



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I788704 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 01 日

(21) 申請案號：109132595

(22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 24 日

(51) Int. Cl. : **G01N33/68 (2006.01)**

(30) 優先權：	2013/10/24	美國	61/895,376
	2014/04/14	美國	61/978,994
	2014/09/08	美國	62/047,062

(71) 申請人：美商納諾索米克斯公司 (美國) NANOSOMIX, INC. (US)  
美國

(72) 發明人：高茲爾 艾德華 J GOETZL, EDWARD J. (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

WO	2011/094645A1	WO	2011/109440A1
WO	2013/071239A1		

審查人員：劉力夫

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：0 共 59 頁

(54) 名稱

分析個體樣品之方法

(57) 摘要

本發明係關於阿茲海默症及其他神經退化性疾病之生物標記及診斷及預後方法。本發明亦提供用於偵測該生物標記之組合物以及適用於治療阿茲海默症及其他神經退化性疾病之組合物及方法。

The present invention relates to biomarkers and diagnostic and prognostic methods for Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. The invention also provides compositions for detecting the biomarker as well as compositions and methods useful for treating Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders.



I788704

## 【發明摘要】

## 【中文發明名稱】

分析個體樣品之方法

## 【英文發明名稱】

METHOD OF ANALYZING SAMPLE FROM SUBJECT

## 【中文】

本發明係關於阿茲海默症及其他神經退化性疾病之生物標記及診斷及預後方法。本發明亦提供用於偵測該生物標記之組合物以及適用於治療阿茲海默症及其他神經退化性疾病之組合物及方法。

## 【英文】

The present invention relates to biomarkers and diagnostic and prognostic methods for Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. The invention also provides compositions for detecting the biomarker as well as compositions and methods useful for treating Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders.

## 【指定代表圖】

無

## 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

分析個體樣品之方法

### 【英文發明名稱】

METHOD OF ANALYZING SAMPLE FROM SUBJECT

### 【技術領域】

本發明係關於用於阿茲海默症及其他神經退化性疾病之生物標記及診斷及預後方法。本發明亦提供用於偵測該生物標記之組合物以及適用於治療阿茲海默症及其他神經退化性疾病之組合物及方法。

### 【先前技術】

有超過 540 萬美國人且在全世界有 3500 萬人患有阿茲海默症，其為癡呆之最常見形式。目前，診斷阿茲海默症之唯一確定方式為在患者死亡後直接檢查腦組織。醫生使用腦成像、行為評估、精神測試及其他手段來診斷疑似患有阿茲海默症之患者的病症，但該等手段皆不具有高精確度，且其中許多種較為昂貴或不實用。

因此，此項技術中需要用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病之生物標記及方法。另外，此項技術中需要用於偵測生物標記之組合物以及適用於治療阿茲海默症及其他神經退化性疾病之組合物及方法。本發明藉由提供用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病之非侵入性精確方法來滿足此需求。本發明進一步提供用於診斷、預後、預測及治療阿茲海默症及其他神經退化性疾病之新穎方法、分析

法、套組及組合物。

### 【發明內容】

本發明提供診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益的方法，其包含：分析來自該個體之生物樣品中之一或多個生物標記的含量；及基於生物標記之含量，診斷或預後個體之神經退化性疾病，鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體，或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中的效益，其中該一或多個生物標記中之至少一者係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、組織蛋白酶D (CTSD)、1型溶酶體相關膜蛋白(LAMP1)、泛素化蛋白(UBP)、熱休克蛋白70 (HSP70)、神經元特異性烯醇酶(NSE)、神經纖毛輕鏈(NFL)、CD9、CD63、CD81及CD171。在一些實施例中，將該生物樣品中之一或多個生物標記之含量與對照樣品中之一或多個生物標記之含量相比較，且其中該生物樣品之一或多個生物標記之含量與對照樣品相比有所升高。在其他實施例中，神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆(Lewy body dementia)、纏結為主型老年癡呆、皮克症(Pick's disease, PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症(Guam parkinsonism-dementia complex)、FTDP-17、利替可-波帝格症(Lytico-Bodig disease)、多發性硬化、創

傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在其他實施例中，生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子(buccal swab)、皮膚、腦組織及腦脊髓液。在又其他實施例中，磷酸化Tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr394。在其他實施例中，磷酸化Tau之含量係藉由分析磷酸化Tau聚核苷酸、磷酸化Tau多肽之含量或磷酸化Tau活性之水準來測定。在又其他實施例中，磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，磷酸化IRS-1係在選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群的一或多個殘基上經磷酸化。在其他實施例中，磷酸化IRS-1之含量係藉由分析磷酸化IRS-1聚核苷酸、磷酸化IRS-1多肽之含量或磷酸化IRS-1活性之水準來測定。在其他實施例中，該方法進一步包含自生物樣品分離囊泡。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體(exosome)、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在某些實施例中，經分離之外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在其他實施例中，一或多個生物標記之含量為該一或多個生物標記之蛋白質、磷酸化蛋白質、mRNA或miRNA含量。

本發明亦提供診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患

神經退化性疾病之風險下之個體或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中的效益的方法，其包含：自獲自個體之生物樣品分離囊泡；及測定囊泡中之一或多個生物標記的含量，其中該樣品中之該一或多個生物標記之含量與對照樣品中之該一或多個生物標記之含量相比有所升高指示神經退化性疾病，其中該一或多個生物標記中之至少一者係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在其他實施例中，囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在一些實施例中，神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在其他實施例中，生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦組織及腦脊髓液。在又其他實施例中，磷酸化tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在其他實施例中，磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr

394。在又其他實施例中，磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在其他實施例中，磷酸化IRS-1係在選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群的一或多個殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，經分離之外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在其他實施例中，自生物樣品分離囊泡包含：使生物樣品與試劑在該生物樣品中所存在之囊泡與該試劑結合以形成囊泡-試劑複合物的條件下接觸；及自該囊泡-試劑複合物分離該囊泡以獲得含有該囊泡之樣品，其中該樣品中所存在之囊泡之純度大於該生物樣品中所存在之囊泡之純度。在其他實施例中，自生物樣品分離囊泡包含：自該生物樣品分離囊泡以獲得囊泡樣品；使該囊泡樣品與試劑在該囊泡樣品中所存在之囊泡與該試劑結合以形成囊泡-試劑複合物的條件下接觸；及自該囊泡-試劑複合物分離該囊泡以獲得含有該囊泡之樣品，其中該樣品中所存在之囊泡之純度大於該生物樣品中所存在之囊泡之純度。在某些態樣中，該試劑為抗體、凝集素、配位體、可溶性受體、結合蛋白或寡核苷酸。在其他態樣中，該抗體為多株或單株抗體。在又其他態樣中，該抗體為單株NCAM抗體。在其他態樣中，該抗體為單株抗人NCAM抗體。在又其他態樣中，該抗體為單株CD171抗體。在其他態樣中，該抗體為單株抗人CD171抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD9抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD63抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD81抗體。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在其他實施例

中，該一或多個生物標記之含量為該一或多個生物標記之蛋白質、磷酸化蛋白質、mRNA或miRNA含量。

本發明提供診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益的方法，其包含：自個體獲得生物樣品；將囊泡特異性抗體應用於該樣品，其中該囊泡之存在使得產生抗體-囊泡複合物；分離抗體-囊泡複合物；分析抗體-囊泡複合物中之一或多個生物標記之含量；及基於該一或多個生物標記之含量，診斷或預後個體之神經退化性疾病，鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體，或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益，其中該等生物標記中之至少一者係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在一些實施例中，該抗體-囊泡複合物係在固相上產生。在又其他實施例中，該方法進一步包含自抗體-囊泡複合物釋放囊泡。在某些實施例中，該固相為非磁性珠粒、磁性珠粒、瓊脂糖(agarose)或瓊脂糖(sepharose)。在其他實施例中，藉由將抗體-囊泡複合物曝露於3.5至1.5之低pH值下來釋放囊泡。在又其他實施例中，藉由添加高pH值溶液來中和所釋放之囊泡。在其他實施例中，藉由將所釋放之囊泡與溶解溶液一起培育來溶解所釋放之囊泡。在再其他實施例中，溶解溶液含有蛋白酶及磷酸酶之抑制劑。在其他實施例中，藉由囊泡之數目或囊泡生物標記之值校正該一或多個生物標記之含量。在其他實施例中，該等囊泡係選自由



以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在某些實施例中，該抗體為多株或單株抗體。在其他實施例中，該抗體為單株NCAM抗體。在其他實施例中，抗體為單株抗人NCAM抗體。在又其他態樣中，該抗體為單株CD171抗體。在其他態樣中，該抗體為單株抗人類CD171抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD9抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD63抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD81抗體。在一些實施例中，該等外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在其他實施例中，該磷酸化tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。在其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群的一或多個殘基上經磷酸化。在又其他實施例中，該生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦組織及腦脊髓液。在一些實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎

縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在其他實施例中，該一或多個生物標記之含量為該一或多個生物標記之蛋白質、磷酸化蛋白質、mRNA或miRNA含量。

本發明提供用於評定個體之神經退化性疾病狀況的生物標記組，其包含一或多個生物標記，其中分析該組中之生物標記之含量；且其中該生物標記含量決定個體之神經退化性疾病狀況，特異性為至少40%，其中該生物標記組中之至少一或多者係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在一些實施例中，該生物標記含量決定個體之神經退化性疾病狀況，特異性為至少40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。在一些實施例中，該生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦脊髓液。在其他實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在又其他實施例中，該方法進一步包含分析來自

樣品之囊泡中之生物標記含量。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。

本發明亦提供用於診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體，或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益的套組，該套組包含一或多種特異性結合囊泡之試劑、一或多種特異性結合生物標記之試劑、一或多個用於收集及或容納生物樣品之容器及其使用說明書，其中該神經退化性疾病與生物標記含量改變相關，且其中該生物標記係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在一些實施例中，該等試劑為多株或單株抗體。在其他實施例中，該等抗體為單株NCAM抗體。在其他實施例中，該抗體為單株抗人類NCAM抗體。在又其他態樣中，該抗體為單株CD171抗體。在其他態樣中，該抗體為單株抗人類CD171抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD9抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD63抗體。在其他態樣中，該抗體為單株CD81抗體。在某些實施例中，該等外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在其他實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆

(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在又其他實施例中，該生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦脊髓液。在再其他實施例中，該磷酸化tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在其他實施例中，該磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。在再其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群的一或多個殘基上經磷酸化。在其他實施例中，該等套組進一步包含用於分析樣品中之生物標記含量的電腦模型或算法。

本發明亦提供用於診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體，或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益的套組，該套組包含一或多種特異性結合囊泡之試劑、一或多種用於偵測生物標記mRNA或miRNA之探針或引子、一或多個用於收集及或容納生物樣品之容器及其使用說明書，其中該神經退化性疾病與生物標記含量改變相關，且其中該生物標記係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-

43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在一些實施例中，該等試劑為多株或單株抗體。在其他實施例中，該等外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在又其他實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在再其他實施例中，該生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦脊髓液。在其他實施例中，該磷酸化tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。在其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群的一或多個殘基上

