



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080807 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280064163. 5

G01N 33/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 21

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

102011057021. 7 2011. 12. 23 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/076552 2012. 12. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/092952 DE 2013. 06. 27

(71) 申请人 于利希研究中心有限公司

地址 德国于利希

(72) 发明人 D·威尔伯尔德 S·A·丰克

L·旺-迪特里希 E·比克曼

O·班纳赫

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 殷骏

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书15页

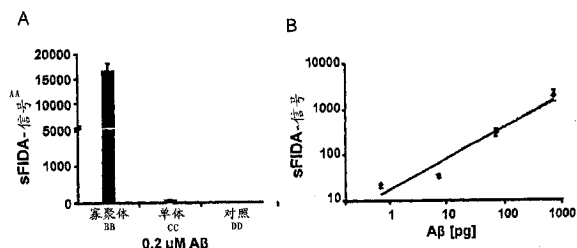
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

选择性量化 A- β 聚集体的方法

(57) 摘要

本发明涉及选择性量化 A- β 聚集体的方法, 包括将抗 A- β 抗体固定在基材上, 将样品施加于基材上, 加入用于检测的标记的探针, 其通过特异性结合 A- β 聚集体标记这些探针和检测标记的聚集体。



1. 一种选择性量化和 / 或表征 A- β 聚集体的方法,包括下列步骤:
 - a) 将待测样品施加于基材上,
 - b) 加入用于检测的经标记的探针,其通过特异性结合 A- β 聚集体标记这些 A- β 聚集体和
 - c) 检测标记的 A- β 聚集体,其中步骤 a) 可在步骤 b) 之前实施。
2. 根据权利要求 1 的方法,其特征在于,在步骤 a) 之前将捕获分子固定在基材上。
3. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,进行样品的预处理。
4. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,使用玻璃基材。
5. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,基材具有亲水性涂层。
6. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,基材用右旋糖酐涂覆。
7. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,所述捕获分子与基材或与涂层共价结合。
8. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,所述捕获分子用荧光染料标记。
9. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,所述捕获分子为抗 A- β 抗体。
10. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,所述抗 A- β 抗体特异性结合 A- β 聚集体的表位。
11. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,使用 A- β 肽 - 特异性探针。
12. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,所述探针为荧光染料 - 标记的抗 A- β 抗体。
13. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,使用两种或两种以上不同的探针。
14. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,使用两种或两种以上具有不同标记的荧光染料的探针。
15. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,至少一种探针为特异性结合 A- β 肽的 N 端表位的抗 A- β 抗体。
16. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,检测通过空间分辨荧光显微术进行。
17. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,检测通过共聚焦荧光显微术、荧光相关光谱法 (FCS) 进行,任选地与交叉相关和单粒子免疫溶剂激光扫描法、激光扫描显微术 (LSM)、Wetfeld 显微镜和 / 或 TIRF 显微镜,以及相应的超分辨率模式 STED、SIM、STORM、dSTORM 结合。
18. 根据权利要求 17 的方法,其特征在于,在检测中收集很多数据点使得能够相对背景信号检测单一聚集体。
19. 根据权利要求 18 的方法,其特征在于,只要空间分辨事件存在就读出尽量多的值。
20. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,脑脊液 (CSF, 脑脊液)、血液和 / 或尿用作测量试样。
21. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,使用内标或外标用于量化 A- β 聚集体。
22. 根据前述权利要求之一的方法,其特征在于,用于量化 A- β 聚集体的标准物为由多肽序列构建的聚合物,其中所述多肽序列就其序列而言在相应的部分区域中与内源蛋白

质是相同的或与那内源蛋白质在相应的部分区域上具有至少 50% 的同源性,所述内源蛋白质引起蛋白质聚集疾病或淀粉样变性或蛋白质错误折叠疾病,其中聚合物不聚集。

23. 用于根据前述权利要求之一来选择性量化 A- β 聚集体的试剂盒,含有一种或多种的下列组分:

- 用疏水物质涂覆的玻璃基材,
- 标准物;
- 捕获分子;
- 探针;
- 含捕获分子的基材;
- 溶液;和
- 缓冲液。

24. 一种测定活性物质和 / 或用于治疗 AD 的治疗方法的效力的方法,其特征在于,实施根据权利要求 1-22 之一的方法,并将活性物质和 / 或治疗方法根据它们对 A- β 聚集体形成的作用相互比较,其中选择出与对照相比表现出更低的 A- β 聚集体形成的那些活性物质和 / 或治疗方法。

25. 决定在临床研究或试验中的个体接纳的方法,其特征在于,量化和 / 或表征根据权利要求 1-22 之一的 A- β 聚集体并将测量值与阈值比较。

26. A- β 聚集体 - 特异性的探针。

27. A- β 聚集体 - 特异性的或 A- β 寡聚物 - 特异性的探针的用途,用于特异性结合特定的 A- β 聚集体或 A- β 寡聚物。

选择性量化 A- β 聚集体的方法

[0001] 本发明涉及选择性量化 A- β 聚集体的方法,包括将 A- β 捕获分子固定在基材上,将待研究的样品施加于基材上,加入用于检测的标记的探针,其通过特异性结合 A- β 聚集体标记这些探针,并检测经标记的聚集体。

[0002] A- β 聚集体出现于阿尔茨海默病 (AD, 阿耳茨海默氏痴呆, 拉丁语 = Morbus Alzheimer)。其包括帕金森氏病例如属于一种由不同种类组成的临床病症,其共同标准在许多情况 (但不排除其它情况) 下是各个特定蛋白质以 β 折叠结构的有序构象的细胞外全身性或局部沉积。由年龄决定的痴呆是当今社会中一个越来越大的问题,这是因为由于提高的预期寿命,越来越多的人遭受其苦并因此对社会保险系统和其可资助性产生影响。

[0003] 内源蛋白质病理学聚集体,例如寡聚物或纤丝,出现于许多神经变性疾病中。在阿尔茨海默氏痴呆的情况下,例如在大脑中发现 β 淀粉样肽沉积物 (A- β 肽沉积物) 和在帕金森氏病情况下,共核蛋白 (Synuclein) 沉积物。然而, β 淀粉样肽沉积物 (或肽-纤丝) 仅是过程的最后阶段,其以从来自 APP (淀粉样前体蛋白) 的单体 β 淀粉样肽的分裂开始,然后形成神经毒性的 β 淀粉样肽寡聚物并最后以斑点中的 β 淀粉样肽纤丝的沉积物结束。AD 的主要病理学特征是由 A- β 肽组成的老年斑或淀粉样斑的形成。此外,产生来自 Tau 蛋白的神经纤丝沉积物。A- β 肽的前体蛋白质, APP, 定位于神经元的细胞膜中。通过蛋白质水解降解和之后的修饰,由此产生不同长度和类型的 A- β 片段,例如 A- β 1-40、A- β 1-42、或 pGluA- β 3-42。单体 A- β 肽也在健康机体的整个一生期间都产生。

[0004] 按照自 1990 年代的淀粉样蛋白级联假说,以斑点形式的 A- β 沉积物是疾病症状的触发者。然而近年来,不同的研究表明,特别是小的、自由扩散的 A- β 寡聚物在所有 A- β 类别中具有最大的毒性,并且对 AD 的发生和进展负责。因此, A- β 肽的聚集体与 AD 发病机理直接相关。

[0005] 然而目前,可靠的诊断在引人关注的临床症状出现以后才是可能的,在这种情况下,以最大 90% 的可靠性为出发点。目前存在的至今唯一可靠的诊断可能,直到患者死亡后通过大脑中各种不同改变的组织学检测。

[0006] 因此,需要鉴定和量化估计 A- β 聚集体,尤其是小的、自由扩散的 A- β 寡聚物或聚集体的方法。

[0007] 迄今为止仅仅描述了几种表征和量化组织和体液中致病性聚集体或寡聚物的方法。

[0008] 与 A- β 结合并抑制其聚集的化合物例如由 Chafekar 等 (ChemBioChem 2007, 8, 1857-1864) 获知。这些物质由 A- β 肽 (KLVEFF 序列) 中的部分组成并用于治疗目的,没有用这些物质进行组织和体液中的致病性聚集体或寡聚物的表征和量化。

[0009] 目前,对于 AD,还没有公认的标准和 / 或鉴定,所谓的生物标志物。至今这种生物标志物的出发点是使用 PET 放射性示踪剂用于成像方法,这基于放射活性标记的物质结合淀粉质斑块的假设并因此在检测之后可以是斑块沉积的测量。尽管在 PET 信号和疾病之间有显而易见的联系,但至今仍不能由此使可靠的诊断成为可能,因为许多没有老年痴呆的人也表现出高示踪剂保留。高成本和在仪器上必要的技术开支对这些方法也是不利的,其

中仪器并不是随处可获得的。

[0010] 作为其它的出发点,目前正在研究患者的血液或脊髓液(CSF)中多种物质的量和分析它们作为生物标志物有用性。这些物质之一为A- β 肽。迄今为止,患者脊髓液中单体A- β 含量的测定,可能地与Tau浓度的测定相结合似乎最可靠。然而,该值有如此高的变化以致不能利用这种生物标志物对个体进行可靠的诊断。这种方法的应用由DE69533623 T2获知。尽管有这些不同的方法,但迄今为止任何可靠的生物标志物得到公认还是不可能的。

