

(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 10 月 26 日 (26.10.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/201511 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/533 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/087570

(22) 国际申请日: 2022 年 4 月 19 日 (19.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。中国科学院深圳理工大学 (筹) (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市

南山区桃源街道学苑大道 1068 号, Guangdong 518051 (CN)。

(72) 发明人: 陈宇 (CHEN, Yu); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。屈雪琪 (QU, Xueqi); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。毛梦 (MAO, Meng); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。柴岳 (CHAI, Yue); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。陈静 (CHEN, Jing); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (CN)。

(54) Title: BIOMARKER FOR EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种用于早期诊断阿尔茨海默症的生物标志物及其用途

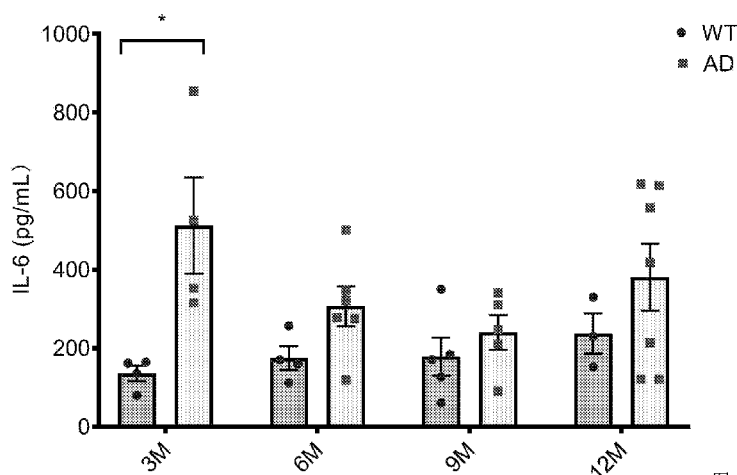


图 1

(57) Abstract: A biomarker for the early diagnosis of Alzheimer's disease (AD) and a use thereof. In particular, one or more of peripheral blood interleukin 6, peripheral blood CD8⁺ T cells and peripheral blood CD4⁺ T cells act as biomarkers for the early diagnosis of neurodegenerative diseases. A method for the early diagnosis of neurodegenerative diseases, comprising: determining whether an individual is affected by a neurodegenerative disease according to a change in the expression levels of interleukin 6 in peripheral blood and/or a change in the number of CD8⁺ T cells and/or a change in the number of CD4⁺ T cells; and determining the progression of the neurodegenerative disease according to the extent of the elevation of the expression levels of interleukin 6 and/or the severity of abnormalities in CD4⁺ T cells and/or CD8⁺ T cells in the peripheral blood. AD occurrence and progression is clinically diagnosed by means of detecting biomarkers in the blood, which is low-cost, easy to operate, and low-risk, and which facilitates large-scale screening, thus possessing practical application value.

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, 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, 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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 用于早期诊断阿尔茨海默症的生物标志物及其用途, 具体为外周血白细胞介素6、外周血CD8⁺T细胞和外周血CD4⁺T细胞中的一种或几种作为早期诊断神经退行性疾病的生物标志物。神经退行性疾病的早期诊断方法, 根据外周血中白细胞介素6表达水平的变化和/或CD8⁺T细胞数量的变化和/或CD4⁺T细胞数量的变化判断是否罹患神经退行性疾病, 根据外周血中白细胞介素6表达上升水平和/或CD4⁺T细胞和/或CD8⁺T细胞异常情况的严重程度判断神经退行性疾病进程。通过检测血液中生物标志物进行AD发生发展的临床诊断, 成本低, 易操作, 风险小, 易于大规模筛查, 具有实际应用价值。

一种用于早期诊断阿尔茨海默症的生物标志物及其用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种用于早期诊断阿尔茨海默症的生物标志物及其用途。

背景技术

阿尔茨海默症（Alzheimer's disease, AD）是和年龄相关的中枢神经退行性疾病，是老年痴呆中最常见的类型。在临床上，AD 病人以进行性记忆减退、认知功能障碍、语言障碍、记忆力减退、执行能力下降和人格方面的改变等表现，约占所有痴呆的 60%-70%。最新数据表明，目前全球有 5000 万痴呆患者，到 2050 年，在全世界范围内将增加 3 倍。AD 患者脑内典型的病理特征是寡聚 β 淀粉样蛋白（ $A\beta$ ）斑块聚集、Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结（NFT）和脑内广泛的炎症反应。目前，被广泛接受的致病假说有： $A\beta$ 聚集假说、Tau 蛋白异常假说、胆碱能假说、神经炎症假说等。由于该病的病因复杂，上述假说均不能有效阐明其发病机制，且其治疗药物研究进展缓慢，目前全球仍缺乏治愈 AD 的药物或方法。一直以来，抗 $A\beta$ 的免疫治疗是也研发热点，但因其药物研发难度大，现阶段进入 III 期临床的药物大都以失败告终。因此，对 AD 进行多角度的病理机制研究和寻找早期生物检测标记物迫在眉睫。

由于 AD 的发生、发展是一个动态演变的过程，从最早的 $A\beta$ 沉积到出现痴呆症状之间的间隔，可以长达 20 多年，并且是一个不可逆的慢性神经退行性病变过程。针对 AD 的早期临床诊断和后续治疗是解决 AD 病症的关键点。目前 AD 的诊断方法主要是联合诊断，主要包括：神经心理学评估，认知损伤测试；脑部老年斑块和 Tau 蛋白 PET 扫描；脑部核磁共振（MRI）和脑脊液（CSF）标志物， $A\beta$ 沉积，磷酸化 tau 蛋白检测等。但是，由于 AD 早期症状不明显，当对病症做出明确诊断时，患者多到达病程晚期，多数神经元出现死亡，如果能在病人发病早期进行快速诊断或使潜在病人提前发现风险，针对性地进行治疗或预防，能有助于患者病程滞留在轻微智力损伤阶段（mild cognitive impairment, MCI）而减缓恶化，从而保证病人生活质量和减轻社会负担。现阶段对 AD 的早期分子筛查技术包括正电子发射型计算机断层显像（PET）和脑脊液 $A\beta$ 分子水平检测等，前者要对受检者注射一定剂量的放射性物质；后者操作损伤大，易造成外科感染。这些诊断技术针对 AD 早期诊断的可靠性也不太稳定，

因此很难用于 AD 早期筛查。AD 的预防、诊断、治疗与康复是目前世界上公认的难题，对 AD 早期诊断新的标志物开发及简便的检测手段是未来对 AD 诊疗的重要方向之一。

发明内容

为了解决现有技术中的问题，本发明旨在提供一种用于早期诊断阿尔茨海默症的生物标志物及其用途。

神经炎症是 AD 患者脑内主要病理特征之一，炎症过程促进了 A β 病理学和 Tau 病理学进展。因此，神经炎症在 AD 疾病发生和发展过程中起着关键作用，针对脑内神经炎症的治疗已经成为现阶段治疗 AD 的新的热点。而这种靶向调控早期神经炎症的关键分子被视为有潜力的干预 AD 新的治疗靶点。大量研究表明，血液中的循环免疫细胞在维持中枢神经系统稳态和介导神经系统疾病的免疫反应方面发挥至关重要的作用。神经炎症过程中，脑内激活的小胶质细胞和星形胶质细胞释放多种细胞因子和趋化因子等炎性介质，有助于血脑屏障的通透性增加并允许外周循环免疫细胞的浸润、粘附和迁移，进一步影响脑内抗神经炎症的免疫反应。近期研究发现，AD 患者大脑中存在浸润的外周循环的效应 CD8⁺ T 细胞，这群细胞不仅可以激活小胶质细胞诱导剧烈的炎症反应，从而进一步加剧 AD 脑内神经炎症爆发。这一发现证实了外周循环的免疫细胞在 AD 发生发展中起着免疫监控的重要作用。最新研究表明，在 AD 患者脑内和 AD 小鼠模型海马中发现一群适应性外周免疫细胞亚群，它们可以释放炎症因子和细胞毒性分子，促进脑内炎症反应从而导致神经元功能障碍。促炎细胞因子增加、免疫细胞浸润和神经胶质细胞活化是 AD 中重要的神经炎症反应。

