

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/564



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98812956.6

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1158528C

[22] 申请日 1998.12.7 [21] 申请号 98812956.6

[30] 优先权

[32] 1997.12.7 [33] IL [31] 122490

[86] 国际申请 PCT/IL1998/000592 1998.12.7

[87] 国际公布 WO1999/030163 英 1999.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2000.7.5

[71] 专利权人 耶达研究与开发有限公司

地址 以色列雷霍沃特

[72] 发明人 M·辛尼茨基 M·戴克曼

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

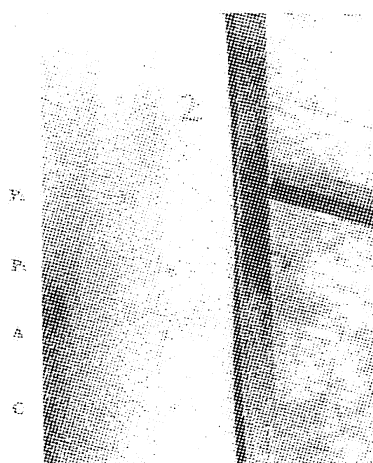
代理人 樊卫民

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 精神分裂症的皮肤测试

[57] 摘要

提供一种用来测定受试者中精神分裂症的诊断方法，其中给受试者注射一种制品，该制品包含血小板来源的等电点大于约 6.5 的蛋白质或其级分，确定在注射部位的迟发型超敏反应(DTH)的发生。阳性 DTH 反应表明该测试受试者很可能患精神分裂症。还提供用于诊断方法的蛋白质制品及其制备方法，以及使用以上方法用于精神分裂症诊断的试剂盒。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种蛋白质制品的应用，该蛋白质制品包含血小板来源的蛋白质或其级分，其等电点大于 6.5，其用于制备在个体中诊断精神分裂症的可注射试剂，诊断是通过将该试剂给个体注射后测定该个体的迟发型超敏反应。