[0011] 其它困难是对于A- β 聚集体的具体量化与A- β 单体和/或A- β 总含量相反,迄今为止只有几种检测系统可获得。作为可能的检测系统,目前采用ELISAs,其中A- β 寡聚物利用抗体检测。其中所用的抗体识别仅非常特异性的类型的A- β 寡聚物或不是由A- β 肽构成的非特异性的其它寡聚物,但在非常不同的蛋白质中,其对评价有不利的影响。

[0012] 利用构象异构体-特异性抗体应用ELISA支持的方法例如由W02005/018424 A2获知。

[0013] 作为其它检测方法,采用夹心ELISA测量法。本发明中为了固定A- β 分子使用A- β -特异性抗体。相同的抗体随后也用于检测。通过此方法,单体不产生信号,因为抗体结合位点已经被捕获分子占据。特定的信号因此只由二聚体或较大的寡聚物产生。然而在该评价中,这样一种方法仅能够量化存在于样品中的所有聚集体的总和而不能表征个别的聚集体。为了可靠地检测和量化个别的A- β 聚集体,ELISA支持的方法也缺少对此必需的敏感性。此种夹心ELISA法的应用由W02008/070229 A2获知。

[0014] 本发明的目的要提供一种蛋白质聚集疾病、尤其是AD的生物标志物,和一种量化和表征A- β 聚集体的超灵敏的方法。通过表征生物标志物,即测定体液或组织中该物质(生物标志物)的数目、量和/或尺寸,疾病和/或有关疾病的病程和患者的状况的信息的确切诊断将成为可能。

[0015] 本发明的其它目的要提供选择性量化导致和/或表征蛋白质聚集疾病的致病性聚集体的方法,尤其是任何尺寸和组成的A- β 聚集体、A- β 寡聚物以及同时还有小的、自由扩散的A- β 寡聚物。

[0016] 此目的通过选择性量化和/或表征A- β 聚集体的方法来实现,包括下列步骤:

[0017] a) 将待测样品施加于基材上,

[0018] b) 加入用于检测的经标记的探针,其通过特异性结合A- β 聚集体标记这些A- β 聚集体,和

[0019] c) 检测标记的聚集体,其中步骤b)可在步骤a)之前实施。

[0020] A- β 聚集体或A- β 寡聚物的表征指形式、尺寸和/或组成的测定。

[0021] 本发明意义上的术语A- β 单体描述一种肽分子,其为淀粉样前体蛋白APP的一部分,其以名称A- β 已知。根据来源种类(人和/或动物)和加工,A- β 单体的精确氨基酸序列可在长度和特性上变化。

[0022] 本发明意义上的术语A- β 寡聚物既描述A- β 聚集体又描述A- β 寡聚物以及小的、自由扩散的A- β 寡聚物。本发明意义上的寡聚物为由2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个单体或其多倍体形成的聚合物。在此可能的是,A- β 寡聚物中A- β 单体必须是彼此相同的,但不一定是所有。

[0023] 因此A- β 聚集体将理解为既指A- β 寡聚物又指小的、自由扩散的A- β 寡聚物。

这还包括聚集体,例如描述了纤丝的片段,“初纤维”、“ADDLs”和 p56^{*}。对本发明必要的是:关于尺寸 A- β 聚集体为在体内可迁移的聚集体或聚合物而不是由于其固定在体内以淀粉样- β 肽斑块沉积物的形式存在的尺寸。

[0024] 作为基材,根据本发明选择具有尽可能低的非特异性的结合能力的物质,特别是鉴于 A- β 寡聚物。

[0025] 在本发明的一个实施方式中,选择玻璃基材。

[0026] 基材可用亲水材料涂覆,亲水材料优选聚-D-赖氨酸、聚乙二醇(PEG)或右旋糖酐。

[0027] 在本发明的一个实施方式中,将玻璃表面羟基化并随即用氨基基团活化。

[0028] 为了制备待涂覆的基材,实施下列步骤中的一个或多个步骤:

[0029] 在超声波浴或血浆清洁剂中洗涤玻璃基材或玻璃载片,作为此步骤的替代,在 5M NaOH 中温育至少 3 小时,

[0030] 用水冲洗随后在氮气下干燥,

[0031] 浸渍在比例为 3 : 1 的浓硫酸和过氧化氢的溶液中以活化羟基基团,

[0032] 用水冲洗至中性 pH,然后用乙醇冲洗并在氮气氛下干燥,

[0033] 浸渍在 3-氨基丙基三乙氧基甲硅烷(APTES)(1-7%) 在无水甲苯中的溶液或乙醇胺的溶液中,

[0034] 用丙酮或 DMSO 和水冲洗并在氮气氛下干燥。

[0035] 对于用右旋糖酐、优选羧甲基右旋糖酐(CMD)包覆,将基材用 CMD 的水溶液(在 10mg/ml 或 20mg/ml 的浓度下)和任选的 N-乙基-N-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC), (200mM) 和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), (50mM) 温育,然后洗涤。

[0036] 在一种变化中,所述羧甲基右旋糖酐与玻璃表面共价结合,其按照上面的描述首先被羟基化然后用胺基活化。

[0037] 作为基材,也可以使用,微量滴定板,优选具有玻璃基底的微量滴定板。由于利用聚苯乙烯框架使用浓硫酸是不可能的,在本发明的一种实用的改进中按类似于 Janissen 等(Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 71(2), 200-207) 的方法进行玻璃表面的活化。

[0038] 在本发明一种替代方案中,将捕获分子固定在基材上以俘获和固定 A- β 聚集体。

[0039] 优选地抗 A- β 抗体用作捕获分子。

[0040] 在一个替代方案中,捕获分子与基材共价结合。

[0041] 在其它替代方案中,将捕获分子与涂层、优选右旋糖酐层共价结合。

[0042] 抗 A- β 抗体特异性结合 A- β 聚集体的一个表位。在本发明的一个替代方案中,表位具有 A- β 肽的氨基末端部分的氨基酸序列,其选自部分区域 A- β 1-8(SEQ ID NO :2), A- β 1-11(SEQ ID NO :3), A- β 1-16(SEQ ID NO :4), A- β 3-11(SEQ ID NO :5) 和 pyroGluA- β 3-11(SEQ ID NO :6), A- β 11-16(SEQ ID NO :7) 和 pyroGluA- β 11-16(SEQ ID NO :8),例如人 N 端表位的氨基酸序列(具有下列序列:DAEFRHDSGYE(1-11, SEQ ID NO :3)。

[0043] 在本发明的一个实施方式中,将捕获分子(抗体)固定在基材上,任选地在 CMD- 包覆的载片被 EDC/NHS 的混合物(分别 200 和 50mM) 活化之后。

[0044] 可以使剩余的没有捕获分子结合的羧酸端基失活。

[0045] 为了使 CMD 间隔子上的这些羧酸端基失活,使用在 DMSO 中的乙醇胺。在施加样品

之前,基材或载片用 PBS 冲洗。

[0046] 将待检测的样品在如此制备的基材上温育。

[0047] 在本发明的一个实施方式中,直接在基材(未包覆的基材)上进行样品的施加,任选地通过共价键合在任选地活化的基材的表面上。

[0048] 在本发明的一种变化中,通过下列方法中的一种或多种方法进行样品的预处理:

[0049] - 加热(最高为样品的沸点温度)

[0050] - 一个或多个冻融循环,

[0051] - 用水或缓冲液稀释,

[0052] - 用酶,例如蛋白酶、核酸酶、脂肪酶处理,

[0053] - 离心,

[0054] - 沉淀,

[0055] - 与探针竞争,以排挤任何存在的抗 A- β 抗体。

[0056] 在进一步的步骤中,A- β 聚集体以经标记的用于以后检测的探针标记。

[0057] 在本发明的一种变化中,抗 A- β 抗体用作探针。俘获分子和探针可以相同。

[0058] 在本发明的一个实施方式中,捕获分子和探针不同。这样例如不同的抗 A- β 抗体可用作捕获分子和探针。在本发明的其它实施方式中,除可能的染料标记以外使用彼此相同的捕获分子和探针。在本发明的可替代的方式中,除可能的染料标记以外使用彼此相同的多种探针。在本发明的其它替代方案中,使用至少 2 种或更多不同的捕获分子和/或探针,其来自于不同的抗 A- β 抗体且任选地还具有不同的染料标记。

[0059] 然而,不同的分子,诸如不同的抗 A- β 抗体,也可以用作捕获分子。俘获分子可以是 A- β 肽的特定氨基酸序列,例如 A- β 1-40/42,pyroGlu 3-40/42 或 pyroGlu 11-40/42。

[0060] 同样,若干不同的分子,诸如不同的抗 A- β 抗体,可以用作探针。

[0061] 至于随后表面的质量控制,例如含捕获分子的涂层的均一性,可以使用以荧光染料标记的捕获分子。为此,优选使用没有受检测干扰的染料。经此随后的构造检验变成可能,以及测量结果的标准化。

