



(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 I698642 B

(45) 公告日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 11 日

(21) 申請案號：106108738

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 16 日

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

G01N33/566 (2006.01)

(30) 優先權：2016/03/16 南韓

10-2016-0031534

(71) 申請人：南韓商人民生物公司 (南韓) PEOPLEBIO, INC. (KR)

南韓

(72) 發明人：李炳燮 LEE, BYOUNG SUB (KR)；李官修 LEE, KWAN SOO (KR)；金信元 KIM, SHIN WON (KR)；林君澤 LIM, KUN TAEK (KR)；金光濟 KIM, GWANG JE (KR)；柳志宣 YU, JI SUN (KR)

(74) 代理人：陳翠華

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 36 頁

(54) 名稱

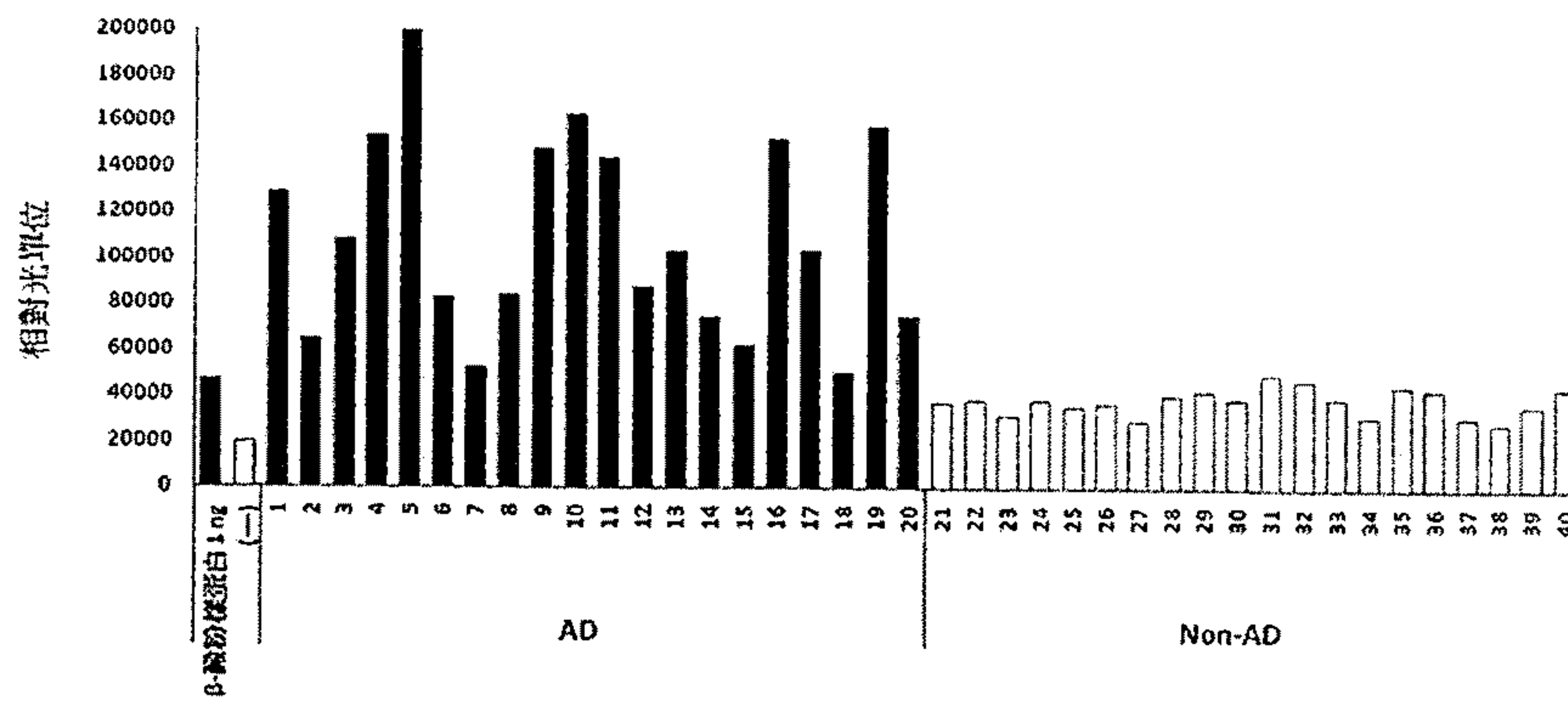
用於形成聚集體的多肽的聚集體檢測方法

(57) 摘要

本發明涉及生物樣品(biosample)的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法，上述生物樣品(biosample)的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法包括：步驟(a)，向分析物件的生物樣品摻加上述用於形成聚集體的多肽的二聚體；步驟(b)，通過培養上述步驟(a)的結果物，來還形成上述用於形成聚集體的多肽的聚集體；步驟(c)，使結合劑-標誌物與上述步驟(b)的結果物相接觸，上述結合劑-標誌物由信號產生標誌物和與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體相結合的結合劑結合而成；以及步驟(d)，對從與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號進行檢測。

指定代表圖：

磷酸鹽吐溫緩衝液：
向10 μ l的血漿添加0.25ng的 β -澱粉樣蛋白二聚物後在37 $^{\circ}$ C溫度下培養4天
-6E10/FF51辣根過氧化物酶



第 1b 圖

I698642

發明摘要

※ 申請案號：106108738

※ 申請日：106/03/16

※IPC 分類：*G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於形成聚集體的多肽的聚集體檢測方法

METHOD FOR DETECTING AGGREGATE FORM OF
AGGREGATE-FORMING POLYPEPTIDES

【中文】

本發明涉及生物樣品 (biosample) 的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法，上述生物樣品 (biosample) 的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法包括：步驟 (a)，向分析物件的生物樣品摻加上述用於形成聚集體的多肽的二聚體；步驟 (b)，通過培養上述步驟 (a) 的結果物，來還形成上述用於形成聚集體的多肽的聚集體；步驟 (c)，使結合劑-標誌物與上述步驟 (b) 的結果物相接觸，上述結合劑-標誌物由信號產生標誌物和與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體相結合的結合劑結合而成；以及步驟 (d)，對從與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號進行檢測。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1b）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於形成聚集體的多肽的聚集體檢測方法

METHOD FOR DETECTING AGGREGATE FORM OF
AGGREGATE-FORMING POLYPEPTIDES

【技術領域】

【0001】 本發明涉及生物樣品 (biosample) 的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法或試劑盒。

【先前技術】

【0002】 首先，還存在構成蛋白質的多肽形成多聚體 (multimer)，來形成功能性蛋白質的情況，但是在正常狀態下，以單體存在，若處於非正常的狀態 (例如，轉換為錯配型 (mismatched type))，則通過形成多聚體，來凝聚而誘發疾病的情況多 (Massimo Stefani, et al., J. Mol. Med. 81:678-699(2003); and Radford SE, et al., Cell. 97:291-298(1999))。

【0003】 例如，與蛋白質的非正常的凝聚或錯配相關的疾患或疾病包含：阿爾茨海默病 (Alzheimer disease)、克羅伊茨費爾特-雅各病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、海綿狀腦病 (Spongiform encephalopathies)、帕金森病 (Parkinson's disease)、亨廷頓病 (Huntington's Disease)、肌萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis)、絲氨酸蛋白酶抑制劑缺乏症 (Serpin deficiency)、肺氣腫 (emphysema)、肝硬化 (cirrhosis)、II型糖尿病、一次性全身性澱粉樣變病 (amyloidosis)、二次性全身性澱粉樣變病、額顳癡呆 (Fronto-temporal dementias)、老年人澱粉樣變病、家族性澱粉樣

多發性神經病 (familial amyloid polyneuropathy)、遺傳性澱粉樣腦血管病 (hereditary cerebral amyloid angiopathy) 及血液透析相關澱粉樣變病。

【0004】 在對是否存在這種疾患或疾病或進行程度進行測定中，由於抗原的量在試樣中非常少或抗原的大小非常小，難以進行測定或在體內的抗原的量和試樣中的抗原的量不成比例的情況下，例如，眾所周知，與正常人相比，參與阿爾茨海默病的 β -澱粉樣蛋白 (β -澱粉樣蛋白，amyloid- β) 也在非正常人中 β -澱粉樣蛋白低聚物的水準高，但是當難以檢測血液試樣內 β -澱粉樣蛋白低聚物量或在血液試樣內以非定型的方式存在 β -澱粉樣蛋白低聚物時，有可能難以進行診斷。

【0005】 並且，還存在由於所要測定的抗原過小或量少，因此很難通過三明治法酶聯免疫吸附試驗 (sandwich ELISA) 診斷疾病的情況。

【0006】 對此，本發明人認識到對患者和正常人之間的診斷信號的差異 (differentiation) 進行最大化的用於形成聚集體的多肽的聚集體檢測方法的開發必要性。

【0007】 本說明書全文中，參照了多篇論文及專利文獻，並表示了其引用。所引用的論文及專利文獻的公開內容全部插入於本說明書作為參照，從而更加明確說明本發明所屬的技術領域的水準及本發明的內容。

【發明內容】

【0008】 發明所欲解決之問題

【0009】 在上述背景下，本發明人為了開發檢測用於形成聚集體的多肽的聚集體的新型方法，進行了廣泛的研究，其結果，利用抑制多肽的聚集體形成的防禦系統 (清除系統 (clearingsystem)) 的差異，開發了對患者