2. 根据权利要求 1 中所述的应用，其中所述蛋白质或其级分的等电点范围在 6.5 至 9.5 之间。

3. 一种通过个体中 DTH 反应的检测用于诊断该个体中精神分裂症的试剂盒，包括由人血小板制备的蛋白质或其级分，其中所述的蛋白质或其级分的等电点大于 6.5。

4. 根据权利要求 3 中所述的试剂盒，其中的蛋白质或其级分的等电点范围在 6.5 至 9.5 之间。

5. 根据权利要求 3 中所述的试剂盒，其中的蛋白质或其级分由除待测个体之外的大批个体中得到的异体血小板制备。

6. 根据权利要求 3 中所述的试剂盒，其中的蛋白质或其级分由待测个体中得到的自体血小板制备。

7. 一种制备用于在个体中诊断精神分裂症的试剂的方法，该诊断是通过在将试剂注射入该个体中后检测个体中的 DTH 反应，所述方法包括：

a) 由大批个体中得到血液样品，由所述的样品制备混合物，从中收集血小板；

b) 由所述的血小板制品中制备蛋白质级分，其包含等电点大于 6.5 的蛋白质或其级分。

8. 根据权利要求 7 中所述的方法，其中所述的蛋白质或其级分的 pI 范围在 6.5 至 9.5 之间。

精神分裂症的皮肤测试

发明领域

本发明涉及诊断测试，特别是精神性疾病的诊断测试。

参考文献目录

以下是帮助理解本发明背景的相关参考文献目录。

1. Nyland, H., Naess, A. 和 Lundre, H., 精神分裂症患者外周血中的淋巴细胞亚群。斯堪的那维亚精神病学学报 (Acta Psychiat. Scand.), 1980; 61; 313-318
2. Hirata-Hibi, M., Higashi, S., Tachibana, T. 和 Watanabe, N., 精神分裂症中刺激产生的淋巴细胞。普通精神病学学报 (Arch. Gen. Psychiat.) 1982; 39; 82-87
3. Coeffey, C. E., Sullivan, J. I. 和 Rice, P. R., 精神分裂症中的 T 淋巴细胞。精神病学 (Biol. Psychiatry.) 1983; 18; 113-119
4. Kolyaskina, G. I., 精神分裂症中的血液淋巴细胞—免疫学和病毒学方面。精神病学进展 (Adv. Biol. Psychiat.), 1983; 12; 142-149
5. Bessler, H., Eviatar, J., Meshulan, M., Tyano, S., Djaldetti, M. 和 Sirota, P., 精神分裂症患者体内对茶碱敏感的淋巴细胞亚群。精神病学 (Biol. Psychiatry.) 1987; 22; 1025-1029
6. Muller, N., Ackenheil, M., Eckstein, R., Hofschuster, E. 和 Mempel, W., 精神分裂症患者体内抑制性细胞功能的减弱。纽约科学院年鉴 (Ann. N. Y. Acad. Sci.), 1987; 396; 686-690
7. Mihalovic, L. J. 和 Jankovic, B. D., 心室内注入的抗 caudatus 抗体对猫脑部电活动的影响。自然 (Nature), 1961; 192; 665

8. Rapport, M. M., Karplak, S. E. 和 Mahadik, S. P., 注入脑部的抗体的生物学活性。Fed. Proc., 1979; 38; 2391
9. Vartanian, M. E., Doyskina, G. S., Lozovsky, D. V., Burbaera, G. S. 和 Ignaton, S. A., 精神分裂症中的体液免疫和细胞免疫方面。生育缺陷原始文献系列 D. Bergsma 和 A. Goldstein, 编 Vol 14; 339-364; Alan R. Liss; New York, N.Y; 1978
10. Rotman, A., 神经药理学研究中的血小板。神经药理学进展 (Prog. Neuropsychopharmacol.), 1983; 6; 135-151
11. Pletscher, A., 生物精神病学, Gea Racagni, 编; Elsevier Science Publisher; 1991; 2, 354-356
12. Shinitzky, M., Deckmann, M., Kessler, A., Sirota, P., Rabbs, A. 和 Elizur, A., 痴呆和精神分裂症中的血小板自体抗体—与精神失常的可能关联。纽约科学院年鉴, 1991; 621; 205-217
13. Kessler, A. 和 Shinitzky, M., 精神分裂症患者的血小板携带抑制多巴胺摄入的自体抗体。精神生物学 (Psychobiology), 1993; 21; 229-306
14. PCT 专利申请 WO 95/23970
15. Shinitzky, M 等人, W097/13152
16. Deckmann 等, 意大利精神病学和行为学科学杂志 (Italian Journal of Psychiatry and Behavioural Sciences), 6: 29-34, 1996

通过在括号中标明以上参考文献在上面目录中的号码, 就可以在下面的文章中识别它们。

发明背景

精神分裂症是一种综合征, 包括妄想狂、幻听、幻想、紧张症、行为异常和抑郁多种症状。精神分裂症患者约占总人口的 1%。由于发病在幼年, 所以病人一生中的绝大多数时间都需要医学和精神病学监护, 给社会带来巨大的经济和社会负担。因此精神分裂症是工业化社会代价最高的疾病之一。

因为还未阐明精神分裂症的生化基础，目前诊断仍然仅仅基于精神病学评价。此外，尽管精神安定药物可以减轻症状，但目前没有精神分裂症的有效疗法。

许多报告提示免疫系统与几类精神失常的病因学和发病过程相关。在精神分裂症患者血液中已经发现与脑抗原有交叉反应的血清抗体⁽¹⁻⁶⁾，这表明精神分裂症也是一种自体免疫性疾病⁽⁷⁻⁹⁾。此外，血小板作为一种神经组织模型已得到应用^(10, 11)，在精神分裂症和痴呆患者中已经检测到血小板自体抗体水平升高，但在躁狂抑郁症、抑郁症、人格障碍或分裂情感性失调患者中则检测不到⁽¹²⁻¹⁴⁾。基于高水平血小板相关抗体的检测，描述了一种用于多梗塞痴呆和阿尔茨海默型痴呆的诊断的检定⁽¹⁵⁾。

