELISA确定的。

[0430] 作为说明提供了以下实施例,并且不应将这些实施例解释为限制本发明的范围。

[0431] 实施例

[0432] 实施例1

[0433] 抗A $\beta$ 17抗体的产生

[0434] 用以下对应于A $\beta$ (12-17)(SEQ ID NO:2)的肽VHHQKL和对应于A $\beta$ (11-17)(SEQ ID NO:3)的肽EVHHQKL免疫四只兔子,用第一种肽免疫它们中的两只,并且用第二种肽免疫它们中的另外两只兔子。两种肽在N末端包含额外的氨基酸,用于结合的半胱氨酸。

[0435] 用于结合的载体是钥孔血蓝素(KLH)(Pierce,参考号:77600)。通过交联剂NHS-PEG<sub>4</sub>-马来酰亚胺(Pierce,参考号:22104)进行结合。关于佐剂,使用三种类型:弗氏完全佐剂(Sigma,参考号:F5881)、弗氏不完全佐剂(Sigma,参考号:F5506)和Imject明矾(Pierce,参考号:77161)。

[0436] 免疫方案如下所示:

[0437] -每周用100 $\mu$ g的肽免疫四只兔子。

[0438] -使用弗氏完全佐剂作为佐剂进行第一次给药,然后用弗氏不完全佐剂进行另一次给药,并且用明矾进行第三次给药。

[0439] -在前三次给药后,获得的抗体滴度太低以至于不能纯化。因此,在另外三次给药中(交替使用佐剂:弗氏不完全佐剂-明矾-弗氏不完全佐剂)剂量增加到200 $\mu$ g肽。

[0440] -四只兔子获得的抗体滴度非常高,并通过亲和色谱法(使用A $\beta$ 17肽)进行纯化。

[0441] 进行斑点印迹以确定抗A $\beta$ 17抗体的特异性,其中包括其他A $\beta$ 肽(图1)。以两个稀释度(1:1000和1:2000)加入抗A $\beta$ 17抗体并且所使用的第二抗体是山羊抗兔-HRP(1:2000)。在2.5 $\mu$ l中每种肽加载500ng。使用SNAP技术以1分钟和3分钟曝光用ECL显影斑点印迹。如所述图中所示,抗体对A $\beta$ 17肽具有高度特异性,并且它并不特异性地识别A $\beta$ 15、A $\beta$ 16、A $\beta$ 38、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42。

[0442] 实施例2

[0443] 样品中A $\beta$ 17肽的确定

[0444] (1)通过质谱确定

[0445] 试剂

[0446] 甲酸、氯化钠、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸( $\alpha$ -CHCA)、三氟乙酸(TFA)、DL-二硫苏糖醇(DTT)、三乙醇胺、Tris和牛血清白蛋白(BSA)来自Sigma(Steinheim,Germany)。乙腈购自Carlo-Erba(Rodano,MI,Italy)。庚二亚氨酸二甲酯·2HCl(DMP)获自Pierce(Rockford,IL,USA)。三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)样品缓冲液购自Bio-Rad(Hercules,CA,USA)。

[0447] 免测沉淀法(IP)操作

[0448] 如Portelius等人,2007(J.Proteome.Res.6(11),4433-4439)所述并使用一些修改来执行IP-MALDI操作从而使所述操作适合狗样品的分析。首先,使用不同量的A $\beta$ 特异性抗体(6E10和4G8-分别对氨基酸4-9和18-22中的A $\beta$ 表位具有特异性,Signet Laboratories,Inc.,Dedham,MA,USA)和SAR2(对抗A $\beta$ 40羧基末端表位具有特异性,Araclon Biotech S.L.,Zaragoza,Spain)以通过蛋白质印迹法确定每种抗体的最佳量。优化操作包括不同步骤。根据生产商的说明书,将每种抗体单独地加入至50 $\mu$ LDynabeads蛋白G

(Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway)。将珠粒与不同量的抗体一起孵育,清洗,然后将所述珠粒在具有DTT的三(羟甲基)甲基甘氨酸样品缓冲液中煮沸来洗脱抗体。通过蛋白质印迹法确定每种抗体的饱和量。此外,还优化了所述珠粒与抗体以及珠粒-抗体复合物与样品的孵育时间(1小时并且过夜)和温度(4°C,室温和37°C)。另一个优化的参数是洗脱条件(0.5、2.5和5%的甲酸,以及有机溶剂(如乙腈)的几种百分比)。

[0449] 在本研究期间应用了两种不同的方案。第一种基本上是基于使用优化参数的生产商的说明书:将A $\beta$ 特异性抗体(4 $\mu$ g6E10或8 $\mu$ g4G8或6 $\mu$ gSAR2)的等份部分与50 $\mu$ L Dynabeads 蛋白G一起在室温下在旋转震荡器中孵育1小时。此后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS:1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O,5mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O,138mM NaCl)进行三次清洗。加入1mL CSF并在室温下在旋转震荡器中孵育过夜。孵育后,利用磁铁(DynaMag-2或DynaMag-15,Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway)将CSF从所述珠粒中除去并弃去。用1mL100mM Tris(pH=6.8)清洗珠粒三次,并使用25 $\mu$ L5%的甲酸进行最终洗脱。将洗脱液在室温下在Thermomixer中孵育5分钟。用ZipTip C<sub>18</sub>吸头(Millipore,Billerica,MA,USA)将洗脱的化合物脱盐。ZipTip C<sub>18</sub>方案由几个步骤组成:使用乙腈进行吸头溶剂化,用0.1%TFA调节(将该步骤重复几次),样品加载(通过上下移液几次),使用0.1%TFA的清洗步骤和使用3 $\mu$ L $\alpha$ -CHCA(5mg/mL)的最终洗脱。

[0450] 在第二方案中,将柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液,pH=5.0(24.5mM柠檬酸,52mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)用于清洗和结合步骤,代替PBS。在洗脱前,用PBS清洗珠粒,代替100mM Tris pH=6.8。该第二方案导致具有较低背景噪声的质谱以及更强的峰,并将它用于实验的其余部分。