[0062] 在本发明的一个实施方式中,特异性结合 A- β 肽的 N 端表位的抗 A- β 抗体用作探针。

[0063] 为了检测,对探针进行标记使得它们发射视觉上可检测的信号,选自荧光、生物荧光和化学发光发射和吸收。

[0064] 在一个替代方案中,探针以染料标记。优选在此涉及荧光染料。

[0065] 在本发明的一个实施方式中,使用至少 2、3、4、5、6 种或更多不同的探针。探针可以既在它们特异性结合 A- β 聚集体方面又在它们不同的标记例如以荧光染料标记方面不同。

[0066] 探针也可以相互组合,其适用于 FRET(荧光共振能量转移)作为检测法。

[0067] 几种以不同荧光染料标记的不同探针的应用增加测量中获得的相关信号的特异性。另外,A- β 单体的屏蔽也因此变成可能。如果探针和捕获分子相同,或者二者识别交叉的表位,则 A- β 单体的检测可以尤其被避免。

[0068] 在本发明的一个实施方式中,使用对特定的 A- β 聚集体种类特异性的探针,诸如 A- β (x-40,), A- β (x-42) 或焦谷氨酸 A- β (3-x)、焦谷氨酸 A- β (11-x)。X 为 1 和 40 之间

的全体自然数或 42, 其中本领域技术人员根据他们对 A- β 肽序列的认识确定将使用的序列的长度。在其它替代方案中, 可以使用对特定的 A- β 聚集体形式特异的探针, 诸如可商购获得的抗体“A-11”或“I-11”。

[0069] A- β 聚集体 - 特异性的或 A- β 寡聚物 - 特异性的探针的使用或用途因此也是本发明的主题。这些探针特异性结合特定的 A- β 聚集体、或 A- β 寡聚物, 优选地前述的种类。通过特异性结合特定的 A- β 聚集体或 A- β 寡聚物, 可以测定 A- β 聚集体或 A- β 寡聚物的特性和 / 或尺寸和结构。

[0070] A- β 聚集体 - 特异性的或 A- β 寡聚物 - 特异性的探针因此也是本发明的主题。

[0071] 在其它替代方案中, 用荧光染料标记的 A- β 肽可用作探针。

[0072] 作为待测的样品, 可以使用体液或组织。在本发明的一个实施方式中, 样品选自脊髓液 (CSF)、血液、血浆和尿。样品可通过本领域技术人员已知的不同制备步骤完成。

[0073] 本发明的优点是在未处理的样品、优选 CSF 中测定 A- β 聚集体的可能。

[0074] 测定 A- β 聚集体的组成、尺寸和 / 或形式的方法因此也是本发明的主题。在该方法中, 使用上面提及和描述的操作步骤。

[0075] 所标记的聚集体的检测通过扫描或其它类型的表面成像法进行。检测优选通过共聚焦荧光显微术或荧光相关光谱法 (FCS)、尤其与交叉相关和单粒子免疫溶剂激光扫描检测法和 / 或激光扫描显微术 (LSM) 结合实施。

[0076] 在本发明的一个替代方案中, 检测以共聚焦激光扫描显微术进行。

[0077] 在本发明的一个实施方式中, 为此使用激光聚焦, 例如应用于激光扫描显微术、或 FCS (荧光相关光谱系统) 中, 和使用相应的超分辨率模式诸如 STED 或 SIM。作为此实施方式的替代方式, 可以用 TIRF 显微镜、及其相应的超分辨率模式, 诸如 STORM 或 dSTORM 进行检测。

[0078] 因此在本发明方法的实施方式中不包括基于非空间分辨信号的方法, 如 ELISA 或夹心 ELISA。

[0079] 在检测中, 高空间分辨率是有利的。在本发明方法的一个实施方式中, 收集其中很多数据点使得能够相对背景信号检测一个聚集体, 其中背景信号例如由仪器 - 特定的噪声、其它非特定的信号或非特异性结合的探针产生。以这种方式, 只要空间分辨的事件诸如像素存在就读出尽可能多的值 (读出值)。通过空间分辨, 相对各自的背景测定每一事件因而代表与没有空间分辨信号的 ELISA 法相比较的优点。

[0080] 在一个替代方案中, 几种不同的探针应用于本发明的方法中。结果, 信息, 即读出值, 倍增, 因为对于每一个点, 对于每一个聚集体或对于每一个检测事件, 依赖于产生信号的特定探针接受到分离的信息项。因此对于每个事件信号的特异性增加。因此对于所检测的每一个聚集体, 也可以测定其组成, 即聚集体的特性, 即 A- β 种类, 诸如 A- β (1-40)、A- β (1-42)、焦谷氨酸 A- β (3-40/42、11-40/42) 或它们的混合物的组成。

[0081] 不同探针的数目在本发明中只受将要使用的荧光染料的干涉限制。因此可以使用 1、2、3、4 种或更多不同的探针 - 染料组合。

[0082] 空间分辨信息对根据上面描述的方法的评价是必要的。这可以例如是荧光的特性和 / 或强度。在评价这些所有使用和检测的探针的数据时, 根据本发明测定聚集体的数目、及其形式、尺寸和 / 或它们的其组成。本发明中可以直接或间接地获得关于寡聚物的尺寸

的信息,依赖于颗粒是否比所使用的成像方法的空间分辨率小或大,在一个实施方式中可以使用背景最小化的算法和 / 或可以应用强度阈值。

[0083] 作为荧光染料,可以使用本领域技术人员已知的染料。作为替代,可以使用 GFP(绿色荧光蛋白)、其轭合物和 / 或融合蛋白、和量子点。

[0084] 通过运用内标法或外标法,试验结果客观地可相互比较因此富有意义。

[0085] 在本发明的一个实施方式中,运用内标法或外标法量化 A- β 聚集体。

[0086] 基于对荧光强度分布的分析(FIDA-荧光强度分布分析),本发明的方法为所谓的表面 FIDA(Surface-FIDA)。

[0087] 通过选择俘获分子和探针分子,可以确定必须具有多大尺寸的寡聚物以便能促进检测(信号)。

[0088] 此外,用本发明的方法对小的、自由扩散的 A- β 聚集体进行精确分析也是可能的。由于它们的尺寸,该尺寸低于它们的光学显微镜的分辨率,这些小的 A- β 寡聚物可困难地与背景荧光区分开来(例如由未结合的抗体产生的)。

[0089] 以及极高的灵敏性,本发明的方法在 A- β 聚集体的数目的大范围内还表现出线性。

[0090] 本临时发明的其它主题是小的、自由扩散的 A- β 聚集体作为检测和鉴定蛋白质聚集疾病、特别是 AD 的生物标志物的用途。本发明还涉及鉴定和 / 或检测蛋白质聚集疾病、特别是 AD 的方法,其特征在于,用上面所述的本发明方法分析来自患者的体液样品,优选 CSF。

[0091] 在本发明的一种变化中,采用内标或外标。

[0092] 这种量化寡聚物或致病性聚集体的标准物,其中寡聚物或致病性聚集体表征蛋白质聚集疾病或淀粉样变性或蛋白质错误折叠疾病,其特征在于,聚合物由多肽序列构建,其中多肽序列就它们的序列方面在相应的部分区域中与内源蛋白质是相同的或与内源蛋白质在相应的部分区域上具有至少 50% 的同源性,其表征蛋白质聚集疾病或淀粉样变性或蛋白质错误折叠疾病,其中聚合物不聚集。

[0093] 在本发明的意义下,作为标准物,描述普遍有效和接受的、固定的参考量,其用于比较和测定特性和 / 或量,特别是用于测定内源蛋白质致病聚集体的大小和量。本发明意义下的标准物可用于仪器和 / 或测量的校准。

[0094] 在本发明的意义下,术语“蛋白质聚集疾病”,也包括淀粉样变性和蛋白质错误折叠疾病。此类疾病的实例和与此相关的内源蛋白质为:关于 AD 的 A- β 蛋白和 Tau 蛋白,关于帕金森氏病的 α - 共核蛋白或关于朊病毒病例如人克雅氏病(CJD)、羊瘙痒病和牛海绵脑病(BSE)的朊蛋白。

[0095] “同源序列”,在本发明的意义下,意味着氨基酸序列与造成蛋白质聚集疾病的内源致病聚集体或寡聚物的氨基酸序列具有至少 50、55、60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% 的同一性。在本说明中,代替术语“同一性”,同等意义地使用术语“同源的”或“同源物”。两个核酸序列或多肽序列之间的同一性通过借助于基于 Smith, T. F. 和 Waterman, M. S(Adv. Appl. Math. 2:482-489(1981)) 的算法的 BESTFIT 程序的比较来计算,通过设置下列对于氨基酸的参数:空隙产生罚分(Gap creation penalty):8,和空隙延伸罚分(Gap extension

penalty):2;和下列对于核酸的参数:空隙产生罚分:50,和空隙延伸罚分:3。优选地,两个核酸序列或多肽序列之间的同一性通过核酸序列/多肽序列相对于各自的总序列长度来确定,如它们通过借助于基于 Needleman, S. B. 和 Wunsch, C. D. (J. Mol. Biol. 48:443-453) 的算法的 GAP 程序在下列对于氨基酸的参数的设置下比较进行计算:空隙产生罚分:8和空隙延伸罚分:2;和下列对于核酸的参数:空隙产生罚分:50 和空隙延伸罚分:3。

