



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107636468 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(21)申请号 201680032358.X

(22)申请日 2016.04.01

(30)优先权数据

2015901210 2015.04.02 AU

2016900347 2016.02.03 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2016/050248 2016.04.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/154682 EN 2016.10.06

(71)申请人 CRC心理健康有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 S·艾顿 N·福克斯 A·I·布什

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务
所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 24/08(2006.01)

G01N 29/04(2006.01)

A61B 5/055(2006.01)

A61K 31/4412(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

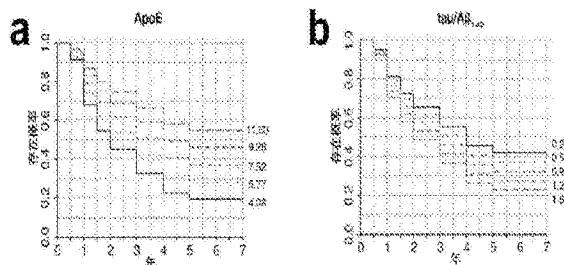
权利要求书2页 说明书27页 附图7页

(54)发明名称

用于预测认知退化的风险的方法

(57)摘要

本发明涉及用于在患者中预测认知退化的风险、监测认知退化的进展和诊断认知退化的方法。本发明进一步涉及通过降低患者的脑铁水平或降低患者的CSF铁蛋白水平来减小患者的认知退化的进展速度的方法。



1. 一种用于预测患者的认知退化的风险的方法,所述方法包括:
测定患者的脑铁的第一水平;
将所述铁的第一水平与脑铁的参考水平进行比较;
测定所述脑铁的第一水平与所述参考水平之间的差异;和
从所述差异推导所述患者的认知退化的风险。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中脑铁水平的所述差异为升高,由此表明增加的认知退化的风险。
3. 一种诊断患者的认知退化的方法,所述方法包括:
测定患者的脑铁的第一水平;
将所述脑铁的第一水平与脑铁的参考水平进行比较;
测定所述脑铁的第一水平与所述参考水平之间的差异;
从所述差异推导所述患者的认知退化。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中脑铁水平的所述差异为升高,由此诊断认知退化。
5. 一种用于监测患者的认知退化的进展的方法,所述方法包括:
在第一时间点测定所述患者的脑铁的水平;
在所述第一时间点之后的第二时间点测定同一患者的脑铁的水平;
任选地将来自所述第一和第二时间点的脑铁的水平与参考水平进行比较;
在各所述第一和第二时间点测定所述脑铁的水平之间的差异;
从来自所述第一和第二时间点的脑铁水平的差异推导认知退化的进展。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述脑铁水平的差异在所述第一和第二时间点之间为升高,以使所述第二时间点的铁水平相对于所述参考水平比所述第一时间点高,由此表明增加的认知退化的进展。
7. 根据权利要求1至6任一项所述的方法,其中所述脑铁的水平测定为选自包括血浆铜蓝蛋白、淀粉样前体蛋白、tau、铁蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白结合蛋白的组的铁相关蛋白水平的量度,或通过磁共振成像MRI、和超声波检查来测定。
8. 根据权利要求1至7任一项所述的方法,其中所述脑铁为皮层铁。
9. 根据权利要求1至8任一项所述的方法,其中所述脑铁的水平测定为脑脊液(CSF)铁蛋白的量度。
10. 根据权利要求1至8任一项所述的方法,其中所述脑铁的水平通过MRI、任选的超场7T MRI或临床3T MRI成像来测定。
11. 根据权利要求1至10任一项所述的方法,其进一步包括:
测定患者的载脂蛋白E (ApoE) 水平;
将所述患者的Apo E的水平与来自认知正常个体的Apo E的参考水平进行比较;
测定所述患者的Apo E水平和参考水平、与对应于所述患者的脑铁水平和脑中的参考水平之间的相关性;和
从所述Apo E水平和所述脑铁水平之间的相关性推导认知退化的风险。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述相关性为正相关,由此表明增加的认知退化的风险。
13. 根据权利要求11或12所述的方法,其进一步包括:

测定所述患者的Apo E基因型。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述Apo E基因型包含Apo ϵ 4等位基因。

15. 根据权利要求11至14任一项所述的方法, 其中所述Apo E水平测定为CSF Apo E水平的量度。

16. 根据权利要求1至15任一项所述的方法, 其进一步包括测定选自淀粉样蛋白 β 肽、Tau、磷酸化-tau、突触核蛋白、Rab3a、A β 、CSF tau/A β 1-42和神经丝蛋白、任选的Tau或A β 的认知缺损的生物标志物的水平。

17. 根据权利要求1至16任一项所述的方法, 其中所述参考水平从认知正常的个体测定。

18. 根据权利要求1至17任一项所述的方法, 其中所述认知退化包括轻度认知缺损(MCI)、向阿尔茨海默病(AD)的MCI转化、和AD。

19. 根据权利要求1至18任一项所述的方法, 其中在测量脑铁、铁蛋白或CSF铁蛋白之前, 将未结合的细胞铁除去从而仅测定铁相关蛋白水平。

20. 一种用于减小患者的认知退化的进展速度的方法, 所述方法包括降低所述患者的脑铁水平。

21. 一种用于减小患者的认知退化的进展速度的方法, 所述方法包括降低所述患者的CSF铁蛋白水平。

22. 一种用于增强患者的认知表现的方法, 所述方法包括降低所述患者的CSF铁蛋白水平。

23. 根据权利要求21或22所述的方法, 其中所述CSF铁蛋白水平通过施用有效量的去铁酮或降铁药物来降低。

24. 根据权利要求20至23任一项所述的方法, 其中所述患者具有Apo E基因型并且任选地携带 ϵ 4等位基因。

25. 根据权利要求20至23任一项所述的方法, 其中所述患者为认知正常患者。

用于预测认知退化的风险的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预测涉及痴呆、认知障碍和/或情感障碍和/或行为障碍的领域、阿尔茨海默病及相关痴呆的领域的认知退化的风险的方法。更特别地,其涉及基因易损性、预后方法和治疗方法。其涉及脑铁和认知退化之间的相关性。优选地,本发明涉及将铁蛋白或更优选的脑脊液(CSF)铁蛋白作为用于诊断、预后和/或监测认知退化的进展和根据认知退化的诊断或预后将个体分成一个以上的类别的方法中的脑铁水平的指标。更具体地,本发明涉及受试者的阿尔茨海默病(AD)的诊断、预后和监测或者通过作为AD生物标志物的与基因型相关的脑铁水平的测定将患有该疾病的个体分类。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(AD)对澳大利亚的已经广泛的负担预计会由于人口老龄化和没有有效的治疗而增加。靶向AD中涉及的已知通路的药物的最近的大规模III期临床试验未能使患者获益。存在的新兴共识为,改变疾病的治疗应该在疾病的临床前阶段期间、当淀粉样蛋白 β (A β)病理现象开始蓄积时提供。AD的早期检测因此对于有效地治疗该疾病是必要的。目前没有临床上可接受的用于AD和例如认知退化等的导致AD的相关病症的预后生物标志物。

[0003] AD脑病理学在认知症状的发作之前约二十年开始发展。因此,抗-AD疗法在该临床前阶段给予时可以有最好的成功机会。有必要识别在AD早期预测认知退化的生物标志物。淀粉样蛋白PET影像是最先进的老年认知退化的生物标志物。由PiB、flutemetamol或florbetapir放射性配体识别的高A β 负荷(burden)(A β +)预测了认知正常(CN)受试者中的3年以上的记忆力综合评分的平均效应大小(average effect size)(斜率之间的差异)约为0.5的认知下降。A β 影像是认知下降的敏感的预测指标(98%),但是研究已经反复显示在脑中已经具有高A β 负荷的年龄60岁以上的认知未受损的人群的高发病率(~20-30%)。现在清楚的是其它因素对于促进认知下降转为阿尔茨海默氏痴呆是必要的。

[0004] 尸检研究(post-mortem study)已经显示tau沉积与A β 负荷相比与认知缺损更密切地关联。已经尝试通过测量患者的例如tau和A β 等的靶点的水平来诊断或差异性诊断AD,所述患者的水平在痴呆患者的脑脊液("CSF")中特别地升高或降低。

[0005] A β 和tau形成AD的脑淀粉样蛋白和缠结的蛋白质构象病(proteopathies)并且已经是广泛的生物标志物研究的对象。皮层淀粉样蛋白和海马体tau的蓄积是AD的特殊病征(pathognomonic),但是也可以视为临床正常而在人体中大量存在。

[0006] 现在理解的是,就其自身,A β 的预后和诊断值是有限的,无论其在体液中或经由正电子发射断层扫描(PET)成像测量。尸检研究发现正常老化中的脑tau蓄积,而且虽然升高的CSF tau是最好的可用预后生物标志物之一,但其仍不是临床上有用的。

[0007] 鉴于以上所述,需要一种改进的方法,其特别是在疾病的发作时,识别患有导致例如AD等的神经障碍的认知退化的那些患者或表现认知下降的那些患者,这可以辅助延缓疾病进展。通过存在于来自疑似患有AD的受试者的生物样本中的标志物的可靠的测量来检测

临床前或早期疾病的能力也会使疾病的治疗和管理更早地开始。相同的试验可以用于监测下降的进展,而没有对昂贵的设备的需要、在目前可用的诊断和预后的方法中经历的不适和副作用。

[0008] 可以在可检测的临床指标的描绘之前在达到早期预后时为临床医生提供帮助并且将避免对实际的验证性脑成像试验的需要的试验将是有益的。

[0009] 随着进行临床试验的用于AD的疾病缓解疗法,识别可以在尽可能早的阶段检测风险个体的疾病的特征的生物标志物存在社会的和经济的必要性,所以抗-AD疗法可以在疾病负担轻微时施用并且其可以防止或延缓功能的和不可逆的认知丧失。

[0010] 因此,期望提供患者的认知退化的简单并且有效的测量,其可以用于诊断、预后或监测患有认知退化的患者并且与患者的认知退化相关。如果早期并且适当地治疗,该早期检测可以辅助延迟AD的发作,或者监测进行针对认知退化的药物治疗的患者的进展。

发明内容

[0011] 在AD的发作之前测量认知退化可以使得能够利用会延缓疾病进展的药物进行早期治疗。

[0012] 因此,在本发明的一方面,提供了一种用于预测患者的认知退化的风险的方法,所述方法包括:

[0013] 测定患者的脑铁的第一水平;

[0014] 将所述脑铁的第一水平与脑铁的参考水平进行比较;

[0015] 测定所述脑铁的第一水平与所述参考水平之间的差异;和

[0016] 从所述差异推导所述患者的认知退化的风险。

[0017] 申请人已经确定了脑铁升高作为导致AD的认知退化的可选/辅助预测。他们提出脑的铁负荷对AD的纵向结果(认知、脑萎缩)在量级上与疾病的更为确定的生物标志物(例如CSF tau和A β)具有相似的影响。

[0018] 在本发明的实施方案中,脑铁的水平可以测定为例如但不限于血浆铜蓝蛋白、淀粉样蛋白前体蛋白、tau、铁蛋白、转铁蛋白和转铁蛋白结合蛋白等的任何铁相关蛋白水平的量度。优选地,脑铁通过铁蛋白水平或通过MRI或通过任何本领域技术人员可用的方法测定。在优选的实施方案中,脑铁的水平测定为脑脊液(CSF)铁蛋白的量度。

[0019] 使用CSF中的主要铁结合蛋白铁蛋白作为指标,高脑铁积累(load)与认知正常、轻度认知缺损和AD受试者的队列在6-7年间较差的认知和脑萎缩相关。

[0020] 在本发明的另一方面,提供了一种诊断患者的认知退化的方法,所述方法包括:

[0021] 测定患者的脑铁的第一水平;

[0022] 将所述脑铁的第一水平与脑铁的参考水平进行比较;

[0023] 测定所述脑铁的第一水平与所述参考水平之间的差异;

[0024] 从所述差异推导所述患者的认知退化。

[0025] 在本发明的又一方面,提供了一种用于监测患者的认知退化的进展的方法,所述方法包括:

[0026] 在第一时间点测定所述患者的脑铁的水平;

[0027] 在所述第一时间点之后的第二时间点测定同一患者的脑铁的水平;

- [0028] 任选地将来自所述第一和第二时间点的脑铁的水平与参考水平进行比较;
- [0029] 在各所述第一和第二时间点测定所述脑铁的水平差异;
- [0030] 从来自所述第一和第二时间点的脑铁水平的差异推导认知退化的进展。
- [0031] 脑铁的水平变化可以另外用于评估患者的认知退化的任何变化。因此,在脑铁的水平监测中,可以在一段时间内监测认知退化的出现,或者跟踪患者的认知退化进展。
- [0032] 在本发明的另一实施方案中,用于测定认知退化的方法进一步包括:
- [0033] 测定患者的载脂蛋白E (ApoE) 水平;
- [0034] 将所述患者的Apo E的水平与Apo E的参考水平进行比较;
- [0035] 测定所述患者的Apo E水平和参考水平、与对应于所述患者的脑铁水平和脑铁的参考水平之间的相关性;和
- [0036] 从所述Apo E水平和所述脑铁水平之间的相关性推导认知退化的风险。
- [0037] 申请人已经发现CSF铁蛋白水平与CSF ApoE水平形成显著的关联并且具有APOE ϵ 4同种型的受试者与没有AD风险等位基因的受试者相比具有升高的CSF铁蛋白。
- [0038] 在又一实施方案中,本方法进一步包括测定认知缺损的生物标志物例如但不限于Tau或A β 的水平,将其单独或者与评估认知退化的方法组合使用。这些另外的标志物可以提高用于确定认知退化的风险的方法的准确度。
- [0039] 在本发明的另一方面,提供了一种用于减小认知退化的进展速度的方法,所述方法包括降低脑铁水平。
- [0040] 在本发明的另一方面,提供了一种用于减小认知退化的进展速度的方法,所述方法包括降低CSF铁蛋白水平。
- [0041] 在本发明的又一方面,提供了一种用于提高认知表现的方法,所述方法包括降低CSF铁蛋白水平。
- [0042] 为了降低脑铁或CSF铁蛋白水平,可以使用例如铁螯合剂如去铁酮(deferiprone)等的化合物。

附图说明

- [0043] 图1显示如通过基线CSF生物标志物预测的从MCI向痴呆的转化。基于极小Cox比例风险模型(参阅表4),转化针对(a) ApoE(铁蛋白=6.5ng/mL, tau/A β ₁₋₄₂=0.69单位)和(b) tau/A β ₁₋₄₂(铁蛋白=6.5ng/mL, ApoE=7.2 μ g/mL)的各五分位数作图。在图的右侧的数字表示五分位数界限(quintile boundary)。
- [0044] 图2显示CSF铁蛋白作为MCI转化为AD的生物标志物的应用。MCI转化为AD的逻辑回归模型的受试者工作曲线(参阅表4)。(a) 基础模型,其包含人口统计学信息:年龄、性别、BMI、受教育年限和APOE ϵ 4状态。(b) 基础模型加CSF铁蛋白。(c) 基础模型加CSF ApoE。(d) 基础模型加tau/A β ₁₋₄₂。AUC-曲线下面积。
- [0045] 图3显示CSF铁蛋白与ApoE水平相关并且根据APOE基因型变化。(a, b) 建立CSF中的铁蛋白的模型。(增补表1的M3)。极小多元回归包含CSF ApoE和APOE ϵ 4。(a) APOE ϵ 4携带者和非 ϵ 4携带者的CSF ApoE和铁蛋白水平的散点图。基因型不影响ApoE与铁蛋白之间的关系;然而,基因型与CSF铁蛋白水平相关,因此对 ϵ 4携带者和非 ϵ 4携带者分别作图。全模型的线性部分的 R^2 为0.341(在图上显示)。(b) APOE ϵ 4携带者和非携带者的CSF铁蛋白水平