和正常人之間的診斷信號的差異 (differentiation) 進行最大化的用於形成聚集體的多肽的聚集體檢測方法。

【0010】 因此，本發明的目的在於，提供生物樣品 (biosample) 的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法。

【0011】 本發明的再一目的在於，提供用於檢測生物樣品的用於形成聚集體的多肽的聚集體的試劑盒。

【0012】 根據以下發明的詳細說明、發明要求保護範圍及附圖更加明確本發明的其他目的及優點。

【0013】 解決問題之技術手段

【0014】 根據本發明的一實施方式，提供生物樣品 (biosample) 的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法，包括：步驟 (a)，向分析物件的生物樣品摻加上述用於形成聚集體的多肽的二聚體；步驟 (b)，通過培養上述步驟 (a) 的結果物，來進一步形成上述用於形成聚集體的多肽的聚集體；步驟 (c)，使結合劑-標誌物與上述步驟 (b) 的結果物相接觸，上述結合劑-標誌物由信號產生標誌物和與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體相結合的結合劑結合而成；以及步驟 (d)，對從與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號進行檢測，其中，進行充分時間的上述步驟 (b) 的培養，使得所摻加的上述用於形成聚集體的多肽的二聚體可借助上述生物樣品進行多聚體化。

【0015】 本發明涉及利用抑制多肽的聚集體形成的防禦系統(清除系統 (clearingsystem)) 的差異，來對患者和正常人之間的診斷信號的差異 (differentiation) 進行最大化的用於形成聚集體的多肽的聚集體檢測方法。

【0016】 在本說明書中，術語 “用於形成聚集體的多肽”是指可形成多聚體（低聚物型）或可形成基於與單體的疏水性相互作用的聚集體的多肽。尤其，下述結構變化會誘發多種疾病。例如，包含阿爾茨海默病、克羅伊茨費爾特-雅各病、海綿狀腦病、帕金森病、亨廷頓病、肌萎縮性側索硬化症、絲氨酸蛋白酶抑制劑缺乏症、肺氣腫、肝硬化、II型糖尿病、一次性全身性澱粉樣變病、二次性全身性澱粉樣變病、額顳癡呆、老年人澱粉樣變病、家族性澱粉樣多發性神經病、遺傳性澱粉樣腦血管病及血液透析相關澱粉樣變病。

【0017】 通常，上述用於形成聚集體的多肽的非-聚集體為正常，凝膠型誘發疾病，尤其，誘發如阿爾茨海默病、克羅伊茨費爾特-雅各病或帕金森病等神經退行性疾病。

【0018】 根據本發明的一實例，進行上述摻加的用於形成聚集體的多肽的二聚體的多聚體化的上述生物樣品為具有上述用於形成聚集體的多肽的多聚體參與的疾病的人類的生物樣品，更優選地，可借助上述生物樣品進行多聚體化的充分的培養時間為如下充分的時間：使利用具有用於形成聚集體的多肽的多聚體參與的疾病的人類的生物樣品來產生的信號比利用正常人類的生物樣品來產生的信號大1.3~20倍。

【0019】 以下，對用於檢測生物樣品的用於形成聚集體的多肽的聚集體的本發明的方法按步驟進行詳細說明如下：

【0020】 步驟（a）進行摻加（spiking）

【0021】 首先，本發明的方法包括向分析物件的生物樣品摻加上述用於形成聚集體的多肽的二聚體的步驟。

【0022】 在本說明書中，術語“生物樣品 (biosample)”是指所要進行分析的有機體-來源試樣。上述生物樣品是指可根據生物源的細胞、組織、或生物體液或可根據本發明進行分析的其他介質 (medium)，它們包含從人類採集的試樣、用於人類或動物的食品採集的試樣。優選地，分析物件的生物樣品為包含血液、血清、血漿、淋巴液、牛奶、小便、大便、眼淚、唾液、精液、腦提取物 (例如，腦部均質液)、脊髓液 (SCF)、闌尾、脾臟及扁桃體組織提取物的體內流體試樣。更優選地，上述生物樣品為血液，最優選地，是血漿。

【0023】 根據本發明的再一實例，上述用於形成聚集體的多肽包含： β -澱粉樣蛋白肽 ($A\beta$ peptide) 和tau蛋白質，參與阿爾茨海默病；朊病毒蛋白 (prion)，參與克羅伊茨費爾特-雅各病及海綿狀腦病； α -突觸核蛋白 (α -synuclein)，參與帕金森病；免疫球蛋白 (Ig) 輕鏈，參與一次性全身性澱粉樣變病的；血清澱粉樣蛋白A，參與二次性全身性澱粉樣變病；tau蛋白質，參與額顳癡呆；甲狀腺素視黃質運載蛋白 (transthyretin)，參與家族性澱粉樣多發性神經病； β 2-微球蛋白 (β 2-microglobulin)，參與血液透析相關澱粉樣變病；亨廷頓蛋白 (huntingtin)，參與亨廷頓病；超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase)，參與肌萎縮性側索硬化症；絲氨酸蛋白酶抑制劑，參與絲氨酸蛋白酶抑制劑缺乏症、肺氣腫及肝硬化；以及胰澱素 (amylin)，參與II型糖尿病。更優選地，上述用於形成聚集體的多肽為參與阿爾茨海默病的 β -澱粉樣蛋白肽或tau蛋白質或者參與帕金森病的 α -突觸核蛋白，最優選地，是 β -澱粉樣蛋白肽。

【0024】 在本說明書中，術語“摻加 (spiking)”是指向分析物件的

生物樣品添加用於形成聚集體的多肽的二聚體或添加後進行混合的過程。

【0025】 在本說明書中，術語“多聚體”中還包含低聚物。

【0026】 在本說明書中，術語“二聚體”是由兩個單體結合而成的。

【0027】 根據本發明，在向生物樣品摻加上述用於形成聚集體的多肽的二聚體的情況中，爲了利用用於抑制形成用於形成聚集體的多肽的聚集體的防禦系統（清除系統）差異來對患者和正常人之間的診斷信號的差異進行最大化，即，在患者的生物樣品中因防禦系統（清除系統）的程度低，從而促進用於形成聚集體的多肽的聚集體的形成，相反地，在正常人的生物樣品中，因防禦系統（清除系統）的程度高，從而使用于形成聚集體的多肽的聚集體的形成減少，由此使診斷信號的差異（differentiation）最大化。

【0028】 根據本發明的另一實例，上述用於形成聚集體的多肽的二聚體由作爲上述用於形成聚集體的多肽的單體型的序列表中序列1的氨基酸序列形成的兩個 β -澱粉樣蛋白肽通過由上述序列表中序列1的氨基酸序列形成的 β -澱粉樣蛋白肽的第26位的Cys殘基形成二硫化鍵而成。

【0029】 根據本發明的再一實例，向上述步驟（a）的結果物進一步添加緩衝液。更優選地，相對於生物樣品，添加3~15倍（v/v）的上述緩衝液，尤其優選地，添加5~13倍（v/v）的上述緩衝液，進而優選地，添加7~11倍（v/v）的上述緩衝液，進而優選地，添加8~10倍（v/v）的上述緩衝液。

【0030】 在本發明中所利用的緩衝液可使用在本領域中公知的多種緩衝液，但優選地，上述緩衝液爲含有非離子性表面活性劑的磷酸鹽緩衝液。

【0031】 在本發明中所利用的在磷酸鹽緩衝液中含有的非離子性表面活性劑可使用在本領域中公知的非離子性表面活性劑，優選地，包含烷氧基化烷基醚 (alkoxylated alkyl ether)、烷氧基化烷基酯 (alkoxylated alkyl ester)、烷基多苷 (alkylpolyglycosides)、聚甘油酯 (polyglyceryl ester)、聚山梨醇酯 (polysorbate) 類及多糖酯 (polysugar ester)。更優選地，使用吐溫-20 (Tween-20) 或聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)，最優選地，使用吐溫-20。

【0032】 步驟 (b)，進一步形成用於形成聚集體的多肽的聚集體

【0033】 其次，本發明的方法包括：步驟 (b)，通過培養上述步驟 (a) 的結果物，來進一步形成上述用於形成聚集體的多肽的聚集體。

【0034】 本發明的最大特徵之一為如下：由於在生物樣品中所要測定的用於形成聚集體的多肽的聚集體 (抗原) 的量非常少或用於形成聚集體的多肽的聚集體 (抗原) 的大小非常小，難以進行測定或在體內的用於形成聚集體的多肽的聚集體 (抗原) 的量和生物樣品中的用於形成聚集體的多肽地聚集體 (抗原) 的量不成比例的情況下，通過向生物樣品摻加上述的上述用於形成聚集體的多肽的二聚體，來進一步形成用於形成聚集體的多肽的聚集體，從而可測定是否存在疾病或疾病或疾病或疾病的進行程度。

【0035】 根據本發明的再一實例，在1~50°C溫度下，更優選地，在25~50°C溫度下，尤其優選地，在25~45°C溫度下，進而優選地，在25~40°C溫度下，培養 (incubation) 上述步驟 (a) 的結果物，來進一步形成上述步驟 (b) 的用於形成聚集體的多肽的聚集體，

在本發明中，進行充分時間的上述步驟 (b) 的培養，使摻加的上述用

於形成聚集體的多肽的二聚體可借助上述生物樣品進行多聚體化，更優選地，可借助上述生物樣品進行多聚體化的充分的培養時間為如下充分的時間：使利用具有用於形成聚集體的多肽的多聚體參與的疾病的人類的生物樣品來產生的信號比利用正常人類的生物樣品來產生的信號大1.3~20倍。