經磷酸化。在其他實施例中，該等套組進一步包含用於分析樣品中之生物標記含量的電腦模型或算法。

在其他實施例中，本發明提供診斷個體之神經退化性疾病之方法，其包含以下步驟：(i)自該個體獲得含有囊泡之測試生物樣品，(ii)量測該測試生物樣品中之一或多個生物標記之含量，(iii)將該測試生物樣品中之該一或多個生物標記之含量與對照生物樣品中之該一或多個生物標記之對照含量進行比較，及(iv)藉由偵測到該測試生物樣品中之該一或多個生物標記之含量相對於對照生物樣品有所增加來確定個體患有神經退化性疾病，其中該一或多個生物標記中之至少一者係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在一些實施例中，該等外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在其他實施例中，該磷酸化tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr394。在其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在

選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群的一或多個殘基上經磷酸化。在又其他實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在再其他實施例中，該生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦脊髓液。在其他實施例中，該磷酸化tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在其他實施例中，該方法進一步包含自該生物樣品分離囊泡。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。

在其他實施例中，本發明提供用於分析來自個體之樣品的方法，其包含以下步驟：(i)自個體獲得包含囊泡之生物樣品，(ii)量測該生物樣品中之一或多個生物標記之含量，及(iii)將該生物樣品中之該一或多個生物標記之含量與對照生物樣品中之該一或多個生物標記之對照含量進行比較。在一些實施例中，該個體已經診斷患有或疑似患有神經退化性疾病。在其他實施例中，該方法進一步包含診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別個體患神經退化性疾病之風險性或制定治療方案或預測療法在患有或疑似患有神經退化性疾病之個體中之

效益。在某些實施例中，該一或多個生物標記中之至少一者係選自由以下組成之群：Tau、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在一些實施例中，將該生物樣品中之該一或多個生物標記之含量與對照樣品中之該一或多個生物標記之含量相比較，且其中該生物樣品之該一或多個生物標記之含量與對照樣品相比有所升高。在其他實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元症、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森症。在其他實施例中，該生物樣品係選自由以下組成之群：全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦組織及腦脊髓液。在又其他實施例中，該磷酸化Tau係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化Tau係在選自由以下組成之群的一或多個殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。在其他實施例中，該磷酸化Tau之含量係藉由分析磷酸化Tau聚核苷酸、磷酸化Tau多肽之含量或磷酸化Tau活性之水準來測定。在又其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘



基上經磷酸化。在再其他實施例中，該磷酸化IRS-1係在選自由P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1組成之群之一或多個殘基上經磷酸化。在其他實施例中，該磷酸化IRS-1之含量係藉由分析磷酸化IRS-1聚核苷酸、磷酸化IRS-1多肽之含量或磷酸化IRS-1活性之水準來測定。在其他實施例中，該方法進一步包含將囊泡自生物樣品分離。在其他實施例中，該等囊泡係選自由以下組成之群：外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體。在某些實施例中，該等經分離之外泌小體係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。在其他實施例中，該方法進一步包含測定P-S312-IRS-1與P-panY-IRS-1之比率(R或胰島素抗性指數)。在其他實施例中，本發明之方法進一步包含用於分析樣品中之一或多個生物標記含量的電腦模型或算法。在其他實施例中，該一或多個生物標記之含量為該一或多個生物標記之蛋白質、磷酸化蛋白質、mRNA或miRNA含量。

根據本文中之揭示內容，熟習此項技術者將容易想到本發明之此等及其他實施例，且特定地涵蓋所有該等實施例。

本發明之各限制可涵蓋本發明之各種實施例。因此，預期本發明之各態樣中可包括涉及任一要素或要素組合的本發明之各限制。本發明在其應用方面不受以下發明描述中所闡述之組分之構建及安排的細節限制。本發明能夠以其他方式實施或以各種方式實踐或執行。此外，本文中所使用之措詞及術語皆出於描述之目的且不應被視為限制性的。在本文中，使用「包括(including)」、「包含(comprising)」或「具有(having)」、「含有(containing)」、「涉及(involving)」及其變化形

式意欲涵蓋在其後所列出之項目及其等效物以及額外項目。必須注意，除非上下文另外明確規定，否則如本文中及所附申請專利範圍中所使用之單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個參考物。

### 【實施方式】

### [相關申請案]

本申請案主張2013年10月24日申請之美國臨時專利申請案第61/895,376號、2014年4月14日申請之美國臨時專利申請案第61/978,994號及2014年9月8日申請之美國臨時專利申請案第62/047,062號之優先權，該等申請案以全文引用之方式併入本文中。

應理解，本發明並不限於本文中所描述之特定方法、方案、細胞株、分析法及試劑，因為此等內容可變化。亦應理解，本文中所使用之術語意欲描述本發明之特定實施例，且不意欲以任何方式限制如所附申請專利範圍中所闡述之本發明範疇。

必須注意，除非上下文另外明確規定，否則如本文中及所附申請專利範圍中所用之單數形式「一」及「該」包括複數個參考物。因此，例如參考物「一個片段(a fragment)」包括複數個此種片段，參考物一種「抗體(antibody)」係指熟習此項技術者已知之一或多種抗體及其等效物，諸如此類。

除非另外界定，否則本文中所使用之所有技術及科學術語具有與一般熟習本發明所屬之技術者通常所理解的意義相同的意義。儘管類似或等效於本文中描述之彼等方法及材料之任何方法及材料可用於實行或測試本發明，但現在描述較佳方法、裝置及材料。在本文中所引用之所有出版物皆以全文引用之方式併入本文中，以便描述及揭示

可連同本發明一起使用之公開案中所報導之方法、試劑及工具。不應認為本文中承認本發明無權先於先前發明之此種揭示內容。

除非另外指示，否則將採用本領域之技術範圍內的習知化學、生物化學、分子生物學、細胞生物學、遺傳學、免疫學及藥理學方法來實踐本發明。該等技術已於文獻中充分解釋。參見例如 Gennaro, A.R. 編 (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, Mack Publishing Co.; Colowick, S. 等人 編, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc.; *Handbook of Experimental Immunology*, 第 I-IV 卷 (D.M. Weir 及 C.C. Blackwell 編, 1986, Blackwell Scientific Publications); Maniatis, T. 等人 編 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, 第 I-III 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. 等人 編 (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 第 4 版, John Wiley & Sons; Ream 等人 編 (1998) *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, Academic Press; PCR (*Introduction to Biotechniques Series*), 第 2 版 (Newton 及 Graham 編, 1997, Springer Verlag)。

本發明部分係關於發現可分析外泌小體生物標記以鑑別患有或可能罹患神經退化性疾病之個體，該等疾病包括例如阿茲海默症 (AD)、多發性硬化 (MS) 及額顳葉型癡呆 (FTD)。

本發明部分係基於發現在患有神經退化性疾病 (例如阿茲海默症) 之個體之循環中所存在的神經元衍生外泌小體中，某些生物標記意外增加。本發明顯示可分析此等生物標記之外泌小體含量以診斷患有神經退化性疾病之個體之神經退化性疾病。本發明進一步顯示，對來自

個體之神經元衍生外泌小體中之某些生物標記進行量測可用於預測神經退化性疾病之後續發展(例如鑑別處於罹患神經退化性疾病之風險下之個體)。

本發明提供一組用於評定個體之神經退化狀況的生物標記。在此實施例中，分析生物標記含量，且生物標記含量決定個體之神經退化狀況，其特異性為至少40%。

本發明亦提供用於本文中所描述之方法的組合物。該等組合物可包括小分子化合物：肽及蛋白質，包括其抗體或功能活性片段；及聚核苷酸，包括小干擾核糖核酸(siRNA)、微RNA (miRNA)、核糖核酸酶及反義序列。(參見例如Zeng (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:9779-9784；及Kurreck (2003) Eur J Biochem 270:1628-1644。)

本發明進一步提供用於診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體或制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益的套組。在此等實施例中，該等套組包含一或多種特異性結合外泌小體之抗體、一或多種特異性結合生物標記之抗體、一或多個用於收集及或容納生物樣品之容器及套組使用說明書。

在本文中，章節標題僅用於組織目的，且不應被視為以任何方式限制本文中所描述之主題。

## 生物樣品

本發明提供用於阿茲海默症及其他神經退化性疾病之生物標記以及診斷及預後方法。測定獲自個體之生物樣品中之生物標記含量。在一些實施例中，本發明之生物樣品可自血液獲得。在一些實施例

中，自個體抽取約1-10 mL血液。在其他實施例中，自個體抽取約10-50 mL血液。血液可抽取自身體之任何合適區域，包括手臂、腿部或經由中央靜脈導管可接取的血液。在一些實施例中，在處理或活動後收集血液。medical exam舉例而言，可在健康檢查後收集血液。亦可協調收集時序以增加存在於樣品中之外泌小體的數目及/或組成。舉例而言，可在運動或誘導血管擴張之處理後收集血液。

血液在收集後可與各種組分組合，以保存或製備用於後續技術之樣品。舉例而言，在一些實施例中，血液在收集後用抗凝血劑、細胞固定劑、蛋白酶抑制劑、磷酸酶抑制劑、蛋白質、DNA或RNA防腐劑處理。在一些實施例中，經由靜脈穿刺，使用含有諸如EDTA或肝素之抗凝血劑的真空收集管收集血液。亦可使用塗覆有肝素之注射器及皮下注射針收集血液。亦可將血液與將適用於細胞培養之組分組合。舉例而言，在一些實施例中，將血液與細胞培養基或經補充細胞培養基(例如細胞激素)組合。

生物樣品亦可獲自本領域中已知之其他來源，包括全血、血清、血漿、尿液、間質液、腹膜液、子宮頸拭子、淚液、唾液、頰拭子、皮膚、腦脊髓液或包括例如腦組織之其他組織。

### **富集或分離囊泡(外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡及核外粒體)**

可使樣品經由正向選擇、負向選擇或正向及負向選擇之組合來富集囊泡。在一些實施例中，直接捕捉囊泡。在其他實施例中，捕捉血細胞且自剩餘生物樣品中收集囊泡。在一些實施例中，在生物樣品中富集之囊泡為外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡或核外

粒體。在一些實施例中，在生物樣品中富集之囊泡為神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。

亦可基於囊泡之生物化學性質之差異使樣品富集囊泡。舉例而言，可使樣品基於抗原、核酸、代謝、基因表現或後生差異來富集囊泡。在一些基於抗原差異之實施例中，在利用流動式細胞量測術下，使用呈磁場梯度之抗體結合磁性或順磁珠粒或經螢光標記之抗體。在一些基於核酸差異之實施例中，使用流動式細胞量測術。在一些基於代謝差異之實施例中，使用藉由流動式細胞量測術或其他分選技術所量測之染料攝取/排除率。在一些基於基因表現之實施例中，使用具有細胞激素之細胞培養物。亦可基於本領域中已知之其他生物化學性質使樣品富集囊泡。舉例而言，可使樣品基於pH值或運動性來富集囊泡。此外，在一些實施例中，使用一種以上之方法以富集囊泡。在其他實施例中，使用抗體、配位體或可溶性受體使樣品富集囊泡。