[0096] 如果两个氨基酸序列具有相同的氨基酸序列,则它们在本发明意义上相同。

[0097] 术语内源蛋白质的“相应的部分区域”理解为这样的肽序列,其根据本发明的定义,具有相同的或以给定百分数同源的单体肽序列,由其构建根据本发明的标准物。

[0098] 对于根据本发明的标准物根本的是,标准物不聚集,优选地通过使用不聚集的单体序列,这是因为内源蛋白质的“相应的部分区域”不对聚集负责,或者由于封阻,对聚集负责的基团不聚集。

[0099] 本发明意义下的聚集体为:

[0100] - 颗粒,其由多个优选相同的、不是相互共价结合的结构单元构成,和/或

[0101] - 多个单体的非共价团聚。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,所述标准物具有准确定义的数目的表位,其为了相应探针的结合而共价地相互连接(间接地或通过氨基酸、间隔子和/或官能团)。

[0103] 本发明意义下的探针选自由下列组成的组:抗体、纳米抗体(Nanobody)和亲和抗体(Affibody)。此外,探针是对于待检测的聚集体具有充分的结合特异性的所有分子,例如,染料(硫磺素 T、刚果红等)。

[0104] 表位的数目通过使用多肽序列来测定,所述多肽序列就其序列而言与形成表位的内源蛋白质的那个部分区域相同,或与该部分区域具有至少 50% 的同源性,并且在这种情况下具有表位的生物学活性。在根据本发明的标准物的构建中以所希望的数目嵌入经如此选择的多肽序列和/或根据本发明相互连接。

[0105] 根据本发明的标准物为聚合物,其由上面所描述的多肽序列,优选地表位构建,视情况,包含其他组成要素。

[0106] 在本发明的另一个实施方案中,上面所描述的多肽序列,优选地表位,和/或其具有相应表位的生物学活性的同源物,提供相对于各标准物的剩余单体类型之一的数目而言和/或相对于所有其他单体的数目而言相等或更多数目的单体。

[0107] 在本发明的另一个实施方案中,表位是 A- β 肽的表位,其选自部分区域 A- β 1-8 (SEQ ID NO:2)、A- β 1-11 (SEQ ID NO:3)、A- β 1-16 (SEQ ID NO:4)、A- β 3-11 (SEQ ID NO:5) 和 pyroGluA- β 3-11 (SEQ ID NO:6)、A- β 11-16 (SEQ ID NO:7) 和 pyroGluA- β 11-16 (SEQ ID NO:8),例如人 N 末端表位(具有下列序列:DAEFRHDSGYE(1-11; 相应于 SEQ ID NO:3)。

[0108] PyroGlu 是焦谷氨酸的缩写,其可以由 A- β 肽的 3 和/或 11 位的谷氨酸残基形成,在 N-末端的残基被分裂出去之后。

[0109] 根据本发明的标准物分子由上面所定义的多肽序列构建的聚合物。本发明意义下的寡聚物为由 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个单体形成的聚合物(单体,理解为上面提到的多肽序列),或其多倍物,优选地 2-16、4-16、8-16,特别优选地 8 或 16,或其多倍物。

[0110] 因此,根据本发明的标准物为根据本发明的寡聚物或者聚合物。

[0111] 在本发明的一个备选方案中,所述标准物是水溶性的。

[0112] 在本发明的一个备选方案中,根据本发明的标准物由相同的多肽序列构建。

[0113] 在本发明的一个备选方案中,根据本发明的标准物由不同的多肽序列构建。

[0114] 在本发明的一个备选方案中,这样的上面所定义的多肽序列以线性构型相互排列。

[0115] 在本发明的一个备选方案中,这样的上面所定义的多肽序列相互排列成支化的、根据本发明的寡聚物。

[0116] 在本发明的一个备选方案中,这样的上面所定义的多肽序列相互排列成交联的、根据本发明的寡聚物。

[0117] 支化的或交联的、根据本发明的寡聚物可以借助于赖氨酸或借助于点击化学通过单个构件的连接来制备。

[0118] 如上面所描述的,根据本发明的标准物,即根据本发明的寡聚物或聚合物,除了以准确定义的数目存在的多肽序列,优选地表位外,还可以包含额外的氨基酸、间隔子和 / 或官能团,通过其,多肽序列,优选地表位,共价地相互连接。

[0119] 在一个备选方案中,排除多肽序列,优选地表位与半胱氨酸,特别是借助于半胱氨酸的二硫桥接的直接连接(以避免还原剂解开桥接)。同样,在另一个变化形式中,排除一方面间隔子与多肽序列和另一方面与半胱氨酸的直接连接。

[0120] 在一个备选方案中,本发明涉及标准物分子,其包含 A- β 肽的氨基末端部分的拷贝或由 A- β 肽的氨基末端部分的拷贝构建,所述氨基末端部分选自部分区域 A- β 1-8 (SEQ ID NO :2)、A- β 1-11 (SEQ ID NO :3)、A- β 1-16 (SEQ ID NO :4)、A- β 3-11 (SEQ ID NO :5) 和 pyroGluA- β 3-11 (SEQ ID NO :6)、A- β 11-16 (SEQ ID NO :7) 和 pyroGluA- β 11-16 (SEQ ID NO :8),例如人 N 末端表位(具有下列序列:DAEFRHDSGYE(1-11))。

[0121] 通过官能团的表位复制可以在单个构件的合成之前或之后进行。根据本发明的标准物的特征是,多肽序列的共价连接。

[0122] 根据本发明的待使用的多肽序列可以与 A- β 全长肽的序列是相同的或者显示与 A- β 全长肽的序列 50、55、60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% 的同源性。

[0123] 备选地,也使用这样的多肽序列以构建根据本发明的标准物分子,其与 A- β 全长肽的部分区域是相同的或者显示与 A- β 全长肽的部分区域 50、60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% 的同源性。

[0124] 对于根据本发明所使用的序列重要的是,其不(或仅根据条件受控地)聚集的特性和 / 或其作为表位的活性。

[0125] 在本发明的另一个实施方案中,标准物以树枝体(Dendrimere)构建。根据本发明的树枝体从上面所描述的根据本发明待使用的多肽序列构建并且可以包含中心支架分子。优选的是,所述支架分子为链霉抗生物素蛋白单体,特别优选地聚合物,尤其是四聚体。

[0126] 在一个变化形式中,根据本发明的树枝体包含这样的多肽序列,其具有与 A- β 肽的部分区域是相同的或显示与相应的部分区域至少 50% 的同源性的序列。

[0127] 根据本发明,术语“至少 50%的同源性”,也理解为更高的同源性,其选自 50、55、60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%组成的组。

[0128] 标准物,有利地在水中具有较高的溶解度、作为内源蛋白质致病聚集体或寡聚物的,在根据本发明的实施方案中由这样的多肽序列形成,其与 A- β 肽的 N-末端区是相同的或具有与其至少 50%的同源性。根据本发明, A- β 多肽的 N-末端区,理解为氨基酸序列 A- β 1-8 (SEQ ID NO :2)、A- β 1-11 (SEQ ID NO :3)、A- β 1-16 (SEQ ID NO :4)、A- β 3-11 (SEQ ID NO :5) 和 pyroGluA- β 3-11 (SEQ ID NO :6)、A- β 11-16 (SEQ ID NO :7) 和 pyroGluA- β 11-16 (SEQ ID NO :8)。

[0129] 根据本发明的标准物分子可以包含针对至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个不同探针的表位。

[0130] 因此可以将对于不同探针特征性的表位嵌入在根据本发明的标准物中,即,使用这样的多肽序列,其与 A- β 肽的不同区是相同的,或具有与其至少 50%的同源性,但具有相应表位的活性。

[0131] 为此在一个实施方案中,使用这样的多肽序列,其与 A- β 多肽的 N-末端区是相同的或具有至少 50%的同源性,以及这样的多肽序列,其与 A- β 多肽的 C-末端区是相同的或具有至少 50%的同源性。

[0132] 在本发明的一个实施方案中,所述标准物分子包含所谓的间隔子。

[0133] “间隔子”,理解为这样的分子,其通过共价键被嵌入标准物分子中并且具有确定的物理和 / 或化学性质,通过其标准物分子的性质被改变。在根据本发明的标准物的一个实施方案中,使用亲水性或疏水性,优选地亲水性间隔子。亲水性间隔子选自由聚乙二醇、糖、甘油、聚-L-赖氨酸或 β -丙氨酸形成的分子的组。

[0134] 在本发明的一个备选方案中,根据本发明的标准物包含 (另外的) 官能团。

[0135] 官能团,理解为与标准物分子共价连接的分子。在一个变化形式中,所述官能团包含生物素基团。由此与链霉抗生物素蛋白的强的共价键合成为可能。因此,包含生物素基团的标准物分子可以与包含链霉抗生物素蛋白基团的分子相连接。如果根据本发明的标准物分子包含生物素和 / 或链霉抗生物素蛋白基团,那么可以构建更大的标准物或将更多的,可能地,不同的标准物分子连接在一个支架上。

