



(21) 申請案號：110125805 (22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 14 日
 (51) Int. Cl. : **G01N33/68 (2006.01)** **C07K14/47 (2006.01)**
 (30) 優先權：2020/07/14 美國 62/705,759
 2021/03/04 美國 63/200,399
 (71) 申請人：比利時商健生藥品公司 (比利時) JANSSEN PHARMACEUTICA NV (BE)
 比利時
 (72) 發明人：寇爾布 哈特穆瑟 KOLB, HARTMUTH C. (DE)；崔安娜 波茲爾 蓋廉 TRIANA-BALTZER, GALLEN (US)；沙德 載德 SAAD, ZIAD (US)
 (74) 代理人：何愛文；王仁君
 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：16 共 133 頁

(54) 名稱

用於偵測 t a u 蛋白病或類澱粉蛋白生成疾病的基於血液之檢定

(57) 摘要

一種用於以高敏感度、準確度、及精確度偵測來自對象之基於血液之樣本中 p217+tau 的方法。檢定包含：使樣本與針對 p217+tau 表位之捕捉抗體接觸以使捕捉抗體與血漿中之 p217+tau 肽結合，以形成抗體-肽複合物；及分開地使抗體-肽複合物與偵測抗體接觸以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。p217+tau 之量係藉由偵測偵測抗體來判定。所偵測之 P217+tau 之量係用於判定對象是否患有 tau 蛋白病或處於發展 tau 蛋白病之風險、或對象是否患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險（當 p217+tau 肽之量高於預設閾值時）。該方法具有改善的敏感度，使得預設閾值高於檢定之定量下限及/或偵測下限。

A method for detecting p217+tau in blood-based samples from a subject with high sensitivity, accuracy, and precision. The assay comprises contacting a sample with a capture antibody directed against a p217+tau epitope to bind the capture antibody to p217+tau peptides in plasma to form antibody-peptide complexes, and separately contacting the antibody-peptide complexes with a detection antibody to bind the detection antibody to the antibody-peptide complexes. The amount of p217+tau is determined by detecting the detection antibody. The amount of p217+tau detected is used to determine whether the subject has tauopathy or is at risk of developing tauopathy, or whether the subject has amyloidogenic disease or is at risk of developing amyloidogenic disease when the amount of p217+tau peptides is above a predetermined threshold value. The method has improved sensitivity such that the predetermined threshold value is above a Lower Limit of Quantification and/or Lower Limit of Detection of the assay.

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於偵測tau蛋白病或類澱粉蛋白生成疾病的基於血液之檢定

【英文發明名稱】 BLOOD-BASED ASSAY FOR DETECTING TAUOPATHY

OR AMYLOIDOGENIC DISEASE

【中文】

一種用於以高敏感度、準確度、及精確度偵測來自對象之基於血液之樣本中 p217+tau 的方法。檢定包含：使樣本與針對 p217+tau 表位之捕捉抗體接觸以使捕捉抗體與血漿中之 p217+tau 肽結合，以形成抗體-肽複合物；及分開地使抗體-肽複合物與偵測抗體接觸以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。p217+tau 之量係藉由偵測偵測抗體來判定。所偵測之 P217+tau 之量係用於判定對象是否患有 tau 蛋白病或處於發展 tau 蛋白病之風險、或對象是否患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險（當 p217+tau 肽之量高於預設閾值時）。該方法具有改善的敏感度，使得預設閾值高於檢定之定量下限及/或偵測下限。

【英文】

A method for detecting p217+tau in blood-based samples from a subject with high sensitivity, accuracy, and precision. The assay comprises contacting a sample with a capture antibody directed against a p217+tau epitope to bind the capture antibody to p217+tau peptides in plasma to form antibody-peptide complexes, and separately contacting the antibody-peptide complexes with a detection antibody to bind the

detection antibody to the antibody-peptide complexes. The amount of p217+tau is determined by detecting the detection antibody. The amount of p217+tau detected is used to determine whether the subject has tauopathy or is at risk of developing tauopathy, or whether the subject has amyloidogenic disease or is at risk of developing amyloidogenic disease when the amount of p217+tau peptides is above a predetermined threshold value. The method has improved sensitivity such that the predetermined threshold value is above a Lower Limit of Quantification and/or Lower Limit of Detection of the assay.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於偵測tau蛋白病或類澱粉蛋白生成疾病的基於血液之檢定

【英文發明名稱】 BLOOD-BASED ASSAY FOR DETECTING TAUOPATHY

OR AMYLOIDOGENIC DISEASE

【技術領域】

發明人：哈特穆斯·克里斯蒂安·科爾布(Hartmuth Christian KOLB)、賈倫·特里亞納·巴爾策(Gallen TRIANA-BALTZER)、及齊亞德·塞爾哈爾·薩德(Ziad Serhal SAAD)

序列表

【0001】 本申請案含有序列表，其已經以ASCII格式藉由電子方式提交且其全文以引用方式併入本文中。該ASCII副本（建立於2021年6月30日）被命名為JAB7064_SL.txt且檔案大小為19,357位元組。

相關申請案之交互參照

【0002】 本申請案主張2020年7月14日提出申請之美國臨時專利申請案序號62/705,759及2021年3月4日提出申請之美國臨時專利申請案序號63/200,399之優先權，其全部內容以引用方式併入本文中。

【0003】 本申請案係關於用於偵測tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成(amyloidogenic)疾病之方法。具體而言，本申請案發明係關於測量基於血液之樣本中之單或多磷酸化p217+tau蛋白物種之量的方法及其用途。

【先前技術】

【0004】 阿茲海默症(Alzheimer's Disease, AD)是一種在臨床上藉由下列表徵的退化性腦部病症：逐漸喪失記憶、認知、推理、判斷、及情緒穩定性，其逐漸導致極重度心智衰退(profound mental deterioration)而最終死亡。AD係老年人類之進行性心智減退(progressive mental failure)（失智症）很常見的原因。美國有超過5百萬人罹患AD，且人數隨著高齡化人口還在成長。實際上，超過65歲的人中有10%患有AD，且其係此族群中的第5大死因。整體而言，AD在美國係第6大死因（3位年長者中有1位死於AD或另一種失智症），且估計在2020年的花費為3050億美元。AD亦已在全世界種族群組中觀察到，且呈現目前及未來的主要公共衛生問題。

【0005】 患有AD的個體之腦部展現出特有病變，該等病變稱為老年（或類澱粉）斑塊、類澱粉血管病變（血管中的類澱粉沉積）、及神經纖維纏結。大量此等病變，特別是類澱粉斑塊及雙螺旋絲(paired helical filament)之神經纖維纏結，通常在患有AD之患者中發現於人類腦部之對記憶及認知功能相當重要的若干區域。

【0006】 神經纖維纏結主要是由超磷酸化tau蛋白之聚集物組成。tau之主要生理功能係微管聚合及穩定。tau與微管之結合係藉由介於tau之微管結合區中之正電荷與微管晶格(lattice)上之負電荷之間的離子交互作用而發生(Butner

and Kirschner, *J Cell Biol.* 115(3):717-30, 1991)。tau蛋白含有85個可能的磷酸化位點，且許多這些位點處之磷酸化干擾tau之主要功能。結合至軸突微管晶格之tau處於低磷酸化狀態，而AD中聚集的tau經超磷酸化，其提供不同於生理活性的tau池之獨特表位(Iqbal et al., *Curr Alzheimer Res.* 7(8): 656–664, 2010)。

【0007】 AD腦部中tau蛋白病之進展遵循不同的蔓延模式。已基於人類腦部中tau蛋白病進展之Braak分期及臨床前tau模型中tau聚集物注射後之tau蛋白病蔓延，描述tau蛋白病傳播及蔓延假說(Frost et al., *J Biol Chem.* 284:12845-52, 2009; Clavaguera et al., *Nat Cell Biol.* 11:909-13, 2009)。據信tau蛋白病可以類普里昂蛋白之方式自一個腦部區域蔓延至下一個腦部區域。此蔓延過程將涉及可被附近神經元吸收且進一步誘導tau蛋白病之tau種子之外化。

【0008】 許多生物化學變化可在症狀發作前至多20年被偵測到。美國國家老化研究所及阿茲海默症協會(National Institute on Aging and Alzheimer's Association, NIA-AA)研究架構提供用於診斷阿茲海默症(AD)之機制，其係基於關於基本致病過程、 β 類澱粉蛋白(A)、病理性tau (T)、及神經退化(N)的測量。使用tau特異性放射性示跡劑之正電子發射斷層攝影術(Tau PET)已用於測量患者之tau神經纖維纏結(NFT)病理。然而，Tau PET係昂貴且繁複的程序，且tau特異性放射性示跡劑的可用性可能有限。

【0009】 神經纖維纏結中之tau蛋白之片段移動至腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)，在此處其可藉由敏感檢定採集及測量。因此，可使用辨識CSF中之tau蛋白衍生片段的檢定，偵測神經疾病的存在。然而，CSF的取得需要患者經歷侵入性腰椎穿刺手術，其涉及醫師將針頭插入椎管(spinal canal)以收集用於

檢定之CSF樣本。此類手術令人不舒服且相當惱人，因此不宜頻繁重複，且不適用於定期監測患者之疾病狀態。

【發明內容】

【0010】 本申請案之一個例示性實施例係關於一種偵測對象中之p217+tau肽的檢定方法。該方法包含：使血漿樣本與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以使捕捉抗體與血漿中之p217+tau肽結合，以形成抗體-肽複合物；及洗滌抗體-肽複合物。接著，該方法繼續使抗體-肽複合物與偵測抗體接觸，以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。接著，該方法偵測偵測抗體，以判定血漿樣本中之p217+tau肽之量。

【0011】 亦提供一種偵測對象之tau蛋白病的方法。該方法包含：自對象獲得血漿樣本；及使用檢定偵測存在於血漿樣本中之p217+tau肽之量。檢定使用針對p217+tau表位之捕捉抗體以使捕捉抗體與血漿中之p217+tau肽結合，以形成抗體-肽複合物，並使用偵測抗體以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。該方法進一步包括下列之步驟：當p217+tau肽之量高於預設閾值時，判定對象患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。預設閾值高於檢定之定量下限(Lower Limit of Quantification, LLOQ)。

【0012】 亦提供一種偵測對象之類澱粉蛋白生成疾病的方法。該方法包含：自對象獲得血漿樣本；及使用檢定偵測存在於血漿樣本中之p217+tau肽之量。檢定使用針對p217+tau表位之捕捉抗體以使捕捉抗體與血漿中之p217+tau肽結合，以形成抗體-肽複合物，並使用偵測抗體以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。該方法進一步包括下列之步驟：當p217+tau肽之量高於預設閾值時，

判定對象患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險。預設閾值高於檢定之定量下限(Lower Limit of Quantification, LLOQ)。

【0013】 在本申請案之另一態樣中，提供一種用於偵測或預測對象之tau蛋白病的方法。該方法包含偵測血漿樣本中之p217+tau肽之量，其係藉由使血漿樣本與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸以使捕捉抗體與血漿中之p217+tau肽結合，以形成抗體-肽複合物，並分開地使抗體-肽複合物與偵測抗體接觸以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合；及產生tau數據，tau數據對應於偵測到的217+tau肽之量。該方法亦包含獲得生物標記數據，生物標記數據對應於自患者偵測到的至少一種生物標記，其中生物標記係選自包含NFL、脂聯素、及瘦素之群組。該方法進一步包含使用機器學習模組將tau數據及進一步的生物標記數據與一組參考數據進行比較，以判定或預測對象是否患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。

【0014】 對所屬技術領域中具有通常知識者而言，在閱讀以下實施方式（包括圖式及隨附申請專利範圍）後，本發明之此等及其他態樣將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0015】

〔圖1a〕顯示自根據先前揭示之檢定獲得的1:4稀釋之血漿偵測到的p217+tau之數據。

〔圖1b〕顯示自根據先前揭示之檢定獲得的1:16稀釋之血漿偵測到的p217+tau之數據。

〔圖1c〕顯示自根據先前揭示之檢定獲得的血漿之經半變性樣本偵測到的p217+tau之數據。

〔圖1d〕顯示自根據先前揭示之檢定獲得的血漿之免疫沉澱樣本偵測到的p217+tau之數據。

〔圖2a〕顯示展示自根據先前揭示之檢定獲得的自CSF之p217+tau測量與根據本申請案之例示性檢定獲得的自CSF之p217+tau測量之間的相關性之數據。

〔圖2b〕顯示比較根據先前揭示之檢定獲得的血清中所偵測到的p217+tau水平及根據本申請案之例示性檢定獲得的血清中所偵測到的p217+tau水平之數據。

〔圖3a〕顯示展示自使用根據本申請案之例示性實施例之兩種不同偵測抗體獲得的自CSF之p217+tau測量之間的相關性之數據。

〔圖3b〕顯示展示自使用根據本申請案之例示性實施例之兩種不同偵測抗體獲得的自血清之p217+tau測量之間的相關性之數據。

〔圖3c〕顯示展示自使用根據本申請案之例示性實施例之兩種不同偵測抗體獲得的自血漿之p217+tau測量之間的相關性之數據。

〔圖4a〕顯示比較在本申請案之例示性實施例中不同樣本稀釋劑對珠叢聚(clumping)的效應之數據。

〔圖4b〕顯示比較不同樣本稀釋劑對由本申請案之例示性實施例所偵測的p217+tau水平的效應之數據。

〔圖5a〕顯示自根據本申請案之例示性實施例獲得的血清偵測到的p217+tau之數據。

〔圖5b〕顯示自根據本申請案之例示性實施例獲得的血漿偵測到的p217+tau之數據。

〔圖5c〕顯示展示出自如圖5b中所示之血清偵測到的p217+tau與自如圖5c中所示之血漿偵測到的p217+tau之間的相關性之數據。

〔圖5d〕顯示展示出自如圖5c中所示之血漿偵測到的p217+tau與自如圖5b中所示之血清偵測到的p217+tau之間的相關性之數據。

〔圖6a〕顯示使用用於本申請案之檢定之例示性實施例的校正肽所產生之代表性校正曲線。

〔圖6b〕顯示展示出本申請案之例示性檢定在血清及血漿中的稀釋線性之數據。

〔圖7a〕顯示展示出本申請案之例示性檢定在血漿中的測試內(intra-test)精確度之數據。

〔圖7b〕顯示展示出本申請案之例示性檢定在血漿中的測試間(inter-test)精確度之數據。

〔圖7c〕顯示展示出本申請案之例示性檢定在血漿中的測試內精確度之進一步數據。

〔圖8a〕顯示展示出在AD對象中於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於血漿中偵測到的p217+tau的相關性之數據。

〔圖8b〕顯示展示出在AD對象中於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於血漿中偵測到的p217+tau的相關性之進一步數據。

〔圖9a〕顯示展示出在驗證群組中於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於血漿中偵測到的p217+tau的相關性之進一步數據。

〔圖9b〕顯示圖7b之數據的接收者操作特徵(Receiver-Operating Characteristic, ROC)曲線，其指示根據本申請案之例示性檢定獲得的血漿測量在區分tau蛋白病之腦部病理中的敏感度。

〔圖10a〕顯示展示出於CSF中偵測到的p217+tau與由正電子發射斷層攝影術(PET)造影偵測到的腦組織中tau累積之相關性的數據。

〔圖10b〕顯示圖7b之數據的ROC曲線，其指示於CSF中之p217+tau測量在區分tau蛋白病之腦部病理中的敏感度。

〔圖11a〕顯示展示出在驗證群組中於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於血漿中偵測到的p217+tau的相關性之進一步數據。

〔圖11b〕顯示圖11a之具有 ≤ 0.089 之CSF A β 42/40比率的類澱粉蛋白陽性患者之數據子集。

〔圖11c〕顯示圖11a之具有 > 0.089 之CSF A β 42/40比率的類澱粉蛋白陰性患者之數據子集。

〔圖12a〕顯示展示出於CSF中偵測到的p181tau與使用本申請案之例示性檢定於血漿中偵測到的p217+tau的相關性之數據。

〔圖12b〕顯示圖12c之數據的ROC曲線，其指示於血漿中之p217+tau測量在區分CSF p217+tau水平中的敏感度。

〔圖12c〕顯示圖11a之數據與血漿p217+tau及CSF p217+tau之閾值，以用於區分患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險的患者與未處於發展tau蛋白病之風險的患者。

〔圖12d〕顯示圖12e之數據的ROC曲線，其指示於血漿中之p217+tau測量在區分CSF p217+tau水平中的敏感度。

〔圖12e〕顯示圖12c之認知正常對象之數據子集。

〔圖12f〕顯示圖12g之數據的ROC曲線，其指示於血漿中之p217+tau測量在區分CSF p217+tau水平中的敏感度。

〔圖12g〕顯示圖12c之輕度至中度失智症對象之數據子集。

〔圖13a〕顯示圖13b之數據的ROC曲線，其指示於血漿中之p217+tau測量在區分於CSF中之A β 42/40比率中的敏感度。

〔圖13b〕顯示展示出於CSF中之A β 42/40比率與使用本申請案之例示性檢定於血漿中偵測到的p217+tau的相關性之數據。

〔圖13c〕顯示圖13d之數據的ROC曲線，其指示於血漿中之p217+tau測量在區分於CSF中之A β 42/40比率中的敏感度。

〔圖13d〕顯示圖13a之認知正常對象之數據子集。

〔圖13e〕顯示圖13f之數據的ROC曲線，其指示於血漿中之p217+tau測量在區分於CSF中之A β 42/40比率中的敏感度。

〔圖13f〕顯示圖13a之輕度至中度失智症對象之數據子集。

〔圖14a〕顯示展示出於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於粗血漿(crude plasma)中偵測到的p217+tau的相關性之數據。

〔圖14b〕顯示展示出於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於化學萃取血漿中偵測到的p217+tau的相關性之數據。

〔圖14c〕顯示展示出於CSF中偵測到的p217+tau與使用本申請案之例示性檢定於經半變性血漿中偵測到的p217+tau的相關性之數據。

〔圖15a〕顯示自根據本申請案之檢定之例示性實施例獲得的血漿之經半變性樣本偵測到的p217+tau之數據。

〔圖15b〕顯示使用用於本申請案之檢定之另一例示性實施例的校正肽所產生之代表性校正曲線，其中樣本在測量之前經半變性。

〔圖15c〕顯示展示出圖9b之例示性檢定的測試內精確度之數據，其中樣本在測量之前經半變性。

〔圖16a〕顯示根據本申請案之例示性實施例的用於區分tau蛋白病之腦部病理的機器學習方法之ROC曲線，該方法使用血清p217+tau水平作為生物標記特徵。

〔圖16b〕顯示根據本申請案之例示性實施例的用於區分tau蛋白病之腦部病理的機器學習方法之ROC曲線，該方法使用血清p217+tau水平及神經絲輕鏈(NFL)之數據作為生物標記特徵。

〔圖16c〕顯示根據本申請案之例示性實施例的用於區分tau蛋白病之腦部病理的機器學習方法之ROC曲線，該方法使用血清p217+tau水平及NFL及脂聯素之數據作為生物標記特徵。

〔圖16d〕顯示根據本申請案之例示性實施例的用於區分tau蛋白病之腦部病理的機器學習方法之ROC曲線，該方法使用血清p217+tau水平及NFL、脂聯素、及瘦素之數據作為生物標記特徵。

〔圖16e〕顯示根據本申請案之例示性實施例的用於區分tau蛋白病之腦部病理的機器學習方法之ROC曲線，該方法使用NFL、脂聯素、及瘦素之數據作為生物標記特徵。

【實施方式】

【0016】 除非另有定義，否則本文中所使用之所有技術及科學用語，均與本發明有關技術領域中具有通常知識者所通常了解之意義相同。在其他方面，在本文中所使用的某些用語具有如本說明書所定之意義。在本文中所引用的所有專利、已公開專利申請案及公開案係以引用方式併入，猶如全文說明於本文中。應注意的是，如本文及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」皆包括複數指稱，除非上下文另有明確規定。

【0017】 除非另有說明，在本文中描述之任何數值（諸如濃度或濃度範圍）應理解為在所有情況下皆受到用語「約(about)」之修飾。因此，數值一般包括記載值之 $\pm 10\%$ 。例如，濃度1 mg/mL包括0.9 mg/mL至1.1 mg/mL。同樣地，濃度範圍1%至10% (w/v)包括0.9% (w/v)至11% (w/v)。如本文中所使用，明示使用之數值範圍包括所有可能的子範圍、在該範圍內之所有個別數值，包括在該等範圍內之整數及數值之分數，除非上下文以其他方式清楚指示。

【0018】 如本文中所使用，用語「抗體(antibody)」或「免疫球蛋白(immunoglobulin)」係指能夠結合抗原或其部分之特異性蛋白質。此等用語在本文中係以廣泛含義使用，並包括免疫球蛋白或抗體分子，包括多株抗體、單株抗體（包括鼠類、人類、人類調適(human-adapted)、人源化、及嵌合單株抗體）、及抗體片段。

【0019】 大致上，抗體是對特定抗原展現出結合特異性之蛋白質或肽鏈。抗體結構係熟知的。免疫球蛋白可分為五大類，即IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，取決於重鏈恆定域(constant domain)胺基酸序列。IgA及IgG係進一步被細分為同型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。因此，本申請案之抗體可係五大類或對應子類中之任一者。較佳的是，本申請案之抗體係IgG1、IgG2、

IgG3、或IgG4。任何脊椎動物物種的抗體輕鏈可分派為兩種截然不同類型（即 κ 及 λ ）中之一者，視其等恆定域的胺基酸序列而定。因此，本申請案之抗體可含有 κ 或 λ 輕鏈恆定域。根據具體實施例，本申請案之抗體包括來自小鼠抗體或人類抗體之重鏈及/或輕鏈恆定區。

【0020】 除重鏈及輕鏈恆定域之外，抗體含有輕鏈及重鏈可變區。免疫球蛋白輕鏈或重鏈可變區係由被「抗原結合部位(antigen binding site)」中斷的「架構(framework)」區所組成。抗原結合部位係使用如下各種用語及編號方案定義：

- (i) Kabat：「互補決定區(Complementarity Determining Region)」或「CDR」是基於序列可變性(Wu and Kabat, *J Exp Med.* 132:211-50, 1970)。通常而言，抗原結合部位在各可變區內具有三個 CDR（例如重鏈可變區(VH)中之 HCDR1、HCDR2、及 HCDR3 及輕鏈可變區(VL)中之 LCDR1、LCDR2、及 LCDR3）；
- (ii) Chothia：用語「高度變異區(hypervariable region)」、「HVR」係指如 Chothia 及 Lesk 所定義般在結構上係高度變異之抗體可變域中的區域(Chothia and Lesk, *J Mol Biol.* 196:901-17, 1987)。通常而言，抗原結合部位在各 VH（H1、H2、H3）及 VL（L1、L2、L3）中具有三個高度變異區。編號系統以及 CDR 及 HVR 之注釋已由 Abhinandan 及 Martin 修訂(Abhinandan and Martin, *Mol Immunol.* 45:3832-9, 2008)；
- (iii) IMGT：形成抗原結合部位之區域的另一定義已由 Lefranc (Lefranc et al., *Dev Comp Immunol.* 27:55-77, 2003)基於來自免疫球蛋白及 T 細胞受體之 V 域的比較提出。國際免疫遺傳學(International ImMunoGeneTics, IMGT)資

料庫([http://www_imgt_org](http://www.imgt.org))提供此等區域之標準化編號及定義。CDR、HVR、及 IMGT 描繪之間的對應性係描述於同上之 Lefranc et al., 2003 中；

(iv) 抗原結合部位亦可基於「特異性決定殘基用途」(Specificity Determining Residue Usage, SDRU)描繪(Almagro, *Mol Recognit.* 17:132-43, 2004)來描繪，其中 SDR 係指直接涉及抗原接觸之免疫球蛋白的胺基酸殘基。

【0021】 「架構(framework)」或「架構序列(framework sequence)」係抗體可變區內被定義為抗原結合部位序列以外的其餘序列。由於抗原結合部位之確切定義可藉由上述之各種描繪決定，所以確切的架構序列取決於抗原結合部位之定義。架構區(FR)是可變域之更加高度保留的部分。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個由三個高度變異環連接之FR（分別是FR1、FR2、FR3、及FR4），其通常採用 β 褶板組態。各鏈中之高度變異環係藉由FR緊密靠近地固持在一起，且與來自另一條鏈之高度變異環一起促成抗體之抗原結合部位的形成。抗體之結構分析顯示序列與由互補決定區形成之結合部位之形狀之間的關係(Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817, 1992; Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215:175-182, 1990)。儘管其存在高序列可變性，但六個環中之五者僅採用一小組主鏈構形，稱為「正則結構(canonical structure)」。該等構形首先藉由環之長度且其次藉由關鍵殘基在該等環及架構區中某些位置處之存在來決定，該等關鍵殘基透過其堆積、氫鍵、或承擔不常見主鏈構形之能力來決定構形。

【0022】 如本文中所使用，用語「抗原結合片段(antigen-binding fragment)」係指抗體片段，諸如例如雙鏈抗體、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、雙硫鍵穩定性Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、雙硫鍵穩定

性雙鏈抗體（ds雙鏈抗體）、單鏈抗體分子(scFv)、單域抗體(sdab)、scFv二聚體（雙價雙鏈抗體）、由包含一或多個CDR之抗體的一部分形成之雙特異性或多特異性抗體、駱駝化(camelized)單域抗體、奈米抗體、域抗體、雙價域抗體、或任何其他結合至抗原但不包含完整抗體結構之抗體片段。抗原結合片段能夠結合至親本抗體(parent antibody)或親本抗體片段所結合之相同抗原。根據具體實施例，抗原結合片段包含輕鏈可變區、輕鏈恆定區、及重鏈恆定區之Fd區段。根據其他具體實施例，抗原結合片段包含Fab及F(ab')。

【0023】 如本文中所使用，用語「表位(epitope)」係指免疫球蛋白、抗體、或其抗原結合片段特異性結合之抗原上之位點。表位可以由鄰接胺基酸或藉由蛋白質之三級折疊所並置之非鄰接胺基酸形成。由鄰接胺基酸形成之表位一般在暴露於變性溶劑時保留，而由三級折疊形成之表位一般在用變性溶劑處理時損失。表位一般包括呈獨特空間構象之至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15個胺基酸。判定表位之空間構象之方法包括例如x射線結晶學及2維核磁共振。參見例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed.(1996)。

【0024】 如本文中所使用，用語「tau」或「tau蛋白(tau protein)」係指具有多種異構體之豐富的中樞神經及周邊神經系統蛋白。在人類中樞神經系統(CNS)中，由於選擇性剪接而存在大小範圍在長度為352至441個胺基酸之六種主要的tau異構體(Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009)。該等異構體因調控地包括0至2個N端插入及3或4個串聯排列之微管結合重複序列而彼此不同，且稱為0N3R、1N3R、2N3R、0N4R、1N4R、及2N4R。如本文中所使用，用語「對照tau (control tau)」係指不含磷酸化及其他轉譯後修飾之SEQ ID

NO: 1的tau異構體。如本文中所使用，用語「tau」包括包含突變之蛋白質，例如全長野生型tau之點突變、片段、插入、缺失、及剪接變體。用語「tau」亦涵蓋tau胺基酸序列之轉譯後修飾。轉譯後修飾包括但不限於磷酸化。

【0025】 除非另有指示，否則如本文中所使用，tau蛋白或其片段中之胺基酸的編號係參照SEQ ID NO: 1中所示之胺基酸序列。

【0026】 如本文中所使用，用語「p217+tau肽(p217+tau peptide)」、「p217+tau」、「或「p217+tau蛋白(p217+tau protein)」意指在tau蛋白之殘基217處經磷酸化(pT217)的人類tau蛋白或tau片段，且可或可不進一步在tau蛋白之額外殘基處經磷酸化（諸如例如殘基212 (pT212)），其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號。

【0027】 如本文中所使用，用語「p217+tau表位(p217+tau epitope)」係指含有磷酸化T217及磷酸化T212中之至少一者的tau表位，其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號。p217+tau表位之實例包括例如pT3表位。如本文中所使用，用語「pT3表位(pT3 epitope)」係指含有在殘基217處經磷酸化之人類tau蛋白之胺基酸210至220的表位，且可或可不進一步在額外殘基（諸如例如殘基212）處經磷酸化，其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號。

【0028】 如本文中所使用，用語「長p217+tau肽(long p217+tau peptide)」、「長p217+tau (long p217+tau)」、「長型p217+tau肽(long form of p217+tau peptide)」、或「長p217+tau肽片段(long p217+tau peptide fragment)」之各者具有相同意義，其係指一種p217+tau肽，其包含p217+tau表位及包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位。根據本申請案之實施例之「長p217+tau肽」可具有不同長度。例如，「長p217+tau肽片段」之胺基端可係tau蛋白之胺基酸殘

基1、2、3、4、5、6、或7。在一個實例中，「長p217+tau肽」可包含p217+tau蛋白之胺基酸殘基7至220。

【0029】 如本文中所使用，用語「短p217+tau肽(short p217+tau peptide)」、「短p217+tau (short p217+tau)」、「短型p217+tau肽(short form of p217+tau peptide)」、或「短p217+tau肽片段(short p217+tau peptide fragment)」之各者具有相同意義，其係指一種p217+tau肽，其包含p217+tau表位及包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位，但不含有包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位。根據本申請案之實施例之「短p217+tau肽」可具有不同長度。例如，「短p217+tau肽」之胺基端可係在包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位與包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位之間的任何胺基酸殘基。在一個實例中，「短p217+tau肽」可包含p217+tau蛋白之胺基酸殘基119至220。

【0030】 如本文中所使用，用語「長tau肽(long tau peptide)」、「長tau (long tau)」、「長型tau肽(long form of tau peptide)」、或「長tau肽片段(long tau peptide fragment)」之各者具有相同意義，其係指一種tau肽，其包含由磷酸化非依賴性捕捉抗體辨識的tau表位及包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位。根據本申請案之實施例之「長tau肽片段」可具有不同長度。例如，「長tau肽片段」之胺基端可係tau蛋白之胺基酸殘基1、2、3、4、5、6、或7。

【0031】 如本文中所使用，用語「短tau肽(short tau peptide)」、「短tau (short tau)」、「短型tau肽(short form of tau peptide)」、或「短tau肽片段(short tau peptide fragment)」之各者具有相同意義，其係指一種tau肽，其包含由磷酸化非依賴性捕捉抗體辨識的tau表位及包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位，但不含有包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位。根據本申請案之實施例

之「短tau肽片段」可具有不同長度。例如，「短tau肽」之胺基端可係在包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位與包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位之間的任何胺基酸殘基。

【0032】 如本文中所使用，用語「捕捉抗體(capture antibody)」係指結合至所關注之抗原的抗體，其係直接或間接連接至固體支持物。固體支持物之實例包括但不限於微粒或珠，諸如磁珠或順磁珠。捕捉抗體之實例包括但不限於結合至p217+tau表位之單株抗體。

【0033】 根據本申請案之實施例，捕捉抗體可係單株抗體，其包含：分別具有SEQ ID NO: 23、24、及25之多肽序列的免疫球蛋白重鏈HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及具有SEQ ID NO: 26、27、及28之多肽序列的免疫球蛋白輕鏈LCDR1、LCDR2、及LCDR3。在一具體實施例中，捕捉抗體係pT3。如本文中所使用，用語「pT3」係指一種抗體，其結合至p217+tau肽，且具有SEQ ID NO:19之重鏈可變區胺基酸序列及SEQ ID NO:20之輕鏈可變區胺基酸序列。在一個實施例中，pT3單株抗體係由小鼠融合瘤表現。在另一實施例中，捕捉抗體係人源化抗體，其具有SEQ ID NO: 21之重鏈可變區胺基酸序列及SEQ ID NO: 22之輕鏈可變區胺基酸序列。

【0034】 根據本申請案之其他實施例，捕捉抗體可係單株抗體，其以磷酸化非依賴性方式結合至在tau蛋白之胺基酸150與250之間的表位，較佳的是人類tau蛋白之胺基酸211至221或胺基酸159至163，且位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號。在一具體實施例中，捕捉抗體係hT7。如本文中所使用，用語「hT7」係指一種公開可得之單株抗體，其結合至包含人類tau蛋白之胺基酸