在其他實施例中，使用表面標記在樣品中正向富集囊泡。在一些實施例中，囊泡為外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡或核外粒體。在其他實施例中，使用NCAM、CD171、CD9、CD63、CD81、不同的神經元或星形細胞黏附蛋白、微神經膠質細胞CD18/11或CD3T細胞膜細胞表面標記以富集外泌小體。在一些實施例中，使用不存在於囊泡群體上之細胞表面標記，以藉由耗盡細胞群體來負向富集囊泡。亦可使用流動式細胞量測術分選，以使用與螢光標記結合之細胞表面標記或細胞內或細胞外標記來進一步富集外泌小體。細胞內及細胞外標記可包括核染色劑或針對優先表現於囊泡中之細胞內或

細胞外蛋白質之抗體。細胞表面標記可包括針對優先表現於外泌小體上之細胞表面抗原(例如NCAM)之抗體。在一些實施例中，細胞表面標記為神經元衍生外泌小體表面標記，包括例如NCAM或CD171。在一些實施例中，使用單株NCAM、CD9、CD63、CD81或CD171抗體以自樣品富集或分離外泌小體。在某些態樣中，NCAM、CD9、CD63、CD81或CD171抗體經生物素標記。在此實施例中，經生物素標記之NCAM或CD171抗體可形成抗體-外泌小體複合物，該複合物可隨後使用抗生蛋白鏈菌素-瓊脂糖樹脂或珠粒分離。在其他實施例中，NCAM、CD9、CD63、CD81或CD171抗體為單株抗人NCAM、CD9、CD63、CD81或CD171抗體。

在一些實施例中，隨後使自生物樣品富集之囊泡富集特定類型之囊泡。舉例而言，使生物樣品富集外泌小體，然後使富集之外泌小體隨後富集神經衍生外泌小體。在一些實施例中，使生物樣品富集囊泡之個別神經細胞源。在某些態樣中，囊泡之神經細胞源為微神經膠質細胞、神經元或星形細胞。

在其他實施例中，自生物樣品分離或富集囊泡，其包含：使生物樣品與試劑在該生物樣品中存在之囊泡與該試劑結合以形成囊泡-試劑複合物的條件下接觸；及將該囊泡自該囊泡-試劑複合物分離以獲得含有該囊泡之樣品，其中存在於該樣品中之囊泡之純度大於存在於該生物樣品中之囊泡之純度。在某些實施例中，試劑為抗體或凝集素。適用於形成囊泡-凝集素複合物之凝集素描述於美國專利申請公開案第2012/0077263號中。在一些實施例中，囊泡為外泌小體、微粒、微泡、奈米體、細胞外囊泡或核外粒體。在一些實施例中，外泌

小體為神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體或微神經膠質細胞衍生外泌小體。在一些實施例中，進行多個分離或富集步驟。在本發明實施例之某些態樣中，進行第一分離步驟以將外泌小體自血液樣品分離，且進行第二分離步驟以將神經衍生外泌小體與其他外泌小體分離。在其他實施例中，使用溶解試劑溶解囊泡-試劑複合物之囊泡部分，且分析經溶解之囊泡的蛋白質含量。在一些實施例中，抗體-囊泡複合物在固相上產生。在又其他實施例中，方法進一步包含自抗體-囊泡複合物釋放囊泡。在某些實施例中，固相為非磁性珠粒、磁性珠粒、瓊脂糖(agarose)或瓊脂糖凝膠(sepharose)。在其他實施例中，藉由將抗體-囊泡複合物曝露於3.5與1.5之間的低pH來釋放囊泡。在又其他實施例中，藉由添加高pH溶液中和經釋放之囊泡。在其他實施例中，藉由用溶解溶液培育釋放之囊泡來溶解釋放之囊泡。在再其他實施例中，溶解溶液含有蛋白酶及磷酸酶之抑制劑。

### 神經退化性疾病

本發明提供用於個體之神經退化性疾病診斷或預後、鑑別處於神經退化性疾病風險之個體或對患有神經退化性疾病之個體制定治療方案或預測療法效益的方法。

在一些實施例中，該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默氏症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆、纏結為主型老年癡呆、皮克氏症(PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元疾病、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症、



FTDP-17、利替可-波帝格症、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森氏症。

在一些實施例中，本發明使得開業醫師能夠診斷或預後個體之一或多種神經退化性疾病。在其他實施例中，本發明使得開業醫師能夠排除或去除一或多種神經退化性疾病作為一種診斷可能性。在又其他實施例中，本發明使得開業醫師能夠鑑別處於罹患神經退化性疾病之風險下之個體。在其他實施例中，本發明使得開業醫師能夠預測個體隨後是否會罹患神經退化性疾病。在其他實施例中，本發明使得開業醫師能夠制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中的效益。

## 生物標記

分析獲自患有或處於患有神經退化性疾病(例如阿茲海默症)風險下之個體的生物樣品中之生物標記含量。在一些實施例中，生物標記為磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、TDP-43、 $\alpha$ -突觸核蛋白、SOD-1、FUS、FKBP51、IRS-1、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在其他實施例中，磷酸化tau係在一或多個絲胺酸殘基處經磷酸化。在本發明實施例之某些態樣中，磷酸化tau係在選自由以下組成之群的至少一個絲胺酸殘基上經磷酸化：Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396及Ser-422。在其他實施例中，磷酸化tau係在一或多個蘇胺酸殘基上經磷酸化。在本發明實施例之某些態樣中，磷酸化tau係在選自由以下組成之群的至少一個蘇胺酸殘基上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205及Thr-231。在又其他實施例中，磷酸化tau係

在一或多個酪胺酸殘基上經磷酸化。在本發明實施例之某些態樣中，磷酸化tau係在選自由以下組成之群的至少一個酪胺酸殘基上經磷酸化：Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。在其他實施例中，使用針對一或多個磷酸化位點之抗體來測定或分析磷酸化tau含量。在本發明實施例之某些態樣中，本發明中所使用之抗體優先結合磷酸化tau，該磷酸化tau係在一或多個以下磷酸化位點上經磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。在其他實施例中，磷酸化IRS-1為P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1。

在一些實施例中，本發明之生物標記含量係藉由測定生物標記之基因表現加以量測。在某些實施例中，基因表現變化係藉由測定表1中所示之一或多個基因之表現量加以量測。在某些態樣中，生物標記之基因表現係使用PCR、微陣列或定序來測定。在一些實施例中，生物標記之表現量係藉由量測生物標記之mRNA或miRNA含量來測定。

一般技術者有若干種可用於偵測及分析本發明之標記的方法及裝置。關於患者測試樣品中之多肽或蛋白質，通常使用免疫分析裝置及方法。此等裝置及方法可將經標記之分子用於各種夾層競爭性或非競爭性分析型式中，以產生與相關分析物之存在或量相關的信號。另外，可採用某些方法及裝置，諸如生物感測器及光學免疫分析法，以測定分析物之存在或量，而不需要經標記之分子。

儘管其他方法已為熟習此項技術者所熟知(例如量測標記RNA含

量)，但較佳使用免疫分析法來分析標記。標記之存在或量一般係藉由使用對各標記具有特異性之抗體且偵測特異性結合來測定。可利用任何合適的免疫分析法，例如酶聯免疫分析法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、競爭性結合分析法、平面形波導技術及其類似方法。可直接或間接地偵測抗體與標記的特異性免疫結合。直接標記包括與抗體連接之螢光或發光標籤、金屬、染料、放射性核種及其類似物。間接標記包括此項技術中熟知之各種酶，諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶及其類似物。

本發明亦涵蓋使用對標記具有特異性之固定抗體。抗體可固定於多種固體支撐物上，諸如磁性或層析基質粒子、分析場所(諸如微量滴定孔)之表面、固體基質材料(諸如塑膠、耐綸、紙)片及其類似物。可藉由將抗體或複數個抗體以陣列形式塗覆於固體支撐物上來製備分析條。隨後可將此條浸入測試樣品中，且隨後藉由洗滌及偵測步驟進行快速處理以產生可量測信號，諸如著色點。

可用一份測試樣品分開地或同時地分析複數個標記。可將若干標記組合在一個測試中以便有效處理多個樣品。另外，熟習此項技術者應識別來自同一個體之多個樣品(例如在連續時間點)的測試值。此種對連續樣品進行測試將允許鑑別標記含量隨時間之變化。標記含量之增加或減少以及不存在標記含量變化將提供關於病症狀況之有用資訊，包括(但不限於)鑑別距事件起始之大致時間、可搶救組織之存在及量、藥物療法之適當性、各種療法之有效性、事件嚴重程度之鑑別、病症嚴重程度之鑑別及患者治療結果(包括未來事件之風險)之鑑別。

可構建由本發明中所提及之標記之組合組成的分析，以提供與差異性診斷相關之相關資訊。可使用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更多或單個標記來構建此種小組。可使用本發明中所描述之方法分析單一標記或包含更大標記小組之標記子集，以使臨床敏感性或各種臨床情形之特異性最佳化。P-S312-IRS-1與P-panY-IRS-1之比率(R或胰島素抗性指數)可用於預測神經退化性疾病之風險或診斷神經退化性疾病。

亦可以多種物理型式進行標記分析。舉例而言，使用微量滴定盤或自動化裝置可用於促進對大量測試樣品之處理。或者，可研發單樣品型式，以促進以適時方式(例如急救車輸送或急診室情形)進行即刻治療及診斷。尤其適用之物理型式包含具有複數個用於偵測複數個不同分析物之離散可定址位置之表面。該等型式包括蛋白質微陣列或「蛋白質晶片」及毛細管裝置。

本發明之生物標記在神經退化性疾病(例如阿茲海默症)之早期偵測及監測中起重要作用。該等疾病之標記典型地為身體樣品中所發現之可量測之物質。所量測之量可與潛在疾病或病症病理生理學、存在或不存在神經退化性疾病、未來患神經退化性疾病之機率相關。在接受對其病狀進行治療之患者中，所量測之量亦將與治療反應性相關。

在一些實施例中，生物標記係藉由選自由以下組成之群的方法加以量測：免疫組織化學法、免疫細胞化學法、免疫螢光法、免疫沈澱法、西方墨點法(western blotting)及ELISA。

## 臨床分析效能

本發明之方法可用於臨床分析，以診斷或預後個體之神經退化

性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體，及/或用於制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中的效益。臨床分析效能可藉由測定分析之敏感性、特異性、ROC曲線下面積(AUC)、精確度、陽性預測值(PPV)及陰性預測值(NPV)加以評定。本文中揭示用於診斷或預後個體之神經退化性疾病、鑑別處於患神經退化性疾病之風險下之個體，或用於制定治療方案或預測療法在患有神經退化性疾病之個體中之效益的分析法。

分析之臨床效能可基於敏感性。本發明之分析之敏感性可為至少約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。分析之臨床效能可基於特異性。本發明之分析之特異性可為至少約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。分析之臨床效能可基於ROC曲線下面積(AUC)。本發明之分析之AUC可為至少約0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95。分析之臨床效能可基於精確度。本發明之分析之精確度可為至少約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。

