

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 12 月 7 日 (07.12.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/232108 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01) **G01N 15/02** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) **G01N 15/10** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/097777
- (22) 国际申请日: 2023 年 6 月 1 日 (01.06.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202210622135.6 2022年6月2日 (02.06.2022) CN
- (71) 申请人: 浙江大学医学院附属第一医院 (**THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF ZHEJIANG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE**) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市上城区庆春路 79 号, Zhejiang 310006 (CN)。浙江大学(**ZHEJIANG UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 章京 (**ZHANG, Jing**); 中国浙江省杭州市上城区庆春路 79 号, Zhejiang 310006 (CN)。田辰 (**TIAN, Chen**); 中国浙江省杭州市上城区庆春路 79 号, Zhejiang 310006 (CN)。郭焱 (**GUO, Zhen**); 中国浙江省杭州市上城区庆春路79号, Zhejiang 310006 (CN)。

- (74) 代理人: 北京唐颂永信知识产权代理有限公司 (**BEIJING TANGSONG IP FIRM**); 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 1602室, Beijing 100081 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) **Title:** METHOD, SYSTEM, COMPOSITION, AND KIT FOR DIAGNOSING AND IDENTIFYING NON-ALZHEIMER'S DISEASE COGNITIVE DISORDER

(54) 发明名称: 诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病认知障碍的方法、系统、组合物和试剂盒

(57) **Abstract:** A method, system, composition, and kit for diagnosing and identifying a non-Alzheimer's disease (AD) cognitive disorder, i.e., a "non-AD cognitive disorder". The system for diagnosing a "non-AD cognitive disorder" comprises: a first examination module used for examining the central nervous system source biomarker of extracellular vesicles (EV) in the body fluid of a test subject, so as to confirm the number and the particle size of the EVs carrying the central nervous system source-specific marker; a second examination module used for examining the marker related to the non-AD cognitive disorder of the EV in the body fluid of the test subject so as to confirm the number and the particle size of the EVs carrying the marker related to the non-AD cognitive disorder; and a diagnosis and identification module for diagnosing whether the test subject suffers from a non-AD cognitive disorder, the diagnosis being based on the examination results of the central nervous system source marker and the marker related to the non-AD cognitive disorder respectively obtained by the first examination module and the second examination module.

(57) 摘要: 一种诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病 (AD) 认知障碍, 即"非AD认知障碍"的方法、系统、组合物和试剂盒。其中, 用于诊断"非AD认知障碍"的系统包括: 第一检测模块, 其用于检测受试者体液中细胞外囊泡 (EV) 的中枢神经系统来源生物标志物, 以确认携带中枢神经系统来源特异性标志物的EV的数量和粒径; 第二检测模块, 其用于检测受试者体液中EV的非AD认知障碍相关的标志物以确认携带非AD认知障碍相关的标志物的EV的数量和粒径; 以及诊断及鉴别诊断模块, 其基于第一检测模块和第二检测模块分别获得的中枢神经系统来源标志物和非AD认知障碍相关的标志物的检测结果来诊断受试者是否罹患非AD认知障碍。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

说明书

诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病认知障碍的方法、系统、组合物和试剂盒

5 技术领域

本申请涉及生物医学技术领域，尤其是涉及体外诊断检测技术领域，涉及采用双标志物和/或多标志物进行非阿尔兹海默病认知障碍检测的方法和系统，优选采用双标志物和/或多标志物同时进行非阿尔兹海默病认知障碍检测的方法和系统。

10

背景技术

阿尔兹海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 主要由 β 淀粉样蛋白沉积及神经缠结导致中枢神经系统神经元损伤，患者出现认知障碍症状。临床工作中患者出现认知障碍症状就诊，认知障碍症状并非只由 AD 一种原因引起，临床工作中诊断患者为 AD 时其中常混杂有非 AD 认知障碍，其误诊率为 23~88%，非 AD 认知障碍包括 Lewy 体痴呆、额颞叶痴呆、Pick 病、伴有痴呆的肌萎缩性侧索硬化症等多种疾病。

基于临床认知量表及症状的诊断很难将 AD 与非 AD 认知障碍进行区分，影像学检查费用极为高昂然而对于鉴别 AD 与非 AD 认知障碍作用有限，AD 与非 AD 认知障碍鉴别在临床工作中及科研领域一直是难点及研究瓶颈，并且为患者诊疗就医及后续治疗造成极大障碍，影响其治疗效果。本申请提供的诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍方法，能够有效提高 AD 与非 AD 认知障碍鉴别诊断能力，辅助非 AD 认知障碍诊断，能够极大改善非 AD 认知障碍误诊率。

基于脑脊液的生物标志物检测在神经系统疾病研究中广泛应用，但是在临床应用中由于脑脊液采集的有创性很难被患者接受，极大地限制了临床转化与后续应用。本申请主要基于外周血检测对非 AD 认知障碍进行诊断，能够广泛应用于临床实践及大规模筛查。同时，本申请中关键生物标志为创新性发现的外周血神经来源细胞外囊泡 (Extracellular Vesicle, EV) 相关生物标志物，能够通过检测外周血中神经系统来源 EV 及其携带的疾病相关蛋白直

接反应中枢神经系统病变，从而实现对非 AD 认知障碍的诊断及鉴别诊断。本申请核心检测技术为纳米流式检测技术，通过这一技术实现对外周血中神经系统来源 EV 高灵敏、高通量检测，并且能够实现快速、低成本检测，为临床应用及大规模筛查提供了技术支持。

5 本申请聚焦非 AD 认知障碍诊断及鉴别诊断这一临床及科研难题，通过全新纳米流式检测技术，应用创新发现的中神经系统来源 EV 标志物，实现非 AD 认知障碍快速、高效诊断及鉴别诊断，为临床非 AD 认知障碍诊断工作提供新的技术手段及方法。

10 发明内容

如上所述，在本领域中还未存在利用外周体液有效地对非 AD 认知障碍进行诊断、鉴别诊断的系统、方法以及试剂盒，本申请旨在提供一种能够在外周体液中有效识别到不同中枢神经系统来源生物标志物，将其与疾病相关标志物联合检测，多重标记同时检测，以达到避免获取脑脊液，只通过少量
15 外周体液样本就可以反应中枢神经系统变化的效果。

即，本申请利用在外周体液中识别中枢神经系统来源的生物标志物进行非 AD 认知障碍诊断及鉴别诊断。

具体来说，本申请涉及以下内容：

1. 一种用于诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍的系统，其包括：

20 第一检测模块，其用于检测受试者体液中 EV 的中枢神经系统来源生物标志物，以确认携带中枢神经系统来源特异性标志物的 EV 的数量和粒径；

第二检测模块，其用于检测受试者体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认携带非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径；

25 诊断模块，其基于第一检测模块和第二检测模块分别获得的中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

2. 根据项 1 所述的系统，其中，

所述第一检测模块和所述第二检测模块同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物；

30 或者

所述第一检测模块和所述第二检测模块为同一模块，其同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关生物标志物。

3. 根据项 1 或 2 所述的系统，其还包括：

5 富集模块，其用于获取受试者的体液并对其进行预处理以富集体液中的 EV。

4. 根据项 3 所述的系统，其中，所述富集模块还包括用于对富集的 EV 进行筛选。

5. 根据项 1-4 中任一项所述的系统，其中，

10 诊断模块统计同时检测到携带中枢神经系统来源生物标志物和非 AD 认知障碍相关的生物标志物的 EV 的数量，基于统计的同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 的数量的比值来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

15 6. 根据项 1-5 中任一项所述的系统，其中，所述粒径为相关蛋白阳性 EV 分布数量最多处所对应的粒径，诊断模块基于检测的粒径来鉴别诊断出罹患认知障碍的受试者罹患非 AD 认知障碍而不是阿尔兹海默病的受试者。

7. 根据项 1-6 中任一项所述的系统，其中，所述 EV 为神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

20 8. 根据项 1-7 中任一项所述的系统，其中，所述体液选自血液、血清、血浆、唾液、尿液、淋巴液、精液或乳汁中的一种或两种以上。

9. 根据项 1-8 中任一项所述的系统，其中，所述中枢神经系统来源标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)、
25 谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

10. 根据项 1-9 中任一项所述的系统，其中，所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

30 11. 根据项 3 所述的系统，其中，所述富集模块具有进行以下步骤中的一种或两种以上的子模块：离心、超速离心、超滤管过滤、聚合沉降、特异

性抗体捕获。

12. 根据项 1-11 中任一项所述的系统，其中第一检测模块用于使受试者的 EV 与经标记的、与中枢神经系统来源标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断具有中枢神经系统来源生物标志物的 EV 的存在及含量。

13. 根据项 1-12 中任一项所述的系统，其中，第二检测模块用于使受试者的 EV 与经标记的、与非 AD 认知障碍相关标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断具有非 AD 认知障碍相关标志物的 EV 的存在及含量。

14. 根据项 12 或 13 所述的系统，其中，所述标记选自以下中的一种或两种以上：荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

15. 一种用于诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍的组合物，其包括：

用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体，以及

用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体。

16. 根据项 15 所述的组合物，其中，所述中枢神经系统来源标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

17. 根据项 15 或 16 所述的组合物，其中，所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

18. 根据项 15-17 中任一项所述的组合物，其中，所述用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体和所述用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体是经标记的抗体，优选所述标记选自以下中的一种或两种以上：荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

19. 一种用于检测受试者非 AD 认知障碍的试剂盒，其包括：

用于检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物的试剂，以

及

用于检测受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂。

20. 根据项 19 所述的试剂盒，其中，所述用于检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物的试剂和用于检测受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂为项 15-18 中任一项所述的组合物。

5 21. 根据项 19 所述的试剂盒，还包括：

用于获取受试者的生物样本的试剂和装置，优选用于获取受试者 EV 的试剂和装置。

22. 一种用于诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍的方法，其包括：

10 第一检测步骤，其检测受试者体液中 EV 的中枢神经系统来源生物标志物，以确认携带中枢神经系统来源特异性标志物的 EV 的数量和粒径；

第二检测步骤，其检测受试者体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认携带非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径；

15 诊断步骤，其基于第一检测步骤和第二检测步骤分别获得的中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

23. 根据项 22 所述的方法，其中，

所述第一检测步骤和所述第二检测步骤同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物；或者

20 所述第一检测步骤和所述第二检测步骤为同一步骤，其同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关生物标志物。

24. 根据项 22 或 23 所述的方法，其还包括：

富集步骤，其获取受试者的体液并对其进行预处理以富集体液中的 EV。

25 25. 根据项 24 所述的方法，其中，所述富集步骤还包括对富集的 EV 进行筛选。

26. 根据项 22-25 中任一项所述的方法，其中，

30 诊断步骤统计同时检测到携带中枢神经系统来源生物标志物和非 AD 认知障碍相关的生物标志物的 EV 的数量，基于统计的同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 的

数量的比值来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

27. 根据项 22-26 中任一项所述的方法，其中，所述粒径为相关蛋白阳性 EV 分布最多处对应的粒径，诊断步骤基于检测的粒径来鉴别诊断出罹患认知障碍的受试者罹患非 AD 认知障碍而不是 AD。

5 28. 根据项 22-27 中任一项所述的方法，其中，所述 EV 为神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

29. 根据项 22-28 中任一项所述的方法，其中，所述体液选自血液、血清、血浆、唾液、尿液、淋巴液、精液或乳汁中的一种或两种以上。

10 30. 根据项 22-29 中任一项所述的方法，其中，所述中枢神经方法来源标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

31. 根据项 22-30 中任一项所述的方法，其中，所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

20 32. 根据项 25 所述的方法，其中，所述富集步骤具有进行以下步骤中的一种或两种以上的子步骤：离心、超速离心、超滤管过滤、聚合沉降、特异性抗体捕获。

33. 根据项 22-32 中任一项所述的方法，其中第一检测步骤使受试者的 EV 与经标记的、与中枢神经系统来源标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断具有中枢神经系统来源生物标志物的 EV 的存在及含量。

25 34. 根据项 22-33 中任一项所述的方法，其中，第二检测步骤使受试者的 EV 与经标记的、与非 AD 认知障碍相关标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断具有非 AD 认知障碍相关标志物的 EV 的存在及含量。

30 35. 根据项 33 或 34 所述的方法，其中，所述标记选自以下中的一种或两种以上：荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记

或胶体金标记。

发明的效果

利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物，即使仅仅利用受试者的外周体液也能够诊断及鉴别受试者是否罹患 AD，并能够将罹患 AD 和非 AD 认知障碍进行鉴别诊断。

利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物能够有效地从外周体液中富集且特异性地标记能够反映非 AD 认知障碍疾病变化的生物标志物，相比直接检测外周体液中的疾病相关标志物，诊断效果更优。

利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物可以有效地利用外周体液来进行检测，从而可以避免创伤性地获取受试者的脑脊液，大大降低受试者的取样风险、大大减轻检测的困难程度、大大增加检测的临床应用性和推广性。

利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物，能够同时检测中枢神经系统来源标志物与疾病相关标志物，降低样本检测时间，更加高效、便捷。

本申请的核心是采用双标志物和/或多标志物进行非 AD 认知障碍检测的方法和系统，可以实现双标志物和/或多标志物的同时检测，即利用标志物来确认 EV 中来源于中枢神经系统的部分，在此基础上利用与疾病相关的标志物，产生的共同检测结果为疾病的诊断、鉴别诊断、追踪和药物评估服务。

20

附图说明

图 1A 显示对单颗粒纳米流式细胞仪使用 250 nm 荧光质控球的质控结果；

图 1B 显示对单颗粒纳米流式细胞仪使用 68~155 nm 粒径质控球的质控结果；

图 1C 显示对超速离心获得的 EV 的粒径分布、浓度分析结果；

图 2A 显示实施例 4 的发现队列中，与 NC 组和 NAD 组相比，AD 组血浆中 GPR162 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值有下降的趋势，但这种差异无统计学显著性；

图 2B 显示实施例 4 的发现队列中，与 NC 组相比，AD 组血浆中 pTau217

蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (****, $p<0.0001$) ; 与 NC 组相比, NAD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低 (***, $p<0.001$) ;

图 2C 显示实施例 4 的发现队列中, 血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, $p<0.0001$)、NC 组 VS NAD 组 (***, $p<0.001$) 均存在显著性差异;

图 2D 显示实施例 4 的发现队列中, 通过受试者工作特征曲线 (Receiver operating characteristic curve ,ROC) 分析进行诊断效率评估, GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双标的曲线下面积 (Area under curve ,AUC) 为 0.85 (NC VS AD) ;

图 2E 显示实施例 4 的发现队列中, 与 NC 组和 NAD 组相比, AD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值有下降的趋势, 但这种差异无统计学显著性;