(ANCOVA: P 值 = 1.10×10^{-8})。 (c) CSF ApoE的多元回归。APOE ϵ 4携带者和非携带者的ApoE水平 (ANCOVA: P = 2.50×10^{-9})。数据为平均值 $\pm$ 标准差 (s.e.)。‘n’在柱形图中示出。

[0046] 图4显示CSF铁蛋白水平独立地预测认知状态。(a-c) 基线ADAS-Cog13评分的多元回归表示为CSF (a) 铁蛋白 ($L < 5.5$; $H > 7.3$ ng/ml)、(b) ApoE ($L < 5.8$; $H > 7.8$ mg/ml) 和 (c) tau/Ab₁₋₄₂ ($L < 0.35$; $H > 0.76$) 的三分位数。(d) 基线RVLT评分的多元回归表示为CSF铁蛋白三分位数。数据针对极小模型中的基线诊断、性别、受教育年限和AD CSF生物标志物调整。数据为平均值 $\pm$ 标准差。‘n’在柱形图中示出。CN, 认知正常; MCI, 轻度认知缺损。

[0047] 图5显示如通过基线CSF生物标志物预测的从MCI向痴呆的转化。(a) 基于极小Cox比例风险模型的MCI存在率 (survival) (表2), 转化针对铁蛋白的各五分位数 (适用队列的平均值: ApoE = 7.2 mg/ml, tau/Ab₁₋₄₂ = 0.69 单位) 作图。在图的右侧的数字表示五分位数界限。该极小模型仅包含CSF生物标志物。(b) 根据CSF生物标志物的平均诊断年龄的变化。将针对Cox模型中的各五分位数界限的B50%存在率选取的月数针对那些界限的单位值作图。线性模型的梯度用于估计针对分析物的每单位变化 (与图5a和图1相比) 的转化的年龄的变化。(c-e) MCI转化为AD的逻辑回归模型的受试者工作曲线 (表2)。(c) 控制年龄、性别、BMI、受教育年限和APOE ϵ 4状态的基础模型。(d) 基础模型加ApoE和tau/Ab₁₋₄₂。(e) 基础模型加ApoE、tau/Ab₁₋₄₂和铁蛋白。AUC, 曲线下面积。

[0048] 图6显示CSF铁蛋白水平独立地预测脑结构变化。(a-c) 基于CSF (a) 铁蛋白 ($L < 5.5$; $H > 7.3$ ng/ml)、(b) ApoE ($L < 5.8$; $H > 7.8$ mg/ml) 和 (c) tau/Ab₁₋₄₂ ($L < 0.35$; $H > 0.76$) 的三分位数的纵向海马体变化。(d-f) 基于CSF (d) 铁蛋白、(e) ApoE和 (f) tau/Ab₁₋₄₂ 的三分位数的纵向侧脑室变化。这些混合效应模型针对年龄、性别、基线诊断、受教育年限、APOE ϵ 4状态和颅内容积来校正。在基线处的三分位数对于所有模型没有显著性差异, 因此, 对于视觉显示, 基线值保持在各诊断组的校正的平均值。CN, 认知正常; H, 最高三分位数; M, 中间三分位数; MCI, 轻度认知缺损; L, 最低三分位数。

[0049] 图7显示铁蛋白和其它生物标志物对AD表现的影响的示意图。(a) 在认知正常 (虚线) 和发展成AD的受试者 (实线) 中, CSF铁蛋白在随时间推移的认知表现方面对 (b) CSF tau/Ab₁₋₄₂和ApoE具有性质不同的影响。较高的CSF铁蛋白水平通过 $[\alpha]$ 分与较差的基线认知状态 (例如, RVLT) 相关, 其中 $[\alpha] = \ln[\text{铁蛋白 (ng/ml)}] * 1.77$ (表2)。该效应随时间推移是恒定的, 使得 $[\alpha] = [\beta, \gamma]$ 。结果, 铁蛋白引起转化为AD的年龄向左移动 $[\delta]$ 个月, 其中 $[\delta] = \text{铁蛋白 (ng/ml)} * 3$ (图5b)。tau/Ab₁₋₄₂或ApoE的水平与基线认知状态 $[\epsilon]$ 和认知退化的速度二者相关, 使得 $[\epsilon] < [\varphi, \gamma]$ 。该效应引起诊断的年龄移动 $[\eta]$ 个月, 其中 $[\eta] = \text{ApoE (mg/ml)} * 8$ 或tau/Ab₁₋₄₂ (单位) * 17 (图5b)。

[0050] 图8显示如通过由APOE- ϵ 4等位基因状态分类的基线CSF因素预测的认知正常 (CN) 受试者中的认知下降。(A-B) 基线 (A) CSF tau/Ab₁₋₄₂比和 (B) CSF铁蛋白与APOE ϵ 4携带者和非携带者在7年中的RAVLT评分的年变化之间的关联。(C-D) 基线 (C) CSF tau/Ab₁₋₄₂比和 (D) CSF铁蛋白与APOE ϵ 4携带者和非携带者在7年中的ADAS-Cog13评分的年变化之间的关联。(E) 用于预测CN ϵ 4受试者在7年中的稳定的或退化的 (每年 ≥ 1 RAVLT单位变化) 认知的基线CSF铁蛋白的ROC。曲线下面积 (AUC) = 0.96。

具体实施方式

[0051] 在AD的发作之前测量认知退化可以使早期治疗干预延缓疾病进展。在临床前阶段给予的抗-AD疗法将具有最好的成功机会。然而,在某些情况下,痴呆或AD可能没有全面发病,但是患者表现轻度认知缺损(MCI)的症状或为最终可能经历认知退化的认知正常的老年人。监测进展对于管理随时间推移的认知退化是当务之急。

[0052] 因此,在本发明的一方面,提供了一种用于预测患者的认知退化的风险的方法,所述方法包括:

[0053] 测定患者的脑铁的第一水平;

[0054] 将所述脑铁的第一水平与脑铁的参考水平进行比较;

[0055] 测定所述脑铁的第一水平与所述参考水平之间的差异;和

[0056] 从所述差异推导所述患者的认知退化的风险。

[0057] 申请人已经确定了脑铁升高为导致AD的认知退化的可选/辅助预测。铁在发病期间在受影响的区域蓄积,但是直至最近都存在关于其对发病机理的影响的争论。他们已经量化了脑铁对AD的进展的贡献。申请人提出脑的铁负荷对AD的纵向结果(认知、脑萎缩)在量级上与疾病的更为确定的生物标志物(例如CSF tau和A β)具有相似的影响。这些发现与越来越多的暗示AD发病机理中的铁升高的证据组合,已经为脑铁水平作为使用MRI和先进的技术的AD的生物标志物提供了支持。

[0058] AD中的铁升高是未探究的、推定的认知下降的共同决定因素(co-determinate)。直至最近,铁对AD发病机理的贡献仍是不清楚的。在这里,申请人提出了铁对纵向AD结果的影响。

[0059] 本发明涉及评估作为认知表现下降程度的量度的认知退化的风险。当患者的认知表现下降时,会发生引起例如健忘、保持专注的能力降低和解决问题的能力降低等的与老化相关的各种症状的变化。症状通常进展为更严重的病症,例如痴呆和抑郁症、或甚至阿尔茨海默病。

[0060] 轻度认知缺损(MCI)是介于正常老化的预期的认知下降和痴呆的更严重的下降之间的中间阶段。它可涉及记忆、语言、思考和判断力问题,这些问题比正常的年龄相关的变化大。轻度认知缺损引起严重到足以使经历它们的个体或其它人注意到的认知变化,但是这些变化并未严重到足以干扰日常生活或独立的功能。

[0061] 目前,在痴呆、认知障碍和/或情感障碍和/或行为障碍、阿尔茨海默病及相关痴呆的领域中的临床诊断通常需要医疗病史和身体检查的评价,包括神经病学、神经心理学和精神病学评估,所述评估包括记忆和/或心理测试,语言障碍和/或其它局灶性认知缺陷(focal cognitive deficits)(例如失用症、失算症和左右定向障碍)的评估,受损的判断力和一般解决问题的困难性的评估,从渐进式被动至明显的激动范围内的人格变化的评估,以及各种生物、放射学和电生理学试验,诸如测量脑容量或者从例如相关脑区的磁共振成像(MRI)或正电子发射断层扫描(PET)等的神经成像模态得到的活性测量等。申请人已经发现脑铁、铁蛋白和CSF铁蛋白与认知功能之间的相关性,其将使得能够简单评估这些患者的认知退化的风险。

[0062] 如本文所使用的,所提及的认知退化包括轻度认知缺损(MCI)、向阿尔茨海默病(AD)的MCI转化、和AD。然而,本发明也广泛地涉及痴呆、认知障碍和/或情感障碍和/或行为障碍、阿尔茨海默病及相关痴呆的领域。术语“认知退化”可以与“认知下降”互换使用。

[0063] 如本文所使用的术语“认知正常 (cognitively normal, CN) 患者”意指不具有显著的认知缺损或日常生活活动受损的受试者。可以将疑似处于或者处于认知退化的风险中的患者与CN患者进行比较。这包括认知正常但是显示例如脑中的淀粉样蛋白载荷 (amyloid loading) (优选地通过PET成像来确定) 等的指示神经疾病的标志物的水平变化的患者。CN患者的特征将辅助提供可以确定相对于正常所退化的参考水平或参考值。优选地, CN患者不携带Apoε4等位基因。

[0064] 认知退化的风险可以相对于将提供参考水平的CN患者来评估。处于认知退化和/或阿尔茨海默病的风险中的患者包括具有家族史、基因易损性和等位基因缺失的那些。他们可以是易感的并且携带使他们易于发生导致痴呆和AD的更迅速的认知退化的基因。

[0065] 可以根据本发明的任何方法试验和/或治疗的患者包括患有如下的那些患者: 伴有抑郁症治疗史的认知功能障碍、伴有抑郁症史的认知功能障碍、伴有双相疾病 (bipolar disease) 或精神分裂性障碍的认知功能障碍、伴有广义的焦虑性障碍的认知功能障碍、伴有注意力缺陷的认知功能障碍、ADHD障碍或注意力缺陷和ADHD障碍二者、诵读困难、发育迟缓、学校适应性反应、阿尔茨海默病、遗忘型轻度认知缺损、非遗忘型轻度认知缺损、伴有基于神经成像或者通过临床检查的白质病变的认知缺损、额颞叶痴呆、年龄在65岁以下的那些、血清同型半胱氨酸水平低于10nmol/l的那些和具有高血清转铁蛋白水平 (最高的群体四分位数) 的那些的认知障碍。

[0066] 除非另有说明, 如本文所使用的, 术语“个体”、“受试者”和“患者”通常指人类受试者, 例如, 在体内模型 (例如, 用于测试药物毒性) 中有用的非人类哺乳动物的上下文中, 通常指鼠科动物、类人猿、犬科动物、猫科动物和有蹄类动物等 (例如, 小鼠、大鼠、其它啮齿类、兔、犬、猫、猪、牛、绵羊、马、灵长类等)。

[0067] 如本文所使用的, 术语“测定”、“测量”、“评价”、“评估”和“分析”通常指任何形式的测量, 并且包括确定成分在生物样本中是否存在。这些术语包括定量和/或定性测定二者, 其需要生物样本的样本处理和转化步骤。评估可以是相对的或绝对的。短语“测定……的水平”可以包括测定存在的某物质的量, 以及确定其存在或不存在。

[0068] 脑铁的水平可以从疑似患有认知退化的患者或另一时间段的同一患者中测定。可选地, 脑铁的水平可以从已知不患有认知退化的患者中测定, 从而提供参考值或参考水平或对照水平。优选地, 这来自健康对照者或认知正常的个体 (CN)。

[0069] 如本文所使用的, “参考值”或“参考水平”可以互换使用并且可以选自包括绝对值、相对值、具有上限和/或下限的值、范围值、平均值 (mean value)、中值、均值 (average value)、缩小的质心值、或与特定的对照或基线值相比较的值的组。优选地, 其为从与所讨论的生物或试验样本平行制备的已知的样本得到的预定的参考值。应当理解的是可以在测定参考值时使用其它统计学变量。参考值可以基于个体样本值, 诸如, 从来自患有认知退化的个体但在较早的时间点获取的样本得到的值, 或者从来自患者、或除了正在进行试验的个体以外的患有该障碍的其它患者、或为除了CN个体以外的未诊断为患有认知退化的个体的“正常”或“健康”个体的样本得到的值等。参考值可以基于例如来自AD患者或患有认知退化的患者、正常个体或者基于包括或排除待测样本的样本池等的大量的参考样本。

[0070] 对于诊断和预后方法, “参考水平”典型地为预定的参考水平, 例如从患有认知退化的人群得到的水平的平均值。在某些情况下, 预定的参考水平来源于从年龄匹配的人群

得到的水平(例如,为所述水平的平均值或中值)。在本文中公开的一些实例中,年龄匹配的人群包括不患有AD的个体或神经退行性疾病个体。

[0071] 对于提供认知退化的预后或认知退化的风险的方法,虽然也考虑同时测定的参考水平(例如,来源于包括正在进行试验的样本的样本池的参考值),但参考水平通常也可以认为是针对特定的诊断被视为“正常”的预定的水平(例如,未诊断为患有认知退化的年龄匹配的个体的平均水平或者除了AD和/或健康的年龄匹配的个体以外的诊断为患有认知退化的年龄匹配的个体的平均水平)。

[0072] 参考水平也可以是恒定的内部对照的量度从而使第一水平和参考水平的测量值标准化来降低试验间的变异性。内部对照可以是来自例如红十字会等的血库的样本。

[0073] 因此,在实施本发明的方法时,可以从患有认知退化的个体中得到一组样本,并且可以从不患有认知退化的个体中得到一组样本。

[0074] 测得的脑铁的水平可以为脑中的结合或未结合的铁的水平的一级测量值或者其可以为铁的二级测量值(从中可以确定但不一定推导出铁的量的测量值(定性数据)),例如如铁蛋白等的铁相关蛋白水平的量度。因此,如果测量如铁蛋白水平等的铁相关蛋白水平,可以对样本进行处理以排除未结合的细胞铁。

[0075] 在本发明的实施方案中,脑铁的水平可以测定为例如但不限于血浆铜蓝蛋白、淀粉样前体蛋白、tau、铁蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白结合蛋白等的任何铁相关蛋白水平的量度。优选地,脑铁通过铁蛋白水平、或者通过MRI或超声波检查、或者通过任何本领域技术人员可用的方法来测定。

