

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95137389

※ 申請日期：95-10-11

※IPC 分類：G 01N 33/68

一、發明名稱：(中文/英文)

以阿茲海默症特異性之 ERK1/ERK2 磷酸化比率的變化作為阿茲
海默症特異性的分子生物標記/Alzheimer's disease-specific
alterations of the ERK1/ERK2 phosphorylation ratio-Alzheimer's
disease-specific molecular biomarkers (ADSMB)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

布蘭雪特洛克菲勒神經學協會/

BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES INSTITUTE

代表人：(中文/英文) 馬克 A. 柯查/MARK A. COCHRAN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國馬利蘭州洛克威利市醫學中心路9601號3樓/9601 Medical Center Drive,
3rd Floor, Rockville, MD 20850, USA

國 籍：(中文/英文) 美國/USA

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1 塔邦 庫瑪 康恩/Tapan Kumar Kahn

2. 丹尼爾 艾科/Daniel Alkon

國 籍：(中文/英文) 1. 印度/India 2. 美國/USA

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 申請美國、申請日：2005 年 10 月 11 日、申請案號：11/246,524
2. 申請美國/PCT、申請日：2005 年 10 月 11 日、申請案號：PCT/US2005/036014
3. 申請美國/PCT、申請日：2006 年 06 月 07 日、申請案號：PCT/US2006/22156
4. 申請美國/PCT、申請日：2006 年 09 月 25 日、申請案號：PCT/US2006/37186

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種測定生物體是否具有阿茲海默症的檢測方法。本發明亦係關於一種鑑定有效用於治療阿茲海默症之先導化合物的方法，其係將非阿茲海默症細胞與 β 類澱粉樣肽（amyloid beta peptide）相接觸培養、以蛋白激酶 C 活化劑激活該細胞、使該細胞接觸測試化合物，藉以測定阿茲海默症特異性分子生物標記的值。本發明同時係關於檢測生物體內之阿茲海默症的方法，其藉由在蛋白激酶 C 活化劑激活後測定細胞內特異性磷酸化促分裂原活化蛋白激酶之比率的變化。此處所述之阿茲海默症特異性分子生物標記可有效用於診斷阿茲海默症、監控生物體內之阿茲海默症的進展以及作為鑑定用於治療或預防阿茲海默症之化合物的篩檢方法。本發明亦係關於含有利用阿茲海默症特異性分子生物標記以偵測和診斷阿茲海默症之試劑的套組。

六、英文發明摘要：

The present invention is relates to methods of diagnosing Alzheimer's Disease as well as to methods of confirming the presence or absence of Alzheimer's Disease in a subject. The present invention is also directed to methods of identifying a lead compound useful for the treatment of Alzheimer's Disease by contacting non-Alzheimer's cells with an amyloid beta peptide, stimulating the cells with a protein kinase C activator, contacting the cells with a test compound, and determining the value of an Alzheimer's diseaseDisease-specific molecular biomarker.

The present invention is also directed to methods of diagnosing Alzheimer's Disease in a subject by detecting alterations in the ratio of specific phosphorylated MAP kinase proteins in cells after stimulation with a protein kinase C activator. The Alzheimer's Disease-specific molecular biomarkers disclosed herein are useful for the diagnosis of Alzheimer's Disease, monitoring the progression of Alzheimer's Disease in a subject and in screening methods for the identification of compounds for treating or preventing Alzheimer's Disease. The invention is also directed to kits containing reagents for the detection and diagnosis of the presence or absence of Alzheimer's Disease using the Alzheimer's Disease-specific molecular biomarkers disclosed herein.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係一種測定生物體是否具有阿茲海默症的檢測方法。本發明亦係關於一種篩檢先導化合物的方法，其用於發展有效治療或預防阿茲海默症的治療劑。本發明復係關於藉由檢測於以蛋白激酶 C 活化劑活化後細胞內特異性磷酸化促分裂原活化蛋白(Mitogen-activated protein, MAP)激酶的比率變化而檢測病人阿茲海默症的方法。此處所述的阿茲海默症特異性分子生物標記(Alzheimer's Disease-Specific Molecular Biomarkers, 以下簡稱 ADSMB)可用於診斷阿茲海默症、用於監控疾病的進展以及用於鑑定先導化合物的篩檢方法中。

【先前技術】

細胞內鈣平衡的干擾、氧化壓力程度的增加和發炎機制所導致的興奮性毒性及神經細胞死亡已被認為係由阿茲海默症(Alzheimer's Disease, 以下簡稱 AD)的病因所促成(Ito 等人 1994, Putney, 2000; Yoo 等人 2000; Sheehan 等人 1997; De Luigi 等人 2001; Anderson 等人 2001; Remarque 等人 2001)。利用舒緩素(bradykinin, 以下簡稱 BK)作為刺激劑的試驗中已知可造成細胞內鈣離子濃度及其他細胞生理作用等許多 AD 相關疾病。作為強效發炎介質的舒緩素(BK)係在異常病理生理如創傷、中風、疼痛、缺血和氣喘狀態下由大腦和周邊細胞所產生(Regoli 等人 1993; Bockmann 和 Paegelow 2000; Ellis 等人 1989; Kamiya 等人 1993)。

藉由作用於一種 G 蛋白耦合受體的 B2 舒緩素受體 (BK2bR)，舒緩素(BK)經由活化磷脂酶 C(phospholipase C，以下簡稱 PLC)觸發磷脂醯肌醇 (phosphatidylinositol，以下簡稱 PI)的轉換而依序從 IP3-致敏庫(sensitive stores)產生可增加細胞內 Ca^{2+} 釋出的肌醇-1,4,5-三磷酸酯 (inositol 1,4,5-trisphosphate，以下簡稱 IP3)(Noda 等人 1996；Venema 等人 1998；Wassdal 等人 1999；Cruzblanca 等人 1998；Ricupero 等人 1997；Pascale 等人 1999)。經由相同的路徑，BK 亦藉由激化促分裂原活化蛋白(MAP)激酶而觸發其他促炎性細胞激素的產生 (Hayashi 等人，2000；Schwaninger 等人 1999；Phagoo 等人 2001)。AD 大腦細胞內 Ca^{2+} 濃度大幅上升的現象亦如同 AD 周邊細胞回應舒緩素的刺激和 K^{+} 管道的不活化時 (Etcheberrigaray 等人 1993、1998；Hirashima 等人 1996；Gibson 等人 1996(a))。

藉由磷脂酶 C(PLC)的刺激及後續 BK2bR 的活化亦可導致二醯甘油 (diacylglycerol)的產生而與細胞內 Ca^{2+} 的增加共同激化蛋白激酶(PKC)異構物。BK-活化 PLC/磷脂- Ca^{2+} /PKC 與 Ras/Raf 信號路徑進行一連串的交互作用，而激化 MAP 激酶家族亞群中一種細胞外信號調節激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2，以下簡稱 Erk1/2，Erk1 和 Erk2，其共同被稱為 Erk1/2) (Berridge1984；BAssa 等人 1999；Hayashi 等人 2000；Blaukat 等人 2000；Zhao 等人，疾病的神經

生物學 11：166~183，2002)。Erk1/2 從多信號傳導路徑接收信號以及藉由通過許多轉錄因子包括 AP-1、NF- κ B 和 cAMP 反應元件結合蛋白 (cyclic AMP-responsive element binding protein，以下簡稱 CREB) 之調節基因表現而導致細胞的增生和分化。作為其一主要激酶，Erk2 在多重絲胺酸/蘇胺酸位點包括 Ser-262 和 Ser-356 磷酸化 tau 蛋白 (Reynolds 等人 1993；Lu 等人 1993)。此外，在不同實驗室中已顯示 PKC-活化 MAP 激酶和 BK 受體相關路徑可調節溶解型類澱粉先驅蛋白 (soluble form of amyloid precursor protein，以下簡稱 sAPP) (Desdouits- Magnen 等人 1998；Gasparini 等人 2001；Nitsch 等人 1994、1995、1996、1998)。這些發現認為 BK 相關 sAPP 過程可能與 PKC-MAP 激酶路徑有關。另一方面，例如病毒感染的病理狀態增加氧化壓力、異常化 APP 的表現和暴露於 AP β 而導致 MAP 激酶的活化 (Rodems 和 Spector 1998；McDonald 等人 1998；Ekinici 等人 1999；Grant 等人 1999) 及加強 tau 的磷酸化 (Greenberg 等人 1994；Ekinici 和 Sheal 1999；Knowles 等 1999)。這些效應擾亂了 AD 病因中的 MAP 激酶信號路徑。

促分裂原活化蛋白激酶 (如 Erk1 和 Erk2) 調節微管相關蛋白 tau 的磷酸化及 β 類澱粉蛋白的處理，其在阿茲海默症的病理生理學上均極為重要。在家族和散發性阿茲海默症的纖維母細胞中已檢測出舒緩素之 Erk1/2 磷酸化的強化及延長作用，但在年紀相仿的對

照組中則否(Zhao 等人, 疾病神經學 11: 166~183, 2002)。

在阿茲海默症纖維母細胞內已發現舒緩素誘發的持續性 Erk1/2 磷酸化作用, 其為 WO 02/067764 的主題, 而將其完整併入於此以供參照。

亟需一種用於診斷阿茲海默症的檢測法, 其具有高敏感性和高特異性並且可有效篩檢治療和預防阿茲海默症的化合物。與先前習知的檢測法比較, 本發明者已於第一時間鑑定出具有高敏感和高特異性之用於診斷阿茲海默症的獨特阿茲海默症特異性生物標記。因此, 此處所述之作為診斷基礎的獨特阿茲海默症特異性分子生物標記在檢測阿茲海默症上具有高敏感性和特異性。本發明的獨特阿茲海默症特異性分子生物標記亦可有效用於篩檢法中以鑑定出可能被用作為治療和預防阿茲海默症之治療劑的化合物。

【發明內容】

本發明係關於一種檢測生物體是否具有阿茲海默症的方法。本發明具體實施例之方法包括將取自該生物體的細胞與 β 類澱粉樣胜肽相接觸培養, 並檢測所述接觸培養步驟是否誘發該細胞成為阿茲海默症表現型, 當該細胞會被誘發成阿茲海默症表現型時, 顯示該生物體係不具阿茲海默症。本發明另一具體實施例中, 若於與該 β 類澱粉樣胜肽之接觸培養步驟中, 並未對該細胞產生顯著變化的阿茲海默症表現型時, 顯示該生物體係具有阿茲海默症, 而所謂沒有顯著變化的阿茲海默症表現型係指阿茲海

默症特異性分子生物標記的數值相較於與該 β 類澱粉樣胜肽之接觸培養前之數值是不變的，或是阿茲海默症特異性分子生物標記的數值相較於與該 β 類澱粉樣胜肽之接觸培養前之數值是少於 15%，或少於 14%，或少於 13%，或少於 12%，或少於 11%，或少於 10%，或少於 9%，或少於 8%，或少於 7%，或少於 6%，或少於 5%，或少於 4%，或少於 3%，或少於 2%，或少於 1%，或少於 0.5%，或少於 0.25%。

本發明一具體實施例中， β 類澱粉樣胜肽係為 $A\beta$ (1-42)，但其他 β 類澱粉樣胜肽亦同可利用。本發明另一具體實施例中，並包括將該細胞與蛋白激酶 C 活化劑相接觸培養，該蛋白激酶 C 活化劑並可選自舒緩素、苔蘚蟲素、旁貝素、膽素、凝血酶、前列腺素 $F2\alpha$ 和血管收縮素所構成的群組。於本發明另一具體實施例中，該細胞則可選自皮膚纖維母細胞、唾液、血液、尿液、皮膚細胞、頰黏膜細胞與腦脊髓液所構成的群組。前述方法並可於體內或體外檢測，較佳為於體外檢測。

本發明一具體實施例中，當該細胞阿茲海默症特異性分子生物標記的數值係大於零之正數值時，將被誘發阿茲海默症表現型。

本發明一測定生物體不具阿茲海默症的方法之較佳具體實施例中，包括將取自該生物體的細胞與 $A\beta$ (1-42) 相接觸培養；將該細胞與舒緩素相接觸培養；測定阿茲海默症特異性分子生物標記的數值；當該特異性阿茲海默症分子生物標記的數值係大於零之正數值時，顯

示該生物體係不具阿茲海默症。於本發明另一具體實施例中，與該 β 類澱粉樣胜肽 ($A\beta$ (1-42)) 之接觸培養步驟中，並未對該細胞產生顯著變化的阿茲海默症表現型時，顯示該生物體係具有阿茲海默症。所謂沒有顯著變化的阿茲海默症表現型係指阿茲海默症特異性分子生物標記的數值相較於與該 β 類澱粉樣胜肽 ($A\beta$ (1-42)) 接觸培養前之數值是不變的，或是阿茲海默症特異性分子生物標記的數值相較於與該 β 類澱粉樣胜肽 ($A\beta$ (1-42)) 之接觸培養前之數值是少於 15%，或少於 14%，或少於 13%，或少於 12%，或少於 11%，或少於 10%，或少於 9%，或少於 8%，或少於 7%，或少於 6%，或少於 5%，或少於 4%，或少於 3%，或少於 2%，或少於 1%，或少於 0.5%，或少於 0.25%。本發明一較佳具體實施例中，該細胞係周邊細胞。本發明另一較佳具體實施例中，該細胞可選自皮膚纖維母細胞、唾液、血液、尿液、皮膚細胞、頰黏膜細胞與腦脊髓液所構成的群組。

本發明亦係關於一種鑑定有效用於治療阿茲海默症之先導化合物的方法，其步驟包括將非阿茲海默症的細胞與 β 類澱粉樣胜肽相接觸培養、將相同細胞與蛋白激酶 C 活化劑相接觸培養、將該細胞進一步與接觸測試化合物接觸培養，以及檢測一阿茲海默症特性異分子生物標記的數值。

本發明的一具體實施例中，該 β 類澱粉樣胜肽係 $A\beta$ (1-42)，但並不僅限於此，其他 β 類澱粉樣胜肽亦同可利用。本發明的另一具體實施例中，該非阿茲海默

症細胞係選自纖維母細胞、唾液、血液、尿液、皮膚細胞、頰黏膜細胞和腦脊髓液所構成的群組。本發明又另一具體實施例中，該蛋白激酶 C 活化劑係選自舒緩素、苔蘚蟲素(bryostatin)、旁貝素(bombesin)、膽素(cholecystokinin)、凝血酶、前列腺素 F2 α 和血管收縮素所構成的群組。