[0451] 对于人样品的免测沉淀法,使用50 $\mu$ L Dynabeads绵羊抗小鼠(Invitrogen Dynal AS,Oslo,Norway)。用PBS清洗珠粒三次,并与最佳量的特异性抗体(8 $\mu$ g6E10或8 $\mu$ g4G8)在室温下在旋转震荡器中孵育1小时。此后,除去上清液并用1mL0.2M的三乙醇胺(pH=8.2)清洗珠粒。加入处于0.2M三乙醇胺(pH=8.2)中的1mL20mM DMP(具有胺反应基团的同型双功能交联剂;(Greg T Hermanson,2010))溶液之后发生交联反应。将珠粒和抗体在室温下孵育30分钟,然后弃去上清液并通过在旋转震荡器中加入1mL50mM Tris(pH=7.5)持续15分钟来终止反应。用1mL含有0.1%BSA的PBS清洗交联的珠粒三次。加入1mL混合的人CSF并将其在室温下孵育过夜。弃去上清液并用PBS清洗珠粒几次。用25 $\mu$ L5%的甲酸洗脱A $\beta$ 物质。使用如上所述的相同方案用ZipTip C<sub>18</sub>对洗脱的化合物脱盐。

[0452] MALDI-TOF和MALDI-TOF/TOF质谱法(MS)。

[0453] 将0.7 $\mu$ L的洗脱样品直接放置在MALDI靶板上直至完全蒸发。使用配备有在200Hz的重复频率下运行的二极管泵送固态Nd:YAG激光器(355nm)的ABI4800MALDI-TOF/TOF质谱仪(AB/Sciex)采集所有光谱。为了获得MS光谱,仪器在反射器模式下运行并且所有实验均在阳离子模式下进行。激光器点火后400纳秒,应用20kV的加速电压。离子在两级反射器中重新聚焦并最终在第二检测器中检测。镜2与源1的电压差保持恒定在1.105的比率值。对于MS/MS采集源1,电压保持在8kV,激光值设置为比MS实验中高1000个单位。通过时间离子选择器(Timed Ion Selector)在250的分辨率值下(半峰全宽)针对破碎选择前体离子。所选的离子在到达碰撞室之前在减速堆叠(deceleration stack)中减速并且当在1keV动能下与空气碰撞时发生解离(高能碰撞诱导解离)。在短暂的延迟时间后,在15kV下在第二源中将碎片离子再加速。在所有MS/MS实验中激活亚稳态抑制剂以避免检测出剩余的前体离子

和不希望的亚稳态衰变碎片。使用Data Explorer软件进行光谱处理(平滑和/或噪声过滤)。仅报告单同位素的m/z比率。用生产商所提供的肽混合物来外部校准质谱仪,覆盖了900-4000Da的分子量范围。必要时,用胰岛素(M+H+=5730.609Da)校准仪器。

[0454] 图2中显示了脑脊髓液(CSF)样品和血浆样品的质谱结果,其中用箭头指示对应于A $\beta$ 17的峰。

[0455] (2)通过ELISA确定

[0456] 试剂和溶液

[0457] - $\beta$ -淀粉样1-17标准品,人源。20ng/ml母液。

[0458] -优化以将抗体吸附到其表面上的微孔板。

[0459] -对人A $\beta$ 肽的NH<sub>2</sub>末端具有特异性的捕获单克隆抗体(6E10抗体)。

[0460] -检测结合生物素的多克隆抗体,其特异性地识别末端在氨基酸17的人A $\beta$ 肽。

[0461] -链霉亲和素-HRP结合物的放大剂溶液。

[0462] -稳定的发色团TMB。

[0463] -涂覆缓冲液:100mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>pH9.6。

[0464] -清洗缓冲液:50mM Tris,0.05%吐温20,150mM NaCl,pH8.0。

[0465] -封闭缓冲液:50mM tris,0.2%吐温20,0.5%BSA,pH8.0。

[0466] -保存溶液:20mg/ml海藻糖,50mM tris,pH8.0。

[0467] -抗体稀释剂:50mM tris,0.05%BSA,0.5M NaCl,0.05%吐温20,pH8.0。

[0468] -PBST:80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,100mM NaCl,0.5%吐温20,pH7.5。

[0469] -标准品/样品稀释剂:在PBST中1:100稀释度的合成封闭剂。

[0470] -终止溶液:1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

[0471] 方法

[0472] 使用识别A $\beta$ 淀粉样肽中氨基酸1-17的6E10单克隆捕获抗体来涂覆孔板。根据抗体的饱和浓度确定所使用的浓度,使得它将不会是抗原-抗体反应中的限制因素。为此目的,通过将抗小鼠IgG HRP结合的抗体在室温下振荡孵育1小时以及与发色底物进行孵育的步骤并随后终止反应来监测吸附至孔的抗体从而将450nm的吸光值与每孔中的抗体浓度相关联。选择信号不随抗体浓度增加的浓度。

[0473] 一旦选择了饱和浓度,用处于涂覆缓冲液中的100 $\mu$ l捕获抗体涂覆微孔板并在4 $^{\circ}$ C下在约20h的期间内孵育过夜(ON)。

[0474] 然后,用清洗缓冲液清洗孔板5次,并且每孔加入300 $\mu$ l封闭缓冲液。将孔板在室温下孵育3小时。然后,将孔板用清洗缓冲液清洗5次,并加入100 $\mu$ l保存溶液。使孔板蒸发直至出现海藻糖的白色晕圈特征(在室温下2-3天)。这样处理的孔板可以在4 $^{\circ}$ C下保持用铝箔覆盖并且在两年内是稳定的。

[0475] 样品制备

[0476] 可以使用未稀释或在样品/标准品稀释剂中1:2至1:10稀释的样品。对于血浆样品推荐1:3稀释,对于血细胞样品推荐1:5。为了确保准确定量,必须与样品相同的稀释剂或缓冲液中产生标准曲线和空白。

[0477] 用200pg/ml的肽A $\beta$ 17母液在用6E10mAb涂覆并用海藻糖处理的孔板上制备人A $\beta$ 17(hA $\beta$ 17)的标准曲线样品。从这些溶液,制备在样品/标准品稀释剂中1:2连续稀释液从而获

得200、100、50、25、12.5、6.25和3.125pg/ml的浓度。加入100 $\mu$ l的每种样品并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜(或在37 $^{\circ}$ C下孵育2h)。