[0076] 因此,本发明提供铁相关蛋白水平(例如血浆铜蓝蛋白、淀粉样前体蛋白、tau、铁蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白结合蛋白等)与关于APOE基因型、CSF tau、Aβ和ApoE水平的信息结合使用,来预测正常人群和患有MCI的个体中的认知下降的速度。

[0077] 铁蛋白是体内的铁贮藏蛋白并且在AD脑组织中升高。在培养体系中,通过神经胶质体的铁蛋白表达和分泌取决于细胞铁水平。CSF中的铁蛋白水平很可能反映脑中的铁水平并且可以具有临床效用。

[0078] 因此,在优选的实施方案中,脑铁的水平测定为脑脊液(CSF)铁蛋白的量度。因此,本发明提供使用CSF铁蛋白浓度(与关于APOE基因型、CSF tau、Aβ和ApoE水平的信息结合)的测量来预测优选显示轻度认知缺损(MCI)的症状的个体中的认知下降的速度。

[0079] 在另一实施方案中,提供使用CSF铁蛋白浓度(优选与关于APOE基因型、CSF tau、Aβ和ApoE水平的信息结合)的测量来预测不显示症状(正常)的个体中的认知下降的速度。

[0080] 使用CSF中主要的铁结合蛋白铁蛋白作为指标,高脑铁积累与认知正常(n=91)、轻度认知缺损(n=144)和AD(n=67)受试者的队列在6-7年间较差的认知(例如ADAS-Cog;图5a)和脑萎缩(例如侧脑室-结构MRI;图5b)相关。CSF铁蛋白对这些和其它AD结果的量级影响与tau/Aβ42比-AD的金标准CSF生物标志物是可比的。CSF铁蛋白在研究期间独立地预测了向AD的进展(图5c)并且改善了tau/Aβ的预测潜力。铁蛋白的每1ng/mL的增加将诊断提前3个月。因此,申请人已经证明了脑铁在AD中的作用,并且提出将脑铁作为AD预后的靶标。

[0081] 在进行本申请要求保护的方法时,优选确定脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平。如本领域技术人员将认识到的,脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平(例如,浓度、表达和/或活性)可以定性或定量。优选地,脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白

的水平定量为DNA、RNA、脂质、碳水化合物、蛋白质、金属或蛋白质表达的水平。

[0082] 显而易见的是,多种定性和定量技术可以用于确定脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平。这些技术可以包括2D DGE、例如多反应监测质谱法(MRM-MS)等的质谱法(MS)、实时(RT)-PCR、核酸阵列;ELISA、功能分析、酶分析、各种免疫学方法、或者生化方法例如毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱、二维液相电泳(2-D-LPE)、或它们在凝胶电泳中的迁移模式、或MRI。

[0083] 然而,对本领域技术人员将是显而易见的是用于确定脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平的合适的技术将取决于分子的特征。例如,如果分子为铁,则MRI可以用于量化分子的水平。

[0084] 在另一实例中,如果测定铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的存在,铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平可以利用第二检测试剂例如铁蛋白特异性的标记抗体通过ELISA技术来测定。为了提高准确度,取自患者的CSF样本可以在检测铁水平之前预处理以除去其它非铁结合分子或者除了铁蛋白以外的其它铁结合分子。因此,样本可以在评估前处理。

[0085] 在其中铁结合分子为蛋白质的非限制性实例中,蛋白质的水平也可以通过免疫分析检测。本领域技术人员会将免疫分析视为使用抗体来特异性地结合至抗原(即蛋白质)的分析。因此,免疫分析的特征在于检测蛋白质与抗体的特异性结合。用于检测蛋白质的免疫分析可以是竞争性或非竞争性的。非竞争性免疫分析是其中直接测量捕获的分析物(即蛋白质)的量的分析。在竞争性分析中,存在于样本中的分析物(即蛋白质)的量通过测量由存在于样本中的分析物(即蛋白质)从捕获试剂(即抗体)置换(或竞争掉)的(外源性)分析物的添加量而间接测量。

[0086] 在竞争性分析的一个实例中,将已知量的(外源性)蛋白质添加至样本中并且随后使样本与抗体接触。结合至抗体的(外源性)蛋白质的添加量与该外源性蛋白质添加之前的样本中的蛋白质的浓度成反比。在另一分析中,例如,抗体可以直接结合至使它们固定化的固体底物。这些固定化的抗体随后捕获存在于试样中的目标蛋白。其它免疫学方法包括但不限于流体或凝胶沉淀反应、免疫扩散(单向或双向)、凝集分析、免疫电泳、放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)、Western印迹、脂质体免疫分析、补体结合分析、免疫放射分析、荧光免疫分析、蛋白A免疫分析或免疫PCR。

[0087] 铁蛋白可以通过酶联免疫吸附分析(ELISA)的手段或任何本领域技术人员可用的方法方便地测量。

[0088] 因此,能够提供患有或很可能发展为导致例如AD等的疾病的认知退化的个体的指征的脑铁水平可以借助任何本领域技术人员可用的方法通过测量优选铁蛋白、最优选CSF铁蛋白来测量。

[0089] CSF铁蛋白在通常通过腰椎穿刺(lumbar puncture或spinal tap)从脑脊液得到的CSF样本中测量。作为一个实例,可以将CSF采集至聚丙烯管或注射器中,并且随后转移至聚丙烯传送管而没有任何离心步骤,之后在采集后1小时内在干冰上冷冻。可以立即分析它们,或者在-80℃下冷冻。CSF铁蛋白的蛋白水平使用Myriad Rules Based Medicine平台(Human Discovery MAP,v1.0)来测定。

[0090] 脑铁水平可以使用任何可用的能够特异性地测定来自受试者或待测个体的脑铁的水平测量技术来测量。测量可以是定量的或定性的,只要测量能够指示脑铁的水平高

于或低于来自参考样本的参考值即可。

[0091] 在另一优选的实施方案中,脑铁的水平通过MRI、任选的超场 (ultra field) 7T MRI或临床3T MRI成像来测定。

[0092] 存在三种主要的方法来使用MRI量化体内的铁。1) T2*映射:铁的存在局部地干扰质子的相干自旋,缩短T2*,其可以用T2*映射 (使用多梯度回波, GRE) 成像。2) QSM:铁的存在影响组织的磁化系数,也可以使用梯度回波成像来映射。3) 场依赖性弛豫速率增加 (FDRI):通过使用在两个不同的场强 (3T和7T) 下采集的T2w,可以估计铁水平。

[0093] 虽然一篇重要的文献已经研发了在 $\leq 3T$ 下使用MRI来报告AD (见下文) 和其它疾病中皮层铁的截面增大,但已经有关于MRI从其它组织变化中区分铁蓄积的能力的警示,对于推断铁含量,7T与3T相比具有主要的优势。一者是更高的信噪比,其可以用于增加空间分辨率和/或缩短扫描时间。7T具有对磁化率 (susceptibility) 的敏感性增加的益处。随着场强增大,铁敏感图像的对比度增强。这已经在梯度回波相位图像中证明。伴有分辨率增加的磁化率敏感性已经导致了使用7T来量化例如AD40-42帕金森氏病和肌萎缩性侧索硬化症等的神经退行性疾病中的铁。研究已经显示海马体和皮质层的增强的可视化归因于增加的7T的铁敏感性。预期增加的在7T下对铁的敏感性可以降低方差 (variance) 并且改善统计功效。与3T相比,7T的更高的空间分辨率允许相中的皮质分层可视化,有利于对皮质层之间的铁沉积的研究。

[0094] 在过去的20年中,MRI已经用于测量脑铁含量,揭示了老化的脑中的铁升高,而这在AD中被夸大了。在横断面研究中,主观受损的个体和患有AD的个体的脑铁浓度和记忆功能之间存在负相关,然而,尚没有对通过MRI测量的铁对AD结果的影响的纵向研究。申请人目前提出,高脑铁含量转化为较早的发病年龄。

[0095] 基于如优选经由CSF铁蛋白测量的相对于参考水平的高脑铁含量转化为认知退化的发现,认为本发明中脑铁和CSF铁蛋白的增加将转化为患者和参考水平之间的差异。该差异辅助推导认知退化的风险。

[0096] 脑铁水平的差异在患者和参考水平之间为升高将表明认知退化的风险增加。升高的程度将提供是否存在认知退化的风险的诊断或评估的指征。小的升高可以表明风险,而高的升高很可能指示认知退化。患者和参考水平之间的升高不断增加将表明认知退化的风险增加。

[0097] 为了简洁的目的,在本文中包含的一些说明将在AD的背景下进行。然而,认为本领域技术人员将能够理解本发明也可以用作预后或诊断,或者用于辅助例如但不限于多发性硬化、大脑性瘫痪、帕金森氏病、神经病 (影响周围神经的病症)、痴呆、路易体痴呆 (DLB)、多发梗塞性痴呆 (MID)、血管性痴呆 (VD)、精神分裂症和/或抑郁症、认知缺损和额颞叶痴呆等的其它神经障碍的进展的诊断/预后和/或监测。

[0098] 在本发明的另一方面,提供了一种诊断患者的认知退化的方法,所述方法包括:

[0099] 测定患者的脑铁的第一水平;

[0100] 将所述脑铁的第一水平与脑铁的参考水平进行比较;

[0101] 测定所述脑铁的第一水平与所述参考水平之间的差异;

[0102] 从所述差异推导所述患者的认知退化。

[0103] 申请人的高脑铁积累与较差的认知相关的发现可以用于诊断认知退化。在患者水

平和参考水平之间为升高的脑铁水平的差异将指示认知退化的诊断。升高的程度将提供认知退化的严重性的指征。小的升高可以表明风险,而高的升高很可能指示认知退化的诊断。患者和参考水平之间的升高不断增加将指示认知退化增加。

[0104] 本领域技术人员将理解,诊断是指尝试确定或识别可能的疾病或障碍的过程,和通过该过程得出的意见。

[0105] 此外,如有必要,可以验证或确认患者的认知退化的阳性诊断,例如测定淀粉样蛋白积累 (amyloid load) 或淀粉样蛋白水平来确认高的新皮层淀粉样蛋白的存在。通常互换使用的术语淀粉样蛋白积累或淀粉样蛋白水平,或者淀粉样蛋白和淀粉样蛋白片段的存在,是指在脑中沉积的脑淀粉样蛋白 β (A β 或淀粉样蛋白- β) 的浓度或水平,淀粉样蛋白- β 肽为(老年性)斑块的主要成分。

[0106] 患者也可以使用包括PET和MRI的成像技术、或者例如当与PET一起使用时在例如PiB等的诊断工具的辅助下(也称为PiB-PET)确认为认知退化阳性。优选地,认知退化阳性的患者为PiB阳性。更优选地,患者具有与高的新皮层淀粉样蛋白积累 (PiB阳性) 对应的标准摄取值比率 (standard uptake value ratio, SUVR)。例如,目前的实践认为SUVR可以反映1.5为脑中的高水平并且低于1.5可以反映脑中的新皮层淀粉样蛋白积累的 low 水平。本领域技术人员将能够确定什么被认为是新皮层淀粉样蛋白积累的高或低水平。如本领域技术人员将认识到的,患者也可以通过测量来自CSF的淀粉样蛋白 β 和tau而确认为神经疾病阳性。

[0107] 此外,在表征脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的诊断能力时,本领域技术人员可以计算针对这些生物标志物的诊断分界点 (cut-off)。该分界点可以是数值、水平或范围。诊断分界点应当提供辅助尝试确定或识别认知退化的过程的数值水平或范围。

[0108] 例如,如果脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平高于诊断分界点,则所述水平可以诊断认知退化。可选地,如本领域技术人员将认识到的,如果脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平低于诊断分界点,则所述水平可以诊断认知退化。

[0109] 用于脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的诊断分界点可以使用多个本领域技术人员已知的统计分析软件程序得出。作为实例,测定诊断分界点的常用技术包括测定正常个体的平均值和使用例如具有规定的灵敏度和特异度值的 $\pm 2SD$ 和/或ROC分析。典型地,灵敏度和特异度大于80%是可接受的,但是这取决于各疾病情况。如果在与开发试验不同的临床环境中使用,则诊断分界点的定义可能需要重新得出。为了实现这一点,测量对照个体来确定平均值 $\pm SD$ 。如本领域技术人员将认识到的,使用在从对照个体得到的测量值以外或远离从对照个体得到的测量值的 $\pm 2SD$ 可以用于识别在正常范围以外的个体。可以认为在正常范围以外的个体是疾病阳性的。在新的临床环境中得到的值随后将与历史值进行比较来确定根据统计检验判断旧的诊断标准是否仍是适用的。已知具有病状的个体也将包括在分析中。在疾病和对照状态样本二者均可用的情况下,可以选择具有选定的灵敏度和特异度 (典型地80%) 的ROC分析方法来确定指示认知退化的诊断值。诊断分界点的确定也可以使用本领域技术人员已知的统计模型来确定。

[0110] 可以预期的是,在本发明的方法中使用脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白,在提供神经疾病的出现的预后评价时也可以与本领域已知的神经疾病的临床评估的其它方法组合使用。

[0111] 如有必要,确定性诊断可以例如通过包括PET和MRI的成像技术、或者例如当与PET一起使用时在例如PiB等的诊断工具的辅助下(也称为PiB-PET)验证或确认。

[0112] 在应用本发明的方法时,认为可以进行关于患者中的认知退化的出现的临床或近临床(near clinical)测定并且其对于确定性诊断可以是或不是决定性的。

[0113] 类似地,本发明的方法可以用于在认知退化的预后中提供辅助并且将被认为辅助进行关于认知退化的出现或性质的临床前测定的评估。这将被认为是指发现了哺乳动物具有显著提高的发展认知退化的可能性。

[0114] 本领域技术人员将理解的是,临床测定认知退化的出现与脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平(与关于APOE基因型、CSF tau、A β 和ApoE水平的信息结合)的评估组合,将被认为涉及如下的评估:包括但不限于记忆和/或心理测试、语言障碍和/或其它局灶性认知缺陷(例如失用症、失算症和左右定向障碍)的评估、受损的判断力和一般解决问题的困难性的评估,从渐进式被动至明显的激动范围内的人格变化的评估。可以预期的是,本发明的方法在提供神经疾病的出现的预后评价时也可以与本领域已知的神经疾病的临床评估的其它方法组合使用。

[0115] 如有必要,疑似认知退化的患者的认知退化的确定性诊断例如通过包括PET和MRI的成像技术、或者例如当与PET一起使用时在例如PiB等的诊断工具的辅助下(也称为PiB-PET)验证或确认。因此,本发明的方法可以在预筛选时或以预后方式使用来评估患者的认知退化,并且如有必要,进一步的确定性诊断可以例如用PiB-PET等进行。

[0116] 在本发明的又一方面,提供了一种用于监测患者的认知退化的进展的方法,所述方法包括:

[0117] 在第一时间点测定所述患者的脑铁的水平;

[0118] 在所述第一时间点之后的第二时间点测定同一患者的脑铁的水平;

[0119] 任选地将来自所述第一和第二时间点的脑铁的水平与参考水平进行比较;