[0136] 在本发明的另一个备选方案中,标准物分子包含用于分光光度测定的染料和 / 或芳族氨基酸。芳族氨基酸例如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸或组氨酸,或选自该组。由于色氨酸的嵌入,使得溶液中标标准物浓度的分光光度法测定成为可能。

[0137] 本发明的进一步的目标是包含多肽的树枝体,就其序列而言在相应的部分区域中与内源蛋白质是相同的或与内源蛋白质在相应的部分区域上具有至少 50%的同源性,所述内源蛋白质作为蛋白质聚集疾病的特征。

[0138] 根据本发明的树枝体可以包含标准物的每个上面所描述的特征或每个其任意组合。

[0139] 在本发明的另一个备选方案中,它们是:

[0140] 包含准确定义数目的用于探针的共价结合的表位

[0141] 包含 A- β 肽的表位的树枝体,

[0142] 所述树枝体的特征在于,其在水中具有比作为蛋白质聚集疾病的特征的内源蛋白质致病聚集体更高的溶解度,

[0143] 包含官能团的树枝体,

[0144] 包含至少一个间隔子分子的树枝体和 / 或

[0145] 包含用于分光光度法测定的染料和 / 或芳族氨基酸的树枝体。

[0146] 根据本发明,所述树枝体具有辐射对称。

[0147] 在一个变化形式中,树枝体第一代支化通过赖氨酸,特别是三个赖氨酸来实现。

[0148] 在本发明的另一个备选方案中,在标准物,特别是树枝体中,所述多肽序列优选地表位,不通过与硫原子的键合,不通过硫醚键和 / 或不通过半胱氨酸(可能地,借助于通过半胱氨酸的二硫桥接)相互地或与标准物的其他组成要素例如氨基酸、间隔子和 / 或官能团和 / 或其他上面所描述的组成要素相连接,特别是共价地结合。同样,在另一个变化形式中,多肽序列,优选地表位,和与其结合的间隔子不通过与硫原子的键合,不通过硫醚键和 / 或不通过半胱氨酸相互地或与标准物的其他组成要素例如氨基酸、其他间隔子和 / 或官能团和 / 或其他上面所描述的组成要素相连接,特别是共价地结合。

[0149] 本发明还涉及用于制备如上面所描述的标准物的方法。

[0150] 在一个实施方案中,根据本发明的标准物借助于本领域技术人员已知的肽合成或重组方法制备。

[0151] 本发明的另一个目标是上面所描述的标准物或上面所描述的树枝体用于量化作为蛋白质聚集疾病的特征的内源蛋白质致病聚集体或寡聚物的用途。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,使用标准物以量化 A- β 寡聚物。

[0153] 根据本发明,本发明的寡聚物或聚合物用作量化内源蛋白质的致病性聚集体或寡聚物的方法中的标准物,其中内源蛋白质用于表征蛋白质聚集疾病或淀粉样变性或蛋白质错误折叠疾病。

[0154] 本发明的标准物应用于本发明的一个实施方式中用于表面 FIDA 方法、Elisa(夹心 Elisa) 或 FACS 中的校准。

[0155] 在另一个实施方案中,本发明涉及包含根据本发明的标准物的试剂盒。可以将本发明的试剂盒的化合物和 / 或组分包装在容器中,可能地具有 / 在缓冲液和 / 或溶液中。备选地,可以将几个组分包装在相同的容器中。除此之外或备选地,可以将一个或多个组分吸附在固体载体,例如玻璃板、芯片或尼龙膜上或微滴定板的孔上。试剂盒还可以包含对任一个实施方案的对于试剂盒的用法的说明书。

[0156] 在本发明的一个备选方案中,通过下列来使用用于量化内源蛋白质致病聚集体或寡聚物的标准物:

[0157] 在第一步中,用探针标记标准物或树枝体并测定与标准物或树枝体结合的探针的数目,

[0158] 在第二步中,用探针标记作为蛋白质聚集疾病的特征的内源蛋白质致病聚集体或寡聚物,测定各自结合至致病聚集体或寡聚物的探针的数目,

[0159] 在第三步中,比较来自第 1 步与来自第 2 步的各自结合至标准物或树枝体的探针的数目,和

[0160] 在第四步中,来自体液的寡聚物的数目和大小由此得到测定。

[0161] 在本发明的一个变化形式中,根据本发明的标准物,优选地树枝体,被用于表面-FIDA-法的校准。在第一步中,将来自体液的內源致病聚集体,例如A- β 聚集体,通过捕捉分子,例如捕捉抗体,固定在玻璃表面上。在A- β 聚集体的情况下,可以为此使用N-末端结合捕捉抗体。在固定化后,通过两个不同的探针标记聚集体。在A- β 聚集体的情况下,使用例如A- β 抗体,两者都通过N-末端结合表位结合。将检测探针用优选地不同的荧光染料标记。由此它们在显微镜下,例如激光扫描显微镜下是可见的。

[0162] 根据本发明,排除內源多肽的单体检测,通过在检测系统中使用三种不同的或三种不同地标记的探针,其与相似的或相同的表位结合。备选地或另外地,可以排除单体的检测,因为具有较低强度的信号因强度切分点不被评价。这是因为较大的聚集体具有更多个对于这两个具有不同地标记的染料的探针的结合位点,单体检测备选地或另外地可以由于这些信号的交叉关联而被排除。

[0163] 本发明的标准物可用作检测中的內标或外标。

[0164] 还有本发明的主题为用于根据上面所述的方法选择性量化A- β 聚集体的试剂盒。此种试剂盒可含有一种或多种下列组分:

[0165] - 玻璃基材,其以疏水物质、优选右旋糖酐、优选羧甲基右旋糖酐涂覆;

[0166] - 标准物;

[0167] - 捕获分子;

[0168] - 探针;

[0169] - 含捕获分子的基材。

[0170] 本发明试剂盒的化合物和/或组分可包装在容器中,任选地与缓冲剂和/或溶液一起/在缓冲剂溶液中。作为替代许多组分可包装在相同的容器中。除这之外或作为这的替代,一种或多种组分可吸收在固体支持体,诸如玻璃板、芯片或尼龙膜上或吸附在微量滴定板的孔上。此外,试剂盒可含有任何一个实施方案的试剂盒的使用说明。

[0171] 在试剂盒的其它改进中,上面所述的捕获分子固定在基材上。此外,试剂盒可含有溶液和/或缓冲液。为了保护固定在其上的右旋糖酐表面和/或捕获分子,这些可用溶液或缓冲液覆盖。

[0172] 本发明的其它主题为本发明的方法用于AD的诊断、早期诊断和/或预后的应用。

[0173] 本发明的其它主题为本发明的方法用于监测AD的治疗和用于监测和/或检验活性物质的效力和/或治疗的应用。这可用于临床试验、研究中以及用于治疗监测中。为此,根据本发明的方法对样品进行试验并将结果进行比较。

[0174] 本发明的其它主题为本发明的方法和生物标志物用于决定在临床研究中一个人是否被接受的用途。为此,根据本发明的方法对样品进行试验并将参考极限值作出决定。

[0175] 本发明的其它主题为利用本发明的方法测定活性物质的效力和/或治疗的方法,在该方法中将由样品得到的结果相互比较。样品为在施用活性物质或实施治疗之前或之后、或在施用活性物质或实施治疗之后的不同时间采出的体液。基于该结果,选择活性物质和/或治疗,通过这A- β 聚集体降低发生。根据本发明将结果与不经受活性物质和/或治疗的对照比较。

实施例:

[0176] I. 在 CSF 中测定 A- β 寡聚物 (A- β 聚集体)

[0177] 1. 基材制备

[0178] 将玻璃载片在超声波浴中清洁 15 分钟。表面用水冲洗三次并在氮气流中干燥。将清洁过的载片持浸于 3 : 1 (V/V) 浓硫酸和过氧化氢的混合物中至少 30 分钟以活化羟基基团。然后将其用水冲洗直至冲洗水具有中性的 pH。在一秒钟的漂洗步骤中使用 99% 乙醇然后将载片在氮气流中干燥。将玻璃载片浸于 1-7% 的 3-氨基-丙基三乙氧基甲硅烷 (APTES) 在无水甲苯中的溶液中 1 至 4 小时。用 5% 的 APTES 和 2 小时的温育时间获得良好的结果。然后将载玻片用丙酮和水冲洗并在氮气流中干燥。

[0179] 为了用右旋糖酐包覆, 将玻璃表面羟基化然后用氨基基团活化。将羧甲基右旋糖酐 (CMD) 以 10mg/ml 的浓度溶于水中并与 N-乙基-N-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) (200mM) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (50mM) 混合。在 10 分钟的预温育之后, 将溶液于室温再温育 2 小时。然后将玻璃载片用水洗涤。

[0180] 2. 将作为捕获分子的抗体固定在包覆的基材上。

[0181] 另一表面的活化用 EDC/NHS 的溶液 (200 或 50mM) 进行 5 分钟。将抗体的溶液加入到该溶液中并于 4°C 温育 2 小时。结果抗体与 CMD- 包覆的玻璃表面共价结合。然后为了使 CMD 间隔子上剩余的活性羧基端基团失活, 用 1M 在 DMSO 中的乙醇胺温育 15 分钟。然后将基材用 PBS 洗涤三次。