图 2F 显示实施例 4 的发现队列中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (*, $p<0.01$) ;

图 2G 显示实施例 4 的发现队列中, 血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, $p<0.0001$)、NC 组 VS NAD 组 (***, $p<0.001$) 均存在显著性差异;

图 2H 显示实施例 4 的发现队列中, 通过 ROC 分析进行诊断效率评估, GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 为 0.85 (NC VS AD) ;

图 2I 显示实施例 4 的发现队列中, 使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 数据, AUC 为 0.91 (NC VS AD) ;

图 3A 显示实施例 4 的发现队列中, 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径显著降低 (***, $p<0.001$) ;

图 3B 显示实施例 4 的发现队列中, AD 组血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径也显著降低 (**, $p<0.01$) ;

图 3C 显示实施例 4 的发现队列中, 使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 分布极值粒径数据, AUC 为 0.82(AD VS NAD) ;

图 4A 显示实施例 4 的验证队列中, 与 NC 组和 NAD 组相比, AD 组血浆中 GPR162 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值有下降的趋势, 但这种差异无统计学显著性;

图 4B 显示实施例 4 的验证队列中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (****, $p<0.0001$); 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低 (****, $p<0.0001$);

图 4C 显示实施例 4 的验证队列中, 血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, $p<0.0001$)、AD 组 VS NAD 组 (****, $p<0.0001$) 均存在显著性差异;

图 4D 显示实施例 4 的验证队列中, 通过 ROC 分析进行诊断效率评估, GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 为 0.74 (NC VS AD);

图 4E 显示实施例 4 的验证队列中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著下降 (***, $p<0.001$); 与 NC 组相比, NAD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著下降 (****, $p<0.0001$); 此外, 与 AD 组相比, NAD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著下降 (****, $p<0.0001$);

图 4F 显示实施例 4 的验证队列中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (***, $p<0.001$); NAD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低 (***, $p<0.001$);

图 4G 显示实施例 4 的验证队列中, 血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, $p<0.0001$)、NC 组 VS NAD 组 (****, $p<0.0001$)、AD 组 VS NAD 组(*, $p<0.01$)均存在显著性差异;

图 4H 显示实施例 4 的验证队列中, 通过 ROC 分析进行诊断效率评估, GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双标 AUC 为 0.84 (NC VS AD);

图 4I 显示实施例 4 的验证队列中, 使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 数据, AUC 为 0.93 (NC VS AD)。

图 5A 显示实施例 4 的验证队列中, 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径显著降低 (***,

p<0.001) ;

图 5B 显示实施例 4 的验证队列中,AD 组血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径也显著降低 (**, p<0.01) ;

图 5C 显示实施例 4 的验证队列中, 使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入
5 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 分布极值粒径数据, AUC 为 0.88(AD VS NAD) ;

图 6A 显示实施例 7 中, 与 NC 组和 NAD 组相比, AD 组血浆中 CHAT 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (**, p<0.01) ;

图 6B 显示实施例 7 中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳
10 性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (****, p<0.001) ; 与 NC 组相比, NAD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低 (***, p<0.01) ;

图 6C 显示实施例 7 中, 血浆中 CHAT 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, p<0.001)、NC 组 VS NAD 组
15 (***, p<0.05) 均存在显著性差异;

图 6D 显示实施例 7 中, 通过 ROC 分析进行诊断效率评估, CHAT 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 为 0.88 (NC VS AD) ;

图 6E 显示实施例 7 中, 通过 ROC 分析进行诊断效率评估, CHAT 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 为 0.88 (AD VS NAD) ;

图 6F 显示实施例 7 中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 NR2D 蛋白阳性
20 EV 占总 EV 数量的比例显著降低 (***, p<0.001) ; 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 NR2D 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例也显著降低 (***, p<0.001) ;

图 6G 显示实施例 7 中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳
25 性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (****, p<0.0001) ; 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例也显著降低 (***, p<0.001) ;

图 6H 显示实施例 7 中, 血浆中 NR2D 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比例在 NC 组 VS AD 组(****, p<0.0001)、NC 组 VS NAD
30 组 (***, p<0.001) 均存在显著性差异;

图 6I 显示实施例 7 中，通过 ROC 分析进行诊断效率评估，NR2D 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 为 0.82 (NC VS AD)；

图 6J 显示实施例 7 的发现队列中，通过 ROC 分析进行诊断效率评估，NR2D 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 为 0.69 (AD VS NAD)；

5 图 6K 显示实施例 7 中，使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 CHAT+pTau217 和 NR2D+pTau217 数据，AUC=0.96 (NC VS AD)；

图 6L 显示实施例 7 中，使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 CHAT+pTau217 和 NR2D+pTau217 数据，AUC=0.88 (AD VS NAD)。

10 具体实施方式

下面将参照附图更详细地描述本申请的具体实施例。虽然附图中显示了本申请的具体实施例，然而应当理解，可以以各种形式实现本申请而不应被这里阐述的实施例所限制。相反，提供这些实施例是为了能够更透彻地理解本申请，并且能够将本申请的范围完整的传达给本领域的技术人员。

15 需要说明的是，在说明书及权利要求当中使用了某些词汇来指称特定组件。本领域技术人员应可以理解，技术人员可能会用不同名词来称呼同一个组件。本说明书及权利要求并不以名词的差异来作为区分组件的方式，而是以组件在功能上的差异来作为区分的准则。如在通篇说明书及权利要求当中所提及的“包含”或“包括”为一开放式用语，故应解释成“包含但不限于”。

20 说明书后续描述为实施本申请的较佳实施方式，然所述描述乃以说明书的一般原则为目的，并非用以限定本申请的范围。本申请的保护范围当视所附权利要求所界定者为准。

在本申请中细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EV) 是细胞间通信的成熟介质，是由不同类型的激活或凋亡细胞释放的小膜囊泡，包括白细胞、血小板、红细胞和内皮细胞，在人类和动物体液中均可检测到。EV 被分为三个主要群体：凋亡小体、微泡和外泌体。

25

在本申请的一个具体实施方式中，本申请涉及一种诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病认知障碍，即“非 AD 认知障碍”的方法、系统、组合物和试剂盒，其包括：检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物，检测

30 受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物，以及基于中枢神经

系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来鉴别诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

在本申请的一个具体实施方式中，本申请涉及一种诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病认知障碍，即“非 AD 认知障碍”的方法、系统、组合物和试剂盒，其包括：检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物以确认具有中枢神经系统来源标志物的 EV 的数量和粒径，检测受试者生物体液中 EV 携带的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认具有非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径，以及基于中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来鉴别诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍，其中，检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物同时进行。

在本申请的一个具体实施方式中，本申请涉及一种诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病认知障碍，即“非 AD 认知障碍”的方法、系统、组合物和试剂盒，其包括：第一检测模块，其用于检测受试者体液中 EV 携带的中枢神经系统来源标志物以确认携带中枢神经系统来源标志物的 EV 的数量和粒径，第二检测模块，其用于检测受试者体液中 EV 携带的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认具有非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径，以及诊断模块，其基于第一检测模块和第二检测模块分别获得的中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来鉴别诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

在本申请的一个具体实施方式中，本申请涉及一种诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病认知障碍，即“非 AD 认知障碍”的方法、系统、组合物和试剂盒，其包括：第一检测模块，其用于检测受试者体液中 EV 携带的中枢神经系统来源标志物以确认携带中枢神经系统来源标志物的 EV 的数量和粒径，第二检测模块，其用于检测受试者体液中 EV 携带的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认携带非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径，以及诊断模块，其基于第一检测模块和第二检测模块分别获得的中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来鉴别诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。所述第一检测模块和所述第二检测模块同时检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者生物体液中的

非 AD 认知障碍相关的标志物；或者所述第一检测模块和所述第二检测模块为同一模块，其同时检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物。

如上所述，在本申请的方法和系统中，发明人独创性地开发出一种新的方法和系统，即采用具有不同作用的双标志物和/或多标志物来进行检测，尤其是可以同时通过这样的双标志物和/或多标志物来进行检测，从而仅仅利用少量外周体液也能够有效地诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍。这样的检测方法和系统不需要提取患者的脑脊液，大大减轻了患者的取样风险。同时由于采用具有标识中枢系统来源的标志物和与待检测疾病相关的标志物的双重标记和/或多重标记，可以大大提高检测的准确程度，如果进一步同时进行检测，还可以提高整体检测的效率。而现有的其它方法往往需要更为复杂的提取、富集、或纯化步骤等才能够获取用于诊断的 EV。本申请则简化了操作步骤，独创性地利用来源于中枢神经系统的标志物来标注来源，并结合与疾病相关的标志物，从而实现了疾病检测准确度和效率的提升。

进一步地，本申请的方法还包括：获取受试者的生物体液并对其进行预处理以富集生物体液中的 EV，检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物是指检测受试者体液中富集的 EV 中的中枢神经系统来源标志物，检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物是指检测受试者体液中富集的 EV 携带的非 AD 认知障碍相关的标志物。

进一步地，本申请的方法还包括：获取受试者的生物体液并对其进行预处理以富集生物体液中的 EV，对富集的 EV 进行筛选，检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物是指检测受试者体液中筛选的 EV 中的中枢神经系统来源标志物，检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物是指检测受试者体液中筛选的 EV 携带的非 AD 认知障碍相关的标志物。

本申请的方法还包括诊断模块统计同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量，基于统计的同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 的数量的比值来鉴别诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

在本申请的一个具体的实施方式中，同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和认知障碍相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 生物样本的数量的比

值，在健康受试者和认知障碍（AD 和非 AD）受试者中存在显著差异。例如与健康受试者相比，该比值在 AD 和非 AD 受试者中显著降低。

进一步地，诊断模块基于检测的粒径来区分罹患认知障碍的受试者罹患阿尔兹海默病或罹患非 AD 认知障碍，其中所述粒径为分布极值对应的粒径。

5 具体来说，通常将检测到中枢神经系统来源标志物和 AD 相关的标志物两者的 EV 称为双阳性 EV，基于双阳性 EV 的数量和粒径来区分罹患认知障碍的受试者罹患 AD 或罹患非 AD 认知障碍。在本申请中，分布极值对应的粒径是指颗粒分布数量最多的粒径大小。在一个具体的实施方式中，分布极值对应的粒径是通过纳米流式检测仪及相关纳米颗粒流式分析仪测量得到的。

10 在本申请中，通过中枢神经系统来源标志物和非 AD 相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 的数量的比值即可判断受试者是否罹患认知障碍。但是将认知障碍中的阿尔兹海默病和非 AD 认知障碍区分则需要进一步基于所检测到的 EV 的中枢神经系统来源标志物和 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的分布极值对应的粒径。

15 在本申请的一个具体的实施方式中，同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和认知障碍相关的标志物的分布极值对应的粒径，在 AD 和非 AD 认知障碍受试者中存在显著差异。例如与非 AD 受试者相比，该粒径在 AD 受试者中显著降低。

20 进一步地，本申请的系统还包括：富集模块，其对获取受试者的生物体液进行预处理以富集生物体液中的 EV。

所述富集模块还可以包括用于对富集的 EV 进行筛选，以进一步提高所得到的 EV 的准确度。

25 本申请还涉及一种用于检测非 AD 认知障碍的组合物，其包括：用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体，以及用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体。

本申请还涉及一种用于检测受试者非 AD 认知障碍的试剂盒，其包括：用于检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物的试剂，以及用于检测受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂。

30 在一个具体的实施方式中，用于检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物的试剂和用于检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标

志物的试剂为本申请所描述的上述组合物。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,生物体液为血液、血清、血浆、唾液、尿液、淋巴液、精液或乳汁。优选的生物体液是血液、血清、血浆、唾液或尿液。用于获取受试者生物体液的方法可以是任何本领域技术人员已知的方法。本领域技术人员可以针对所选用的生物体液的方法来从受试者中获取。

如在本文中所涉及的细胞外囊泡(Extracellular Vesicle, EV)是指从细胞膜上脱落或者从细胞分泌的双层膜结构的囊泡状小体,直径从 40nm 到 1000nm 不等。EV 主要由微囊泡(Microvesicles, MVs)和外泌体(Exosomes, Exs)组成,微囊泡是细胞激活、损伤或凋亡后从细胞膜脱落的小囊泡,直径约为 100nm~1000nm。外泌体(Exosomes)由细胞内的多泡小体(Multivesicular Bodies)与细胞膜融合后以外泌体的形式释放到细胞外,直径约为 30~150nm,可以由众多不同类型的细胞所释放,并且执行不同的细胞功能,包括细胞间通讯、抗原呈递、和蛋白质以及核酸的转移。EV 广泛存在于细胞培养上清以及各种体液(血液、淋巴液、唾液、尿液、精液、乳汁)中,携带有细胞来源相关的多种蛋白质、脂类、DNA、mRNA、miRNA 等,参与细胞间通讯、细胞迁移、血管新生和免疫调节等过程。在一个具体的实施方式中,优选所述 EV 为神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,获取受试者的生物体液并对其进行预处理以富集生物体液中的 EV 的方法可以为离心、超速离心、超滤管过滤、聚合沉降或特异性抗体捕获。在本文中,离心、超速离心、超滤管过滤、聚合沉降或特异性抗体捕获均具有本领域技术人员可以理解的含义,本领域技术人员可以根据待获取的 EV 来选择合适的方法。

在本申请的方法或系统的一个实施方式中,采用超速离心的方法来从生物体液中富集 EV,尤其是富集神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

在本申请的方法或系统的一个实施方式中,采用普通离心或超滤管过滤来富集 EV,尤其是富集神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

在本申请的方法或系统的一个实施方式中，采用脂质探针对富集 EV，尤其是富集神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV 进行筛选。在本申请的方法或系统的一个实施方式中，脂质探针的序列为 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

5 (SEQ ID NO: 1); 5'端修饰: 5'-CY3; 3'端修饰: 3'-Cholesteryl。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，所述中枢神经系统来源标志物是来源于如下神经元或细胞的生物标志物：成熟神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、未成熟神经元、施旺细胞、放射状胶质细胞、中间前体细胞、谷氨酸能神经元、GABA 能神经元、多巴胺能神经元、5-羟色胺能神经元、胆碱能神经元。在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，优选中枢神经系统来源标志物是神经元来源的生物标志物。在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，优选中枢神经系统来源标志物是星形胶质细胞和/或少突胶质细胞来源的生物标志物。

15 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源标志物为位于中枢神经系统来源的 EV 表面的标志物。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，所述中枢神经系统来源的标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶(Choline O-acetyltransferase, CHAT)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

25 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，所述中枢神经系统来源的标志物为 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)和 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)。

5 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)。

10 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D)。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)和谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D)。