本發明的某些具體實施例中，該阿茲海默症特異性分子生物標記的值若小於未接觸測試化合物之對照細胞測得之類似分子生物標記的值時，則該阿茲海默症特異性分子生物標記的值顯示該化合物可有效用於治療阿茲海默症。在較佳的具體實施例中，該對照細胞已接觸 β 類澱粉樣胜肽。在其他較佳的具體實施例中，該 β 類澱粉樣胜肽係 A β (1-42)，但並不僅限於此，其他 β 類澱粉樣胜肽亦同可利用。又其他較佳的具體實施例中，該對照細胞已接觸蛋白激酶 C 活化劑。

某些具體實施例中，該鑑定有效用於治療阿茲海默症之先導化合物的方法進一步的步驟包括與未改良化合物的安全性和藥效比較改良該經鑑定有效用於治療阿茲海默症的化合物至最佳化或改善其安全性和藥效。在一較佳的具體實施例中，該經鑑定之改良化合物可有效用於治療阿茲海默症。

本發明亦揭示一種治療阿茲海默症的方法，其包括將治療有效劑量之該經改良化合物投予至需治療的生物體。

本發明亦係關於一種鑑定有效用於治療阿茲海默

症之化合物的方法，其包括使非阿茲海默症對照細胞接觸 $A\beta(1-42)$ (並不僅限於此，其他 β 類澱粉樣肽亦同可利用)、使該相同對照細胞接觸舒緩素、使該對照細胞進一步接觸測試化合物，以及檢測阿茲海默症特异性分子生物標記的值以鑑定一化合物是否可有效用於治療阿茲海默症。

在某些具體實施例中，本發明係關於檢測生物體之阿茲海默症的方法，其步驟包括使獲得自生物體的細胞接觸蛋白激酶 C 活化劑及檢測細胞內特异性磷酸化 MAP 激酶的比率以檢測生物體的阿茲海默症。在一較佳的具體實施例中，該特异性磷酸化 MAP 激酶的比率係介於兩種磷酸化 MAP 激酶之間的比率。在較佳的具體實施例中，本發明的檢測方法包括一種體外的檢測法。在本檢測法又更佳的具體實施例中，該特异性磷酸化 MAP 激酶係屬於相同蛋白家族中相互不同的序列變異株。

本發明的某些具體實施例中，特异性磷酸化 MAP 激酶的比率係磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率以及係藉由磷酸化 Erk1 常態化量除以磷酸化 Erk2 常態化量之計算而得。在本發明的較佳具體實施例中，該蛋白激酶 C 活化劑係選自舒緩素、苔蘚蟲素、旁貝素、膽素、凝血酶、前列腺素 $F2\alpha$ 和血管收縮素所構成的群組。

本發明的某些具體實施例中，該可有效用於檢測法中的細胞係周邊細胞。在較佳的具體實施例中，該細

胞可為皮膚細胞、皮膚纖維母細胞、血液細胞或頰黏膜細胞。在某些具體實施例中，該細胞非分離自腦脊髓液。在其他較佳的具體實施例中，該細胞不包括腦脊髓液。又其他較佳的具體實施例中，該細胞非取自脊髓穿刺或腰椎穿刺。

本檢測法的某些具體實施例中，蛋白激酶 C 活性劑係在含血清的介質內接觸細胞。本發明的其他較佳具體實施例中，蛋白激酶 C 活性劑係在無血清的介質內接觸該細胞。

本發明之檢測法的某些具體實施例中，藉由免疫分析法檢測磷酸化 MAP 激酶。本發明的較佳具體實施例中，該免疫分析法可為放射免疫分析法、西方墨點分析法、免疫螢光分析法、酵素免疫分析法、免疫沈澱分析法、化學螢光分析法、免疫組織化學分析法、免疫電泳分析法、圓漬墨點分析法，或狹縫墨點分析法。在本發明檢測法的更佳具體實施例中，該測定係利用蛋白質陣列、胜肽陣列或蛋白質微陣列。

在本發明之檢測法的某些具體實施例中，當利用本發明所述方法檢測出阿茲海默症為陰性時（欠缺或並無具阿茲海默症之檢測結果），可進一步藉由本發明所揭露的其他方法確認其係不具阿茲海默症。所述確認的檢測方法可同時或先後於本發明中所揭露之方法進行。相似的情況下，當利用本發明所述方法檢測出阿茲海默症為陽性時（檢測結果顯示具阿茲海默症），進一步亦可藉由本發明所揭露的其他方法確認其係具阿

茲海默症，而此確認的檢測方法可同時或先後於本發明中所揭露之方法進行。

在本發明之檢測法的某些具體實施例中，生物體內之阿茲海默症的檢測可藉由使取自生物體的細胞接觸蛋白激酶 C 活化劑然後檢測磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率，其中該磷酸化第一和磷酸化第二 MAP 激酶係取自已接觸蛋白激酶 C 活化劑的細胞。在本發明檢測法的進一步具體實施例中，檢測取自生物體未接觸蛋白激酶 C 活化劑之細胞內磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率，然後從取自細胞接觸蛋白激酶 C 活化劑後之磷酸化第一和第二 MAP 激酶的比率減去此比率以根據其比率上的差異檢測該生物體之阿茲海默症的存在。

在本發明之檢測法的較佳具體實施例中，若該比率的差異為正值則該生物體被檢測為存在有阿茲海默症。

在本發明之檢測法的其他較佳具體實施例中，若該比率的差異為負值或零則該生物體被檢測為不存在阿茲海默症。

本發明的某些具體實施例係關於用於檢測生物體之阿茲海默症的套組。在本發明的某些具體實施例中，該套組包含一蛋白激酶 C 活化劑；在本發明進一步的具體實施例中，該套組包含對磷酸化第一 MAP 激酶具專一性的抗體。在本發明又進一步的具體實施例中，該套組包含對磷酸化第二 MAP 激酶具專一性的抗

體。在較佳的具體實施例中，該套組包含上述的任何組合。

在本發明的某些具體實施例中，該用於檢測生物體阿茲海默症的套組包含一或多種蛋白激酶 C 活化劑其係選自舒緩素、苔蘚蟲素、旁貝素、膽素、凝血酶、前列腺素 F2 α 和血管收縮素所構成的群組。在一較佳具體實施例中，該套組可包括前述之任何組合。

在本發明的某些具體實施例中，該用於檢測生物體阿茲海默症的套組含有用於磷酸化 Erk1 或磷酸化 Erk2 或二者的特異性抗體。在本發明的較佳具體實施例中，該套組含有抗磷酸化 Erk1 抗體。在本發明的其他較佳具體實施例中，該套組含有抗磷酸化 Erk2 抗體。在一較佳具體實施例中，該套組可包括前述之任何組合。

在本發明的某些具體實施例中，該用於檢測生物體阿茲海默症的套組可進一步包括 β 類澱粉樣胜肽，而該 β 類澱粉樣胜肽可為 A β (1-42)。

在本發明的某些具體實施例中，該用於檢測生物體是否具有阿茲海默症的套組，包含一 β 類澱粉樣胜肽；一對磷酸化第一 MAP 激酶具專一性的抗體；以及一對磷酸化第二 MAP 激酶具專一性的抗體。在一較佳具體實施例中，該 β 類澱粉樣胜肽可為 A β (1-42)。在一較佳具體實施例中，該套組可包括前述之任何組合。

本發明的某些具體實施例係關於篩檢用於治療或預防阿茲海默症之測試化合物(或先導化合物)的方

法，其包括：使用於檢測生物體阿茲海默症的分離細胞接觸蛋白激酶 C 活化劑，其中該接觸係存在測試化合物(或先導化合物)；檢測磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率，其中該磷酸化第一和磷酸化第二 MAP 激酶係取自該接觸後的細胞；檢測未接觸測試化合物(或先導化合物)生物體細胞內之磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率；將未接觸測試化合物(或先導化合物)獲得的比率減去接觸測試化合物(或先導化合物)獲得的比率；以及根據比率上的差異鑑定該用於治療阿茲海默症的測試化合物(或先導化合物)。在篩檢用於治療或預防阿茲海默症測試化合物(或先導化合物)之方法的較佳具體實施例中，該比率計算出之差異若為負值或零時表示一測試化合物(或先導化合物)可有效用於治療阿茲海默症。

在較佳的具體實施例中，本發明係關於篩檢用於治療或預防阿茲海默症體外檢測法之測試化合物(或先導化合物)的方法。

用於篩檢治療或預防阿茲海默症測試化合物(或先導化合物)之方法的較佳具體實施例中，該第一 MAP 激酶係 Erk1 以及第二 AMP 激酶蛋白係 Erk2。本發明又更佳的具體實施例中，藉由磷酸化 Erk1 的常態化量除以磷酸化 Erk2 的常態化量計算該比率。在本發明的進一步具體實施例中，該蛋白激酶 C 活化劑係選自舒緩素、苔蘚蟲素、旁貝素、膽素、凝血酶、前列腺素 F2 α 和血管收縮素所構成的群組。在本發明的進一步

具體實施例中，該細胞為周邊細胞。本發明又進一步的具體實施例中，該周邊細胞係選自皮膚細胞、皮膚纖維母細胞、血液細胞和頰黏膜細胞所構成的族群。本發明又進一步的具體實施例中，該細胞非分離自腦脊髓液。本發明又進一步的具體實施例中，該細胞不包括腦脊髓液。本發明又進一步的具體實施例中，該細胞非取自髓穿刺或腰椎穿刺。本發明又進一步的具體實施例中，該蛋白激酶 C 活化劑係在含血清的介質內接觸該細胞。本發明又進一步的具體實施例中，該蛋白激酶 C 活化劑係在無血清的介質內接觸該細胞。本發明又進一步的具體實施例中，藉由免疫分析法檢測磷酸化 MAP 激酶。本發明又進一步的具體實施例中，該免疫分析法係放射免疫分析法、西方墨點分析法、免疫螢光分析法、酵素免疫分析法、免疫沈澱分析法、化學螢光分析法、免疫組織化學分析法、免疫電泳分析法、圓漬墨點分析法，或狹縫墨點分析法。本發明又進一步的具體實施例中，該檢測法係利用蛋白質陣列、胜肽陣列或蛋白質微陣列。

在某些具體實施例中，本發明係關於一種監控生物體內阿茲海默症病程的方法，其包括檢測阿茲海默症特異性分子生物標記。在某些較佳具體實施例中，該方法包括在一個以上的時間點檢測阿茲海默症的特異性分子生物標記。在較佳的具體實施例中，在相隔至少 6 個月的時間點檢測該阿茲海默症的特異性分子生物標記，該時間點更佳為相隔至少 12 個月。在本發明

的較佳具體實施例中，疾病之阿茲海默症特異性分子生物標記的數值（較少的正數值）可顯示該生物體之阿茲海默症的惡化程度。

在某些具體實施例中，本發明係關於用於治療阿茲海默症的組成物，其包括以此處所述之任何化合物篩檢方法所鑑定的化合物。在較佳的具體實施例中，本發明的組成物包括用於需治療阿茲海默症之生物體的醫藥上組成物，其含有以此處所述化合物篩檢的任何方法所鑑定的治療有效劑量之化合物。

藉由篩檢化合物的任何此處所述方法可鑑定出治療有效劑量的化合物。

在某些具體實施例中，本發明係關於一種治療阿茲海默症的方法，其包括投予治療有效劑量之任何已揭示醫藥上組成物至需治療的生物體。

【實施方式】

在某些面向中本發明係關於檢測取自己鑑定被用於測試和診斷之人類細胞內阿茲海默症的方法。該檢測係根據獨特阿茲海默症特異性分子生物標記的發現。在某些面向中，本發明係關於監控阿茲海默症病程的方法以及係關於鑑定用於治療或預防阿茲海默症之先導化合物的篩檢方法。在某些面向中本發明亦係關於確認生物體或由生物體取出細胞樣本是否具阿茲海默症的方法。

由於無法從人類活體中直接取得腦內的神經細

胞，因此不易早期診斷出阿茲海默症。藉由檢測此處所述的阿茲海默症特異性分子生物標記，本發明提供一種早期檢測阿茲海默症之高可行性、高特異性和高選擇性的檢測法。此外，此處所述的阿茲海默症特異性分子生物標記可作為追蹤疾病進展及作為鑑定被發展用於治療和預防阿茲海默症之治療劑的基礎。

本發明者已發現利用具有高敏感性和高專一性以周邊(非中樞性)組織檢測阿茲海默症之檢測法的一種阿茲海默症獨特分子生物標記。本發明之最大優點為此處所述的檢測和方法可在最低傷害程度下從生物體取得該組織，即不需使用脊椎穿刺法。因此，本發明的一面向係關於早期偵測生物體內阿茲海默症的一種檢測或測試法，其利用對人類細胞例如皮膚纖維母細胞或其他周邊細胞如血液細胞內生長介質之基線常態化反應以專一性抗體檢測由蛋白激酶C活化劑(如舒緩素)誘發之磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的內控比率。

在本發明的方法中，該取自個體或病人的細胞為任何的活細胞。本發明的測試中較佳為使用皮膚纖維母細胞，但可使用容易取得或處理的任何其他周邊組織細胞(即，中樞神經系統之外的組織細胞)。其他合適的細胞包括，但不侷限於，血液細胞如紅血球和淋巴球、頰黏膜細胞、神經細胞如嗅覺神經細胞、腦脊髓液、尿液及任何其他周邊細胞類型。此外，該用於比較的細胞非必然來自健康的供給者。

該細胞可為新鮮或經過培養(請參閱美國專利案

6,107,050)。在一特定的具體實施例中，可使用從生物體的皮膚穿刺檢體獲得皮膚纖維母細胞。可直接利用此處所述的技術分析這些纖維母細胞或進行細胞培養。然後根據實施例和說明書全文內所述的方法分析該經培養的纖維母細胞。其他步驟中可能需要製備用於分析的其他類型細胞，例如頰黏膜細胞、神經細胞如嗅覺細胞、血液細胞如紅血球和淋巴球等。例如，可藉由採血輕易地從周邊血管取得血液細胞。藉由標準程序(例如，利用細胞篩選儀、離心等)可分離該細胞以進行後續的分析。

