



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116348769 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202180062649.4

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2021.07.14

专利代理师 黄登高 彭昶

(30) 优先权数据

62/705759 2020.07.14 US

63/200399 2021.03.04 US

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/069595 2021.07.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/013286 EN 2022.01.20

(71) 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时·比尔斯·特恩豪特斯路30号

(72) 发明人 H·C·科尔布

G·特里亚纳-巴尔泽 Z·萨德

权利要求书3页 说明书40页

序列表13页 附图29页

(54) 发明名称

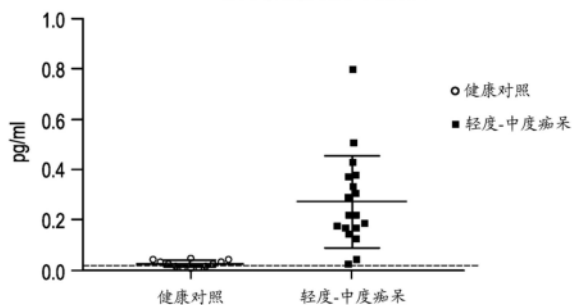
用于检测tau蛋白病或淀粉样蛋白形成性疾病的基于血液的测定

(57) 摘要

一种用于以高灵敏度、准确度和精度检测来自受试者的基于血液的样品中的p217+tau的方法。该测定包括使样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使该捕获抗体与血浆中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,以及单独地使该抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使该检测抗体与该抗体-肽复合物结合。通过检测该检测抗体来确定p217+tau的量。当p217+tau肽的量大于预定阈值时,检测到的p217+tau的量用于确定该受试者是否患有tau蛋白病或是否处于发展tau蛋白病的风险,或者该受试者是否患有淀粉样蛋白形成性疾病或是否处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险。该方法具有提高的灵敏度,以使得该预定阈值大于该测定的定量下限和/或检测下限。

血浆p219+Tau

修改的测定: 2019年12月2日



1. 一种检测受试者中的p217+tau肽的测定方法,所述方法包括:
从所述受试者获得血浆样品;
使所述血浆样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使所述捕获抗体与所述血浆样品中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物;
洗涤所述抗体-肽复合物;
使所述抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合;以及
检测所述检测抗体以确定所述血浆样品中的所述p217+tau肽的量。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获抗体被固定在固相上。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述固相是磁珠。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获抗体与含有人tau蛋白的氨基酸210至220的表位结合。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述检测抗体与包含人tau蛋白的氨基酸7至20或氨基酸116至127的表位结合。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述捕获抗体是pT3。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述检测抗体是pT82。
8. 根据权利要求3所述的方法,其中所述血浆样品在与所述捕获抗体接触之前用样品稀释剂稀释,所述样品稀释剂包含非离子表面活性剂和三(羟甲基)氨基甲烷中的至少一者。
9. 一种检测受试者的tau蛋白病的方法,所述方法包括:
从所述受试者获得血浆样品;
使用测定来检测所述血浆样品中的p217+tau肽的量,其中所述测定使用针对p217+tau表位的捕获抗体以使所述捕获抗体与所述血浆样品中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,并使用检测抗体以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合;以及
当所述p217+tau肽的量大于预定阈值时,确定所述受试者患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险,其中所述预定阈值大于所述测定的定量下限(LL0Q)。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述测定在测量所述p217+tau肽的存在量之前不通过免疫沉淀从所述血浆样品浓缩所述p217+tau肽。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血浆样品是粗制血浆。
12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述LL0Q对应于所述测定的15%至25%变异系数(CV)。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述LL0Q对应于所述测定的20%CV。
14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述预定阈值是所述LL0Q的至少3倍。
15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述预定阈值是所述测定的检测下限的至少10倍。
16. 根据权利要求9所述的方法,其中所述tau蛋白病选自由以下各项组成的组:家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与17号染色体相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-

痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、以及拳击员痴呆症(拳击疾病)。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述tau蛋白病是阿尔茨海默病。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述tau蛋白病是进行性核上性麻痹。

19. 一种检测受试者的淀粉样蛋白形成性疾病的方法,所述方法包括:

从所述受试者获得血浆样品;

使用测定来检测所述血浆样品中的p217+tau肽的量,其中所述测定使用针对p217+tau表位的捕获抗体以使所述捕获抗体与所述血浆样品中的所述p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,并使用检测抗体以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合;以及

当所述p217+tau肽的量大于预定阈值时,确定所述受试者患有淀粉样蛋白形成性疾病或处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险,其中所述预定阈值大于所述测定的定量下限(LLQ)。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述测定在测量所述p217+tau肽的存在量之前不通过免疫沉淀从所述血浆样品浓缩所述p217+tau肽。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述血浆样品是粗制血浆。

22. 根据权利要求19所述的方法,其中所述LLQ对应于所述测定的15%至25%变异系数(CV)。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述LLQ对应于所述测定的20%CV。

24. 根据权利要求19所述的方法,其中所述预定阈值是所述LLQ的至少3倍。

25. 根据权利要求19所述的方法,其中所述预定阈值是所述测定的定量下限的至少10倍。

26. 根据权利要求19所述的方法,其中所述淀粉样蛋白形成性疾病是阿尔茨海默病。

27. 一种用于检测或预测受试者的tau蛋白病的方法,所述方法包括:

通过以下步骤来检测血浆样品中的p217+tau肽的量:使所述血浆样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使所述捕获抗体与所述血浆样品中的所述p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,以及单独地使所述抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合;

生成对应于检测到的所述p217+tau肽的量的tau数据;

获得对应于从所述受试者检测到的至少一种生物标志物的生物标志物数据,其中所述生物标志物选自包括以下各项的组:NFL、脂连蛋白和瘦蛋白;以及

使用机器学习模块将所述tau数据和另外的生物标志物数据与一组参考数据进行比较,以确定或预测所述受试者是否患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述机器学习模块包括支持向量机模块、随机森林模块、逻辑回归模块和梯度提升模块中的至少一者。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述tau蛋白病选自以下各项组成的组:家族性阿尔茨海默病、散发性阿尔茨海默病、与17号染色体相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠

结痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病、以及拳击员痴呆症(拳击疾病)。

30. 根据权利要求27所述的方法,其中所述tau蛋白病是阿尔茨海默病。

31. 根据权利要求27所述的方法,其中所述tau蛋白病是进行性核上性麻痹。

用于检测tau蛋白病或淀粉样蛋白形成性疾病的基于血液的测定

[0001] 序列表

[0002] 本申请包含已经以ASCII格式电子递交的序列表,并且据此全文以引用方式并入。所述ASCII副本创建于2021年6月30日,命名为JAB7064WOPCT_SL.txt,并且大小为20,602字节。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2020年7月14日提交的美国临时申请序列号62/705,759和2021年3月4日提交的美国临时申请序列号63/200,399的优先权,这些申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0005] 本申请涉及用于检测tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病的方法。具体而言,本发明申请涉及测量基于血液的样品中的单个或多个磷酸化的p217+tau蛋白种类的量的方法及其用途。

背景技术

[0006] 阿尔茨海默病(AD)是退行性脑障碍,其特征在于进行性的记忆、认知、推理、判断和情感稳定性的丧失,该丧失逐渐导致极度精神衰退和最终的死亡。AD是老年人的进行性精神障碍(痴呆)的非常常见的原因。在美国有超过500万人患有AD,并且该数量随着老年人群而增长。实际上,超过65岁的人中有10%患有AD,并且AD是该人群中第5位主要死亡原因。在美国,总体上AD是第6位主要死亡原因(3个老年人中有1个死于AD或其它痴呆),并且据估计该疾病在2020年花费掉3050亿美元。AD还在全世界的种族群体中观察到,并且代表目前和未来的主要公共健康问题。

[0007] 患有AD的个体的脑表现出称作老年(或淀粉样蛋白)斑块、淀粉样蛋白血管病(淀粉样蛋白在血管中沉积)和神经原纤维缠结的特征性病变。一般在患有AD的患者中对于记忆和认知功能重要的人脑几个区域中发现大量的这些病变,特别是淀粉样斑块和成对螺旋细丝的神经原纤维缠结。

[0008] 神经原纤维缠结主要由超磷酸化tau蛋白的聚集体构成。tau的主要生理功能为微管聚合和稳定。tau与微管的结合通过tau的微管结合区的正电荷与微管网架上的负电荷之间的离子相互作用发生(Butner和Kirschner, J Cell Biol. 115(3):717-30, 1991)。tau蛋白含有85个可能的磷酸化位点,并且这些位点中的许多位点处的磷酸化干扰tau的主要功能。结合至轴突微管网架的tau处于低磷酸化状态,而AD中的聚集的tau是超磷酸化的,从而提供不同于tau的生理活性库的独特表位(Iqbal等人, Curr Alzheimer Res. 7(8):656-664, 2010)。

[0009] AD脑中tau蛋白病的发展遵循明显的蔓延模式。tau蛋白病传播和蔓延假设已经基于人脑中的tau蛋白病发展的Braak阶段和在临床前tau模型中的tau聚集体注射后的tau蛋

白病蔓延进行了描述(Frost等人,J Biol Chem.284:12845-52,2009;Clavaguera等人,Nat Cell Biol.11:909-13,2009)。据信tau蛋白病能够以类似朊病毒的方式从一个脑区蔓延到下一脑区。该蔓延过程将涉及tau种子的外化,该tau种子可被附近神经元吸收并且诱导进一步的tau蛋白病。

[0010] 许多生物化学变化能够在症状发作前最多20年检测到。美国国家衰老研究院所-阿尔茨海默病协会研究框架(National Institute on Aging and Alzheimer's Association (NIA-AA) Research Framework)提供了基于与潜在病理过程、 β 淀粉样蛋白(A)、病理性tau(T)和神经退化(N)相关的测量值进行的阿尔茨海默氏病(AD)诊断的机理。使用tau特异性放射性示踪剂(Tau PET)的正电子发射断层扫描已经用于测量患者中的tau神经原纤维缠结(NFT)病理学。然而,Tau PET是昂贵且繁琐的过程,并且tau特异性放射性示踪剂的可用性可能是有限的。

[0011] 神经原纤维缠结中的tau蛋白片段移动到脑脊液(CSF),该tau蛋白片段能够在脑脊液处获取并通过灵敏测定测量。因此,可使用识别CSF中的tau蛋白衍生片段的测定来检测神经疾病的存在。然而,CSF的取回需要患者经历侵入性腰椎穿刺过程,该过程涉及内科医生将针插入到脊椎管中收集CSF样品用于测定。这种过程是不舒服和麻烦的,因此,不希望频繁重复,并且不适于定期监测患者的疾病状态。

发明内容

[0012] 本申请的一个示例性实施方案涉及一种检测受试者中的p217+tau肽的测定方法。所述方法包括使血浆样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使所述捕获抗体与所述血浆中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,以及洗涤所述抗体-肽复合物。所述方法然后继续使所述抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合。所述方法然后检测所述检测抗体,以确定所述血浆样品中的所述p217+tau肽的量。

[0013] 还提供了一种检测受试者的tau蛋白病的方法。所述方法包括从所述受试者获得血浆样品以及使用测定来检测所述血浆样品中存在的所述p217+tau肽的量。所述测定使用针对p217+tau表位的捕获抗体以使所述捕获抗体与所述血浆中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,并使用检测抗体以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合。所述方法还包括用于确定当所述p217+tau肽的量大于预定阈值时所述受试者患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险的步骤。所述预定阈值大于所述测定的定量下限(LLoQ)。

[0014] 还提供了一种检测受试者的淀粉样蛋白形成性疾病的方法。所述方法包括从所述受试者获得血浆样品以及使用测定来检测所述血浆样品中存在的所述p217+tau肽的量。所述测定使用针对p217+tau表位的捕获抗体以使所述捕获抗体与所述血浆中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,并使用检测抗体以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合。所述方法还包括用于确定当所述p217+tau肽的量大于预定阈值时所述受试者患有淀粉样蛋白形成性疾病或处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险的步骤。所述预定阈值大于所述测定的定量下限(LLoQ)。

[0015] 在本申请的另一个方面,提供了一种用于检测或预测受试者的tau蛋白病的方法。所述方法包括通过以下步骤来检测血浆样品中的p217+tau肽的量:使所述血浆样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使所述捕获抗体与所述血浆中的p217+tau肽结合,从而

形成抗体-肽复合物,以及单独地使所述抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使所述检测抗体与所述抗体-肽复合物结合,以及生成对应于所检测的所述p217+tau肽的量的tau数据。所述方法还包括获得对应于从所述患者检测到的至少一种生物标志物的生物标志物数据,其中所述生物标志物选自包括以下各项的组:NFL、脂连蛋白和瘦蛋白。所述方法还包括使用机器学习模块将所述tau数据和另外的所述生物标志物数据与一组参考数据进行比较,以确定或预测所述受试者是否患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险。

[0016] 对于本领域的技术人员而言,在阅读本发明的以下详细描述(包括附图和所附权利要求书)之后,本发明的这些方面和其他方面将变得显而易见。

附图说明

[0017] 图1a显示了根据先前公开的测定获得的从1:4稀释的血浆中检测到的p217+tau的数据。

[0018] 图1b显示了根据先前公开的测定获得的从1:16稀释的血浆中检测到的p217+tau的数据。

[0019] 图1c显示了根据先前公开的测定获得的从血浆的半变性样品中检测到的p217+tau的数据。

[0020] 图1d显示了根据先前公开的测定获得的从血浆的免疫沉淀样品中检测到的p217+tau的数据。

[0021] 图2a显示了展示根据先前公开的测定获得的来自CSF的p217+tau测量值与根据本申请的一个示例性测定获得的来自CSF的p217+tau测量值之间的相关性的数据。

[0022] 图2b显示了比较根据先前公开的测定获得的在血清中检测到的p217+tau水平与根据本申请的一个示例性测定获得的在血清中检测到的p217+tau水平的数据。

[0023] 图3a显示了展示使用根据本申请的示例性实施方案的两种不同的检测抗体获得的来自CSF的p217+tau测量值之间的相关性的数据。

[0024] 图3b显示了展示使用根据本申请的示例性实施方案的两种不同的检测抗体获得的来自血清的p217+tau测量值之间的相关性的数据。

[0025] 图3c显示了展示使用根据本申请的示例性实施方案的两种不同的检测抗体获得的来自血浆的p217+tau测量值之间的相关性的数据。

[0026] 图4a显示了比较在本申请的示例性实施方案中不同的样品稀释剂对珠粒凝集的作用的数据。

[0027] 图4b显示了比较通过本申请的示例性实施方案检测到的不同的样品稀释剂对p217+tau水平的作用的数据。

[0028] 图5a显示了从根据本申请的一个示例性实施方案获得的血清中检测到的p217+tau的数据。

[0029] 图5b显示了从根据本申请的一个示例性实施方案获得的血浆中检测到的p217+tau的数据。

[0030] 图5c显示了展示如图5b所示的从血清中检测到的p217+tau与如图5c所示的从血浆中检测到的p217+tau之间的相关性的数据。

[0031] 图5d显示了展示如图5c所示的从血浆中检测到的p217+tau与如图5b所示的从血

清中检测到的p217+tau之间的相关性的数据。

[0032] 图6a显示了针对本申请的一个测定的一个示例性实施方案使用校准肽生成的代表性校准曲线。

[0033] 图6b显示了展示在血清和血浆中本申请的一个示例性测定的稀释线性度的数据。

[0034] 图7a显示了展示在血浆中本申请的一个示例性测定的测试内精度的数据。

[0035] 图7b显示了展示在血浆中本申请的一个示例性测定的测试间精度的数据。

[0036] 图7c显示了展示在血浆中本申请的一个示例性测定的测试内精度的其他数据。

[0037] 图8a显示了展示在AD受试者中使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在血浆中检测到的p217+tau的相关性的数据。

[0038] 图8b显示了展示在AD受试者中使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在血浆中检测到的p217+tau的相关性的其他数据。

[0039] 图9a显示了展示在验证队列中使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在血浆中检测到的p217+tau的相关性的其他数据。

[0040] 图9b显示了图7b的数据的接收者操作特征(ROC)曲线,该曲线表示在区分tau蛋白病的脑病理学方面根据本申请的示例性测定获得的血浆测量值的灵敏度。

[0041] 图10a显示了展示通过正电子发射断层扫描(PET)成像检测到的在CSF中检测到的p217+tau与tau在脑组织中的积聚的相关性的数据。

[0042] 图10b显示了图7b的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分tau蛋白病的脑病理学方面CSF中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0043] 图11a显示了展示在验证队列中使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在血浆中检测到的p217+tau的相关性的其他数据。

[0044] 图11b显示了针对CSF AB42/40比率 ≤ 0.089 的淀粉样蛋白阳性患者的图11a的数据的子集。

[0045] 图11c显示了针对CSF AB42/40比率 > 0.089 的淀粉样蛋白阴性患者的图11a的数据的子集。

[0046] 图12a显示了展示使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p181tau与在血浆中检测到的p217+tau的相关性的数据。

[0047] 图12b显示了图12c的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分CSF p217+tau水平方面血浆中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0048] 图12c显示了图11a的数据以及血浆p217+tau和CSFp217+tau的阈值,所述阈值用于将患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险的患者与无发展成tau蛋白病的风险的那些患者区分开来。

[0049] 图12d显示了图12e的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分CSF p217+tau水平方面血浆中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0050] 图12e显示了针对认知正常受试者的图12c的数据的子集。

[0051] 图12f显示了图12g的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分CSF p217+tau水平方面血浆中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0052] 图12g显示了针对轻度-中度痴呆受试者的图12c的数据的子集。

[0053] 图13a显示了图13b的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分CSF中的AB42/40比率方

面血浆中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0054] 图13b显示了展示使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的Aβ42/40比率与在血浆中检测到的p217+tau的相关性的数据。

[0055] 图13c显示了图13d的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分CSF中的Aβ42/40比率方面血浆中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0056] 图13d显示了针对认知正常受试者的图13a的数据的子集。

[0057] 图13e显示了图13f的数据的ROC曲线,该曲线表示在区分CSF中的比率Aβ42/40比率方面血浆中的p217+tau测量值的灵敏度。

[0058] 图13f显示了针对轻度-中度痴呆受试者的图13a的数据的子集。

[0059] 图14a显示了展示使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在粗制血浆中检测到的p217+tau的相关性的数据。

[0060] 图14b显示了展示使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在化学提取的血浆中检测到的p217+tau的相关性的数据。

[0061] 图14c显示了展示使用本申请的一个示例性测定在CSF中检测到的p217+tau与在半变性血浆中检测到的p217+tau的相关性的数据。

[0062] 图15a显示了从根据本申请的一个测定的一个示例性实施方案获得的血浆的半变性样品检测到的p217+tau的数据。

[0063] 图15b显示了针对本申请的一个测定的另一个示例性实施方案使用校准肽生成的代表性校准曲线,其中样品在测量之前是半变性的。

[0064] 图15c显示了展示图9b的示例性测定的测试内精度的数据,其中样品在测量之前是半变性的。

[0065] 图16a显示了根据本申请的一个示例性实施方案使用作为生物标志物特征的血清p217+tau水平来区分tau蛋白病的脑病理学的机器学习方法的ROC曲线。

[0066] 图16b显示了根据本申请的一个示例性实施方案使用作为生物标志物特征的血清p217+tau水平和神经丝轻链(NFL)的数据来区分tau蛋白病的脑病理学的机器学习方法的ROC曲线。

[0067] 图16c显示了根据本申请的一个示例性实施方案使用作为生物标志物特征的血清p217+tau水平以及NFL和脂连蛋白的数据来区分tau蛋白病的脑病理学的机器学习方法的ROC曲线。

[0068] 图16d显示了根据本申请的一个示例性实施方案使用作为生物标志物特征的血清p217+tau水平以及NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的数据来区分tau蛋白病的脑病理学的机器学习方法的ROC曲线。

[0069] 图16e显示了根据本申请的一个示例性实施方案使用作为生物标志物特征的NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的数据来区分tau蛋白病的脑病理学的机器学习方法的ROC曲线。

具体实施方式

[0070] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。否则,本文所用的某些术语具有本说明书中所述的含义。本文引用的所有专利、公布的专利申请和出版物均以引用方式并入本文,如同在本

文中进行了充分阐述。值得注意的是,除非上下文清楚决定不是这样,否则本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个”、“一种”、“该”和“所述”包括复数指代。

[0071] 除非另行指出,否则任何数值,诸如本文所述的浓度或浓度范围被理解为在所有情况下用术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值的 $\pm 10\%$ 。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1%至10% (w/v)的浓度范围包括0.9% (w/v)至11% (w/v)。除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,使用的数值范围明确地包括所有可能的子范围、该范围之内所有单个数值,包括此类范围之内整数和该范围之内分数。

[0072] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是指能够结合抗原或其部分的特异性蛋白质。这些术语在本文中广义地使用,并且包括免疫球蛋白或抗体分子,包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括鼠科动物、人、人适应的、人源化和嵌合单克隆抗体)和抗体片段。

[0073] 一般来讲,抗体是蛋白质或肽链,其对于特定抗原表现出结合特异性。抗体结构是众所周知的。根据重链恒定结构域氨基酸序列,可将免疫球蛋白指定为五种主要种类,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgA和IgG进一步亚分类为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。因此,本申请抗体可为五种主要种类或对应的亚类中的任一种。优选地,本申请的抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。基于其恒定结构域的氨基酸序列,可将任何脊椎物种的抗体轻链指定为两种完全不同的类型即 κ 和 λ 中的一种。因此,本申请的抗体可含有 κ 或 λ 轻链恒定结构域。根据特定实施方案,本申请的抗体包括来自小鼠抗体或人抗体的重链和/或轻链恒定区。

[0074] 除重链和轻链恒定结构域之外,抗体还含有轻链和重链可变区。免疫球蛋白轻或重链可变区由被“抗原结合位点”间断的“框架”区组成。抗原结合位点用如下各种术语和编号方案定义:

[0075] (i) Kabat:“互补决定区”或“CDR”基于序列可变性(Wu和Kabat, J Exp Med.132:211-50,1970)。一般来讲,抗原结合位点在每个可变区具有三个CDR(例如重链可变区(VH)中的HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及轻链可变区(VL)中的LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[0076] (ii) Chothia:术语“高变区”、“HVR”是指抗体可变结构域的区域,这些区域是结构高变的,如由Chothia和Lesk所定义(Chothia和Lesk, J Mol Biol.196:901-17,1987)。一般地,抗原结合位点具有在每个VH(H1、H2、H3)和VL(L1、L2、L3)中的三个高变区。CDR和HVR的编号系统以及注释已由Abhinandan和Martin(Abhinandan和Martin, Mol Immunol.45:3832-9,2008)修订;

[0077] (iii) IMGT:形成抗原结合位点的区域的另一定义已通过Lefranc(Lefranc等人, Dev Comp Immunol.27:55-77,2003)基于免疫球蛋白和T细胞受体的V结构域的比较提出。国际免疫遗传学(IMGT)数据库(<http://www.imgt.org>)提供了这些区的标准化编号和定义。CDR、HVR和IMGT划分之间的对应性在Lefranc等人,2003(同上)中有所描述;

[0078] (iv) 也可基于“使用的特异性决定残基”(SDRU)(Almagro, Mol Recognit.17:132-43,2004)来划分抗原结合位点,其中SDR是指直接参与抗原接触的免疫球蛋白的氨基酸残基。

[0079] “框架”或“框架序列”是在抗体的可变区之内除限定为抗原结合位点序列的那些之外的剩余序列。因为抗原结合位点的确切定义可通过如上所述的多种划分来确定,所以确切的构架序列取决于抗原结合位点的定义。框架区(FR)是可变结构域的更高度保守的部

分。天然重链和轻链的可变结构域各自包括四个FR(分别为FR1、FR2、FR3和FR4),其通常采取 β 片层构型,通过三个高变环连接。每条链中的高变环通过FR并与另一条链的高变环紧密结合在一起,并且有助于形成抗体的抗原结合位点。抗体的结构分析显示出互补决定区所形成的结合位点的序列和形状之间的关系(Chothia等人,J.Mol.Biol.227:799-817,1992;Tramontano等人,J.Mol.Biol.215:175-182,1990)。尽管其序列变异性较高,六个环中的五个仅采取小规模主链构象,称为“典范结构”。这些构象首先由环的长度确定,其次由通过其包装、氢键合或呈现独特主链构象的能力决定构象的环和框架区中特定位置处关键残基的存在而确定。

[0080] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,诸如例如,双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定双抗体(ds双抗体)、单链抗体分子(scFv)、单结构域抗体(sdab)、scFv二聚体(二价双抗体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的双特异性或多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或与抗原结合但不包含完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够结合至与亲本抗体或亲本抗体片段结合的抗原相同的抗原。根据具体实施方案,抗原结合片段包含轻链可变区、轻链恒定区、以及重链恒定区的Fd区段。根据其他具体实施方案,抗原结合片段包含Fab和F(ab')。

[0081] 如本文所用,术语“表位”是指免疫球蛋白、抗体或其抗原结合片段特异性结合至其的抗原上的位点。表位可由连续氨基酸或由通过蛋白质的三级折叠并置的不连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常在独特空间构象中包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如x射线晶体学和2维核磁共振。参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编辑(1996年)。

[0082] 如本文所用,术语“tau”或“tau蛋白”是指具有多种同种型的丰富的中枢和周围神经系统蛋白质。在人中枢神经系统(CNS)中,由于可变剪接,存在大小范围为352至441氨基酸长度的六种主要tau同种型(Hanger等人,Trends Mol Med.15:112-9,2009)。同种型通过0至2个N末端插入序列的调节内含物以及3或4个串联排列的微管结合重复序列而彼此不同,并且被称为0N3R、1N3R、2N3R、0N4R、1N4R和2N4R。如本文所用,术语“对照tau”是指SEQ ID NO:1的tau同种型,其缺乏磷酸化及其他翻译后修饰。如本文所用,术语“tau”包括包含全长野生型tau的突变,例如点突变、片段、插入、缺失和剪接变体的蛋白质。术语“tau”还涵盖tau氨基酸序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于磷酸化。

[0083] 除非另外指明,否则如本文所用,tau蛋白或其片段中的氨基酸编号参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

[0084] 如本文所用,术语“p217+tau肽”、“p217+tau”或“p217+tau蛋白”是指在tau蛋白的残基217(pT217)处磷酸化,并且可以或不可以在另外的残基诸如例如tau蛋白的残基212(pT212)处进一步磷酸化的人tau蛋白或tau片段,其中这些位置的编号跟据SEQ ID NO:1中的编号。

[0085] 如本文所用,术语“p217+tau表位”是指含有磷酸化的T217和磷酸化的T212中的至少一者的tau表位,其中这些位置的编号跟据SEQ ID NO:1中的编号。p217+tau表位的示例

包括例如pT3表位。如本文所用,术语“pT3表位”是指含有人tau蛋白的氨基酸210至220的表位,该表位在残基217处磷酸化,并且可以或不可在另外的残基诸如例如残基212处进一步磷酸化,其中这些位置的编号根据SEQ ID NO:1中的编号。

[0086] 如本文所用,术语“长p217+tau肽”、“长p217+tau”、“长形式的p217+tau肽”或“长p217+tau肽片段”中的每一者具有相同的含义,是指包含p217+tau表位和包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位的p217+tau肽。根据本申请的实施方案的“长p217+tau肽”可具有不同的长度。例如,“长p217+tau肽片段”的氨基末端可为tau蛋白的氨基酸残基1、2、3、4、5、6或7。在一个示例中,“长p217+tau肽”可包含p217+tau蛋白的氨基酸残基7至220。

[0087] 如本文所用,术语“短p217+tau肽”、“短p217+tau”、“短形式的p217+tau肽”或“短p217+tau肽片段”中的每一者具有相同的含义,是指包含p217+tau表位和包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位,但不含有包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位的p217+tau肽。根据本申请的实施方案的“短p217+tau肽”可具有不同的长度。例如,“短p217+tau肽”的氨基末端可为包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位与包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位之间的氨基酸残基中的任一个。在一个示例中,“短p217+tau肽”可包含p217+tau蛋白的氨基酸残基119至220。

[0088] 如本文所用,术语“长tau肽”、“长tau”、“长形式的tau肽”或“长tau肽片段”中的每一者具有相同的含义,是指包含由磷酸化非依赖性捕获抗体识别的tau表位和包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位的tau肽。根据本申请的实施方案的“长tau肽片段”可具有不同的长度。例如,“长tau肽片段”的氨基末端可为tau蛋白的氨基酸残基1、2、3、4、5、6或7。

[0089] 如本文所用,术语“短tau肽”、“短tau”、“短形式的tau肽”或“短tau肽片段”中的每一者具有相同含义,是指包含由磷酸化非依赖性捕获抗体识别的tau表位和包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位,但不含有包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位的tau肽。根据本申请的实施方案的“短tau肽片段”可具有不同的长度。例如,“短tau肽”的氨基末端可为包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位与包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位之间的氨基酸残基中的任一个。

[0090] 如本文所用,术语“捕获抗体”是指结合至感兴趣的抗原并直接或间接连接至固相载体的抗体。固相载体的示例包括但不限于微粒或珠,诸如磁珠或顺磁珠。捕获抗体的示例包括但不限于结合至p217+tau表位的单克隆抗体。

[0091] 根据本申请的实施方案,捕获抗体可为单克隆抗体,该单克隆抗体包含分别具有SEQ ID NO:23、24和25的多肽序列的免疫球蛋白重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及具有SEQ ID NO:26、27和28的多肽序列的免疫球蛋白轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一个具体实施方案中,捕获抗体为pT3。如本文所用,术语“pT3”是指结合至p217+tau肽并具有SEQ ID NO:19的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:20的轻链可变区氨基酸序列的抗体。在一个实施方案中,pT3单克隆抗体由小鼠杂交瘤表达。在另一个实施方案中,捕获抗体是具有SEQ ID NO:21的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链可变区氨基酸序列的人源化抗体。

[0092] 根据本申请的其他实施方案,捕获抗体可为单克隆抗体,该单克隆抗体以磷酸化非依赖性方式结合至tau蛋白的氨基酸150和氨基酸250之间的表位,优选地人tau蛋白的氨基酸211至221或氨基酸159至163,并且这些位置的编号根据SEQ ID NO:1中的编号。在一个具体实施方案中,捕获抗体为hT7。如本文所用,术语“hT7”是指可公开获得的单克隆抗体,

该单克隆抗体结合至包含人tau蛋白的氨基酸159至163的表位,其中这些位置的编号根据SEQ ID NO:1中的编号。hT7单克隆抗体可例如从赛默飞世尔公司(ThermoFisher)商购获得(例如,目录号:MN1000)。