15 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 GPR162 蛋白,所述非 AD 认知障碍相关的标志物为 pTau217 蛋白。

20 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 GABRD 蛋白,所述非 AD 认知障碍相关的标志物为 pTau217 蛋白。

25 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 GPR162 蛋白和 GABRD 蛋白,所述非 AD 认知障碍相关的标志物为 pTau217 蛋白。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 CHAT 蛋白,所述非 AD 认知障碍相关的标志物为 pTau217 蛋白。

30 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中,所述中枢神经系统来源的标志物为 NR2D 蛋白,所述非 AD 认知障碍相关的标志物为

pTau217 蛋白。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，所述中枢神经系统来源的标志物为 CHAT 蛋白和 NR2D 蛋白，所述非 AD 认知障碍相关的标志物为 pTau217 蛋白。

5 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物的步

 骤包括：使受试者的 EV 与经标记的、与中枢神经系统来源标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断携带中枢神经系统来源标志物的 EV 的存在及含量；所述非 AD 认知障碍相关的标志物
10 为蛋白质，检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物的步骤包括：使受试者的 EV 与经标记的、与非 AD 认知障碍相关标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断携带非 AD 认知障碍相关标志物的 EV 的存在及含量。

 进一步，在具体的实施方式中，优选时受试者的 EV 同时与经标记的、
15 与中枢神经系统来源标志物特异性反应的抗体和经标记的、与非 AD 认知障碍相关标志物特异性反应的抗体进行反应，从而高效地追踪到双标和/或多标阳性的 EV。

 进一步，在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，还包括统计检测到中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物
20 两者的 EV 的数量，和测量检测到中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物两者的 EV 的粒径，这样可以在追踪到双标和/或多标阳性的 EV 之后，还可以充分地考虑这样的 EV 的数量和/或其粒径，结合这些指标的结果来分析受试者罹患非 AD 认知障碍的风险。

 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，所述标记
25 选自以下中的一种或两种以上：荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，荧光标记物选自以下中的一种或两种以上：Qdot525、Qdot545、Qdot565、Qdot585、Qdot605、Qdot625、Qdot655、Qdot705、Qdot800、Alexa350、Alexa 405、
30 Alexa488、Alexa 532、Alexa546、Alexa555、Alexa 568、Alexa 594、Alexa647、

Alexa700、Alexa750。

在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记均可以采用本领域技术人员所熟知的方法。

- 5 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，检测反应后标记信号的强度以判断中枢神经系统来源标志物的存在及含量可以采用，例如免疫测定，如 ELISA、Luminex、MSD、Quanterix、Singulex、eCL8000、Cobas 是用于测量蛋白质生物标志物的优选方法。

- 10 在本申请的方法或系统或组合物或试剂盒的具体实施方式中，用于统计检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物两者的 EV 的数量，和/或测量检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物两者的 EV 的粒径的检测仪器，包括但不限于粒度分析仪、纳米流式细胞仪。例如，利用纳米颗粒追踪技术检测 EV 的粒径，以及利用纳米流式分析技术检测上述双阳性的 EV 的数量。

- 15 在本申请的一个具体的实施方式中，涉及一种用于检测非 AD 认知障碍的组合物，其包括：用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体，以及用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体。

- 20 在本申请的一个具体的实施方式中，所述用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体和所述用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体是经标记的抗体，优选所述标记选自以下中的一种或两种以上：荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

在本申请的一个具体的实施方式中，一种用于检测非 AD 认知障碍的组合物，其包括：用于靶向 GPR162 蛋白的抗体，以及用于靶向 tau(pTau217)蛋白的抗体。

- 25 在本申请的一个具体的实施方式中，一种用于检测非 AD 认知障碍的组合物，其包括：用于靶向 GABRD 蛋白的抗体，以及用于靶向 tau(pTau217)蛋白的抗体。

- 30 本申请涉及一种用于检测受试者非 AD 认知障碍的试剂盒，其包括：用于检测受试者生物体液中的中枢神经系统来源标志物的试剂，以及用于检测受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂。所述用于检

测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物的试剂和用于检测受试者生物体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂可以为上述本申请涉及的组合物。

在本申请涉及的试剂盒中,还包括用于获取受试者的 EV 的试剂和装置。

- 5 其中,用于获取 EV 的试剂和装置可以包括本领域技术人员所知的常用的试剂盒和装置。

利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物,即使仅仅利用受试者的少量外周体液就能够诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍进行诊断及鉴别。

- 10 利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物能够有效地从外周体液中富集且特异性地标记能够反映非 AD 认知障碍变化的生物标志物,相比直接检测外周体液中的疾病相关标志物,诊断效果更优。

- 利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物可以有效地利用外周体液来进行检测,从而可以避免创伤性地获取受试者的脑脊液,大大降低受试者的取样风险、大大减轻检测的困难程度、大大增加检测的临床应用性和推广性。
- 15 利用本申请的方法、系统、试剂盒以及组合物,能够同时检测中枢神经系统来源标志物与疾病相关标志物,降低样本检测时间,更加高效、便捷。

实施例

实施例 1

- 20 超速离心对 EV 进行富集

1. 来自受试者的血浆在 37℃ 迅速解冻 (2min 内), 涡旋混匀;
2. 血浆样品 (>300 μ L) 在 4℃, 2,000 $\times$ g 条件下离心 15min, 取上清;
3. 接着在 4℃, 12,000 $\times$ g 条件下离心 30min, 取上清;
4. 吸取 100 μ L 离心后的血浆至 1.5mL 超离管中, 并加入 900 μ L 0.22 μ m
- 25 过滤的磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH7.4), 混匀;
5. 在 4℃, 100,000 $\times$ g 条件下, 超速离心 70min;
6. 弃去约 900 μ L 上清, 向剩余液体中 (约 100 μ L) 加入 200 μ L PBS (0.22 μ m 滤膜过滤), 使用 200 μ L 量程移液器吹吸 200 次, 重悬沉淀;
7. 向重悬后的液体中加入 700 μ L PBS(0.22 μ m 滤膜过滤), 混匀;
- 30 8. 在 4℃, 100,000 $\times$ g 条件下, 超速离心 70min;

9. 弃去上清，保留约 150 μ L 液体，使用 200 μ L 量程移液器吹吸 200 次，重悬沉淀；
10. 分装，保存至 -80 $^{\circ}$ C 待用。

5 实施例 2

对超速离心获得的 EV 进行表征

使用 Nanofcm 对超速离心获得的 EV 的粒径及浓度进行表征。

1. 首先使用 250 nm 荧光质控球、68~155 nm 粒径质控球（购自厦门福流生物科技有限公司）对 Nanofcm 进行调试，使其荧光检测、粒径区分处于最佳状态（图 1A、1B）。其中，图 1A 显示单颗粒纳米流式细胞仪使用 250 nm 荧光质控球的质控结果。散射光通道（SS），绿色荧光通道（FITC）和红色荧光通道（PC5）均处于信号值较高（第 1 列）、信号峰均一（第 2, 3 列）的状态；说明单颗粒纳米流式细胞仪对荧光信号的检测已调整至较好的状态。图 1B 显示单颗粒纳米流式细胞仪使用 68~155 nm 粒径质控球的质控结果。粒径质控球是由 4 种粒径不同的球混合而成，如图 1B 所示，单颗粒纳米流式细胞仪能够精确检测到该粒径球中 4 种不同粒径群的颗粒；说明该仪器对粒径信号的检测已调整至较好的状态。

2. 取超速离心获得的细 EV，根据具体情况，将其稀释至仪器记录颗粒数 4000-8000 个/min 为佳。

- 20 3. 根据 Nanofcm 记录结果，对超速离心获得的细 EV 的粒径分布、浓度情况进行分析（图 1C）。

实施例 3

利用标记方法标记用于检测生物标志物的抗体

- 25 使用的试剂：

利用 Alexa Fluor 荧光标记 kit，来标记中枢神经系统来源 EV 生物标志物的抗体和相关阿尔茨海默病生物标志物的抗体。其中，中枢神经系统来源 EV 生物标志物的抗体为 GPR162 和 GABRD 多克隆抗体。阿尔茨海默病生物标志物的抗体为 pTau217 多克隆抗体。其中，标记 GPR162 和 GABRD 多克隆抗体的试剂为 ZenonTM Alexa FluorTM 488 Rabbit IgG Labeling Kit，购买

30

自 Thermo Fisher Scientific; 标记 pTau217 多克隆抗体的试剂为 Zenon™ Alexa Fluor™ 647 Rabbit IgG Labeling Kit, 购买自 Thermo Fisher Scientific。

1. 样本封闭

- (1) 取 10 μ L 利用上述方法经超速离心分离的 EV 至 0.6 mL 离心管;
- 5 (2) 加入 10 μ L 2% BSA 溶液 (0.22 μ m 滤膜过滤), 混匀;
- (3) 室温 (25-26°C) 封闭 1 小时, 以去除非特异性结合;
- (4) 加入 10 μ L PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释, 终止封闭。

2. 样本标记

本实验涉及中枢神经系统特异性标志物 GPR162 和 GABRD; 疾病相关标志物抗体 pTau217。使用 Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG Labeling Kit 标记 GPR162 和 GABRD, Zenon™ Alexa Fluor™ 647 Rabbit IgG Labeling Kit 标记 pTau217;

- (1) 取 1 μ g 相应标志物的抗体, 用 PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释至 5 μ L (0.2 μ g/ μ L);
- 15 (2) 加入 5 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ Labeling Kit A 液, 混匀后室温 (25-26°C) 避光孵育 20min;
- (3) 向 (2) 步骤的溶液中加入 3 μ L (3 μ g) Zenon™ Alexa Fluor™ Labeling Kit B 液 (B 液稀释至 1 μ g/ μ L), 混匀后室温 (25°C) 避光孵育 10min, 以淬灭游离荧光;
- 20 (4) 加入 PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释至总体积 50 μ L;
- (5) 取 5 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ 647 Rabbit IgG Labeling Kit 标记的 pTau217 于步骤 1 封闭完毕的样本中, 混匀后室温 (25-26°C) 避光孵育 5min;
- (6) 加入 3 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG Labeling Kit 标记的 GPR162 或 GABRD 于步骤 (5) 样本中, 混匀后 4°C 避光孵育过夜;

25 3. 样本固定

- (1) 次日, 在标记完毕的样本中加入 20 μ L 4% PFA (0.22 μ m 滤膜过滤), 混匀后室温 (25-26°C) 避光孵育 20min;
- (2) 加入 50 μ L PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释固定后的样本, 待用。

4. 检测

30 使用 NanoFCM 纳米流式分析仪进行检测标记信号强度与粒径分布, 从

而确定相关生物标志物的存在及含量。

实施例 4

在大量临床样本中检测上述生物标记物的鉴别诊断能力

5 1. 发现队列

分别获取年龄、性别匹配的健康对照（NC 组）28 例、阿尔茨海默病受试者（AD 组）44 例、非 AD-认知障碍（NAD 组）31 例的血浆样本，作为发现队列，利用上述实施例 3 方法进行实验。

10 利用纳米流式分析仪 NanoFCM 分别检测 GPR162、GABRD 单荧光标记、pTau217 单荧光标记、GPR162 和 pTau217 双荧光标记的 EV 数量、以及 GABRD 和 pTau217 双荧光标记的 EV 数量，计算其占总 EV 数量的比值，检测其区分 NC、AD、NAD 的能力。

发现队列中，与 NC 组和 NAD 组相比，AD 组血浆中 GPR162 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值有下降的趋势，但这种差异无统计学显著性（图 2A）；
15 与 NC 组相比，AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低（****， $p<0.0001$ ）；与 NC 组相比，NAD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低（***， $p<0.001$ ）（图 2B）；血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组（****， $p<0.0001$ ）、NC 组 VS NAD 组（***， $p<0.001$ ）均存在显著性差异（图
20 2C）。通过受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve ,ROC）分析进行诊断效率评估，GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双标的曲线下面积（area under curve ,AUC）为 0.85（图 2D）。

发现队列中，与 NC 组和 NAD 组相比，AD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值有下降的趋势，但这种差异无统计学显著性（图 2E）；
25 与 NC 组相比，AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低（*， $p<0.01$ ）（图 2F）；血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组（****， $p<0.0001$ ）、NC 组 VS NAD 组（***， $p<0.001$ ）均存在显著性差异（图 2G）。通过 ROC 分析进行诊断效率评估，GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双标的曲线下面积（area under
30 curve ,AUC）为 0.85（图 2H）。

使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 数据, AUC 为 0.91 (NC VS AD) (图 2I)。

经分析, 依靠 GPR162+pTau217 或者 GABRD+pTau217 双阳性 EV 占总 EV 数量的比值, 虽然能够很好地区分 NC 和 AD 患者; 但是对 AD 和 NAD 的鉴别诊断能力有限。因此, 将粒径分布作为参考因素, 探索出使用极值粒径来对 AD 和 NAD 进行区分; 即: 不同实验组样本, 目标蛋白阳性的囊泡的粒径分布可能存在差异; 我们将目标蛋白阳性囊泡数目最大值对应的粒径进行分析, 结果如下:

发现队列中, 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径显著降低 (***, $p<0.001$) (图 3A); AD 组血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径也显著降低 (**, $p<0.01$) (图 3B); 使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 分布极值粒径数据, AUC 为 0.82 (AD VS NAD) (图 3C)。

发现队列的结果显示, 血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值以及血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值均具有较好的区分健康对照和阿尔茨海默病的潜力, 尤其是采用 GPR162+pTau217 双阳性 EV 比例与 GABRD+pTau217 双阳性 EV 比例进行联合诊断。对 GPR162+pTau217 双阳性 EV 和 GABRD+pTau217 双阳性 EV 分布极值粒径进行联合分析, 能够较好地鉴别诊断阿尔茨海默病与非 AD-痴呆。

紧接着, 在样本量更大的验证队列中进行验证。

2. 验证队列

分别获取年龄、性别匹配的健康对照 (NC 组) 57 例、阿尔茨海默病受试者 (AD 组) 88 例、非 AD-痴呆 (NAD 组) 62 例的血浆样本, 作为验证队列, 利用上述实施例 3 方法进行实验。

验证队列中, 与 NC 组和 NAD 组相比, AD 组血浆中 GPR162 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值有下降的趋势, 但这种差异无统计学显著性 (图 4A); 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显

著降低 (****, $p < 0.0001$) ; 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低 (****, $p < 0.0001$) (图 4B); 血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, $p < 0.0001$)、AD 组 VS NAD 组 (****, $p < 0.0001$) 均存在显著性差异 (图 4C)。通过受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve ,ROC) 分析进行诊断效率评估, GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双标的曲线下面积 (area under curve ,AUC) 为 0.74 (NC VS AD) (图 4D)。