因此，在某些面向中本發明係關於檢測和治療生物體之阿茲海默症的方法。在某些具體實施例中，本發明的檢測方法係根據取自生物體細胞內已被蛋白激酶 C 活化劑所激化的兩種特異性和不同磷酸化 MAP 激酶之比率的測定。在某些具體實施例中，本發明亦係關於含用於檢測阿茲海默症之試劑的套組。在某些面向中，本發明係關於篩檢用於鑑定治療阿茲海默症之先導化合物的方法以及係關於利用先導化合物的這些化合物或化學衍生物治療或預防生物體之阿茲海默症的方法。

I. 定義

此處藥物篩檢和檢測一文中所述的”敏感性”意指該測試疾病中顯示陽性結果的感染個體比例，即真陽性結果除以真陽性和偽陰性結果的總和，其通常以百分比表示。

此處藥物篩檢和檢測一文中所述的”特異性”意指該測試疾病中顯示陰性測定結果的個體比例，即真陰性結果佔真陰性和偽陽性結果總和的比例，其通常以百分比表示。

此處”高敏感性”一詞意指一檢測法具有大於或等於約 50%、或約 55%、或約 60%、或約 65%、或約 70%、或約 75%、或約 80%、或約 85%、或約 90%、或約 95%、或約 96%、或約 97%、或約 98%、或約 99%或約 100% 的敏感性。

此處”高特異性”一詞意指一檢測法具有大於或等於約 50%、或約 55%、或約 60%、或約 65%、或約 70%、或約 75%、或約 80%、或約 85%、或約 90%、或約 95%、或約 96%、或約 97%、或約 98%、或約 99%或約 100% 的特異性。

此處”先導化合物”係指此處所述之化合物篩檢法所鑑定出的化合物。先導化合物具有將此處所述之阿茲海默症特異性分子生物標記轉換成相當於利用正常健康細胞檢測阿茲海默症特異性分子生物標記所計算出之值的活性。先導化合物於後續可被化學性地改良而最佳化或強化其活性以作為治療或預防阿茲海默症的醫藥組成物。

此處所述的”序列變異”係指具有構造上和功能上相互關係的蛋白質。在某些具體實施例中，序列變異係在胺基酸層次上分享構造上類似性以及在酵素活性上分享功能屬性的蛋白質。在某些具體實施例中，序

列變異為可催化其他蛋白質之磷酸化作用的 MAP 激酶。

此處所述的”不具阿茲海默症”係指生物體或由該生物體所取出之細胞並不存有可供計測或偵測之阿茲海默症表現型。

此處所述生物體或由該生物體所取出細胞的”阿茲海默症表現型”係指，但不限於，阿茲海默症特異性分子生物標記的數值係大於零之正數值。

此處所述的” β 類澱粉樣胜肽”係指 β 類澱粉樣胜肽之任何片段或全長。

II. 檢測阿茲海默症的方法

在某些具體實施例中，本發明係關於檢測阿茲海默症的方法。在某些較佳具體實施例中，該檢測方法的步驟包括從生物體取得細胞樣本、使該細胞樣本接觸蛋白激酶 C 活化劑以及檢測該細胞樣本內特異性磷酸化 MAP 激酶的比率以檢測該生物體內的阿茲海默症。在某些特定具體實施例中，此處所述的檢測法可於體外或活體內進行。在一特定的具體實施例中，該蛋白激酶 C 活化劑為舒緩素。在進一步的特定具體實施例中，特異性磷酸化 MAP 激酶的比率係磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率，其係磷酸化 Erk1 之相對或常態化量除以磷酸化 Erk2 之相對或常態化量的計算而得。

阿茲海默症特異性分子生物標記

此檢測及篩檢用於治療阿茲海默症之此處所述化

合物的方法係根據發明者對阿茲海默症之獨特分子生物標記的發現。阿茲海默症特異性分子生物標記的數值視某些變數而定，舉例如用於檢測的細胞、用於檢測的蛋白激酶 C 活化劑以及用於測定磷酸化比率的特異性 MAP 激酶活化劑。

在一特定的具體實施例中，阿茲海默症特異性分子生物標記的測定可藉由檢測被蛋白激酶 C 活化劑激化之細胞內磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率，然後將此值減去無蛋白激酶 C 活化劑之對照溶液(載劑)激化之細胞內磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率。在某些具體實施例中，若該差異大於零，即正值，則被檢測為阿茲海默症。在更佳的具體實施例中，若該差異小於或等於零，則表示無阿茲海默症。

在其他具體實施例中，以蛋白激酶 C 活化劑激化細胞後藉由檢測兩種磷酸化 MAP 激酶的比率測定阿茲海默症特異性分子生物標記。該分子生物標記的測定可藉由檢測被蛋白激酶 C 活化劑激化之細胞內第一磷酸化 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率，然後將此比率減去無蛋白激酶 C 活化劑之對照溶液(載劑)激化之細胞內磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率。在某些較佳具體實施例中，若該差異大於零，即正值，則被檢測為阿茲海默症。在更佳的具體實施例中，若該差異小於或等於零，則表示無阿茲海默症。

在某些具體實施例中，取自己被診斷為阿茲海默

症患者之細胞樣本(AD細胞)內的阿茲海默症特異性分子生物標記為一正數值。在某些較佳的具體實施例中，當藉由被舒緩素激化的AD細胞內檢測磷酸化Erk1對磷酸化Erk2的比率以測定阿茲海默症特異性分子生物標記時，AD細胞內該阿茲海默症特異性分子生物標記的正數值介於從約零至約0.5的範圍。

在某些具體實施例中，若檢測細胞係取自非阿茲海默症癡呆(非ADD細胞)，舉例如帕金森氏症、杭丁頓氏症(Huntington's)或臨床精神分裂症之患者時，該阿茲海默症特異性分子生物標記係為負數值。在某些較佳具體實施例中，當藉由檢測被舒緩素激化之非ADD細胞內的磷酸化Erk1對磷酸化Erk2比率測定阿茲海默症特異性分子生物標記時，該負數值介於從約零至約-0.2或約-0.3的範圍。

在某些具體實施例中，取自年紀相仿之非阿茲海默症患者的對照細胞樣本其阿茲海默症特異性分子生物標記為負數值、零或極低的正數值。當藉由檢測被舒緩素激化之AC細胞內的磷酸化Erk1對磷酸化Erk2比率測定阿茲海默症特異性分子生物標記時，其AC細胞內之阿茲海默症特異性分子生物標記介於從低於約0.05至約-0.2的範圍。

在本發明的某些具體實施例中，藉由計算舒緩素激化之細胞內磷酸化Erk1對磷酸化Erk2的比率減去無舒緩素溶液激化之細胞內磷酸化Erk1對磷酸化Erk2的比率可測定出該阿茲海默症特異性分子生物標記。

此可表示如下：阿茲海默症特異性分子生物標記＝

$$\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{舒緩素}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{載劑}}\}$$

在某些具體實施例中(如第一圖所示)，AD 細胞內阿茲海默症特異性分子生物標記測定為在大於約 0.02 和低於約 0.4 之間的正比值。混合型 AD/PD/LBD 病群內的阿茲海默症特異性分子生物標記為在極低的正比值，即低於約 0.02 或約 0.03。非癡呆症年紀相仿對照細胞內的阿茲海默症特異性分子生物標記為負比值或在極低的正數值，即低於約 0.01。非 ADD 細胞內的阿茲海默症特異性分子生物標記為負比值。第一圖中描述四種不同類型病人的 ADSMB (圖中註明為”辨識因子(DF)”)：取自 Coriell 細胞庫和經屍體解剖確認之阿茲海默症(AD)、混合型 AD/PD/DLV(藉由屍體解剖確認為阿茲海默症、帕金森氏症和雷維小體症的混合型)、年紀相仿的對照(AC)及非 AD 癡呆症(帕金森氏症和杭丁頓氏症)的細胞株。

在某些具體實施例中(如第二圖所示)，該圖顯示了阿茲海默症特異性分子生物標記的線性迴歸分析作為其與癡呆症期間之年數的函數關係。該線性迴歸顯示約-0.01 的負斜度表示癡呆期間之年數與正比值之阿茲海默症特異性分子生物標記之間的逆向關係。當癡呆症的年數增加(即，阿茲海默症惡化)時，該阿茲海默症特異性分子生物標記的正數值變得較低。由於該疾病在早期時有更高的正數值，因此阿茲海默症特異性分子生物標記的測定可早期診斷出阿茲海默症。藉由檢

測經舒緩素激化之細胞內磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比值減去無舒緩素介質激化之細胞內磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比值測定阿茲海默症特異性分子生物標記。此可表示如下：阿茲海默症特異性分子生物標記 = $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{舒緩素}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{載劑}}\}$ 。阿茲海默症特異性分子生物標記之線性迴歸分析顯示其和屍體解剖確認病例之病程的函數關係。阿茲海默症特異性分子生物標記在疾病的早期較為有效。此顯示本發明之方法可更有效用於阿茲海默症的早期診斷。

蛋白激酶 C 活化劑

可特別被使於本檢測法、套組及鑑定本發明化合物之篩檢法內的蛋白激酶 C 活化劑包括，但不侷限於：舒緩素； α -APP 調節劑；苔蘚蟲素 1；苔蘚蟲素 2；DHI；1,2-二辛醯基-sn-甘油；FTT；狼毒素(Gnidimacrin)，西北狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)；(-)-吲哚內醯胺 V；脂氧素 A₄ (Lipoxin A₄)；林比毒(Lyngbyatoxin)，小單孢菌屬(*Micromonospora* sp.)；油酸；1-油醯基-2-乙醯基-sn-甘油；4 α -巴豆醇(4 α -Phorbol)；巴豆醇-12,13-二丁酸酯；巴豆醇-12,13-二癸酸酯；4 α -巴豆醇-12,13-二癸酸酯；豆蔻醯巴豆醇乙酯(Phorbol-12-myristate-13-acetate)；L- α -磷脂醯基肌醇-3,4-二磷酸酯，二軟脂醯基-，戊銨鹽；L- α -磷脂醯基肌醇-4,5-二磷酸酯，二軟脂醯基-，戊銨鹽；L- α -磷脂醯基肌醇-3,4,5-二磷酸酯，二軟脂醯基-，戊銨鹽；1-硬脂醯基-2-十九醯基-sn-甘油；瑞香毒素

(Thymeleatoxin)，瑞香(*Thymelea hirsuta* L.)；胰島素；巴豆醇酯；溶血磷脂酰膽鹼；脂多醣；蒽環黴素(anthracycline)；柔紅黴素(daunorubicin)及硫酸釩。已知為”類蘚苔植物(bryologues)”的化合物亦包含於其內。類蘚苔植物已被描述例如於 Wender 等人，有機快報(Organic Letters，美國)2005 年 5 月 12 日(10)1995~8 頁；Wender 等人，有機快報(美國)2005 年 4 月 17 日，7(6)11.77~80 頁；Wender 等人，醫藥化學期刊(Journal of Medical Chemistry，美國)2004 年 12 月 16 日，47(26)6638~44 頁。可單獨使用蛋白激酶 C 活化劑或結合任何其他蛋白激酶 C 活化劑於該檢測法、套組和篩檢此處所述化合物的方法中。

舒緩素係在各種炎症性病程中產生的一種強效血管活性九肽(nonapeptide)。舒緩素結合並活化特異性細胞膜舒緩素受體，因而觸發一連串導致蛋白質磷酸化作用之已知為”促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)”的細胞內反應。添加磷酸鹽基至絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸殘基的蛋白質磷酸化作用係藉由大量總稱為蛋白激酶的酵素。磷酸化作用通常可改良蛋白質的功能及激發其活性。磷酸化作用係一短暫的過程，其被能夠去磷酸化基質的磷酸酶所逆轉而達到體內的平衡。任何磷酸化或去磷酸化作用的干擾可阻斷生化路徑及細胞功能。此類阻斷作用可能為某些腦性疾病的根本病因。

測定或檢測磷酸化蛋白的濃度

檢測阿茲海默症的方法及篩檢化合物以鑑定有效

用於治療或預防阿茲海默症之此處所述藥物的方法係依賴本發明之阿茲海默症特異性分子生物標記的檢測。

在一較佳具體實施例中，藉由西方墨點法檢測細胞內磷酸化蛋白的濃度。可利用抗-Erk1、抗-Erk2、抗磷酸化-Erk1 和抗磷酸化-Erk2 檢測纖維母細胞內磷酸化 Erk1 或磷酸化 Erk2 的蛋白質濃度(細胞傳導科技)。亦可在細胞樣本內檢測不同蛋白質的濃度以作為常態化的參考蛋白。參考蛋白的可能實施例包括，但不侷限於，膜聯蛋白-II (annexin-II)或肌動蛋白(actin)。

在一具體實施例中，根據下述程序進行酵素連結免疫吸附分析(ELISA)：1) 在雙重或三重處理之後將纖維母細胞溶解產物加入事先塗佈抗-Erk抗體的 96 孔微量盤內；2) 在室溫下將微量盤之孔內的樣本培養約 2 小時；3) 抽出樣本並以磷酸鹽緩衝液(PBS)化洗滌液清洗各孔；4) 將抗磷酸化-Erk1/2 或反正常 Erk1/2 抗體的稀釋液加入各孔內，然後在室溫下培養約 1 小時；5) 抽出並以緩衝液清洗；6) 將共軛辣根過氧化氫酶(HRP)之第二抗體的稀釋液加入各孔內，然後在室溫下培養約 30 分鐘；7) 抽出並以緩衝液清洗；8) 加入穩定化色原質(chromogen)如二胺基聯苯胺(DAB)，然後在室溫下培養約 30 分鐘；9) 加入終止液然後檢測在 450 奈米的吸光度。在常態化後評估 Erk1/2 的磷酸化作用： $NR = A_F / A_R$ 。其 NR=標準比率； A_F 為磷酸化-Erk1/2 的吸光度值；以及 A_R 為總(正常)Erk1/2 的吸光度。

在一較佳的具體實施例中，利用抗磷酸化-Erk1/2 抗體在西方墨點上檢測 Erk1/2 的磷酸化作用。經由光密度掃描定量磷酸化-Erk1/2 的免疫反應信號程度。利用在分開的西方墨點上從具有抗正常 Erk1/2 抗體的相同細胞溶解產物樣本檢測總 Erk1/2 信號的平均密度常態化磷酸化-Erk1/2 信號的平均密度。該常態化公式為： $NR = D_F / D_R$ 。其 NR(常態化比率)代表 Erk1/2 的磷酸化程度； D_F 為磷酸化-Erk1/2 的平均密度，以及 D_R 為在西方墨點上從相同樣本測得 Erk1/2 總量的平均密度。