[0120] 在各所述第一和第二时间点测定所述脑铁的水平差异;

[0121] 从来自所述第一和第二时间点的脑铁水平的差异推导认知退化的进展。

[0122] 脑铁的水平变化可以另外用于评估患者的认知退化的任何变化。因此,在脑铁的水平监测中,可以在一段时间内监测认知退化的出现,或者跟踪患者的认知退化进展。

[0123] 因此,来自患者的脑铁的水平变化可以用于评估认知功能和认知退化、诊断或者辅助认知退化的预后或诊断和/或在患者中监测向AD的进展(例如,跟踪患者的进展和/或跟踪患者中的药物或手术治疗的效果)。

[0124] 可以预期也涉及相对于之前取自相同的哺乳动物的样本的改变的水平。因此,可以不要求与例如来自CN样本等的参考水平进行比较。在这一点上,参考水平可以是在更早的时间点的脑铁的水平。

[0125] 可以预期的是,脑铁的水平也可以在多于一个时间点从患者中得到。通过涉及监测患者的认知退化的进展的本发明的方法,这样的连续采样将被认为是可行的。连续采样可以在任何期望的时间轴上进行,例如每月、每季度(即,每三个月)、每半年、每年、每两年、或者更不频繁。测得的水平和预定的水平之间的比较可以在每次测量新样本时进行,或者与水平相关的数据可以保持更低频率的分析。

[0126] 在另一实施方案中,脑铁水平的差异在第一和第二时间点之间为升高以使第二时

间点的铁水平相对于参考水平比第一时间点高,由此表明增加的认知退化的进展。申请人已经提出具有相对低的铁蛋白($<6.6\text{ng/mL}$)的患者在可预见的未来将不会退化。这可以潜在地解释为什么30%的 $\epsilon 4+\text{ve}$ 受试者不发展成AD。相反地,高于该阈值的铁蛋白的每单位增加预示更迅速的退化。

[0127] 本发明的方法可以另外用于监测给予哺乳动物的治疗的效果,也称为治疗监测,以及患者管理。脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平的变化可以用于评价患者对药物治疗的响应。以这种方式,也可以通过检查在治疗开始之后患者中的脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平来开发新的治疗方案。

[0128] CSF样本可以在对铁蛋白水平的评估之前预处理以除去未结合的铁。

[0129] 本发明的方法因此可以辅助监测临床研究,例如,用于针对神经疾病的特定的治疗的评价。例如,可以测试化合物使患有认知退化的患者中的脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平正常化至在对照或CN患者中发现的水平的能力。在治疗的患者中,可以测试化合物使脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平维持在对照或CN患者中所观察到的水平或靠近所述水平的能力。

[0130] 在本发明的另一实施方案中,用于测定认知退化的方法进一步包括:

[0131] 测定患者的载脂蛋白E (ApoE) 水平;

[0132] 将所述患者的Apo E的水平与Apo E的参考水平进行比较;

[0133] 测定所述患者的所述Apo E水平和参考水平、与对应于所述患者的脑铁水平和脑铁的参考水平之间的相关性;和

[0134] 从所述Apo E水平和所述脑铁水平之间的相关性推导认知退化的风险。

[0135] 申请人已经发现CSF铁蛋白水平与CSF ApoE水平形成显著的相关性(图3a)并且具有APOE $\epsilon 4$ 同种型的受试者与没有AD风险等位基因的受试者相比具有升高的CSF铁蛋白(图3b)。尸检前额皮层中的ApoE和铁蛋白mRNA水平的分析确认了与该CSF蛋白研究(校正了年龄,基因型未知)相似的强度和方向的相关性。APOE $\epsilon 3$ 和 $\epsilon 4$ 敲入小鼠的脑铁含量的测量值也揭示了具有 $\epsilon 4$ 敲入的小鼠与WT(+32%;3月龄的小鼠)相比具有升高的铁。

[0136] 显著地,HFE的铁蓄积突变(引起血色素沉着病)具有与APOE $\epsilon 4$ 的上位相互作用从而增加AD风险和使疾病发作加快5.5年。申请人提出APOE $\epsilon 4$ 影响CSF铁蛋白和认知表现之间的关联。在纵向记忆表现的混合效应模型(RAVLT;7年)中,升高的CSF铁蛋白预示APOE $\epsilon 4$ 携带者($p=0.003$)而不是非携带者中加快的认知下降(图5)。因此,携带APOE $\epsilon 4$ 等位基因引起脑铁升高,和如使用作为脑铁状态的报告子的CSF铁蛋白测量的增加的对铁介导的损伤的易损性。

[0137] 申请人还提出CSF铁蛋白在预测7年中正常人群中的认知下降时与确定的AD风险变量、APOE- $\epsilon 4$ 、CSF tau/ $\text{A}\beta_{1-42}$ 和ApoE组合。

[0138] 因此,可以应用申请人的这些发现来改进用于评估认知退化的方法。在优选的实施方案中,认知退化通过使用CSF铁蛋白测量脑铁来确定。从这些发现中,携带APOE $\epsilon 4$ 等位基因和高铁的患者易患认知退化。

[0139] 在进一步的实施方案中,脑铁或CSF铁蛋白水平在预测正常人群中的认知下降时可以与例如但不限于APOE- $\epsilon 4$ 、CSF tau/ $\text{A}\beta_{1-42}$ 和ApoE等的确定的AD风险变量组合。

[0140] 因此,脑铁和APOE $\epsilon 4$ 等位基因之间的正相关可以表明增加的认知退化或下降的风

险。

[0141] 在又一实施方案中,本方法进一步包括测定例如但不限于淀粉样蛋白 β 肽、tau、磷酸化-tau (phospho-tau)、突触核蛋白、Rab3a、A β 和神经丝蛋白等的认知缺损的生物标志物的水平。这些另外的生物标志物可以单独或者与评估认知退化的方法组合使用。本发明的方法不需要限于仅评估脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白来确定认知退化。这些另外的标志物可以提高用于确定认知退化的风险的方法的准确度和减少评估中的假阳性。

[0142] 在本发明的另一方面,提供了一种用于减小认知退化的进展速度的方法,所述方法包括降低脑铁水平。

[0143] 该方法基于正常人群在CSF铁蛋白水平越高时认知表现越差的发现。通过测量CSF铁蛋白水平,申请人已经将测量值与脑铁和认知退化的量度相关联。不受理论限制,降低脑铁将降低与认知退化相关的CSF铁蛋白水平。

[0144] 在本发明的另一方面,提供了一种用于减小认知退化的进展速度的方法,所述方法包括降低CSF铁蛋白水平。

[0145] 在本发明的又一方面,提供了一种用于提高认知表现的方法,所述方法包括降低CSF铁蛋白水平。

[0146] 为了降低脑铁或CSF铁蛋白水平,可以使用例如铁螯合剂如去铁酮等的化合物。然而,会类似地降低脑铁或CSF铁蛋白的其它化合物也包括在本发明的范围内。

[0147] 对患者施用铁螯合剂可以降低脑或CSF中的以CSF铁蛋白的形式的铁的水平。这对于显示认知退化的患者将是特别有效的。由于高CSF铁蛋白水平与高脑铁相关,携带Apo ϵ 4等位基因的患者也将从该治疗中获益。然而,不携带Apo ϵ 4的CN患者也可以从降低CSF铁蛋白水平的脑铁中获益。

[0148] 铁螯合剂或降铁药物的施用可以经由例如静脉内、皮下、肠胃外、口服或局部给药等的任何合适的途径来进行,只要药物能够到达待治疗区域来降低铁水平即可。

[0149] 改进可以通过如本文所述的评估认知退化的方法来确定。

[0150] 在另一方面,本发明提供了可以用于患者的认知退化的诊断和/或预后、或者用于识别处于认知退化的风险中的患者的试剂盒。

[0151] 因此,本发明提供了可以根据本发明的方法用于患者的认知退化的诊断或预后、或者用于识别处于认知退化的风险中的患者、或者用于监测给予患有认知退化的患者的治疗的效果的试剂盒。

[0152] 如所考虑的试剂盒可以包含一组试剂,其可以包括但不一定限于对测定脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平是特异性的多肽、蛋白和/或寡核苷酸。因此,可以用于测定脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平来表明受试者患有认知退化的试剂盒的试剂将能够用于将检测脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的任何方法,所述方法例如但不限于2D DGE、例如多反应监测质谱法(MRM-MS)等的质谱法(MS)、实时(RT)-PCR、核酸阵列;ELISA,功能分析,酶分析,各种免疫学方法,或者生化方法例如毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱、二维液相电泳(2-D-LPE)、或者凝胶电泳中它们的迁移模式等。例如,可以预期的是,可以使用识别脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的任何抗体。

[0153] 在优选的实施方案中,本发明提供了在用于针对认知退化的患者的筛查、诊断或

预后的方法中使用的试剂的试剂盒,其中所述试剂盒提供了一组试剂来量化来自哺乳动物的样本中的至少脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平。

[0154] 在更进一步的实施方案中,试剂盒进一步提供测定例如但不限于APOE- ϵ 4、CSF tau/Ab $_{1-42}$ 和ApoE等的其它AD风险变量的组件(means)用于与该组试剂组合使用来量化来自哺乳动物的样本中的脑铁、优选铁蛋白或更优选CSF铁蛋白的水平。AD风险变量可以通过量化淀粉样蛋白 β 肽、tau、磷酸化-tau、突触核蛋白、Rab3a、A β 或神经丝蛋白来测定。因此适于测定这些风险变量的试剂可以包括在试剂盒中。

[0155] 本领域技术人员可以使用任何合适的试剂来测定和量化AD风险变量、APOE- ϵ 4、CSF tau/Ab $_{1-42}$ 和ApoE并且更优选淀粉样蛋白 β 肽、tau、磷酸化-tau、突触核蛋白、Rab3a、A β 和神经丝蛋白的存在。

[0156] 本发明的其它方面在阅读以下本发明的特定实施方案的描述后对于本领域普通技术人员将变得显而易见。

[0157] 其中术语“包括”、“包含”、“包含于”或“含有”用于本说明书中(包括权利要求),它们将解释为说明所述特征、整体、步骤或组分的存在,但是不排除一种以上的其它特征、整体、步骤或组分、或其组的存在。

[0158] 现在将通过参考以下非限制性实施例来更全面地描述本发明。

[0159] 实施例

[0160] 实施例1:脑脊液中的铁蛋白水平预测阿尔茨海默病结果并且由APOE调节

[0161] 铁蛋白是身体的主要铁贮藏蛋白;通过使用铁蛋白的脑脊液(CSF)水平作为指标,在阿尔茨海默病神经成像启动计划(ADNI)队列中研究脑铁状态对纵向结果的影响。

[0162] 本实施例显示基线CSF-铁蛋白数据与阿尔茨海默病神经成像启动计划(ADNI)前瞻性临床队列中7年的生物标志物、认知、解剖和诊断结果的关联。其显示CSF铁蛋白水平在预测AD的各种结果方面与更为确定的AD CSF生物标志物tau/Ab $_{1-42}$ 比和载脂蛋白E(ApoE)水平相比具有相似的用途。

[0163] (i) 方法

[0164] ADNI描述。数据在2014年7月15日从阿尔茨海默病神经成像启动计划(ADNI)数据库(adni.loni.usc.edu)下载。之前已经详细地描述了ADNI研究(Ali-Rahmani等(2014))。

[0165] ADNI 1的招募入选和排除标准。入选标准如下:(1) Hachinski缺血评分 ≤ 4 ;(2) 允许的药物在筛查前4周稳定;(3) 老年抑郁量表评分 < 6 ;(4) 视觉和听觉敏锐度对于神经心理学测试是足够的;良好的总体健康状态,不患有排除登记的疾病;(5) 六年级的教育或等同的工作经历;(6) 能够流利地说英语或西班牙语;(7) 具有每周10小时的亲自或通过电话联系的学习伙伴,其可以陪同参与者进行门诊随访。

[0166] 不同的诊断组的标准总结在表1中。各组是年龄匹配的。认知正常(CN)受试者必须没有显著的认知缺损或受损的日常生活活动。临床诊断的AD患者必须已经患有轻度AD并且必须要满足美国国立神经病、语言障碍和卒中研究所-阿尔茨海默病及相关疾病协会关于可能的AD39的标准,然而轻度认知缺损受试者(MCI)不能满足这些标准,其具有基本完整的一般认知以及功能性能,但是符合MCI的定义的标准。

[0167] CSF生物标志物采集和分析。CSF在ADNI参与者的子集中基线处采集一次。CSF中的Ab $_{1-42}$ 和tau水平使用Luminex平台测量。ApoE和铁蛋白的蛋白水平使用Myriad Rules

Based Medicine平台 (Human Discovery MAP, v1.0; 见ADNI材料和方法) 测量。CSF因子H (FH) 水平使用多重人神经变性试剂盒 (HNDG1-36K; Millipore, Billerica, MA) 根据制造商的过夜方案经少量改动来测量。

[0168] 将CSF采集至提供给各位点的聚丙烯管或注射器中, 并且随后转移至聚丙烯传送管而没有任何离心步骤, 之后在采集后1小时内于干冰上冷冻用于随后在干冰上连夜运送至在宾夕法尼亚大学医学中心的ADNI生物标志物中心实验室。等分试样 (0.5ml) 从在室温下解冻 (1h) 并且轻轻混合之后的这些样本制备。等分试样在-80℃下在条形码标记的聚丙烯小瓶中保存。将新鲜的、之前从未解冻过的、针对纵向时间点的各受试者的集合的0.5ml的等分试样, 在用于本研究的相同的分析批 (analytical run) 中的相同的96孔板上分析, 从而使批间和试剂盒批次的变异源最小化。一式两份的样本的批内变异系数 (%CV), 对于Ab1-42而言范围为2.5至5.9%, 对于tau而言为2.2-6.3%, 并且CSF池样本的批间%CV, 对于Ab1-42而言范围为5.1至14%, 对于tau而言为2.7-11.2%。

[0169] 载脂蛋白E (ApoE) 和铁蛋白的蛋白水平使用Rules Based Medicine (Human Discovery MAP, v1.0) 测定。关于步骤和标准操作程序的进一步的信息可以在之前的出版物 (Shaw, L.M., 等 (2011) 和McKhann, G., 等 (1984)) 中和网上 (<http://www.adni-info.org/>) 找到。

[0170] 结构MRI获取和处理。分析中包括利用1.5-T MRI和在1.2mm同位素靶的周围具有可变分辨率的矢状量的3D MPRAGE的受试者。参见 (www.loni.ucla.edu/ADNI) 并且详见 (Shaw, L.M. 等 (2009))。所利用的海马体和腹侧容积是在2014年7月15日下载的作为ADNIMERGE R程序包的一部分的ADNIMERGE主表中的那些。仅CN和MCI受试者包括在MRI分析中。在基线、6个月、1年、然后每年一次持续6年进行MRI扫描。