验证队列中, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著下降 (***, $p < 0.001$) ; 与 NC 组相比, NAD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著下降 (****, $p < 0.0001$) ; 此外, 与 AD 组相比, NAD 组血浆中 GABRD 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著下降 (****, $p < 0.0001$) (图 4E) ; 与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (***, $p < 0.001$) ; NAD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值也显著降低 (***, $p < 0.001$) (图 4F); 血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值在 NC 组 VS AD 组(****, $p < 0.0001$)、NC 组 VS NAD 组 (****, $p < 0.0001$)、AD 组 VS NAD 组(*, $p < 0.01$)均存在显著性差异(图 4G)。通过 ROC 分析进行诊断效率评估, GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双标的曲线下面积 (area under curve ,AUC) 为 0.84 (图 4H)。

使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 数据, AUC 为 0.93 (NC VS AD) (图 4I)。

与发现队列情况相似, 依靠 GPR162+pTau217 或 GABRD+pTau217 双阳性 EV 占总 EV 数量的比值, 虽然能够很好地区分 NC 和 AD 患者; 但是对 AD 和 NAD 的鉴别诊断能力有限。因此, 我们依旧将粒径分布作为参考因素, 使用极值粒径来对 AD 和 NAD 进行区分; 我们将目标蛋白阳性囊泡数目最大值对应的粒径进行分析, 结果如下:

验证队列中, 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径显著降低 (***, $p < 0.001$) (图 5A) ; AD 组血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 分布极值对应的粒径也显著降低 (**, $p < 0.01$) (图 5B) ; 使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入

GPR162+pTau217 和 GABRD+pTau217 分布极值粒径数据, AUC 为 0.88(AD VS NAD) (图 5C)。

验证队列的结果与发现队列一致, 即: 血浆中 GPR162 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值以及血浆中 GABRD 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比值均具有较好的区分健康对照和阿尔茨海默病的潜力, 尤其是采用 GPR162+pTau217 双阳性 EV 比例与 GABRD+pTau217 双阳性 EV 比例进行联合诊断。对 GPR162+pTau217 双阳性 EV 和 GABRD+pTau217 双阳性 EV 分布极值粒径进行联合分析, 能够较好地鉴别诊断阿尔茨海默病与非 AD-痴呆。

综上, 实施例 4 结果表明, 采用 GPR162+pTau217 双阳性 EV 比例与 GABRD+pTau217 双阳性 EV 比例进行联合分析, 能够较好地地区分健康对照和阿尔茨海默病。对 GPR162+pTau217 双阳性 EV 和 GABRD+pTau217 双阳性 EV 分布极值粒径进行联合分析, 能够较好地鉴别诊断阿尔茨海默病与非 AD-痴呆。

实施例 5

用 PEG8000 沉降富集 EV

1. 来自受试者的血浆在 37℃ 迅速解冻 (2min 内), 涡旋混匀;
2. 血浆样品 (>300 μ L) 在 4℃, 2,000 $\times$ g 条件下离心 15min, 取上清;
3. 接着在 4℃, 12,000 $\times$ g 条件下离心 30min, 取上清;
4. 吸取 10 μ L 离心后的血浆至 1.5mL 离心管中, 加入 70 μ L PBS 和 20 μ L 40% PEG8000, 充分吹打混匀, 室温静置 30min;
5. 12000g, 4℃, 离心 20min;
6. 弃上清, 加入 100 μ L PBS 重悬, 吹打混匀, 10 μ L/管进行分装, 保存于 -80℃ 备用。

实施例 6

1. 样本封闭

- (1) 取 10 μ L 利用上述方法经 PEG8000 的 EV 至 0.6mL 离心管;
- (2) 加入 10 μ L 2% BSA 溶液 (0.22 μ m 滤膜过滤), 混匀;

(3) 室温 (25-26℃) 封闭 1 小时, 以去除非特异性结合;

(4) 加入 10 μ L PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释, 终止封闭。

2. 样本标记

利用标记方法标记用于检测生物标志物的抗体

5 使用的试剂:

利用 Alexa Fluoro 荧光标记 kit, 来标记 CHAT、NR2D, 以及 pTau217 的抗体。其中, 标记 CHAT 抗体的试剂为 Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Mouse IgG2b Labeling Kit, 购买自 Thermo Fisher Scientific; 标记 NR2D 抗体的试剂为 Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG Labeling Kit, 购买自 Thermo Fisher Scientific; 标记 pTau217 抗体的试剂为 Zenon™ Alexa Fluor™ 647 Rabbit IgG Labeling Kit, 购买自 Thermo Fisher Scientific。

(1) 取 1 μ g 相应标志物的抗体, 用 PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释至 5 μ L (0.2 μ g/ μ L);

15 (2) 加入 5 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ Labeling Kit A 液, 混匀后在室温 (25-26℃) 避光孵育 20min;

(3) 向 (2) 步骤的溶液中加入 3 μ L (3 μ g) Zenon™ Alexa Fluor™ Labeling Kit B 液 (B 液稀释至 1 μ g/ μ L), 混匀后室温 (25℃) 避光孵育 10min, 以淬灭未结合的游离荧光素;

(4) 加入 PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释至总体积 50 μ L;

20 (5) 取 5 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ 647 Rabbit IgG Labeling Kit 标记的 pTau217 于步骤 1 封闭完毕的样本中, 混匀后室温 (25-26℃) 避光孵育 5min;

(6) 加入 3 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG Labeling Kit 标记的 CHAT 或 NR2D 于步骤 (5) 样本中, 混匀后 4℃ 避光孵育过夜;

3. 探针孵育

25 使用试剂: 合成 DNA anchor, 其序列为 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO: 1); 5'端修饰: 5'-CY3; 3'端修饰: 3'-Cholesteryl。该脂质探针能够与 EV 膜结合, 探针标记阳性的颗粒被认为是真正的 EV; 该方法进一步提高了 EV 标记的科学性和准确度。

30 (1) 次日, 加入 62 μ L PBS+5 μ L 脂质探针 (脂质探针工作液浓度 10

μM) (反应体积 100 μl , 探针终浓度 500nM), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1h。

(2) 在标记完毕的样本中加入 100 μL 4% PFA (0.22 μm 滤膜过滤), 混匀后室温 (25-26 $^{\circ}\text{C}$) 避光孵育 20min;

(3) 用 PBS 稀释到合适浓度上机, 标准: 用 CytoFLEX 检测, 每秒颗粒数小于 1 万个颗粒。在脂质探针门下收集 50000 个颗粒 (此情况下总颗粒数约为 100000; 换言之, 使用脂质探针对实施例 5 得到颗粒进行筛选, 其中真正的 EV 约为 50%)。

4.检测

使用 CytoFLEX 的 VSSC 模式检测脂质探针阳性情况下, 相关蛋白标记的阳性比例。

实施例 7

在临床样本中检测上述生物标记物的鉴别诊断能力

分别获取年龄、性别匹配的健康对照 (NC 组) 20 例、阿尔茨海默病受试者 (AD 组) 20 例、非 AD-痴呆 (NAD 组) 20 例的血浆样本, 利用上述实施例 6 的方法进行实验。

利用 CytoFLEX 的 VSSC 模式分别检测 CHAT、NR2D 单荧光标记、pTau217 单荧光标记、CHAT 和 pTau217 双荧光标记的 EV 数量、以及 NR2D 和 pTau217 双荧光标记的 EV 数量, 计算其占脂质探针标记阳性的 EV 数量的比例, 检测其区分 NC、AD、NAD 的能力。

结果显示, 与 NC 组相比, AD 组血浆中 CHAT 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例显著降低 (***, $p<0.001$); 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 CHAT 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例也显著降低 (**, $p<0.01$) (图 6A)。与 NC 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例显著降低 (***, $p<0.001$); 与 NAD 组相比, AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例也显著降低 (**, $p<0.01$) (图 6B); 血浆中 CHAT 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比例在 NC 组 VS AD 组 (***, $p<0.001$)、AD 组 VS NAD 组 (*, $p<0.05$) 均存在显著性差异 (图 6C)。通过 ROC 分析进行诊断效率评估, CHAT 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 分别为 0.88 (NC VS AD) (图 6D), $\text{AUC}=0.82$ (AD vs NAD) (图 6E)。

此外，与 NC 组相比，AD 组血浆中 NR2D 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例显著降低 (***, $p < 0.001$)；与 NAD 组相比，AD 组血浆中 NR2D 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例也显著降低 (***, $p < 0.001$) (图 6F)。与 NC 组相比，AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比值显著降低 (****, $p < 0.0001$)；与 NAD 组相比，AD 组血浆中 pTau217 蛋白阳性 EV 占总 EV 数量的比例也显著降低 (***, $p < 0.001$) (图 6G)；血浆中 NR2D 蛋白和 pTau217 蛋白双阳性 EV 占总 EV 数量的比例在 NC 组 VS AD 组 (****, $p < 0.0001$)、NC 组 VS NAD 组 (***, $p < 0.001$) 均存在显著性差异 (图 6H)。通过 ROC 分析进行诊断效率评估，NR2D 蛋白和 pTau217 蛋白双标的 AUC 分别为 0.82 (NC VS AD) (图 6I)，0.69 (AD vs NAD) (图 6J)。

使用逻辑回归分析 Enter 方法纳入 CHAT+pTau217 和 NR2D+pTau217 数据，AUC=0.96 (NC VS AD) (图 6K)；AUC=0.88 (AD VS NAD) (图 6L)。

经分析，依靠 CHAT+pTau217 和 NR2D+pTau217 双阳性 EV 占总 EV 数量的比例，不仅能够很好地区分 NC 和 AD 患者；也能有效鉴别诊断 AD 和 NAD。

以上所述，仅是本申请的较佳实施例而已，并非是对本申请作其它形式的限制，任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本申请技术方案内容，依据本申请的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型，仍属于本申请技术方案的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种用于诊断及鉴别诊断非阿尔兹海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 认知障碍的系统, 其包括:

5 第一检测模块, 其用于检测受试者体液中细胞外囊泡 (Extracellular Vesicle, EV) 的中枢神经系统来源生物标志物, 以确认携带中枢神经系统来源特异性标志物的 EV 的数量和粒径;

 第二检测模块, 其用于检测受试者体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认携带非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径;

10 诊断模块, 其基于第一检测模块和第二检测模块分别获得的中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

 2. 根据权利要求 1 所述的系统, 其中,

15 所述第一检测模块和所述第二检测模块同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物; 或者

 所述第一检测模块和所述第二检测模块为同一模块, 其同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关生物标志物。

20 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的系统, 其还包括:

 富集模块, 其用于获取受试者的体液并对其进行预处理以富集体液中的 EV。

 4. 根据权利要求 3 所述的系统, 其中, 所述富集模块还包括用于对富集的 EV 进行筛选。

25 5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的系统, 其中,

 诊断模块统计同时检测到携带中枢神经系统来源生物标志物和非 AD 认知障碍相关的生物标志物的 EV 的数量, 基于统计的同时检测到携带中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 的数量的比值来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

30 6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的系统, 其中, 所述粒径为相关蛋白阳性 EV 分布数量最多处所对应的粒径, 诊断模块基于检测的粒径来鉴别诊

断出罹患认知障碍的受试者罹患非 AD 认知障碍而不是 AD。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的系统，其中，所述 EV 为神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

5 8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的系统，其中，所述体液选自血液、血清、血浆、唾液、尿液、淋巴液、精液或乳汁中的一种或两种以上。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的系统，其中，所述中枢神经系统来源标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

10

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的系统，其中，所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

15 11. 根据权利要求 3 所述的系统，其中，所述富集模块具有进行以下步骤中的一种或两种以上的子模块：离心、超速离心、超滤管过滤、聚合沉降、特异性抗体捕获。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的系统，其中第一检测模块用于使受试者的 EV 与经标记的、与中枢神经系统来源标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断具有中枢神经系统来源生物标志物的 EV 的存在及含量。

20

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的系统，其中，第二检测模块用于使受试者的 EV 与经标记的、与非 AD 认知障碍相关标志物特异性反应的抗体进行反应，以及检测反应后标记信号的强度以判断具有非 AD 认知障碍相关标志物的 EV 的存在及含量。

25

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的系统，其中，所述标记选自以下中的一种或两种以上：荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

15. 一种用于诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍的组合物，其包括：
用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体，以及

30

用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中, 所述中枢神经系统来源标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D (Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的组合物, 其中, 所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

18. 根据权利要求 15-17 中任一项所述的组合物, 其中, 所述用于靶向中枢神经系统来源标志物的抗体和所述用于靶向非 AD 认知障碍相关的标志物的抗体是经标记的抗体, 优选所述标记选自以下中的一种或两种以上: 荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

19. 一种用于检测受试者非 AD 认知障碍的试剂盒, 其包括:

用于检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物的试剂, 以及

用于检测受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂。

20. 根据权利要求 19 所述的试剂盒, 其中, 所述用于检测受试者生物体液中 EV 的中枢神经系统来源标志物的试剂和用于检测受试者生物体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物的试剂为权利要求 15-18 中任一项所述的组合物。

21. 根据权利要求 19 所述的试剂盒, 还包括:

用于获取受试者的生物样本的试剂和装置, 优选用于获取受试者 EV 的试剂和装置。

22. 一种用于诊断及鉴别诊断非 AD 认知障碍的方法, 其包括:

第一检测步骤, 其检测受试者体液中 EV 携带的中枢神经系统来源生物标志物, 以确认携带中枢神经系统来源特异性标志物的 EV 的数量和粒径;

第二检测步骤, 其检测受试者体液中 EV 的非 AD 认知障碍相关的标志物以确认携带非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量和粒径;

诊断步骤, 其基于第一检测步骤和第二检测步骤分别获得的中枢神经系统来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的检测结果来诊断受试者是否

罹患非 AD 认知障碍。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中，

所述第一检测步骤和所述第二检测步骤同时检测受试者体液中的中枢神经方法来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关的标志物；

5 或者

所述第一检测步骤和所述第二检测步骤为同一检测步骤，其同时检测受试者体液中的中枢神经系统来源标志物和检测受试者体液中的非 AD 认知障碍相关生物标志物。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法，其还包括：

10 富集步骤，其获取受试者的体液并对其进行预处理以富集体液中的 EV。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述富集步骤还包括对富集的 EV 进行筛选。

26. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的方法，其中，

15 诊断步骤统计同时检测到携带中枢神经方法来源生物标志物和非 AD 认知障碍相关的生物标志物的 EV 的数量，基于统计的同时检测到携带中枢神经方法来源标志物和非 AD 认知障碍相关的标志物的 EV 的数量占总 EV 的数量的比值来诊断受试者是否罹患非 AD 认知障碍。