[0478] 检测步骤

[0479] 检测抗体是抗末端在氨基酸17的人A $\beta$ 肽的多克隆生物素结合的抗体。在活化步骤和在室温下在黑暗中孵育过夜后发生抗体与生物素的结合。在随后的步骤中将过量的生物素失活。加入在抗体稀释剂中稀释的检测抗体。每孔加入100 $\mu$ l,然后在室温下振荡孵育1h。然后,将100ml在抗体稀释剂中1/50稀释的HRP偶联的链霉亲和素(得自SIGMA)加入至每个孔中并在室温下振荡孵育1h。为了使孔板显色,使用100 $\mu$ l发色底物TMB(ZEU Immunotec)。加入TMB并且在黑暗中孵育45分钟。每孔加入50 $\mu$ l终止溶液。在酶标仪Synergy HT(BioTek Instruments)中读取450nm的吸光值。

[0480] A $\beta$ 17定量

[0481] 可以使用任何免疫测定软件包来计算结果。用于曲线拟合的方法是线性回归法并且如下所示计算出A $\beta$ 17的浓度:

[0482] (i)如下所示,计算出每个标准品稀释液和样品的平均净OD:

[0483] 平均净OD(nm)=平均结合OD(nm)-平均零OD(nm)。

[0484] (ii)在坐标纸上绘制标准品稀释液的平均净OD(nm)相对于标准品的A $\beta$ 浓度(pg/ml)。通过这些点绘制最佳曲线以构建标准曲线。

[0485] (iii)可以通过由标准曲线的内插法来确定未知样品和对照中的A $\beta$ 浓度。

[0486] (iv)将针对样品获得的值乘以每个样品的稀释因子。

[0487] (v)将产生信号大于200pg/ml标准品的样品进一步稀释并测定。

[0488] 实施例3

[0489] 可重复性以及检测限和定量限的确定

[0490] 为了分析免疫测定的可重复性,测量了孔板内的差异度、测定内的差异度、血浆样品中测定间的差异度和细胞样品中测定间的差异度。

[0491] 通过分析在相同孔板中样品、标准样品和参考样品中三次重复的孔之间的差异来计算孔板内的差异度。在测定内的可重复性中,比较了在相同测定中11个不同的孔板中分析的4种参考血浆样品所获得的浓度。在血浆样品的测定间的差异度中,当分析两个不同的并且独立的测定中两个血浆样品时测量了从浓度中获得的差异。细胞样品中测定间的差异度是指8个细胞对照样品的两次不同的并且独立的确定之间A $\beta$ 17水平的比较。

[0492] 表1中显示了获得的结果:

[0493]	板内的差异度 (%)	5.11
	测定内的差异度 (%)	11.50
	血浆样品的测定间的差异度 (%)	9.51
	细胞样品的测定间的差异度 (%)	21.55

[0494] 通过两种不同的方法计算检测限(DL)和定量限(QL):

[0495] (a)方法1:

[0496]  $DL = \text{浓度}_{\text{空白}} + 3\sigma_{\text{空白}}$

[0497]  $QL = \text{浓度}_{\text{空白}} + 10\sigma_{\text{空白}}$

[0498] (b)方法2:

[0499]  $DL = 3.3\sigma_{\text{空白}}/m$

[0500]  $QL = 10\sigma_{\text{空白}}/m$

[0501] 其中 $\sigma_{\text{空白}}$ 是空白的标准偏差,而 $m$ 是校准线的斜率

[0502] 表2中显示了使用这两种方法获得的检测限(DL)和定量限(QL):

	方法1	方法2
[0503] 检测限 (pg/ml)	21.883	2.914
定量限 (pg/ml)	21.904	8.830

[0504] 实施例4

[0505] AD诊断和A $\beta$ 17/A $\beta$ 40/A $\beta$ 42水平之间的相关性

[0506] 使用实施例1中所述的夹心ELISA测定,确定来自65岁以上的对照健康(CS>65或HC>65)的受试者群体(19位受试者),来自患有轻度阿尔茨海默氏病(轻度AD)的受试者群体(17位受试者),来自患有前驱性或疑似轻度认知障碍(MCI)的受试者群体(16位受试者)和来自患有非前兆性或可能轻度认知障碍(MCI)的受试者群体(16位受试者)的血浆样品中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42水平。在图3A、图4A、图5A和图6A的表中显示了针对所述肽获得的以pg/mL为单位的浓度。

[0507] 轻度AD中血浆中A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平(血浆中的总肽+结合至细胞的肽)(PIB(17+40+42))相对于对照健康受试者以及可能的MCI受试者或非前驱性受试者相对于轻度阿尔茨海默氏病受试者显著地不同。然而,标志物PIB(17+40+42)在HC>65受试者和疑似MCI受试者之间没有差别,而PIB(40+42)的差异非常显著(图3B)。

[0508] 能够在这些组之间进行区分的有待测量的其他相关参数如下所示(图3、4、5和6):

[0509] -结合至细胞的A $\beta$ 17、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平(CB(17+40+42))。如图3所示,结合至细胞的这些肽水平在疑似MCI和轻度AD受试者体内比在可能MCI和健康受试者体内更高。并且有可能高度显著地区分健康受试者和轻度AD、可能的MCI和疑似MCI受试者以及区分MCI受试者和轻度AD受试者。

[0510] -血浆中总A $\beta$ 42总肽水平+结合至细胞的A $\beta$ 42肽水平(TP42+CB42)。如图3所示,这些标志物的水平在疑似MCI和轻度AD受试者体内比在可能MCI和健康受试者体内更高。并且有可能高度显著地区分健康受试者和轻度AD或疑似MCI受试者以及区分可能MCI受试者和轻度AD受试者。

[0511] -血浆中总A $\beta$ 40总肽水平加上结合至细胞的A $\beta$ 40肽水平(TP40+CB40)。如图3所示,这些标志物的水平在疑似MCI和轻度AD受试者体内比在可能MCI和健康受试者体内更高。并且有可能高度显著地区分可能MCI和轻度AD。

[0512] -血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平和血浆中游离的A $\beta$ 40肽水平之间的比率(FP17/40)能够区分疑似MCI和轻度AD(图4)。