本发明通过检测 AD 疾病不同阶段的外周血中炎症因子水平、免疫细胞亚群变化与脑内神经炎症严重程度的相关性，从而确定外周血中炎症因子表达水平的改变和免疫细胞亚群数量的改变在 AD 进程中的指示作用。

本发明的具体技术方案如下：

本发明第一方面提供外周血白细胞介素 6、外周血 CD8⁺ T 细胞和外周血 CD4⁺ T 细胞中的一种或几种作为早期诊断神经退行性疾病的生物标志物的用途。

进一步地，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

本发明第二方面提供外周血白细胞介素 6、外周血 CD8⁺ T 细胞和外周血 CD4⁺ T 细胞中的一种或几种在制备神经退行性疾病早期诊断的产品中的用途。

进一步地，所述产品包括：通过酶联免疫吸附、实时荧光定量 PCR 或 RT-PCR 检测外周

血白细胞介素 6 表达水平以诊断神经退行性疾病的产品；和/或通过流式细胞分析或免疫荧光染色检测外周血 CD8⁺ T 细胞和/或外周血 CD4⁺ T 细胞数量的变化以诊断神经退行性疾病的产品。

进一步地，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

本发明第三方面提供外周血白细胞介素 6、外周血 CD8⁺ T 细胞和外周血 CD4⁺ T 细胞中的一种或几种作为神经退行性疾病药物靶点的用途。

进一步地，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

本发明第四方面提供一种神经退行性疾病的早期诊断方法，包括如下步骤：

检测外周血中白细胞介素 6 的表达水平和/或 CD8⁺ T 细胞的数量和/或 CD4⁺ T 细胞的数量，根据外周血中白细胞介素 6 表达水平的变化和/或 CD8⁺ T 细胞数量的变化和/或 CD4⁺ T 细胞数量的变化判断是否罹患神经退行性疾病，根据外周血中白细胞介素 6 表达上升水平和/或 CD4⁺ T 细胞和/或 CD8⁺ T 细胞异常情况的严重程度判断神经退行性疾病进程；

当外周血中白细胞介素 6 的表达水平增多和/或 CD8⁺ T 细胞的数量提高和/或 CD4⁺ T 细胞的数量减少，则罹患神经退行性疾病。

进一步地，所述早期诊断方法还包括：检测脑脊液中白细胞介素 6 的表达水平和/或 CD8⁺ T 细胞的数量，根据脑脊液中白细胞介素 6 表达水平的变化和/或 CD8⁺ T 细胞数量的变化判断是否罹患神经退行性疾病，根据脑脊液中白细胞介素 6 表达上升水平和/或 CD8⁺ T 细胞异常情况的严重程度判断神经退行性疾病进程；

当脑脊液中白细胞介素 6 的表达水平增多和/或 CD8⁺ T 细胞的数量提高，则罹患神经退行性。

进一步地，根据外周血中白细胞介素 6 表达水平的变化和 CD8⁺ T 细胞数量的变化进行诊断；

当外周血中白细胞介素 6 的表达水平增多和 CD8⁺ T 细胞的数量提高，则罹患神经退行性疾病。

进一步地，根据外周血中白细胞介素 6 表达水平的变化、CD8⁺ T 细胞数量的变化和 CD4⁺ T 细胞数量的变化进行诊断；

当外周血中白细胞介素 6 的表达水平增多，CD8⁺ T 细胞的数量提高和 CD4⁺ T 细胞的数量减少，则罹患神经退行性疾病。

进一步地，根据外周血白细胞介素 6 表达水平的变化、外周血 CD8⁺ T 细胞数量的变化和

脑脊液 CD8⁺ T 细胞数量的变化进行诊断；

当外周血白细胞介素 6 的表达水平增多、外周血 CD8⁺ T 细胞的数量提高和脑脊液 CD8⁺ T 细胞的数量提高，则罹患神经退行性疾病。

进一步地，所述外周血取自人或小鼠。

进一步地，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

本发明第五方面上述用途或上述早期诊断方法在筛选神经退行性疾病治疗药物中的应用。

进一步地，所述神经退行性疾病治疗药物抑制外周血中白细胞介素 6 的表达和/或减少外周血中 CD8⁺ T 细胞的数量和/或增加 CD4⁺ T 细胞的数量。

进一步地，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

本发明第六方面提供上述用途或上述早期诊断方法在筛选神经退行性疾病的新生物标志物或新药物靶点中的应用。

进一步地，新生物标志物或新药物靶点影响外周血中白细胞介素 6 表达水平和/或 CD8⁺ T 细胞数量和/或 CD4⁺ T 细胞数量。

进一步地，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

本发明的有益效果为：

本发明通过基于外周循环中免疫细胞和免疫分子的改变实现诊断早期 AD，具体提供作为早期诊断 AD 的标志物炎症因子 IL-6、外周循环免疫细胞亚群 CD8⁺ T 细胞和辅助性 CD4⁺ T 细胞，可以直接对外周血样本进行检测，判断机体的炎症水平，实现 AD 的早期筛查中。其优势在于，通过检测血液中生物标志物进行 AD 发生发展的临床诊断不仅降低了诊断成本，而且容易操作，避免了受检者脑内取样过程中感染中枢风险，患者接受度高且比较容易进行疾病的大规模筛查，提高了检测的效率，增加了结果的准确性，具有实际应用的价值。本发明可用于指导临床筛查、AD 致病机理的研究、AD 治疗药物的筛选以及 AD 的新生物标志物和潜在的新用药靶点的筛选中，具有广阔的应用前景。

附图说明

图1. 3月龄（3M）、6月龄（6M）、9月龄（9M）和12月龄（12M）野生型小鼠（WT）和APP/PS1小鼠（AD）外周血中IL-6表达量变化（* $p < 0.05$ ）。

图 2. 3 月龄（3M）和 6 月龄（6M）野生型小鼠（WT）和 APP/PS1 小鼠（AD）外周血

中适应性免疫细胞亚群的变化 ($*p < 0.05$)。

图 3. 3 月龄 (3M) 和 6 月龄 (6M) 野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠 (AD) 小鼠的脑组织免疫荧光染色的结果图片 (比例尺=50 μm) 和不同月龄 CD8⁺T 细胞细胞浸润的统计结果 ($*p < 0.05$)。A. 脑片在脑图谱中拍摄的位置。B. 为不同月龄脑组织切片中小胶质细胞表面标记物 Iba1, T 细胞表面标记物 CD8, 细胞核标记物 DAPI。C. 为不同月龄 WT 和 AD 小鼠脑内浸润 CD8⁺ T 细胞统计结果。

图 4. 3 月龄 (3M) 和 6 月龄 (6M) 野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠 (AD) 脑脊液内 IL-6 表达水平的结果 ($*p < 0.05$)。