27. 根据权利要求 22-26 中任一项所述的方法，其中，所述粒径为相关蛋白阳性 EV 分布数量最多处所对应的粒径，诊断步骤基于检测的粒径来鉴别诊断出罹患认知障碍的受试者罹患非 AD 认知障碍而不是 AD。

28. 根据权利要求 22-27 中任一项所述的方法，其中，所述 EV 为神经元来源的 EV、星形胶质细胞来源的 EV、少突胶质细胞来源的 EV 或小胶质细胞来源的 EV。

29. 根据权利要求 22-28 中任一项所述的方法，其中，所述体液选自血液、血清、血浆、唾液、尿液、淋巴液、精液或乳汁中的一种或两种以上。

30. 根据权利要求 22-29 中任一项所述的方法，其中，所述中枢神经系统来源标志物为 G 蛋白偶联受体 162(G Protein-Coupled Receptor 162, GPR162)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 δ (Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Delta, GABRD)、乙酰胆碱转移酶 (Choline O-acetyltransferase, CHAT)、谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2D(Glutamate

ionotropic receptor NMDA type subunit 2D, NR2D) 中的一种或两种以上。

31. 根据权利要求 22-30 中任一项所述的方法, 其中, 所述非 AD 认知障碍相关的标志物为第 217 位磷酸化 tau(pTau217)蛋白。

5 32. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中, 所述富集步骤具有进行以下步骤中的一种或两种以上的子步骤: 离心、超速离心、超滤管过滤、聚合沉降、特异性抗体捕获。

33. 根据权利要求 22-32 中任一项所述的方法, 其中第一检测步骤使受试者的 EV 与经标记的、与中枢神经系统来源标志物特异性反应的抗体进行反应, 以及检测反应后标记信号的强度以判断具有中枢神经方法来源生物标志物的 EV 的存在及含量。

34. 根据权利要求 22-33 中任一项所述的方法, 其中, 第二检测步骤使受试者的 EV 与经标记的、与非 AD 认知障碍相关标志物特异性反应的抗体进行反应, 以及检测反应后标记信号的强度以判断具有非 AD 认知障碍相关标志物的 EV 的存在及含量。

15 35. 根据权利要求 33 或 34 所述的方法, 其中, 所述标记选自以下中的一种或两种以上: 荧光标记、同位素标记、酶标记、化学发光剂标记、量子点标记或胶体金标记。

