



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201935003 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：107142472

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 28 日

(51)Int. Cl. : G01N33/53 (2006.01)

G01N33/573 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2017/11/29 美國

62/591,879

(71)申請人：美商新生物科技研發公司 (美國) NEW BIOTIC, INC. (US)

美國

(72)發明人：梁 榮盼 LIANG, VICTORIA JUNG-PAN (US)；洪 欣薇 ANG, JOCELYN

SHINWEI (US)；歌谷雅 安德魯 GACUYA, ANDREW CELINO (US)；洪 杉

本 ANG, SAM POON (SG)

(74)代理人：鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：46 項 圖式數：0 共 64 頁

(54)名稱

監測麩醯胺酸合成酶水平的方法

METHOD FOR MONITORING GLUTAMINE SYNTHETASE LEVELS

(57)摘要

本發明關於監測哺乳動物，具體而言是人類個體中腸麩醯胺酸合成酶水平的方法，並且可用於檢測腸麩醯胺酸合成酶缺乏症。該方法基於在施用一預定量的含麩胺酸的蛋白質組合物後，在受控制的禁食及餐後條件下測定該個體中的麩胺酸鹽水平。該方法可用於量化該哺乳動物代謝飲食麩胺酸鹽作為診斷標記物以預測與麩胺酸鹽毒性相關的中樞神經系統(central nervous system, CNS)、精神病，或神經病症的發作或傾向的能力。該方法還可用以設計用於矯正哺乳動物個體中麩醯胺酸合成酶缺乏水平的方案，以治療或預防這樣的病症。該方法及其相應的量化可以使用來自當前實驗室設備、生物測試晶片的數據手動導出，或者可以自動化到醫療設備或實驗室設備中，其具有用於測量並計算輸出顯示量化、診斷範圍或缺乏程度的硬體及軟體。該方法的另一優點為，因為其可檢測麩胺酸鹽毒性，因此可在出現身體症狀之前及早期檢測及預防神經系統疾病的發作。

The present invention relates to a method for monitoring intestinal glutamine synthetase levels in a mammal, particularly in a human subject, and is useful for detecting intestinal glutamine synthetase deficiency. The method is based on determining glutamate levels in the subject under controlled fasting and postprandial conditions after administration of a predetermined quantity of a glutamate containing protein composition. The method is useful for quantifying the ability of the mammal to metabolize dietary glutamate as a diagnostic marker for predicting the onset of or propensity for developing a central nervous system (CNS), psychotic, or neurological disorder, associated with glutamate toxicity. The method is also useful for designing regimens for rectifying glutamine synthetase deficiency levels in a mammal subject in order to treat or prevent such a disorder. This method and its corresponding quantification can be derived manually using data from current laboratory equipment, bio test chips, or it can be automated into a medical device or a laboratory apparatus complete with hardware and software for measurements with computational output showing quantification, diagnostic range or deficiency levels. Another advantage of this method is that

because it detects glutamate toxicity, it can potentially detect and prevent the onset of neurological disease early on, before physical symptoms are manifested.

【發明說明書】

【中文發明名稱】 監測麩醯胺酸合成酶水平的方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR MONITORING GLUTAMINE SYNTHETASE LEVELS

【技術領域】

【0001】 本發明關於監測哺乳動物，特別是人類個體中腸麩醯胺酸合成酶 (glutamine synthetase，GS) 水平的方法，並且可用於檢測腸麩醯胺酸合成酶缺乏症。該方法基於在施用預定量的含麩胺酸鹽的蛋白質組合物後，在受控制的禁食及餐後條件下測定該個體中的麩胺酸鹽水平。該方法可用於量化該哺乳動物代謝飲食麩胺酸鹽作為診斷標記物的能力，以預測與麩胺酸鹽毒性相關的中樞神經系統 (central nervous system，CNS)、精神病，或神經病症的發作或傾向。該方法還可用於設計用於矯正哺乳動物個體中麩醯胺酸合成酶缺乏水平的方案，以治療或預防這種病症。該方法及其相應的量化可以使用來自當前實驗室設備、生物測試晶片的數據手動導出，或者可以自動化到醫療設備或實驗室設備中，其具有用於測量並計算輸出顯示量化、診斷範圍或缺乏程度的硬體及軟體。該方法的另一個優點是，因為它可以檢測麩胺酸鹽毒性，所以它可以在出現身體症狀之前及早檢測及預防神經系統疾病的發作。

【先前技術】

【0002】 對於許多疾病，例如癌症、腫瘤、肝臟、腎臟、血液或遺傳性疾病，有不同的生物標記物及血液測試來確認診斷。然而，沒有精確的生物標記

物或單一可靠的血液測試可用於正確診斷廣泛的神經及精神疾病。在例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)或帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)的疾病的情況下，通常需要許多醫學檢驗及測試來診斷患者是否患有這些病症。診斷過程可包括身體檢查、血液檢查及成像程序，例如磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)。排除其他條件及錯誤診斷是重要的。從首次觀察症狀開始，診斷過程通常需要9-12個月。沒有可以積極診斷這些病症的血液檢查，也沒有一種有效的方法來監測特定治療的療效。對於快速發展的致命疾病，如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)，診斷後的中位生存時間約為31.8個月，一確定該疾病的確定生物標記物或血液檢測可能提供早期干預的可能性，進而挽救生命。

【0003】一些研究顯示，患有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)的患者(Andreaou等人，2008年)、阿茲海默症(Miulli、Norwell，以及Schwartz，1993年)、帕金森氏症(Iwasaki、Ikeda、Shojima，以及Kinoshita，1992年)，以及多發性硬化症(Westall、Hawkins、Ellison，以及Myers，1980年)與健康對照組患者相比，其血漿中的麩胺酸鹽(即，麩胺酸)水平增加，表示麩胺酸代謝的系統性缺乏是該疾病的潛在原因。長期以來人們一直懷疑麩胺酸鹽的全身缺乏代謝是肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)的主要原因(Plaitakis以及Caroscio，1987年)。與高水平麩胺酸鹽誘導的毒性相關的其他神經系統疾病包括：自閉症(Shimmura等人，2011年)、精神分裂症(Ivanovaa、Boykoa、Yu、Krotenkoa、Semkea，以及Bokhana，2014年)，癲癇(Rainesalo、Keränen、Palmio、Peltola、Oja，以及Saransaari，2004年)，阿茲海默症(Miulli、Norwell，以及Schwartz，1993年)，以及精神病(Ivanovaa、Boykoa、Yu、Krotenkoa、Semkea，以及Bokhana，2014年)。此外，在大鼠中風

模型中使用功能性磁共振成像，Campos及其同事顯示出，血漿麩胺酸鹽清除劑降低血漿麩胺酸鹽水平與大腦中麩胺酸鹽的顯著降低相關，並與神經學方面的改善相關(Campos等人，2011年)。Leibowitz及其同事進行的一項類似研究證實，血液麩胺酸鹽濃度降低與神經功能改善有關(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。

【0004】 麩胺酸鹽是人體中樞神經系統的主要神經傳導物質，為體內最豐富的胺基酸之一。該胺基酸佔大腦中總神經傳導物質活性的約90%。麩胺酸鹽的有益作用在很大程度上取決於嚴格的體內平衡，透過將腦細胞外液(extracellular fluid，ECF)中的麩胺酸鹽濃度維持在0.3-2 $\mu\text{M/L}$ 的正常範圍內(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。動物模型及人體臨床研究揭示了病理性升高的細胞外液(ECF)麩胺酸鹽水平與數種急性和慢性神經退化性疾病的關聯，包括中風、創傷性腦損傷(traumatic brain injury，TBI)、腦內出血、腦缺氧、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)(Andreaou等人，2008年)、老年癡呆症等。這些疾病的特徵在於，由於血腦屏障(blood brain barrier，BBB)的破壞促進了腦細胞外液(ECF)中麩胺酸鹽濃度的數百倍升高，進而使得麩胺酸鹽沿著其濃度梯度在血漿及腦細胞外液之間自由移動。(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。

【0005】 因此，在我們尋找神經疾病的有效生物標記物的嘗試中，我們試圖間接測量腸道中麩醯胺酸合成酶(GS)的活性。我們提出的生物標記物測量在攝取預定量的膳食麩胺酸鹽之前與之後的血清麩胺酸鹽水平。透過測量在攝取膳食麩胺酸鹽之前及之後的血清麩胺酸鹽，可以量化腸麩醯胺酸合成酶(GS)活性的效率，因為麩醯胺酸合成酶(GS)是唯一可以執行該功能的酶。

【0006】 我們認為腸麩醯胺酸合成酶(GS)活性甚至比血清麩醯胺酸合成酶(GS)水平更能指示疾病發作，因為它是升高的血清麩胺酸鹽水平，這是腸道中麩醯胺酸合成酶(GS)活性缺乏的結果，最終導致麩胺酸鹽毒性及其相關的神經及精神疾病。該方法可靠、可重複且有效，因為它允許我們透過簡單地計算麩醯胺酸合成酶(GS)的活性來繞過尚未被理解的生物複雜性。

【0007】 可以看出，升高的血清麩胺酸鹽水平及將膳食麩胺酸鹽代謝為麩醯胺酸的能力受損存在潛在的嚴重健康問題。因此，從上述文獻中顯而易見的是，迫切需要開發可靠的診斷方法以量化人類個體中飲食攝取的麩胺酸鹽代謝的有效性，以預測許多上述神經疾病狀態的發作或進展。此外，這種診斷方法將提供設計有效治療方案及監測治療功效的手段。該方法的另一個優點是，因為它可以檢測麩胺酸鹽毒性，它可以在早期，甚至在20歲時檢測並預防神經系統疾病的發作。

【發明內容】

【0008】 在本發明中，我們開發了一種量化及監測麩胺酸鹽代謝效率的方法，作為生物標記物來測量麩醯胺酸合成酶缺乏以追蹤各種神經病症的進展，或預測其發作或嚴重程度。這些病症包括，但不限於，肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、帕金森氏症、阿茲海默症、多發性硬化症、癡呆、周邊神經病變、不寧腿症候群，以及與麩胺酸鹽毒性相關的一系列其他精神病及相關病症，如焦慮症、自閉症、強迫症(obsessive compulsive disorder, OCD)、重度憂鬱症，躁鬱症，以及精神分裂症。本發明透過在兩個不同時間點監測一人類患者的麩胺酸鹽水平來實現，以在受控方案下獲得禁食及餐後血清麩胺酸鹽水平，該方案包

括禁食，然後攝取一預定的、標準化的含高麩胺酸鹽的液體膳食或懸浮液。因此，該方法提供了監測腸麩醯胺酸合成酶活性的方法，具體而言是鑑定降低的活性，其可以透過不能將麩胺酸鹽適當地代謝為麩醯胺酸來指示麩胺酸鹽毒性的風險。

【0009】於另一具體實施例中，本發明關於在兩個或更多個選定時間點監測人類個體中腸麩醯胺酸合成酶活性之方法，包含以下步驟：

- (a) 使該患者禁食(水除外)至少約12小時；
- (b) 透過靜脈穿刺從該患者體內取出第一(禁食)血液樣品；
- (c) 將該第一血液樣品轉移至第一容器，可視需要地含有在約0°C至約5°C之間預冷的抗凝血劑；
- (d) 口服給予該患者含有相當於約5至約15克的麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液；
- (e) 在給予步驟(d)的水溶液或懸浮液後約15分鐘至約90分鐘，透過靜脈穿刺從該患者體內取出第二(餐後)血液樣品；
- (f) 將該第二血液樣品轉移至一第二容器，可視需要地含有在約0°C至約5°C之間預冷的抗凝血劑；
- (g) 將各該第一及第二血液樣品離心以從該血液樣品中的血小板中分離血清，以提供第一(禁食)血清樣品及第二(餐後)血清樣品；
- (h) 透過向每個該血清樣品中加入去蛋白劑，對各該第一血清樣品及該第二血清樣品進行去蛋白處理；
- (i) 將來自步驟(h)的每個該血清樣品離心，以從該樣品中的該血清中分離蛋白質，以提供第一(禁食)無蛋白質血清樣品及第二(餐後)無蛋白質血清樣品；

(j) 分析該第一及第二無蛋白質血清樣品以確定每個樣品的血清麩胺酸鹽水平；以及

(k) 比較來自步驟(j)的血清麩胺酸鹽水平以間接確定該患者的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【0010】 本發明亦關於一種監測人類個體中腸麩醯胺酸合成酶活性之方法，包含以下步驟：

- (i) 提供第一(禁食)血液樣品，其在禁食狀態的第一時間點從該個體獲得，其中該個體較佳地除了水之外禁食至少約12小時的時間；
- (ii) 提供第二(餐後)血液樣品，其在對在步驟(i)的該禁食狀態中的該個體口服給予包含相當於約5至約15克的麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液後約15分鐘至約90分鐘的第二時間點從該個體獲得；
- (iii) 將該第一血液樣品轉移至第一容器，可視需要地含有在約0°C至約5°C之間預冷的抗凝血劑；
- (iv) 將該第二血液樣品轉移至第二容器，可視需要地含有在約0°C至約5°C之間預冷的抗凝血劑；
- (v) 將各該第一及第二血液樣品離心以從該血液樣品中的血小板中分離血清，以提供第一(禁食)血清樣品及第二(餐後)血清樣品；
- (vi) 透過向每個該血清樣品中加入去蛋白劑，對該第一血清樣品及該第二血清樣品進行去蛋白處理；
- (vii) 將來自步驟(vi)的每個該血清樣品離心，以從該樣品中的該血清中分離蛋白質，以提供第一(禁食)無蛋白質血清樣品及第二(餐後)無蛋白質血清樣品；

