

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580022515.0

[43] 公开日 2007 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 101010589A

[22] 申请日 2005.7.1

[21] 申请号 200580022515.0

[30] 优先权

[32] 2004.7.2 [33] GB [31] 0414894.6

[86] 国际申请 PCT/GB2005/002592 2005.7.1

[87] 国际公布 WO2006/003414 英 2006.1.12

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.4

[71] 申请人 伦敦王室学院

地址 英国伦敦

[72] 发明人 S·洛夫斯通

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司
代理人 张广育 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

阿尔茨海默病的生物标记

[57] 摘要

一种诊断阿尔茨海默病的测试，包括测量取自受试人样本的细胞或体液中的 GSK-3 水平。该测试提供了诊断阿尔茨海默病的相对非侵入性方法，可用于预测患有轻度认知损害的哪些个体将患阿尔茨海默病。

1. 一种预测或诊断阿尔茨海默病的方法，包括测量取自受试人的样本的细胞或体液中 GSK-3 的水平。
2. 权利要求 1 的方法，其中测量 GSK-3 同种型的总量并将其与对照组比较。
3. 权利要求 1 的方法，其中活性 GSK-3 和非活性 GSK-3 的水平均被测量。
4. 权利要求 1、2 或 3 的方法，其中阿尔茨海默病阳性标志通过检测到 GSK-3 蛋白或活性升高 20% 确定。
5. 上述权利要求任一项的方法，其中受试人已被诊断患轻度认知损害。
6. 上述权利要求任一项的方法，其中被测样本为血清或血浆。
7. 一种用于预测或诊断阿尔茨海默病的测试的药盒，包括至少一种如下抗体：
 - 抗 GSK-3 抗体；
 - 抗活性 GSK-3 抗体。
8. 权利要求 7 的药盒，其中抗 GSK-3 抗体为抗 GSK-3 α/β ，抗活性 GSK-3 抗体为抗 GSK-3 α/β Tyr216/219。
9. 权利要求 7 或 8 的药盒，还包含抗非活性 GSK-3 抗体。
10. 权利要求 9 的药盒，其中抗非活性 GSK-3 抗体为抗 GSK-3 α/β Ser21/9。
11. 用于诊断或预测阿尔茨海默病的测试的抗 GSK-3 抗体或抗非活性 GSK-3 抗体。
12. 抗 GSK-3 抗体抗非活性 GSK-3 抗体在制备用于诊断或预测阿尔茨海默病的测试的药盒中的用途。

阿尔茨海默病的生物标记

本发明涉及阿尔茨海默病的诊断,更具体而言涉及该病早期的可靠诊断。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种破坏性疾病,仅英国就有 60 多万人患此病。对 AD 和相关病症在分子水平上的认识的进展较其临床评估的进展快。通过临床交谈和补充调查以排除少见的可治疗的易于引起混淆的疾病即可进行诊断。由于建立了预防或矫正 AD 的具体治疗方法,诊断该病的限制因素与临床更相关,并且可能显著延误对治疗方法的有效评估和使用。

如果一般认定的疾病矫正治疗 (disease modification therapy) 的临床试验可针对患早期痴呆的患者,那么该临床试验的进展可大为增进。由于有证据表明 AD 和其它病症的认知减退在神经病理学衰退开始发生的多年后才发生,因此疾病矫正治疗有可能成为有效的辅助预防策略。但是,对已形成的痴呆难以进行鉴别诊断,因此目前尚不能在全部痴呆综合症状出现前对神经变性过程作出可靠检测。由于没有痴呆前驱期的独立标记(甚至在可证实认知被损害时),很难预测主观记忆受损的哪些个体将发展为完全痴呆。

对变化的测量也有很大问题。因此,在 AD 和相关病症中所有三方面的评估——鉴别诊断、早期诊断和变化测量——目前主要局限于临床评估,并且不使用生物标记。阿尔茨海默病协会和国家老年研究所 (Alzheimer's Association and the National Institute of Ageing) 认识到了对疾病状态的独立标记的迫切需求,他们组织的评议小组制定了成功的生物标记的标准。理想地说,该生物标记应该“可靠、可再现、具有非侵入性、操作简单并且价格便宜”,同时具有 80% 以上的敏感性和特异性。但现在还没有这样的标记。

AD 和额颞痴呆 (fronto-temporal dementia, FTD) 为被称为 tau 蛋白病 (tauopathy) 的一组病症的一部分,所述 tau 蛋白病的特征在于高度磷酸化 tau 蛋白的聚集。已鉴定了多种 tau 激酶,其中糖原合成酶