159至163的表位，其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號。hT7單株抗體可商購自例如ThermoFisher（例如目錄號：MN1000）。

【0035】 如本文中所使用，用語「偵測抗體(detection antibody)」係指結合至所關注之抗原、且具有可偵測標示或係連接至二級偵測系統的抗體。可偵測標示之實例包括但不限於各種酶、輔基、螢光材料、發光材料、生物發光材料、及放射性材料。偵測抗體之實例包括但不限於單株抗體，其結合至tau蛋白，較佳的是包含人類tau蛋白之胺基酸7至20或116至127的表位，其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號。當在包含胺基酸7至20的表位處結合至tau蛋白之單株抗體係用作為針對經捕捉之p217+tau肽的偵測抗體時，偵測到長tau片段。當在包含胺基酸116至127的表位處結合至tau蛋白之單株抗體係用作為針對經捕捉之p217+tau肽的偵測抗體時，偵測到短tau片段及長tau片段兩者。

【0036】 根據本申請案之實施例，偵測抗體可係單株抗體，其包含：分別具有SEQ ID NO: 10、11、及12之多肽序列的免疫球蛋白重鏈HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及具有SEQ ID NO: 13、14、及15之多肽序列的免疫球蛋白輕鏈LCDR1、LCDR2、及LCDR3。在一具體實施例中，偵測抗體係hT43。如本文中所使用，用語「hT43」係指一種單株抗體，其結合至包含人類tau蛋白之胺基酸7至20的表位，其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號，且抗體具有SEQ ID NO: 16之重鏈可變區胺基酸序列及SEQ ID NO: 17之輕鏈可變區胺基酸序列。

【0037】 在另一實施例中，偵測抗體可係單株抗體，其包含：分別具有SEQ ID NO: 2、3、及4之多肽序列的免疫球蛋白重鏈HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及具有SEQ ID NO: 5、6、及7之多肽序列的免疫球蛋白輕鏈

LCDR1、LCDR2、及LCDR3。在另一具體實施例中，偵測抗體係pT82。如本文中所使用，用語「pT82」係指一種單株抗體，其結合至包含人類tau蛋白之胺基酸119至126（較佳的是117至127）的表位，其中位置之編號係根據SEQ ID NO: 1中之編號，且抗體具有SEQ ID NO: 8之重鏈可變區胺基酸序列及SEQ ID NO: 9之輕鏈可變區胺基酸序列。

【0038】 如本文中所使用，用語「基於pT3之檢定(pT3-based assay)」係指其中使用pT3抗體作為捕捉抗體的檢定。如本文中所使用，用語「pT3xhT43」係指一種檢定，其中使用pT3抗體作為捕捉抗體，且使用hT43抗體作為偵測抗體。如本文中所使用，用語「pT3xpT82」係指一種檢定，其中使用pT3抗體作為捕捉抗體，且使用pT82抗體作為偵測抗體。

【0039】 如本文中所使用，用語「基於hT7之檢定(hT7-based assay)」係指其中使用hT7抗體作為捕捉抗體的檢定。如本文中所使用，用語「hT7xpT82」係指檢定，其中使用hT7抗體作為捕捉抗體，且使用pT82抗體作為偵測抗體。

【0040】 如本文中所使用，用語「對象(subject)」係指動物，且較佳地是哺乳動物。根據具體實施例，對象係哺乳動物，包括非靈長類（例如駱駝、驢、斑馬、乳牛、豬、馬、山羊、綿羊、貓、狗、大鼠、兔、天竺鼠、獺、或小鼠）或靈長類（例如猴、黑猩猩、或人類）。在具體實施例中，對象係人類。

【0041】 如本文中所使用，「tau蛋白病(tauopathy)」涵蓋涉及tau在腦內之病理性聚集的任何神經退化性疾病。除家族性及偶發性AD之外，其他例示性tau蛋白病是連鎖於染色體17之額顳葉失智症伴隨巴金森氏症(frontotemporal

dementia with parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)、進行性上眼神經核麻痺症、皮質基底核退化症、匹克症(Pick's disease)、進行性皮質下膠質增生(progressive subcortical gliosis)、僅纏結失智症(tangle only dementia)、彌漫性神經纖維纏結伴隨鈣化、嗜銀顆粒性失智症、肌萎縮性脊髓側索硬化症/巴金森氏症-失智複合症、唐氏症、吉斯曼-史特斯勤-先克病(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease)、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease)、包涵體肌炎、庫賈氏病(Creutzfeld-Jakob disease)、多系統萎縮症、C型尼曼匹克症(Niemann-Pick disease type C)、普里昂蛋白大腦類澱粉血管病變、亞急性硬化性泛腦炎、強直性肌肉失養症、非關島運動神經元病伴隨神經纖維纏結、腦炎後巴金森氏症、及慢性創傷性腦病變(諸如拳擊手型失智症(拳擊疾病))(Morris et al., *Neuron*, 70:410-26, 2011)。

【0042】 如本文中所使用，用語「類澱粉蛋白生成疾病(amyloidogenic disease)」包括與不溶性類澱粉蛋白纖維之形成或沉積相關(或由其造成)的任何疾病。例示性類澱粉蛋白生成疾病包括但不限於全身性類澱粉變性、阿茲海默症、成年型糖尿病、巴金森氏症、亨汀頓氏症、額顳葉失智症、及普里昂蛋白相關傳染性海綿狀腦病變(在人類中的庫魯病及庫賈氏病、及分別在綿羊及牛中的羊搔癢症及BSE)。不同類澱粉蛋白生成疾病係藉由沉積纖維之多肽組分的本質界定或表徵。例如，在患有阿茲海默症之對象或患者中， β 類澱粉蛋白(例如野生型、變體、或截短 β 類澱粉蛋白)係類澱粉蛋白沉積之特徵多肽組分。因此，阿茲海默症係例如對象或患者腦部中「以 $A\beta$ 沉積為特徵之疾病」或「與 $A\beta$ 沉積相關之疾病」之一實例。用語「 β 類澱粉蛋白(β -amyloid

protein)」、「 β 類澱粉肽(β -amyloid peptide)」、「 β 類澱粉蛋白(β -amyloid)」、「 $A\beta$ 」、及「 $A\beta$ 肽($A\beta$ peptide)」在本文中可互換使用。

【0043】 如本文中所使用，用語「判定(determining)」、「測量(measuring)」、「評估(assessing)」、及「檢定(assaying)」可互換使用，且包括定量判定及定性判定兩者。此等用語係指任何形式的測量，且包括判定一特徵(characteristic)、特質(trait)、或特徵(feature)是否存在。評估可係相對或絕對的。「評估…的存在(assessing the presence of)」包括判定存在之某物之量、以及判定其是否存在或不存在。

【0044】 如本文中所使用，用語「診斷(diagnosis)」意指偵測疾病或病症、或判定疾病或病症之階段或程度，疾病或病症諸如tau蛋白病或類澱粉蛋白生成疾病。通常，疾病或病症之診斷係基於指示疾病之一或多種因子及/或症狀的評估。可基於指示疾病或病況存在或不存在之因子（例如p217+tau）的存在、不存在、或量，做出診斷。被視為指示特定疾病診斷之各因子或症狀不需要與該特定疾病完全相關，即可能有可自診斷因子或症狀推論的鑑別診斷。同樣地，可能有以下情況：指示特定疾病之因子或症狀存在於未患有該特定疾病之個體中。用語「診斷(diagnosis)」亦涵蓋判定藥物療法（例如抗p217+tau抗體療法）之治療效果、或預測對藥物療法（例如抗p217+tau抗體療法）之反應模式。診斷方法可單獨使用，或與醫療領域中已知的針對特定疾病或病症（例如阿茲海默症）之其他診斷及/或分期方法組合使用。

【0045】 如本文中所使用，用語「增加(increase)」及「減少(decrease)」係指樣本中特定生物標記之數量相較於對照或參考水平的差異。例如，相較於參考水平，患有疾病之患者之樣本中特定肽之數量可以升高量或減少量存在。

在一個實施例中，「水平增加(increase of a level)」或「水平減少(decrease of a level)」可係樣本中存在的生物標記水平相較於對照組之間的差異，其為至少約1%、至少約2%、至少約3%、至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約50%、至少約60%、至少約75%、至少約80%或更多。在一個實施例中，「水平增加」或「水平減少」可係樣本中存在的生物標記水平相較於對照組之間的統計上顯著差異。例如，若生物標記之所測量水平落在距任何對照或參考組之平均值約1.0個標準偏差、約1.5個標準偏差、約2.0個標準偏差、或約2.5個標準偏差之外，則差異可具統計顯著性。參考或對照者可係例如來自健康個體之樣本、或在較早時間點（諸如在投予治療劑之前的時間點或在治療方案期間之較早時間點）自相同個體取得之樣本。

【0046】 如本文中所使用，用語「經單離(isolated)」意指生物組分（諸如核酸、肽、或蛋白質）已經與該組分自然存在於其中之生物體中的其他生物組分（即其他染色體及染色體外DNA及RNA、及蛋白質）實質上分離、與該等其他生物組分分開生產、或自該等其他生物組分純化出來。已「經單離」之核酸、肽、及蛋白質因而包括藉由標準純化方法純化之核酸及蛋白質。「經單離」核酸、肽、及蛋白質可係組成物之一部分且仍為經單離的，只要此組成物並非該核酸、肽、及蛋白質之原生環境的一部分。該用語亦包含藉由在宿主細胞中重組表現所製備之核酸、肽及蛋白質以及化學合成之核酸。

【0047】 如本文中所使用，「結合至tau蛋白之經單離抗體(isolated antibody that binds to a tau protein)」或「經單離抗tau抗體(isolated anti-tau antibody)」意欲指特異性結合tau蛋白且實質上不含其他具有不同抗原特異性之

抗體的抗體（例如，經單離抗tau偵測抗體實質上不含特異性結合tau以外之抗原的抗體）。然而，經單離抗tau偵測抗體可以與其他相關抗原（例如來自其他物種（諸如tau物種同源物））具有交叉反應性。

【0048】 如本文中所使用，用語「特異性結合(specifically bind/specific binding)」係指本申請案之抗tau抗體以約 1×10^{-6} M或更緊密之解離常數(K_D)結合至預設目標的能力，例如約 1×10^{-7} M或更小、約 1×10^{-8} M或更小、約 1×10^{-9} M或更小、約 1×10^{-10} M或更小、約 1×10^{-11} M或更小、約 1×10^{-12} M或更小、或約 1×10^{-13} M或更小。 K_D 係獲自 K_d 與 K_a 之比（即 K_d/K_a ），且以莫耳濃度(M)表示。抗體之 K_D 值可鑑於本揭露使用所屬技術領域中之方法判定。例如，抗tau抗體之 K_D 值可藉由使用表面電漿共振判定，諸如藉由使用生物感測器系統，例如Biacore®系統、Proteon儀器(BioRad)、KinExA儀器(Sapidyne)、ELISA、或所屬技術領域中具有通常知識者已知之競爭性結合檢定。一般而言，抗tau抗體結合至預設目標（即tau）之 K_D 較其針對非特異性目標之 K_D 小至少十倍，如藉由使用例如Proteon儀器(BioRad)之表面電漿共振所測量。然而，特異性結合至tau之抗tau抗體可與其他相關目標具有交叉反應性，例如與來自其他物種（諸如來自小鼠、大鼠、狢、狗、或豬）之相同預設目標（同源物）具有交叉反應性。

【0049】 如本文中所使用，用語「多核苷酸(polynucleotide)」同義地稱為「核酸分子(nucleic acid molecule)」、「核苷酸(nucleotide)」、或「核酸(nucleic acid)」，係指任何多核糖核苷酸或多去氧核糖核苷酸，其可為未經修飾之RNA或DNA、或經修飾之RNA或DNA。「多核苷酸(polynucleotide)」包括但不限於單股及雙股DNA、為單股及雙股區之混合物的DNA、單股及雙股RNA、及為單股及雙股區之混合物的RNA、包含可為單股或（更典型地）雙股

或單股及雙股區之混合物的DNA及RNA之混成分子。此外，「多核苷酸(polynucleotide)」係指包含RNA或DNA或RNA及DNA兩者的三股區。用語多核苷酸亦包括含有一或多個經修飾鹼基之DNA或RNA及具有為了穩定性或其他理由經修飾之主鏈的DNA或RNA。「經修飾(modified)」鹼基包括例如三苯甲基化(tritylated)鹼基及不常見鹼基諸如肌昔(inosine)。可對DNA及RNA進行各種修飾；因此，「多核苷酸(polynucleotide)」包含典型在自然界所發現之經化學、酶、或代謝修飾之多核苷酸形式，以及病毒和細胞所特有之DNA及RNA的化學形式。「多核苷酸(polynucleotide)」亦包含相對短之核酸鏈，其通常稱為寡核苷酸。

【0050】 如本文中所使用，用語「調節、改善、或治療(modulating, ameliorating, or treating)」或「治療(treatment)」包括身體及/或心智病況的疾病預防、或已發展之身體及/或心智病況在其建立之後的改善或消除、或此類病況之特徵症狀的減輕。

【0051】 如本文中所使用，用語「準確度(accuracy)」係指檢定之所估值與真實值的接近程度。

【0052】 如本文中所使用，用語「精確度(precision)」係指自檢定之相同均質樣本之多次取樣獲得的一系列測量間的一致程度。

【0053】 如本文中所使用，用語「敏感度(sensitivity)」係指樣本中可以檢定中可接受之準確度及精確度測量的最低分析物濃度。

【0054】 本申請案提供用於偵測基於血液之樣本（特別係血漿）中之單或多磷酸化p217+tau肽的檢定及方法。相較於用於收集CSF的腰椎穿刺，血液樣本的收集快速且容易執行，並使發生感染或其他併發症之風險降低。本申請

案之檢定及方法以充分的敏感度、精確度、及準確度測量基於血液之樣本中之p217+tau肽。因此，相較於基於CSF之檢定，本申請案提供一種用於測量及/或監測對象中之p217+tau水平的改良方式，其係藉由最小化樣本收集對對象之負擔，藉此能夠更頻繁檢定並監測p217+tau水平的變化（其對於監測並評估對治療之反應係特別所欲的）。用於本申請案之檢定及方法中的樣本可係血液、血清、或血漿樣本。較佳的是，樣本係血漿樣本。更佳的是，血漿樣本未經免疫沉澱以濃縮含在其中的p217+tau肽。在一具體實施例中，樣本係粗血漿樣本。

【0055】 本申請案之檢定及方法係關於藉由使用捕捉抗體測量基於血液之樣本中之p217+tau肽，該捕捉抗體結合至樣本中之p217+tau肽。捕捉抗體較佳地係固定至固相，使得捕捉抗體與存在於樣本中之p217+tau肽選擇性結合並將其固定至固相。在分開的步驟中，使經捕捉之p217+tau肽與抗tau偵測抗體接觸，抗tau偵測抗體係用報導子元件標示，報導子元件允許偵測經捕捉之p217+tau物種。本文所述之檢定及方法可用於各種診斷目的，例如用於診斷對象之AD、其他tau蛋白病、以A β 沉積為特徵之其他疾病、或其他類澱粉蛋白生成疾病；監測治療的有效性；識別適用於抗p217+tau治療之對象；針對PET造影及/CSF檢定預篩選對象，以進一步偵測AD、其他tau蛋白病、以A β 沉積為特徵之其他疾病、或其他類澱粉蛋白生成疾病；識別對象以將其收案於與AD、其他tau蛋白病、以A β 沉積為特徵之其他疾病、或其他類澱粉蛋白生成疾病相關之臨床試驗等。

【0056】 在一個例示性實施例中，本申請案之檢定及方法包括下列之步驟：使基於血液之樣本與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以使捕捉抗體與樣本中之p217+tau肽結合，以產生抗體-肽複合物；接著洗滌抗體-肽複合物。

抗體-肽複合物可用不干擾檢定之任何合適溶液洗滌，諸如例如緩衝溶液（例如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)溶液）。接著，可使經洗滌之抗體-肽複合物與偵測抗體接觸，以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。接著，偵測偵測抗體以判定樣本中之p217+tau肽之量。

【0057】 在Kolb等人之美國專利第10,591,492號（在下文中稱為「Kolb '492專利」）（其全文以引用方式併入本文中）中，揭示一種用於測量生物樣本中之p217+tau肽的檢定。生物樣本可包括腦脊髓液(cerebral spinal fluid, CSF)、血液、或腦部均質物。在Kolb '492專利中觀察到，粗血清或血漿中之tau測量未展現理想的診斷性能，且可能有敏感度及基質干擾障礙帶來的困擾。如下文所展示，粗血清中之測量顯示Kolb '492專利中所述之檢定因大多數測量係低於其檢定之定量下限(LLOQ)（其係指可以可接受的精確度及準確度定量判定的分析物之最低量）而無法提供足夠的敏感度，且顯示僅在樣本經免疫沉澱，接著洗提液經熱變性之後可偵測。下文提供之實例3證實，Kolb '492專利中所述之pT3xpT82檢定（在單一步驟中將樣本與捕捉抗體及偵測抗體兩者組合於相同混合物內）在用於測量血漿中之p217+tau肽時，缺乏敏感度及稀釋線性。

【0058】 相比之下，雖然相較於CSF，基於血液之樣本中之p217+tau肽水平顯著更低，但本申請案之檢定及方法不在測量之前先藉由免疫沉澱濃縮樣本中之p217+tau肽，即可出乎意料地以改善的敏感度自人類血清及/或血漿樣本測量p217+tau肽。免疫沉澱係一種繁複且不精確的程序。因此，本申請案提供改良的檢定及方法，其改善測量p217+tau肽之敏感度，而不用在測量之前對樣本進行繁瑣的免疫沉澱預處理。具體而言，已出乎意料地發現，(1)用於使捕捉

抗體存在於血清及/或血漿樣本中之p217+tau肽結合以形成抗體-肽複合物、及(2)用於使抗體-肽複合物與偵測器抗體結合之分開步驟，可成功降低樣本中其他組分（例如內源性生產或外源性投予的干擾抗體）的干擾，使得檢定對於偵測血清及/或血漿中之p217+tau肽具有足夠的敏感性。在一個實施例中，可先使樣本與捕捉抗體接觸以使捕捉抗體與樣本中之p217+tau肽結合，接著洗滌以移除任何可能干擾檢定之未結合組分。在洗滌之後，接著使經捕捉之p217+tau肽與偵測抗體接觸以使偵測抗體與經捕捉之p217+tau肽結合。下文提供之實例4進一步證實，當使用Kolb '492專利中所述之檢定（在單一步驟中將樣本與捕捉抗體及偵測抗體兩者組合於相同混合物內）測量血清中之p217+tau肽時，觀察到對應於干擾組分之假影信號(artifact signal)，其未在CSF中觀察到。然而，使用包含用於使捕捉抗體及偵測器抗體與p217+tau肽結合之分開步驟的例示性方法（如本申請案中所述）獲得的p217+tau測量，不存在此假影信號。

【0059】 此外，亦已出乎意料地發現，本申請案之檢定及方法在自人類血漿樣本測量p217+tau肽時，相較於人類血清樣本係出乎意料地更為敏感，此係由於血漿中可偵測的p217+tau水平出乎意料地增加，如以下實例7中所進一步顯示。本申請案之檢定及方法能夠測量p217+tau肽，並為健康對象及患有下列或處於發展下列之風險的對象兩者提供準確且精確的定量結果：tau蛋白病，且更具體的是AD。本申請案之檢定及方法亦能夠測量p217+tau肽，並為下列提供準確且精確的定量結果：健康對象；及患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險的對象，特別是患有失智症（例如輕度至中度失智症）之對象。具體而言，檢定及方法能夠自高於本申請案之檢定之LLOQ的兩組對象之血漿樣本測量p217+tau肽，其指示可接受且可靠的敏感度水平。檢定

之LLOQ可在檢定之變異係數(coefficient of variation, CV)之15%至25%內、在CV之15%至20%內、或較佳地在CV之20%。此外，根據本申請案之檢定及方法自健康對象之血漿樣本獲得的p217+tau測量在數字上可與自AD對象之測量分開。因此，本申請案之檢定及方法提供準確且精確的測量，其可用於識別健康對象與AD對象。

【0060】 在一個實施例中，本申請案之檢定及方法自來自對象之血漿樣本測量p217+tau，並隨後判定該對象患有tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病或處於發展tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病之風險（當自血漿樣本測量之p217+tau之量係高於預設閾值時）。預設閾值可係用於區分下列之任何合適的閾值：患有tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病或處於發展tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病之風險的對象，此係相較於健康且未處於發展tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病之風險的對象。預設閾值可經判定為血漿p217+tau濃度，其用於：區分高於如藉由PET造影所測量之腦部或腦部區域中之tau水平的患者與低於該水平者；區分高於CSF中之tau（例如磷酸化tau，諸如p181或p217+tau）水平的患者與低於該水平者；區分高於諸如CSF或血漿中之β類澱粉蛋白（例如Aβ40或Aβ42）水平的患者；區分高於諸如CSF或血漿中之Aβ42與Aβ40之比的患者與低於該比者；及區分認知正常之患者及患有失智症之患者。由於本申請案之檢定及方法在人類血漿中出乎意料地具有更高的敏感度，預設閾值係高於檢定之LLOQ，藉此提供敏感的可定量閾值水平以識別患有tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成或處於發展tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成之風險的對象（與健康對象分開）。具體而言，預設閾值係高於檢定之LLOQ及/或偵測下限(Lower Limit of Detection, LLOD)，其係可以可靠偵測的分析物之最低量。例

如，預設閾值可係檢定之LLOQ的至少3、4、5、7、或10倍及/或檢定之LLOD的至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、或120倍。

【0061】 經識別為患有tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病或處於發展tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病之風險的對象可經指示以獲得進一步臨床測試，諸如例如CSF收集及/或PET造影，以進一步評估此等對象之腦部病理。在另一實施例中，可向經識別為患有tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病或處於發展tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病之風險的對象投予活性劑，該活性劑係用於治療認知衰退、或tau蛋白病及/或類澱粉蛋白生成疾病，例如AD。用於治療tau蛋白病之活性劑可包括抗tau抗體、抗p217+tau抗體、針對人類tau之小干擾RNA (siRNA)、針對p217+tau之siRNA、膽鹼酯酶抑制劑、N-甲基-D-天冬胺酸(NMDA)拮抗劑等。用於類澱粉蛋白生成疾病之活性劑可包括抗類澱粉蛋白抗體、 β 分泌酶抑制劑、 γ 分泌酶抑制劑、針對人類 β 類澱粉蛋白之小干擾RNA (siRNA)、膽鹼酯酶抑制劑、N-甲基-D-天冬胺酸(NMDA)拮抗劑等。

【0062】 在一些實施例中，預設閾值可對應於基線值或顯著較基線值高之值。如本文中所使用，「顯著較高(significantly higher)」係指統計上顯著的較高值（並非單獨歸因於機率），其具有0.05或更小之p值。「顯著較高」可係較健康自願者中所發現者高至少約1%、2%、5%、或10%，其p值為小於0.05、0.04、0.03、0.01、0.005、0.001等。基線值可對應於健康個體族群之平均水平。基線值亦可對應於在相同對象中判定之先前水平之平均值。

【0063】 在一個實施例中，捕捉抗體係針對p217+tau表位之單株抗體，且偵測抗體係針對包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位之單株抗體。在另一實施例中，捕捉抗體係針對p217+tau表位之單株抗體，且偵測抗體係針對包含

人類tau蛋白之胺基酸殘基119至126（較佳的是116至127）的表位之單株抗體。在一個例示性實施例中，捕捉抗體係單株抗體，其包含：分別具有SEQ ID NO: 23、24、及25之多肽序列的免疫球蛋白重鏈HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及具有SEQ ID NO: 26、27、及28之多肽序列的免疫球蛋白輕鏈LCDR1、LCDR2、及LCDR3，且偵測抗體係單株抗體，其包含：分別具有SEQ ID NO: 10、11、及12之多肽序列的免疫球蛋白重鏈HCDR1、HCDR2、及HCDR3；及具有SEQ ID NO: 13、14、及15之多肽序列的免疫球蛋白輕鏈LCDR1、LCDR2、及LCDR3。更具體而言，捕捉抗體係pT3且/或偵測抗體係hT43。

【0064】 根據本申請案之一實施例，所關注之樣本中之p217+tau肽係用針對p217+tau表位之捕捉抗體捕捉。經捕捉之p217+tau肽（雖然所有皆含有p217+tau表位）可具有不同長度，其可藉由偵測結合至不同表位之偵測抗體偵測。例如，針對包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體僅可偵測仍含有tau蛋白之胺基酸殘基7至20（「長p217+tau肽」）的經捕捉之p217+tau肽或其片段，而針對包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位之偵測抗體不僅可偵測長p217+tau肽，亦可偵測短p217+tau肽。可使經捕捉之p217+tau肽與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20或116至127的表位之偵測抗體接觸，藉此偵測並測量樣本中之長p217+tau肽或p217+tau肽（長及短p217+tau肽）之量。樣本中之短p217+tau肽之量係藉由自p217+tau肽之量減去長p217+tau肽之量來計算。

【0065】 鑑於針對使用本申請案之檢定及方法在血漿中偵測p217+tau肽觀察到敏感度獲得出乎意料的改善，因此據信經改善之敏感度同樣適用於偵測上述短p217+tau肽及/或長p217+tau肽。因此，在本申請案之另一實施例中，本

申請案之檢定及方法包括自血清及/或血漿樣本測量短p217+tau及/或長p217+tau 肽。具體而言，本申請案之檢定及方法可以增加的敏感度，自人類血漿測量短 p217+tau及/或長p217+tau。在一進一步實施例中，本申請案之檢定及方法自來自對象之血漿樣本測量短p217+tau及/或長p217+tau，並隨後判定該對象患有tau 蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險，其中自血漿樣本測量之短p217+tau肽及/或長p217+tau肽之量係高於（多個）預設閾值。（多個）預設閾值係高於檢定之 LLOQ。

【0066】 根據本申請案之另一實施例，除捕捉並測量樣本中之p217+tau 肽之量之外，樣本中之總tau肽係用磷酸化非依賴性捕捉抗體捕捉，該磷酸化非 依賴性捕捉抗體諸如針對在tau蛋白之胺基酸150與250之間的tau表位（較佳的 是包含tau蛋白之胺基酸159至163的表位）之抗體。可使經捕捉之總tau肽與針 對包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20或116至127的表位之偵測抗體接觸，藉此偵 測並測量樣本中之總長tau肽或總tau肽（長及短tau肽片段）之量。樣本中之短 總tau肽之量係藉由自總tau肽之量減去長總tau肽之量來計算。

【0067】 根據本申請案之實施例，與樣本中之p217+tau肽相關之值，諸 如樣本中之p217+tau肽之量及長p217+tau肽之量（可選地總tau肽之量及總長tau 片段之量），以及基於測量量之資訊，諸如所計算之短p217+tau肽及短總tau 肽、或與p217+tau肽相關之比（諸如短tau肽片段之量與長tau肽片段之量之比、 短p217+tau肽之量與短tau片段之總量之比、長p217+tau肽之量與長tau片段之總 量之比等），可用於一或多種診斷目的。在一個實施例中，若符合下列條件， 則判定對象患有tau蛋白病：與p217+tau肽相關之比（例如短p217+tau肽之量與

長p217+tau肽之量之比)係顯著高於對應基線比,且所測量之p217+tau、短p217+tau、及/或長p217+tau之量係高於檢定之LLOQ。

【0068】 在一個實施例中,本申請案之方法包含:(i)使基於血液之樣本(較佳的是血漿樣本)與針對包含磷酸化p217+tau的表位之捕捉抗體接觸,以捕捉樣本中之p217+tau肽;(ii)分開地使經捕捉之p217+tau肽與針對包含胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體接觸(較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後),以藉此測量長p217+tau肽之量,且/或與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位之偵測抗體接觸(較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後),以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量;及(iii)基於p217+tau肽之量、或短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比,判定對象是否患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。診斷可藉由將來自對象之樣本中之p217+tau肽之量或濃度與對應的預設閾值水平進行比較來執行。診斷亦可藉由將來自對象之樣本中之短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比與對應基線比進行比較來執行,其中短p217+tau肽及長p217+tau肽之量係高於其各別檢定之LLOQ。

【0069】 在另一實施例中,本申請案之方法包含:(i)使基於血液之樣本(較佳的是血漿樣本)與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸,以捕捉樣本中之p217+tau肽,且/或與針對在tau蛋白之胺基酸150與250之間的tau表位之磷酸化非依賴性捕捉抗體接觸,以捕捉樣本中之總tau肽;(ii)分開地使經捕捉之p217+tau肽、或經捕捉之總tau肽與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基116至127的表位之偵測抗體接觸(較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽或經捕捉之總tau肽之後),以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量、或總短tau肽之量;及(iii)基於樣本中之短p217+tau肽之量與總短tau肽之量之比,判定對象是否患有tau蛋

白病或處於發展tau蛋白病之風險。診斷可藉由將來自對象之樣本中之短p217+tau肽之量與包含與pT3抗體所辨識者相同的tau蛋白區域（即tau之胺基酸211至221）之總短tau肽之量之比與對應基線值進行比較來執行，其中短p217+tau肽之量係高於檢定之LLOQ。

【0070】 在另一實施例中，本申請案之方法包含：(i)使基於血液之樣本（較佳的是血漿樣本）與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之p217+tau肽；(ii)分開地使經捕捉之p217+tau肽與針對包含胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量長p217+tau肽之量，且/或與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基116至127的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量；及(iii)基於p217+tau肽之量、或短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比，判定治療對對象的有效性，其中所測量之p217+tau肽、短p217+tau肽、及/或長p217+tau肽之（多個）量係高於各別檢定之LLOQ。

【0071】 在又另一實施例中，本申請案之方法包含：(i)使基於血液之樣本（較佳的是血漿樣本）與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之p217+tau肽，且/或與針對在tau蛋白之胺基酸150與250之間的tau表位之磷酸化非依賴性捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之總tau肽；(ii)分開地使經捕捉之p217+tau肽、或經捕捉之總tau肽與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基116至127的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽或經捕捉之總tau肽之後），以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量、或總短tau肽之量；及(iii)

基於生物樣本中之短p217+tau肽之量與總短tau肽之量之比之量，判定治療對對象的有效性，其中所測量之短p217+tau肽之量係高於檢定之LLOQ。

【0072】 在又另一實施例中，在治療之前、期間、或之後，藉由監測p217+tau肽之量、短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比、或短p217+tau肽之量與總短tau肽之量之比，判定治療對對象的有效性，其中p217+tau肽、短p217+tau肽、及/或長p217+tau肽之量係高於其各別檢定之LLOQ。值相對於基線之降低示意對治療之正向反應。當循環中病理性tau的半衰期增加，且/或病理性tau自腦部清除時，值亦可在生物流體中暫時增加。

【0073】 根據一具體態樣，tau蛋白病包括但不限於選自由以下所組成之群組之一或多者：阿茲海默症（包括家族性阿茲海默症及偶發性阿茲海默症）、連鎖於染色體17之額顳葉失智症伴隨巴金森氏症(FTDP-17)、進行性上眼神經核麻痺症、皮質基底核退化症、匹克症、進行性皮質下膠質增生、僅纏結失智症、彌漫性神經纖維纏結伴隨鈣化、嗜銀顆粒性失智症、肌萎縮性脊髓側索硬化症/巴金森氏症-失智複合症、唐氏症、吉斯曼-史特斯勤-先克病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵體肌炎、庫賈氏病、多系統萎縮症、C型尼曼匹克症、普里昂蛋白大腦類澱粉血管病變、亞急性硬化性泛腦炎、強直性肌肉失養症、非關島運動神經元病伴隨神經纖維纏結、腦炎後巴金森氏症、慢性創傷性腦病變、及拳擊手型失智症（拳擊疾病）。

【0074】 較佳的是，tau蛋白病係阿茲海默症（包括家族性阿茲海默症及偶發性阿茲海默症）、FTDP-17、或進行性上眼神經核麻痺症。

【0075】 最佳的是，tau蛋白病係阿茲海默症（包括家族性阿茲海默症及偶發性阿茲海默症）。

【0076】 根據一個實施例，本申請案之方法包含：**(i)**使基於血液之樣本（較佳的是血漿樣本）與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之p217+tau肽；**(ii)**分開地使經捕捉之p217+tau肽與針對包含胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量長p217+tau肽之量，且/或與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基116至127的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量；及**(iii)**基於p217+tau肽之量、或短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比，判定對象是否適用於抗p217+tau抗體療法，其中p217+tau肽、短p217+tau、及/或長p217+tau之量係高於各別檢定之LLOQ。