(viii) 分析該第一及第二無蛋白質血清樣品以確定每個樣品的血清麩胺酸鹽水平；以及

(ix) 比較來自步驟(viii)的血清麩胺酸鹽水平以間接確定該患者的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【0011】 於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(k)或(ix)中，根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平之間的差異確定該患者的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【0012】 於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(k)或(ix)中，根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平的比例確定該患者的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【0013】 於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(k)或(ix)中，透過(A)確定在該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與在該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異，(B)從步驟(A)的結果中減去 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，以及(C)將步驟(B)的結果除以一樣品群的近似最大血清麩胺酸鹽水平，以將該患者的腸麩醯胺酸合成酶活性確定為一腸麩醯胺酸合成酶缺乏的比率。應該注意的是，一樣品群的最大血清麩胺酸鹽水平可以變化。超過 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以及超過 $150\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的值都是可能的。這樣的值可以為 $157\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

【0014】 於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，包含該步驟(k)還包括步驟(D)：將步驟(k)的步驟(C)之結果乘以100，以獲得腸麩醯胺酸合成酶缺乏的百分比。

【0015】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該水溶液或懸浮液包含相當於基於該患者重量的約70 mg/kg至約225mg/kg的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【0016】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該水溶液或懸浮液包含相當於約10克的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【0017】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該水溶液或懸浮液包含相當於基於該患者重量的約150 mg/kg的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【0018】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該水性懸浮液或溶液為可消化蛋白的水溶液或懸浮液。

【0019】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該可消化蛋白的水性懸浮液或溶液基本上不含麩醯胺酸。

【0020】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該水性懸浮液或溶液為乳清蛋白的溶液或懸浮液。

【0021】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該乳清蛋白的水性懸浮液或溶液基本上不含麩醯胺酸。

【0022】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該水性懸浮液或溶液包含約75克[較佳約50克]的懸浮或溶解在約200至約250 ml水或果汁中的乳清蛋白。

【0023】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(d)或(ii)中，該果汁為蘋果汁。

【0024】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(e)或(ii)中的時間為約60分鐘。

【0025】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(b)或(i)中，該第一(禁食)血液樣品具有約1至約10 ml的體積，且其中在步驟(e)或(ii)中，該第二(餐後)血液樣品具有約1至約10 ml的體積。

【0026】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(b)或(i)中，該第一(禁食)血液樣品具有約5 ml的體積，且其中在步驟(e)或(ii)中，該第二(餐後)血液樣品具有約5 ml的體積。

【0027】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(c)或(iii)中的該抗凝血劑和步驟(f)或(iv)中的該抗凝血劑選自EDTA (乙二胺四乙酸)、肝素鈣、檸檬酸鈉，以及肝素鈉。

【0028】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(c)或(iii)中的該抗凝血劑和步驟(f)或(iv)中的該抗凝血劑為EDTA (乙二胺四乙酸)。

【0029】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(g)或(v)中，該離心為各自對該第一血液樣品和該第二血液樣品在約0°C至約5°C下以約17,000 ×g進行約10分鐘。

【0030】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(h)或(vi)中，該去蛋白劑選自高氯酸、三氯乙酸，以及鎢酸。

【0031】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(h)或(vi)中，該去蛋白劑為高氯酸。

【0032】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(h)或(vi)中，該去蛋白劑為具有濃度為約0.2 N至約0.4 N且體積為約5 ml的高氯酸。

【0033】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(i)或(vii)中，該離心為各自對該第一血液樣品和該第二血液樣品在約0°C至約5°C下以約19,000 ×g進行約10分鐘。

【0034】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(i)或(viii)中的該分析透過酵素連結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)進行。

【0035】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，包含進一步的步驟(1)：如果該第二樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性與該第一樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性之間的差異大於一預定值，治療該人類個體的腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或一與其相關的疾病或預防這種疾病的進展。

【0036】本發明還關於一種方法，包含如果該第二樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性與該第一樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性之間的差異大於預定值，則診斷該個體具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與之相關的疾病或其進展的風險。

【0037】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，包含進一步的步驟(1)：如果該第二樣品中的血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中的血清麩胺酸鹽水平之間的差異大於預定值，則治療該人類個體的腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或與之相關的疾病或預防這種疾病的進展。

【0038】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中該預定值為60 μmol/L的血清麩胺酸鹽。

【0039】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中該預定值為30 $\mu\text{mol/L}$ 的血清麩胺酸鹽。

【0040】本發明還關於一種方法，該方法包含如果該第二樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性與該第一樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性之間的差異大於預定值，則診斷該個體具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有或處於與其相關的疾病或其進展的風險。

【0041】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，包含進一步的步驟(1)：如果該腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比大於預定值，則治療該人類個體的腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或與其相關的疾病，或預防這樣的疾病的進展。

【0042】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中該預定值為19.11%。

【0043】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中在步驟(1)中，治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或與其相關的疾病或預防這種疾病進展的方法是透過在該患者中增加該腸道麩醯胺酸合成酶活性。

【0044】本發明還關於一種能夠增加腸麩醯胺酸合成酶活性的試劑在製備用於在有需要的個體體內治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或與其相關的疾病或預防該疾病進展之藥物的用途。於某些具體實施例中，該試劑為益生菌，用於調節該個體小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。於某些具體實施例中，該試劑為具有一益生質的益生菌，以

調節該個體的小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。於某些具體實施例中，該試劑用於口服給藥。

【0045】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(1)中的治療方法包含向該患者施用麩醯胺酸合成酶。

【0046】本發明還關於一種麩醯胺酸合成酶在製備用於在有需要的個體內治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展之藥物的用途。

【0047】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(1)中的方法包含口服施用益生菌以調節該患者的小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【0048】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中步驟(1)中的方法包含口服施用具有益生質的益生菌以調節該患者的小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【0049】於另一具體實施例中，本發明關於治療中樞神經系統或精神病之方法。

【0050】於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其中該神經病學或精神病學病症選自阿茲海默症、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、自閉症、腦萎縮、癡呆、癲癇、重度憂鬱症、多發性硬化症、強迫症、帕金森氏症、周邊神經病變、不寧腿症候群、精神分裂症、僵體症候群，以及中風。於另一具體實施例中，本發明關於一種方法，其使用硬體、生物晶片、微米及奈米陣列技術或等同物，或與化學或放射性同位素標記技術組合，用於血清麩胺酸鹽水平的自動

測量，並且以硬體及軟體完成測量及計算輸出顯示腸麩醯胺酸合成酶缺乏水平的量化、診斷範圍。

【0051】於另一具體實施例中，本發明關於一種用於診斷血清中麩胺酸鹽水平的醫療設備或裝置，包含使用硬體、生物晶片、微米及奈米陣列技術或等同物或與化學或放射性同位素組合，並且以硬體及軟體完成測量及計算輸出顯示腸麩醯胺酸合成酶缺乏水平的量化、診斷範圍。

【0052】於另一方面，本發明關於一種用於實施如本文所述之方法的套組，包含能夠特異性檢測該樣品中麩胺酸鹽的試劑，以及用於實施該方法的說明書。

【0053】於另一方面，本發明關於一種生物標記物在製造套組的用途，其中該生物標記物為來自個體的血液樣品中的麩胺酸鹽，該套組有助於量化腸麩醯胺酸合成酶活性，包含在第一時間點從處於禁食狀態的該個體獲得第一(禁食)血液樣品；在對該處於禁食狀態下的個體口服給予含有相當於約5至約15克的麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液後約15分鐘至約90分鐘的第二時間點從該個體獲得第二(餐後)血液樣品；分析該樣品以獲得禁食和餐後血清麩胺酸鹽水平；以及比較該水平以確定該腸麩醯胺酸合成酶活性。

【0054】於另一方面，本發明關於一種生物標記物在製造套組的用途，其中

根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平之間的差異確定該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性；

根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平的比例確定該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性；或者

透過(A)確定在該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與在該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異，(B)從步驟(A)的結果中減去30 $\mu\text{mol/L}$ ，(C)將步驟(B)的結果除以樣品群的近似最大血清麩胺酸鹽水平(定義為該餐後血清麩胺酸鹽水平減去該禁食血清麩胺酸鹽水平的差異)，以及可視需要地(D)將步驟(C)的結果乘以100以獲得腸麩醯胺酸合成酶缺乏的百分比，以將該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性確定為腸麩醯胺酸合成酶缺乏的比率。

【0055】 於另一方面，本發明關於一種生物標記物在製造套組的用途，其中

該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異大於30 $\mu\text{mol/L}$ 的血清麩胺酸鹽，表示腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或一異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與之相關的疾病或其進展的風險，或

腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比大於19.11%，表示腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或一異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與之相關的疾病或其進展的風險。

【0056】 於另一方面，本發明關於一種醫藥組合物，用於在有需要的個體中治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展，包含能夠增加該個體腸麩醯胺酸合成酶活性的試劑以及醫藥上可接受的載體。

【0057】 於另一方面，本發明關於一種醫藥組合物，其中該試劑為益生菌，用以調節該個體小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【0058】 於另一方面，本發明關於一種醫藥組合物，其中該試劑為具有益生質的益生菌，用以調節該個體的小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【0059】於另一方面，本發明關於一種醫藥組合物，用於治療在有需要的個體中腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展，包含麩醯胺酸合成酶以及醫藥上可接受的載體。

定義

【0060】如本文所用，除非明確相反地陳述，否則以下術語具有所指示的含義。

【0061】「個體」乙詞意指需要診斷或治療或對疾病或病症進行干涉或預後的人類個體或患者或動物，該疾病或病症例如疼痛或瘙癢，特別是神經性疼痛或瘙癢。

【0062】「治療有效的」乙詞意指對需要治療的個體，例如人類患者或動物，提供醫學從業者理解為有意義或可證明益處所需的治療劑的量。

【0063】本文所用的「治療(動詞)」、「治療(動名詞)」或「治療(名詞)」等詞包括減輕、減弱或改善病症，例如，升高的血清麩胺酸鹽水平或相關的中樞神經系統狀況，或預防或減少感染病症或表現出症狀的風險，改善或預防症狀的根本原因，抑制病情，遏制病情的發展，緩解病情，導致病情消退，或預防性及/或治療性地停止該病症的症狀。

【0064】如本文所用，「約」或「近似」等詞係指本領域普通技術人員將理解的可接受偏差的程度，其可在一定程度上變化，這取決於其所用的上下文。通常，「約」或「近似」可以表示在引用值附近具有 $\pm 5\%$ 範圍的數值。

【0065】根據本發明，麩胺酸鹽，具體而言是血液樣品中的麩胺酸鹽水平可以用作標記物，用於定量/測量腸麩醯胺酸合成酶活性及/或用於診斷腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高的血清麩胺酸鹽或與其相關的疾病或其進展的發

生或風險。如本文所用，生物學標記物(或稱為生物標記物或標記物)具有客觀測量和評價的特徵，作為正常或異常生物過程/條件、疾病、致病過程，或對治療或治療干涉的反應的指示。標記物可包括存在或不存在指示特定生物過程/條件的特徵或模式或特徵的集合。標記物通常用於診斷及/或預後的目的。然而，它可以用於治療、監測、藥物篩選以及本文所述的其他目的，包括評估癌症治療劑的有效性。

【0066】 本文使用的「診斷」通常包括確定個體是否可能受給定疾病、病症或功能障礙的影響。技術人員通常基於一種或多種診斷指標進行診斷，該診斷指標即為標記物，其存在、不存在或其量指示疾病、病症或功能障礙的存在或不存在。

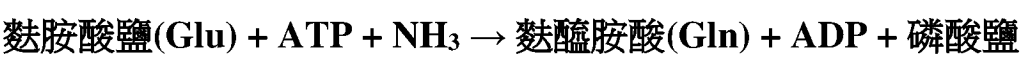
【0067】 如本文所用的「預後」通常係指對臨床病症或疾病的可能過程和結果的預測。通常透過評估指示對疾病的有利或不利的過程或結果的疾病的因素或症狀來進行患者的預後。應當理解的是，「預後」乙詞不一定是指以100%準確度預測病症的過程或結果的能力。相反地，技術人員將理解「預後」乙詞係指某一過程或結果將發生的概率增加；亦即，當與沒有表現出該病症的個體相比時，在表現出給定病症的患者中更可能發生過程或結果。

【0068】 如本文所用，「異常升高」水平可以指與參考或對照水平相比增加的水平。例如，異常升高的水平可能高於一參考或對照水平超過10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%，或2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍或更多。參考或對照水平可以指在未患病的正常個體中測量的水平。

【0069】 如本文所用，被描述為「基本上不含」一物質的材料包括小於5% (w/w)、小於4%、小於3% (w/w)、小於2% (w/w)、小於1% (w/w)或一無法檢測量的該物質。

【實施方式】

【0070】 在人體及大多數哺乳動物中，麩胺酸鹽被代謝為麩醯胺酸。麩醯胺酸合成酶(GS)催化麩胺酸鹽和氨縮合形成麩醯胺酸，如下列反應所示：



【0071】 如果小腸中的麩醯胺酸合成酶(GS)不足，則只有一部分麩胺酸鹽(Glu)會轉化為麩醯胺酸(Gln)。參閱表1。

表 1			
膳食麩胺酸鹽	在小腸中的麩醯胺酸合成酶(GS)活性	血清 麩 醯 胺 酸 (Gln)	血清 麩 胺 酸 鹽 (Glu)
每餐 10-15 克	100% 麩醯胺酸合成酶(GS)活性	血清 麩 醯 胺 酸 (Gln)增加	血清 麩 胺 酸 鹽 (Glu)無增加
每餐 10-15 克	0% 麩醯胺酸合成酶(GS)活性	血清 麩 醯 胺 酸 (Gln)無增加	血清 麩 胺 酸 鹽 (Glu)增加
每餐 10-15 克	部分麩醯胺酸合成酶(GS)活性	血清 麩 醯 胺 酸 (Gln)部分增加(例如，X%)	血清 麩 胺 酸 鹽 (Glu)部分增加(例如，1-X%)

【0072】 基於此，我們測量禁食12小時後的血清麩胺酸鹽水平，並從餐後血清麩胺酸鹽水平中減去(攝取麩胺酸鹽液體飲食後1至1.5小時，以確定麩醯胺酸合成酶(GS)酶將麩胺酸鹽轉化為麩醯胺酸的效率)。然後將該結果除以從一群健康個體觀察到的餐後及禁食血清麩胺酸鹽基線的差異。對於通常在健康個體中觀察到的殘留或基線血清麩胺酸鹽水平，我們將30 μM/L的因子應用於以下的表達中。

$$\frac{(Glu_{pp} - Glu_f) - 30}{Max(Glu_{pp} - Glu_f) - 30} \times 100\% = \% GS \text{ 缺乏}$$

