



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118984938 A

(43) 申请公布日 2024.11.19

(21) 申请号 202380026755.6

(22) 申请日 2023.04.10

(30) 优先权数据

2022-065117 2022.04.11 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/014583 2023.04.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/199893 JA 2023.10.19

(71) 申请人 卫材R&D管理有限公司

地址 日本

(72) 发明人 屈江勘太 田原和浩 汤本英美子

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 周莎

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 27/62 (2021.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

对活性型食欲素A进行定量的方法

(57) 摘要

一种对试样中的活性型食欲素A进行定量的方法,包括:将上述试样与识别食欲素A的C末端侧的单克隆抗体相接触来分离食欲素A类的步骤;将分离后的上述食欲素A类用蛋白酶消化,得到由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽的步骤;以及对上述肽进行质谱分析的步骤。

1. 一种对试样中的活性型食欲素A进行定量的方法,包括:
将所述试样与识别食欲素A的C末端侧的单克隆抗体接触来分离食欲素A类的步骤;
将分离后的所述食欲素A类用蛋白酶消化,得到由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽的步骤;以及
对所述肽进行质谱分析的步骤。
2. 根据权利要求1所述的方法,其还包括在进行所述质谱分析之前通过固相萃取法纯化所述肽的步骤。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其还包括在进行所述质谱分析之前进行高速液相色谱的步骤。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中通过免疫沉淀对所述食欲素A类进行分离。
5. 一种使用权利要求1~4中任一项所述的方法对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果来辅助诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或者创伤性脑损伤的方法。
6. 根据权利要求5所述的方法,其是辅助诊断神经退行性疾病的方法。
7. 根据权利要求5或6所述的方法,其中,从所述受试者处采集的试样是脑脊液。
8. 根据权利要求5~7中任一项所述的方法,其中,所述神经退行性疾病是突触核蛋白病或Tau蛋白病。
9. 根据权利要求5~8中任一项所述的方法,其中,所述神经退行性疾病是帕金森病、阿尔茨海默病或轻度认知障碍。

对活性型食欲素A进行定量的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及一种对活性型食欲素A进行定量的方法。

背景技术

[0002] 食欲素是大脑中参与维持觉醒的神经递质。食欲素存在两种异构体,其中之一是食欲素A。例如,已知的引起过度嗜睡(嗜睡症)的发作性睡病是一种由于食欲素神经元丧失而引起的疾病,并且发作性嗜睡病患者的大脑(脑脊液中)中的食欲素A的浓度明显较低。

[0003] 嗜睡症不限于在发作性嗜睡病中,在各种神经退行性疾病中也可见。例如,帕金森病患者除了运动障碍外,很多时候还并发日间嗜睡的症状。使用目前广泛使用的菲尼克斯Phoenix公司制造的放射免疫测定法(RIA)来测定帕金森病患者的脑脊液中的食欲素A的浓度,其结果是该食欲素A的浓度有下降的趋势,但其变化很小且偏差较大(非专利文献1)。

[0004] 近年的对脑脊液中的食欲素A的相关研究结果表明,通过目前广泛使用的菲尼克斯公司制造的放射免疫测定法(RIA)中所使用的(或同等产品的)抗食欲素A多克隆抗体可识别食欲素A类,其大部分被截短作为代谢物存在于脑脊液中(非专利文献2)。

[0005] 另一方面,文献指出被截短的食欲素A代谢物不具有与维持觉醒相关的活性(非专利文献3),它表明食欲素A固有的与维持清醒相关的活性可能仅限于未经过代谢的完整形,或者仅限于即使经过代谢,其代谢(截断)也只限于C末端部位的食欲素A类。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] [非专利文献1]Miriam,W.,等人,"帕金森病中的进行性多巴胺和下丘脑分泌素缺乏:对睡眠和觉醒有影响吗?",J Sleep Res.[睡眠研究杂志]2012年12月;21(6):710-717。

[0009] [非专利文献2]Sakai,N.,Matsumura,M.,Lin,L et al.,"在1型和2型发作性嗜睡病患者脑脊液中的下丘脑分泌素-1的HPLC分析。"Scientific Reports 9,477(2019)。

[0010] [非专利文献3]Manja,L等,"对食欲素A和食欲素B在人类食欲素1和食欲素2受体上的结构活性研究得出了食欲素2受体选择性配体和食欲素1受体优先配体",J.Med.Chem.2004,47,5,1153-1160

发明内容

[0011] 发明要解决的问题

[0012] 本公开的目的在于提供一种对活性型食欲素A进行定量的方法。

[0013] 用于解决问题的技术手段

[0014] 鉴于上述情况,本发明人进行了深入研究,结果发现了一种用于特异性定量脑脊液中存在的活性型食欲素A的方法,完成了本说明书。

[0015] 即,本说明书涉及以下[1]~[24]。

[0016] [1]一种对试样中的活性型食欲素A进行定量的方法,包括:

[0017] 将试样与识别食欲素A的C末端侧的单克隆抗体相接触来分离食欲素A类的步骤;

[0018] 将分离后的上述食欲素A类用蛋白酶消化,得到由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽的步骤;以及

[0019] 对上述肽进行质谱分析的步骤。

[0020] [2]根据[1]所述的方法,其进一步包括在进行上述质谱分析之前通过固相萃取法纯化上述肽的步骤。

[0021] [3]根据[1]或[2]所述的方法,其还包括在进行上述质谱分析之前进行高速液相色谱的步骤。

[0022] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的方法,其中,通过免疫沉淀对上述食欲素A类进行分离。

[0023] [5]一种使用[1]~[4]中任一项所述的方法对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果来辅助诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或者创伤性脑损伤的方法。

[0024] [6]根据[5]所述的方法,其是辅助诊断神经退行性疾病的方法。

[0025] [7]一种使用[1]~[4]中任一项所述的方法对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果来诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或者创伤性脑损伤的方法。

