



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105247367 B

(45)授权公告日 2018.04.27

(21)申请号 201480027933.8

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105247367 A

(43)申请公布日 2016.01.13

(30)优先权数据  
13/833,008 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/CA2014/000250 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/138919 EN 2014.09.18

(73)专利权人 彼德·史戴斯  
地址 加拿大亚伯达省  
专利权人 筒井茂树

(72)发明人 彼德·史戴斯 筒井茂树

(74)专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司 11012

代理人 黄泽雄 王燕

(51)Int.Cl.  
G01N 33/53(2006.01)  
G01N 21/64(2006.01)  
G01N 33/52(2006.01)  
G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件  
CN 102725639 A,2012.10.10,权利要求  
116-127,说明书第[0045]-[0056]、[0130]-  
[0131]、[0142]-[0159]、[0229]段,表1。  
CN 102365295 A,2012.02.29,  
Adam S. Crystal,et al.A comparison of  
amyloid fibrillogenesis using the novel  
fluorescent compound K114.《Journal of  
Neurochemistry,》.2003,第86卷

审查员 许珊萍

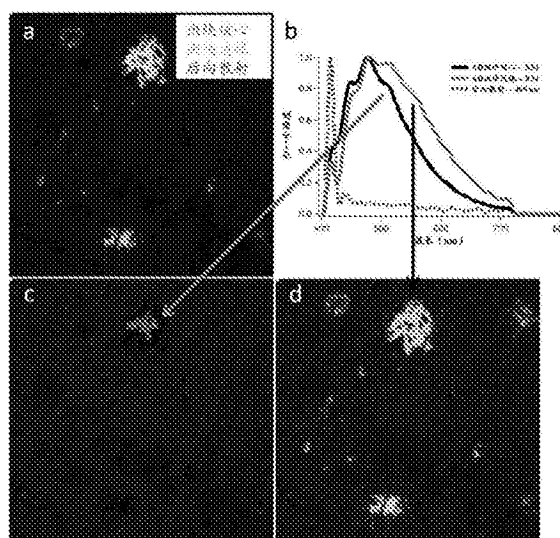
权利要求书1页 说明书21页 附图12页

(54)发明名称

用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法

(57)摘要

提供一种检测个体中与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法,所述方法包括(a)将来自于个体的白细胞与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触,及(b)检测结合至致病蛋白质聚集体的探针,其中所述白细胞中致病蛋白质聚集体的存在表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。在一个实施方案中,所述疾病为阿尔茨海默氏病、轻度认知缺损或外伤性脑损伤。



1. 结合至致病蛋白质聚集体的构象-敏感的荧光探针在制造用于检测与白血球中异常蛋白质聚集相关的疾病的试剂盒的用途,其中当所述探针结合至致病蛋白质聚集体时,所述构象-敏感的荧光探针的发射光谱或吸收光谱改变;所述与白血球中异常蛋白质聚集相关的疾病选自以下的组:阿尔茨海默氏病、轻度认知缺损、大脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤和牛海绵样脑病(BSE)。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述探针是K114、刚果红、X34、BSB、FSB、IMSB、柯胺-G、甲氧基-X34、甲氧基-X04、硫磺素-T、硫磺素-S、匹兹堡化合物B、噻嗪红R、金胺-0、p-FTAA或与p-FTAA有关的发光共轭聚噻吩(LCP)或发光共轭寡聚噻吩(LCO)。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述试剂盒包括:所述构象-敏感的荧光探针用于产生所述结合至致病蛋白质聚集体的构象-敏感的荧光探针在多个波长下的发射光谱或吸收光谱,并将所述发射光谱或吸收光谱与一个或多个参比光谱比较的使用说明。

## 用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法

### [0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2013年03月15日提交的美国专利申请第13/833008号的优先权,其内容以引用方式全文并入于此作为参考。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法。在一个实施方案中,所述与异常蛋白质聚集相关的疾病是阿尔茨海默氏病。

### 背景技术

[0004] 阿尔茨海默氏病(AD)是老年人口痴呆的最常见原因,全世界超过3500万人受到影响,且若不开发出有效的疗法,到2050年受影响人口预计将上升至1亿1500万(Barnes和Yaffe 2011)。这种年龄相关的神经变性病症以淀粉样蛋白 $\beta$ (A $\beta$ ) (包括脑中的老年斑块、神经原纤维缠结和突触丢失)为病理特征(SeIkoe 2001)。虽然AD是一种变性病症是明确的,但免疫系统的作用也是突出的(由Britschgi和Wyss-Coray综述,2007)。在AD中,有毒的A $\beta$ 肽聚集成更高分子量的组装体,且不仅在细胞外间隙,也在脑中的血管壁上蓄积(de Ia Torre 2002;Deane与Zlokovic 2007),增加它们的通透性(Nagababu等人,2009),并促进将T淋巴细胞转运至脑中(Farkas等人,2003)。巨噬细胞/小神经胶质细胞吸收A $\beta$ ,且为A $\beta$ 清除的关键因素(Majumdar等人,2008;Mildner等人,2007;Simard等人,2006)。嗜中性粒细胞也通过血脑屏障破坏渗入AD脑中(Stamatovic等人,2005)。

[0005] 尽管付出了相当大的努力,但是既没有对于AD的治疗,甚至也没有用于可靠地建立确定的诊断的临床试验;脑组织的死后检查是目前确认AD诊断的唯一确定方法。实际上,目前的诊断标准将“可能的AD”作为具有最高确定度的类别(McKhann等人,2011),这反映出死后诊断的局限。简单和可靠的试验基于下述几个原因将会是重要的:如果入组的个体具有明确的诊断,治疗性试验将会更可靠,使得能够研究更多的同质群体。一旦这个成为可能,较轻的痴呆(轻度认知缺损)病例(其还未达到对于AD的诊断标准),能被正确地分类为其他原因(例如,血管的)的早期AD,使合适的治疗能得到更好的预测及建立。

[0006] 从人口健康角度,考虑到AD脑中的生物化学变化(例如淀粉样蛋白沉积)开始于出现临床症状的几年前到也许数十年前,当可行时,检测早期临床前疾病并建立预防措施是可能的。因此,随着发达国家准备开始应对AD不可避免的流行,对于AD便宜的、非侵入性的及快速的检验是至关重要的。

[0007] 对于发展生物标记以支持AD诊断,人们已做出了大量的努力。在血液中,焦点集中于测定血浆中的A $\beta$ 水平。这并未被证实是可靠的,因为A $\beta$ 40、A $\beta$ 42的水平或二者的比率不能可靠地区分健康对照和AD患者(Thambisetty与Lovestone 2010)。其他方式包括血浆的蛋白质组学分析,但是它是昂贵的、复杂的,无法经受高通量分析的考验且仍需实验的。A $\beta$ 的CSF分析及(磷酸化的)微观相关(tau)水平具有更强的预测价值(van Rossum等人,2012;Senanarone等人,2012),但与血液相比其是侵入性的,不太可能成为正式研究试验外的常规

方法。成像标记 (MRI、fMRI、FDG-PET、淀粉样蛋白-PET) (Jack 2012;Matsuda和Imabayashi 2012) 全都更昂贵,不是普遍可用的,且要么是非特异的 (MRI) 要么是高度专业化的,只在几个中枢 (center) 可用 (例如,淀粉样蛋白-PET)。因此,用于诊断AD和将发展为AD的AD相关的轻度认知缺损的简单且便宜的血液检测是高度值得期望的。人血小样品中进行检测的能力将是对目前方法的巨大改进,并为发展简单、快速高通量筛选方法铺平道路。这样的方法也适用于于其他以异常蛋白质聚集为特征的疾病。

## 发明内容

[0008] 发明人描述了用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集相关疾病的新方法。如实施例中所述,发明人已确认在非血浆血液成分 (例如循环血白细胞和血小板) 中检测与疾病相关的致病蛋白质聚集物是可能的,所述疾病包括但不限于:阿尔茨海默氏病、牛海绵样脑病 (BSE) 和外伤性脑损伤。此外,带有结合至致病蛋白质聚集物的荧光探针的波谱荧光技术的使用已被证明能够容易地区分健康对照的血样和患有与异常蛋白聚集相关的疾病的个体的血样。因而,以结合至致病蛋白质聚集物的荧光探针对非血浆血液成分进行的波谱分析使中枢神经中通常与异常蛋白质聚集相关的疾病的检出成为可能。使用转基因动物模型,也表明在此所述的方法能够在脑样品中观察到病状的同时,在疾病进展时尽早使用血样识别患有阿尔茨海默氏病的个体。

[0009] 因此,本公开涉及一种检测个体中与异常蛋白聚集相关的疾病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括 (a) 将来自个体的非血浆血液成分与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触,及 (b) 检测结合至致病蛋白质聚集体的探针,其中所述非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的存在表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0010] 本公开也涉及一种用于检测来自个体的血样中的致病蛋白质聚集体的体外方法。在一个实施方案中,所述方法包括 (a) 将来自血样的非血液成分与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触,及 (b) 检测所述结合至致病蛋白质聚集体的探针。

[0011] 在一个实施方案中,在此所述的方法包括从个体中获取血样以及先从所述血样中分离出一种或多种非血浆血液成分,再将所述非血浆血液成分与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触。在一个实施方案中,所述非血浆血液成分选自红细胞、白细胞、微泡和血小板。在一个优选的实施方案中,所述非血浆血液成分是白细胞。在一个实施方案中,在此所述的方法包括从个体中获取血样,以及先从所述血样中分离血沉棕黄色层,再将所述血沉棕黄色层与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触。

[0012] 在一个实施方案中,在此所述的方法包括从个体中获取血样,以及先从所述血样中分离白细胞,再将所述白细胞与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触。

[0013] 在另一实施方案中,在此所述的方法包括从个体中获取包含血沉棕黄色层的血样,再将所述血沉棕黄色层的白细胞与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触。

[0014] 在另一实施方案中,所述探针是荧光探针,任选构象敏感的探针。任选地,所述探针是刚果红、刚果红衍生物、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、柯胺-G (Chrysamine-G)、甲氧基-X34、甲氧基-X04、硫磺素-T、硫磺素-S、匹兹堡化合物B (Pittsburgh compound B)、噻嗪红 R、金胺-O、p-FTAA或与p-FTAA有关的发光共轭聚噻吩 (LCP) 或发光共轭寡聚噻吩 (LCO)。

[0015] 在一个实施方案中,所述探针包含选择性地结合至致病蛋白质聚集体的抗体。任

选地,所述抗体由以可检测的标记物(例如荧光标记物)标记。在一个实施方案中,所述探针是抗 $\beta$ -淀粉样蛋白抗体。在一个实施方案中,所述探针是抗-微管相关或抗-高度磷酸化的微管相关抗体。

[0016] 在另一实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针包括检测结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光或吸光度。

[0017] 在另一实施方案中,检测所述探针的荧光或吸光度包括检测荧光信号强度、产生荧光发射光谱和/或产生吸收光谱。在一个实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光包括检测两个或更多个波长下的荧光信号的强度或两个或多个波长下结合至致病蛋白质聚集体的探针的吸光度。

[0018] 在另一实施方案中,所述方法进一步包含将与非血浆血液成分接触的探针的荧光或吸光度和与参比非血浆血液成分接触的参比探针的荧光或吸光度比较。任选地,所述参比非血浆血液成分来自于患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的参比个体,个体非血浆血液成分的荧光或吸光度与参比非血浆血液成分的荧光或吸光度间的一致性表明了所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0019] 在另一实施方案中,检测所述探针的荧光或吸光度包括检测两个或更多个波长下的荧光发射信号强度,产生包含两个或更多个波长下的测量的荧光发射光谱,或产生包含两个或更多个波长下测量的吸收光谱。

[0020] 在另一实施方案中,所述方法进一步包括将所述荧光发射光谱与一种或多种参比荧光发射光谱比较。任选地,至少一个参比发射光谱是来自患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的参比个体的参比非血浆血液成分的荧光发射光谱。所述荧光发射光谱和至少一个参比荧光发射光谱间的一致性表明了所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。可选择地,至少一个参比发射光谱是来自于健康对照参比个体(例如未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的个体)的参比非血浆血液成分的荧光发射光谱,所述荧光发射光谱与至少一个参比荧光光谱间的一致性表明了所述个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。任选地,所述参比发射光谱包含非神经性疾病对照。

[0021] 在另一实施方案中,所述方法进一步包括将所述吸收光谱与一个或多种参比吸收光谱比较。任选地,至少一个参比吸收光谱是来自患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的参比个体的参比非血浆血液成分的吸收光谱,所述吸收光谱与至少一个参比吸收光谱间的一致性表明了所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。可选择地,至少一个参比吸收光谱是来自健康对照参比个体(例如未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的个体)的参比非血浆血液成分的吸收光谱,所述吸收光谱与至少一个参比吸收光谱间的一致性表明了所述个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0022] 本领域普通技术人员将理解在一些实施方案中,个体非血浆血液成分的荧光光谱或吸收光谱的荧光或吸光度与参比非血浆血液成分的荧光光谱或吸收光谱的荧光或吸光度的差异或相似点可表明所述个体患有或未患有与异常蛋白聚集相关的疾病,这取决于所述参比非血浆血液成分的疾病状态。相似地,个体非血浆血液成分的荧光光谱或吸收光谱与参比非血浆血液成分的荧光光谱或吸收光谱的差异或相似点可表明所述样品具有致病蛋白质聚集体或不具有致病蛋白质聚集体,这取决于所述参比非血浆血样是否具有致病蛋白质聚集体。

[0023] 在另一实施方案中,所述方法包括将荧光发射光谱或吸收光谱与多个参比光谱相比较。例如,在一个实施方案中,使用两个或更多个不同的激发波长产生两个或更多个荧光发射光谱,并将其与使用相同或相似的激发波长所产生的两个或更多个参比光谱比较。

[0024] 在另一实施方案中,所述方法进一步包括:

[0025] (a) 产生荧光发射光谱或吸收光谱;

[0026] (b) 进行光谱分解以确定对荧光发射光谱或吸收光谱有贡献的单个基础光谱的权重;并

[0027] (c) 使用所述权重确定个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的可能性或使用所述权重确定样品具有致病蛋白质聚集体的可能性。

[0028] 在另一实施方案中,所述单个基础光谱确定于(a) 已知患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的个体的样品,(b) 健康对照个体的样品和/或(c) 未与探针接触的样品。在一个实施方案中,所述样品是已知具有或不具有特定的致病蛋白质聚集体的非血浆血液成分。

[0029] 可使用本领域已知的不同的方法进行光谱分解,以确定单个基础光谱的权重。例如,在一个实施方案中,使用线性代数法进行光谱分解。在一个实施方案中,使用非线性代数法进行光谱分解。在另一实施方案中,使用Levenberg-Marquardt算法进行光谱分解。

[0030] 也可使用本领域已知的不同的方法将荧光发射光谱或吸收光谱与一种或多种参比波谱进行比较,以确定所述波谱间的一致性,或确定所述波谱间的差异或相似点。在一个实施方案中,合适的方法产生波谱间相似处或差异的定量测量。在一个实施方案中,在此所描述的方法进一步包括生成统计测量或可能性评分,即波谱或波谱集表明与异常蛋白质聚集相关的疾病的存在或致病蛋白质聚集体的存在。例如,在一个实施方案中,可使用机器学习(machine learning)、遗传算法或主成分分析用于比较波谱或波谱集。