【0073】 以上剛出現的等式用於確定麩醯胺酸合成酶缺乏的百分比，其中 Glu係指血清麩胺酸鹽，f係指禁食狀態，pp係指餐後狀態，GS係指麩醯胺酸合成酶。

【0074】 上述等式使用個體測量的血清麩胺酸鹽水平來量化麩胺酸鹽轉化為麩醯胺酸的缺乏，並因此量化麩醯胺酸合成酶的缺乏。在臨床試驗條件下攝取標準量的純麩胺酸鹽後，從個體的餐後血清麩胺酸鹽水平中減去禁食時的血清麩胺酸鹽水平。然後減去30 μM/L以抵消由純麩胺酸鹽的消耗所預期的麩胺酸鹽的增加。然後將這些值的差異與數據庫中觀察到的最嚴重的情況進行比較。這透過將數值之間的差除以該個體的餐後及禁食麩胺酸鹽水平之間的差異來完成，該個體具有在該個體庫內的該測量的最高值，在這種情況下為187 μM/L。然後，再次減去30 μM/L以抵消麩胺酸鹽的預期增加。在一健康個體中，透過麩醯胺酸合成酶將麩胺酸鹽代謝為麩醯胺酸應該導致小於或等於30 μM/L的值，具有標準差。因此，在上述模型中增加的條件為，麩醯胺酸合成酶缺乏的計算百分比應該被強制為0%以表示沒有缺乏。

【0075】 我們對患有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)的個體的臨床觀察顯示，在我們的模型中，計算的麩醯胺酸合成酶缺乏百分比為陽性百分比，亦即缺乏。由於將該個體的得分與餐後及禁食麩胺酸鹽水平之間的差異最大的個體進行比較，因此可以計算出從0到100%的麩胺酸鹽合成酶缺乏的精確數量。這顯示測試過程中攝取的麩胺酸鹽沒有轉化為麩醯胺酸，這表示缺乏麩醯胺酸合成酶進行這種轉化。

【0076】 透過該模型得分為0%表示該個體是健康的且沒有麩胺酸合成酶缺乏。如果他們的餐後及禁食麩胺酸鹽水平之間的差異小於或等於30 $\mu\text{M/L}$ ，則表示他們的身體可以在收集兩個樣品之間的時間內成功且有效地將食用的麩胺酸鹽代謝成麩醯胺酸。

【0077】 只有兩個麩胺酸鹽水平之間的差異記錄最高的個體才能達到100%的分數，因此被直接用於該公式中。如果需要具有比當前個體更高的計算差異的新個體，則將更新此數值以反映更新及擴展的數據庫。

【0078】 Nakagawa及其同事發現，在健康個體中，平均70公斤的人類食用14.5克膳食麩胺酸鹽後，禁食血清麩胺酸鹽及餐後血清麩胺酸鹽水平之間的差異在 $33 \pm 16 \mu\text{mol/L}$ 至 $63 \pm 34 \mu\text{mol/L}$ 的範圍內 (Nakagawa、Takahashi，以及Suzuki，1960年)。健康個體中的血清麩胺酸鹽差異與之前的研究結果一致，與含有207 mg/kg總麩胺酸鹽的高蛋白膳食後禁食水平相比，血漿麩胺酸鹽峰值水平增加約2倍(參閱，Stegink，L.D.等人，Factors Affecting Plasma Glutamate Levels in Normal Adults Subjects，第333-351頁，第345頁，於Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology，L.J. Filer, Jr.等人編輯，Raven出版社，紐約1979年)。相較之下，在表現出與麩胺酸鹽毒性相關的神經病症的人類個體中觀察到的差異異常地大，例如，271至340.4 $\mu\text{mol/L}$ (參見實施例部分)。我們還顯示了，對於治療後症狀改善的患者，禁食血清麩胺酸鹽與餐後血清麩胺酸鹽水平皆下降，與神經病症的嚴重程度減輕或消退相符。

【0079】 此外，先前已發現血漿麩胺酸鹽水平與膳食系統中攝取的麩胺酸鹽相關。參閱，Stegink，L.D.等人，1979年。例如，各種高蛋白質食物，如奶油布丁、漢堡，以及奶昔，含有相對高水平的麩胺酸鹽。下表A提供了Stegink等人

的數據，以g/kg計算蛋白質的攝取以及以mg/kg計算麩胺酸鹽(對於普通成人)以及所觀察到的禁食血漿麩胺酸鹽水平(μm/dl)、血漿麩胺酸鹽水平(μm/dl)的峰值及範圍。如條目中所示，如果減去峰值 - 禁食值，即6.3減去3.3或7.1減去4.1，則留下3.0 μm/dl的數值，當乘以10時得到30 μm/l的數值。

表 A						
				血漿麩胺酸鹽水平(μm/dl)		
餐食	蛋白質攝取 (g/kg)	添加的麩胺酸鈉 (MSG) (mg/kg)	總麩胺酸鹽 (mg/kg)	禁食 ^a	峰值 ^a	範圍 ^b
奶油布丁 (成人)	1.0	0	207	3.3 ± 1.6	6.3 ± 3.4	3 - 12
漢堡-奶昔	1.0	0	171	4.1 ± 1.8	7.1 ± 3.9	4 - 15

N = 6，^a 平均值 ± 標準差，^b 峰值

【0080】對於許多疾病，例如癌症、腫瘤、肝臟、腎臟、血液或遺傳性疾病，有不同的生物標記物及血液測試來確認診斷。然而，沒有精確的生物標記物或單一可靠的血液測試可用於正確診斷廣泛的神經及精神疾病。在例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis，ALS)或帕金森氏症的疾病的情況下，通常需要許多醫學檢驗及測試來診斷一患者是否患有這些病症。診斷過程可包括身體檢查、血液檢查及成像程序，例如磁共振成像(magnetic resonance imaging，MRI)。排除其他條件及錯誤診斷是重要的。從首次觀察症狀開始，診斷過程通常需要9-12個月。沒有可以積極診斷這些病症的血液檢查，也沒有一種有效的方法來監測特定治療的療效。對於快速發展的致命疾病，如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)，診斷後的中位生存時間約為31.8個月，一確

定該疾病的確定生物標記物或血液檢測可能提供早期干預的可能性，進而挽救生命。

【0081】 一些研究顯示，患有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)的患者 (Andreaou等人，2008年)、阿茲海默症(Miulli、Norwell，以及Schwartz，1993年)、帕金森氏症(Iwasaki、Ikeda、Shojima，以及Kinoshita，1992年)，以及多發性硬化症(Westall、Hawkins、Ellison，以及Myers，1980年)與健康對照組患者相比，其血漿中的麩胺酸鹽水平增加，表示麩胺酸代謝的系統性缺乏是該疾病的潛在原因。長期以來人們一直懷疑麩胺酸鹽的全身缺乏代謝是肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)的主要原因(Plaitakis以及Caroscio，1987年)。與高水平麩胺酸鹽誘導的毒性相關的其他神經系統疾病包括：自閉症(Shimmura等人，2011年)、精神分裂症(Ivanovaa、Boykoa、Yu、Krotenkoa、Semkea，以及Bokhana，2014年)，癲癇(Rainesalo、Keränen、Palmio、Peltola、Oja，以及Saransaari，2004年)，阿茲海默症(Miulli、Norwell，以及Schwartz，1993年)，以及精神病(Ivanovaa、Boykoa、Yu、Krotenkoa、Semkea，以及Bokhana，2014年)。此外，在大鼠中風模型中使用功能性磁共振成像，Campos及其同事顯示出，血漿麩胺酸鹽清除劑降低血漿麩胺酸鹽水平與大腦中麩胺酸鹽的顯著降低相關，並與神經學方面的改善相關(Campos等人，2011年)。Leibowitz及其同事進行的一項類似研究證實，血液麩胺酸鹽濃度降低與神經功能改善有關(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。

【0082】 麩胺酸鹽是人體中樞神經系統的主要神經傳導物質，為體內最豐富的胺基酸之一。該胺基酸佔大腦中總神經傳導物質活性的約90%。麩胺酸鹽的有益作用在很大程度上取決於嚴格的體內平衡，透過將腦細胞外液(extracellular

fluid，ECF)中的麩胺酸鹽濃度維持在0.3-2 $\mu\text{M/L}$ 的正常範圍內(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。動物模型及人體臨床研究揭示了病理性升高的細胞外液(ECF)麩胺酸鹽水平與數種急性和慢性神經退化性疾病的關聯，包括中風、創傷性腦損傷(traumatic brain injury，TBI)、腦內出血、腦缺氧、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)(Andreaou等人，2008年)、老年癡呆症等。這些疾病的特徵在於，由於血腦屏障(blood brain barrier，BBB)的破壞促進了腦細胞外液(ECF)中麩胺酸鹽濃度的數百倍升高，進而使得麩胺酸鹽沿著其濃度梯度在血漿及腦細胞外液之間自由移動。(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。

【0083】血腦屏障(BBB)是由內皮細胞、外被細胞以及星狀神經膠細胞的相互作用網絡所形成。內皮細胞形成血管內層並透過緊密連接彼此結合，而外被細胞包裹內皮細胞並幫助維持血腦屏障(BBB)的體內平衡及止血。最後，星狀神經膠細胞覆蓋外被細胞並透過生長因子的分泌維持緊密連接的不可侵犯性。除了保持緊密連接外，這些生長因子還促進酶系統及轉運蛋白的極化，包括麩胺酸鹽轉運蛋白。沿著血腦屏障(BBB)的星狀神經膠細胞也透過其末端的各種蛋白質及離子轉運蛋白調節血腦屏障(BBB)的離子濃度及星狀神經膠細胞極化，例如葡萄糖受體及鉀離子(K^+)通道(Cabezas等人，2014年)。曾經被認為存在於神經元而非星狀神經膠細胞中，星狀神經膠細胞末端已被證實含有N-甲基-D-天門冬酸(N-methyl-D-aspartate，NMDA)受體以及 α -胺基-3-羥基-5-甲基-4-異噁唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid，AMPA)受體(Dzamba、Honsa，以及Anderova，2013年)。

【0084】 AMPA受體(AMPA)與NMDA受體(NMDAR)都是離子型跨膜受體，其具有麩胺酸鹽的激動劑結合位點。一旦麩胺酸鹽與AMPA受體(AMPA)結合，受體就被活化並打開可滲透鈉與鉀的離子通道。在神經元中，如果有足夠的麩胺酸鹽活化受體足夠長的時間，鈉與鉀的流入將足以使神經元內部去極化，因而導致鎂離子阻斷NMDA受體(NMDAR)的離子通道去除，並允許鈣離子(Ca^{2+})流過麩胺酸鹽調節的離子通道。然而，星狀神經膠細胞中的NMDA受體(NMDAR)要不是被鎂離子微弱地阻斷，就是鎂離子阻斷不存在，這取決於發現星狀神經膠細胞的區域，而且與神經元相比，星狀神經膠細胞的靜止膜電位是超極化的。關於離子型受體麩胺酸鹽過度刺激導致興奮毒性神經細胞死亡的理論受到了批評，因為已經證明AMPA受體(AMPA)很快就會對長期麩胺酸鹽暴露不敏感(Dzamba、Honsa，以及Anderova，2013年)。然而，NMDA受體(NMDARs)幾乎沒有對麩胺酸鹽不敏感(Verkhratsky及Kirchhoff，2007年)。與神經元及缺乏鎂離子阻斷相比，這種性質與它們的超極化神經膠質靜止膜電位結合，產生了由於過量的細胞外麩胺酸鹽濃度導致顯著增加的 Ca^{2+} 流入的脆弱性。這是重要的，因為科學家已經觀察到麩胺酸鹽濃度與星狀神經膠細胞中 Ca^{2+} 流入強度之間的正相關性。在體外，用麩胺酸鹽刺激的星狀神經膠細胞也顯示出增加的細胞死亡(Lee、Ting、Adams、Brew、Chung，以及Guillemin，2010年)。

【0085】 在存在高水平的血清麩胺酸鹽的情況下，星狀神經膠細胞末端的NMDA受體(NMDARs)將被過度活化，進而允許危險的高水平的 Ca^{2+} 進入細胞。已知這樣的 Ca^{2+} 流入星狀神經膠細胞會誘導麩胺酸鹽從星狀神經膠細胞向細胞外空間的囊泡釋放(Malarkey及Papura，2008年)。過量的細胞外麩胺酸鹽透過損害星狀神經膠細胞麩胺酸鹽轉運蛋白以及透過誘導神經元與星狀神經膠細胞中

致命的鈣流入而進一步損害星狀神經膠細胞。研究顯示，興奮性胺基酸轉運蛋白2 (excitatory amino acid transporter 2, EAAT2)負責星狀神經膠細胞中約90%麩胺酸鹽的攝取，使其成為關鍵的麩胺酸鹽轉運蛋白(Kim、Lee、Kegelman、Su，以及Das，2011年)。為反應細胞外空間中過量的麩胺酸鹽，星狀細胞膜上的興奮性胺基酸轉運蛋白2 (EAAT2)超時工作以攝取麩胺酸鹽。然而，隨著麩胺酸鹽的持續超載，興奮性胺基酸轉運蛋白2 (EAAT2)最終變得功能失調。Li，1997年，發現在四種麩胺酸轉運蛋白興奮性胺基酸轉運蛋白1 (EAAT1)至興奮性胺基酸轉運蛋白4 (EAAT4)中，興奮性胺基酸轉運蛋白2 (EAAT2)在阿茲海默症(AD)患者中受影響最大。他指出阿茲海默症(AD)患者有85%興奮性胺基酸轉運蛋白2 (EAAT2)的損失(Li、Mallory、Alford、Tanaka，以及Masliah，1997年)。興奮性胺基酸轉運蛋白2 (EAAT2)的這種損失對星狀神經膠細胞及周圍的神經元和神經膠質細胞是災難性的。在正常的生理條件下，星狀神經膠細胞的作用是從細胞外空間去除麩胺酸鹽，具體而言是突觸裂縫，並儲存大部分大腦的麩胺酸鹽。事實上，星狀神經膠細胞中的麩胺酸鹽含量比細胞外空間高10,000倍(Ganel以及Rothstein，1999)。當興奮性胺基酸轉運蛋白2 (EAAT2)功能失調時，星狀神經膠細胞不再攝取麩胺酸鹽或維持ECF中的麩胺酸鹽穩態。因此，調節神經元突觸周圍及突觸後神經元周圍的麩胺酸鹽水平的星狀神經膠細胞上的NMDA受體(NMDAR)變得過度刺激。1994年，Ulas等人對帕金森氏症(PD)與阿茲海默症患者中興奮性胺基酸受體的結合進行了放射自顯影研究。他發現在帕金森氏症(PD)及阿茲海默症(AD)患者中，與NMDA受體(NMDAR)的結合顯著增加(Ulas、Weihmuller、Brunner、Joyce、Marshall，以及Cotman，1994年)。

