



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593926 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810274968.1

罗奈尔得·L·海斯

(22)申请日 2012.09.14

(74)专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002

(30)优先权数据

61/534,560 2011.09.14 US

61/569,047 2011.12.09 US

代理人 王洁

(62)分案原申请数据

201280044530.5 2012.09.14

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 促进军事医学的亨利·M·杰克逊  
基金会公司

地址 美国马里兰州

申请人 班扬生物标记公司

(72)发明人 哈维·波拉德 张磊

奥弗·艾德elman

罗伯特·J·乌尔萨诺 李合

苏童平 凯文·嘉旺·王

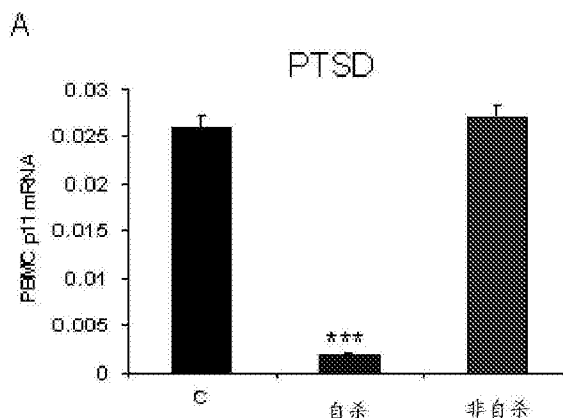
权利要求书2页 说明书28页 附图14页

### (54)发明名称

检测和监测用于PTSD的诊断生物标志物以及区分自杀式与非自杀式障碍的方法和试剂盒

### (57)摘要

危及生命的创伤如恐怖袭击、战争、灾难、精神打击或身体攻击、严重事故和暴力经常激起称为创伤后应激障碍(PTSD)和与其相关的自杀的情绪和行为障碍。用于PTSD和自杀的准确的诊断和治疗计划仍然是困难的。特异性标志物的发现为鉴定当进行干预时可以经历更好结果的组的更准确的临床评估创造新的机会。本发明提供了在怀疑患有PTSD和/或具有自杀倾向的对象的生物样品中检测P-11、UBE3A、STY1、EMAP-II、SIP1、ORC5L、DCX、SCYE蛋白的方法,以及提供对性别具有特异性的其它PTSD标志物。



1. 一种泛素蛋白连接酶E3A (UBE3A) 在制备用于确定创伤后应激障碍 (PTSD) 存在的试剂盒中的用途, 包括:

基于从对象中获得的生物样品中测量的UBE3A的量, 确定怀疑患有PTSD的对象中PTSD的存在。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 还包括:

如果对象为男性, 则测量生物样本中与PTSD相关的至少一种PTSD标志物的量, 其中所述的至少一种PTSD标志物为泛素结合酶E2L3; Fas (TNFRSF6) 相关死亡结构域蛋白; 蛋白激酶, AMP激活的,  $\beta$ 1非催化亚基; 激肽释放酶10; 丝裂原活化蛋白激酶4; TAF6 RNA聚合酶II, TATA框结合蛋白 (TBP) 相关因子, 80kDa; 蛋白激酶C,  $\alpha$ ; DNA断裂因子, 45kDa,  $\alpha$ 多肽; 三角形四肽重复干扰素诱导蛋白4; 纹蛋白, 钙调素结合蛋白; 磷酸肌醇-3-激酶, 催化的,  $\alpha$ 多肽; 肿瘤坏死因子受体超家族、成员6; 核自身抗原精子蛋白 (组蛋白结合的); ras同源基因家族、成员A; NIMA (never in mitosis gene a) 相关激酶2; SWI/SNF相关的, 矩阵相关的, 染色质肌动蛋白依赖性调节子, 亚家族a, 成员2; 芳香烃受体核转位蛋白; 突触相关膜蛋白, 91kDa同源物 (小鼠); G1向S期转换蛋白2; 或整合素,  $\alpha$ 2 (CD49B, VLA-2受体的 $\alpha$ 2亚基), 或其组合物; 以及

基于在生物样本中测量的至少一个PTSD标记物的量来确定对象中PTSD的存在。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 还包括:

如果对象是女性, 则测量生物样品中与PTSD相关的至少一种PTSD标记物的量, 其中所述至少一种PTSD标记物是运动神经元存活蛋白结合蛋白1 (SIP1); 桥粒斑菲素蛋白2; 分泌蛋白SEC8; 表皮生长因子受体通路底物8; 二酰基甘油激酶, 110kDa; 中心体相关蛋白2; 通用转录因子IIF, 多肽2, 30kDa; 神经源素3; 或ADP-核糖转移酶, 或其组合; 以及

基于在生物样本中测量的至少一个PTSD标记物的量来确定对象中PTSD的存在。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的用途, 其特征在于, 还包括:

测量生物样品中的自杀标记物的量, 其中自杀标记物为P-11或P2RX7; 以及

基于在生物样本中测量的自杀标记物的量确定对象是否是自杀的。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述的生物样品是全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、汗液、前额皮质组织、海马组织、或同侧皮层组织。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 还包括:

监测从对象连续收集的生物样品中UBE3A量的时间变化。

7. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 还包括:

监测从对象连续收集的生物样品中UBE3A的量的时间变化, 其中所述的对象与治疗药物一起施用以治疗PTSD。

8. 一种用于使用泛素蛋白连接酶E3A (UBE3A) 来确定创伤后应激障碍 (PTSD) 的存在的试剂盒, 包括:

用于保持从对象分离的生物样品的基质;

与UBE3A特异性相互作用的试剂;

用于所述的试剂和所述的样品或所述的样品的一部分反应以检测用于诊断对象中PTSD的UBE3A的存在或量的印刷说明书。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂是特异性地结合针对UBE3A

的自身抗体的抗原。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂是特异性结合UBE3A的抗体。

11. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂与UBE3A的相互作用通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测定。

12. 一种用于确定对象中创伤后应激障碍(PTSD)的存在的体外诊断装置,所述装置包括:

用于保持从对象收集的生物样品的样品室;

与所述样品室流体连通的检测模块,所述的检测模块含有与泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)特异性相互作用的试剂;

电源;以及

与所述电源和所述检测模块可操作通信的数据处理模块;

其中所述检测模块分析所述生物样品以检测存在于所述生物样品中的UBE3A并且将在所述生物样品中检测到的UBE3A的存在电子通信至所述数据处理模块;

其中所述数据处理模块具有涉及检测对象中的PTSD的输出,所述输出是所测量的UBE3A的量,PTSD的存在或不存在或PTSD的严重性。

13. 根据权利要求12所述的装置,其特征在于,还包括显示器,与数据处理模块电子通信并显示所述输出。

14. 根据权利要求12所述的装置,其特征在于,还包括发射器,用于将所述输出通信至远程位置。

15. 根据权利要求12所述的装置,其特征在于,所述输出是数字化的。

16. 一种用于在对象中检测PTSD的体外诊断装置,其特征在于,所述装置包括:

用于保持来自对象的生物样品的手持的样品室;

与所述样品室流体连通的检测模块,所述检测模块含有与泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)特异性相互作用的试剂;以及

响应在生物样品中存在的至少一种测量的UBE3A而提供比色变化的染料。

## 检测和监测用于PTSD的诊断生物标志物以及区分自杀式与非自杀式障碍的方法和试剂盒

[0001] 本申请为申请日是2012年9月14日、申请号是201280044530.5、发明创造名称是“用于检测和监测用于创伤后应激障碍 (PTSD) 的诊断生物标志物以及用于区分自杀式与非自杀式障碍的方法和试剂盒”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2011年9月14日提交的美国临时专利申请号61/534,560和2011年12月11日递交的美国临时专利申请号61/569,047的优先权。每个相关申请在这里通过参考并入。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明是在美国陆军 (U.S. Army) 给予的DAMD17-00-1-0110号资助以及国家心理健康研究所 (National Institute of Mental Health) 给予的02-M-0317号资助下由政府支持作出的。政府对本发明具有一定的权利。

### 技术领域

[0006] 本发明基本涉及在患有创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD) 的对象中产生的标志物的可靠的检测和鉴定并提供用于在患有该障碍的对象中区分自杀与非自杀式神经病理学的可靠的衡量标准。特别地,本发明涉及用于检测PTSD及自杀的方法和试剂盒以及用于患有该障碍的患者的治疗和给药的方法。此外,本发明提供一种体外诊断装置,其使对于PTSD和自杀的诊断和预后重要的标志物的可靠的检测和鉴定成为可能。