【0077】 根據一具體態樣，若符合下列條件，則判定對象適用於抗p217+tau抗體療法：基於血液之樣本（特別是血漿樣本）中之p217+tau肽之量、或基於血液之樣本或血漿樣本中之短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比顯著高於對應基線值，其中對應基線值係高於測量p217+tau肽、短p217+tau肽、及/或長p217+tau肽之檢定的LLOQ，或p217+tau肽、短p217+tau肽、及/或長p217+tau之量係高於其各別檢定之LLOQ。

【0078】 根據另一具體態樣，本申請案之方法包含：**(i)**使基於血液之樣本（較佳的是血漿樣本）與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之p217+tau肽，或與針對在tau蛋白之胺基酸150與250之間的tau表位之磷酸化非依賴性捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之總tau肽；**(ii)**分開地使經捕捉之p217+tau肽、或經捕捉之總tau肽與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基116至127的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽或經捕捉之總tau肽之後），以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量、或總短tau肽之量；及**(iii)**基於生

物樣本中之短p217+tau肽之量與總短tau肽之量之比，判定對象是否適用於抗p217+tau抗體療法，其中短p217+tau肽之量係高於檢定之LLOQ。

【0079】 根據一個實施例，若符合下列條件，則判定對象適用於抗p217+tau抗體療法：短p217+tau肽之量與總短tau肽之量之比顯著高於對應基線值，其中短p217+tau肽之量係高於檢定之LLOQ。

【0080】 在一個實施例中，本申請案之方法包含：(i)使基於血液之樣本（較佳的是血漿樣本）與針對包含磷酸化p217+tau的表位之捕捉抗體接觸，以捕捉樣本中之p217+tau肽；(ii)分開地使經捕捉之p217+tau肽與針對包含胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量長p217+tau肽之量，且/或與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量樣本中之長及短p217+tau肽之量；及(iii)基於p217+tau肽之量，判定對象是否患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險。診斷可藉由將來自對象之樣本中之p217+tau肽之量或濃度與對應的預設閾值水平進行比較來執行，其中p217+tau肽之量或濃度係高於步驟(i)及(ii)之檢定之LLOQ。

【0081】 本申請案亦關於測量基於血液之樣本（特別是血漿）中與抗體複合之p217+tau、以及樣本中未結合抗體之游離p217+tau。在一個實施例中，總抗體係使用親和技術捕捉，接著經受變性條件，變性條件包括離散劑(chaatroph)、熱去活化、或其他蛋白質破壞(protein disruption)技術。p217+tau係使用rpHPLC與抗體分離，並使用本申請案之方法測量，其允許定量結合抗體之p217+tau。

【0082】 根據一通常態樣，本發明係關於一種監測對象中之抗p217+tau抗體治療的方法，該方法包含：本申請案係關於一種監測對象中之抗p217+tau抗體治療的方法，該方法包含：(i)自對象獲得基於血液之樣本（特別是血漿樣本）；(ii)自含有總p217+tau之基於血液之樣本獲得經半變性樣本；(iii)使經半變性樣本與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以捕捉經半變性樣本中之p217+tau肽；及(iv)分開地使經捕捉之p217+tau肽與針對包含胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量長p217+tau肽之量，且/或與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基119至126的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量經半變性樣本中之長及短p217+tau肽之量，其中p217+tau肽、短p217+tau肽、及/或長p217+tau肽之量經測量高於其各別檢定之LLOQ。

【0083】 自含有p217+tau肽之基於血液之樣本製備經半變性樣本，其係藉由降解抗體及/或其他血液組分（其干擾捕捉抗體及/或偵測抗體與p217+tau肽之結合、或干擾結合至p217+tau肽之偵測抗體的偵測），而不降解存在於基於血液之樣本中之p217+tau肽。在一個實施例中，在使抗體變性之預設溫度下將基於血液之樣本加熱預設時間量，以製備經半變性樣本。預設溫度可係75°C至100°C、80°C至90°C、或85°C。預設時間量可係0.1至30分鐘、1至15分鐘、2至10分鐘、3至9分鐘、或7分鐘。在加熱變性之後，可選地可將樣本冷卻至對p217+tau肽適當穩定之溫度（例如等於或低於4°C），以停止經半變性樣本內蛋白質之進一步降解。在一個例示性實施例中，將基於血液之樣本加熱至85°C達7分鐘，隨後在4°C冰浴中冷卻10分鐘，以製備經半變性樣本。

【0084】 根據另一通常態樣，本申請案係關於一種監測對象中之抗p217+tau抗體治療的方法，該方法包含：(i)自對象獲得基於血液之樣本（特別是血漿樣本）；(ii)自含有總p217+tau之基於血液之樣本獲得經半變性樣本，其中經半變性樣本經加熱以使樣本中之抗體變性；(iii)使經半變性樣本與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸，以捕捉經半變性樣本中之p217+tau肽；(iv)分開地使經捕捉之p217+tau肽與針對包含胺基酸殘基7至20的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量長p217+tau肽之量，或與針對包含tau蛋白之胺基酸殘基116至127的表位之偵測抗體接觸（較佳的是在洗滌經捕捉之p217+tau肽之後），以藉此測量經半變性樣本中之長及短p217+tau肽之量；(v)藉由自總p217+tau之量減去不含抗體之p217+tau之量來計算樣本中結合抗體之p217+tau之量；(vi)計算結合抗體之p217+tau與不含抗體之p217+tau之比；及(vii)基於所計算之比，監測對象中之抗p217+tau抗體治療，其中p217+tau肽、短p217+tau肽、及/或長p217+tau肽之量經測量高於其各別檢定之LLOQ。

【0085】 根據一具體態樣，在治療之前、期間、或之後，藉由監測結合抗體之p217+tau肽及不含抗體之p217+tau肽之量，判定治療對對象的有效性。不含抗體之p217+tau之值相對於基線之降低、或結合抗體之p217+tau之值相對於基線之增加、及因此結合抗體之p217+tau與不含抗體之p217+tau之比相對於基線之增加示意對治療之正向反應。當循環中病理性tau的半衰期增加，且/或病理性tau自腦部清除時，不含抗體之p217+tau之值亦可在基於血液之流體（諸如血漿）中暫時增加。

【0086】 在本申請案之進一步態樣中，該等檢定及方法可用於監測正接受下列之患者中之p217+tau水平：任何針對tau蛋白病之治療，其包括但不限於投予外源性抗tau抗體，更具體的是抗p217+tau抗體；或任何針對類澱粉蛋白生成疾病之治療。對基於血液之樣本（特別是血漿樣本）中之p217+tau水平的偵測可用於許多不同目的，包括用作為決策工具，以判定治療之劑量水平或給藥間隔應增加或減少，以確保達到或維持有效或安全的藥物水平；藉由提供達到最低pK水平之證據，而用作為起始抗tau藥物療法之輔助；及用作為臨床試驗應排除或包括患者的指示及作為後續監測對臨床試驗用藥要求之遵從性的輔助。

【0087】 根據具體態樣，本申請案之方法之捕捉抗體在與樣本接觸之前，係先結合至固體支持物。捕捉抗體可提供於診斷套組中，診斷套組用於測量基於血液之樣本（特別是血漿樣本）中之p217+tau，其預結合至固相，諸如結合至微量滴定盤之孔或結合至磁珠。偵測抗體可含有或附接至任何可偵測標示（例如螢光分子、生物素等），其係可直接偵測的或可經由二級反應（例如與鏈黴親和素之反應）偵測。替代地，可使用含有可偵測標示之第二試劑，其中第二試劑對一級抗體具有結合特異性。在一具體實施例中，偵測抗體經生物素化。

【0088】 根據具體態樣，可使用所屬技術領域中已知之任何合適技術（包括ELISA及單分子陣列平台），判定本申請案之方法中所測量之p217+tau肽之量。根據具體態樣，本申請案之方法使用高敏感度陣列平台（諸如Quanterix Simoa或MSD S-plex）以測量基於血液之樣本（特別是血漿樣本）中之p217+tau肽之量，基於血液之樣本相較於CSF具有較低濃度的p217+tau肽。

【0089】 在本申請案之一進一步態樣中，本申請案之檢定及方法提供一種用於測量基於血液之樣本（例如血液、血清、及/或血漿）中之p217+tau肽的基於珠之檢定，其減少由檢定試劑造成之干擾，且因此更為準確且精確。已發現，某些檢定試劑在用於測量基於血液之樣本中之p217+tau肽時，以對藉由檢定獲得的測量產生干擾之方式交互作用。具體而言，在基於珠之檢定（其中捕捉抗體在與基於血液之樣本接觸前係結合至磁珠）中，發現用於製備基於血液之樣本的樣本稀釋劑會干擾在基於血液之樣本中之檢定的準確度及精確度。例如，如以下實例7中所示，獲自Simoa Homebrew檢定入門套組（目錄號101351，可商購自Quanterix）的樣本稀釋劑展示珠計數減少，據信其係由用作為捕捉抗體之基材的磁珠叢聚所造成。然而，本申請案之檢定及方法利用減少由珠叢聚所造成之干擾的樣本稀釋劑。具體而言，本申請案之樣本稀釋劑包含非離子性界面活性劑。更具體而言，非離子性界面活性劑包括親水性聚氧化乙烯鏈及/或芳族烴親脂性或疏水性基團。更具體而言，非離子性界面活性劑係Triton X-100。樣本稀釋劑亦可包含參(羥甲基)胺基甲烷(Tris)，發現其會進一步減少對檢定之干擾。下文進一步描述之實例7證實，含有Triton X-100之樣本稀釋劑減少觀察到的干擾，且基於Tris緩衝劑之樣本稀釋劑相較於基於磷酸鹽緩衝劑之樣本稀釋劑提供更佳的干擾減少。本申請案之樣本稀釋劑可進一步包括不會干擾基於血液之樣本中之p217+tau測量的其他合適組分，諸如NaCl、乙二胺四乙酸(EDTA)、嗜異性阻斷劑、及/或牛血清白蛋白。

【0090】 在另一通常態樣中，本申請案係關於一種用於自基於血液之樣本（例如血液、血清、血漿）偵測p217+tau之套組，其包含(a)針對p217+tau表位之捕捉抗體，可選地針對在tau蛋白之胺基酸150與250之間的tau表位之磷酸

化非依賴性捕捉抗體；(b)磁珠，其用於接合捕捉抗體至其上；(c)樣本稀釋劑，其包含非離子性界面活性劑；及(d)至少一種針對tau蛋白表位之偵測抗體，tau蛋白表位包含tau蛋白之胺基酸殘基7至20或116至127。套組係用於測量樣本中之p217+tau肽之量、短p217+tau肽之量與長p217+tau肽之量之比、及/或短p217+tau肽之量與總短tau肽之量之比。

【0091】 在本申請案之另一態樣中，根據上述檢定及方法自基於血液之樣本（例如血液、血清、血漿）獲得的p217+tau測量在計算裝置中經進一步分析，以偵測且/或預測對象之tau蛋白病。具體而言，自基於血液之樣本獲得的p217+tau測量係在與對應於針對其他生物標記（其亦可自基於血液之樣本偵測）獲得的測量之數據組合下，由計算裝置分析，以提供進一步改善的對象之tau蛋白病偵測及/或預測。使用可自基於血液之樣本適當測量之（多種）生物標記的經改善之偵測及/或預測tau蛋白病（特別是AD）的能力可用於各種診斷目的，例如用於診斷對象之AD或其他tau蛋白病；監測治療的有效性；識別適用於抗tau或抗p217+tau治療之對象；針對PET造影及/CSF檢定預篩選對象，以進一步偵測AD或其他tau蛋白病；識別對象以將其收案於與AD或其他tau蛋白病相關之臨床試驗等。

【0092】 在一個例示性實施例中，提供一種用於偵測或預測對象之tau蛋白病的方法。該方法包含使用檢定偵測基於血液之樣本（例如血液、血清、血漿）中之p217+tau肽之量。檢定可係本申請案中所述之任何例示性檢定。具體而言，檢定藉由下列測量基於血液之樣本（特別是血漿）中之p217+tau肽之量：使樣本與結合至樣本中之p217+tau肽之捕捉抗體接觸；及在分開步驟中，使經捕捉之p217+tau肽與抗tau偵測抗體接觸，抗tau偵測抗體係用報導子元件標

示，報導子元件允許偵測經捕捉之p217+tau物種。更具體而言，檢定偵測血漿樣本中之p217+tau肽之量，其係藉由使血漿樣本與針對p217+tau表位之捕捉抗體接觸以使捕捉抗體與血漿中之p217+tau肽結合，以形成抗體-肽複合物，並分開地使抗體-肽複合物與偵測抗體接觸以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合。

【0093】 計算裝置獲得藉由檢定偵測的p217+tau測量，以產生對應於p217+tau肽之量的tau數據。tau數據可表示藉由檢定偵測的p217+tau肽之量。替代地，tau數據可表示二元狀態（是/否），其指示量是否高於預設閾值。檢定係足夠敏感的（如上所論述），使得預設閾值係高於檢定方法之LLOQ。計算裝置亦可獲得對象之醫療數據，諸如例如人口統計資訊（例如年齡、性別）、醫學病史、電子病歷(Electronic Medical Record, EMR)、對應於患者用藥紀錄之藥局數據等。具體而言，電腦裝置可獲得對應於至少一種自患者偵測到的生物標記的測量或二元狀態之生物標記數據。生物標記可係針對tau蛋白病之任何合適生物標記。較佳的是，生物標記可自對象之基於血液之樣本（特別是血漿樣本）偵測。例如，生物標記可選自由下列所組成之群組：類澱粉蛋白 β ($A\beta$)、神經絲輕鏈(NFL)、脂聯素、瘦素、及其他發炎或代謝標記。更具體而言，生物標記係選自NFL、脂聯素、及瘦素。計算裝置使用機器學習模組分析tau數據及生物標記數據，以判定或預測對象是否患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。使用一組參考數據訓練機器學習模組。機器學習模組將tau數據及生物標記數據與一組參考數據進行比較，以判定或預測對象是否患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。該組參考數據包括參考組患者之tau數據及生物標記數據、連同對應於tau蛋白病之腦部病理的數據（例如疾病分期、於CSF中偵測到的p217+tau之量、腦部組織中之tau的PET測量等）。

【0094】 機器學習模組可係監督式及/或非監督式機器學習模組。機器學習模組可係機器學習分類器，用於將數據集識別為與兩個類別中之一者相關。機器學習模組可包括支持向量機、隨機森林、邏輯迴歸、梯度提升模組、或其集成(ensemble)模組。在一個實施例中，機器學習模組係集成模組，其包含下列中之至少一者：支持向量機、隨機森林、邏輯迴歸、及/或梯度提升模組。

【0095】 所屬技術領域中具有通常知識者將理解，本文所述之例示性電腦實施之實施例可以任何數目的方式實施，包括以分開的軟體模組、以硬體與軟體之組合等。例如，例示性方法可係一或多個程式中之實施例，程式係儲存在非暫時性儲存媒體中，並含有碼行（在編譯時，可由一或多個處理器核心或單獨處理器執行）。根據一個實施例之系統包含複數個處理器核心及在複數個處理器核心上執行之一組指令，以執行以上論述之例示性方法。處理器核心或單獨處理器可併入任何合適的電子裝置或可與任何合適的電子裝置通訊，例如在裝置內的機上(on board)處理配置或裝置外部的處理配置，例如可與裝置之至少一部分通訊的行動計算裝置、智慧型手機、計算平板(computing tablet)、計算裝置等。

實例

【0096】 下列實例是要進一步說明本發明之性質。應理解的是，下列實例不會對本發明造成限制，且本發明之範疇係由隨附申請專利範圍決定。

實例 1：用於偵測血漿中之 p217+tau 之高敏感度檢定

【0097】 本申請案之改良檢定之一例示性實施例係提供於實例I。實例I之例示性實施例利用基於珠之酶聯免疫吸附檢定(ELISA)來偵測且/或定量樣本中之p217+tau肽的存在。具體而言，實例I利用單分子陣列(SiMoA)基於珠之數位ELISA系統，其可購自Quanterix Corp. (Boston, MA)。SiMoA檢定使用飛升(femtoliter)大小的反應腔室之陣列，以數位方式計數個別免疫複合物。如以下所進一步論述，製備檢定特異性試劑，並將其提供於SiMoA分析儀，以與樣本中之p217+tau肽反應並偵測p217+tau肽。檢定特異性試劑包括：具有2.7 μm 直徑之順磁捕捉珠、緩衝劑及試劑（來自Simoa Homebrew檢定入門套組，目錄號101351，可商購自Quanterix）、洗滌緩衝劑1（可商購自Quanterix）、磁珠（可以Simoa Homebrew輔助珠小瓶(918)目錄號101732商購自Quanterix）、捕捉抗體、及偵測抗體。實例I之捕捉抗體係pT3小鼠單株抗體(mAb)。實例I之偵測抗體係hT43 mAb。

【0098】 實例I中分析之各樣本係稀釋於樣本稀釋劑中。實例I中所用之例示性樣本稀釋劑包括50 mM Tris緩衝劑、100 mM NaCl、5 mM EDTA、2% (v/v)牛血清白蛋白、及0.5% (v/v) Triton X-100、嗜異性阻斷劑HBR-9（可以目錄號3KC564商購自Scantibodies Laboratory, Santee CA）。樣本稀釋劑具有7.4之pH。

【0099】 實例I之檢定係使用由New England Peptide客製的校正肽校正。校正肽係含有hT43及pT3表位（藉由PEG4連接子連接）之肽，並具有4357 g/mol之分子量。校正肽具有SEQ ID NO: 18之胺基酸序列。

試劑製備

【0100】 在第一步驟中，將順磁捕捉珠用0.3 mg/mL的捕捉抗體（其在實例I中係pT3 mAb）依照Quanterix手冊所提供之規程塗佈，以將捕捉抗體附接至珠。將經塗佈之捕捉珠於來自Simoa Homebrew檢定入門套組之珠稀釋緩衝劑中稀釋至100,000個珠/mL，並添加300,000個珠/mL輔助珠，以獲得400,000個珠/mL之珠總濃度。

【0101】 將偵測抗體（其在實例I中之係hT43 mAb）以60x依照Quanterix手冊所提供之規程生物素化，並於上述樣本稀釋劑中稀釋至濃度為0.9 µg/mL偵測抗體之偵測溶液。

【0102】 將鏈黴親和素β-D-半乳糖苷酶(streptavidin β-D-galactosidase, SBG)濃縮物於SBG稀釋劑（來自Simoa Homebrew檢定入門套組）中稀釋至200 pM。

【0103】 將校正肽於0.1%磷酸/水中回溶至5 mg/mL，等分至各為20 µL的單位，並冷凍。當準備使用時，將校正肽等分單位解凍並以1:1000稀釋（例如將1.5 µl稀釋至1498.5 µl），並將稀釋液用樣本稀釋劑以1:1000進一步稀釋，使得最終肽濃度係5000 pg/ml。實例I之檢定係以不同濃度的校正肽校正，以形成跨下列濃度的標準曲線：30、10、3.33、1.11、0.37、0.186、0.093、0.046、0.023、0.012、0.006、及0 pg/mL。

【0104】 將藉由實例I之檢定分析的血漿樣本以1:2稀釋於樣本稀釋劑中。

SiMoA 檢定

【0105】 產生客製SiMoA檢定，其包含三步驟規程。此三步驟規程包括下列步驟：使用於分析之樣本與附接pT3mAb之捕捉珠（如上所製備）與用於分析之樣本接觸35分鐘；接著將捕捉珠用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) Tween-20溶液（特別是為Simoa HD-1儀器設計之洗滌緩衝劑1（可商購自Quanterix））洗滌；然後將捕捉珠與偵測抗體培養5分鐘；接著將捕捉珠用洗滌緩衝劑1洗滌第二次；將捕捉珠與SBG培養5分鐘；將珠用基於PBS之溶液（特別是洗滌緩衝劑1）再次洗滌；及最後添加25 μL 的100 μM 試鹵靈(resorufin)- β -D-半乳糖苷(resorufin- β -D-galactopyranoside, RGP)，之後裝載至用於藉由SiMoA HD-1儀器成像及測量之測量盤中。各反應係在Simoa比色管中執行，且包含：25 μL 的珠溶液，其包含附接pT3 mAb之順磁珠及輔助珠（如上所製備）；172 μL 的稀釋樣本或校正物；100 μL 的偵測溶液，其包含偵測生物素化偵測抗體（如上所製備）；100 μL 的SBG溶液；及25 μL 的100 μM RGP。

【0106】 SiMoA分析儀利用高解析度螢光成像以偵測珠部分（其飛升大小的反應腔室之陣列對應於與至少一種酶相關聯之珠部分發螢光）及各反應腔室之螢光強度。SiMoA分析儀基於此等測量產生平均每個珠之酶數(average number of enzymes per bead, AEB)的輸出。

實例 2：存在於血漿中之檢定競爭性抗體的偵測

【0107】 在額外的上游樣本操作下，即使是在與實例1之檢定之試劑競爭的檢定競爭性抗體（諸如例如在對象內內源性生產的檢定競爭性抗體、或外源性投予至對象的檢定競爭性抗體）存在下，實例1之高敏感度可用於測量p217+tau之水平。本文在實例2中所述之方法可用作為藥效動力學檢定，以研究

治療性抗p217+tau抗體，諸如存在於血漿中之人源化pT3 mAb。例如，實例2之方法可用於測量用於治療tau蛋白病之活性劑對自人類對象取得之血漿樣本中存在的tau之周邊水平的影響，特別是抗p217+tau單株抗體（例如人源化pT3 mAb）。

【0108】 先將血漿樣本之等分試樣以1:3稀釋於0.1M NaOAc中，隨後在85°C下加熱7分鐘，接著在冰浴(4°C)中冷卻10分鐘。將經加熱且隨後冷卻之樣本流體在4°C下以14000xg離心10分鐘，並將上清液與沉澱物分離。將1M Tris鹼溶液以7%體積添加至上清液中，以使上清液達到中性pH，並獲得例示性經半變性樣本。同時，在製備經半變性樣本流體之期間之期間，將血漿樣本之第二等分試樣在冰浴中冷卻。此第二等分試樣在本文實例2中亦稱為未變性樣本流體。

【0109】 由SiMoA分析儀針對經半變性流體信號產生之輸出對應於存在於血漿樣本中之p217+tau之總量，而針對未變性流體產生之輸出對應於血漿樣本中之游離p217+tau。輸出係與來自校正肽之標準曲線相關，以分別獲得存在於血漿樣本中之p217+tau總量及游離p217+tau的濃度。自前者減去後者提供存在於血漿樣本中之游離p217+tau之量的定量測量。

【0110】 使用CSF及外源性添加之抗體，判定實例2中所用之精確加熱時間及溫度，其係作為足以不可逆地修飾樣本中之任何干擾抗體的加熱時間及溫度之組合，使得彼等不再於檢定中干擾p217+tau抗體的結合（雖然p217+tau信號本身不受到任何影響）。具體而言，使用CSF及外源性添加之抗體獲得的數據顯示，p217+tau信號耐85°C高溫至少10分鐘，但抗體在經過僅2分鐘的85°C高溫之後變性。因此，使用實例2之經半變性流體及未變性流體獲得的結果無法

提供捕捉抗體是否結合至p217+tau的直接量度，而是證實檢定競爭性抗體（其干擾p217+tau檢定偵測及定量p217+tau之量的能力）存在於血漿中。

實例 3：不適用於血漿之先前 p217+tau 檢定

【0111】 如上所論述，用於測量生物樣本中之p217+tau肽的檢定係先前揭示於Kolb '492專利中。然而，Kolb '492專利未針對定量存在於人類血清或血漿中之p217+tau肽之量提供任何實例。反而，Kolb '492專利指示，粗血清或血漿樣本有干擾上的困難，且無法以足夠的敏感度測量及定量，直到樣本經免疫沉澱，接著洗提液經熱變性。

【0112】 實例3使用一組人類血漿樣本，評估Kolb '492專利之實例1中所述之檢定，人類血漿樣本係獲自5位健康自願(healthy volunteer, HV)對照對象及5位已知患有阿茲海默症(AD)之對象。本實例中使用pT3 mAb作為捕捉抗體，並使用pT82 mAb作為偵測抗體。如由SiMoA分析儀所產生，根據實例3獲得的數據係以AEB為單位示於圖1a至圖1d中。各圖的左側顯示對應於AD對象之數據，且圖的右側顯示對應於HV之數據。針對各類別的對象，平均值係以較長水平線表示，其中數據集之±標準偏差(SD)係以平均值線上下方之較短的線顯示。

【0113】 將此等血漿樣本之各者以兩種不同稀釋率（1:4及1:16）根據Kolb '492專利稀釋。使用兩種血漿樣本稀釋液獲得的結果係分別提供於圖1a及圖1b中。圖1a中所示之數據展示，在1:4稀釋率下，40%的血漿樣本經測量低於Kolb '492專利之實例1中所述之檢定之LLOQ，而20%經測量等於LLOQ，且另外40%經測量顯著高於所有其他樣本。具體而言，實例3在1:4稀釋率下有6/10

個樣本經測量等於或低於LLOQ (AEB = 信號 = 0.035 = S/N > 2 且 CV < 20%)，其他4個樣本呈現明顯較高的信號 (較LLOQ高11至745x)。如圖1b中所示，在1:16稀釋率下，所有血漿樣本 (包括已在1:4稀釋率下經測量顯著較高的40%血漿樣本) 經測量低於Kolb '492專利之實例1中所述之檢定之LLOQ。更具體而言，實例3在1:16稀釋率下的所有樣本經測量皆低於LLOQ，其指示實例3在1:4稀釋率下之4/10位對象中的高信號 (如上所述) 實質上係非線性，因此可視為來自血漿基質的假影。圖1a及圖1b中所示之數據證實，使用Kolb '492專利之實例1中所述之檢定來偵測血漿中之p217+tau肽時，缺乏敏感度並缺乏稀釋線性，因此此檢定不適合用於分析存在於血漿中之p217+tau肽之量。

【0114】 根據以上實例2，使來自相同5位HV及5位AD對象之一組血漿樣本變性，以獲得10個不同的經半變性樣本流體。如實例2中所述獲得經半變性樣本流體之程序修飾干擾抗體，使得彼等不再干擾p217+抗體與樣本中之p217+tau肽的結合，而不降解藉由p217+抗體偵測的p217+tau信號。將經半變性樣本流體之各者以1:6稀釋，並使用Kolb '492專利之實例1中所述之檢定測量。結果係示於圖1c中。如圖1c中可見，獲得經半變性樣本流體之程序消除先前已在沒有任何變性步驟下在1:4稀釋率下經測量顯著高於LLOQ的40%樣本中之所有可定量信號 (示於圖1b中)。如實例2中所述獲得經半變性樣本流體之程序不會降解藉由p217+抗體偵測的p217+tau信號。因此，圖1c中所示之數據意味著，圖1a中所示之自血漿偵測到的信號可能受到來自p217+tau肽以外的其他組分之干擾及/或假影的污染。具體而言，圖1a中所示之4/10個血漿樣本中之高p217+tau信號係在變性之後消除，其指示此信號並非真實tau信號。圖1a及圖1c中所示之1:16粗血漿數據指示AD相對於HV的較高信號，其證實消除基質干擾

之步驟可顯示血漿中之生物標記相關的p217+tau信號。然而，不良的敏感度使Kolb '492專利之實例1中所述之檢定不適用於測量血漿樣本中之p217+tau。

【0115】 Kolb '492專利承認粗血清或血漿可能有敏感度及基質干擾障礙帶來的困擾，並描述可在與Kolb '492專利之實例1中所述之檢定組合下使用富集策略（使用免疫沉澱）以提供基於血液之病理性tau測量。下文證實，免疫沉澱與Kolb '492專利之實例1中所述之檢定的組合提供改善的敏感度及HV與AD對象的分離。

【0116】 使用pT3抗體，對一組來自相同5位HV及5位AD對象的一組血漿樣本針對其p217+tau信號進行免疫沉澱，之後根據Kolb '492專利之實例1中所述之檢定測量。將免疫沉澱樣本以1:4之比用樣本稀釋劑稀釋。來自具有1:4稀釋率的免疫沉澱樣本之結果係示於圖1d中。比較圖1d與圖1a（其以相同稀釋比測量，但未先用pT3抗體進行免疫沉澱）中所示之結果，免疫沉澱步驟改善了檢定之敏感度，使得來自AD對象之血漿樣本經測量皆在線性範圍內，並與HV樣本分離良好。圖1d顯示，自HV樣本獲得的血漿中存在的p217+tau肽之量稍微高於Kolb '492專利之實例1中所述之檢定之LLOQ，但未提供高於檢定之LLOQ的可靠可定量結果（例如LLOQ落在HV樣本之標準偏差內）。此等結果指示，血漿p217+tau信號之純化及濃縮可產生有用的血漿p217+tau檢定。然而，免疫沉澱係一種費力且不精確的程序，其係過度繁瑣，且可能進一步造成檢定不準確。本申請案之檢定及方法不需要分開的免疫沉澱步驟來濃縮其p217+tau信號，以獲得對偵測人類血漿樣本中之p217+tau肽而言具有充分敏感度的結果。

實例 4：先前檢定與本申請案之高敏感度檢定用於偵測 p217+tau 肽的比較

【0117】 本申請案之檢定及方法包括下列之分開步驟：使血漿樣本與捕捉抗體接觸，以使捕捉抗體與血漿中之p217+tau肽結合，以產生抗體-肽複合物；及在洗滌後使抗體-肽複合物與偵測抗體接觸，以使偵測抗體與抗體-肽複合物結合，其係例示於實例1中。第一步驟的使血漿樣本與捕捉抗體接觸及隨後在與偵測抗體接觸之前洗滌抗體-肽複合物，使p217+tau信號與血漿樣本中之干擾組分分離。具體而言，使樣本中之p217+tau肽與捕捉抗體結合，同時將樣本中之干擾組分洗掉，之後將偵測抗體添加至抗體-肽複合物中。包括此等分開步驟之檢定及方法在本文中亦稱為「3步驟」檢定。相比之下，Kolb '492專利之實例1中所述之檢定同時將其生物樣本與捕捉抗體及偵測抗體兩者組合，以在洗滌步驟之前允許兩種抗體與生物樣本結合。Kolb '492專利之實例1中所述之檢定在本文中亦稱為「2步驟」檢定。在此實例中，相較於「2步驟」檢定，「3步驟」檢定之第一步驟中的培養時間及樣本體積輸入亦增加，以允許最大程度地捕捉信號。如以下實例4中所進一步證實，已出乎意料地發現，本申請案之「3步驟」檢定相對於「2步驟」檢定在自血清測量p217+tau肽時，提供改善的敏感度（其未在自CSF測量時觀察到）。

【0118】 實例4比較本申請案之「3步驟」檢定與「2步驟」檢定自CSF及血清兩者測量p217+tau肽的情形。使用「2步驟」檢定及「3步驟」檢定兩者，測量具有不同認知狀態的複數位對象之一組CSF樣本。具體而言，使用「2步驟」檢定及「3步驟」檢定兩者，測量來自臨床研究中21位輕度至中度失智症對象之96個CSF樣本。針對各樣本，在圖2a中將使用「2步驟」檢定獲得的結果（以偵測到的p217+tau之pg/mL計）（顯示於X軸）映射至使用「3步驟」檢定

獲得的結果（顯示於Y軸）。此外，使用「2步驟」檢定及「3步驟」檢定兩者，測量與實例3相同的5位HV及5位AD對象之一組血清樣本。所獲得之結果（以偵測到的p217+tau之pg/mL計）係以長條圖示於圖2b中，其中各樣本的左側長條對應於使用「2步驟」檢定獲得的結果，且右側長條對應於使用「3步驟」檢定獲得的結果。

【0119】 如圖2a中可見，「2步驟」檢定及「3步驟」檢定展示在用於測量CSF樣本中之p217+tau肽時的高度相關性($r^2 = 0.94$)。然而，圖2b顯示，當該等檢定係用於測量血清樣本中之p217+tau肽時，並未觀察到此相關性。此外，雖然圖1a顯示當使用「2步驟」檢定自血漿測量p217+tau肽時，提供遠高於其餘樣本之測量的樣本子集，但圖2b顯示當使用「3步驟」檢定自血清測量p217+tau肽時，此等異常高的信號大幅降低。圖2b之數據顯示，使用「2步驟」檢定觀察到的異常高的p217+tau信號，並未類似地在使用「3步驟」檢定測量相同樣本時觀察到。因此，圖2b之數據證實，使用「2步驟」檢定觀察到的異常高的p217+tau信號與檢定之干擾及/或假影相關，且不能準確測量存在於樣本中之p217+tau肽。此數據顯示，CSF中有可忽略的基質干擾，但在血液產物中有顯著的正干擾。

實例 5：使用用於偵測 217+tau 肽之本申請案之高敏感度檢定的偵測抗體的比較

【0120】 實例5使用兩種不同的偵測抗體，以如實例1中所述之例示性檢定，評估在三種類型的生物流體（即CSF、血清、及血漿）之間的一致性及其相對斷裂。具體而言，實例5比較hT43與pT82用於實例I之檢定（除了如實例5中

所指明之不同偵測抗體) 中作為偵測抗體之間的差異。針對兩個例示性實施例，捕捉抗體係pT3。因此，實例5中所比較的兩個例示性檢定係pT3xhT43及pT3xpT82。

【0121】 使用實例1之檢定及類似於實例1之改良檢定（惟偵測抗體被修改為hT43 mAb），測量來自臨床研究中18位AD（特別是患有輕度至中度失智症者）對象之CSF、血清、及血漿。針對CSF、血清、及血漿獲得的結果（以偵測到的p217+tau之pg/mL計）係分別示於圖3a、圖3b、及圖3c中。針對各類型的生物流體，在圖3a、圖3b、及圖3c中分別將針對CSF、血清、及血漿使用pT3xhT43檢定獲得的結果（以偵測到的p217+tau之pg/mL計）（顯示於X軸）映射至使用pT3xpT82檢定獲得的結果（顯示於Y軸）。圖3a至圖3c之各者中顯示線性迴歸線、連同線性迴歸線之 R^2 值。如圖3a至圖3c中所示，在所有三種樣本類型中，使用hT43偵測抗體與使用pT82抗體獲得的結果高度一致（ $R^2 = 0.82$ 至 0.95 ）。圖3a至圖3c中所示之線性迴歸線的斜率分別係2.83、2.41、及2.05。此外，pT3xpT82檢定跨CSF、血清、及血漿獲得的結果之水平較pT3xhT43檢定高約2.5x。如上所論述，pT3辨識在人類tau蛋白之胺基酸210至220處的表位。偵測抗體hT43辨識人類tau蛋白之胺基酸7至20，且偵測抗體pT82辨識tau蛋白之胺基酸116至127。因此，相較於hT43所辨識者，pT82辨識的表位與pT3較接近，其允許pT82除長p217+肽片段之外亦辨識短p217+肽片段（相較於hT43）。據信，由於tau已知在CSF中為高度斷裂，且相較於hT43，pT82能夠偵測較短且因此更多的p217+肽片段，因此pT3xpT82檢定相較於pT3xhT43檢定報告更高的濃度。有趣的是，pT3xpT82檢定亦在血清及血漿中觀察到類似的較高水平，其指示血液組分（例如血清及血漿）中的tau之粗斷裂模式(crude

fragmentation pattern) (在胺基酸20與116之間) 可與CSF中的類似，且在血液產物中的hT43與pT82表位之間沒有更大的斷裂。由於pT3xhT43及pT3xpT82檢定顯示跨CSF、血清、及血漿為高度一致，其意味著p217+tau斷裂水平反映CSF中的斷裂，因此實例5中所評估之兩種檢定被認為是可互換的。然而，相對於pT3xhT43檢定，pT3xpT82檢定提供更大的敏感度。

實例 6：用於偵測 p217+tau 肽之檢定中之不同樣本稀釋劑的比較

【0122】 實例6評估用於實例I之檢定中的不同樣本稀釋劑（除了如實例6中所指明之不同樣本稀釋劑），以判定何種稀釋劑會減少藉由檢定獲得之p217+tau信號中的珠叢聚及/或假影。緩衝劑類型（PBS對Tris）、NaCl濃度、及嗜異性阻斷劑（例如阻斷人類抗小鼠交互作用）的影響係以對假影血清p217+tau信號及對ELISA方法結束時偵測到的珠數目的影響來測量。實例6中所評估之不同樣本稀釋劑係示於下表1中。

表 1.