[0513] -结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率(CB17/42)能

够区分健康受试者或可能MCI受试者和疑似MCI受试者(图4)。

[0514] -血浆中总A $\beta$ 17肽水平+结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平和血浆中总A $\beta$ 42肽水平加上结合至细胞的A $\beta$ 42肽水平之间的比率(TP17+CB17/TP42+CB42)能够区分健康受试者或可能MCI受试者和疑似MCI受试者(图4)。

[0515] -血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平和血浆中游离的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平之间的比率(FP17/FP40+FP42)能够区分疑似MCI和轻度AD(图5)。

[0516] -结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平和结合至细胞的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平之间的比率(CB17/CB40+CB42)能够区分健康受试者或可能MCI受试者和疑似MCI受试者以及区分健康受试者和轻度AD受试者(图5)。

[0517] -血浆中总A $\beta$ 17肽水平+结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平和血浆中总A $\beta$ 40和A $\beta$ 42肽水平(PIB(40+42))之间的比率能够区分健康受试者或可能MCI受试者与疑似MCI受试者(图5)。

[0518] -血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平和结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平之间的比率(FP17/CB17)能够区分健康受试者或可能MCI受试者和轻度AD受试者以及区分健康受试者和疑似MCI受试者(图6)。所有A $\beta$ 17比率的统计分析(曼-惠特尼U检验(U Mann-Whitney test))显示仅在血浆中游离的标志物A $\beta$ 17肽水平/结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平(FP17/CB17)方面具有统计学显著差异。

[0519] 同样地,血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平和结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平的比率与AD发展之间存在关系。认知障碍发展的越厉害,则血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平越高,并因此血浆中游离的A $\beta$ 17肽水平和结合至细胞的A $\beta$ 17肽水平的比率(FP17/CB17)也越大。

[0520] 表3:

[0521]

	FP17/TP17	TP17/CB17	FP17/CB17	FP17/PIB17	TP17/PIB17	CB17/PIB17
HC>65vs可能MCI	0.313	0.987	0.296	0.282	0.987	0.987
HC>65vs疑似MCI	0.169	0.608	0.020	0.082	0.608	0.608
HC>65vs轻度AD	0.113	0.296	<0.001	0.004	0.296	0.296
可能MCI vs疑似MCI	0.749	0.720	0.109	0.462	0.720	0.720
可能MCI vs轻度AD	0.615	0.397	0.002	0.075	0.397	0.397
疑似MCI vs轻度AD	0.815	0.439	0.228	0.288	0.439	0.439

## 序列表

<110> ARACLON BIOTECH, S.L.

<120> 用于确定淀粉样肽的抗体、试剂盒和方法

<130> P7069EP00

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

Leu

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于制备抗Aβ17-特异性多克隆Ab的肽

<400> 2

Val His His Gln Lys Leu  
1 5

[0001]

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于制备抗Aβ17-特异性多克隆Ab的肽

<400> 3

Glu Val His His Gln Lys Leu  
1 5

<210> 4

<211> 770

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg  
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro  
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln  
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp  
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu  
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn  
 85 90 95  
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val  
 100 105 110  
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu  
 115 120 125  
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys  
 130 135 140  
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile  
 165 170 175  
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu  
 180 185 190  
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val  
 195 200 205  
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys  
 210 215 220  
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu  
 245 250 255  
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile  
 260 265 270  
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg  
 275 280 285  
 Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile  
 290 295 300  
 Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe  
 305 310 315 320  
 Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr  
 325 330 335  
 Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr  
 340 345 350  
 Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala  
 355 360 365

[0002]

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp  
370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala  
385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala  
405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile  
420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn  
435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met  
450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu  
465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys  
485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe  
500 505 510

[0003]

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser  
515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser  
530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp  
545 550 555 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val  
565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala  
580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro  
595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe  
610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val  
625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser  
645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp  
 660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu  
 675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly  
 690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu  
 705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val  
 725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met  
 740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met  
 755 760 765

Gln Asn  
 770

[0004]

<210> 5  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <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 Ile Ala  
 35 40

<210> 6  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <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  
 35 40