【0036】 根據本發明的另一實例，在爲了使利用人類的生物樣品來產生的信號比利用正常人類的生物樣品來產生的信號大1.3~20倍而進行充分時間的上述步驟（b）的用於形成聚集體的多肽的聚集體的進一步形成的步驟中，將結果物培養1天至12天，更優選地，培養1天至10天，尤其優選地，培養1天至8天，進而優選地，培養1天至6天，進而優選地，培養2天至6天，最優選地，培養2天至5天。

【0037】 在本說明書中，術語“培養”是指在恒定的溫度下，使分析物件的生物樣品規定時間保持站立（kept to stand）或進行搖動（shaking），在搖動的情況下，優選地，指輕微搖動（mild shaking）。

【0038】 本發明的最大特徵之一中的另一個爲在恒定的溫度下，通過將生物樣品站立（即，培養），來使存在於生物樣品的經摻加的用於形成聚集體的多肽的二聚體和用於形成聚集體的多肽相互凝聚（aggregation）得好，從而將患者和正常人之間的診斷信號的差異最大化。

【0039】 （c）與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體相結合的結合劑-標誌物與上述步驟（b）的結果物的相接觸

【0040】 並且，本發明的方法包括步驟（c），使結合劑-標誌物與上述步驟（b）的結果物相接觸，上述結合劑-標誌物由信號產生標誌物和與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體相結合的結合劑結合而成。

【0041】 在本發明中，與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體相結合的結合劑為抗體，肽適體、AdNectin、affibody(affibody，美國專利第5831012號)、Avimer(Avimer, Silverman, J. et al, Nature Biotechnology 23(12):1556(2005))或Kunitz結構域(Kunitz domain, Arnoux B et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58(Pt 7):12524(2002))，及Nixon, AE, Current opinion in drug discovery & development 9(2):2618(2006))。

【0042】 在本發明中，與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體進行結合的結合劑相結合的信號產生標誌物包含化合物標誌物(例如，生物素)、酶標誌物(例如，鹼性磷酸酶、過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶及 β -葡糖苷酶)、放射性標誌物(例如， I^{125} 及 C^{14})、螢光標誌物(例如，螢光素)、發光標誌物、化學發光標誌物及螢光共振能量轉移標誌物(FRET, fluorescence resonance energy transfer)，但並不限定於此。

【0043】 步驟(d)，對從與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號進行檢測

【0044】 最後，本發明的方法包括：步驟(d)，檢測從與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號。

【0045】 對從與上述用於形成聚集體的多肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號進行檢測的步驟可通過在本領域中公知的多種方法進行，例如，可利用與抗原-抗體反應相關的免疫分析法來進行。

【0046】 根據本發明的另一實例，通過包括如下步驟的方法來進行上述步驟(c)及步驟(d)，步驟(c-1)，使上述步驟(b)的結果物與用於對捕獲(capturing)上述聚集體的上述用於形成聚集體的多肽上的表位進行識

別的捕獲抗體相接觸；步驟(c-2)，使上述捕獲的聚集體與用於對上述用於形成聚集體的多肽上的表位進行識別的檢測抗體相接觸；以及步驟(c-3)，對聚集體-檢測抗體複合體進行檢測。

【0047】 這種檢測方法利用兩種形態的抗體，即，利用捕獲抗體及檢測抗體。在本說明書中，術語“捕獲抗體”是指可與所要檢測的用於形成聚集體的多肽相結合的抗體。術語“檢測抗體”是指可與通過上述捕獲抗體捕獲的用於形成聚集體的多肽相結合的抗體。“抗體”是指可與抗原相結合的免疫球蛋白。在本說明書中所利用的抗體不僅包含所要檢測的表位、抗原或可與抗原片段相結合的總抗體，而且包含抗體片段(例如，F(ab')₂，Fab'，Fab，Fv)。

【0048】 作為上述檢測方法，利用對用於形成聚集體的多肽上的表位進行特異性識別的一套的捕獲抗體及檢測抗體，上述捕獲抗體及檢測抗體特異性識別的上述表位相同或重疊。

【0049】 在提及與捕獲抗體及檢測抗體相關的表位而使用的術語“重疊(overlapped with)”包括完全部分或部分重疊的氨基酸序列的表位。例如，與6E10、FF51及WO2抗體有關的表位具有分別由人類β-澱粉樣蛋白肽序列的氨基酸3~8、氨基酸1~4及氨基酸4~10形成的氨基酸序列。這種表位可利用完全重疊的表位進行說明。

【0050】 根據本發明的再一實例，在提及人類β-澱粉樣蛋白肽序列而表述的情況下，上述表位元具有由氨基酸3~8、氨基酸1~4或氨基酸4~10形成的氨基酸序列。

【0051】 根據本發明的另一實例，上述捕獲抗體識別的表位為在上述

用於形成聚集體的多肽中不反復的序列，上述檢測抗體識別的表位是在上述用於形成聚集體的多肽中不反復的序列。根據本發明的檢測方法，與捕獲抗體相結合的用於形成聚集體的多肽不能再次與檢測抗體相結合，這是因為不存在檢測抗體識別的追加的表位。

【0052】 根據本發明的再一實例，上述捕獲抗體及檢測抗體相同。即，優選地，與捕獲抗體及檢測抗體進行特異性結合的表位相同。

【0053】 根據本發明的另一實例，上述捕獲抗體與固體基質相結合。這種形態的公知的物質包含如聚苯乙烯（ polystyrene ）、聚丙烯（ polypropylene ）、玻璃、金屬及凝膠等烴類聚合物。上述固體基質能夠以試紙條、試紙條、微teeter板、粒子（例如，微珠）、親和性柱及免疫印跡膜（例如，聚偏氟乙烯（ polyvinylidene fluoride ）膜）形態存在（參照：美國專利第5143825號、第5374530號、第4908305號及第5498551號）。

【0054】 根據本發明的再一實例，上述檢測抗體具有生成可檢測的信號的標誌物。上述標誌物包含：化合物標誌物（例如，生物素）；酶標誌物（例如，鹼性磷酸酶、過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶及 β -葡萄糖苷酶）；放射性標誌物（例如， I^{125} 及 C^{14} ），螢光標誌物（例如，螢光素）、發光標誌物、化學發光標誌物及螢光共振能量轉移標誌物，但並不限定於此。在本領域中公知用於標誌物抗體的多種標誌物及方法（ Harlow and Lane, eds. *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. ）。

【0055】 在本發明中，針對於可與用於形成聚集體的多肽相結合的抗體，可根據融合方法（ Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*,

6:511-519(1976))、重組去氧核糖核酸 (DNA) 方法 (美國專利第481656號或噬菌體抗體圖書館 (Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991); 及Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991)) 等現有技術, 可利用之前記載的表位元作為免疫原來準備。在Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1988; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 及 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991中記載有用於製備上述抗體的通常的方法。

【0056】 用於製備單克隆抗體的雜交細胞株的準備步驟通過生產無限增值細胞株 (immortal cell line) 及抗體的淋巴細胞的融合而進行。上述單克隆抗體的製備可利用在本領域中公知的技術進行。作為多克隆抗體, 可向適合的動物注入上述的抗原, 並收集包含抗體的抗血清後, 根據通過公知的親和性技術分離抗體的方法製備。

【0057】 聚集體-檢測抗體複合體的檢測步驟可利用本領域的公知的方法進行。聚集體-檢測抗體複合體的形成呈現在生物樣品中聚集體的存在。上述步驟可根據現有的方法, 例如, 如在Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980及Harlow and Lane, eds. Antibodies: A Laboratory Manual(1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y中記載, 利用多種可檢測的標誌物/基質對, 來以定量或定性的方式進行。

【0058】 在將上述檢測抗體作為鹼性磷酸酶進行標誌物的情況下, 利用5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸鹽 (BCIP)、氯化硝基四氮唑藍 (NBT) 及細胞

外液 (ECF) 作為用於顯色反應的基質。在利用辣根過氧化物酶標誌物的情況下，作為基質利用氯萘酚 (chloro naphthol)、氨基 - 乙基噻唑 (Amino-ethylcarbazole)、二氨基聯苯胺 (diaminobenzidine)、D-螢光素 (D-luciferin)、光澤精 (lucigenin) (硝酸雙 -N- 甲基吡啶翁 (bis-N-methylacridinium nitrate))、試鹵靈苄基酸酯 (Resorufin benzyl ether)、魯米諾 (Luminol)、arm flex 紅試劑 (10-乙酰基-3,7-二羥基吩噁嗪 (10-Acetyl-3,7-dihydroxypenoxazin))、3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (TMB)、增強化學發光 (ECL, enhanced chemiluminescence) 及聯氮-二(3-乙基-苯並噻唑-6-磺酸) 二鉍鹽 (ABTS) 等。

【0059】 通過這種方法，可使利用具有用於形成聚集體的多肽的多聚體參與的疾病的人類的生物樣品來產生的信號比利用正常人類的生物樣品來產生的信號大1.3~20倍，更優選地，大1.5~10倍，尤其優選地，大1.6~10倍。

【0060】 根據本發明的再一實施方式，本發明提供試劑盒，用於檢測包含用於形成聚集體的多肽的二聚體的生物樣品的、用於形成聚集體的多肽的聚集體。

【0061】 本發明的試劑盒利用對上述的本發明的生物樣品的用於形成聚集體的多肽的聚集體進行檢測的方法，為了避免說明書的過度的複雜性，對兩者之間共同的內容省略其記載。