[0026] [8]根据[7]所述的方法,其是诊断神经退行性疾病的方法。

[0027] [9]根据[5]~[8]中任一项所述的方法,其中,从上述受试者处采集的试样是脑脊液。

[0028] [10]根据[5]~[9]中任一项所述的方法,其中,上述神经退行性疾病是突触核蛋白病或Tau蛋白病。

[0029] [11]根据[5]~[10]中任一项所述的方法,其中,上述神经退行性疾病是帕金森病、阿尔茨海默病或轻度认知障碍。

[0030] [12]根据[3]所述的方法,其中,通过免疫沉淀对上述食欲素A类进行分离。

[0031] [13]一种使用[12]所述的方法对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果辅助诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或者创伤性脑损伤的方法。

[0032] [14]根据[13]所述的方法,其是辅助诊断神经退行性疾病的方法。

[0033] [15]根据[13]所述的方法,其中,从上述受试者处采集的试样是脑脊液。

[0034] [16]根据[13]所述的方法,其中,上述神经退行性疾病是突触核蛋白病或Tau蛋白病。

[0035] [17]根据[13]所述的方法,其中,上述神经退行性疾病是帕金森病、阿尔茨海默病或轻度认知障碍。

[0036] [18]一种使用[12]所述的方法对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果来诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或者创伤性脑损伤的方法。

[0037] [19]根据[18]所述的方法,其是诊断神经退行性疾病的方法。

[0038] [20]根据[18]所述的方法,其中,从上述受试者处采集的试样是脑脊液。

[0039] [21]根据[18]所述的方法,其中,上述神经退行性疾病是突触核蛋白病或Tau蛋白

病。

[0040] [22]根据[18]所述的方法,其中,上述神经退行性疾病是帕金森病、阿尔茨海默病或轻度认知障碍。

[0041] [23]一种使用[1]~[4]中任一项所述的方法对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果确定昼夜节律的方法。

[0042] [24]根据[23]所述的方法,其中,从上述受试者处采集的试样是脑脊液。

[0043] 发明效果

[0044] 根据本公开,可以提供一种对活性型食欲素A进行定量的方法。

附图说明

[0045] 图1是表示出实施例1中的、待定量的肽(由序列编号1表示的氨基酸序列所构成的肽)和示出定量结果的图表的图。

[0046] 图2是表示出比较例1中的、待定量的肽(由序列编号2表示的氨基酸序列所构成的肽)和示出定量结果的图表的图。

[0047] 图3是表示出比较例2中的、待定量的肽(由序列编号1表示的氨基酸序列所构成的肽)和示出定量结果的图表的图。

[0048] 图4是示出健康人、帕金森病患者和阿尔茨海默病患者以及轻度痴呆症患者的脑脊液中的活性型食欲素A的定量结果的图。

[0049] 图5是示出健康人、帕金森病患者和阿尔茨海默病患者以及轻度痴呆症患者的脑脊液中的、活性型食欲素A的量与食欲素A代谢物(C末端侧被截断的食欲素A)的量的相关性的图。

[0050] 图6是示出健康人的脑脊液中的活性型食欲素A的量随时间而变化的图表。

[0051] 图7是示出健康人的脑脊液中的食欲素A的量随时间而变化的图表。

具体实施方式

[0052] 以下,对本公开的方法进行详细说明。在序列编号1表示的氨基酸序列(XPLPDCCR:序列编号1)中,N末端的X表示焦谷氨酸残基。在序列编号2表示的氨基酸序列(LYELLHGAGNHAAGILTX:序列编号2)中,C末端的X表示酰胺化亮氨酸残基。在序列编号3表示的氨基酸序列(XPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTX:序列编号3)中,N末端的X表示焦谷氨酸残基,C末端的X表示酰胺化亮氨酸残基。序列编号4表示的氨基酸序列是TCSCR:序列编号4。

[0053] 本公开的一个实施方式涉及的对活性型食欲素A进行定量的方法包括:通过将试样与识别食欲素A的C末端侧的单克隆抗体相接触来分离食欲素A类的步骤;将分离后的上述食欲素A类用蛋白酶消化,得到由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽的步骤;以及对上述肽进行质谱分析的步骤。

[0054] 食欲素A是未经过代谢的完整的食欲素A和食欲素A的代谢物的总称。

[0055] 活性型食欲素A是未经过代谢的完整的食欲素A和仅在C末端的一部分上经过代谢(截断)的食欲素A的代谢物的总称。被识别食欲素A的C末端侧的单克隆抗体所识别的、并且包含由序列编号1表示的氨基酸序列的食欲素A及其代谢物是活性型食欲素A。

[0056] 在本公开中,定量指的是确定试样中存在的目标物质的数量或浓度。定量可以是绝对定量或相对定量。相对定量可以是确定与另一种分析物的量相比较的相对量。

[0057] 试样可以是脑脊液、血液、血浆、血清或唾液,优选脑脊液。

[0058] 抗食欲素A的单克隆抗体是识别食欲素A的C末端侧的抗体。食欲素A的C末端侧是指由序列编号3表示的氨基酸序列(食欲素A的全长)中的第14位~第33位的氨基酸序列。也可以说食欲素A在由序列编号2表示的氨基酸序列中具有相对于上述单克隆抗体的表位。上述单克隆抗体可以通过惯用的杂交瘤技术产生的抗体,也可以是市售的单克隆抗体。上述单克隆抗体可以是小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0059] 由序列编号1表示的氨基酸序列是存在于食欲素A的N末端附近的序列,是序列编号3表示的氨基酸序列中的第1位~第8位的氨基酸序列。由序列编号2表示的氨基酸序列是存在于食欲素A的C末端附近的序列,是序列编号3表示的氨基酸序列中的第16位~第33位的氨基酸序列。由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽可以通过用蛋白酶将分离后的食欲素A类进行消化而获得的。作为蛋白酶,可以使用胰蛋白酶。