【0086】 如Dzamba、Honsa，以及Anderova所解釋的，星狀神經膠細胞及突觸後神經元中麩胺酸鹽與NMDA受體(NMDAR)的結合增加可透過以下機制導致神經元及神經膠質細胞死亡：NMDA受體(NMDAR)的過度活化導致Ca²⁺的流入，其由線粒體吸收，然後變為去極化。這促進了活性氧類的產生，其可以破壞線粒體作用及細胞調節其細胞內Ca²⁺的能力，最終導致壞死性細胞死亡。如果透過NMDA受體(NMDAR)的Ca²⁺流入的強度較小，則發生細胞凋亡而非壞死結果，因為線粒體僅為部分去極化。這使得足夠的ATP來支持細胞凋亡過程(Dzamba、Honsa，以及Anderova，2013年)。由於星狀神經膠細胞及神經元在物理上接近，因此在Ca²⁺流入期間星狀神經膠細胞釋放麩胺酸鹽會影響周圍的星狀神經膠細胞及神經元，導致神經元興奮毒性，因為神經元中的NMDA受體(NMDAR)被細胞外麩胺酸鹽過度刺激並如同星狀神經膠細胞那樣經歷凋亡或壞死性細胞死亡。儘管多巴胺通常通過調節Ca²⁺訊息傳遞來保護神經元免受麩胺酸鹽誘導的興奮性毒性(Vaarmann、Kovac、Holmstrom、Gandhi，以及Abramov，2013年)，但已發現NMDA受體(NMDAR)結合的增加與多巴胺轉運蛋白的結合降低及由此導致的多巴胺失衡有關(Ulas、Weihmuller、Brunner、Joyce、Marshall，以及Cotman，1994年)。因此，鈣的穩態安全網，多巴胺，也受到NMDA受體(NMDAR)過度刺激的反向影響。因此，神經元及星狀神經膠細胞都受到細胞外麩胺酸鹽毒性的持續條件的直接且不利地影響。

【0087】 不幸的是，由於細胞外麩胺酸鹽毒性引起的星狀神經膠細胞及神經元的死亡造成的問題不僅僅是他們自己的死亡。過量麩胺酸鹽的影響超出了直接的事件連鎖反應：血清麩胺酸鹽過度刺激星狀神經膠細胞末端的NMDA受體(NMDAR)，導致極端的Ca²⁺流入，從星狀神經膠細胞釋放細胞內麩胺酸並使

線粒體去極化，導致壞死或凋亡的細胞死亡。如前所述，星狀神經膠細胞末端的關鍵作用是透過分泌調節內皮緊密連接的生長因子來維持血腦屏障(BBB)。不幸的是，當星狀神經膠細胞死亡時，星形細胞末端不再能夠維持血腦屏障(BBB)。因此，簡單地說，由細胞外麩胺酸鹽引起的星狀神經膠細胞的死亡導致血腦屏障(BBB)完整性的喪失及血腦屏障(BBB)滲透性的增加。

【0088】 存在第二種途徑，其中由功能失調的星狀神經膠細胞的麩胺酸鹽的囊泡釋放引起的過量細胞外麩胺酸鹽增加血腦屏障(BBB)通透性。大腦中過量的細胞外麩胺酸鹽不僅消除了星狀神經膠細胞的保護作用，而且還直接影響內皮細胞的緊密連接。在最近的一項研究中，Vazana以麩胺酸鹽灌注皮質區並通過使用螢光追蹤劑發現血腦屏障(BBB)滲透性增加(Vazana等人，2016年)。透過一系列測試，Vanza確定過量的細胞外麩胺酸鹽過量會活化內皮細胞上的NMDA受體，進而導致 Ca^{2+} 流入，進而誘導產生一氧化氮(NO)。然後一氧化氮(NO)通過間隙連接擴散到其他內皮細胞並活化鳥苷酸環化酶以產生環單磷酸鳥苷(cGMP)。環單磷酸鳥苷(cGMP)重排緊密連接蛋白，最終使血腦屏障(BBB)更具滲透性。因此，我們看到細胞外空間中過量的麩胺酸鹽直接透過操縱緊密細胞連接，而間接地透過破壞星狀神經膠細胞增加血腦屏障(BBB)滲透性，進而阻止它們保護血腦屏障(BBB)。

【0089】 還有第三種途徑，其中細胞外麩胺酸鹽增加血腦屏障(BBB)通透性。 Ca^{2+} 是細胞內及細胞外調節血腦屏障(BBB)中緊密連接的重要因子，調節血腦屏障(BBB)滲透性的不同分子使用細胞內 Ca^{2+} 來這樣做。細胞外 Ca^{2+} 的增加與血腦屏障(BBB)通透性降低相關(Banerjee以及Bhat，2007年)。如果過量的細胞外麩胺酸鹽與NMDA受體(NMDAR)結合導致 Ca^{2+} 流入異常增加，那麼可用於維持

與調節血腦屏障(BBB)通透性及完整性的細胞外 Ca^{2+} 較少。事實上，在正常生理學中，大腦通過NMDA受體(NMDAR)對星狀神經膠細胞進行 Ca^{2+} 內流，使血腦屏障(BBB)更具滲透性，進而增加腦氧水平(Mishra、Reynolds、Chen、Gourine、Rusakov，以及Attwell，2016年)。似乎在患病的情況下，身體使用相同的機制來增加緊密連接的滲透性。因此，當緊密連接的滲透性增加與血清麩胺酸鹽水平過高的人結合時，麩胺酸鹽可能無意中通過血腦屏障(BBB)與氧氣一起流入。

【0090】 這種透過麩胺酸鹽誘導發生的滲透性的相應增加：星狀神經膠細胞死亡，內皮細胞緊密連接重新排列及/或細胞外 Ca^{2+} 減少，打開通常被阻斷無法進入大腦的物質的閘門，產生正回饋迴路，其中更多的血清麩胺酸鹽通過該屏障，進而加劇了現有的毒性。其他物質現在能夠通過更具滲透性的血腦屏障(BBB)進入，這些物質的有害影響也不容忽視。我們的工作模式的有效性與Leibowitz及其同事的研究合作；亦即，當試圖降低血清麩胺酸鹽水平時，無論是關於何種機制，降低的血液麩胺酸鹽濃度與改善的神經學結果相關(Leibowitz、Boyko、Shapira，以及Zlotnik，2012年)。

【0091】 因此，有鑑於該途徑，顯然升高的血漿麩胺酸鹽是引起麩胺酸鹽毒性的因素。然而，問題仍然存在：血液中麩胺酸鹽濃度升高的原因是什麼？對人類而言，麩胺酸鹽主要來自食物。麩胺酸鹽是人類飲食中最豐富的氨基酸。它存在於天然及許多加工或水解食品而被食用，且以麩胺酸鈉(monosodium glutamate，MSG)形式的添加劑及風味增強成分被使用。

【0092】 在健康個體中，食物中被食用的大部分麩胺酸鹽在腸道中被轉化為麩醯胺酸，亦即為從胃的幽門括約肌到肛門的胃腸道部分，且在人類中，由小腸及大腸所組成。然後腸道的微絨毛將麩醯胺酸及殘留的麩胺酸鹽轉移到血

液中。在每天對年輕男孩餵食12.75 g的游離麩胺酸鹽的研究中，並未觀察到毒性作用，顯示在健康個體中有效地除去口服給予的游離麩胺酸鹽(Nakagawa、Takahashi，以及Suzuki，1960年)。其他研究也證實，晝夜攝取量不會影響血漿麩胺酸鹽水平。類似地，當向健康的人類個體提供高蛋白質膳食時，這些膳食不會提高血漿麩胺酸鹽，儘管麩醯胺酸有所增加，這表示與腸道黏膜麩胺酸鹽相比，麩醯胺酸的吸收更有效(Palmer、Rossiter、Levin，以及Oberholzer，1973年)。

【0093】 腸道能夠發揮這樣的功能，是因為它存在了超過100兆的微生物，統稱為微生物體。生活在人類體內及體表的這些微生物具有以下重要功能：合成維生素、幫助消化、發育以及維持免疫系統。麩胺酸鹽代謝為麩醯胺酸主要是透過人類小腸中產生麩醯胺酸合成酶的細菌所造成。這些細菌通常是革蘭氏陽性細菌，包括大多數種類的乳酸桿菌，例如植物乳酸桿菌，以及革蘭氏陰性細菌，例如大腸桿菌、脆弱類桿菌、假單胞菌以及克雷伯氏菌。由這些細菌在腸中產生的麩醯胺酸合成酶(GS)是用於將膳食麩胺酸鹽轉化為小腸中的麩醯胺酸的重要酵素。腸道麩醯胺酸合成酶(GS)的作用在維持血清麩胺酸鹽的穩態水平方面具有非常重要的意義，因為它的唯一目的是將膳食麩胺酸鹽轉化為麩醯胺酸。腸道中沒有其他酵素可以發揮這種功能。因此，腸道產生麩醯胺酸合成酶(GS)的細菌的存在及健康對於維持血液中麩胺酸鹽的穩態水平是至關重要的。

【0094】 由於腸道生態失調所導致的這些常駐細菌的缺乏或破壞，導致腸道受損及消化異常。生態失調是由於過少的有益細菌加上不想要的細菌、酵母及/或寄生蟲的過度生長所導致的腸道菌群的不平衡。因此，生態失調導致麩醯

胺酸合成酶(GS)活性的喪失以及隨之而來的膳食麩胺酸鹽的代謝不足及低效率。這導致血液中游離麩胺酸鹽水平升高，其通常比健康個體的血清基礎水平高出許多倍。因此，已經觀察到微生物體的腸內穩態在神經系統疾病中產生重要作用，例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS) (Fang，2015年)、阿茲海默症(Bhattacharjee以及Lukiw，2013年)、自閉症(Mulle、Sharp，以及Cubells，2013年)、精神分裂症(Nemani、Hosseini Ghomi、McCormick，以及Fan，2015年)、帕金森氏症(Scheperjans等人，2014年)，多發性硬化症(multiple sclerosis, MS)(Westall、Molecular Mimicry Revisited：Gut Bacteria and Multiple Sclerosis，2006年)，以及精神分裂症(Nemani、Hosseini Ghomi、McCormick，以及Fan，2015年)。事實上，Braniste及其同事的一項研究發現，無菌小鼠因出生時沒有微生物體而具有增加的血腦屏障(BBB)通透性。當該小鼠暴露於有益的腸道微生物群時，滲透性的增加隨後得到改善，且緊密的連接蛋白表達被上調(Braniste等，2014年)。肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)轉基因SOD1-G93A小鼠模型展現出腸道通透性的增加以及腸道微生物體移位，表示微生物體在肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)中的潛在未被辨識出的作用(Shaoping Wu1，2015年)。帕金森氏症也有類似的研究報告(Sampson等人，2016年)。

【0095】在我們自己的研究調查中，我們看到了類似的結果。表2顯示了肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者的綜合糞便分析報告。該患者的報告顯示大腸桿菌沒有生長，這是小腸中主要的麩醯胺酸合成酶細菌之一，在正常情況下應該為4+。表3顯示該患者的禁食麩胺酸鹽含量為141 $\mu\text{mol/L}$ ，而正常禁食麩胺酸鹽含量應為30 $\mu\text{mol/L}$ 。根據Peters在1969年的研究，健康人類的正常血漿游離麩胺酸鹽應為29.90至30.85 $\mu\text{mol/L}$ (4.4-4.5 ppm)(Peters、Lin、Berridge、

Cummings，以及Chao，1969年)。該實例顯示肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者的血清麩胺酸鹽比正常高出9倍。該表第三欄顯示該患者在餵食90分鐘後血清麩胺酸鹽水平為271 μmol/L，而正常餐後血清麩胺酸鹽應為60 μmol/L。這假設禁食血清葡萄糖水平小於或等於30 μmol/L，(禁食可以為8到30 μmol/L，以及PPSG-禁食麩胺酸鹽預計低於30 μmol/L，這是二個單獨的標記)且餐後血清麩胺酸鹽水平與禁食血清麩胺酸鹽水平之間的差異不應大於30 μmol/L。因此，該患者的餐後血清麩胺酸鹽比正常水平高出約4.5倍。表3顯示另一位肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者的餐後血清麩胺酸鹽水平為340.4 μmol/L，比健康個體的血清麩胺酸鹽水平高出11倍以上。這些升高的水平可導致級聯效應，其中血液中高濃度的游離麩胺酸鹽可破壞血腦屏障，導致腦中的中毒狀況及神經元的死亡。因此，我們的工作模式為腸道生態失調可導致腸道細菌無法產生麩醯胺酸合成酶(GS)，進而無法有效地代謝麩胺酸鹽，進而導致血清麩胺酸鹽水平升高。

【0096】 表2：綜合糞便分析：肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者 # 1 的有益菌群

	有益菌群					
	脆弱類桿菌	雙叉乳酸桿菌屬	大腸桿菌	乳酸桿菌屬	腸球菌屬	梭菌屬
細菌培養	3+	4+	無生長	4+	4+	2+

注意：範圍為1+到4+，其中4+是正常的，無生長為高度異常的(任意單位)