[0182] 3. 将 A- β 聚集体固定在预处理过的基材上

[0183] 将待检测的样品在基材上温育 1 小时, 然后用 TBST (0.1%) (W/W)、在 TBS 缓冲液中的吐温 -20、TBS : 50nM Tris-HCl、0.15M NaCl, pH7.4) 洗涤两次。

[0184] 4. 样品与荧光染料连接用于其标记

[0185] 使用 Nab 228、抗小鼠 Alexa 633 和 6 E10 Alexa 488 抗体。Nab228 抗体用 KIT (荧光标记的 KIT Alexa-647, Molecular Probes, Karlsruhe, 德国) 按照厂家的说明进行标记。将标记的抗体在黑暗中于 4°C 贮存在含有 2mM 叠氮化钠的 PBS 中。

[0186] 5. 用探针标记聚集体

[0187] 所用抗体的量依赖于期望的标记程度。加入探针并于室温温育 1 小时, 然后用 TBST 洗涤五次和用 TBS 洗涤两次。

[0188] 6. 聚集体的检测和样品的试验

[0189] 用共聚焦激光扫描显微镜 LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany) 进行测量。显微镜安装有氩离子激光器和三个氦氖激光器。将激光束聚焦于衍射 - 限制的 0.25 飞升的体积点上。测定 1000x1000 像素的区域的荧光强度。由于使用不同的探针, 进行共定位分析。为了获得代表值, 在载片上若干位点处测量该区域。

[0190] 用得自 Carl Zeiss, Jena, 德国的 ZEN2008 软件进行测量。

[0191] 7. CSF 样品的分析

[0192] 用本发明的方法对 26 份来自不同患者的 CSF 样品进行分析。样品分别源自 14 位 AD 患者和 12 位对照患者 (不同年龄的关于蛋白质聚集疾病是健康的)。结果汇总于附图 1 中。结果表明明显的组间的差别是可能的。在 AD 组中 A- β 寡聚物的平均值显著高于对照组。

[0193] 8. 与 MMSE 的相关性

[0194] 将本发明的分析结果与提供者的 MMSE (简易精神状态测试) 比较。结果汇总于附图 2 中。根据该结果, MMSE 试验的评价和本发明的析的评价之间相关性变得清晰。

[0195] II. 聚集体标准物的检测

[0196] 1. 聚集体标准物的制备

[0197] 在一个实施例中, 构建 A- β 寡聚物标准物, 其针对结合 A- β 抗体的 N 端具有 16 个表位 (与 A- β -(1-11) 相对应的表位, 序列: DAEFRHDSGYE)。

[0198] 首先, 合成多抗原肽 (MAP), 其由四个 N 端 A- β 表位 A- β 1-11 构成。将这些多抗原肽按照附图 3A 与三重赖氨酸核偶联, 其用于通过 UV/VIS 光谱学进行 MAP 浓度的精确测定, 含有两个色氨酸。此外, 生物素尾端与 N- 末端连接。这用于四个 4-MAP 单位分别与四聚体的偶合, 如附图 3 中 B 部分所示。在 4-MAP 和抗生蛋白链菌素的温育后形成 16-MAP, 如附图 3 中 C 部分所示。通过尺寸排阻色谱法将 16-MAP 与保温混合物的其它组分分离。

[0199] 下一步, 将 MAP-16 在 PBS 中连续稀释并用于 s F I DA 试验检测 A- β 寡聚物。

[0200] 2. 玻璃板的制备

[0201] 将玻璃微量滴定板在超声波浴中清洁 15 分钟然后用血浆清洁剂处理 10 分钟。为了活化玻璃表面, 将孔在 5M NaOH 中温育至少 3 小时, 用水冲洗然后在氮气流中干燥。为了用右旋糖酐包覆, 将玻璃表面羟基化然后用氨基基团活化。为此, 将玻璃板在 5M 乙醇胺在 DMSO 中的溶液中温育过夜。下一步, 将玻璃用水冲洗并在氮气流中干燥。将羧甲基右旋糖酐 (CMD) 以 20mg/ml 的浓度溶于水中并与 N- 乙基-N-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC), (200mM) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS), (50mM) 混合。在 10 分钟的预温育之后, 将溶液于室温再温育 2 小时。然后将玻璃板用水洗涤。

[0202] 3. 将作为捕获分子的抗体固定在包覆的玻璃上

[0203] 另一活化用 EDC/NHS 的溶液 (200 或 50mM) 进行 5 分钟。将抗体的溶液加入到该溶液中并于 4°C 温育 2 小时。结果, 抗体共价结合于 CMD- 活化的玻璃表面上。然后为了使 CMD 间隔子上剩余的活性羧基端基团失活, 用 1M 在 DMSO 中的乙醇胺温育 5 分钟。然后将玻璃用 PBS 洗涤三次。

[0204] 4. 将 MAP-16 固定在预处理过的玻璃上

[0205] 将待检测的含有 MAP-16 的样品在玻璃上温育 1 小时, 然后用 TBST (0.1%) (W/W)、在 TBS 缓冲液中的吐温-20, TBS: 50nM Tris-HCl、0.15M NaCl, pH7.4) 洗涤三次。

[0206] 5. 用荧光染料标记探针

[0207] 使用 6E10-Alexa-488 抗体和 IC-16 抗体。IC16 抗体用试剂盒 (荧光标记的试剂盒 Alexa-647, Molecular Probes, Karlsruhe, 德国) 按照厂家的说明进行标记。将标记的抗体在黑暗中于 4°C 贮存在含有 2mM 叠氮化钠的 PBS 中。

[0208] 6. 用探针标记聚集体

[0209] 加入探针并于室温温育 1 小时, 然后用 TBST 洗涤五次和用水洗涤两次。

[0210] 7. 聚集体标准物的检测

[0211] 用共聚焦激光扫描显微镜 LSM710 (Carl Zeiss, Jena, 德国) 进行测量。显微镜安装有氦离子激光器和三个氦氖激光器。以瓷砖扫描模型 (Tile-Scan-Modus) 进行测量, 其中对孔中的邻接面进行测量并装配显像。每个瓷砖扫描含有 3x2 单独的影像, 且每个影像具有 213x213 μm 的面积。

[0212] 作为替代,在 TIRF 显微镜 (TIRF = 全内反射) 进行测量,其中 TIRF 显微镜由倒置显微镜 DMI6000、激光盒和 Hamamatsu EM-CCD c9100 照相机构成。在瓷砖扫描模式 3x3 单独的显像中每个的尺寸为 109.9x109.9 μm 。

[0213] 用软件“Image J”进行评价 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)。通过使用不同的探针,可以实施共定位分析。为此,首先从单独像素的强度值中减去截止值 (定义为不含 MAP-16 的阴性对照)。下一步,加入许多共定位的像素,其强度高于零。

[0214] 附图 4 显示测量的结果。可清楚地看出 sFIDA 信号,即共定位的像素的量,与 MAP-16 分子的浓度相关。

[0215] III. A- β 聚集体 (A- β 寡聚物) 与 A- β 单体的比较

[0216] 1. 通过 sFIDA 测定

[0217] 为了能排除 A- β 单体也被 sFIDA 检测到因而 A- β 寡聚物的信号被扭曲的可能性,按照 Johansson 等, FEBS J. 2006, 273, 第 2618-2630 页的方案制备 A- β 单体和寡聚物 (由合成的 A- β 构成),并用系统测试。另外,将 A- β 寡聚物在 PBS 中连续稀释并在浓度系列中检验试验的线性。按照上面的描述进行测量, Zeiss LSM 710 显微镜用于检测并记录 2x25 图像,其中每个图像的尺寸为 213x213 μm 和 1024x1024 像素。结果如附图 5 所示。A- β 寡聚物产生清晰的 sFIDA 信号,然而 A- β 单体不是这样。根据附图 5B 可以看出 sFIDA 信号与 A- β 寡聚物的浓度相关联而且非常低的 A- β 寡聚物浓度对产生正信号是必要的。

[0218] 2. FRET 测量

[0219] 为了确定对于 sFIDA 除之前所选择的数量的交叉-相关的像素外的另一信号是否也可产生,进行 FRET 测量。FRET 代表 **Förster** 共振能量转移。在 FRET 中将所激发的荧光染料能量转入另一荧光染料中。FRET 强度尤其依赖于供体 (Donor) 和受体 (Akzeptor) 之间的距离且在最高 10nm 的范围内可被观察到。因此在 sFIDA 中使用 FRET 以将 A- β 单体与 A- β 寡聚物区分将是可能的。将与供体染料偶联的抗 A- β 抗体 (例如 6E10-Alexa488) 和适于此的与能接受的染料偶联的抗 A- β 抗体 (例如 IC-16-Alexa647) 在 A- β 寡聚物上相互在直接接近处结合, FRET 由于空间接近成为可能。6E10-Alexa-488 和 IC-16-Alexa647 与两个偶然在彼此的距离小于 10nm 处固定的 A- β 单体结合,将在统计学上是非常不大可能的。如果占据以俘获抗体覆盖的表位的抗体用于检测,则概率可降低至零。对于该实验, A- β 单体和 A- β 寡聚物通过尺寸排阻色谱法来制备并被固定,而对于 sFIDA 测量,按照上面的描述进行。在以 Leica 荧光显微镜进行的随后的测量中,荧光染料以 488nm 的波长激动并在 705nm 的波长下检测 FRET 发射。作为对照,还测量了两份样品,其中在每份样品中仅加入一种荧光染料-偶联的抗体。