[0060] 在本公开的方法中,可以通过已知的方法对食欲素A类进行分离。作为该已知的方法,可以列举免疫沉淀,但不限于此。免疫沉淀例如可以包括:将与抗体结合的磁珠和含有脑脊液的检体混合的步骤;将得到的混合液离心,并回收磁珠的步骤;以及使用还原剂,从回收的磁珠中洗脱目标抗原的步骤。

[0061] 本公开的方法可进一步包括在进行质谱分析之前,通过固相萃取法纯化由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽的步骤。作为固相萃取法,可以列举反相固相萃取法、正相固相萃取法和离子交换固相萃取法。在固相中,使用以二氧化硅为载体的填料、以离子交换树脂等聚合物为载体的填料等。作为固相萃取法中使用的柱,可以使用具有在硅胶载体的周围结合了十八烷基的填料的柱(C18柱)、具有在硅胶载体的周围结合了辛基的填料的柱(C8柱)、具有在硅胶载体的周围结合了苯乙基的填料的柱、具有在硅胶载体的周围结合了二醇基的填料的柱、具有在硅胶载体的周围结合了氨丙基的填料的柱等。

[0062] 在本公开的方法中,可以在进行质谱分析之前进行液相色谱。即,本公开的质谱分析可以是液相色谱质谱分析。液相色谱质谱分析的分析条件的例子示于实施例1中。

[0063] 使用本公开的方法可以对从受试者处采集的试样中的活性型食欲素A进行定量,并基于定量结果来诊断或者辅助诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或者创伤性脑损伤。另外,使用本公开的方法可以鉴定患有这些疾病等的患者。作为睡眠障碍,例如可以列举入睡困难、中途觉醒、睡眠时间缩短和醒来困难等。作为神经退行性疾病,例如可以列举突触核蛋白病、Tau蛋白病等,更具体地可以列举帕金森病、阿尔茨海默病、轻度认知障碍、发作性嗜睡病、路易体痴呆、额颞叶变性、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、亨廷顿病、肌张力障碍、朊病毒疾病、舞蹈病-棘红细胞增多症、肾上腺脑白质营养不良等。诊断或辅助诊断创伤性脑损伤包括对由创伤性脑损伤引起的睡眠障碍进行鉴定。

[0064] 为了诊断或辅助诊断食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或创伤性脑损伤,例如,可以提前制作示出在已经被诊断患有食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或创伤性脑损伤的患者的脑脊液中的、活性型食欲素A的量与食欲素A代谢物(C末端截断)的量之间相关性的近似直线,并将该近似直线与基于未诊断患者(受试者)的定量结果的近似直线进行比较即可。在一部分实施方式中,本说明书中所述的方法包括确定活性型食欲素A的

量是否超过预定截断值的步骤。预设的上述截断值可以是基于接受者操作特性 (ROC) 分析而确定的活性型食欲素A的量。

[0065] 受试者可以在通过本公开的方法进行诊断或辅助诊断之前,没有被诊断过患有食欲素A缺乏、睡眠障碍、神经退行性疾病或创伤性脑损伤,也可以被诊断过患有这些疾病等。在后一种的情况下,可以进行本公开的方法以查看疾病的进展情况、愈合水平等。

[0066] 实施例

[0067] 下面,基于实施例对本公开进行更详细地说明,但本公开不限于以下的实施例。NC (Normal Control) 是指健康人,PD是指帕金森病患者,AD是指阿尔茨海默病患者,MCI是指轻度认知障碍患者。下文中,当仅描述为“%”时,意思是指“w/v%”(质量/体积%)。

[0068] (参考例1)

[0069] <免疫沉淀磁珠的制备>

[0070] (1) 将含有0.2mg抗食欲素A小鼠单克隆抗体(识别食欲素A的C末端侧、富士胶片和光纯药株式会社制造、产品编号:287-98321(原和光纯药株式会社制造、原产品编号:283-98323))的溶液放入带有8kDa超滤透析膜的塑料管(GE Healthcare Cat#80648413)中,在2L的0.1M NaHCO₃、0.5M NaCl、pH8.3的(以下称为偶联缓冲液)中进行溶剂置换。(在4°C环境下放置过夜约16小时)

[0071] (2) 称取0.25g的CNBr活化的Sepharose 4B磁珠(Cytiva制造),并在1L的1mM盐酸水溶液中搅拌20分钟。

[0072] (3) 将磁珠回收到玻璃布氏漏斗上,并用25mL的1mM盐酸水溶液洗涤。

[0073] (4) 用25mL的偶联缓冲液洗涤两次。

[0074] (5) 将磁珠回收到50mL锥形管中,并以3500rpm离心分离5分钟。

[0075] (6) 除去所有上清液,加入溶剂置换后的抗体溶液。

[0076] (7) 目视添加偶联缓冲液与磁珠体积等量。

[0077] (8) 在室温下旋转搅拌2小时。

[0078] (9) 以3500rpm离心分离5分钟,除去上清液。

[0079] (10) 用25mL的偶联缓冲液洗涤三次。(反复进行以3500rpm离心分离5分钟和去除上清液)

[0080] (11) 以3500rpm离心分离5分钟,除去上清液后,加入1M乙醇胺水溶液(pH8-8.5,用pH试纸确认)直至与磁珠体积等量,在室温下旋转搅拌两小时。

[0081] (12) 将磁珠回收到玻璃布氏漏斗上,并用25mL预先冷藏的0.1M乙酸钠+0.5M氯化钠缓冲液(pH4.0)洗涤回收的磁珠。

[0082] (13) 用25mL预先冷藏的0.1M三盐酸盐+0.5M氯化钠缓冲液(pH8.0)进一步洗涤磁珠。

[0083] (14) 用上述pH4.0的缓冲液和pH8.0的缓冲液重复洗涤总共4次。

[0084] (15) 用25mL的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤两次。

[0085] (16) 使用25mL的PBS制备50体积%的浆液,并在4°C下保存。

[0086] (实施例1)