[0031] 在另一实施方案中,所述与异常蛋白质聚集相关的疾病选自由下述疾病组成的组:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏症、轻度认知缺损、大脑淀粉样血管病、肌病、神经病、脑外伤、额颞痴呆、皮克氏病、多发性硬化、朊病毒病、唐氏综合征和ALS。

[0032] 在另一实施方案中,所述致病蛋白质聚集体包括淀粉样蛋白、任选地为 $\beta$ -淀粉样蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、亨廷顿蛋白(huntingtin)、微管相关蛋白(tau protein)、高度磷酸化的微管相关蛋白(pTau)、朊病毒蛋白、 $\alpha$ B-晶状体蛋白(CRYAB)、结蛋白、硒蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白和/或超氧化物歧化酶(SOD)。

[0033] 在另一实施方案中,所述致病蛋白质聚集体包括 $\beta$ -淀粉样蛋白,所述疾病是阿尔茨海默氏病。

[0034] 在另一实施方案中,将来自个体的白细胞与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触的步骤在碱性pH下进行。例如,在一个实施方案中,所述pH高于9、高于10或高于11。在一个实施方案中,所述pH任选地为约10.5。在另一实施方案中,将来自个体的白细胞与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触的步骤在酸性pH下进行,任选地pH低于6、低于5或低于4。

[0035] 在另一实施方案中,在此所描述的方法包括使用多个不同的激发波长产生多个荧光测量值或多个荧光光谱。例如,在一个实施方案中,所述方法包括在两个或更多个激发波长下生成两个或更多个荧光发射光谱。在一个实施方案中,所述方法包括在三、四、五、六、七、八、九、十或多于十个的激发波长下分别生成三、四、五、六、七、八、九、十或高于十个荧光发射光谱。不限制于任何的理论,变化激发波长和分析两个或更多个荧光光谱被认为增

加用于血液中致病蛋白质聚集体检测的在此所述方法的灵敏度和/或特异性。

[0036] 在另一实施方案中,至少一个激发波长在近紫外区内,任选约200nm至约400nm。在一个实施方案中,至少一个激发波长为约300nm至约500nm,任选约375nm或约445nm。在另一实施方案中,所述激发波长与固定半导体激光二极管的标准波长一致。在一个实施方案中,所述激发波长包括一种或多种选自约375nm、约405nm、约445nm和约457nm的波长。在一个实施方案中,至少一个激发波长在约200nm和2000nm之间。

[0037] 在另一实施方案中,通过测量多个波长下的荧光或吸光度强度产生荧光发射光谱或吸收光谱。在一个实施方案中,通过从约400nm至约700nm或从约200nm至约2000nm进行测量生成波谱。

[0038] 在另一实施方案中,将结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光或吸光度归一化为细胞计数。在一个实施方案中,将结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光或吸光度归一化为用于测量荧光或吸光度(例如在光路内或成像场内)的样品中的细胞计数。用于确定细胞计数的本领域已知的不同方法包括例如通过使用荧光团(例如DRAQ5)对细胞核染色,在样品中定量或估测细胞数目。

[0039] 在另一实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针包括于样品池或微量滴定板中,测量非血浆血液成分的样品中结合至致病蛋白质聚集体的荧光或吸光度。

[0040] 在另一实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针包括在包含非血浆元素的样品的全部或部分2维场中测量结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光或吸光度。

[0041] 本公开也涉及一种用于评估来源于个体的非血浆血液成分的方法,所述个体疑似患有与异常蛋白质聚集相关的疾病,所述方法包括:

[0042] a) 从个体中获取测试血样,

[0043] b) 从所述测试血样中分离非血浆血液成分,

[0044] c) 将所述非血浆血液成分与结合至非血浆血液成分中的致病蛋白质聚集体的探针接触,以及

[0045] d) 检测结合至致病蛋白质聚集体的探针,

[0046] 其中所述非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的存在表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0047] 在一个实施方案中,所述非血浆血液成分是白细胞、微泡和/或血小板。在一个实施方案中,所述非血浆血液成分是白细胞或血小板。

[0048] 在一个实施方案中,所述探针是荧光探针,任选地为构象敏感的探针。

[0049] 在另一实施方案中,所述探针是刚果红、刚果红衍生物、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、柯胺-G、甲氧基-X34、甲氧基-X04、硫磺素-T、硫磺素-S、匹兹堡化合物B、噻嗪红R、金胺-O、p-FTAA或与p-FTAA有关的发光共轭聚噻吩(LCP)或发光共轭寡聚噻吩(LCO)。

[0050] 在另一实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针包括检测结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光或吸光度。

[0051] 在另一实施方案中,如在此所述,检测荧光或吸光度包括检测荧光信号的强度,产生荧光发射光谱或产生吸收光谱。

[0052] 在另一实施方案中,与异常蛋白质聚集相关的疾病选自由下列疾病组成的组:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏症、轻度认知缺损、大脑淀粉样血管病、肌病、神经病、

脑外伤、额颞痴呆、皮克氏病、多发性硬化、朊病毒病、唐氏综合征和ALS。

[0053] 在另一实施方案中,所述致病蛋白质聚集体包括淀粉样蛋白、任选地为 $\beta$ -淀粉样蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、亨廷顿蛋白(huntingtin)、微管相关蛋白、高度磷酸化的微管相关蛋白(pTau)、朊病毒蛋白、 $\alpha$ B-晶状体蛋白(CRYAB)、结蛋白、硒蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白和/或超氧化物歧化酶(SOD)。

[0054] 在另一实施方案中,所述致病蛋白质聚集体包括 $\beta$ -淀粉样蛋白,所述疾病是阿尔茨海默氏病。

[0055] 本公开也涉及一种用于分析非血浆血液成分,以检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0056] (a) 探针,其用于检测非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的存在和

[0057] (b) 使用说明。

[0058] 在一个实施方案中,所述探针是荧光探针,任选地为刚果红、刚果红衍生物、K114、X34、BSB、FSB、IMSB、柯胺-G、甲氧基-X34、甲氧基-X04、硫磺素-T、硫磺素-S、匹兹堡化合物B、噻嗪红R、金胺-O、p-FTAA或与p-FTAA有关的发光共轭聚噻吩(LCP)或发光共轭寡聚噻吩(LCO)。

[0059] 在另一实施方案中,所述与异常蛋白质聚集相关的疾病选自由下列疾病组成的组:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏症、轻度认知缺损、大脑淀粉样血管病、肌病、神经病、脑外伤、额颞痴呆、皮克氏病、多发性硬化、朊病毒病、唐氏综合征和ALS。

[0060] 在另一实施方案中,所述致病蛋白质聚集体包括淀粉样蛋白、任选 $\beta$ -淀粉样蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、亨廷顿蛋白、微管相关蛋白、高度磷酸化的微管相关蛋白(pTau)、朊病毒蛋白、 $\alpha$ B-晶状体蛋白(CRYAB)、结蛋白、硒蛋白、肌动蛋白、肌球蛋白和/或SOD。

[0061] 在一个实施方案中,所述试剂盒对检测个体中与异常蛋白质聚集相关的疾病是有用的。在另一实施方案中,所述试剂盒对评估来自个体的非血浆血液成分(例如白细胞)是有用的,所述个体疑似患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。在一个实施方案中,所述试剂盒对(例如通过使用在此所述的方法)检测来自于个体的血样中的致病蛋白质聚集体是有用的。

[0062] 通过下文的详细描述,本公开的其它特征和优势将是显而易见的。但是应理解的是,在指出优选的实施方案时,说明和具体实施例仅通过例证的方式给出,因为通过多个实施方案的这种描述,处于本公开的精神与范围内的各种改变和变形对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

## 附图说明

[0063] 下文中描述了关于附图的实施方案,其中:

[0064] 图1描述了X-34的光谱荧光图像,所述X-34为荧光淀粉样蛋白探针(Styren等人,2000),其结合至5xFAD AD转基因小鼠脑的福尔马林固定切片中的老年斑块,为每个像素收集光谱分辨数据的12个通道。a)显示出淀粉样蛋白斑块的典型形态和斑块“成熟”的两种状态的分解图像。b)从斑块和数学分解操作所使用的激光后向散射中测量的发射光谱。如c和d所示,X-34图像中大淀粉样蛋白斑块的中心和边界的密集发射被很好地分离。这些结果阐明不仅能检测脑中淀粉样蛋白斑块的能力,也能在单个斑块中区分多种聚集状态的能力。

[0065] 图2示出了5xFAD小鼠脑的福尔马林固定切片的抗- $A\beta$  (6E10) 免疫荧光。a) 老年斑块的典型形态, 其为6E10免疫-阳性(星号)。也在血管周围观察到6E10-阳性血细胞(正方框(square box))。b) a中正方框的高放大倍数图像, 表明白细胞包含为 $A\beta$ 的物质。

[0066] 图3示出了小鼠血沉棕黄层样品中具有6E10免疫荧光的X-34的双标记。a-c) 来自循环血的5xFAD小鼠血沉棕黄层中具有6E10免疫荧光的分解X-34图像。用6E10免疫荧光信号清楚地共定位(co-located) X-34-阳性细胞。d) X-34-阳性5xFAD小鼠血沉棕黄层白细胞的发射光谱。来自循环血的X-34-阳性白细胞的测量的发射光谱实际上与来自5xFAD小鼠脑中的老年斑块(虚线)的那些是相同的, 表明白细胞包含与斑块中所发现的那些非常相似的物质。

[0067] 图4示出了X-34的2-光子光谱荧光图像, 所述X-34结合至来自健康对照(HC)和AD患者的血沉棕黄层的类淀粉样蛋白物质。a) 真彩色(左列)、分解的自体荧光(灰色)和AD-特异性X-34(白色)通道(中和右列)。仅从AD血沉棕黄层中检测到AD特异性X-34信号。b) AD-特异性X-34信号和自体荧光的发射光谱。c) 仅在AD白细胞中显示出强的AD-特异信号的柱状图。CJD指患有克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob)的患者。

[0068] 图5示出了使用淀粉样蛋白探针X-34的双标记, 所述探针具有来自健康对照(HC)和AD患者的血沉棕黄层中的抗- $A\beta$ 抗体(6E10)。AD-特异性X-34信号(详见图4)仅在AD白细胞(f)中是强的, 其与强 $A\beta$ 免疫标记(g)共定位。但是仅有部分AD白细胞是阳性的。相反, 在健康对照的血沉棕黄层中仅观察到非常弱的背景信号(b、c)。激光后向散射方便地鉴别出每个细胞(d、h), 使用在此所描述的光谱技术, 该信号被完美地从其他发射(信号)中分离。

[0069] 图6示出了K114的光谱荧光图像, 其为另一种荧光淀粉样蛋白探针(Crystal 2003), 结合至健康对照(HC)和AD患者的血沉棕黄层中的类淀粉样蛋白物质上。a) 真彩色(左列), 分解的自体荧光和AD-特异性K114通道(右列)。b) HC-、AD-特异性K114信号和自体荧光的发射光谱。

[0070] 图7是反映个体患有AD还是轻度认知缺损(MCI)的可能性的简化综合指数(“ADR指数”即“AD相关指数”)。使用淀粉样蛋白探针K114标记从患者获取的白细胞并根据上文进行波谱分析。

[0071] 图8示出了以刚果红染色的多发性硬化患者的人脑。这些数据表明慢性MS斑块具有淀粉样蛋白沉积, 其在血液白细胞中, 以与AD相似的方式, 应是可检测的。

[0072] 图9示出了由血液(图9A)和脑(图9B)样品以及野生型(WT)对照样品的波谱分析获得的AD指数, 所述血液和脑样品来自1月、2月、3月和10月的患有阿尔茨海默氏病的转基因小鼠模型(5xFAD), 所述野生型(WT)对照样品使用如实施例6中所述的探针K114。

[0073] 图10示出了对比于实施例7中所述的健康对照(HC), 通过分析来自诊断患有阿尔茨海默氏病(AD)的个体的血液所获取的光谱图。

[0074] 图11示出了白细胞的染色, 所述白细胞获取自具有 $A\beta_{1-42}$ 抗体和致病蛋白质聚集体(K114)探针的健康对照(图11A)和患有阿尔茨海默氏病(AD)的个体(图11B)。健康对照和AD个体均显示出 $A\beta_{1-42}$ 染色, 但是对于K-114, 图11B显示出更高水平的染色, 表明致病蛋白质聚集体的存在。白细胞通常显示出小的亮的包涵体以及更弥散的胞液染色, 它们对于淀粉样蛋白探针标记均是阳性的。所述包涵体在健康对照和AD血液中均出现, 但是在AD样品中数目更多, 并显示出独特的光谱特征; 另一方面胞液标记在AD样品中更强, 实际上在健康

对照白细胞中是检测不到的。 $AB_{1-42}$ 免疫标记白细胞的子集,既标记颗粒体也标记弥散的胞液。图11C示出 $AB_{1-42}$ 免疫标记的总体强度在AD对健康对照(HC)中是相似的。

[0075] 图12示出了与获取自阿尔茨海默氏病(AD)的个体和健康对照(HC)的光谱相比,通过使用结合至致病蛋白质聚集体(K-114)的探针,分析来自外伤性脑损伤(TBI)后5天仍处于昏迷的个体的白细胞所获取的光谱。

[0076] 图13示出了以K-114进行的血小板染色,所述血小板获取自野生类型对照和5xFAD小鼠。图13A和13B示出了K114真彩色图像,而图13C和13D示出了分解的K114图像。图13E示出了 $AB$ -特异性K114信号的发射光谱和自体荧光。与野生型对照血小板相比,5xFAD血小板显示出更高的 $AB$ -特异性K114信号(图13B和13D)。

[0077] 发明详述

[0078] 发明人已发现来自于AD个体的非血浆血液成分中淀粉样蛋白探针荧光的光谱特征与那些来自于人类和小鼠脑的老年斑块高度相似,因此证明非血浆血液成分包含与脑斑块中所发现的物质相似的物质。不被任何理论所限制,假定暴露于致病蛋白质聚集体的非血浆血液成分(例如白细胞、血小板和/或红细胞)使这些聚集体累积。本发明的方法将循环的非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的存在和与异常蛋白质聚集相关的疾病的诊断相关联。本发明也描述了用于在非血浆血液成分中检测和/或识别致病蛋白质聚集体的方法。

[0079] 因此,本公开的一方面提供了一种在个体中检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法,其中个体的非血浆血液成分的致病蛋白质聚集物的存在表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。本公开的另一方面提供了通过将样品与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触,任选通过光谱分析在样品中识别所述致病蛋白质聚集体的类型或组成,在来自个体的血样中用于检测致病蛋白质聚集体的方法。