## 組合物

適用於本發明方法之組合物包括特異性識別與神經退化性疾病相關之生物標記的組合物，其中該生物標記為磷酸化tau、A $\beta$ 1-42、磷酸化IRS、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。在一些實施例中，該組合物提高至少一種tau或IRS-1磷酸酶之活性。在其他實施例中，該組合物降低至少一種tau

或IRS-1激酶之活性。在又其他實施例中，該組合物係選自由以下組成之群：肽、核酸、抗體及小分子。

在某些實施例中，本發明係關於特異性偵測與神經退化性疾病相關之生物標記的組合物。如本文中其他部分所詳述，本發明係基於發現磷酸化tau、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE及NFL為AD及其他神經退化性疾病之特異性生物標記。在一個實施例中，本發明之組合物特異性結合且偵測磷酸化tau。在一個實施例中，本發明之組合物特異性結合且偵測在tau上之一或多個絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基上經磷酸化之tau。在一些實施例中，本發明之組合物特異性結合在S396上經磷酸化(S396 tau磷酸化)之tau。在一些實施例中，本發明之組合物特異性結合在T181上經磷酸化(T181 tau磷酸化)之tau。在再其他實施例中，本發明之組合物特異性結合在一或多個選自由以下組成之群的殘基上經磷酸化之tau：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。本發明之組合物可包含抗體、肽、小分子、核酸及其類似物。在其他實施例中，本發明之組合物特異性結合且偵測磷酸化IRS-1。在一個實施例中，本發明之組合物特異性結合且偵測P-S312-IRS-1或P-panY-IRS-1。在其他實施例中，本發明之組合物特異性結合且偵測CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。

在一些實施例中，該組合物包含抗體，其中該抗體特異性結合本發明之生物標記或囊泡。如本文中所用及下文進一步論述之術語

「抗體」意欲包括該抗體之亦與生物標記或囊泡(例如外泌小體)具有特異性反應性之片段。可使用習知技術對抗體進行片段化，且用與上文針對完整抗體所描述相同之方式對該等片段進行效用篩檢。舉例而言，F(ab)<sub>2</sub>片段可藉由用胃蛋白酶處理抗體來產生。可處理所得F(ab)<sub>2</sub>片段以還原二硫橋，從而產生Fab片段。亦可藉由重組DNA技術或藉由對完整抗體進行酶或化學裂解來產生抗原結合部分。抗原結合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、dAb及互補決定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv)、單域抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類化抗體、雙功能抗體及多肽，其含有足以提供與多肽結合之特異性抗原之至少一部分免疫球蛋白。在某些實施例中，抗體進一步包含與其連接且能夠偵測到之標記(例如，標記可為放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子)。

在某些實施例中，本發明之抗體為單株抗體，且在某些實施例中，本發明使得可獲得用於產生特異性結合本發明之生物標記或外泌小體之新穎抗體的方法。舉例而言，用於產生特異性結合生物標記或外泌小體之單株抗體的方法可包含：向小鼠投與能有效刺激可偵測之免疫反應的量的包含該生物標記或外泌小體或其片段之免疫原性組合物，自該小鼠獲得抗體生產細胞(例如來自脾之細胞)，且將該等抗體生產細胞與骨髓瘤細胞融合，以獲得抗體生產融合瘤，且測試該等抗體生產融合瘤以鑑別產生特異性結合生物標記或外泌小體之單株抗體的融合瘤。獲得融合瘤後，可視情況在融合瘤衍生細胞可產生特異性結合生物標記或外泌小體之單株抗體的培養條件下使融合瘤在細胞培養物中繁殖。可自細胞培養物中純化單株抗體。

如關於抗體所使用之術語「具有特異性反應性」正如此項技術中通常所理解欲意謂該抗體在相關抗原(例如生物標記或外泌小體)與其他非相關抗原之間具有充分選擇性。在某些採用抗體之方法(諸如治療應用)中，可能需要更高程度之結合特異性。單株抗體與多株抗體相比一般更傾向於有效判別所要抗原與交叉反應多肽。影響抗體：抗原相互作用之特異性的一個特徵為抗體對抗原之親和力。儘管可利用一定範圍的不同的親和力來達到所要特異性，但一般較佳抗體之親和力(解離常數)將為約 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 或更小。

可產生抗體以特異性結合外泌小體之抗原決定基或本發明之生物標記，包括例如神經元衍生外泌小體、磷酸化Tau、A $\beta$ 1-42、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171。

另外，用於篩選抗體以便鑑別所要抗體之技術可能影響所獲得之抗體的性質。多種不同的技術可用於測試抗體與抗原之間的相互作用，以鑑別尤其理想之抗體。該等技術包括ELISA、表面電漿子共振結合分析法(例如Biacore結合分析法，Biacore AB，Uppsala，Sweden)、夾心分析法(例如IGEN International, Inc. (Gaithersburg，Md)的順磁珠粒系統)、西方墨點法、免疫沈澱分析法、免疫細胞化學法及免疫組織化學法。

在一些實施例中，本發明係關於用於治療或預防神經退化性疾病之組合物。如本文中其他部分所詳述，本發明係基於發現tau磷酸化牽涉多種神經退化性疾病(例如阿茲海默症)之病理學。因此，在一個實施例中，本發明提供防止tau磷酸化之組合物。在一個實施例



中，該等組合物防止在tau上之一或多個絲胺酸殘基上發生tau磷酸化。在其他實施例中，該等組合物防止在tau上之一或多個蘇胺酸殘基上發生tau磷酸化。在其他實施例中，該等組合物防止在tau上之一或多個酪胺酸殘基上發生tau磷酸化。在另一實施例中，本發明提供減輕tau磷酸化之組合物。在一個實施例中，該等組合物減輕在tau上之一或多個絲胺酸、蘇胺酸及/或酪胺酸殘基上發生tau磷酸化。在又其他實施例中，該等組合物減輕在選自由以下組成之群的一或多個殘基上發生tau磷酸化：Thr-153、Thr-181、Thr-205、Thr-231、Ser-199、Ser-202、Ser-214、Ser-235、Ser-262、Ser-356、Ser-396、Ser-422、Tyr18、Tyr29、Tyr197、Tyr310及Tyr 394。

在一些實施例中，本發明係關於用於治療或預防神經退化性疾病之組合物。如本文中其他部分所詳述，本發明係基於發現IRS-1磷酸化牽涉多種神經退化性疾病(例如阿茲海默症)之病理學。因此，在一個實施例中，本發明提供防止IRS-1磷酸化之組合物。在另一實施例中，本發明提供減輕IRS-1磷酸化之組合物。

適用於防止及/或減輕tau或IRS-1磷酸化之組合物包括蛋白質、肽、核酸、小分子及其類似物。

## 治療方法

本發明提供治療個體之神經退化性疾病之方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，其中該組合物減輕tau及/或IRS-1磷酸化程度。在其他實施例中，該組合物增強至少一種tau或IRS-1磷酸酶之活性。在又其他實施例中，該組合物降低至少一種tau或IRS-1激酶之活性。在其他實施例中，該組合物係選自由以下組成之群：肽、核酸、

抗體及小分子。在其他實施例中，本發明提供治療個體之神經退化性疾病之方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，其中該組合物減少CTSD、LAMP1或UBP之含量。在又其他實施例中，本發明提供治療個體之神經退化性疾病之方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，其中該組合物增加HSP70之含量。在其他實施例中，本發明提供治療個體之神經退化性疾病之方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，其中該組合物針對參考含量將磷酸化tau、A $\beta$ 1-42、磷酸化IRS-1、CTSD、LAMP1、UBP、HSP70、NSE、NFL、CD9、CD63、CD81及CD171之含量標準化。

## 套組

本發明之另一態樣涵蓋用於偵測或監測個體之神經退化性疾病的套組。本發明涵蓋具有不同組分之多種套組。一般而言，該套組將包括用於對個體體內之一或多個生物標記進行定量之構件。在另一實施例中，該套組將包括用於收集生物樣品之構件、用於對生物樣品中之一或多個生物標記進行定量之構件及套組內含物之使用說明書。在某些實施例中，該套組包含用於富集或分離生物樣品中之外泌小體之構件。在其他態樣中，用於富集或分離外泌小體之構件包含自生物樣品富集或分離外泌小體所必需的試劑。在某些態樣中，該套組包含用於對生物標記之量進行定量的構件。在其他態樣中，用於對生物標記之量進行定量的構件包含偵測生物標記之量所必需的試劑。

表1

基因	英特茲基因(Entrez Gene)名稱	位置
微管相關蛋白tau	MAPT	染色體17，NC_000017.11 (45894336..46028334)
澱粉樣蛋白 $\beta$ (A4)前驅蛋白質	APP	染色體21，NC_000021.9 (25880550..26171128)
TAR DNA結合蛋白43	TARDBP	染色體1，NC_000001.11 (11012622..11025492)
$\alpha$ -突觸核蛋白	SNCA	染色體4，NC_000004.12 (89724099..89838296)
超氧化歧化酶1	SOD1	染色體21，NC_000021.9 (31659622..31668931)
FUS RNA結合蛋白	FUS	染色體16，NC_000016.10 (31180110..31194871)
FK506結合蛋白51	FKBP51	染色體6，NC_000006.12 (35573585..35728583)
胰島素受體基質1	IRS1	染色體2，NC_000002.12 (226731317..226799829)
組織蛋白酶D	CTSD	染色體11，NC_000011.10 (1752752..1763992)
溶酶體相關膜蛋白1	LAMP1	染色體13，NC_000013.11 (113297154..113323426)
泛素B	UBB	染色體17，NC_000017.11 (16380793..16382745)
泛素C	UBC	染色體12，NC_000012.12 (124911646..124915041)
泛素A-52殘基核糖體蛋白融合產物1	UBA52	染色體19，NC_000019.10 (18563766..18577460)
核糖體蛋白S27a	RPS27A	染色體2，NC_000002.12 (55231903..55235853)
熱休克70kDa蛋白1A	HSPA1A	染色體6，NC_000006.12 (31815514..31817942)
熱休克70kDa蛋白4	HSPA4	染色體5，NC_000005.10 (133051970..133105017)
烯醇酶2 ( $\gamma$ ，神經元)	ENO2	染色體12，NC_000012.12 (6914450..6923696)
神經纖毛，輕多肽	NEFL	染色體8，NC_000008.11 (24950955..24956869，補體)

鑒於本文中之揭示內容，一般技術者將容易想到本發明之此等及其他實施例。

## 實例

參考以下實例將進一步理解本發明，該等實例僅意欲為本發明之例示性實例。提供此等實例僅用於說明所主張之發明。本發明之範疇不受所例示之實施例限制，該等實施例僅意欲作為本發明之單一態樣之說明。在功能上等效之任何方法皆在本發明之範疇內。根據前述發明描述，本發明之各種修改以及本文中所述之修改對於熟習此項技術者而言將變得顯而易見。該等修改意欲在所附申請專利範圍之範疇內。

### **實例1：患有阿茲海默症之人類個體體內的神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau及A $\beta$ 1-42含量**

如下分析患有阿茲海默症(AD)之人類個體體內的磷酸化Tau及A $\beta$ 1-42蛋白質之含量。自對照個體(n=20)及患有AD之個體(n=20)收集十毫升靜脈血。在AD個體意識上完好時收集第一血液樣品。在AD個體已罹患可能的AD後，收集第二血液樣品。藉由標準臨床及實驗室準則建立AD診斷。