[0093] 如本文所用,术语“检测抗体”是指结合至感兴趣的抗原并具有可检测标签或连接至辅助检测系统的抗体。可检测标签的示例包括但不限于各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。检测抗体的示例包括但不限于结合至tau蛋白的单克隆抗体,优选地包含人tau蛋白的氨基酸7至20或116至127的表位,其中这些位置的编号根据SEQ ID NO:1中的编号。当在包含氨基酸7至20的表位处结合至tau蛋白的单克隆抗体用作所捕获的p217+tau肽的检测抗体时,检测长tau片段。当在包含氨基酸116至127的表位处结合至tau蛋白的单克隆抗体用作所捕获的p217+tau肽的检测抗体时,检测短tau片段和长tau片段两者。

[0094] 根据本申请的实施方案,检测抗体可为单克隆抗体,该单克隆抗体包含分别具有SEQ ID NO:10、11和12的多肽序列的免疫球蛋白重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及具有SEQ ID NO:13、14和15的多肽序列的免疫球蛋白轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一个具体实施方案中,检测抗体是hT43。如本文所用,术语“hT43”是指结合至包含人tau蛋白的氨基酸7至20的表位的单克隆抗体,其中这些位置的编号根据SEQ ID NO:1中的编号,并且该抗体具有SEQ ID NO:16的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:17的轻链可变区氨基酸序列。

[0095] 在另一个实施方案中,检测抗体可为单克隆抗体,该单克隆抗体包含分别具有SEQ ID NO:2、3和4的多肽序列的免疫球蛋白重链HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及具有SEQ ID NO:5、6和7的多肽序列的免疫球蛋白轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。在另一个具体实施方案中,检测抗体是pT82。如本文所用,术语“pT82”是指结合至包含人tau蛋白的氨基酸119至126,优选地117至127的表位的单克隆抗体,其中这些位置的编号根据SEQ ID NO:1中的编号,并且该抗体具有SEQ ID NO:8的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:9的轻链可变区氨基酸序列。

[0096] 如本文所用,术语“基于pT3的测定”是指其中pT3抗体用作捕获抗体的测定。如本文所用,术语“pT3xhT43”是指其中pT3抗体用作捕获抗体并且hT43抗体用作检测抗体的测定。如本文所用,术语“pT3xpT82”是指其中pT3抗体用作捕获抗体并且pT82抗体用作检测抗体的测定。

[0097] 如本文所用,术语“基于hT7的测定”是指其中hT7抗体用作捕获抗体的测定。如本文所用,术语“hT7xpT82”是指其中hT7抗体用作捕获抗体并且pT82抗体用作检测抗体的测定。

[0098] 如本文所用,术语“受试者”是指动物,并且优选地指哺乳动物。根据特定实施方案,受治疗者是哺乳动物,包括非灵长类(例如骆驼、驴、斑马、奶牛、猪、马、山羊、绵羊、猫、犬、大鼠、兔、豚鼠、绒猴或小鼠)或灵长类(例如猴、黑猩猩或人)。在特定实施方案中,受试者是人。

[0099] 如本文使用,“tau蛋白病”涵盖涉及脑之内的tau病理性聚集的任何神经退化性疾病。除家族性和散发性AD之外,其他示例性tau蛋白病是与17号染色体相关的额颞痴呆及帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结性痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、

克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、具有神经原纤维缠结的非关岛运动神经元病、脑炎后帕金森综合征和慢性创伤性脑病诸如拳击员痴呆症(拳击疾病)(Morris等人,Neuron,70:410-26,2011)。

[0100] 如本文所用,术语“淀粉样蛋白形成性疾病”包括与不溶性淀粉样蛋白原纤维的形成或沉积相关(或由其引起)的任何疾病。示例性淀粉样蛋白形成性疾病包括但不限于全身性淀粉样变性、阿尔茨海默病、早发型糖尿病、帕金森病、亨廷顿舞蹈症、额颞叶痴呆和朊病毒相关性传染性海绵状脑病(人的库鲁(kuru)病和克罗伊茨费尔特-雅各布(Creutzfeldt-Jacob)病以及绵羊和牛的瘙痒病和BSE)。不同的淀粉样蛋白形成性疾病通过沉积的原纤维的多肽组分的性质来定义或表征。例如,在患有阿尔茨海默病的受试者或患者中, β -淀粉样蛋白(例如,野生型、变体或截短的 β -淀粉样蛋白)是淀粉样蛋白沉积的特征性多肽组分。因此,阿尔茨海默病是例如受试者或患者脑中“以 $A\beta$ 沉积为特征的疾病”或“与 $A\beta$ 沉积相关的疾病”的示例。术语“ β -淀粉样蛋白”、“ β -淀粉样肽”、“ β -淀粉样”、“ $A\beta$ ”和“ $A\beta$ 肽”在本文中可互换使用。

[0101] 如本文所用,术语“确定”、“测量”、“评估”和“测定”可互换使用,并且包括定量确定和定性确定两者。这些术语是指任何形式的测量,并且包括确定特性、性状或特征是否存在。评估可以是相对的或绝对的。“评估存在”包括确定存在的某物的量,以及确定其是否存在。

[0102] 如本文所用,术语“诊断”意指检测疾病或障碍或确定疾病或障碍(诸如tau蛋白病或淀粉样蛋白形成性疾病)的阶段或程度。通常,疾病或障碍的诊断基于评估指示该疾病的一个或多个因素和/或症状。可基于指示疾病或病症的存在或不存在的因素(例如p217+tau)的存在、不存在或量作出诊断。被认为指示特定疾病的诊断的每种因素或症状不需要仅与该特定疾病相关,即可存在可从诊断因素或症状推断出的鉴别诊断。同样,可存在指示特定疾病的因素或症状存在于不患该特定疾病的个体中的情况。术语“诊断”还涵盖确定药物治疗(例如,抗p217+tau抗体疗法)的治疗效果,或预测对药物治疗(例如,抗p217+tau抗体疗法)的响应模式。诊断方法可独立使用,或与医学领域已知的用于特定疾病或障碍(例如,阿尔茨海默病)的其他诊断和/或分期方法结合使用。

[0103] 如本文所用,术语“提高”和“降低”是指样品中特定生物标志物的量与对照水平或参照水平相比的差异。例如,特定肽的量可以与参照水平相比升高的量或降低的量存在于患有疾病的患者的样品中。在一个实施方案中,“水平的提高”或“水平的降低”可为样品中存在的生物标志物的水平与对照相比的差异为至少约1%、至少约2%、至少约3%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约75%、至少约80%或更多。在一个实施方案中,“水平的提高”或“水平的降低”可为样品中存在的生物标志物的水平与对照相比的统计意义上的显著差异。例如,如果生物标志物的测量水平落在任何对照组或参照组的平均值的约1.0标准偏差、约1.5标准偏差、约2.0标准偏差或约2.5标准偏差之外,则差异可具有统计意义上的显著性。参照或对照可为例如来自健康个体的样品或在较早的时间点(诸如在施用治疗剂之前的时间点或在治疗方案期间的较早时间点)取自同一个体的样品。

[0104] 如本文所用,术语“分离的”意指生物组分(诸如核酸、肽或蛋白质)已经与组分天然存在的生物体的其他生物组分(即其他染色体和染色体外的DNA和RNA以及蛋白质)基本

上分离、分开得到或从其中纯化出来。因此,已经“分离的”核酸、肽和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。“分离的”核酸、肽和蛋白质可为组合物的一部分,并且如果这样的组合物不是核酸、肽或蛋白质自身环境的一部分,则仍然是分离的。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸、肽和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0105] 如本文所用,“结合至tau蛋白的分离的抗体”或“分离的抗tau抗体”旨在指特异性结合tau蛋白并且基本上不合具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,分离的抗tau检测抗体基本上不合特异性结合除tau之外的抗原的抗体)。然而,分离的抗tau检测抗体可与例如来自其他物种(诸如tau物种同源物)的其他相关抗原具有交叉反应性。

[0106] 如本文所用,术语“特异性结合”或“特异结合”是指本申请的抗tau抗体以约 1×10^{-6} M或更低,例如约 1×10^{-7} M或更低、约 1×10^{-8} M或更低、约 1×10^{-9} M或更低、约 1×10^{-10} M或更低、约 1×10^{-11} M或更低、约 1×10^{-12} M或更低、或约 1×10^{-13} M或更低的解离常数(K_D)与预定靶标结合的能力。 K_D 获自 K_d 与 K_a 的比率(即 K_d/K_a)并且表示为摩尔浓度(M)。根据本公开,抗体的 K_D 值可以使用本领域中的方法确定。例如,抗tau抗体的 K_D 值可通过使用表面等离子共振,诸如通过使用生物传感器系统,例如 **Biacore**[®] 系统、Proteon仪器(BioRad)、KinExA仪器(Sapidyne)、ELISA或本领域的技术人员已知的竞争性结合测定来确定。通常,抗tau抗体与预定靶标(即,tau)结合的 K_D 比其对于非特异性靶标的 K_D 小至少十倍,如通过使用例如Proteon仪器(BioRad)的表面等离子共振测量的。然而,特异性结合至tau的抗tau抗体可与其他相关靶标,例如与来自其他物种(同源物),诸如来自小鼠、大鼠、狨猴、狗或猪的相同预定靶标具有交叉反应性。

[0107] 如本文所用,同义地称为“核酸分子”、“核苷酸”或“核酸”的术语“多核苷酸”是指任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可为未修饰的RNA或DNA或者修饰的RNA或DNA。“多核苷酸”包括但不限于单链和双链的DNA、为单链区和双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区和双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更典型地为双链或者为单链区和双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子。此外,“多核苷酸”是指包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个修饰的碱基的DNA或RNA,以及具有出于稳定性或其他原因而被修饰的主链的DNA或RNA。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化的碱基和稀有碱基诸如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括通常天然存在的多核苷酸的化学修饰、酶修饰或代谢修饰形式,以及病毒和细胞特有的DNA和RNA的化学形式。“多核苷酸”也包括相对短的核酸链,通常被称为寡核苷酸。

[0108] 如本文所用,术语“调节、改善或治疗”或“疗法”包括预防身体和/或精神病症,或者一旦已建立就改善或消除所发展的身体和/或精神病症,或者减轻此类病症的特征性症状。

[0109] 如本文所用,术语“准确度”是指值与测定的真实值的接近程度。

[0110] 如本文所用,术语“精度”是指从测定的相同均质样品的多次取样获得的一系列测量值之间的一致性的接近度。

[0111] 如本文所用,术语“灵敏度”是指在测定中可以可接受的准确度和精度测量的样品中的最低分析物浓度。

[0112] 本申请提供了用于在基于血液的样品(特别是血浆)中检测单个或多个磷酸化的p217+tau肽的测定和方法。与用于收集CSF的腰椎穿刺相比,血液样品的收集快速且易于进

行,并且提供了降低的感染或其他并发症的风险。本申请的测定和方法以足够的灵敏度、精度和准确度测量基于血液的样品中的p217+tau肽。因此,与基于CSF的测定相比,本申请提供了用于测量和/或监测受试者中的p217+tau水平的改进方式,该方式通过使受试者的样品收集的负担最小化并且由此使得能够更频繁地测定和监测p217+tau水平的变化,这对于监测和评估对治疗的响应是特别期望的。在本申请的测定和方法中使用的样品可以是血液、血清或血浆样品。优选地,样品是血浆样品。更优选地,血浆样品没有被免疫沉淀以浓缩其中含有的p217+tau肽。在一个特定实施方案中,样品是粗制血浆样品。

[0113] 本申请的测定和方法涉及通过使用与样品中的p217+tau肽结合的捕获抗体来测量基于血液的样品中的p217+tau肽。优选地将捕获抗体固定在固相上,以使得捕获抗体选择性地结合至并将样品中存在的p217+tau肽固定在固相上。在单独的步骤中,使捕获的p217+tau肽与抗tau检测抗体接触,所述抗tau检测抗体用允许检测捕获的p217+tau种类的报告基因元件标记。本文所述的测定和方法可用于各种诊断目的,例如用于诊断受试者的AD、其他tau蛋白病、以A β 沉积为特征的其他疾病或其他淀粉样蛋白形成性疾病,监测治疗的有效性,鉴定适用于抗p217+tau治疗的受试者,预筛选用于PET成像和/或CSF测定以进一步检测AD、其他tau蛋白病、以A β 沉积为特征的其他疾病或其他淀粉样蛋白形成性疾病的受试者,鉴定参与涉及AD、其他tau蛋白病、以A β 沉积为特征的其他疾病或其他淀粉样蛋白形成性疾病的临床试验的受试者,等等。

[0114] 在一个示例性实施方案中,本申请的测定和方法包括以下步骤:使基于血液的样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使捕获抗体与样品中的p217+tau肽结合,从而产生抗体-肽复合物,然后洗涤抗体-肽复合物。抗体-肽复合物可以用不干扰测定的任何合适的溶液,例如缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液)洗涤。然后可以使洗涤的抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使检测抗体结合至抗体-肽复合物。然后对检测抗体进行检测以确定样品中的p217+tau肽的量。

[0115] 在Ko1b等人的美国专利号10591492中(下文称为“Ko1b'492专利”)(该专利以引用的方式整体并入本文),公开了用于测量生物样品中的p217+tau肽的测定。生物样品可包括脑脊液(CSF)、血液或脑匀浆物。在Ko1b'492专利中观察到,粗制血清或血浆中的tau测量未表现出理想的诊断性能,并且可受到灵敏度和基质干扰障碍的困扰。如下文所示,在粗制血清中的测量值显示Ko1b'492专利中描述的测定不能提供足够的灵敏度,因为大多数测量值低于该测定的定量下限(LLoQ),所述定量下限是指能够以可接受的精度和准确度定量测定的分析物的最低量,并且仅显示出在样品被免疫沉淀然后洗脱液热变性后是可检测的。下文提供的实施例3展示了,当用于测量血浆中的p217+tau肽时,Ko1b'492专利中描述的pT3xpT82测定(该测定将样品与捕获抗体和检测抗体在同一混合物中以单个步骤组合)缺乏灵敏度和稀释线性度。

[0116] 相比之下,虽然与CSF相比,基于血液的样品中的p217+tau肽的水平显著更低,但是本申请的测定和方法可出乎意料地以更高的灵敏度测量来自人血清和/或血浆样品的p217+tau肽,而无需在测量之前通过免疫沉淀首先浓缩样品中的p217+tau肽。免疫沉淀是麻烦且不精确的方法。因此,本申请提供了改进的测定和方法,所述测定和方法提高了测量p217+tau肽的灵敏度,而无需在测量之前对样品进行免疫沉淀的繁琐预处理。具体而言,已经出乎意料地发现,(1)用于将捕获抗体结合至存在于血清和/或血浆样品中的p217+tau肽

以形成抗体-肽复合物,以及(2)用于将抗体-肽复合物结合至检测抗体的单独的步骤,可以成功地减少来自样品中的其他组分(例如,内源产生的或外源施用的干扰性抗体)的干扰,以使得该测定对于检测血清和/或血浆中的p217+tau肽足够灵敏。在一个实施方案中,样品可以首先与捕获抗体接触以使捕获抗体结合至样品中的p217+tau肽,然后洗涤以除去可能干扰测定的任何未结合的组分。在洗涤后,使捕获的p217+tau肽与检测抗体接触,使检测抗体与捕获的p217+tau肽结合。下文提供的实施例4还展示了,当使用Kolb'492专利中描述的测定(所述测定将样品与捕获抗体和检测抗体在同-混合物中以单个步骤组合)来测量血清中的p217+tau肽时,观察到对应于干扰组分的伪影信号(这在CSF中未观察到)。然而,如本申请所述,使用包括使捕获抗体和检测抗体结合至p217+tau肽的单独的步骤的示例性方法获得的p217+tau测量值不存在这种伪影信号。

[0117] 此外,还出乎意料地发现,当测量来自人血浆样品的p217+tau肽时,与人血清样品相比,本申请的测定和方法出乎意料地更灵敏,这是因为在血浆中可检测的p217+tau水平出乎意料地增加,如下文实施例7中进一步所示。本申请的测定和方法能够测量p217+tau肽,并为健康受试者和患有tau蛋白病(更具体而言,AD)或处于发展tau蛋白病的风险的那些受试者提供准确和精确的定量结果。本申请的测定和方法还能够测量p217+tau肽,并为健康受试者和患有淀粉样蛋白形成性疾病或处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险的那些受试者,尤其是患有痴呆(例如,轻度-中度痴呆)的受试者提供准确和精确的定量结果。具体而言,所述测定和方法能够测量大于本申请的测定的LLOQ的来自两组受试者的血浆样品的p217+tau肽,这表示可接受且可靠的灵敏度水平。测定的LLOQ可以在测定的变异系数(CV)的15%-25%内,在CV的15%-20%内,或优选地在CV的20%内。此外,根据本申请的测定和方法从健康受试者的血浆样品获得的p217+tau测量值与来自AD受试者的那些测量值在数字上是可分离的。因此,本申请的测定和方法提供了可用于从AD受试者中鉴定出健康受试者的准确和精确的测量。

[0118] 在一个实施方案中,本申请的测定和方法测量来自受试者的血浆样品的p217+tau,并且随后当从血浆样品测量的p217+tau的量大于预定阈值时确定受试者患有tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病或者处于发展tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病的风险。预定阈值可以是任何合适的阈值,用于将患有tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病或者处于发展tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病的风险的那些受试者与健康且无发展成tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病的风险的那些受试者区分开来。预定阈值可被确定为血浆p217+tau浓度,用于:区分如通过PET成像所测量大于脑或脑区域中的tau水平的那些患者和小于该水平的那些患者;区分大于CSF中的tau(例如,磷酸化的tau,诸如p181或p217+tau)水平的那些患者和小于该水平的那些患者;区分大于诸如在CSF或血浆中的 β -淀粉样蛋白(例如,A β 40或A β 42)的水平的那些患者;区分大于诸如在CSF或血浆中的A β 42与A β 40的比率的那些患者和小于该比率的那些患者;以及区分认知正常的那些患者和患有痴呆的那些患者。由于本申请的测定和方法在人血浆中的出乎意料地更高的灵敏度,预定阈值大于测定的LLOQ,从而提供灵敏的、可定量的阈值水平,该阈值水平用于鉴定患有tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性或者处于发展tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性的风险的那些受试者与健康受试者。具体而言,预定阈值大于测定的LLOQ和/或检测下限(LLOD),所述检测下限是可被可靠地检出的分析物的最低量。例如,预定阈值可以是测定的LLOQ的至少

3、4、5、7或10倍和/或测定的LLOD的至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110或120倍。

[0119] 被鉴定为患有tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病或者处于发展tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病的风险的受试者可以被指导以获得进一步的临床测试,例如CSF收集和/或PET成像,以进一步评估这些受试者的脑病理学。在另一个实施方案中,被鉴定为患有tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病或者处于发展tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病的风险的受试者可以被施用用于治疗认知衰退或者tau蛋白病和/或淀粉样蛋白形成性疾病(例如,AD)的活性剂。用于治疗tau蛋白病的活性剂可包括抗tau抗体、抗p217+tau抗体、针对人tau的小干扰RNA(siRNA)、针对p217+tau的siRNA、胆碱酯酶抑制剂、N-甲基D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂等。针对淀粉样蛋白形成性疾病的活性剂可包括抗淀粉样蛋白抗体、 β 分泌酶抑制剂、 γ 分泌酶抑制剂、针对人 β 淀粉样蛋白的小干扰RNA(siRNA)、胆碱酯酶抑制剂、N-甲基D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂等。

[0120] 在一些实施方案中,预定阈值可对应于基线值或显著高于基线值的值。如本文所用,“显著较高”是指具有统计意义上的显著性而不是仅由于偶然性的较高值,该值具有0.05或更小的p值。在p值小于0.05、0.04、0.03、0.01、0.005、0.001等的情况下,“显著较高”可以比健康志愿者中存在的高至少约1%、2%、5%或10%。基线值可以对应于健康个体群体中的平均水平。基线值也可以对应于在同一受试者中测定的此前水平的平均值。

[0121] 在一个实施方案中,捕获抗体是针对p217+tau表位的单克隆抗体,并且检测抗体是针对包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位的单克隆抗体。在另一个实施方案中,捕获抗体是针对p217+tau表位的单克隆抗体,并且检测抗体是针对包含人tau蛋白的氨基酸残基119至126,优选地氨基酸残基116至127的表位的单克隆抗体。在一个示例性实施方案中,捕获抗体是包含分别具有SEQ ID NO:23、24和25的多肽序列的免疫球蛋白重链HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:26、27和28的多肽序列的免疫球蛋白轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3的单克隆抗体,并且检测抗体是包含分别具有SEQ ID NO:10、11和12的多肽序列的免疫球蛋白重链HCDR1、HCDR2和HCDR3以及具有SEQ ID NO:13、14和15的多肽序列的免疫球蛋白轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3的单克隆抗体。更具体而言,捕获抗体是pT3和/或检测抗体是hT43。

[0122] 根据本申请的一个实施方案,用针对p217+tau表位的捕获抗体来捕获感兴趣的样品中的p217+tau肽。所捕获的p217+tau肽虽然均含有p217+tau表位,但可具有不同的长度,这可通过结合至不同表位的检测抗体来检测。例如,针对包含tau蛋白的氨基酸残基7至20的表位的检测抗体只可检测仍然含有tau蛋白的氨基酸残基7至20的所捕获的p217+tau肽或其片段(“长p217+tau肽”),而针对包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位的检测抗体不仅可检测长p217+tau肽,而且可检测短p217+tau肽。所捕获的p217+tau肽可与针对包含tau蛋白的氨基酸残基7至20或氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,从而检测和测量样品中的长p217+tau肽或p217+tau肽(长和短p217+tau肽)的量。通过从p217+tau肽的量减去长p217+tau肽的量来计算样品中的短p217+tau肽的量。

[0123] 鉴于使用本申请的测定和方法在血浆中检测p217+tau肽所观察到的出乎意料地提高的灵敏度,据信提高的灵敏度同样适用于上文所述的短p217+tau肽和/或长p217+tau肽的检测。因此,在本申请的另一个实施方案中,本申请的测定和方法包括测量来自血清和/或血浆样品的短p217+tau和/或长p217+tau肽。具体而言,本申请的测定和方法可以以

增加的灵敏度测量来自人血浆的短p217+tau和/或长p217+tau。在另一个实施方案中,本申请的测定和方法测量来自受试者的血浆样品的短p217+tau和/或长p217+tau,并且随后确定该受试者患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险,其中从血浆样品测量的短p217+tau和/或长p217+tau肽的量大于预定阈值。预定阈值大于测定的LLOQ。

[0124] 根据本申请的另一个实施方案,除了捕获和测量样品中p217+tau肽的量之外,还用磷酸化非依赖性捕获抗体,诸如针对tau蛋白的氨基酸150和氨基酸250之间的表位,优选地包含tau蛋白的氨基酸159至163的表的抗体来捕获样品中的总tau肽位。所捕获的总tau肽可与针对包含tau蛋白的氨基酸残基7至20或116至127的表位的检测抗体接触,从而检测和测量样品中的总长tau肽或总tau肽(长tau肽片段和短tau肽片段)的量。通过从总tau肽的量减去总长tau肽的量来计算样品中的短总tau肽的量。

[0125] 根据本申请的实施方案,与样品中的p217+tau肽相关的值,诸如p217+tau肽的量和长p217+tau肽的量,任选地样品中的总tau肽的量和总长tau肽片的量,以及基于测量量的信息,诸如所计算的短p217+tau肽和短总tau肽,或与p217+tau肽相关的比率,诸如短tau肽片的量与长tau肽片的量的比率、短p217+tau肽的量与短tau肽的总量的比率、长p217+tau肽的量与长tau肽的总量的比率等可用于一种或多种诊断目的。在一个实施方案中,如果与p217+tau肽相关的比率,例如,短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率显著高于对应的基线比率并且所测量的p217+tau、短p217+tau和/或长p217+tau的量大于测定的LLOQ,则确定受试者患有tau蛋白病。

[0126] 在一个实施方案中,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对包含磷酸化的p217+tau的表位的捕获抗体接触,以捕获样品中的p217+tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽与针对包含氨基酸残基7至20的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量长p217+tau肽的量,和/或与针对包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量,以及(iii)基于p217+tau肽的量或短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率来确定受试者是否患有tau蛋白病或是否处于发展tau蛋白病的风险。可通过将来自受试者的样品中的p217+tau肽的量或浓度与对应的预定的阈值水平进行比较来进行诊断。还可以通过将来自受试者的样品中的短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率与对应的基线比率进行比较来进行诊断,其中短p217+tau肽和长p217+tau肽的量大于它们各自的测定的LLOQ。

[0127] 在另一个实施方案中,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对p217+tau表位的捕获抗体接触以捕获样品中的p217+tau肽,和/或与针对tau蛋白的氨基酸150和氨基酸250之间的tau表位的磷酸化非依赖性捕获抗体接触以捕获样品中的总tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽或捕获的总tau肽与针对包含tau蛋白的氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽或捕获的总tau肽之后进行接触,从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量或总短tau肽的量,以及(iii)基于样品中的短p217+tau肽的量与总短tau肽的量的比率来确定受试者是否患有tau蛋白病或是否处于发展tau蛋白病的风险。可通过将来自受试者的样品中的短p217+tau肽的量与包含与pT3抗体所识别的tau蛋白相同的区域(即,tau的氨基酸211至221)的总短tau肽的量的比率与对应基线值进行比较来进行诊断,其中短p217+tau肽的量大于测定的LLOQ。

[0128] 在另一个实施方案中,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对p217+tau表位的捕获抗体接触以捕获样品中的p217+tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽与针对包含氨基酸残基7至20的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量长p217+tau肽的量,和/或与针对包含tau蛋白的氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量,以及(iii)基于p217+tau肽的量或短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率来确定受试者中的治疗的有效性,其中所测量的p217+tau肽、短p217+tau肽和/或长p217+tau肽的量大于各自的测定的LLOQ。

[0129] 在再一个实施方案中,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对p217+tau表位的捕获抗体接触以捕获样品中的p217+tau肽,和/或与针对tau蛋白的氨基酸150和氨基酸250之间的tau表位的磷酸化非依赖性捕获抗体接触以捕获样品中的总tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽或捕获的总tau肽与包含tau蛋白的氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽或捕获的总tau肽之后进行接触,从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量或总短tau肽的量,以及(iii)基于生物样品中的短p217+tau肽的量与总短tau肽的量的比率的量来确定受试者中的治疗的有效性,其中所测量的短p217+tau肽的量大于测定的LLOQ。

[0130] 在再一个实施方案中,通过在治疗之前、期间或之后监测p217+tau肽的量、短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率或短p217+tau肽的量与总短tau肽的量的比率来确定受试者中的治疗的有效性,其中p217+tau肽、短p217+tau肽和/或长p217+tau肽的量大于它们各自的测定的LLOQ。相对于基线值的降低发出针对治疗的正响应的信号。当病理性tau在循环中的半衰期增加和/或病理性tau从脑中被清除时,值也可以在生物流体中暂时增加。

[0131] 根据一个具体方面,tau蛋白病包括但不限于选自由以下各项组成的组的一者或多者:阿尔茨海默病(包括家族性阿尔茨海默病和散发性阿尔茨海默病)、17号染色体相关的额颞叶痴呆合并帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、皮克氏病、进行性皮质下胶质增生、仅缠结性痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化症、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩侧索硬化-帕金森综合征-痴呆复合征、唐氏综合症、格-施-沙氏病、哈勒沃登-施帕茨病、包涵体肌炎、克-雅病、多系统萎缩、尼曼-皮克病C型、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、亚急性硬化性全脑炎、强直性肌营养不良、伴发神经原纤维缠结的非关岛型运动神经元病、脑炎后帕金森综合征、慢性创伤性脑病和拳击员痴呆症(拳击疾病)。

[0132] 优选地,tau蛋白病是阿尔茨海默病(包括家族性阿尔茨海默病和散发性阿尔茨海默病)、FTDP-17或进行性核上性麻痹。

[0133] 最优选地,tau蛋白病是阿尔茨海默病(包括家族性阿尔茨海默病和散发性阿尔茨海默病)。

[0134] 根据一个实施方案,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对p217+tau表位的捕获抗体接触以捕获样品中的p217+tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽与针对包含氨基酸残基7至20的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量长p217+tau肽的量,和/或与针对包含tau蛋白的氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,

从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量,以及(iii)基于p217+tau肽的量或短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率来确定受试者是否适用于抗p217+tau抗体疗法,其中p217+tau肽、短p217+tau和/或长p217+tau的量大于各自的测定的LL0Q。

[0135] 根据一个具体方面,如果基于血液的样品(特别是血浆样品)中的p217+tau肽的量,或基于血液的样品或血浆样品中的短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率显著高于对应的基线值,则确定受试者适合于抗p217+tau抗体疗法,其中所述对应的基线值大于测量p217+tau肽、短p217+tau肽和/或长p217+tau肽的测定的LL0Q,或者p217+tau肽、短p217+tau肽和/或长p217+tau的量大于它们各自的测定的LL0Q。

[0136] 根据另一个具体方面,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对p217+tau表位的捕获抗体接触以捕获样品中的p217+tau肽,或与针对tau蛋白的氨基酸150和氨基酸250之间的tau表位的磷酸化非依赖性捕获抗体接触以捕获样品中的总tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽或捕获的总tau肽与针对包含tau蛋白的氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽或捕获的总tau肽之后进行接触,从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量或总短tau肽的量,以及(iii)基于生物样品中的短p217+tau肽的量与总短tau肽的量的比率的量来确定受试者是否适用于抗p217+tau抗体疗法,其中短p217+tau肽的量大于测定的LL0Q。

[0137] 根据一个实施方案,如果短p217+tau肽的量与总短tau肽的量的比率显著高于对应的基线值,则确定受试者适用于抗p217+tau抗体疗法,其中短p217+tau肽的量大于测定的LL0Q。

[0138] 在一个实施方案中,本申请的方法包括(i)使基于血液的样品(优选地血浆样品)与针对包含磷酸化的p217+tau的表位的捕获抗体接触,以捕获样品中的p217+tau肽,(ii)单独地使捕获的p217+tau肽与针对包含氨基酸残基7至20的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量长p217+tau肽的量,和/或与针对包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量样品中的长和短p217+tau肽的量,以及(iii)基于p217+tau肽的量来确定受试者是否患有淀粉样蛋白形成性疾病或是否处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险。可通过将来自受试者的样品中的p217+tau肽的量或浓度与对应的预定阈值水平进行比较来进行诊断,其中p217+tau肽的量或浓度大于步骤(i)和(ii)的测定的LL0Q。