[0171] 统计分析。所有统计工作使用程序包ggplot2 (Team, R.C.R: (2014))、nlme (Wickham, H. (2009))、car (Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. & Team, R.C. (2014)) 和Deducer (Fox, J. & Weisberg, S. (2011)) 用R (版本3.1.0) (Jack, C.R., Jr., 等. (2008)) 进行。测试了应用回归模型、残差的正态分布和非多重共线性所必需的条件。所有模型均满足这些条件。极小模型 (minimal model) 使用赤池信息准则 (AIC) 和贝叶斯信息准则 (BIC) 经由逐步回归得到, 确保维持核心假设。如果受试者有一个以上的协变量丢失, 则将他们从分析中排除。在受试者过早地离开研究时, 在建模中将他们的数据包括至他们离开的点。将以下变量进行自然对数转换来确保正态性: CSF铁蛋白、因子H、tau和血红蛋白, 而ADAS-cog13是开平方转换的。

[0172] 评估诊断组之间各CSF生物标志物的差异的ANCOVA模型最初包含年龄、性别、BMI、APOE基因型、及CSF血红蛋白 (Hb) 和因子H (Factor H) 的水平。包含CSF Hb作为血液污染的指标, 来对进针时伤及血管 (traumatic tap) 而向CSF样本中引入血浆铁蛋白的可能性做控制变量研究。由于已知铁蛋白水平在某些炎症病症中升高, 因而将FH用于对感染做控制变量研究。

[0173] CSF铁蛋白和ApoE的多元回归模型最初包含年龄、性别、BMI、APOE基因型、及CSF血红蛋白 (Hb) 和因子H的水平, 加上CSF tau、Ab1-42、和铁蛋白或ApoE的各种包括在内。极小模型在表5的表格图例中描述。

[0174] 基线阿尔茨海默病认知评估量表 (ADAS-cog13) 和Rey词汇学习测验 (RVLT) 评分与

CSF铁蛋白、CSF tau/Ab₁₋₄₂比和CSF ApoE的关联针对各认知量表用协变量调整的多元回归来测试。对于这些分析,年龄、性别、BMI、受教育年限、APOE-ε4等位基因和基线诊断最初作为协变量而包含。为了评估基线CSF铁蛋白水平与纵向临床结果(7年中的ADAS-cog13和RVLT评分)的关联性,使用线性混合效应模型。调整这些模型与认知的基线模型相同的变量,并且另外包括时间作为与各CSF生物标志物相互作用的变量。任何这些相互作用项的有效值将表明变量影响认知变化的速度。对于ADAS-cog13、纵向分析,极小模型包括受教育年限、性别和APOE-ε4等位基因。对于使用RVLT的纵向分析,极小模型包括受教育年限和性别。

[0175] Cox比例风险模型用于评估CSF分析物对向AD转化的时间的影响。初始模型包含在基线处的年龄、性别、受教育年限和APOE-ε4基因型作为混杂变量,以及CSF ApoE、tau/Ab₁₋₄₂和铁蛋白。仅包含CSF生物标志物的极小模型经由BIC逐步减少法和对数似然检验来鉴定。逻辑回归分析用于评估CSF分析物对转化为AD的风险的影响。CSF铁蛋白、ApoE和tau/Ab₁₋₄₂分析物的组合包括在MCI转化为AD的逻辑回归模型中,其中调整了在基线处的年龄、性别、受教育年限、APOE基因型和BMI。这些模型确定在从MCI参与者中识别稳定的MCI参与者时这些分析物的预测性能,所述MCI参与者长达102个月已具有向AD的诊断性改变。受试者工作曲线(receiver-operator curves)和曲线下面积由逻辑回归模型的预测概率推导。

[0176] CSF铁蛋白、ApoE、tau/Ab₁₋₄₂与海马体和侧脑室的纵向结构(MRI)变化之间的关系使用针对年龄、受教育年限、BMI、性别、APOE基因型和颅内容积调整的线性混合模型来分析。对于所有模型,CSF铁蛋白、ApoE、tau/Ab₁₋₄₂和基线诊断作为固定效应而包含并且不从极小模型中除去。还包括两个随机效应,截距和斜率(时间)。所有模型还包括时间和诊断之间、时间和CSF铁蛋白之间、时间和CSF ApoE之间、以及时间和CSF tau/Ab₁₋₄₂之间的相互作用。

[0177] 所有AD受试者由于数量少和随访短而从MRI分析中排除。来自ADNI的PET成像数据因为测量了CSF铁蛋白并且也在基线处进行PET成像的患者太少而不包括在分析中。

[0178] (ii) 结果

[0179] CSF铁蛋白与AD的生物标志物之间的关系。与其它报告一致,CSF铁蛋白水平在ADNI队列中的认知正常(CN;n=91)、轻度认知缺损(MCI;n=144)和AD(n=67)受试者(ANCOVA:P=0.591;表4)之间没有差异。

[0180]

	单位	CN	MCI	AD	<i>p</i>
n	-	91	144	67	NA
年龄	年(标准差)	75.74 (5.43)	74.85 (7.2)	74.57 (7.61)	0.502
女性	n (%)	46 (50.55)	47 (32.64)	29 (43.28)	0.021
教育	年(标准差)	15.67 (2.94)	15.91 (2.95)	15.01 (2.96)	0.123
APOE-ε4 +ve	n (%)	22 (24.18)	75 (52.08)	46 (68.66)	6.50×10^{-8}
ADAS-Cog13	单位(标准差)	9.51 (4.16)	19.19 (5.94)	29.22 (8.21)	2.75×10^{-56}
CSF 铁蛋白	ng/ml(标准差)	6.4 (2.07)	6.95 (2.72)	6.94 (2.99)	0.591
CSF ApoE	μg/ml(标准差)	7.3 (2.21)	7.1 (2.22)	6.35 (2.27)	0.012
CSF tau	pg/ml(标准差)	69.78 (28.01)	104.3 (52.41)	122.63 (57.47)	4.57×10^{-7}
CSF ptau	pg/ml(标准差)	24.77 (13.34)	36.39 (16.09)	41.39 (20.76)	1.13×10^{-6}
CSF Aβ ₁₋₄₂	pg/ml(标准差)	205.31 (56.38)	161.06 (52.06)	142.16 (36.84)	2.29×10^{-6}
CSF tau/Aβ ₁₋₄₂	单位(标准差)	0.39 (0.26)	0.75 (0.5)	0.94 (0.52)	7.80×10^{-9}
海马体	mm ³ (标准差)	7219.6 (848.6)	6230.9 (1047.8)	5766.6 (1283.2)	6.71×10^{-20}
侧脑室	mm ³ (标准差)	34052.62 (16528.1)	44842.52 (23574.05)	49902.53 (26896.68)	3.35×10^{-5}

[0181] 表4.用于本研究的来自ADNI队列的受试者的基线特征,通过诊断分类。CN-认知正常;MCI-轻度认知损害;AD-阿尔茨海默病。未调整的单位值在表中示出。针对CSF分析物和MRI脑结构的ANCOVA模型示出的p值针对年龄、性别、受教育年限、BMI、APOE基因型、CSF血红蛋白和CSF因子H调整。颅内容积也包括在脑结构的ANCOA模型中。

[0182] 当队列根据CSF Ab₁₋₄₂水平(分界点192ng/l;如之前在Mattsson,N.,等(2014)中提出的)区分时,铁蛋白水平也没有变化,从而反映可能的脑淀粉样蛋白负荷(ANCOVA:P=0.946)。但是在包括确定的AD17的CSF生物标志物(tau、p-tau、Ab₁₋₄₂)的铁蛋白的多元回归建模中,CSF铁蛋白水平虽然不通过p-tau,但通过Ab₁₋₄₂(偏(partial)R²=0.013,P=0.029)和tau(偏R²=0.086,P<0.001;模型1,表1)预测。

[0183] 表1.CSF铁蛋白与阿尔茨海默病的CSF生物标志物之间的关系建模。列出三个模型来探究CSF铁蛋白水平和两个确定的CSF生物标志物Aβ₁₋₄₂和tau(M1和M2)之间的关联,以及CSF铁蛋白水平和较新的候选CSF生物标志物ApoE蛋白水平(M2&M3)之间的关联。所有模型最初包含变量:年龄、性别、BMI、APOE基因型、基线诊断以及CSF tau、p-tau、Aβ₁₋₄₂、Hb和FH的水平。M2&M3另外包括ApoE CSF水平。M1极小模型包含:APOE基因型、tau、BMI、性别和FH。M2极小模型包含:APOE基因型和ApoE水平,并且保留tau和Aβ₁₋₄₂。M3极小模型除了除去tau和Aβ₁₋₄₂以外,包含的与M2相同。AIC-赤池信息准则,BIC-贝叶斯信息准则。

[0184]

模型	A β_{1-42}		tau		ApoE		ApoE ³		AIC	BIC
	β	PR ²	p-值	β	PR ²	p-值	β	PR ²	p-值	
N1	0.051	0.013	0.029	0.129	0.086	4.12×10^{-8}	.	.	.	160 189.5
N2	0.003	0.000	0.904	0.026	0.003	0.219	0.213	0.236	7.69×10^{-32}	95.62 121.4
N3	.	.	.	.	.	.	0.224	0.341	4.04×10^{-39}	93.32 111.7

[0185] 由于载脂蛋白E基因 (APOE) 等位基因是AD的主要遗传风险 (Corder, E.H., 等 (1993)) 并且CSF载脂蛋白E蛋白 (ApoE) 水平与Ab₁₋₄₂ (Cruchaga, C. 等 (2012); Martinez-Morillo, E. 等 (2014)) 和tau (Toledo, J.B. 等 (2014); Martinez-Morillo, E. 等 (2014)) 相关, 因而重新建立模型以包括CSF ApoE水平。这消除了铁蛋白和其它生物标志物之间的关系 (Ab₁₋₄₂: $R^2 < 0.001$, $P = 0.904$; tau: $R^2 = 0.003$, $P = 0.219$; 模型2, 表1)。这导致检测到ApoE和铁蛋白之间的出乎意料的强关联 (线性项偏 $R^2 = 0.243$, $P = 7.69 \times 10^{-22}$), 其在Ab₁₋₄₂和tau

(非显著性项)从模型中除去时得以改进(线性项偏 $R^2=0.341$, $P=1.52$;模型3,表1,图3a)。

[0186] 在模型3中,APOE基因型强烈地影响CSF铁蛋白($P=1.10 \times 10^{-8}$),其中作为主要AD风险的等位基因 $\epsilon 4$ 诱导比非 $\epsilon 4$ 携带者高22%的水平(图3b)。相反地,在CSF ApoE的多元回归建模中,APOE $\epsilon 4$ -阳性受试者与非 $\epsilon 4$ 携带者相比具有较低的ApoE水平(-16%; $P=2.50 \times 10^{-9}$)(图3c)。血浆铁蛋白水平与血浆ApoE水平或APOE $\epsilon 4$ 等位基因状态不相关,但是存在血浆铁蛋白和CSF铁蛋白水平之间的适度关联($\beta=0.075$, $P=0.0002$)。

[0187] 铁蛋白与神经精神病学评估的关联。考察了AD中的CSF铁蛋白与认知表现的关系。在包含AD生物标志物和其它临床变量的多元回归模型中,基线ADAS-Cog13(阿尔茨海默病评估量表)评分独立地与CSF铁蛋白($P=0.006$;表5)、ApoE水平($P=0.0003$)和tau/Ab1-42比($P=0.025$)相关。在三分位数分析中,与低($<5.4\text{ng/ml}$)相比,高(47.2ng/ml)的铁蛋白的水平与约低3分的ADAS-Cog13评分相关(图4a)。类似地,如之前报道的(Toledo, J. B. 等(2014);Kester, M. I. 等(2009)),在三分位数中,ApoE的低水平(图4b)与约低4分的ADAS-Cog13相关,并且较高的tau/Ab1-42比与约低2分的ADAS-Cog13相关(图4c)。

[0188] 为了确定CSF铁蛋白的基线值是否预测纵向认知结果,构建了7年中的年度ADAS-Cog13评分的混合效应模型(表5为统计数据,表2为患者数量),并且观察到如之前报道的(Toledo, J. B. 等(2014);Kester, M. I. 等(2009)),ApoE($P=0.006$)和tau/Ab1-42比($P=2.7 \times 10^{-7}$)二者仍与认知变化的速度(与时间相互作用)相关。然而,铁蛋白通过恒定的横向衰减(constant cross-sectional decremen)影响ADAS-Cog13($P=4.93 \times 10^{-4}$ 仅主效应;表5)。

[0189] 表2.纵向认知评估的患者数量。Bl:基线。CN:认知正常。MCI:轻度认知缺损。AD:阿尔茨海默病

	CN	MCI	AD
Bl	88	137	63
6 个月	88	137	61
1 年	86	138	63
2 年	82	123	52
3 年	78	97	4
4 年	55	47	2
5 年	49	39	0
6 年	54	37	0
7 年	43	27	0

[0190]

[0191]

模型	铁蛋白 [†]		tan/APoE		ApoE	
横向认知 {MR}	β {se}	p	β {se}	p	β {se}	p
-ADAS-Cog13	0.139 {0.050}	0.006	0.104 {0.046}	0.025	-0.170 {0.049}	0.0002
-RVLT	-1.77 {0.559}	0.0017	NS	NS	1.033 {0.564}	0.0677
纵向认知 {MELM}	β {se}	p	β {se}	p	β {se}	p
ADAS-Cog13 [*]						
-主效应	0.178 {0.051}	0.0005	0.129 {0.049}	0.009	-0.180 {0.051}	0.0004
-相互作用 - 时间	0.0005 {0.016}	0.977	0.061 {0.016}	2.70x10 ⁻²	-0.044 {0.016}	0.006
RVLT						
-主效应	-1.60 {0.63}	0.012	-0.847 {0.608}	0.165	1.03 {0.63}	0.104
-相互作用 - 时间	-0.025 {0.152}	0.817	-0.610 {0.150}	4.85x10 ⁻⁴	0.279 {0.152}	0.066
MCI 转化为 AD	统计数据 *	p	统计数据 *	p	统计数据 *	p
-Cox {风险比}	1.10 {1.01-1.19}	0.030	1.53 {1.03-2.28}	0.037	0.83 {0.75-0.95}	0.008
-LR {优势比}	2.32 {1.88-2.90}	9.001x10 ⁻⁴	1.45 {1.16-1.80}	0.0001	0.38 {0.30-0.48}	1.88x10 ⁻²
MRI 萎缩速度 {MELM}	β {se}	p	β {se}	p	β {se}	p
-海马体	-18.23 {7.86}	0.019	-35.31 {7.79}	6.81x10 ⁻⁶	21.38 {8.02}	0.008
-侧脑室 *	0.007 {0.003}	0.008	0.013 {0.002}	4.19x10 ⁻⁴	-0.009 {0.003}	0.0002

[0192] 表5. 建立CSF生物标志物与AD结果的关联的模型。所有模型最初包含变量: 年龄、性别、BMI、APOE基因型、基线诊断; MRI模型另外包括颅内容积。用于认知模型的极小模型包