對於血液收集，自各個體取得10 ml靜脈血，且在37°C下保持45分鐘且在4°C下以1,000×g離心20分鐘以獲得血清，在-80°C下以0.5 ml等分試樣儲存該血清。接下來，將0.5 ml各血清樣品與0.5 ml不含鈣及鎂之杜爾貝科平衡鹽溶液(Dulbecco's balanced salt solution, DBS)混合，該溶液含有兩倍建議濃度之蛋白酶抑制劑混合物(Roche Applied Sciences, Inc., Indianapolis, IN)、磷酸酶抑制劑混合物(Pierce Halt, Thermo Scientific, Inc., Rockford, IL)；且在室溫下培育15分鐘。

對於血漿，0.5 ml血漿接收0.1 mL凝血活酶-D (Fisher Scientific, Inc., Hanover Park, IL)，隨後在室溫下培育30分鐘且以1,500×g離心5

分鐘。隨後將0.4 ml含有2.5倍建議濃度之蛋白酶及磷酸酶抑制劑混合物的DBS添加至各上清液。

將此等血清及血漿上清液與252  $\mu$ l之快速提取外泌小體沈澱溶液(EXOQ; System Biosciences, Inc., Mountainview, CA)完全混合，且將混合物在4°C下培育1小時。將所得外泌小體懸浮液在4°C下以1,500 $\times$ g離心30分鐘，移除上清液且將各外泌小體集結粒再懸浮於250  $\mu$ l之具有蛋白酶及磷酸酶抑制劑混合物之DBS中，以便對來自於神經來源之外泌小體進行免疫化學富集。接下來，各樣品接收2  $\mu$ g之小鼠抗人NCAM抗體(ERIC 1, sc-106, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)，其先前已用EZ-Link磺酸基-NHS-生物素系統(Thermo Scientific, Inc.)進行生物素標記。在4°C下2小時後，將20  $\mu$ l之抗生蛋白鏈菌素-瓊脂糖樹脂(Thermo Scientific, Inc.)添加至各樣品，隨後在4°C下在搖動下培育1小時。隨後將樣品在4°C下以200 g離心10分鐘，移除上清液且使各集結粒再懸浮於250  $\mu$ l之具有蛋白酶及磷酸酶抑制劑之混合物的ELISA結合緩衝液(System Biosciences, Inc.)中。

藉由針對人類CD81之ELISA套組(System Biosciences, Inc.及Hölzel Diagnostika, Cologne, Germany)對神經元衍生外泌小體蛋白質進行定量，同時根據供應商之指導，用人類純化重組CD81抗原(Origene Technologies, Inc., Rockville, MD)、人類A $\beta$ 1-42、總人類tau及人類磷酸化tau [pS396] (Life Technologies/Invitrogen, Camarillo, CA)及人類磷酸化tau[pT181] (Innogenetics, Inc., Alpharetta, GA)驗證抗原。

如下表2中所示，患有AD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體

磷酸化Tau (pS396)含量與對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。類似地，患有AD之個體體內的血清外泌小體A $\beta$ 1-42含量與對照含量相比顯著增加。AD與對照個體之間的血清外泌小體總Tau含量無顯著差異。

**表2**

組	總Tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)	pS396 Tau (pg/ml)
AD (n = 20)	290 $\pm$ 160	14.28 $\pm$ 4.61 <sup>+</sup>	13.46 $\pm$ 10.38*
對照組(n = 20)	298 $\pm$ 125	9.61 $\pm$ 2.92	1.46 $\pm$ 0.35

平均值 $\pm$ 標準差；\* $p < 0.0001$ ，與對照組相比， $+p = 0.0005$ ，藉由雙尾非配對t檢驗。

此等結果顯示神經元衍生血清外泌小體A $\beta$ 1-42及磷酸化Tau之含量適用於鑑別患有AD之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

進行第二系列實驗，以測定患有早期阿茲海默症(亦即最輕度認知障礙，MCI)及晚期阿茲海默症之人類個體體內的磷酸化Tau及A $\beta$ 1-42蛋白質之含量。自患有早期AD之個體(n=10)及患有晚期AD之個體(n=8)收集10 ml靜脈血。如上所述處理血液樣品，且使用上文所述之ELISA套組對神經元衍生外泌小體蛋白質A $\beta$ 1-42、Tau及磷酸化Tau之含量進行定量。

如下表3中所示，早期AD及晚期AD之神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau(pS396)含量類似。早期AD及晚期AD之血清外泌小體A $\beta$ 1-42含量亦類似。

表3

組	總Tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)	pS396 Tau (pg/ml)
早期AD (n = 10)	315 $\pm$ 152	13.76 $\pm$ 4.27	13.81 $\pm$ 9.30
晚期AD (n = 8)	305 $\pm$ 96	13.44 $\pm$ 3.11	13.83 $\pm$ 13.30

值為平均值 $\pm$ 標準差

此等結果顯示神經元衍生血清外泌小體A $\beta$ 1-42及磷酸化Tau之含量適用於鑑別患有早期AD或晚期AD之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

### 實例2：患有阿茲海默症之人類個體體內的神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau含量

如下分析患有阿茲海默症(AD)之人類個體體內的神經元衍生外泌小體磷酸化Tau蛋白含量。自患有AD之人類個體收集血液樣品且如以上實例1中所述加以處理，不同之處在於，在進行神經元衍生外泌小體富集後，分析樣品中之以下磷酸化Tau蛋白：pSer-199 Tau、pSer-202 Tau、pSer-214 Tau、pSer-235 Tau、pSer-262 Tau、pSer-356 Tau、pSer-422 Tau、pThr-153 Tau、pThr-181 Tau、pThr-205 Tau或pThr-231 Tau。

神經元衍生外泌小體磷酸化Tau含量與對照含量相比顯著增加。此等結果顯示神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau含量適用於鑑別患有AD之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

### 實例3：患有多發性硬化之人類個體體內的神經元衍生血清外泌小體蛋白含量

如下分析患有多發性硬化(MS)之人類個體體內的磷酸化Tau蛋白

含量。自患有MS之人類個體收集血液樣品且如以上實例1中所述加以處理，不同之處在於，在進行神經元衍生外泌小體富集後，分析樣品中之以下外泌小體蛋白：pSer-199 Tau、pSer-202 Tau、pSer-214 Tau、pSer-235 Tau、pSer-262 Tau、pSer-356 Tau、pSer-396 Tau、pSer-422 Tau、pThr-153 Tau、pThr-181 Tau、pThr-205 Tau或pThr-231 Tau。

神經元衍生外泌小體磷酸化Tau含量與對照含量相比顯著增加。此等結果顯示神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau含量適用於鑑別患有MS之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷多發性硬化及其他神經退化性疾病。

#### **實例4：患有額顳葉型癡呆之人類個體體內的神經元衍生血清外泌小體蛋白含量**

如下分析患有額顳葉型癡呆(FTD)之人類個體體內的磷酸化Tau蛋白含量。自患有FTD之人類個體收集血液樣品且如以上實例1中所述加以處理，不同之處在於，在進行神經元衍生外泌小體富集後，分析樣品中之以下外泌小體蛋白：pSer-199 Tau、pSer-202 Tau、pSer-214 Tau、pSer-235 Tau、pSer-262 Tau、pSer-356 Tau、pSer-396 Tau、pSer-422 Tau、pThr-153 Tau、pThr-181 Tau、pThr-205 Tau或pThr-231 Tau。

神經元衍生外泌小體磷酸化Tau含量與對照含量相比顯著增加。此等結果顯示神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau含量適用於鑑別患有FTD之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷額顳葉型癡呆及其他神經退化性疾病。



### **實例5：神經元衍生之血清外泌小體蛋白含量預測人類個體之阿茲海默氏症**

如下分析人類個體內的神經元衍生外泌小體磷酸化Tau蛋白含量以預測阿茲海默氏症(AD)(例如鑑別處於發生阿茲海默氏症風險之個體)。在AD診斷前(例如在AD發作前)且再在阿茲海默氏症診斷後(例如在發生明顯癡呆後)自人類個體收集血液樣品。如以上實例1中所述處理血液樣品，但在神經元衍生外泌小體富集後分析樣品中以下外泌小體蛋白：pSer-199 Tau、pSer-202 Tau、pSer-214 Tau、pSer-235 Tau、pSer-262 Tau、pSer-356 Tau、pSer-396 Tau、pSer-422 Tau、pThr-153 Tau、pThr-181 Tau、pThr-205 Tau或pThr-231 Tau。

在AD診斷之前及之後獲取之血液樣品中的神經元衍生外泌小體磷酸化Tau含量與對照含量相比顯著增加(亦即，在AD發作前及在發生明顯癡呆後，神經元衍生外泌小體磷酸化Tau含量增加)。此等結果顯示神經元衍生之血清外泌小體磷酸化Tau含量適用於預測個體是否將發生AD。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於阿茲海默症及其他神經退化性疾病之預後及診斷。

### **實例6：患有阿茲海默氏症之人類個體內的神經元衍生之血清外泌小體磷酸化Tau、總Tau及A $\beta$ 1-42含量增加**

如下分析患有阿茲海默氏症(AD)之人類個體內的外泌小體總Tau、磷酸化Tau (P-T181及P-S396)及A $\beta$ 1-42蛋白含量。自患有AD之個體(n=57)及對照個體(n=57)收集10毫升靜脈血。如以上實例1中所述處理血液樣品且分離外泌小體。

藉由ELISA套組定量外泌小體蛋白之人類A $\beta$ 1-42、人類總tau及

人類P-S396-tau (Life Technologies/Invitrogen, Camarillo, CA)、人類P-T181-tau (Innogenetics Division of Fujirebio US, Inc., Alpharetta, GA) 及人類CD81 (Hölzel Diagnostika-Cusabio, Cologne, Germany)，並根據供應商之指導使用人類純化重組CD81抗原(Origene Technologies, Inc., Rockville, MD)驗證CD81抗原標準曲線。

進行個別判別分類器分析以定義比較AD個體與對照個體之最佳簡單線性模型。兩判別分析考慮所有變量且逐步進行。最終模型僅保留輸入最小偏F值3.84且移出2.71的變量。所有群組之先驗機率視為相等。計算費雪函數係數(Fisher Function Coefficients)及組內共變數。在面積標準誤差之非參數分佈假設下進行接受者操作特徵(Receiver operating characteristics)(ROC)分析以確定該判別AD個體與對照個體模型之效能。用SPSS v21.0 (IBM)進行判別及ROC分析。

如下表4中所示，患有AD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體總tau、P-T181-tau、P-S396-tau及A $\beta$ 1-42含量與對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。

**表4**

組	總Tau (pg/ml)	pT181 Tau (pg/ml)	pS396 Tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)
AD (n = 57)	191 $\pm$ 12.3 <sup>+</sup>	106 $\pm$ 6.10 <sup>*</sup>	25.4 $\pm$ 2.25 <sup>*</sup>	18.5 $\pm$ 2.97 <sup>*</sup>
對照組(n = 57)	130 $\pm$ 11.9	16.9 $\pm$ 1.89	3.88 $\pm$ 0.26	0.83 $\pm$ 0.13