[0080] 如本文所使用的,术语“与异常蛋白质聚集相关的疾病”指与蛋白质错折叠和聚集相关和/或以蛋白质错折叠和聚集为特征的任何疾病。在这样的疾病中,所述蛋白质可从它们的可溶的功能状态错折叠和聚集至具有高 $\beta$ -折叠( $\beta$ -sheet)含量的高度有序的纤维组装体(“淀粉样肽”或“淀粉样蛋白”)。而“与异常蛋白质聚集相关的疾病”可能根本是不相关的,它们共同之处在于结合至淀粉样蛋白探针,例如刚果红。所述与异常蛋白质聚集相关的疾病包括,但不限于:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏症、轻度认知缺损、大脑淀粉样血管病、脑外伤、额颞痴呆、皮克氏病、多发性硬化、朊病毒病、唐氏综合征和肌萎缩侧索硬化(ALS)。其他与异常蛋白质聚集相关的疾病包括神经肌肉障碍,例如肌病(例如结蛋白肌病、 $\alpha$ -B晶状体蛋白肌病、硒蛋白肌病、遗传性包涵体肌病、肌动蛋白肌病、肌球蛋白肌病)(Vicart等人,1998)和神经病(例如家族性淀粉样变性神经病变)(Sharma和Goebel 2005)。与异常蛋白质聚集相关的疾病也包括神经障碍和/或神经变性障碍。与异常蛋白质聚集相关的疾病不限于本文所列举的具体疾病;使用本文所描述的方法,可以检测任何包含将错折叠蛋白质聚集作为其一部分的疾病。

[0081] 在不同的疾病中,不同的蛋白质可以被错折叠和聚集。例如,阿尔茨海默氏病以包含在脑组织中积聚的斑块的 $\beta$ -淀粉样蛋白为特征。在帕金森氏症中见到 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -Syn)神经元包涵体。亨廷顿氏症与亨廷顿蛋白的聚集相关。对朊病毒病(例如传染性海绵状脑病、牛海绵状脑病和克雅氏病(CJD))(的发生)负有责任的传染性试剂是朊病毒蛋白的错折叠和聚集形式。此外,本公开的发明人有证据表明在多发性硬化症患者的脑中发现淀粉

样蛋白沉积。

[0082] 如本文所使用的,术语“致病蛋白质聚集体”指体内存在的蛋白质和多肽的毒性错折叠和聚集形式。如本文所使用的,术语“蛋白质聚集体”至错折叠的肽或蛋白质低聚物,其包括肽二聚体和大于二聚体的低聚物。“致病蛋白质聚集体”的实例包括淀粉样蛋白。“淀粉样蛋白”是用于描述不溶的纤维状蛋白质聚集体的一般术语。致病蛋白质聚集体也可包括可溶的聚集体,例如 $\beta$ -淀粉样蛋白低聚物。所述致病蛋白质聚集体可由单一蛋白质或多个不同的蛋白质构成。所述致病蛋白质聚集体也可包含脂质和核酸成分。可在致病蛋白质聚集体中发现的蛋白质的实例包括但不限于: $\beta$ -淀粉样蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、亨廷顿蛋白、微管相关蛋白、高度磷酸化的微管相关蛋白(pTau)、朊病毒蛋白、 $\alpha$ B-晶状体蛋白(CRYAB)、结蛋白、硒蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白以及超氧化物歧化酶(SOD)。

[0083] 如本文所使用的短语“在个体中检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法”指一种测定个体是否患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法或过程。短语“在个体中检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法”也指一种测定个体是否具有与异常蛋白质聚集相关的疾病的提高的发病风险的方法。本文所使用的术语“风险”和“提高的风险”指所述个体具有发病的倾向,例如与人口一般风险相比提高的风险。短语“检测疾病”也指在未出现症状的患者中检测疾病。“检测疾病”也包括检测所述疾病的阶段、严重程度、亚型或进展。

[0084] 在一个实施方案中,本文所描述的方法包括从个体中获取血样。获取血样的方法是本领域所熟知的。在一个实施方案中,所述样品包括血液、全血或其中一部分。在另一个实施方案中,所述血样包括血沉棕黄层。在另外的实施方案中,所述血样包括白细胞。如本文所使用的“非血浆血液成分”指除了血浆外的血液成分(例如红细胞、白细胞、微泡和血小板)。

[0085] 血沉棕黄层是血液密度梯度离心后的抗凝血样品部分。所述血沉棕黄层包含血液的大部分白细胞和血小板。可使用本领域已知的技术,将所述血沉棕黄层从血样中分离。任选地,可离心所述血样,并可移除所述血沉棕黄层(或白细胞带)。在一个实施方案中,若需要不含红细胞的样品,则溶解任何污染的红细胞。

[0086] 如本文所使用的,术语“白细胞”或“白血球”指免疫系统的细胞。所述白细胞的实例包括粒细胞,例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞(单核细胞的衍生物)。在一个实施方案中,在包括但不限于单核细胞和/或巨噬细胞的噬菌细胞的血液白细胞中识别出致病蛋白质聚集体。不被任何理论所限制,发明人认为白细胞的所有主要类型均可潜在地积聚致病A $\beta$ 或其他错折叠的蛋白质/肽,然后将这些运送至循环血。通过巨噬细胞和嗜中性粒细胞的吞噬作用是关键防线,其清除病原体和排泄物。此外,当淋巴细胞不是吞噬细胞时,则在这些免疫细胞间观察到细胞间的蛋白质转移(称为trogonocytosis)(由Caumartin等人综述,2006)。

[0087] 如本文所使用的,术语“分离白细胞”指获取包含白细胞的样品,其由白细胞或主要由白细胞组成。在一个实施方案中,分离白细胞指获取不含或基本上不含非白细胞的细胞的样品。术语“分离白细胞”任选地指分离血样的血沉棕黄层。本文所描述的方法在白细胞的样品上进行,例如包含白细胞的样品,其由白细胞组成或主要由白细胞组成。在另一实施方案中,本文所描述的方法在血沉棕黄层样品中进行。

[0088] 在另一实施方案中,分离白细胞的特定的类型,并在那个特定的亚型中进行本文

所述的方法。白细胞类型的实例包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、NK细胞、单核细胞和巨噬细胞。

[0089] 如图13所示,当以K114染色,与致病蛋白质聚合体相关的血液血小板示出了独特的光谱,并可与源于健康对照的血小板区分。其他的非血浆血液成分(例如血红细胞和微泡)也可积聚致病A $\beta$ 或其他错折叠的蛋白质/肽,然后将这些运送至循环血。

[0090] 本文所描述的方法包括个体的非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的识别。可使用数种方法检测非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的存在。在一个实施方案中,使用特异性结合至致病蛋白质聚集体和/或与所述致病蛋白质聚集体相互作用的探针在非血浆血液成分中检测所述致病蛋白质聚集体。

[0091] 本文所描述的方法也包括与个体的非血浆血液成分相关的致病蛋白质聚集体的识别。可使用数种方法检测与非血浆血液成分相关的致病蛋白质聚集体的存在。如本文所使用的,术语与非血浆血液成分“相关”被用于指吸附或吸收至非血浆血液成分表面、吸收至非血浆血液成分内部或处于非血浆血液成分外部的独立的颗粒体的致病蛋白质聚集体。在一个实施方案中,术语与非血浆血液成分“相关”指吸附或吸收至白细胞表面、吸收至白细胞内部或处于白细胞外部的独立的颗粒体的致病蛋白质聚集体。

[0092] 在一个实施方案中,使用特异性结合至致病蛋白质聚集体和/或与致病蛋白质聚集体相互作用的探针在非血浆血液成分(例如白细胞)中检测所述致病蛋白质聚集体。如在此所使用的,术语“结合至致病蛋白质聚集体的探针”包括直接和间接结合至聚集体。

[0093] 如在此所使用的,术语“探针”指任何直接或间接结合至致病蛋白质聚集体的可检测的试剂。在一个实施方案中,所述探针是荧光探针或发光探针。“荧光探针”是由其他波长激发时,具有发射特定波长光线的能力的探针。

[0094] 在另一实施方案中,所述探针是构象-敏感的荧光或发光探针。“构象-敏感”指所述荧光和/或发光探针的吸收和/或发射光谱,以及发射强度随其目标肽、蛋白质、脂质、核酸或大分子组装体变化,从而传递出这样的组装体或聚集体的构象状态。可设计所述探针以随所述大分子聚集体的构象函数展现出最大的光谱变化,以最大化致病聚集体的灵敏度和特异性。

[0095] 在另一实施方案中,所述探针特异性结合至淀粉样蛋白原纤维。用于检测淀粉样肽的构象敏感的荧光探针的具体实例包括但不限于:刚果红、刚果红衍生物和双-苯乙烯基苯(如K114、X34、BSB、FSB、IMSB、柯胺-G、甲氧基-X34、甲氧基-X04)、硫磺素类似物(硫磺素-T、硫磺素-S、匹兹堡化合物B)、噻嗪红R、金胺-0、五聚甲酰噻吩乙酸(p-FTAA)和相关的发光共轭聚噻吩(LCP)或发光共轭寡聚噻吩(LCO)。如在此所使用的,术语“将细胞与探针接触”或“以探针标记细胞”指任何将细胞暴露于探针,以使所述探针能结合至细胞中的致病蛋白质聚集体或或与细胞相关的蛋白质聚集体的方法。在一个实施方案中,将细胞与探针接触或用探针标记前,先透化所述细胞。标记非血浆血液成分的方法(例如带有荧光探针的细胞)是本领域所熟知的。例如,白细胞被任选地固定和干燥,然后以荧光探针染色。探针的pH、时间、浓度和载体可能对于探针是特异的。在一个实施方案中,发明人检测了探针,其优选地在碱性pH(例如大于10或约10.5的pH)下与非血浆血液成分接触。这导致使用在此所描述的光谱法,用于检测致病蛋白质聚集体的灵敏度和/或特异性的改善。

[0096] 一旦所述非血浆血液成分被标记,可使用多种方法检测荧光探针与蛋白质聚集体

的结合。在一个实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针包括检测结合至致病蛋白质聚集体的探针的荧光。检测所述探针的荧光可通过任意本领域已知的方法完成。

[0097] 在另一实施方案中,检测结合至致病蛋白质聚集体的探针包括检测结合至致病蛋白质聚集体的探针的吸光度。探针的“吸光度”是任意特定波长下所述探针吸收的光的量。检测所述探针的吸光度可通过任意本领域已知的方法完成。在另一实施方案中,检测所述探针的吸光度包括产生吸收光谱。

[0098] 在一个实施方案中,使用光度计对所述探针的荧光或吸光度进行光谱分解。所述光度计任选是成像或非成像光度计。在另一实施方案中,使用大视场光谱照相机检测探针的发射。

[0099] 在一个实施方案中,使用荧光光谱仪检测荧光或吸光度。在一个实施方案中,使用光谱2-光子成像。例如,使用常规狭带超快激光(如Chameleon, Coherent Inc.)或超宽带飞秒激光(Octavius, Thorlabs)和光谱激光-扫描显微镜(如Nikon AIRMP)进行光谱2-光子成像。在另一实施方案中,使用光谱多光子或光谱1-光子成像。可使用一种或多种激发波长以激发所述荧光探针,其包括全部UV、近UV、可见和近红外。在一个实施方案中,所述激发波长在大约200nm和大约2000nm之间,任选在大约400nm和700nm之间。可使用多种程序(例如程序ImageTrak(<http://www.ucalgary.ca/styslab/imagetrak>))分析图像。

[0100] 在另一实施方案中,使用非成像分光仪,如从样品池、小样品架或多孔板检测荧光和吸光度。此处,使标记的细胞悬浮,由一条或多条激光谱线激发,使用(非成像)分光计收集所述发射。

[0101] 在另一实施方案中,如在FACS分析仪中使用单室光谱分析检测所述荧光和吸光度。在另一实施方案中,使用酶标仪(microplate reader)。

[0102] 在一个实施方案中,检测所述探针的荧光包括检测来自于探针的荧光信号强度。在另一实施方案中,检测所述探针的荧光度包括检测来自于探针的蛋白质聚集体特异的荧光强度。术语“蛋白质聚集体特异的荧光”指来自于结合至蛋白质聚集体的探针的荧光对致病蛋白质聚集体是特异的,且并不归属于背景荧光、自体荧光或正常状态的蛋白质。

[0103] 在另一实施方案中,检测所述探针的吸光度包括检测探针的吸收的程度、强度或数量。在另一实施方案中,检测所述探针的吸收包括检测探针的蛋白质聚集体特异性吸收的程度、强度或数量。术语“蛋白质聚集体特异性吸光度”指结合至蛋白质聚集体的探针的吸光度对致病蛋白质聚集体是特异性的,并不归因于背景吸收、自体吸收或正常状态的蛋白质。

[0104] 所述方法任选进一步地包括将探针的荧光和吸光度与参比非血浆血液成分中参比探针的荧光或吸光度比较。优选地,所述参比探针和用于接触个体非血浆血液成分的探针是相同探针。

[0105] 在一个实施方案中,参比非血浆血液成分、或对照非血浆血液成分是源于参比个体的非血浆血液成分,所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。在另一实施方案中,参比非血浆血液成分或对照非血浆血液成分是源于参比个体的非血浆血液成分,所述个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。所述参比非血浆血液任选在与个体非血浆血液成分相同的时间测试。在另一实施方案中,所述参比非血浆血液成分在与个体非血浆血液成分不同的时间测试。任选地,参比光谱是预设的或归一化的对照光谱,其代表了具有特定致病蛋

白质聚集体的非血浆血液成分或来自患有与致病蛋白质聚集相关疾病的个体的非血浆血液成分。如在此所使用的，术语“个体非血浆血液成分”指源于测试个体的非血浆血液成分。在优选的实施方案中，所述非血浆血液成分是白细胞。

[0106] 个体非血浆血液成分的荧光或吸光度和患有与异常蛋白质聚集相关疾病的参比个体的参比非血浆血液成分的荧光和吸光度间一致或相似表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。个体非血浆血液成分的荧光或吸光度和患有与异常蛋白质聚集相关疾病的参比个体的参比非血浆血液成分的荧光或吸光度间的不同表明所述个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0107] 同样地，个体非血浆血液成分的荧光或吸光度和未患有与异常蛋白质聚集相关疾病的参比个体的参比非血浆血液成分的荧光或吸光度间的一致或相似表明所述个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0108] 个体非血浆血液成分的荧光和吸光度和参比非血浆血液成分的荧光或吸光度间的一致或相似，任选由荧光的量、荧光的强度或荧光的性质或吸光度的程度测定。在另一实施方案中，个体非血浆血液成分的荧光或吸光度和参比非血浆血液成分的荧光和吸光度间的一致或相似，由分析荧光发射光谱或吸收光谱测定，例如通过在荧光发射光谱或吸收光谱中，识别相似的荧光发射光谱或吸收光谱模式或相似的峰和低谷测定。

[0109] 在另一实施方案中，与未患有与异常蛋白质聚集相关疾病的患者的参比非血浆血液成分相比，个体非血浆元素的荧光或吸光度增加，任选荧光或吸光度的统计上显著增加的认识，表明试验个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0110] 在另一实施方案中，与来自患有与异常蛋白质聚集相关疾病的患者的参比非血浆血液成分相比，来自于个体非血浆血液成分的荧光或吸光度的相似量的识别表明所述测试个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。在一个实施方案中，荧光或吸光度“相似的量”指荧光或吸光度无统计学上显著的差异。