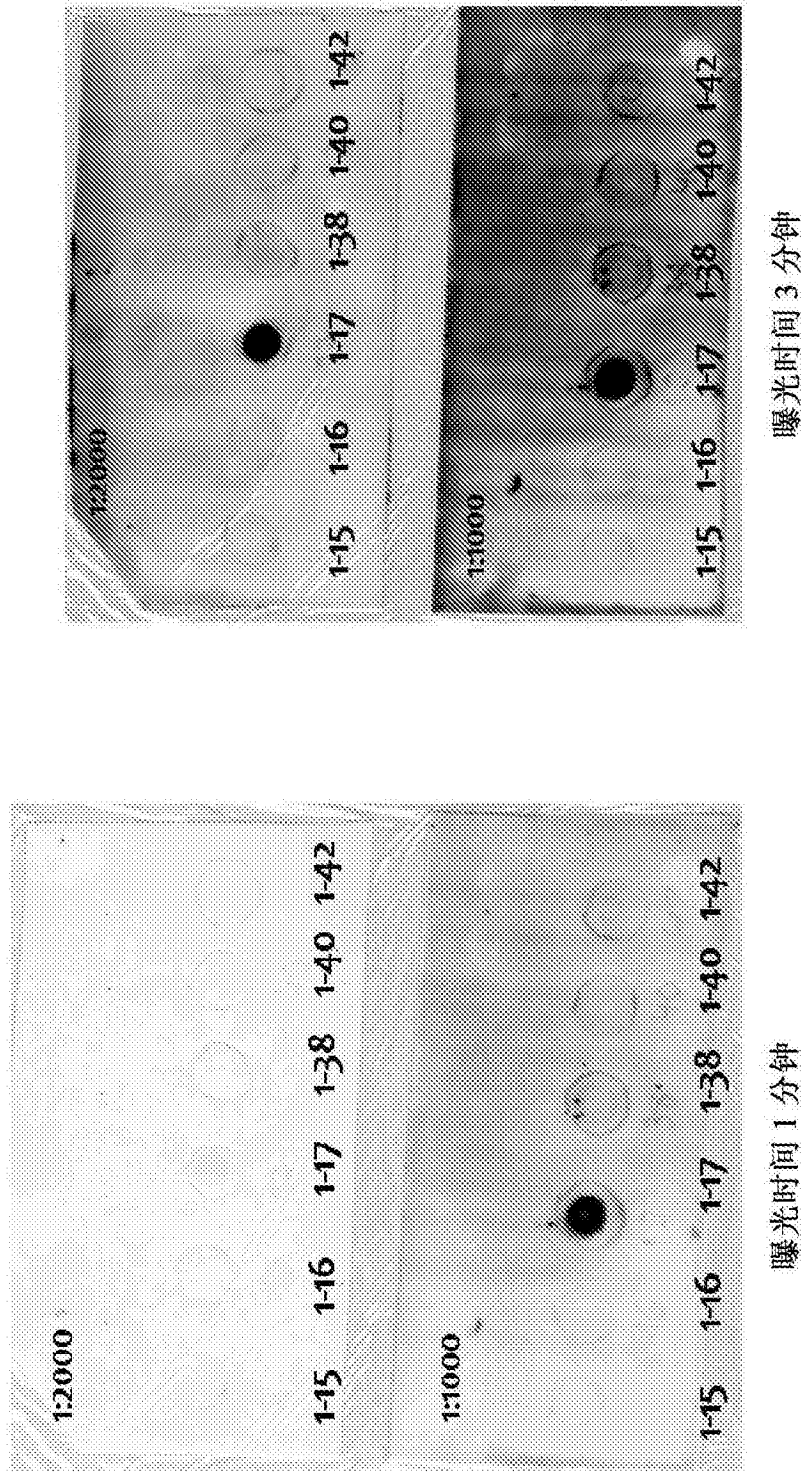


图1

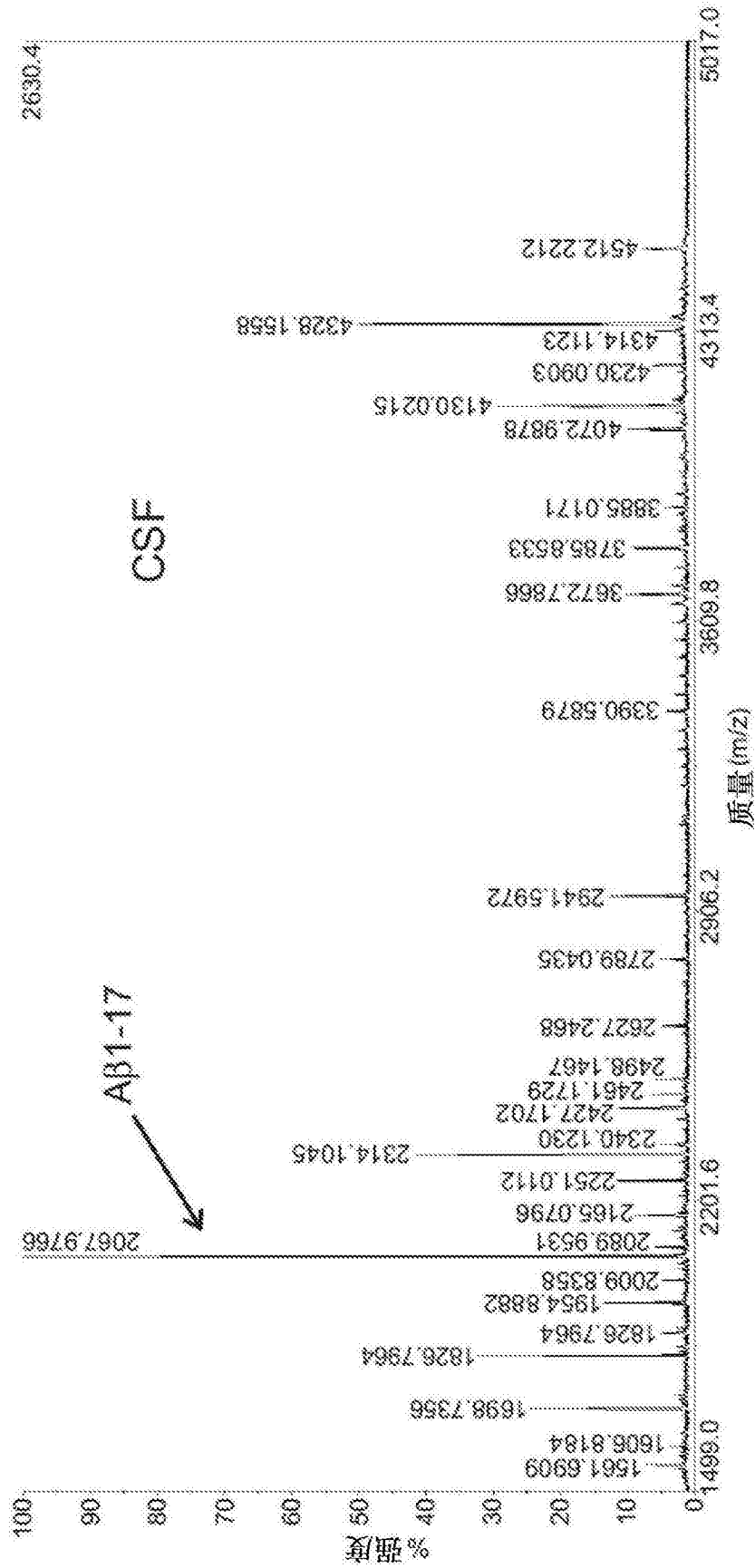


图2A

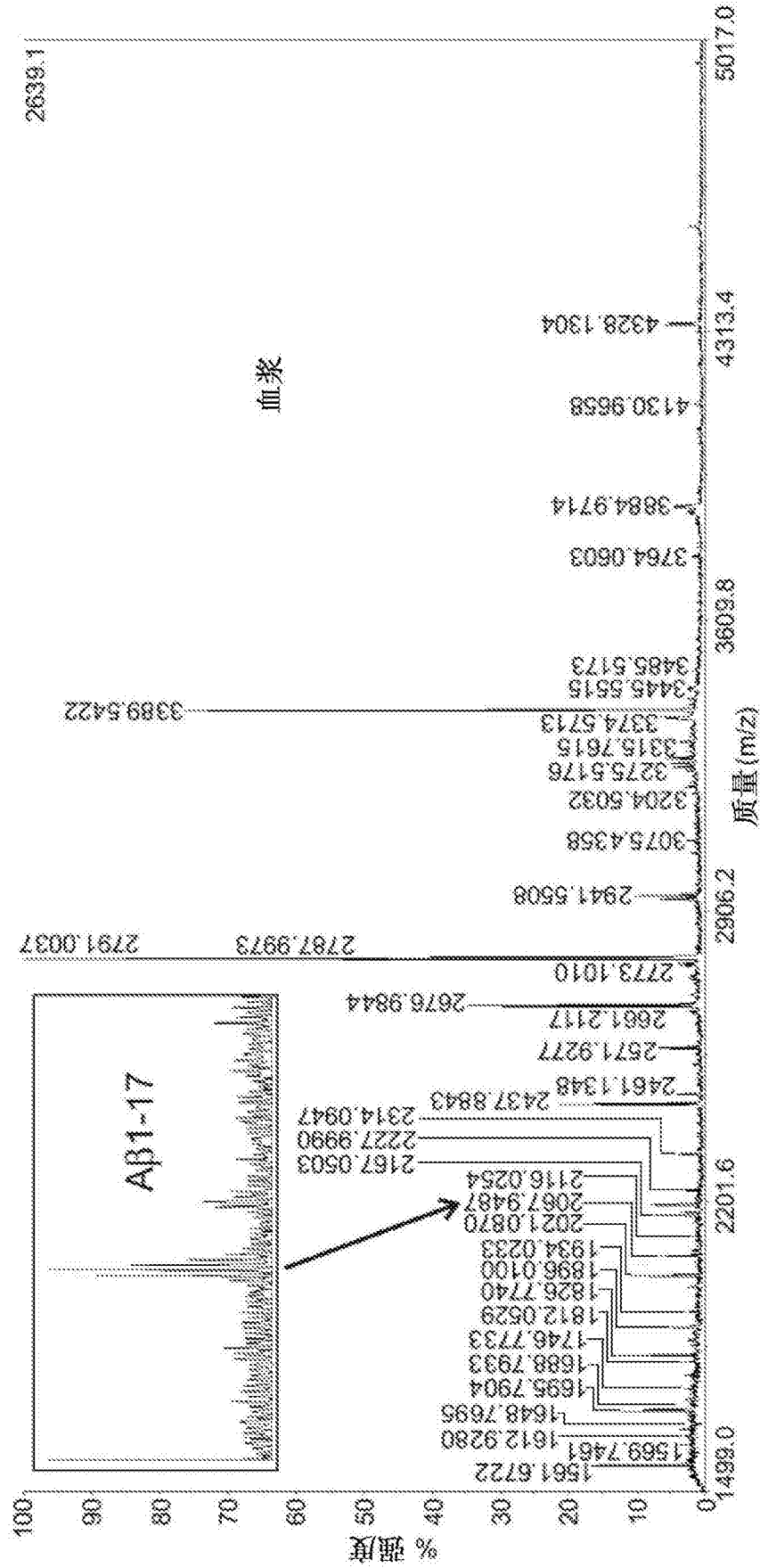


图2B(继续)

(A)

	FP 17	TP 17	CB 17	TP+CB 17	TP17+TP40+TP42	CB17+CB40+CB42	PIB (17+40+42)
CS>65	23.59 ± 17.54	71.59 ± 52.06	79.25 ± 47.64	150.84 ± 98.70	197.91 ± 54.49	262.43 ± 65.16	460.35 ± 109.44
可能MCI	33.42 ± 53.09	80.91 ± 77.84	71.89 ± 35.42	152.90 ± 110.29	224.53 ± 108.02	240.99 ± 69.81	465.52 ± 158.57
疑似MCI	21.30 ± 6.87	57.22 ± 24.53	63.60 ± 19.40	120.80 ± 41.92	212.75 ± 88.12	306.03 ± 78.21	518.78 ± 132.62
轻度AD	29.98 ± 17.93	74.97 ± 54.72	72.07 ± 30.41	147.04 ± 83.85	221.93 ± 62.19	310.04 ± 81.29	531.97 ± 107.38

	TP40	CB40	TP42	CB42
CS>65	87.0 ± 11.3	62.3±8.3	39.5±10.9	59.5±44.8
可能MCI	89.2±16.7	52.5±6.4	54.4±40.5	46.7±47.9
疑似MCI	99.6±18.2	58.5±18.9	56.0±56.0	41.2±74.7
轻度AD	91.4±18.9	65.9±13.9	55.6±28.2	48.4±83.3