樣本稀釋劑	組成
1	來自 Simoa Homebrew 檢定入門套組之樣本稀釋劑
2	50 mM 磷酸鹽緩衝劑、50 mM NaCl、及 0.5% (v/v) Triton X-100
3	50 mM 磷酸鹽緩衝劑、100 mM NaCl、及 0.5% (v/v) Triton X-100
4	50 mM Tris 緩衝劑、50 mM NaCl、及 0.5% (v/v) Triton X-100
5	50 mM Tris 緩衝劑、100 mM NaCl、及 0.5% (v/v) Triton X-100
6	50 mM 磷酸鹽緩衝劑、50 mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100、及 HBR-9
7	50 mM 磷酸鹽緩衝劑、100 mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100、及 HBR-9
8	50 mM Tris 緩衝劑、50 mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100、及 HBR-9
9	50 mM Tris 緩衝劑、100 mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100、及 HBR-9

【0123】 雖然在表1中未指明，但各樣本稀釋亦包括5 mM EDTA及2% (v/v)牛血清白蛋白。

【0124】 使用類似於實例1之經修改檢定，用本文在實例6中所述之不同樣本稀釋劑來分析自具有高tau水平之人類對象獲得的三個匯集血清樣本及1pg/mL校正肽溶液（作為陰性對照組）。使用SiMoA分析儀以判定裝載至SiMoA盤上之珠的數目、及樣本及稀釋劑之各組合的AEB。圖4a顯示在9個不同樣本稀釋劑之各者中三個血清樣本及校正肽之裝載至SiMoA盤上之珠的數目。圖4b顯示在9個不同樣本稀釋劑之各者中三個血清樣本及校正肽之由SiMoA分析儀偵測之螢光信號，其以AEB為單位。圖4a及圖4b提供以長條圖表示的在不同樣本稀釋劑中測量之各樣本之數據，其係以與表1中所列相同的順序顯示。

【0125】 如圖4a中可見，樣本稀釋劑1（其係來自Simoa Homebrew檢定入門套組之樣本稀釋劑）在所有三個血清樣本中相較於在校正肽溶液中提供顯著較低的珠計數（1688至2921對5378）。樣本稀釋劑2至9改善在血清中的珠計數，並實質上減少在使用Simoa Homebrew稀釋劑（樣本稀釋劑1）測量的樣本中之兩者中所見的假影信號。據信，當檢定係用於分析血清樣本時，在血清中觀察到的此減少珠計數係由在檢定中用作為捕捉抗體之基材的順磁珠之叢聚造成。順磁珠之叢聚係非所欲的，因為其負面影響檢定之檢測血清中p217+tau的準確度及精確度。圖4a中所示之數據展示，樣本稀釋劑2至9（其等皆包括清潔劑Triton X-100）提供增加的珠計數，且因此減少會以其他方式負面干擾檢定之準確度及精確度的珠叢聚。此外，圖4a顯示基於Tris緩衝劑之樣本稀釋劑提

供較基於磷酸鹽之緩衝劑高的珠計數，其證實基於Tris之緩衝劑可用於減少由珠叢聚造成之對檢定準確度及精確度的干擾。如圖4b中可見，針對校正肽溶液所有樣本稀釋劑皆提供類似水平的螢光信號。然而，樣本稀釋劑1亦導致偵測到顯著的螢光信號，這是其他樣品稀釋劑未觀察到的（雖然樣本稀釋劑2、3、及5亦導致偵測到一些螢光信號）。使用樣本稀釋劑1觀察到的這些螢光信號增加據信與檢定之干擾及/或假影相關，其類似於圖2b中針對「2步驟」檢定所證實的，且不能準確測量存在於血清樣本中之p217+tau肽。圖4b亦顯示，添加HBR-9（其係經設計以減少檢定試劑之抗小鼠IgG橋接的嗜異性阻斷劑）進一步減少檢定中之干擾及/或假影。具體而言，如在圖4b中可見，樣本稀釋劑6至9顯示相較於樣本稀釋劑2至5與血清樣本中之一者顯示出較少的螢光信號，其指示添加HBR-9對檢定提供進一步的干擾及/或假影減少。圖4a及圖4b中之數據顯示，在實例4中評估之樣本稀釋劑之中，樣本稀釋劑9（其與實例1中所述之樣本稀釋劑相同）提供最小的珠叢聚及假影信號兩者。鑑於以上論述的數據，當使用Tris緩衝劑、較低NaCl濃度、及嗜異性阻斷劑時觀察到特定改善。

實例 7：血清及血漿中之 p217+tau 肽的偵測比較

【0126】 實例7使用實例1中所述之例示性檢定來評估血清及血漿中之p217+tau肽的偵測。使用實例1之例示性檢定來測量來自10位HV（在本文中亦稱為健康自願者或健康對照組）及與實例5相同之16位AD對象的一組血清樣本，且結果係示於圖5a中。來自HV對象之樣本係獲自採血服務(blood collection service)且推定其認知正常。使用實例1之例示性檢定來測量來自12位HV之子集及來自圖5a之對象組之18位AD對象的一組血漿樣本，且結果係示於圖5b中。

在圖5a及圖5b中，各圖的左側顯示對應於HV對象之數據，且圖的右側顯示對應於AD對象之數據。針對各類別的對象，平均值係以較長水平線表示，其中數據集之±標準偏差(SD)係以平均值線上下方之較短的線顯示。圖5a及圖5b中亦顯示一條虛線，以分別顯示針對血清及血漿之各者的檢定之LLOQ。根據實例7獲得之數據係以pg/mL示於圖5a至圖5b中。此外，針對血漿及血清樣本兩者皆記述於圖5a及圖5b中之各對象（即10位HV及16位AD對象），在圖5c及圖5d中將使用獲自對象之血漿獲得的結果（以偵測到的p217+tau之pg/mL計）映射至使用來自相同對象之血清獲得的結果。如圖5a及圖5b中可見，自AD對象獲得之血清及血漿樣本兩者的測量值皆顯著高於自HV對象獲得之血清及血漿樣本。此數據意味著血清及血漿兩者皆可用於診斷目的。令人驚訝的是，自血漿獲得之測量經記述較自血清獲得之測量在濃度上高約2至3x（特別是2.3x），如藉由對針對所有對象判定的自血漿測量之p217+tau與自血清測量之p217+tau的比率進行平均所判定。然而，如圖5d中所示，數據的線性迴歸顯示1.9之斜率，其指示自血漿獲得之測量較自血清獲得之測量高1.9x。由於p217+tau分析物在血清中之可偵測水平低，許多自HV對象獲得之血清樣本經測量低於檢定之LLOQ。然而，由於p217+tau在血漿中之偵測值較高，所有自HV及AD患者獲得之血漿樣本經測量係等於或高於檢定之LLOQ。因此，實例1中所述之例示性檢定可用於偵測及定量HV及AD對象兩者之血漿中p217+tau肽的量。此外，如圖5b中可見，自HV對象偵測到的p217+tau肽之範圍不實質上與自AD對象偵測到的p217+tau肽之範圍重疊。自HV患者獲得之所有血清樣本經測量低於檢定之LLOQ（示於圖5a中），但大部分（12個中之11個）來自相同HV患者之血漿樣本經測量在線性範圍內高於檢定之LLOQ（示於圖5b中）。血漿及血清

p217+tau濃度測量相關性良好($r^2 = 0.82$)，然而血漿測量平均較血清測量高約1.9x，如圖5c中所示。因此，本申請案之檢定令人驚訝地提供定量數據，其可用於將HV對象與AD對象分開。具體而言，當於血漿中偵測到的p217+tau肽之量高於預設閾值（例如約0.1 pg/mL，其係基於圖5b中所示之數據）時，可判定對象患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險，該tau蛋白病特別是阿茲海默症。

實例 8：用於偵測血漿中之 p217+tau 之檢定的線性範圍

線性範圍與校正材料

【0127】 生產實例1中所述之校正肽。校正肽含有pT3及hT43之核心表位，其由PEG4連接子隔開，且校正肽係用於產生使來自SiMoA分析儀之AEB輸出與校正肽濃度相關的標準曲線。藉由如實例1中所指明之校正肽之不同稀釋液的5次獨立運行所產生之代表性標準曲線係示於圖6a中。使用4參數曲線擬合數據簡化法（4PL、 $1/y^2$ 加權）以產生校正曲線。實例1之例示性檢定的偵測下限(LLOD)係判定為計算校正水平，其產出等於零校正品之平均值+ 2.5標準偏差(SD)的AEB，包括10% CV。根據這些標準，代表性數據產出約0.002 pg/mL之LLOD。檢定之線性範圍（介於LLOQ與定量上限(ULOQ)之間）係定義為達到CV < 20%及預期回收率80至120%的最低至最高標準曲線點。根據這些標準，實例1之例示性檢定之線性範圍係0.012至30 pg/mL。5次獨立運行之校正曲線對齊良好（其展示具有5至30,000 fg/mL之寬動態範圍的一致信號），且展示在整個範圍內增加的信號，但在頂點時偶爾飽和，其意味著0.005至10

pg/mL作為實例1之例示性檢定的動態範圍。圖6a中所示之5次獨立運行中各稀釋液之平均值、SD、CV、及信號背景比(S/B)係提供於下表2中。

表 2.

pg/mL 校正物	平均 AEB	SD	CV (%)	S/B
0	0.015	0.003	20.4	1
0.006	0.026	0.003	13.1	1.7
0.012	0.037	0.003	7.5	2.5
0.023	0.059	0.004	6.8	3.9
0.046	0.104	0.005	4.7	6.9
0.093	0.188	0.017	9.0	12.5
0.186	0.344	0.030	8.7	22.8
0.37	0.662	0.044	6.7	43.9
1.11	1.968	0.200	10.2	130.4
3.33	5.515	0.387	7.0	365.5
10	14.228	1.440	10.1	942.8
30	23.524	0.187	0.8	1558.7

LLOD = 背景 + 2.5sd = .015 + (2.5 × 0.003) = .0228 AEB，其計算至理論濃度為 0.002 pg/mL
LLOQ = 校正曲線上顯示 CV < 20% 且信號雜訊(S/N) > 2 的第一點 = 0.012 pg/mL

血漿稀釋線性

【0128】 為了評估稀釋線性並判定用於測試血清及血漿樣本之最低要求稀釋率(MRD)，將一組來自具有高tau水平之AD對象的3個匯集血清樣本及來自具有高水平之AD對象的1個匯集血漿樣本於樣本稀釋劑中以1:2至1:6稀釋率（即1:2、1:3、1:4、1:5、及1:6稀釋率）滴定，並根據實例1之檢定測量。接著再調整自各稀釋液偵測到的p217+tau之量，以提供存在於未稀釋血清或血漿樣本中之p217+tau之估計濃度，並將其與自血清或血漿樣本之1:3稀釋液判定的p217+tau之估計濃度進行比較。所獲得之數據係顯示為圖6b中各樣本之1:3稀釋

第59頁，共 84 頁(發明說明書)

液中p217+tau之估計濃度的%。針對3個血清樣本之各者獲得之結果於圖6b中係以圓形(●)符號、方形(■)符號、及三角形(▲)符號表示。針對血漿樣本獲得之結果於圖6b中係以倒三角形(▼)符號表示。如圖6b中可見，樣本稀釋液之各者係在所有顯示的血清及血漿樣本之其他稀釋液的20%內。此數據證實跨1:2至1:6稀釋率之範圍的稀釋線性係可接受的。由於血清及血漿樣本含有低量的p217+tau，1:2之稀釋率可係較佳的。

實例 9a：用於偵測血漿中之 p217+tau 之檢定的技術定性

精確度

【0129】 為了評估自血漿之p217+tau測量的重複間(inter-replicate)精確度，根據實例1之例示性檢定以四重複測量232個血漿樣本（包含HV及AD對象兩者）之群組。基於校正肽標準曲線，檢定之LLOQ係判定為10 fg/mL。在考量樣本之1:2稀釋率之後，將LLOQ調整至20 fg/mL。然而，基於將自各樣本偵測到的p217+tau之平均量（以fg/mL計）映射至跨各樣本之各組四重複測量的CV %，數據指示不精確度在低於約40 fg/ml開始增加（圖7a）。圖7a之數據顯示，93%的樣本(216/232)經測量高於檢定之LLOQ（在此實例中係CV<20%時之濃度= 40 fg/ml，並以虛線顯示）。此外，除4個樣本外，所有樣本經測量均在限研究使用(Research Use Only, RUO)檢定的20% CV之可接受限度內。跨所有232個血漿樣本的平均測試內精確度係7.1% CV，且跨高於LLOQ之樣本的平均測試內精確度係6.7% CV。

【0130】 為了評估實例1之檢定的測試間精確度，製備含有低、中、及高濃度的校正肽於樣本稀釋劑中之一小組3個品質控制(QC)樣本、連同來自具

有高tau水平之AD對象的匯集血漿樣本及來自具有高tau水平之AD對象的匯集血清樣本。接著根據實例1之例示性檢定測量此等樣本進行5次獨立運行。自此等樣本偵測到的p217+tau之經稀釋校正量係示於圖7b中。針對各樣本，平均值係以較長水平線表示，其中數據集之±標準偏差(SD)係以平均值線上下方之較短的線顯示。此等5個樣本之測試間精確度係判定為5至15% CV。

實驗室之間的可轉移性

【0131】 為了評估p217+tau檢定在測試地點之間的精確度，可使用同批試劑在兩個不同位置測試一組自HV及AD對象獲得之血漿樣本。若樣本之測量在兩個測試地點之間非常類似，則可確認例示性檢定可在實驗室之間轉移。

分析物穩定性

【0132】 內源性p217+tau表位在血漿中之穩定性可藉由將自AD對象獲得之血漿池等分而在各種溫度下評估，並使各等分試樣在4°C、22°C、或37°C下儲存1、2、或4小時。此外，可將等分試樣之子集冷凍-解凍（-80°C至22°C）1、2、3、或4次。若此等不同儲存條件之間未觀察到信號的顯著變化，則其將指示實例1之例示性檢定所辨識之tau物種（及特定表位）足夠穩定以允許進行標準儲存/測試程序。

實例 9b：用於偵測血漿中之 p217+tau 之檢定的技術定性

精確度

【0133】 此外，亦分析來自實例9a之227個血漿樣本（157位輕度至中度、70位認知正常對象）的檢定結果，以評估自血漿之p217+tau測量的重複間精確度，且檢定結果係示於圖7c中。偵測所有圖7c中所示之樣本（呈現信號> LLOD），且具有可接受的精確度（<25% CV，平均CV= 7.1%）。事實上，223/227個樣本(98.2%)呈現< 20% CV。為了更好地建立定量下限(LLOQ)，基於低於其則血漿測量更有可能呈現> 20% CV的點來設定37 fg/ml之截止值。如圖7c中所示，所有樣本之94.7%經測量高於此LLOQ。

實例 10：用於在相較於 CSF p217+tau 及 Tau PET 下偵測血漿中之 p217+tau 之檢定的臨床定性

【0134】 為了評估實例1之例示性檢定在AD診斷及分期上的實用性，獲得三個群組的血漿樣本以使用檢定進行p217+tau測量。分析此等測量與CSF p217+tau水平及/或TauPET SUVR之相關性，其係進一步解釋於以下群組3之論述中。

群組 1：AD 群組中之血漿 p217+tau 與 CSF p217+tau 的相關性

【0135】 群組1評估於血漿中偵測到的p217+tau肽與來自相同AD對象之匹配CSF中偵測到的p217+tau的相關性。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定，測量來自臨床研究中16位AD對象（其經臨床診斷患有輕度至中度失智症，其中臨床失智評分爲1+）之各者的腰椎液(LF) CSF樣本。根據上述實例1之例示性檢定，測量來自相同16位AD對象之血漿樣本。針對各對象，在圖8a及圖8b中將於對應CSF樣本中偵測到的p217+tau之量（以pg/mL計）（顯

示於X軸) 映射至於對應血漿樣本中偵測到的p217+tau之量 (顯示於Y軸), 圖8b以對數標度顯示圖8a之數據。線性迴歸線 ($R^2 = 0.43$, 斜率= 0.007, $p=0.006$) 連同線性迴歸線之 R^2 值係示於圖8a中。血漿p217+tau濃度係CSF p217+tau濃度之1.95 +/- 0.23% (平均值+/- SEM)。

群組 2：驗證群組中之血漿 p217+tau 與 CSF p217+tau 的相關性

【0136】 群組2評估於血漿中偵測到的p217+tau肽與臨床研究中經診斷患有輕度至中度失智症 (臨床失智評分為1+) 之較大對象群組(n=159) (除了來自另一臨床研究之無症狀對象群組(n=70)之外) 中於CSF中偵測到的p217+tau的相關性。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定, 測量來自包含229位對象的群組2之LF CSF樣本。根據實例1之例示性檢定, 測量來自相同229位對象之血漿樣本。針對各對象, 在圖9a中將於對應CSF樣本中偵測到的p217+tau之量 (以pg/mL計) (顯示於X軸) 映射至於對應血漿樣本中偵測到的p217+tau之量 (以fg/ml計) (顯示於Y軸)。線性迴歸 (未顯示) 具有 $R^2 = 0.35$, 斜率= 6, 且 $p<0.0001$ 。

【0137】 圖9a亦包括表示第一閾值(6.6 pg/mL)之垂直虛線, 高於第一閾值則CSF樣本指示對象患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險 (例如, 如由增加的CSF p217+tau水平及/或增加的TauPET SUVR所證實, 其係進一步解釋於以下群組3之論述中); 及表示第二閾值(104 fg/mL)之對應水平虛線, 高於第二閾值則血漿樣本指示對象患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。標示為「真+」的右上象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆高於第一及第二閾值的對象, 其指示CSF及血漿測量兩者一致識別對象為患有tau蛋白病或處於

發展tau蛋白病之風險。標示為「真-」的左下象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆低於第一及第二閾值的對象，其指示CSF及血漿測量兩者一致識別對象為未處於發展tau蛋白病之風險。標示為「偽+」的左上象限對應於CSF樣本經測量高於第一閾值、但血漿樣本經測量低於第二閾值的對象，其指示血漿測量識別該等對象為患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險，而CSF測量則不然。標示為「偽-」的右下象限對應於CSF樣本經測量低於第一閾值、但血漿樣本經測量高於第二閾值的對象，其指示CSF測量識別該等對象為患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險，而血漿測量則不然。圖9a之各象限中所識別之對象數目係提供下表3中。

表 3.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	133	74	10	12
對象之%	58	32	4	5

【0138】 使用來自圖9a及表3之數據產生圖9b中所示之接收者操作特徵(ROC)曲線，使血漿測量能夠區分具有符合下列條件之CSF測量的患者：高於第二閾值，其指示對象患有tau蛋白病或有患tau蛋白病之風險；或低於第二閾值，其指示對象為健康或未處於發展tau蛋白病之風險。實例1之血漿檢定顯示良好的特異性及敏感度，其中AUC = 0.943 (95% CI: 90.9, 97.8)。

【0139】 據Kolb '492專利報導，其中所述之「2步驟」檢定能夠將來自具有「活檢+ (biopsy+)」腦活檢樣本之對象的CFS樣本與來自具有「活檢- (biopsy-)」腦活檢樣本之對象的CFS樣本分開，其指示CSF中之p217+tau的測量

可指示患者之tau蛋白病（特別是AD）的臨床病理。鑑於本文中之圖9a及圖9b及表3中提供之數據，根據本申請案之檢定及方法的血漿測量亦指示患者之tau蛋白病的臨床病理（對應於CSF中之p217+tau增加），且可用作為用於偵測患者之tau蛋白病的預測性生物標記。

群組 3：CSF p217+tau 與 tau 之 PET 測量的相關性

【0140】 群組3評估於CSF中偵測到的p217+tau肽與自PET影像測量之腦組織中之¹⁸F-T807 (¹⁸F-AV-1451)示蹤劑滯留的相關性。¹⁸F-T807示蹤劑滯留之PET測量（Tau PET測量）對應於腦組織中之tau累積，其係領先指標，用於區分患有tau蛋白病或有患tau蛋白病之風險的對象與未處於發展tau蛋白病之風險的健康對象。

【0141】 群組3包括處於不同認知衰退狀態（認知未受損對照組、輕度認知損傷、AD失智症、及數種其他神經退化性病徵）的178位對象。Tau PET測量係自群組3中各對象之腦部之Braak分期I至IV感興趣區域(ROI)獲得。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定，測量自此等對象同時或並存收集之LF CSF樣本。針對各對象，在圖10a中將於CSF樣本中偵測到的p217+tau之量（以pg/mL計）（顯示於X軸）映射至於對應對象中之經F¹⁸標示T807示蹤劑之標準化攝取值比(SUVR)。群組3之對象展示出具有範圍的經F¹⁸標示T807示蹤劑之SUVR的tau PET測量，如圖10a之Y軸所示。線性迴歸（未顯示）具有R² = 0.722，且p<0.0001。

【0142】 群組3之對象亦可分成兩個不同子集：發現與腦組織中類澱粉蛋白β (Aβ)沉積之增加相關或不相關的對象，如藉由PET所測量。具有增加量

的A β -之對象在實例10中稱為A β +, 而不具有增加量的A β -之對象在下文中稱為A β -。圖10a以較深的陰影顯示A β +-對象, 而A β -對象大多數存在於圖之左下象限且係以較淺的陰影顯示。針對A β +-子集, 於CSF中之P217+tau測量與經F¹⁸標示T807示蹤劑之SUVR的線性迴歸(未顯示)具有 $R^2 = 0.740$, 且 $p < 0.0001$ 。針對A β +-子集, 於CSF中之P217+tau測量與經F¹⁸標示T807示蹤劑之SUVR的線性迴歸(未顯示)具有 $R^2 = 0.091$, 且 $p = 0.532$ 。使用來自圖10a之數據產生ROC曲線, 使CSF測量能夠區分具有符合下列條件之經F¹⁸標示T807示蹤劑之SUVR的患者: 高於閾值(例如1.25), 其指示對象患有tau蛋白病或有患tau蛋白病之風險; 或低於閾值, 其指示對象為健康或未處於發展tau蛋白病之風險。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定獲得的CSF測量在預測此高T807 SUVR方面顯示良好的特異性及敏感度, 其中 $AUC = 0.905$ (95% CI: 86, 94.9), 且亦識別出6.6 pg/mL為所欲閾值, CSF p217+tau測量高於閾值指示對象患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。此所欲閾值因而用於分析自群組2獲得之數據, 如上所論述, 以分析自血漿至TauPET之p217+tau測量之間的相關性。因此, 圖10a及圖10b中提供之數據當與自群組2獲得之數據組合檢視時, 進一步證實根據本申請案之檢定及方法的血漿測量指示患者之tau蛋白病的臨床病理(對應於腦組織中之tau累積增加), 且可用作為用於偵測患者之tau蛋白病的預測性生物標記。

實例 11：用於在相較於 CSF p217+tau 及 CSF p181tau 下偵測血漿中之 p217+tau 之檢定的臨床定性

【0143】 為了評估實例1之例示性檢定在AD診斷及分期上的實用性，獲得血漿樣本以使用檢定進行p217+tau測量。針對與CSF p217+tau水平及/或CSF p181tau水平的相關性，分析此等測量。CSF p181tau水平對應於自CSF偵測到的在tau蛋白之殘基181處經磷酸化之人類tau蛋白或tau片段之量。

驗證群組中之血漿 p217+tau 與 CSF p217+tau 的相關性

【0144】 使用與實例9b中所用者相同的群組，以評估於血漿中偵測到的p217+tau肽與於CSF中偵測到的p217+tau的相關性。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定，測量來自包含227位對象的此群組之LF CSF樣本。根據上述實例1之例示性檢定，測量來自相同227位對象之血漿樣本。針對各對象，在圖11a中將於對應CSF樣本中偵測到的p217+tau之量（以pg/mL計）（顯示於X軸）映射至於對應血漿樣本中偵測到的p217+tau之量（以fg/ml計）（顯示於Y軸）。線性迴歸（未顯示）具有 $R^2 = 0.35$ 。血漿p217+tau濃度係CSF p217+tau濃度之 $1.87 \pm 0.11\%$ （平均值 \pm SEM）。

【0145】 圖11b及圖11c顯示藉由患者之類澱粉蛋白狀態（例如A+或A-）分開的圖11a之數據。A+指示被視為類澱粉蛋白陽性的患者，其具有 ≤ 0.089 之CSF A β 42/40比。A-指示被視為類澱粉蛋白陰性的患者，其具有 > 0.089 之CSF A β 42/40比。應注意的是，圖11b或圖11c中不包括圖11a中之17位對象，此係因為無法取得此等患者之CSF類澱粉蛋白數據。圖11b顯示A+患者子集(n = 160)之數據，且圖11c顯示A-患者子集(n = 50)之數據。圖11b之線性迴歸（未顯示）具有 $R^2 = 0.27$ 。圖11c之線性迴歸（未顯示）具有 $R^2 = 0.01$ 。A+患者中之血漿p217+tau濃度係CSF p217+tau濃度之 $1.63 \pm 0.08\%$ （平均值 \pm SEM）。A-患者

中之血漿p217+tau濃度係CSF p217+tau濃度之2.73 +/- 0.39%（平均值+/- SEM）。如以上記述之數據所示，血漿與CSF p217+tau比在類澱粉蛋白陽性群組中略微但顯著較低（ $p < 0.0001$ ，使用非成對t檢定）。

CSF p217+tau 與 CSF p181tau 的相關性

【0146】 評估於CSF中偵測到的p217+tau肽與於CSF中偵測到的p181水平的相關性。來自輕度至中度失智症對象之CSF樣本($n=286$; 89% A+)係使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定及藉由Innotest p181tau檢定來測量，以分別判定自CSF樣本偵測到的p217+tau及p181之濃度。針對各對象，在圖12a中將於CSF樣本中偵測到的p181tau之量（以pg/mL計）（顯示於X軸）映射至於對應對象中之CSF樣本中偵測到的p217+tau之量（以pg/mL計）（顯示於Y軸）。CSF p181 tau水平增加的患者可被識別為T+，其指示患者患有tau蛋白病或有患tau蛋白病之風險。CSF p181水平低於一定閾值之患者可被識別為T-，其指示患者係健康的或未處於發展tau蛋白病之風險。針對此實例， ≥ 52 pg/ml之CSF p181tau濃度被識別為T+，而 < 52 pg/ml之CSF p181tau濃度被稱為T-。使用圖12a中所示之數據的線性迴歸來建立此閾值CSF p181tau濃度與CSF中之p217+tau濃度的相關性。基於此數據，52 pg/ml之CSF p181tau閾值係與11.4 pg/ml之CSF中之p217+tau相關。因此，可使用 ≥ 11.4 pg/ml之CSF p217+tau濃度來識別T+患者，同時可使用 < 11.4 pg/ml之CSF p217+tau濃度來識別T-患者。

【0147】 使用來自圖11a之數據產生ROC曲線（圖12b），使CSF p217+tau測量能夠區分T+與T-患者。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定獲得的CSF測量顯示用於預測患者會是T+或T-的高準確度，其中

AUC = 0.9469。ROC曲線之Youden指數分析判定用於區分T+與T-患者之血漿p217+tau的閾值為124.6 fg/ml。

【0148】 來自圖11a之數據亦顯示於圖12c中，其中垂直虛線表示第一閾值（如上所判定為11.4 pg/ml），高於第一閾值則CSF樣本指示其屬於T+患者，且對應水平虛線表示第二閾值（如上所判定為124.6 fg/ml），高於第二閾值則血漿樣本指示其屬於T-患者。標示為「真+」的右上象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆高於第一及第二閾值兩者的對象，其指示CSF及血漿測量兩者一致識別對象為患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險。標示為「真-」的左下象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆低於第一及第二閾值的對象，其指示CSF及血漿測量兩者一致識別對象為未處於發展tau蛋白病之風險。標示為「偽+」的左上象限對應於CSF樣本經測量高於第一閾值、但血漿樣本經測量低於第二閾值的對象，其指示血漿測量識別該等對象為患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險，而CSF測量則不然。標示為「偽-」的右下象限對應於CSF樣本經測量低於第一閾值、但血漿樣本經測量高於第二閾值的對象，其指示CSF測量識別該等對象為患有tau蛋白病或處於發展tau蛋白病之風險，而血漿測量則不然。圖12c顯示分別為10及2%的低偽+/-率。圖12c之各象限中所識別之對象數目係提供下表4中。