[0139] 本发明还涉及测量基于血液的样品中与抗体复合的p217+tau以及样品中的非抗体结合的游离p217+tau。在一个实施方案中,使用亲和力技术捕获总抗体,之后使用包括液剂、热失活或其他蛋白质破坏技术的变性条件。使用rpHPLC将p217+tau与抗体分离,并使用本申请的方法进行测量,从而允许对抗体结合的p217+tau的定量。

[0140] 根据一般方面,本发明涉及一种监测在受试者中使用抗p217+tau抗体进行的治疗方法,所述方法包括:本申请涉及监测在受试者中使用抗p217+tau抗体进行的治疗方法,所述方法包括:(i)从受试者获得基于血液的样品,特别是血浆样品,(ii)从含有总p217+tau的基于血液的样品获得半变性样品,(iii)使半变性样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触以捕获半变性样品中的p217+tau肽,以及(iv)分别地使捕获的p217+tau肽与针对包含氨基酸残基7至20的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量长p217+tau肽的量,和/或与针对包含tau蛋白的氨基酸残基119至126的表

位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量半变性样品中的长和短p217+tau肽的量,其中所测量的p217+tau肽、短p217+tau肽和/或长p217+tau肽的量大于它们各自的测定的LLOQ。

[0141] 通过降解干扰捕获抗体和/或检测抗体与p217+tau肽的结合或者干扰与p217+tau肽结合的检测抗体的检测的抗体和/或其他血液组分,但不降解基于血液的样品中存在的p217+tau肽来从含有p217+tau肽的基于血液的样品制备半变性样品。在一个实施方案中,通过在使抗体变性的预定温度下将基于血液的样品加热预定量的时间来制备半变性样品。预定温度可以为75℃至100℃、80℃至90℃或85℃。预定量的时间可以为0.1至30分钟、1至15分钟、2至10分钟、3至9分钟或7分钟。热变性后,可任选地将样品冷却至对p217+tau肽适当稳定的温度(例如,等于或低于4℃),以停止半变性样品中的蛋白质的进一步降解。在一个示例性实施方案中,通过将基于血液的样品加热至85℃持续7分钟并且随后在4℃冰浴中冷却10分钟来制备半变性样品。

[0142] 根据另一个一般方面,本申请涉及一种监测在受试者中使用抗p217+tau抗体进行的治疗的方法,所述方法包括:(i)从受试者获得基于血液的样品,特别是血浆样品,(ii)从含有总p217+tau的基于血液的样品获得半变性样品,其中加热半变性样品以使样品中的抗体变性,(iii)使半变性样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以捕获半变性样品中的p217+tau肽,(iv)单独地使捕获的p217+tau肽与针对包含氨基酸残基7至20的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量长p217+tau肽的量,或与针对包含tau蛋白的氨基酸残基116至127的表位的检测抗体接触,优选地在洗涤捕获的p217+tau肽之后进行接触,从而测量半变性样品中的长和短p217+tau肽的量,(v)通过从总p217+tau的量中减去不合抗体的p217+tau的量来计算样品中的抗体结合的p217+tau的量,(vi)计算抗体结合的p217+tau与不合抗体的p217+tau的比率,以及(vii)基于所计算的比率来监测在受试者中使用抗p217+tau抗体进行的治疗,其中所测量的p217+tau肽、短p217+tau肽和/或长p217+tau肽的量大于它们各自的测定的LLOQ。

[0143] 根据一个具体方面,通过在治疗之前、期间或之后监测抗体结合的和不合抗体的p217+tau肽的量来确定受试者中的治疗的有效性。不合抗体的p217+tau的值相对于基线的减少或抗体结合的p217+tau的值相对于基线的增加,并且因此抗体结合的p217+tau与不合抗体的p217+tau的比率相对于基线的增加发出针对治疗的正响应的信号。当病理性tau在循环中的半衰期增加和/或病理性tau从脑中清除时,不合抗体的p217+tau的值也可在基于血液的流体(例如血浆)中暂时增加。

[0144] 在本申请的另一个方面,测定和方法可用于监测经历任何tau蛋白病治疗(包括但不限于施用外源性抗tau抗体,更具体而言,抗p217+tau抗体)或任何淀粉样蛋白形成性疾病治疗的患者中的p217+tau水平。基于血液的样品,特别是血浆样品中的p217+tau的水平检测可用于多种不同的目的,包括用作确定治疗的剂量水平或给药间隔是否应该增加或减少以确保达到或维持有效或安全的药物水平的决策工具;通过提供达到最低pK水平的证据而用作抗tau药物疗法起始的辅助;以及用作患者应当从临床试验中排除或包括在临床试验中的指示,以及用作随后监测对临床试验药物要求的符合性的辅助。

[0145] 根据具体方面,本申请的方法的捕获抗体在与样品接触之前首先结合至固体载体。捕获抗体可以在诊断试剂盒中提供,用于测量基于血液的样品(特别是血浆样品)中的

p217+tau,所述样品预先结合至固相,例如结合至微量滴定皿的孔或结合至磁珠。检测抗体可含有或附接至任何可检测标签(例如,荧光分子、生物素等),所述标签可直接检测或可通过次级反应(例如,与链霉亲和素反应)检测。另选地,可使用含有可检测标签的第二试剂,其中该第二试剂对一抗具有结合特异性。在一个特定实施方案中,检测抗体是生物素酰化的。

[0146] 根据具体方面,在本申请的方法中测量的p217+tau肽的量可使用本领域已知的任何合适的技术来确定,包括ELISA和单分子阵列平台。根据具体方面,本申请的方法使用高灵敏度阵列平台,例如Quanterix Simoa或MSD S-plex,来测量基于血液的样品(特别是血浆样品)中的p217+tau肽的量,所述基于血液的样品与CSF相比具有更低浓度的p217+tau肽。

[0147] 在本申请的另一个方面,本申请的测定和方法提供了用于测量基于血液的样品(例如,血液、血清和/或血浆)中的p217+tau肽的基于珠粒的测定,该测定具有的由测定试剂引起的干扰有所降低,并且因此更准确和精确。已经发现,当用于测量基于血液的样品中的p217+tau肽时,某些测定试剂以对通过测定获得的测量值产生干扰的方式相互作用。具体而言,在其中捕获抗体在与基于血液的样品接触之前结合至磁珠的基于珠粒的测定中,据发现用于制备基于血液的样品的样品稀释剂干扰基于血液的样品中的测定的准确度和精度。例如,如下文实施例7中所示,从SimoaHomebrew测定简易试剂盒,目录#101351(可从Quanterix商购获得)获得的样品稀释物展示出减少的珠粒计数,这被认为是由用作捕获抗体的底物的磁珠的凝集引起的。然而,本申请的测定和方法利用减少由珠粒凝集导致的干扰的样品稀释剂。具体而言,本申请的样品稀释剂包括非离子表面活性剂。更具体而言,非离子表面活性剂包括亲水性聚环氧乙烷链和/或芳族烃亲脂性或疏水性基团。更具体而言,非离子表面活性剂是Triton X-100。样品稀释剂还可包括三(羟甲基)氨基甲烷(Tris),据发现它可进一步减少对测定的干扰。下文进一步描述的实施例7表明,含有Triton X-100的样品稀释剂降低了所观察的干扰,并且与基于磷酸盐缓冲液的样品稀释剂相比,基于Tris缓冲液的样品稀释剂提供了更好的干扰降低。本申请的样品稀释剂还可以包括不干扰基于血液的样品中的p217+tau的测量值的其他合适的组分,诸如NaCl、乙二胺四乙酸(EDTA)、异嗜性阻断剂和/或牛血清白蛋白。

[0148] 在另一个一般方面,本申请涉及用于从基于血液的样品(例如,血液、血清、血浆)检测p217+tau的试剂盒,所述试剂盒包括(a)针对p217+tau表位的捕获抗体,任选地针对tau蛋白的氨基酸150和氨基酸250之间的tau表位的磷酸化非依赖性捕获抗体,(b)用于缀合捕获抗体的磁珠,(c)包含非离子表面活性剂的样品稀释剂,以及(d)至少一种针对包含tau蛋白的氨基酸残基7至20或氨基酸残基116至127的tau蛋白表位的检测抗体。该试剂盒用于测量样品中的p217+tau肽的量、短p217+tau肽的量与长p217+tau肽的量的比率和/或短p217+tau肽的量与总短tau肽的量的比率。

[0149] 在本申请的另一个方面,在计算设备中进一步分析根据上文所述的测定和方法从基于血液的样品(例如,血液、血清、血浆)获得的p217+tau测量值,以检测和/或预测受试者的tau蛋白病。具体而言,通过计算设备对从基于血液的样品获得的p217+tau测量值与对应于从其他生物标志物(也可从基于血液的样品检测到)获得的测量值的数据组合进行分析,以提供进一步改善的受试者的tau蛋白病的检测和/或预测。使用可从基于血液的样品适当

测量的生物标志物来检测和/或预测tau蛋白病(特别是AD)的改善的能力可用于各种诊断目的,例如用于诊断受试者的AD或其他tau蛋白病,监测治疗的有效性,鉴定适用于抗tau或抗p217+tau治疗的受试者,预筛选用于PET成像和/或CSF测定以进一步检测AD或其他tau蛋白病的受试者,鉴定受试者适合纳入涉及AD或其他tau蛋白病的临床试验等。

[0150] 在一个示例性实施方案中,提供了用于检测或预测受试者的tau蛋白病的方法。所述方法包括使用测定来检测基于血液的样品(例如,血液、血清、血浆)中的p217+tau肽的量。所述测定可以是本申请中描述的任何示例性测定中的任一个。具体而言,所述测定通过以下步骤来测量基于血液的样品(特别是血浆)中的p217+tau肽的量:使样品与结合至样品中的p217+tau肽的捕获抗体接触,并且在单独的步骤中使捕获的p217+肽与抗tau检测抗体接触,所述抗tau检测抗体用允许检测捕获的p217+tau种类的报告基因元件标记。更具体而言,所述测定通过以下步骤来检测血浆样品中的p217+tau肽的量:使血浆样品与针对p217+tau表位的捕获抗体接触,以使捕获抗体与血浆中的p217+tau肽结合,从而形成抗体-肽复合物,以及单独地使抗体-肽复合物与检测抗体接触,以使检测抗体与抗体-肽复合物结合。

[0151] 计算设备获得通过测定检测到的p217+tau测量值以生成对应于p217+tau肽的量的tau数据。tau数据可以表示通过测定检测到的p217+tau肽的量。另选地,tau数据可以表示指示其量是否大于预定阈值的二元状态(是/否)。如上文所讨论,所述测定是足够灵敏的,以使得预定阈值大于测定方法的LLOQ。计算设备还可以获得受试者的医疗数据,诸如例如人口统计信息(例如,年龄、性别)、病史、电子病案(EMR)、对应于患者的用药记录的药房数据等。具体而言,计算机设备可以获得对应于从患者检测到的至少一个生物标志物的测量值或二元状态的生物标志物数据。生物标志物可以是针对tau蛋白病的任何合适的生物标志物。优选地,生物标志物可从受试者的基于血液的样品,特别是血浆样品检测到。例如,生物标志物可选自由以下各项组成的组:淀粉样蛋白- β (A β)、神经丝轻链(NFL)、脂连蛋白、瘦蛋白和其他炎性或代谢标志物。更具体而言,生物标志物选自NFL、脂连蛋白和瘦蛋白。计算设备使用机器学习模块来分析tau数据和生物标志物数据,以确定或预测受试者是否患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险。使用一组参考数据来训练机器学习模块。机器学习模块将tau数据和生物标志物数据与一组参考数据进行比较,以确定或预测受试者是否患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险。对于参考组患者,一组参考数据包括tau数据和生物标志物数据,以及对应于tau蛋白病的脑病理学的数据(例如,疾病阶段、在CSF中检测到的p217+tau的量、脑组织中tau的PET测量值等)。

[0152] 机器学习模块可以是有监督和/或无监督机器学习模块。机器学习模块可以是用于将数据集鉴定为与两个类别之一相关的机器学习分类器。机器学习模块可以包括支持向量机、随机森林、逻辑回归、梯度提升模块或它们的集成模块。在一个实施方案中,机器学习模块是包括支持向量机、随机森林、逻辑回归和/或梯度提升模块中的至少一者的集成模块。

[0153] 本领域的技术人员应当理解,本文所述的示例性计算机实施的实施方案可以任何数量的方式实现,包括以单独的软件模块形式、以硬件和软件的组合形式等。例如,示例性方法可以是存储在非暂态存储介质中并且包含代码行的一个或多个程序中的实施方案,该代码行在被编译时可由一个或多个处理器内核或单独的处理器执行。根据一个实施方案的系统包括多个处理器内核和在多个处理器内核上执行以执行上述示例性方法的一组指令。

处理器内核或单独的处理器可结合在任何合适的电子设备中或可与任何合适的电子设备(例如在设备内的板处理布置结构或设备外部的处理布置结构上)进行通信,所述电子设备例如移动计算设备、智能电话、计算平板电脑、计算设备等,其可与设备的至少一部分进行通信。

[0154] 实施例

[0155] 以下实施例用于进一步说明本发明的实质。应当理解,以下实施例不限制本发明,并且本发明的范围由所附权利要求书确定。

[0156] 实施例1:用于检测血浆中的p217+tau的高灵敏度测定

[0157] 实施例I中提供了本申请的改善的测定的一个示例性实施方案。实施例I的示例性实施方案利用基于珠粒的酶联免疫吸附测定(ELISA)来检测和/或定量样品中p217+tau肽的存在。具体而言,实施例I利用可从Quanterix Corp. (Boston, MA)获得的基于单分子阵列(SiMoA)珠粒的数字ELISA系统。SiMoA测定使用飞升大小的反应室的阵列,以数字方式对单个免疫复合物进行计数。如下文进一步讨论,制备测定特异性试剂,并提供给SiMoA分析仪,从而与样品中的p217+tau肽反应并检测所述肽。测定特异性试剂包括:2.7 μ m直径的顺磁性捕获珠粒、来自Simoa Homebrew测定简易试剂盒(目录#101351,购自Quanterix)的缓冲液和试剂、洗涤缓冲液1(购自Quanterix)、磁珠(以Simoa Homebrew辅助珠粒小瓶(918)购自Quanterix,目录#101732)、捕获抗体和检测抗体。实施例1的捕获抗体是pT3小鼠单克隆抗体(mAb)。实施例1的检测抗体是hT43 mAb。

[0158] 将实施例I中分析的每个样品在样品稀释剂中稀释。实施例I中使用的示例性样品稀释剂包括50mM Tris缓冲液、100mM NaCl、5mM EDTA、2% (v/v)牛血清白蛋白和0.5% (v/v) Triton X-100、异嗜性阻断试剂HBR-9(以目录#3KC564购自Scantibodies Laboratory, Santee CA)。样品稀释剂的pH为7.4。

[0159] 使用由New England Peptide定制的校准肽来校准实施例I的测定。校准肽是含有通过PEG4接头连接的hT43和pT3表位的肽,并且具有4357g/mol的分子量。校准肽具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0160] 试剂制备

[0161] 在第一步中,用0.3mg/mL的捕获抗体(在实施例I中为pT3 mAb)包被顺磁性捕获珠粒,遵循Quanterix手册中提供的将捕获抗体附接于珠粒的方案。将经包被的捕获珠粒在珠粒稀释缓冲液(得自Simoa Homebrew测定简易试剂盒)中稀释至100,000个珠粒/mL,然后添加300,000珠粒/mL的辅助珠粒,得到珠粒的总浓度为400,000个珠粒/mL。

[0162] 将实施例I中为hT43 mAb的检测抗体按照Quanterix手册中提供的方案以60x生物素酰化,并在上文所述的样品稀释液中稀释,得到浓度为0.9 μ g/mL检测抗体的检测溶液。

[0163] 将链霉亲和素 β -D-半乳糖苷酶(SBG)浓缩物在来自Simoa Homebrew测定简易试剂盒的SBG稀释液中稀释至200pM。

[0164] 将校准肽在0.1%磷酸/水中重构为5mg/mL,等分为20 μ L的单位并冷冻。当准备使用时,将校准肽等分试样单位解冻并以1:1000稀释(例如,将1.5 μ L稀释到1498.5 μ L中),并且将稀释液以1:1000用样品稀释剂进一步稀释,使得肽的最终浓度为5000pg/ml。用不同浓度的校准肽来校准实施例I的测定以形成跨以下浓度的标准曲线:30pg/mL、10pg/mL、3.33pg/mL、1.11pg/mL、0.37pg/mL、0.186pg/mL、0.093pg/mL、0.046pg/mL、0.023pg/mL、

0.012pg/mL、0.006pg/mL和0pg/mL。

[0165] 将通过实施例I的测定来分析的血浆样品在样品稀释剂中1:2稀释。

[0166] SiMoA测定

[0167] 建立包括三步方案的定制SiMoA测定。该三步方案包括以下步骤:使如上制备的附接有pT3mAb的捕获珠粒的分析用样品与分析用样品接触35分钟,然后用磷酸盐缓冲液(PBS) Tween-20溶液洗涤捕获珠粒,特别是设计用于Simoa HD-1仪器(可从Quanterix商购获得)的洗涤缓冲液1,然后将捕获珠粒与检测抗体一起温育5分钟,随后用洗涤缓冲液1对捕获珠粒进行第二次洗涤,将捕获珠粒与SBG一起温育5分钟,用基于PBS的溶液(特别是洗涤缓冲液1)再次洗涤珠粒,并且最后添加25 μ L的100 μ M试卤灵- β -D-吡喃半乳糖苷(RGP),然后加载到测量盘中,用于通过SiMoAHD-1仪器进行成像和测量。每个反应在Simoa比色皿中进行,并且包含25 μ L的如上制备的包含附接有pT3 mAb的顺磁性珠粒和辅助珠粒的珠粒溶液、172 μ L的稀释样品或校准物、100 μ L的如上制备的包含检测生物素酰化的检测抗体的检测溶液、100 μ L的SBG溶液和25 μ L的100 μ M RGP。

[0168] SiMoA分析仪利用高分辨率荧光成像(检测珠粒的级分)、飞升大小的反应室的阵列(发出对应于与至少一种酶结合的珠粒的级分的荧光)以及每个反应室的荧光强度。SiMoA分析仪基于这些测量值生成每个珠粒的酶平均数(AEB)输出。

[0169] 实施例2:存在于血浆中的测定竞争性抗体的检测

[0170] 通过另外的上游样品操作,实施例1的高灵敏度可用于测量p217+tau的水平,甚至在存在与实施例1的测定的试剂竞争的测定竞争性抗体的情况下,例如,在受试者体内内源产生的那些测定竞争性抗体或外源施用于受试者的测定竞争性抗体。本文实施例2中所述的方法可用作药效动力学测定以研究血浆中存在的治疗性抗p217+tau抗体,诸如人源化pT3 mAb。例如,实施例2的方法可用于测量用于治疗tau蛋白病的活性剂,特别是抗p217+tau单克隆抗体(例如,人源化pT3 mAb)对从人受试者取回的血浆样品中存在的tau的外周水平的影响。

[0171] 血浆样品的等分试样首先在0.1MNaOAc中1:3稀释,随后在85 $^{\circ}$ C加热7分钟,接着在冰浴(4 $^{\circ}$ C)中冷却10分钟。将加热并随后冷却的样品流体在4 $^{\circ}$ C以14000xg离心10分钟,并将上清液与沉淀物分离。将1M Tris碱溶液以7%体积添加到上清液中以实现上清液的中性pH,并且获得示例性半变性样品。平行地,在制备半变性样品流体的方法中,将血浆样品的第二等分试样在冰浴中冷却。该第二等分试样在本文的实施例2中也称为非变性样品流体。

[0172] 由SiMoA分析仪生成的针对半变性流体信号的输出对应于血浆样品中存在的p217+tau的总量,而未变性流体生成的输出对应于血浆样品中的游离p217+tau。将输出与来自校准肽的标准曲线相关联以分别获得存在于血浆样品中的p217+tau的总量和游离p217+tau的浓度。从前者减去后者提供了存在于血浆样品中的游离p217+tau的量的定量测量值。

[0173] 使用CSF和外源添加的抗体,确定实施例2中使用的精确加热时间和温度,作为加热时间和温度的组合,该组合足以不可逆地修饰样品中的任何干扰抗体,使得它们在测定中不再干扰p217+tau抗体的结合,而p217+tau信号本身不受任何影响。具体而言,使用CSF和外源添加的抗体获得的数据显示,p217+tau信号能耐受85 $^{\circ}$ C热量至少10分钟,而抗体在85 $^{\circ}$ C热量下仅2分钟后变性。因此,使用实施例2的半变性流体和非变性流体获得的结果不提供捕获抗体是否结合至p217+tau的直接度量,而是展示血浆中存在干扰p217+tau测定检

测和定量p217+tau的量的能力的测定竞争性抗体。

[0174] 实施例3:不适用于血浆的先前p217+tau测定

[0175] 如上文所讨论,在Ko1b'492专利中此前公开了用于测量生物样品中的p217+tau肽的测定。然而,Ko1b'492专利未提供用于定量存在于人血清或血浆中的p217+tau肽的量的任何示例。相反,Ko1b'492专利指出,粗制血清或血浆样品具有干扰困难,并且不能以足够的灵敏度进行测量和定量,直到样品被免疫沉淀,随后洗脱液热变性。

[0176] 实施例3使用从5名健康志愿者(HV)对照受试者和5名已知患有阿尔茨海默病(AD)的受试者获得的一组人血浆样品评估了在Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定。在该示例中,pT3 mAb用作捕获抗体,pT82mAb用作检测抗体。根据实施例3获得的数据以AEB为单位显示在图1a至图1d中,如通过SiMoA分析仪所生成。每个图的左侧显示了对应于AD受试者的数据,并且图的右侧显示了对应于HV的数据。对于每类受试者,平均值显示为较长的水平线,数据集的±标准偏差(SD)显示为在平均值线上方和下方的较短线。

[0177] 这些血浆样品中的每个根据Ko1b'492专利以两种不同的稀释度即1:4和1:16进行稀释。使用两种血浆样品稀释液获得的结果分别提供在图1a和图1b中。图1a中显示的数据表明,在1:4稀释下,40%所测量的血浆样品小于在Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定的LLOQ,而20%所测量的等于LLOQ,另外40%所测量的显著大于所有其他样品。具体而言,在1:4稀释下,在所测量的实施例3的10个样品中,有6个等于或小于LLOQ(AEB=信号=0.035=S/N>2和CV<20%),而其他4个样品表现出明显更高的信号(11-745x大于LLOQ)。如图1b所示,在1:16稀释下,所有血浆样品,包括在1:4稀释下测量显著更高的那些40%,测量值小于在Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定的LLOQ。更具体而言,在1:16稀释下,所测量的实施例3的所有样品小于LLOQ,表明如上文所述在实施例3的10名受试者中在1:4稀释下有4名的高信号是基本上非线性的,并且因此可以被认为是来自血浆基质的伪影。图1a和图1b中显示的数据表明,在使用Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定检测血浆中的p217+tau肽时缺乏灵敏度且缺乏稀释线性,因此,这种测定不适合于分析血浆中存在的p217+tau肽的量。

[0178] 将来自相同的5名HV和5名AD受试者的一组血浆样品根据上述实施例2变性,以获得10种不同的半变性样品流体。如实施例2中所述获得半变性样品流体的方法修饰干扰性抗体,使得它们不再干扰p217+抗体与样品中的p217+tau肽的结合,而不降解通过p217+抗体所检测的p217+tau信号。半变性样品流体中的每种以1:6稀释,并使用Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定进行测量。结果示于图1c中。从图1c中可以看出,获得半变性样品流体的方法消除了40%样品中的所有可定量信号,这些样品在1:4稀释下此前在没有任何变性步骤的情况下的测量值显著高于的LLOQ(如图1b中所示)。如实施例2所述获得半变性样品流体的方法不降解由p217+抗体检测到的p217+tau信号。因此,图1c中显示的数据表明,从图1a中显示的血浆检测到的信号可被来自除p217+tau肽以外的其他组分的干扰和/或伪影污染。具体而言,图1a中所示的4/10个血浆样品的高p217+tau信号在变性后被消除,表明该信号不是真实tau信号。图1a和图1c中所示的1:16粗制血浆数据表明AD中的信号比HV中更高,表明消除基质干扰的步骤可以显示血浆中的生物标志物相关的p217+tau信号。然而,低灵敏度妨碍了Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定适合于测量血浆样品中的p217+tau。

[0179] Ko1b'492专利承认粗制血清或血浆可受到灵敏度和基质干扰障碍的困扰,并且描

述了使用免疫沉淀的富集策略可以与Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定组合使用,以提供病理性tau的基于血液的测量值。下文展示了免疫沉淀与Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定组合提供了改善的灵敏度以及HV与AD受试者的区分。

[0180] 在根据Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定进行测量之前,使用pT3抗体对来自相同的5名HV和5名AD受试者的一组血浆样品的p217+tau信号进行免疫沉淀。用样品稀释剂以1:4的比率稀释免疫沉淀的样品。这些1:4稀释的免疫沉淀样品的结果显示在图1d中。将图1d中所示的结果与图1a中所示的结果进行比较,这些结果是在相同的稀释比率下但不使用pT3抗体进行第一免疫沉淀的情况下测量的,免疫沉淀步骤提高了测定的灵敏度,使得来自AD受试者的血浆样品均在线性范围内测量,并且与HV样品具有良好的区分。图1d显示,从HV样品获得的血浆中存在的p217+tau肽的量略大于Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定的LLOQ,但不提供大于测定的LLOQ的可靠、可定量结果(例如,LLOQ落入HV样品的标准偏差内)。这些结果表明,血浆p217+tau信号的纯化和浓缩可以产生有用的血浆p217+tau测定。然而,免疫沉淀是费力且不精确的方法,它过于繁琐并且可在测定中引入另外的不准确度。本申请的测定和方法不需要单独的免疫沉淀步骤来浓缩其p217+tau信号,以获得具有足够灵敏度的结果来检测人血浆样品中的p217+tau肽。

[0181] 实施例4:用于检测p217+tau肽的先前测定与本申请的高灵敏度测定的比较

[0182] 本申请的测定和方法包括分离步骤,用于使血浆样品与捕获抗体接触以使捕获抗体与血浆中的p217+tau肽结合以产生抗体-肽复合物,以及使抗体-肽复合物与检测抗体接触以在洗涤后使检测抗体与抗体-肽复合物结合,如实施例1中所示例。第一步骤使血浆样品与捕获抗体接触并随后在与检测抗体接触之前洗涤抗体-肽复合物,该步骤将血浆样品中的p217+tau信号与干扰组分分离。具体而言,样品中的p217+tau肽与捕获抗体结合,而样品的干扰成分在检测抗体加入到抗体-肽复合物之前被洗掉。包括这些分离步骤的测定和方法在本文中也称为“3步”测定。相比之下,在Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定将测定的生物样品与捕获抗体和检测抗体同时组合,以允许两种抗体在洗涤步骤之前与生物样品结合。如在Ko1b'492专利的实施例1中描述的测定在本文中也称为“2步”测定。在该示例中,与“2步”测定相比,“3步”测定的第一步骤中的温育时间和样品体积输入也增加,以允许信号的最大捕获。如以下实施例4中所进一步展示,已经出乎意料地发现,当测量来自血清的p217+tau肽时,本申请的“3步”测定提供优于“2步”测定的改善的灵敏度,这在从CSF测量时未观察到。

[0183] 实施例4将本申请的“3步”测定与测量来自CSF和血清来自的p217+tau肽的“2步”测定进行比较。使用“2步”和“3步”测定来测量具有不同认知状态的一组多名受试者的CSF样品。具体而言,在临床研究中使用“2步”和“3步”测定来测量来自21名轻度-中度痴呆受试者的96个CSF样品。对于每个样品,将使用“2步”测定(显示在X-轴上)获得的结果(以pg/mL所检测的p217+tau计)映射到图2a中使用“3步”测定(显示在Y-轴上)获得的结果。此外,使用“2步”和“3步”测定来测量与实施例3相同的5名HV和5名AD受试者的一组血清样品。所得的结果(以pg/mL所检测的p217+tau计)显示在图2b的柱状图中,其中每个样品的左侧条柱对应于使用“2步”测定获得的结果,右侧条柱对应于使用“3步”测定获得的结果。

[0184] 从图2a中可以看出,当用于测量CSF样品中的p217+tau肽时,“2步”和“3步”测定展示出高度相关性($r^2=0.94$)。然而,图2b显示当该测定用于测量血清样品中的p217+tau肽

时未观察到这种相关性。此外,虽然图1a显示当“2步”测定用于测量来自血浆的p217+tau肽时,样品的子集提供了比其余样品大得多的测量值,但是图2b显示当“3步”测定用于测量来自血清的p217+tau肽时,这些异常高的信号显著降低。图2b的数据显示使用“2步”测定观察到的异常高的p217+tau信号类似地在使用“3步”测定测量的相同的样品中未观察到。因此,图2b的数据表明,使用“2步”测定观察到的异常高的p217+tau信号与测定的干扰和/或伪影相关,并且不能准确地测量样品中存在的p217+tau肽。该数据表明,在CSF中存在可忽略的基质干扰,但是在血液制品中存在显著的正干扰。

[0185] 实施例5:使用本申请的高灵敏度测定来检测p217+tau肽的检测抗体的比较

[0186] 实施例5使用两种不同的检测抗体与实施例1中所述的示例性测定来评估三种类型的生物流体(即,CSF、血清和血浆)之间的一致性和相对片段化。具体而言,实施例5比较了作为用于实施例I的测定的检测抗体(除了实施例5中指定的不同的检测抗体)的hT43和pT82之间的差异。对于两个示例性实施方案,捕获抗体是pT3。因此,实施例5中比较的两个示例性测定是pT3xhT43和pT3xpT82。

[0187] 使用实施例1的测定和类似于实施例1的改进的测定来测量来自临床研究中的18名AD(特别是患有轻度-中度痴呆的那些)受试者的CSF、血清和血浆,不同的是检测抗体被改为hT43 mAb。所得的CSF、血清和血浆的结果(以pg/mL所检测的p217+tau计)分别显示在图3a、3b和3c中。对于每种类型的生物流体,将使用pT3xhT43测定(显示在X-轴上)获得的结果(以pg/mL所检测的p217+tau计)分别映射到使用图3a、3b和3c中的pT3xpT82测定(显示在Y-轴上)获得的针对CSF、血清和血浆的结果。图3a至图3c中的每个显示了线性回归线以及该线性回归线的 R^2 值。如图3a至图3c所示,在所有三种样品类型中,使用hT43检测和pT82抗体获得的结果是高度一致的($R^2=0.82$ 至 0.95)。图3a至图3c中所示的线性回归线的斜率分别为2.83、2.41和2.05。此外,pT3xpT82测定在CSF、血清和血浆中获得比pT3xhT43测定高约2.5x水平的结果。如上文所讨论,pT3识别人tau蛋白的氨基酸210至220处的表位。检测抗体hT43识别人tau蛋白的氨基酸7至20,检测抗体pT82识别tau蛋白的氨基酸116至127。因此,pT82识别比hT43识别的表位更接近pT3的表位,这使得pT82识别短p217+肽片段以及相较于hT43的长p217+肽片段。据信,pT3xpT82测定报告比pT3xhT43测定更高的浓度,因为已知tau在CSF中高度片段化,并且pT82必须能够检测比hT43更短并且因此更多的p217+肽片段。有趣的是,在血清和血浆中也观察到类似的更高水平的pT3xpT82测定,表明tau的粗片段化模式(在氨基酸20和氨基酸116之间)在血液组分(例如,血清和血浆)中可以类似于在CSF中,并且血液制品中的hT43和pT82表位之间无更大的片段化。因为pT3xhT43和pT3xpT82测定显示出CSF、血清和血浆的高度一致性,表明p217+tau片段化水平反映了CSF中的片段化,据信实施例5中评估的两个测定是可互换的。然而,pT3xhT43测定提供了比pT3xpT82测定更高的灵敏度。

[0188] 实施例6:用于检测p217+tau肽的测定的不同样品稀释剂的比较

[0189] 实施例6评估了用于实施例I的测定的不同样品稀释剂(除了实施例6中指定的不同样品稀释剂之外),以确定哪种稀释剂将减少通过测定获得的p217+tau信号中的珠粒凝集和/或伪影。根据对血清p217+tau信号伪影和对在ELISA方法结束时检测到的珠粒数量的影响来测量缓冲液类型(PBS与Tris)、NaCl浓度和异嗜性阻断剂(例如,阻断人抗小鼠相互作用)的存在的影响。实施例6中评估的不同样品稀释剂显示于下表1中。

[0190] 表1.