图3

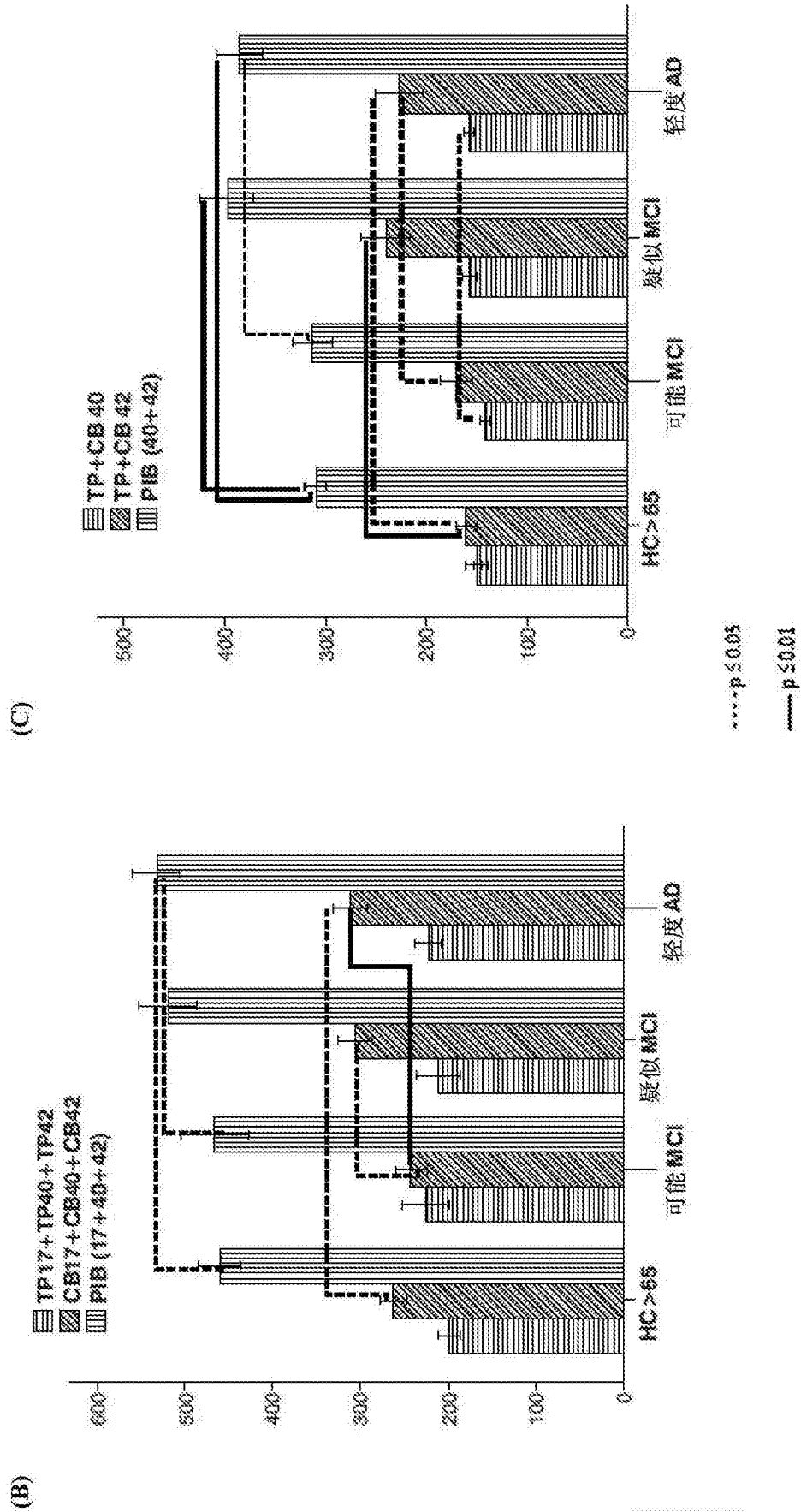
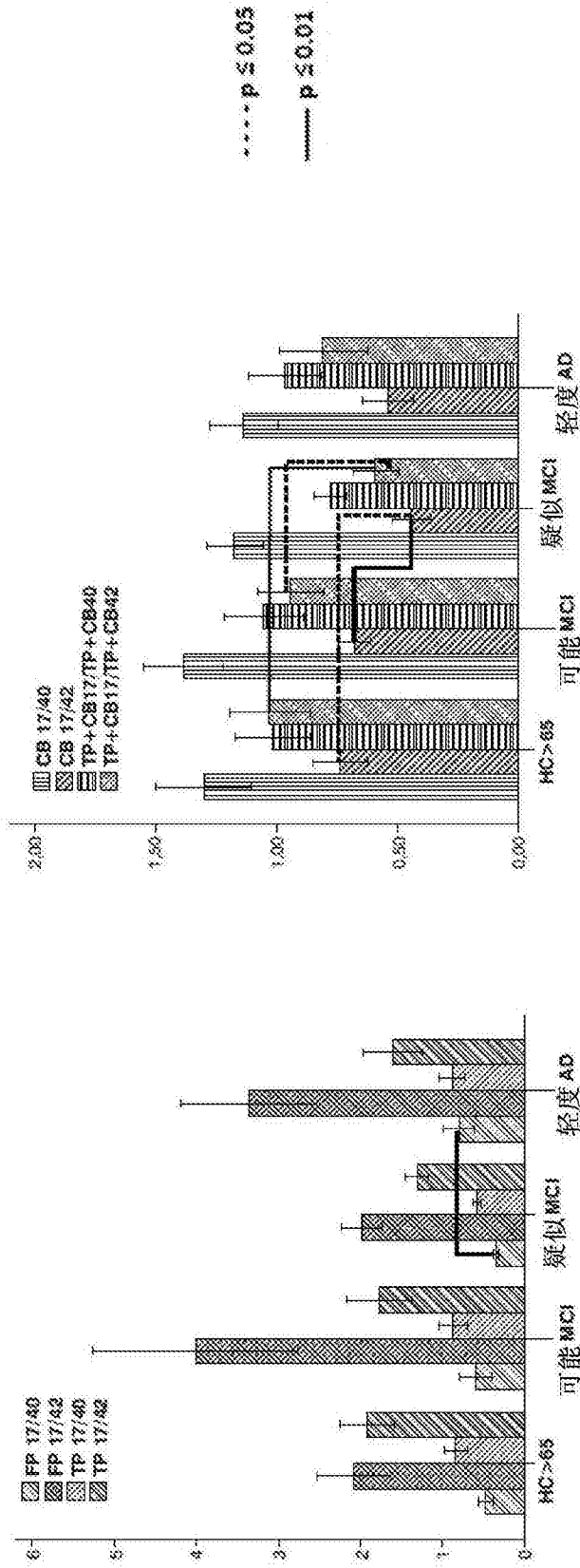


图3(继续)

	FP 17/40	FP 17/42	TP 17/40	TP 17/42	CB 17/40	CB 17/42	TP+CB17/ TP+CB40	TP+CB17/ TP+CB42
CS>65	0.46 ± 0.38	2.07 ± 1.96	0.82 ± 0.57	1.91 ± 1.43	1.30 ± 0.86	0.73 ± 0.50	1.02 ± 0.67	1.02 ± 0.72
可能MCI	0.58 ± 0.77	4.00 ± 4.99	0.86 ± 0.70	1.76 ± 1.62	1.38 ± 0.66	0.67 ± 0.27	1.05 ± 0.65	0.94 ± 0.54
疑似MCI	0.33 ± 0.10	1.97 ± 0.99	0.57 ± 0.18	1.30 ± 0.54	1.17 ± 0.45	0.44 ± 0.32	0.77 ± 0.26	0.59 ± 0.36
轻度AD	0.79 ± 0.79	3.34 ± 3.40	0.87 ± 0.66	1.59 ± 1.51	1.13 ± 0.58	0.53 ± 0.43	0.96 ± 0.60	0.81 ± 0.76

(A)