在一具體實施例中(如第三圖所示)，就舒緩素處理組(BK+)而言，細胞在 37°C 下以 10 奈克分子舒緩素處理 10 分鐘。就對應載劑處理組(BK-)而言，無血清(24 小時)細胞在 37°C 下以同量的 DMSO(無 BK)處理 10 分鐘。在 10 分鐘之後，經 BK+處理之 AD 細胞株的 p-Erk1/2 條帶較 BK-處理者為黑，但對照細胞株則相反。此顯示 Erk 之 BK 誘發激化作用對 AD 細胞株而言較高。

此外，在一具體實施例中，如第五 A 圖所示，測定對照(非 AD)之細胞株(AG07723、AG11363、AG09977、AG09555 和 AG09878)的阿茲海默症特異性分子生物標記(圖中註明為"辨識因子(DF)")並發現其具有小的負值。經 1.0 微克分子 A β -42 處理(ADSMB)後再一次依所述方法測定發現其具有較高的正數值。此顯示經 1.0 微克分 A β (1-42)處理之後舒緩素誘發、

活化出較高的 Erk1/Erk2 比值。AC 細胞株在 $A\beta(1-42)$ 處理之後有類似 AD 表現型的行為。此外，如第五 B 圖所示，AC 細胞株經 1.0 微克分子 $A\beta(1-42)$ 處理 24 小時之後測定 ADSMB(“辨識因子(DF)”)。如較早所發現 ADSMB 的比值較高並且為正數值。相同細胞株先以 1.0 微克分子 $A\beta(1-42)$ 處理 24 小時繼之以 0.1 奈克分子苔蘚蟲素處理 20 分鐘。再一次測定 ADSMB(DF) 的比值並且發現其具有小的負值。此顯示水溶性 $A\beta$ -誘發的變化可因苔蘚蟲素的治療而逆轉。

本發明用於檢測蛋白質的免疫分析法可為免疫螢光分析法、放射免疫分析法、西方墨點分析法、酵素免疫分析法、免疫沈澱分析法、化學螢光分析法、免疫組織化學分析法、圓漬或狹縫墨點分析法等。(於“免疫分析法的原理和實務”中 (1991) Christopher P. Price 和 David J. Neoman(編輯)，Stockton 出版社，紐約州紐約市；Ausubel 等人(編輯)(1987)於“最新分子生物學實驗手冊”(Current Protocols in Molecular Biology) 中 John Wiley 和 Sons 出版公司，紐約州紐約市)。此檢測可為呈色法或放射線法或熟習本技術之人士所習知的任何其他方法。技術中已知用於 ELISA 的標準技術已描述於免疫診斷法 (Methods in Immunodiagnosis)，第二版，Rose 和 Bigazzi 編輯，John Wiley 和 Sons 出版公司，紐約 1980 以及 Campbell 等人，免疫學方法 (Methods of Immunology)，W.A. Benjamin 公司，1964；將其併入於此以供參照。此類

檢測法可為述於此技術中的直接、間接、競爭性或非競爭性免疫分析法(於"免疫分析法的原理和實務"(Principles and Practice of Immunoassay, 1991), Christopher P. Price 和 David J. Neoman(編輯), Stockton 出版社, 紐約州紐約市; Oellirich, M. 1984, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22: 895~904; Ausubel 等人(編輯)1987 於最新分子生物學實驗手冊, John Wiley 和 Sons 出版公司, 紐約州紐約市)。

細胞類型、蛋白質分離及抗體

如前所述, 該取自被檢測病人的細胞可為任何的細胞。可使用細胞的實施例包括, 但不侷限於, 皮膚細胞、皮膚纖維母細胞、頰黏膜細胞、血液細胞如紅血球、淋巴球和淋巴胚細胞, 以及神經細胞和可表現 Erk1/2 蛋白的任何其他細胞。亦可使用屍檢樣本和病理樣本。亦可使用含這些細胞的組織, 其包括腦組織或腦細胞。這些細胞可為新鮮、經培養或冷凍。分離自細胞或組織的蛋白質樣本可即刻被用於檢測法或用於篩檢化合物的方法中, 或被冷凍以待後續使用。在一較佳具體實施例中, 使用纖維母細胞。纖維母細胞可獲得自皮膚穿刺檢體。

藉由熟習本技術之人士可藉由習知的方法從細胞分離出蛋白質。在一較佳的方法中, 分離自病人的細胞在磷酸鹽緩衝液(PBS)中清洗和沈澱。然後以含 50 奈克分子 NaF、1 毫克分 EDTA、1 毫克分子 EGTA、20 微克/毫升亮抑胜肽酶(leupeptin)、50 微克/毫升抑胜

肽素(pepstatin)、10 毫克分子 TRIS-HCl, pH=7.4, 的”均質緩衝液”清洗並離心沈澱。除去上清液, 並將”均質緩衝液”加入沈澱物中接著超音波振盪該沈澱物。可立即使用該蛋白質萃取物或儲存於-80°C 下以待日後分析。

在本發明的方法中, 用於本免疫分析法的抗體可源自單株或多株抗體。用於產生抗體的該磷酸化和非磷酸化 Erk1/2 蛋白可來自天然或重組源或藉由化學合成而產生。天然 Erk1/2 蛋白可藉由習知方法分離自生物樣本。可用於分離 Erk1/2 蛋白之生物樣本的實施例包括, 但不侷限於, 皮膚細胞如纖維母細胞、纖維母細胞株如阿茲海默症纖維母細胞株以及對照纖維母細胞株, 其購自 Coriell 細胞庫公司(Camden, 紐約)和列於國家老化研究中心 1991 年的細胞株目錄、美國國家一般醫學研究院 1992/1993 年的細胞株目錄(NIH 出版公司 92~2011(1992))。

III. 用於檢測阿茲海默症的套組

本發明進一步係關於可被使用於上述任何檢測測試中的套組。該套組包含單一種檢測測試法或上述測試法的任何組合。該套組含有可辨認一般 Erk1/2(未磷酸化 Erk1 或未磷酸化 Erk2)或磷酸化 Erk1/2(磷酸化 Erk1 或磷酸化 Erk2)的抗體。該套組含有可辨認一般 MAP 激酶以及磷酸化 MAP 激酶的抗體。該套組亦可含有任何此處所述之一或多種的蛋白激酶 C 活化劑(舉例如舒緩素或苔蘚蟲素)。抗體可為多株或單株抗體。

該套組含有可進行一或多件檢體如皮膚穿刺檢體的器械、緩衝液和儲存容器。該套組亦含有檢測用於鑑定本發明阿茲海默症特異性分子生物標記之比率以及檢測試驗內使用抗體或其他成分的說明書。該說明書中亦描述採集檢體如皮膚穿刺檢體的程序。該套組中亦含有用於進行如檢測常態化參考蛋白抗體之檢測試驗的其他試劑。辨認可能參考蛋白之抗體的實施例包括，但不侷限於，可辨認膜聯蛋白-II 或肌動蛋白的抗體。該套組亦含有緩衝液、次級抗體、對照細胞等。

IV. 篩檢用於治療或預防阿茲海默症之化合物的方法

本發明亦係關於篩檢和鑑定用於治療或預防阿茲海默症之物質的方法。根據此具體實施例，將可鑑定和選擇出能逆轉或改善此處所述的阿茲海默症特異性分子生物標記(即，恢復至正常細胞所發現的水準)而作為有效用於治療或預防阿茲海默症的物質。

藉由此實施例，該鑑定治療物質的篩檢法涉及的步驟包括使取自阿茲海默症患者的樣本細胞於任何此處所述之蛋白激酶 C 活化劑存在下接觸一物質，然後檢測任何此處所述的阿茲海默症特異性分子生物標記。鑑定和選擇可逆轉或改善阿茲海默症特異性分子生物標記恢復至正常細胞(即，取自非阿茲海默症患者的細胞)之程度的物質而作為有效用於治療或預防阿茲海默症的藥物。

在某些具體實施例中，可逆轉或改善阿茲海默症特異性分子生物標記的物質為可使阿茲海默症特異性

分子生物標記的正比值更為降低和/或朝更負比值移動的藥物。

V. 監控阿茲海默症病程的方法

本發明亦係關於監控生物體內阿茲海默症病程的方法。第 2 圖為阿茲海默症特異性分子生物標記的線性迴歸分析作為其與癡呆症期間之年數的函數關係。該線性迴歸顯示約 -0.01 的負斜度，表示癡呆期間之年數與正比值之阿茲海默症特異性分子生物標記之間的逆向關係。當癡呆症的年數增加(即，阿茲海默症惡化)時，該阿茲海默症特異性分子生物標記的正數值變得較低。在某些具體實施例中，由於該疾病在早期時有更高的正數值，因此阿茲海默症特異性分子生物標記的測定可早期檢測出阿茲海默症。在某些具體實施例中，當一生物體的阿茲海默症惡化時其阿茲海默症特異性分子生物標記具有較低的正數值。

在某些具體實施例中，藉由檢測經舒緩素激化之細胞內磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率減去無舒緩素介質激化之細胞內磷酸化 Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率可測定出阿茲海默症特異性分子生物標記。此可表示如下：阿茲海默症特異性分子生物標記＝

$$\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{舒緩素}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{載劑}}\}$$

VI. β 類澱粉樣胜肽

本發明中所述“ β 類澱粉樣胜肽”係可與「 β 類澱粉樣蛋白 (beta amyloid protein)」或「 $A\beta$ 」相替換。在許多同質體中， β 類澱粉樣胜肽係類澱粉先驅蛋白 (屬穿

膜蛋白之一種) 其中段上具 39-43 個胺基酸長度之片段，其分子量約 4 KDa。類澱粉先驅蛋白亦存有多種的同質體，例如 APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹ 與 APP⁷⁷⁰。目前已知存在於人體內之 APP 為 Kang 等人於 1987 (Nature 325:733-736) 所述具有 695 個胺基酸長度的多胜肽，此即命名為 APP 之正常型蛋白質。另則由 Ponte 等人 (Nature 331:525-527) 與 Tanzi 等人於 1988 (Nature 331:528-530) 所述 751 個胺基酸長度的多胜肽，Kitaguchi 等人於 1988 (Nature 331:530-532) 所述 770 個胺基酸長度的多胜肽。藉由分泌酵素對 APP 之剪切，β 類澱粉樣胜肽被發現同時分別有 40 個胺基酸長度的「短型」以及 42-43 個胺基酸長度的「長型」。部分 APP 之疏水基團，係在 β 類澱粉樣胜肽之羧端被發現，此即造成其聚集的可能原因，特別是在長型的 AAP 中。β 類澱粉樣胜肽可以在人類或其他哺乳類之體液 (例如腦脊髓液) 中被發現或純化，無論其係正常個體或罹患有類澱粉樣胜肽生成障礙 (amyloidogenic disorders) 的個體。

此處所述的“β 類澱粉樣胜肽”係包括藉分泌酵素剪切 APP 所產生的胜肽或是與該剪切產物相同或實質相同之合成胜肽。本發明中的 β 類澱粉樣胜肽可產自各種不同來源，例如：組織、細胞株或體液 (如血清或腦脊髓液)。β 類澱粉樣胜肽可產自例如中國蒼鼠卵巢 (CHO) 細胞之 APP 表現細胞 (Walsh 等人 2002, Nature 416:535-539)，β 類澱粉樣胜肽並可利用已知方式 (Wood 等人 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550) 由組織來

源加以製備。此外， β 類澱粉樣胜肽並可利用已知方法 (Fields 等人 1992, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p 77) 加以合成。因此，胜肽可利用固相合成的 Merrifield 技術，經由側鏈胺基酸保護方式，以 t-Boc 或 F-moc 化學保護 α -胺基，例如利用應用生物系統(Applied Biosystems)所生產型號為 430A 或 431 之胜肽合成儀。較長之胜肽抗原可利用已知重組 DNA 技術加以合成。例如：一編碼胜肽或結合胜肽的多核苷酸可於合成或被選殖後，插入一適當的表現載體中，並經轉染至一適當之宿主細胞中表現。 β 類澱粉樣胜肽同時也包括正常 β 類澱粉樣胜肽突變後相關的序列。

由 β 類澱粉樣胜肽所誘發 Erk1 參數(阿茲海默症特異性分子生物標記)之異常，可作為是否具阿茲海默症的確認檢測方法。亦即， β 類澱粉樣胜肽參數的陰性反應顯示具有阿茲海默症，而為陽性反應時，則不具有阿茲海默症。換句話說，當將細胞與 β 類澱粉樣胜肽接觸培養而誘發細胞的阿茲海默症表現型時，係顯示該生物體或細胞並不具阿茲海默症。相反情況下，如果將細胞與 β 類澱粉樣胜肽接觸培養後對阿茲海默症特異性分子生物標記沒有或僅有些許的改變時，則係顯示該細胞或生物體係具有阿茲海默症。

雖然 β 類澱粉樣胜肽 (1-42) (例如 $A\beta$ (1-42)) 係一較佳誘發刺激物，但其他例如 (1-39)、(1-40)、(1-41)、(1-43)、(25-35)、(16-22)、(16-35)、(10-35)、(8-25)、(28-38)、(15-39)、(15-40)、(15-41)、(15-42) 或 (15-43)

的 β 類澱粉樣胜肽片段，或其他任何之 β 類澱粉樣胜肽片段，皆能利用於本發明中之任何的方法或套組中。

VII. 用於治療阿茲海默症的組成物

本發明亦係關於用於治療或預防阿茲海默症的組成物。可利用此處所述篩檢法鑑定出的化合物配製用於投予需治療之生物體的醫藥組成物。

本發明之醫藥組成物或利用此處所述篩檢法所鑑定之化合物(或先導化合物的化學衍生物)根據習知方法藉由混合例如醫藥上可接受載劑而成的醫藥組成物可製成例如錠劑(包括糖衣錠劑和薄膜錠劑)、粉末、顆粒、膠囊(包括軟膠囊)、溶液、注射液、栓劑、緩釋劑等，以作為口服、皮下、經表皮、經皮或非經口(例如，局部、直腸或靜脈內)的投藥。