括基线诊断、性别、受教育年限和AD CSF生物标志物。用于Cox比例风险模型(Cox)的极小模型仅包含AD CSF生物标志物。用于MRI模型的极小模型包含年龄、性别、基线诊断、受教育年限、APOE ϵ 4状态和颅内容积。具有可用的数据的所有受试者包括在认知模型中。只有在基线处分类为MCI的受试者包括在MCI转化模型中。MRI模型包含在基线处分类为认知正常或MCI的受试者。在基线处的AD受试者由于数量少和缺乏随访而不包括(表3)。*转化模型的统计数据基于各分析物的1个四分位距变化(铁蛋白:3.3ng/mL, tau/Ab₁₋₄₂:0.67单位; ApoE:3.1 μ g/ml)。†铁蛋白值进行对数转换, 不包括非参数Cox和LR模型。 $\hat{\beta}$ -系数是ADAS-Cog13的平方根。#对于侧脑室, β -系数是脑室容积(ventricle volume)的自然对数。MR:多元回归, MELM:混合效应线性模型。Cox:Cox比例风险模型。LR:逻辑回归。NS:不显著。

[0193] 认知使用在区分对照和MCI患者时更灵敏的Rey词汇学习测验(RVLT)来建模。在该模型中, 仅铁蛋白水平与横向认知表现相关($P=0.0017$; 表5, 图4d), 但是CSF铁蛋白与纵向模型中的退化的速度不相关($P=0.817$; 表5)。基线tau/Ab₁₋₄₂比($P=4.85 \times 10^{-5}$)与RVLT中的认知下降的速度相关, 但是对于ApoE而言仅存在趋势($P=0.066$)。因此, 在两个认知量表中, CSF铁蛋白通过恒定的量影响表现而无论疾病状态如何。

[0194] 如果高铁蛋白水平随时间推移通过恒定的值使认知表现变差, 则具有高铁蛋白水平的MCI个体将在相对较早的间隔时间(interval)满足用于AD诊断的标准。为了对此进行研究, 对进行了CSF铁蛋白、ApoE和tau/Ab₁₋₄₂测量的144名MCI受试者采用Cox比例风险模型。在7年中的MCI转化的极小模型(仅包含这些CSF生物标志物; 表5)中, 铁蛋白($P=0.03$; 图5a)、ApoE($P=0.008$; 增补图6a)和tau/Ab₁₋₄₂($P=0.037$; 增补图6b)各自为显著的预测变量。

[0195] 使用该模型估计各生物标志物的各五分位数的50%存在率(survivorship)需要多少个月。构建这些值(以月计; y-轴)相对于各分析物的五分位数界限(quintile boundaries)的值(以指定的单位计; x-轴)的线性模型。这些函数的梯度估计与基线CSF分析物的一单位变化相关的平均转化年龄(以月计)的变化。对于生物标志物之间的比较, 变化以与分析物值的标准差变化相关的平均转化年龄表示。铁蛋白的一标准差变化与9.5个月的转化年龄的改变相关, 而ApoE和tau/Ab₁₋₄₂各自为18.2和8.6个月(图5b)。

[0196] 在单独调整的逻辑回归模型中, 各生物标志物的基线浓度增加了其四分位距, 对于铁蛋白(OR:1.36, 95%CI:1.17-1.58)和tau/Ab₁₋₄₂比(OR:1.13, CI:0.95-1.35)而言增加了转化为AD的几率, 并且对于ApoE(OR:0.72, CI:0.61-0.85)而言降低了该几率。将所有三个分析物纳入一个模型增加了各分析物的预测值(OR(CI):铁蛋白=2.32[1.86-2.9], tau/Ab₁₋₄₂=1.45[1.16-1.8], ApoE=0.38[0.3-0.48]; 表5)。

[0197] 基于逻辑回归模型的受试者工作曲线测定了这些分析物预测转化为AD的准确度。基础模型(年龄、性别、受教育年限、BMI、APOE ϵ 4基因型)的曲线下面积(AUC)为0.6079(图5c), 其通过铁蛋白(AUC:0.6321; 图2b)或ApoE(0.6311; 图2c)的单一包含、或略微通过tau/Ab₁₋₄₂(0.6177; 图2d)而增加。当tau/Ab₁₋₄₂包括在包含ApoE的模型中时, AUC轻微地增加(从0.6311至0.6483; 图5d)。这种结合已确定的AD用CSF生物标志物的性能通过加入铁蛋白值而显著改善(从0.6483至0.6937图5e)。

[0198] 铁蛋白与脑萎缩的关联。研究了铁蛋白水平是否与CN和MCI受试者的6年期间以一年为间隔的海马体和侧脑室区域的神经解剖变化相关(表3为患者数量)。

[0199] 表3.纵向MRI评估的患者数量。BI:基线。CN:认知正常。MCI:轻度认知缺损。AD:阿尔茨海默病

	CN	MCI	AD
BI	79	108	48
6个月	80	108	49
1年	74	96	37
[0200] 2年	66	85	35
3年	57	62	0
4年	38	35	0
5年	26	24	0
6年	24	14	0

[0201] 探究了当其它生物标志物也在建模中包括时CSF铁蛋白的影响,然而CSF铁蛋白之前已经显示在单独考虑时预测各种脑结构的萎缩。基线ApoE、铁蛋白和tau/Ab₁₋₄₂值在调整的纵向模型中各自独立地预示海马体容积(表5)。海马体的萎缩速度在具有高CSF铁蛋白的个体中更大($P=0.02$;图6a)。低CSF ApoE ($P=0.008$;图6b)或高tau/Ab₁₋₄₂ ($P=6.80 \times 10^{-6}$;图6c)也预示萎缩。随时间推移的侧脑室扩大类似地独立地与高-CSF铁蛋白 ($P=0.008$;图6d)、低-CSF ApoE ($P=0.0002$;图6e)或高Q5tau/Ab₁₋₄₂ ($P=4.19 \times 10^{-8}$;图6f)相关。

[0202] (iii) 讨论

[0203] 这些分析显示CSF铁蛋白水平独立地与ADNI队列中的认知表现相关并且预测了MCI转化为AD。铁蛋白对这些结果的量级影响与确定的生物标志物ApoE和tau/Ab₁₋₄₂是可比的;然而,铁蛋白的影响的本质不同。铁蛋白与研究周期中的认知表现的恒定的变化相关(图7a),然而,与其它生物标志物相关的衰减随时间推移而放大(图7b)。响应高铁蛋白水平(每1ng/ml铁蛋白1.77RVLT分;表5)的向下的移动(较差的认知表现)导致较早的诊断年龄(每1ng/ml铁蛋白3个月;图5b)。这将与AD早龄发作的患者具有比晚发性患者大的新皮层铁负荷的发现一致。这些数据共同支持考虑降低脑铁的治疗策略,该策略已经在阿尔茨海默和帕金森氏病的II期试验中报告了有益的结果。如可以从如去铁酮等的药物预期的,可以想象降低CSF铁蛋白将使MCI向AD的转化延迟多达3年。

[0204] 该数据为AD发病机理中的铁提供了探索性的见解,识别ApoE与铁蛋白的未预料到的相互作用。铁蛋白水平通过APOE- $\epsilon 4$ 等位基因升高,认为是ApoE影响了铁蛋白水平,而不是相反情况。这些发现表明APOE基因型应当影响组成性的脑铁负荷。

[0205] 这些数据支持APOE $\epsilon 4$ 状态通过升高铁蛋白水平赋予对AD的易感性的观点。

[0206] 本实施例显示基线CSF铁蛋白水平与91名认知正常、144名轻度认知缺损(MCI)和67名AD受试者的7年中的认知表现呈负相关,并且预测了MCI转化为AD。铁蛋白与CSF载脂蛋白E水平密切相关并且通过阿尔茨海默风险等位基因APOE- $\epsilon 4$ 升高。这些发现揭示升高的脑铁不利地影响AD进展,并且引入脑铁升高作为APOE- $\epsilon 4$ 为AD的主要遗传风险因素的可能的机制。

[0207] 实施例2:脑脊髓铁蛋白决定临床前APOE- ϵ 4携带者的认知下降的风险

[0208] 载脂蛋白E (ApoE) 的 ϵ 4等位基因赋予阿尔茨海默病 (AD) 的最大的风险,并且由于 ϵ 4携带使脑脊液 (CSF) 铁蛋白升高约20% (Ayton S等 (2015)),最近的数据暗示脑铁积累作为风险向量。CSF铁蛋白水平预测纵向认知表现和轻度认知缺损 (MCI) 受试者转变为AD的风险。本实施例显示CSF铁蛋白在预测正常人群的7年中的认知下降中与确定的AD风险变量APOE- ϵ 4、CSF tau/ $A\beta_{1-42}$ 和ApoE结合。

[0209] (i) 方法

[0210] 本实施例使用从阿尔茨海默病神经成像启动计划 (ADNI) 数据库得到的数据 (adni.loni.usc.edu;2014年7月15日)。

[0211] $A\beta_{1-42}$ 、tau (Luminex)、ApoE、铁蛋白 (Myriad Rules Based Medicine) 的基线CSF水平和纵向雷氏听觉视觉学习任务 (longitudinal Ray Auditory-Visual Learning Task, RAVLT;对早期变化敏感) 以及AD评估量表-认知子集 (ADAS-Cog13) 评分使用线性混合效应模型用R (版本3.2.1) 分析。确认了正态性和非多重共线性。将来自过早地离开的受试者的数据包括至其离开的点。

[0212] (ii) 结果

[0213] 前期痴呆受试者的初始模型 (表6) 揭示了tau/ $A\beta_{1-42}$ 比和时间对认知表现的双向相互作用 (RAVLT: $P=0.011$;ADAS-Cog13: $P=0.0011$),确认了本指标预测认知退化的速度。Tau/ $A\beta_{1-42}$ 不与其它AD风险因素APOE- ϵ 4状态、诊断、铁蛋白或ApoE水平 (单独地,或者以更高次项组合) 相互作用。相反,CSF铁蛋白在与时间、APOE ϵ 4和诊断的四向相互作用中预测认知 (RAVLT: $P=0.0169$;ADAS-Cog13 $P=0.0297$)。

[0214] 在认知正常 (CN) 和MCI受试者的单独建模中,ttau/ $A\beta_{1-42}$ 针对MCI (RAVLT: $P=0.072$;ADAS-Cog13; $P=0.019$) 和CN (RAVLT: $P=0.039$;ADAS-Cog13; $P=0.006$;图8A、B) 受试者预测认知退化,并且该指标不与其它包括的变量相互作用。

[0215] 所有与铁蛋白的相互作用项对于MCI受试者均为不显著的,但是存在对认知表现显著的主效应 (RAVLT: $P=0.019$;ADAS-Cog13: $P=0.042$;与之前一致,如Ayton S等 (2015) 中描述的简化建模)。然而,对于CN受试者,铁蛋白在与时间和 ϵ 4的3向相互作用中预测认知退化 (RAVLT: $P=0.0035$;ADAS-Cog13: $P=0.010$;图8C、D)。根据 ϵ 4状态的CN受试者的分类揭示铁蛋白强预测 ϵ 4+ve受试者中的认知下降 (RAVLT: $P=0.0008$;ADAS-Cog13: $P=0.016$)。对于 ϵ 4-ve受试者,较低的铁蛋白水平在ADAS-Cog13 ($P=0.016$) 中但不在RAVLT ($P=0.477$) 中预测认知的适度退化。

[0216] 最后,试验基线CSF铁蛋白来确定其能否用于从衰退的 (RAVLT恶化 ≥ 1 分/年) CN ϵ 4+ve受试者中区分稳定的受试者。受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积在6.6ng铁蛋白/ml的预测阈值处为0.96 (图8E)。

[0217]

	所有受试者			仅 MCI			仅 CN			CN ≤ 4 阴性			CN ≤ 4 阳性		
	n	S.D.	or %	n	S.D.	or %	n	S.D.	or %	n	S.D.	or %	n	S.D.	or %
人口统计学															
受试者	234	-	-	144	-	-	94	-	-	69	-	-	21	-	-
APOE $\epsilon 4$ +ve	96	41%		73	52%		21	23%		0	0%		21	100%	
年龄	75.2	6.5		74.9	7.2		75.7	5.1		75.6	5.2		76.0	6.4	
性别 (女性)	93	40%		47	33%		46	51%		38	53%		8	35%	
受教育年限	15.8	3.0		15.9	3		15.6	3.0		15.7	2.8		15.5	3.4	
RAVLT															
控制变量	f	P		f	P		f	P		f	P		f	P	
诊断	57.08	1.06×10^{-12}		NA	NA		NA	NA		NA	NA		NA	NA	
性别	11.96	0.0007		2.83	0.095		16.17	0.0001		12.91	0.0006		4.84	0.043	
受教育年限	7.16	0.008		0.25	0.616		17.75	0.0001		15.454	0.002		3.13	0.066	
测试变量 / 相互作用															
$\tau_{\text{au}}/\Delta\beta_{1-42}$	1.10	0.296		1.43	0.233		0.04	0.833		0.329	0.568		0.352	0.468	
$\tau_{\text{au}}/\Delta\beta_{1-42} \times \text{时间}$	6.34	0.011		3.24	0.072		4.77	0.019		6.058	0.014		0.645	0.424	
铁蛋白	0.064	0.800		5.55	0.019		0.018	0.894		0.047	0.830		0.743	0.401	
铁蛋白 $\times \text{时间} \times \epsilon 4 \times \text{诊断}^*$	5.73	0.0169		0.477	0.490		8.627	0.0035		0.507	0.477		17.05	0.0008	
ADAS-cog13															
控制变量	f	P		f	P		f	P		f	P		f	P	
诊断	112	$<1.0 \times 10^{-26}$		NA	NA		NA	NA		NA	NA		NA	NA	
性别	4.07	0.0447		0.283	0.598		10.1	0.002		10.604	0.002		0.957	0.343	
受教育年限	5.78	0.0169		1.03	0.306		9.65	0.003		13.973	0.0004		0.302	0.562	
测试变量 / 相互作用															
$\tau_{\text{au}}/\Delta\beta_{1-42}$	2.39	0.109		2.78	0.098		0.06	0.805		0.007	0.933		0.03	0.862	
$\tau_{\text{au}}/\Delta\beta_{1-42} \times \text{时间}$	10.72	0.0011		5.00	0.026		7.61	0.006		7.630	0.006		1.879	0.160	
铁蛋白	1.51	0.221		4.22	0.041		1.67	0.200		1.985	0.164		1.218	0.286	
铁蛋白 $\times \text{时间} \times \epsilon 4 \times \text{诊断}^*$	4.73	0.0297		0.237	0.627		6.69	0.019		5.858	0.016		6.041	0.016	

[0218] 表6. 患者人口统计学和统计模型。CN和MCI受试者 (AD受试者由于低随访率而从纵向分析中排除) 中的纵向 (7年) 认知表现 (RAVLT, ADAS-Cog13) 的独立协变量调整的线性混

合效应线性模型。在使用赤池信息准则和贝叶斯信息准则得到极小模型之前,在建模时最初包括的变量为:年龄、性别、BMI、受教育年限、APOE- ϵ 4等位基因、基线诊断、CSF tau/A β 、CSF ApoE、CSF铁蛋白。NA:不适用。@ADAS-Cog13变量进行平方根转换。#CSF铁蛋白进行自然对数转换。*当队列根据列标题限制时,将该相互作用变量简化至更低次项。CN-认知正常;MCI-轻度认知缺损;RAVLT-雷氏听觉视觉学习测试;ADAS-Cog13-阿尔茨海默病评定量表-认知。