### 背景技术

[0007] 创伤后应激障碍 (Post-Traumatic Stress Disorder, PTSD) 影响了7-8%的美国总人口以及约15%的从战争返回的退伍军人。症状可以持续数月或数十年。不幸的是,在患病的平民和军人个体中PTSD经常被误诊以及放任不治疗,扰乱他们的生活质量、他们的家庭和孩子、以及我们的医疗保健系统。即使确诊时,PTSD进程的严重程度仍然难以治疗。尽管这种障碍的神经生物学相关性的广泛研究,以及努力去了解潜在的病理学,这种疾病的细胞和分子机制仍然知之甚少。

[0008] PTSD是一种严重致残焦虑症,可以在对象看到或经历涉及伤害或死亡威胁的创伤性事件后出现,可以在临床上以急性或慢性形式被发现。有关的创伤性经历包括经历或目睹儿童虐待、交通事故、内科合并症、身体攻击、自然灾害、入狱或战争。PTSD的症状包括噩梦连连或白天回闪的侵袭,特点是高度焦虑;过度警觉,意为用于战斗或逃跑的持续跳动准备;以及避免与可能提醒患者创伤的任何东西或任何人接触。急性PTSD可能在3-6个月内消退,然而,慢性PTSD是一种消长疾病,可以持续几个月、几年、或几十年。PTSD往往与其他精神疾病特别是抑郁、物质滥用和自杀想法并存。因此,PTSD可能导致严重残疾。

[0009] PTSD的目前的诊断建立在临床病史和对象精神状态检查的基础上,采用临床结构

性访谈、症状检查表、或病人自我报告。然而,采用这些对象测试,仍然难以区分PTSD和其他精神疾病,导致关于治疗干预和病因学的更加明确的了解两方面的困难的治疗决定。目前的临床评估存在的限制将大大受益于更加客观的装置,以提高鉴定PTSD患者的能力,并因此能够将PTSD与其他精神疾病区分开。

[0010] 自杀是所有年龄段死亡的十大主要原因之一,也是15-34岁的人死亡的前三个原因之一。自杀倾向以及这些倾向的进程是非常难以诊断的。通常自杀倾向只能通过精神状态检查进行预防性诊断,但更普遍是在自杀企图作出后。自杀是一个具有挑战性的心理健康问题,因为所有主要的精神障碍增加自杀的风险。精神疾病,如BP、MDD、SCZ或PTSD,存在于大约 90%的进行自杀的人中,并导致大多数人处于自杀的危险中。在自杀牺牲者中在他们死亡时这些精神障碍的发生率为87.3%~98%。

[0011] 许多风险因素增加PTSD患者企图自杀的机会,这些因素包括:1) 多次住院,2) 抑郁, 3) 在PTSD发病前存在应激生活事件,4) 在PTSD发病时比较年轻,5) PTSD症状发作之间没有空闲间隔期,6) 雌性,7) 性行为,8) PTSD症状先前发作的更多次数,和9) 循环情绪性格。这些特征已经常规使用于企图鉴定那些整个过程处于较高的自杀风险的人们。

[0012] 预防自杀已成为军事组织的另一个主要问题。单单在美国陆军,自杀的发生率在目前的经济危机以及伊拉克和阿富汗战争期间一直稳步上升。虽然已经花费很多努力在努力理解能够增加自杀风险的生物因素,以及鉴定发生在那些具有自我伤害倾向的人们中的生物学改变中,目前,没有客观的生物学标志物以防止自杀。PTSD的最近研究发现在PTSD患者中自杀和自杀企图的大幅增加的风险。62%的诊断PTSD的个体具有自杀构想,因为创伤性事件普遍增加个人的自杀风险。患有PTSD的个体的自杀企图的可能性比不患有它的个体大约高 15倍。因而存在确定患有PTSD的患者的自杀风险的需要。