图 5. 3 月龄 (3M) 和 6 月龄 (6M) 野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠 (AD) 大脑皮层和海马体内的 IL-6 基因表达水平的结果 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)。

具体实施方式

为了更清楚地理解本发明, 现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中, 各原始试剂材料均可商购获得, 未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件, 或按照仪器制造商所建议的条件。

本发明主要在 APP/PS1 小鼠模型 (以下简称 AD 小鼠模型) 进行, AD 小鼠模型是模拟 AD 疾病理想的动物模型之一, 广泛应用于 AD 致病机制的研究。本发明以不同月龄 AD 小鼠模型作为研究对象, 通过脑组织免疫荧光染色技术、总 RNA 提取技术、qRT-PCR 技术、外周血清的酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等, 通过对同窝野生型 (同窝野生型) 和患病组 (APP/PS1 转基因小鼠, AD) 组间对比, 得到了外周血中炎症因子 IL-6 和细胞毒性 CD8⁺ T 细胞、辅助性 CD4⁺ T 细胞在 AD 转基因小鼠外周循环发生异常与脑内炎症发生发展相关的明确结论。基于此, 本发明提供了外周血中炎症因子 IL-6 表达水平改变和细胞毒性 CD8⁺ T 细胞、辅助性 CD4⁺ T 细胞数量变化可作为 AD 早期诊断分子标志物的可靠证据: 3 月龄 AD 小鼠对应病人的病程发展为即将迈入轻微智力损伤 (MCI) 阶段, 6 月龄 AD 小鼠则 AD 病症特征明确。以下将结合实例对本发明的特征和性能进行进一步的详细描述。

本发明所涉及的材料:

同窝野生型小鼠和 APP/PS1 小鼠模型来自美国 Jackson 实验室;

多聚甲醛购自 Sigma-aldrich, 货号: 158127;

包埋剂 OCT 购自 SAKURA, 货号: 4583;

Iba1 一抗购自 Wake 公司, 货号: 019-19741;
CD8 一抗购自 Invitrogen, 货号: 14-0195-82;
DAPI 购自 Thermo scientific 公司, 货号: 62248;
荧光二抗购自 Thermo scientific;
红细胞裂解液购自 BD Biosciences 公司, 货号: 555899;
流式分析使用的抗体均购自 BD Biosciences 公司, 货号依次为:
Ms CD45 FITC 30-F11, 货号: 553079;
Ms CD3 MolCpx PerCP-Cy5.5 17A2, 货号: 560527;
Ms CD4 APC-H7 GK1.5, 货号: 560181;
Ms CD8a PE 53-6.7, 货号: 553032;
Ms CD19 PE-Cy7 1D3, 货号: 552854;
Ms CD49b APC DX5, 货号: 560628;
马血清购自 Gibco 公司, 货号: 26050088;
胎牛血清购自 Life Technologies 公司, 货号: 16050-122;
DAPI 购自 Thermo scientific 公司, 货号: D1306;
DPBS 购自 Sigma 公司, 货号: D8662-24*500ML;
Trizol 购自 invitrogen 公司, 货号: 15596026;
反转录试剂盒购自 Thermo scientific, 货号 K1622;
实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Thermo scientific, 货号 4368706;
ELISA 试剂盒购自 R&D, 货号: M6000B。

实施例 1: 外周血中炎症因子 IL-6 的表达水平检测

本实施例使用 ELISA 试剂盒, 分别对 3 月龄和 6 月龄野生型小鼠和 APP/PS1 小鼠外周血中的白细胞介素 6 (IL-6) 的表达水平进行检测, 步骤如下:

1、血清样品采集

将 3 月龄及 6 月龄同窝野生型和 AD 小鼠用异氟烷气体麻醉后, 眼底采血法收集小鼠的血液样本至 1.5 mL 的灭菌 EP 管中, 断颈后并用剪刀迅速断头处死小鼠, 并按照下述方法分离血清:

将抗凝血样品置于 4℃ 静置 4 h, 待血液凝固后自然析出血清, 在 4℃ 下 4000 rpm 离心 30 min, 分离血清, 弃去不溶物;

将血清移至新的灭菌 EP 管，分装后-80℃储存备用。

2、试剂配置

(1) 阳性对照配制：用 1 mL 去离子水溶解 IL-6 阳性对照，充分混匀，备用。

(2) 洗涤液配制：用去离子水按 1:25 稀释至工作浓度。

(3) 发光试剂配制：在上机检测前 15 min，将试剂盒中的发光试剂 A 和试剂 B 按照 1:1 体积混匀，避光保存。

(4) IL-6 标准品配制：将试剂盒中提供的 5000 pg/mL 的标准品在新的 EP 管中用校准稀释剂按照 1:10 稀释成 500 pg/mL 的标准品，再稀释成浓度分别为 250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL 和 7.81 pg/mL 的标准品。

3、ELISA 检测

(1) 向测试孔中加入 50 μ L 测定稀释剂 RD1W。

(2) 向测试孔中依次加入标准品、对照样品和待测样品，用试剂盒中提供的封口膜封口后室温孵育 2 h。

(3) 孵育结束后，撕下封口膜，弃去液体，每孔中加入 400 μ L 洗涤液洗涤检测板，洗涤 4 次，弃去洗涤液。

(4) 向测试孔中加入 100 μ L 小鼠 IL-6 偶联物，封口膜封口后，室温孵育 2 h。

(5) 重复步骤 (3) 1 次。

(6) 向测试孔中加入 100 μ L 配制的发光试剂，避光室温孵育 39 min。

(7) 加入 100 μ L 终止液，轻弹混匀测试板确保充分混匀。

(8) 读板：在 30 min 内完成每个孔的光密度检测。

(9) 计算：根据试剂盒提供的公式进行浓度定量计算。

4、实验结果

3 月龄 (3M)、6 月龄 (6M)、9 月龄 (9M) 和 12 月龄 (12M) 的野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠 (AD) 外周血血清中的炎症因子 IL-6 的表达水平如图 1 所示。由图可知，与 WT 组小鼠相比，在 3 月龄 AD 小鼠的外周血血清中 IL-6 表达水平显著上升，随着疾病进程的发展，IL-6 在外周血血清中出现持续上升的趋势。表明在 AD 发生早期阶段外周血循环系统参与到 AD 引起的疾病进程，可以作为早期 AD 诊断的外周血生物标记物。

实施例 2：外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 的流式细胞分析

本实施例对6月龄和9月龄的野生型小鼠和 APP/PS1 小鼠的外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 进行流式细胞分析, 步骤如下:

1、高活性的外周血单个核细胞 (PBMCs) 制备

(1) 在 200 μ L 抗凝全血中加入 3 倍体积的红细胞裂解液轻轻混匀, 室温静止 10 min, 其间轻混匀 2 次, 裂解红细胞。

(2) 在 800 $\times$ g 下离心 2 min, 弃上清, 收集细胞, 用 1 mL PBS 清洗样品 1 次。

(3) 使用 500 μ L 缓冲液重悬, 300 目细胞滤网过滤后, 孵育抗体, 后上机分析。

2、流式分析

(1) 将上述步骤制备的 PBMCs 细胞悬液用含有 2%胎牛血清的 DPBS 调整细胞密度为 5×10^6 个/mL。

(2) 取 40 μ L 细胞悬液加入预先装有 50 μ L 荧光标记的特异性抗体的塑料离心管中, 再加入 50 μ L 灭活正常马血清 (按 1:20 用 DPBS 稀释), 4 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min。