表 4.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	108	91	24	4
對象之%	48	40	10	2

【0149】 圖12e及圖12g顯示藉由認知正常對輕度至中度失智症患者分開的圖12c之數據。圖12e顯示患者之認知正常子集的數據，且圖12g顯示患者之輕度至中度失智症子集的數據。

【0150】 使用來自圖12e之數據產生ROC曲線（圖12d），使CSF p217+tau測量能夠區分患者之認知正常子集(n =70)中的T+與T-患者。認知正常子集之CSF測量顯示類似水平的準確度，其中AUC = 0.9045。使用ROC曲線之Youden指數分析，以判定用於區分T+與T-患者之血漿p217+tau的閾值。

【0151】 圖12e亦包括表示第一閾值（如上所判定為11.4 pg/ml）之垂直虛線，高於第一閾值則CSF樣本指示其屬於T+患者；及表示第二閾值（如藉由圖12d之ROC曲線所判定）之對應水平虛線，高於第二閾值則血漿樣本指示其屬於T-患者。標示為「真+」的右上象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆高於第一及第二閾值兩者的對象。標示為「真-」的左下象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆低於第一及第二閾值的對象。標示為「偽+」的左上象限對應於CSF樣本經測量高於第一閾值、但血漿樣本經測量低於第二閾值的對象。標示為「偽-」的右下象限對應於CSF樣本經測量低於第一閾值、但血漿樣本經測量高於第二閾值的對象。圖12e顯示分別為23及0%的低偽+/-率。圖12e之各象限中所識別之對象數目係提供下表5中。

表 5.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	5	49	16	0
對象之%	7	70	23	0

【0152】 使用來自圖12g之數據產生ROC曲線（圖12f），使CSF p217+tau測量能夠區分患者之輕度至中度失智症子集(n =157)中的T+與T-患者。輕度至中度失智症子集之CSF測量顯示類似水平的準確度，其中AUC = 0.9254。使用ROC曲線之Youden指數分析，以判定用於區分T+與T-患者之血漿 p217+tau的閾值。

【0153】 圖12g亦顯示表示第一閾值（如上所判定為11.4 pg/ml）之垂直虛線，高於第一閾值則CSF樣本指示其屬於T+患者；及表示第二閾值（如藉由圖12f之ROC曲線所判定）之對應水平虛線，高於第二閾值則血漿樣本指示其屬於T-患者。標示為「真+」的右上象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆高於第一及第二閾值兩者的對象。標示為「真-」的左下象限對應於CSF及血漿樣本兩者經測量皆低於第一及第二閾值的對象。標示為「偽+」的左上象限對應於CSF樣本經測量高於第一閾值、但血漿樣本經測量低於第二閾值的對象。標示為「偽-」的右下象限對應於CSF樣本經測量低於第一閾值、但血漿樣本經測量高於第二閾值的對象。圖12g顯示分別為9及4%的低偽+/-率。圖12g之各象限中所識別之對象數目係提供下表6中。

表 6.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	100	36	14	7
對象之%	64	23	9	4

【0154】 圖12e及圖12g中所示之數據顯示，根據本申請案之檢定及方法的血漿測量在認知正常及輕度至中度失智症子集之各者中提供類似的預測能力 (predictive power)。

實例 12：用於在相較於 CSF β 類澱粉蛋白下偵測血漿中之 p217+tau 之檢定的臨床定性

【0155】 為了評估實例1之例示性檢定在AD診斷及分期上的實用性，獲得血漿樣本以使用檢定進行p217+tau測量。分析此等測量與CSF β 類澱粉蛋白水平的相關性。

血漿 p217+tau 與 CSF β 類澱粉蛋白水平的相關性

【0156】 使用210位患者之群組，以評估於血漿中偵測到的p217+tau肽與CSF β 類澱粉蛋白水平的相關性。測量來自此群組之CSF樣本，以判定存在於樣本中之A β 42的量及A β 40的量。根據上述實例1之例示性檢定，測量來自相同227位對象之血漿樣本。偵測到的A β 42量與A β 40量之比係領先指標，用於區分患有類澱粉蛋白生成疾病或有患類澱粉蛋白生成疾病之風險的對象與未處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險的健康對象。針對各對象，在圖13a中將對應CSF樣本中之偵測到的A β 42量與A β 40量之比（A β 42/40比）（顯示於X軸）映射至於對應血漿樣本中偵測到的p217+tau之量（以fg/ml計）（顯示於Y軸）。

A β 42/40比降低的患者可被識別為A+，其指示患者患有類澱粉蛋白生成疾病或有患類澱粉蛋白生成疾病之風險。A β 42/40比增加的患者可被識別為A-，其指

示患者係健康的或未處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險。針對此實例， ≤ 0.089 之 $A\beta_{42/40}$ 比被識別為A+，而 > 0.089 之 $A\beta_{42/40}$ 比被稱為A-。

【0157】 使用來自圖13b之數據產生ROC曲線（圖13a），使血漿p217+tau測量能夠區分具有T+之患者與T-患者。血漿p217+tau顯示用於預測患者會是A+或A-的高準確度，其中AUC = 0.8964。ROC曲線之Youden指數分析判定用於區分A+與A-患者之血漿p217+tau的閾值為103.9 fg/ml。

【0158】 圖13b亦包括表示第一閾值（如上所判定為0.089）之垂直虛線， $A\beta_{42/40}$ 比低於第一閾值指示A+患者；及表示第二閾值（如上所判定為103.9 fg/ml）之對應水平虛線，血漿p217+tau水平低於第二閾值指示A-患者。左上象限標示為「真+」，其中 $A\beta_{42/40}$ 比低於第一閾值且血漿p217+tau水平高於第二閾值，其指示 $A\beta_{42/40}$ 比及血漿p217+tau測量兩者一致識別對象為患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險。標示為「真-」的右下象限對應於 $A\beta_{42/40}$ 比高於第一閾值、且血漿p217+tau水平低於第二閾值的對象，其指示 $A\beta_{42/40}$ 比及血漿p217+tau測量兩者一致識別對象為未處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險。標示為「偽+」的右上象限對應於 $A\beta_{42/40}$ 比及血漿p217+tau水平分別高於第一及第二閾值的對象，其指示血漿p217+tau水平識別該等對象為患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險，而 $A\beta_{42/40}$ 比則不然。標示為「偽-」的左下象限對應於 $A\beta_{42/40}$ 比低於第一閾值、且血漿p217+tau水平經測量低於第二閾值的對象，其指示 $A\beta_{42/40}$ 比識別該等對象為患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險，而血漿p217+tau水平則不然。圖13b顯示分別為1及18%的低偽+/-率。圖13b之各象限中所識別之對象數目係提供下表7中。

表 7.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	123	48	2	37
對象之%	58	23	1	18

【0159】 圖13d及圖13f顯示藉由認知正常對輕度至中度失智症患者分開的圖13b之數據。圖13d顯示患者之認知正常子集的數據，且圖13f顯示患者之輕度至中度失智症子集的數據。

【0160】 使用來自圖13d之數據產生ROC曲線（圖13c），使血漿p217+tau測量能夠區分患者之認知正常子集(n =70)中的具有A+之患者與A-患者。患者之認知正常子集的血漿p217+tau測量具有AUC = 0.6554之ROC曲線。使用ROC曲線之Youden指數分析，以判定用於區分A+與A-患者之血漿p217+tau的閾值。

【0161】 圖13d亦包括表示第一閾值（如上所判定為0.089）之垂直虛線，A β 42/40比低於第一閾值指示A+患者；及表示第二閾值（如藉由圖13c之ROC曲線所判定）之對應水平虛線，血漿p217+tau水平低於第二閾值指示A-患者。左上象限標示為「真+」，其中A β 42/40比低於第一閾值且血漿p217+tau水平高於第二閾值。標示為「真-」的右下象限對應於A β 42/40比高於第一閾值、且血漿p217+tau水平低於第二閾值的對象。標示為「偽+」的右上象限對應於A β 42/40比及血漿p217+tau水平分別高於第一及第二閾值的對象。標示為「偽-」的左下象限對應於A β 42/40比低於第一閾值、且血漿p217+tau水平經測量低

於第二閾值的對象。圖13d顯示分別為10及24%的偽+/-率。圖13d之各象限中所識別之對象數目係提供下表8中。

表 8.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	21	25	7	17
對象之%	30	36	10	24

【0162】 使用來自圖13f之數據產生ROC曲線（圖13e），使血漿p217+tau測量能夠區分患者之輕度至中度失智症子集(n = 140)中的具有A+之患者與A-患者。血漿p217+tau測量在患者之輕度至中度失智症子集中提供高準確度，其中AUC = 0.9832。使用ROC曲線之Youden指數分析，以判定用於區分A+與A-患者之血漿p217+tau的閾值。

【0163】 圖13f亦包括表示第一閾值（如上所判定為0.089）之垂直虛線，A β 42/40比低於第一閾值指示A+患者；及表示第二閾值（如藉由圖13e之ROC曲線所判定）之對應水平虛線，血漿p217+tau水平低於第二閾值指示A-患者。左上象限標示為「真+」，其中A β 42/40比低於第一閾值且血漿p217+tau水平高於第二閾值。標示為「真-」的右下象限對應於A β 42/40比高於第一閾值、且血漿p217+tau水平低於第二閾值的對象。標示為「偽+」的右上象限對應於A β 42/40比及血漿p217+tau水平分別高於第一及第二閾值的對象。標示為「偽-」的左下象限對應於A β 42/40比低於第一閾值、且血漿p217+tau水平經測量低於第二閾值的對象。圖13f顯示分別為0及6%的偽+/-率。圖13f之各象限中所識別之對象數目係提供下表9中。

表 9.

	真+	真-	偽+	偽-
對象數目	113	18	0	9
對象之%	81	13	0	6

【0164】 圖13d及圖13f中提供之數據顯示，根據本申請案之檢定及方法的血漿測量提供在患者之輕度至中度失智症子集中之預測準確度的改善。

實例 13：經生物化學純化之血漿 p217+tau 與 CSF p217+tau 的相關性

【0165】 測試額外36位患者之群組，以進一步評估於血漿中偵測到的 p217+tau 肽與於CSF中偵測到的p217+tau的相關性。使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定，測量此群組中之CSF樣本。以三種不同方式測量來自相同對象之血漿樣本。第一，根據實例1之例示性檢定測量粗血漿樣本。第二，將tau肽自血漿樣本化學萃取，並根據實例1之例示性檢定測量。第三，將血漿樣本根據實例2半變性，使得干擾蛋白質因熱變性。針對各對象，在圖14a中將於對應CSF樣本中偵測到的p217+tau之量（以pg/mL計）（顯示於X軸）映射至於對應粗血漿樣本中偵測到的p217+tau之量（以fg/ml計）（顯示於Y軸）。圖14a之線性迴歸（未顯示）具有 $R^2 = 0.6418$ 。在圖14b中將CSF樣本中 p217+tau之量（以pg/mL計）（顯示於X軸）映射至於對應經化學萃取血漿樣本中偵測到的p217+tau之量（以fg/ml計）（顯示於Y軸）。圖14b之線性迴歸（未顯示）具有 $R^2 = 0.6748$ 。在圖14c中將CSF樣本中p217+tau之量（以pg/mL計）

(顯示於X軸) 映射至於對應經半變性血漿樣本中偵測到的p217+tau之量(以fg/ml計)(顯示於Y軸)。圖14c之線性迴歸(未顯示)具有 $R^2 = 0.5484$ 。

實例 14：用外源性抗 tau 抗體治療之對象中總 p217+tau 的定量

【0166】 本申請案之檢定及方法可用於偵測自經歷抗tau抗體(特別是抗p217+tau抗體)治療之對象獲得之血漿樣本中的總p217+tau。然而,在經歷抗tau抗體治療之對象之血漿樣本中偵測p217+tau可能受到由血漿樣本中治療抗體之存在所造成之干擾及/或假影的影響。因此,用於產生實例2中所述之經半變性樣本流體之步驟可用於處理來自經歷抗tau抗體治療之對象之血漿樣本,以減少來自治療抗體之干擾,同時允許p217+tau信號留在經半變性樣本流體中。

【0167】 實例14修改實例1之例示性檢定,其中用於使樣本變性之步驟係與針對根據實例2獲得經半變性樣本流體所述者相同的方式進行。使用HV及AD對象之血漿樣本評估經修改之例示性檢定。根據實例10之例示性檢定加熱及測量此等血漿樣本,且結果(以偵測到的p217+tau之pg/mL計)係示於圖15a中。圖15a的左側顯示對應於HV對象之數據,且圖的右側顯示對應於AD對象之數據。針對各類別的對象,平均值係以較長水平線表示,其中數據集之標準偏差(SD)係以平均值線上下方之較短的線顯示。如圖15a中可見,AD對象之經半變性血漿樣本的測量值顯著高於自HV對象獲得者,其反映使用實例1檢定在粗血漿樣本中見到的結果。

【0168】 實例14之經修改例示性檢定係用於測量一小組來自抗p217+tau抗體療法之第1期臨床試驗的585個血漿樣本,以研究評估敏感度及精確度。代表性標準曲線係產生自經半變性樣本流體(自如實例1中所指明之校正肽之不

同稀釋液獲得)之8次獨立運行,且係示於圖15b中。用於如實例14中所述檢定經半變性樣本之線性範圍(在LLOQ與ULOQ之間)係定義為達到CV < 20%及預期回收率80至120%的最低至最高標準曲線點,然後針對樣本之1:6稀釋液進行校正。根據這些標準,實例10之經修改例示性檢定之線性範圍係約0.24至180 pg/mL。然而,為了用實際樣本評估實例14之經修改例示性檢定之精確度,將自各經半變性血漿樣本偵測到的p217+tau之平均量(以fg/mL計)映射至各樣本之CV % (圖15c)。圖15c之數據顯示CV範圍在0至141%,且平均值為14%。此外,圖15c中所示之樣本的82%具有CV < 20%,且樣本的66%係在線性範圍內。垂直虛線表示經半變性樣本中不精確度似乎增加的濃度,且因此係使用實例14之方法的約0.2 pg/ml之樣本定義LLOQ。

【0169】 鑑於此數據,進一步設想到,本申請案之檢定及方法可與血漿樣本之分析前操作組合,以測量自具有外源性投予抗tau抗體之對象獲得的血漿樣本中之p217+tau水平,以監測抗tau抗體療法對血漿中之p217+tau水平的藥理效應。

實例 15：偵測及/或預測 tau 蛋白病之電腦實施方法

【0170】 實例15描述一種例示性電腦實施方法,其用於分析tau蛋白病之生物標記的基於血液之測量,以改善對象之tau蛋白病的偵測及/或預測。具體而言,實例15中所用之生物標記測量中之一者係自血清樣本檢定之p217+tau水平。然而,設想實例15中所述之方法同樣適用於在血漿中測量之p217+tau水平,諸如使用實例1之例示性檢定獲得的測量。

【0171】 在實例15中，將一小組23種基於血液之生物標記於血漿及血清樣本中檢定，該等樣本來自在第III期臨床研究中199位患有輕度至中度AD之對象。23種基於血液之生物標記包括p217+tau、NFL、脂聯素、瘦素、及其他發炎及代謝標記。此外，針對此等患者之各者，亦使用Kolb '492專利之實例1中所述之pT3xhT43檢定，測量於CSF中之p217+tau水平。若自對象之CSF測量之p217+tau狀量超過21 pg/mL，則判定對象為「T陽性(T-positive)」，此濃度對應於使用Innotest p181-tau定義「T」狀態常用的截止值70 pg/mL。接著將對應於23個生物標記測量及於CSF中之p217+tau測量之數據、連同所有199位對象之患者人口統計數據（例如年齡及性別）分為兩個不同數據集：訓練集(n = 150)及保留(holdout)集(n = 49)。分析訓練集以選擇與CSF水平增加具有較高相關性之特徵—已被識別為「T陽性」之對象。所選特徵包括p217+tau、NFL、脂聯素、及瘦素之基於血液之測量。使用訓練集訓練複數個機器學習模組。具體而言，使用訓練集訓練支持向量機模組、隨機森林模組、邏輯迴歸模組、梯度提升模組。使用所有此等經訓練之機器學習模組的集成以產生結果。

【0172】 為了評估由集成機器學習模組產生之結果的敏感度及準確度，藉由集成機器學習模組分析來自保留集之數據，以產生保留集之各對象之數據是否對應於「T陽性」對象的判定。接著，將由集成機器學習模組產生之判定與保留集之對象的實際「T陽性」狀態進行比較，以評估集成機器學習模組之敏感度及準確度。使用如下表10中所示之生物標記的不同子集以此方式評估集成機器學習模組。

表 10.

數據子集	生物標記特徵
對照組	無生物標記，使用對象之年齡及性別分析
1	血清 p217+tau
2	血清 p217+tau 及 NFL
3	血清 p217+tau、NFL、及脂聯素
4	血清 p217+tau、NFL、脂聯素、及瘦素
5	NFL、脂聯素、及瘦素

【0173】 對照組數據子集包括來自保留集之數據並排除任何生物標記數據。具體而言，藉由集成機器學習模組使用各對象之非生物標記特徵（年齡及性別）來分析對照組數據子集。由集成機器學習模組針對對照組數據子集產生之分析係用於產生ROC曲線，使集成機器學習模組能夠在沒有任何生物標記的情況下區分保留集中之對象的「T陽性」狀態，其係以虛線顯示於圖16a至圖16e中。在沒有任何生物標記數據的情況下，集成機器學習模組分析對照組數據子集之ROC曲線的AUC係0.59。

【0174】 數據子集1至5之各者包括對照組數據子集及來自對應於上表10中所指明之生物標記的保留集之數據。由集成機器學習模組針對數據子集1至5之各者產生之分析係提供於下表5至表9中。在下表5至表9中，具有超過21 pg/mL之CSF中p217+tau測量的對象係列為「觀察+」，而低於該值者係列為「觀察-」。在表5至表9中，由集成機器學習模組識別為對應於「T陽性」狀態的對象係列為「預測+」，而未被識別為對應於「T陽性」狀態者係列為「預測-」。

【0175】 使用自血清之p217+tau測量作為特徵之數據子集1的分析結果係提供於表11中。來自表11之數據係用於產生ROC曲線，使集成機器學習模組能

夠用自血清之p217+tau測量區分保留集中之對象的「T陽性」狀態，其係以實線顯示於圖16a中。ROC曲線的AUC係0.87。

表 11.

	預測+	預測-
觀察+	9	9
觀察-	0	31

【0176】 具有自血清之p217+tau測量及NFL之數據作為特徵之數據子集2的分析結果係提供於表12中。來自表12之數據係用於產生ROC曲線，使集成機器學習模組能夠用自血清之p217+tau測量及NFL之數據區分保留集中之對象的「T陽性」狀態，其係以實線顯示於圖16b中。ROC曲線的AUC係0.89。

表 12.

	預測+	預測-
觀察+	14	4
觀察-	1	30

【0177】 具有自血清之p217+tau測量及NFL及脂聯素之數據作為特徵之數據子集3的分析結果係提供於表13中。來自表13之數據係用於產生ROC曲線，使集成機器學習模組能夠用自血清之p217+tau測量及NFL及脂聯素之數據區分保留集中之對象的「T陽性」狀態，其係以實線顯示於圖16c中。ROC曲線的AUC係0.92。

表 13.

	預測+	預測-
觀察+	11	7
觀察-	0	31

【0178】 具有自血清之p217+tau測量及NFL、脂聯素、及瘦素之數據作為特徵之數據子集4的分析結果係提供於表14中。來自表14之數據係用於產生ROC曲線，使集成機器學習模組能夠用自血清之p217+tau測量及NFL、脂聯素、及瘦素之數據區分保留集中之對象的「T陽性」狀態，其係以實線顯示於圖16d中。ROC曲線的AUC係0.96。

表 14.

	預測+	預測-
觀察+	11	7
觀察-	1	30

【0179】 具有NFL、脂聯素、及瘦素之數據作為特徵之數據子集5的分析結果係提供於表15中。來自表15之數據係用於產生ROC曲線，使集成機器學習模組能夠用NFL、脂聯素、及瘦素之數據而不是自血清之p217+tau測量區分保留集中之對象的「T陽性」狀態，其係以實線顯示於圖16e中。ROC曲線的AUC係0.78。

表 15.

	預測+	預測-
--	-----	-----

觀察+	8	10
觀察-	4	27

【0180】 實例15中所用之生物標記特徵集係由血清p217+tau、NFL、脂聯素、及瘦素所組成，其各者與CSF p127+ Tau水平分別具有0.47、0.37、0.16、-0.23之斯皮爾曼相關性(Spearman correlation)。使用血清p217+tau、年齡、及性別作為特徵之機器學習分析導致性能改善，其具有0.87之AUC（相較於對照組數據子集之0.59）。藉由依序添加NFL、脂聯素、及瘦素作為特徵來增加機械學習分析之複雜性，其漸進地改善性能，導致分別為0.89、0.92、及0.96之AUC。當機器學習分析包括所有4種生物標記（自血清之p217+tau測量及NFL、脂聯素、及瘦素之數據）作為特徵時，準確度為0.84，其顯著高於無資訊率($p < 0.005$)。移除自血清之p217+tau測量作為特徵將AUC降低至0.78，且因此意味著p217+tau測量會是預測「T陽性」狀態的重要生物標記。

【0181】 使用所有4種生物標記時，準確度為0.84，其顯著高於無資訊率($p < 0.005$)。自完整模型省略血清Tau將AUC降低至0.78。

【0182】 總而言之，可使用基於血液之生物標記來識別Tau陽性對象。血清p217+Tau係用於預測輕度至中度AD對象之tau蛋白病或tau蛋白病之腦部病理的最佳單一分析物（例如於CSF中偵測到的p217+tau之量）。

【0183】 本文所述及所主張之發明並不限於本文所揭示之具體實施例之範疇，因為此等實施例係意欲作為本發明之數個態樣的說明。任何等效實施例係意欲在本發明之範疇內。實際上，根據先前描述，除了本文所示及所述者之外，本發明之各種修改對於所屬技術領域中具有通常知識者而言將變得顯而易

見。此類修改亦意欲落入隨附申請專利範圍之範疇內。本文所引用之所有公開案之全文係以引用方式併入本文中。

【符號說明】 無

序列表

<110> 比利時商健生藥品公司(Janssen Pharmaceutica NV)

<120> 用於偵測 tau 蛋白病或類澱粉蛋白生成疾病的基於血液之檢定

<130> JAB7064

<140> 110125805

<141> 2021-07-14

<150> 63/200,399

<151> 2021-03-04

<150> 62/705,759

<151> 2020-07-14

<160> 28

<170> PatentIn 第 3.5 版

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> tau protein 2N4R

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> PT82 mAb 之 CDR-H1 序列

<400> 2
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
 1 5 10

<210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> PT82 mAb 之 CDR-H2 序列

<400> 3
 Gln Ile Arg Leu Gln Ser Asp Asn Tyr Ala Thr Arg Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成肽

<220>
<223> PT82 mAb 之 CDR-H3 序列

<400> 4
Gly Ile Thr Tyr
1

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成肽

<220>
<223> PT82 mAb 之 CDR-L1 序列

<400> 5
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成肽

<220>
<223> PT82 mAb 之 CDR-L2 序列

<400> 6
Ser Ala Ser Ile Arg Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成肽
peptide

<220>
<223> PT82 mAb 之 CDR-L3 序列

<400> 7

Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> PT82 mAb 之 VH 序列

<400> 8

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30Trp Met Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ala Gln Ile Arg Leu Gln Ser Asp Asn Tyr Ala Thr Arg Tyr Ala Glu
50 55 60Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Thr Ser
65 70 75 80Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95Tyr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110Val Ser Ala
115

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> PT82 mAb 之 VL 序列

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ile Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Tyr Met Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成肽

<220>

<223> HT43 mAb 之 HCDR1

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成肽

<220>

<223> HT43 mAb 之 HCDR2

<400> 11

Thr Ile Asn Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

第 6 頁，共 14 頁(序列表)

Gly

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> HT43 mAb 之 HCDR3

<400> 12
 Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> HT43 mAb 之 LCDR1

<400> 13
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Phe Glu
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> HT43 mAb 之 LCDR2

<400> 14
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成肽

<220>

<223> HT43 mAb 之 LCDR3

<400> 15

Phe Gln Gly Ser Leu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> HT43 mAb 之重鏈可變區

<400> 16

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Thr Ile Asn Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Val Ser Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> HT43 mAb 之輕鏈可變區

<400> 17

Asp Val Leu Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> 校正肽 pT3xhT43

<220>

<221> 位點

<222> (20)..(21)

<223> dPEG4 連接子

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> 磷酸化蘇胺酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> 磷酸化蘇胺酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (40)..(40)

<223> C端醯胺

<400> 18

Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly
 1 5 10 15

Leu Gly Asp Arg Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 20 25 30

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val
 35 40

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> PT3 小鼠 mAb VH

<400> 19

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成多肽

<220>
 <223> PT3 小鼠 mAb VL

<400> 20
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成多肽

<220>
 <223> PT3 人源化 mAb VH

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 第 11 頁，共 14 頁(序列表)

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成多肽

<220>

<223> PT3 人源化 mAb VL

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
 第 12 頁，共 14 頁(序列表)

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> PT3 小鼠 mAb HCDR1，Kabat 編號

<400> 23
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> PT3 小鼠 mAb HCDR2，Kabat 編號

<400> 24
 Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列說明：合成肽

<220>
 <223> PT3 小鼠 mAb HCDR3，Kabat 編號

<400> 25
 Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成肽

<220>

<223> PT3 小鼠 mAb LCDR1，Kabat 編號

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成肽

<220>

<223> PT3 小鼠 mAb LCDR2，Kabat 編號

<400> 27

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列說明：合成肽

<220>

<223> PT3 小鼠 mAb LCDR3，Kabat 編號

<400> 28

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種偵測對象中之p217+tau肽的檢定方法，該方法包含：

自該對象獲得血漿樣本；

使該血漿樣本與針對 p217+tau 表位之捕捉抗體接觸，以使該捕捉抗體與該血漿樣本中之 p217+tau 肽結合，以形成抗體-肽複合物；

洗滌該等抗體-肽複合物；

使該等抗體-肽複合物與偵測抗體接觸，以使該偵測抗體與該等抗體-肽複合物結合；及

偵測該偵測抗體，以判定該血漿樣本中之該等 p217+tau 肽之量。

【請求項2】 如請求項1所述之方法，其中該捕捉抗體係固定在固相上。

【請求項3】 如請求項2所述之方法，其中該固相係磁珠。

【請求項4】 如請求項1所述之方法，其中該捕捉抗體結合至含有人類tau 蛋白之胺基酸210至220的表位。

【請求項5】 如請求項1所述之方法，其中該偵測抗體結合至包含人類tau 蛋白之胺基酸7至20或116至127的表位。

【請求項6】 如請求項4所述之方法，其中該捕捉抗體係pT3。

【請求項7】 如請求項5所述之方法，其中該偵測抗體係pT82。

【請求項8】 如請求項3所述之方法，其中該血漿樣本在與該捕捉抗體接觸之前係用樣本稀釋劑稀釋，該樣本稀釋劑包含非離子性界面活性劑及參(羥甲基)胺基甲烷中之至少一者。

【請求項9】 一種偵測對象之tau蛋白病的方法，該方法包含：

自該對象獲得血漿樣本；

使用檢定偵測該血漿樣本中之 p217+tau 肽之量，其中該檢定使用針對 p217+tau 表位之捕捉抗體以使該捕捉抗體與該血漿樣本中之 p217+tau 肽結合，以形成抗體-肽複合物，並使用偵測抗體以使該偵測抗體與該等抗體-肽複合物結合；及

當該等 p217+tau 肽之該量高於預設閾值時，判定該對象患有 tau 蛋白病或處於發展 tau 蛋白病之風險，其中該預設閾值高於該檢定之定量下限(Lower Limit of Quantification, LLOQ)。

【請求項10】如請求項9所述之方法，其中在測量存在之該等p217+tau肽之該量前，該檢定不藉由免疫沉澱濃縮來自該血漿樣本之該等p217+tau肽。

【請求項11】如請求項9所述之方法，其中該血漿樣本係粗血漿(crude plasma)。

【請求項12】如請求項9所述之方法，其中該LLOQ對應於該檢定之15至25%變異係數(coefficient of variation, CV)。

【請求項13】如請求項12所述之方法，其中該LLOQ對應於該檢定之20% CV。

【請求項14】如請求項9所述之方法，其中該預設閾值係該LLOQ之至少3倍。

【請求項15】如請求項9所述之方法，其中該預設閾值係該檢定之偵測下限之至少10倍。

【請求項16】如請求項9所述之方法，其中該tau蛋白病係選自由下列所組成之群組：家族性阿茲海默症、偶發性阿茲海默症、連鎖於染色體17之額顳葉失智症伴隨巴金森氏症(frontotemporal dementia with parkinsonism linked to

chromosome 17, FTDP-17)、進行性上眼神經核麻痺症、皮質基底核退化症、匹克症(Pick's disease)、進行性皮質下膠質增生(progressive subcortical gliosis)、僅纏結失智症(tangle only dementia)、彌漫性神經纖維纏結伴隨鈣化、嗜銀顆粒性失智症、肌萎縮性脊髓側索硬化症/巴金森氏症-失智複合症、唐氏症、吉斯曼-史特斯勤-先克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease)、包涵體肌炎、庫賈氏病(Creutzfeld-Jakob disease)、多系統萎縮症、C型尼曼匹克症(Niemann-Pick disease type C)、普里昂蛋白大腦類澱粉血管病變、亞急性硬化性泛腦炎、強直性肌肉失養症、非關島運動神經元病伴隨神經纖維纏結、腦炎後巴金森氏症、慢性創傷性腦病變、及拳擊手型失智症(拳擊疾病)。

【請求項17】如請求項16所述之方法，其中該tau蛋白病係阿茲海默症。

【請求項18】如請求項16所述之方法，其中該tau蛋白病係進行性上眼神經核麻痺症。

【請求項19】一種偵測對象之類澱粉蛋白生成(amyloidogenic)疾病的方法，該方法包含：

自該對象獲得血漿樣本；

使用檢定偵測該血漿樣本中之 p217+tau 肽之量，其中該檢定使用針對 p217+tau 表位之捕捉抗體以使該捕捉抗體與該血漿樣本中之該等 p217+tau 肽結合，以形成抗體-肽複合物，並使用偵測抗體以使該偵測抗體與該等抗體-肽複合物結合；及

當該等 p217+tau 肽之該量高於預設閾值時，判定該對象患有類澱粉蛋白生成疾病或處於發展類澱粉蛋白生成疾病之風險，其中該預設閾值高於該檢定之定量下限(LLOQ)。

【請求項20】如請求項19所述之方法，其中在測量存在之該等p217+tau肽之該量前，該檢定不藉由免疫沉澱濃縮來自該血漿樣本之該等p217+tau肽。

【請求項21】如請求項19所述之方法，其中該血漿樣本係粗血漿。

【請求項22】如請求項19所述之方法，其中該LLOQ對應於該檢定之15至25%變異係數(CV)。

【請求項23】如請求項22所述之方法，其中該LLOQ對應於該檢定之20% CV。

【請求項24】如請求項19所述之方法，其中該預設閾值係該LLOQ之至少3倍。

【請求項25】如請求項19所述之方法，其中該預設閾值係該檢定之定量下限之至少10倍。

【請求項26】如請求項19所述之方法，其中該類澱粉蛋白生成疾病係阿茲海默症。

【請求項27】一種用於偵測或預測對象之tau蛋白病的方法，該方法包含：
偵測血漿樣本中之 p217+tau 肽之量，其係藉由使該血漿樣本與針對 p217+tau 表位之捕捉抗體接觸以使該捕捉抗體與該血漿樣本中之該等 p217+tau 肽結合，以形成抗體-肽複合物，並分開地使該等抗體-肽複合物與偵測抗體接觸以使該偵測抗體與該等抗體-肽複合物結合；