[0219] (iii) 讨论

[0220] 这些数据显示具有相对低的铁蛋白(<6.6ng/mL)的CN ϵ 4+ve受试者在可预见的未来将不会退化,其可以潜在地解释为什么30%的 ϵ 4+ve受试者不发展成AD。相反地,高于该阈值的铁蛋白的每单位增加预示更迅速的退化。

[0221] 这些发现揭示CSF铁蛋白对 ϵ 4携带者和非携带者的显著不同的影响。 ϵ 4携带者的CSF铁蛋白水平均 $\geq$ 4.5ng/mL,但是在非 ϵ 4受试者中变为所述值的一半,因此受试者表现轻微的认知退化(图8C、D)。

[0222] 实施例3:评估患者的认知退化的风险

[0223] 在实施本发明的方法时,可以预期的是将评估患者的认知能力的水平。该水平将为确定它们是否将随时间推移而退化奠定基础。患者在评估之后可能已经显示认知缺损的迹象。

[0224] 可以得到CSF样本并且CSF铁蛋白水平通过例如免疫分析等的方法测定。随后可以将该样本与以相同的方式处理的来自CN患者的预定的样本进行比较。

[0225] 将测定所述患者与CN患者的CSF铁蛋白水平的差异。根据差异的程度,可以确定认知退化的程度。如果差异大并且患者的CSF铁蛋白水平相对于CN患者水平较高,则进行评估的患者会显示较高的认知退化的风险。如果差异相对于CN患者水平较小,则进行评估的患者会显示较低的认知退化的风险。

[0226] 本试验可以平行地进行来确定患者的基因型。如果患者携带Apo ϵ 4等位基因,则认知退化的风险将更高。

[0227] 实施例4:监测患者的认知退化

[0228] 根据实施例3在第一时间点测试患者。第二次试验在第一时间点之后的另一时间点进行。评估患者CSF铁蛋白和来自CN患者的参考水平之间的差异。

[0229] 随后可以将所述差异与来自第一时间点的差异进行比较。

[0230] 如果差异更大,则退化将已经进展。

[0231] 患者可以基于升高的CSF铁蛋白水平诊断为患有认知退化。

[0232] 实施例5:减小患者的认知退化的进展速度

[0233] 如实施例3基于他们的CSF铁蛋白水平评估患者的认知退化的水平。按照通过患者的体格、年龄和体重计算的时间和剂量对患者施用去铁酮。

[0234] 在一段时间后重新评估患者的认知表现来评估认知退化是否已经减轻。

[0235] 虽然本发明的前述书面说明使本领域普通技术人员能够实施和使用目前被认为是其最佳方式的方式,但本领域普通技术人员将理解和认识到本文中的特定的实施方案、方法和实施例的变化、组合和等同物的存在。因此本发明不应该受限于上述实施方案、方法和实施例,但是所有实施方案和方法都限制在如在本文中宽泛地描述的本发明的范围和主

旨内。

[0236] 参考文献

[0237] Ali-Rahmani,F.,Schengrund,C.L.&Connor,J.R.HFE gene variants,iron,and lipids:a novel connection in Alzheimer's disease.Frontiers in pharmacology5, 165 (2014) .

[0238] McKhann,G.,et al.Clinical diagnosis of Alzheimer's disease:report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease.Neurology 34,939-944 (1984) .

[0239] Shaw,L.M.,et al.Qualification of the analytical and clinical performance of CSF biomarker analyses in ADNI.Acta neuropathologica 121,597-609 (2011) .

[0240] Shaw,L.M.,et al.Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects.Annals of neurology 65,403-413 (2009) .

[0241] Jack,C.R.,Jr.,et al.The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI):MRI methods.Journal of magnetic resonance imaging:JMIRI 27,685-691 (2008) .

[0242] Team,R.C.R:A Language and Environment for Statistical Computing. (R Foundation for Statistical Computing,2014) .

[0243] Wickham,H.ggplot2:elegant graphics for data analysis,(Springer New York,2009) .

[0244] Pinheiro,J.,Bates,D.,DebRoy,S.,Sarkar,D.&Team,R.C.nlme:Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. (2014) .

[0245] Fox,J.&Weisberg,S.An R Companion to Applied Regression,(Sage,2011) .

[0246] Mattsson,N.,et al.Effects of cerebrospinal fluid proteins on brain atrophy rates in cognitively healthy older adults.Neurobiology of aging 35, 614-622 (2014) .

[0247] Corder,E.H.,et al.Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.Science 261,921-923 (1993) .

[0248] Cruchaga,C.,et al.Cerebrospinal fluid APOE levels:an endophenotype for genetic studies for Alzheimer's disease.Human molecular genetics 21,4558-4571 (2012) .

[0249] Martinez-Morillo,E.,et al.Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls.Acta neuropathologica (2014) .

[0250] Toledo,J.B.,et al.CSF Apo-E levels associate with cognitive decline and MRI changes.Acta neuropathologica 127,621-632 (2014) .

[0251] Kester,M.I.,et al.CSF biomarkers predict rate of cognitive decline in Alzheimer disease.Neurology 73,1353-1358 (2009) .

[0252] Ayton S, Faux NG, Bush AI, Alzheimer's Disease Neuroimaging I. Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. Nature communications. 2015;6:6760.