[0191]	样品稀 释剂	组合物
	1	来自 Simoa Homebrew 测定起始试剂盒的样品稀释剂
	2	50mM 磷酸盐缓冲液、50mM NaCl 和 0.5% (v/v) Triton X-100
	3	50mM 磷酸盐缓冲液、100mM NaCl 和 0.5% (v/v) Triton X-100
	4	50mM Tris 缓冲液、50mM NaCl 和 0.5% (v/v) Triton X-100
[0192]	5	50mM Tris 缓冲液、100mM NaCl 和 0.5% (v/v) Triton X-100
	6	50mM 磷酸盐缓冲液、50mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100 和 HBR-9
	7	50mM 磷酸盐缓冲液、100mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100 和 HBR-9
	8	50mM Tris 缓冲液、50mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100 和 HBR-9
	9	50mM Tris 缓冲液、100mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100 和 HBR-9

[0193] 虽然未在表1中指定,但每个样品稀释剂还包含5mM EDTA和2% (v/v) 牛血清白蛋白。

[0194] 使用类似于实施例1的改进的测定(使用如本文实施例6中所述的不同样品稀释剂)来对从具有高tau水平和1pg/mL校准肽溶液(作为阴性对照)的人受试者获得的三个合并血清样品进行分析。SiMoA分析仪用于确定加载到SiMoA盘上的珠粒的数量以及样品和稀释剂的每个组合的AEB。图4a显示了对于三个血清样品和在9个不同的样品稀释剂中的每个中的校准肽,加载到SiMoA盘上的珠粒的数量。图4b显示了对于三个血清样品和在9个不同的样品稀释剂中的每个中的校准肽,通过SiMoA分析仪以单位AEB检测的荧光信号。图4a和图4b提供了以柱状图表示的在不同的样品稀释剂中测量的每个样品的数据,以与表1中所列相同的顺序显示。

[0195] 从图4a中可以看出,样品稀释剂1(它是来自Simoa Homebrew测定简易试剂盒的样品稀释剂)与校准肽溶液相比在所有三种血清样品中提供显著更低的珠粒计数(1688-2921对5378)。样品稀释剂2至样品稀释剂9改善了血清中的珠粒计数,并且显著降低了在使用Simoa Homebrew稀释剂(样品稀释剂1)测量的两个样品中观察到的伪影信号。据信,当测定用于分析血清样品时,在血清中观察到的这种减少的珠粒计数是由在测定中用作捕获抗体的底物的顺磁性顺磁性的凝集引起的。顺磁性珠粒的凝集是不希望的,因为它对检测血清中的p217+tau的分析的准确度和精度有负面影响。图4a中显示的数据表明,样品稀释剂2至样品稀释剂9(所有均包括洗涤剂Triton X-100)提供了增加的珠粒计数,并且因此减少珠粒凝集,否则珠粒凝集将不利地干扰测定的准确度和精度。此外,图4a显示基于Tris缓冲液的样品稀释剂提供比基于磷酸盐的缓冲液更高的珠粒计数,表明基于Tris的缓冲液可用于减少由珠粒凝集引起的对测定准确度和精度的干扰。从图4b中可以看出,所有样品稀释剂为校准肽溶液提供相似的荧光信号水平。然而,样品稀释剂1也导致检测到显著的荧光信号,这在其他样品稀释剂中未观察到(虽然样品稀释剂2、样品稀释剂3和样品稀释剂5也导致一些荧光信号得到检测)。用样品稀释剂1观察到的这些增加的荧光信号被认为与测定的干扰和/或伪影相关,类似于图2b中的“2步”测定所展示的,并且不能准确地测量存在于血

清样品中的p217+tau肽。图4b还显示HBR-9(它是被设计用于减少测定试剂的抗小鼠IgG桥接的异嗜性阻断剂)的添加进一步减少了测定中的干扰和/或伪影。具体而言,从图4b中可以看出,样品稀释剂6至样品稀释剂9显示出比样品稀释剂2至样品稀释剂5更少的荧光信号,其中血清样品中的一种表明HBR-9的添加进一步减少了对测定的干扰和/或伪影。图4a和图4b中的数据显示实施例4中评估的样品稀释剂,即样品稀释剂9(它与实施例1中描述的样品稀释剂相同)提供了最小珠粒凝集和伪影信号。鉴于以上讨论的数据,当使用Tris缓冲液、较低的NaCl浓度和异嗜性阻断剂时观察到特别的改善。

[0196] 实施例7:血清和血浆中的p217+tau肽检测的比较

[0197] 实施例7使用实施例1中描述的示例性测定评估了血清和血浆中的p217+tau肽的检测。使用实施例1的示例性测定来测量来自10名HV(本文中也称为健康志愿者或健康对照)和与实施例5相同的16名AD受试者的一组血清样品,结果显示于图5a中。来自HV受试者的样品从血液收集服务获得并且被推测为认知正常。使用实施例1的示例性测定来测量来自图5a的受试者组的12名HV和18名AD受试者的子集的一组血浆样品,结果显示于图5b中。在图5a和图5b中,每个图的左侧显示了对应于HV受试者的数据,并且图的右侧显示了对应于AD受试者的数据。对于每类受试者,平均值显示为较长的水平线,数据集的±标准偏差(SD)显示为在平均值线上方和下方的较短线。在图5a和图5b中的每个上还显示了虚线,该虚线分别显示血清和血浆中的每个的测定的LLOQ。根据实施例7获得的数据以pg/mL为单位显示在图5a至图5b中。此外,对于血浆和血清样品均在图5a和图5b中报告的每名受试者(即,10名HV和16名AD受试者),将使用从受试者获得的血浆所获得的结果(以pg/mL所检测的p217+tau计)映射到使用来自图5c和图5d中的相同受试者的血清所获得的结果。从图5a和图5b中可以看出,从AD受试者获得的血清和血浆样品的测量值均显著高于从HV受试者获得的血清和血浆样品。该数据表明血清和血浆均可用于诊断目的。出乎意料的是,从血浆获得的测量值被报告为比从血清获得的测量值高约2至3x(特别是2.3x)的浓度,如通过对所有受试者确定的从血浆测量的p217+tau与从血清测量的p217+tau的比率取平均值所确定。然而,如图5d所示,数据的线性回归显示斜率为1.9,表明从血浆获得的测量值比从血清获得的测量值高1.9x。因为p217+tau分析物的可检测水平在血清中是较低,所以从HV受试者获得的许多血清样品的测量值小于测定的LLOQ。然而,因为血浆中的p217+tau的检测较高,所以从HV和AD患者获得的所有血浆样品的测量值等于或大于测定的LLOQ。因此,实施例1中描述的示例性测定可用于检测和定量HV和AD受试者的血浆中的p217+tau肽的量。另外,从图5b中可以看出,从HV受试者检测到的p217+tau肽的范围与从AD受试者检测到的p217+tau肽的范围基本上不重叠。从HV患者获得的所有血清样品的测量值小于测定的LLOQ(显示在图5a中),但是来自相同HV患者的大多数(12名中的11名)血浆样品的测量值在线性范围内大于测定的LLOQ(显示在图5b中)。血浆和血清p217+tau浓度测量值的相关性较好($r^2=0.82$),然而血浆测量值平均比血清中的那些高约1.9x,如图5c所示。因此,本申请的测定出乎意料地提供了可用于将HV受试者与AD受试者区分开的定量数据。具体而言,当在血浆中检测到的p217+tau肽的量大于预定阈值(例如,基于图5b中显示的数据,约0.1pg/mL)时,受试者可以被确定为患有tau蛋白病(特别是阿尔茨海默病)或处于发展tau蛋白病的风险。

[0198] 实施例8:用于检测血浆中的p217+tau的测定的线性范围

[0199] 具有校准材料的线性范围

[0200] 制备实施例1中所述的校准肽。校准肽含有由PEG4接头分开的pT3和hT43的核心表位,并且用于生成将来自SiMoA分析仪的AEB的输出与校准肽浓度相关联的标准曲线。图6a中显示了通过如实施例1中所指定的校准肽的不同稀释液的5次单独运行生成的代表性标准曲线。使用4参数曲线拟合数据约简法(4PL, 1/y²加权)生成校准曲线。将实施例1的示例性测定的检测下限(LLOD)确定为所计算的校准物水平,产生等于零校准物的平均值+2.5标准偏差(SD)的AEB,包括10%CV。根据这些标准,代表性数据产生为约0.002pg/mL的LLOD。将LLOQ和定量上限(ULOQ)之间的测定的线性范围定义为达到CV<20%以及预期的回收率80%至120%的最低至最高标准曲线点。根据这些标准,实施例1的示例性测定的线性范围为0.012pg/mL至30pg/mL。5次单独运行的校正曲线能够很好地对齐(表示具有5fg/mL至30,000fg/mL的宽动态范围的一致信号),并表明信号在整个范围内有所增加,偶尔在顶点处饱和,表明实施例1的示例性测定的动态范围为0.005pg/mL至10pg/mL。下面表2中提供了图6a中所示的5次单独运行的每次稀释的平均值、SD、CV以及信号与背景的比率(S/B)。

[0201] 表2.

pg/mL 校准物	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 + 2.5 sd = .015 + (2.5 × 0.003) = .0228 AEB, 该公式计算至 0.002pg/mL 的理论浓度

LLOQ = 校准曲线上的第一点, 显示出 CV < 20% 并且信噪比 (S/N) > 2 = 0.012pg/mL

[0203] 血浆的稀释线性度

[0204] 为了评估稀释线性并确定测试血清和血浆样品所需的最小稀释(MRD),将来自具有高tau水平的AD受试者的一组3个合并血清样品和来自具有高水平的AD受试者的1个合并血浆样品在样品稀释剂中从1:2稀释度滴定到1:6稀释度(即,1:2、1:3、1:4、1:5和1:6稀释),并根据实施例1的测定来测量。然后再调整从每个稀释液中检测到的p217+tau的量,以提供未稀释血清或血浆样品中存在的p217+tau的估算浓度,并且与从血清或血浆样品的1:3稀释液中确定的p217+tau的估算浓度进行比较。所得的数据在图6b中显示为在1:3稀释的每个样品中的p217+tau的估算浓度的百分比。在图6b中以圆圈(●)符号、正方形(■)符号和三角形(▲)符号表示针对3个血清样品中的每个获得的结果。在图6b中以倒三角形(▼)符号表示针对血浆样品获得的结果。从图6b中可以看出,对于所有显示的血清和血浆样品,样品稀释液中的每个在其他稀释液的20%内。该数据表明在1:2至1:6稀释范围内具有可接受的稀释线性度。因为血清和血浆样品含有少量p217+tau,所以1:2稀释可以是优选的。

[0205] 实施例9a:用于检测血浆中的p217+tau的测定的技术鉴定

[0206] 精度

[0207] 为了评估来自血浆的p217+tau测量值的重复间精度,根据实施例1的示例性测定一式四份测量232个血浆样品(包括HV和AD受试者)的队列。基于校准肽标准曲线,测定的LLOQ被确定为10fg/mL。在1:2稀释样品后,将LLOQ调整至20fg/mL。然而,基于将从每个样品检测到的p217+tau的平均量(以fg/mL计)映射到每个样品的一式四份测量值的每个组的%CV,数据表明不精确度从小于约40fg/mL开始增加(图7a)。图7a的数据显示,测定的93%的样品(216/232)的测量值大于LLOQ(在该实例中CV<20%的浓度=40fg/mL,并且以虚线显示)。此外,对于仅供研究使用(RUO)的测定,除了4个样品之外的所有样品的测量值均在20%CV的可接受限度内。所有232个血浆样品的平均测试内精度为7.1%CV,并且那些大于LLOQ的样品的平均测试内精度为6.7%CV。

[0208] 为了评估实施例1的测定的测试间精度,制备在样品稀释剂中含有低、中和高浓度的校准肽的一组3个质量控制(QC)样品,以及来自具有高tau水平的AD受试者的血浆的合并样品和来自具有高tau水平的AD受试者的血清的合并样品。然后根据实施例1的示例性测定对这些样品进行针对5次单独运行的测量。从这些样品检测到的p217+tau的稀释校正量显示在图7b中。对于每个样品,平均值显示为较长的水平线,数据集的±标准偏差(SD)显示为在平均值线上方和下方的较短线。这5个样品的测试间精度被确定为5%至15%CV。

[0209] 实验室之间的可转移性

[0210] 为了评估测试中心之间的p217+tau测定的精度,在两个单独的位置使用相同批次的试剂来测试从HV和AD受试者获得的一组血浆样品。如果样品的测量值在两个测试中心之间非常相似,则证实示例性测定可在实验室之间转移。

[0211] 分析物稳定性

[0212] 内源性p217+tau表位在血浆中的稳定性可以在不同温度下通过以下步骤来评估:将从AD受试者获得的一批血浆等分,并且将每个等分试样在4℃、22℃或37℃下储存1小时、2小时或4小时。另外,等分试样的子组可以冻融(-80℃至22℃)1次、2次、3次或4次。如果在这些不同的储存条件下未观察到信号的显著变化,则这将表明通过实施例1的示例性测定识别的tau种类(和特定表位)足够稳定以允许标准储存/测试程序。

[0213] 实施例9b:用于检测血浆中的p217+tau的测定的技术鉴定

[0214] 精度

[0215] 另外,还分析了来自实施例9a的227个血浆样品(157个轻度-中度,70个认知正常的受试者)的测定结果,以评估来自血浆的p217+tau测量值的重复间精度,并且显示于图7c中。检测图7c中所示的所有样品(表现出信号>LLOD)并且具有可接受的精度(<25%CV,平均CV=7.1%)。事实上,223/227个样品(98.2%)表现出<20%CV。为了更好地建立定量下限(LLOQ),基于该点设定37fg/mL的截断值,在该点以下血浆测量值更可能表现出>20%CV。如图7c所示,所有样品的94.7%的测量值大于该LLOQ。

[0216] 实施例10:与CSF p217+tau和Tau PET相比,检测血浆中的p217+tau的测定的临床鉴定

[0217] 为了评估实施例1的示例性测定在AD的诊断和分期中的效用,获得三个队列的血浆样品用于使用该测定进行p217+tau测量。分析这些测量值与CSF p217+tau水平和/或

TauPET SUVR的相关性,这将在下文对队列3的讨论中进一步解释。

[0218] 队列1:AD队列中的血浆p217+tau与CSFp217+tau的相关性

[0219] 队列1评估在血浆中检测到的p217+tau肽与在来自相同AD受试者的匹配CSF中检测到的p217+tau的相关性。使用在Kolb'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定来测量来自临床研究中的16名AD受试者(它们被临床诊断为轻度-中度痴呆,临床痴呆等级为1+)中的每个的腰部流体(LF)CSF样品。根据上文所述的实施例1的示例性测定来测量来自相同的16名AD受试者的血浆样品。对于每名受试者,将在对应的CSF样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在X-轴上)映射到在图8a和图8b中的对应的血浆样品中检测到的p217+tau的量(显示在Y-轴上),这些图以对数标度显示图8a的数据。图8a中显示了线性回归线($R^2=0.43$,斜率=0.007, $p=0.006$)以及该线性回归线的R2值。血浆p217+tau浓度是CSF p217+tau浓度的 $1.95\pm 0.23\%$ (平均值 \pm SEM)。

[0220] 队列2:验证队列中的血浆p217+tau与CSFp217+tau的相关性

[0221] 除了来自另一临床研究的无症状受试者队列($n=70$)之外,队列2还评估在临床研究中诊断为轻度-中度痴呆(临床痴呆等级1+)的更大受试者队列($n=159$)中在血浆中检测到的p217+tau肽与在CSF中检测到的p217+tau的相关性。使用在Kolb'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定来测量来自队列2(包括229名受试者)的LF CSF样品。根据实施例1的示例性测定来测量来自相同的229名受试者的血浆样品。对于每名受试者,将在对应的CSF样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在X-轴上)映射到在图9a中的对应的血浆样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在Y-轴上)。线性回归(未示出)具有 $R^2=0.35$,斜率=6,以及 $p<0.0001$ 。

[0222] 图9a还包括表示第一阈值(6.6pg/mL)的垂直虚线和表示第二阈值(104fg/mL)的对应的水平虚线,大于第一阈值,CSF样品将指示受试者患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险(例如,如通过增加的CSF p217+tau水平和/或增加的TauPET SUVR来展示,在下文队列3的讨论中进一步解释),大于第二阈值,血浆样品将指示受试者患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险。标记为"是+"的右上象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者大于第一阈值和第二阈值的受试者,表明CSF和血浆测量值二者在将受试者为鉴定患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险方面是一致的。标记为"是-"的左下象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者小于第一阈值和第二阈值的受试者,表明CSF和血浆测量值二者在将受试者鉴定为无发展成tau蛋白病的风险方面是一致的。标记为"非+"的左上象限对应于其中所测量的CSF样品大于第一阈值但所测量的血浆样品小于第二阈值的受试者,表明血浆测量值将那些受试者鉴定为患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险,而CSF测量值则不能。标记为"非-"的右下象限对应于其中所测量的CSF样品小于第一阈值但所测量的血浆样品大于第二阈值的受试者,表明CSF测量值将那些受试者鉴定为患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险,而血浆测量值则不能。在图9a的每个象限中鉴定的受试者的数量在下表3中提供。

[0223] 表3.

[0224]

	是+	是-	非+	非-
受试者的数量	133	74	10	12
受试者的百分比	58	32	4	5

[0225] 图9a和表3的数据用于产生接收者操作特征(ROC)曲线,图9b中显示了血浆测量值区分那些患者的CSF测量值大于第二阈值还是小于第二阈值的能力,大于第二阈值表示受试者患有tau蛋白病或有tau蛋白病的风险,小于第二阈值表示受试者健康或无发展成tau蛋白病的风险。实施例1的血浆测定显示出良好的特异性和灵敏度,AUC=0.943(95%CI:90.9、97.8)。

[0226] 据Ko1b'492专利报道,该专利描述的“2步”测定能够将来具有“活检+”脑活检样品的受试者的CSF样品与来自具有“活检-”脑活检样品的受试者的CSF样品区分开来,表明CSF中的p217+tau的测量值可以指示患者的tau蛋白病(特别是AD)的临床病理学。鉴于本文的图9a和图9b以及表3中提供的数据,根据本申请的测定和方法的血浆测量值也指示患者的tau蛋白病的临床病理学,对应于CSF中p217+tau的增加,并且可用作检测患者的tau蛋白病的预测性生物标志物。

[0227] 队列3:CSF p217+tau与tau的PET测量值的相关性

[0228] 队列3评估在CSF中检测到的p217+tau肽与从PET图像测量的脑组织中的¹⁸F-T807(¹⁸F-AV-1451)示踪剂保留的相关性。¹⁸F-T807示踪剂保留的PET测量值(Tau PET测量值)对应于脑组织中的tau积聚,这是用于区分患有tau蛋白病或有tau蛋白病的风险的受试者与无发展成tau蛋白病的风险的健康受试者的先行指标。

[0229] 队列3包括处于不同认知衰退状态(认知未受损的对照、轻度认知受损、AD痴呆和若干其他神经退行性疾病)的178名受试者。Tau PET测量值从队列3中的每名受试者的脑的感兴趣的布拉克(Braak)阶段I-IV区域(ROI)获得。使用在Ko1b'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定来测量从这些受试者同时或并行收集的LF CSF样品。对于每名受试者,将在CSF样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在X-轴上)映射到在图10a中的对应的受试者中的F¹⁸标记的T807示踪剂的标准摄取值比率(SUVR)。队列3的受试者展示出具有一定SUVR范围的F¹⁸标记的T807示踪剂的tau PET测量值,如图10a的Y-轴上所示。线性回归(未示出)具有R²=0.722,以及p<0.0001。

[0230] 队列3的受试者还可以被分成两个不同的子集:被发现与脑组织中的淀粉样蛋白-β(Aβ)沉积的增加相关或不相关的那些受试者,如通过PET所测量。Aβ的量增加的那些在实施例10中被称为Aβ+,而Aβ的量不增加的那些在下文中被称为Aβ-。图10a以较暗的阴影显示了Aβ+的那些受试者,而Aβ-受试者大多数存在于图的左下象限,以较亮的阴影显示。对于Aβ+子集,F¹⁸标记的T807示踪剂的CSF至SUVR的p217+tau测量值的线性回归(未显示)具有R²=0.740,以及p<0.0001。对于Aβ+子集,F¹⁸标记的T807示踪剂的CSF至SUVR的p217+tau测量值的线性回归(未显示)具有R²=0.091,以及p=0.532。来自图10a的数据用于产生CSF测量值区分F¹⁸标记的T807示踪剂的SUVR大于阈值(例如,1.25)还是小于阈值的那些患者的能力的ROC曲线,大于阈值表示受试者患有tau蛋白病或有tau蛋白病的风险,小于阈值表示受试者健康或无发展成tau蛋白病的风险。使用在Ko1b'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定获得的CSF测量值显示出用于预测这种高T807 SUVR的良好特异性和灵敏度,其中AUC=0.905(95%CI:86、94.9),并且还鉴定出6.6pg/mL是所期望的阈值,大于该阈值CSF p217+tau测量值将指示受试者患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险。如上文所讨论,所期望的阈值因此可用于从队列2获得的数据的分析,从分析从血浆至TauPET的p217+tau测量值之间的相关性。因此,当将图10a和图10b中提供的数据与从队列2获得的数据组合进行查

看时,进一步展示了根据本申请的测定和方法的血浆测量值指示患者的tau蛋白病的临床病理学,对应于脑组织中tau积聚的增加,并且可用作检测患者的tau蛋白病的预测性生物标志物。

[0231] 实施例11:与CSF p217+tau和CSF p181tau相比,检测血浆中的p217+tau的测定的临床鉴定

[0232] 为了评估实施例1的示例性测定在AD的诊断和分期中的效用,获得血浆样品用于使用该测定进行p217+tau测量。分析这些测量值与CSF p217+tau水平和/或CSF p181tau水平的相关性。CSF p181tau水平对应于从CSF检测到的人tau蛋白或tau蛋白的残基181被磷酸化的tau片段的量。

[0233] 验证队列中的血浆p217+tau与CSF p217+tau的相关性

[0234] 使用实施例9b中所用的相同队列来评估在血浆中检测到的p217+tau肽与在CSF中检测到的p217+tau的相关性。使用在Kolb'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定来测量来自该队列(包括227名受试者)的LF CSF样品。根据上文所述的实施例1的示例性测定来测量来自相同的227名受试者的血浆样品。对于每名受试者,将在对应的CSF样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在X-轴上)映射到在图11a中的对应的血浆样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在Y-轴上)。线性回归(未示出)具有 $R^2=0.35$ 。血浆p217+tau浓度是CSF p217+tau浓度的 $1.87\pm 0.11\%$ (平均值 \pm SEM)。

[0235] 图11b和图11c显示了通过患者的淀粉样蛋白状态(例如,A+或A-)区分的图11a的数据。A+表示被认为是淀粉样蛋白阳性的患者,具有的CSF A β 42/40比率 ≤ 0.089 。A-表示被认为是淀粉样蛋白阴性的患者,具有的CSF A β 42/40比率 > 0.089 。值得注意的是,来自图11a的17名受试者不包括在图11b或图11c中,因为这些患者不能获得CSF淀粉样蛋白数据。图11b显示了A+的患者子集的数据(n=160),并且图11c显示了A-的患者子集的数据(n=50)。图11b的线性回归(未示出)具有 $R^2=0.27$ 。图11c的线性回归(未示出)具有 $R^2=0.01$ 。A+患者中的血浆p217+tau浓度为CSF p217+tau浓度的 $1.63\pm 0.08\%$ (平均值 \pm SEM)。A-患者中的血浆p217+tau浓度为CSF p217+tau浓度的 $2.73\pm 0.39\%$ (平均值 \pm SEM)。如以上报道的数据所示,在淀粉样蛋白阳性队列中血浆与CSF p217+tau的比率略微但显著较低($p < 0.0001$,使用未配对t检验)。

[0236] CSF p217+tau与CSF p181tau的相关性

[0237] 评估了在CSF中检测到的p217+tau肽与在CSF中检测到的p181的水平的相关性。分别使用在Kolb'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定以及通过Innotest p181tau测定来测量来自轻度-中度痴呆受试者(n=286;89%A+)的CSF样品,以确定从CSF样品检测的p217+tau和p181的浓度。对于每名受试者,将在CSF样品中检测到的p181tau的量(以pg/mL计)(显示在X-轴上)映射到在图12a中的对应的受试者中的CSF样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在Y-轴上)。CSF p181 tau的水平增加的那些患者可被鉴定为T+,表明患者患有tau蛋白病或有tau蛋白病的风险。CSF p181的水平小于特定阈值的那些患者可被鉴定为T-,表明患者是健康的或无发展成tau蛋白病的风险。对于该示例,CSF p181tau浓度 ≥ 52 pg/mL被鉴定为T+,而CSF p181tau浓度 < 52 pg/mL被称为T-。图12a中所示数据的线性回归用于将该阈值CSF p181tau浓度与CSF中的p217+tau的浓度相关联。基于该数据,CSF p181tau阈值为52pg/mL与CSF中的p217+tau为11.4pg/mL相关联。因此,CSF p217+tau浓度 \geq

11.4pg/mL可用于将那些患者鉴定为T+,而CSF p217+tau浓度<11.4pg/mL可用于将那些患者鉴定为T-。

[0238] 来自图11a的数据用于产生CSF p217+tau测量值区分T+与T-患者的能力的ROC曲线(图12b)。使用在Ko1b'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定获得的CSF测量值显示出预测患者将是T+还是T-的高准确度,AUC=0.9469。ROC曲线的约登(Youden)指数分析确定用于区分T+患者与T-患者的血浆p217+tau的阈值为124.6fg/mL。

[0239] 来自图11a的数据也显示于图12c中,其中垂直虚线表示第一阈值(如上文所确定为11.4pg/mL),并且对应的水平虚线表示第二阈值(如上文所确定为124.6fg/mL),大于第一阈值,CSF样品将指示为T+患者,大于第二阈值,血浆样品将指示为T-患者。标记为“是+”的右上象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者大于第一阈值和第二阈值二者的受试者,表明CSF和血浆测量值二者在将受试者为鉴定患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险方面是一致的。标记为“是-”的左下象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者小于第一阈值和第二阈值的受试者,表明CSF和血浆测量值二者在将受试者鉴定为无发展成tau蛋白病的风险方面是一致的。标记为“非+”的左上象限对应于其中所测量的CSF样品大于第一阈值但所测量的血浆样品小于第二阈值的受试者,表明血浆测量值将那些受试者鉴定为患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险,而CSF测量值则不能。标记为“非-”的右下象限对应于其中所测量的CSF样品小于第一阈值但所测量的血浆样品大于第二阈值的受试者,表明CSF测量值将那些受试者鉴定为患有tau蛋白病或处于发展tau蛋白病的风险,而血浆测量值则不能。图12c分别显示了10%和2%的低非+/-比率。下表4中提供了在图12c的每个象限中鉴定的受试者的数量。

[0240] 表4.

[0241]	是+	是-	非+	非-
受试者的数量	108	91	24	4
受试者的百分比	48	40	10	2

[0242] 图12e和图12g显示了由认知正常与轻度-中度痴呆患者区分的图12c的数据。图12e显示了认知正常的患者子集的数据,图12g显示了轻度-中度痴呆的患者子集的数据。

[0243] 来自图12e的数据用于产生CSF p217+tau测量值在认知正常的患者子集(n=70)中区分T+与T-患者的能力的ROC曲线(图12d)。认知正常子集的CSF测量值显示出相似的准确度水平,AUC=0.9045。ROC曲线的约登指数分析用于确定区分T+与T-患者的血浆p217+tau的阈值。

[0244] 图12e还包括表示第一阈值(如上文所确定为11.4pg/mL)的垂直虚线和表示第二阈值(如通过图12d的ROC曲线所确定)的对应的水平虚线,大于第一阈值,CSF样品将指示为T+患者,大于第二阈值,血浆样品将指示为T-患者。标记为“是+”的右上象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者大于第一阈值和第二阈值二者的受试者。标记为“是-”的左下象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者小于第一阈值和第二阈值的受试者。标记为“非+”的左上象限对应于其中所测量的CSF样品大于第一阈值但所测量的血浆样品小于第二阈值的受试者。标记为“非-”的右下象限对应于其中所测量的CSF样品小于第一阈值但所测量的血浆样品大于第二阈值的受试者。图12e分别显示了23%和0%的低非+/-比率。下表5中提供了在图12e的每个象限中鉴定的受试者的数量。

[0245] 表5.