產生 tau 數據，該等 tau 數據對應於偵測到的該等 p217+tau 肽之該量；

獲得生物標記數據，該等生物標記數據對應於自該對象偵測到的至少一種生物標記，其中該生物標記係選自包含 NFL、脂聯素、及瘦素之群組；及

使用機器學習模組將該等 tau 數據及進一步的生物標記數據與一組參考數據進行比較，以判定或預測該對象是否患有 tau 蛋白病或處於發展 tau 蛋白病之風險。

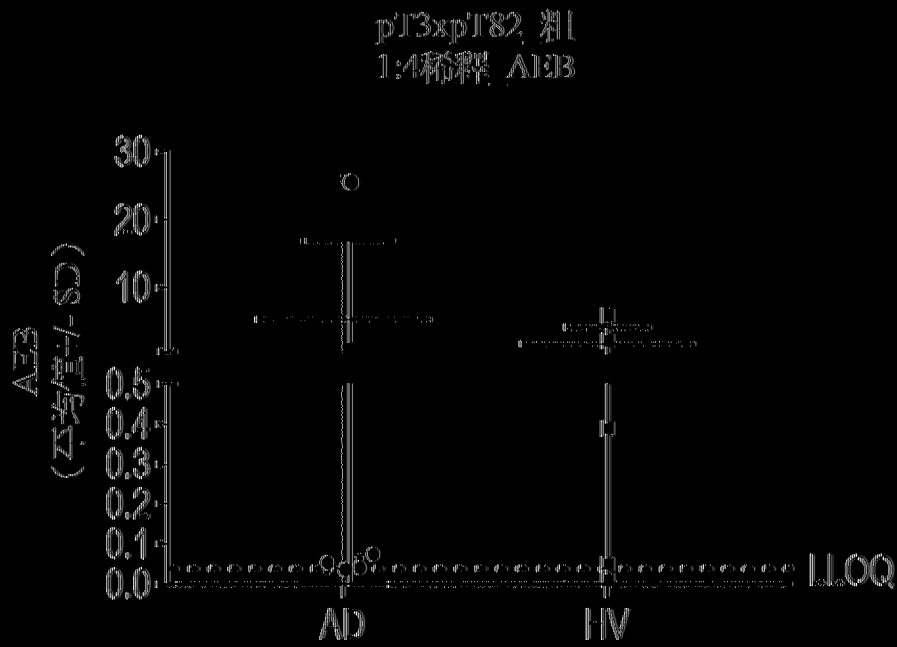
【請求項28】 如請求項27所述之方法，其中該機器學習模組包含下列中之至少一者：支持向量機模組、隨機森林模組、邏輯迴歸模組、及梯度提升模組。

【請求項29】 如請求項27所述之方法，其中該tau蛋白病係選自由下列所組成之群組：家族性阿茲海默症、偶發性阿茲海默症、連鎖於染色體17之額顳葉失智症伴隨巴金森氏症(frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)、進行性上眼神經核麻痺症、皮質基底核退化症、匹克症(Pick's disease)、進行性皮質下膠質增生(progressive subcortical gliosis)、僅纏結失智症(tangle only dementia)、彌漫性神經纖維纏結伴隨鈣化、嗜銀顆粒性失智症、肌萎縮性脊髓側索硬化症/巴金森氏症-失智複合症、唐氏症、吉斯曼-史特斯勤-先克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease)、包涵體肌炎、庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、多系統萎縮症、C型尼曼匹克症(Niemann-Pick disease type C)、普里昂蛋白大腦類澱粉血管病變、亞急性硬化性泛腦炎、強直性肌肉失養症、非關島運動神經元病伴隨神經纖維纏結、腦炎後巴金森氏症、慢性創傷性腦病變、及拳擊手型失智症(拳擊疾病)。

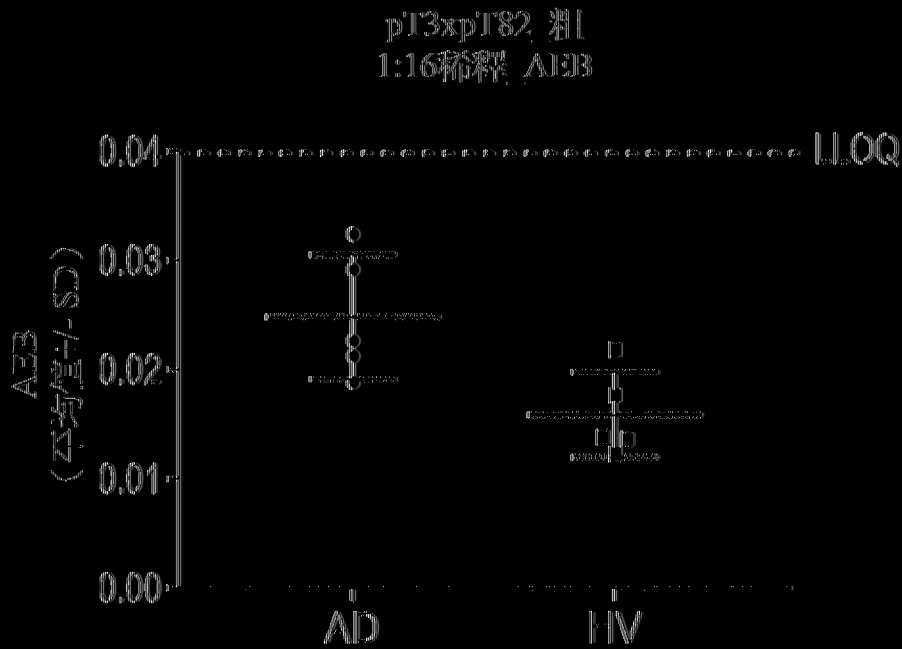
【請求項30】 如請求項27所述之方法，其中該tau蛋白病係阿茲海默症。

【請求項31】 如請求項27所述之方法，其中該tau蛋白病係進行性上眼神經核麻痺症。

(發明圖式)

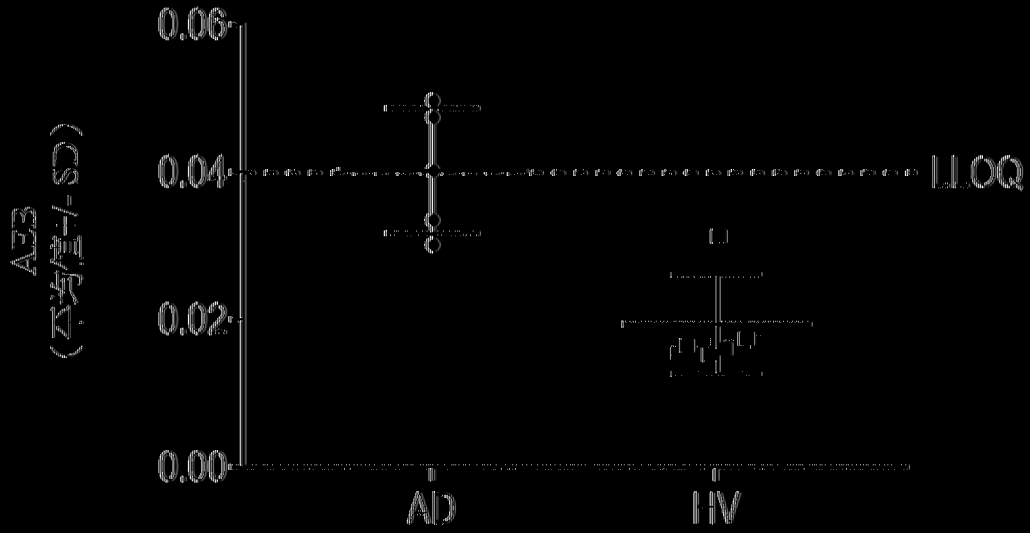


(圖1A)



(圖1B)

p13xp182 排膠
1:6稀釋 A193

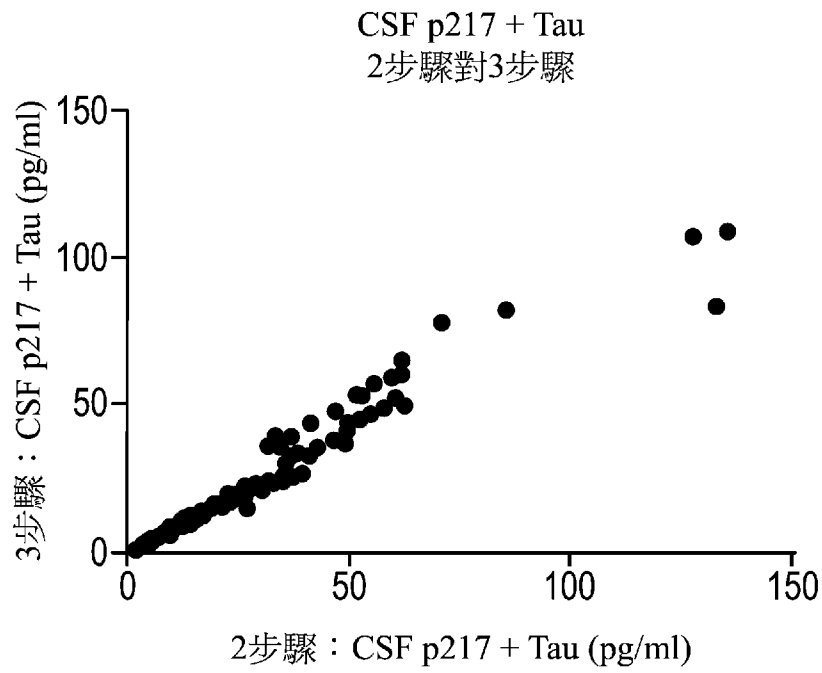


(圖1C)

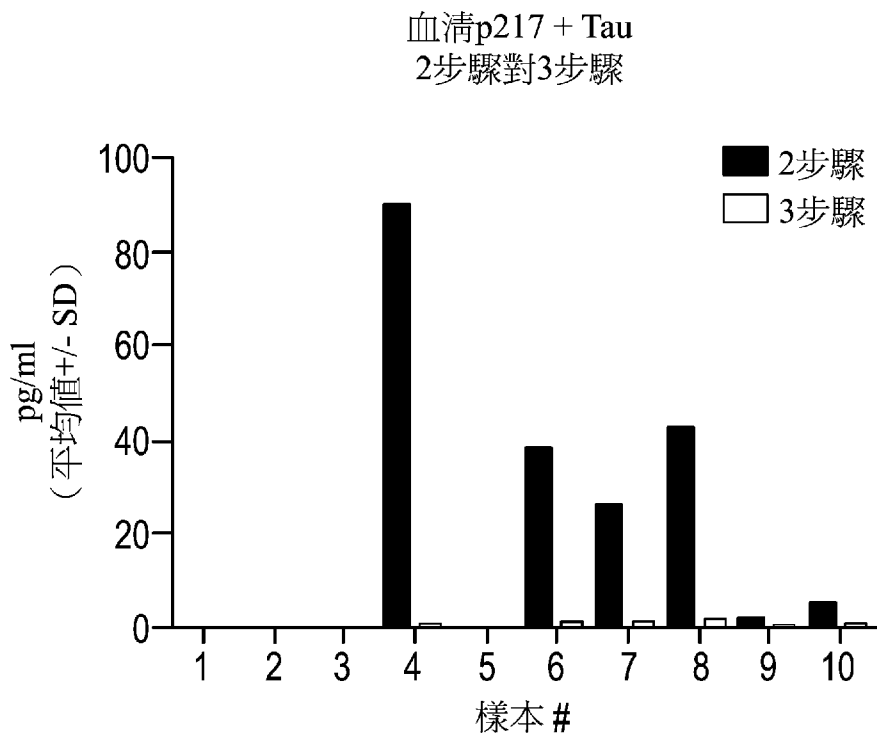
p13 IP
接著p13xp182 Simoa @1:4稀釋



(圖1D)

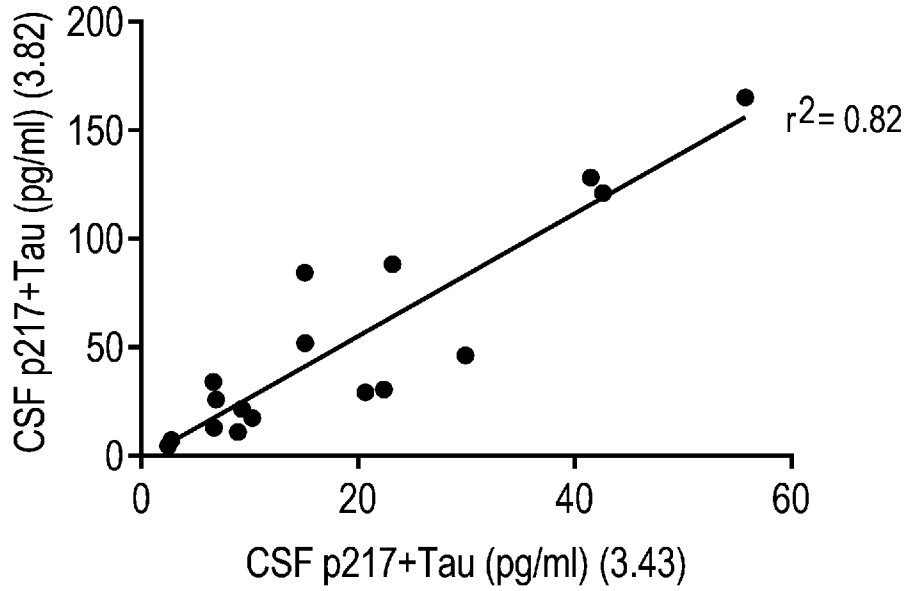


【圖2A】



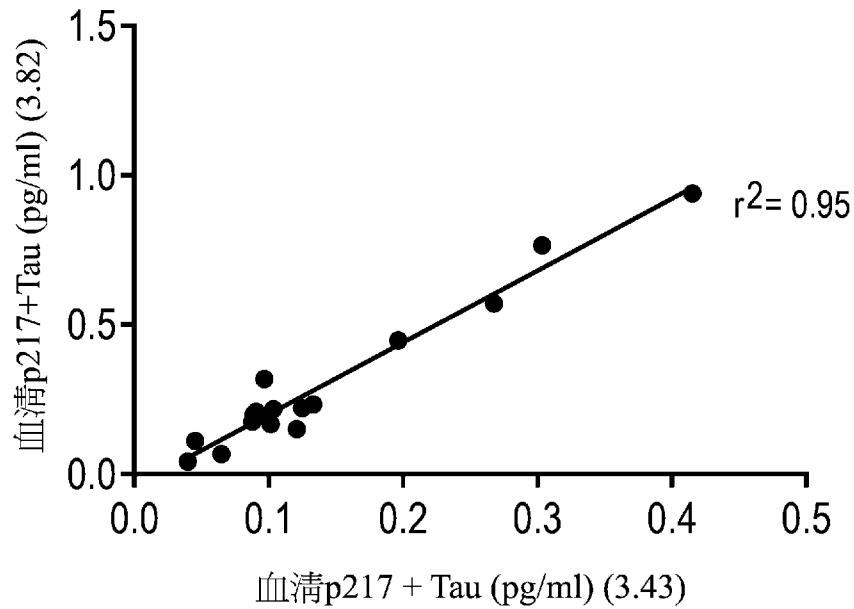
【圖2B】

粗3步驟
CSF (3.43)對CSF (3.82)



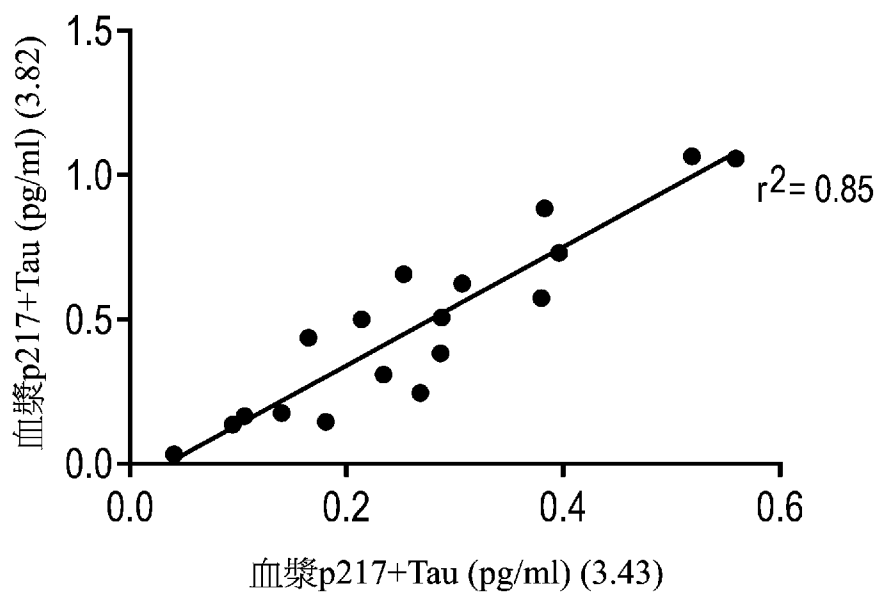
【圖3A】

粗3步驟
血清(3.43)對血清(3.82)



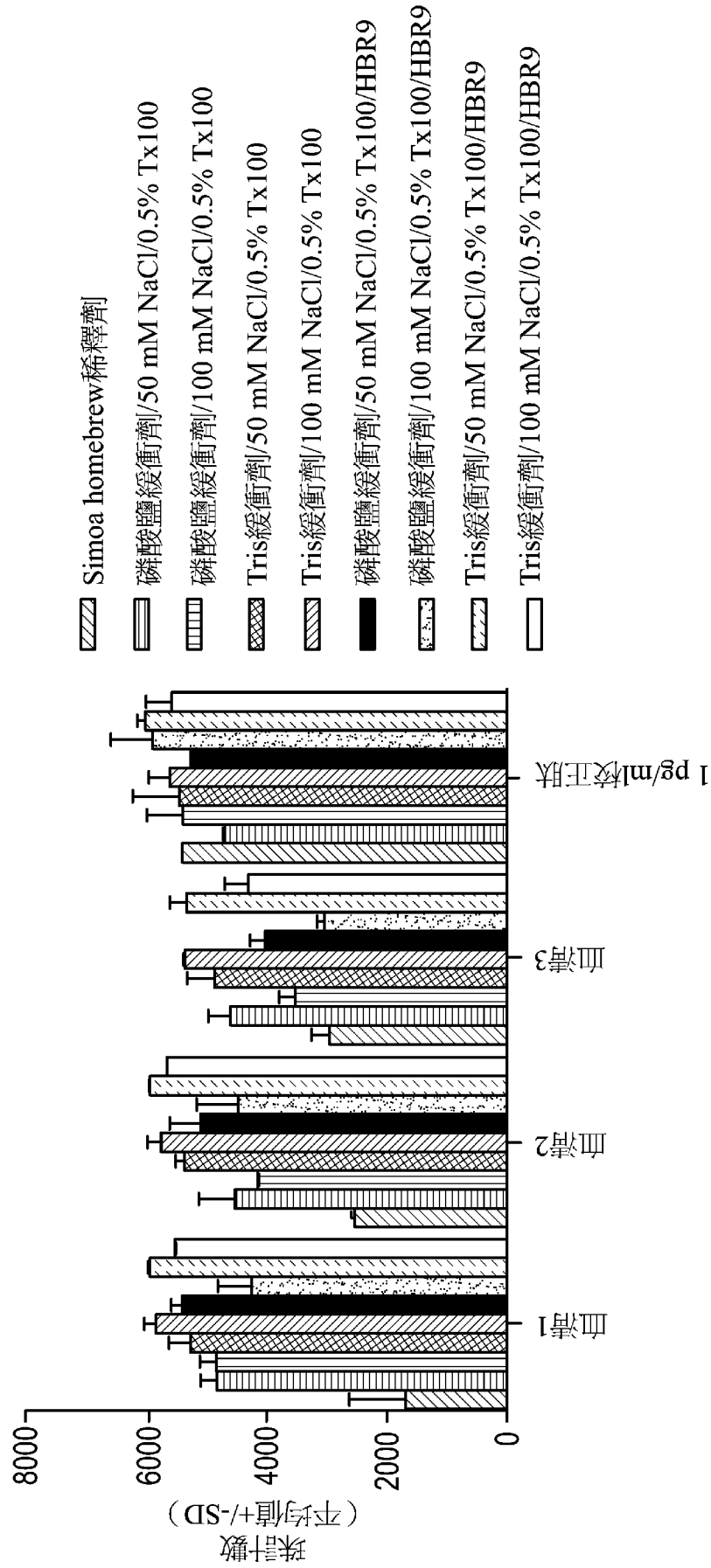
【圖3B】

粗3步驟
血漿(3.43)對血漿(3.82)