[0013] 用于PTSD的治疗包括心理治疗,特别是认知行为治疗和辅助药物治疗,主要采用特异性血清素重吸收抑制剂(serotonin-specific reuptake inhibitor,SSRI's)。已经研究了许多不同的药理学方法。一种方法是基于临床假设,即重度抑郁症(Major Depressive Disorder,MDD) 和PTSD可能具有很多共同点。例如,这些存在享有共同的风险因素,具有重叠的症状,并经常一起出现。因此,广泛认为抗抑郁药,如SSRI药物氟西汀(百忧解)(fluoxetine(Prozac)) 和帕罗西汀(赛乐特)(paroxetine(Paxil)),在治疗PTSD的一些症状中是有效的。其它通常施用的SSRI抗抑郁药包括文拉法辛(怡诺思)(venlafaxine(Effexor)) 和舍曲林(佐洛复)(sertraline(Zoloft))。

[0014] 然而,PTSD患者可能还有其它共存或并存的临床问题。这些并存状况已经导致其它类型的药物添加到医疗设备中。通常施用的抗精神病药物包括米氮平(瑞美隆)(mirtazapine (Remeron))、奥氮平(再普乐)(olanzapine(Zyprexa)) 和喹硫平(思瑞康)(quetiapine (Seroquel))。还使用 $\beta$ 受体阻滞剂普萘洛尔(propranolol)用于试图阻断PTSD患者中记忆的形成。已经报道哌唑嗪(Prazosin),一种 $\alpha_1$ -选择性肾上腺素受体拮抗剂,减少与PTSD相关的创伤有关的恶梦和睡眠障碍。因此,共病,无论是因果关系或补偿性的,可能使得PTSD 药物治疗的可能方法变得复杂。这些问题暗示可能需要用于PTSD的更加客观的、基于生物学的标准。

[0015] 虽然一直努力开发临床策略以鉴定PTSD患者,但是目前还没有用于在患者中检测这种风险的生物测定方法。因此,PTSD患者的诊断只建立在临床病史和精神状态检查的基

基础上,通常采用临床结构性访谈、症状检查表和病人自我报告。目前的临床评估将大大受益于更加客观的测试。

[0016] 生物标志物越来越多地使用用于及时和准确地诊断疾病,以及甚至在临床表现出现之前,鉴定处于某些疾病和倾向的高风险的个体。目前没有客观的标志物来验证PTSD的诊断或作为用于PTSD治疗的客观替代指标。在没有用于PTSD患者的临床使用的标志物的情况下,诊断一直依赖于主观临床评估,或来自心理学家的无症状诊断。因为PTSD只能通过患者的个人访谈进行诊断,其中患者可能认识到给出他们知道正确的答案,目前的方法使得难以诊断患有这些疾病的对象。其结果是,在数千名患病的个体中,经常遗漏、误诊或放任不治疗大多数PTSD病例。在遗漏这些疾病的某些情况中,公众的安全也受到危害。

[0017] 尽管当今的标志物分析的技术,对于能够帮助精神疾病例如PTSD、MDD、SCZ和BP的客观检测的预后指标,仍存在未满足的需要。此外,在诊断那些处于自杀风险的患者时,存在提供将有助于鉴定那些患有精神疾病的患者的衡量标准的需要。此外,存在客观地诊断PTSD的方法的需要,客观地监测PTSD进程和预防自杀的需要,在临床表现前检测PTSD的方法的需要,以及通过使用体外诊断装置以鉴定神经化学标志物从而指导恰当的治疗疗程的临床干预的需要。

## 发明内容

[0018] 提供了一种诊断工具,用于创伤后应激障碍(Post-traumatic stress disorder, PTSD)和/或自杀单独的或与基于访谈的评估或用于其它疾病例如MDD、SCZ和BP的其它生物标志物水平结合的临床评价。此外,通过使用标志物,提供了提高PTSD和自杀风险评估的客观的衡量标准。经过反复测试,关于生活方式或药物治疗方案的有效性提供了反馈。

[0019] 本发明进一步提供了专门设计和校准以检测在患有精神疾病例如PTSD、MDD、SCZ、BP和自杀的患者的样品中差异存在的神经元蛋白标志物的体外诊断装置。这些装置提出了灵敏、快速、非侵入性的方法用于通过检测和确定表明精神疾病的标志物的量以帮助精神疾病的诊断。在患者样品中这些标志物的测量,单独或与患者访谈结合,提供诊断医师能够关联某个精神疾病的严重程度的可能的诊断的信息。