【0097】 表3：3名肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者的禁食及餐後血清麩胺酸鹽(Glu)水平

	禁食	正常基線	餐後	正常基線
	μmol/L	μmol/L	μmol/L	μmol/L
患者#1 血清麩胺酸鹽 (Glu)水平	141	30	271	60
患者#2 血清麩胺酸鹽 (Glu)水平	NA	NA	340	60
患者#3 血清麩胺酸鹽 (Glu)水平	33	30	184	60

NA：未得到數據

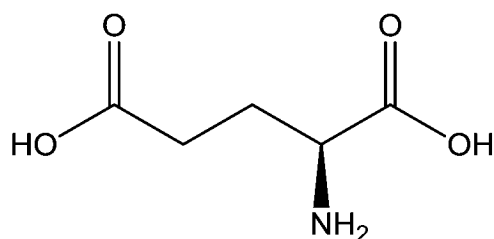
【0098】 因此，腸道中麩醯胺酸合成酶(GS)的活性對於預防腦中麩胺酸鹽血清水平升高及麩胺酸鹽毒性以及最終預防神經障礙至關重要。因為腸道中的麩醯胺酸合成酶(GS)活性在血清麩胺酸鹽的穩態中具有無可替代的作用，所以它可以潛在地作為神經障礙的診斷工具。

【0099】 2001年，Vermeiren等人試圖基於血清中麩醯胺酸合成酶(GS)的水平開發神經疾病的生物標記物。他檢查了阿茲海默症(AD)患者與對照組患者血清中的麩醯胺酸合成酶(GS)水平。然而，他發現阿茲海默症(AD)與對照組個體的麩醯胺酸合成酶(GS)濃度之間沒有統計學上的顯著差異(Vermeiren、Le Bastard、Clark、Engelborghs，以及De Deyn，2011年)。因此，他將血清中的麩醯胺酸合成酶(GS)排除作為準確的生物標記物。然而，他的搜索在一定程度上被誤導，因為大多數麩醯胺酸合成酶(GS)活動位於大腦及胃腸道系統的微生物體中。血清中麩醯胺酸合成酶(GS)的水平不如在腸道或大腦中測量到的麩醯胺酸合成酶(GS)的水平那麼明顯。Gunnerson於1992年實際上發現腦脊髓液(cerebral spinal fluid，CSF)中的麩醯胺酸合成酶(GS)可以作為神經疾病的生物標記物。他發現患有阿茲海默症(AD)的個體的腦脊液中麩醯胺酸合成酶(GS)明顯高於對照組。在39名阿茲海默症(AD)患者中，38名患者的腦脊液中有麩醯胺酸合成酶

(GS)。在44個對照中，有1個的腦脊髓液(CSF)中具有麩醯胺酸合成酶(GS)(Gunnerson以及Haley，1992年)。因此，可以看出，如果在正確的位置觀察到麩醯胺酸合成酶(GS)，可以作為神經疾病的有效診斷工具。然而，這種形式的測試是侵入性的、昂貴的、危險的，並且缺乏作為預防性診斷工具的潛力。鑑於腸道中的麩醯胺酸合成酶(GS)僅由細菌產生，且這些細菌僅在膳食麩胺酸鹽存在下有活性，因此測量腸道中麩醯胺酸合成酶(GS)的水平也將是侵入性且不切實際的。此外，由於腸道微生物體中不同種類的微生物之間的大量且複雜的相互作用，量化麩醯胺酸合成酶(GS)活性將是昂貴且不切實際的。

【0100】 麩胺酸、麩胺酸鹽、麩醯胺酸及麩醯胺酸合成酶

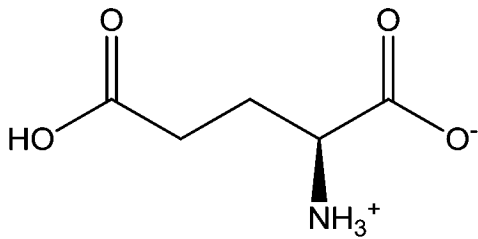
【0101】 麩胺酸為一種天然存在的 α -胺基酸，其具有化學式 $C_5H_9O_4N$ 並對應於L的以下化學結構，亦即麩胺酸的S，立體異構物。



L-麩胺酸

【0102】 麩胺酸鹽為人體中樞神經系統的主要神經傳導物質，並且為該系統中最豐富的游離胺基酸。麩胺酸鹽佔大腦中總神經傳導物質活性的約90%。

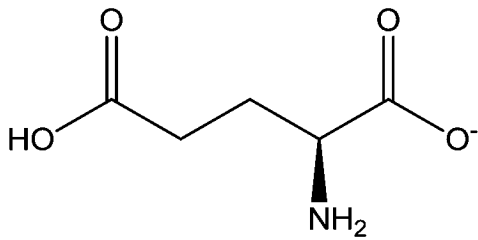
【0103】 在其固體形式和微酸性pH值下，麩胺酸作為兩性離子存在，對應於以下化學結構。



L-麩胺酸兩性離子形式

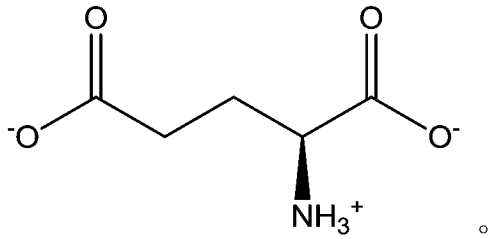
【0104】 大多數生物體在蛋白質的生物合成中使用麩胺酸。在人類中，它被認為是非必需胺基酸，因為它可以由人體合成。麩胺酸廣泛存在於多種蛋白質中，包括許多食品，例如肉類、魚類、乳製品、蛋，以及大豆蛋白。鈉鹽，麩胺酸鈉，被用於作為食品的調味料和風味增強劑。

【0105】 麩胺酸鹽陰離子可以通過以下化學結構描述

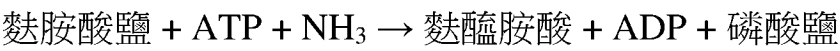


麩胺酸鹽陰離子

或者通過整體的，單負的兩性離子



【0106】 在人體和大多數哺乳動物中，麩胺酸被代謝為麩醯胺酸。麩醯胺酸合成酶催化麩胺酸鹽和氨的縮合形成麩醯胺酸，如下列反應所示。



【0107】 麩醯胺酸合成酶(GS)在腦、腎臟、肝臟、骨骼肌和心臟中少量存在。但是大部分酶活性透過微生物體發生在人體的小腸中，微生物體能夠在蛋

白質消化過程中產生麩醯胺酸合成酶。然而，由於各種原因，一些個體不能將膳食麩胺酸鹽充分代謝為麩醯胺酸，導致與健康個體的基線水平相比麩醯胺酸合成酶活性缺乏。

【0108】 產生麩醯胺酸合成酶的細菌

【0109】 人類小腸中膳食麩胺酸鹽對麩醯胺酸的代謝主要透過產生麩醯胺酸合成酶的細菌發生，如革蘭氏陽性菌，包括溶纖維丁酸弧菌，多種乳酸桿菌如胚芽乳酸桿菌以及革蘭氏陰性菌如大腸桿菌、脆弱桿菌、假單胞菌和克雷伯氏菌。由這些細菌在腸中產生的麩醯胺酸合成酶是將大部分麩胺酸鹽從食物來源轉化為麩醯胺酸的重要酶。由於腸道生態失調導致的這些常駐細菌的缺乏或破壞而導致腸道受損、消化異常，特別是在蛋白質膳食後血液中的麩胺酸鹽異常升高。

【0110】 麩醯胺酸合成酶細菌在中樞神經系統疾病中的作用

【0111】 許多神經系統患者抱怨消化和腸道問題。隨著常駐麩醯胺酸合成酶細菌的置換，我們的假設與我們在本發明中的臨床觀察相符，亦即食物中麩胺酸鹽代謝的能力可能嚴重受損，導致膳食麩胺酸鹽轉化為麩醯胺酸的效率低下，進而當測量禁食及餐後麩胺酸水平時，可檢測做為麩醯胺酸合成酶缺乏的百分比。隨之而來的血液中升高的麩胺酸鹽可能導致血腦屏障的破壞，導致神經性疾病的表現。(Mayhan & Didion, 1996年)。測量腸中的麩醯胺酸合成酶活性而且沒有結果來量化血清中該酶的水平是困難且不切實際的。當前具體實施例被設計為一種測量人類個體中麩醯胺酸合成酶活性的更簡單方式，作為預測與麩胺酸鹽毒性相關的中樞神經系統(CNS)、精神性疾病或相關病症的發作或傾

向的生物標記物。該方法還有助於設計用於調節個體中的血清麩胺酸鹽水平以治療或預防這種病症的方案。

【0112】 麩醯胺酸合成酶缺乏對血清麩胺酸鹽的診斷優勢

【0113】 雖然簡單地測量個體腸道中麩醯胺酸合成酶的水平是理想的，但是難以直接測量腸道中的麩醯胺酸合成酶水平，因為微生物體的複雜性代表給出一個體的腸道的完整及準確的輪廓將是昂貴而耗費勞力的。因此，其作為診斷測試是不可行的。

【0114】 由於直接測量是不切實際的，許多研究反過來研究個體的血清麩胺酸鹽水平。如前所述，升高的血清麩胺酸鹽水平與先前研究的個體的神經病學狀況有關。然而，我們假設用於計算麩醯胺酸合成酶缺乏百分比的概述模型優於簡單地觀察血清麩胺酸鹽水平。量化麩醯胺酸合成酶缺乏更準確地評估並預測神經病症的嚴重程度及發作，並且可以作為神經病症的預防性早期檢測。

【0115】 對於血清麩胺酸鹽達到足夠高水平以診斷異常，可以推斷這種升高的讀值的根本原因必須長時間影響個體。因此，雖然升高的血清麩胺酸鹽可以並且與神經病症有關，但它不是理想的診斷措施。如果個體顯示血清麩胺酸鹽水平升高，則由此引起的損害可能已經發生一段時間。

【0116】 另一方面，測量患者的麩醯胺酸合成酶缺乏水平具有早期檢測能力的優點。麩醯胺酸合成酶的缺乏最終導致血清麩胺酸鹽升高。甚至在問題進展到血清麩胺酸鹽水平升高的程度之前，本文件中概述的方法可以檢測到這種危險。透過這種方法，可以檢測到對神經病症的易感性，並且可以在個體中發生神經障礙之前預測疾病進展，進而產生巨大的預防益處。

【0117】 為了進行本文所述之方法，可以從一有需要的個體獲得一血液樣品，並且可以透過本領域已知的方法測量生物樣品中的標記物，例如免疫測定法，例如ELISA (酵素連結免疫吸附測定)。於一些具體實施例中，在兩個不同的時間點從個體獲得兩個血液樣品，例如一第一禁食時間點和口服給予包含麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液後的第二餐後時間點。除了水之外，處於禁食狀態的個體較佳禁食至少約12小時的期間。在口服施用包含麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液後約第二個餐後時間點為約15分鐘至約90分鐘。

【0118】 如本領域所知，麩胺酸(麩胺酸鹽)可存在於多種富含蛋白質的食物來源中。因此，於一些具體實施例中，如本文所用的水溶液或懸浮液可以是包含二聚蛋白源如乳清蛋白、酪蛋白或大豆蛋白的營養組合物。這種營養組合物的市售實例包括例如管灌安素(Osmolite)(Abbott公司)。

【0119】 於某些具體實施例中，該水溶液或懸浮液包含相當於基於該個體重量的約70 m/kg至約225mg/kg的麩胺酸(麩胺酸鹽)。於一實施例中，該水溶液或懸浮液包含相當於基於該個體重量的約150 m/kg的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【0120】 於某些具體實施例中，該水溶液或懸浮液包含相當於約10克的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【0121】 於某些具體實施例中，該水溶液或懸浮液包含一可消化蛋白。例如，該水溶液或懸浮液為乳清蛋白的一溶液或懸浮液。較佳地，該水溶液或懸浮液基本上不含麩醯胺酸。

【0122】 於某些具體實施例中，該水性懸浮液或溶液包含約75 [較佳約50] 克懸浮或溶解於約200至約250 ml水或果汁中的乳清蛋白。較佳為乳清蛋白，因為它含有麩胺酸鹽而非麩醯胺酸，其他形式的蛋白質也是如此。

【0123】 特定而言，在收集兩個樣品時，該第一(禁食)血液樣品和該第二(餐後)血液樣品的個體不允許排尿，因為這樣做會立即降低血清麩胺酸鹽並人為扭曲(透過排泄降低水平)，導致測試無效。僅在收集該第一(禁食)血液樣品之前和收集該第二(餐後)血液樣品之後立即使個體排尿。此外，應排除或特別控制導瀉的個體。

【0124】 血液樣品可通過本領域已知的不同方法獲得，例如周圍靜脈穿刺(靜脈穿刺)。可以對血液樣品進行抗凝、離心及/或去蛋白處理，以獲得無蛋白的血清樣品。可以透過本領域已知的方法，例如免疫測定，如ELISA，分析所獲得的血清樣品中每個樣品中的麩胺酸鹽水平。

【0125】 於某些具體實施例中，如果該第二樣品中的血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中的血清麩胺酸鹽水平之間的差異大於一預定值，例如，30 $\mu\text{mol/L}$ 的血清麩胺酸鹽，該個體被認為具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或一異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有或與之相關的疾病或其進展的風險。

【0126】 於某些具體實施例中，如果腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比大於一預定值，例如，19.11%，該個體被認為具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與其相關的疾病或其進展的風險。

【0127】 在確定個體具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與其相關的疾病或其進展的風險之後，可以對個體進行進一步的測試(例如常規身體檢查，包括影像測試，例如，X射線乳房攝影，核磁共振成像(MRI)或超音波以符合疾病發生及/或確定進展的階段/時期。