[0087] <CSF(脑脊液)中的特定食欲素A的定量>

[0088] (1) 将400μL来自PD的CSF(或将500pg合成食欲素A肽溶解于400μL的1%BSA作为标

准溶液或将400 μ L的1%BSA作为空白溶液)加入到聚丙烯管中。

[0089] (2) 添加500pg稳定同位素标记(亮氨酸¹³C标记)的食欲素A肽(5 μ L的100ng/mL溶液)。

[0090] (3) 添加参考例1中得到的免疫沉淀磁珠(50体积%的浆液)30 μ L。

[0091] (4) 在室温下旋转搅拌1.5小时。

[0092] (5) 以3000rpm离心分离1分钟,将上清液回收到新的聚丙烯管中,然后加入1mL的25mM三乙基碳酸氢铵(TEABC)并洗涤磁珠。

[0093] (6) 以3000rpm离心分离1分钟,除去上清液后,加入1mL的25mM TEABC并洗涤磁珠。再次重复本步骤,总共洗涤3次。

[0094] (7) 以3000rpm离心分离1分钟,除去上清液后,加入20 μ L的5mM二硫苏糖醇(在25mM TEABC中),在65 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。

[0095] (8) 加入20 μ L的10mM碘乙酰胺(在25mM TEABC中),室温避光孵育30分钟。

[0096] (9) 加入40 μ L的10 μ g/mL胰蛋白酶(在25mM TEABC中),并在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜(约16小时)。

[0097] (10) 添加100 μ L的25mM TEABC并混合后,以3000rpm离心分离3分钟,回收上清液。

[0098] (11) 使用Toptip C18(Glygen),在下述条件(a)~(e)下对上清液进行脱盐。

[0099] (a) 将50 μ L的、60%乙腈水溶液+0.1%甲酸加入柱中,以3000rpm离心3分钟。

[0100] (b) 将200 μ L的、水+0.1%甲酸加入柱中,以3000rpm离心3分钟。

[0101] (c) 将上述步骤(10)中获得的上清液加入到柱中,以3000rpm离心3分钟。

[0102] (d) 将200 μ L的、水+0.1%甲酸加入柱中,以3000rpm离心3分钟。

[0103] (e) 将100 μ L的60%乙腈水溶液+0.1%甲酸加入柱中,以3000rpm离心3分钟后,将样品回收到1.5mL的聚丙烯管中。

[0104] (12) 将回收的样品在-80 $^{\circ}$ C环境下保存15分钟,使溶液冷冻。

[0105] (13) 使用Speed-vac系统进行减压干燥。

[0106] (14) 将减压干燥后的样品中加入27.5 μ L的、2%乙腈水溶液+0.1%甲酸,进行再溶解。

[0107] (15) 以15000rpm离心分离3分钟,并将25 μ L的上清液转移至LC/MS小瓶中。

[0108] (16) 使用Orbitrap Fusion Lumos LC/MS系统,在下列条件下对由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽进行精确定量,并对活性型食欲素A进行定量。结果如图1所示。如图1所示,t检验的结果是,与NC相比,PD患者的CSF中的活性型食欲素A显著降低。

[0109] (定量的条件)

[0110] 柱:NANO HPLC毛细管柱(NTCC-360/100),Nikkyo Technos制造,内径100 μ m 150mm

[0111] 柱温:室温

[0112] 流速:500nL/分

[0113] 注入量:5 μ L

[0114] 溶剂:

[0115] 流动相A 4%乙腈水溶液+0.5%乙酸

[0116] 流动相B 80%乙腈水溶液+0.5%乙酸

[0117] 1%B(0分)-1%B(5分)-37%B(20分)-68%B(25分)-99%B(26分)-99%B(30分)

- [0118] 喷涂电压:2000V
- [0119] 吹扫气体:1Arb
- [0120] 离子传输管温度:275°C
- [0121] 平行反应模式条件
- [0122] 四极杆隔离窗口:1m/z
- [0123] 激活类型:HCD
- [0124] RF镜头:60%
- [0125] AGC目标:500,000
- [0126] 在精确定量中检测到以下肽:
- [0127] C末端胰蛋白酶消化肽(由序列编号2表示的氨基酸序列所组成的肽)621.3476m/z,高能碰撞解离(HCD)的碰撞能量30%,轨道阱分辨率60000
- [0128] C末端胰蛋白酶消化肽(稳定同位素标记)633.0429m/z,高能碰撞解离(HCD)的碰撞能量30%,轨道阱分辨率30000
- [0129] N末端胰蛋白酶消化肽(由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽)5514.7180m/z,高能碰撞解离(HCD)的碰撞能量20%,轨道阱分辨率60000
- [0130] N末端胰蛋白酶消化肽(稳定同位素标记)518.2266m/z,高能碰撞解离(HCD)的碰撞能量20%,轨道阱分辨率30000
- [0131] (比较例1)
- [0132] 在实施例1中,对由序列编号2表示的氨基酸序列所组成的肽进行定量,而不对由序列编号1表示的氨基酸序列所组成的肽进行定量。结果如图2所示。如图2所示,当比较PD患者和NC之间的脑脊液中具有C末端的食欲素A代谢物的量并进行t检验时,没有显著差异。
- [0133] (比较例2)
- [0134] 对于实施例1的步骤(5)中回收的上清液,使用与多克隆抗体(由富士胶片和光纯药株式会社制造,产品编号:280-98311)结合的免疫沉淀磁珠代替与单克隆抗体结合的免疫沉淀磁珠,除此之外,与实施例1同样地进行免疫沉淀和质谱分析,并对食欲素A代谢物(C末端侧被截断的食欲素A)进行定量。结果如图3所示。如图3所示,当比较PD患者和NC之间的脑脊液中的C末端被截断的食欲素A代谢物的量并进行t检验时,没有显著差异。
- [0135] (实施例2)
- [0136] 与实施例1同样地对表现出阿尔茨海默病和轻度认知障碍的患者的脑脊液中的活性型食欲素A进行定量。结果与实施例1的结果一起示于图4。与NC相比,表现出阿尔茨海默病和轻度认知障碍的患者的脑脊液中的活性型食欲素A有下降趋势。
- [0137] (参考例2)
- [0138] 与比较例2同样地对表现出阿尔茨海默病和轻度认知障碍的患者的脑脊液中的食欲素A代谢物进行定量。图5是示出对于NC以及分别表现出PD、阿尔茨海默病以及轻度认知障碍的患者的脑脊液,通过实施例1的方法测定的活性型食欲素A的量(纵轴)与通过比较例2的方法测定的食欲素A代谢物(C末端侧被截断的食欲素A)的量(横轴)的相关性的图。如图5所示,在NC中观察到高相关性(确定系数=0.82),但在表现出PD、阿尔茨海默病和轻度认知障碍的患者的脑脊液中相关性较低(确定系数=0.029~0.49)。由此认为表现出PD、阿尔茨海默病和轻度认知障碍的患者的脑脊液中的活性型食欲素A尤其减少。