【0062】 根據本發明的再一實例，上述試劑盒還包含：捕獲抗體，用於對用於形成聚集體的多肽上的表位進行識別；以及檢測抗體，用於對由上述捕獲抗體識別的上述表位進行識別。

【0063】 對照先前技術之功效

【0064】 對本發明的特徵及優點進行概括如下：

(a) 本發明提供生物樣品的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法或試劑盒。

(b) 在本發明的方法中，由於在生物樣品中所要測定的用於形成聚集體的多肽的聚集體（抗原）的量非常少或用於形成聚集體的多肽的聚集體（抗原）的大小非常小，難以進行測定或在人體內的用於形成聚集體的多肽的聚集體（抗原）的量和生物樣品中的用於形成聚集體的多肽的聚集體（抗原）的量不成比例的情況下，利用抑制形成多肽的聚集體的防禦系統（清除系統）的差異，來將患者和正常人之間的診斷信號的差異（differentiation）最大化。

(c) 本發明能夠以便利且迅速的方式進行，這是能夠實現生物樣品的用於形成聚集體的多肽的聚集體的檢測方法的自動化。

【圖式簡單說明】

【0065】 圖1a及圖1b表示根據本發明的實施例處理s26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物（s26C-Beta-Amyloid）(1-40)Dimer）後，在培養3天和培養4天的樣品中，利用多聚體檢測系統（MDS，multimer detection system）（6E10/FF51HRP套件（set））的 β -澱粉樣蛋白低聚物（oligomer）檢測結果。

【0066】 圖2表示根據本發明的實施例處理s26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後，在培養0天、1天、2天、3天、4天及5天的樣品中，利用多聚體檢測系統（6E10/FF51HRP套件）的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測結果。

【0067】 圖3表示根據本發明的實施例處理0.25ng的s26C- β -澱粉樣蛋

白(1-40)二聚物後，培養0天、5天的樣品和在無處理後，培養0天、5天的樣品中利用多聚體檢測系統(6E10/FF51辣根過氧化物酶套件(6E10/FF51HRP set))的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測結果。

【0068】 圖4a及圖4b表示根據本發明的實施例處理s26C- β -澱粉樣蛋白(1-40)二聚物後，在培養1天、2天的樣品中，利用多聚體檢測系統(6E10/WO2辣根過氧化物酶套件(6E10/WO2HRP set))的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測結果。

【0069】 圖5表示根據本發明的實施例處理s26C- β -澱粉樣蛋白(1-40)二聚物後，在培養1天、2天、3天、4天的樣品中，利用多聚體檢測系統(6E10/WO2辣根過氧化物酶套件)的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測結果。

【實施方式】

【0070】 以下，通過實施例更詳細地說明本發明。這些實施例只用於更詳細地說明本發明，根據本發明的要旨，本發明的範圍並不限於這些實施例，這對於本發明所屬技術領域的普通技術人員來說是顯而易見的。

【0071】 實施例

【0072】 實施例1：實驗材料的準備

【0073】 從西格馬(sigma)公司購買了塗敷緩衝液(Carbonate-Bicarbonate Buffer)、磷酸鹽吐溫緩衝液(PBST)、TBST及磷酸鹽緩衝液(PBS)。從伯樂(Bio-rad)公司購買了Block Ace。作為緩衝液在磷酸鹽吐溫緩衝液中將Block Ace稀釋為0.4%來製備。作為阻斷(blocking)緩衝液以在D.W中稀釋1%的Block Ace的方式製備。從Scantibodies Laboratory公司購買了HBR1。從抗體(Biolegend)公司購買了

6E10 抗體。從 Absolute Antibody 公司購買了 WO2-辣根過氧化物酶 (WO2-HRP) 抗體。從株式會社 The H lab 公司購買了 FF51-辣根過氧化物酶 (FF51-HRP)。從 Absolute Antibody 公司購買了 WO2-辣根過氧化物酶抗體。從抗體公司購買了重組 (recombinant) β -澱粉樣蛋白 (A β) 1-42。從 JPT 公司購買了重組 S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物。從首爾大學盆唐醫院及中央大學醫院接收血漿樣品。從 Nunc 公司購買了板。與 6E10、FF51 及 WO2 抗體有關的表位具有分別由人類 β -澱粉樣蛋白肽的氨基酸 3~8、氨基酸 1~4 及氨基酸 4~10 形成的氨基酸序列。S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物的序列為 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGCNKGAIIGLMVGGVV，借助各單體的第 26 位的 Cystein 殘基，來形成具有二硫化鍵的二聚物 (Dimer) 形態。

【0074】 實施例 2：6E10 板的製備

【0075】 在 10ml 的塗敷緩衝液 (西格瑪公司) 中稀釋 30 μ g 的 6E10 抗體 (抗 β -澱粉樣蛋白蛋白質, Biologend)，在板 (Nunc 公司) 中將 100 μ l 接種于各孔後，在 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中進行了 1 天的反應。在磷酸鹽緩衝液中將上述板清洗 3 次，在 D.W 中接種溶解有 1% 的 Block Ace 的 240 μ l 的阻斷緩衝液後，在常溫條件下進行了 2 小時的反應。利用磷酸鹽緩衝液將上述板清洗 3 次，在常溫條件下乾燥 30 分鐘後使用。

【0076】 實施例 3：準備對照組

【0077】 作為陽性對照組 (positive control)，向 10 μ l 的重組 β -澱粉樣蛋白 1-42 (rec. A β) (1 μ g/ml) 添加 990 μ l 的磷酸鹽吐溫緩衝液來使用了 100 μ l。作為陰性對照組 (negative control) 使用了 100 μ l 的磷酸鹽緩衝液。

【0078】 實施例 4：準備樣品

【0079】 將2樣品作為基準準備了樣品。在微量恒溫儀 (heat block) 中，將冷凍的血漿樣品溶解15分鐘後，進行30秒鐘的渦流 (vortexing)，然後使用。在20 μ l的血漿中混合8.08 μ l的HBR1 (0.123mg/ml)、180 μ l的磷酸鹽吐溫緩衝液及20 μ l的S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物 (0.25ng/10 μ l) 來準備摻加有0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物的樣品，使得總體積為228.08 μ l。

【0080】 實施例5：培養 (incubation)

【0081】 作為在上述實施例4中通過處理S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物來準備的樣品，在37 $^{\circ}$ C培養箱中分別培養0天、1天、2天、3天、4天、5天 (6E10/FF51辣根過氧化物酶套件)。並且，作為在上述實施例4中通過無處理S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物來準備的樣品，在37 $^{\circ}$ C培養箱中，培養了0天、5天 (6E10/FF51辣根過氧化物酶套件)。並且，作為在上述實施例4中通過處理S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物來準備的樣品，分別在37 $^{\circ}$ C培養箱中，培養了1天、2天、3天、4天 (6E10/WO2辣根過氧化物酶套件)。

【0082】 實施例6：6E10/FF51辣根過氧化物酶套件：在處理S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物後培養3天、4天的樣品中利用多聚體檢測系統的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測。

【0083】 在6E10塗敷板 (3 μ g/ml) 分別接種100 μ l的在陽性對照組及陰性對照組中處理0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白 (1-40) 二聚物來培養3天、4天而成的樣品後，在常溫條件下進行了1小時的反應。利用TBST將上述板清洗3次，並在緩衝液A中使FF51-HRP抗體製備成0.5 μ g/ml後，每次接種

100 μ l。利用TBST將上述板清洗3次後，接種了100 μ l的增強化學發光溶液。作為與增強化學發光進行反應的板插入於luminometer儀（珀金埃爾默儀器有限公司（perkinelmer）），並測定了發光（luminescent）信號。其結果如圖1a、圖1b。

【0084】 圖1a及圖1b表示添加s26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後，根據培養時間的AD樣品和Non AD樣品之間的信號的變化。表示在培養3天和4天的各個條件下，AD和Non AD之間的差異。

【0085】 通過圖1a及圖1b觀察，當與Non AD患者樣品進行比較時，在AD患者的樣品中的 β -澱粉樣蛋白低聚物的信號呈現得高，這是判斷為用於抑制形成 β -澱粉樣蛋白低聚物的防禦系統在AD患者樣品中與Non AD患者相比不太活化。

【0086】 實施例7：6E10/FF51辣根過氧化物酶套件：在處理S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後培養0天、1天、2天、3天、4天、5天的樣品中利用多聚體檢測系統（multimer detection system）的 β -澱粉樣蛋白低聚物（oligomer）檢測。

【0087】 在6E10塗敷板（3 μ g/ml）分別接種100 μ l的在陽性對照組及陰性對照組中處理0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物來培養0天、1天、2天、3天、4天、5天而成的樣品後，在常溫條件下進行了1小時的反應。利用TBST將上述板清洗3次，並在緩衝液A中使FF51-HRP抗體製備成0.5 μ g/ml後，每次接種100 μ l。利用TBST將上述板清洗3次後，接種了100 μ l的增強化學發光溶液。作為與增強化學發光進行反應的板插入於luminometer儀（珀金埃爾默儀器有限公司），並測定了發光信號。其結果如

圖2。

【0088】 圖2作為添加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後，根據培養時間確認AD樣品和Non AD樣品之間的信號的變化的圖表，表示隨著培養時間增加AD樣品的信號與Non AD樣品的信號相比增加1.15倍、1.34倍、1.64倍、2.14倍、3.01倍、3.35倍。