[0020] 本发明进一步提供了用于PTSD检测的检测性别特异和非性别特异的蛋白的方法。代表性的PTSD标志物是选自:突触结合蛋白1(synaptotagmin 1),泛素蛋白连接酶E3A(ubiquitin protein ligase E3A),聚合酶(以DNA为模板的), $\Delta$ 1,催化亚基125kDa(polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa),微小诱导细胞因子亚家族E,成员1(内皮单核细胞激活的)(small inducible cytokine subfamily E, member 1 (endothelial monocyte-activating)),非转移细胞1蛋白(Nm23A) (non-metastatic cells 1 protein (Nm23A)),蛋白激酶C-类似物1,核蛋白,共济失调-毛细血管扩张症位点(protein kinase C-like 1, nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus),单克隆抗体KI-87鉴定的抗原,磷脂酶C, $\beta$ 1(磷酸肌醇特异性的)(phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)),电压门控钾通道,亚家族H(eag相关的),成员6(potassium voltage-gated channel, and subfamily H(eag-related), member 6),P-11和P2RX7的PTSD特异性的至少一个、多个或所有性别中性蛋白、其肽、变体或片段。标志物P-1和P2RX7还可以使用用于确定自杀患者。

[0021] 代表性的雄性特异性PTSD标志物是选自:泛素结合酶E2L3 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2L3),FAS相关死亡结构域蛋白 (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain),蛋白激酶,AMP激活的, $\beta$ 1非催化亚基 (protein kinase,AMP activated, beta 1 non-catalytic subunit),激肽释放酶10 (kallikrein 10),丝裂原活化蛋白激酶4 (mitogen-activated protein kinase 4),TAF6 RNA聚合酶II,TATA框结合蛋白 (TBP)-相关因子,80kDa (TATA box binding protein (TBP)-associated factor,80kDa),蛋白激酶C, $\alpha$  (protein kinase C,alpha),DNA断裂因子,45kDa, $\alpha$ 多肽 (DNA fragmentation factor,45kDa,alpha polypeptide),三角形四肽重复干扰素诱导蛋白4 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4),纹蛋白、钙调素结合蛋白 (striatin,calmodulin binding protein),磷酸肌醇-3-激酶,催化 $\alpha$ 多肽 (phosphoinositide-3-kinase,catalytic alpha polypeptide),肿瘤坏死因子受体,超家族,成员6 (tumor necrosis factor receptor,superfamily,member 6),核自身抗原精子蛋白 (组蛋白结合的) (nuclear autoantigenic sperm protein(histone binding)),ras同源基因家族,成员A (ras homolog gene family,member A),NIMA (never in mitosis gene a) 相关激酶2 (NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2),SWI/SNF相关的,基质相关的,染色质肌动蛋白依赖性调节子,亚家族a,成员2 (SWI/SNF related,matrix associated,actin dependent regulator of chromatin, subfamily a,member 2),芳香烃受体核转位蛋白 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator),突触相关膜蛋白,91kDa同源物 (小鼠) (synaptosomal-associated protein,91kDa homolog (mouse)),G1向S期转换蛋白2 (G1 to S phase transition 2) 和整合素, $\alpha$ 2 (CD49B, VLA-2受体的 $\alpha$ 2亚基) (integrin,alpha 2 (CD49B,alpha 2subunit of VLA-2receptor))的PTSD 特异性的至少一个、多个或所有雄性特异性蛋白、其肽、变体或片段。

[0022] 代表性的雌性特异性PTSD标志物是选自:运动神经元存活蛋白结合蛋白1 (survival of motor neuron protein interacting protein 1),桥粒斑菲素蛋白2 (plakophilin2),分泌蛋白SEC8 (secretory protein SEC8),表皮生长因子受体通路底物8 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 8),二酰基甘油激酶, $\theta$  110kDa (diacylglycerol kinase,theta 110kDa),中心体相关蛋白2 (centrosomal protein 2),通用转录因子IIF,多肽2,30kDa (general transcription factor IIF, polypeptide 2,30kDa),神经源素3 (neurogenin 3),和ADP-核糖转移酶 (NAD<sup>+</sup>,聚 (ADP-核糖) 聚合酶) (ADP-ribosyltransferase (NAD<sup>+</sup>;poly (ADP-ribose) polymerase)) 的PTSD特异性的至少一个、多个或所有雌性特异性蛋白、其肽、变体或片段。