平均值 $\pm$ 標準差；\* $p < 0.0001$ ，與對照組相比，+ $p = 0.0005$ ，藉由非配對t測試。

逐步判別分析產生逐漸併入P-T181-tau、P-S396-tau及A $\beta$ 1-42但未併入總tau之模型，其產生威爾克 $\lambda$ 值(Wilk's Lambda) 0.229及準確F值119 ( $p < 0.001$ )。最終模型將96.4%之AD患者正確分類。來自ROC分

析之最終模型的曲線下面積(AUC)為0.999，且個別蛋白質之P-T181-tau、P-S396-tau、A $\beta$ 1-42及總tau之個別AUC值分別為0.991、0.988、0.987及0.731。

此等結果顯示患有阿茲海默症之個體體內的神經元衍生血清外泌小體總Tau、P-T181-tau、P-S396-tau及A $\beta$ 1-42之含量有所增加，且適用於鑑別患有阿茲海默症之個體。此等結果進一步顯示本發明之分析法及方法將患有阿茲海默症之個體正確分類。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

#### **實例7:患有額顳葉型病症之人類個體體內的神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau、總Tau及A $\beta$ 1-42之含量增加**

如下分析患有額顳葉型病症(FTD)之人類個體體內的外泌小體總Tau、磷酸化Tau(P-T181及P-S396)之含量及A $\beta$ 1-42蛋白含量。自患有FTD之個體(n=16)及對照個體(n=16)收集10毫升靜脈血。如以上實例1中所述處理血液樣品且分離外泌小體。

藉由ELISA套組對外泌小體蛋白之人類A $\beta$ 1-42、人類總tau及人類P-S396-tau (Life Technologies/Invitrogen, Camarillo, CA)、人類P-T181-tau (Innogenetics Division of Fujirebio US, Inc., Alpharetta, GA)及人類CD81 (Hölzel Diagnostika-Cusabio, Cologne, Germany)進行定量，同時根據供應商之指導，使用人類純化重組CD81抗原(Origene Technologies, Inc., Rockville, MD)驗證CD81抗原標準曲線。

執行個別判別分類器分析以定義最佳簡單線性模型，以便比較FTD個體與對照個體。兩次判別分析考慮所有變量且逐步進行。最終

模型僅保留輸入最小偏F值3.84且移出2.71的變量。所有群組之先驗機率被視為相等的。計算費雪函數係數及組內共變數。在面積標準誤差之非參數分佈假設下，進行接受者操作特徵(ROC)分析以確定該模型用於判別FTD個體與對照個體之效能。用SPSS v21.0 (IBM)進行判別及ROC分析。

如下表5中所示，患有FTD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-T181-tau及A $\beta$ 1-42含量與對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。

**表5**

組	總Tau (pg/ml)	pT181 Tau (pg/ml)	pS396 Tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)
FTD (n = 16)	135 $\pm$ 15.8	82.6 $\pm$ 9.20*	2.13 $\pm$ 0.33	7.54 $\pm$ 1.01*
對照組(n = 16)	148 $\pm$ 30.1	9.32 $\pm$ 2.86	3.13 $\pm$ 0.46	0.76 $\pm$ 0.35

平均值 $\pm$ 標準差；\*p<0.0001，藉由非配對t測試與對照組相比。

在逐步判別分析中，P-T181-tau獲得威爾克 $\lambda$ 值0.324及準確F值62.5 (p<0.001)。在最終模型中，與對照個體對比(75% FTD及100%對照組)，外泌小體P-T181-tau將87.5%之FTD患者正確分類。對於來自ROC分析之最終模型，P-T181-tau之AUC為0.992且A $\beta$ 1-42之AUC為0.969。

此等結果顯示，患有額顳葉型病症之個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-T181-tau及A $\beta$ 1-42之含量有所增加，且適用於鑑別患有額顳葉型病症之個體。此等結果進一步顯示本發明之分析法及方法將患有額顳葉型病症之個體正確分類。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷額顳葉型病症及其他神經退化性疾病。

**實例8：神經元衍生血清外泌小體磷酸化Tau及A $\beta$ 1-42含量預測阿茲**

## 海獸症在人類個體中之發展

如下分析人類個體體內的外泌小體總Tau、磷酸化Tau(P-T181及P-S396)之含量及A $\beta$ 1-42蛋白含量。在兩個時間點自個體(n=24)收集10毫升靜脈血：第一個時間點為個體診斷出阿茲海默症之前1至10年(阿茲海默症臨床前(Alzheimer's preclinical), AP)，且第二個時間點為初步診斷出阿茲海默症(AD)時。亦自對照個體(n=24)收集靜脈血樣品。如以上實例1中所述處理血液樣品且分離外泌小體。

藉由ELISA套組對外泌小體蛋白之人類A $\beta$ 1-42、人類總tau及人類P-S396-tau (Life Technologies/Invitrogen, Camarillo, CA)、人類P-T181-tau (Innogenetics Division of Fujirebio US, Inc., Alpharetta, GA)及人類CD81 (Hölzel Diagnostika-Cusabio, Cologne, Germany)進行定量，同時根據供應商之指導，使用人類純化重組CD81抗原 (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD)驗證CD81抗原標準曲線。

如下表6中所示，患有AD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-T181-tau、P-S396-tau及A $\beta$ 1-42含量與對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。此外，早在AD臨床診斷之前10年，個體體內之神經元衍生血清外泌小體P-T181-tau及P-S396-tau含量即顯著增加(參見表6)。對於A $\beta$ 1-42而言，AD及AP組之平均含量皆顯著高於對照個體含量，且AD平均含量亦顯著高於AP組之平均含量(參見表6)。

表6

組	總Tau (pg/ml)	pT181 Tau (pg/ml)	pS396 Tau (pg/ml)	A $\beta$ 1-42 (pg/ml)
AD (n = 24)	165 $\pm$ 15.8	91.1 $\pm$ 4.42*	25.2 $\pm$ 1.85*	14.5 $\pm$ 1.41*
AP (n = 24)	154 $\pm$ 13.6	85.7 $\pm$ 3.75*	19.2 $\pm$ 2.00*	6.64 $\pm$ 0.58*#
對照組(n = 16)	148 $\pm$ 116.5	35.6 $\pm$ 3.49	4.72 $\pm$ 0.64	1.51 $\pm$ 0.52

平均值 $\pm$ 標準誤差平均值；\*p<0.0001，藉由配對t測試與對照組

相比較；# $p < 0.0001$ ，藉由配對t測試與AD相比。

此等結果顯示，患有阿茲海默症之個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-T181-tau、P-S396-tau及 $A\beta 1-42$ 之含量有所增加，且適用於鑑別患有阿茲海默症之個體。此等結果亦顯示，早在阿茲海默症臨床診斷之前10年，個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-T181-tau、P-S396-tau及 $A\beta 1-42$ 之含量即有所增加。此等結果進一步顯示本發明之分析法及方法適用於鑑別處於患神經退化性疾病(例如阿茲海默症)風險下之個體。另外，此等結果顯示本發明之分析法及方法可適用於早期偵測且測定阿茲海默症之進展。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

#### **實例9：患有神經退化性疾病或糖尿病之人類個體體內的神經元衍生血漿外泌小體總IRS-1及磷酸化IRS-1含量**

以如下方式分析人類個體體內的外泌小體總IRS-1之含量及磷酸化IRS-1 (P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1)蛋白含量。自26個患有AD之個體、20個患有2型糖尿病(DM2)之個體、16個患有FTD之個體及相匹配之對照個體收集30 ml靜脈血。在室溫下將血液樣品培育10分鐘且在1500 g下離心15分鐘。抽吸血漿且在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下以等分試樣形式儲存。

在室溫下將0.5 ml血漿與0.15 ml凝血活酶-D (Fisher Scientific, Inc., Hanover Park, IL)一起培育1小時，隨後添加0.35 ml不含鈣及鎂之杜爾貝科平衡鹽溶液(DBS<sup>-2</sup>)，該溶液具有三倍推薦最終濃度之蛋白酶抑制劑混合液(Roche Applied Sciences, Inc., Indianapolis, IN)及磷酸酶抑制劑混合液(Pierce Halt, Thermo Scientific, Inc.,

Rockford, IL)。在 1,500 g 下離心 20 min 後，將上清液與 252  $\mu$ l ExoQuick 外泌小體沈澱溶液 (EXOQ ; System Biosciences, Inc. , Mountainview, CA) 混合，且在 4°C 下培育 1 小時。在 4°C 下在 1,500 g 下將所得外泌小體懸浮液離心 30 分鐘，且在 -80°C 凍融循環後藉由渦旋混合將各丸粒與抑制劑混合液一起再懸浮於 250  $\mu$ l 蒸餾水中，隨後對來自於神經來源之外泌小體進行免疫化學富集。

在 4°C 下將各樣品與 1  $\mu$ g 小鼠抗人類 CD171 (L1CAM 神經黏著蛋白) 生物素標記抗體 (純系 5G3, eBioscience, San Diego, CA) 一起在 50  $\mu$ L 3% BSA (1:3.33 稀釋度之阻斷劑 BSA 於 PBS 中之 10% 溶液, Thermo Scientific, Inc.) 與 50  $\mu$ L 3% BSA 中培育 1 小時，且在 4°C 下培育 30 分鐘。在 4°C 下在 200 g 下離心 10 分鐘且移除上清液後，使各丸粒再懸浮於 0.5 mL M-PER 哺乳動物蛋白質提取試劑 (Thermo Scientific, Inc.) 中，其已用 1 M Tris-HCl (pH 8.6) 調節至 pH 8.0 且含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑之混合液。在 37°C 下將此等懸浮液培育 20 分鐘且渦旋混合 15 秒，隨後儲存在 -80°C 下，直至用於 ELISA 為止。

藉由 ELISA 套組對外泌小體蛋白之人類 P-S312-IRS-1 (Life Technologies Corp. , Carlsbad , CA)、人類 P-panY-IRS-1 (Cell Signaling Technology , Danvers , MA)、人類總 IRS-1 (AMSBIO, LLC , Cambridge , MA) 及四跨膜外泌小體標記人類 CD81 (Hölzel Diagnostika-Cusabio , Cologne , Germany) 進行定量，同時根據供應商之指導，使用人類純化重組 CD81 抗原 (Origene Technologies, Inc. , Rockville , MD) 驗證 CD81 抗原標準曲線。將各分析組中之所有 CD81 測定值之平均值設定為 1.00，且各樣品之相對值用於將其回收率標準