【0089】 通過圖2觀察，當與Non AD患者樣品進行比較時，在AD患者的樣品中的 β -澱粉樣蛋白低聚物的信號呈現得高，這是判斷為用於抑制形成 β -澱粉樣蛋白低聚物的防禦系統在AD患者樣品中與Non AD患者相比不太活化。

【0090】 實施例8：6E10/FF51辣根過氧化物酶套件：在處理0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後培養0天、5天的樣品和無處理後培養0天、5天的樣品中利用多聚體檢測系統（multimer detection system）的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測。

【0091】 在6E10塗敷板（3 μ g/ml）分別接種100 μ l的在陽性對照組及陰性對照組中處理0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後未處理0天、5天、分別培養0天、5天的樣品後，在27 $^{\circ}$ C的培養箱（incubator）中，以靜置狀態進行了1小時的反應。利用TBST將上述板清洗3次，並在緩衝液A中使FF51-HRP抗體製備成0.5 μ g/ml後，每次接種100 μ l。利用TBST將上述板清洗3次後，接種了100 μ l的增強化學發光溶液。作為與增強化學發光進行反應的板插入於luminometer儀（珀金埃爾默儀器有限公司），並測定了發光信號。其結果如圖3。

【0092】 圖3作為在不添加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物，並培

養0天、5天，添加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後培養0天、5天的樣品中，測定 β -澱粉樣蛋白低聚物的資料，示出當未摻加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物和摻加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物時，根據時間AD樣品的信號比Non AD樣品的信號增加。

【0093】 在不摻加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物，並培養0天、5天的樣品的情況下，AD的信號與Non AD的信號相比分別示出1.09倍、1.97倍的差異，從0天至5天間 β -澱粉樣蛋白低聚物的變化量增加了1.8倍。相反地，在摻加0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後，培養0天、5天的樣品的情況下，AD的信號與Non AD的信號相比分別示出1.1倍、3.47倍的差異，從0天至5天間 β -澱粉樣蛋白低聚物的變化量增加了3.15倍。

【0094】 通過圖3觀察，當與Non AD患者樣品進行比較時，在AD患者的樣品中的 β -澱粉樣蛋白低聚物的信號呈現得高，這是判斷為用於抑制形成 β -澱粉樣蛋白低聚物的防禦系統在AD患者樣品中與Non AD患者相比不太活化。

【0095】 實施例9：6E10/WO2辣根過氧化物酶套件：在處理S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後培養1天和2天的樣品中利用多聚體檢測系統的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測。

【0096】 在6E10塗敷板（3 μ g/ml）分別接種100 μ l的在陽性對照組及陰性對照組中處理0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物來培養1天和2天而成的樣品後，在常溫條件下進行了1小時的反應。利用TBST將上述板清洗3次，並在緩衝液A中使WO2-HRP抗體製備成0.25 μ g/ml後，每次接種100ul。利用TBST將上述板清洗3次後，接種了100 μ l的增強化學發光溶液。

作為與增強化學發光進行反應的板插入於luminometer儀（珀金埃爾默儀器有限公司），並測定了發光信號。其結果如圖4a及圖4b。

【0097】 圖2示出添加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後，根據培養時間的AD樣品和 Non AD樣品之間的信號的變化。示出在培養1天和2天的各個條件下，AD和Non AD之間的差異。

【0098】 通過圖4a及圖4b觀察，當與Non AD患者樣品進行比較時，在AD患者的樣品中的 β -澱粉樣蛋白低聚物的信號呈現得高，這是判斷為用於抑制形成 β -澱粉樣蛋白低聚物的防禦系統在AD患者樣品中與Non AD患者相比不太活化。

【0099】 實施例10：6E10/WO2辣根過氧化物酶套件：在處理S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後培養1天、2天、3天、4天而成的樣品中利用多聚體檢測系統的 β -澱粉樣蛋白低聚物檢測。

【00100】 在6E10塗敷板（3 μ g/ml）分別接種100 μ l的在陽性對照組及陰性對照組中處理0.25ng的S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物，來培養1天、2天、3天、4天的樣品後，在常溫條件下進行了1小時的反應。利用TBST將上述板清洗3次，並在緩衝液A中使WO2-HRP抗體製備成0.25 μ g/ml後，每次接種100 μ l。利用TBST將上述板清洗3次後，接種了100 μ l的增強化學發光溶液。作為與增強化學發光進行反應的板插入於luminometer儀（珀金埃爾默儀器有限公司），並測定了發光信號。其結果如圖5。

【00101】 圖5為添加S26C- β -澱粉樣蛋白（1-40）二聚物後，根據培養時間確認AD樣品和Non AD樣品之間的信號的變化的圖表。其結果，在培養第一天，AD樣品的平均信號比Non AD的平均信號高1.19倍，並在總體上樣

品信號上升。相反地，確認了如下：在第二天、第三天、第四天中，在總體上變高的樣品的信號值降低，並AD樣品與Non AD樣品相比呈現1.69倍、1.50倍、1.41倍差異。

【00102】 通過圖5觀察，當與Non AD患者樣品進行比較時，在AD患者的樣品中的 β -澱粉樣蛋白低聚物的信號呈現得高，這是判斷為用於抑制形成 β -澱粉樣蛋白低聚物的防禦系統在AD患者樣品中與Non AD患者相比不太活化。

【0100】 以上，對本發明的特定部分進行了詳細說明，就本發明所屬技術領域的普通技術人員來說，這種詳細說明只屬於優選實例，本發明的範圍並不局限於此，這是顯而易見的。因此，本發明的實質性的範圍應根據所附的發明要求保護範圍和其他的等同技術方案來定義。

【符號說明】 無

【生物材料寄存】 無

申請專利範圍

1. 一種血漿 (plasma) 的 β -澱粉樣蛋白肽 ($A\beta$ peptide) 的聚集體的檢測方法，其中，
包括：
步驟 (a)，向分析物件的血漿摻加 (spiking) 上述 β -澱粉樣蛋白肽的二聚體；
步驟 (b)，通過培養上述步驟 (a) 的結果物，來進一步形成上述 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體；
步驟 (c)，使結合劑-標誌物與上述步驟 (b) 的結果物相接觸，上述結合劑-標誌物由信號產生標誌物和與上述 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體相結合的結合劑結合而成；以及
步驟 (d)，對從與上述 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體結合而成的結合劑-標誌物產生的信號進行檢測，
其中，進行充分時間的上述步驟 (b) 的培養，使得所摻加的上述 β -澱粉樣蛋白肽的二聚體能夠借助上述血漿進行多聚體化；
且其中，上述 β -澱粉樣蛋白肽的二聚體為借助由序列表中序列 1 的氨基酸序列形成的 β -澱粉樣蛋白肽的第 26 位的 Cys 殘基形成二硫化鍵而成的二聚體。
2. 如請求項 1 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，使所摻加的上述 β -澱粉樣蛋白肽的二聚體進行多聚體化的上述血漿為具有上述 β -澱粉樣蛋白肽的多聚體參與的疾病的人類的血漿。

3. 如請求項 2 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，能夠借助上述血漿進行多聚體化的充分的培養時間為如下充分的時間：使利用具有 β -澱粉樣蛋白肽的多聚體參與的疾病的人類的血漿來產生的信號比利用正常人類的血漿來產生的信號大 1.3~20 倍。
4. 如請求項 1 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，向上述步驟（a）的結果物還添加緩衝液。
5. 如請求項 4 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，相對於血漿，添加 3~15 倍（v/v）的上述緩衝液。
6. 如請求項 5 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，上述緩衝液為含有非離子性表面活性劑的磷酸鹽緩衝液。
7. 如請求項 1 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，在 1~50°C 溫度下培養（incubation）上述步驟（a）的結果物，來進一步形成上述步驟（b）的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體。
8. 如請求項 1 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，將上述步驟（a）的結果物培養（incubation）1 天至 12 天，來進一步形成上述步驟（b）的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體。
9. 如請求項 1 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，通過包括如下步驟的方法來進行上述步驟（c）及步驟（d），
步驟（c-1），使上述步驟（b）的結果物與用於對捕獲（capturing）上述聚集體的上述 β -澱粉樣蛋白肽上的表位進行識別的捕獲抗體相接觸；
步驟（c-2），使上述捕獲的聚集體與用於對上述 β -澱粉樣蛋白肽上的表