	是+	是-	非+	非-
受试者的数量	5	49	16	0
受试者的百分比	7	70	23	0

[0247] 来自图12g的数据用于产生CSF p217+tau测量值在轻度-中度痴呆患者子集 (n=157) 中区分T+与T- 患者的能力的ROC曲线(图12f)。轻度-中度痴呆子集的CSF测量值显示出相似的准确度水平, AUC=0.9254。ROC曲线的约登指数分析用于确定区分T+与T- 患者的血浆p217+tau的阈值。

[0248] 图12g还显示表示第一阈值(如上文所确定为11.4pg/mL)的垂直虚线和表示第二阈值(如通过图12f的ROC曲线所确定)的对应的水平虚线, 大于第一阈值, CSF样品将指示为T+患者, 大于第二阈值, 血浆样品将指示为T- 患者。标记为“是+”的右上象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者大于第一阈值和第二阈值二者的受试者。标记为“是-”的左下象限对应于其中所测量的CSF和血浆样品二者小于第一阈值和第二阈值的受试者。标记为“非+”的左上象限对应于其中所测量的CSF样品大于第一阈值但所测量的血浆样品小于第二阈值的受试者。标记为“非-”的右下象限对应于其中所测量的CSF样品小于第一阈值但所测量的血浆样品大于第二阈值的受试者。图12g分别显示了9%和4%的低非+/-比率。在图12g的每个象限中鉴定的受试者的数量在下表6中提供。

[0249] 表6.

	是+	是-	非+	非-
受试者的数量	100	36	14	7
受试者的百分比	64	23	9	4

[0251] 图12e和图12g中所示的数据显示, 根据本申请的测定和方法的血浆测量值在认知正常和轻度-中度痴呆子集中的每个中提供类似的预测能力。

[0252] 实施例12: 与CSF β -淀粉样蛋白相比, 检测血浆中的p217+tau的测定的临床鉴定

[0253] 为了评估实施例1的示例性测定在AD的诊断和分期中的效用, 获得血浆样品用于使用该测定进行p217+tau测量。分析这些测量值与CSF β -淀粉样蛋白水平的相关性。

[0254] 血浆p217+tau与CSF β -淀粉样蛋白水平的相关性

[0255] 使用一个210名患者的队列来评估血浆中检测到的p217+tau肽与CSF β -淀粉样蛋白水平的相关性。测量来自该队列的CSF样品以确定样品中存在的AB42的量和AB40的量。根据上文所述的实施例1的示例性测定来测量来自相同的227名受试者的血浆样品。检测到的AB42的量与AB40的量的比率是区分患有淀粉样蛋白形成性疾病或有淀粉样蛋白形成性疾病的风险的受试者与无发展成淀粉样蛋白形成性疾病的健康的受试者的先行指标。对于每名受试者, 将在对应的CSF样品中检测到的AB42的量与AB40的量的比率(AB42/40比率)(显示在X-轴上)映射到在图13a中的对应的血浆样品中检测到的p217+tau的量(以fg/ml计)(显示在Y-轴上)。AB42/40比率降低的那些患者可被鉴定为A+, 表明患者淀粉样蛋白形成性疾病或有淀粉样蛋白形成性疾病的风险。AB42/40比率增加的那些患者可被鉴定为A-, 表明患者是健康的或无发展成淀粉样蛋白形成性疾病的风险。对于该示例, AB42/40比率 \leq 0.089的被鉴定为A+, 而AB42/40比率 $>$ 0.089被称为A-。

[0256] 来自图13b的数据用于产生血浆p217+tau测量值区分T+患者与T- 患者的能力的

ROC曲线(图13a)。血浆p217+tau显示出预测患者将是A+还是A-的高准确度, $AUC=0.8964$ 。ROC曲线的约登(Youden)指数分析确定用于区分A+患者与A-患者的血浆p217+tau的阈值为103.9fg/mL。

[0257] 图13b还包括表示第一阈值(如上文所确定为0.089)的垂直虚线和表示第二阈值(如上文所确定为103.9fg/mL)的对应的水平虚线, 小于第一阈值, A β 42/40比率将指示为A+患者, 小于第二阈值, 血浆p217+tau水平将指示为A-患者。标记为“是+”的左上象限, 其中A β 42/40比率小于第一阈值并且血浆p217+tau水平大于第二阈值, 表明A β 42/40比率和血浆p217+tau测量值二者在将受试者鉴定为患有淀粉样蛋白形成性疾病或处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险方面是一致的。标记为“是-”的右下象限对应于其中A β 42/40比率大于第一阈值并且血浆p217+tau水平小于第二阈值的受试者, 表明A β 42/40比率和血浆p217+tau测量值在将受试者鉴定为无发展成淀粉样蛋白形成性疾病的风险方面是一致的。标记为“非+”的右上象限对应于其中A β 42/40比率和血浆p217+tau水平分别大于第一阈值和第二阈值的受试者, 表明血浆p217+tau水平将那些受试者鉴定为患有淀粉样蛋白形成性疾病或处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险, 而A β 42/40比率则不能。标记为“非-”的左下象限对应于其中A β 42/40比率小于第一阈值并且所测量的血浆p217+tau水平小于第二阈值的受试者, 表明A β 42/40比率将那些受试者鉴定为患有淀粉样蛋白形成性疾病或处于发展淀粉样蛋白形成性疾病的风险, 而血浆p217+tau水平则不能。图13b分别显示了1%和18%的低非+/-比率。下表7中提供了在图13b的每个象限中鉴定的受试者的数量。

[0258] 表7.

	是+	是-	非+	非-
受试者的数量	123	48	2	37
受试者的百分比	58	23	1	18

[0260] 图13d和图13f显示了由认知正常与轻度-中度痴呆患者区分的图13b的数据。图13d显示了认知正常的患者子集的数据, 图13f显示了轻度-中度痴呆的患者子集的数据。

[0261] 来自图13d的数据用于产生血浆p217+tau测量值在认知正常的患者子集($n=70$)中区分A+患者与A-患者的能力的ROC曲线(图13c)。认知正常的患者子集的血浆p217+tau测量值具有 $AUC=0.6554$ 的ROC曲线。ROC曲线的约登指数分析用于确定区分A+与A-患者的血浆p217+tau的阈值。

[0262] 图13d还包括表示第一阈值(如上文所确定为0.089)的垂直虚线和表示第二阈值(如通过图13c的ROC曲线所确定)的对应的水平虚线, 小于第一阈值, A β 42/40比率将指示为A+患者, 小于第二阈值, 血浆p217+tau水平将指示为A-患者。标记为“是+”的左上象限, 其中A β 42/40比率小于第一阈值并且血浆p217+tau水平大于第二阈值。标记为“是-”的右下象限对应于其中A β 42/40比率大于第一阈值并且血浆p217+tau水平小于第二阈值的受试者。标记为“非+”的右上象限对应于其中A β 42/40比率和血浆p217+tau水平分别大于第一阈值和第二阈值的受试者。标记为“非-”的左下象限对应于其中A β 42/40比率小于第一阈值并且所测量的血浆p217+tau水平小于第二阈值的受试者。图13d分别显示了10和24%的非+/-比率。下表8中提供了在图13d的每个象限中鉴定的受试者的数量。

[0263] 表8.

	是+	是-	非+	非-

受试者的数量	21	25	7	17
受试者的百分比	30	36	10	24

[0265] 来自图13f的数据用于产生血浆p217+tau测量值在轻度-中度痴呆患者子集(n=140)中区分A+患者与A-患者的能力的ROC曲线(图13e)。血浆p217+tau测量值在AUC=0.9832的轻度-中度痴呆患者子集中提供了高准确度。ROC曲线的约登指数分析用于确定区分A+与A-患者的血浆p217+tau的阈值。

[0266] 图13f还包括表示第一阈值(如上文所确定为0.089)的垂直虚线和表示第二阈值(如通过图13e的ROC曲线所确定)的对应的水平虚线,小于第一阈值,AB42/40比率将指示为A+患者,小于第二阈值,血浆p217+tau水平将指示为A-患者。标记为“是+”的左上象限,其中AB42/40比率小于第一阈值并且血浆p217+tau水平大于第二阈值。标记为“是-”的右下象限对应于其中AB42/40比率大于第一阈值并且血浆p217+tau水平小于第二阈值的受试者。标记为“非+”的右上象限对应于其中AB42/40比率和血浆p217+tau水平分别大于第一阈值和第二阈值的受试者。标记为“非-”的左下象限对应于其中AB42/40比率小于第一阈值并且所测量的血浆p217+tau水平小于第二阈值的受试者。图13f分别显示了0和6%的非+/-比率。下表9中提供了在图13f的每个象限中鉴定的受试者的数量。

[0267] 表9.

	是+	是-	非+	非-
受试者的数量	113	18	0	9
受试者的百分比	81	13	0	6

[0269] 图13d和图13f中提供的数据显示,根据本申请的测定和方法的血浆测量值在轻度-中度痴呆患者子集中提供预测准确度的改善。

[0270] 实施例13:通过生物化学纯化进行的血浆p217+tau与CSFp217+tau的相关性

[0271] 测试另一个36名患者的队列以进一步评估血浆中检测到的p217+tau肽与CSF中检测到的p217+tau的相关性。使用在Ko1b'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定来测量该队列中的CSF样品。以三种不同的方式测量来自相同受试者的血浆样品。第一,根据实施例1的示例性测定来测量粗制血浆样品。第二,从血浆样品中化学提取tau肽并根据实施例1的示例性测定进行测量。第三,根据实施例2使血浆样品半变性,从而通过加热使干扰性蛋白质变性。对于每名受试者,将在对应的CSF样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在X-轴上)映射到在图14a中的对应的粗制血浆样品中检测到的p217+tau的量(以pg/mL计)(显示在Y-轴上)。图14a的线性回归(未示出)具有 $R^2=0.6418$ 。将p217+tau的量(以pg/mL计)CSF样品(显示在X-轴上)映射到在图14b中的对应的化学提取的血浆样品中检测到的p217+tau的量(以fg/ml计)(显示在Y-轴上)。图14b的线性回归(未示出)具有 $R^2=0.6748$ 。将p217+tau的量(以pg/mL计)CSF样品(显示在X-轴上)映射到在图14c中的对应的半变性血浆样品中检测到的p217+tau的量(以fg/ml计)(显示在Y-轴上)。图14c的线性回归(未示出)具有 $R^2=0.5484$ 。

[0272] 实施例14:用外源性抗tau抗体处理的受试者中的总p217+tau的定量

[0273] 本申请的测定和方法可用于检测血浆样品中的总p217+tau,所述血浆样品获自经历抗tau抗体,特别是抗p217+tau抗体治疗的受试者。然而,经历抗tau抗体治疗的受试者的血浆样品中的p217+tau的检测可受由治疗抗体在血浆样品中存在导致的干扰和/或伪影的

影响。因此,实施例2中描述的用于生成半变性样品流体的步骤可用于处理来自经历抗tau抗体处理的受试者的血浆样品,以减少来自处理抗体的干扰,同时允许p217+tau信号保留在半变性样品流体中。

[0274] 实施例14修改了实施例1的示例性测定,具有以与根据实施例2所述获得半变性样品流体相同的方式使样品变性的步骤。使用HV和AD受试者的血浆样品来评估修改的示例性测定。将这些血浆样品加热并根据实施例10的示例性测定进行测量,结果(以pg/mL所检测的p217+tau计)显示在图15a中。图15a的左侧显示了对应于HV受试者的数据,并且图的右侧显示了对应于AD受试者的数据。对于每类受试者,平均值显示为较长的水平线,数据集的士标准偏差(SD)显示为在平均值线上方和下方的较短线。从图15a中可以看出,AD受试者的半变性血浆样品的测量值显著高于从HV受试者获得的那些,反映了用实施例1测定在粗制血浆样品中观察到的结果。

[0275] 实施例14的修改的示例性测定用于测量来自抗p217+tau抗体疗法的1期临床试验的一组585个血浆样品,通过进行研究来评估灵敏度和精度。代表性标准曲线从8次单独运行的半变性样品流体生成,所述半变性样品流体从如实施例1中所指定的校准肽的不同稀释液获得并且显示于图15b中。如实施例14所述测定半变性样品的LLOQ和ULOQ之间的线性范围被定义为达到预期的CV<20%和80%至120%回收率的最低至最高标准曲线点,然后对样品的1:6稀释进行校正。根据这些标准,实施例10的修改的示例性测定的线性范围为约0.24至180pg/mL。然而,为了通过实际样品评估实施例14的修改的示例性测定的精度,将从每个半变性血浆样品检测的p217+tau的平均量(以fg/mL计)映射到每个样品的%CV(图15c)。图15c的数据显示出CV范围为0至141%,平均值为14%。此外,图15c中所示的82%的样品的CV<20%,并且66%的样品在线性范围内。垂直虚线表示半变性样品的浓度,其中不精确度似乎增加,因此实施例14的方法的样品限定的LLOQ为约0.2pg/mL。

[0276] 鉴于该数据,进一步预期本申请的测定和方法可以与血浆样品的预分析操作组合,以测量从具有外源施用的抗tau抗体的受试者获得的血浆样品中的p217+tau的水平,从而监测抗tau抗体疗法对血浆中的p217+tau水平的药理学作用。

[0277] 实施例15:检测和/或预测tau蛋白病的计算机实施的方法

[0278] 实施例15描述了用于分析tau蛋白病的生物标志物的基于血液的测量值以改善受试者的tau蛋白病的检测和/或预测的示例性计算机实施的方法。具体而言,实施例15中使用的生物标志物测量值中的一个是从血清样品测定的p217+tau水平。然而,预期实施例15中描述的方法同样适用于在血浆中测量的p217+tau水平,诸如使用实施例1的示例性测定获得的那些测量值。

[0279] 在实施例15中,在来自III期临床研究中具有轻度至中度AD的199名受试者的血浆和血清样品中测定一组23个基于血液的生物标志物。23个基于血液的生物标志物包括p217+tau、NFL、脂连蛋白、瘦蛋白和其他炎性和代谢标志物。此外,对于这些患者中的每个,还使用在Kolb'492专利的实施例1中描述的pT3xhT43测定来测量CSF中的p217+tau水平。如果从受试者的CSF测量的p217+tau肽的量超过21pg/mL,则受试者被确定为“T阳性”,该浓度对应于用于定义“T”状态的Innotest p181-tau的70pg/mL的常用截断值。然后将对应于CSF中的23个生物标志物测量值和p217+tau测量值的数据,以及所有199名受试者的患者人口统计数据(例如,年龄和性别)分成两个不同的数据集:训练集(n=150)和保留集(n=49)。分析

训练集以选择与CSF水平增加具有更高相关性的特征——那些已经被鉴定为“T阳性”的受试者。所选择的特征包括p217+tau、NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的基于血液的测量值。使用训练集来训练多个机器学习模块。具体而言，使用训练集来训练支持向量机模块、随机森林模块、逻辑回归模块、梯度提升模块。所有这些训练的机器学习模块的集成被用于生成结果。

[0280] 为了评估由集成机器学习模块生成的结果的灵敏度和准确度，通过集成机器学习模块来分析来自保留集的数据，以生成保留集的每个受试者的数据是否对应于“T阳性”受试者的确定。然后将由集成机器学习模块生成的确定与保留集的受试者的实际“T阳性”状态进行比较，以评估集成机器学习模块的灵敏度和准确度。使用如下表10中所示的生物标志物的不同子集以这种方式评估集成机器学习模块。

[0281] 表10.

数据子集	生物标志物特征
对照	无生物标志物，使用受试者的年龄和性别进行分析
1	血清 p217+tau
2	血清 p217+tau 和 NFL
3	血清 p217+tau、NFL 和脂连蛋白
4	血清 p217+tau、NFL、脂连蛋白和瘦蛋白
5	NFL、脂连蛋白和瘦蛋白

[0284] 对照数据子集包括来自保留集的数据，不包括任何生物标志物数据。具体而言，使用每名受试者的非生物标志物特征（年龄和性别）通过集成机器学习模块来分析对照数据子集。由集成机器学习模块针对对照数据子集生成的分析被用于产生ROC曲线，该ROC曲线用于评估集成机器学习模块在不存在任何生物标志物的情况下区分保留集中的受试者的“T阳性”状态的能力，在图16a至图16e中显示为虚线。在不存在任何生物标志物数据的情况下，分析对照数据子集的集成机器学习模块的ROC曲线的AUC为0.59。

[0285] 数据子集1至数据子集5中的每个包括对照数据子集和来自对应于上表10中所指定的生物标志物的保留集的数据。下表5至表9中提供了由集成机器学习模块针对数据子集1至数据子集5中的每个生成的分析。在CSF中具有超过21pg/mL的p217+tau测量值的受试者在下表5至表9中被列为“观察+”，而小于该阈值则被列为“观察-”。在表5至表9中，由集成机器学习模块鉴定为对应于“T阳性”状态的受试者被列为“预测+”，而未鉴定为对应于“T阳性”状态的那些则被列为“预测-”。

[0286] 利用来自血清的p217+tau测量值作为特征的数据子集1的分析结果提供于表11中。来自表11的数据被用于产生ROC曲线，该ROC曲线用于评估集成机器学习模块通过来自血清的p217+tau测量值区分保留集中的受试者的“T阳性”状态的能力，在图16a中显示为实线。ROC曲线的AUC为0.87。

[0287] 表11.

	预测+	预测-
观察+	9	9

观察-	0	31
-----	---	----

[0289] 具有来自血清的p217+tau测量值和NFL数据的特征的数据子集2的分析结果提供于表12中。来自表12的数据被用于产生ROC曲线,该ROC曲线用于评估集成机器学习模块通过来自血清的p217+tau测量值和NFL的数据区分保留集中的受试者的“T阳性”状态的能力,在图16b中显示为实线。ROC曲线的AUC为0.89。

[0290] 表12.

	预测+	预测-
观察+	14	4
观察-	1	30

[0292] 具有来自血清的p217+tau测量值以及NFL和脂连蛋白的数据作为特征的数据子集3的分析结果提供于表13中。来自表13的数据被用于产生ROC曲线,该ROC曲线用于评估集成机器学习模块通过来自血清的p217+tau测量值以及NFL和脂连蛋白的数据区分保留集中的受试者的“T阳性”状态的能力,在图16c中显示为实线。ROC曲线的AUC为0.92。

[0293] 表13.

	预测+	预测-
观察+	11	7
观察-	0	31

[0295] 具有来自血清的p217+tau测量值以及NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的数据作为特征的数据子集4的分析结果提供于表14中。来自表14的数据被用于产生ROC曲线,该ROC曲线用于评估集成机器学习模块通过来自血清的p217+tau测量值以及NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的数据区分保留集中的受试者的“T阳性”状态的能力,在图16d中显示为实线。ROC曲线的AUC为0.96。

[0296] 表14.

	预测+	预测-
观察+	11	7
观察-	1	30

[0298] 具有NFL、脂连蛋白和瘦蛋白作为特征的数据的数据子集5的分析结果提供于表15中。来自表15的数据被用于产生ROC曲线,该ROC曲线用于评估集成机器学习模块通过NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的数据而不是来自血清的p217+tau测量值区分保留集中的受试者的“T阳性”状态的能力,在图16e中显示为实线。ROC曲线的AUC为0.78。

[0299] 表15.

	预测+	预测-
观察+	8	10
观察-	4	27

[0301] 实施例15中使用的生物标志物特征组由血清p217+tau、NFL、脂连蛋白和瘦蛋白组成,它们中的每个与CSFp127+tau水平的斯皮尔曼(Spearman)相关性分别为0.47、0.37、0.16、-0.23。使用血清p217+tau、年龄和性别作为特征的机器学习分析产生改善性能,具有0.87的AUC,而对照数据子集为0.59。通过按顺序添加作为特征的NFL、脂连蛋白和瘦蛋白来

增加机器学习分析的复杂性逐渐改善了性能,分别产生0.89、0.92和0.96的AUC。当机器学习分析包括所有4种生物标志物(来自血清的p217+tau测量值以及NFL、脂连蛋白和瘦蛋白的数据)作为特征时,准确度为0.84,显著高于无信息速率($p < 0.005$)。从血清中除去作为特征的p217+tau测量值使AUC降低至0.78,因此表明p217+tau测量值将是用于预测“T阳性”状态的重要生物标志物。

[0302] 对于所有4种生物标志物,准确度为0.84,显著高于无信息速率($p < 0.005$)。从完全模型中省略血清tau使AUC降低至0.78。

[0303] 总之,基于血液的生物标志物可用于鉴定Tau阳性受试者。血清p217+tau是用于预测轻度至中度AD受试者的tau蛋白病或tau蛋白病的脑病理学(例如,在CSF中检测到的p217+tau的量)的最佳单一分析物。

[0304] 本文描述和受权利要求书保护的本发明的范围不受本文所公开的具体实施方案的限制,因为这些实施方案旨在作为本发明的若干方面的说明。任何等同的实施方案旨在处于本发明的范围内。实际上,除了本文所示和所述的那些之外,根据前面的描述,本发明的各种修改形式对于本领域的技术人员将变得显而易见。此类修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。本文引用的所有公布全文以引用方式并入并入。

序列表

<110> JANSSEN PHARMACEUTICA NV
 <120> 用于检测tau蛋白病或淀粉样蛋白形成性疾病的基于血液的测定
 <130> JAB7064
 <140>
 <141>
 <150> 63/200,399
 <151> 2021-03-04
 <150> 62/705,759
 <151> 2020-07-14
 <160> 28
 <170> PatentIn版本3.5
 <210> 1
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <220>
 <223> tau蛋白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
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
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
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
Gly Asp Thr Ser Pro Arg	His Leu Ser Asn Val Ser	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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT82 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT82 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT82 mAb的CDR-H3序列

<400> 4

Gly Ile Thr Tyr

1

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT82 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT82 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT82 mAb的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> 人工序列的描述:合成多肽

<220>

<223> PT82 mAb的VH序列

<400> 8

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<220>

<223> PT82 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> HT43 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> HT43 mAb的HCDR2

<400> 11

Thr Ile Asn Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> HT43 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> HT43 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> HT43 mAb的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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> HT43 mAb的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> 人工序列的描述:合成多肽

<220>

<223> HT43 mAb的重链可变区

<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> 人工序列的描述:合成多肽

<220>

<223> HT43 mAb的轻链可变区

<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> 人工序列的描述:合成多肽
 <220>
 <223> 校准肽pT3xhT43
 <220>
 <221> 位点
 <222> (20) .. (21)
 <223> dPEG4接头
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26) .. (26)
 <223> 磷酸化苏氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31) .. (31)
 <223> 磷酸化苏氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (40) .. (40)
 <223> C-末端酰胺
 <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> 人工序列的描述: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> 人工序列的描述: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> 人工序列的描述: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
			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> 人工序列的描述: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
 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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT3小鼠mAb HCDR1,Kabat编号

<400> 23

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT3小鼠mAb HCDR2,Kabat编号

<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> 人工序列的描述:合成肽

<220>

<223> PT3小鼠mAb HCDR3,Kabat编号

<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> 人工序列的描述:合成肽
<220>
<223> PT3小鼠mAb LCDR1,Kabat编号
<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> 人工序列的描述:合成肽
<220>
<223> PT3小鼠mAb LCDR2,Kabat编号
<400> 27
Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
1 5
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成肽
<220>
<223> PT3小鼠mAb LCDR3,Kabat编号
<400> 28
Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