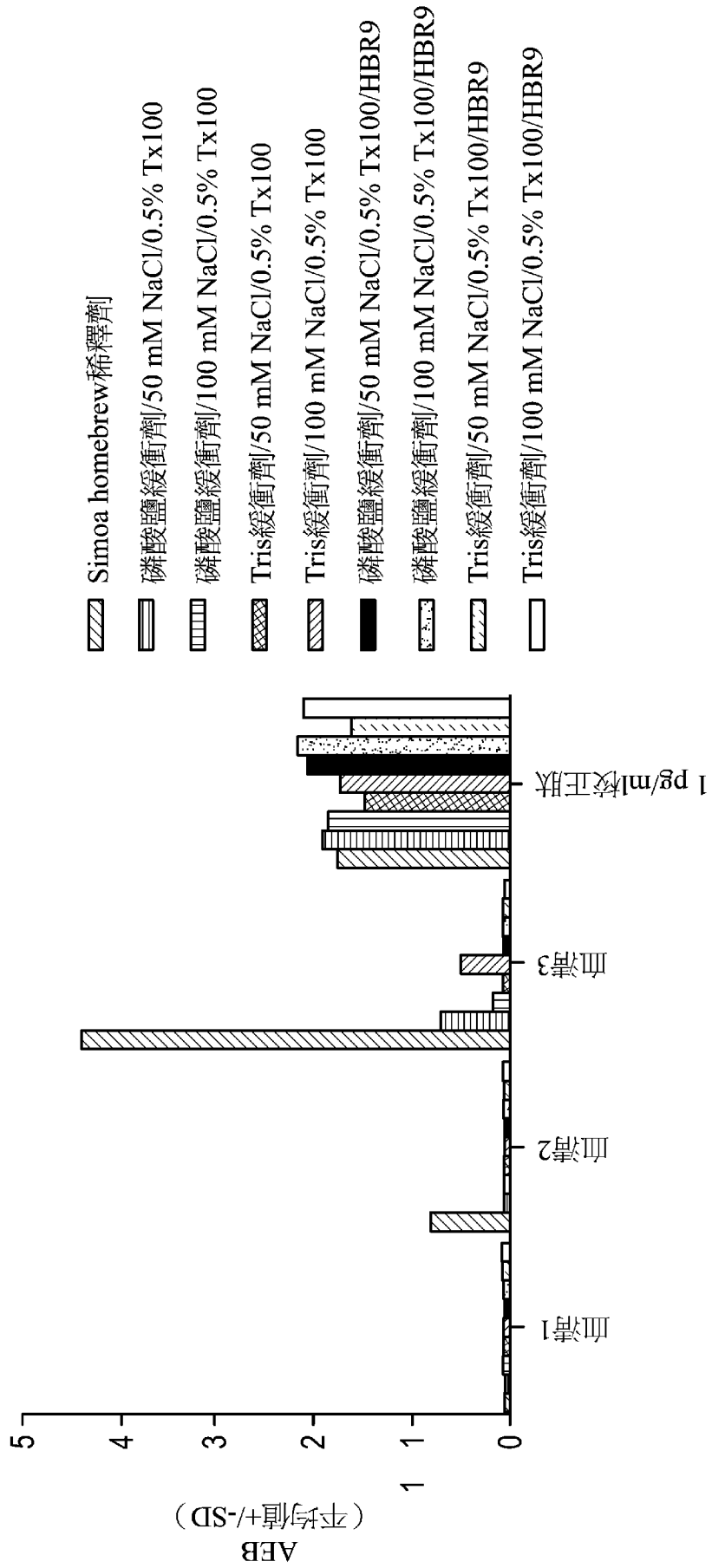
【圖3C】

樣本稀釋劑對珠計數的影響

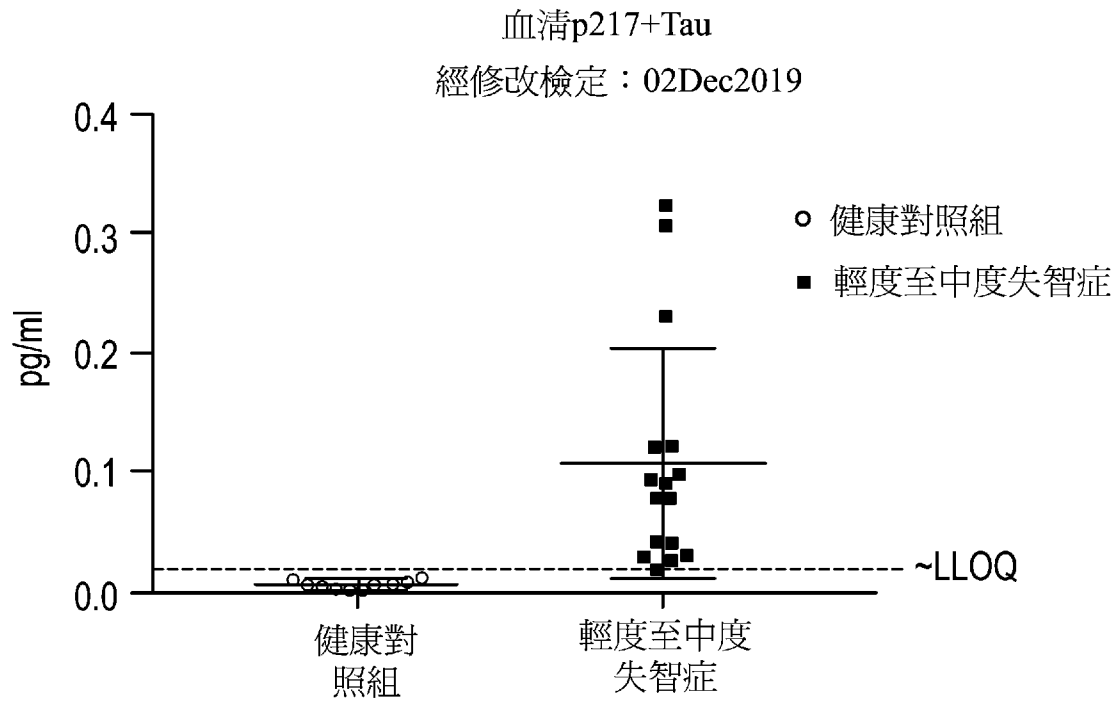


【圖4A】

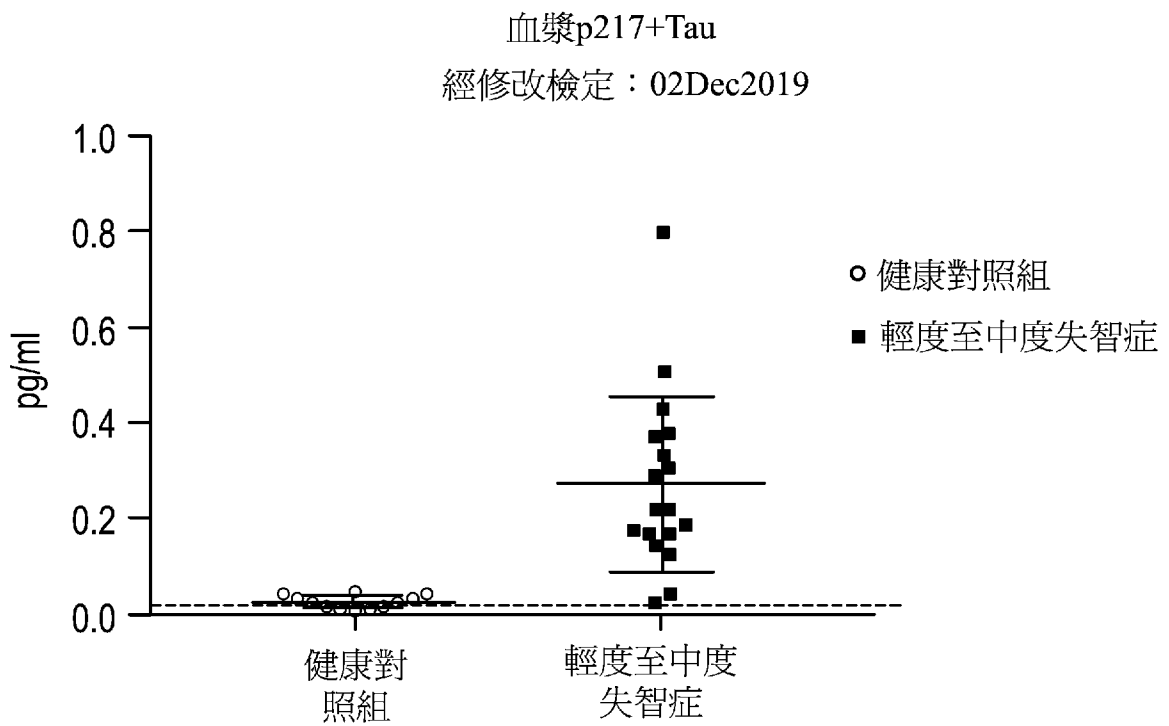
樣本稀釋劑對珠計數的影響



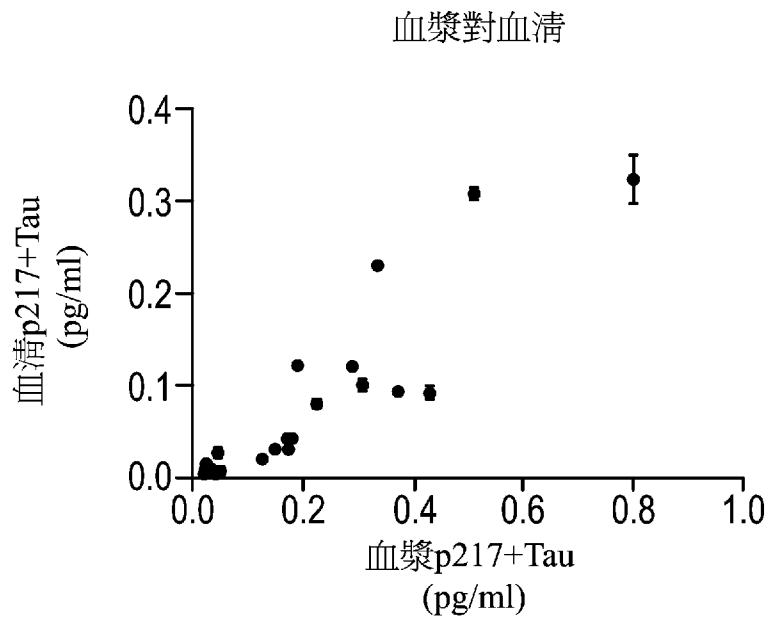
【圖4B】



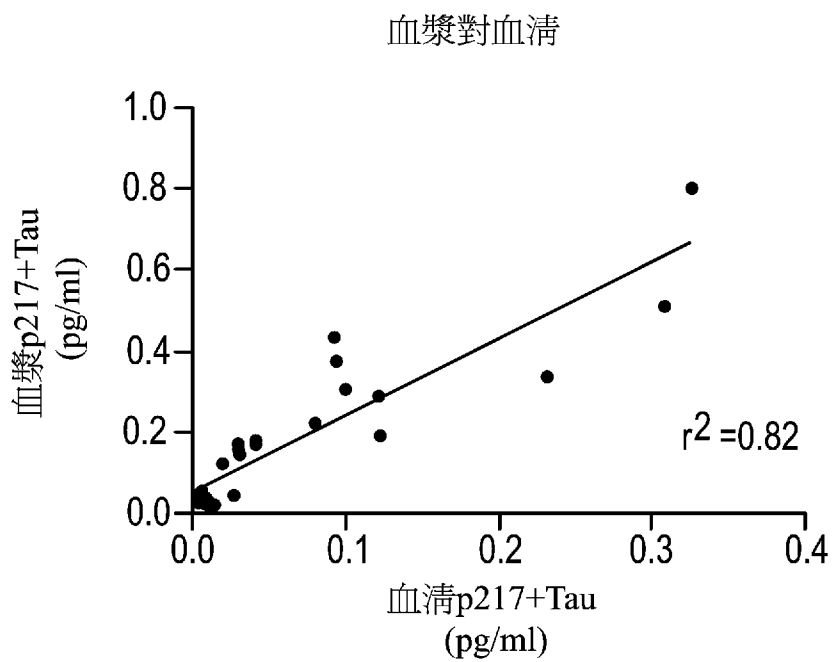
【圖5A】



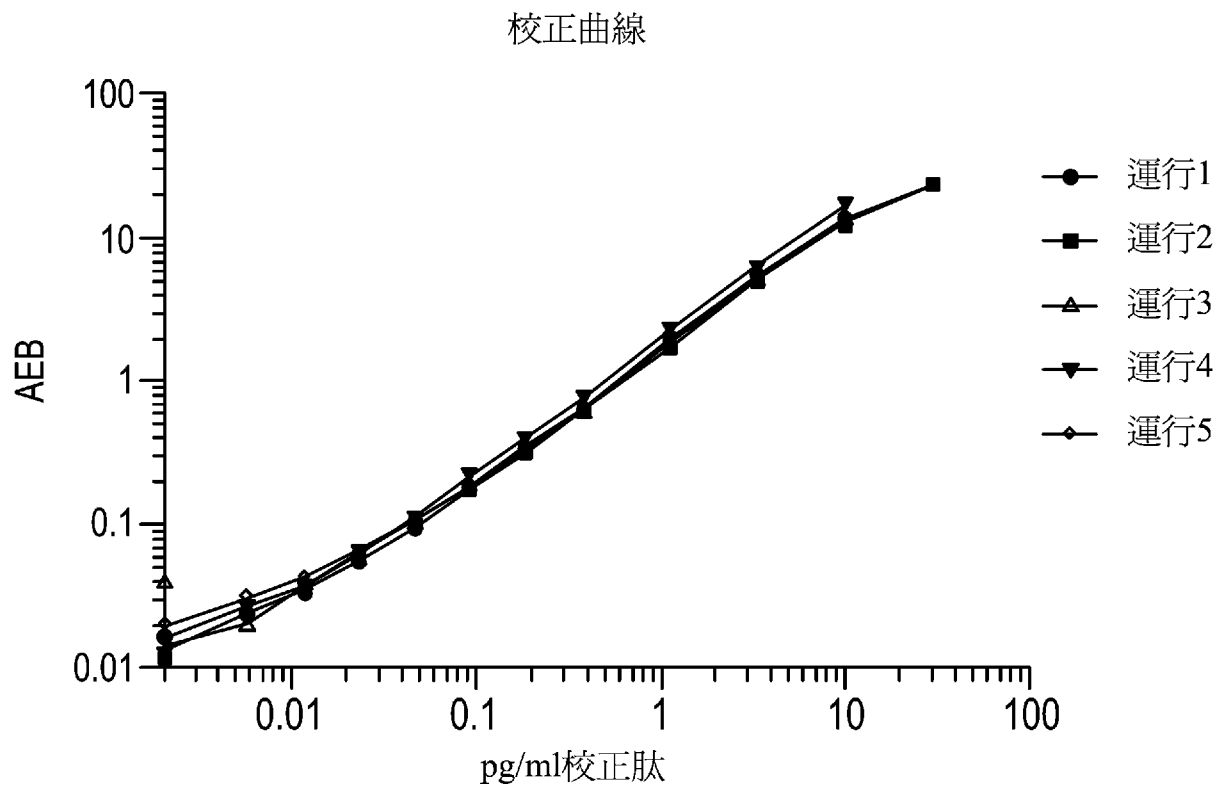
【圖5B】



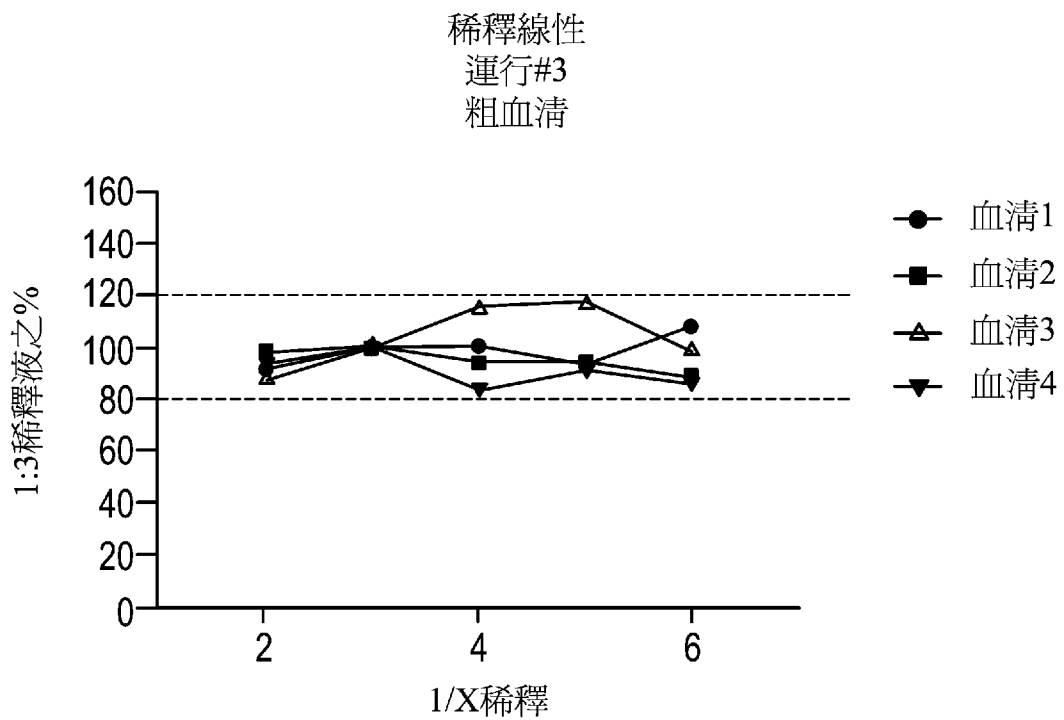
【圖5C】



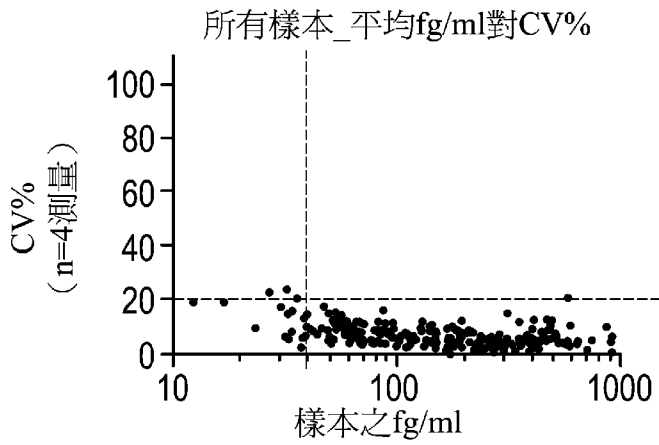
【圖5D】



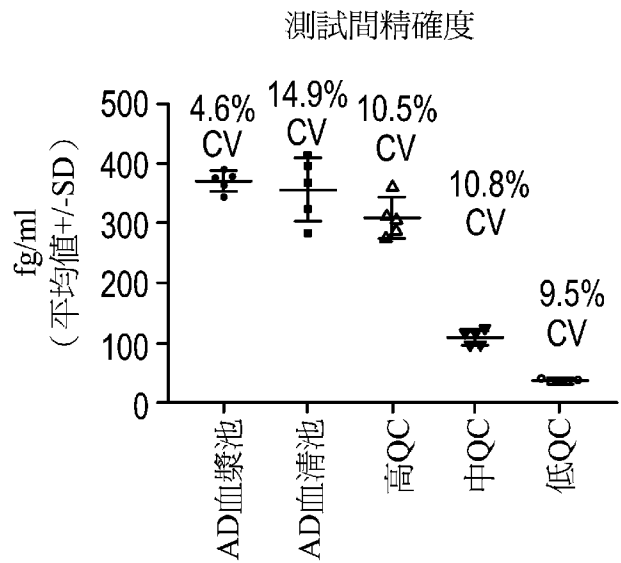
【圖6A】



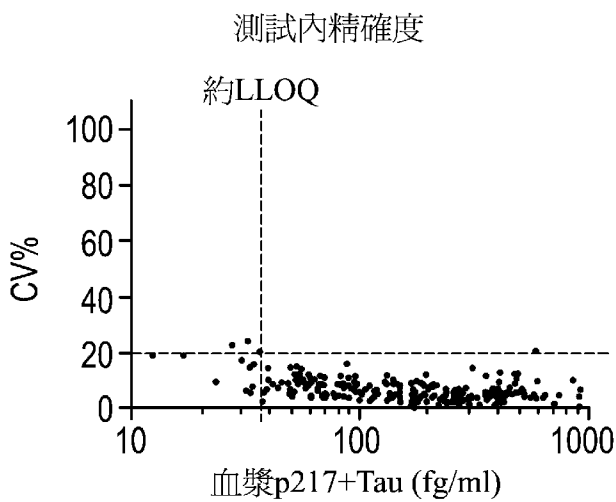
【圖6B】



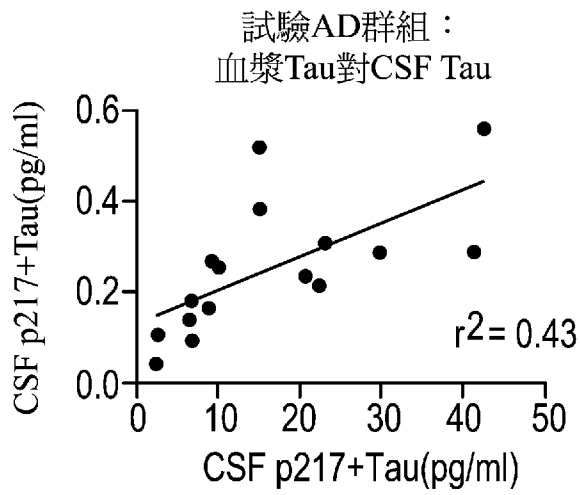
【圖7A】



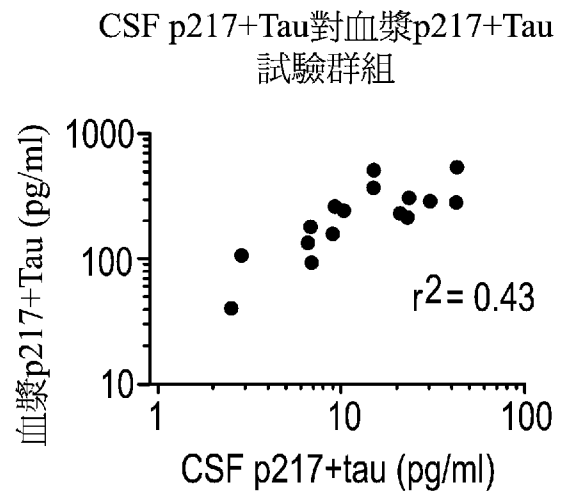
【圖7B】



【圖7C】

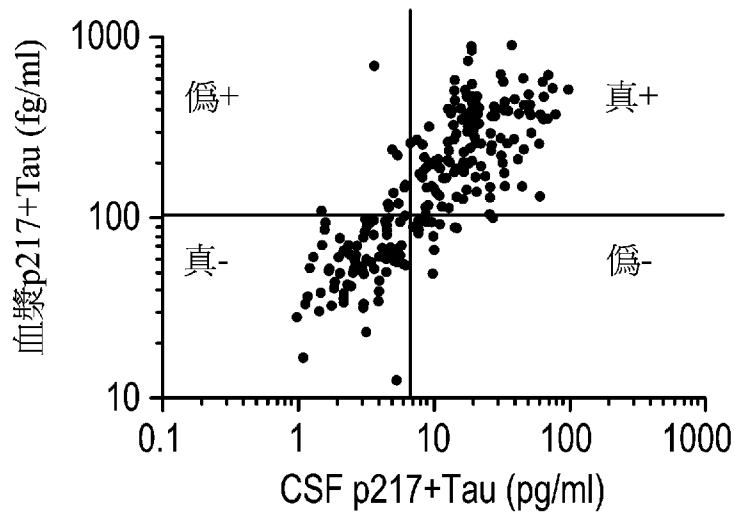


【圖8A】

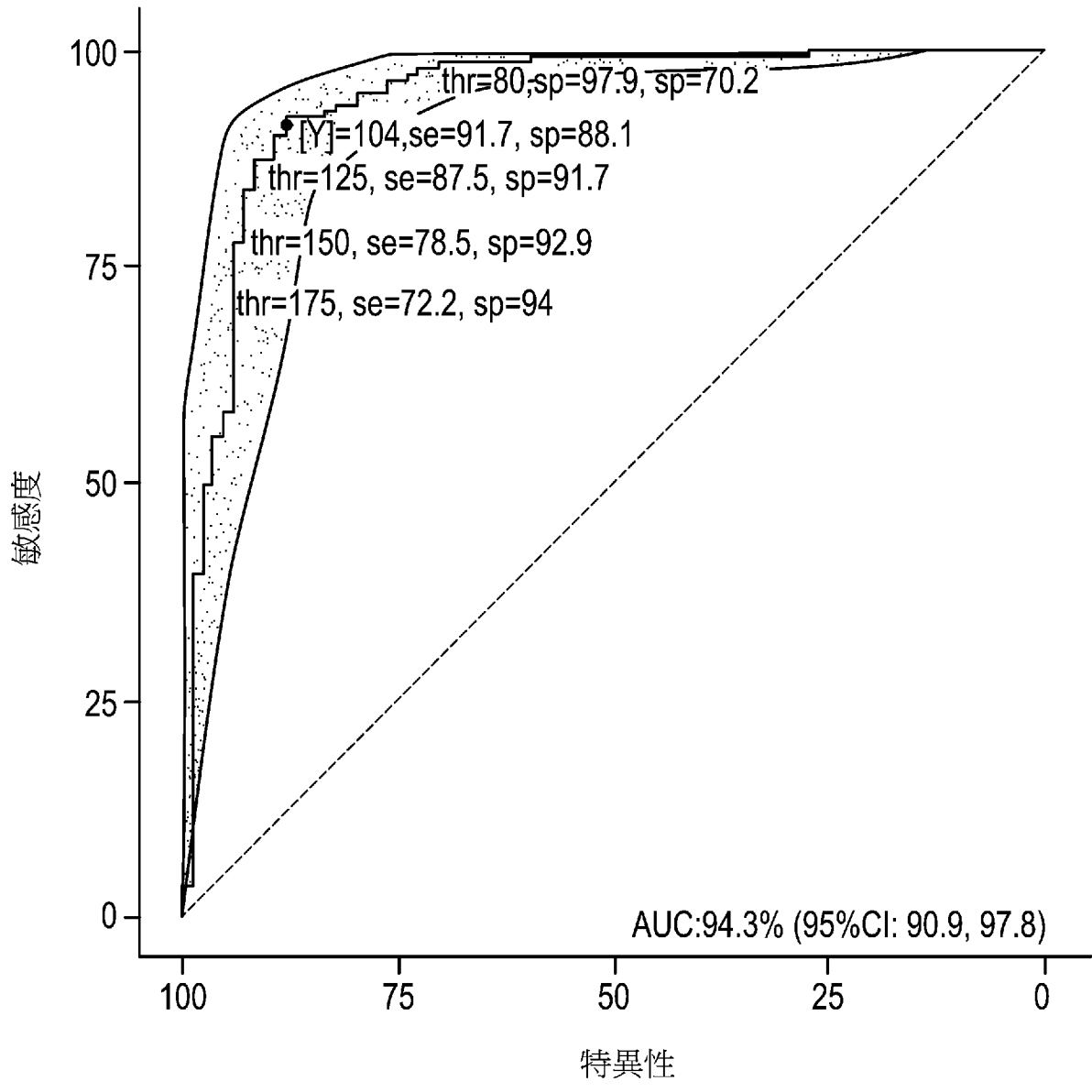


【圖8B】

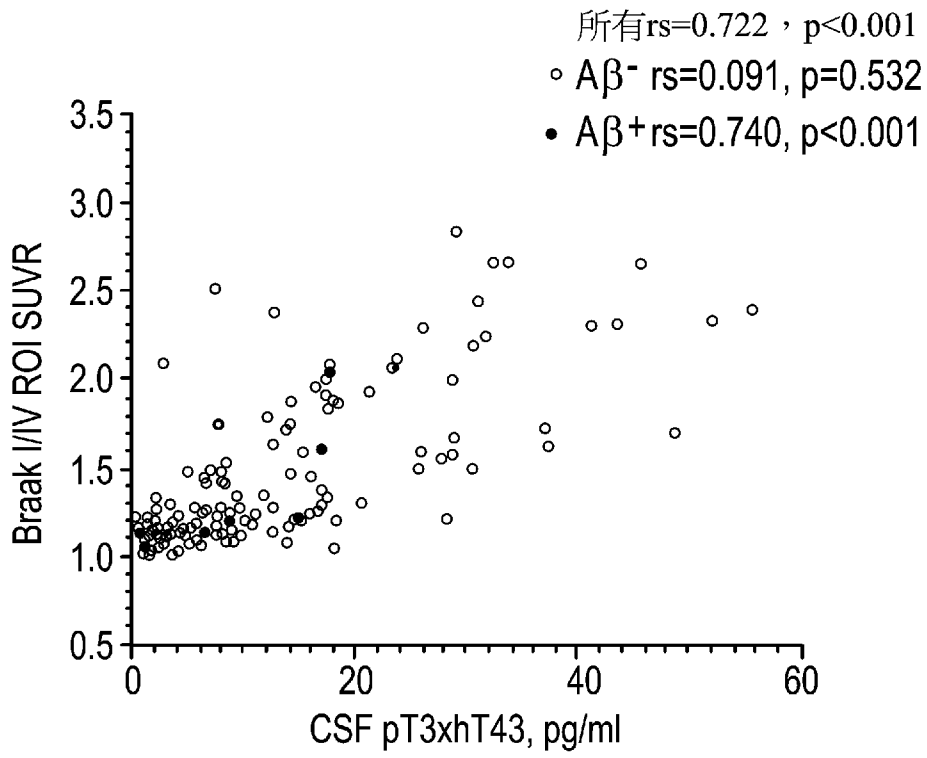
CSF p217對血漿p217



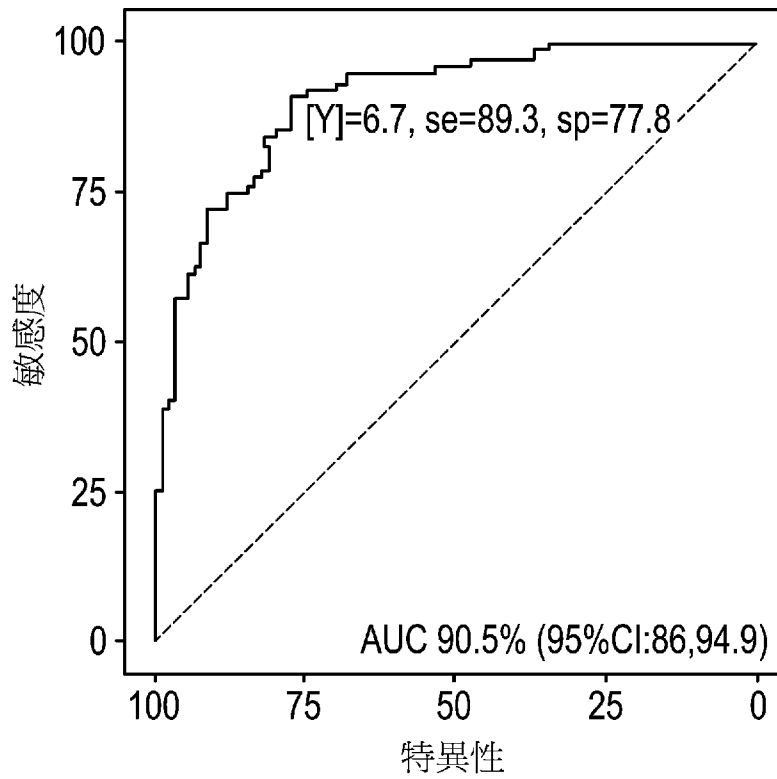
【圖9A】



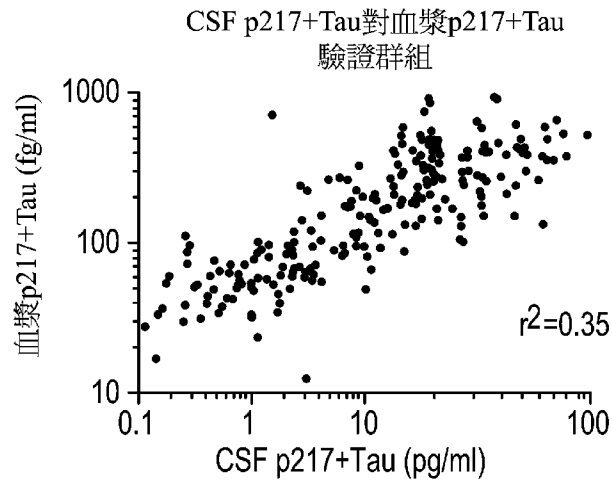
【圖9B】



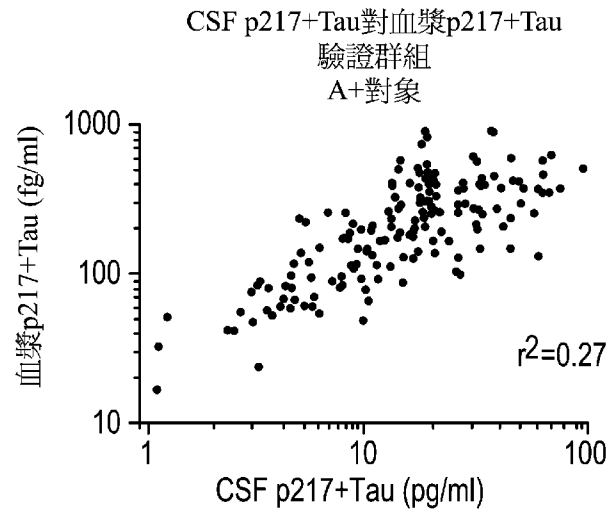
【圖10A】



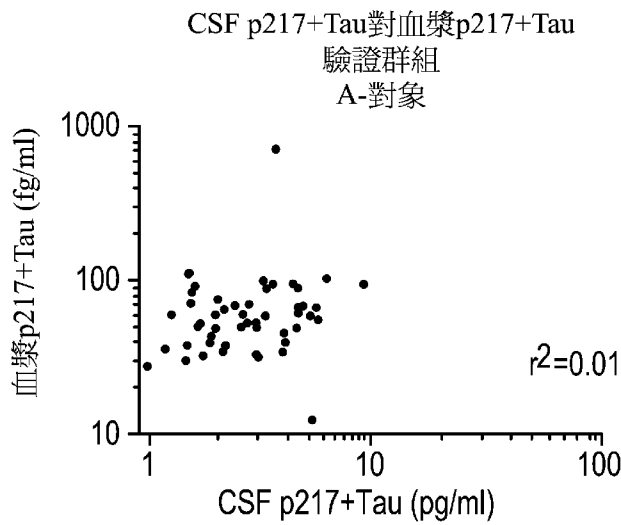
【圖10B】



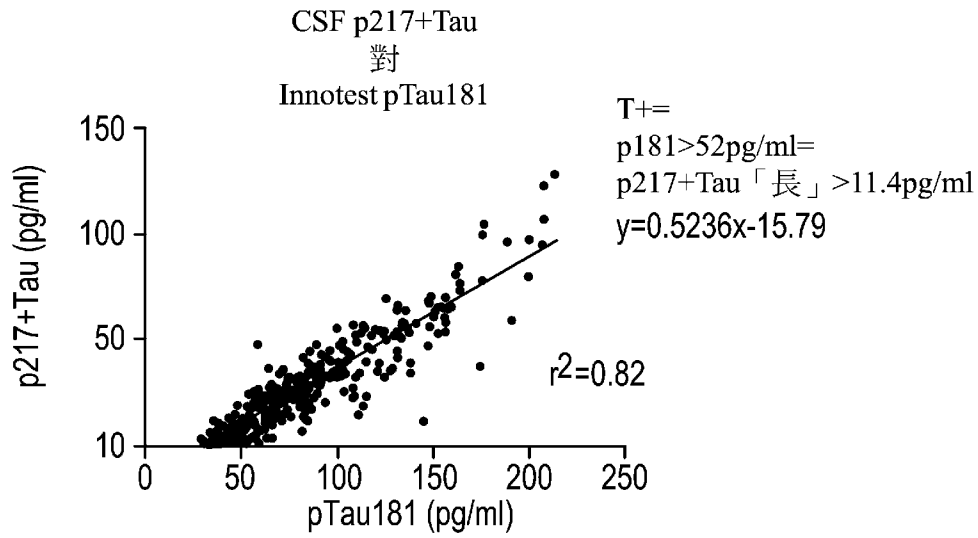
【圖11A】



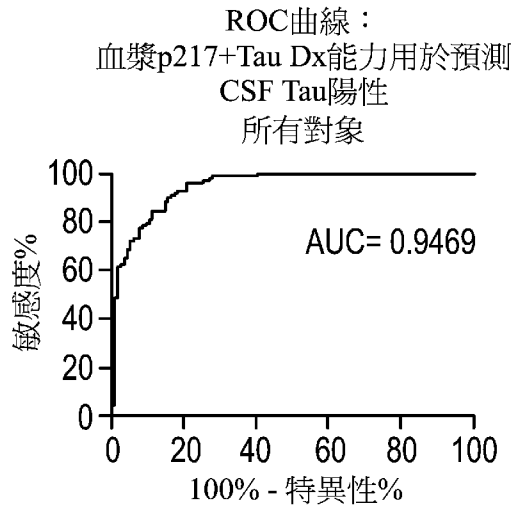
【圖11B】



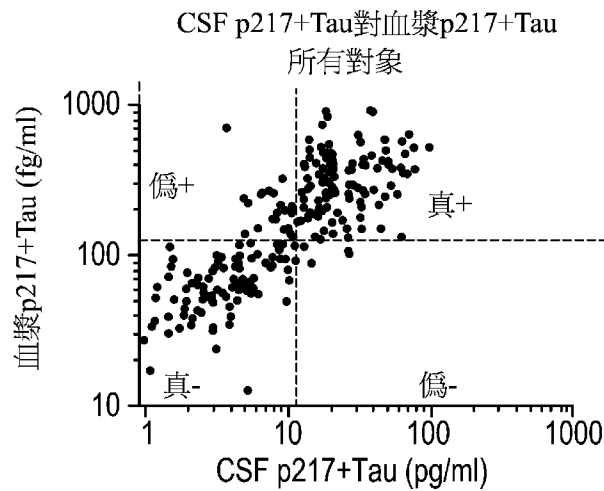
【圖11C】



【圖12A】

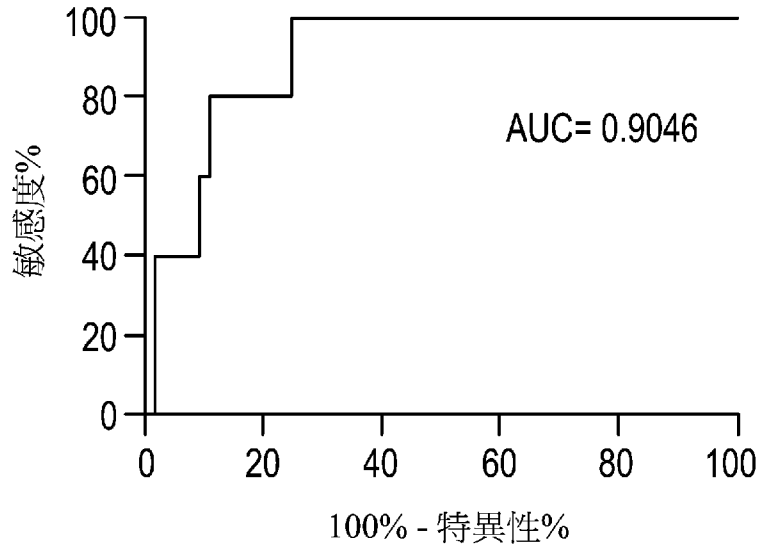


【圖12B】



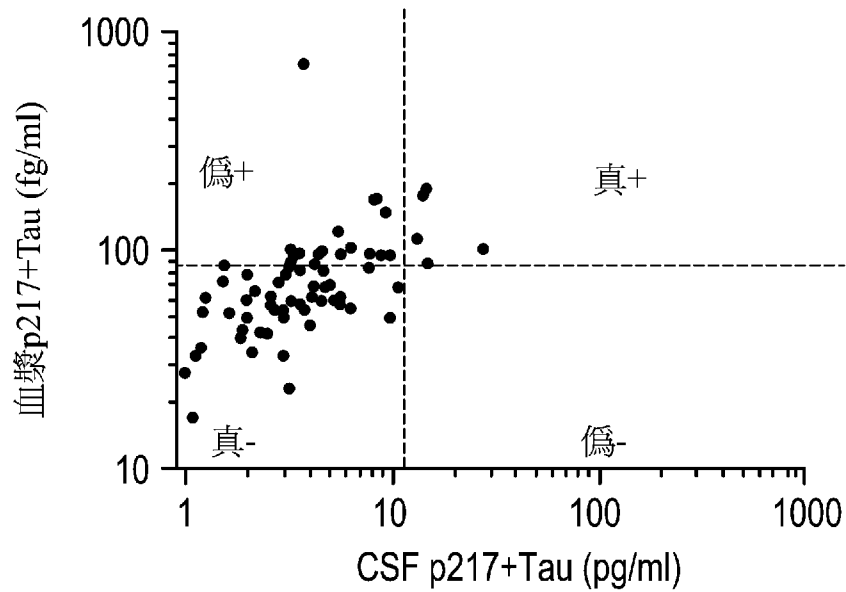
【圖12C】

ROC曲線：
 血漿p217+Tau Dx能力用於預測
 CSF Tau陽性
 認知正常對象



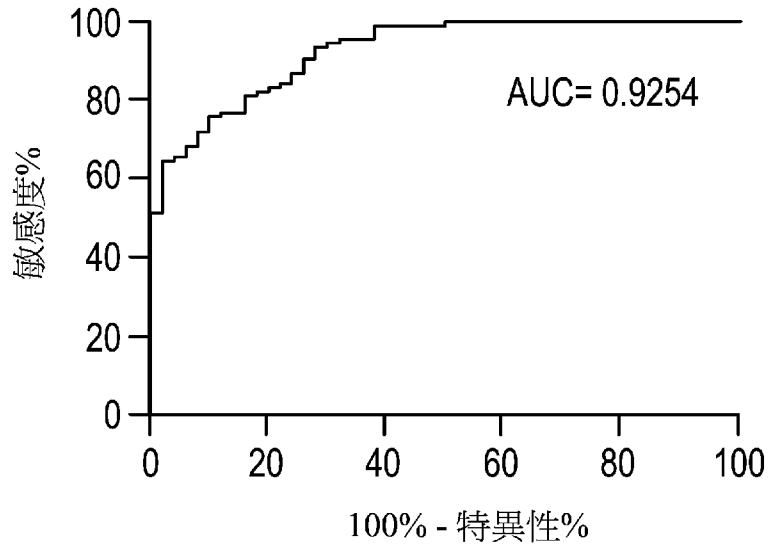