(3) 加入 2 mL 含有 2%胎牛血清的 DPBS 充悬混匀细胞洗涤, 1000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 min, 重复洗涤细胞 1 次。

(4) 加入 500 μ L 预冷 PBS 重悬细胞, 准备上机分析。

3、实验结果

基于不同月龄 AD 外周血中炎症因子 IL-6 表达水平的变化, 本实施例选择 AD 早期阶段: 3 月龄 (3M) 和 6 月龄 (6M) 小鼠进行 PBMCs T 淋巴细胞亚群流式分析, 结果如图 2。流式结果分析表明, 与 WT 小鼠相比, 在 6 月龄 AD 小鼠的外周血中, 辅助性 T 细胞 (CD4 $^{+}$ T 细胞) 表达显著降低, 细胞毒性 T 细胞 (CD8 $^{+}$ T 细胞) 显著升高, 说明外周循环中的免疫细胞可以对 AD 脑内的神经炎症发挥免疫调节作用。揭示在 AD 进程 (CD8 $^{+}$ T 细胞) 可以作为早期 AD 诊断的外周循环生物标志物。

实施例 3: CD8 $^{+}$ T 细胞的细胞浸润检测

本实施例使用免疫荧光染色试剂盒, 对野生型小鼠和 APP/PS1 小鼠模型 (AD 小鼠模型) 的脑组织进行 CD8、Iba1 和 DAPI 染色, 步骤如下:

1、小鼠脑组织切片

(1) 麻醉及脑组织灌注取样: 向小鼠腹腔注射水合氯醛麻醉, 深度麻醉后, 固定在手术木板上, 置于解剖盘中, 后端头取脑, 并用多聚甲醛浸泡固定 24 h。

(2) 小鼠的灌注固定: 使用 4 $^{\circ}$ C 的 PBS 灌注小鼠, 每只 20 mL, 后使用 4 $^{\circ}$ C 的 4%多聚

甲醛（称取 40 g 多聚甲醛溶于装有 500 mL DEPC 水的玻璃容器中，持续加热，磁力搅拌至 60℃，形成乳白色悬液。用 1.0 mmol/L 的 NaOH 调节 pH 为 7.0，使溶液呈清亮状，再加入约 500 mL 2×PBS，充分混匀，过滤后定容至 1000 mL，4℃保存备用）灌注，每只小鼠 20 mL，至组织变硬。

（3）取材：小心剥离脑组织，置于 15 mL 离心管中，用 4%多聚甲醛（固定剂）后固定 24 h。

（4）脱水：将多聚甲醛固定好的组织用 PBS（清洗液）洗 3 次，20%蔗糖（脱水剂）脱水至组织沉底，30%蔗糖 4℃下脱水过夜。

（5）将包埋剂 OCT 滴加到标本台，放入恒冷箱切片机内至变白，然后取出，迅速将表面用单面刀片修平。

（6）用安全刀片将标本底部修平后粘附于标本台，然后置入-24℃恒冷箱切片机的冷冻台中，待组织略微发白时用 OCT 在标本表面涂一薄层，继续冷冻 20 min。

（7）调好切片厚度后开始切片，切片厚度 20 μm，切好的片子连续收集，移入含 4%多聚甲醛的 24 孔板。

（8）将切好的片子放 4℃保存备用。

2、免疫荧光染色

（1）小心挑出合适位置的切片到预先放有 1 mL 预冷 PBS 的 24 孔板中，用预冷 PBS 洗 3 次，每次 10 min。

（2）打孔及封闭：0.2% Triton X-100（PBS 稀释）、0.1% BSA 及 5%马血清（PBS 稀释），室温孵育 40 min，放置摇床上慢速摇晃。

（3）PBS 室温下洗 3 次，每次 5 min。

（4）一抗孵育：使用抗体稀释液（PBS 中含 0.01% BSA 和 5%马血清）按 1:100 进行稀释，每孔中加入 200 μL，4℃慢速摇晃孵育过夜。

（5）回收一抗，PBS 室温下洗 3 次，每次 10 min。

（6）3%马血清室温下封闭脑片 30 min。

（7）二抗孵育及 DAPI 染色：使用 PBS 按 1:500 稀释二抗，室温避光孵育 2 h；DAPI 按 1:5000 稀释储存液，室温孵育 15 min。

（8）用 PBS 室温下洗 3 次，每次 15 min。

（9）封片：取粘性载玻片，在右侧磨砂面用铅笔标记具体信息，在载玻片中间滴一滴

PBS，沾取切片放于 PBS 液滴上，吸除 PBS 溶液，在载玻片中央横铺 160 μ L 封片剂，用长条盖玻片盖住切片，避免气泡以及褶皱产生。

(10) 平放于避光处晾干。

3、实验结果

3 月龄 (3M)、6 月龄 (6M)、9 月龄 (9M) 和 12 月龄 (12M) 的野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠(AD)的染色图片如图 3 所示。由图可知，在 6 月龄 AD 小鼠皮层和海马部位有外周来源的 CD8⁺ T 细胞浸润入脑内病灶部位，随着病情发展，9 月龄和 12 月龄 AD 小鼠脑组织中 CD8⁺ T 细胞浸润增多，小胶质细胞激活数目增多，且成聚集状态，而 3 月龄小鼠没有出现这一现象。这一结果表明，在 AD 小鼠模型中，CD8⁺ T 细胞介导的神经炎症发生发展在 3 月龄和 6 月龄之间或者更早阶段。这说明可将 CD8⁺ T 细胞的数目改变可以作为 AD 的早期标记物。

实施例 4:脑脊液中炎症因子 IL-6 的表达水平检测

1、脑脊液样品采集：

小鼠麻醉后，将头部固定于定向仪上。采集脑脊液时，用湿纱布擦试大鼠颈背部皮肤，剪去背毛，暴露皮肤并消毒，用手术刀沿纵轴切一纵行切口（约 1 cm），用剪刀钝性分离颈部背侧肌肉。为避免出血，最深层附着在骨上的肌肉用手术刀背刮开，暴露寰枕膜。由枕骨大孔进针直接抽取脑脊液。抽取完毕后缝合外层肌肉、皮肤。刀口处可撒涂磺胺药粉，防止感染。采完脑脊液后，应注入等量的消毒生理盐水，以保持原来脑脊髓腔的压力。

2、IL-6 表达水平检测

本实施例对 3 月龄 (3M) 和 6 月龄 (6M) 的野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠(AD)的脑脊液进行 ELISA 检测，测定随着疾病进程 IL-6 表达平的变化，实验步骤与实施例 1 相同。

3、实验结果

3 月龄 (3M) 和 (6M) 的野生型小鼠 (WT) 和 APP/PS1 小鼠(AD)的脑脊液中 IL-6 表达水平变化如图 4。在 3 月龄和 6 月龄小鼠的脑脊液中，与 WT 小鼠相比，AD 小鼠在两个月龄中均表现出 IL-6 表达水平显著升高。说明在 AD 发生早期阶段 IL-6 参与到 AD 引起的疾病进程，可以作为早期 AD 诊断的脑脊液检测生物标记物。

实施例 5：大脑皮层和海马体内炎症因子 IL-6 的表达水平检测

本实施例使用实时荧光定量 PCR 试剂盒，分别对 3 月龄和 6 月龄野生型小鼠和 APP/PS1 小鼠的大脑皮层 (cortex) 和海马体 (hippocampus) 内的 IL-6 的表达水平进行检测，步骤如