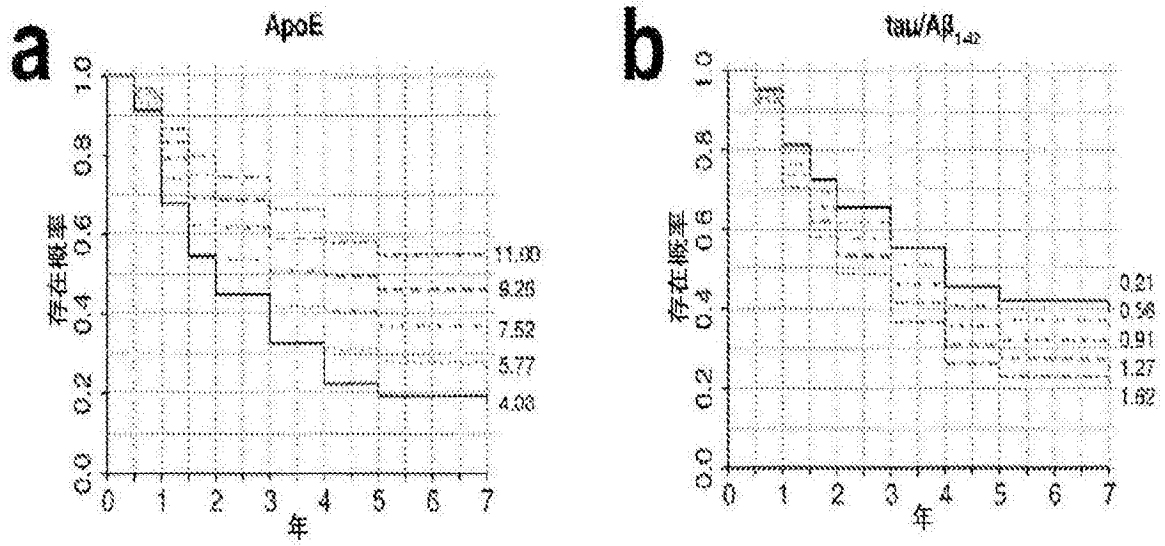


图1

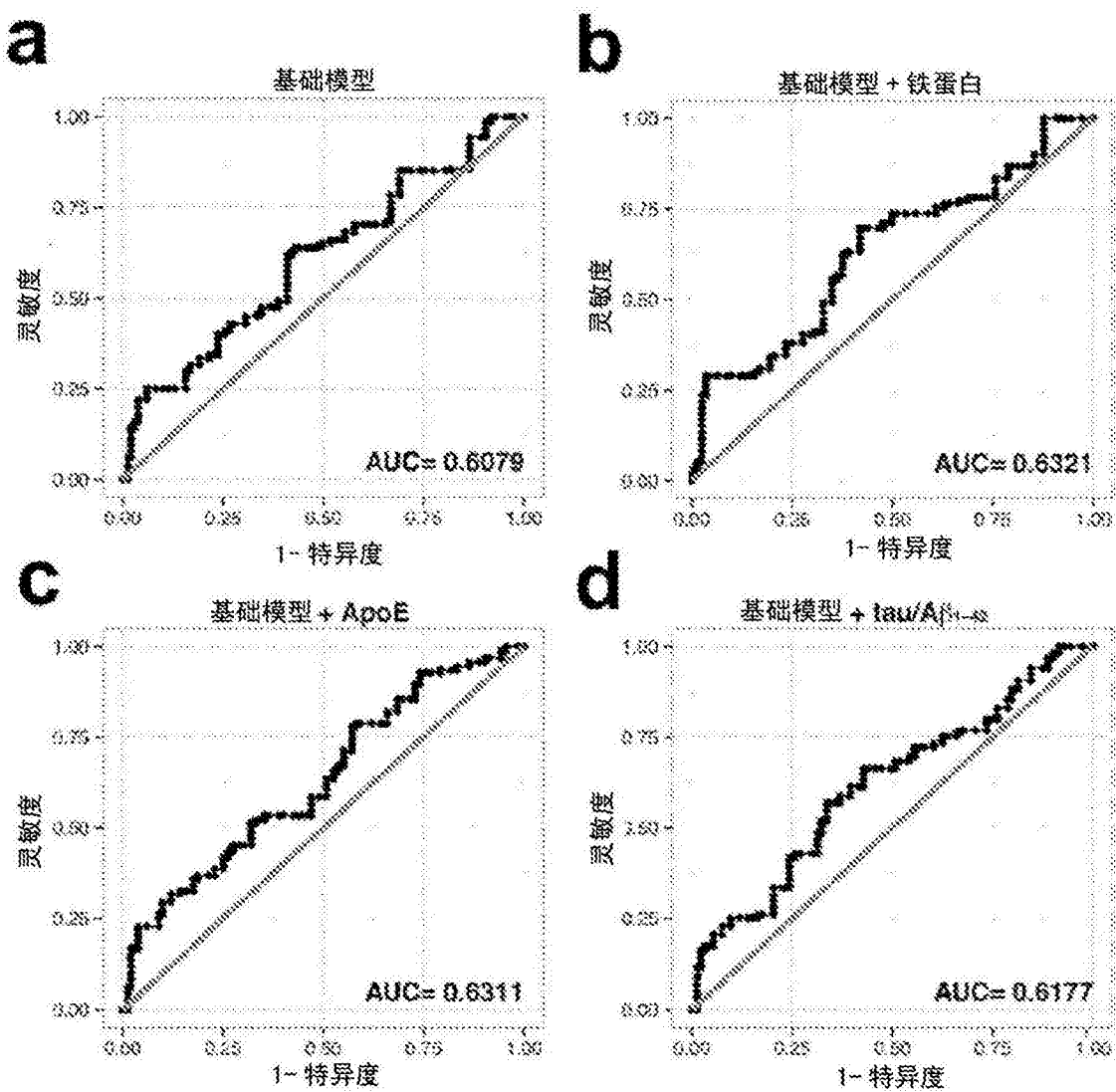


图2

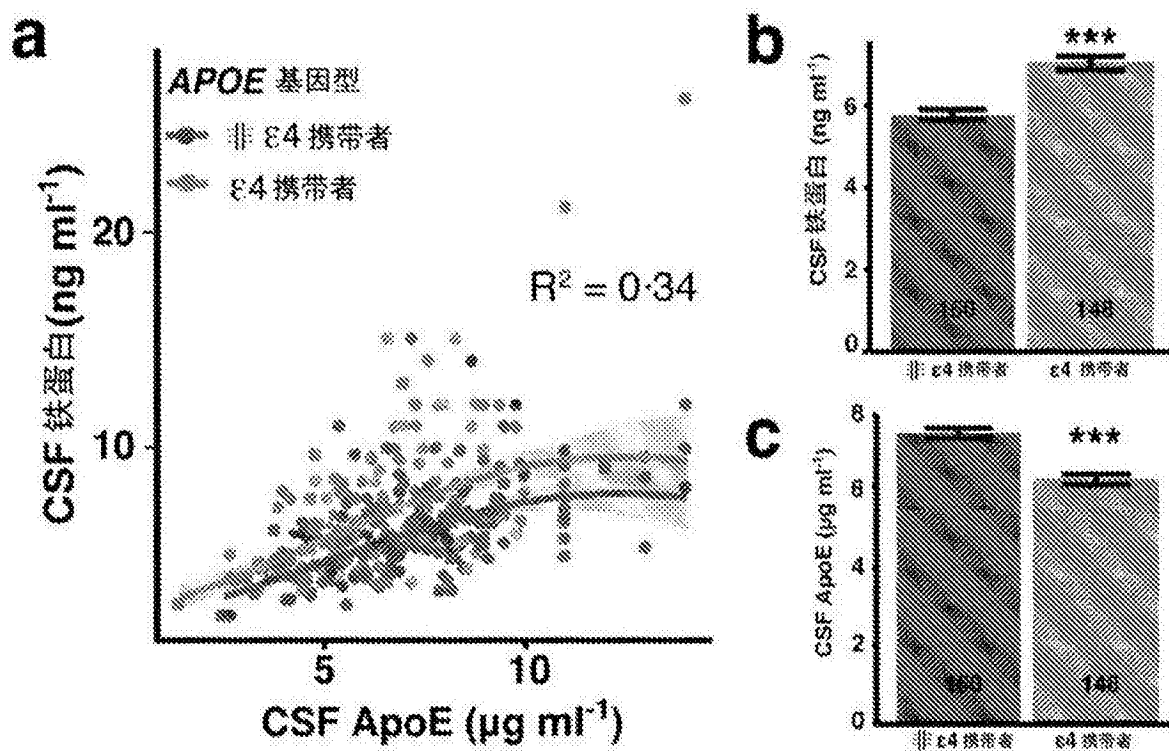


图3

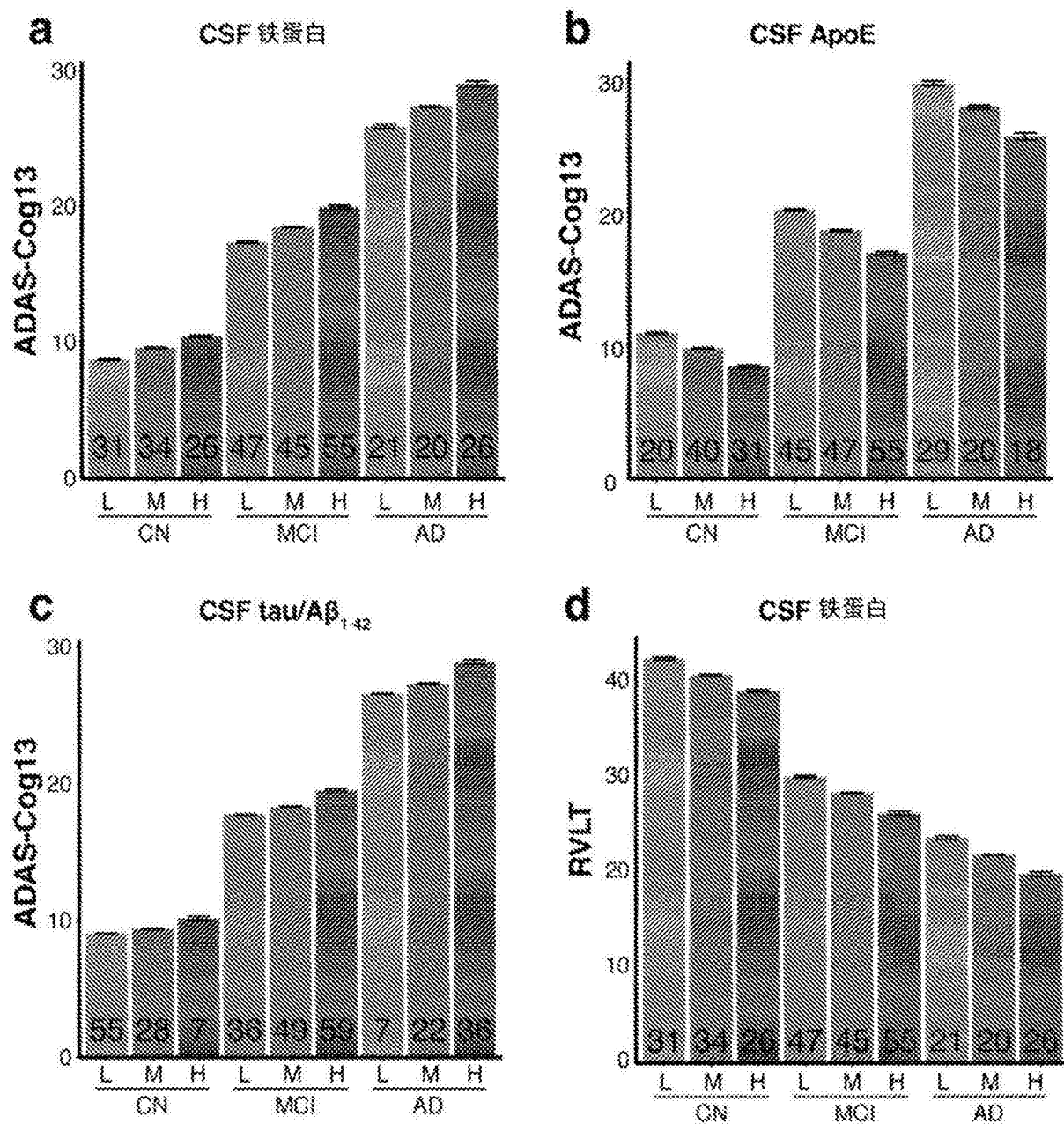


图4

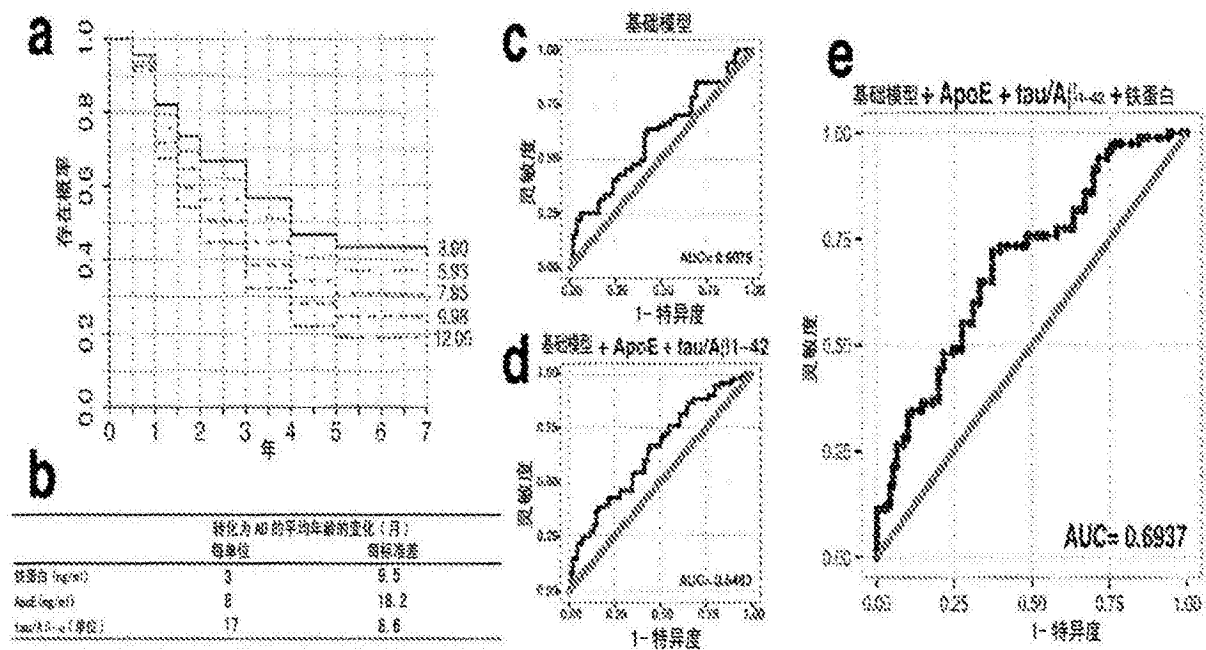


图5

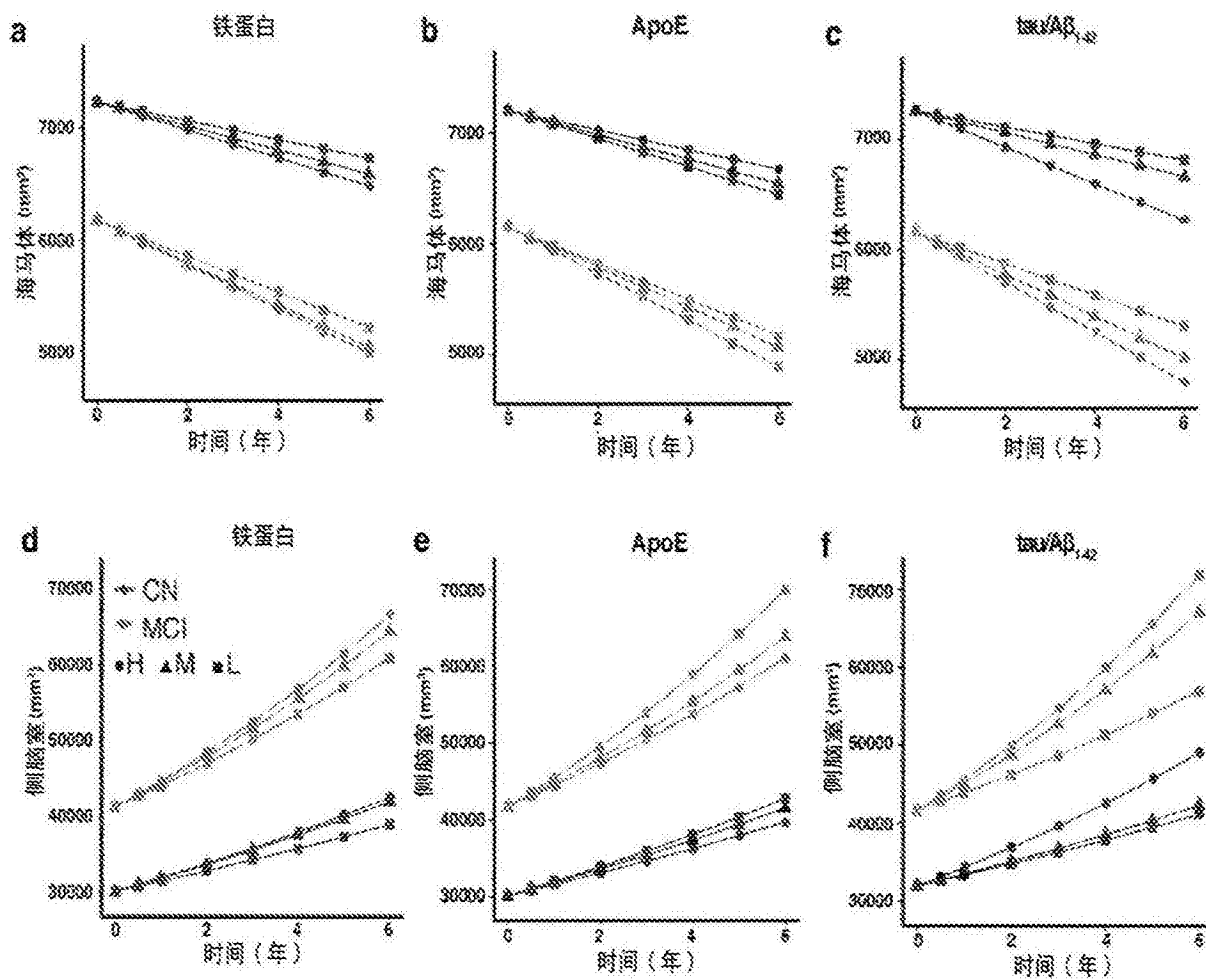


图6

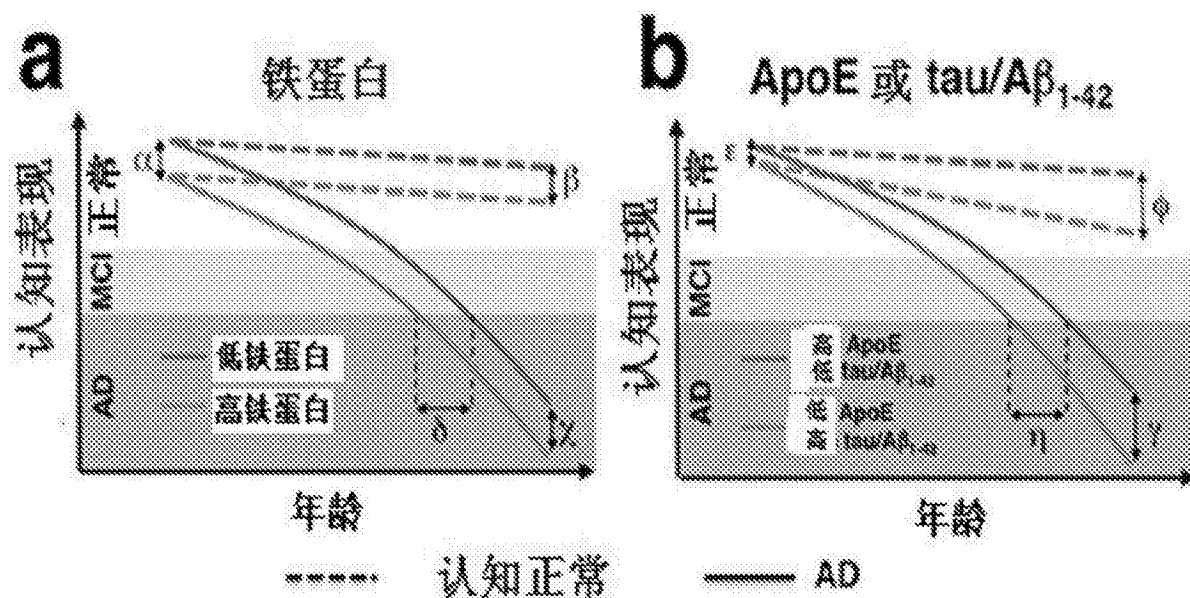


图7

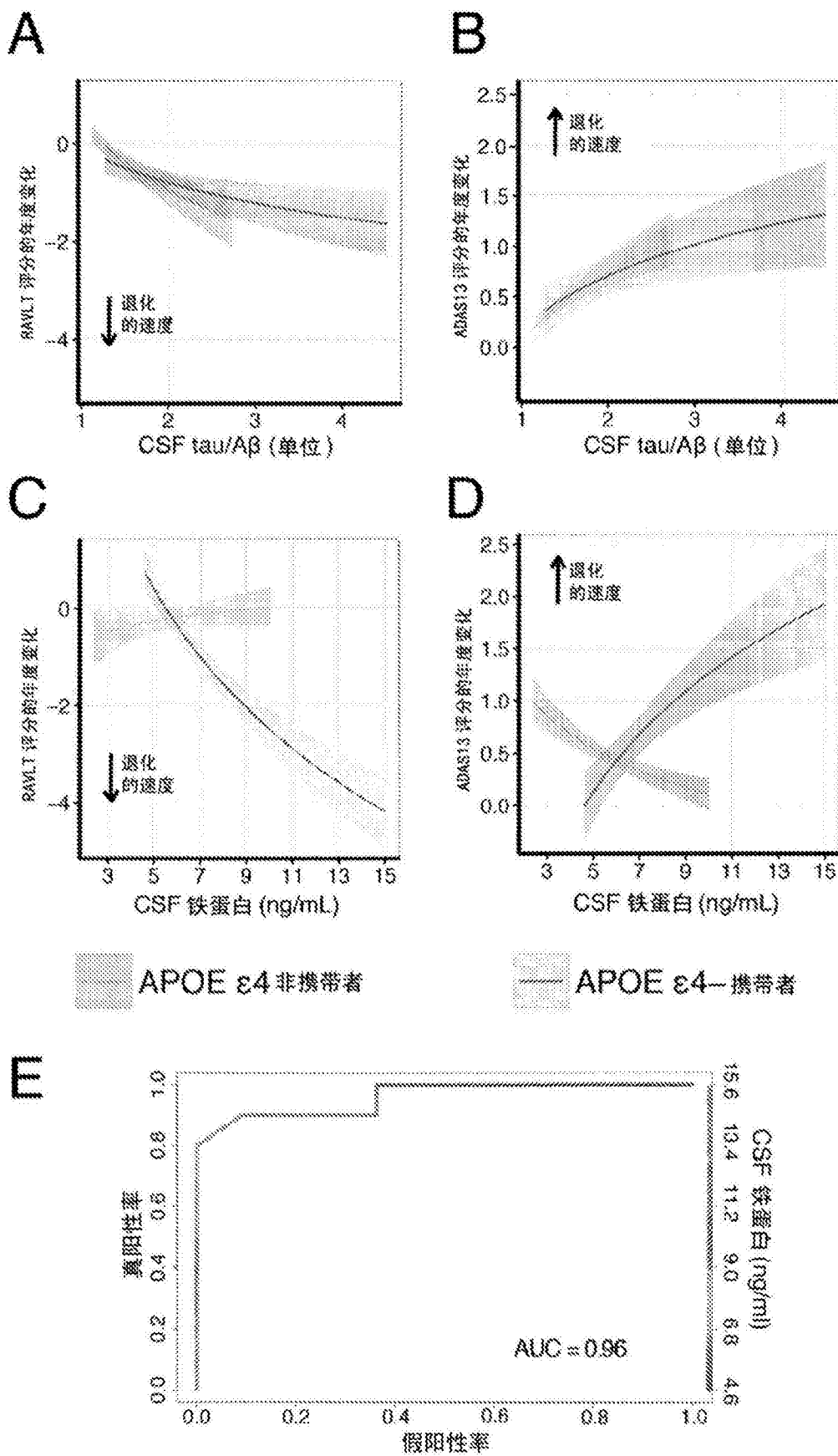


图8