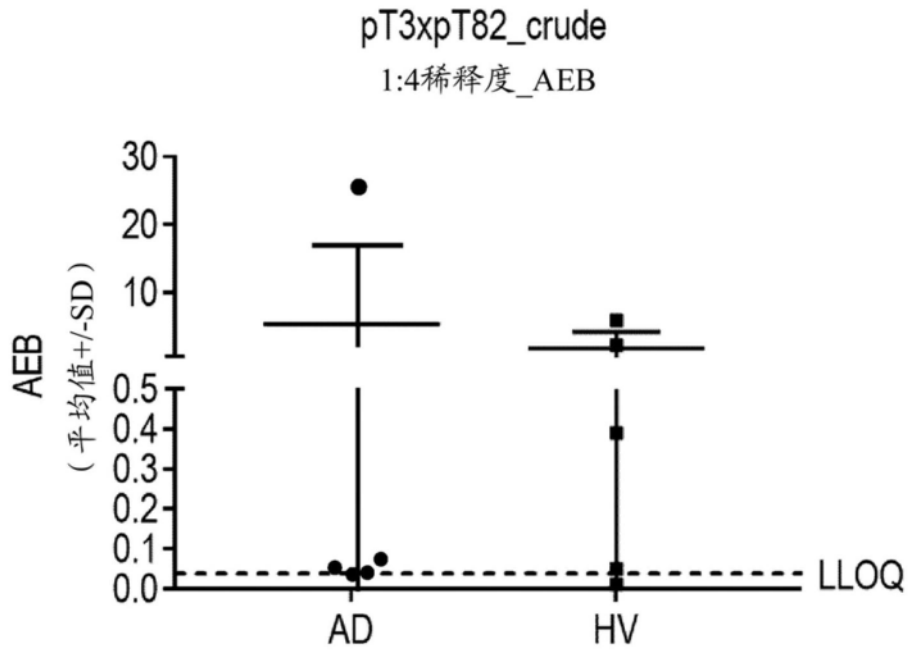


图1A

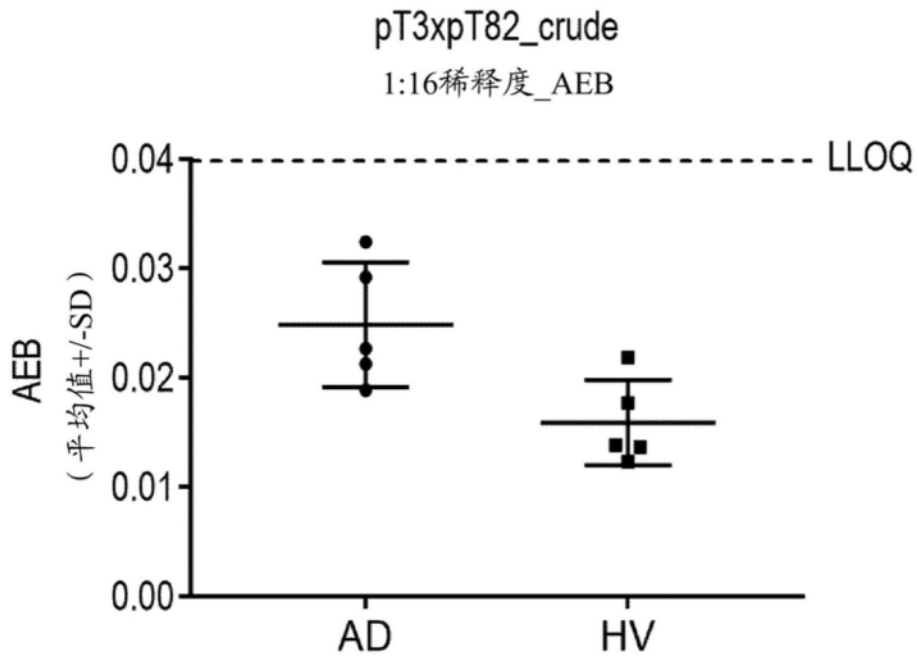


图1B

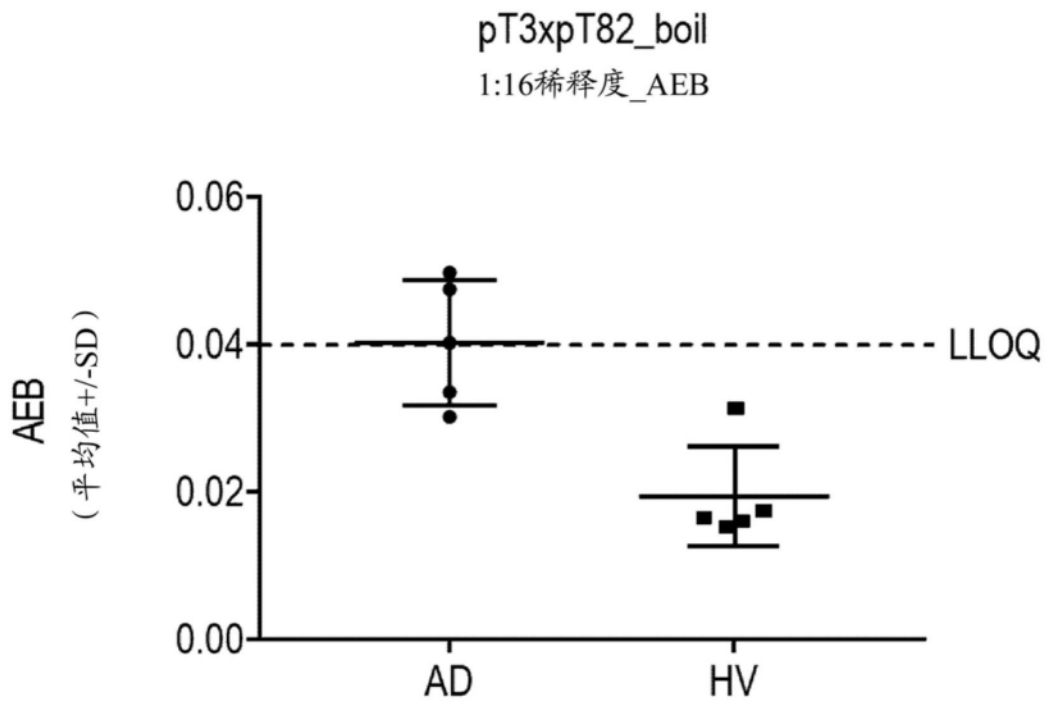


图1C

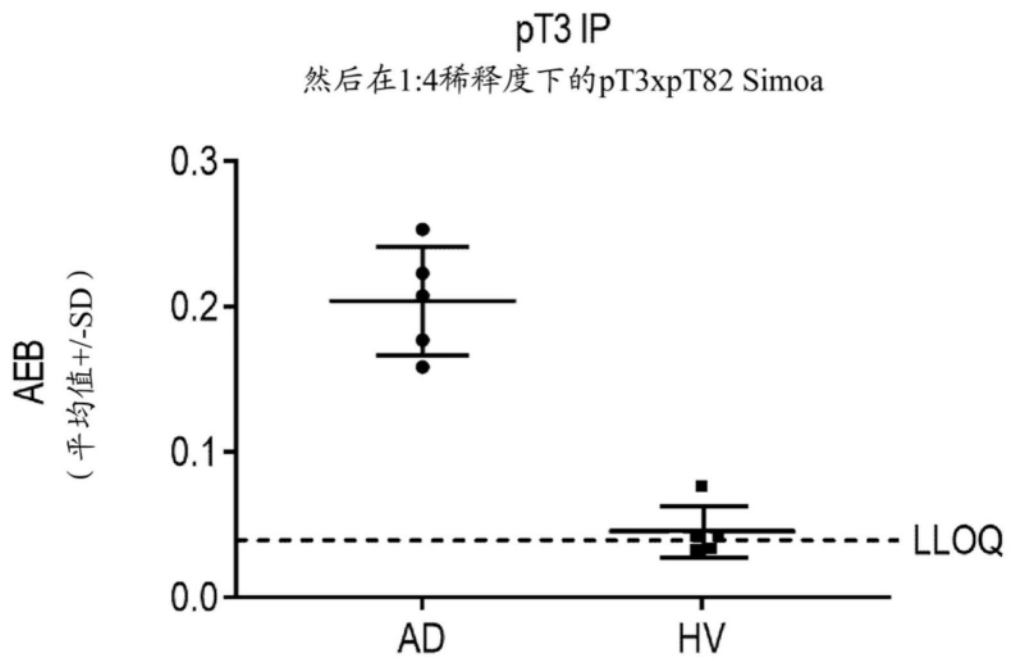


图1D

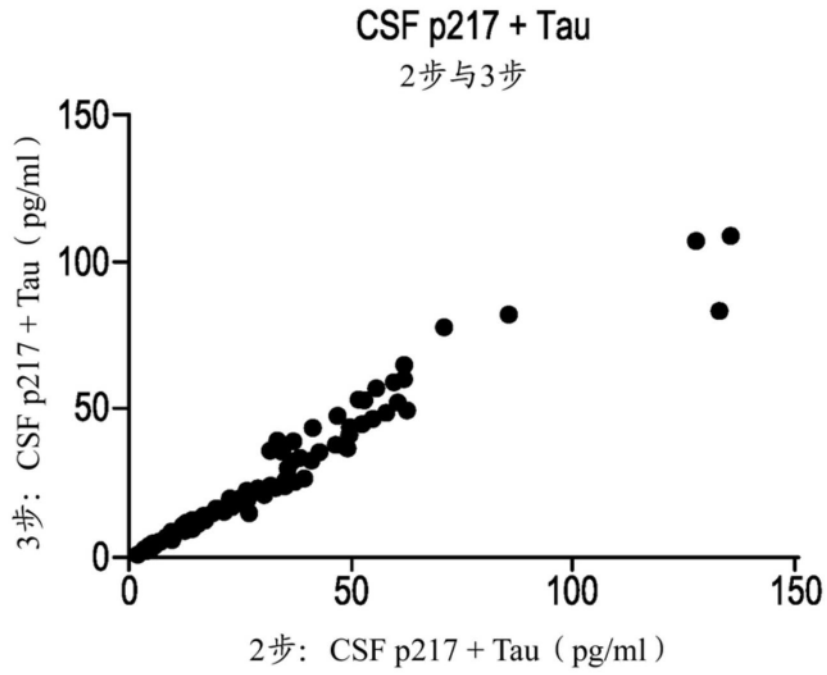


图2A

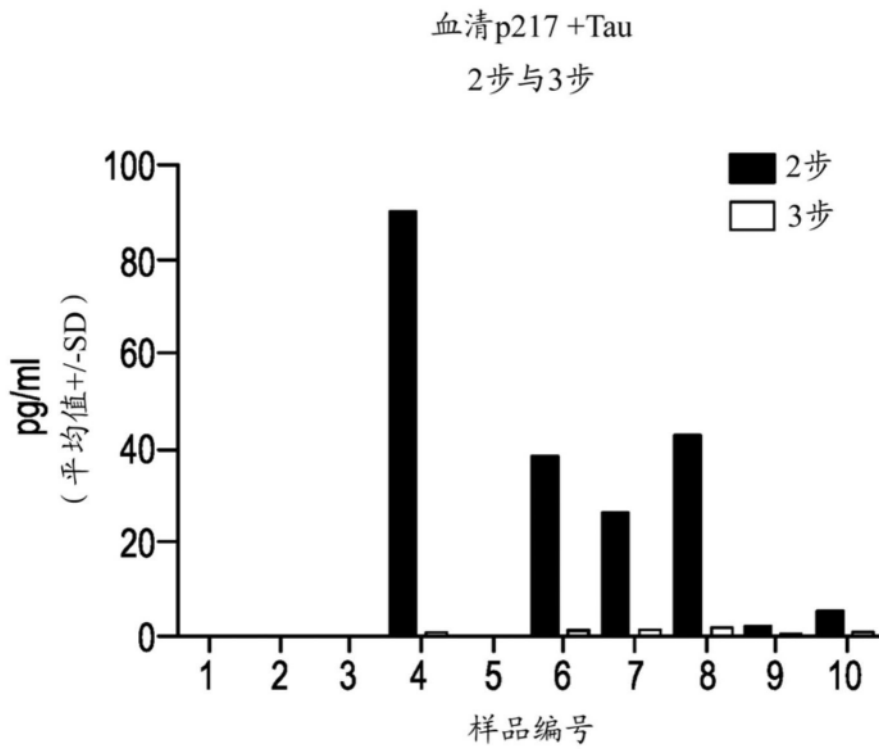


图2B

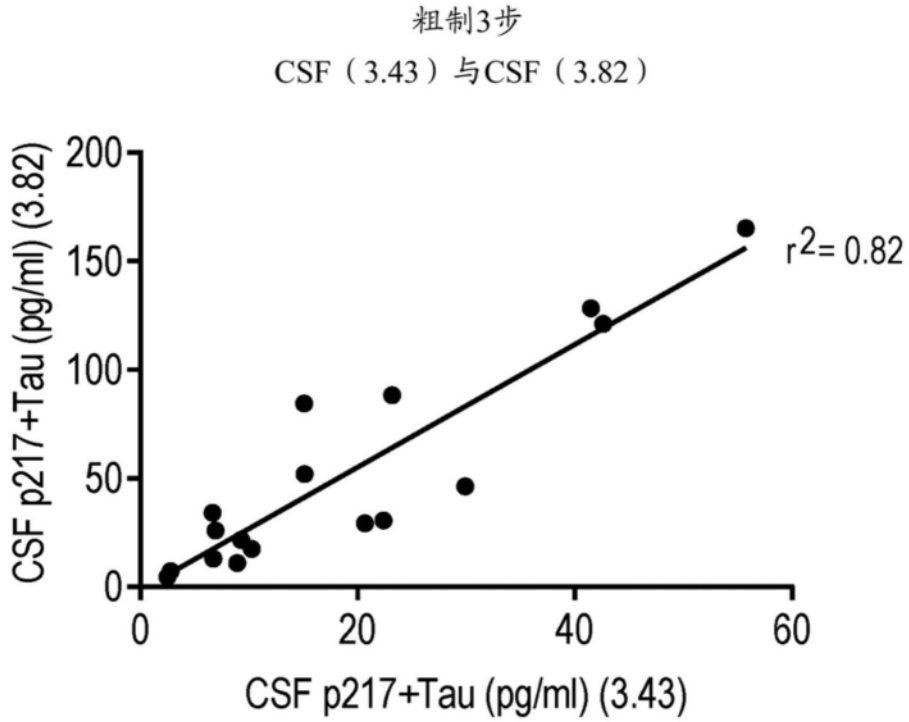


图3A

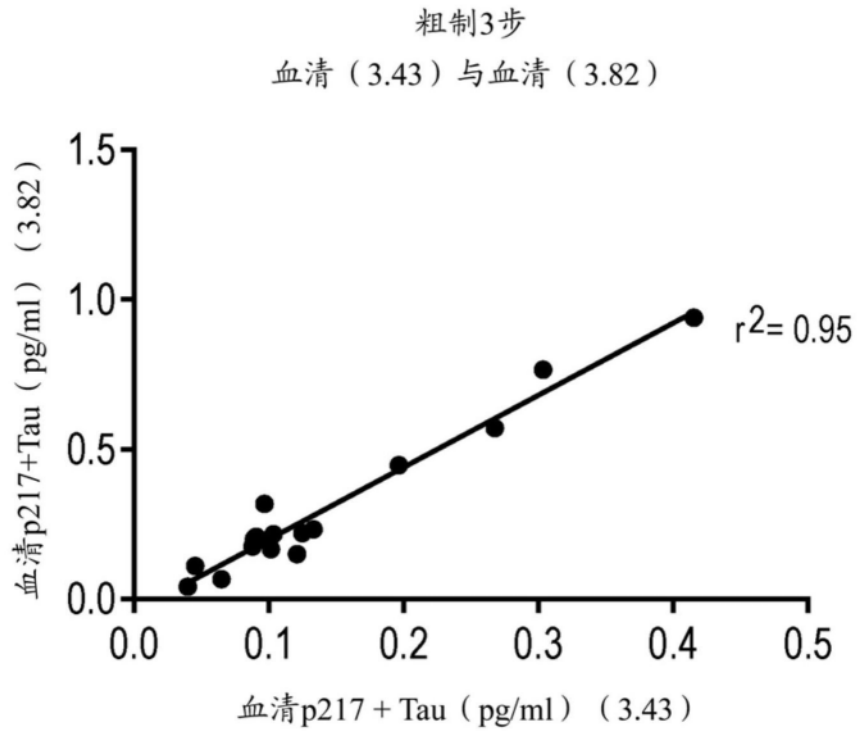


图3B

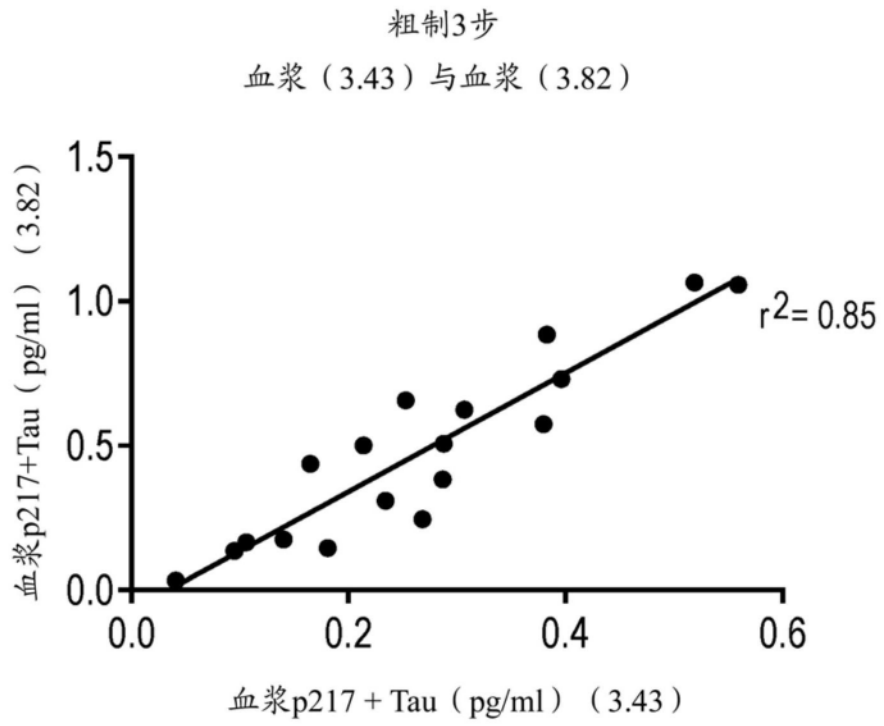


图3C

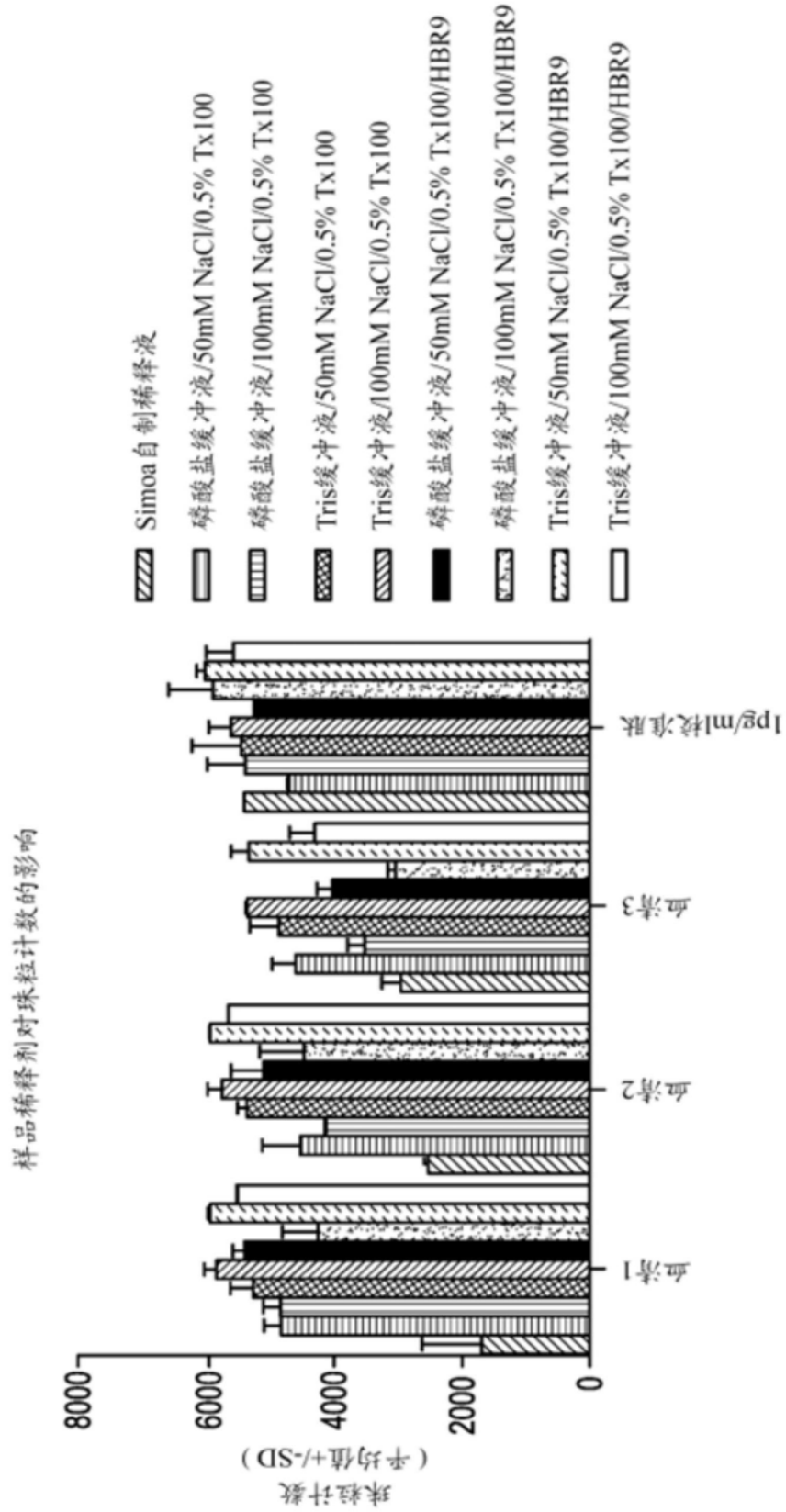


图4A

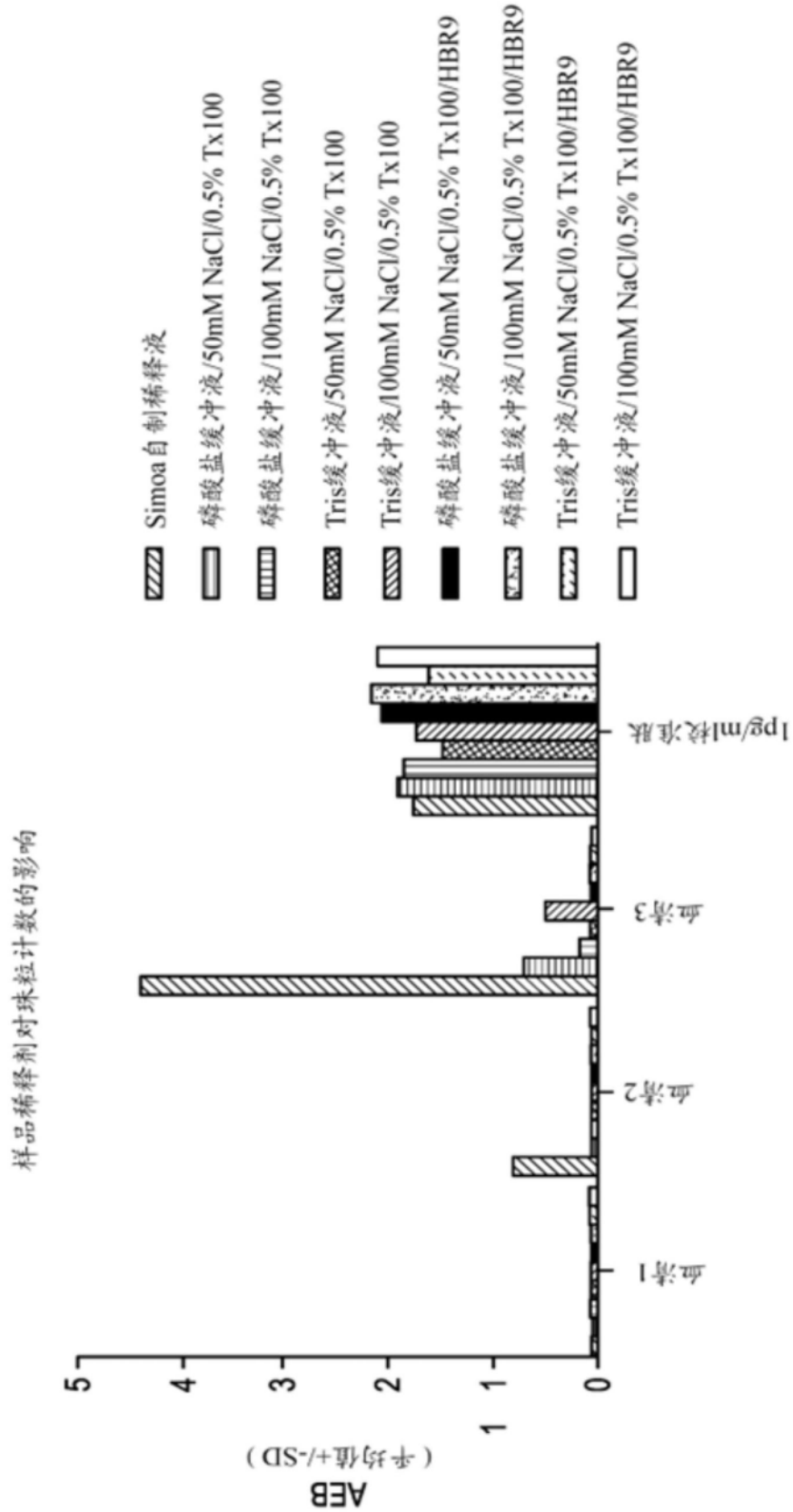


图4B

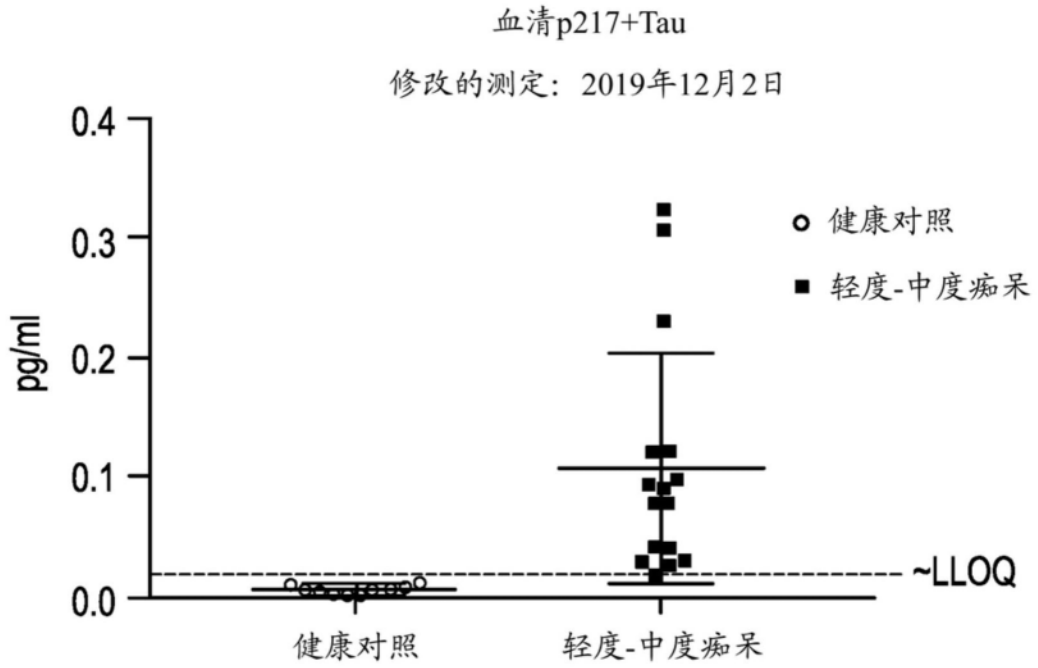


图5A

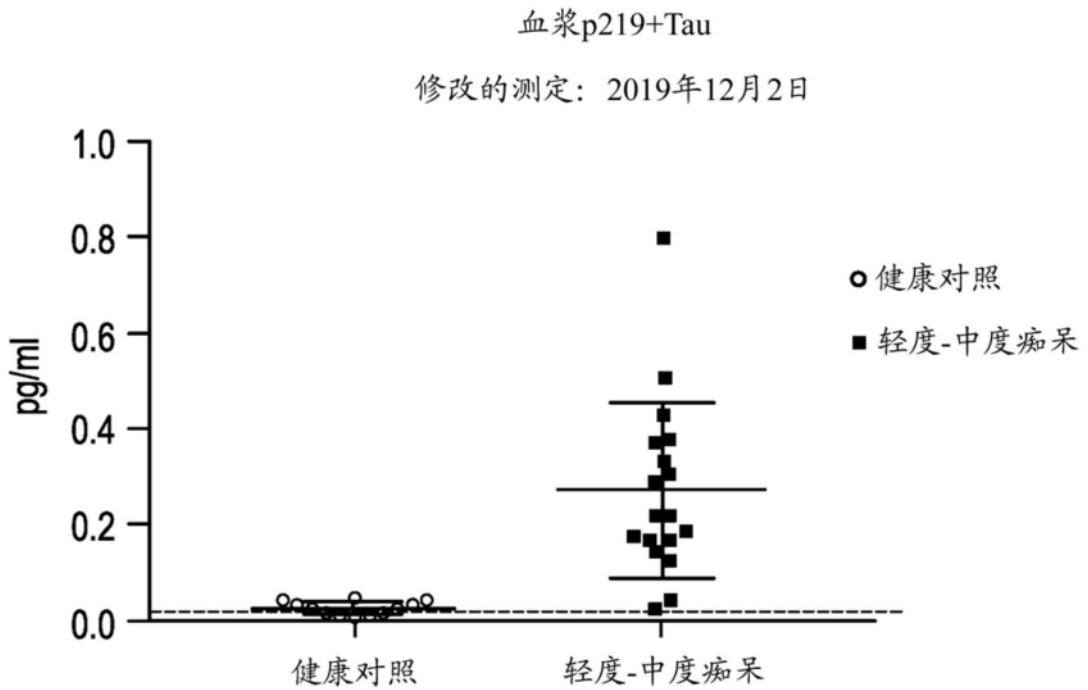


图5B

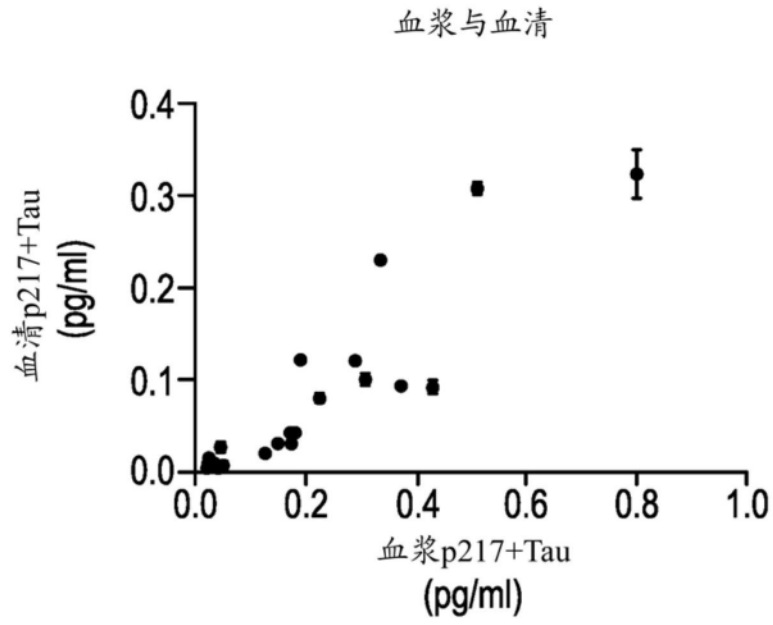


图5C

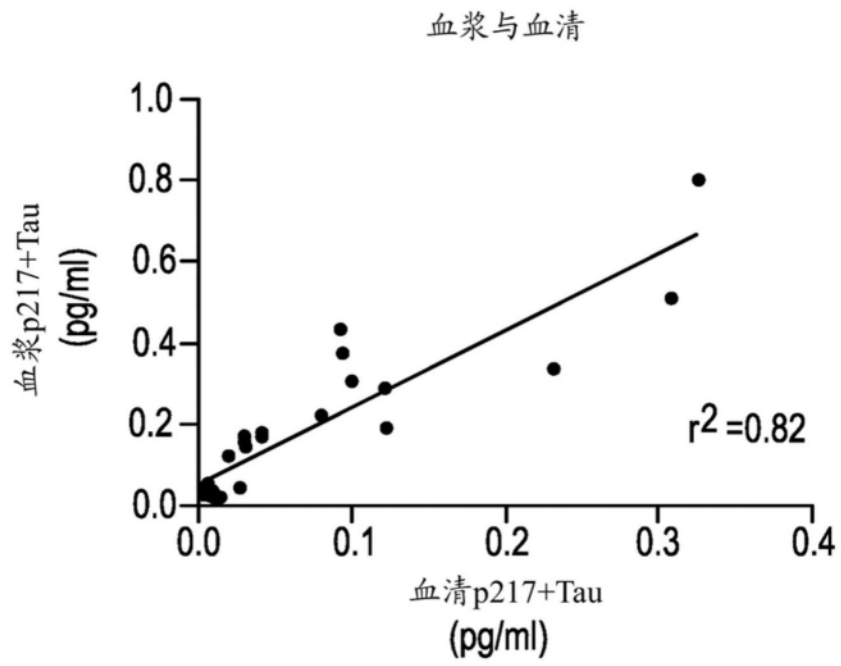


图5D

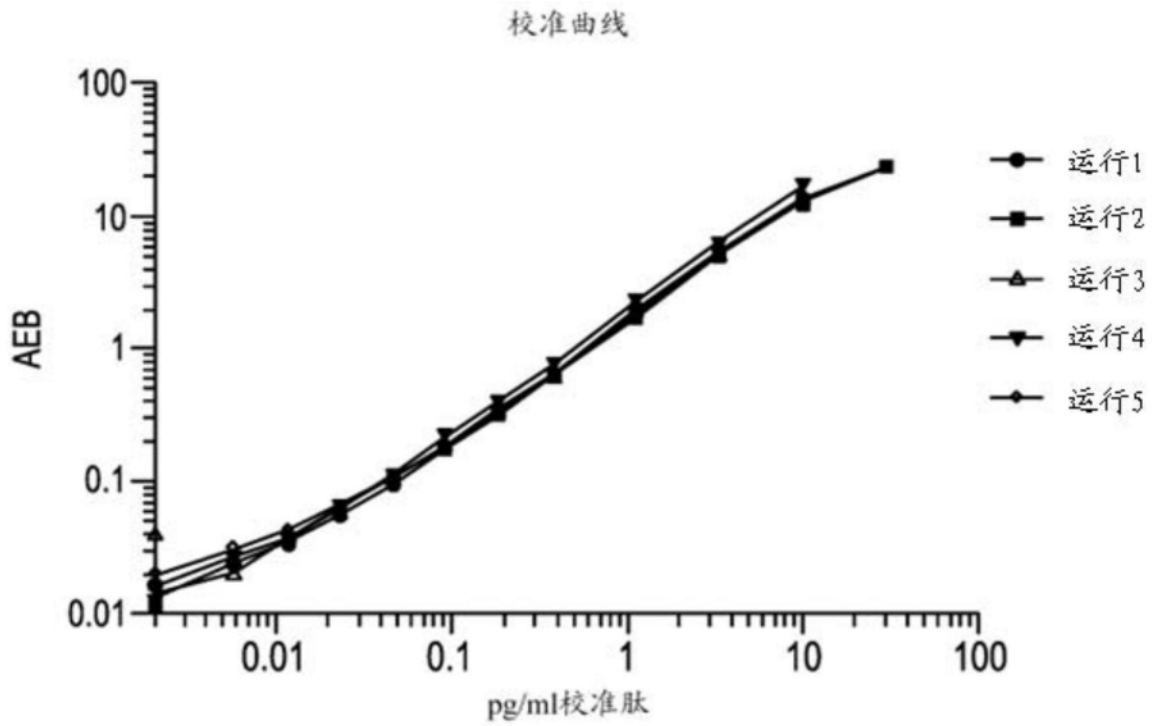


图6A

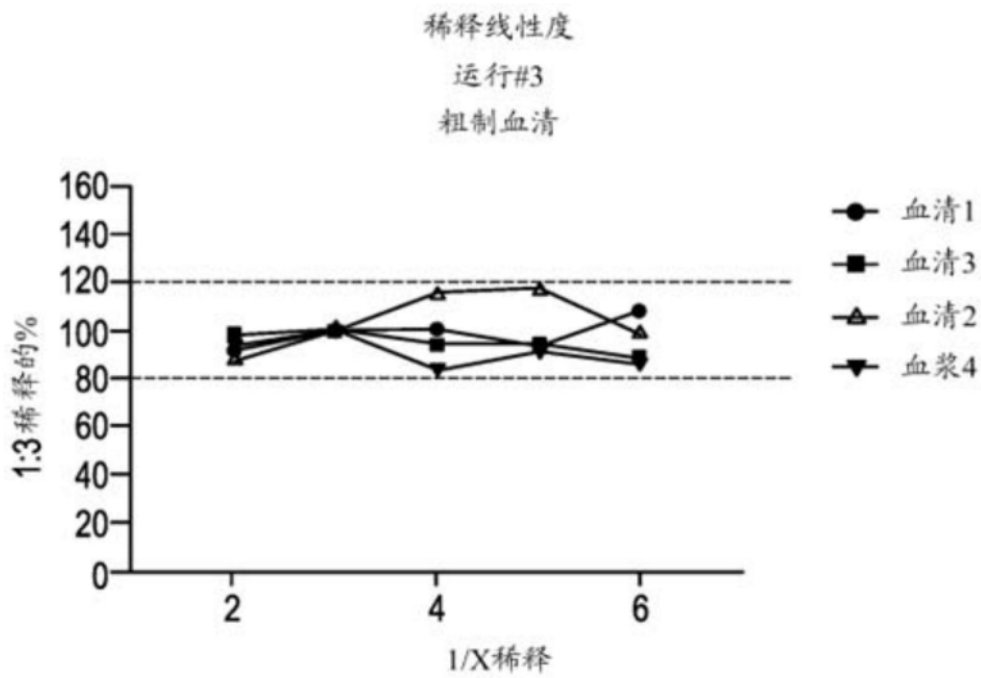


图6B

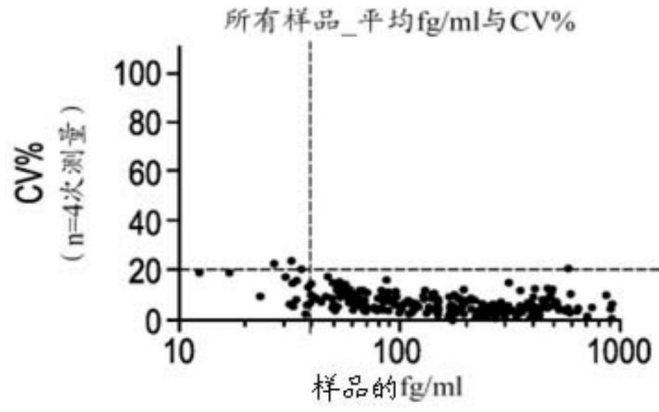


图7A

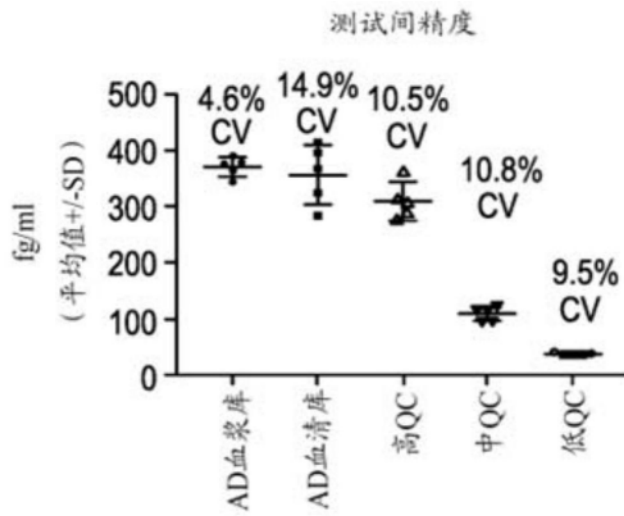


图7B