一种抗自体血小板的细胞应答也在精神分裂症患者中得到证明，将从他们自身血液中提取的血小板给患者自身注射，患者表现出迟发型超敏（DTH）反应⁽¹⁶⁾。

因此本发明的目的是提供一种用于在受试者中诊断精神分裂症的测试。

发明概述

根据本发明的一个新发现是，给精神分裂症患者注射一种特定的血小板蛋白质的新级分，患者表现出典型的迟发型超敏反应特征。在此把这种新级分称为“Pool 2 蛋白”。Pool 2 蛋白组成本发明的一个方面，其特征在于等电点（pI）大于约 6.5，优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间。注射 Pool 2 蛋白后，精神分裂症患者表现出迟发型超敏（DTH）反应。

应当指出，虽然可以把患者对 Pool 2 蛋白的反应归为强的或弱的 DTH 反应，但可能会有这样的情况，患者对 Pool 2 蛋白反应的时间曲线不同于典型的 DTH 反应。

因此本发明提供了一种蛋白质制品（在下文中称为“Pool 2 蛋白”），其中包含血小板来源的蛋白质或其级分（“Pool 2 蛋白”），

其等电点 (pI) 大于约 6.5, 优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间, 通过将该产品给个体注射, 能够引起精神分裂症个体中的 DTH 反应。

本发明进一步提供了用于在受试者中测定精神分裂症的诊断方法, 包括:

- (a) 得到一种制品, 其中包含作为活性成分的血小板来源的蛋白质或其级分 (“Pool 2 蛋白”), 其等电点 (pI) 大于约 6.5, 优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间;
- (b) 将所述的蛋白质制品注射入受试者; 以及
- (c) 检查受试者注射部位迟发型超敏反应的发生, 以强于在非精神分裂症受试者中观察到的反应作为阳性结果, 阳性结果表明该受试者患精神分裂症的可能性高。

根据本发明, 还有一个令人惊讶的发现, Pool 2 蛋白可以由待测个体的自体血小板中制备, 或者是由待测受试者以外的大批个体中得到的异体血小板混合物中制备。在绝大多数的病例中, 还可以令人惊讶的发现, 注射了由异体血小板混合物中得到的 Pool 2 蛋白之精神分裂症患者的 DTH 反应明显较强, 注射了由自体血小板中得到的 Pool 2 蛋白的受试者的 DTH 反应则较弱。这个发现提供了制备 Pool 2 蛋白质制品的优越性, 既可以立即使用, 也可以在合适的条件下 (如冷藏) 将其保存, 用于不同时期在大批个体中诊断精神分裂症。这避免了在实施本发明的诊断检测前, 需要立即重复得到包含受试个体血小板的血液样品。

因此, 通过一个优选的实施方案, 本发明进一步提供了制备用于精神分裂症诊断的试剂的方法, 包括:

- (a) 由大批个体中得到血液样品, 由所述的样品中制备混合物, 从中收集血小板;
- (b) 由所述的血小板制品中制备蛋白质级分, 该血小板制品包含等电点大于约 6.5, 优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间的蛋白质或其级分。

由异种个体中制备的 Pool 2 蛋白, 可以由大批患有精神分裂症

的个体中制备，或者是由获自精神分裂症患者和健康个体的血液样品混合物中制备。

本发明进一步又提供了用于在受试者中测定精神分裂症的诊断方法，包括：

- (a) 由受试个体以外的大批精神分裂症和/或非精神分裂症个体中得到血液样品，并从中收集血小板；
- (b) 由所述的血小板分离物中制备蛋白质级分，该血小板分离物中包含等电点 (pI) 大于约 6.5，优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间的蛋白质或其级分；
- (c) 将所述的蛋白质制品注射入受试者；以及
- (d) 检查受试者注射部位迟发型超敏反应的发生，以强于在非精神分裂症受试者中观察到的反应作为阳性结果，阳性结果表明该受试者患有精神分裂症的可能性高。

通过优选的实施方案，提供了在个体中诊断精神分裂症的方法，如上所述，在合适条件下将在步骤 (b) 中收集的蛋白质级分保存，供日后用于大批受试个体时的重复使用，如在步骤 (c) 和 (d) 中描述。

