

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480031004.0

[43] 公开日 2006年11月29日

[11] 公开号 CN 1871519A

[22] 申请日 2004.9.29

[21] 申请号 200480031004.0

[30] 优先权

[32] 2003.10.22 [33] DE [31] 10349162.7

[86] 国际申请 PCT/EP2004/010889 2004.9.29

[87] 国际公布 WO2005/050219 德 2005.6.2

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.20

[71] 申请人 莱比锡大学

地址 德国莱比锡

[72] 发明人 托马斯·阿伦特 延斯·施蒂勒

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司  
代理人 谢顺星

权利要求书2页 说明书8页

[54] 发明名称

用于诊断阿尔茨海默氏病的快速检测方法

[57] 摘要

本发明涉及诊断阿尔茨海默氏病或该疾病的早期阶段或倾向的方法。所述方法基于可促有丝分裂表达的标记，尤其是 CD 69，以及可外周获得的细胞，例如皮肤细胞或淋巴细胞，在促有丝分裂刺激(a)之前(b)之后的定量测定。特异性刺激指数 a : b 是表明阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向的病症。本发明也涉及适于实施本发明诊断方法的试剂盒。

1. 一种利用患者样品诊断阿尔茨海默氏病或该疾病的早期阶段或倾向的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 对样品中可外周获得的细胞进行促有丝分裂刺激；

(b) 利用促有丝分裂刺激后表达的一种或多种表面标记定量分析步骤(a)之前和之后细胞群体内促有丝分裂刺激的细胞，利用直接针对所述表面标记的抗体将具有表面标记的细胞与不具有表面标记的细胞分离；以及

(c) 测定刺激指数作为步骤(a)之前和之后具有表面标记的细胞数目之间的关系，达到未刺激的对照样品的至少10倍，最大100倍的刺激指数是阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向的病征。

2. 根据权利要求1的方法，其中所说的样品为血样且细胞为淋巴细胞。

3. 根据权利要求1或2的方法，其中所说的表面标记为CD 69。

4. 根据权利要求3的方法，其中所说的CD 69<sup>+</sup>细胞被进一步限定为CD 4<sup>+</sup>和/或CD 8<sup>+</sup>亚群。

5. 根据权利要求1至4之任一项的方法，其中在步骤(a)之前用一种或多种抗凝血化合物稳定化所说的血液。

6. 根据权利要求1至5之任一项的方法，其中用PHA，蛋白A或PWM刺激所说细胞。

7. 根据权利要求1的方法，其中步骤(b)中所说的抗体结合在磁性粒子上且通过免疫磁性分离法进行分离。

8. 根据权利要求1至7之任一项的方法，其中通过测定步骤(a)

之前和之后具有表面标记的细胞的蛋白质含量和/或核酸含量来检测所说的刺激指数。

9. 一种用于诊断阿尔茨海默氏病或该疾病的早期阶段或其倾向的试剂盒，该试剂盒含有下列组分：

(a) 一种用于促有丝分裂刺激的化合物；

(b) 至少一种直接针对促有丝分裂刺激之后表达的表面标记的抗体。

10. 根据权利要求9的试剂盒，该试剂盒还含有：(c) 一种抗凝血化合物；和/或(d) 一种用于细胞裂解的缓冲液。

11. 根据权利要求9或10的试剂盒，其中所说的抗体为结合在磁性粒子上的抗体。

12. 根据权利要求9至11之任一项的试剂盒，其中所说的抗体为抗-CD 69 抗体。

13. 根据权利要求9至12之任一项的试剂盒，该试剂盒还含有抗-CD 4 和/或抗-CD 8 抗体。

## 用于诊断阿尔茨海默氏病的快速检测方法

本发明涉及一种诊断阿尔茨海默氏病或该疾病早期或倾向的方法，该方法是基于可外周获得的细胞，例如皮肤细胞或淋巴细胞在(a)促有丝分裂刺激之前和(b)促有丝分裂刺激之后的促有丝分裂的可表达表面标记，优选CD 69的定量分析，特定的刺激指数a:b为阿尔茨海默氏病或该疾病早期或者倾向的信号。本发明也涉及适于实施本发明诊断方法的试剂盒。

阿尔茨海默氏病不能通过临床方法和可利用的临床旁学(paraclinical)方法以及基于器械和技术的方法最终确诊。其总是需要尸体解剖的验证。常常很难进行相对于其它痴呆病因的诊断区分，尤其是在疾病的早期。然而，在疾病的这些极早期阶段，由于两个原因，确诊是很重要的。一方面，可以诊断区分痴呆病的潜在可治疗形式从而可对受试者进行有效的治疗，另一方面，这些阶段是对阿尔茨海默氏病在神经退行性过程中给予任何形式的治疗性干预的先决条件，这种治疗性干预只有在这些早期阶段才能获得成功。这种确诊仅仅可由阿尔茨海默氏病的生物学标记来保证，即通过适用于该疾病的易测定的敏感性和特异性的生物学变化。