下:

1、RNA 提取

(1) 将 3 月龄及 6 月龄同窝野生型和 AD 小鼠用异氟烷(气体)麻醉后,断颈后用剪刀迅速断头处死,将头放于冰上,迅速分离大脑皮质并分离小鼠的大脑皮层以及海马体。将分离到的组织在含有 4 U/mL 的蛋白酶抑制剂和 RNA 酶抑制剂的 DPBS 洗涤两次。

(2) 匀浆处理:将组织或细胞在液氮中磨碎,每 100 mg 组织加入 1 mL Trizol (RNA 提取试剂),用匀浆仪进行匀浆处理。

(3) 将匀浆样品在室温放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离。

(4) 每使用 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min。

(5) 4℃下 10000×g 离心 15 min。

(6) 把水相转移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA,每使用 1 mL Trizol 加入 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min。

(7) 4℃下 10000×g 离心 10 min,在管侧和管底出现胶状沉淀,弃上清。

(8) 用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,每使用 1 mL Trizol 加 1 mL 75%乙醇,4℃下 7500×g 离心 5 min,弃上清。

(9) 室温放置干燥 5 min,加入 50 μL 无 RNase 的水,用枪头吸打几次,55℃放置 10 min 使 RNA 溶解,-70℃保存。

2、反转录

使用反转录试剂盒将提取的总 RNA 反转录成 cDNA,步骤如下:

在无 RNA 酶的离心管中制备反应混合物 I,体系如下:

组分	添加量
总 RNA	1 μg
Oligo (dT)	1 μL
随机引物	1 μL
无 RNA 酶的水	补足至 12 μL
总体积	12 μL

将上述组分混合后快速离心 5 s,在 70℃孵育 5 min 后,冰浴 2 min,再按下述体系制备反应混合物 II,体系如下:

组分	体积 (μL)
----	---------

缓冲液	4
RNA 酶抑制剂	1
dNTPs (10 mM)	2
反转录酶	1
总体积	8

将反应混合物 I 加入到反应混合物 II 中,快速混合 5 s,在 70℃孵育 5 min 后,冰浴 2 min,按一下程序进行反转录:

25℃, 5 min; 42℃, 60 min; 70℃, 5 min。

得到的 cDNA 模板置于-20℃保存备用。

3、实时荧光定量 PCR

使用实时荧光定量 PCR 试剂盒对 IL-6 的表达水平进行检测,反应体系如下:

组分	体积 (μL)
正向引物 (10 mM)	1
反向引物 (10 mM)	1
酶、缓冲液、dNTPs 和染料的混合物	10
cDNA 模板	1
去离子水	7
总体积	20

其中,正向引物的序列如 SEQ ID No.1 所示,反向引物的序列如 SEQ ID No.2 所示。

SEQ ID No.1: ctgggatgtctgtagctca;

SEQ ID No.2: ctgtgaagtctcctctccgg。

将上述组分混合,6000 rpm 离心 1 min,按以下程序进行扩增:

预变性: 95℃, 10 min;

循环扩增: 95℃, 15 s; 60℃, 1 min; 70℃, 1 min; 循环 40 次;

形成熔解曲线: 95℃, 15 s; 60℃, 1 min;

整个过程中升温和降温的速率为 1.6℃/s。

4、实验结果

由图 5 可知,在 3 月龄和 6 月龄 WT 小鼠中,同一组中野生型小鼠个体之间细胞因子表达的变化相对比较集中,而 AD 小鼠中,同一组不同个体之间各个细胞因子表达变化差异比

较大，且 IL-6 在 3 月龄和 6 月龄 AD 模型小鼠的大脑皮层和海马区基因表达水平显著升高。提示，IL-6 在外周和中枢表达具有明显的相关性，进一步证明本发明中发现的外周血中 IL-6 可以作为早期 AD 的诊断指标。

显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 外周血白细胞介素 6、外周血 CD8⁺ T 细胞和外周血 CD4⁺ T 细胞中的一种或几种作为早期诊断神经退行性疾病的生物标志物的用途。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

3. 外周血白细胞介素 6、外周血 CD8⁺ T 细胞和外周血 CD4⁺ T 细胞中的一种或几种在制备神经退行性疾病早期诊断的产品中的用途。

4. 根据权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述产品包括：通过酶联免疫吸附、实时荧光定量 PCR 或 RT-PCR 检测外周血白细胞介素 6 表达水平以诊断神经退行性疾病的产品；和/或通过流式细胞分析或免疫荧光染色检测外周血 CD8⁺ T 细胞和/或外周血 CD4⁺ T 细胞数量的变化以诊断神经退行性疾病的产品。

5. 根据权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

6. 外周血白细胞介素 6、外周血 CD8⁺ T 细胞和外周血 CD4⁺ T 细胞中的一种或几种作为神经退行性疾病药物靶点的用途。

7. 根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

8. 一种神经退行性疾病的早期诊断方法，其特征在于，包括如下步骤：

检测外周血中白细胞介素 6 的表达水平和/或 CD8⁺ T 细胞的数量和/或 CD4⁺ T 细胞的数量，根据外周血中白细胞介素 6 表达水平的变化和/或 CD8⁺ T 细胞数量的变化和/或 CD4⁺ T 细胞数量的变化判断是否罹患神经退行性疾病，根据外周血中白细胞介素 6 表达上升水平和/或 CD4⁺ T 细胞和/或 CD8⁺ T 细胞异常情况的严重程度判断神经退行性疾病进程；

当外周血中白细胞介素 6 的表达水平增多和/或 CD8⁺ T 细胞的数量提高和/或 CD4⁺ T 细胞的数量减少，则罹患神经退行性疾病。

9. 根据权利要求 8 所述的早期诊断方法，其特征在于，所述早期诊断方法还包括：检测脑脊液中白细胞介素 6 的表达水平和/或 CD8⁺ T 细胞的数量，根据脑脊液中白细胞介素 6 表达水平的变化和/或 CD8⁺ T 细胞数量的变化判断是否罹患神经退行性疾病，根据脑脊液中白细胞介素 6 表达上升水平和/或 CD8⁺ T 细胞异常情况的严重程度判断神经退行性疾病进程；

当脑脊液中白细胞介素 6 的表达水平增多和/或 CD8⁺ T 细胞的数量提高,则罹患神经退行性。

10. 根据权利要求 8 所述的早期诊断方法,其特征在于,根据外周血中白细胞介素 6 表达水平的变化和 CD8⁺ T 细胞数量的变化进行诊断;

当外周血中白细胞介素 6 的表达水平增多和 CD8⁺ T 细胞的数量提高,则罹患神经退行性疾病。

11. 根据权利要求 8 所述的早期诊断方法,其特征在于,根据外周血中白细胞介素 6 表达水平的变化、CD8⁺ T 细胞数量的变化和 CD4⁺ T 细胞数量的变化进行诊断;

当外周血中白细胞介素 6 的表达水平增多, CD8⁺ T 细胞的数量提高和 CD4⁺ T 细胞的数量减少,则罹患神经退行性疾病。

12. 根据权利要求 9 所述的早期诊断方法,其特征在于,根据外周血白细胞介素 6 表达水平的变化、外周血 CD8⁺ T 细胞数量的变化和脑脊液 CD8⁺ T 细胞数量的变化进行诊断;