位進行識別的檢測抗體相接觸；以及

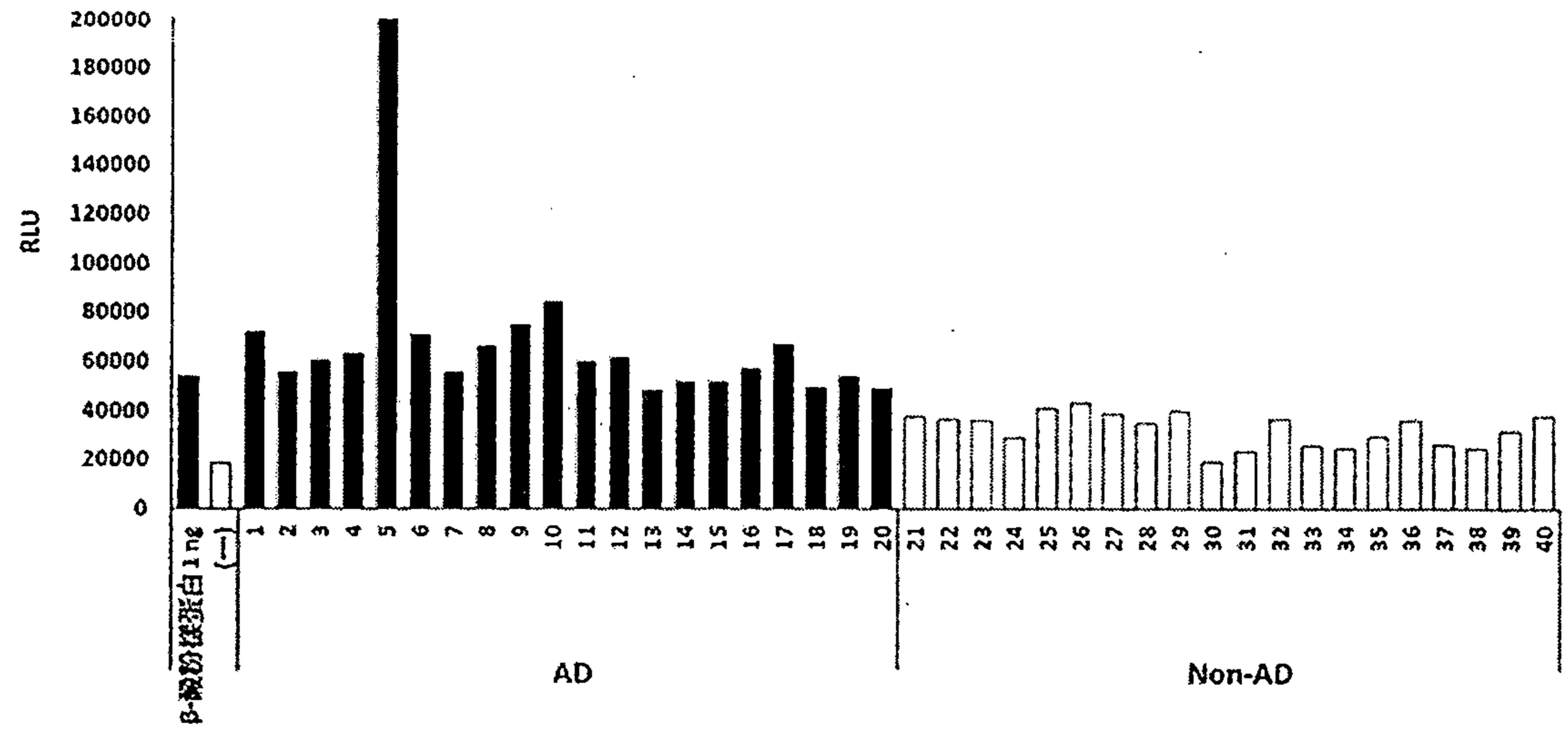
步驟（c-3），對聚集體-檢測抗體複合體進行檢測。

10. 如請求項 9 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，上述檢測抗體為對與上述步驟（c-1）的表位相同或重疊的表位進行識別的檢測抗體。
11. 如請求項 9 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，上述捕獲抗體與固體基質相結合。
12. 如請求項 9 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，上述檢測抗體具有生成能夠檢測的信號的標誌物。
13. 如請求項 12 之血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體的檢測方法，其中，與上述檢測抗體相結合的標誌物為化合物標誌物、酶標誌物、放射性標誌物、螢光標誌物、發光標誌物、化學發光標誌物及螢光共振能量轉移標誌物。
14. 一種試劑盒，其係用於對血漿的 β -澱粉樣蛋白肽的聚集體進行檢測，其中該試劑盒包含：
 β -澱粉樣蛋白肽的二聚體，其為借助由序列表中序列 1 的氨基酸序列形成的 β -澱粉樣蛋白肽的第 26 位的 Cys 殘基形成二硫化鍵而成的二聚體；
捕獲抗體，用於對 β -澱粉樣蛋白肽上的表位進行識別；以及
檢測抗體，用於對由上述捕獲抗體識別的上述表位進行識別。
15. 如請求項 14 之試劑盒，其中，上述試劑盒還包含緩衝液。

16. 如請求項 15 之試劑盒，其中，上述緩衝液為含有非離子性表面活性劑的磷酸鹽緩衝液。
17. 如請求項 14 之試劑盒，其中，上述檢測抗體為對與由上述捕獲抗體識別的上述表位相同或重疊的表位進行識別的檢測抗體。
18. 如請求項 14 之試劑盒，其中，上述捕獲抗體與固體基質相結合。
19. 如請求項 14 之試劑盒，其中，上述檢測抗體具有生成能夠檢測的信號的標誌物。
20. 如請求項 19 之試劑盒，其中，與上述檢測抗體相結合的標誌物為化合物標誌物、酶標誌物、放射性標誌物、螢光標誌物、發光標誌物、化學發光標誌物及螢光共振能量轉移標誌物。