因此阿尔茨海默氏病的生物学标记具有诊断价值且尤其有助于安全鉴定处于潜伏期和临床早期的危险人群和病人。生物学标记也用于后续检查以及预后和对治疗性干预应答的监控。模式生物学标记应符合特定的理论和实践要求。它们尤其包括高特异性和敏感性，鉴定潜伏期的能力，以及高阳性和阴性的指示值。生物学标记应该是可测定的，如有可能，应以一种非-侵入的方式测定且既不会给患者带来负担又不会使其惊恐。这种分析应是低成本的并且易于操作且，如有

可能，可由家庭医生操作。不幸地是，当前已知的阿尔茨海默氏病生物学标记没有一种符合上述的要求。尤其是由于已知生物学标记敏感性和特异性较低，因此不适宜用于诊断方法。其它具有较高敏感性和特异性的诊断检验需要复杂的技术先决作为条件，因此不适于对大部分病人进行局部使用。

因此，本发明实质上是基于提供用于阿尔茨海默氏病诊断的简单方法的技术问题，因此可进行阿尔茨海默氏病的诊断，潜伏期的检测以及阿尔茨海默氏病与其它痴呆病高度敏感性和特异性的诊断区分。

通过提供权利要求中描述的实施方案解决了这些技术问题。很可能开发一种诊断方法，所述方法是基于利用可外周获得的患者细胞诸如皮肤细胞或血液淋巴细胞在存在和不存在有丝分裂刺激条件下，例如在免疫磁性细胞分离之后对促有丝分裂指数(活化指数)的测定。这些细胞的激活伴随可被定量检测的在表面上存在的激活标记，所述定量检测优选通过抗原-抗体相互作用进行，磁性粒子优选包被有所使用的抗体，从而可使磁性细胞分离并随后在促有丝分裂刺激前后对具有这种表面标记的细胞数目进行定量分析。这种特征能够表明与正常状态相区分的特异性的疾病状态。因此本发明的方法可用于阿尔茨海默氏病的诊断，潜伏期的检测以及阿尔茨海默氏病与其它痴呆病的诊断鉴别。

因此，本发明涉及一种利用患者样品诊断阿尔茨海默氏病或这种疾病的早期阶段或倾向的方法，该方法包括如下步骤：

(a) 对样品中可外周获得的细胞进行促有丝分裂刺激；

(b) 利用促有丝分裂刺激后表达的一种或多种表面标记定量分析步骤(a)之前和之后细胞群体内促有丝分裂刺激的细胞，利用直接针对所述表面标记的抗体将具有表面标记的细胞与不具有表面标记的细胞分离；以及

(c) 测定刺激指数，此指数表明步骤(a)之前和之后具有表面标记的细胞数目之间的关系，

刺激指数达到未刺激的对照样品的至少 10 倍，最大 100 倍是阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向的病征。

本领域技术人员知晓用于获得适于本发明方法的患者样品的合适方法，所述样品含有充足的促有丝分裂刺激的细胞。例如，合适的样品为皮组织样品，优选来自静脉血的血样，来自脑脊髓液的细胞以及来自尿液的细胞。

在本发明诊断方法的优选实施方案中，例如，当使用血样时，在其它方法步骤之前添加抗凝血的化合物，例如柠檬酸钠或肝素，可以起到稳定样品的目的。

在这里使用的术语“阿尔茨海默氏病的诊断”也包括后续检查，因此包括预后，治疗性干预效果的监控以及该疾病与其它痴呆病的诊断鉴别。

在这里使用的术语“可外周获得的细胞”是指不用手术或以（最低限度地）侵入的方式可从人的组织取得的细胞，它们包含例如，皮肤细胞和外周血的淋巴细胞，后者优选用于本发明的方法。

用于获得表面标记表达的促有丝分裂刺激可通过使用已知刺激物，诸如植物凝集素(PHA)，蛋白 A，PWM 或其它具有萎缩或有丝分裂效果的化合物来实现。该刺激可受添加单独化合物或组合添加物的影响。

本领域技术人员已知用于这种刺激的合适的实验条件，例如所使用的有丝分裂原的浓度，刺激的持续时间及其它的温育条件。刺激应在允许气体充分交换的合适容器中进行。相应刺激剂的浓度应相应的生理学范围内，既在  $1\ \mu\text{g/ml}$  至  $20\ \mu\text{g/ml}$  PHA,  $1\ \mu\text{g/ml}$  至  $50\ \mu\text{g/ml}$