当外周血白细胞介素 6 的表达水平增多、外周血 CD8⁺ T 细胞的数量提高和脑脊液 CD8⁺ T 细胞的数量提高,则罹患神经退行性疾病。

13. 根据权利要求 8 或 9 所述的早期诊断方法,其特征在于,所述外周血取自人或小鼠。

14. 根据权利要求 8 或 9 所述的早期诊断方法,其特征在于,所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

15. 权利要求 1 所述用途、权利要求 3 所述用途、权利要求 6 所述用途或权利要求 8 所述早期诊断方法在筛选神经退行性疾病治疗药物中的应用。

16. 根据权利要求 15 所述的应用,其特征在于,所述神经退行性疾病治疗药物抑制外周血中白细胞介素 6 的表达和/或减少外周血中 CD8⁺ T 细胞的数量和/或增加 CD4⁺ T 细胞的数量。

17. 根据权利要求 15 所述的应用,其特征在于,所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

18. 权利要求 1 所述用途、权利要求 3 所述用途、权利要求 6 所述用途或权利要求 8 所述早期诊断方法在筛选神经退行性疾病的新生物标志物或新药物靶

点中的应用。

19. 根据权利要求 18 所述的应用，其特征在于，新生物标志物或新药物靶点影响外周血中白细胞介素 6 表达水平和/或 CD8⁺ T 细胞数量和/或 CD4⁺ T 细胞数量。