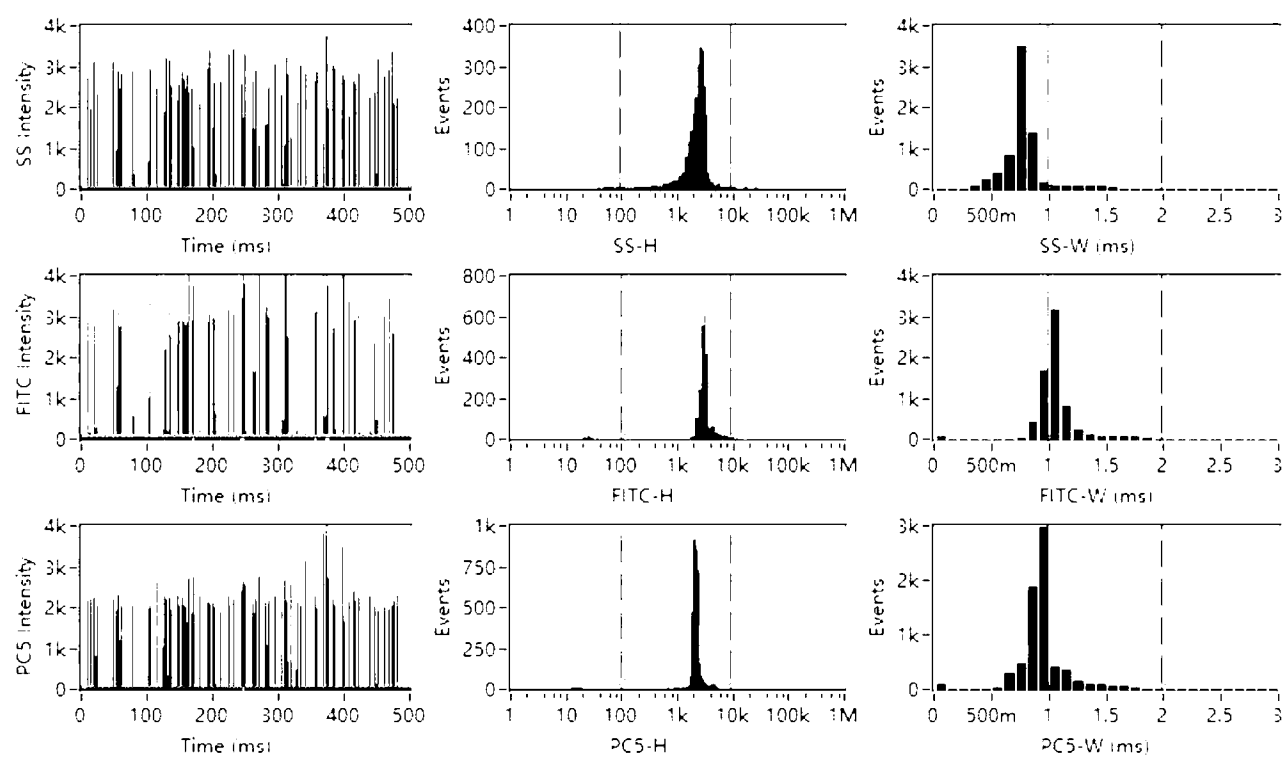


图 1A

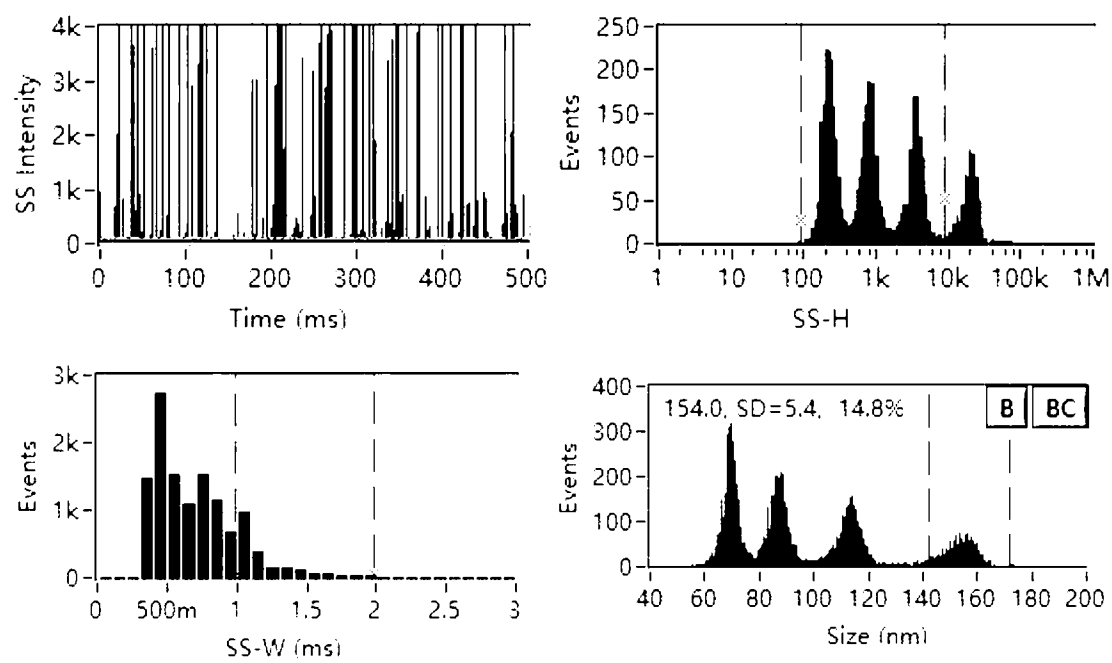


图 1B

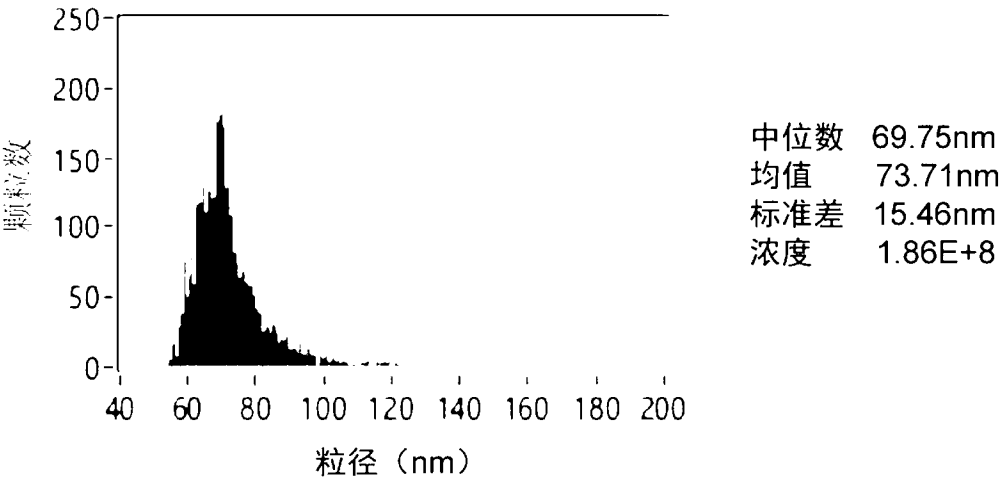


图 1C

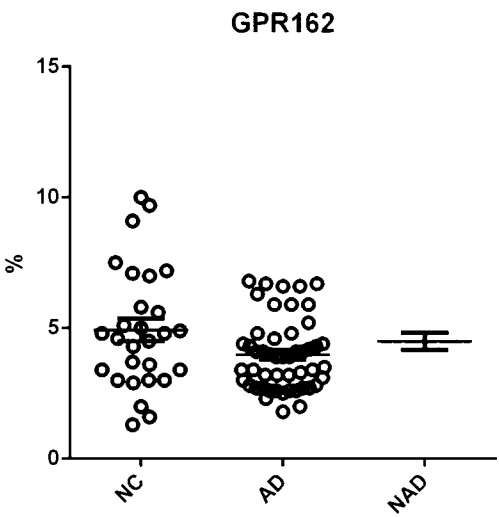


图 2A

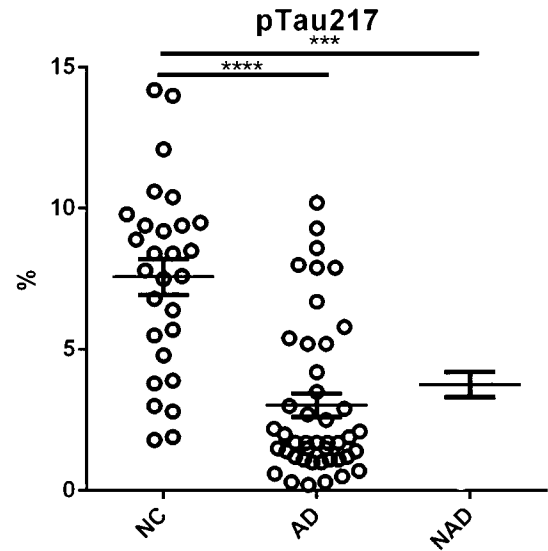


图 2B

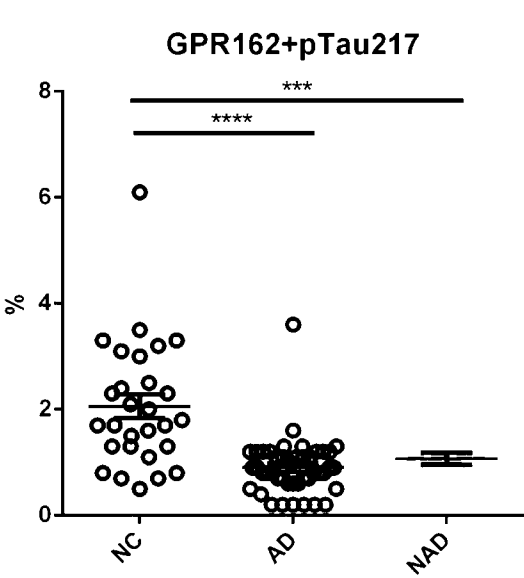


图 2C

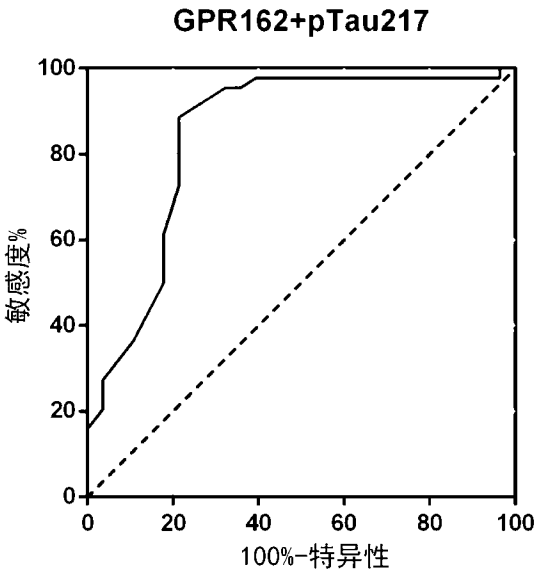


图 2D

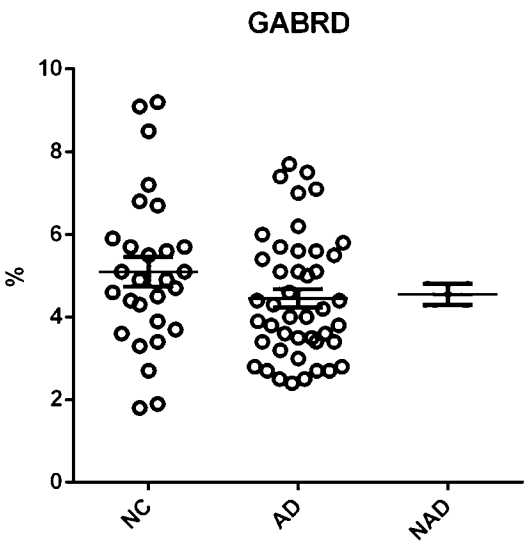


图 2E

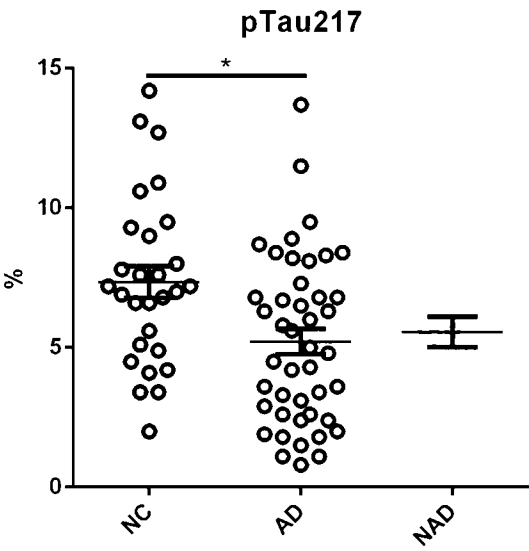


图 2F

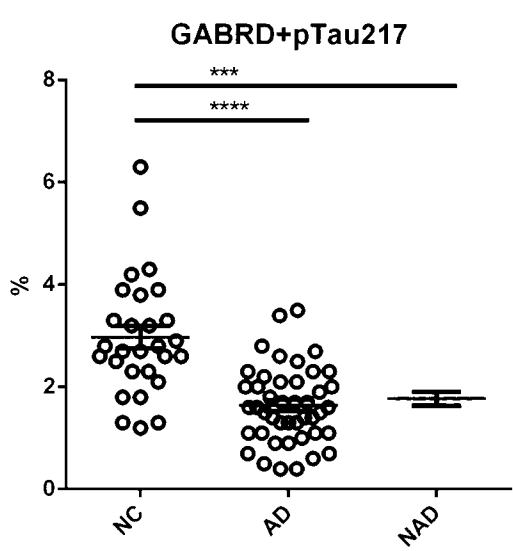


图 2G

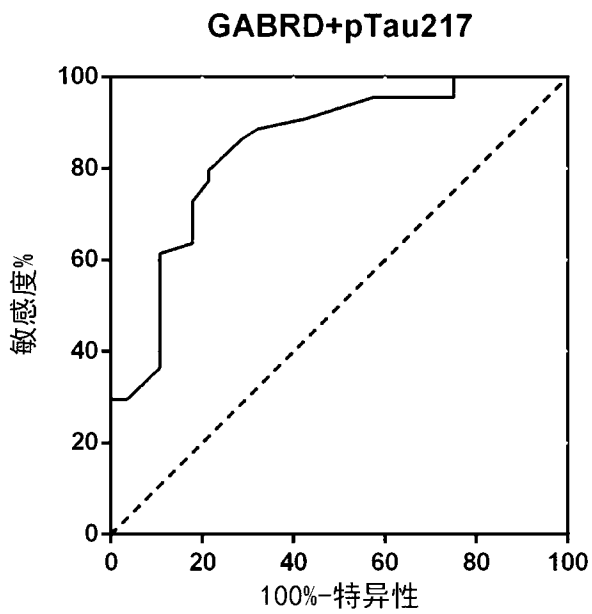


图 2H

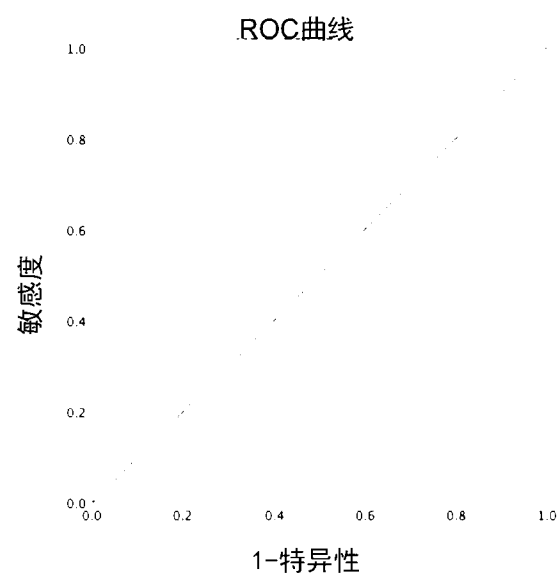


图 2I

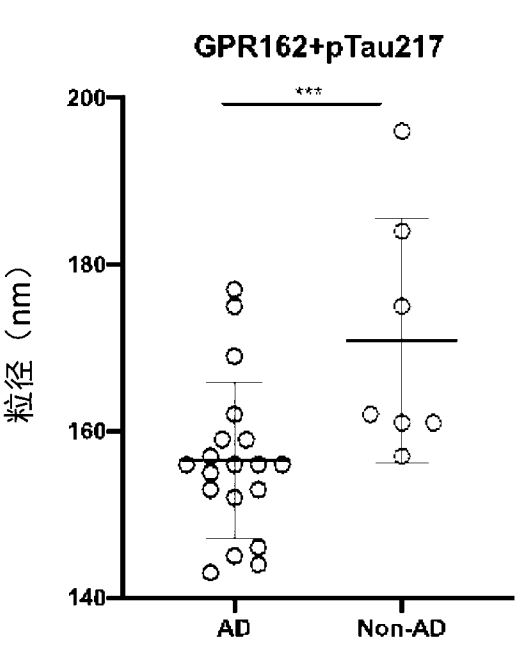


图 3A

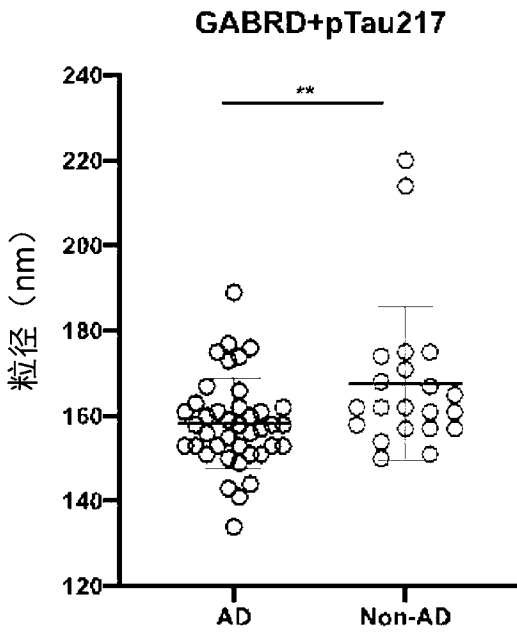


图 3B

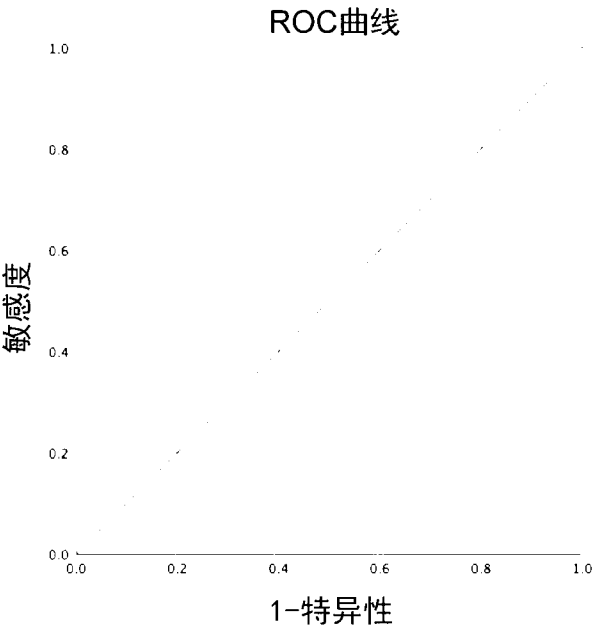


图 3C

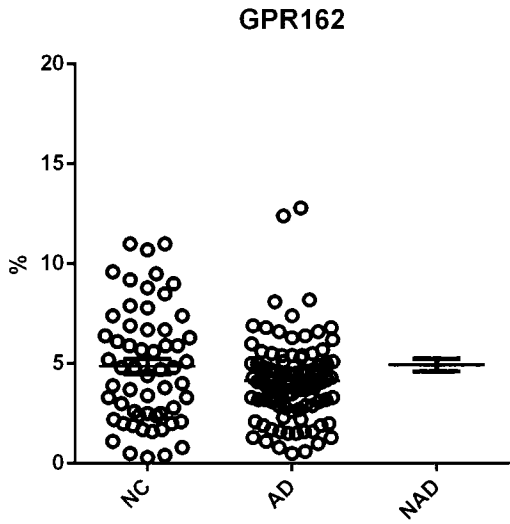


图 4A

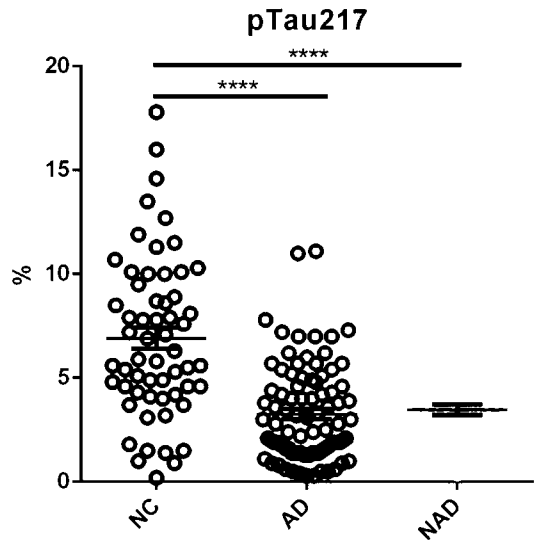


图 4B

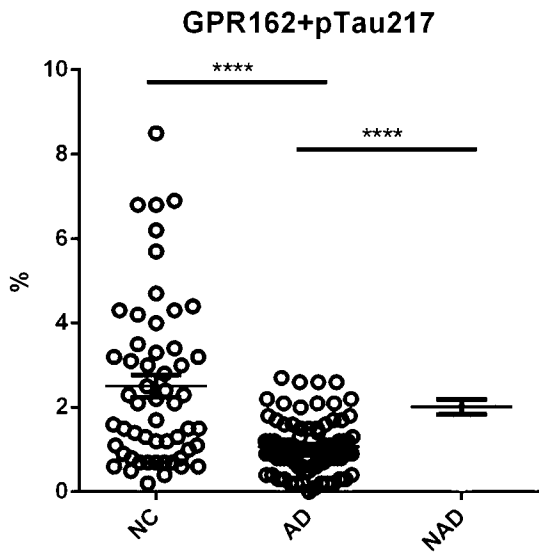


图 4C

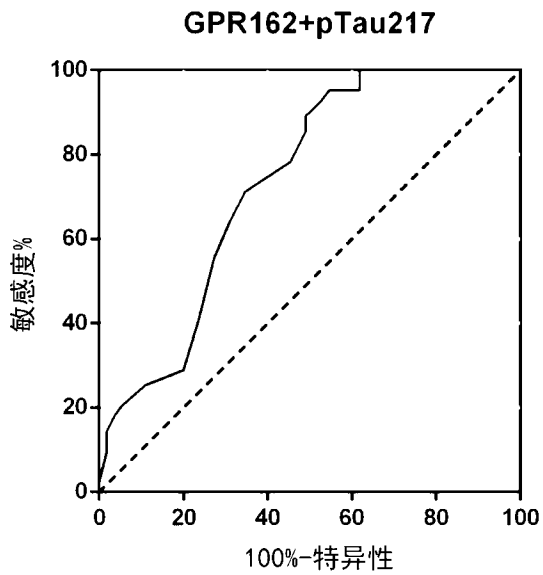


图 4D

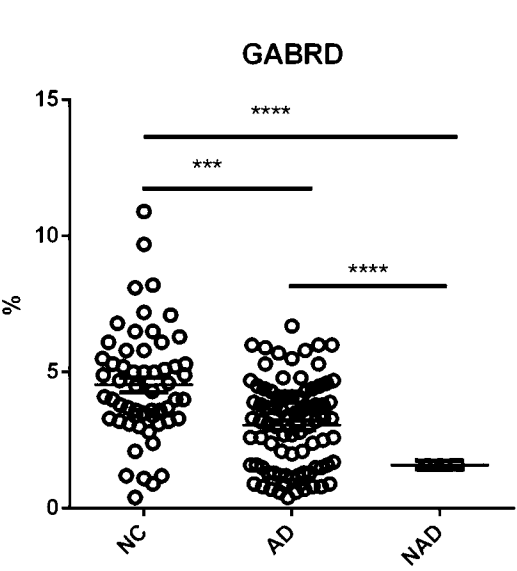


图 4E

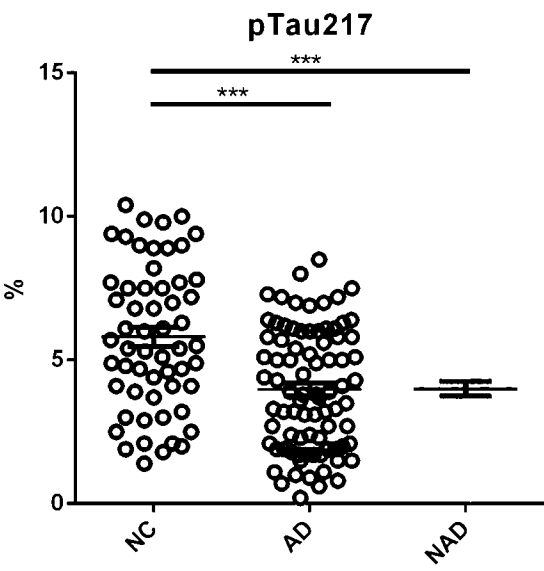


图 4F

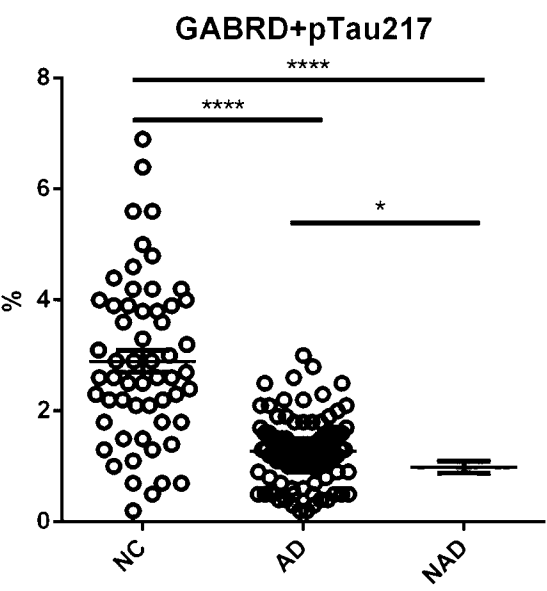


图 4G

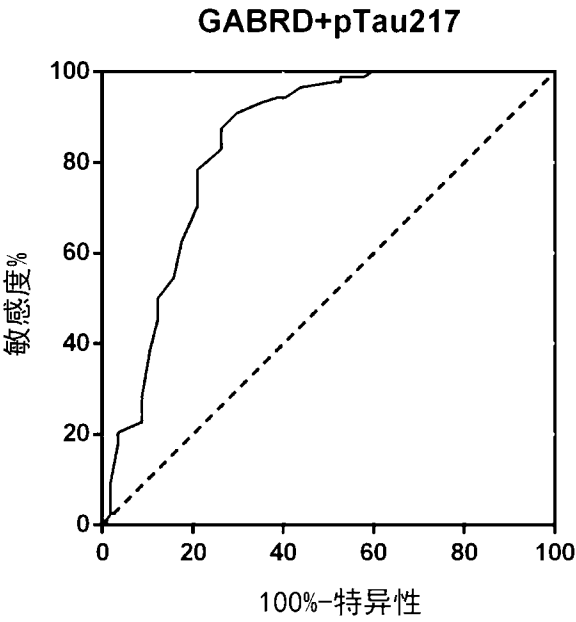


图 4H

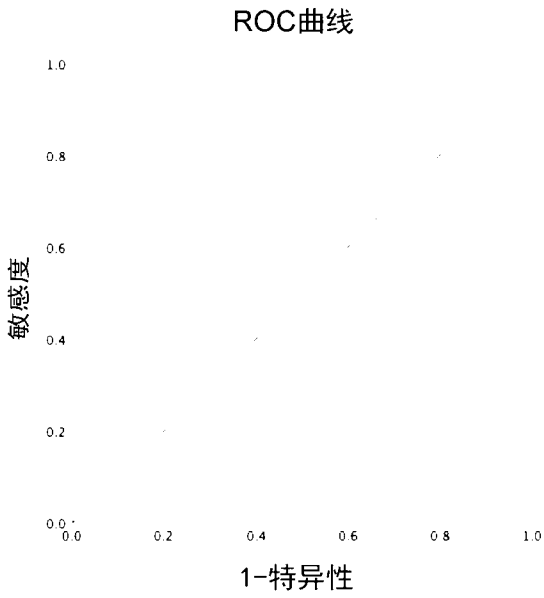


图 4I

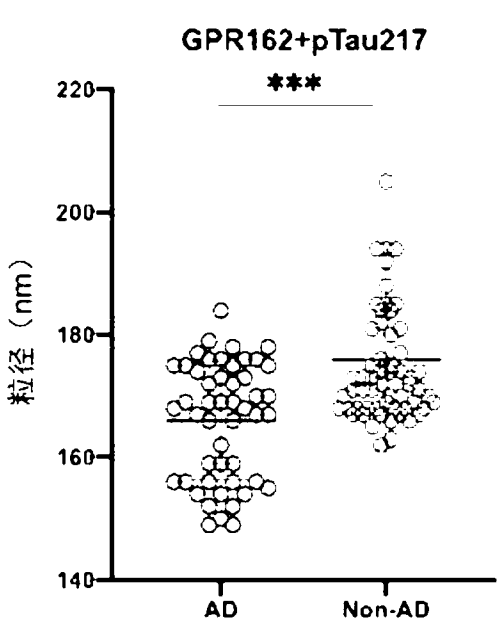


图 5A

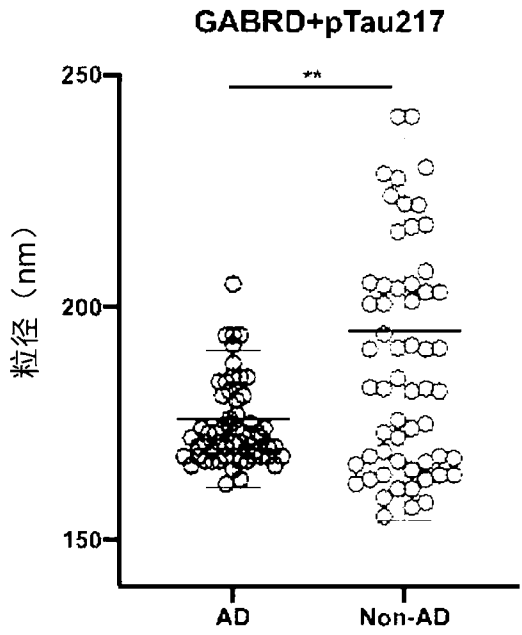


图 5B

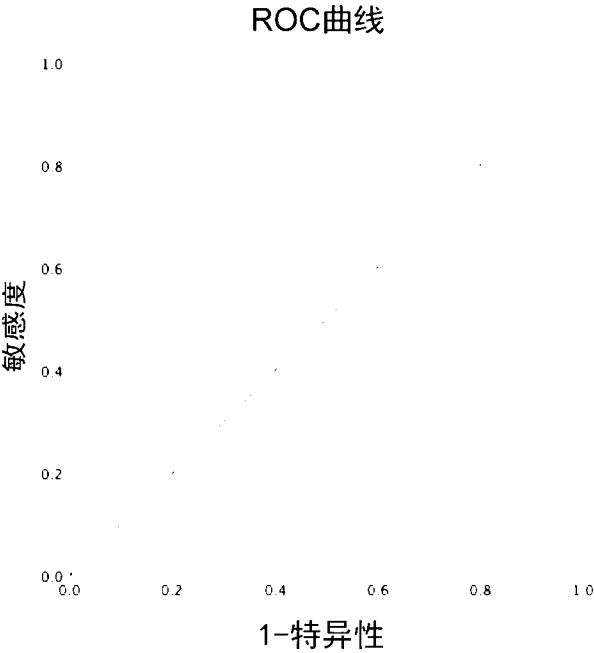


图 5C

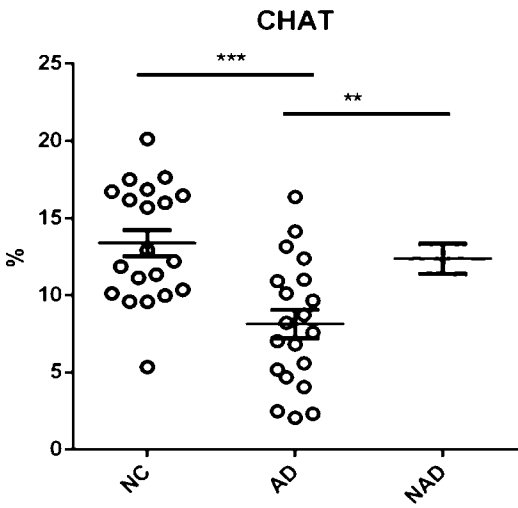


图 6A

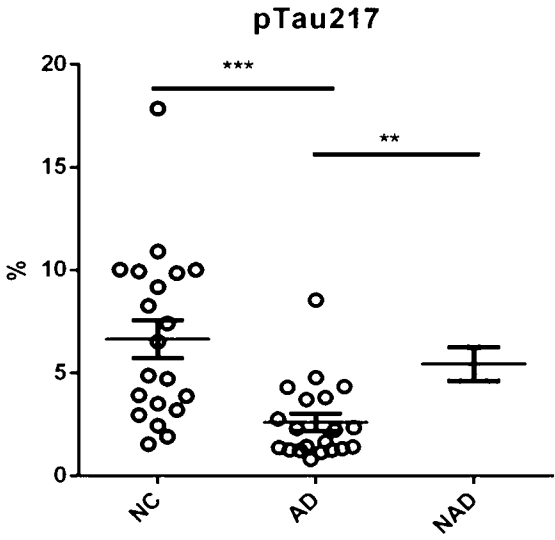


图 6B

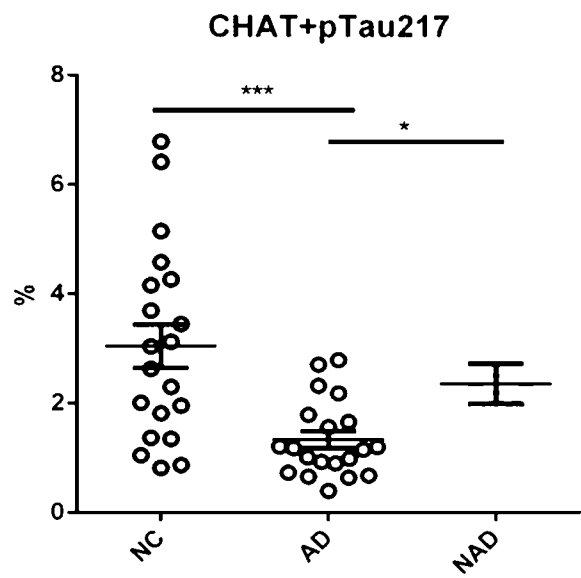


图 6C

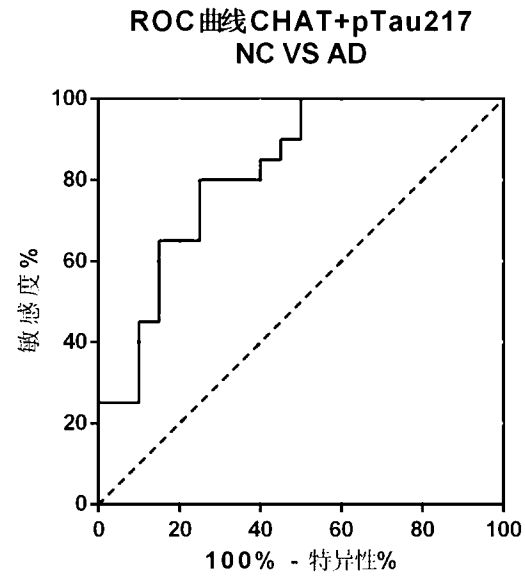


图 6D

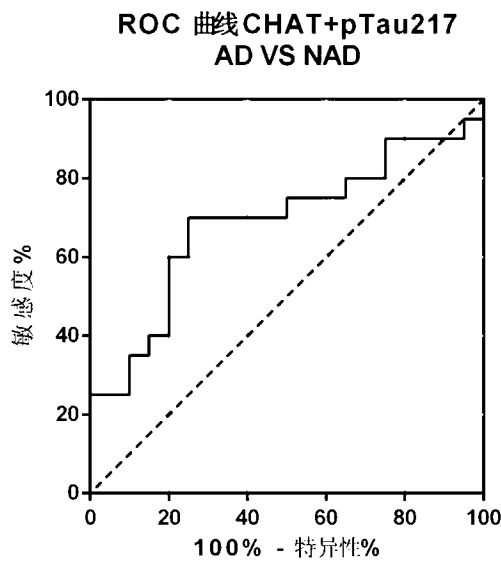


图 6E

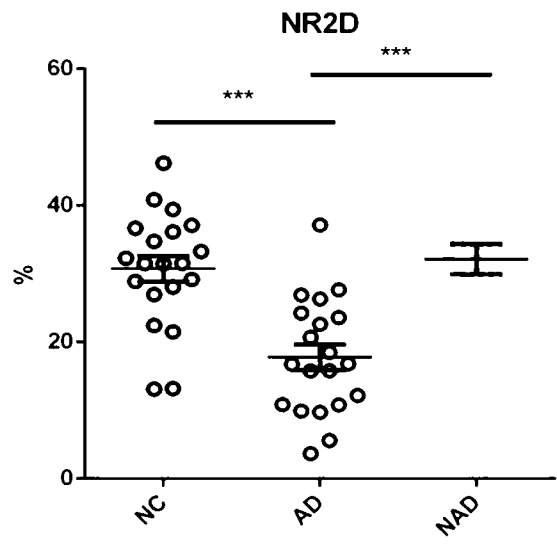


图 6F

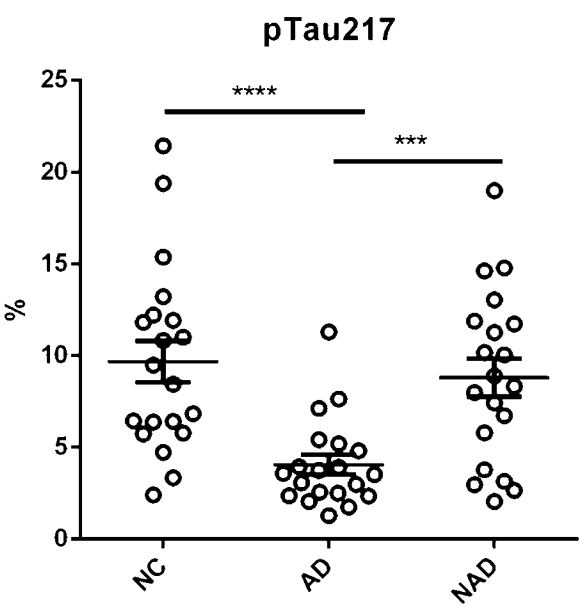


图 6G

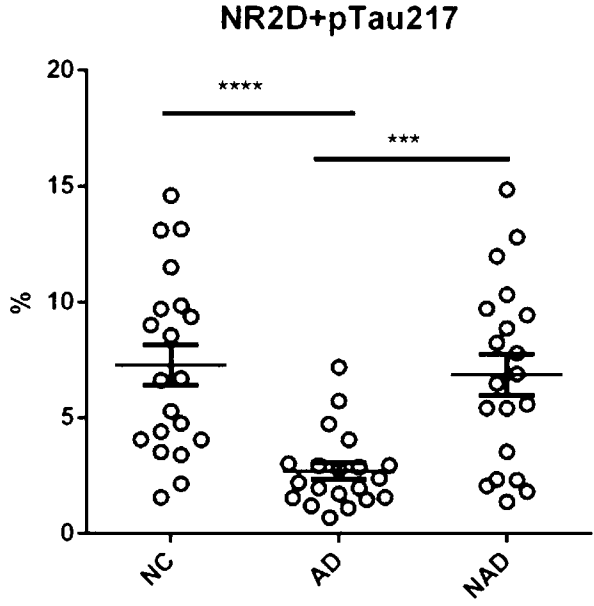


图 6H

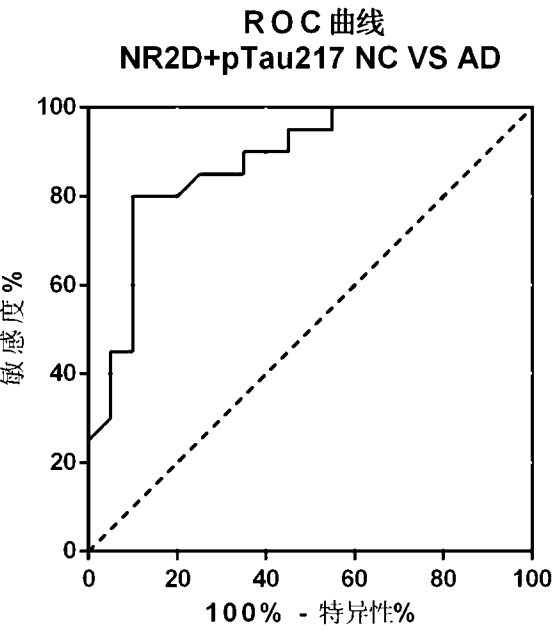


图 6I

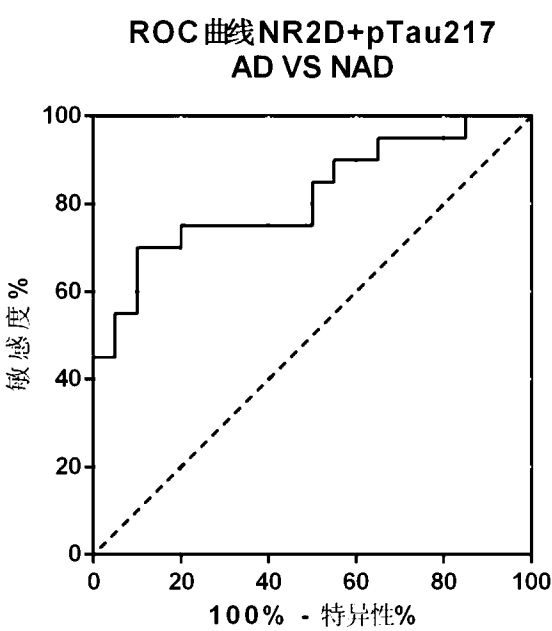


图 6J

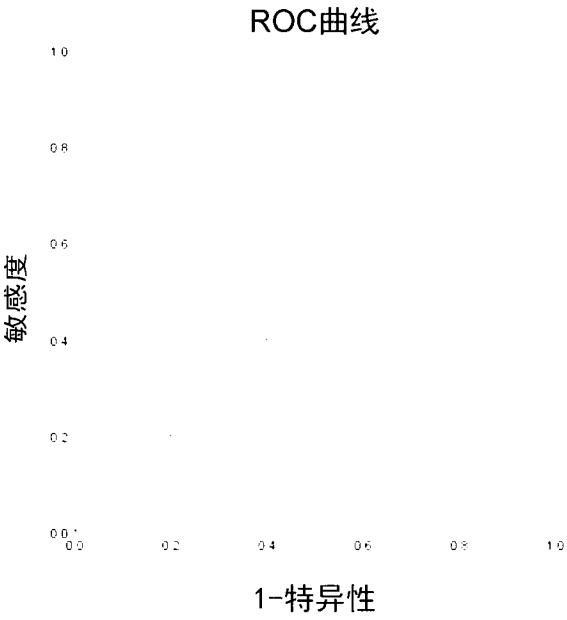


图 6K

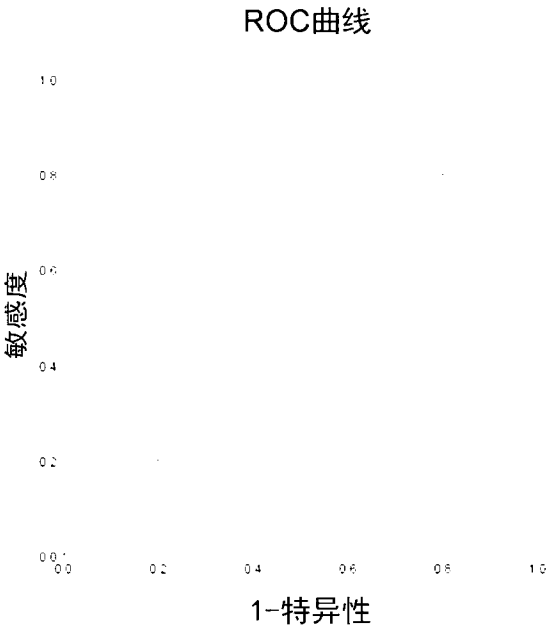


图 6L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/097777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 15/02(2006.01)i; G01N 15/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N33, G01N15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI&CNTXT: 认知障碍, 痴呆, 神经退行性疾病, 胞外囊泡, 外泌体, GPR162, GABRD, CHAT, NR2D, ptau217, GRIN2D, GLUN2D; ISI&ENTXTC&ENTXT: cognitive dysfunction, cognitive impairment, dementia, neurodegenerative disease, extracellular vesicles, exosomes, GPR162, GABRD, CHAT, NR2D, ptau217, GRIN2D, GLUN2D

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021228067 A1 (XY EVERGREEN TECH COMPANY) 18 November 2021 (2021-11-18) abstract, description, pages 2-14 and 26-32, and embodiment 1	1-35
A	CN 110133272 A (PEKING UNIVERSITY) 16 August 2019 (2019-08-16) entire document	1-35
A	CN 111279196 A (BRAINTECH SPA) 12 June 2020 (2020-06-12) entire document	1-35
A	CN 113614531 A (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE et al.) 05 November 2021 (2021-11-05) entire document	1-35
A	TW 201606307 A (NANOSOMIX INC.) 16 February 2016 (2016-02-16) entire document	1-35
A	WO 2019144056 A1 (NANOSOMIX INC.) 25 July 2019 (2019-07-25) entire document	1-35



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 October 2023

Date of mailing of the international search report

10 October 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/097777

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021107154 A1 (FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORP. et al.) 03 June 2021 (2021-06-03) entire document	1-35
A	Azadeh Karami et al. "CSF and plasma cholinergic markers in patients with cognitive impairment" <i>Frontiers in Aging Neuroscience</i> , Vol. 13, 26 August 2021 (2021-08-26), 1-11 entire document	1-35