PWM, 以及  $10 \mu\text{g/ml}$  至  $200 \mu\text{g/ml}$  蛋白 A。刺激时间取决于待检测分子的表达率。然而, 对于特定的检验, 2 至 24 小时的刺激时间应该是必需的。在当表达的表面标记分子为 CD 69 时, 4 小时的刺激时间是最佳的。刺激应在生理条件下进行, 例如可以在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  的气体恒温箱中进行。

本领域技术人员同样也知晓用于表征促有丝分裂刺激效果本身的合适的表面标记, 例如 CD 69, CD 25, CD 45RO, CD 63 和 HLA-Dr, 优选表面标记 CD 69。为实现本发明的目的, 同样也可实施表面标记组合的测定或通过进一步鉴定由特定的表面标记分离的细胞, 其中特定的表面标记为例如 CD 69, 来进行检测, 其中有关对亚细胞群的进一步鉴定, 例如可以利用其它表面标记亚群 (例如  $\text{CD } 4^+$  和/或  $\text{CD } 8^+$  和/或  $\text{CD } 19^+$  和/或  $\text{CD } 56^+$ ) 来进一步鉴定。

从刺激前后具有表面标记的细胞数目的关系得出刺激指数 (活化指数)。刺激指数达到未刺激的对照样品的至少 10 倍, 最大 100 倍是阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向的病征。刺激指数小于未刺激对照样品的 10 倍不表征阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向。可根据常规方法测定具有表面标记的细胞, 例如, Western 印迹, ELISA, RIA, FACS, LSC 等。

为了确定具有表面标记的细胞, 优选利用特有的细胞特征, 将它们与不具有表面标记的细胞或具有其它表面标记的细胞分离。

在本发明的诊断方法中, 通过直接针对目的表面标记的抗体将具有表面标记的细胞与不具有表面标记的细胞分离。适用于此目的的抗体可以是单克隆的, 多克隆的或合成的抗体或其片段。在这方面, 术语“片段”是指与完全抗体具有相同的表位特异性的单克隆抗体的所有部分 (例如, Fab, Fv 或单链 Fv 片段)。这种片段的制备是本领域技术人员公知的, 许多直接针对表面标记的抗体也是可市售获得的。

在本发明诊断方法最优选的实施方案中，表面标记的特异抗体结合在磁性粒子上，例如，顺磁性磁珠（例如，获自 DYNAL A.S., P.O.Box 158 Skøyen, N-0212 Oslo, Norway），其允许根据目前的方法通过免疫磁性分离法分离具有相应表面标记的细胞。

因此刺激指数可在利用目前方法测定的核酸含量和/或蛋白质含量的基础上，通过确定利用目的表面标记分离的细胞的量进行限定，所述的核酸含量和/或蛋白含量的测定方法，例如在细胞裂解之后通过分光光度法或利用特异性染料例如溴化乙锭、碘化丙啶、吖啶橙、DAPI 等对核酸染色后利用光度计定量分析来测定核酸或蛋白质含量。可利用标准曲线由样品的蛋白和/或核酸含量计算细胞数。

本发明也涉及一种适合于实施本发明诊断方法的试剂盒且其至少含有下列组分：

(a) 一种用于促有丝分裂刺激的化合物；

(b) 至少一种直接针对在促有丝分裂刺激之后表达的表面标记的抗体，优选结合在磁性粒子上的抗体。

本发明的试剂盒还优选含有：

(a) 至少一种反应容器；

(b) 一种抗凝血化合物和/或用于细胞裂解的缓冲液；

(c) 用于固定细胞的缓冲液；

(d) 定量分析 DNA 和/或蛋白浓度所需的物质以及用于制作标准曲线的预制溶液；

(e) 用于分离结合在磁性粒子上（如果使用结合在磁性粒子上的抗体时则包含）的细胞的磁体；以及

(f) 用于除去结合上的磁性粒子（如果使用结合在磁性粒子上的

抗体时则含有)的试剂。

在本发明试剂盒的优选实施方案中,抗体为抗-CD 69 抗体。此外,试剂盒可另外含有,或含有代替的抗-CD 69 抗体,抗-CD 4 和/或抗-CD 8 抗体。

最后,合适时,本发明的试剂盒可与一种或多种合适的其它检测剂组合存在,例如荧光-耦合的初级抗体,次级抗体,用于蛋白和/或核酸的检测剂,例如嵌入染料等等。

## 实施例

### 利用阿尔茨海默氏病患者的 CD 69 测定促有丝分裂的刺激指数

可对活着的患者（生物学标记）进行的阿尔茨海默氏病目前已知特征的测定仅仅显示不充分的敏感性和特异性或由于成本或高度复杂的检验方案的原因不适于大规模的检验。用临床方法，仅仅确诊 80 %至 90 %且尤其难以在疾病早期进行诊断区分。由于缺乏合适的生物学标记对该疾病潜伏期的检测目前是不可能的。