20. 根据权利要求 18 所述的应用，其特征在于，所述神经退行性疾病为阿尔茨海默症。

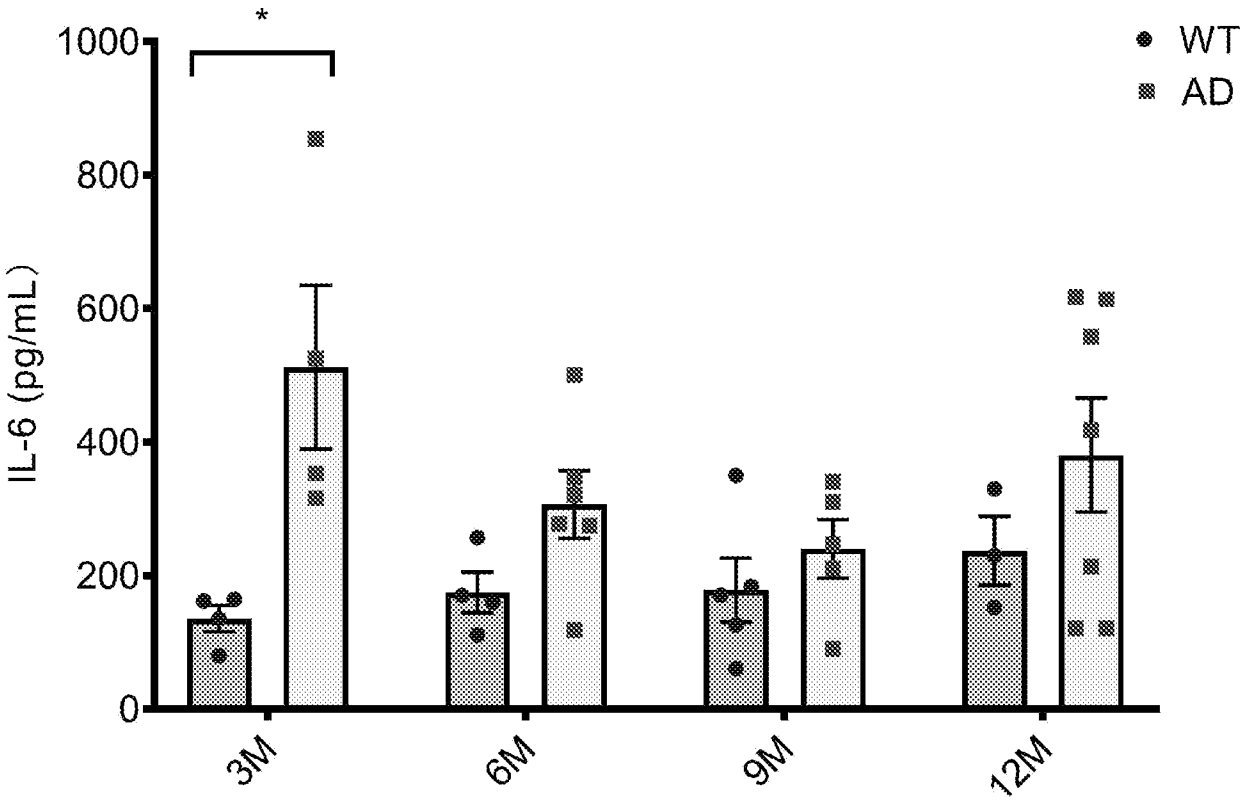


图 1

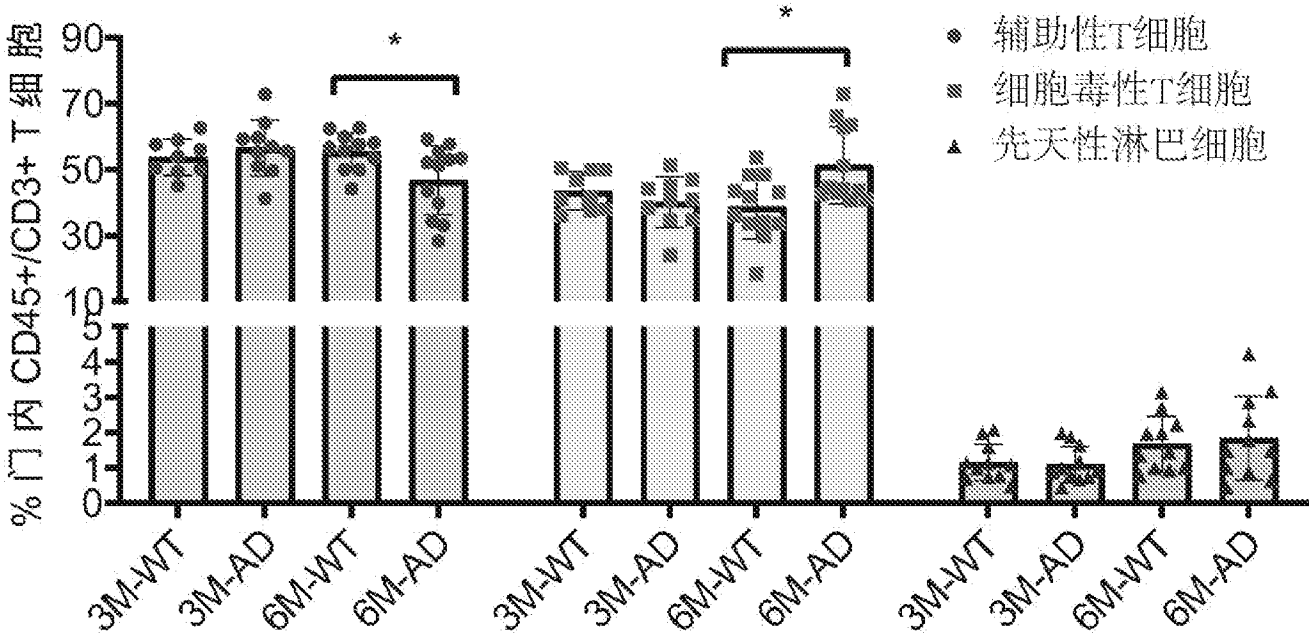


图 2

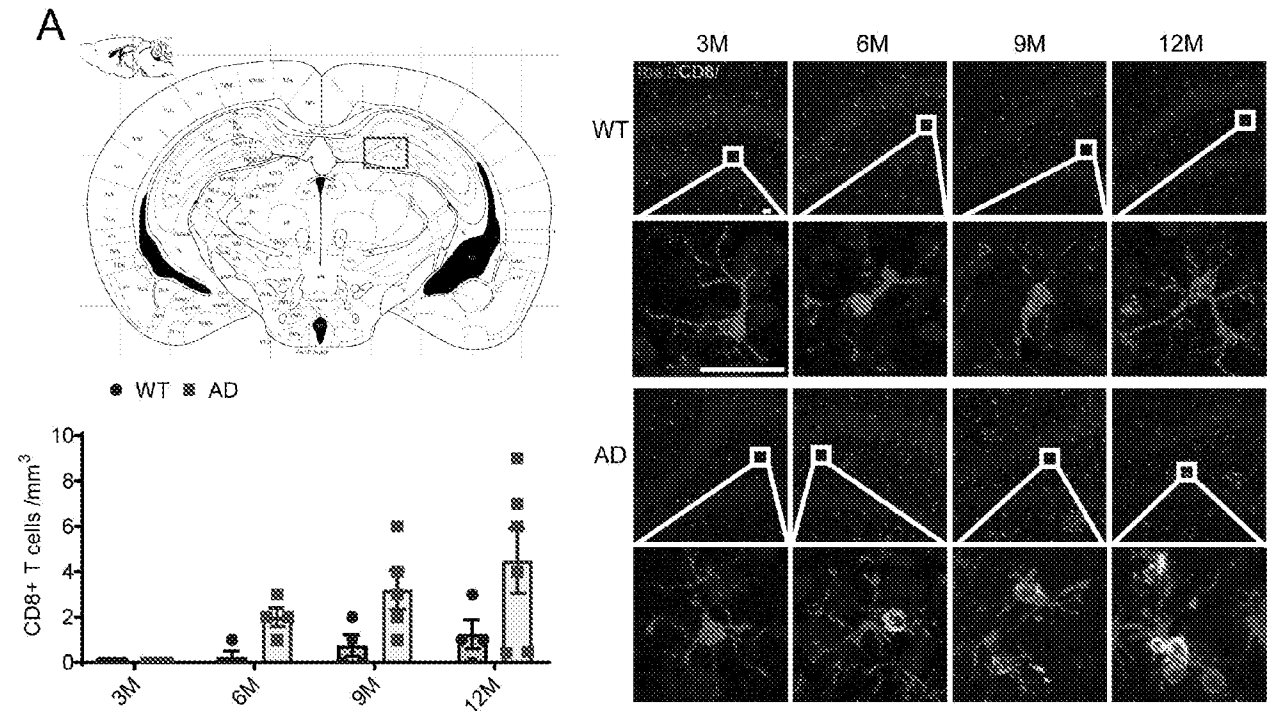


图 3

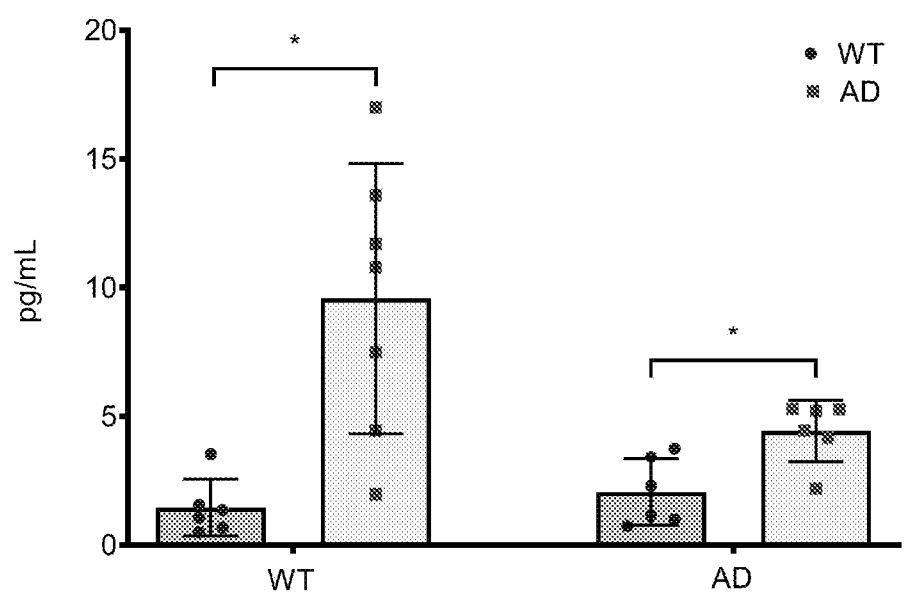


图 4

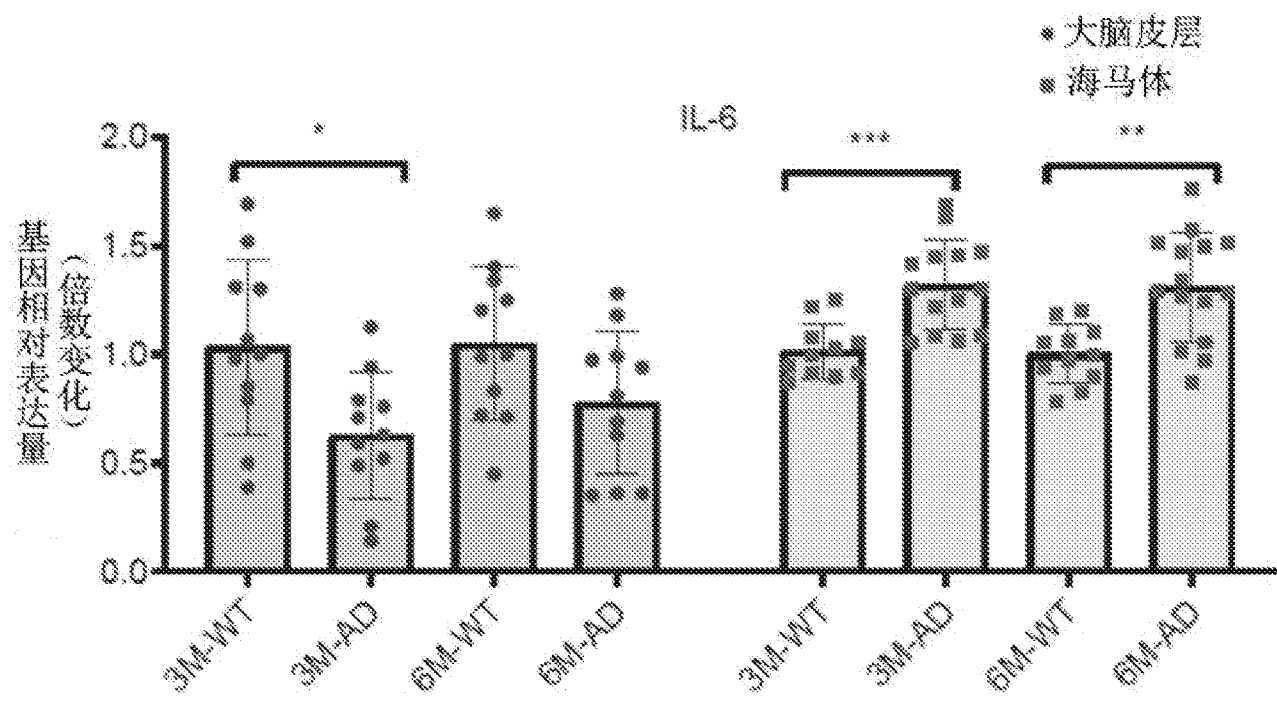


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/087570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/533(2006.01)i; G01N 33/535(2006.01)i; G01N 33/68(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)