虽然，如上文所解释的，由受试个体以外的大批个体中制备 Pool 2 蛋白混合物有其优越性，但根据本发明的诊断方法，也可以使用由受试个体自体血小板中制备的 Pool 2 蛋白制品。

因此本发明提供了用于在受试者中测定精神分裂症的诊断方法，包括：

- (a) 由个体中得到血液样品，并从中收集血小板；
- (b) 由所述的血小板样品中收集蛋白质或其级分，所述蛋白质或其级分的 pI 大于约 6.5，优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间；
- (c) 将所述收集的蛋白质或其级分注射入受试者；以及
- (d) 检查受试者注射部位迟发型超敏反应的发生，以强于在非精神分裂症受试者中观察到的反应作为阳性结果，阳性结果表明该受试者患有精神分裂症的可能性高。

一般,通过让收集的血小板蛋白质经过等电聚焦的方法收集 Pool 2 蛋白,其中用本领域公知的方法收集等电点大于约 6.5,优选的范围在约 6.5 至约 9.5 之间的蛋白质。

然而,根据本发明也可发现,通过不包括等电聚焦的方法也可以制备 Pool 2 蛋白制品,例如,通过使用诸如去污剂可以由血小板样品中提取蛋白质,这种提取方法可使 Pool 2 蛋白具有需要的等电点数值,该蛋白质也能够引起精神分裂症患者的 DTH 反应。

如果需要,通过以上所述的任意一种方法得到的 Pool 2 蛋白制品都可以用来进行进一步分级分离步骤,例如进行薄层层析,进行高压液相色谱或其它多种众所周知的纯化级分的方法。因此可以测试每个得到级分的活性,即它们引起精神分裂症患者 DTH 反应的能力。这些能够引起精神分裂症患者 DTH 反应的纯化的级分以及 Pool 2 蛋白中的单个蛋白质、多肽或肽,也是本发明的一个方面。

根据本发明制备的用于本发明诊断方法的 Pool 2 蛋白制品包括,由 Pool 2 蛋白纯化得到的蛋白质、包含这些蛋白质序列的多肽或肽类,其级分,以及与 Pool 2 蛋白的蛋白质相同的通过合成或基因工程方法得到的蛋白质、多肽或肽类。

根据本发明,用于本发明诊断测定的 Pool 2 蛋白能够引起注射个体的 DTH 活性,可通过本领域公知的方法测试 DTH 活性。简言之,在受试个体前臂或大腿皮内注射 Pool 2 蛋白,在 24、48、72 小时后,通过测量硬结周围的反应直径评价注射位点的反应。如上所述,可能会有这样的情况,反应的时间曲线可不同于典型的 DTH 反应时间曲线。

本发明进一步提供了用于精神分裂症诊断的试剂盒,包括所述的 Pool 2 蛋白、由其得到的活性蛋白质级分,或所述的 Pool 2 蛋白来源的单个活性蛋白质或肽。优选地,这样的蛋白质以可注射的形式或是以适于制备可注射制剂的形式,例如冷冻干燥的形式提供。试剂盒一般提供使用说明或指导记录结果方法的图表或图片。

附图简述

图 1 表示注射了下列制品的精神分裂症患者前臂的反应:

- i. Pool 2 蛋白 (标记为 P2)
- ii. Pool 1 蛋白 (标记为 P1)
- iii. 自体血小板 (标记为 A)
- iv. PBS (标记为 C=对照)

结合上面的附图, 本发明将在以下的实施例中得到说明。

实施例

在以色列 Sha'ar Menashe 精神健康医院、Pardes Hana 老年病医院以及 Weizmann 科学研究所, 进行了一项关于受试者注射了由他(或她)自身血液中收集的血小板或注射了 Pool 2 蛋白后反应的研究。

实施例 1: 自体蛋白质的注射

1. 血小板制备

取受试者静脉血 10 毫升, 20℃, 150 g 离心 20 分钟。收集含有血小板的上清液, 20℃, 2000 g 离心 10 分钟, 共离心三次, 然后将血小板在含有 5 mM EDTA 的磷酸缓冲盐液 (PBS) 中重悬。最后一次洗涤后, 将血小板在无菌 PBS 中重悬, 终浓度为 2×10^8 血小板/毫升。