[0023] 还提供了方法,以检测在全血、CNS组织、血清、血浆、脑脊液、唾液、汗液、泪液、尿、口腔样品、或它们的组合物中的P-11 (膜联蛋白II轻链 (annexin II light chain))的蛋白或mRNA,泛素蛋白连接酶E3A (Ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A)),突触结合蛋白 (Synaptotagmin (STY1)),内皮单核细胞激活多肽 (endothelial monocyte-activating polypeptide (EMAP-II)),运动神经元存活蛋白结合蛋白 (survival of motor neuron protein interacting protein (SIP 1)),起始识别复合物,亚基5-类似物 (Origin recognition complex,subunit 5-like (ORC5L)) 和双皮质;无脑回畸形,X-连锁 (双皮质素) (DCX) (Doublecortex;lissencephaly, X-linked (doublecortin) (DCX)) 的水平;并将

蛋白的测量水平与没有患有这些标志物表明任何精神或神经疾病状态的健康正常对象的该蛋白的测量水平进行比较;或可选地,来自个体的历史水平提供对比物。PTSD、自杀或其它上述疾病的诊断是当从对象采集的样品中的所选择的标志物的水平超出预先选择的正常范围时。对于给定的对象的正常范围是根据患者的具体的变量,举例包括年龄、性别、药物负荷 (medication loading), 以及基于访谈的诊断而进行选择。进一步地,性别特异性的标志物进行了说明。

[0024] 检测这些蛋白的方法是通过常规的免疫测定技术如蛋白免疫印迹 (western blot) 或酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 进行的,但优选通过使用夹心 ELISA法。另外,使用用于检测蛋白抗原或蛋白分解产物的试剂如抗体。

[0025] 可以理解,使用针对上述标志物的抗原以检测身体的自身抗体反应。任一试剂的使用使得对象中测量的标志物的量的检测成为可能,提供用于检测PTSD存在并确定患者的PTSD 诱导的自杀倾向的衡量标准。

[0026] 还使用在外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中的 P-11 mRNA 以检测PTSD和其它精神疾病,例如MDD,以充分了解精神疾病的进程。这里检测的优选方法是通过定量实时聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR) 进行的,其测量来自PTSD、MDD和自杀对象的PBMCs中标志物的 mRNA水平。该方法涉及测量对象的PBMCs中P-11 mRNA水平,并与来自健康个体或非精神病患者以及PTSD或 MDD的非自杀患者的样品中P-11 mRNA的表达水平比较。

[0027] 在患者样品中的P-11蛋白水平容易地在临床或现场环境中在手持或即时护理平台上基本上实时地进行检测。可以理解,P-11 mRNA单独或与伴随P-11蛋白的标志物相结合进行测量。通过使用任一上述这些技术,对于患者来说,检测到的显著低于正常的P-11的水平 (mRNA 或蛋白) 表明那些患有自杀式PTSD的患者。如果检测到的P-11的水平高于正常,该水平表明非自杀式PTSD、BP、MDD或SCZ。关于适于对象的治疗方案的评估是基于从对象获得的生物样品中P-11的测量水平进行选择的。经济报酬可以要求换取P-11蛋白水平或其它发明标志物的测量。至少一个所述标志物单独或与在这里描述的其它PTSD标志物结合进行测量。

[0028] 进一步可以理解,对于所讨论的具体疾病,精神疾病诊断的类型主观地通过互补的精神评估或客观地通过使用其它标志物进一步精确。通过举例的方式,可以使用P2RX7蛋白, P2RX7 mRNA水平或UBE3A用于诊断的精确,提供患者中PTSD和自杀的另外的指示预测因子,进一步帮助PTSD与其它精神疾病的区分。应当理解,鉴定的两个或更多个标志物的使用提供协同的诊断测试,以准确地协助对象中自杀和/或PTSD的检测。

## 附图说明

[0029] 图1示出用于泛素蛋白连接酶E3A (UBE3A) 的受试者操作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线,其中,对于男性 (male) 和女性 (female) 患者,AUC均为100%。