[0111] 在一个实施方案中，荧光的增强或减弱可通过观察荧光图像可视的确定。也可量化增强的荧光或吸光度。在一个实施方案中，与未患有与异常蛋白质聚集相关疾病的患者的参比非血浆血液成分相比，个体非血浆血液成分的荧光或吸光度中至少10%、25%、50%、75%或100%的增强表明测试个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。在另一实施方案中，与患有与异常蛋白质聚集相关疾病的患者的参比非血浆血液成分相比，个体非血浆血液成分的荧光或吸光度中至少10%、25%、50%、75%或100%的降低表明测试个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0112] 荧光或吸收光谱的使用也使得从用荧光探针标记的非血浆血液成分产生光谱特征或荧光发射光谱或吸收光谱。对于给定样品，荧光发射光谱或吸收光谱绘制归一化的来自于探针的荧光或吸光度信号强度对波长图。因而荧光发射光谱或吸收光谱对于给定样品提供了特定的荧光或吸光度特征。

[0113] 在一个实施方案中，本发明的方法包括将个体非血浆血液成分的荧光发射光谱或吸收光谱与一种或多种参比非血浆血液成分的荧光发射光谱或吸收光谱对比。

[0114] 个体非血浆血液成分的荧光发射光谱或吸收光谱与患有与异常蛋白质聚集相关疾病的参比个体的非血浆血液成分的参比荧光发射光谱或吸收光谱间的一致性 or 相似性表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0115] 个体非血浆血液成分的荧光发射光谱或吸收光谱与未患有与异常蛋白质聚集相关疾病的参比个体的非血浆血液成分的参比荧光发射光谱或吸收光谱间的一致性或相似性表明所述个体未患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。如在此所使用的,例如通过在荧光发射光谱或吸收光谱中,识别相似的荧光发射光谱或吸收光谱模式或相似的峰或低谷,确定荧光发射光谱或吸收光谱间的一致性或相似性。在一个实施方案中,如果至少60、70、80、90或95%的光谱特征重叠或基本上重叠,则荧光发射光谱或吸收光谱一致。

[0116] 已显示AD个体中白细胞淀粉样蛋白探针的荧光的光谱特征与来自人和小鼠脑老年斑块的那些是相似的。因此,在另一实施方案中,参比荧光发射光谱或吸收光谱是来自于患有与异常蛋白质聚集相关疾病的个体的标记斑块样品的荧光发射光谱或吸收光谱。任选地,所述斑块样品来自于具有AD的个体的AD-相关斑块。如果测试样品的荧光发射光谱或吸收光谱与斑块样品中的参比发射光谱或吸收光谱一致,则所述测试样品包括致病蛋白质聚集体和/或测试个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0117] 在另一实施方案中,分析荧光发射光谱或吸收光谱以产生指明疾病可能性的指数。在此,按如下所述分析光谱,以提取出多个组分,且分配指明疾病可能性的指数。由特异的发射光谱或吸收光谱组成的分数,其高于特定的阈值,表明所述测试样品包含致病蛋白质聚集体和/或所述测试个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0118] 在一个实施方案中,计算基于荧光发射或吸光度的计分。所述计分反映源于患者的测试细胞患有与异常蛋白质相关疾病的可能性。在此,需要光谱1-光子共聚焦、2-光子或多-光子图像,使用算法(例如,基于Levenberg-Marquardt阻尼最小二乘非线性曲线拟合算法,或线性代数分离/分解算法)处理非血浆血液成分的荧光和/或吸收信号,以将疾病特异性信号从背景和自体荧光发射中分离。因而提取出定量的荧光/吸光度数据,使得疾病对非疾病样品的识别成为可能。在一个实施方案中,所述数学方法产生了与源于患有与异常蛋白质聚集相关疾病的个体的样品相关的计分,和与源于未患有与异常蛋白质聚集相关疾病的个体的样品相关的计分。在一个实施方案中,疾病相关和非疾病相关的计分的不同足够大,以使测试样品作为疾病相关或非疾病相关成为可能。

[0119] 在一个实施方案中,由非血浆血液成分与在此所述的荧光探针接触所得的荧光发射光谱或吸收光谱是不同种类的错折叠蛋白质、细胞自体荧光和背景信号所产生的单个基础光谱的线性组合。这些基础光谱对整体复合物贡献不同的强度,所述整体复合物为贡献光谱的线性组合。设计分解操作以便以定量的方式计算每个基础光谱对整体复合物的相对贡献。一旦从标准样品中确定了基础光谱(例如,已知的健康对照,已知的患有与异常蛋白质聚集相关疾病(例如AD)的患者,未染色样品的细胞自体荧光),使用算法(例如Levenberg-Marquardt算法)分解所述复合光谱,以确定每个贡献于复合物的基础光谱的权重。然后使用这些权重因子以计算多个指数,所述指数表明了任何一个源于健康或患病个体的样品的可能性。

[0120] 因此,在一个实施方案中,所述方法包括:

[0121] a. 从个体非血浆血液成分中产生荧光发射光谱或吸收光谱;

[0122] b. 进行光谱分解,以确定贡献至荧光发射光谱或吸收光谱的单个基础光谱的权重;并

[0123] c. 使用所述权重确定所述个体患有与异常蛋白质聚集相关疾病的可能性。

[0124] 如在此所使用的,术语“光谱分解”指将单个基础光谱从复合荧光发射光谱或吸收光谱中分离的任何方法。在一个实施方案中,使用Levenberg-Marquardt算法进行光谱分解。在另一实施方案中,使用线性分离算法进行光谱分解。

[0125] 在一个实施方案中,从样品(a)已知患有与异常蛋白质聚集相关的疾病的个体,(b)健康对照个体和(c)未与探针接触的样品中确定单个基础光谱。任选地,从非血浆血液成分(例如白细胞)中确定单个基础光谱。

[0126] 在另一实施方案中,在此所描述的方法包括使用机器学习、遗传算法或主成分分析,比较荧光发射光谱与吸收光谱与一种或多种参比荧光发射光谱或参比吸收光谱。例如,在一个实施方案中,使用代表具有特定疾病状态的个体的非-血浆血液成分的光谱数据集,训练遗传算法,以便基于非血浆血液成分,任选地与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触的光谱数据预测个体疾病的状态。

[0127] 本领域普通技术人员能够容易地使用上述的方法评估个体患有与异常蛋白质聚集相关疾病的个体的可能性。

[0128] 在另一实施方案中,非血浆血液成分(例如白细胞)的样品的波谱分析可在不同的时间点进行以检测沉淀物成熟的不同,从而预测潜在疾病的阶段、严重性或进展速率。

[0129] 也可使用致病蛋白质聚集体抗体来检测非血浆血液成分中致病蛋白质聚集体的存在。在一个实施方案中,所述抗体是抗- $\beta$ -淀粉样蛋白抗体,例如6E10、4G8、AB5078P、12F4、AB9234或OMAB。AB9234和OMAB是结合至 $\beta$ -淀粉样蛋白低聚体的抗体。

[0130] 虽然上述的方法意在检测完整的聚集体,任选渗透的细胞,但在另一个实施方案中,在溶解的和/或冻干的细胞中检测聚集体。

[0131] 在一些实施方案中,所述方法进一步包含检测已知与异常蛋白质聚集体相关的疾病相关的额外的蛋白质。例如任选地检测高度磷酸化微管相关蛋白、朊病毒蛋白、 $\alpha$ B-晶状体蛋白和 $\alpha$ -突触核蛋白。任选地,使用抗-磷-微管相关蛋白检测高度磷酸化微管相关蛋白并使用6H4抗体检测朊病毒蛋白。也可使用与ALS相关的SOD的致病形式的抗体。

[0132] 本公开也提供用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集体相关的疾病或用于在血样中检测或识别致病蛋白质聚集体的存在或类型的试剂盒。

[0133] 在一个实施方案中,所述试剂盒包含在非-血浆血液成分中检测致病蛋白质聚集体存在的探针以及使用说明。

[0134] 在一个实施方案中,所述使用说明提供了怎样进行任何在此所描述的方法的说明。

[0135] 所述探针任选是结合至致病蛋白质聚集体的荧光探针。在另一实施方案中,所述探针是构象-敏感性荧光探针。用于检测淀粉样肽的构象-敏感性荧光探针的具体实例包括但不限于:刚果红、刚果红衍生物和双-苯乙烯基苯(如:K114、X34、BSB、FSB、IMSB、柯胺-G、甲氧基-X34、甲氧基-X04)、硫磺素类似物(硫磺素-T、硫磺素-S、匹兹堡化合物B)、噻嗪红R、金胺-0、五聚甲酰噻吩乙酸(p-FTAA)和相关的发光共轭聚噻吩(LCP)或发光共轭寡聚噻吩(LCO)。

[0136] 在其他的实施方案中,所述探针是致病蛋白质聚集体抗体,例如抗 $\beta$ -淀粉样蛋白抗体,如6E10。

[0137] 所述试剂盒用于分析血液以检测多种与异常蛋白质聚集相关的疾病,所述疾病包

括但不限于：阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏症、轻度认知缺损、大脑淀粉样血管病、肌病、神经病、脑外伤、额颞痴呆、皮克氏病、多发性硬化、朊病毒病、唐氏综合征和肌萎缩侧索硬化。

[0138] 以下非限制性实施例是本公开的例证：

### 实施例

[0139] 实施例1. 使用荧光光谱法从血液中检测阿尔茨海默氏病

[0140] 许多神经疾病，例如AD、帕金森氏症、亨廷顿氏病和朊病毒疾病与蛋白质从它们的可溶功能态至具有高 $\beta$ -折叠含量的高度有序的纤维组装体的错折叠和聚集相关。这些病理上不相关的疾病具有的相同点为特异的结合至经典的淀粉样蛋白探针，刚果红，因此被称为“嗜刚果红”疾病。特异性地结合淀粉样蛋白纤维原的构象-敏感性荧光探针已被广泛用于蛋白质聚集的调查研究 (Styren等人, 2000; Klunk等人, 2002; Mathis等人, 2002; Aslund等人, 2009; Nilsson等人, 2005; Hammarstrom等人, 2010)。一些更新的探针具有额外的检测可溶低聚物类别的性质，并基于它们所结合至的蛋白聚集体改变它们的发射光谱，并使它们识别构象的微小的沉积或细微的改变。

[0141] 先进的光谱成像使光谱高度量化的分离成为可能，其包括结合至不同类型聚集体的淀粉样蛋白探针的细微变化。使用这些技术，设计出用于检测AD小鼠模型 (Oakley等人, 2006) 或人类AD患者的脑和血液中错折叠蛋白质 (A $\beta$ 或其他) 的实验。在CNS和血液中研究了以探针X-34 (刚果红衍生物) 标记的蛋白质聚集体的光谱特征。

[0142] 从以X-34标记的AD转基因小鼠脑斑块中获取了强和特异的信号，并可在单一的老年斑块中区分“成熟”和聚集的多种状态 (图1)。也对人类AD患者的脑施用这种策略。在此，能在石蜡包埋的切片中，从神经元纤维缠结和自体荧光脂褐质区分淀粉样蛋白斑块。 $\beta$ -淀粉样蛋白特征与AD小鼠脑中的那些非常相似。这些结果一起表明所述方法能够进行蛋白质错折叠/聚集的灵敏和潜在AD特异性检测。

[0143] 具有抗A $\beta$ 抗体6E10的免疫染色的AD转基因小鼠脑显示出具有6E10免疫-阳性典型形态的老年斑块 (图2a)。此外，也在血管周围观察到6E10-阳性血细胞 (图2a和b)，显示出细胞摄取的物质与所述斑块中发现的非常相似。不被理论所限制，认为循环的白细胞充当“哨兵”，在通过患病的脑后，作为它们经历的“记忆”，所述循环的白细胞具有运输错折叠蛋白质的能力。

[0144] 然而分析死后的脑是AD诊断的事实标准，这是非常不现实的。因此需要寻求非侵入性的技术。支持白细胞充当“循环哨兵”的假设，AD小鼠血液中许多这样的细胞对X-34呈强阳性，具有与大脑斑块中的那些非常相似的光谱特征，表明可在血液中检测相似的“类AD病状” (图3d)。这些阳性白细胞中的许多对A $\beta$ 也呈免疫阳性 (图3a-c)，支持如下的概念：所述阳性白细胞通行至AD脑和/或经脑血管转运、然后将它们中错折叠形态的A $\beta$ 吸收并输出至体循环。野生型 (同窝对照) 白细胞的探针信号是可忽略的。

[0145] 而后在人类AD血样中测试该方法。对从临床诊断的AD和对照 (健康、脑卒中、克雅氏病 (CJD)) 患者中新鲜分离的血沉棕黄层进行类似的分析。所有的AD样品显示出具有X-34的强阳性细胞，展现出特征性发射光谱，这些几乎不存在与所有的对照中 (图4a-b)。仅在AD白细胞中看到强AD-特异性荧光型号 (图4c)。这些结果也表明使用具有用于该分析 (尤其是

选作检测AD)的基础光谱的探针X-34,CJD蛋白质聚集体是无法检出的,这些结果也表明不同的荧光探针和/或不同的特异放射光谱的检测(对CJD是唯一的,但对AD不是),对检测单一推定的与CJD相关的错折叠蛋白质将是必要的。最后,以抗AB共标记所有的X-34-阳性白细胞(图5),表明在AD小鼠中,可在循环人血白细胞中检测“类-AD病理”。

[0146] 总之,这些观察表明可在循环白细胞中检测AD病状。这样的外周异常反映出AD脑中的相关的病状,因此构成了对于AD的可靠检测。

[0147] 实施例2:使用探针K114在白细胞中检测蛋白质聚集体

[0148] 使用荧光探针K114,一种淀粉样蛋白-特异性染料和刚果红的类似物在人类白细胞中检测蛋白质聚集体。此外,使用算法(例如,基于Levenberg-Marquardt阻尼最小二乘非线性曲线拟合算法的算法)处理来自于标记的白细胞的荧光信号,以从背景和自体荧光发射中分离所述疾病-特异性信号。计算基于荧光发射的计数,反映出源于患者的测试细胞样品的可能性,所述患者来源于与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0149] 方案

[0150] 从患者抽取血液至EDTA管并置于冰中。使用标准技术分离血沉棕黄层(白细胞)。简要地,在室温,1700RCF下离心所述血样,移除浓缩的白细胞带(中白层)。在室温下,用ACK裂解液裂解受污染的红细胞3-5min,以PBS洗涤白细胞样品。