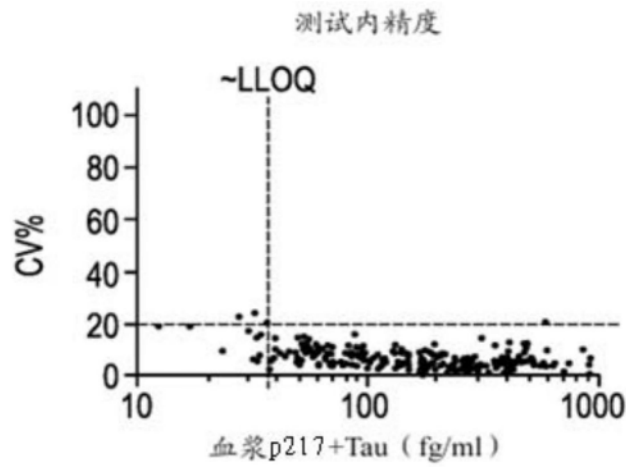


图7C

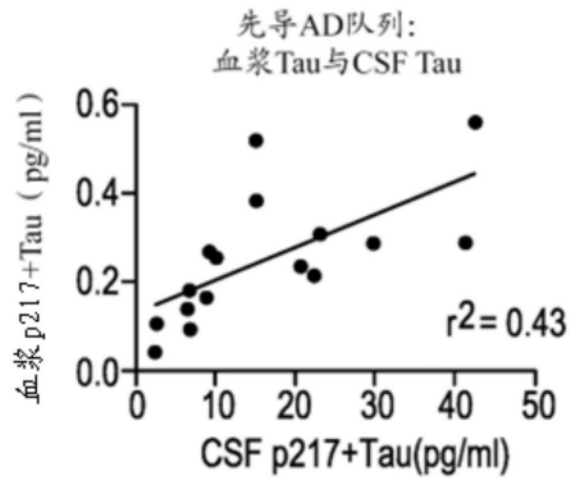


图8A

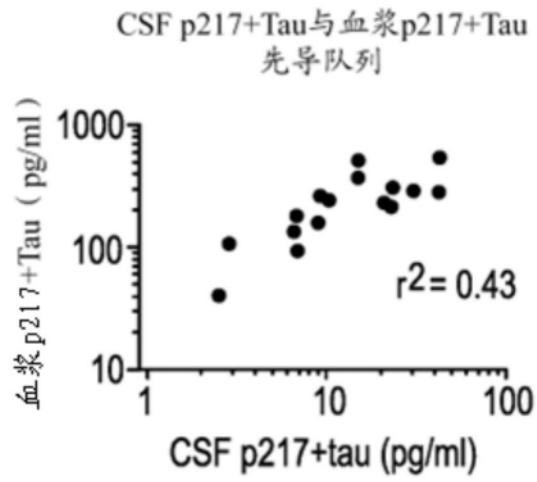


图8B

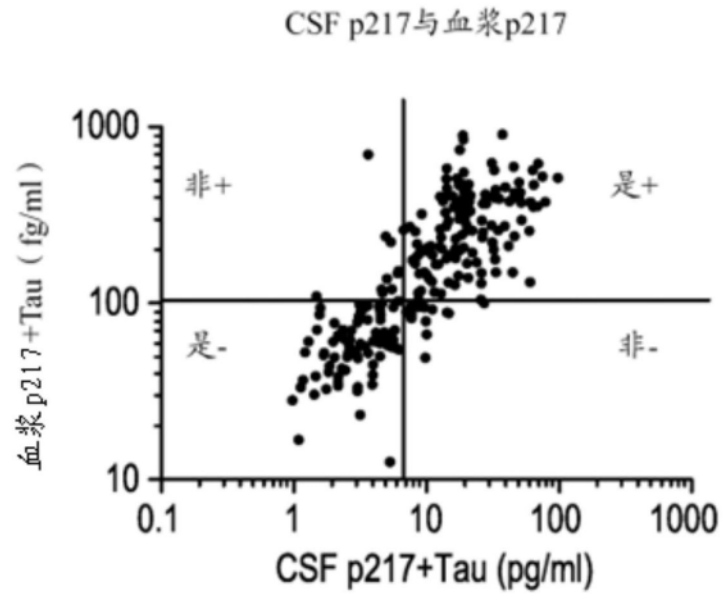


图9A

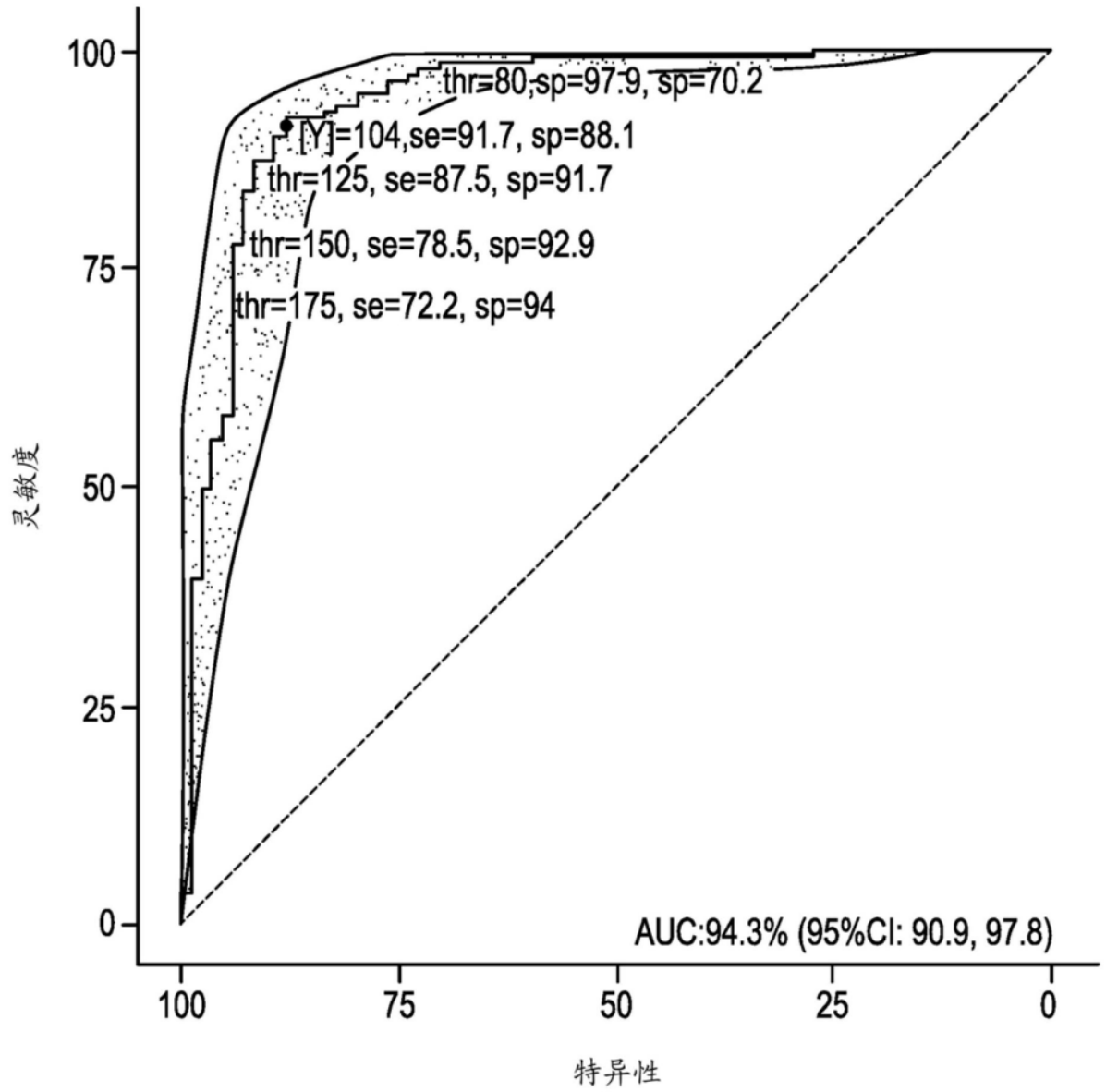


图9B

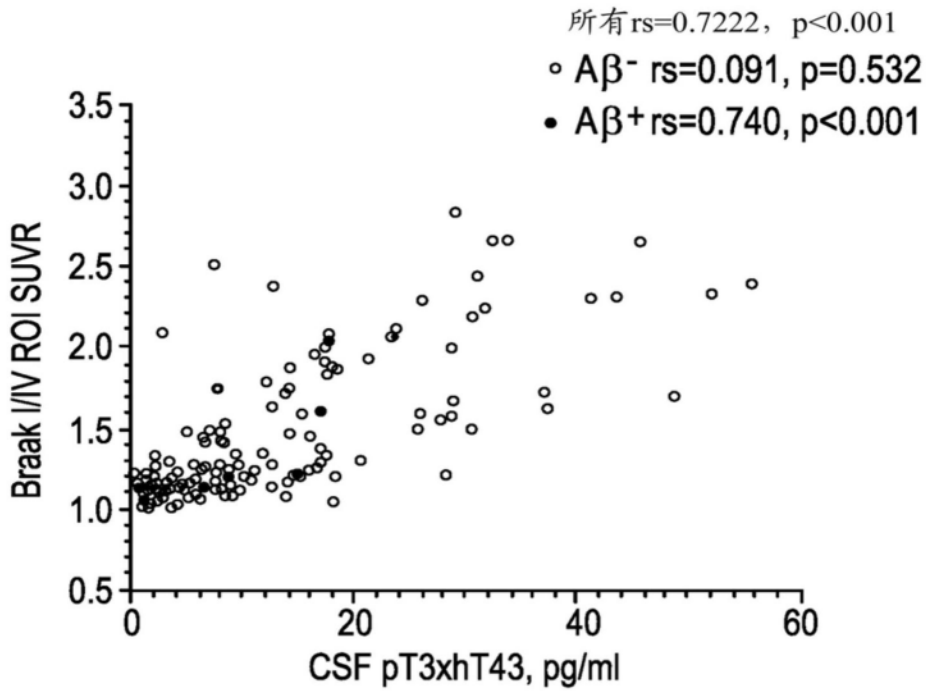


图10A

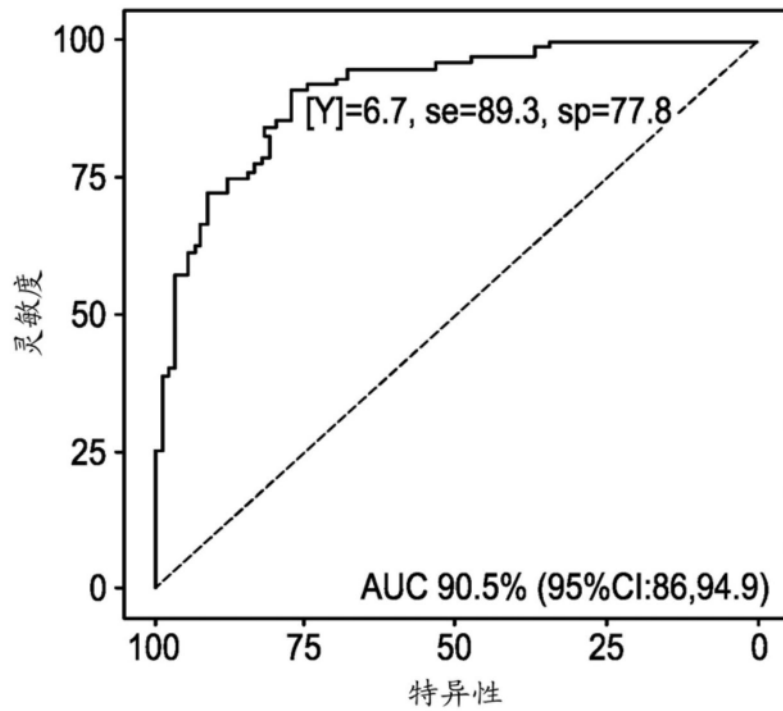


图10B

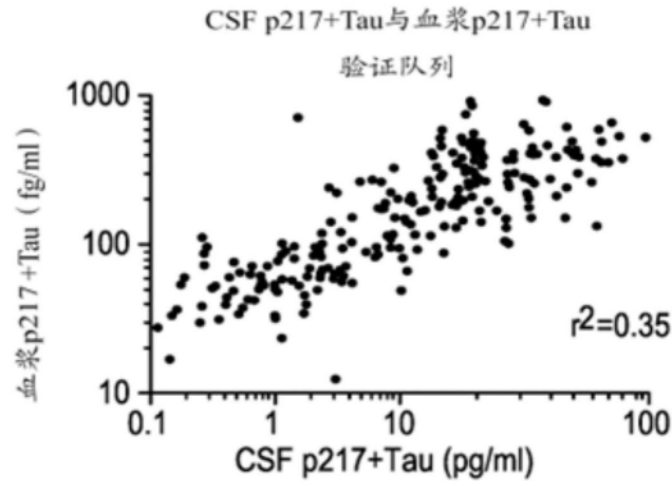


图11A

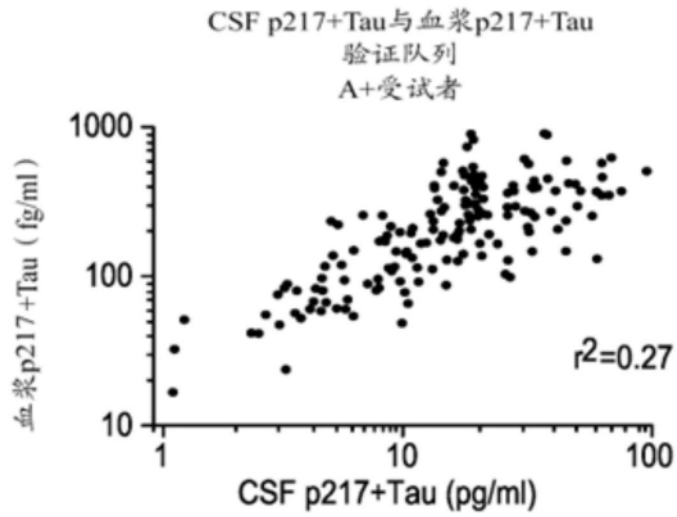


图11B

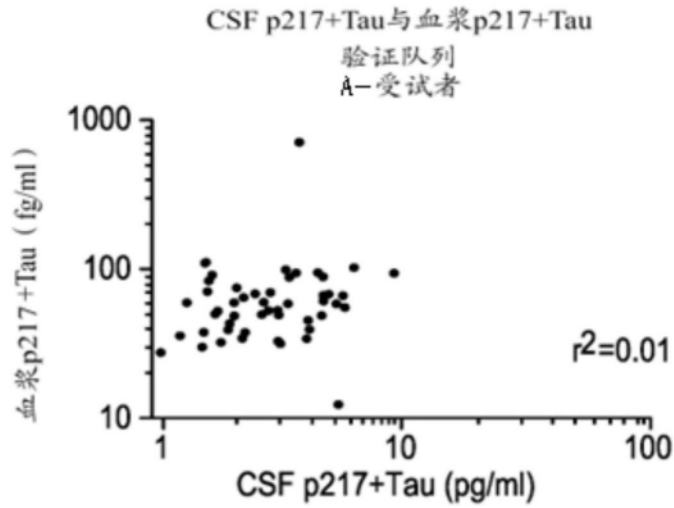


图11C

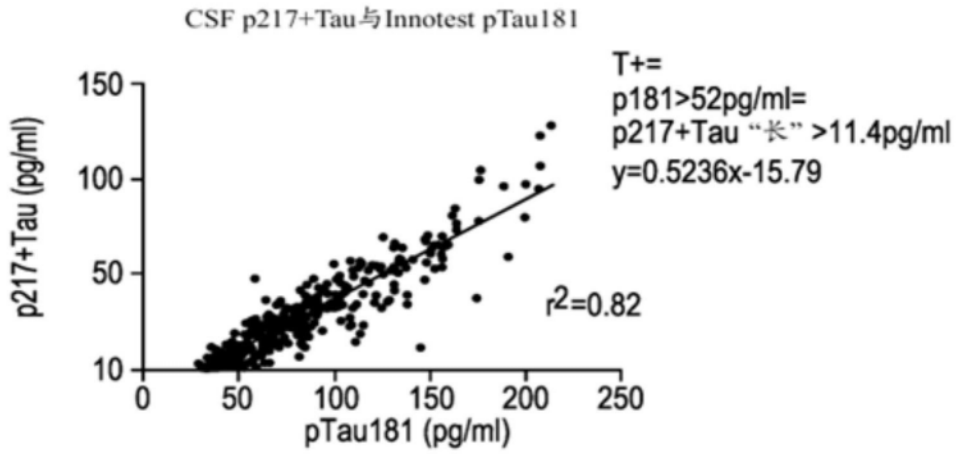


图12A

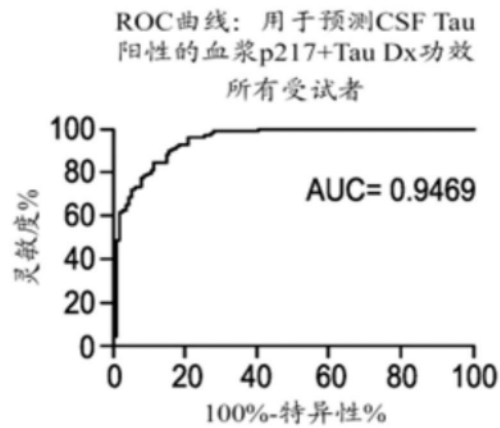


图12B

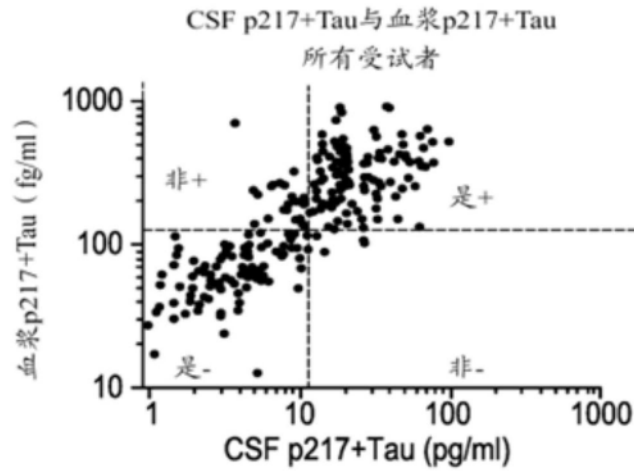


图12C

ROC曲线：用于预测CSF Tau阳性的
血浆p217+Tau Dx功效
认知正常的受试者

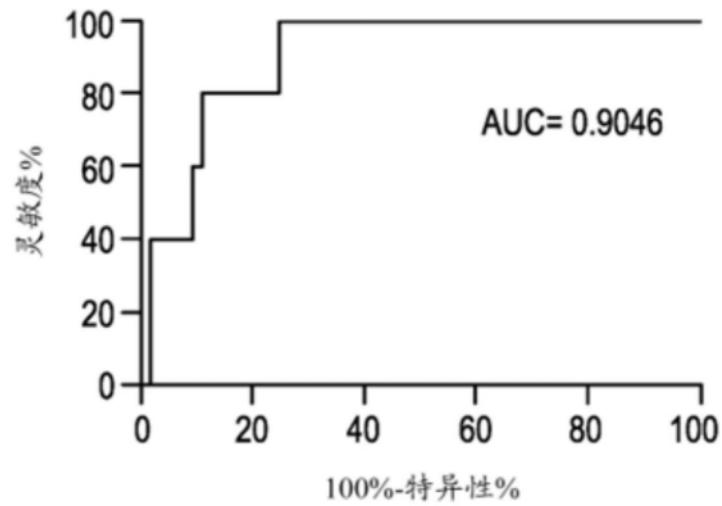


图12D

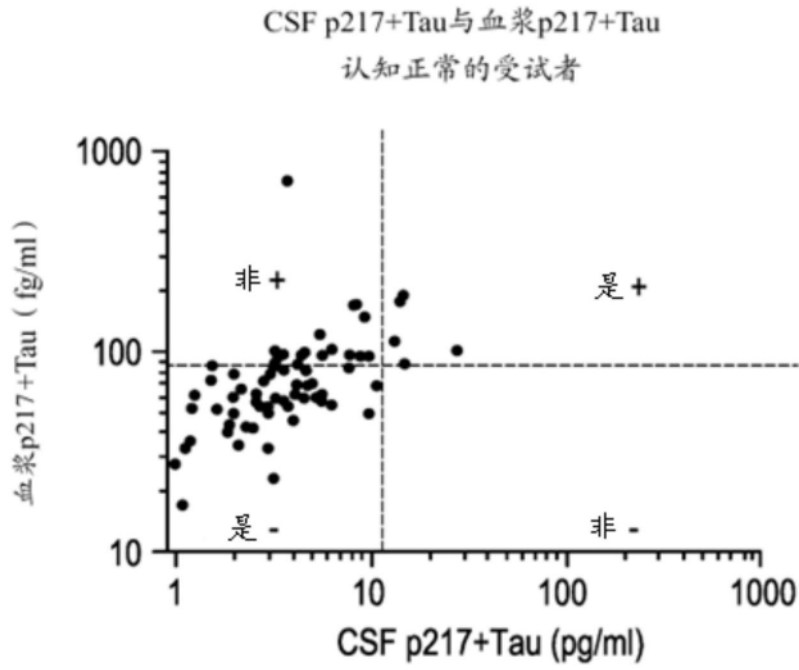


图12E

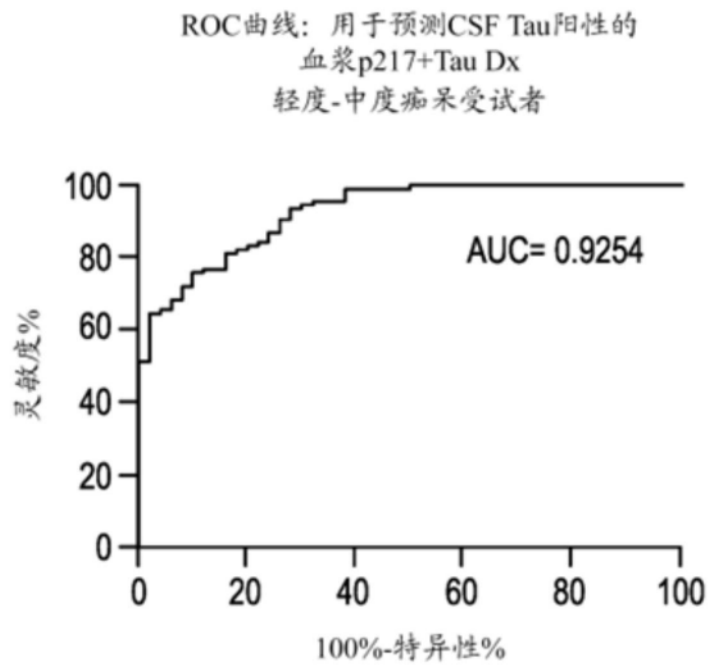


图12F

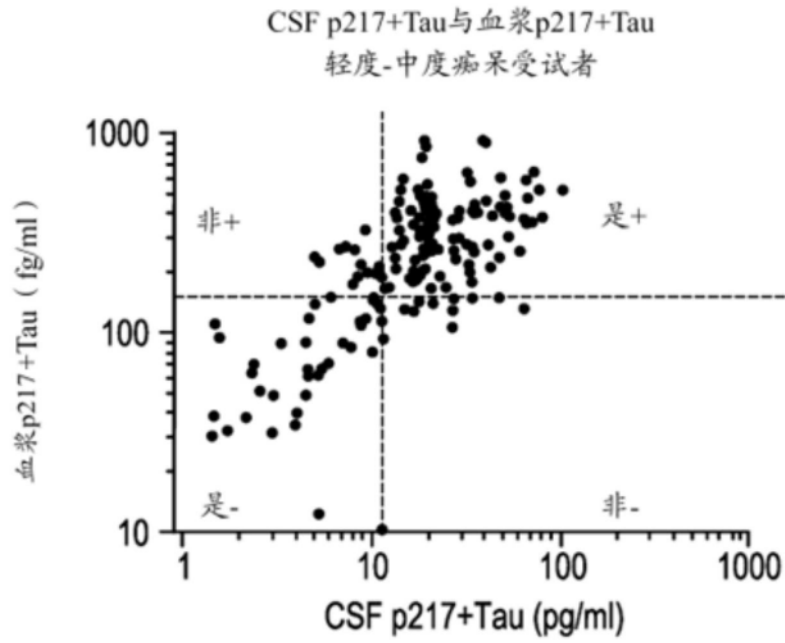


图12G

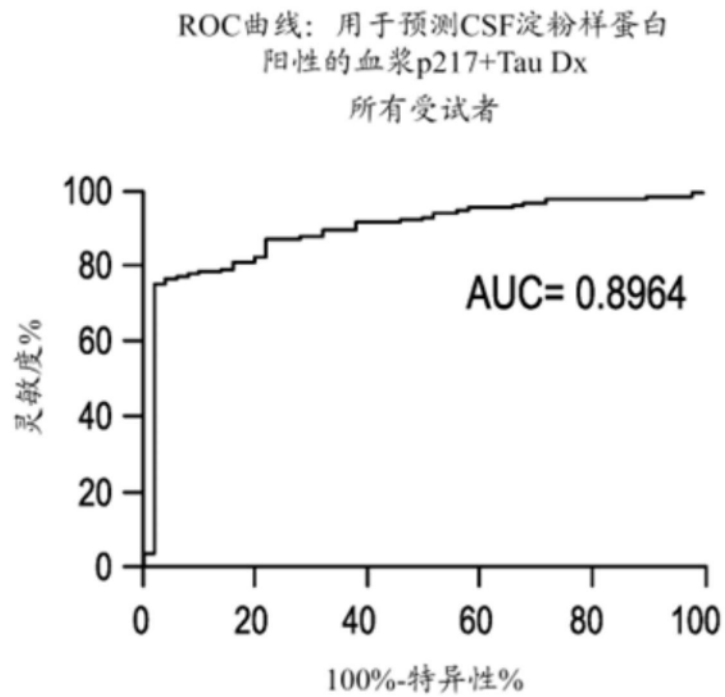