- [0139] (实施例3)
- [0140] <通过LC/MS分析对脑脊液中的活性型食欲素A进行定量>
- [0141] <1>在聚丙烯管中添加400 μ L的试样(从5个健康人中随时间变化而分别采集的脑脊液)和校准曲线溶液(在400 μ L的1%BSA中溶解0.8pg、1.6pg、4pg、10pg、50pg、100pg或400pg合成食欲素A肽而得到的溶液)或空白溶液(1%BSA)。
- [0142] <2>加入稳定同位素(亮氨酸¹³C)标记的食欲素A肽(10 μ L的200ng/mL溶液)。
- [0143] <3>与实施例1的(3)~(10)同样地进行免疫沉淀,回收上清液。
- [0144] <4>使用OASIS(注册商标)HLB洗脱板(沃特世科技有限公司制造),在以下条件<a>~<e>下对上清液进行脱盐。
- [0145] <a>添加300 μ L的、60%乙腈水溶液+0.1%甲酸,并抽吸洗涤。
- [0146] 将500 μ L的、水+0.1%甲酸加入柱中,并抽吸洗涤。
- [0147] <c>将上述步骤<3>中获得的上清液加入到柱中,并抽吸使其吸附。
- [0148] <d>将500 μ L的、水+0.1%甲酸加入柱中,并抽吸洗涤。
- [0149] <e>将100 μ L的、60%乙腈水溶液+0.1%甲酸加入到柱中,抽吸洗脱,将样品回收到1.5mL的聚丙烯管中。
- [0150] <5>与实施例1的(12)~(14)同样地将回收的样品进行干燥并进行再溶解。除了将定量的条件变为以下所示的条件以外,与实施例1的(15)、(16)同样地通过LC/MS对活性型食欲素A进行定量。
- [0151] (定量的条件)
- [0152] 柱:NANO HPLC毛细管柱(NTCC-360/75),Nikkyo Technos制造,内径75 μ m 150mm
- [0153] 柱温:室温
- [0154] 流速:400nL/分
- [0155] 注入量:5 μ L
- [0156] 溶剂:
- [0157] 流动相A 4%乙腈水溶液+0.5%乙酸
- [0158] 流动相B 80%乙腈水溶液+0.5%乙酸
- [0159] 5%B(0分)-5%B(5分)-32%B(20分)-68%B(25分)-99%B(26分)-99%B(30分)
- [0160] 喷涂电压:2000V
- [0161] 吹扫气体:1Arb
- [0162] 离子传输管温度:275 $^{\circ}$ C
- [0163] 平行反应模式条件
- [0164] 四极杆隔离窗口:1m/z
- [0165] 激活类型:HCD
- [0166] RF镜头:60%
- [0167] AGC目标:1000
- [0168] (比较例4)
- [0169] <通过EIA测定对人脑脊液中的食欲素A进行定量分析>
- [0170] 使用食欲素A化学发光EIA试剂盒(菲尼克斯公司制造),按照以下步骤对人脑脊液中的食欲素A进行定量分析。将用1x测定缓冲液连续稀释的人食欲素A标准肽(0pg/mL、1pg/

mL、10pg/mL、100pg/mL、1000pg/mL或10000pg/mL)、以及待定量分析的试样(未稀释,从五个健康人中分别随时间变化而采集的脑脊液)分别加入到孔中。然后,加入溶解在1x测定缓冲液中的抗食欲素A多克隆抗体并混合,在4°C下孵育过夜。接着,吸出反应溶液,添加生物素化的食欲素A,并在室温下孵育1.5小时。用1x测定缓冲液洗涤4次后,加入用1x测定缓冲液稀释1000倍的链霉亲和素-HRP,并在室温下孵育1小时。用1x测定缓冲液洗涤四次后,将底物溶液添加到孔中并在室温下孵育5~10分钟。然后,使用酶标仪(BMG LABTECH公司制造)读取相对发光量。根据人食欲素A标准肽的信号制作标准曲线,计算脑脊液中的食欲素A浓度。

[0171] 图6是示出使用实施例3的方法测定的5个受试者的脑脊液中的活性型食欲素A的量(纵轴)的图表。在图6中,Auth-OXA是指包括N末端的长食欲素A(活性型食欲素A),IPMS是指对本公开所涉及的活性型食欲素A进行定量的方法。图7是示出使用比较例4的化学发光-EIA法所测定的食欲素A的量(含有活性型食欲素A的N末端食欲素片段的总量)(纵轴)的图表。在图7中,OXA是指食欲素A,chemilumi-EIA是指化学发光-EIA法。在图6、7中,纵轴的价值为将每个个体的测定值的平均设为100%时的相对值(%)。在图6、7中,还示出了参考Salomon, RM et al., Biol. Psychiatry 2003, 54, 96-104而计算出的拟合曲线。图6、7的横轴表示时间。图6、7的ID1~ID5是指五个受试者中的每一个。