化。R為胰島素抗性指數，其定義為P-S312-IRS-1與P-panY-IRS-1之比率。

患有AD或FTD或DM2之患者的組平均值之間及各患者組與其各別匹配對照組之間的差異統計顯著性係用非配對t測試來確定，該測試在解譯中包括包法隆尼校正法(Bonferroni correction) (GraphPad Prism 6, La Jolla, CA)。進行個別判別分類器分析以定義最佳簡單線性模型，以便比較組AD與其對照組(AC)、FTD與其對照組(FTC)及DM2與其對照組(DC)。用威爾克 $\lambda$ 方法逐步進行判別分析。在各步驟中，僅保留輸入最小偏F值3.84且移出2.71的變量。所有組之先驗機率被視為相等的。亦計算費雪函數係數及組內共變數。在面積標準誤差之非參數分佈假設下，進行接受者操作特徵(ROC)分析以確定該模型用於判別AD與AC、FTD與FTC、DM2與DC及AD與DM2及FTD之效能。用SPSS v21.0 (IBM)進行判別及ROC分析。為了評定AD患者體內的CSF生物標記與神經富集外泌小體中之IRS-1蛋白之間的結合的顯著性，計算零階皮爾生相關性(Pearson's correlation)及部分相關性(控制年齡及性別)。為了進行縱向分析，用配對t測試(GraphPad)計算在MCI或癡呆症發作之前及之後所取得之AD患者的連續值之間的差異顯著性。

如下表7中所示，患有AD、DM2及FTD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-S312-IRS-1含量與其各別對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。在患有AD、DM2及FTD之個體體內，胰島素抗性指數(R)之比率與其各別對照組相比顯著增加(參見表7)。對於P-panY-IRS-1而言，AD及DM2組之平均含量皆顯著高於對照個體含量(參見



表7)。

表7

組	IRS-1 (pg/ml)	P-S312-IRS-1 (U/ml)	P-panY-IRS-1 (AU)	胰島素抗性指數(R)
AD (n = 26)	5.04 ± 0.10	7.72 ± 0.45*	0.085 ± 0.003*	92.2 ± 5.34*
AC (n = 26)	5.45 ± 0.11	3.94 ± 0.30	0.204 ± 0.005	19.4 ± 1.44
DM2 (n = 20)	5.59 ± 0.12	5.48 ± 0.11*	0.143 ± 0.015*	50.4 ± 6.93*
DC (n = 20)	5.34 ± 0.12	3.24 ± 0.14	0.199 ± 0.005	16.4 ± 0.67
FTD (n = 16)	5.54 ± 0.15	6.12 ± 0.37*	0.226 ± 0.087	29.5 ± 2.08*
FTC (n = 16)	5.30 ± 0.14	4.19 ± 0.18	0.215 ± 0.010	19.9 ± 1.30

平均值±標準誤差平均值；\* $p < 0.0001$ ，藉由配對t測試與對照組相比。

逐步判別分析AD及AC數據，產生首先併入P-panY-IRS-1且其次併入P-S312-IRS-1之模型。最終模型達成威爾克 $\lambda$ 值0.105及準確F值207.9 ( $P < 0.001$ )，且將100%AD患者及AC個體正確分類。在對AD及AC組進行分類之ROC分析中，由最終模型之個別個體評分達成的曲線下面積(AUC)為1(漸近顯著性 $< 0.001$ )。總IRS-1、P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1之AUC值分別為0.722、0.862及0.999。逐步判別分析區分DM2與DC之數據，產生首先併入P-panY-IRS-1且其次併入P-S312-IRS-1之模型。最終模型達成威爾克 $\lambda$ 值0.168及準確F值91.8 ( $P < 0.001$ )，且將97.5%之DM2患者及DC個體正確分類。在對DM2與DC組進行分類之ROC分析中，由最終模型之個別個體評分達成AUC 1。P-panY-IRS-1及P-S312-IRS-1之AUC值分別為0.741 (漸近顯著性 $= 0.009$ )及0.999 (漸近顯著性 $< 0.001$ )。逐步判別分析區分FTD與FTC之數據，產生併入P-S312-IRS-1之模型。最終模型達成威爾克 $\lambda$ 值0.576及準確F值22.1 ( $P < 0.001$ )，且將84%之FTD患者及FTC個體正確分類。在對FTD與FTC組進行分類之ROC分析中，P-S312-IRS-1達成

AUC值0.928 (漸近顯著性<0.001)。

此等結果顯示，在患有AD、DM2及FTD之個體中，神經元衍生血清外泌小體P-S312-IRS-1、P-panY-IRS-1之含量及胰島素抗性指數(R)之比率有所增加，且適用於鑑別患有AD、DM2及FTD之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症、糖尿病額顳葉型癡呆及其他神經退化性疾病。

### 實例10：神經元衍生血清外泌小體磷酸化IRS-1含量及胰島素抗性指數預測人類個體體內阿茲海默症之發展

以如下方式分析人類個體體內的外泌小體總IRS-1之含量及磷酸化IRS-1 (P-S312-IRS-1及P-panY-IRS-1)蛋白質含量。在兩個時間點自個體(n=22)收集10 ml靜脈血：第一個時間點為個體診斷出阿茲海默症之前1至10年(阿茲海默症臨床前，AP)，且第二個時間點為初步診斷阿茲海默症(AD)時。亦自對照個體(n=22)收集靜脈血樣品。如以上實例9中所述處理血液樣品且分離外泌小體。

如下表8中所示，患有AD之個體體內的神經元衍生之血清外泌小體P-S312-IRS-1、P-panY-IRS-1及R與對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。此外，早在AD臨床診斷之前10年，個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-S312-IRS-1、P-panY-IRS-1及R即顯著增加(參見表8)。

表8

組	IRS-1 (pg/ml)	P-S312-IRS-1 (U/ml)	P-panY-IRS-1 (AU)	胰島素抗性指數(R)
AP (n = 22)	5.62 ± 130.5	9.22 ± 1.07*	0.119 ± 0.016*	92.0 ± 1.07*
AD (n = 22)	N/A	9.70 ± 0.95*	0.113 ± 0.011*	101 ± 19.8*
對照組(n = 22)	N/A	2.93 ± 0.13	0.205 ± 0.006	14.7 ± 0.89

平均值±標準誤差平均值；\*p<0.0001，藉由配對t測試與對照組

相比。

此等結果顯示，患有阿茲海默症之個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-S312-IRS-1、P-panY-IRS-1之含量及R有所增加，且適用於鑑別患有阿茲海默症之個體。此等結果亦顯示，早在阿茲海默症臨床診斷之前10年，個體體內的神經元衍生血清外泌小體P-S312-IRS-1、P-panY-IRS-1之含量及R即有所增加。此等結果進一步顯示，本發明之分析法及方法適用於鑑別處於患神經退化性疾病(例如阿茲海默症)之風險下之個體。另外，此等結果顯示本發明之分析法及方法可適用於早期偵測及測定阿茲海默症之進展。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

#### **實例11：患有神經退化性疾病之人類個體體內的神經元衍生血漿外泌小體蛋白質含量**

如下分析人類個體體內的外泌小體組織蛋白酶D (CTSD)、1型溶酶體相關膜蛋白(LAMP1)、泛素化蛋白(UBP)之含量及熱休克蛋白70 (HSP70)含量。自26個患有阿茲海默症(AD)之個體、16個患有額顳葉型癡呆(FTD)之個體及相匹配之對照個體(阿茲海默症對照組-AC及額顳葉型癡呆對照組-FTC)收集30 ml靜脈血。在室溫下將血液樣品培育10分鐘且在1500 g下離心15分鐘。吸移血漿且在-80°C下以等分試樣形式儲存。

在室溫下將0.5 ml血漿與0.15 ml凝血活酶-D (Fisher Scientific, Inc., Hanover Park, IL)一起培育1小時，隨後添加0.35 ml不含鈣及鎂之杜爾貝科平衡鹽溶液(DBS<sup>-2</sup>)，該溶液具有三倍推薦最終濃度之蛋白酶抑制劑混合液(Roche Applied Sciences, Inc., Indianapolis, IN)及

磷酸酶抑制劑混合液 (Pierce Halt, Thermo Scientific, Inc., Rockford, IL)。在 1,500 g 下離心 20 分鐘後，將上清液與 252  $\mu$ l ExoQuick 外泌小體沈澱溶液 (EXOQ; System Biosciences, Inc., Mountainview, CA) 混合，且在 4°C 下培育 1 小時。在 4°C 下，在 1,500 g 下將所得外泌小體懸浮液離心 30 分鐘，且在 -80°C 凍融循環後藉由渦旋混合使各丸粒與抑制劑混合液一起再懸浮於 250  $\mu$ l 蒸餾水中，隨後對來自於神經來源之外泌小體進行免疫化學富集。

在 4°C 下將各樣品與 1  $\mu$ g 小鼠抗人類 CD171 (L1CAM 神經黏著蛋白) 生物素標記抗體 (純系 5G3, eBioscience, San Diego, CA) 一起在 50  $\mu$ L 3% BSA (1:3.33 稀釋度之阻斷劑 BSA 於 PBS 中之 10% 溶液, Thermo Scientific, Inc.) 與 50  $\mu$ L 3% BSA 中培育 1 小時，且在 4°C 下培育 30 分鐘。在 4°C 下，在 200 g 下離心 10 分鐘且移除上清液後，使各丸粒再懸浮於 0.5 mL M-PER 哺乳動物蛋白質提取試劑 (Thermo Scientific, Inc.) 中，其已用 1 M Tris-HCl (pH 8.6) 調節至 pH 8.0 且含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑之混合液。在 37°C 下將此等懸浮液培育 20 分鐘且渦旋混合 15 秒，隨後儲存在 -80°C 下，直至用於 ELISA 為止。

藉由 ELISA 套組對外泌小體蛋白之總泛素 (FIVEphoton Biochemicals, San Diego, CA)、1 型溶酶體相關膜蛋白質 (LAMP1) (USBiological Life Sciences, Salem, MA)、熱休克蛋白 70 (HSP70) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)、組織蛋白酶 D (EMD Milipore Corp., Billerica, MA) 及四跨膜外泌小體標記人類 CD81 (Hölzel Diagnostika-Cusabio, Cologne, Germany) 進行定量，同時根據供應商之指導，使用人類純化重組 CD81 抗原 (Origene Technologies,

Inc., Rockville, MD) 驗證 CD81 抗原標準曲線。將各分析組中之所有 CD81 測定值之平均值設定為 1.00，且各樣品之相對值用於對其回收率進行標準化。

代表性患者組之組平均值之間及各患者組與其各別匹配對照組之間的差異統計顯著性係用非配對 t 測試來確定，該測試在解譯中包括包法隆尼校正法(GraphPad Prism 6, La Jolla, CA)。進行個別判別分類器分析以定義最佳簡單線性模型，以便比較組 AD 與其對照組 (AC)、FTD 與其對照組 (FTC)。用威爾克λ方法逐步進行判別分析。在各步驟中，僅保留輸入最小偏 F 值 3.84 且移出 2.71 的變量。所有群組之先驗機率被視為相等的。亦計算費雪函數係數及組內共變數。在面積標準誤差之非參數分佈假設下，進行接受者操作特徵(ROC)分析以確定分類器模型之效能。為了進行縱向分析，用配對 t 測試(GraphPad)計算在 MCI 或癡呆症發作之前及之後所取得之 AD 患者的連續值之間的差異顯著性。