A	JIA, Longfei et al. "Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid" <i>Alzheimer's & Dementia</i> , Vol. 15, No. 8, 01 August 2019 (2019-08-01), 1071-1080 entire document	1-35
A	Niklas Mattsson-Carlsson et al. "Longitudinal plasma p-tau217 is increased in early stages of Alzheimer's disease" <i>Brain</i> , Vol. 143, No. vol. 11, 17 October 2020 (2020-10-17), 3234-3241 entire document	1-35
A	Sebastian Palmqvist et al. "Discriminative accuracy of plasma phospho-tau217 for Alzheimer disease vs other neurodegenerative disorders" <i>JAMA</i> , Vol. 324, No. 8, 25 August 2020 (2020-08-25), 1-11 entire document	1-35
E	CN 116793909 A (NO.1 HOSPITAL ATTACHED TO MEDICAL COLLEGE, ZHEJIANG UNIV. et al.) 22 September 2023 (2023-09-22) claims, and description, pages 1-19	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/097777

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/097777

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2021228067	A1	18 November 2021	WO	2021228067	A8		23 June 2022	
				EP	4151747	A1		22 March 2023	
				US	2023176075	A1		08 June 2023	
CN	110133272	A	16 August 2019	WO	2019153748	A1		15 August 2019	
CN	111279196	A	12 June 2020	IT	201700105483	A1		21 March 2019	
				CA	3076316	A1		28 March 2019	
				PL	3685167	T3		07 March 2022	
				US	2020216902	A1		09 July 2020	
				US	11359243	B2		14 June 2022	
				WO	2019058303	A1		28 March 2019	
				EP	3685167	A1		29 July 2020	
				EP	3685167	B1		10 November 2021	
				ES	2905144	T3		07 April 2022	
CN	113614531	A	05 November 2021	WO	2020157705	A1		06 August 2020	
				SG	11202107238	UA		29 July 2021	
				US	2022397580	A1		15 December 2022	
				JP	2022519583	A		24 March 2022	
				EP	3918327	A1		08 December 2021	
				EP	3918327	A4		23 November 2022	
TW	201606307	A	16 February 2016	US	2015119278	A1		30 April 2015	
				US	9958460	B2		01 May 2018	
				TW	202102856	A		16 January 2021	
				TWI	788704	B		01 January 2023	
				KR	20160068964	A		15 June 2016	
				KR	102384115	B1		07 April 2022	
				CA	2926092	A1		30 April 2015	
				JP	2016535283	A		10 November 2016	
				JP	6711754	B2		17 June 2020	
				IL	267612	A		29 August 2019	
				EP	3060913	A2		31 August 2016	
				EP	3060913	A4		18 April 2018	
				IL	245176	A0		30 June 2016	
				IL	245176	B		31 July 2019	
				IL	279359	A		31 January 2021	
				IL	279359	B1		01 March 2023	
				IL	279359	B2		01 July 2023	
				US	2018217165	A1		02 August 2018	
				US	11619637	B2		04 April 2023	
				WO	2015061634	A2		30 April 2015	
				WO	2015061634	A3		29 October 2015	
				JP	2020144147	A		10 September 2020	
				JP	7210036	B2		23 January 2023	
				TWI	708058	B		21 October 2020	
WO	2019144056	A1	25 July 2019	US	2023168252	A1		01 June 2023	
				EP	3740567	A1		25 November 2020	
				EP	3740567	A4		09 March 2022	
				JP	2021511510	A		06 May 2021	
				US	2019219578	A1		18 July 2019	
WO	2021107154	A1	03 June 2021	JPWO	2021107154	A1		03 June 2021	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/097777

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				EP	4067906	A1	05 October 2022
				EP	4067906	A4	26 April 2023
				US	2022291242	A1	15 September 2022
CN			116793909	A	22 September 2023	None	

A. 主题的分类		
G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 15/02(2006.01)i; G01N 15/10(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: G01N33, G01N15		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNKI&CNTXT: 认知障碍, 痴呆, 神经退行性疾病, 胞外囊泡, 外泌体, GPR162, GABRD, CHAT, NR2D, ptau217, GRIN2D, GLUN2D ISI&ENTXTC&ENTXT: cognitive dysfunction, cognitive impairment, dementia, nerode-generative disease, extracellular vesicles, exosomes, GPR162, GABRD, CHAT, NR2D, ptau217, GRIN2D, GLUN2D		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2021228067 A1 (XY EVERGREEN TECH COMPANY) 2021年11月18日 (2021 - 11 - 18) 摘要,说明书2-14,26-32页,实施例1	1-35