[0172] 如图6、7所示,在本公开所涉及的方法中观察到具有高振幅的昼夜节律(图6),而在比较例4的化学发光-EIA方法中观察到具有明显较低振幅的昼夜节律。(图7)($p=0.0025$)。由此可知,活性型食欲素A的量根据时间不同变化很大,并且被认为与睡眠-觉醒的节律有关。另外,还发现通过本公开所涉及的方法能够更明确地确定受试者的昼夜节律。

Auth-OXA

(包括 N 末端的长食欲素 A)

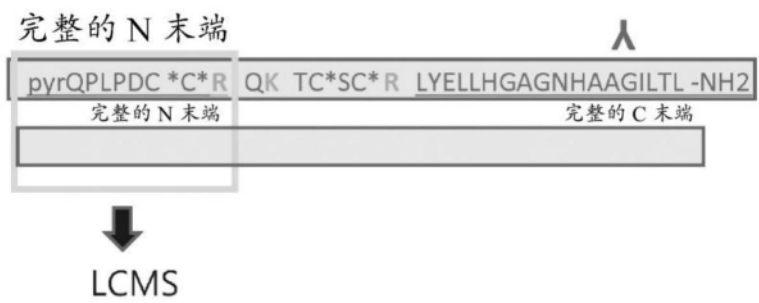
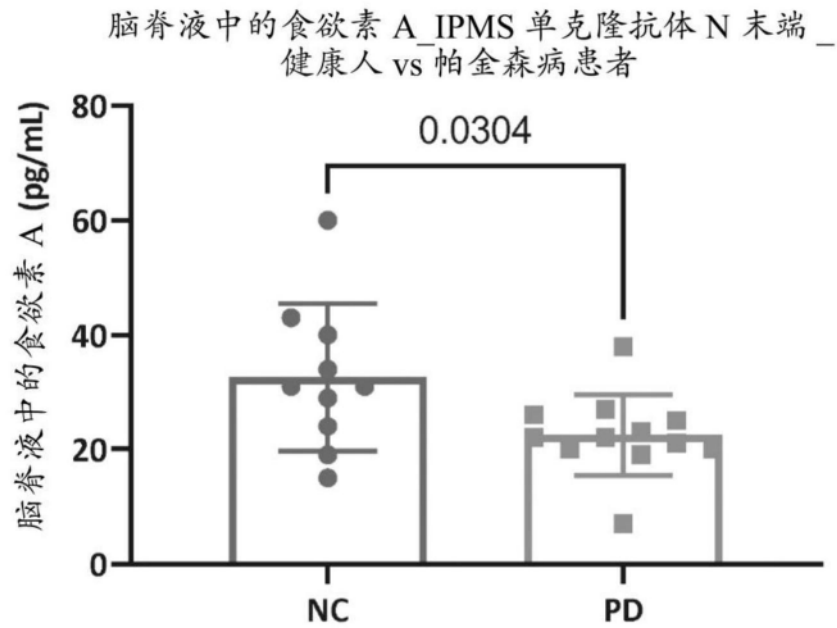


图1

短 N 末端片段
(所有 C 末端被截断)