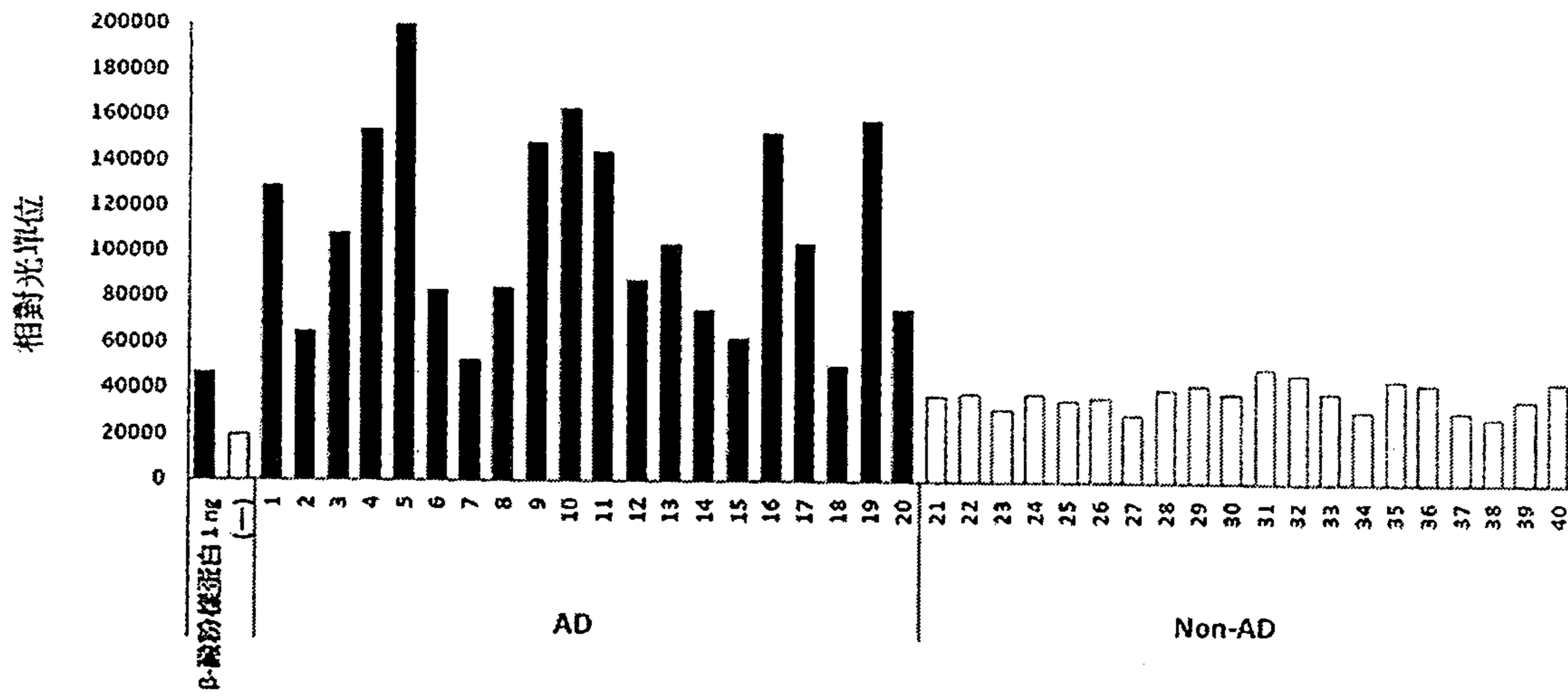
圖式

磷酸鹽吐溫緩衝液：
向10 μ l的血漿添加0.25ng的 β -澱粉樣蛋白二聚物後在37°C溫度下培養3天
-6E10/FF51辣根過氧化物酶



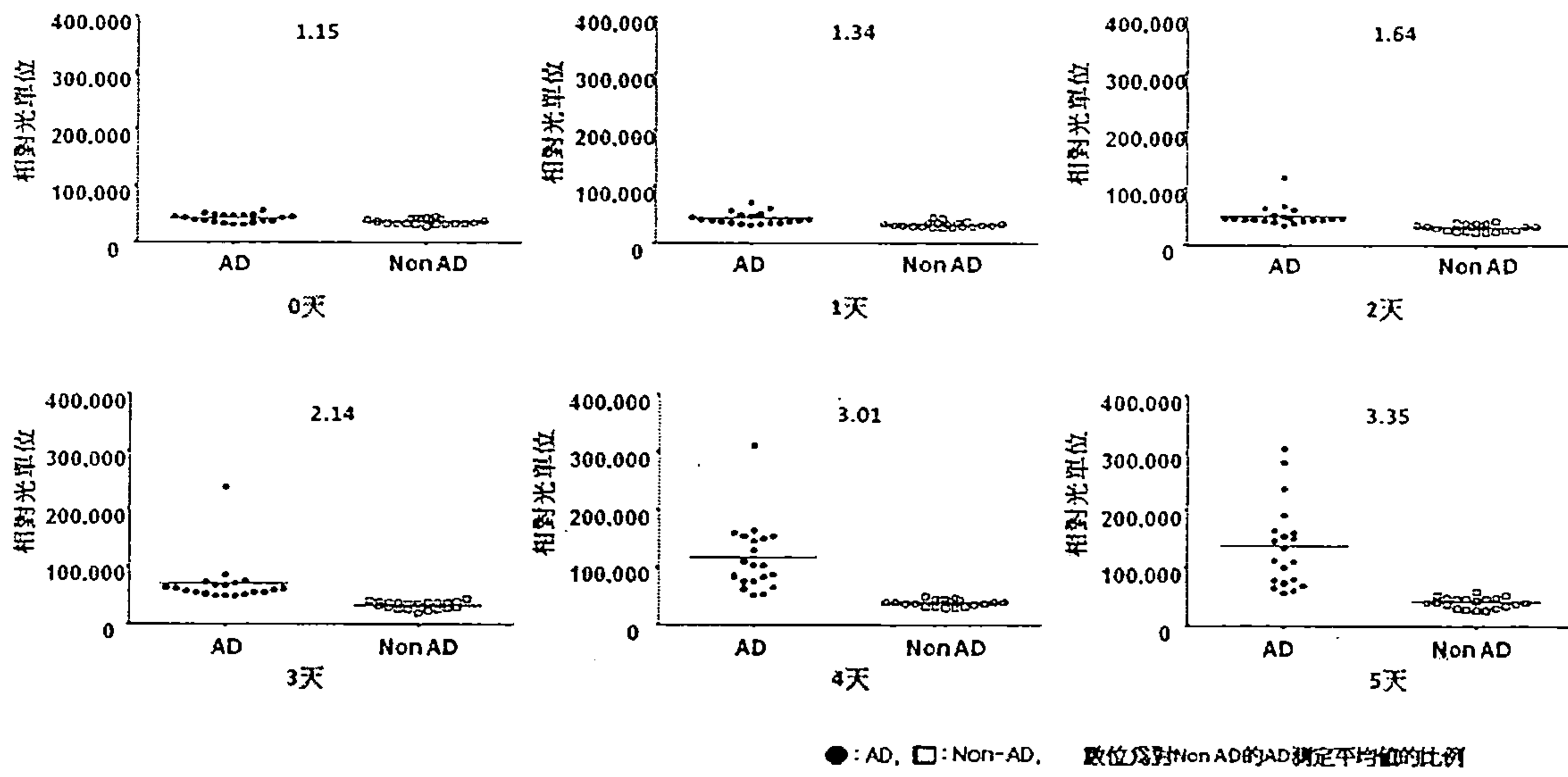
第 1a 圖

磷酸鹽吐溫緩衝液：
向10 μ l的血漿添加0.25ng的 β -澱粉樣蛋白二聚物後在37 $^{\circ}$ C溫度下培養4天
-6E10/FF51辣根過氧化物酶