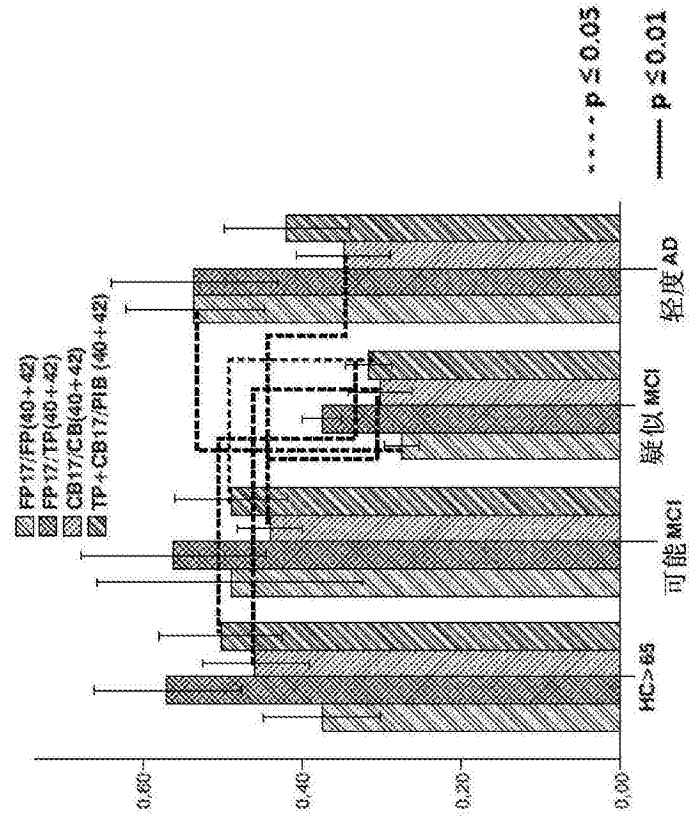


(B)

图4

	FP	TP	CB	TP+CB17/PIB (40+42)
	17/FP(40+42)	17/TP(40+42)	17/CB(40+42)	
CS>65	0.375 ± 0.320	0.570 ± 0.408	0.458 ± 0.294	0.502 ± 0.335
可能MCI	0.490 ± 0.668	0.562 ± 0.469	0.442 ± 0.168	0.490 ± 0.281
疑似MCI	0.275 ± 0.087	0.377 ± 0.097	0.303 ± 0.161	0.317 ± 0.114
轻度AD	0.536 ± 0.359	0.539 ± 0.432	0.348 ± 0.243	0.420 ± 0.328

(A)



(B)

图5

(A)

	FP17/CB17
HC>65	0.264 ± 0.0674
可能 MCI	0.285 ± 0.072
疑似 MCI	0.347 ± 0.109
轻度 AD	0.404 ± 0.120

(B)

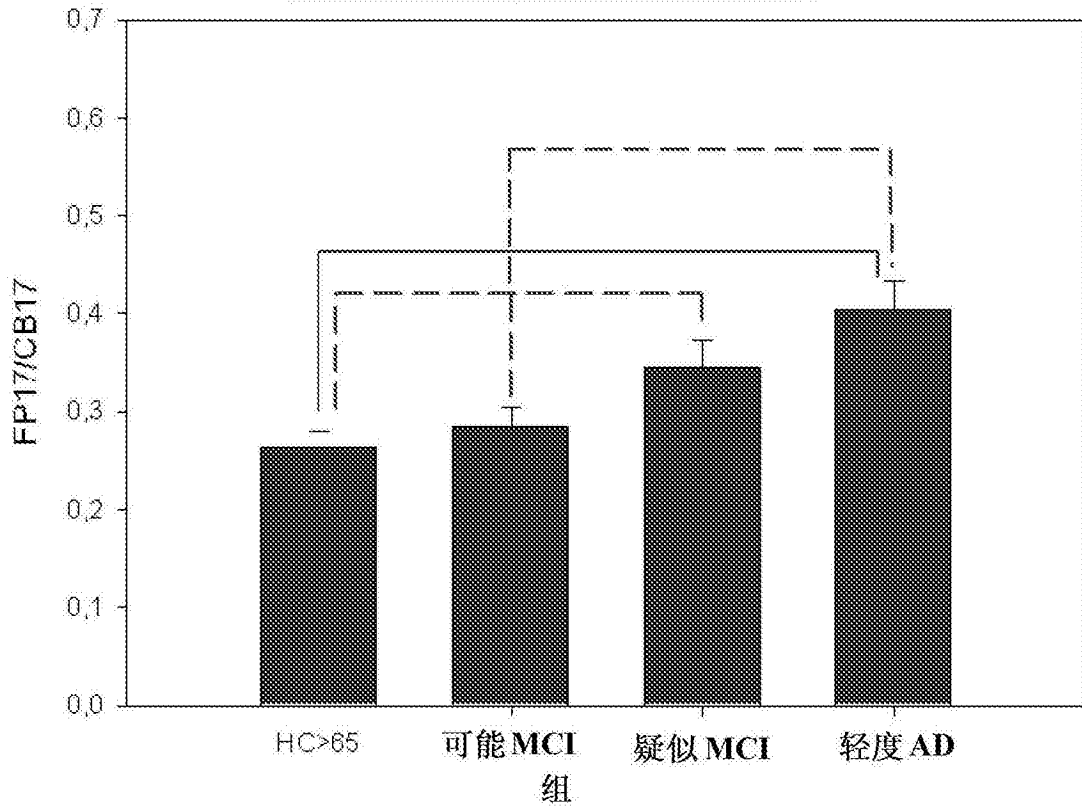


图6

专利名称(译)	用于确定淀粉样肽的抗体、试剂盒和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103547593B</a>	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201280018250.7	申请日	2012-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	艾拉科隆生物技术公司		
[标]发明人	曼努埃尔·萨拉萨·巴里奥		
发明人	曼努埃尔·萨拉萨·巴里奥		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K16/18 C07K2317/34 G01N2333/4709 G01N2800/2821 G01N2800/52 G01N2800/56		
代理人(译)	余刚 张英		
审查员(译)	马驰		
优先权	2011382107 2011-04-12 EP		
其他公开文献	CN103547593A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及能够使用抗Aβ17抗体检测Aβ17肽的免疫测定领域，以及使用所述抗体的试剂盒和方法。本发明还涉及用于诊断或区分神经退行性疾病的阶段的方法。