【0128】於一些具體實施例中，本文所述之方法可以進一步包含治療該個體以至少增加腸麩醯胺酸合成酶活性或降低一異常升高(過量)的血清麩醯胺酸鹽水平或減輕與疾病相關的症狀。

【0129】本發明還提供了作為一種用於治療的醫藥組合物之組合物。

【0130】在特定的具體實施例中，麩醯胺酸合成酶或能夠增加腸麩醯胺酸合成酶活性的試劑可作為一活性成分，以製備用於在一有需要的個體中治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防這種疾病進展的藥物。這種試劑可以為益生菌，可選擇地含有益生質以調節個體小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【0131】如本文所用，「醫藥上可接受的」係指載體與組合物中的活性成分相容，且較佳地可以穩定該活性成分並對接受治療的個體是安全的。該載體可以是活性成分的稀釋劑、載體、賦形劑或基質。合適的賦形劑的一些實例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖、甘露糖、澱粉、阿拉伯膠、磷酸鈣、藻酸鹽、黃耆膠、明膠、矽酸鈣、微晶纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、纖維素、無菌水、糖漿和甲基纖維素。該組合物可另外包含潤滑劑，例如滑石、硬脂酸鎂和礦物油；潤濕劑；乳化劑和懸浮劑；防腐劑，如甲基和羥基苯甲酸丙酯；甜味劑；和調味劑。本發明的組合物可以在給予患者後提供活性成分的快速、持續或延遲釋放的效果。

【0132】根據本發明，該組合物的形式可以是片劑、丸劑、粉末、錠劑、小包、片劑、酏劑、懸浮液、洗劑、溶液、糖漿、軟和硬明膠膠囊、栓劑、無菌注射液和包裝粉末。

【0133】本發明的組合物可通過任何生理學上可接受的途徑遞送，例如口服、口服除外的腸胃外、糞便微生物移植以及栓劑方法。關於腸胃外給藥，較佳以無菌水溶液的形式使用，其可以包含足以使溶液與血液等滲的其他物質，例如鹽或葡萄糖。根據需要，可以適當地緩衝水溶液(較佳pH值為3至9)。在無菌條件下製備合適的腸胃外組合物可以用本領域技術人員熟知的標準藥理學技術完成，並且不需要額外的創造性勞動。

【0134】本文還描述了用於實施本發明方法的套組，其包含能夠特異性檢測樣品中麩胺酸鹽的試劑。這種試劑可以是例如抗體，以進行免疫測定。如本文所用的抗體可以指具有特異性結合特定標的抗原的能力的免疫球蛋白分子。本文所用的抗體不僅包括完整的(即全長的)抗體分子，還包括其保留抗原結合能力的抗原結合片段，例如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv。如本文所用的抗體可包括人源化抗體、嵌合抗體、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體或多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)。如本文所述的抗體為市售可得的或可透過本領域已知的方法製備，例如，透過雜交瘤方法。

【0135】於一些具體實施例中，免疫測定可以是夾心形式。具體而言，該套組包含與檢測抗體配對的捕獲抗體，所述檢測抗體包含可檢測標記，例如酶標記、螢光標記、金屬標記和放射性標記。於某些實例中，該套組為ELISA夾心套組，包含一微量滴定板，該滴定板具有固定有捕獲抗體的孔，含有檢測抗體和顯色試劑的溶液。具體而言，該套組可以進一步包含另外的試劑或緩衝液，用於從個體收集生物樣品的醫療裝置，及/或用於保持及/或儲存樣品的容器。

【0136】檢測分析可以其他形式進行，例如，透過使用任何硬體、生物晶片、微米及奈米陣列技術或等同物，可視需要地與化學或放射性同位素標記技

術組合以自動測量血清麩胺酸鹽水平，並且以硬體及軟體完成測量及計算輸出顯示腸麩醯胺酸合成酶缺乏水平的量化、診斷範圍。

【0137】 於某些實施例中，該套組可包含一檢測裝置，其配置成檢測分析結果並產生與每個孔中麩胺酸水平成比例的信號；當該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異大於一預定值，或該腸內麩醯胺酸合成酶缺乏百分比大於一預定值時，一讀取器被配置為讀取信號並較佳地進一步指示一陽性結果。該讀取器可進一步配置為指示腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或一異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與其相關的疾病或其進展的風險。於一些具體實施例中，當該第二樣品中的血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中的血清麩胺酸鹽水平之間的差異小於一預定值，或者腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比小於一預定值時，該讀取器可以指示一陰性結果；且該讀取器可進一步配置為指示沒有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或具有正常水平的血清麩胺酸鹽或較少的發生可能性或與一異常升高的血清麩胺酸鹽相關的疾病或其進展的風險。

【0138】 該套組可進一步包含使用該套組檢測樣品中麩胺酸鹽水平的使用說明，以及計算得到該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平或腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比之間的差異。

實施例

【0139】 以下實施例進一步描述和說明了本發明範圍內的具體實施例。給出實施例僅用於說明的目的，不應解釋為對本發明的限制，因為在不脫離本發明的精神和範圍的情況下，可以對其進行許多變化。

【0140】 實施例1：監測血清麩胺酸鹽水平的方法 – 健康個體

第 40 頁，共 54 頁(發明說明書)

【0141】 本方法適用於沒有診斷出神經障礙且禁食血清麩胺酸鹽濃度為19.8 $\mu\text{mol/L}$ 的個體(19歲，女性)。服用11.3克膳食麩胺酸鹽後60分鐘測得的餐後血清麩胺酸鹽水平為47.8 $\mu\text{mol/L}$ ，比禁食血清麩胺酸鹽高出28 $\mu\text{mol/L}$ 。

【0142】 本方法證明餐後與禁食麩胺酸鹽水平的差異在30 $\mu\text{mol/L}$ 的正常範圍內。Peters於1969年的研究中描述了健康個體的正常水平(Peters、Lin、Berridge、Cummings，以及Chao，1969年)。使用該公式，個體的缺乏百分比達到0%，表示個體正常地將膳食麩胺酸鹽代謝為麩醯胺酸並且沒有麩醯胺酸合成酶缺乏的證據。

【0143】 **實施例2：監測血清麩胺酸鹽水平的方法 - 具有次要生活方式相關的麩醯胺酸合成酶缺乏的個體**

【0144】 本方法適用於沒有診斷出神經障礙且禁食血清麩胺酸鹽濃度為23.8 $\mu\text{mol/L}$ 的個體(23歲，男性)。服用11.3克膳食麩胺酸鹽後60分鐘測得的餐後血清麩胺酸鹽水平為54.6 $\mu\text{mol/L}$ ，比禁食血清麩胺酸鹽高出30.8 $\mu\text{mol/L}$ 。

【0145】 本方法證明，餐後與禁食麩胺酸鹽水平的差異略微超出30 $\mu\text{mol/L}$ 的正常範圍。使用此數值，個體的缺乏百分比不會達到0%，且將該數值輸入到公式中。麩胺酸鹽測量值之間的差異除以該個體的麩胺酸鹽測量值之間的差異，該差異的最高記錄值為187 $\mu\text{mol/L}$ ，從這二個數值中減去30 $\mu\text{mol/L}$ 。得到的百分比僅為0.51%麩醯胺酸合成酶缺乏。這表示該個體處於臨界健康狀態，因為0.51%這樣微小的數值與其身體輕微無法以健康的速率代謝消耗麩胺酸鹽有關。這可以解釋為不是麩醯胺酸合成酶相關的缺乏，而是生活方式相關的缺乏，其中個體的飲食模式解釋了輕微的讀值，或者可以在標準誤差的範圍內。

【0146】 實施例3：監測血清麩胺酸鹽水平的方法 - 輕度麩醯胺酸合成酶缺乏

【0147】 本方法適用於沒有診斷出神經障礙且禁食血清麩胺酸鹽濃度為20.2 $\mu\text{mol/L}$ 的個體(19歲，女性)。服用11.3克膳食麩胺酸鹽後60分鐘測定餐後血清麩胺酸鹽水平為75 $\mu\text{mol/L}$ ，比禁食血清麩胺酸鹽高出54.8 $\mu\text{mol/L}$ 。

【0148】 本方法證明餐後與禁食麩胺酸鹽水平的差異在30 $\mu\text{mol/L}$ 的正常範圍之外。使用此數值，該個體的缺乏百分比不會達到0%，並且將該數值輸入到公式中。麩胺酸鹽測量值之間的差異除以該患者麩胺酸鹽測量值之間的差異，該差異的最高記錄值為187 $\mu\text{mol/L}$ ，從該二個數值中減去30 $\mu\text{mol/L}$ 。得到的百分比為15.8%麩醯胺酸合成酶缺乏症。雖然該禁食麩胺酸鹽低於30 $\mu\text{mol/L}$ 的健康水平，但隨後麩胺酸鹽的增加表示一溫和的麩醯胺酸合成酶缺乏。

【0149】 實施例4：監測血清麩胺酸鹽水平的方法 - 中度麩醯胺酸合成酶缺乏

【0150】 本方法適用於沒有診斷出神經障礙且禁食血清麩胺酸鹽濃度為88.0 $\mu\text{mol/L}$ 的個體(21歲，男性)。服用11.3克膳食麩胺酸鹽後60分鐘測得的餐後血清麩胺酸鹽水平為161.3 $\mu\text{mol/L}$ ，比禁食血清麩胺酸鹽高出73.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

【0151】 本方法證明餐後與禁食麩胺酸鹽水平的差異在30 $\mu\text{mol/L}$ 的正常範圍之外。使用此數值，個體的缺乏百分比不會達到0%，並且將該數值輸入到公式中。麩胺酸鹽測量值之間的差異除以該患者麩胺酸鹽測量值之間的差異，該差異的最高記錄值為187 $\mu\text{mol/L}$ ，從該二個數值中減去30 $\mu\text{mol/L}$ 。得到的百分比為麩醯胺酸合成酶缺乏27.58%。該個體的禁食麩胺酸鹽水平幾乎為健康標準的3倍。這表示該個體攝取的麩胺酸鹽比他們的身體可以代謝及排泄的更多。該

個體的高蛋白飲食以及低日水攝取量支持了該分析結果。該個體的餐後及禁食麩胺酸鹽水平之間的差異比預期的 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 增加了兩倍多。這表示除了體內高水平的麩胺酸鹽外，該個體還患有麩醯胺酸合成酶缺乏。如果該個體未能改變其飲食或補充其身體的麩醯胺酸合成酶，那麼他們將可能最終損害其血腦屏障的完整性，進而變得具有發展神經疾病症狀的風險。

【0152】 實施例5：監測血清麩胺酸鹽水平的方法 - 由鹼性水引起的高麩醯胺酸合成酶缺乏

【0153】 本方法適用於沒有診斷出神經障礙且禁食血清麩胺酸鹽濃度為 $53.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的個體(21歲，女性)。服用11.3克膳食麩胺酸鹽後60分鐘測得的餐後血清麩胺酸鹽水平為 $163.4\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，比禁食血清麩胺酸鹽高出 $109.9\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

【0154】 本方法證明，餐後與禁食麩胺酸鹽水平的差異大於正常範圍 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的三倍。使用此數值，該個體的缺乏百分比不會達到0%，並且將該數值輸入到公式中。麩胺酸鹽測量值之間的差異除以該患者麩胺酸鹽測量值之間的差異，該差異的最高記錄值為 $187\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，從這二個數值中減去 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。得到的百分比為50.89%麩醯胺酸合成酶缺乏。這表示該個體未來有可能處於風險之中，因為50.89%的高數值與其身體無法以健康的速率代謝消耗的麩胺酸鹽相關，且該數值是年齡較大的肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者的概率。

【0155】 經過進一步的調查，該個體透露她過去3年幾乎一直在飲用鹼性水。後來證實，源於該個體的水的pH值為8.6。另一名沒有診斷出神經系統疾病的個體(22歲，男性)被報告出同樣高的缺乏百分比為50.1%，後來也發現他自2個月前就開始飲用鹼性水。已知負責產生麩醯胺酸合成酶的乳酸桿菌菌株在pH 6.5的水平下茁壯成長，且已記錄鹼性水的鹼度以將pH值增加至約8.6的水平。有

一位個體(57歲，男性)的記錄，其故意飲用pH範圍在8.6到9.0之間的鹼性水，同時每週一次服用兩茶匙植物乳酸桿菌。在4個月內，他出現了極度失眠、早期周邊神經病變，雙腳輕度不協調以及沒有觸發因素的恐慌症發作。當接受他的CDSA時，發現沒有乳酸桿菌生長的紀錄。即使連續三次抗生素治療也只會使乳酸桿菌的生長從健康的4+降至1+或2+。該患者承認在過去50年中從未服用過抗生素。

【0156】 結果摘要：

【0157】 表4提供了結果的總結。

表 4							
餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽 (μmol/L)	麩醯胺酸合成酶缺乏問題的百分比	麩醯胺酸合成酶缺乏的問題	飲食相關的麩胺酸鹽毒性	解讀	評論	應用	餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽 (μmol/L)
<= 30	0%	無	無	非常健康	根據 1969 年 Peters 的研究，正常的新陳代謝或排泄	使用此條件排除麩醯胺酸合成酶(GS) 缺乏與飲食相關的麩胺酸鹽毒性	<= 30
<= 30	0%	無	輕度	臨界健康	由於長期脫水，身體無法排出血清麩胺酸鹽	使用此條件監測飲食相關麩胺酸鹽毒性的早期情況	<= 30
<= 30	(餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽-30) / (餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽-30)的最大值	無	中度	早期麩胺酸鹽毒性	患者攝取的麩胺酸鹽比腎臟排泄的麩胺酸鹽更多	使用此條件來識別與飲食相關的麩胺酸鹽毒性	<= 30
<= 30	((餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺	無	嚴重	晚期麩胺酸鹽	慢性脫水及高蛋白飲食可能是這種	用它來排除非麩醯胺酸合成酶缺乏問題相	<= 30