[0151] 将白细胞在10%中性缓冲福尔马林中固定。将小等分试样的固定白细胞置于载玻片上并干燥。以荧光探针K114或X-34将干燥样品染色。

[0152] 以缓冲液洗涤探针,用水为基础的载体介质覆盖,并在激光扫描显微镜下成像。

[0153] 所述成像均在不同和多个波长下,使用连续波激光照射(带有共聚焦检测的1-光子激发)或使用2-质子激发进行。任选地,也可使用多质子激发。

[0154] 使用光谱成像系统获取数百个细胞的数张图像中的每一张,所述光谱成像系统要求跨越400-750nm的光谱解析数据的32个通道(典型的)。

[0155] 所述细胞成像用于分析荧光包涵体(在对照和AD/MC1(轻度认知缺损)样品中均存在)和用于白细胞胞浆中增强的荧光。这些包涵体通过尺寸和作为初始步骤的手动提取的特征荧光光谱进行分类。这些“基础光谱”代表了样品中的多种发射体:自体荧光、激光后向散射制品、数个来自于每个荧光探针的特征发射。这些光谱因激发波长而不同,并在每个波长下被重新测定(通常使用2个不同的激发波长)。

[0156] 使用这些基础光谱,处理组合图像中的组合荧光以检测每个样品的每个基础光谱的相对权重/贡献,对每个基础光谱产生数值系数。软件部分基于Levenberg-Marquardt阻尼最小二乘非线性曲线拟合算法。

[0157] 使用系数的比率计算每个类别的“疾病指数”:对照、MC1(轻度认知缺损)、AD和其他的神经障碍。不同的障碍,例如CDJ\BSE需要不同的荧光探针和/或不同的基础光谱,以检测单一推定的折叠蛋白质。

[0158] 结论

[0159] 在以K114标记的AD患者的白细胞中观察到AD-特异性信号。以K114标记的健康细胞的发射光谱与以K114标记的AD细胞是可区分的(图6b)。

[0160] 图7是简化的复合指数,其反映出个体患有AD或轻度认知缺损(MC1)的可能性(“ADR指数”即“AD相关的指数”)。白细胞从健康对照(Healthy Cont)、未患有AD/MC1的脑卒

中患者(脑卒中)、患有“其他神经障碍”(OND)的患者和患有阿尔茨海默氏病(AD)、轻度认知缺损(MCI)和大脑淀粉样血管病(CAA)的患者中取样。所述OND患者患有CJD。

[0161] 所有的非-ADR对照(健康对照、脑卒中和CJD)全部呈阴性,所有的ADR患者(AD+MCI)全部为阳性。此外,四分之三的大脑淀粉样血管病(CAA)患者呈阳性。该数据表明所述方法清晰地识别出患有阿尔茨海默氏病和相关障碍的患者。

[0162] 实施例3. MS患者脑中淀粉样蛋白的存在

[0163] 普遍认为AD是具有次级先天炎症的神经变性障碍,但是对于多发性硬化的观点尚不明确。最初,证据有力地支持原发自身免疫性障碍,其产生的炎症攻击引发脱髓鞘和皮质萎缩。但是,近期来自于详细的病理检查的数据和有效的抗炎治疗的经验对该结论产生怀疑(Stys等人,2012)。

[0164] 因此,存在MS也可能是原发变性障碍,具有异常突出的炎症次级反应的可能性。那么什么可能是MS的根源呢?而后慢性MS的病理(其中炎症反应不太突出)表明脱髓鞘病变随时间而发展(可能从斑块中离散的病灶传播?),脑室周围和皮质的病理显示一些可溶的因子(可能在CSF中循环?)可能负有责任。淀粉样蛋白具有这样的性质:它们可传播和错折叠额外的蛋白,作为有毒的可溶种类循环(例如AD中的A $\beta$ 低聚物),而后压缩成不溶的聚集体。图8示出了以刚果红,淀粉样蛋白探针染色的人MS脑。这些数据显示慢性MS斑块具有淀粉样蛋白沉积。这些沉积可能是引起髓鞘质和神经元损伤的MS的主要特征,如A $\beta$ 在AD中所为,或它们对炎症的慢性发作具有反应性。不管怎样,MS脑中淀粉样蛋白斑块的存在表明与AD相类似的,MS患者的循环白细胞也可能携带可检测的淀粉样蛋白质聚集体。

[0165] 实施例4. 更大规模研究:使用荧光光谱对于AD的血液测试

[0166] 获取来自于30个AD和30个年龄匹配的健康对照,以及其他非AD-神经变性障碍的血样。分离血沉棕黄层和以构象敏感探针标记的白细胞。得到光谱2-光子和1-光子图像,并使用算法处理来自于白细胞的荧光信号以从背景和自体荧光发射中分离AD-特异性信号。AD个体的白细胞淀粉样蛋白探针荧光的光谱特征实际上与人和小鼠的老年斑块的相同,这有力地表明特定的白细胞亚群( $\approx$ 1-2%)包含与大脑斑块中发现的那种相似的物质。此外,这些探针-阳性的白细胞对抗A $\beta$ 抗体强烈地共标记,与下述理解相一致:途径脑(微血管系统和/或实质)的特定白细胞暴露于富含A $\beta$ 的环境,给它们带来这种暴露的“记忆”,即通过本发明的方法是可检测的。然后计算基于不同荧光发射的计分,反映出源于AD患者的样品的可能性。在所选的个体中进行死后神经病理学检查以明确地确诊。

[0167] 有证据表明白细胞的“激活”,例如通过感染,也增强探针的荧光,虽然光谱的特征不同。因此本发明也包括具有多种感染、自身免疫疾病和淋巴组织增生障碍(白血病、淋巴瘤)的人类个体,以确保所述方法的特异性。

[0168] 也有证据表明可使用1-质子荧光激发(共聚焦),大大地简化了技术并为相对便宜的高通量仪器的未来发展开辟道路。

[0169] 实施例5. 使用荧光光谱法对牛海绵状脑病(BSE)的血液检测

[0170] 使用来自羊瘙痒病-感染的和健康小鼠的血液,通过渗透性冲击移除红细胞(RBCs),分离非RBC血液成分。用构象敏感的淀粉样蛋白探针对细胞染色。仅在羊瘙痒病血液成分中观察到强阳性信号,而在未感染小鼠中未发现信号。此外,来自于瘙痒病-感染的血样的光谱特征与抗蛋白酶K、抗-PRP-阳性区域中的羊瘙痒病的脾完全相同。

[0171] 然后在实验BSE样品中测试所述方法。使用两种不同的构象敏感的淀粉样蛋白探针,对冷冻分离的血沉棕黄层进行相似的分析,所述血沉棕黄层来自于神经病理学证明的BSE和非-BSE对照,连同健康牛和那些具有其它疾病的牛(例如骨髓灰质炎、脑脓肿)。所有的BSE样品均呈强阳性,而所有的其他样品呈明显的阴性。该数据显示在此所描述的光谱荧光法能可靠地检测血液中的标记物,所述血液中的标记物仅存在于患有BSE的动物中。

[0172] 实施例6. 患有阿尔茨海默氏病的转基因小鼠的血液和脑切片的光谱荧光分析

[0173] 对AD转基因小鼠系(5XFAD, Oakley等, 2006)进行研究,使用在此所述的光谱荧光方法对比所得AD的血液特征和脑AD病理。与人类个体不同,该方法的优势在于可精确了解任何给定年龄下淀粉样蛋白脑病状的发展。

[0174] 通过从经K-114染色并在光谱共聚焦显微镜上成像的白细胞中选择荧光光谱,自小鼠血液中计算AD指数。使用的激发波长包括375、405、445和457nm,但是也可使用包括但不限于这些值之间的波长的其他的波长。使用AD和健康年龄匹配的野生型小鼠。而后这些光谱被用于计算系数以指明许多细胞/图像中的聚集体的光谱与患病的对正常光谱有多接近。而后通过平均像素强度放大代表AD组分的系数,以得到血液的AD指数。

[0175] 小鼠脑切片被福尔马林固定,并以K-114染色。得到这些切片的代表性的光谱图像,并基于荧光强度阈值选择脑区域。而后如上文对血液所做的,使用AD和对照光谱,合计(合计2D图像的像素并重叠成包含强度对波长的单一光谱向量)和处理所选的像素。所产生的系数通过平均像素强度放大,以得到脑的AD指数。

[0176] 结果示出于图9。如之前所报道的(Oakley等人, 2006), AD斑块病状开始于大约2个月时,随年龄快速增长。使用在此所描述的光谱荧光试验,来自于相同个体的血液在2个月时开始呈阳性,与最早脑病状的开始处于相同的年龄。野生型(WT)脑和血液仍保持阴性。这为在此所述的能在血液中检测非常早期疾病的方法的灵敏度提供了进一步的支持。

[0177] 实施例7. 使用K-114的人类个体的血液和脑脊髓液的光谱荧光分析

[0178] 在阿尔茨海默氏病(AD)研究中使用人类个体因下述事实而复杂化:很难从死前的人类样品中确定疾病的诊断或阶段。为了研究在此所描述的方法是否与其他人类个体中检测方法相一致,通过下述方法完成所述调查研究:同时测试血样和脑脊髓液(CSF)样品,并使用目前接受的临床标准(使用Athena Diagnostics ADmark® 磷-Tau/总-Tau/AB42CSF试验测试A $\beta$ (1-42)和tau/磷-tau的CSF水平)分析CSF,以便检测可能的个体是否患有AD。

[0179] 从通过检测A $\beta$ (1-42)和tau/磷-tau的CSF水平明确地被确定为患有AD的个体的样品,以及健康对照样品的以K-114染色的白细胞图片中获取2D光谱共聚焦图像。基于从AD和HC样品中提取的信号强度、积分和光谱分离K-114发射谱。掩蔽没有显示任何K-114发射的细胞区,以消除背景噪点。每个样品的标准化光谱示出于图10中。从患有AD的个体中获取的荧光光谱可容易地从健康对照中区分,并向更短波长显著地蓝移。

[0180] 实施例8. 患有阿尔茨海默氏病的个体和健康对照的外周白细胞样品中A $\beta$ (1-42)和致病蛋白质聚集体的检测

[0181] 使用可检测的A $\beta$ (1-42)抗体(Millipore AB5078P)对来自于患有阿尔茨海默氏病的个体和健康对照的外周白细胞样品进行染色,产生绿色荧光信号,并以结合至致病蛋白质聚集体的探针(K114)进行染色,产生红色荧光信号。

[0182] 如图11所示,健康对照(图11A)和AD样品(图11B)均在白细胞中显示出A $\beta$ 1-42免疫

染色。在两个样品中平均荧光染色强度是大致相等的(图11C)。但是,图11B示出了更高的红色强度,其代表来自于构象选择的淀粉样蛋白探针与抗体共染色的AD-特异性光谱发射,表明了致病蛋白质聚集体的存在。在对照样品中,只有很弱的AD-特异特异的红色信号。这强调了下述观察:在外周白细胞中Aβ1-42的简单免疫检测由它自己是不能可靠地区分健康对照和AD的。与在特定波长下简单分析荧光强度相比,来自于以选择地结合至致病蛋白质聚集体的荧光探针染色的白细胞的光谱形状分析显著地提供了更多的信息,并促使区分正常个体与患有AD的个体。同样地,多波长下分析和对比光谱预计将促进检测其他与异常蛋白质聚集相关的疾病。

[0183] 实施例9.来自于患有外伤性脑损伤个体的血液的光谱荧光分析。

[0184] 外伤性脑损伤(TBI)是AD的主要风险因子,研究已显示损伤后不久淀粉样蛋白斑块沉积便可能是显著的。在此,发明人旨在施用于用于疑似患有AD的个体相似的方法,以分析患有TBI个体的血液,以便在脑损伤后不久检测致病蛋白质聚集体,以此作为评估脑中生化淀粉样蛋白负担的手段。

[0185] 从男性个体中获取血样,所述个体在受伤后5天经历严重闭合性头部外伤和TBI,其仍处于昏迷。

[0186] 图12示出了受伤后5天患有TBI的个体的白细胞样品的光谱分析结果,以及从健康对照和患有阿尔茨海默氏病的个体获取的光谱。所述光谱获取自使用K-114作为探针进行染色和处理的血液白细胞。2-D成像如实施例7中所陈述的进行。光谱均使用375nm的激发波长获取。如图12所示,来自于具有TBI的个体的光谱相对于其他的显示出红移,明显地超出了正常范围。

[0187] 尽管已参考当前被认为是优选的实施例描述了本公开,但应理解本公开并不限于所公开的实施例。相反地,本公开意图涵盖包括在所附的权利要求的主旨和范围内的各种变型和等同模式。

[0188] 所有在此指出的出版物、专利和专利申请在相同的程度上均以引证方式全部合并与此作为参考,如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体及单独地被表明以其全部引作参考。

[0189] 参考文献

[0190] 1. Barnes, D.E. 和 Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 10, 819-828 (2011)。

[0191] 2. Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766 (2001)。

[0192] 3. Britschgi, M. 和 Wyss-Coray, T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* 82, 205-233 (2007)。

[0193] 4. de la Torre, J.C. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 33, 1152-1162 (2002)。

[0194] 5. Deane, R. 和 Zlokovic, B.V. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4, 191-197 (2007)。

[0195] 6. Nagababu, E., Usatyuk, P.V., Enika, D., Natarajan, V. 和 Rifkind, J.M. Vascular endothelial barrier dysfunction mediated by amyloid-beta

proteins. *J Alzheimers Dis* 17,845-854 (2009)。

[0196] 7. Farkas, I.G. 等人, Beta-amyloid peptide-induced blood-brain barrier disruption facilitates T-cell entry into the rat brain. *Acta Histochem* 105, 1151-125 (2003)。

[0197] 8. Majumdar, A. 等人, Degradation of fibrillar forms of Alzheimer's amyloid beta peptide by macrophages. *Neurobiol Aging* 29, 707-715 (2008)。

[0198] 9. Mildner, A. 等人, Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10, 1544-1553 (2007)。

[0199] 10. Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P. 和 Rivest, S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49, 489-502 (2006)。

[0200] 11. Stamatovic, S.M. 等人, Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 593-606 (2005)。

[0201] 12. McKhann, G.M. 等人, The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263-269 (2011)。

[0202] 13. Styren, S.D., Hamilton, R.L., Styren, G.C. 和 Klunk, W.E. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem* 48, 1223-1232 (2000)。

[0203] 14. Klunk, W.E. 等人, Imaging Aβ plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 797-805 (2002)。

[0204] 15. Mathis, C.A. 等人, A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 295-298 (2002)。

[0205] 16. Aslund, A. 等人, Novel pentameric thiophene derivatives for in vitro and in vivo optical imaging of a plethora of protein aggregates in cerebral amyloidoses. *ACS Chem Biol* 4, 673-684 (2009)。

[0206] 17. Nilsson, K.P., Herland, A., Hammarstrom, P. 和 Inganäs, O. Conjugated polyelectrolytes: conformation-sensitive optical probes for detection of amyloid fibril formation. *Biochemistry* 44, 3718-3724 (2005)。

[0207] 18. Hammarstrom, P. 等人, A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. *Biochemistry* 49, 6838-6845 (2010)。

[0208] 19. Oakley, H. 等人, Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129-10140 (2006)。