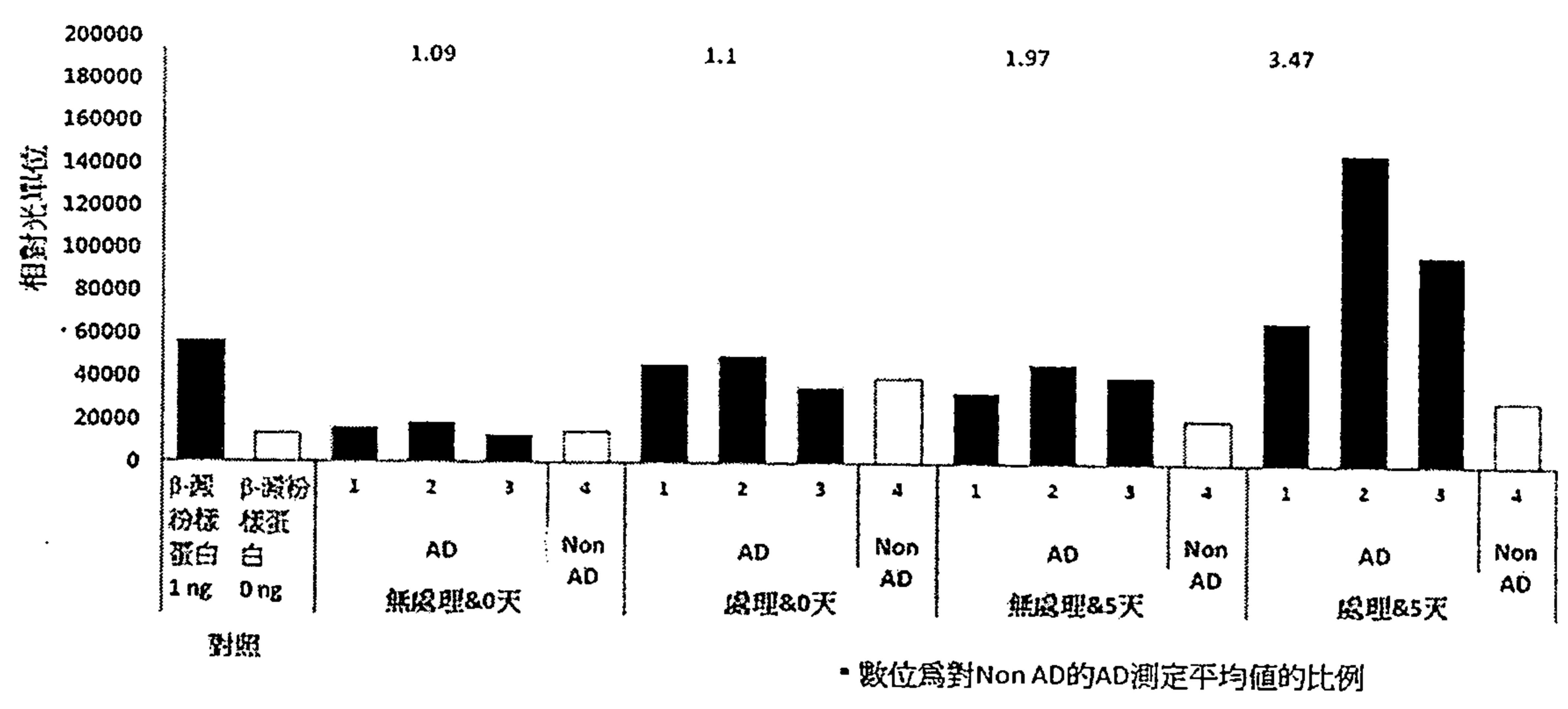
第 1b 圖

摻加0.25ng的二聚物後根據時間經過的信號變化

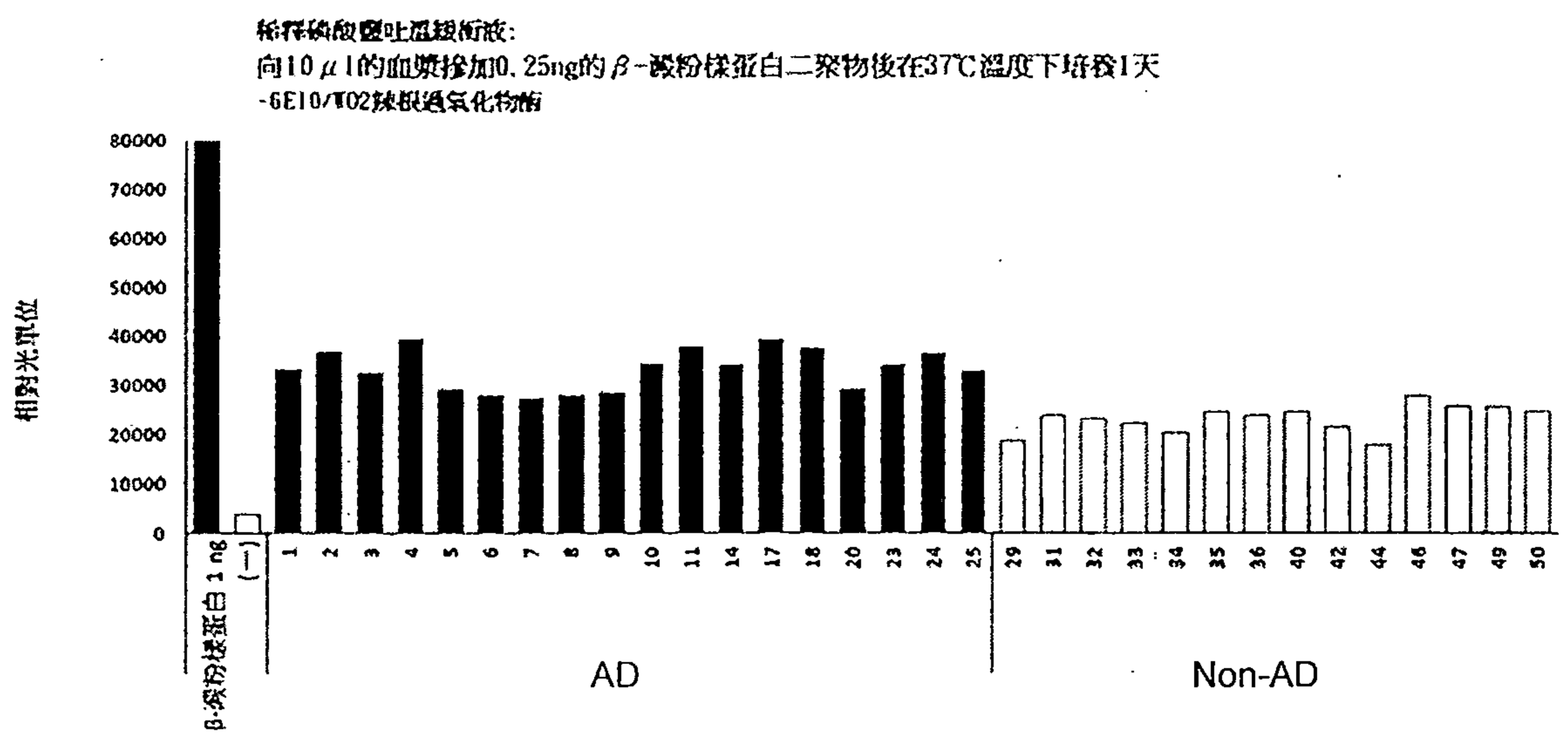


第2圖

摻加0.25ng的二聚物的樣品和未摻加的樣品中根據時間的信號變化

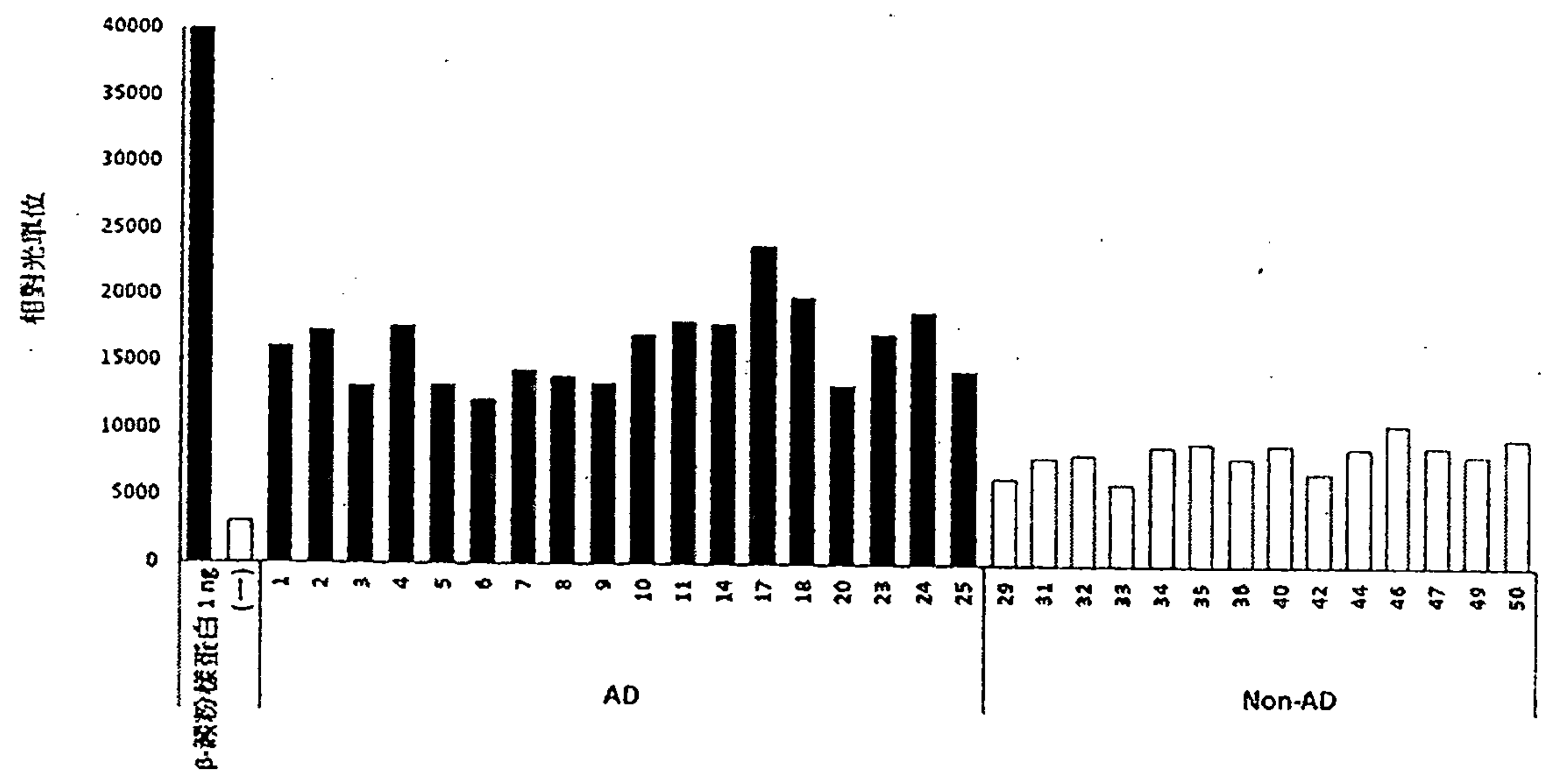


第3圖



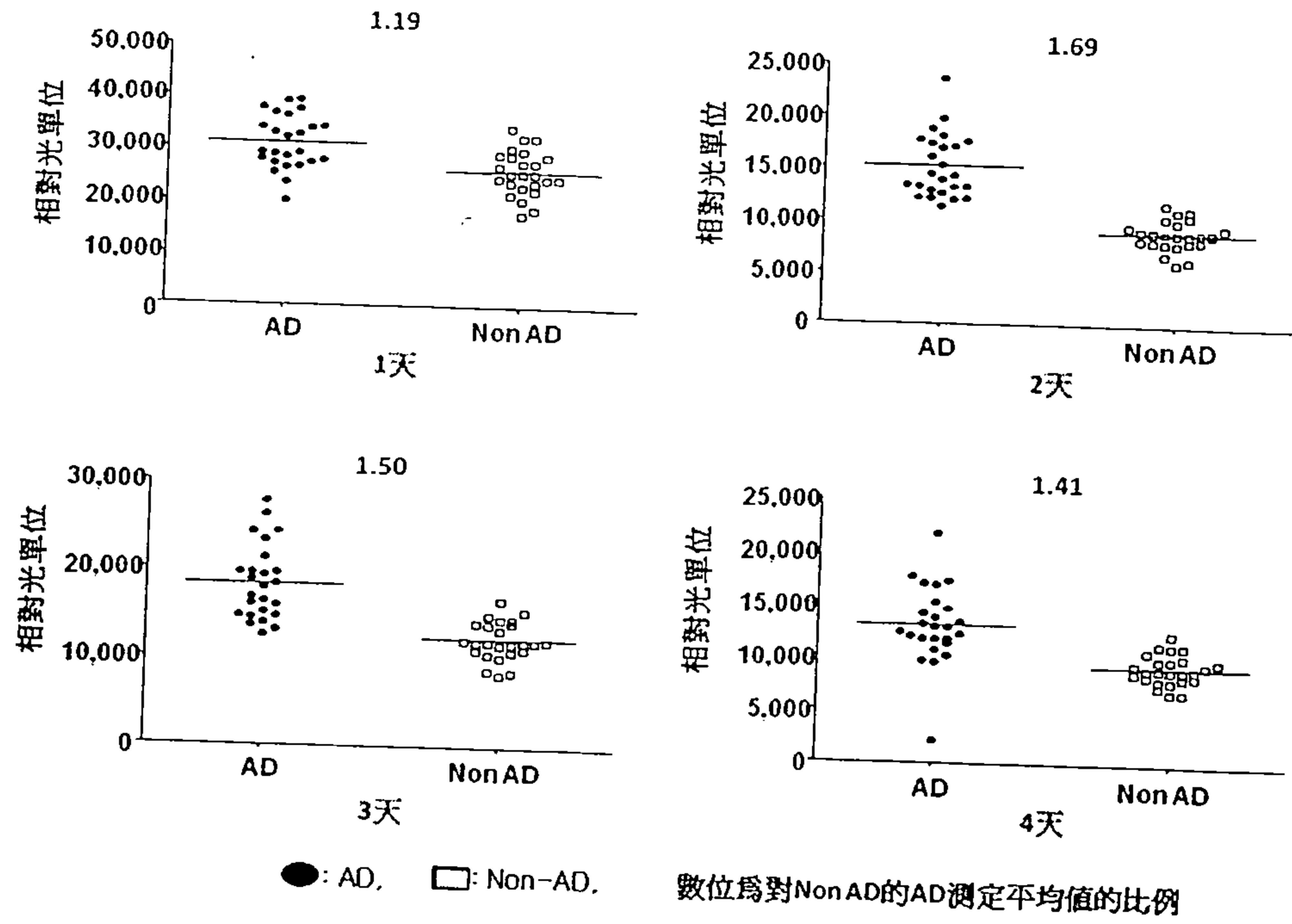
第4A圖

稀釋磷酸鹽吐溫緩衝液:
向10 μ l的血漿添加0.25ng的 β -澱粉樣蛋白二聚物後在37°C溫度下培養2天
-6E10/W02辣根過氧化物酶



第4B圖

參加0.25ng的二聚物後根據時間經過的信號變化



第5圖