	酸鹽-30) / (餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30)的 最大值			毒性	情況的原 因。	關的嚴重麩胺 酸鹽毒性	
> 60	((餐後麩 胺酸鹽 - 禁食麩胺 酸鹽-30) / (餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30)的 最大值	無	急性	急性 麩胺 酸鹽 毒性	嚴重的脫水 與極端的蛋 白質飲食， 即使沒有麩 醯胺酸合成 酶缺乏問題，腸道細菌也被過多的飲食麩胺酸鹽所淹沒，且在2-3小時的消化過程中代謝速度不夠快。	用它來排除非 麩醯胺酸合成 酶缺乏問題相 關的急性麩胺 酸鹽毒性	> 60
31 - 60	(餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30) / (餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30)的 最大值	輕度	無	臨界 健康	輕微的麩醯 胺酸合成酶 缺乏問題	使用此條件監 測輕度麩醯胺 酸合成酶缺乏 問題的患者	31 - 60
61-90	(餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30) / (餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30)的 最大值	中度	無	早期 麩胺 酸鹽 毒性	中度的麩醯 胺酸合成酶 缺乏問題	使用此條件來 識別具有中度 麩醯胺酸合成 酶缺乏問題相 關麩胺酸鹽毒 性的患者	61-90
90-150	(餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30) / (餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸	嚴重	無	晚期 麩胺 酸鹽 毒性	嚴重的麩醯 胺酸合成酶 缺乏問題	這組患者應該 對益生菌治療 產生反應	90-150

	鹽-30)的 最大值						
> 150	(餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30) / (餐後麩胺 酸鹽 - 禁 食麩胺酸 鹽-30)的 最大值	急性	無	急性 麩胺 酸鹽 毒性	急性麩醯胺 酸合成酶缺 乏問題，即 使充分補充 水分，身體 也無法排出 血清麩胺酸 鹽	這組患者需要 限制他們的麩 胺酸鹽攝取 量，以便益生 菌治療能有效 地發揮作用	> 150

【0158】 實施例6：評估具有各種神經障礙的個體中麩醯胺酸合成酶缺乏

【0159】 本發明的方法用於確定一組37名個體(男性及女性)的麩醯胺酸合成酶缺乏百分比，年齡範圍為31至95歲，患有神經障礙。測量每個個體的禁食血清麩胺酸鹽(Gluf)以及餐後血清麩胺酸鹽(Glupp)水平。然後計算每個個體的水平差異，即Glupp - Gluf。然後通過如下差異確定麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)：

【0160】 從每個個體計算的Glupp - Gluf差異中減去30 μmol/L的數值，其被認為是血清麩胺酸鹽的正常值。如果該個體的結果數值為零或更小，則為麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)分配零值。如果得到的數值大於零，則將該結果除以157 μMol/L，這是從所有收集的數據集中從禁食到餐後血清麩胺酸鹽的最高增加(認識到可以從更大的數據觀察到更高的數值)這被認為是病理性升高且不合需要的麩胺酸鹽水平。因此，將此商乘以100可提供該個體的麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)。數據列於表5中。

表 5 患有神經障礙的患者						
個體	年齡 歲數	健康狀態	禁食血 清麩胺 酸鹽水 平 μMol/L	餐後血 清麩胺 酸鹽水 平 μMol/L	餐後血清麩胺 酸鹽 - 禁食血 清麩胺酸鹽	麩醯胺酸 合成酶缺 乏百分比 (%GSD)
1	69	肌肉萎縮性脊髓側索	55.4	143.2	87.80	36.82%

		硬化症(ALS)				
2	66	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	41	181	140	70.06%
3	77	延髓肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	33	184	151	77.07%
4	56	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	74	245	171	89.81%
5	66	延髓肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	33	73	40	6.37%
6	62	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	103	137	34	2.55%
7	70	四肢 LMN 肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	50	89	39	5.73%
8	70	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	48	127	79	31.21%
9	39	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	76	263	187	100.00%
10	50	延髓 FALS	63	205	142	71.34%
11	58	早發性帕金森氏症(PD)	29	142	113	52.87%
12	52	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	32	121	89	37.58%
13	62	延髓肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	32	118	86	35.67%
14	56	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	40	124	84	34.39%
15	68	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	39	117	78	30.57%
16	68	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	41	110	69	24.84%
17	73	肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)管道	55	109	54	15.29%
18	76	延髓肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS) 不在研究中	41	92	51	13.38%
19	83	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	34	76	42	7.64%
20	69	延髓 FALS	68	109	41	7.01%
21	53	阿茲海默症(AD)的早期案例	86.2	174.2	88	36.94%
22	95	阿茲海默症	37.9	106.8	68.9	24.78%
23	64	假性延髓麻痺	49.8	70.5	20.7	0%
24	49	可能是肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	93.4	94.3	0.9	0%

25	57	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	36	66	30	0%
26	47	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	54	66	12	0%
27	67	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	114	109	-5	0%
28	37	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	29	49	20	0%
29	31	神經纖維束化	55	43	-12	0%
30	58	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	82	53	-29	0%
31	74	延髓肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	108	70	-38	0%
32	82	肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	22	48	26	0%
33	77	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	24	46	22	0%
34	52	帕金森氏症	42	63	21	0%
35	47	四肢肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	29	43	14	0%
36	62	FTLD/肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	83	91	8	0%
37	59	四肢/管道肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	64	96	32	1.27%
平均	62	—	53.96	109.57	55.60	21.98%

【0161】 來自表5的數據之總結。

患有神經障礙的肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者	整體	具有麩胺酸鹽毒性的肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	沒有麩胺酸鹽毒性的肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)	增加%
樣本數	37	22	15	--
平均禁食麩胺酸鹽	53.96	50.52	59.01	-14.39%
平均餐後麩胺酸鹽	109.57	138.46	67.19	106.09%
平均餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽	55.60	87.94	8.17	975.95%
在所有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)患者中的平均麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)	21.98%	36.91%	0.08%	36.82%
平均年齡	62	65	58	--

【0162】 實施例7：通常健康個體中麩醯胺酸合成酶的評估

【0163】 本發明的方法(參見實施例5)用於測定26名一般健康個體(也包括一些表示為過重)的男性及女性的麩醯胺酸合成酶缺乏百分比，年齡範圍為20至32歲。數據列於表6中。

表 6						
個體	年齡 歲數	健康 狀態	禁食血清麩 胺酸鹽水平 μMol/L	餐後血清麩 胺酸鹽水平 μMol/L	餐後血清麩胺 酸鹽 - 禁食血 清麩胺酸鹽	麩醯胺酸合成 酶缺乏百分比 (%GSD)
1	23	健康	44.6	176.8	132.2	65.10%
2	22	健康	83.1	202.1	119	56.69%
3	22	健康	53.5	163.4	109.9	50.89%
4	23	健康	38.3	148.1	109.8	50.83%
5	23	健康	38.7	119.5	80.8	32.36%
6	22	健康	88.0	161.3	73.3	27.58%
7	21	嚴重 過重	45.9	111.5	65.6	22.68%
8	23	健康	61.9	125.5	63.6	21.40%
9	20	健康	20.2	75	54.8	15.80%
10	27	嚴重 過重	39.1	90	50.9	13.31%
11	21	健康	16.3	66.9	50.6	13.12%
12	24	健康	48.6	89.5	40.9	6.94%
13	24	健康	23.8	54.6	30.8	0.51%
14	20	健康	17.1	45.7	28.6	0%
15	21	健康	19.8	47.8	28	0%
16	25	健康	41.6	62.7	21.1	0%
17	31	健康	20.2	41.3	21.1	0%
18	25	健康	15.9	36.6	20.7	0%
19	22	健康	23.5	40.4	16.9	0%
20	32	健康	17.0	31.9	14.9	0%
21	26	健康	26.4	40.6	14.2	0%
22	23	健康	19.6	29.1	9.5	0%
23	25	健康	24.3	32.1	7.8	0%
24	21	健康	17.1	22.7	5.6	0%
25	31	健康	15.9	24.4	8.5	0%

【0164】 來自表6的數據之總結。

健康且年輕人類	整體	具有麩胺酸鹽 毒性的健康人 類	沒有麩胺酸鹽 毒性的健康人 類	增加%
樣本數	25	12	13	--
平均禁食麩胺酸鹽	34.42	48.18	21.71	121.96%

平均餐後麩胺酸鹽	81.58	127.47	39.22	224.98%
平均餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽	47.16	79.28	17.52	352.65%
在所有肌肉萎縮性 脊隨側索硬化症 (ALS) 患者中的平 均麩醯胺酸合成酶 缺乏百分比(%GSD)	15.09%	31.39%	0.04%	31.35%
平均年齡	24	23	25	--

【0165】 來自表6的數據之總結。

不到 30 歲的健康且年輕人類的樣本數	25
平均禁食麩胺酸鹽	34.42
平均餐後麩胺酸鹽	81.58
平均餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽	47.16
平均麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)	15.09%
平均年齡	24
具有麩胺酸鹽毒性問題的健康且年輕人類的樣本量	12
具有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均禁食麩胺酸鹽	48.18
具有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均餐後麩胺酸鹽	127.47
具有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽	79.28
具有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)	31.39%
平均年齡	23
沒有麩胺酸鹽毒性問題的健康且年輕人類的樣本量	13
沒有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均禁食麩胺酸鹽	21.71
沒有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均餐後麩胺酸鹽	39.22
沒有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均餐後麩胺酸鹽 - 禁食麩胺酸鹽	17.52
沒有麩胺酸鹽毒性問題的患者的平均麩醯胺酸合成酶缺乏百分比(%GSD)	0.04%
平均年齡	25

【0166】 參考文獻

Andreaou, E., Kapaki, E., Kokotis, P., Paraskevas, G. P., Katsaros, N., Libitaki, G., et al. (2008). Plasma Glutamate and Glycine Levels in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. In Vivo, 22(137-142), 137-41.

Banerjee, S., & Bhat, M. A. (2007). Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier. Annual Review of Neuroscience, 235-258.

Bhattacharjee, S., & Lukiw, W. J. (2013). Alzheimer's disease and the microbiome. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(Article 153).

Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., et al. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*.

Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., Baez, E., Garcia-Segura, L. M., El-Bacha, R. S., et al. (2014 йил 4-August). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 1-11.

Campos, F., Sobrino, T., Ramos-Cabrera, P., Argibay, B., Agulla, J., Perez-Mato, M., et al. (2011). Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(1378–1386).

Dzamba, D., Honsa, P., & Anderova, M. (2013). NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Current Neuropharmacology*, 250-262.

Fang, X. (2015). Potential role of gut microbiota and tissue barriers in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Neuroscience*.

Ganel, R., & Rothstein, J. (1999). Glutamate Transporter Dysfunction and Neuronal Death. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 141, pp. 471-487). Springer, Berlin, Heidelberg.

Gunnerson, D., & Haley, B. (1992). Detection of glutamine synthetase in the cerebral spinal fluid of Alzheimer diseased patients: A potential diagnostic biochemical marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11949-11953.

Ivanovaa, S. A., Boykoa, A. S., Yu., F., Krotenkoa, N., Semkea, A., & Bokhana, N. A. (2014). Glutamate concentration in the serum of patients with schizophrenia. *Procedia Chemistry*, 10(80 – 85), 80-85.

Iwasaki, Y., Ikeda, K., Shojima, T., & Kinoshita, M. (1992). Increased plasma concentrations of aspartate, glutamate and glycine in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 145(175 177), 175-7.

Kim, K., Lee, S.-G., Kegelman, T. P., Su, Z.-Z., & Das, S. K. (2011). Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and Glutamate in Neurodegeneration: Opportunities for Developing Novel Therapeutics. *J Cell Physiology*.

Lee, M.-C., Ting, K. K., Adams, S., Brew, B. J., Chung, R., & Guillemin, G. J. (2010). Characterization of the Expression of NMDA Receptors in Human Astrocytes. *Plos One*, 1-11.

Leibowitz, A., Boyko, M., Shapira, Y., & Zlotnik, A. (2012). Blood Glutamate Scavenging: Insight into Neuroprotection. *International Journal of Medical Sciences*, 13(10041-10066), 10041-10066.

Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S., & Masliah, E. (1997). Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 901-911.

Malarkey, E. B., & Parpura, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem International*, 142-154.

Mayhan, W. G., & Didion, S. P. (1996). Glutamate-Induced Disruption of the Blood-Brain Barrier in Rats. *Stroke*, 27(965-970), 959-9.

Mishra, A., Reynolds, J., Chen, Y., Gourine, A., Rusakov, D., & Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature Neuroscience*, 19, 1619-1627.

Miulli, D. E., Norwell, D. Y., & Schwartz, F. N. (1993). Plasma concentrations of glutamate and its metabolites in patients with Alzheimer's disease. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 93(6), 670-6.

Mulle, J. G., Sharp, W. G., & Cubells, J. F. (2013). The Gut Microbiome: A New Frontier in Autism Research. *Current Psychiatry Reports*, 15(Article 337).

Nakagawa, I., Takahashi, T., & Suzuki, T. (1960). Amino Acid Requirements of Children. *J. Nutrition*, 70, 176-181.

Nemani, K., Hosseini Ghomi, R., McCormick, B., & Fan, X. (2015). Schizophrenia and the gut-brain axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 56(155-160), 155-160.

Palmer, T., Rossiter, M., Levin, B., & Oberholzer, V. G. (1973). The Effect of Protein Loads on Plasma Amino Acid Levels. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 45(827-832), 827-832.

Peters, J. H., Lin, S. C., Berridge, B. J., Cummings, J. G., & Chao, W. R. (1969). Amino Acids, Including Asparagine and Glutamine, in Plasma and Urine of Normal Human Subjects. *Experimental Biology and Medicine*, 131.

Plaitakis, A., & Caroscio, J. T. (1987). Abnormal Glutamate Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology*, 22(575-579), 575-9.