图13A

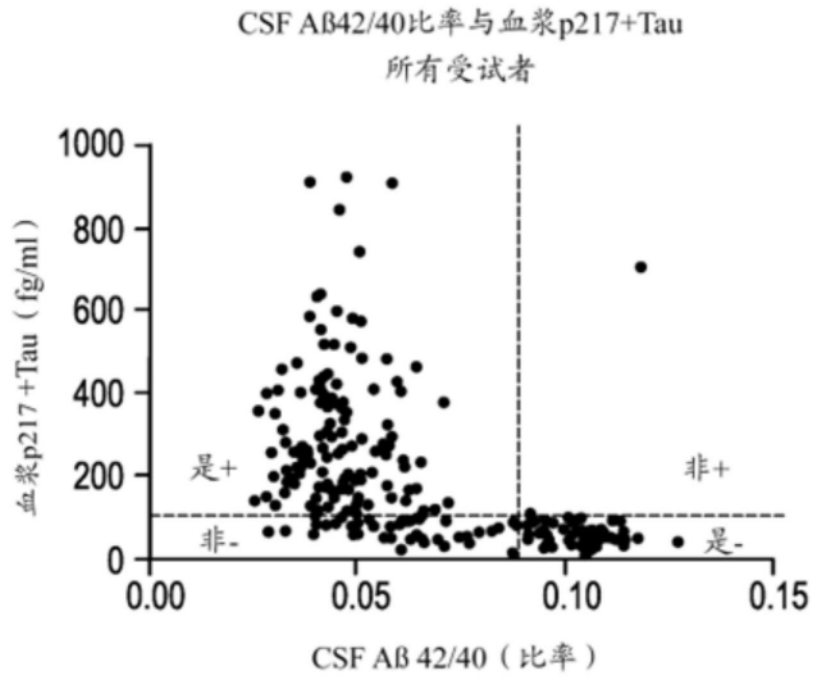


图13B

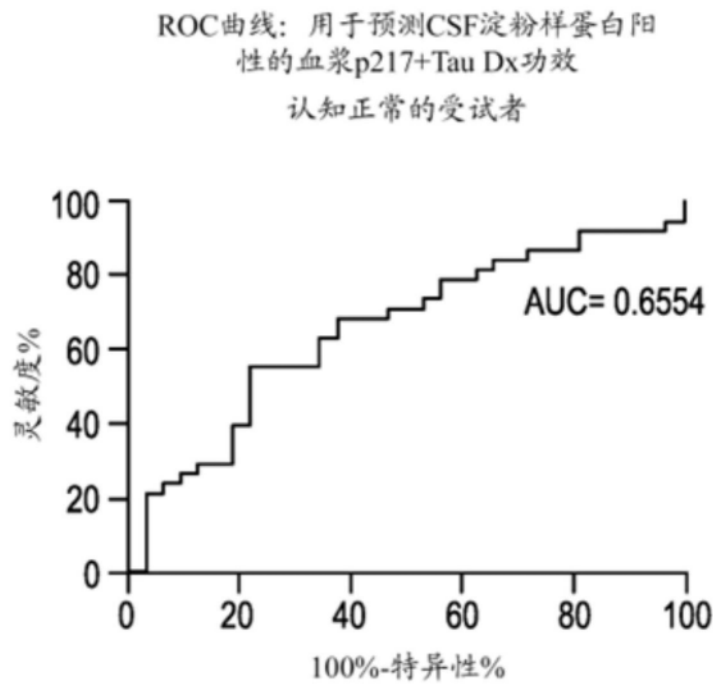


图13C

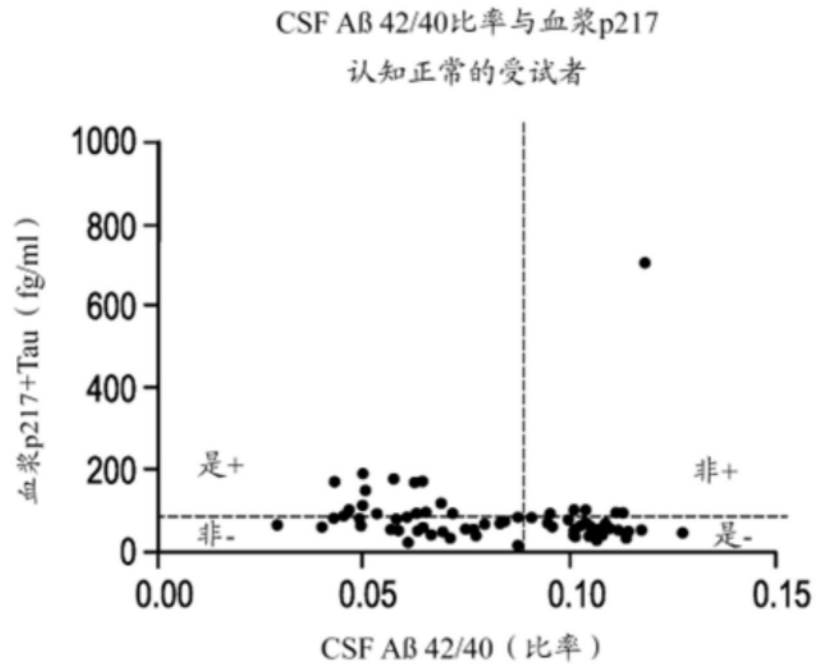


图13D

ROC曲线: 用于预测CSF淀粉样蛋白阳性的
血浆p217+Tau Dx功效
轻度-中度痴呆受试者

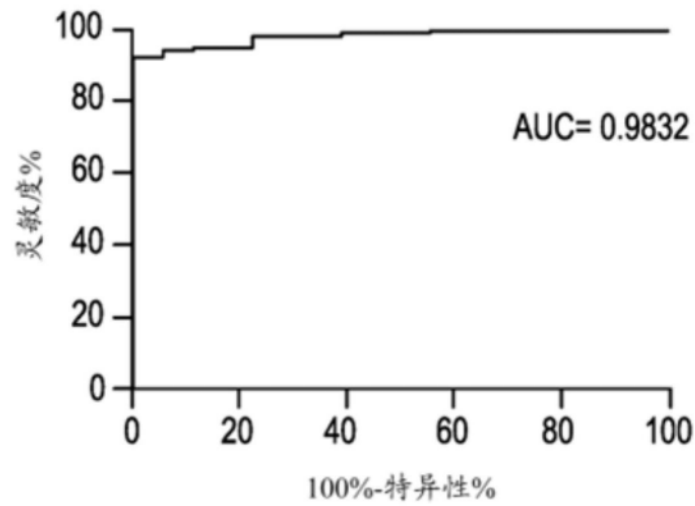


图13E

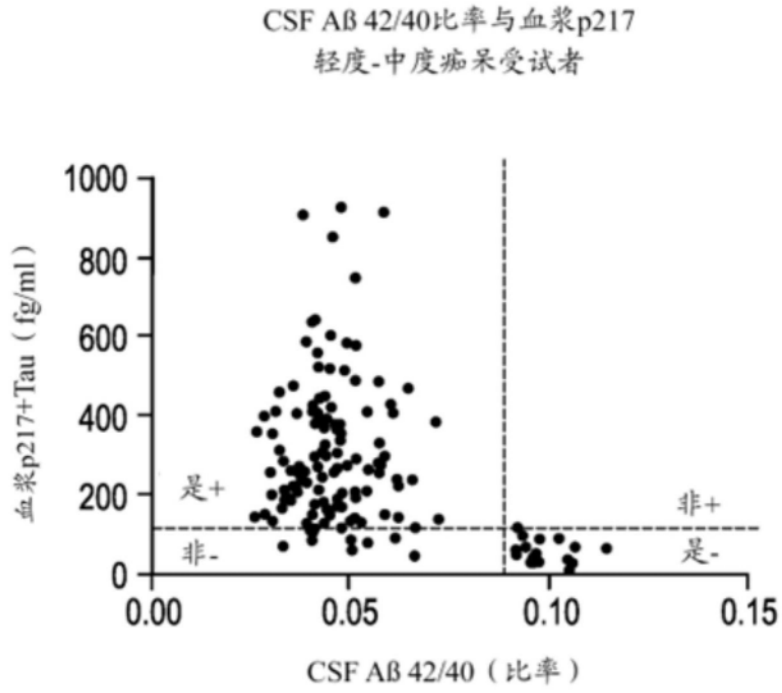


图13F

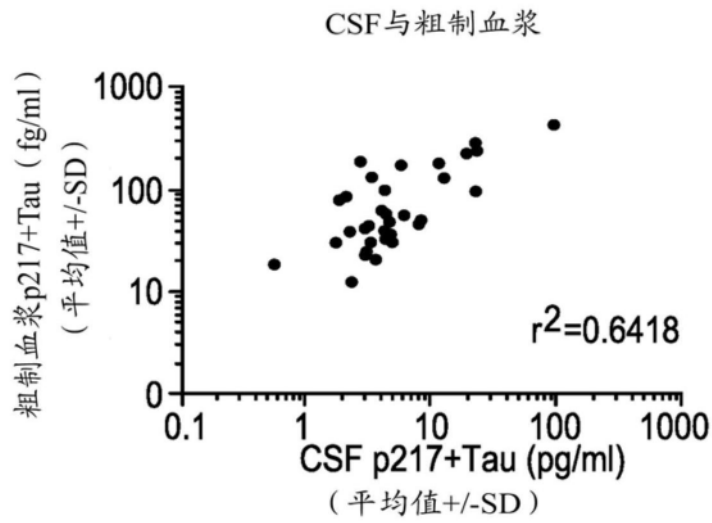


图14A

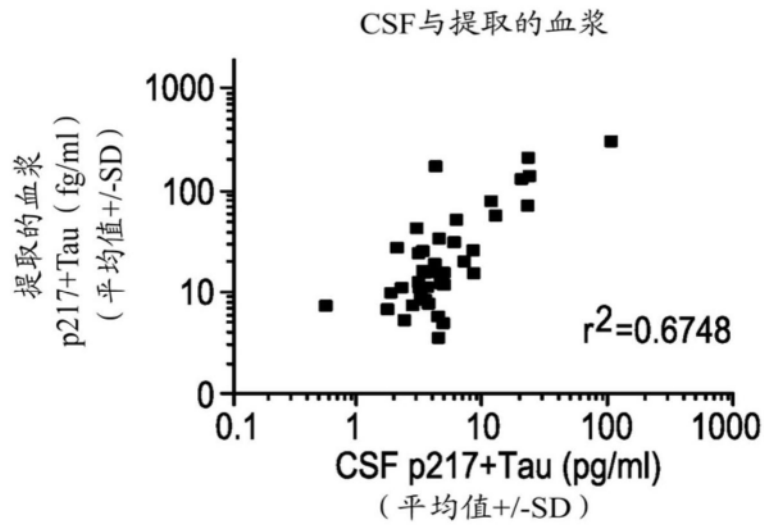


图14B

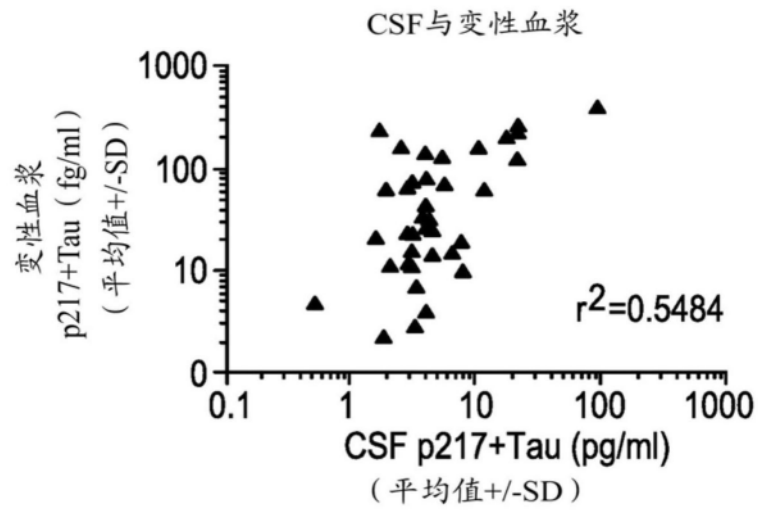


图14C

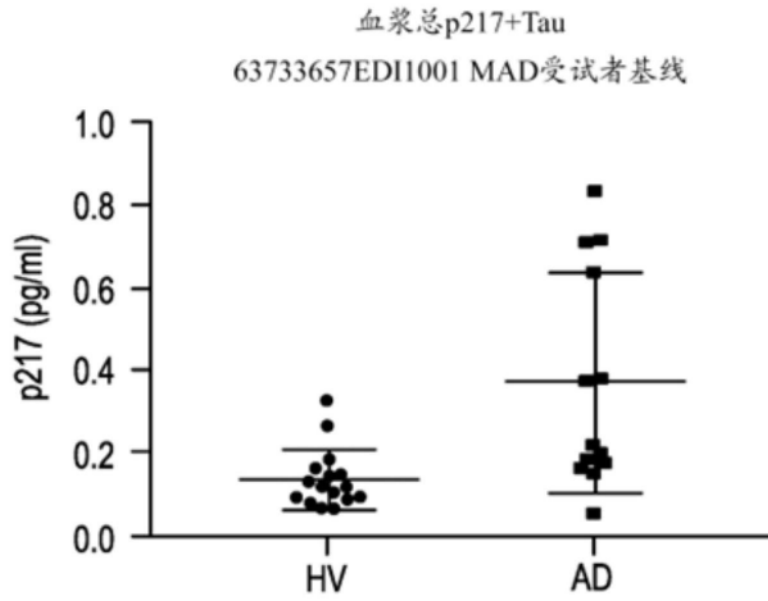


图15A

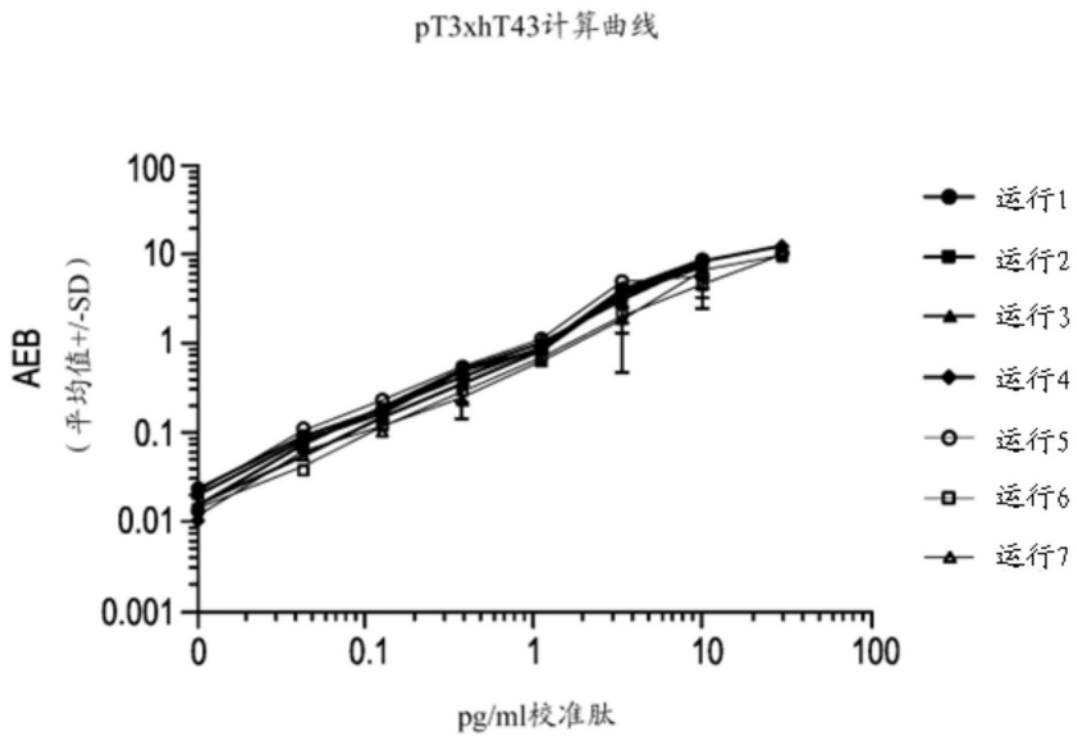


图15B

血浆总p217+Tau
精度和灵敏度

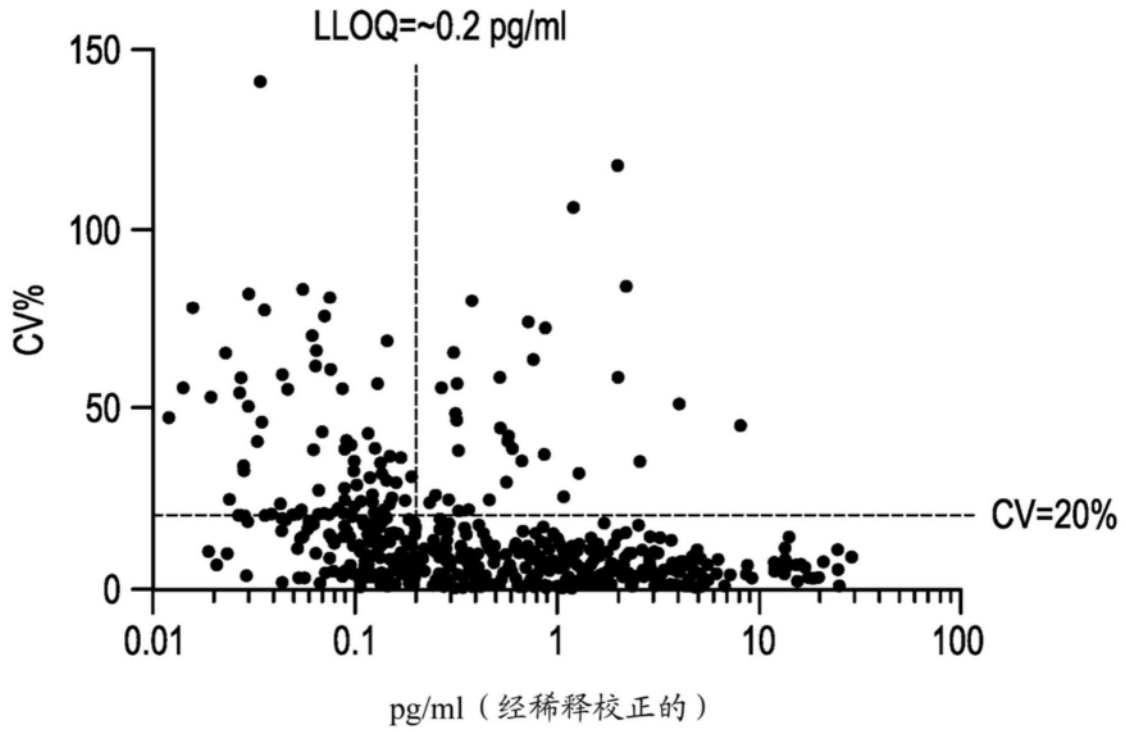


图15C

血清Tau、年龄、性别

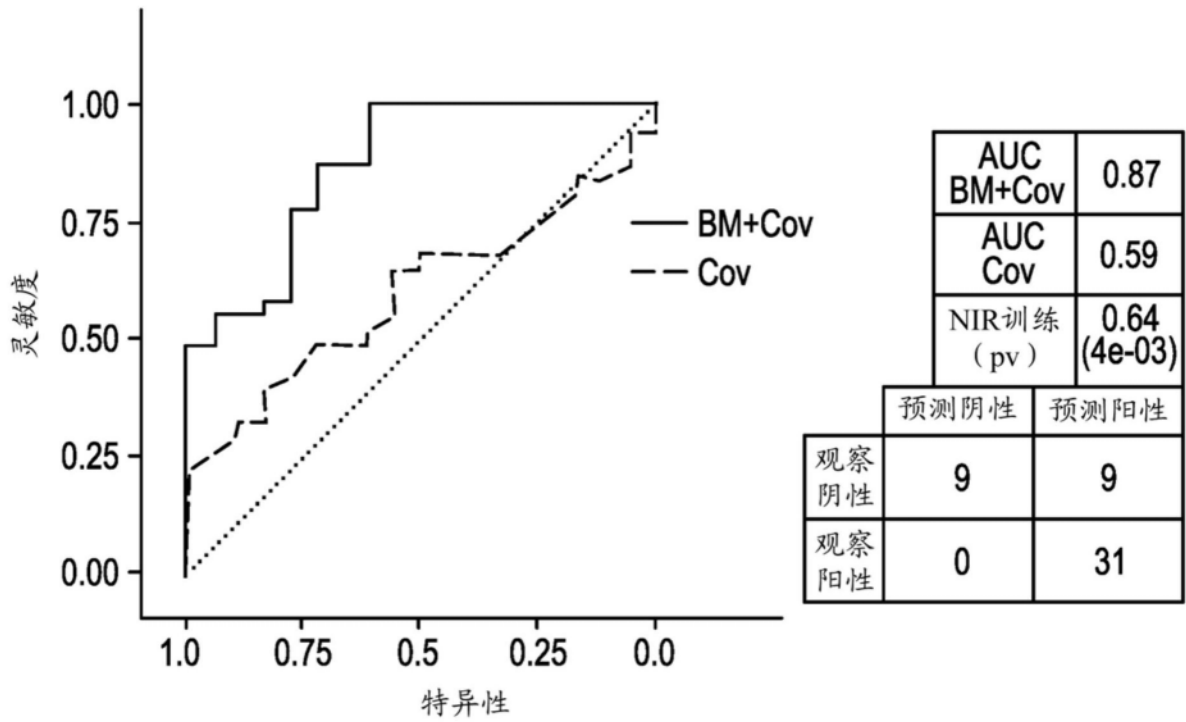


图16A

血清Tau、NFL、年龄、性别

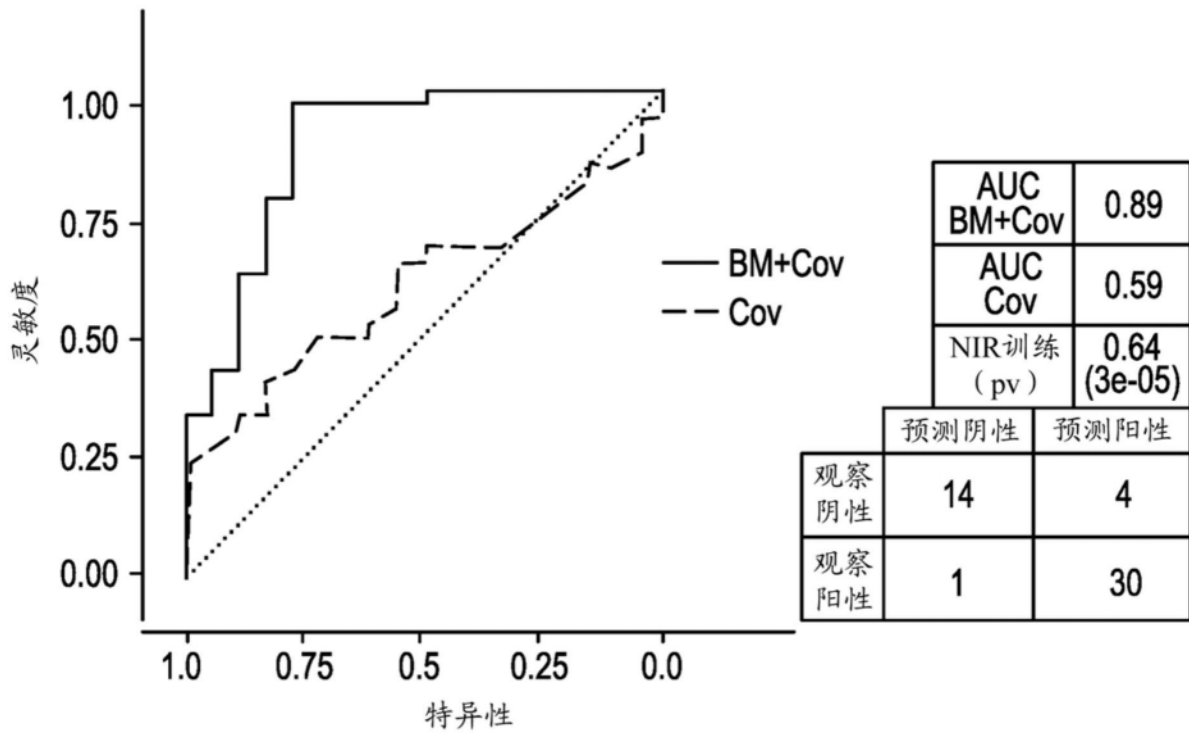


图16B

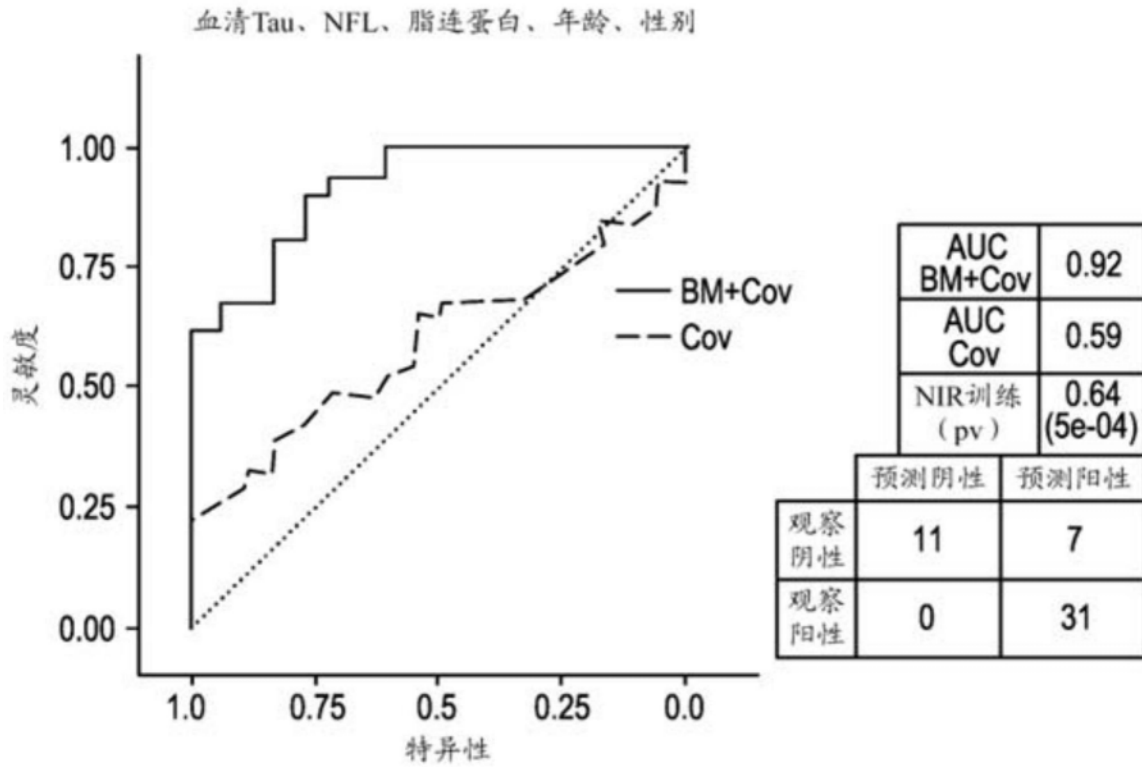


图16C

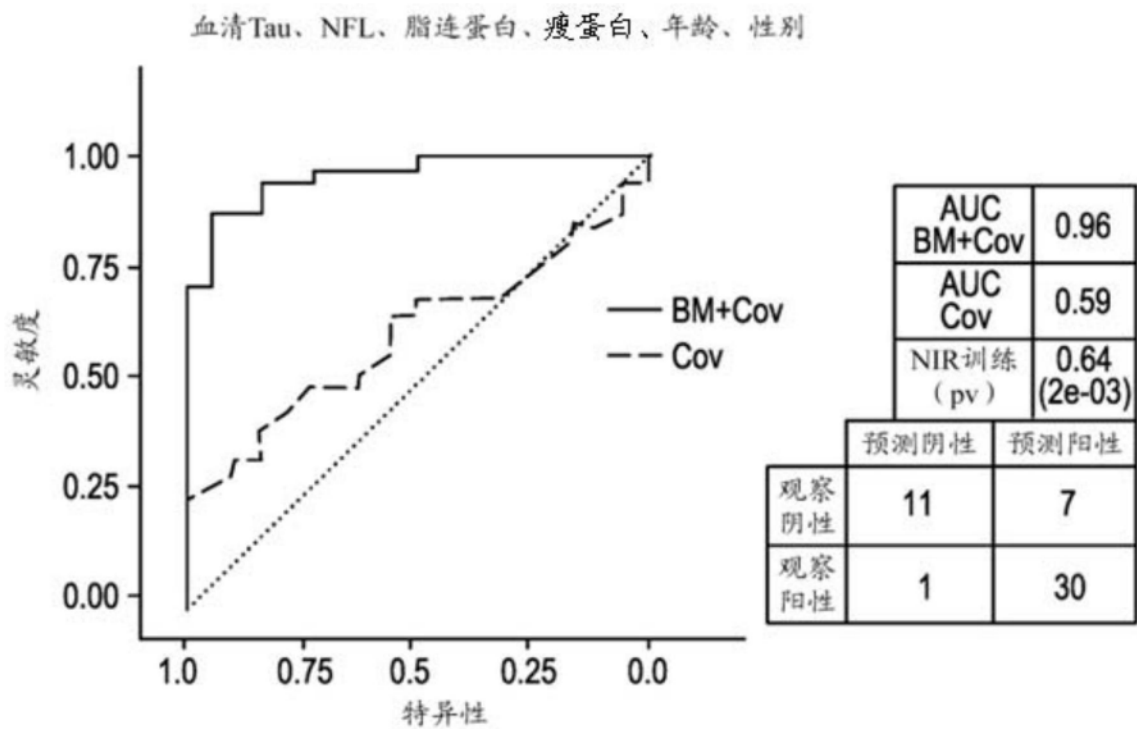


图16D

脂连蛋白、瘦蛋白、NFL、年龄、性别

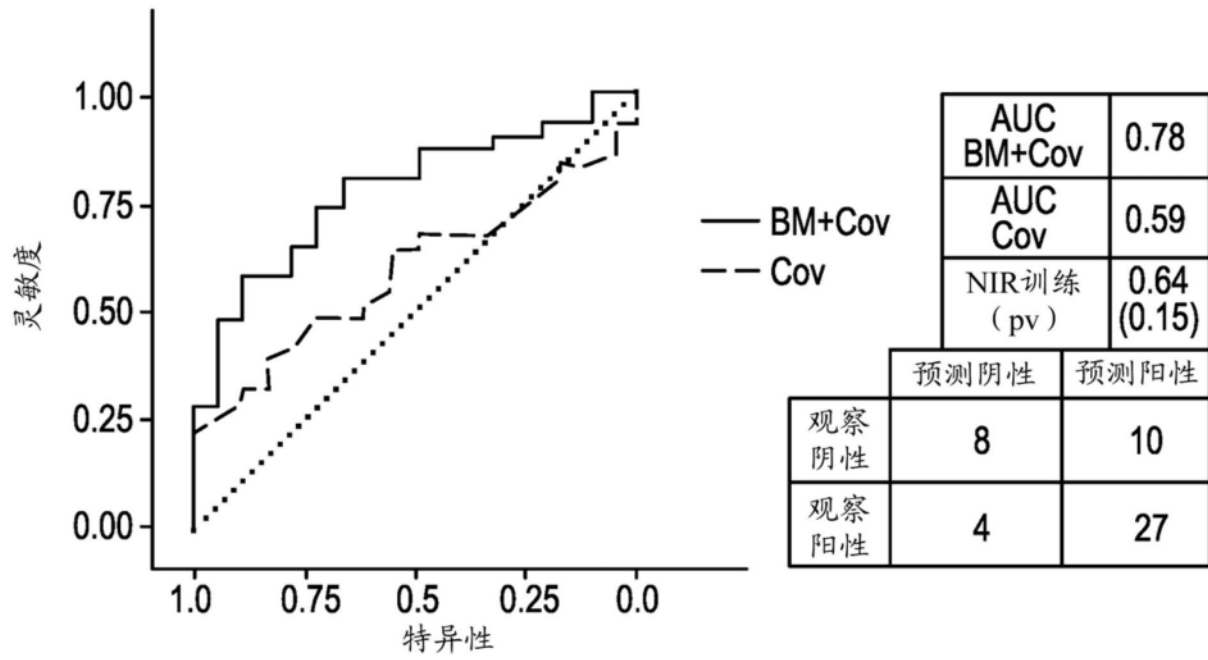


图16E