激酶-3 (GSK-3) 和 CDK-5 似乎是最佳候选。但是, 尽管两者在体外均表现出可使 tau 磷酸化, 但是在神经元和转基因模型中只有一定量的证据表明两者均在体内发生改变。已发现 GSK-3 与神经纤维缠结共存, 并且 CDK5 的前体 p25 大量存在于死后 AD 的脑中。但是, 这种死后研究提出了关于这些观察结果是神经变性的起因还是其作用结果这个问题, 这是涉及直接治疗的重要问题。

Bhat *et al.* (2004; *Journal of Neurochemistry* 89, 1313-1317) 详细描述了作为药物靶标治疗中枢神经系统疾病的 GSK-3。尽管他们表示并未在 AD 大脑中始终观察到的总 GSK-3 水平升高, 但他们指出 AD 脑中的活化形式的 GSK-3 β 有所增加。尽管如此, 他们继续指出抑制 GSK-3 可对 AD 具有治疗效果。

GSK-3 抑制剂在治疗包括 AD 在内的各种疾病中的用途也详细叙述于 Eldar-Finkelman (2002; *Trends in Molecular Medicine* 8, 126-132)。

但是, GSK-3 从未被提出用作合适的 AD 预测或诊断标记。

实验室 AD 诊断测试的已有尝试结果 脑脊液 (CSF) 中蛋白质的改变

AD 患者 CSF 中的各种蛋白质相对于老年对照有所不同。已在 25 个以上的实验—包括 1100 多名 AD 患者中, 通过 ELISA 对 tau 的 CSF 定量进行了大量测量。在这些实验中, AD 患者 tau 的量显著升高。

AD 患者的其它 CSF 实验提供证据表明 AD 患者淀粉状前体蛋白

(APP) 的代谢产物也有所改变。因此, 可溶性 APP 在致病 APP 突变的有症状之携带者和散发性 AD 患者中有所下降, 但是在海绵状脑病患者中也较低。A β 1-42 肽 (以及在某些但不是全部研究中 A β 1-40 肽) 在痴呆患者中也有所降低。因此 CSF 研究发现 AD 患者的两种关键蛋白质均有所改变 (tau 增加, A β 减少), 并且推测许多其它与 AD 的病理生理学相关的蛋白质也有所改变。但是, 没有一种蛋白质对早期变化敏感, 也没有一种蛋白质可区分 AD 和其它神经变性疾病。但是, 在所有这些研究中出现了更为根本的困难, 这是由于腰椎穿刺为侵入性研究, 这将限制其在早期诊断或监测变化的常规研究中的使用。只有在出现了基于血清、血浆或尿液的测试之后, AD 诊断标记才能投入临床应用。

血清或血浆中蛋白质的改变

其它研究已研究了血清或血浆中蛋白质或细胞改变的可能性。尽管一项研究鉴定出血清中 tau 的免疫反应性,但是这与痴呆没有关系。在一项研究中报道 AD 血清中 A β 42 升高,但是该发现难以与 CSF 中的相应降低相一致,因此需要更多研究。最早的 AD 外周标记的报道可能是血小板膜流动性改变(一个越来越受到关注的发现,尽管并不是没有争议)的报道。

WO 2004/027429 公开了一种通过测试血液中谷氨酰胺合成酶诊断 MCI 患者中 AD 的方法和诊断药盒。由于谷氨酰胺合成酶是星形细胞特异的,因此它只能成为神经元损伤的指标。