就阿尔茨海默氏病而言，神经退行性变化是基于营养和促有丝分裂信号的胞内介导的干扰过程。这些胞内信号转导的功能紊乱并不局限于神经系统。它们也类似地存在于这些患者的皮肤细胞和外周血的淋巴细胞上。由于其疾病特异性，这种变化是具有诊断价值的且适于作为生物学标记。

在下述实施例中，在促有丝分裂刺激前后，通过对表达 CD 69 的淋巴细胞免疫磁性细胞分离进行确定是否存在阿尔茨海默氏病典型的营养和促有丝分裂信号胞内介导的功能紊乱的问题。

利用来自 SARSTEDT 公司的血液提取系统通过静脉穿刺来收集血液。提取过程中通过掺入血液提取系统中的抗凝血剂诸如柠檬酸钠或肝素钠稳定血液。在此形式中，其可在室温下储存 24 至 48 小时。刺激实验在可被充分充气的反应容器中进行，诸如 Greiner bio-one 公司的 24 孔悬浮培养板。为此，有丝分裂植物凝集素（PHA），蛋白 A 和美洲商陆有丝分裂原（PWM）被单独或以不同的组合用于各 400  $\mu$ L 的稳定化全血。在此实施例中，相应的有丝分裂原的终浓度在生理学范围内且为 12  $\mu$ g/ml 的 PHA，50  $\mu$ g/ml 的蛋白 A 和 4  $\mu$ g/ml 的 PWM。在气体恒温箱中 37°C 和 5 % CO<sub>2</sub> 浓度的生理条件下进行该刺激 4 小时。取 100  $\mu$ l 的刺激的血液与包被抗体的不同磁性粒子温育。在此实施例中，使用来自 DYNAL 公司的抗-CD 4 和抗-CD 8 包

被的磁性粒子。将相应的磁性粒子过量添加于特定的样品（10  $\mu$ l 磁性粒子悬浮液）中来确保相应淋巴细胞亚群的完全分离。在 4 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟之后，磁性分离相应的淋巴细胞亚群且在随后的冲洗步骤之后，将获得的淋巴细胞亚群转入 100  $\mu$ l 所限定的培养基中，在此实施例中为与 1%胎牛血清（FCS）混合的 RPMI1640。在此实施例中利用各 10  $\mu$ l 的 DYNAL 公司的 DETACHaBEAD 除去结合上的磁性粒子。室温下温育 45 分钟之后，分离所去除的磁性粒子且在若干冲洗步骤之后将细胞悬液吸取在所限定的培养基中，在此实施例中为 RPMI1640。通过添加特异性裂解缓冲液，裂解细胞，用特异性 DNA 染料，诸如溴化乙锭、碘化丙啶、吖啶橙或 DAPI 标记 DNA，且随后经光度定量分析。通过利用 Bradford 的蛋白质测定法比较确定了样品的蛋白质含量。通过标准曲线由样品的 DNA 和/或蛋白质含量计算细胞数。此方法可以直接得到细胞数目。由促有丝分裂刺激前后表达 CD 69 的细胞的数目计算系数（刺激指数），此指数提供了关于这些细胞促有丝分裂刺激能力变化的信息。

刺激指数达到未刺激对照样品的至少 10 倍，最大 100 倍是阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向的病征。刺激指数小于未刺激对照样品的 10 倍不表征阿尔茨海默氏病或该疾病的早期阶段或倾向。

在另一实验中，为了确定表达 CD 69 的细胞的数目，同样测定了样品的蛋白含量和 DNA 的含量。在这里，DNA 的定量不是通过加入 DNA 染色物质来测定的，而是通过测定 DNA 或蛋白对特定波长（例如 260 nm 或 280 nm）的光的吸收值来确定其浓度的。

专利名称(译)	用于诊断阿尔茨海默氏病的快速检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1871519A</a>	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	CN200480031004.0	申请日	2004-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	莱比锡大学		
申请(专利权)人(译)	莱比锡大学		
当前申请(专利权)人(译)	莱比锡大学		
[标]发明人	托马斯阿伦特 延斯施蒂勒		
发明人	托马斯·阿伦特 延斯·施蒂勒		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/70514 G01N2333/70517 G01N2333/7056 G01N2800/2821 G01N33/505 A61P25/28		
优先权	10349162 2003-10-22 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及诊断阿尔茨海默氏病或该疾病的早期阶段或倾向的方法。所述方法基于可促有丝分裂表达的表面标记，尤其是CD 69，以及可外周获得的细胞，例如皮肤细胞或淋巴细胞，在促有丝分裂刺激(a)之前(b)之后的定量测定。特异性刺激指数a:b是表明阿尔茨海默氏病或该疾病早期阶段或倾向的病征。本发明也涉及适于实施本发明诊断方法的试剂盒。