[0220] 在附图 6 中很清楚,测量结果是仅 A- β 寡聚物产生 FRET 信号,而 A- β 单体或对照品不产生 FRET 信号。

[0221] IV. 在阿尔茨海默病小鼠模型的脊髓液中测定 A- β 聚集体

[0222] 在进一步的研究中,研究了是否 sFIDA 也适合于在阿尔茨海默病小鼠模型的脊髓液中检测 A- β 聚集体,如果适合的话,在什么稀释度下进行检测。至于实验步骤,将来自 APP/Ps1 小鼠的脊髓液和非转基因的对照动物在 PBS 缓冲液中以 1 : 10、1 : 50 和 1 : 250 稀释并通过 sFIDA 试验。

[0223] 实验步骤跟上面描述的相似,不过在 Leica 公司的 LSM 上进行测量。发现在来自

转基因小鼠的两份样品之一中甚至在 250- 倍稀释度下显著高的 sFIDA 信号还可检测到,除来自非转基因的对照动物的样品外。每个孔,检测了 25 个 1024x4024 像素的区域(每个 246 μ m),即孔面积的 16%。

[0224] 结果如附图 7 所示。结果表明 sFIDA 不仅适合于在人中的早期诊断,而且适合于监测实际研究中治疗的效力。

[0225] 图表的说明:

[0226] 附图 1

[0227] 在患者的 CSF 中测定 A- β 聚集体

[0228] 附图 2

[0229] 附图 1 的结果与 MMSE 的相关性

[0230] 附图 3:

[0231] A- β 寡聚物标准物的结构,含 16 个结合 N 端的 A- β 抗体的表位,其对应于 A- β 的第一 11 个氨基酸(序列:DAEFRHDSGYE)。A) 合成 4-MAP,由 4 个与三重赖氨酸核偶联的 N 端 A- β 表位 1-11 构成,其含有两个用于通过 UV/VIS 光谱学浓度测定的色氨酸。B 和 C) 为了在各种情况下制备 16-MAP,四个 4-MAP 通过抗生蛋白链菌素四重体(-Teramer)偶联。通过尺寸排阻色谱法将 MAP-16 与其它温育混合物的其它组分分离。

[0232] 附图 4:

[0233] 在各种浓度下进行 MAP-16 的 sFIDA 测量,在 PBS 缓冲液中稀释。不含 MAP-16 的 PBS 缓冲液用作阴性对照。A) 在激光扫描显微镜上进行测量(Zeiss LSM 710)。B)。在 TIRF 显微镜(Leica)上进行测量。

[0234] 附图 5:

[0235] A) sFIDA 对 A- β 单体不敏感,但 B) 检测 A- β 寡聚物浓度-依赖地、线性地且具有高灵敏性。A- β 单体和寡聚物由合成的 A- β 通过尺寸排阻色谱制备且在 PBS 缓冲液中稀释。

[0236] 附图 6:

[0237] sFIDA 以 FRET 信号在 A- β 单体和 A- β 寡聚物上测量。PBS 用作阴性对照。作为其它对照,对样品进行检测,其中在每份样品中仅加入一种染料-偶联的抗体。供体染料为与 A- β 抗体 6E10 偶联的 Alexa488,且受体染料为与 A- β 抗体 IC-16 偶联的 Alexa 647。

[0238] 附图 7:

[0239] 在转基因的(Tg)阿尔茨海默病小鼠模型(APP/PS1)的脊髓液和在非转基因的对照动物(K)中进行 A- β 寡聚物的 sFIDA 检测。作为阴性对照,使用纯缓冲液样品。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 研究中心J黠ich

<120> 选择性量化A- β 聚集体的方法

<130> FZJ 1101 PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
35 40

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

[0002]

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 5

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 焦谷氨酸

<400> 6

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 7

Glu Val His His Gln Lys
1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 焦谷氨酸