- [0209] 20. Caumartin, J., Lemaoult, J. 和 Carosella, E. D. Intercellular exchanges of  
[0210] membrane patches (trogocytosis) highlight the next level of immune  
plasticity. *Transpl Immunol* 17, 20–22 (2006)。
- [0211] 21. Thambisetty, M. 和 Lovestone, S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's  
disease: challenging but feasible. *Biomark Med* 4, 65–79 (2010)。
- [0212] 22. van Rossum, I. A. 等人, Injury markers predict time to dementia in  
subjects with MCI and amyloid pathology. *Neurology* (2012)。
- [0213] 23. Senanarong, V. 等人, Alzheimer's disease dementia as the diagnosis  
best supported by the cerebrospinal fluid biomarkers: difference in cut-off  
levels from Thai experience. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 212063 (2012)。
- [0214] 24. Jack, C. R. J. Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and  
the clinical role imaging will play. *Radiology* 263, 344–361 (2012)。
- [0215] 25. Matsuda, H. 和 Imabayashi, E. Molecular neuroimaging in Alzheimer's  
disease. *Neuroimaging Clin N Am* 22, 57–65, viii (2012)。
- [0216] 26. Nordstedt, C. 等人, Human neutrophil phagocytic granules contain a  
truncated soluble form of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein  
(APP). *J Biol Chem* 269, 9805–9810 (1994)。
- [0217] 27. Styren, S. D. 等人, X-34, A Fluorescent Derivative of Congo Red: A Novel  
Histochemical Stain for Alzheimer's Disease Pathology. *J Histochem Cytochem*  
2000 九月, 第 48 卷 no. 9: 1223–1232。
- [0218] 28. Crystal, A. S. 等人, A comparison of amyloid fibrillogenesis using the  
novel fluorescent compound K114. *J Neurochem.* 2003 九月; 86 (6): 1359–68。
- [0219] 29. Vicart, P. 等人, A missense mutation in the alphaB-crystallin  
chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics* 20, 92–95  
(1998)。
- [0220] 30. Sharma MC, Goebel HH. Protein aggregate myopathies. *Neural India.* 2005  
九月; 53 (3): 273–9。
- [0221] 31. Stys PK, 等人, Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat  
Rev Neurosci.* 2012 六月; 13 (7): 507–14。