因此,需要一种仅涉及对外周样本的测试的新的 AD 诊断或预测测试。

根据本发明的第一方面,本发明提供了一种预测或诊断 AD 的方法,包括测量取自受试人的样本的细胞或体液中 GSK-3 的水平。

GSK-3 和 AD 之间已建立了联系,能够对该酶进行检测就意味着可容易地进行该项测试以提供所需诊断。

可测量 GSK-3 同种型的总量并将其与对照比较。这为受试者是否患有或者可能将患 AD 提供了指示。

优选测量活性和非活性 GSK-3 的水平。活性 GSK-3 的升高指示 AD 出现的可能性,但是非活性 GSK-3 的水平没有变化。

优选 AD 阳性标志通过检测到 GSK-3 蛋白或活性升高 20% 确定。由此指示 AD 存在或将来可能出现。

上述任意所要求保护的技术方案中的所要求保护的方法,其中受试人已被诊断患轻度认知损害(MCI)。该测试可特别用于评估 MCI 患者是否可能出现 AD。

上述任意所要求保护的技术方案中的所要求保护的方法,其中被测样本为血清或血浆。由此提供了一种特别简单的测试 GSK-3 存在的方法,而无须侵入性处理。

根据本发明的第二方面,本发明提供了一种用于预测或诊断阿尔茨海默病的测试的药盒,该药盒包括至少一种如下抗体:抗 GSK-3 抗体和

抗活性 GSK-3 抗体。

这些抗体能够实现测量 GSK-3 和/或活性 GSK-3 的水平。

优选地，抗 GSK-3 抗体为抗 GSK-3 α/β ，抗活性 GSK-3 抗体为抗 GSK-3 α/β Tyr216/219。

该药盒还可包含抗非活性 GSK-3 抗体，它优选为抗 GSK-3 α/β Ser21/9。

根据本发明的第三方面，本发明提供了用于诊断或预测阿尔茨海默病的测试中的抗 GSK-3 抗体或抗非活性 GSK-3 抗体。

根据本发明的第四方面，本发明提供了抗 GSK-3 抗体抗非活性 GSK-3 抗体在制备用于诊断或预测阿尔茨海默病的测试的药盒中的用途。

AD 生物标记的方式

作为 tau 激酶，GSK-3 可能参与 AD 的发病机理。但是，对死后 AD 脑中 GSK-3 的研究并未得出一致结果，其它数据提示其它 tau 激酶如 CDK5 可能更重要。然而，另一个学派认为，tau 磷酸化的变化对该病进程全部为次要的而非主要的。已对早期 AD 中 GSK-3 的水平 and 易获得材料如血细胞中的 GSK-3 蛋白和活性标记作为生物标记的可能性进行了研究。之前尚没有对 AD 外周样本中 GSK-3 的研究。但是测量过其它病症外周样本中 GSK-3 蛋白和活性。之前在精神分裂症中分析了 GSK-3，但结果矛盾(Nadri *et al.* (2002) *Psychiatry Research* 112, 51-57)。精神分裂症和阿尔茨海默病之间没有已知关系。

在本研究中，比较了 GSK-3 蛋白（包括该酶的 α 和 β 同种型）的总量和活性酶（Tyr216/219 磷酸化）和非活性酶（Ser9/21 磷酸化）的水平。将白细胞粗制提取物用作样本，使用标准定量蛋白印迹技术分析 GSK-3。

实际应用

方法

受试者：由老年精神病学服务机构（Old Age Psychiatry services）确定患 AD 的人（根据 NINCDS-ADRDA 确定为“很可能(probable)”）。通过南伦敦全科医生（South London GP）根据年龄/性别登记确定正

常老年人。使用已知的系统有效的方法对所有受试者进行评估。被研究受试者分为已发生 AD 组 ($n=27$)、轻度认知损害组 (通常被认为具有 AD 的前驱症状) ($n=16$) 和正常对照组 ($n=15$)。

样本：将新鲜静脉血收集到含 15%K3E 的 BD 真空采血管 (BD vacutainer) 中。将该血以 3000 rpm 离心 8 分钟，然后将血浆等分并于 -70°C 储存。使用 P200 吸头小心收集剩下的血沉棕黄层 (一些红细胞被收集是允许的)。将该血沉棕黄层转移至洁净的微量管中并于 -20°C 储存备用。

分析：将血沉棕黄层样本解冻，加至 15 ml Falcon 管中的 10 ml 红细胞裂解缓冲液 (10 mM Tris、5 mM MgCl_2 和 10 mM NaCl pH 7.6) 中，并在冰上放置 30 min。然后将裂解样本 2800 rpm 离心 10 分钟，弃去上清。再加入 10 ml 裂解缓冲液，振荡该管，然后再在冰上放置 20 分钟。

再将该样本以 2800 rpm 离心 10 分钟，弃去上清。将 300 μl 2 $\times$ 样本缓冲液加入该沉淀中，并将其从 Falcon 管转移到微量管，并在 100°C 加热 10 min。

为进行蛋白质印迹分析，将 10 μl 裂解样本上样于 10% SDS-PAGE 凝胶并在 150 V 分离 60 min。将蛋白质转移到底膜上，该底膜随后被印迹，并用下列抗体在 4°C 检测过夜：用于使总蛋白标准化的 β 肌动蛋白 AC-15 抗体 (Sigma)、抗总 GSK-3 蛋白的 GSK-3 α/β 抗体 (Bioquote)、检测非活性 GSK-3 的 GSK-3 α/β Ser21/9 抗体和检测活性 GSK-3 的 GSK-3 α/β Tyr216/219 抗体 (Signal Transduction)。用化学发光 Western 检测试剂盒 (Amersham) 检测条带。然后用 Bio-Rad GS710 扫描仪扫描该印记，并使用 Bio-Rad Quantity One 图像分析系统对免疫反应条带的光密度进行定量。