A	CN 110133272 A (北京大学) 2019年8月16日 (2019 - 08 - 16) 全文	1-35
A	CN 111279196 A (品牌科技股份有限公司) 2020年6月12日 (2020 - 06 - 12) 全文	1-35
A	CN 113614531 A (新加坡国立大学 等) 2021年11月5日 (2021 - 11 - 05) 全文	1-35
A	TW 201606307 A (NANOSOMIX INC) 2016年2月16日 (2016 - 02 - 16) 全文	1-35
A	WO 2019144056 A1 (NANOSOMIX INC) 2019年7月25日 (2019 - 07 - 25) 全文	1-35
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
★ 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2023年10月9日	2023年10月10日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	石剑平	
	电话号码 (+86) 010-62085675	

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2021107154 A1 (FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORP等) 2021年6月3日 (2021 - 06 - 03) 全文	1-35
A	Azadeh Karami等. "CSF and plasma cholinergic markers in patients with cognitive impairment" Frontiers in Aging Neuroscience, 第13卷, 2021年8月26日 (2021 - 08 - 26), 1-11 全文	1-35
A	JIA, Longfei 等. "Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid" Alzheimer's & Dementia, 第15卷, 第8期, 2019年8月1日 (2019 - 08 - 01), 1071-1080 全文	1-35
A	Niklas Mattsson-Carlgren等. "Longitudinal plasma p-tau217 is increased in early stages of Alzheimer's disease" Brain, 第143卷, 第11期, 2020年10月17日 (2020 - 10 - 17), 3234-3241 全文	1-35
A	Sebastian Palmqvist等. "Discriminative accuracy of plasma phospho-tau217 for Alzheimer di- sease vs other neurodegenerative disorders" JAMA, 第324卷, 第8期, 2020年8月25日 (2020 - 08 - 25), 1-11 全文	1-35
E	CN 116793909 A (浙江大学医学院附属第一医院 等) 2023年9月22日 (2023 - 09 - 22) 权利要求书, 说明书第1-19页	1-35

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/097777

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021228067	A1	2021年11月18日	WO	2021228067	A8	2022年6月23日
				EP	4151747	A1	2023年3月22日
				US	2023176075	A1	2023年6月8日
CN	110133272	A	2019年8月16日	WO	2019153748	A1	2019年8月15日
CN	111279196	A	2020年6月12日	IT	201700105483	A1	2019年3月21日
				CA	3076316	A1	2019年3月28日
				PL	3685167	T3	2022年3月7日
				US	2020216902	A1	2020年7月9日
				US	11359243	B2	2022年6月14日
				WO	2019058303	A1	2019年3月28日
				EP	3685167	A1	2020年7月29日
				EP	3685167	B1	2021年11月10日
				ES	2905144	T3	2022年4月7日
CN	113614531	A	2021年11月5日	WO	2020157705	A1	2020年8月6日
				SG	11202107238	UA	2021年7月29日
				US	2022397580	A1	2022年12月15日
				JP	2022519583	A	2022年3月24日
				EP	3918327	A1	2021年12月8日
				EP	3918327	A4	2022年11月23日
TW	201606307	A	2016年2月16日	US	2015119278	A1	2015年4月30日
				US	9958460	B2	2018年5月1日
				TW	202102856	A	2021年1月16日
				TWI	788704	B	2023年1月1日
				KR	20160068964	A	2016年6月15日
				KR	102384115	B1	2022年4月7日
				CA	2926092	A1	2015年4月30日
				JP	2016535283	A	2016年11月10日
				JP	6711754	B2	2020年6月17日
				IL	267612	A	2019年8月29日
				EP	3060913	A2	2016年8月31日
				EP	3060913	A4	2018年4月18日
				IL	245176	A0	2016年6月30日
				IL	245176	B	2019年7月31日
				IL	279359	A	2021年1月31日
				IL	279359	B1	2023年3月1日
				IL	279359	B2	2023年7月1日
				US	2018217165	A1	2018年8月2日
				US	11619637	B2	2023年4月4日
				WO	2015061634	A2	2015年4月30日
				WO	2015061634	A3	2015年10月29日
				JP	2020144147	A	2020年9月10日
				JP	7210036	B2	2023年1月23日
				TWI	708058	B	2020年10月21日
WO	2019144056	A1	2019年7月25日	US	2023168252	A1	2023年6月1日
				EP	3740567	A1	2020年11月25日
				EP	3740567	A4	2022年3月9日
				JP	2021511510	A	2021年5月6日
				US	2019219578	A1	2019年7月18日
WO	2021107154	A1	2021年6月3日	JPWO	2021107154	A1	2021年6月3日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/097777

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		EP 4067906 A1	2022年10月5日
		EP 4067906 A4	2023年4月26日
		US 2022291242 A1	2022年9月15日
CN 116793909 A	2023年9月22日	无	