脑脊液中的食欲素 A IPMS 多克隆抗体
N-末端用于后单克隆抗体-IP 脑脊液

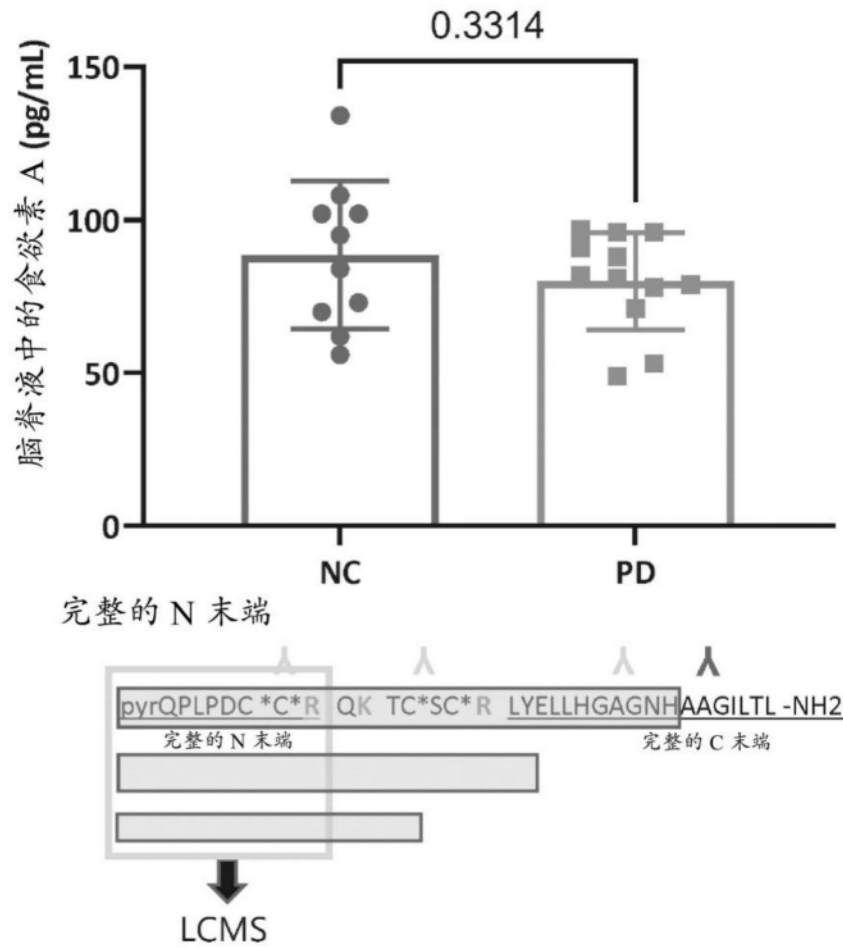


图3

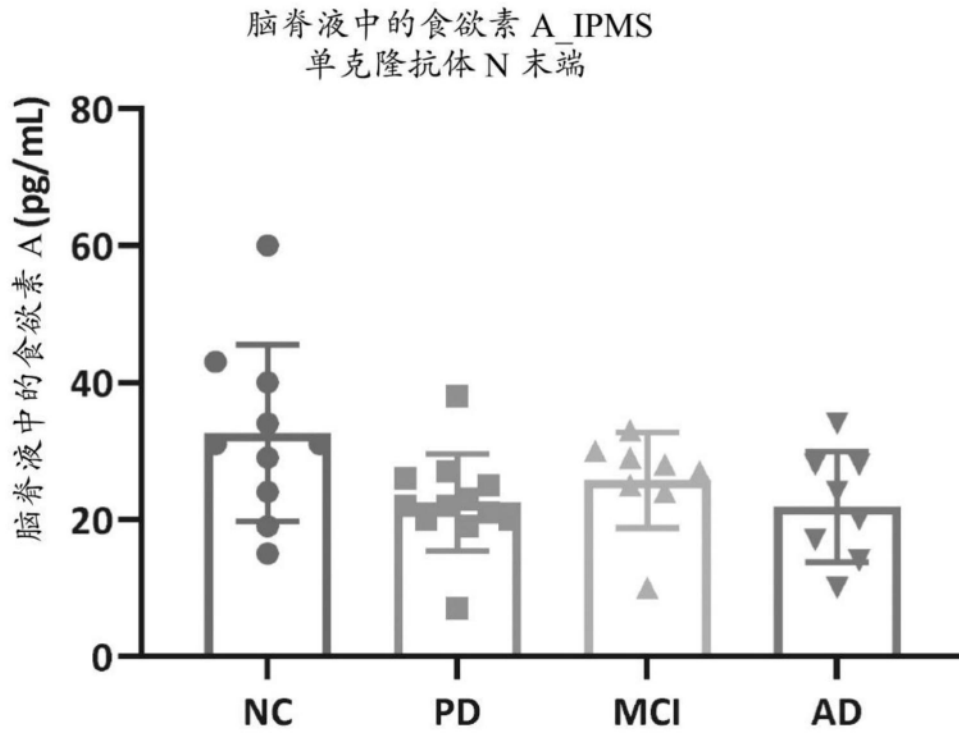


图4

脑脊液中的食欲素 A
每种疾病的多克隆抗体 -IPMS-N 末端 (PostIP) vs
单克隆抗体 -IPMS-N 末端