2. 自体皮肤测试和迟发型超敏反应 (DTH) 的测量

将如上法获得的特定受试者的 0.1 毫升血小板悬液皮内注射回同一受试者的前臂。在距离样品注射部位大约 10 厘米处第二次注射 0.1 毫升 PBS 作为对照。

注射部位的迟发型超敏反应的测量应依照本领域公知的方法 (Skornik, Y., 等人, 癌症免疫学免疫治疗 (Cancer Immunol Immunother.), 11: 93-96, 1981)。

结果

测试分组实施:

- a) 18 位 65 岁以下的健康受试者。
- b) 10 位 65 岁以上的健康受试者。
- c) 41 位精神分裂症患者。
- d) 21 位痴呆患者。

此测试结果如下表 1 中所示。

表 1

用于精神分裂症检测的人自体（自身）抗血小板皮肤反应
多中心研究概要

精神分裂症患者人数 n=41	非精神分裂症患者人数 n=49
皮肤反应阳性: 25	皮肤反应阳性: 0
皮肤反应临界: 13	皮肤反应临界: 1
皮肤反应阴性: 3	皮肤反应阴性: 48
总计	总计
敏感性: 92%	特异性: 98%

由此可见，41 例精神分裂症患者中有 38 例呈 DTH 反应，但在 18 位 65 岁以下健康受试者中仅有一位健康个体呈阳性反应。在 10 位 65 岁以上的健康个体以及 21 位痴呆患者中无阳性反应。因此此项测试的敏感性为 92%，特异性为 98%。

如表所示，仅有一例健康个体呈阳性 DTH 反应，然而几乎所有受试的精神分裂症患者对由他们自体血小板中制备的 Pool 2 蛋白呈 DTH 反应。因此，本发明的诊断检测方法对于受试个体精神分裂症的诊断具有很高的敏感性和特异性。

实施例 2: Pool 1 和 Pool 2 蛋白的制备方法

如实施例 1, 得到含有大约 20 克总蛋白质的血小板悬液, 加入 40 毫升含 0.5% 去污剂 NP-40 和 Triton-X-100 的溶液, 室温下轻微震荡 5 分钟使血小板溶解。然后将此溶液在 20 °C, 4000g 离心 15 分钟。收集上清液, 将沉淀用 10 毫升 0.1% Triton-X-100 再提取两次。合并三次上清液, 加入 BioRad 的 Bio-Lyte Ampholyte™ 3/10 (40%) 至终浓度为 1%。溶解的蛋白质用来做等电聚焦。60 毫升的样品加入 BioRad 的 RoTofor™ 系统, 阳极溶液为 0.1M H₃PO₄, 阴极溶液为 0.1M NaOH。10°C 下 10 瓦恒定功率下等电聚焦大约 4 小时直到电流恒定 30 分钟。依照它们的等电点将蛋白质被分为两类: 等电点范围在 2-6.5 的蛋白质归为 Pool 1 蛋白, 而等电点范围在 6.5-9.5 的蛋白质归为 Pool 2 蛋白。分别收集 Pool 1 和 Pool 2 蛋白, 用 PBS 1: 50 稀释。

实施例 3: 注射 Pool 1 和 Pool 2 蛋白方法

以下 4 种制品皮内注射入精神分裂症患者的前臂:

- i. Pool 2 蛋白 (标记为 P2)
- ii. Pool 1 蛋白 (标记为 P1)
- iii. 自体血小板 (标记为 A)
- iv. PBS

在 4 个不同的注射部位分别注射以上制品各 0.1 毫升, 每个注射部位之间相互间隔大约 10 厘米。在注射后 24 小时、48 小时和 72 小时监视每个注射部位的皮肤反应。