用於本發明醫藥組成物內之醫藥上可接受載劑的實施例包括，但不侷限於各種習知的有機或無機載劑包括用於固體製備物的賦形劑、潤滑劑、黏合劑和分解劑，以及用於液體製備物的溶劑、助溶劑、懸浮劑、等滲劑、緩衝劑、緩和劑等。需要時可加入適量之習知的添加物例如抗菌劑、抗氧化劑、著色劑、甜味劑、吸附劑、濕潤劑等。

用於本發明醫藥組成物內之賦形劑的實施例包括，但不侷限於例如乳糖、蔗糖、D-山梨糖醇、澱粉、玉米澱粉、微晶纖維素、輕質無水矽酸、多糖、雙糖、碳水化合物、海藻糖等。

用於本發明醫藥組成物內之潤滑劑的實施例包

括，但不侷限於例如硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、滑石粉、矽膠等。

用於本發明醫藥組成物內之黏合劑的實施例包括，但不侷限於微晶纖維素、蔗糖、D-山梨糖醇、糊精、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、澱粉、蔗糖、凝膠、甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉等。

用於本發明醫藥組成物內之分解劑的實施例包括，但不侷限於澱粉、羧甲基纖維素、羧甲基纖維素鈣、羧甲基澱粉鈉、L-羥丙基纖維素等。

用於本發明醫藥組成物內之溶劑的實施例包括，但不侷限於注射用水、酒精、丙二醇、聚乙二醇(macrogol)、芝麻油、玉米油、橄欖油等。

用於本發明醫藥組成物內之助溶劑的實施例包括，但不侷限於聚乙二醇、丙二醇、D-山梨糖醇、苯甲酸苄酯、乙醇、三甲胺、膽固醇、三乙醇胺、碳酸鈉、檸檬酸鈉等。

用於本發明醫藥組成物內之助溶劑的實施例包括，但不侷限於表面活性劑如硬脂醯基三乙醇胺、月桂基硫酸鈉、月桂基胺丙酸鹽、卵磷脂、苯基氯卡銨、苯基氯化銨、單硬脂酸甘油酯等；親水性聚合物如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素等。

用於本發明醫藥組成物內之等滲劑的實施例包

括，但不侷限於葡萄糖、D-山梨糖醇、氯化鈉、甘油、D-甘露糖醇等。

用於本發明醫藥組成物內之緩衝劑的實施例包括，但不侷限於磷酸鹽、醋酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽等及其類似物。

用於本發明醫藥組成物內之緩和劑的實施例包括，但不侷限於苯甲醇等。

用於本發明醫藥組成物內之抗菌劑的實施例包括，但不侷限於對氧苯甲酸、氯丁醇、苯甲醇、苯乙醇、脫水乙酸、山梨酸等。

用於本發明醫藥組成物內之抗氧化劑的實施例包括，但不侷限於亞硫酸鹽、抗壞血酸、 α -生育醇等。

在某些具體實施例中，當本發明之醫藥組成物係用於注射時其使用之注射用載劑包括下列任何或全部的物質：溶劑、助溶劑、懸浮劑、等滲劑、緩衝劑、緩和劑等。溶劑的實施例包括，但不侷限於注射用水、生理鹽水、林格氏液等。助溶劑的實施例包括，但不侷限於聚乙二醇、丙二醇、D-甘露糖醇、苯甲酸苄酯、三甲胺、膽固醇、三乙胺、碳酸鈉、檸檬酸鈉等。等滲劑的實施例包括，但不侷限於葡萄糖、D-山梨糖醇、氯化鈉、甘油、D-甘露糖醇等。緩衝劑的實施例包括，但不侷限於如磷酸鹽、醋酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽等之緩衝劑。緩和劑的實施例包括，但不侷限於苯甲醇等。pH調節劑的實施例包括，但不侷限於鹽酸、磷酸、檸檬酸、氫氧化鈉、碳酸氫鈉、碳酸鈉等。

在某些具體實施例中，本發明用於注射的組成物可在無菌操作的冷凍乾器內被冷凍乾燥以及保存於粉末狀態，或被保存於密封的注射容器內(例如，安瓿)。

此外，本發明的醫藥組成物可在使用時以上述的載劑稀釋以供注射。

本發明醫藥組成物內之活性化合物的含量視製劑型式而變化，但其通常約 0.01 至約 99 重量%，較佳約 0.1 至約 50 重量%，更佳約 0.5 至約 20 重量%的全部製劑。

本發明醫藥組成物內的非離子表面活性劑的含量視製劑的型式而變化，但其通常約 1 至約 99.99 重量%，較佳約 10 至約 90 重量%，更佳約 10 至約 70 重量%的全部製劑。

本發明醫藥組成物內之乙醇、苯甲醇或二甲基乙醯胺的含量視製劑的型式而變化，但其通常約 1 至約 99.99 重量%，較佳約 10 至約 90 重量%，更佳約 30 至約 90 重量%的全部製劑。

本發明醫藥組成物內之非離子表面活性劑和乙醇的混合比例並無特殊限制，並且非離子表面活性劑：乙醇的比例為例如約 0.01~99.99：99.99~0.01，較佳約 1~99：99~1，更佳約 10~90：90~10 等。非離子表面活性劑：乙醇更佳約 10~80：90~20、約 50~80：50~20 等，以及更佳約 20：80、約 65：35 等。

本發明醫藥組成物內易溶於水之環糊精衍生物的含量視製劑的型式而變化，但其通常約 1 至約 99.99

重量%，較佳約 10 至約 99.99 重量%，更佳約 20 至約 97 重量%，最佳約 50 至約 97 重量%的全部製劑。

本發明醫藥組成物內之其他添加物的含量視製劑的型式而變化，但其通常約 1 至約 99.99 重量%，較佳約 10 至約 90 重量%，更佳約 10 至約 70 重量%的全部製劑。

本發明醫藥組成物可為含有活性化合物、非離子表面活性劑和易溶於水之環糊精衍生物的醫藥組成物。在此情況下，其各成分即活性化合物、非離子表面活性劑和易溶於水之環糊精衍生物的含量與上述的範圍相同。

VIII. 治療阿茲海默症的方法

本發明亦係關於利用此處所述之醫藥組成物治療或預防阿茲海默症的方法。

本發明之化合物的投藥可藉由口服、非經口(例如，肌肉內、腹腔內、靜脈內、ICV、腦池內注射或輸注、皮下注射或植入)，藉由吸入性噴霧、鼻腔、陰道、直腸、舌下或局部途徑投藥，以及單獨或與適合用於各投藥途徑之習知醫藥上可接受無毒性載劑、佐劑和賦形劑共同被配製成適合劑量單位的配製物。本發明的醫藥組成物和方法可進一步含有通常被應用於治療阿茲海默症的其他治療活性化合物。

在阿茲海默症的治療或預防中，每公斤病人體重的每天適當劑量通常約 0.001 至 100 毫克，其投藥時可利用單一或多劑量的形式。劑量濃度較佳為每天約

0.01 至約 25 毫克/公斤，更佳為每天約 0.05 至約 10 毫克/公斤。適合的劑量濃度為每天約 0.01 至 25 毫克/公斤，每天約 0.05 至 10 毫克/公斤，或每天約 0.1 至 5 毫克/公斤。在此範圍內其劑量可為每天約 0.005 至約 0.05、0.05 至 0.5 或 0.5 至 5 毫克/公斤。用於口服投藥時，該組成物較佳為錠劑的型式其含約 1 至 1000 毫克的活性成分，特別指含約 1、5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、750、800、900 和 1000 毫克的活性成分，並且其劑量係根據病人的症狀而調整。化合物的投藥方法可為每天 1 至 4 次，較佳為每天 1 或 2 次。

然而，應瞭解用於任何特定病人的劑量和投藥頻率視許多因素而變化，其包括所使用特定化合物的活性；該化合物的代謝穩定性和作用時間；病人的年齡、體重、健康狀況、性別、飲食狀態；投藥的模式和時間；排出速率；藥物的組合；特定疾病的嚴重程度以及接受治療的生物主體。

本專利申請案將所揭示的全部參考文獻、專利和印刷刊物併入於此以供參照其全文。

下列實施例係藉由說明以進一步描述本發明的某些較佳具體實施例，而本發明並非限制在該範圍內。

實施例 1：阿茲海默症特異性分子生物標記(ADSMB)

與非 AD 癡呆症和非失智對照纖維母細胞比較，已發現舒緩素(10 奈克分子，在 37°C 下 10 分鐘)對阿茲海默症(AD)纖維母細胞可造成 Erk1/2 較大的磷酸化作用。雖然已觀察加入 Coriell 細胞株的 AD 纖維母細胞可增加 Erk1/2 的磷酸化作用，但是這些測定中的先天性差異顯示在定量、可靠度和可重覆性上亟需獲得改善。為控制纖維母細胞生長速率的內源性差異以及凝膠上萃取蛋白精確量的差異，因此我們引進一種磷酸化作用的新穎測量法——在 BK 刺激之前和後利用 Erk1/2 的比率比較每一病人樣本之 Erk1 對 Erk2 的磷酸化作用。Erk1/Erk2 磷酸化作用之比率、阿茲海默症特異性分子生物標記(ADSMB)的測定可完全分辨出全部非失智對照纖維母細胞和全部 AD 纖維母細胞(第一和第四 A 圖)。對照病例(BK-) (第三圖)明顯較高濃度的 p-Erk1 對全部病人而言並不一致。無法分辨少數病例的非 AD 癡呆症，雖然其可能歸因於臨床診斷時缺乏檢體的證實。藉由配合檢體確認檢測之病人纖維母細胞的 ADSMB 測定結果可支持此判讀(第一和第四 B 圖)，其 ADSMB 可從全部非 AD 癡呆症以及甚至從兼患有 AD 和其他非 AD 病因如帕金森氏症之“混合型”

癡呆症病例中準確分辨出全部的 AD 病例。就 Coriell 細胞樣本和檢體確認樣本而言，此從非 AD 癡呆症和非失智對照病人中分辨 AD 的高準確度可反應在 ADSMB 的顯著敏感性和特異性(第六圖)。當僅就檢體確認檢測而言，其敏感性和特異性可達 100% 的程度。阿茲海默症特異性分子生物標記(ADSMB)隨著病程而變化

從發病期間的病人取得樣本(即，從出現症狀開始測定 ADSMB)，我們檢查 ADSMB 波幅與病程的關係。如圖所示(第二圖)，ADSMB 波幅與病程具有明顯地(以線性迴歸分析)逆相關。這些結果顯示在疾病過程的早期測定時有更多 MAP 激酶磷酸化 ADSMB 被標記。

藉由 $A\beta(1-42)$ 誘發阿茲海默症的表現型

由於 AD 早期的 $A\beta(1-42)$ 濃度最具關鍵性，以及由於 ADSMB 的觀察數據顯示具有早期診斷 AD 的能力，我們在正常對照病人中檢查增加 $A\beta(1-42)$ 對導致 MAP 激酶辨識因子 (DF) 纖維母細胞株異常的可能性，因此，將其於 1.0 微克分子 $A\beta(1-42)$ 中暴露 24 小時。如第五 A 圖所示，在全部 AD 表現型的觀察中與 $A\beta(1-42)$ 預培養時如預期可將正常(負值)ADSMB 表現基轉變成異常正值 ADSMB 表現型。這些結果認為 AD 病人內的 ADSMB 表現型實際上導因於 $A\beta(1-42)$ 濃度的上升。

藉由 PKC 活化劑苔蘚蟲素逆轉阿茲海默症表現型

如先前討論，藉由 PKC 的活化作用調節 MAP 激酶的磷酸化作用(以 ADSMB 測定)，其顯示對隨後 A β 濃度的上升極為敏感。再者，已發現巨內酯(macrolactone)、苔蘚蟲素之強效 PKC 活化劑可加強人類纖維母細胞的 PKC 活化作用及降低以人類 AD 基因轉殖小白鼠之腦內的 A β (1-42)濃度。因此，根據這些發現，我們測試苔蘚蟲素(0.1 奈克分子)對經 A β (1-42)處理之人類纖維母細胞的效應。如所述(第五 B 圖和表一)，苔蘚蟲素可完全逆轉以 A β (1-42)誘發正常纖維母細胞之 MAP 激酶磷酸化作用的改變。苔蘚蟲素將異常、正比值之經 A β 處理的纖維母細胞轉變成先前觀察非 AD 纖維母細胞的正常、負比值的 ADSMB。此苔蘚蟲素的”治療”效果與大量增加長期以苔蘚蟲素治療之 AD 轉殖基因小白鼠的存活率具有一致性。

表一

AC(對照細胞株)(對照組)、 β 類澱粉(A β)誘發細胞及 β 類澱粉(A β)誘發細胞加上苔蘚蟲素治療(A β +BY)之阿茲海默症特异性分子生物標記的測定

細胞株	ADSMB ^a		
	對照組 [*]	A β ^{* #}	A β +BY [#]
AG06959	-	0.13	0.0
AG07732	-0.11	0.12	-0.13
AG11363	0.0	0.16	0.09
AG09977	-0.15	0.13	0.01
平均±標準偏差	-0.09±0.05	0.13±0.01	-0.01±0.05

^{*}P<0.001, [#] P<0.01

^a 根據本試驗方法計算 ADSMB

^{*} T-檢定係進行於對照組和 A β 處理細胞之間

[#] T-檢定係進行於 A β 處理細胞和 A β 加上苔蘚蟲素處理細胞之間

測定 ADSMB 之 MAP 激酶磷酸化作用以檢測 AD 的高敏感性和專一性被認為具有實驗室內測試 AD 而有助於臨床上評估癡呆症的潛力。到目前為止，藉由屍體解剖作為臨床癡呆症的確認通常僅被用於長期患病者。由於 AD 的患病期間長達 8~15 年，已發現與死於疾病惡化的事後臨床診斷比較，在臨床上診斷短期性 AD 具有極高的不準確性。因此，此處用於人類纖維母細胞之 MAP 激酶磷酸化作用比率的周邊生物標記對擬定癡呆症的治療策略上具有極大的價值。

雖然不希望受到理論上的拘束，但對 Erk1 和 Erk2 磷酸化作用之比率對導因於 A β 代謝之 AD 特異性差異的異常可能極為敏感仍引起相當的興趣。此結果及先前 AD 之周邊生物標記的研究顯示 AD 的病理生理學不僅涉及大腦亦和許多其他器官系統有關。此 AD 的系統性病理生理學觀點與普遍存在人類體內以及顯示於血液、唾液、皮膚和腦外組織之澱粉樣和 tau 代謝路徑的觀察具有一致性。