【圖12D】

CSF p217+Tau對血漿p217+Tau
 認知正常對象



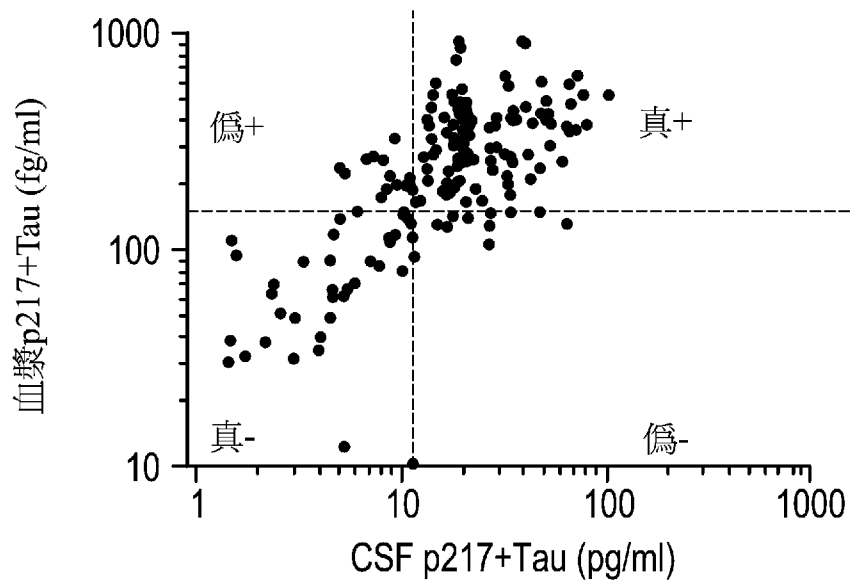
【圖12E】

ROC曲線：
 血漿p217+Tau Dx用於預測
 CSF Tau陽性
 輕度至中度失智症對象



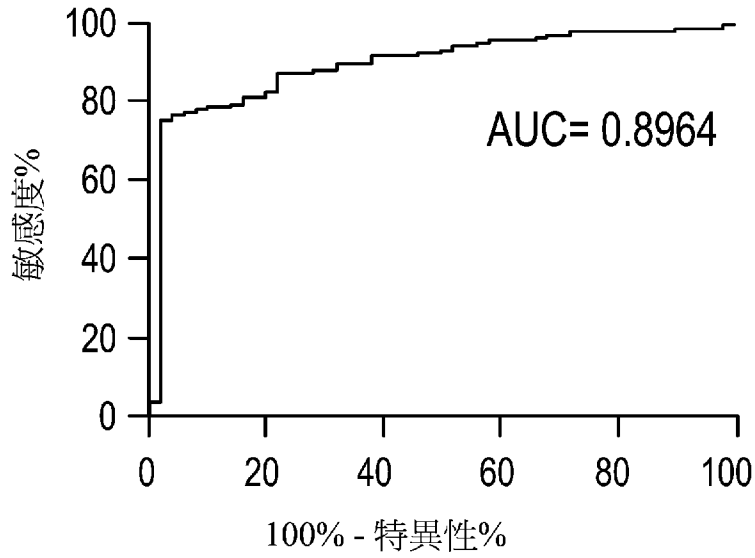
【圖12F】

CSF p217+Tau對血漿p217+Tau
 輕度至中度失智症對象



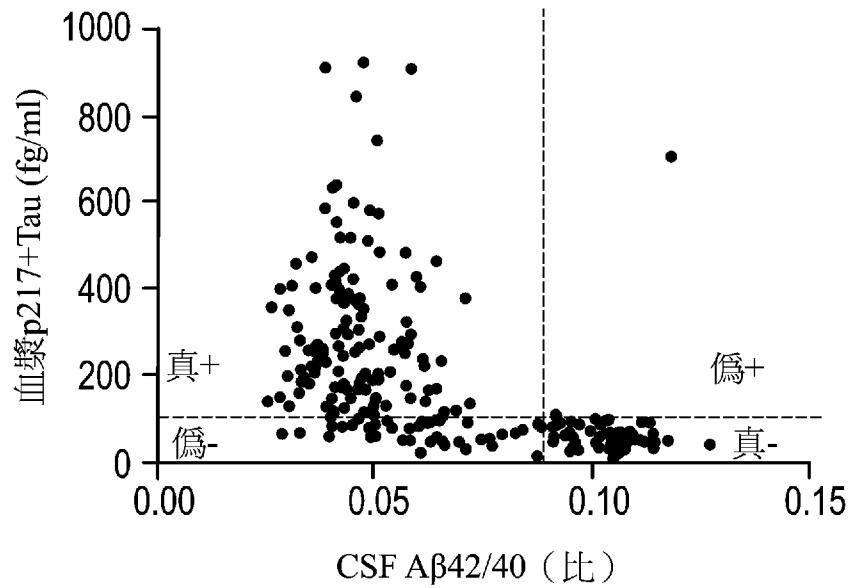
【圖12G】

ROC曲線：
血漿p217+Tau Dx用於預測
CSF類澱粉蛋白陽性
所有對象



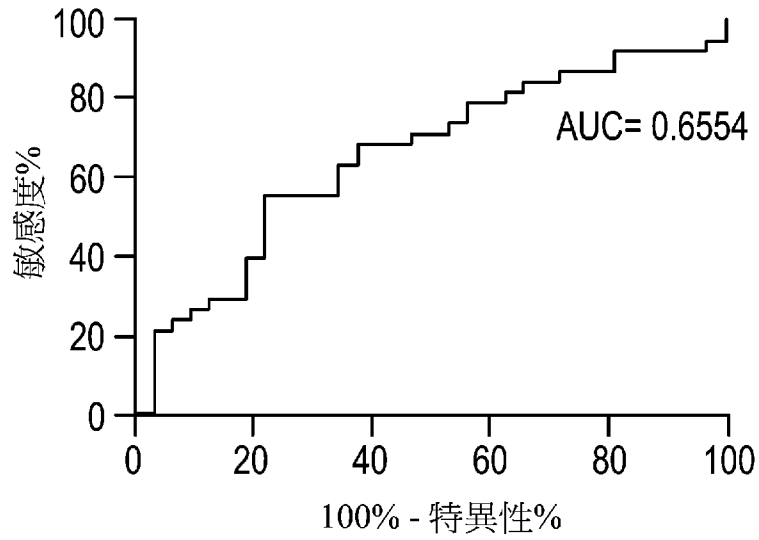
【圖13A】

CSF A β 42/40比對血漿p217+Tau
所有對象



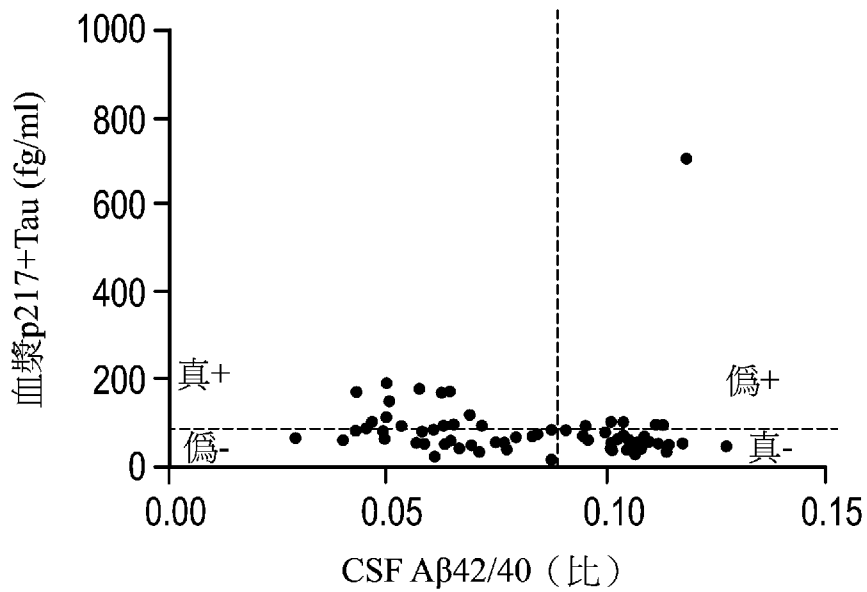
【圖13B】

ROC曲線：
血漿p217+Tau Dx能力用於預測
CSF類澱粉蛋白陽性
認知正常對象



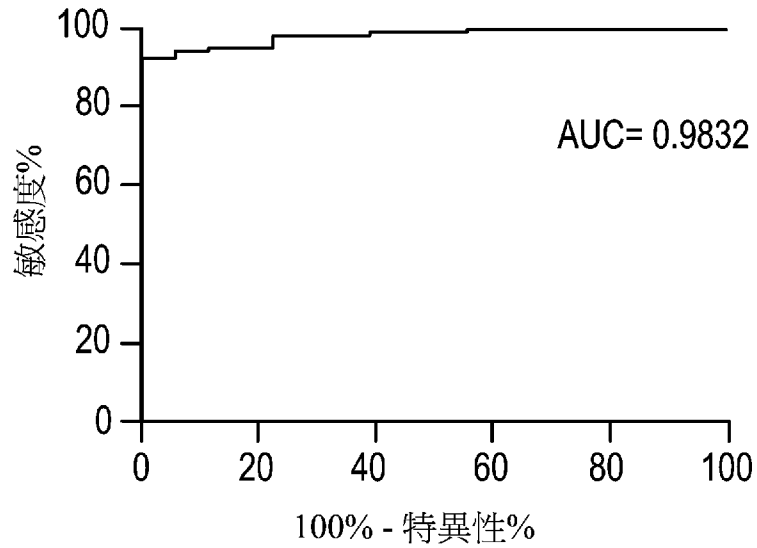
【圖13C】

CSF A β 42/40比對血漿p217
認知正常對象



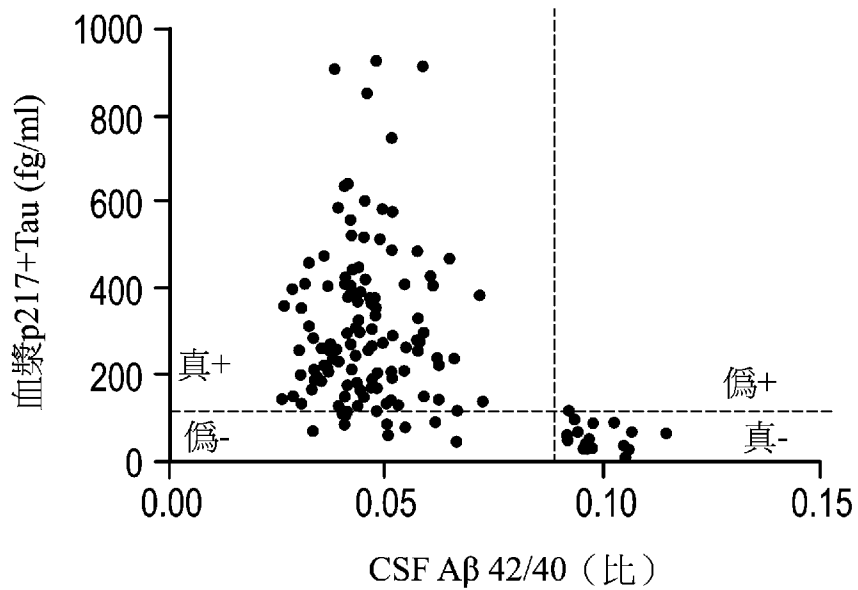
【圖13D】

ROC曲線：
 血漿p217+Tau Dx能力用於預測
 CSF類澱粉蛋白陽性
 輕度至中度失智症對象

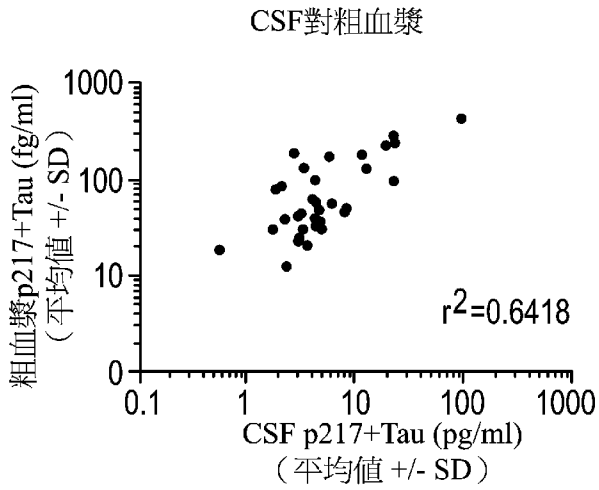


【圖13E】

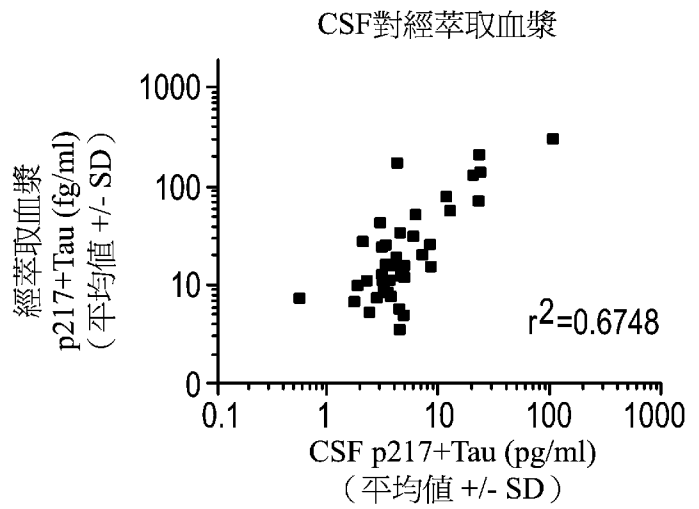
CSF Aβ42/40比對血漿p217
 輕度至中度失智症對象



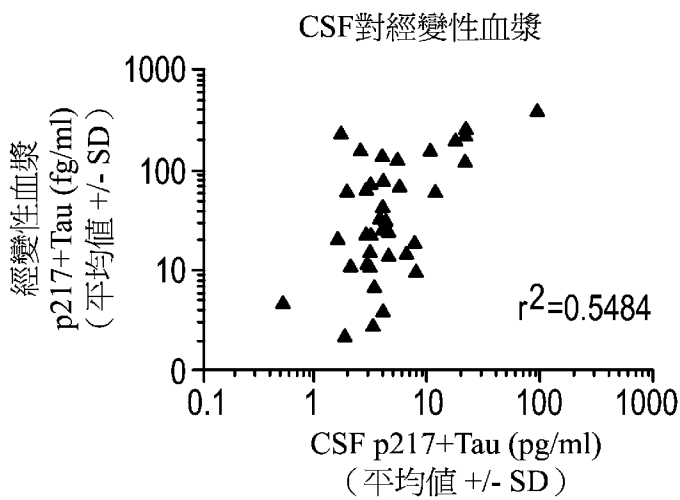
【圖13F】



【圖14A】

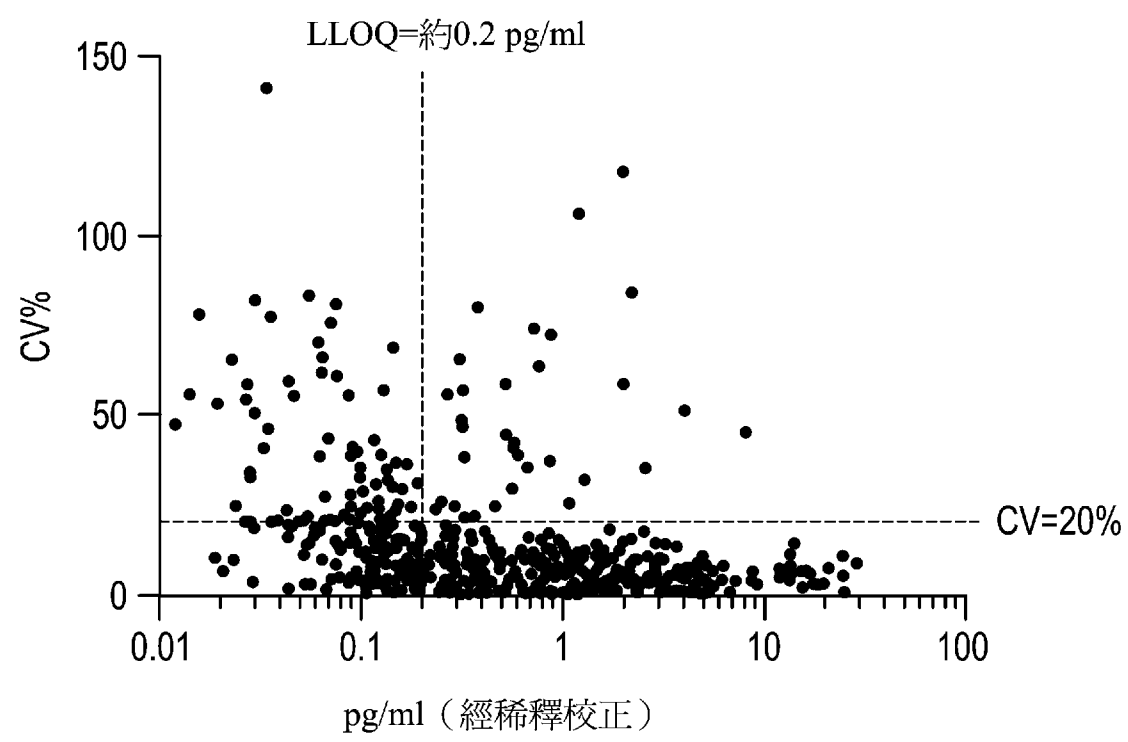


【圖14B】



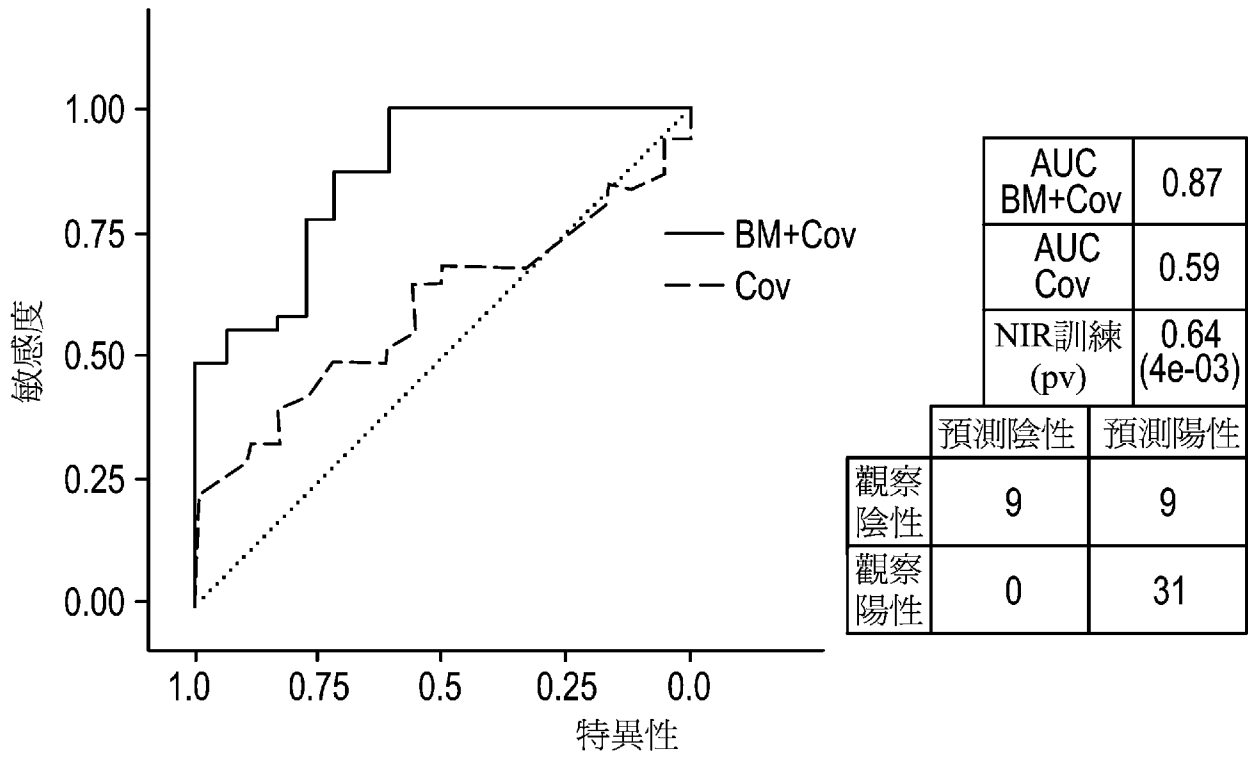
【圖14C】

血漿總p217+Tau
精確度及敏感度



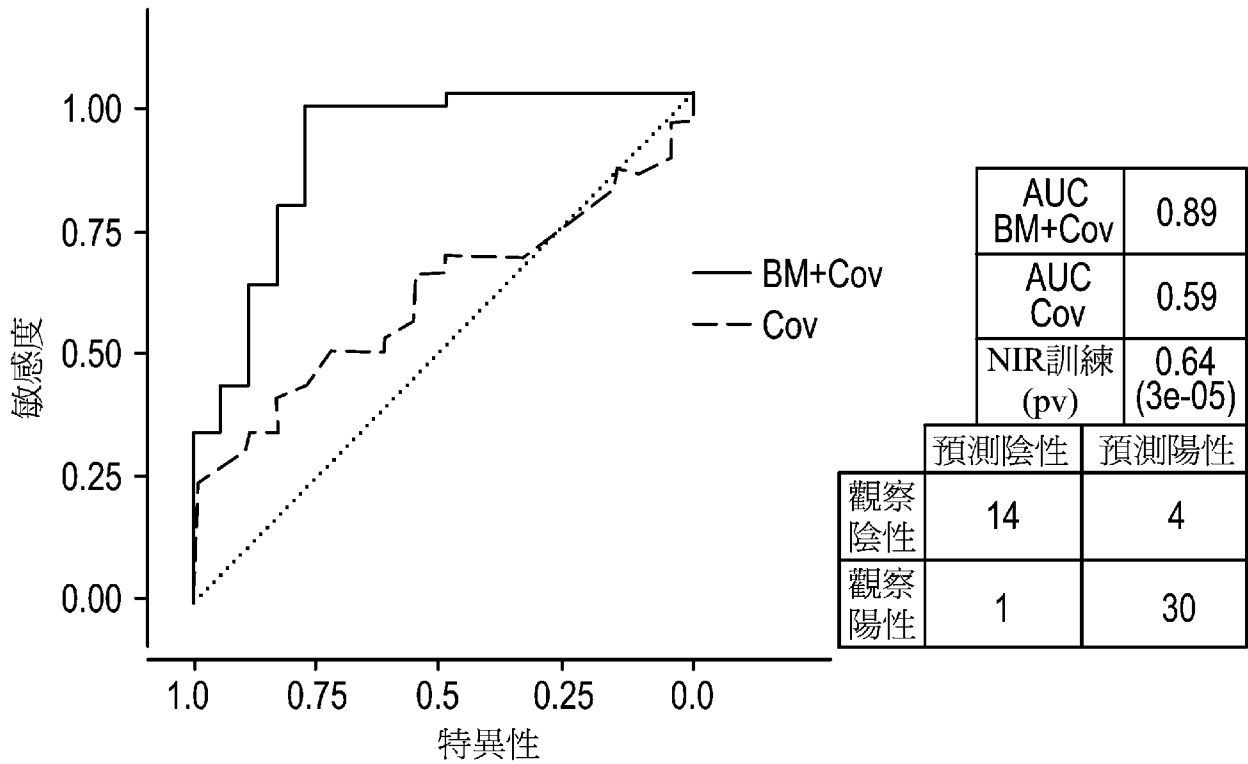
【圖15C】

血清Tau、年齡、性別



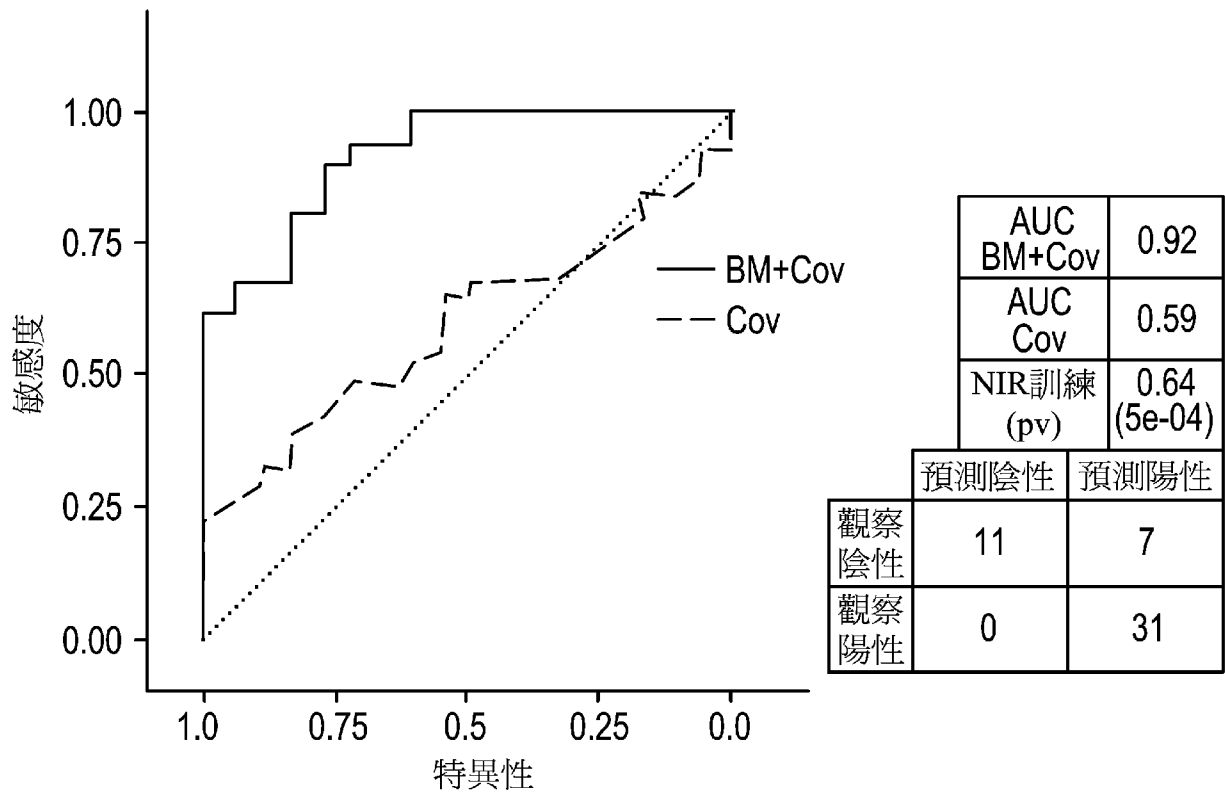
【圖16A】

血清Tau、NFL、年齡、性別



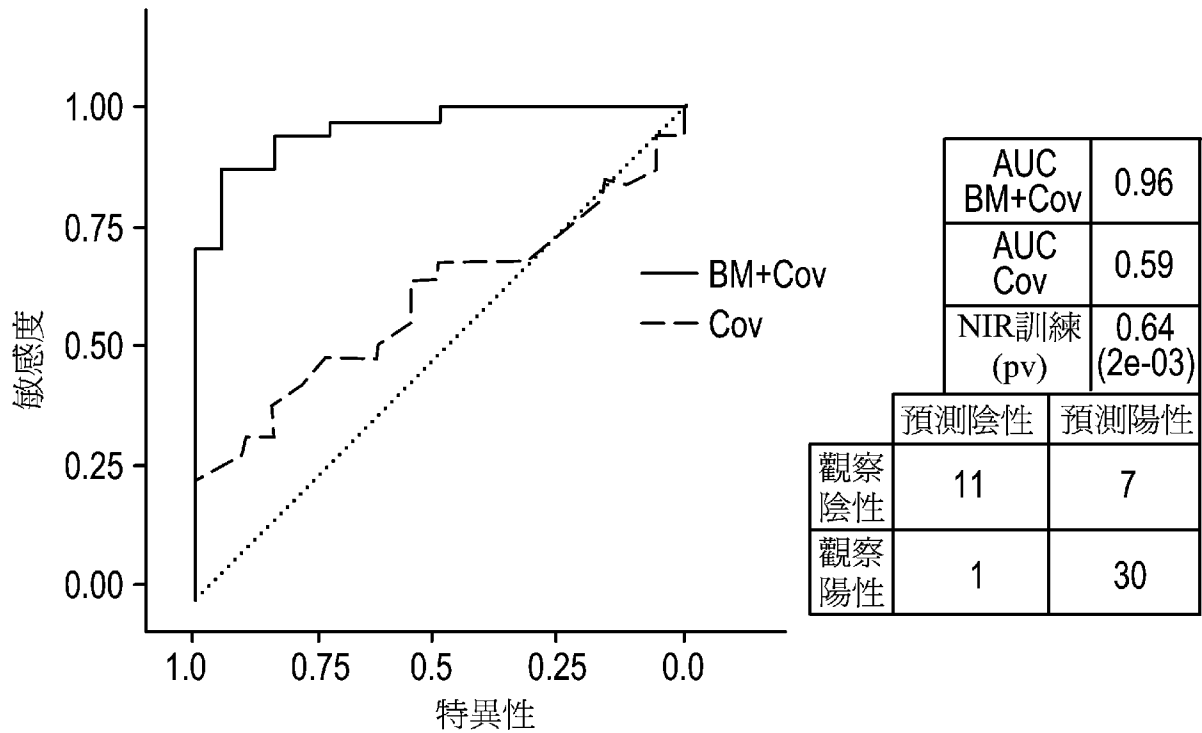
【圖16B】

血清Tau、NFL、脂聯素、年齡、性別



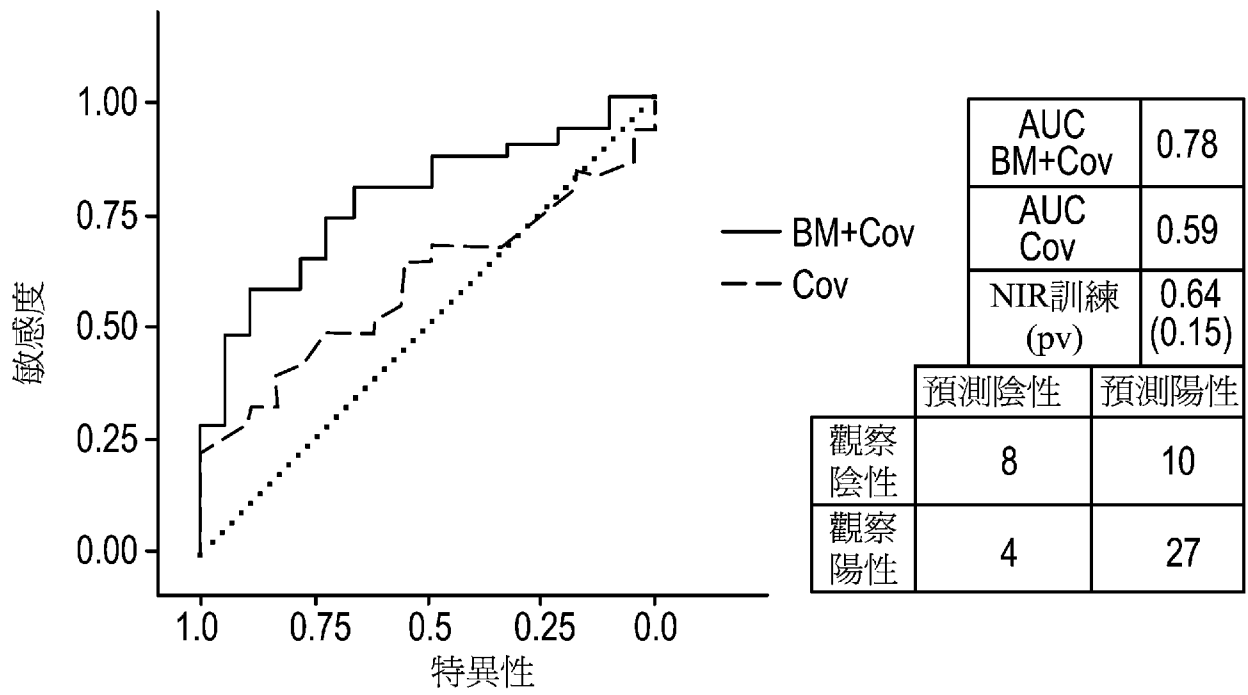
【圖16C】

血清Tau、NFL、脂聯素、瘦素、年齡、性別



【圖16D】

脂聯素、瘦素、NFL、年齡、性別



【圖16E】