结果

结果在图 1 中示出。MCI 和 AD 中的 GSK-3 蛋白 (α 和 β 两种同种型) 和活性 (由 Tyr216/219 磷酸特异性抗体体现) 比正常老年对照的要高 ($p < 0.05$)。非活性 GSK-3 的水平 (由 Ser21/9 抗体体现) 没有改变。约 20% 或以上的 GSK-3 蛋白或活性的量度为 AD 存在或将来可能出现的标志。

结论

这些数据表明：循环白细胞中 GSK-3 的活性得以升高，是因为在阿尔茨海默病中总蛋白的升高和活性酶相对于非活性酶的升高，并且重要的是，在 MCI 的前驱病症中也如此。

可通过开发其它免疫学检测方法例如包括酶联免疫吸附分析（ELISA）改进上述方法。该方法使得其自身易于在临床上应用。因此，外周样本如白细胞或淋巴细胞中的 GSK-3 蛋白和活性的测量提供了对阿尔茨海默病和相关痴呆的有效诊断、早期检测和分期。

对 GSK-3 蛋白和活性的评估可用作早期诊断标记测试，以将患 AD 的人和患可与之混淆的其它病症（例如涉及记忆丧失的其它病症如抑郁、焦虑或引起痴呆的其它病症如血管性痴呆或 Lewy 体痴呆）的人区分开。它也有助于确定患 MCI 的人能否发展为痴呆，或者有助于监测对治疗做出应答的疾病进程（当前仅可获得症状性标记）。因此，该标记有助于监测为疾病矫正所设计的治疗方法的效果，并可用作临床试验中疾病矫正的替代标记。它也有助于预测哪些 AD 患者最易对该疗法做出响应。

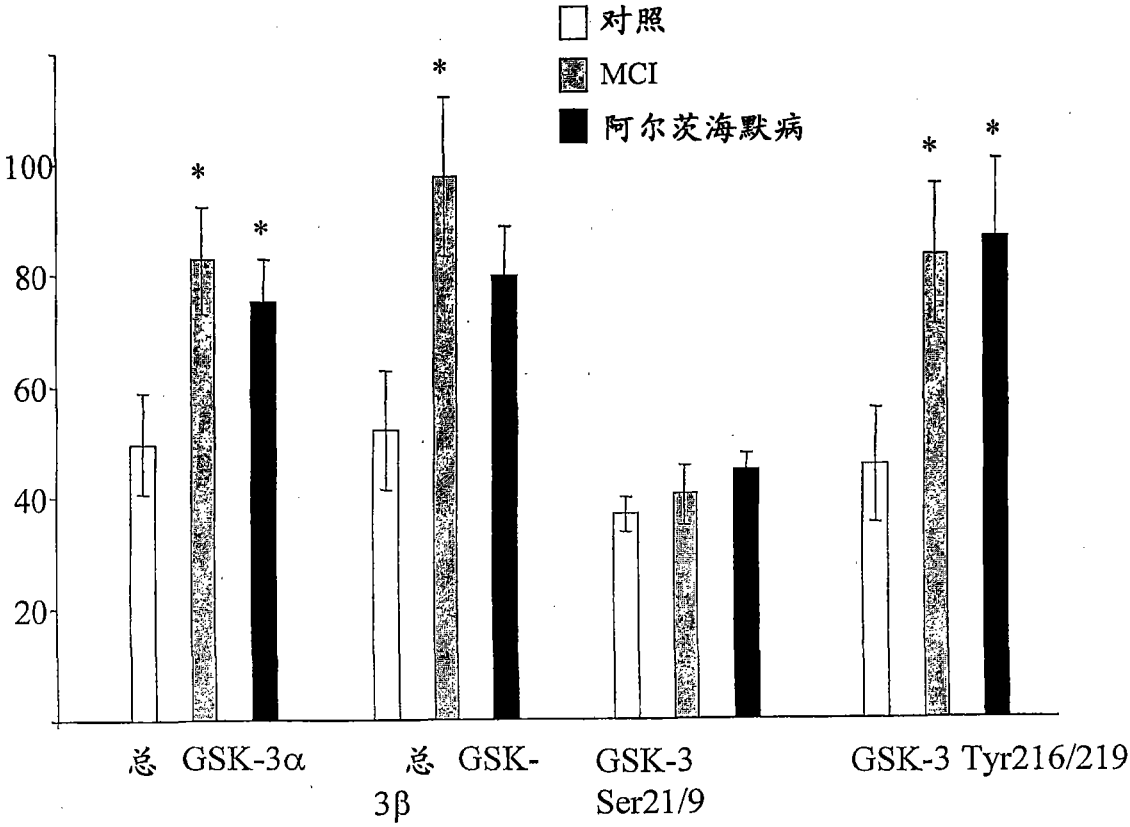


图 1