此處 Erk1/Erk2 比率與 AD 所顯示之緊密關係的注意力亦聚焦於利用這些基質作為“讀出”AD 的信號。例如，PKC 同功異構酶可調節數種匯聚於 MAP 激酶的分子標的。PKC 激化：(1) 增加 s-APP 的 α -分泌酵素而因此間接地降低 β 類澱粉；(2) β 類澱粉激化肝糖合成 3 β -激酶(GSK-3 β)而增加 MAP 激酶的磷酸化作用；(3) PKC 抑制 GSK-3 β ；(4) PKC 本身磷酸化 GSK-3 β ；以及(5) PKC 激化與 BK 和其他 AD-啟動事件有關的細胞

活素(cytokines)炎症信號；(6) 毒性膽固醇代謝物(例如，17-羥基膽固醇)，其平衡性降低 $A\beta$ 之下抑制 α -PKC 以及降低磷酸化 tau 蛋白。

證據顯示 PKC 同功異構酶本身的功能障礙可能與最早啟動 AD 病程有關，而因此經由全部上述的信號事件反映出 Erk1/2 磷酸化作用之比率的異常。

最後，AD 磷酸化作用異常如何經由人類纖維母細胞株的連續繼代而維持其專一性仍為一謎題。此現象必需考慮及其經由 PKC/MAP 激酶濃度與纖維母細胞基因組的交互作用。已知 PKC 和 MAP 激酶可調節基因的表現。因此，可能其本身合成之 PKC/MAP 激酶刺激作用的進行中循環使 PKC 濃度和 MAP 激酶磷酸化作用的異常永遠從一代傳至下一代。

實施例 2： $A\beta$ 的處理

$A\beta(1-42)$ 溶液的製備：開始以 3 毫克分的濃度將 1 毫克 $A\beta(1-42)$ 溶解於六氟異丙醇(Sigma 公司，密蘇里州 St. Louis 市)內，然後將其分成等分置入滅菌微離心管內。在真空下除去六氟異丙醇然後冷凍乾燥。使用前在乾燥條件下將 $A\beta(1-42)$ 膜儲存於 -20°C 。在即將試驗之前從儲存於 DMSO 內的 $A\beta(1-42)$ 製備 5 毫克分子的 $A\beta(1-42)$ 儲備溶液。藉由從 DMSO 儲備溶液溶解 $A\beta(1-42)$ 製備 DMEM 培養液內的 1.0 微克分子儲備溶液。在 25 毫升培養瓶內於 90~100%飽和度下將含有 1.0 微克分子 $A\beta(1-42)$ 的 DMEM 培養液加入無 AD 對

照(AC)細胞，然後置於細胞培養箱(在 37°C 下含 5% 的 CO₂)內 24 小時。細胞於無血清培養液(DMEM)內使其“飢餓”16 小時。在含 10% 血清的 DMEM 內製備 10 奈克分子的舒緩素(DMSO 內)溶液。將 7 毫升的 10 奈克分子 BK 溶液加入 25 毫升培養瓶內，然後在 37°C 下培養 10 分鐘。至於對照組，在含 10% 血清的 DMEM 培養液內加入相同量的 DMSO。將 7 毫升之含 DMSO 的此培養液加入 25 毫升的培養瓶內，然後在 37°C 下培養 10 分鐘。以冰冷(4°C)1x PBS 清洗四次之後，將燒瓶置入乾冰/乙醇混合物內 15 分鐘。從乾冰/乙醇混合物取出燒瓶，然後在各燒瓶內加入 100 微升的裂解液(10 毫克分子的 Tris, pH 7.4; 150 毫克分子的 NaCl; 1 毫克分子的 EDTA; 1 毫克分子的 EGTA; 0.5% 的 NP-40; 1% 的 Triton X-100; 1% 的蛋白酶抑制劑溶液、1% 的絲胺酸/蘇胺酸/酪胺酸磷酸酯酶抑制劑溶液)。燒瓶被置於冷房(4°C)內端對端旋轉振盪器上振盪 30 分鐘，然後以刮匙從各燒瓶收集細胞。超音波振盪細胞然後在 14000 rpm 下離心 15 分鐘，接著在檢測總蛋白質之後取其上清液進行西方墨點法。利用專一性抗體、抗正常 Erk1/2 和抗磷酸化 Erk1/2 測定總 Erk1、Erk2 和磷酸化形式的 Erk1 和 Erk2(p-Erk1 和 p-Erk2)。各細胞株利用至少三支舒緩素處理的燒瓶(BK+)和對應的三支對照燒瓶(BK-)以減少測定時的錯誤。

苔蘚蟲素的處理

從 DMSO 儲備溶液於正常 DMEM 培養液(補充 10%血清和青黴素/鏈黴素)內製備 0.1 奈克分子的苔蘚蟲素溶液。細胞在經 A β 處理之後以正常培養液(補充 10%血清和青黴素/鏈黴素)清洗四次。加入 0.1 奈克分子苔蘚蟲素至細胞，然後將培養瓶置入細胞培養箱(在 37°C 下含 5%的 CO₂)內 20 分鐘。以無血清培養液清洗五次之後在無血清的條件下將燒瓶置於培養箱(在 37°C 下含 5%的 CO₂)內 16 小時。依如上所述方法進行苔蘚蟲素誘發的 MAPK 檢測法。

數據分析

以富士 LAS-1000 Plus 掃描器掃描西方墨點之蛋白條帶的信號。藉由本學院 Nelson 博士(Blanchette 洛克菲勒神經科學院，馬里蘭州 Rockville 市)所研發的特殊設計軟體從掃描蛋白條帶測定 Erk1、Erk2、p-Erk1 和 p-Erk2 的強度。利用條帶測密計測定其強度。撕下選取的蛋白條帶然後在藉由軟體扣除背景值之後計算其各像素密度。分別從樣本(BK+)和對照(BK-)計算 p-Erk1/p-Erk2 的比率。使用下列公式區別 AD 和非 AD 病例：

$$\text{ADSMB} = [\text{p-Erk1/p-Erk2}]^{\text{BK}^+} - [\text{p-Erk1/p-Erk2}]^{\text{BK}^-}$$

ADSMB=阿茲海默症特異性分子生物標記

實施例 3：體外檢測皮膚纖維母細胞以測定磷酸化

Erk1 對磷酸化 Erk2 的比率

將取自 Coriell 醫學研究所的庫存皮膚纖維母細胞，阿茲海默症(AD)、非 AD 癡呆症(non-ADD) (例如，杭丁頓氏症、帕金森氏症和臨床精神分裂症)及年紀相仿的對照細胞(AC)培養至 90~100%的飽和度。細胞在無血清的培養液(DMEM)內"飢餓"16 小時。在 37°C 下的 0 和 10 分鐘加入正常培養液之 DMSO 內的 10 奈克分子舒緩素(BK)。至於對照組，加入相同量的 DMSO。

以冰冷(4°C)1x PBS 清洗四次之後，將燒瓶置入乾冰/乙醇混合物內 15 分鐘。從乾冰/乙醇混合物取出燒瓶，然後在各燒瓶內加入 80 微升的裂解液(10 毫克分子的 Tris, pH 7.4; 150 毫克分子的 NaCl; 1 毫克分子的 EDTA; 1 毫克分子的 EGTA; 0.5%的 NP-40; 1%的 Triton X-100; 1%的蛋白酶抑制劑溶液、1%的絲胺酸/蘇胺酸/酪胺酸磷酸酯酶抑制劑溶液)。

燒瓶被置於冷房(4°C)內端對端旋轉振盪器上振盪 30 分鐘，然後以刮匙從各燒瓶收集細胞。超音波振盪細胞然後在 14000 rpm 下離心 15 分鐘，接著在檢測總蛋白質之後取其上清液進行西方墨點法。

利用專一性抗體、抗正常 Erk1/2 和抗磷酸化 Erk1/2 測定總 Erk1、Erk2 和磷酸化形式的 Erk1 和 Erk2(p-Erk1 和 p-Erk2)。

實施例 4：皮膚纖維母細胞

從 Coriell 醫學研究所購買取自 AD 患者及年紀相

仿對照的庫存皮膚纖維母細胞。從不同來源取得以屍體解剖確認的纖維母細胞。病人在臨床上可能呈現嚴重失智、記憶力退化及其他認知功能的損傷。藉由 CAT 或 CT 掃描這些病人的大腦顯示異常的腦波以及不同程度的大腦萎縮。以取自年紀相仿的正常個體細胞作為對照。

採取新鮮皮膚纖維母細胞的樣本。依如下方法收集和培養從新鮮皮膚組織獲得的纖維母細胞：由合格人員從非 FAD(nFAD)病人和年紀相仿對照取得皮膚穿刺的組織檢體。全部病人(或監護人)必需簽署知情同意書。

取自杭丁頓氏症的庫存纖維母細胞。這些纖維母細胞係取自患有癡呆症並伴隨典型杭丁頓氏症之症狀的杭丁頓氏症(HD)患者。以取自年紀和性別相仿之個體的纖維母細胞作為對照。

實施例 5：材料

從 Gibco BRL 公司購得 DMEM。胎牛血清則購自 Bio Fluids 公司。舒緩素、二苯硼酸-2-胺乙酯(2ABP)、蛋白酶和磷酸酶抑制劑溶液係購自 Sigma 公司；雙吡啶基亞醯胺和 LY294002 係購自 Alexis 公司；PD98059 係購自 Cell Signaling 科技公司。抗磷酸化-Erk1/2 抗體係購自 Cell Signaling 科技公司。抗正常-Erk1/2 係購自 Upstate 生物科技公司。SDS 微膠體(4~20%)係購自 Invertrogene-Novex 公司。硝化纖維素膜係購自

Schleicher & Schuell 公司(新罕布夏州 Keene 市)。全部 SDS 電泳試劑係購自 Bio-Rad 公司。SuperSignal 化學螢光基質套組係購自 Pierce 公司。

或者，舒緩素(分子量 1060.2)可購自 Calbiochem 公司(加州 San Diego 市)。來自兔子的抗磷酸化-p44/p42 MAPK 係獲得自 Cell signaling 科技公司(麻里蘭州 Danvers 市)。抗正常 Erk1/2 係購自 Upstate 生物科技公司(維吉尼亞州 Charlottesville 市)，抗-兔次級抗體係購自 Jackson 實驗室(緬因州 Bar Harbor 市)。β-類澱粉(1-42)(分子量 4514.1)係購自 American Peptide 公司(加州 Sunnyvale 市)。苔蘚蟲素係購自 Biomol 公司(賓夕凡尼亞州 Plymouth Meeting 市)。

實施例 6：AC 和 AD 纖維母細胞的培養

來自包括 FAD 和 nFAD 型以及來自年紀相仿對照(AC)之阿茲海默症患者的庫存纖維母細胞係維持和培養於含 10%胎牛血清(FBS)之 DMEM 的 T25/T75 燒瓶內。使用繼代 6 至 17 次的細胞。

實施例 7：來自新鮮檢體組織或庫存樣本之纖維母細胞的處理及培養

樣本被置於 1xPBS 內然後移至轉移培養液內在實驗室內進行繼代。在除去轉移培養液之後，以 PBS 洗滌皮膚組織然後細剁成 1 毫米大小的植塊。該植塊被

一個接一個轉置於 3 毫升含 45% FBS、100 單位/毫升青黴素和 100 單位/毫升鏈黴素(青黴素/鏈黴素)檢體培養液之通氣 T25 燒瓶的生長表面上。該組織在添加 2 毫升含 10% FBS 的檢體培養液之前在 37°C 下培養 24 小時。培養液在 48 小時之後換成含 10% FBS 和 100 單位/毫升青黴素/鏈黴素的 5 毫升正常培養液。然後根據上述的例行程序繼代和維持該細胞。

這些試驗亦使用人類皮膚纖維母細胞培養系統。在 25 毫升細胞培養瓶內將取自 Coriell 醫學研究所(紐澤西州 Camden 市)之阿茲海默症(AD)、非 AD 癡呆症(例如, 杭丁頓症、帕金森氏症、臨床精神分裂症和年紀相仿對照(AC))的庫存皮膚纖維母細胞培養(補充 10% 血清和青黴素/鏈黴素, 37°C 下含 5% CO₂)至 90~100% 飽滿度。細胞於無血清培養液(DMEM)內使其"飢餓"16 小時。在含 10% 血清的 DMEM 內製備 10 奈克分子的舒緩素(DMSO 內)溶液。將 7 毫升的 10 奈克分子 BK 溶液加入 25 毫升培養瓶內, 然後在 37°C 下培養 10 分鐘。至於對照組, 在含 10% 血清的 DMEM 培養液內加入相同量的 DMSO。將 7 毫升之含 DMSO (<0.01%) 的此培養液加入 25 毫升的培養瓶內, 然後在 37°C 下培養 10 分鐘。以冰冷(4°C) 1x PBS 清洗四次之後, 將燒瓶置入乾冰/乙醇混合物內 15 分鐘。從乾冰/乙醇混合物取出燒瓶, 然後在各燒瓶內加入 100 微升的裂解液(10 毫克分子的 Tris, pH 7.4; 150 毫克分子的 NaCl; 1 毫克分子的 EDTA; 1 毫克分子的 EGTA; 0.5% 的 NP-40;

1%的 Triton X-100；1%的蛋白酶抑制劑溶液、1%的絲胺酸/蘇胺酸/酪胺酸磷酸酯酶抑制劑溶液)。燒瓶被置於冷房(4°C)內端對端旋轉振盪器上振盪 30 分鐘，然後以刮匙從各燒瓶收集細胞。超音波振盪細胞然後在 14000 rpm 下離心 15 分鐘，接著在檢測總蛋白質之後取其上清液進行西方墨點法。