【0167】以參考方式納入

【0168】 每個專利文獻的全部公開內容，包括更正證書、專利申請文件、科學文章、政府報告、網站和本文提及的其他參考文獻，出於所有目的通過引用整體併入本文。在術語發生衝突的情況下，由本說明書控制。

【0169】 等同物

【0170】 在不脫離本發明的精神或基本特徵的情況下，本發明可以以其他特定形式實施。前述實施例在所有方面都應被認為是說明性的，而不是限制在此描述的本發明。在本發明的方法和系統的各種具體實施例中，其中術語「包括」用於所述步驟或組分，還預期所述方法和系統基本上由所述步驟或組分組成或由所述步驟或組分組成。此外，只要本發明仍然可操作，步驟的順序或執行某些動作的順序是不重要的。此外，可以同時進行兩個或更多個步驟或動作。

【0171】 在說明書中，單數形式還包括複數形式，除非上下文另有明確規定。除非另外定義，否則本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域的普通技術人員通常理解的含義相同的含義。在衝突的情況下，由本說明書控制。

【0172】 此外，應該認識到，於某些情況下，組合物可以描述為在混合之前由組分組成，因為在混合時某些組分可以進一步反應或轉化成另外的材料。

【0173】 除非另有說明，本文所用的所有百分比和比率均以重量計。

【符號說明】 無

【生物材料寄存】 無



201935003

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 監測麩醯胺酸合成酶水平的方法**【英文發明名稱】** METHOD FOR MONITORING GLUTAMINE SYNTHETASE

LEVELS

【中文】

本發明關於監測哺乳動物，具體而言是人類個體中腸麩醯胺酸合成酶水平的方法，並且可用於檢測腸麩醯胺酸合成酶缺乏症。該方法基於在施用一預定量的含麩胺酸的蛋白質組合物後，在受控制的禁食及餐後條件下測定該個體中的麩胺酸鹽水平。該方法可用於量化該哺乳動物代謝飲食麩胺酸鹽作為診斷標記物以預測與麩胺酸鹽毒性相關的中樞神經系統(central nervous system, CNS)、精神病，或神經病症的發作或傾向的能力。該方法還可用以設計用於矯正哺乳動物個體中麩醯胺酸合成酶缺乏水平的方案，以治療或預防這樣的病症。該方法及其相應的量化可以使用來自當前實驗室設備、生物測試晶片的數據手動導出，或者可以自動化到醫療設備或實驗室設備中，其具有用於測量並計算輸出顯示量化、診斷範圍或缺乏程度的硬體及軟體。該方法的另一優點為，因為其可檢測麩胺酸鹽毒性，因此可在出現身體症狀之前及早期檢測及預防神經系統疾病的發作。

【英文】

The present invention relates to a method for monitoring intestinal glutamine synthetase levels in a mammal, particularly in a human subject, and is useful for

detecting intestinal glutamine synthetase deficiency. The method is based on determining glutamate levels in the subject under controlled fasting and postprandial conditions after administration of a predetermined quantity of a glutamate containing protein composition. The method is useful for quantifying the ability of the mammal to metabolize dietary glutamate as a diagnostic marker for predicting the onset of or propensity for developing a central nervous system (CNS), psychotic, or neurological disorder, associated with glutamate toxicity. The method is also useful for designing regimens for rectifying glutamine synthetase deficiency levels in a mammal subject in order to treat or prevent such a disorder. This method and its corresponding quantification can be derived manually using data from current laboratory equipment, bio test chips, or it can be automated into a medical device or a laboratory apparatus complete with hardware and software for measurements with computational output showing quantification, diagnostic range or deficiency levels. Another advantage of this method is that because it detects glutamate toxicity, it can potentially detect and prevent the onset of neurological disease early on, before physical symptoms are manifested.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種監測人類個體中腸麩醯胺酸合成酶活性之方法，包含以下步

驟：

- (i) 提供第一(禁食)血液樣品，其在禁食狀態的第一時間點從該個體獲得，其中該個體較佳地除了水之外禁食至少約12小時的時間；
- (ii) 提供第二(餐後)血液樣品，其在對在步驟(i)的該禁食狀態中的該個體口服給予包含相當於約5至約15克的麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液後約15分鐘至約90分鐘的第二時間點從該個體獲得；
- (iii) 將該第一血液樣品轉移至第一容器，可視需要地含有在約0°C至約5°C之間預冷的抗凝血劑；
- (iv) 將該第二血液樣品轉移至第二容器，可視需要地含有在約0°C至約5°C之間預冷的抗凝血劑；
- (v) 將各該第一及第二血液樣品離心以從該血液樣品中的血小板中分離血清，以提供第一(禁食)血清樣品及第二(餐後)血清樣品；
- (vi) 透過向每個該血清樣品中加入去蛋白劑，對該第一血清樣品及該第二血清樣品進行去蛋白處理；
- (vii) 將來自步驟(vi)的每個該血清樣品離心，以從該樣品中的該血清中分離蛋白質，以提供第一(禁食)無蛋白質血清樣品及第二(餐後)無蛋白質血清樣品；
- (viii) 分析該第一及第二無蛋白質血清樣品以確定每個樣品的血清麩胺酸鹽水平；以及

(ix) 比較來自步驟(viii)的血清麩胺酸鹽水平以間接確定該患者的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【第2項】如請求項1之方法，其中在步驟(ix)中，根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平之間的差異確定該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【第3項】如請求項1之方法，其中在步驟(ix)中，根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平的比例確定該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性。

【第4項】如請求項1之方法，其中在步驟(ix)中，透過(A)確定在該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與在該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異，(B)從步驟(A)的結果中減去30 $\mu\text{mol/L}$ ，以及(C)將步驟(B)的結果除以樣品群的近似最大血清麩胺酸鹽水平，以將該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性確定為腸麩醯胺酸合成酶缺乏的比率。

【第5項】如請求項4之方法，該步驟(ix)還包括步驟(D)：將步驟(ix)的步驟(C)之結果乘以100，以獲得腸麩醯胺酸合成酶缺乏的百分比。

【第6項】如請求項1之方法，其中在步驟(ii)中，該水溶液或懸浮液包含相當於基於該個體重量的約70 m/kg至約225mg/kg的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【第7項】如請求項1之方法，其中在步驟(ii)中，該水溶液或懸浮液包含相當於約10克的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【第8項】如請求項1之方法，其中在步驟(ii)中，該水溶液或懸浮液包含相當於基於該個體重量的約150 m/kg的麩胺酸(麩胺酸鹽)。

【第9項】如請求項7之方法，其中在步驟(ii)中，該水性懸浮液或溶液為可消化蛋白的水性懸浮液或溶液。

【第10項】如請求項9之方法，其中在步驟(ii)中，該可消化蛋白質的水性懸浮液或溶液基本上不含麩醯胺酸。

【第11項】如請求項9之方法，其中在步驟(ii)中，該水性懸浮液或溶液為乳清蛋白的溶液或懸浮液。

【第12項】如請求項11之方法，其中在步驟(ii)中，該乳清蛋白的水性懸浮液或溶液基本上不含麩醯胺酸。

【第13項】如請求項12之方法，其中在步驟(ii)中，該水性懸浮液或溶液包含約75克，較佳約50克，懸浮或溶解在約200至約250 ml水或果汁中的乳清蛋白。

【第14項】如請求項13之方法，其中在步驟(ii)中，該果汁為蘋果汁。

【第15項】如請求項9之方法，其中在步驟(ii)中，該第二時間點為將該水溶液或懸浮液口服給予在禁食狀態下的該患者後約60分鐘。

【第16項】如請求項1之方法，其中在步驟(i)中，該第一(禁食)血液樣品具有約1至約10 ml的體積，且其中在步驟(ii)中，該第二(餐後)血液樣品具有約1至約10 ml的體積。

【第17項】如請求項16之方法，其中在步驟(i)中，該第一(禁食)血液樣品具有約5 ml的體積，且其中在步驟(ii)中，該第二(餐後)血液樣品具有約5 ml的體積。

【第18項】 如請求項1之方法，其中步驟(iii)中的該抗凝血劑和步驟(iv)中的該抗凝血劑選自EDTA (乙二胺四乙酸)、肝素鋰、檸檬酸鈉，以及肝素鈉。

【第19項】 如請求項18之方法，其中步驟(iii)中的該抗凝血劑和步驟(iv)中的該抗凝血劑為EDTA (乙二胺四乙酸)。

【第20項】 如請求項1之方法，其中在步驟(v)中，該離心為各自對該第一血液樣品和該第二血液樣品在約0°C至約5°C下以約17,000 ×g進行約10分鐘。

【第21項】 如請求項1之方法，其中在步驟(vi)中，該去蛋白劑選自高氯酸、三氯乙酸，以及鎢酸。

【第22項】 如請求項21之方法，其中在步驟(vi)中，該去蛋白劑為高氯酸。

【第23項】 如請求項22之方法，其中在步驟(vi)中，該去蛋白劑為具有濃度為約0.2 N至約0.4 N且體積為約5 ml的高氯酸。

【第24項】 如請求項1之方法，其中在步驟(vii)中，該離心為各自對該第一血液樣品和該第二血液樣品在約0°C至約5°C下以約19,000 ×g進行約10分鐘。

【第25項】 如請求項1之方法，其中步驟(viii)中的該分析透過酵素連結免疫吸附分析(ELISA)進行。

【第26項】 如請求項1之方法，包含如果該第二樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性與該第一樣品的腸麩醯胺酸合成酶活性之間的差異大於一預定值，則診斷該個體具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與之相關的疾病或其進展的風險。

【第27項】 如請求項1之方法，包含如果該第二樣品中的血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中的血清麩胺酸鹽水平之間的差異大於一預定值，則診斷該個體具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與其相關的疾病或其進展的風險。

【第28項】 如請求項27之方法，其中該預定值為60 $\mu\text{mol/L}$ 的血清麩胺酸鹽。

【第29項】 如請求項1之方法，包含如果該腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比大於預定值，則診斷該個體具有腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與其相關的疾病或其進展的風險。

【第30項】 如請求項29之方法，其中該預定值為19.11%。

【第31項】 一種能夠增加腸麩醯胺酸合成酶活性的試劑在製備用於在有需要的個體體內治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展之藥物的用途。

【第32項】 一種麩醯胺酸合成酶在製備用於在有需要的個體體內治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展之藥物的用途。

【第33項】 如請求項31之用途，其中該試劑為益生菌，用於調節該個體小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群，具體而言是用於口服給藥。

【第34項】 如請求項31之用途，其中該試劑為具有益生質的益生菌，以調節該個體的小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群，具體而言其係用於口服給藥。

【第35項】 如請求項31至34中任一項之用途，其中該疾病為中樞神經系統或精神疾病。

【第36項】 如請求項35之用途，其中神經或精神疾病選自阿滋海默症、肌萎縮性脊髓側索硬化症、自閉症、小腦萎縮、癡呆、癲癇、重度憂鬱症、多發性硬化症、強迫症、帕金森氏症，周邊神經病變、不寧腿症候群、精神分裂症，僵硬人症候群，以及中風。

【第37項】 如請求項1至30中任一項之方法，進一步包含使用硬體、生物晶片、微米及奈米陣列技術或等同物，或與化學或放射性同位素標記技術組合，用於血清麩胺酸鹽水平的自動測量，並且以硬體及軟體完成測量及計算輸出顯示腸麩醯胺酸合成酶缺乏水平的量化、診斷範圍。

【第38項】 一種用於診斷血清中麩胺酸鹽水平的醫療設備或裝置，包含使用硬體、生物晶片、微米及奈米陣列技術或等同物或與化學或放射性同位素組合，並且以硬體及軟體完成測量及計算輸出顯示如請求項37之腸麩醯胺酸合成酶缺乏水平的量化、診斷範圍。

【第39項】 一種用於實施如請求項1至30中任一項之方法的套組，包含能夠特異性檢測該樣品中麩胺酸鹽的試劑，以及用於實施該方法的說明書。

【第40項】 一種生物標記物在製造套組的用途，其中該生物標記物為來自個體的血液樣品中的麩胺酸鹽，該套組有助於定量腸麩醯胺酸合成酶活性，包含在第一時間點從處於禁食狀態的該個體獲得第一(禁食)血液樣品；在對該處於禁食狀態下的個體口服給予含有相當於約5至約15克的麩胺酸(麩胺酸鹽)的水溶液或懸浮液後約15分鐘至約90分鐘的第二時間點從該個體獲得第二(餐後)血液樣

品；分析該樣品以獲得禁食和餐後血清麩胺酸鹽水平；以及比較該水平以確定該腸麩醯胺酸合成酶活性。

【第41項】 如請求項40之用途，其中

根據每個樣品的血清麩胺酸鹽水平之間的差異確定該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性；

根據每個樣品的血清麩胺酸水平的比例確定該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性；或者

透過(A)確定在該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與在該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異，(B)從步驟(A)的結果中減去30 $\mu\text{mol/L}$ ，(C)將步驟(B)的結果除以樣品群的近似最大血清麩胺酸鹽水平(定義為該餐後血清麩胺酸鹽水平減去該禁食血清麩胺酸鹽水平的差異)，以及可視需要地(D)將步驟(C)的結果乘以100以獲得腸麩醯胺酸合成酶缺乏的百分比，以將該個體的腸麩醯胺酸合成酶活性測定為腸麩醯胺酸合成酶缺乏的比率。

【第42項】 如請求項41之用途，其中

該第二樣品中血清麩胺酸鹽水平與該第一樣品中血清麩胺酸鹽水平之間的差異大於30 $\mu\text{mol/L}$ 的血清麩胺酸鹽，表示腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸或具有與之相關的疾病或其進展的風險，或

腸麩醯胺酸合成酶缺乏百分比大於19.11%，表示腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或異常升高(過量)的血清麩胺酸鹽或具有與之相關的疾病或其進展的風險。

【第43項】 一種醫藥組合物，用於在有需要的個體中治療腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展，包含能夠增加該個體腸麩醯胺酸合成酶活性的試劑以及醫藥上可接受的載體。

【第44項】 如請求項43之醫藥組合物，其中該試劑為益生菌，用以調節該個體小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【第45項】 如請求項43之醫藥組合物，其中該試劑為具有益生質的益生菌，用以調節該個體的小腸中產生非致病性麩醯胺酸合成酶的細菌群。

【第46項】 一種醫藥組合物，用於治療在有需要的個體中腸麩醯胺酸合成酶活性缺乏或與其相關的疾病或預防該疾病進展，包含麩醯胺酸合成酶以及醫藥上可接受的載體。