<400> 8

Glu Val His His Gln Lys
1 5

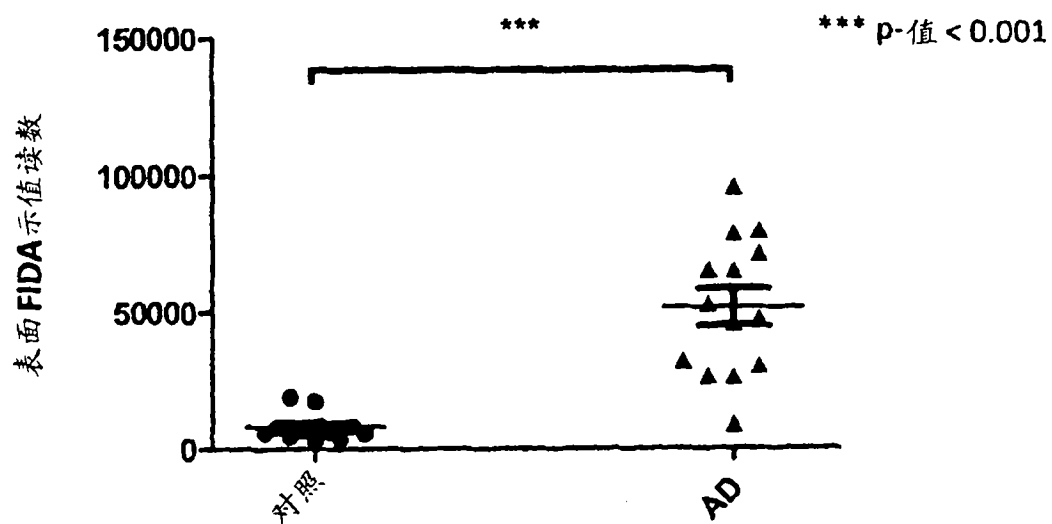


图 1

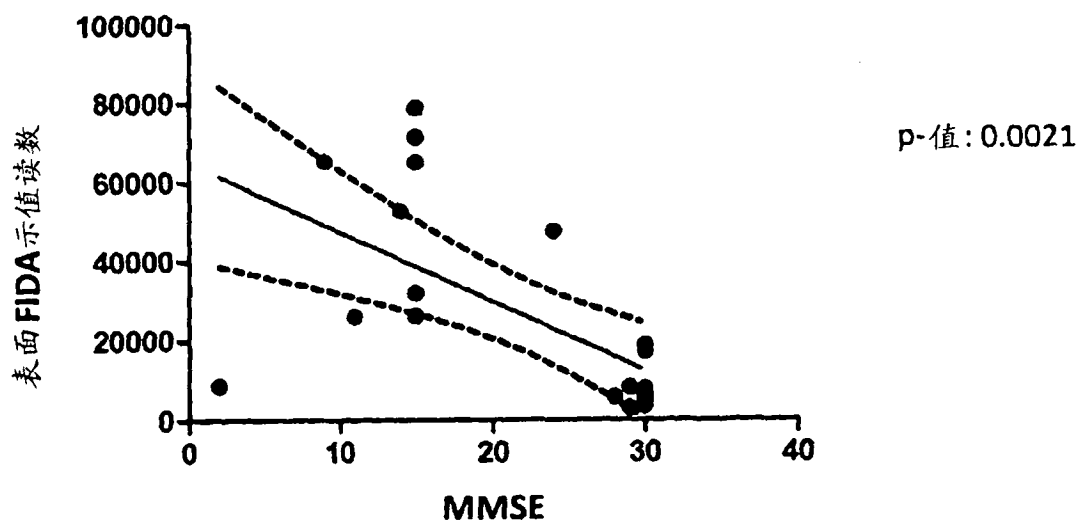


图 2

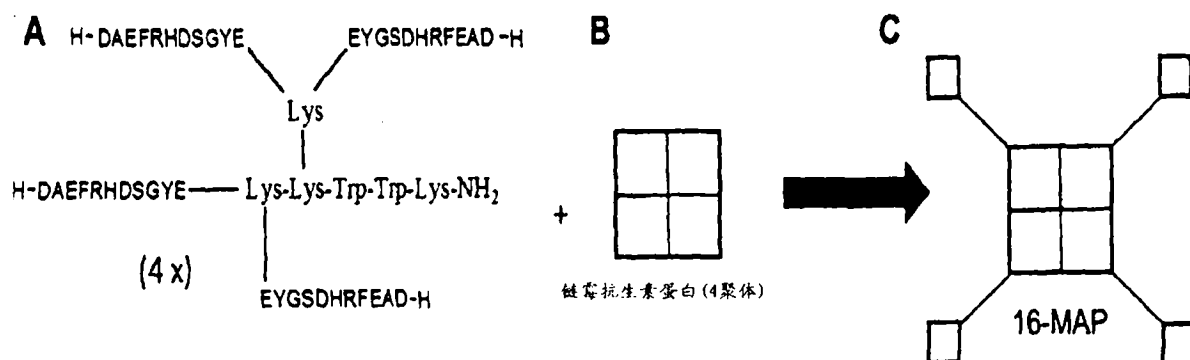


图 3

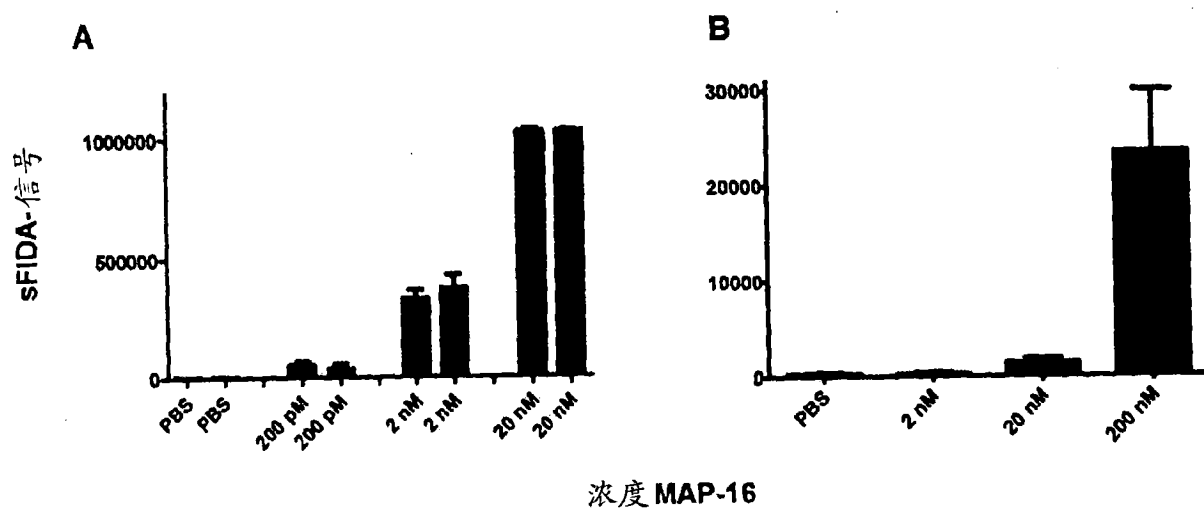


图 4

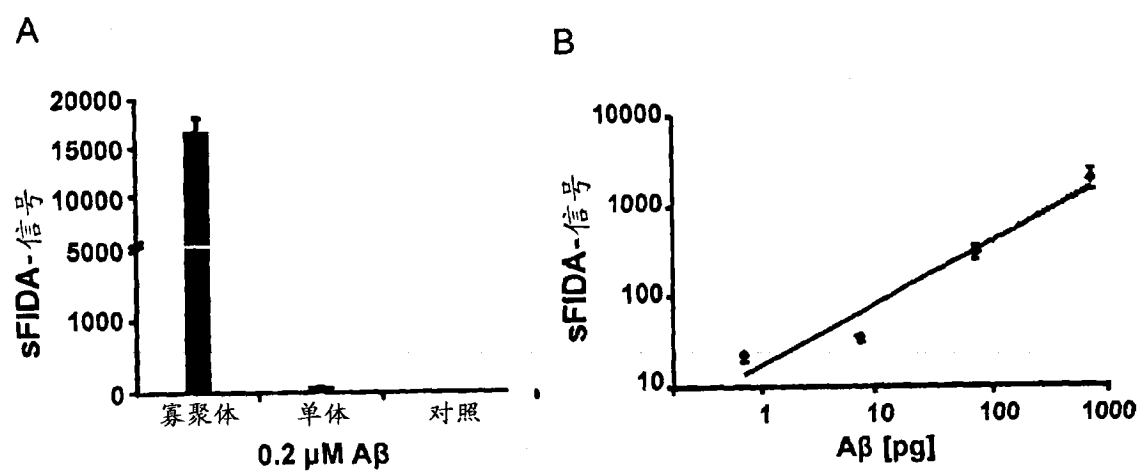


图 5

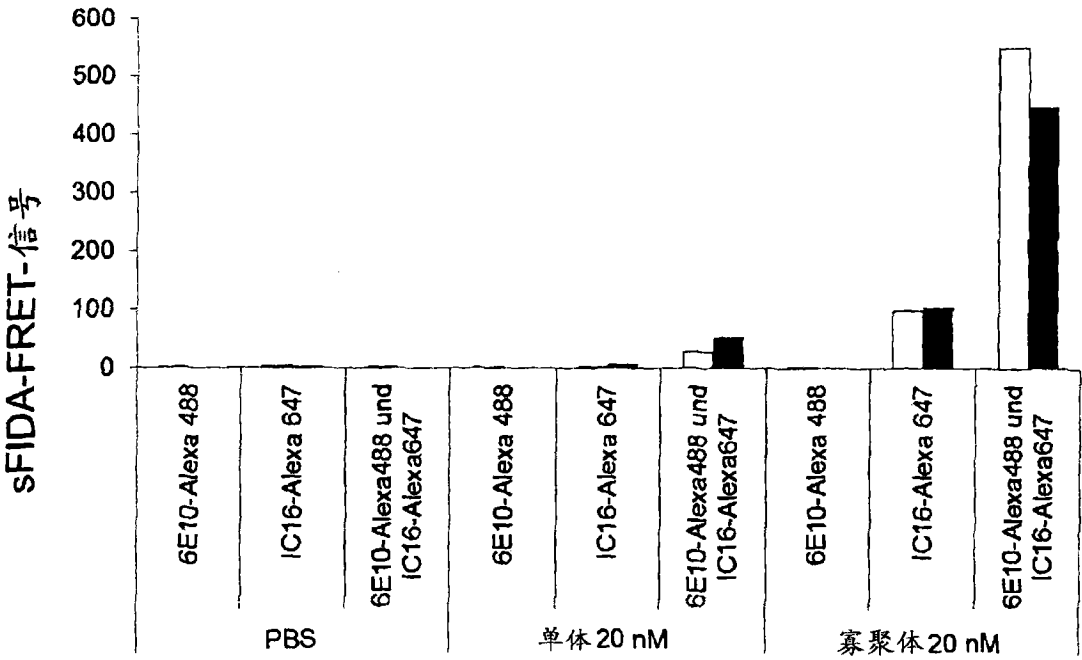


图 6

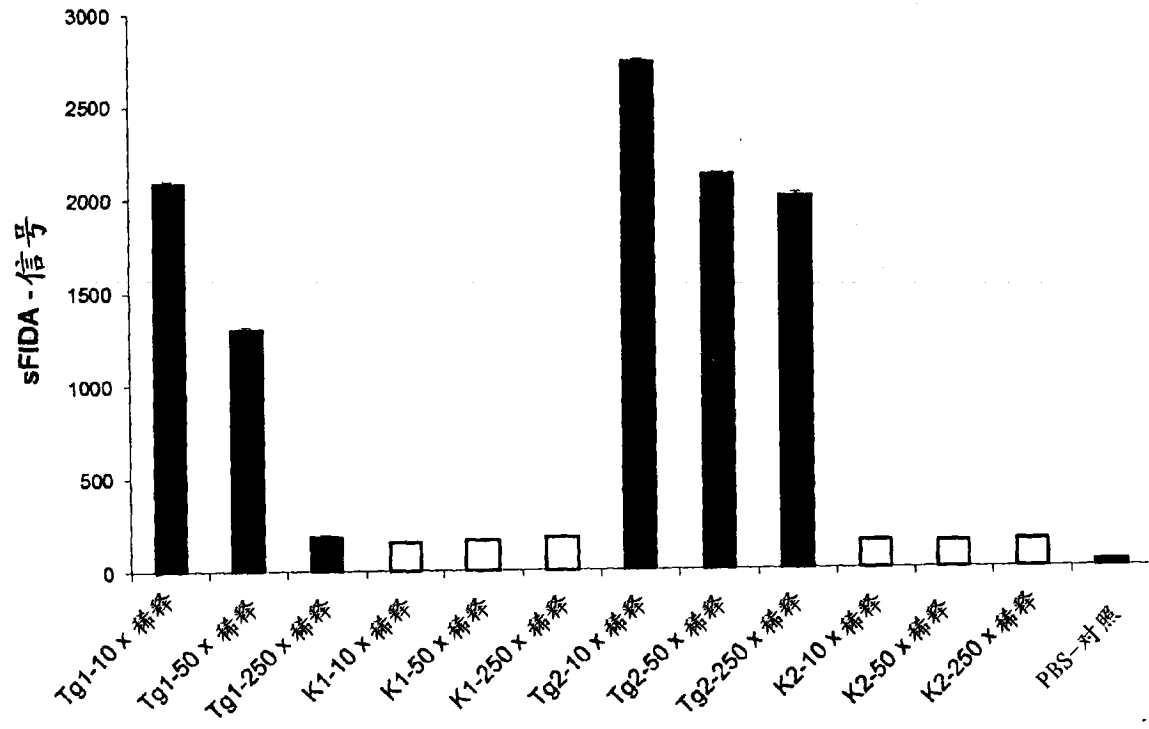


图 7