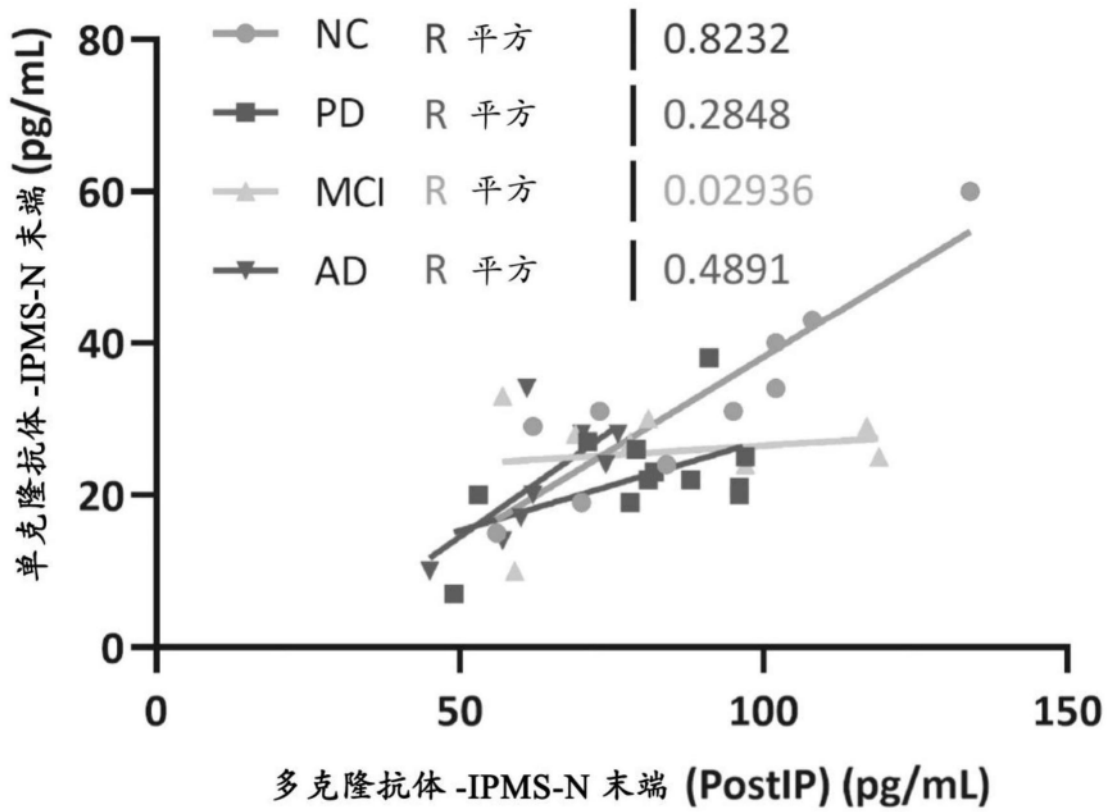


图5

通过 IPMS 得到的包括 N 末端的长食欲素 A

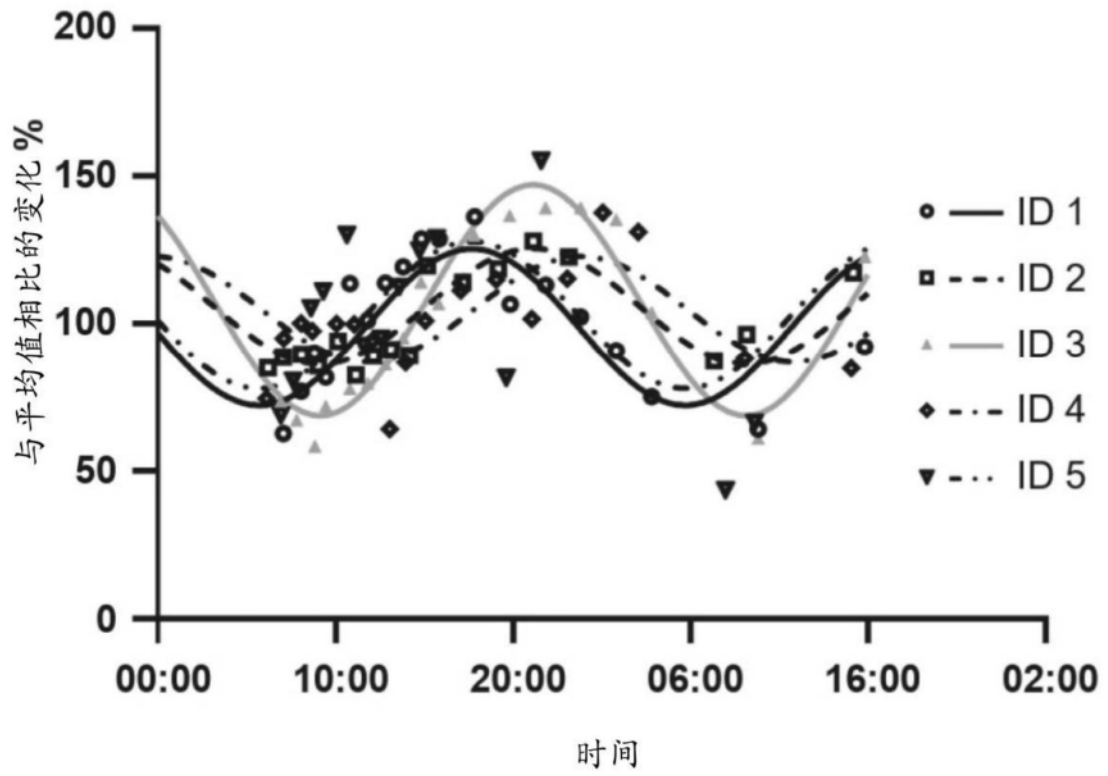


图6

通过化学发光-EIA 法得到的食欲素 A

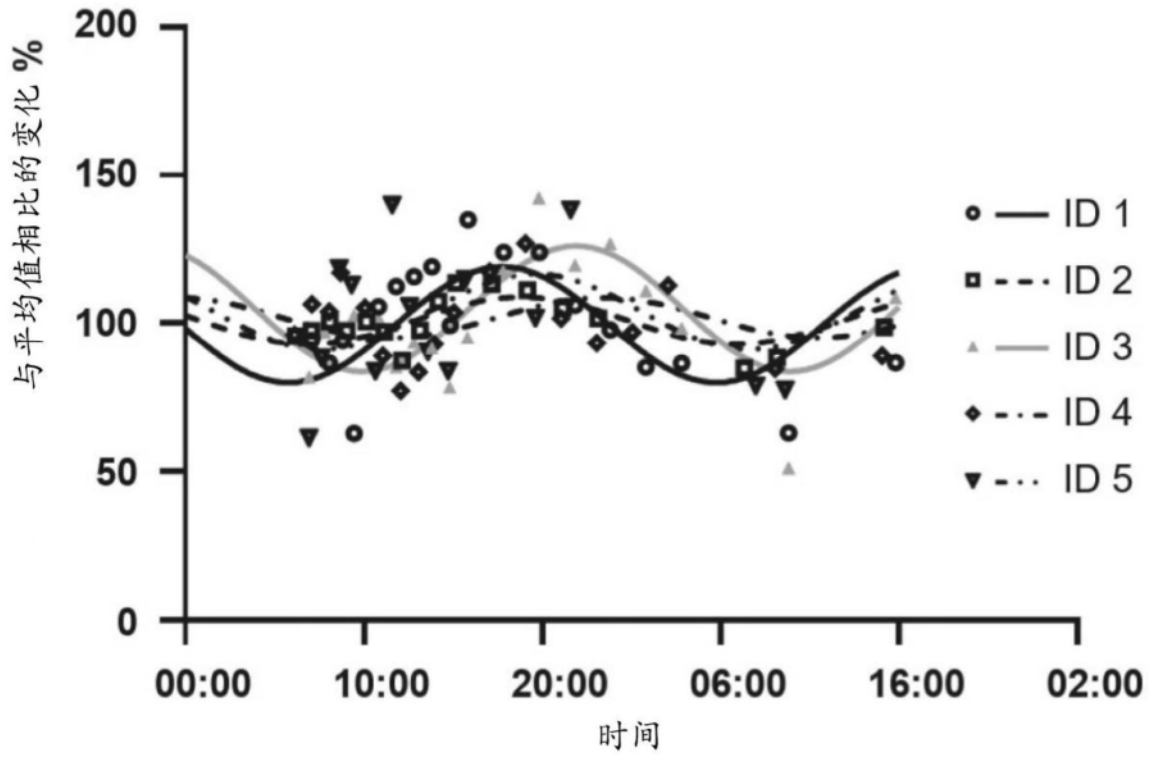


图7