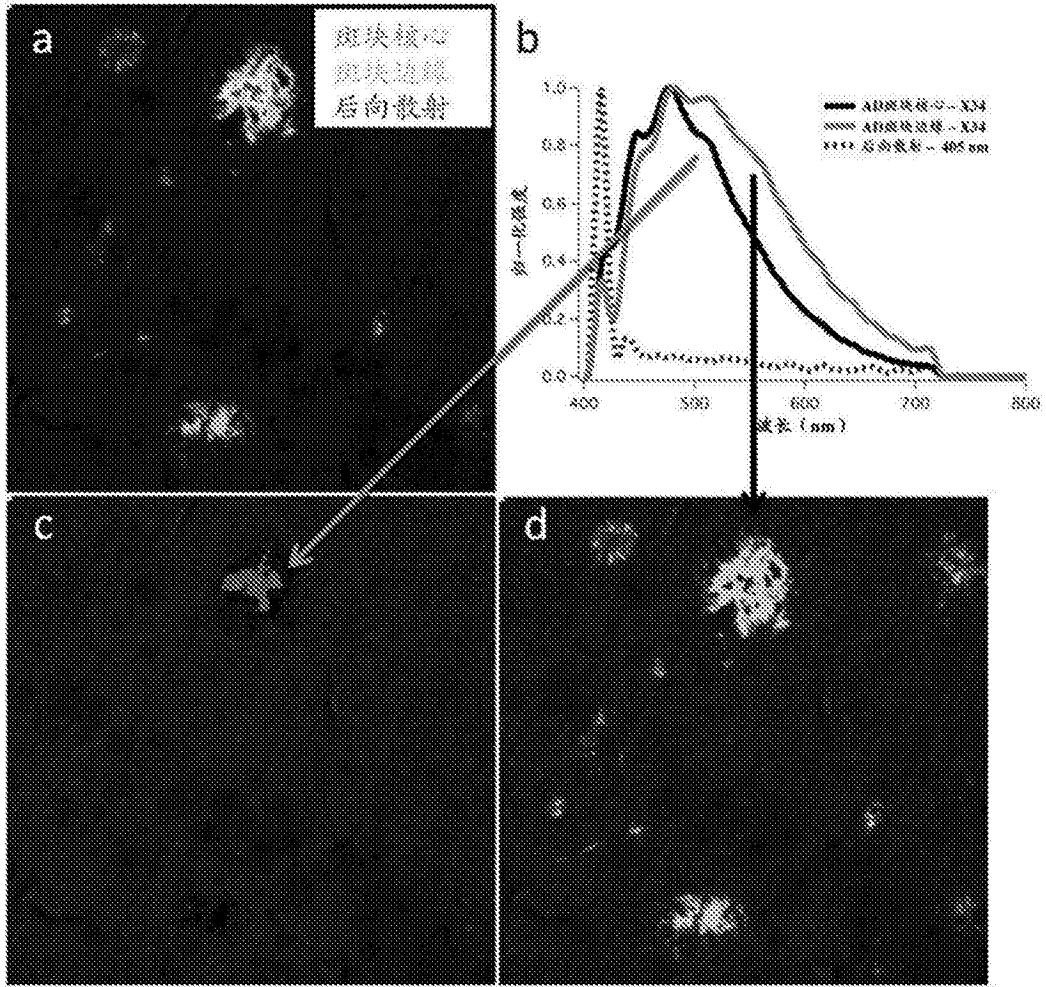


图1

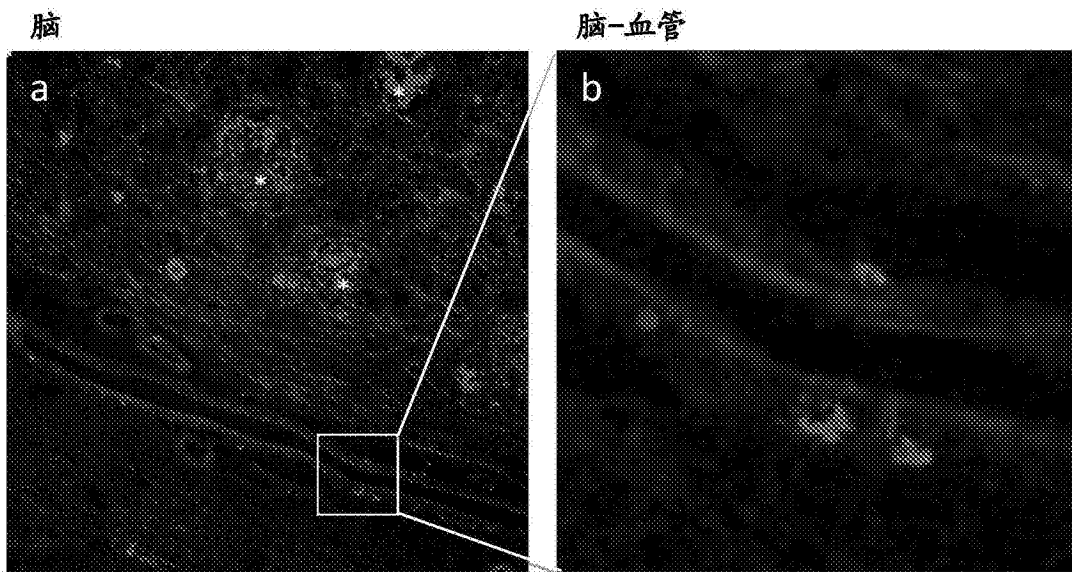


图2

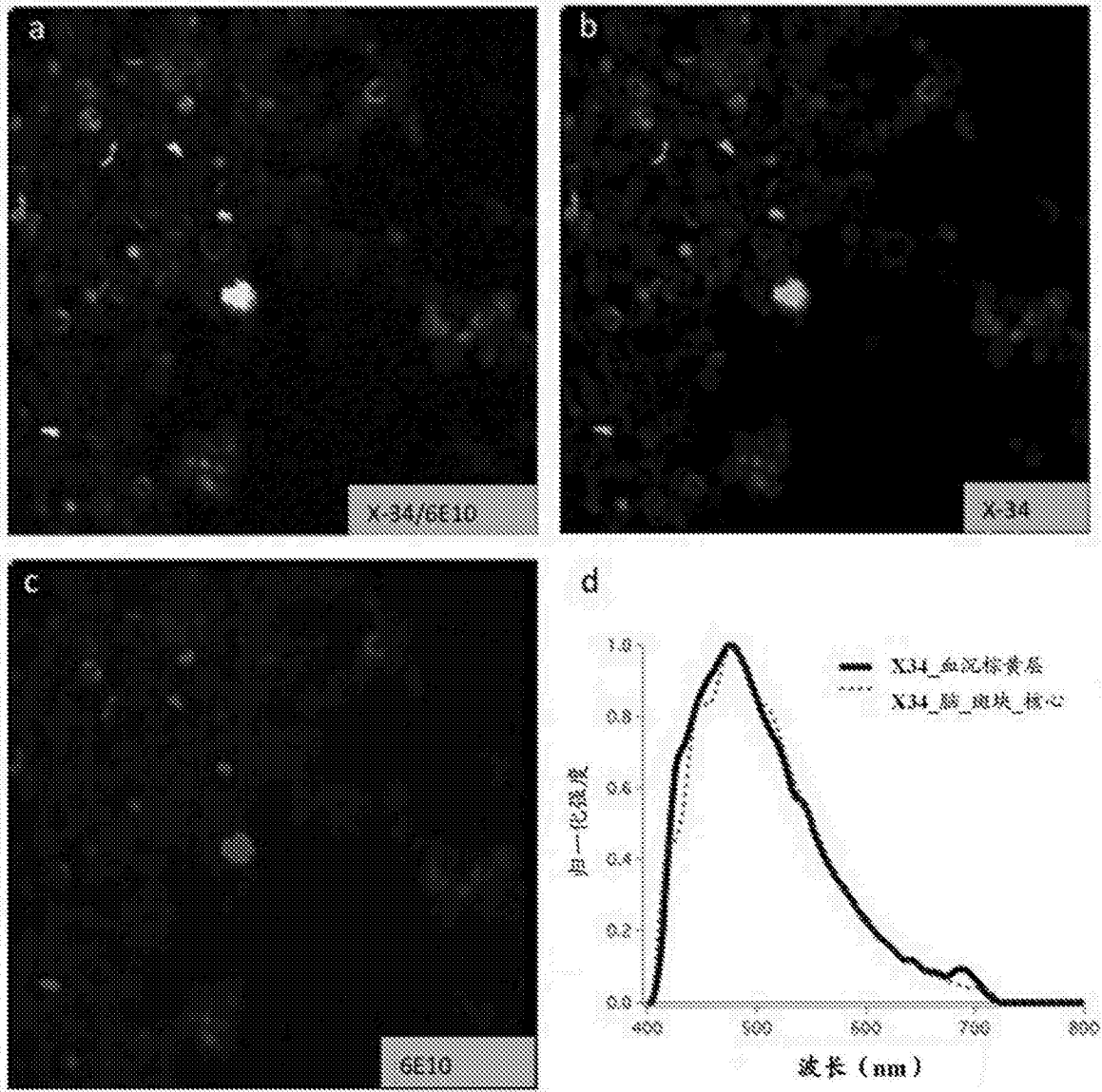


图3

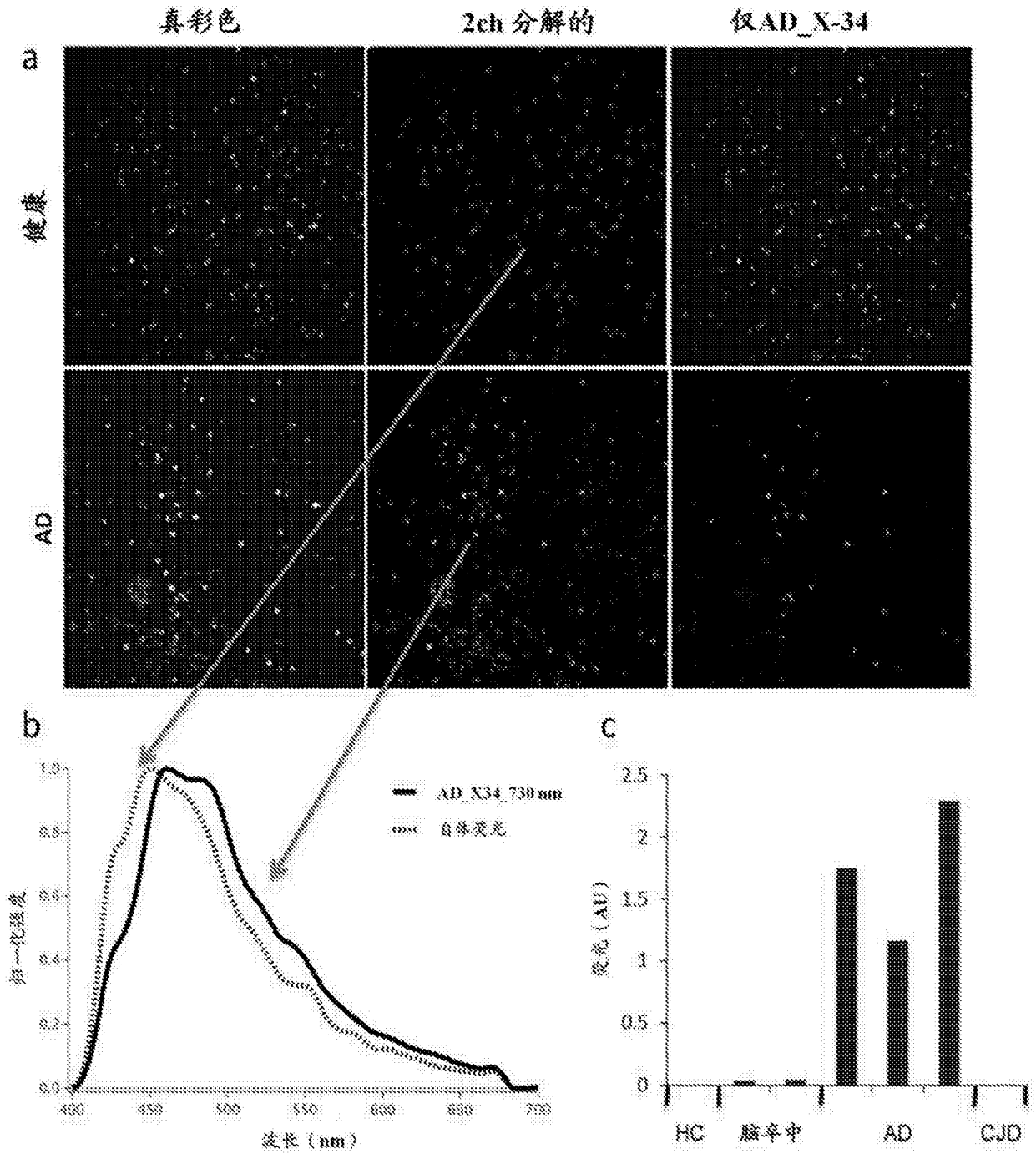


图4

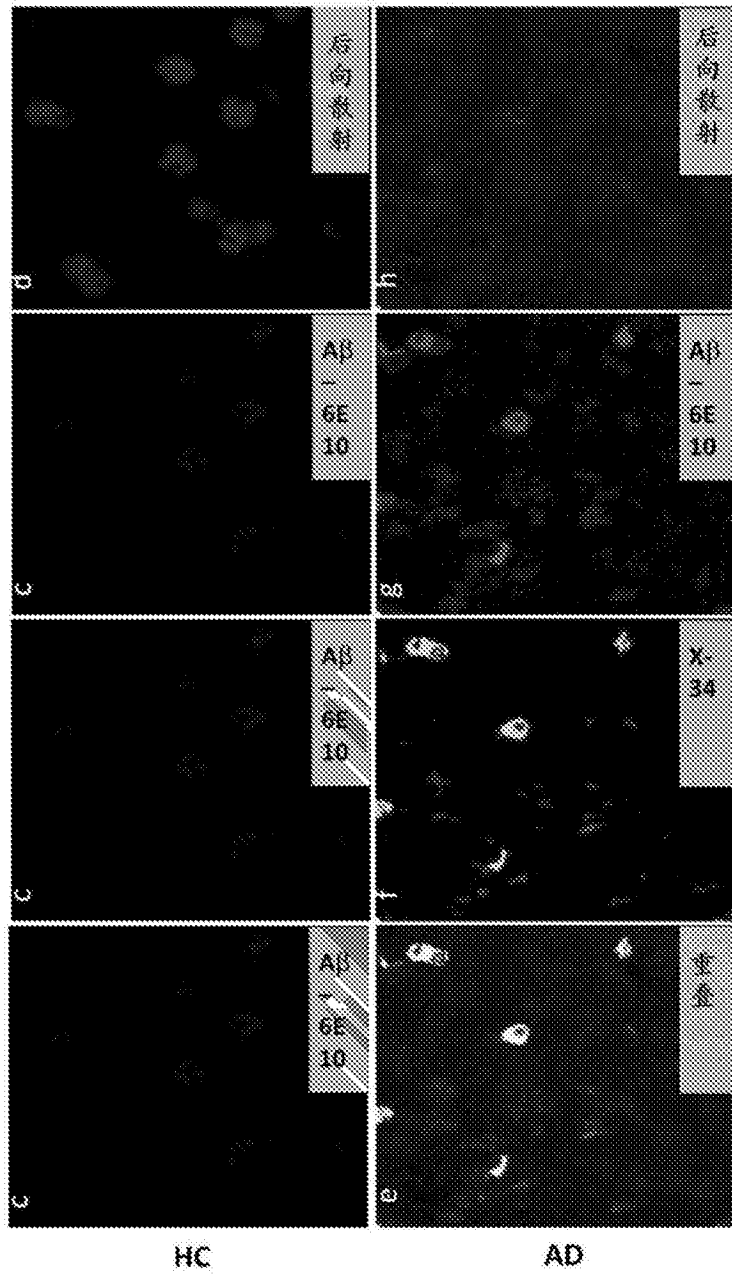


图5

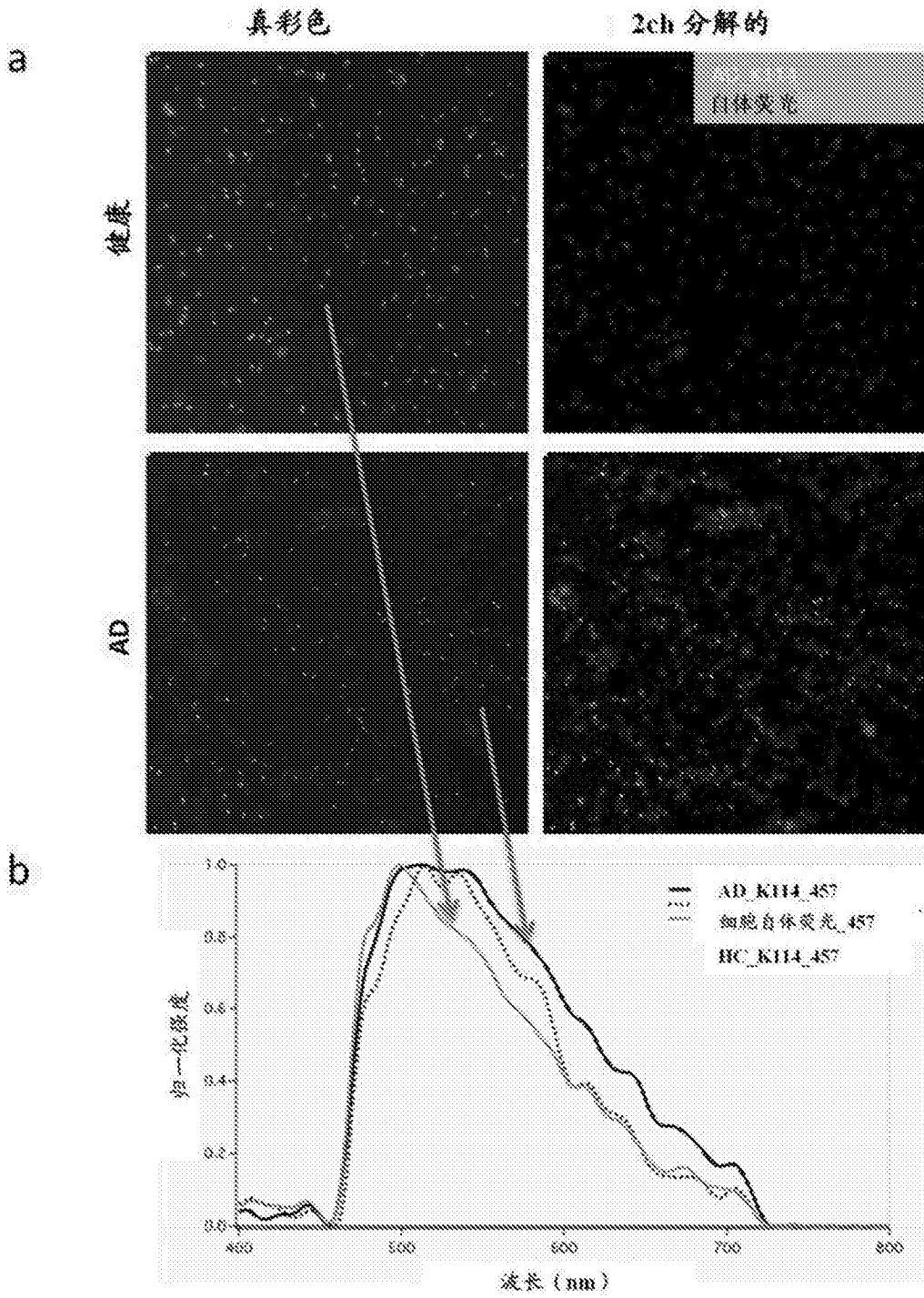


图6

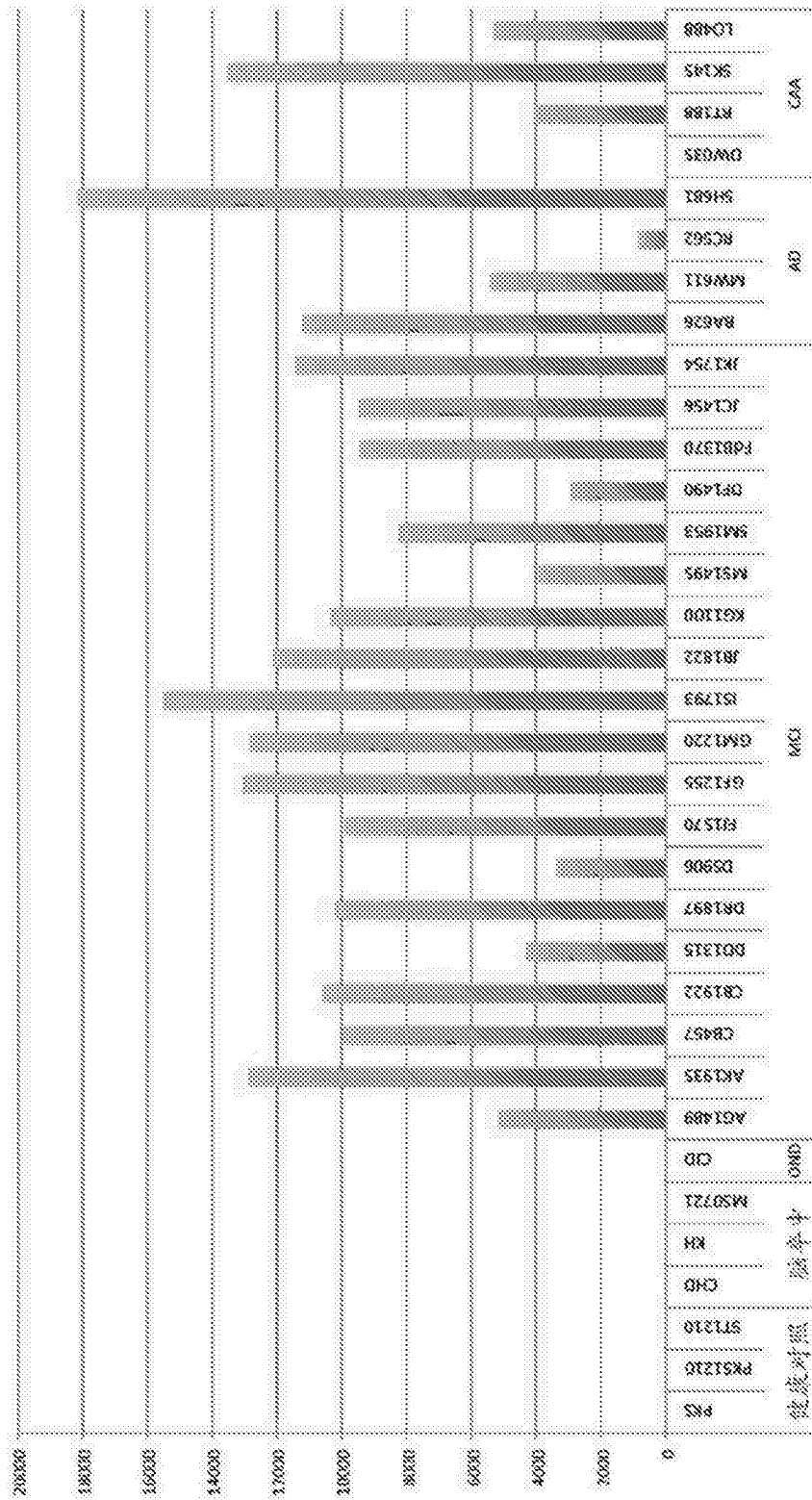


图7

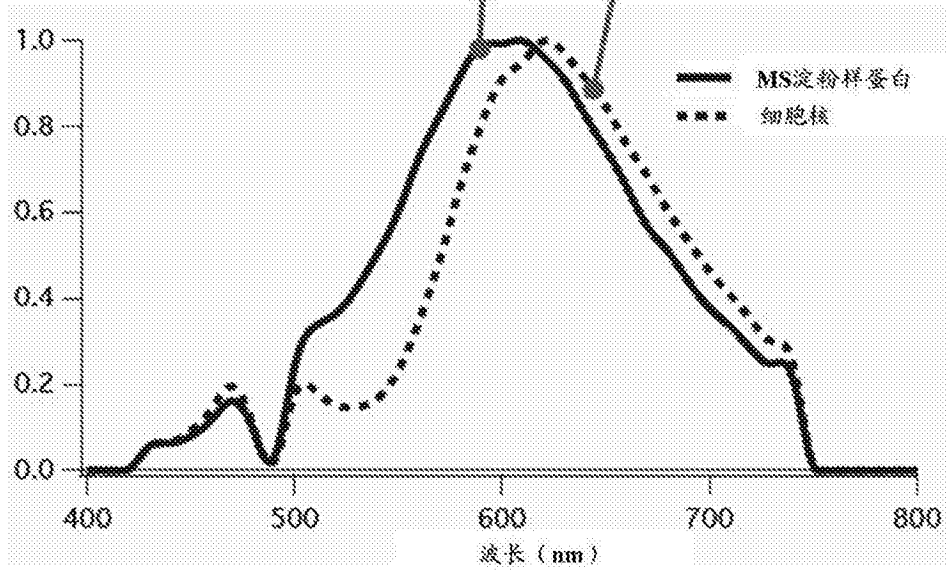
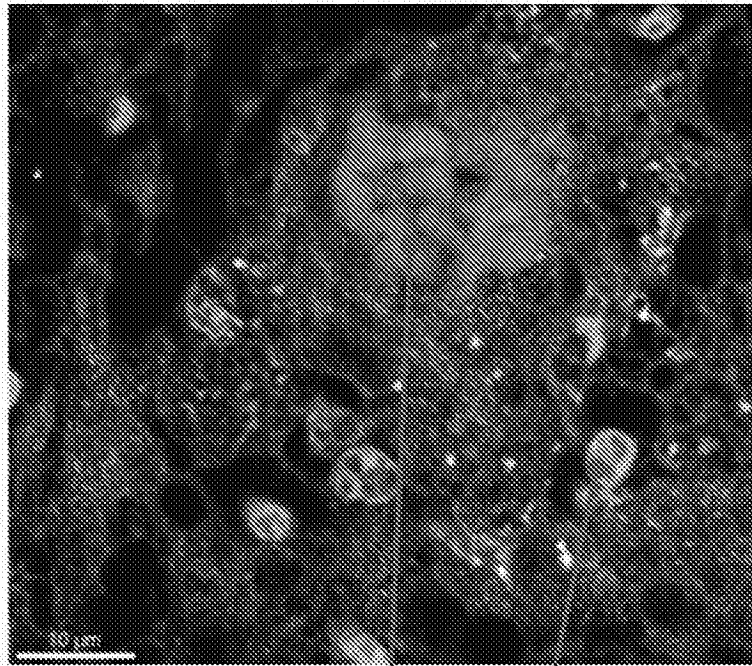
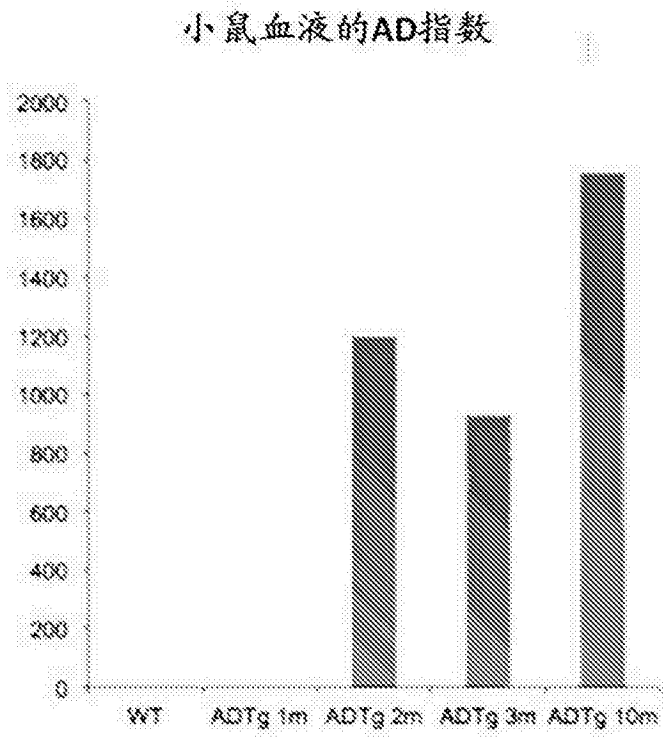