實施例 8：以不同蛋白激酶 C 活化劑處理纖維母細胞

使用舒緩素或不同特異性的蛋白激酶 C 活化劑處理纖維母細胞。在無血清 DMEM 內"飢餓"隔夜之前將庫存 AC 和 AD 皮膚纖維母細胞培養至 80~100%飽滿度。在 37°C 下的不同時間長度以 10 奈克分蛋白激酶 C 活化劑處理細胞而使其產生不同時程的蛋白激酶 C 活化劑誘發效應。緊接蛋白激酶 C 活化劑作用後的反應終止的時間點定義為蛋白激酶 C 活化劑處理後的"0 分鐘"。在各處理時間點用於各細胞株的對照燒瓶之細胞被加入相同體積的 PBS。移除培養液以終止反應，立刻以 pH 7.4 的預冷 PBS 洗滌該細胞然後將燒瓶轉置於乾冰/乙醇上。對獲得和培養自新鮮檢體組織的細胞而言，其使用的濃度可為 0.1 奈克分子蛋白激酶 C 活化劑。該處理時間為在 37°C 下約 10 分鐘。

從乾冰/乙醇將燒瓶移置水冰上以製備經處理之細胞的細胞溶解產物。在各燒瓶加入 1 毫升含 10 毫克分子 Tris, pH 7.4、150 毫克分子 NaCl、1 毫克分子 EDTA、1 毫克分子 EGTA, pH 8、0.5% NP-40、1% Triton

X-100、1%蛋白酶抑制劑溶液(Sigma 公司)和 1%絲胺酸/蘇胺酸/酪胺酸磷酸酯酶抑制劑溶液(Sigma 公司)

10 毫克分子的 Tris, pH 7.4; 150 毫克分子的 NaCl; 1 毫克分子的 EDTA; 1 毫克分子的 EGTA; 0.5%的 NP-40; 1%的 Triton X-100; 1%的蛋白酶抑制劑溶液、1%的絲胺酸/蘇胺酸/酪胺酸磷酸酯酶抑制劑溶液的裂解液。在冷房內端對端旋轉振盪器上振盪 30 分鐘之後，以刮匙從各燒瓶收集細胞。超音波振盪細胞然後在 5000 rpm 下離心 5 分鐘，接著取其上清液進行西方墨點法。

實施例 9：西方墨點法

方法 1：以等量 2X SDS-樣本緩衝液處理細胞溶解產物，然後煮沸 10 分鐘。將取自各樣本的蛋白質溶解於 4~20%微梯度凝膠 (mini-gradient gel) 上，然後轉置於硝化纖維薄膜上。利用 SuperSignal ECL 檢測套組以抗磷酸化 Erk1/2 抗體檢測磷酸化 Erk1/2。為了常態化對 Erk1/2 總量之磷酸化 Erk1/2 的量，以抗磷酸化 Erk1/2 抗體轉漬之後，在 60°C 下以含 62.5 毫克分子 Tris-HCl, pH 6.7、2% SDS 和 100 毫克分子 2-巰基乙醇之洗脫液處理 45 分鐘，將薄膜剝離，然後以抗正常 Erk1/2 抗體進行轉漬。或者，將溶解於 SDS-PAGE 上然後轉置於硝化纖維膜上的複製樣本分別以抗磷化-和抗正常 Erk 抗體進行轉漬。以含 0.01% Tween 20 的 10 毫克分 PBS, pH 7.4, 清洗之後(10 分鐘清洗三次)，

以抗正常 Erk1/2 抗體轉漬該薄膜，接著測定 SDS 凝膠上 Erk1/2 的承載總量。

方法 2：將等量之 2xSDS 樣本緩衝液加入各細胞溶解產物，然後在沸水浴內煮沸 10 分鐘。在 8~16% 微梯度凝膠上進行電泳，然後轉置於硝化纖維膜上。利用特異性抗體測定總 Erk1、Erk2 和磷酸化形式的 Erk1 和 Erk2(p-Erk1 和 p-Erk2)。

實施例 10：數據分析

以富士 LAS-1000 Plus 掃描器掃描磷酸化和正常形式 Erk1/2 的信號。利用 NIH 影像軟體測定各蛋白質條帶的平均光學密度。分別對其總 Erk1/2 信號常態化來自磷酸化-Erk1/2 信號的值。常態化之後，來自各處理細胞株的數據被轉變成基礎對照的百分比然後進行統計分析。

實施例 11：免疫細胞化學法

使纖維母細胞生長於塗佈 0.02 毫克聚離胺酸的 2.5 釐米直徑蓋玻片表面。在以舒緩素或另外如上述蛋白激酶 C 活化劑處理時，在室溫下迅速以冰冷 pH 7.4 之 PBS 洗滌細胞及以 PBS 內 pH 7.4 之 4% 甲醛固定 15 分鐘。在以 pH 7.4 之 PBS 清洗三次之後，細胞在最後 5 分鐘於室溫下以 pH 7.4 之 PBS 內的 0.1% Triton x-100 滲透 30 分鐘。在室溫下與 pH 7.4 之 PBS 內的馬血清培養 30 分鐘之後，細胞與抗磷酸化-Erk1/2 抗體(1:200)

在 4℃ 下培養隔夜。以 pH 7.4 之 PBS 清洗三次蓋玻片上的細胞，然後加入 (1.. 200) 標示螢光的抗小白鼠 IgG (Vector 實驗室) 接著將細胞在室溫下培養 60 分鐘。以 PBS 清洗三次之後利用 Vectashield® 封片劑 (Vector 實驗室) 密封，以理光螢光顯微鏡觀察細胞內的螢光染色信號。以 Bio-Rad 定量軟體 (BioRad) 和 Tnimage 軟體測定細胞影像內之免疫細胞化學信號的強度。以單株抗-BK B2 抗體或抗蛋白激酶 C 活化劑抗體施予正常纖維母細胞，接著與 Cy5-共軛抗小白鼠 IgG 共同培養以定位皮膚纖維母細胞內的 BK 或蛋白激酶 C 活化劑受體。以螢光顯微鏡之影像獲得免疫反應信號的結果。

【圖式簡單說明】

第一圖顯示皮膚纖維母細胞銀行取自 Coriell 細胞庫和立刻置於組織培養基並且獲得屍體解剖證實之皮膚穿刺檢體樣本的阿茲海默症特異性分子生物標記 (ADSMB) 的測定結果。

第二圖顯示阿茲海默症特異性分子生物標記的線性迴歸分析作為其與癡呆症期間之年數的函數關係。

第三圖顯示 AD 和對照細胞株在經舒緩素 (BK+) 和載劑 (DMSO, 無舒緩素 BK-) 處理後之 p-Erk1/2 (磷酸化 Erk1 和 Erk2) 的西方墨點。

第四 A 圖和第四 B 圖顯示依上述方法計算的阿茲海默症特異性分子生物標記 (ADSMB) (圖中註明為"辨

識因子(DF)”。描繪 AD(阿茲海默症)、AC 年紀相仿對照)及取自 Coriell 細胞庫(A) (Coriell 醫學研究所，紐澤西州 Camden 市)和 Neurologic 公司提供(經屍體解剖確認)(B)之非 ADD(非 AD 癡呆症，如帕金森氏症、雷維小體症)的細胞株。其結果顯示 AD 病例的 ADSMB 始終高於 AC 和非 ADD 病例。

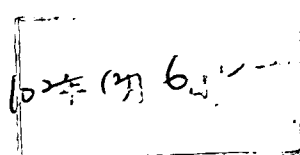
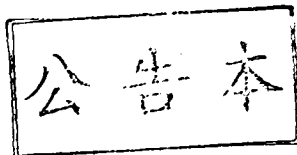
第五 A 圖和第五 B 圖顯示水溶性 A β 誘導及苔蘚蟲素處理可逆轉人類纖維母細胞之阿茲海默症的表現型。

第六 A 圖和六 B 圖顯示 ADSMB 的決策矩陣分析。描繪該生物標記的敏感性和專一性以顯示檢測 Coriell 細胞庫(A)和屍體解剖確認細胞(B)之疾病偵測的有效性。

【主要元件符號說明】

無

十、申請專利範圍：



1. 一種檢測生物體內之阿茲海默症的方法，其步驟包括：

- (a) 將取自該生物體的細胞與蛋白激酶 C 活化劑相接觸培養；
- (b) 計算磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率，其中該磷酸化第一和磷酸化第二 MAP 激酶係取自該接觸步驟後的細胞；
- (c) 檢測取自未接觸步驟(a)活化劑之該生物體細胞內磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率；
- (d) 從步驟(b)中獲得的比率減去步驟(c)中獲得的比率；以及
- (e) 根據步驟(d)計算的差異檢測該生物體之阿茲海默症的存在或不存在，

其中該第一 MAP 激酶為 Erk1 及該第二 MAP 激酶為 Erk2，且其中若該步驟(d)中獲得的比率差異為正值則該生物體被檢測為具有阿茲海默症，若該步驟(d)中獲得的比率差異為負值或零則該生物體被檢測係不具阿茲海默症。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該步驟包括一體外檢測法。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該比率的計算係藉由磷酸化 Erk1 的常態化量除以磷酸化 Erk2 的常

態化量。

- 4.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該蛋白激酶 C 活化劑係選自舒緩素、苔蘚蟲素、旁貝素、膽素、凝血酶、前列腺素 F2 α 和血管收縮素所構成的群組。
- 5.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞係周邊細胞。
- 6.如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該周邊細胞係選自皮膚細胞、皮膚纖維母細胞、血液細胞與頰黏膜細胞所構成的群組。
- 7.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞非分離自腦脊髓液。
- 8.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞不包括腦脊髓液。
- 9.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞非取自脊髓穿刺或腰椎穿刺。
- 10.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該蛋白激酶 C 活化劑係在含血清的介質內接觸該細胞。
- 11.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該蛋白激酶 C 活性劑係在無血清的介質內接觸該細胞。
- 12.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該磷酸化 MAP 激酶係藉由免疫分析法檢測。
- 13.如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該免疫分析法係為放射免疫分析法、西方墨點分析法、免疫螢光分析法、酵素免疫分析法、免疫沈澱分析法、化學

螢光分析法、免疫組織化學分析法、免疫電泳分析法、圓漬墨點分析法，或狹縫墨點分析法。

14.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該測定係利用蛋白質陣列、胜胜肽陣列或蛋白質微陣列。

15.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該方法進一步包含確認阿茲海默症存在或不存在，包括利用步驟 (a)將取自該生物體的細胞與 β 類澱粉樣胜肽相接觸培養；(b)檢測所述接觸培養步驟是否誘發該細胞成為阿茲海默症表現型；其中，當該細胞會被誘發成阿茲海默症表現型時，顯示該生物體係不具阿茲海默症；該細胞於與該 β 類澱粉樣胜肽之接觸培養步驟中，並未對該細胞產生顯著變化的阿茲海默症表現型時，顯示該生物體係具有阿茲海默症。

16.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該方法進一步包含確認阿茲海默症存在或不存在，包括利用步驟 (a)將取自該生物體的細胞與 $A\beta$ (1-42) 相接觸培養；(b)將該細胞與舒緩素相接觸培養；(c)測定阿茲海默症特異性分子生物標記的數值；其中，當該阿茲海默症特異性分子生物標記的數值係大於零之正數值時，顯示該生物體係不具阿茲海默症；該細胞於與該 $A\beta$ (1-42) 之接觸培養步驟中，並未對該細胞產生顯著變化的阿茲海默症表現型時，顯示該生物體係具有阿茲海默症。

17.一種篩檢有效用於治療阿茲海默症之化合物的方法，其包括：

- (a)將診斷有阿茲海默症生物體的細胞分離，將該細胞與蛋白激酶 C 活化劑相接觸培養，其中該接觸係在一測試化合物出現的情況下；
 - (b)計算磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率，其中該磷酸化第一和磷酸化第二 MAP 激酶係取自該接觸培養步驟(a)後的細胞；
 - (c)計算未經步驟(a)測試化合物接觸培養之生物體細胞內之磷酸化第一 MAP 激酶對磷酸化第二 MAP 激酶的比率；
 - (d)從步驟(b)中獲得的比率減去步驟(c)中獲得的比率；
 - (e)根據步驟(d)計算的差異鑑定該有效用於治療阿茲海默症的測試化合物，
- 其中該第一 MAP 激酶為 Erk1 及該第二 MAP 激酶為 Erk2，且該步驟(d)計算的差異若為負值或零時表示該測試化合物係可有效用於阿茲海默症的治疗。

- 18.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該步驟包括一體外檢測法。
- 19.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該比率的計算係藉由磷酸化 Erk1 的常態化量除以磷酸化 Erk2 的常態化量。
- 20.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該蛋白激酶 C 活化劑係選自舒緩素、苔蘚蟲素、旁貝素、膽素、

凝血酶、前列腺素 F2 α 和血管收縮素所構成的群組。

21. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該細胞係周邊細胞。

22. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該周邊細胞係選自皮膚細胞、皮膚纖維母細胞、血液細胞與頰黏膜細胞所構成的群組。

23. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該細胞非分離自腦脊髓液。

24. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該細胞不包括腦脊髓液。

25. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該細胞非取自脊髓穿刺或腰椎穿刺。

26. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該蛋白激酶 C 活化劑係在含血清的介質內接觸該細胞。

27. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該蛋白激酶 C 活性劑係在無血清的介質內接觸該細胞。

28. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該磷酸化 MAP 激酶係藉由免疫分析法檢測。

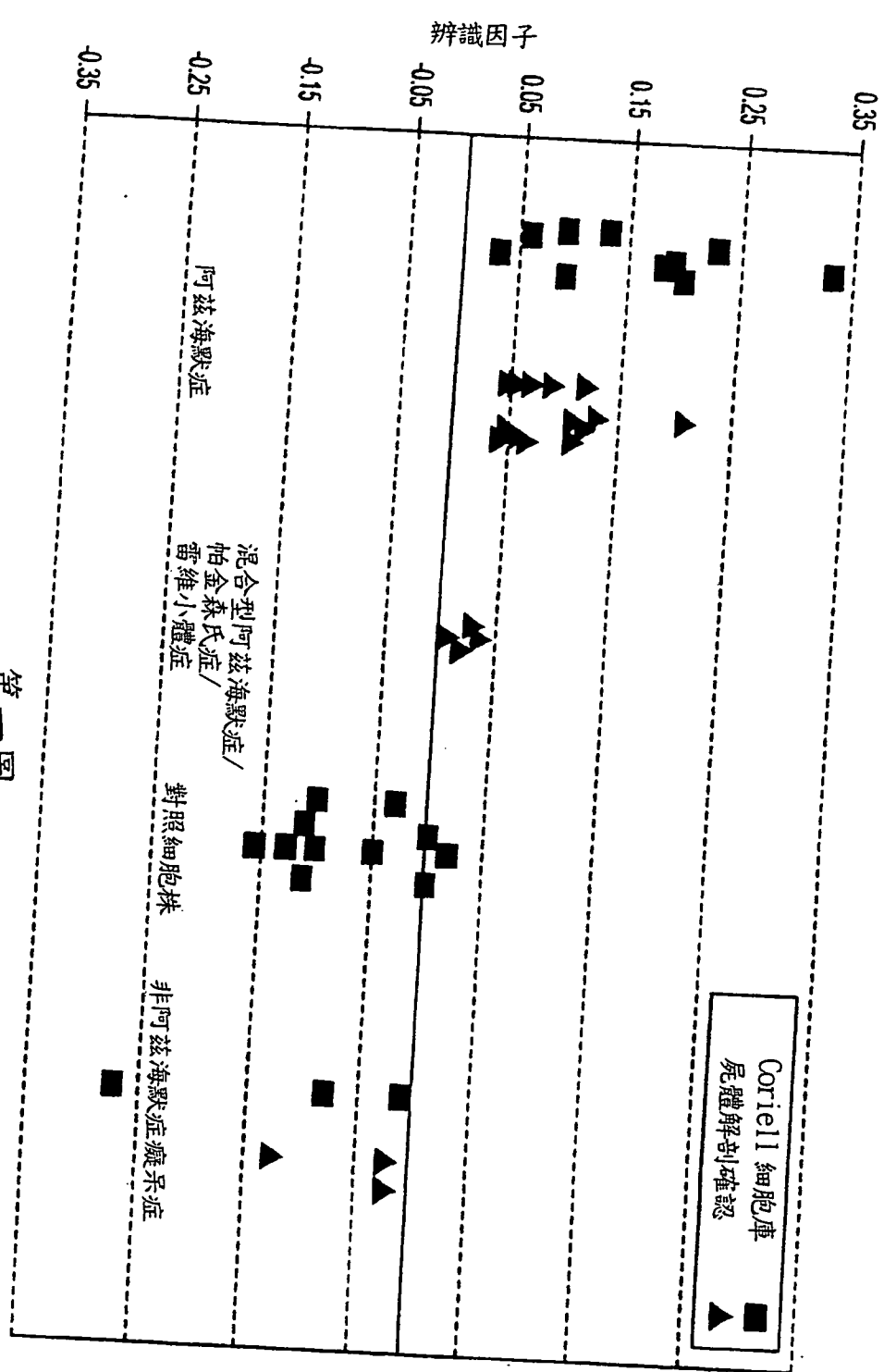
29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該免疫分析法係為放射免疫分析法、西方墨點分析法、免疫螢光分析法、酵素免疫分析法、免疫沈澱分析法、化學螢光分析法、免疫組織化學分析法、免疫電泳分析法、圓漬墨點分析法，或狹縫墨點分析法。

30. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該測定係利用

蛋白質陣列、胜肽陣列或蛋白質微陣列。

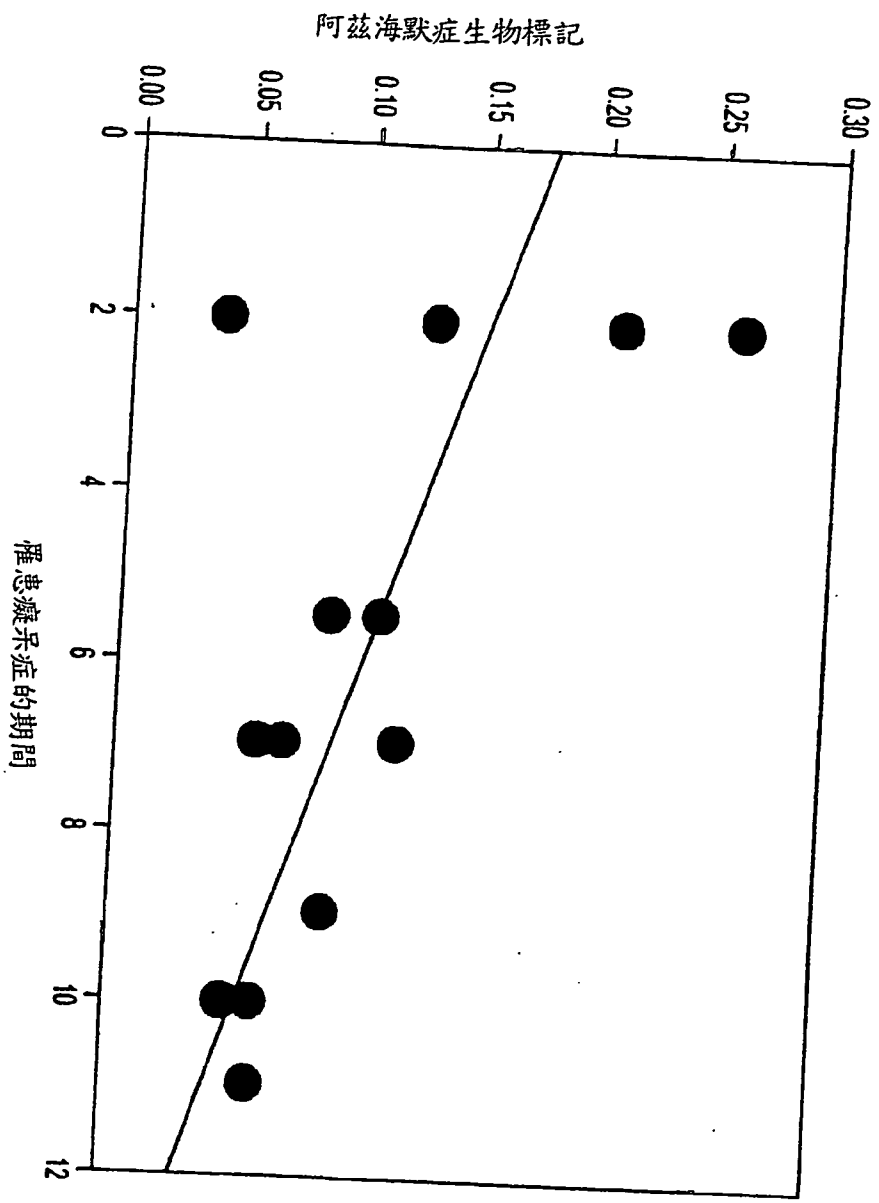
公告本

101年10月9日修(第)正本

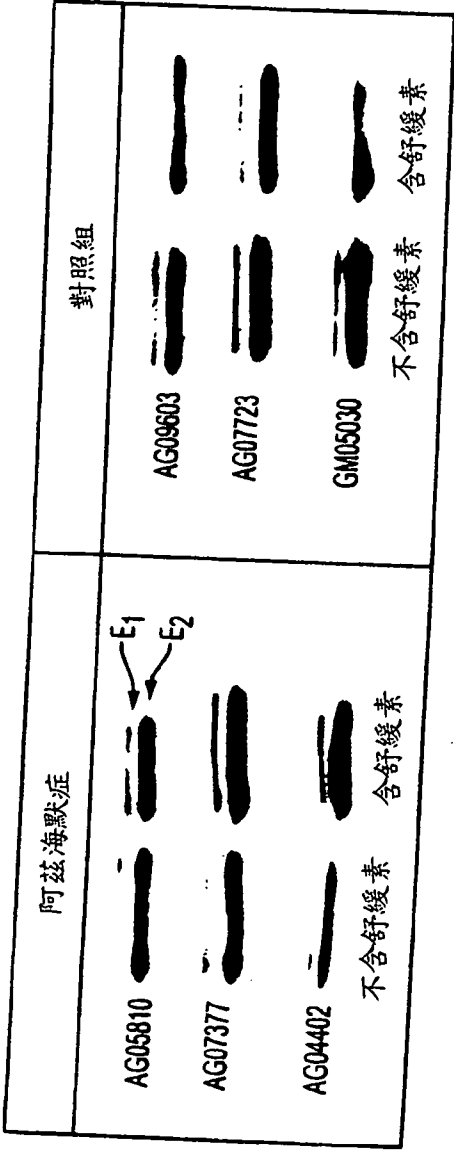


第一圖

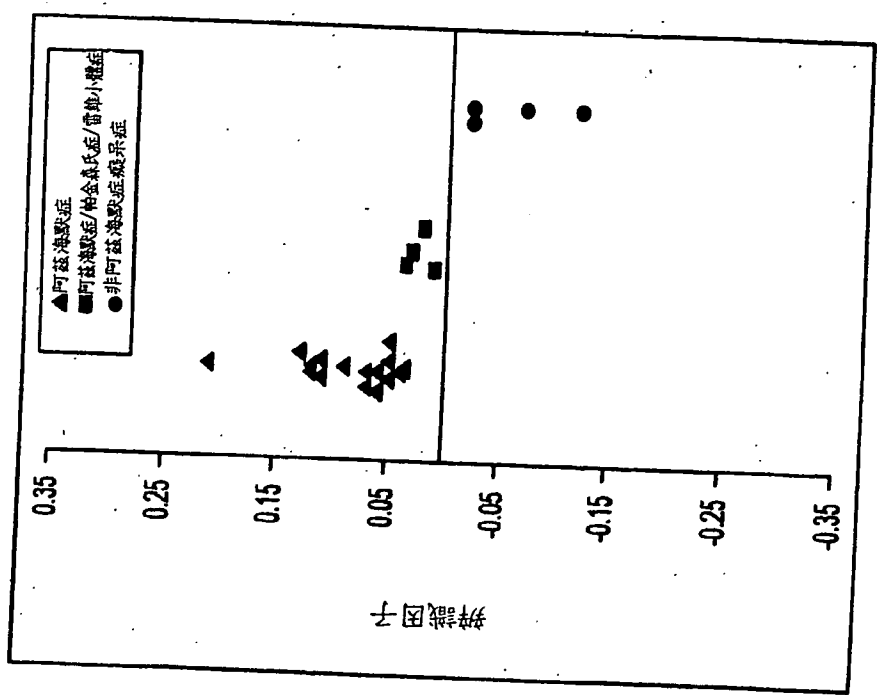
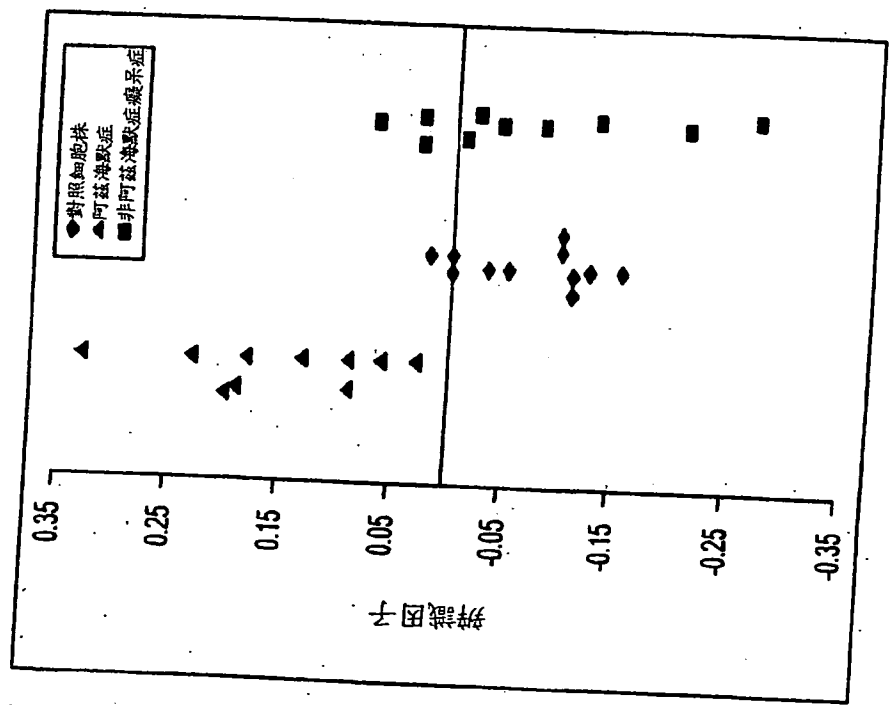
頁
後
第
百
九
月
年
10

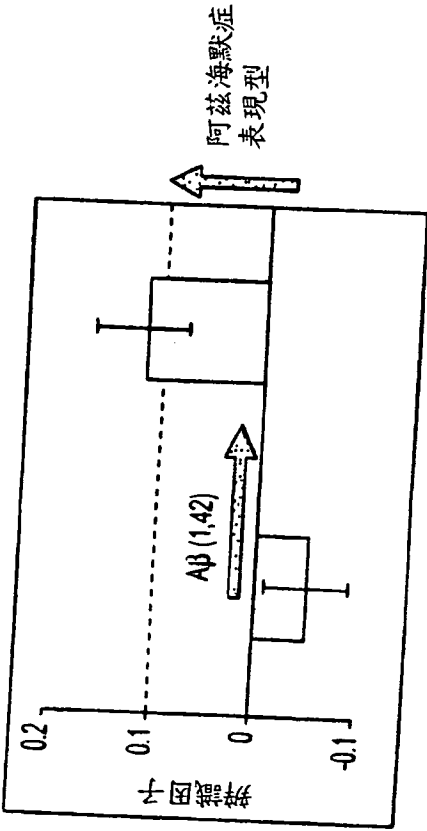


第二圖

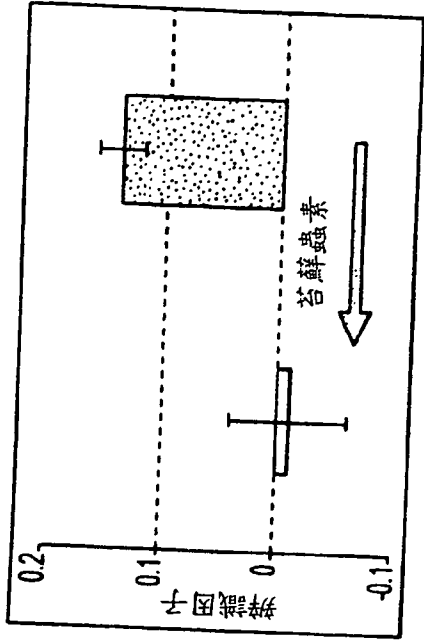


第三圖





第五 A 圖



第五 B 圖