如下表 9 中所示，患有 AD 之個體體內的神經元衍生血清外泌小體 CTSD、LAMP1 及 UBP 蛋白含量與其各別對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加且 HSP70 蛋白含量顯著降低。患有 FTD 之個體體內的神經元衍生血清外泌小體 CTSD 蛋白含量與其各別對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加且 HSP70 蛋白含量顯著降低(參見表 9)。

**表 9**

組	CTSD (ng/ml)	LAMP1 (pg/ml)	UBP (pg/ml)	HSP70 (pg/ml)
AD (n = 26)	17.7 ± 0.80*	1,808 ± 204*	477 ± 25.4*	246 ± 18.0*
AC (n = 26)	8.35 ± 0.27	946 ± 119	225 ± 10.1	394 ± 15.2
FTD (n = 16)	12.8 ± 0.75*	1,071 ± 62.7	255 ± 11.5	165 ± 4.39*
FTC (n = 16)	6.23 ± 0.15	1,147 ± 88.9	228 ± 8.53	429 ± 15.6

平均值 ± 標準誤差平均值；\*p < 0.0005，藉由配對 t 測試與對照組

相比。

逐步判別分析AD及AC數據，產生併入CTSD、隨後併入UBP且最後併入HSP-70但未併入LAMP-1之模型。AD相對於AC之ROC曲線顯示，對於得自於最終模型之CTSD及複合評分，曲線下面積(AUC)皆為1.0，其中將100%之AD患者正確分類。類似ROC分析將100%之FTD相對於FTC對照組及95.8%之AD相對於FTD正確分類。

此等結果顯示，患有AD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體CTSD、LAMP1之含量及UBP蛋白含量有所增加且HSP70蛋白含量有所降低，且適用於鑑別患有AD之個體。此等結果亦表明，患有FTD之個體體內的神經元衍生血清外泌小體CTSD之含量有所增加且HSP70蛋白含量有所降低，且適用於鑑別患有FTD之個體。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症、額顳葉型癡呆及其他神經退化性疾病。

### **實例12：神經元衍生血清外泌小體蛋白質含量預測人類個體體內阿茲海默症之發展**

如下分析人類個體體內的外泌小體組織蛋白酶D (CTSD)、1型溶酶體相關膜蛋白(LAMP1)、泛素化蛋白(UBP)之含量及熱休克蛋白70 (HSP70)含量。在兩個時間點自個體(n=20)收集10 ml靜脈血：第一個時間點為個體診斷出阿茲海默症之前1至10年(阿茲海默症臨床前，AP)，且第二個時間點為初步診斷出阿茲海默症(AD)時。亦自對照個體(n=20)收集靜脈血樣品。如以上實例11中所述處理血液樣品且分離外泌小體。

如下表10中所示，患有AD之個體體內的神經元衍生之血清外泌

小體CTSD、LAMP-1及UBP與對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加且HSP70蛋白含量顯著降低。此外，早在AD臨床診斷之前10年，個體體內的神經元衍生血清外泌小體CTSD、LAMP-1及UBP即有所增加且HSP70蛋白含量即有所降低(參見表10)。

**表10**

組	CTSD (ng/ml)	LAMP1 (pg/ml)	UBP (pg/ml)	HSP70 (pg/ml)
AP	18.4 ± 0.68*	2,638 ± 354*	364 ± 13.9*	244 ± 16.4*
AD	19.0 ± 0.70*	2,080 ± 257*	347 ± 13.9*	250 ± 11.8*
對照組	8.50 ± 0.36	1,035 ± 119	206 ± 7.46	392 ± 14.2

平均值±標準誤差平均值；\* $p < 0.0003$ ，藉由配對t測試與對照組相比。

此等結果顯示，患有阿茲海默症之個體體內的神經元衍生血清外泌小體蛋白CTSD、LAMP-1及UBP之含量有所增加且HSP70有所降低，且適用於鑑別患有阿茲海默症之個體。此等結果亦顯示，早在阿茲海默症臨床診斷之前10年，個體體內的神經元衍生血清外泌小體CTSD、LAMP-1及UBP之含量即有所增加且HSP70即有所降低。此等結果進一步顯示，本發明之分析法及方法適用於鑑別處於患神經退化性疾病(例如阿茲海默症)之風險下之個體。另外，此等結果顯示本發明之分析法及方法可適用於早期偵測及測定阿茲海默症之進展。此等結果進一步表明本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

### **實例13：患有神經退化性疾病之人類個體體內的神經元衍生血漿外泌小體蛋白質含量**

如下分析人類個體體內的外泌小體神經元特異性烯醇酶(NSE)含量及神經纖毛輕鏈(NFL)含量。自20個患有阿茲海默症(AD)之個體及

相匹配之對照個體(阿茲海默症對照組-AC)收集30 ml靜脈血。在室溫下將血液樣品培育10分鐘且在1500 g下離心15分鐘。吸移血漿且在-80℃下以等分試樣形式儲存。

在室溫下將0.5 ml血漿與0.15 ml凝血活酶-D (Fisher Scientific, Inc., Hanover Park, IL)一起培育1小時，隨後添加0.35 ml不含鈣及鎂之杜爾貝科平衡鹽溶液(DBS<sup>-2</sup>)，該溶液具有三倍推薦最終濃度之蛋白酶抑制劑混合液(Roche Applied Sciences, Inc., Indianapolis, IN)及磷酸酶抑制劑混合液(Pierce Halt, Thermo Scientific, Inc., Rockford, IL)。在1,500 g下離心20分鐘後，將上清液與252 µl ExoQuick外泌小體沈澱溶液(EXOQ; System Biosciences, Inc., Mountainview, CA)混合，且在4℃下培育1小時。在4℃下，在1,500 g下將所得外泌小體懸浮液離心30分鐘，且在-80℃凍融循環後藉由渦旋混合使各丸粒與抑制劑混合液一起再懸浮於250 µl蒸餾水中，隨後對來自於神經來源之外泌小體進行免疫化學富集。

在4℃下將各樣品與1 µg小鼠抗人類CD171 (L1CAM神經黏著蛋白)生物素標記抗體(純系5G3, eBioscience, San Diego, CA)一起在50 µL 3% BSA (1:3.33稀釋度之阻斷劑BSA於PBS中之10%溶液, Thermo Scientific, Inc.)與50 µL 3% BSA中培育1小時，且在4℃下培育30分鐘。在4℃下在200 g下離心10分鐘且移除上清液後，使各丸粒再懸浮於0.5 mL M-PER哺乳動物蛋白質提取試劑(Thermo Scientific, Inc.)中，其已用1 M Tris-HCl (pH 8.6)調節至pH 8.0且含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑之混合液。在37℃下將此等懸浮液培育20分鐘且渦旋混合15秒，隨後儲存在-80℃下，直至用於ELISA為止。



藉由ELISA套組對外泌小體蛋白之總神經元特異性烯醇酶(R&D Systems, St. Paul, MN)、神經纖毛輕鏈蛋白質(NFL) (American Research Products, Waltham, MA)及四跨膜外泌小體標記人類CD81 (Hölzel Diagnostika-Cusabio, Cologne, Germany)進行定量，同時根據供應商之指導，使用人類純化重組CD81抗原(Origene Technologies, Inc., Rockville, MD)驗證CD81抗原標準曲線。將各分析組中之所有CD81測定值之平均值設定為1.00，且各樣品之相對值用於將其回收率標準化。

代表性患者組的組平均值之間及各患者組與其各別匹配對照組之間的差異統計顯著性係用非配對t測試來確定，該測試在解譯中包括包法隆尼校正法(GraphPad Prism 6, La Jolla, CA)。進行個別判別分類器分析以定義最佳簡單線性模型，以便比較組AD與其對照組(AC)。用威爾克λ方法逐步進行判別分析。在各步驟中，僅保留輸入最小偏F值3.84且移出2.71的變量。所有組之先驗機率被視為相等的。亦計算費雪函數係數及組內共變數。在面積標準誤差之非參數分佈假設下，進行接受者操作特徵(ROC)分析以確定分類器模型之效能。

如下表11中所示，在患有AD之個體中，神經元衍生血清外泌小體NSE及NFL蛋白含量與其各別對照個體血清外泌小體含量相比顯著增加。

**表11**

組	NSE (pg/ml)	NFL (pg/ml)
AD (n = 20)	6,968 ± 185*	1,296 ± 62*
AC (n = 20)	3,053 ± 134	317 ± 31

平均值±標準誤差平均值；\*p<0.0001，藉由配對t測試與對照組相比。

此等結果顯示，在患有AD之個體中，神經元衍生血清外泌小體NSE含量及NFL蛋白含量有所增加，且適用於鑑別患有AD之個體。此等結果進一步指示本發明之方法及組合物適用於診斷阿茲海默症及其他神經退化性疾病。

根據上述發明說明，本發明之各種修改以及本文中所示及所述之修改對熟習此項技術者而言將變得顯而易見。該等修改意欲在所附申請專利範圍之範疇內。

本文中所引用之所有參考文獻在此皆以全文引用的方式併入本文中。

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種分析個體樣品之方法，其包含以下步驟：(i) 自包含囊泡之生物樣品分離囊泡，其中自生物樣品分離囊泡包含：使生物樣品與試劑在該生物樣品中所存在之囊泡與該試劑結合以形成囊泡-試劑複合物的條件下接觸；及自該囊泡-試劑複合物分離該囊泡以獲得含有該囊泡之樣品，及(ii) 自該經分離之囊泡偵測一或多個生物標記，其中該一或多個生物標記為蛋白質、磷酸化蛋白質、mRNA及/或miRNA，其中該生物樣品係全血、血清或血漿，且其中該囊泡係選自由以下組成之群：神經元衍生外泌小體、星形細胞衍生外泌小體、寡樹突細胞衍生外泌小體及微神經膠質細胞衍生外泌小體。

### 【請求項2】

如請求項1之方法，其中該個體已經診斷患有或疑似患有神經退化性疾病。

### 【請求項3】

如請求項2之方法，其中該神經退化性疾病係選自由以下組成之群：阿茲海默氏症(AD)、血管病性癡呆、額顳葉型癡呆(FTD)、皮質基底核退化(CBD)、進行性核上麻痺(PSP)、路易體性癡呆(Lewy body dementia)、纏結為主型(tangle-predominant)老年癡呆、皮克氏症(Pick's disease, PiD)、嗜銀顆粒性疾病、肌肉萎縮性側索硬化(ALS)、其他運動神經元疾病、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症(Guam parkinsonism-dementia complex)、FTDP-17、利替可-波帝格症(Lytico-Bodig disease)、多發性硬化、創傷性腦損傷(TBI)及帕金森氏症。

**【請求項4】**

如請求項1之方法，其中該試劑為抗體、凝集素、配位體、可溶性受體、結合蛋白或寡核苷酸。

**【請求項5】**

如請求項4之方法，其中該抗體為單株抗人NCAM抗體、單株抗人CD171抗體、單株CD9抗體、單株CD63抗體或單株CD81抗體。

**【請求項6】**

如請求項1之方法，其中該個體為人類。

**【請求項7】**

如請求項1之方法，其中使用選自由以下組成之群之方法進行偵測：定序技術、核酸雜交技術、核酸擴增技術及免疫分析法。