结果

结果如图 1 所示, (i) 为前臂上最高注射部位, (iv) 则为前臂上最低注射部位。

由图所示, 按上述方法测量 DTH 反应, 在该精神分裂症患者的

Pool 2 蛋白注射部位上观察到 DTH 反应，而在 P1 注射部位则没有 DTH 反应。此外，与自体血小板注射部位的 DTH 反应相比，P2 注射部位的 DTH 反应大大增强。因此，在绝大多数情况下，在本发明的诊断测试中，优选地使用由数个异源个体中得到的血液样品混合物制备的 P2 蛋白制品。

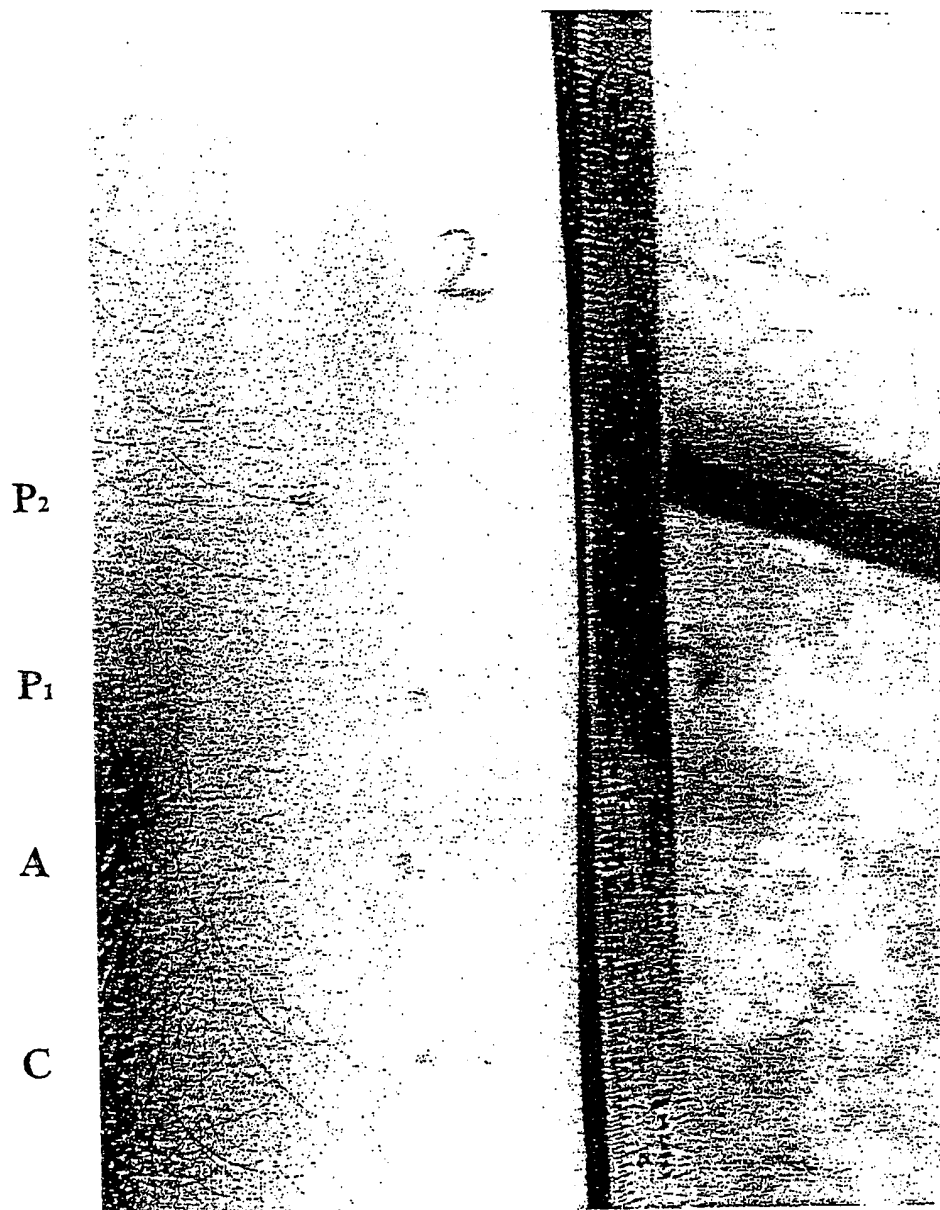


图 1