G01N

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)

EPONPL; ENTXTC; CNTXT; ENTXT; CJFD; Web of Science: 阿尔茨海默, 白介素-6, CD4 T细胞, CD8 T细胞, nterleukin-6, alzheimer's disease, cd4, cd8

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU, Ya-Ying et al. "Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease." <i>Dement Geriatr Cogn Disord Extra</i> , Vol. 5, No. 3, 24 November 2015 (2015-11-24), abstract	1-20
Y	WU, Ya-Ying et al. "Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease." <i>Dement Geriatr Cogn Disord Extra</i> , Vol. 5, No. 3, 24 November 2015 (2015-11-24), abstract	1-20
X	郭振华等 (GUO, Zhenhua et al.). "老年痴呆患者血清中CD3、CD4、CD8、CD4/CD8水平及其意义的研究 (Non-official translation: Study of CD3, CD4, CD8 and CD4/CD8 levels in the Serum of Alzheimer's Patients and Their Significance)" <i>中风与神经疾病杂志 (Journal of Apoplexy and Nervous Diseases)</i> , Vol. 22, No. 5, 31 October 2005 (2005-10-31), sections 1.2 and 2-3	1-20



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

"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

04 January 2023

Date of mailing of the international search report

11 January 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	郭振华等 (GUO, Zhenhua et al.). "老年痴呆患者血清中CD3、CD4、CD8、CD4/CD8水平及其意义的研究 (Non-official translation: Study of CD3, CD4, CD8 and CD4/CD8 levels in the Serum of Alzheimer's Patients and Their Significance)" <i>中风与神经疾病杂志 (Journal of Apoplexy and Nervous Diseases)</i> , Vol. 22, No. 5, 31 October 2005 (2005-10-31), sections 1.2 and 2-3	1-20
X	林巧 等 (LIN, Qiao et al.). "不同认知功能水平对阿尔茨海默病患者外周血辅助性T细胞表达影响 (Different Levels of Cognition on the Expression of Helper T Cell in Alzheimer Patients)" <i>山西医药杂志 (Shanxi Medical Journal)</i> , Vol. 42, No. 4, 30 April 2013 (2013-04-30), abstract	1-7, 15-20
Y	林巧 等 (LIN, Qiao et al.). "不同认知功能水平对阿尔茨海默病患者外周血辅助性T细胞表达影响 (Different Levels of Cognition on the Expression of Helper T Cell in Alzheimer Patients)" <i>山西医药杂志 (Shanxi Medical Journal)</i> , Vol. 42, No. 4, 30 April 2013 (2013-04-30), abstract	1-7, 15-20
X	US 2020341011 A1 (GOETZL, E. J.) 29 October 2020 (2020-10-29) claims 1 and 6	1-20
Y	US 2020341011 A1 (GOETZL, E. J.) 29 October 2020 (2020-10-29) claims 1 and 6	1-20
X	FANI, Lana et al. "Circulating Biomarkers of Immunity and Inflammation, Risk of Alzheimer's Disease, and Hippocampal Volume: a Mendelian Randomization Study." <i>Translational Psychiatry</i> , Vol. 11, No. 1, 17 May 2021 (2021-05-17), abstract	1-7, 15-20
Y	FANI, Lana et al. "Circulating Biomarkers of Immunity and Inflammation, Risk of Alzheimer's Disease, and Hippocampal Volume: a Mendelian Randomization Study." <i>Translational Psychiatry</i> , Vol. 11, No. 1, 17 May 2021 (2021-05-17), entire document	1-7, 15-20
A	BONOTIS, Konstantinos et al. "Systemic Immune Aberrations in Alzheimer's Disease Patients." <i>J Neuroimmunol</i> , Vol. 193, No. 1-2, 26 November 2007 (2007-11-26), entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/087570

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/087570

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020341011	A1	29 October 2020	WO	2019099950	A1	23 May 2019
				EP	3710031	A1	23 September 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/087570

A. 主题的分类

G01N 33/533(2006.01)i; G01N 33/535(2006.01)i; G01N 33/68(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)

G01N

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))

EPONPL;ENTXTC;CNTXT;ENTXT;CJFD;Web of Science:阿尔茨海默, 白介素-6, CD4 T细胞, CD8 T细胞, nterleukin-6, alzheimer's disease, cd4, cd8

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	WU, Ya-Ying等. "Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease." Dement Geriatr Cogn Disord Extra, 第5卷, 第3期, 2015年11月24日 (2015 - 11 - 24), 摘要	1-20
Y	WU, Ya-Ying等. "Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease." Dement Geriatr Cogn Disord Extra, 第5卷, 第3期, 2015年11月24日 (2015 - 11 - 24), 摘要	1-20
X	郭振华等. "老年痴呆患者血清中CD3、CD4、CD8、CD4/CD8水平及其意义的研究" 中风与神经疾病杂志, 第22卷, 第5期, 2005年10月31日 (2005 - 10 - 31), 第1.2、2-3节	1-20
Y	郭振华等. "老年痴呆患者血清中CD3、CD4、CD8、CD4/CD8水平及其意义的研究" 中风与神经疾病杂志, 第22卷, 第5期, 2005年10月31日 (2005 - 10 - 31), 第1.2、2-3节	1-20

☒ 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

“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

2023年1月4日

国际检索报告邮寄日期

2023年1月11日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

毕秀华

电话号码 (86-10)62085643

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	林巧 等. “不同认知功能水平对阿尔茨海默病患者外周血辅助性T细胞表达影响” 山西医药杂志, 第42卷, 第4期, 2013年4月30日 (2013 - 04 - 30), 摘要	1-7, 15-20
Y	林巧 等. “不同认知功能水平对阿尔茨海默病患者外周血辅助性T细胞表达影响” 山西医药杂志, 第42卷, 第4期, 2013年4月30日 (2013 - 04 - 30), 摘要	1-7, 15-20
X	US 2020341011 A1 (GOETZL EDWARD J) 2020年10月29日 (2020 - 10 - 29) 权利要求1、6	1-20
Y	US 2020341011 A1 (GOETZL EDWARD J) 2020年10月29日 (2020 - 10 - 29) 权利要求1、6	1-20
X	FANI, Lana等. “Circulating Biomarkers of Immunity and Inflammation, Risk of Alzheimer’ s Disease, and Hippocampal Volume: a Mendelian Randomization Study.” Translational Psychiatry, 第11卷, 第1期, 2021年5月17日 (2021 - 05 - 17), 摘要	1-7, 15-20
Y	FANI, Lana等. “Circulating Biomarkers of Immunity and Inflammation, Risk of Alzheimer’ s Disease, and Hippocampal Volume: a Mendelian Randomization Study.” Translational Psychiatry, 第11卷, 第1期, 2021年5月17日 (2021 - 05 - 17), 全文	1-7, 15-20
A	BONOTIS, Konstantinos等. “Systemic Immune Aberrations in Alzheimer’ s Disease Patients.” J Neuroimmunol, 第193卷, 第1-2期, 2007年11月26日 (2007 - 11 - 26), 全文	1-20

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:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际申请号
PCT/CN2022/087570

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)
US	2020341011	A1	2020年10月29日	WO	2019099950	A1	2019年5月23日
				EP	3710031	A1	2020年9月23日