图8

**A**



**B**

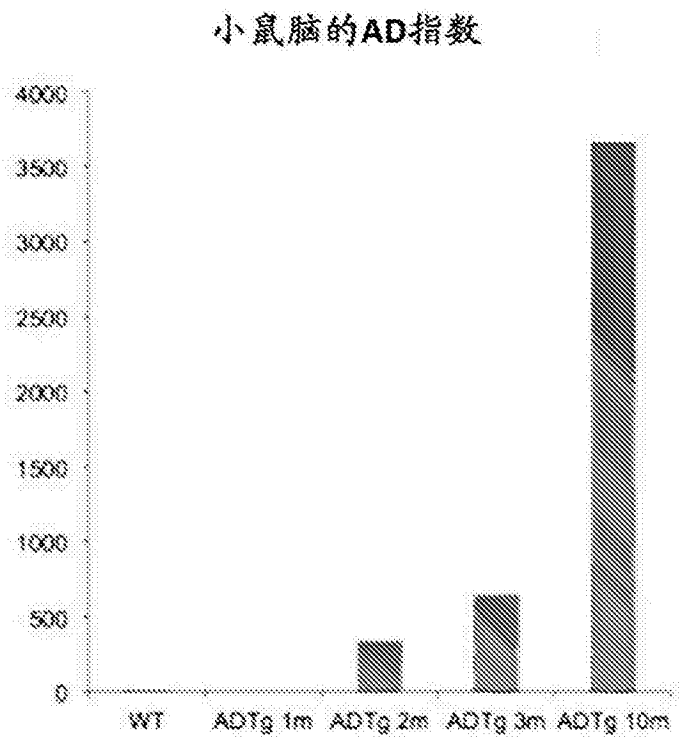


图9

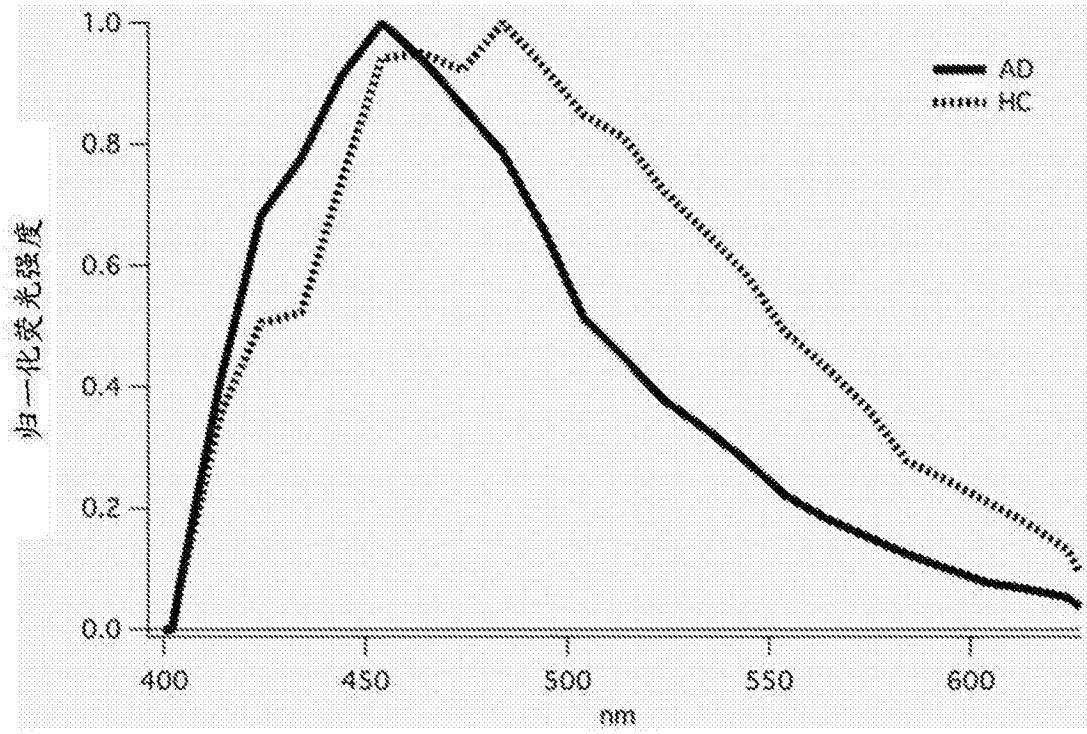


图10

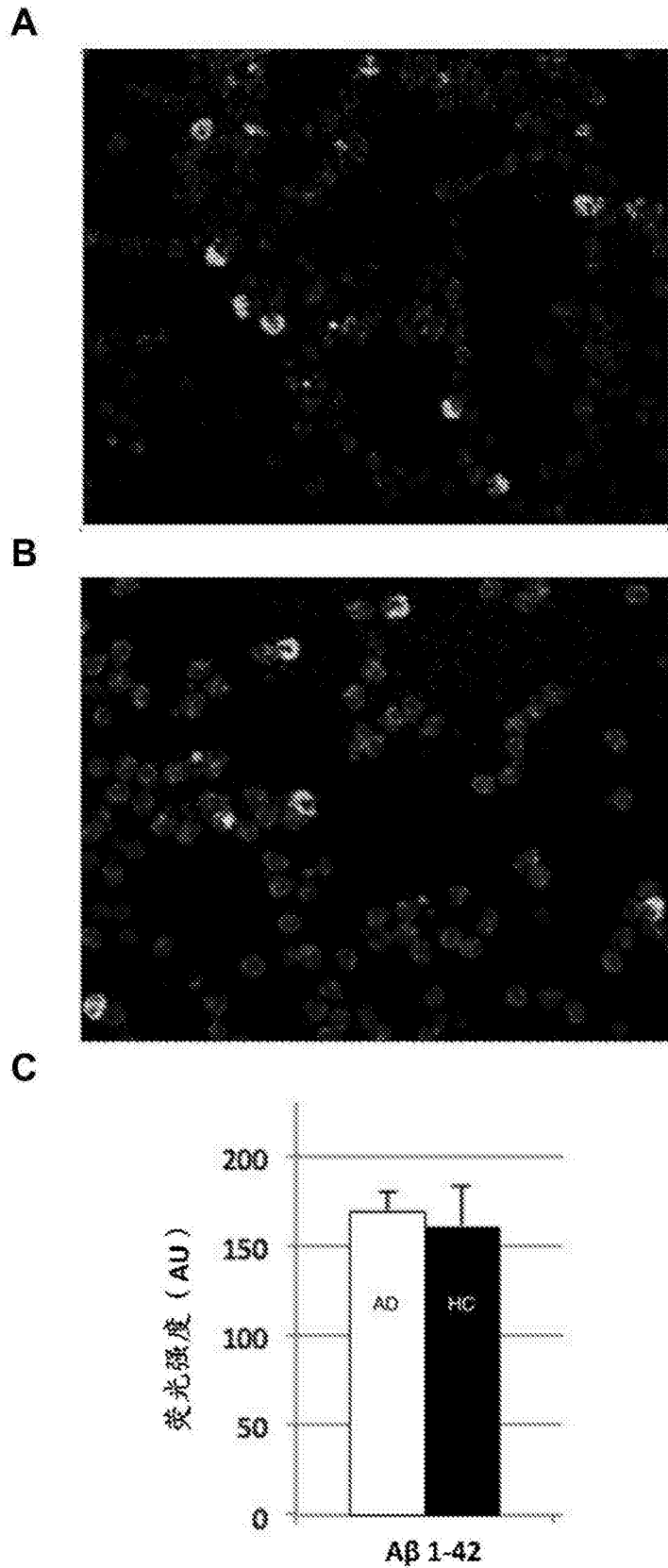


图11

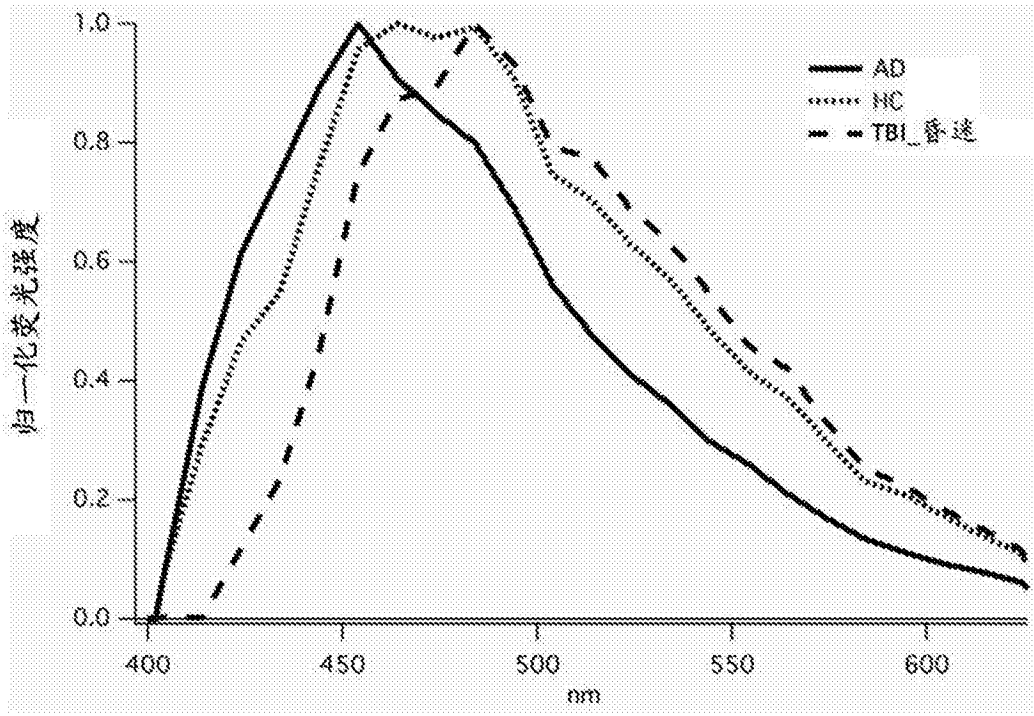


图12

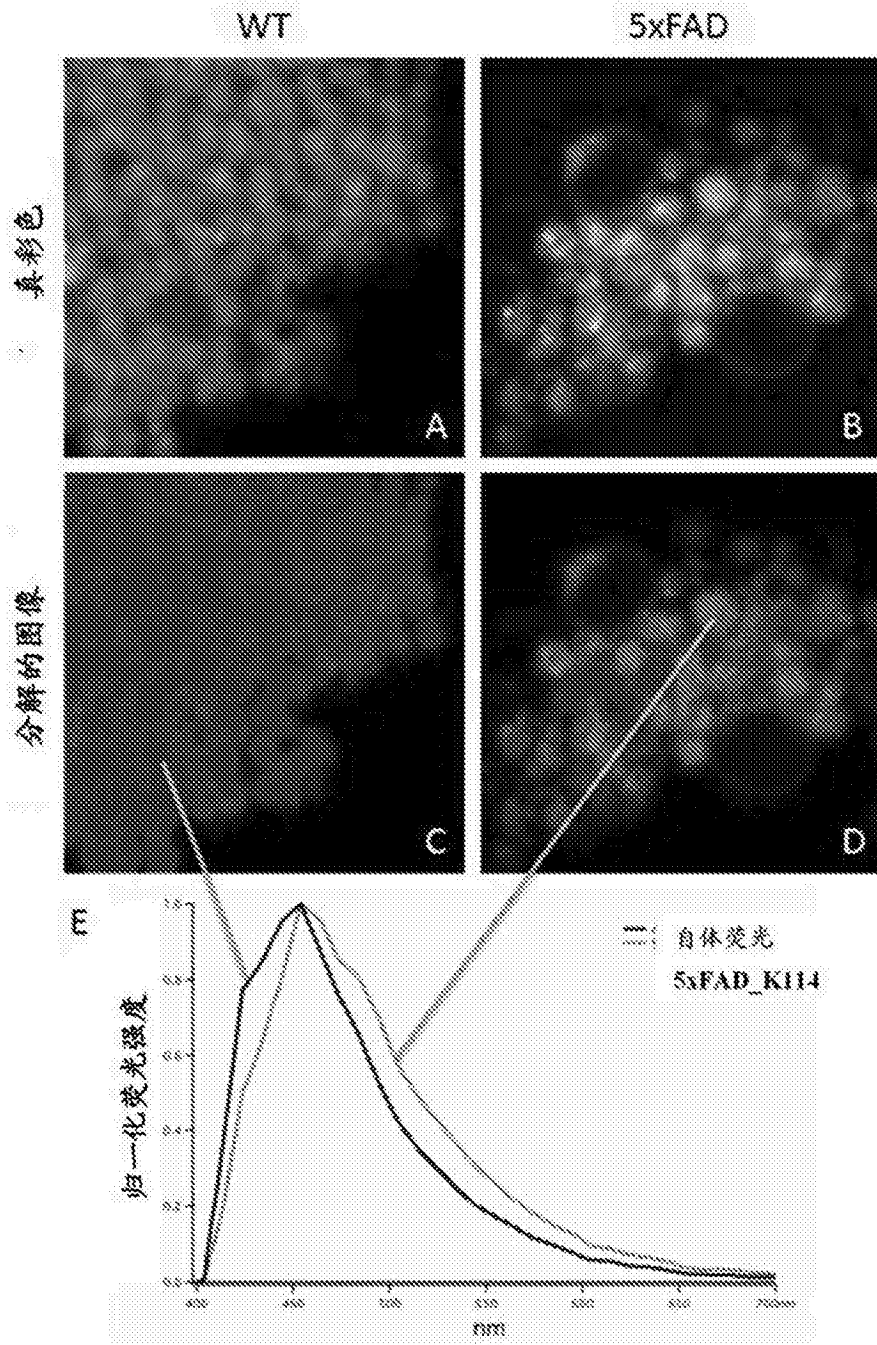


图13

专利名称(译)	用于分析血液以检测与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105247367B</a>	公开(公告)日	2018-04-27
申请号	CN201480027933.8	申请日	2014-03-14
[标]发明人	彼德史戴斯 筒井茂树		
发明人	彼德·史戴斯 筒井茂树		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N33/52 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2814 G01N2800/2821 G01N2800/2828 G01N2800/2835 G01N2800/2842 G01N2800/285 G16B20/00		
代理人(译)	黄泽雄 王燕		
优先权	13/833008 2013-03-15 US		
其他公开文献	CN105247367A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供一种检测个体中与异常蛋白质聚集相关的疾病的方法，所述方法包括(a)将来自于个体的白细胞与结合至致病蛋白质聚集体的探针接触，及(b)检测结合至致病蛋白质聚集体的探针，其中所述白细胞中致病蛋白质聚集体的存在表明所述个体患有与异常蛋白质聚集相关的疾病。在一个实施方案中，所述疾病为阿尔茨海默氏病、轻度认知缺损或外伤性脑损伤。