[0030] 图2示出用于突触结合蛋白1 (STY1) 的ROC曲线,其中,对于男性,AUC为95%,对于女性,AUC为88.8%。

[0031] 图3示出用于微小诱导细胞因子亚家族E (SCYE1) 的ROC曲线,其中,对于男性, AUC

为98.1%，对于女性，AUC为97.9%。

[0032] 图4示出用于在对照和PTSD患者之间限定的发明标志物的ROC曲线，其中，对于样本的统计数据，AUC是88%。

[0033] 图5显示血浆皮质醇的基础水平在PTSD (n=13) 和对照对象 (n=11) 之间没有显著差异 ( $P>0.05$ )。

[0034] 图6显示糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 的mRNA水平在PTSD的PBMCs 中显著低于对照对象。

[0035] 图7示出，与对照 (n=14) 相比，在PTSD患者中显著较低的P-11 mRNA水平 ( $P<0.05$ )。躁郁症 (bipolar, BP) (n=24)、重度抑郁症 (major depressive disorder, MDD) (n=12)、精神分裂症 (schizophrenia, SCZ) (n=12) 的PBMC P-11 mRNA水平显著高于对照对象 (n=14) 中的 ( $P<0.001$ )。

[0036] 图8A示出定量实时PCR分析的结果，显示，与对照对象相比，P-11 mRNA水平在患PTSD的企图自杀者中显著降低 ( $P<0.05$ )。在非自杀患者和对照对象之间在PBMC P-11 mRNA 的表达水平上没有显著差异。

[0037] 图8B示出，与对照对象相比，在患BP的企图自杀者和非自杀患者中P-11 mRNA水平均显著增加 ( $P<0.05$ )。在患BP的企图自杀者和非自杀患者之间在PBMCs P-11 mRNA的表达水平上没有显著差异。\*\*\* $P<0.001$ 。

[0038] 图9A~9D显示在患PTSD的企图自杀者和非自杀的药物治疗的患者的PBMC P-11 mRNA的表达水平和症状之间没有关系。图9A和B比较患PTSD的企图自杀者中PBMC P-11 mRNA的表达水平和汉密顿抑郁量表 (HAMD) (Hamilton Depression Rating Scale (HAMD)) 或汉密尔顿焦虑量表 (HARS) (Hamilton Anxiety Rating Scale (HARS)) 分数。图9C和9D 比较患PTSD的非企图自杀患者中PBMC P-11 mRNA的表达和HAMD或HARS分数。在所有测试组中HAMD或HARS分数和P-11 mRNA水平之间没有显著相关性。

[0039] 图10A~10D显示在患BP的企图自杀者和非自杀患者的PBMC P-11 mRNA的表达水平和症状之间没有关系。

[0040] 图10A和10B比较患BP的企图自杀者中PBMC P-11 mRNA的表达水平和HAMD或 HARS 分数。

[0041] 图10C和10D比较患BP的非自杀患者中PBMC P-11 mRNA的表达和HAMD或HARS 分数。在所有测试组中HAMD或HARS分数和P-11 mRNA水平之间没有显著相关性。

[0042] 图11A和11B示出PBMCs中P2RX7 mRNA水平在对照对象、患PTSD或BP的企图自杀者和非自杀患者之间不同。图11A示出定量实时PCR分析的结果，显示与对照对象相比，P2RX7 mRNA水平在患PTSD的企图自杀者和非自杀患者中均显著降低 ( $P<0.05$ )。图11B 示出与对照对象或患BP的企图自杀者相比，P2RX7 mRNA水平在患BP的非自杀患者中显著降低 ( $P<0.05$ )。与对照对象相比，在患BP的企图自杀者中发现的PBMC P2RX7 mRNA 的表达水平没有显著差异。\*\* $P<0.01$ ；\*\*\* $P<0.001$ 。

[0043] 图12A-12D示出在患PTSD的非自杀患者中PBMC P2RX7 mRNA表达水平之间的关系是与HAMD或HARS分数高度相关的。根据在患PTSD的企图自杀者和非自杀患者中PBMC P2RX7 mRNA的表达水平将HAMD或HARS分数绘制出来。在企图自杀者中分数与P2RX7 mRNA水平不相关，但在非自杀患者中与P2RX7 mRNA水平相关 ( $P<0.05$ )。

[0044] 图13A-13D示出在患BP的企图自杀者和非自杀患者中PBMC P2RX7 mRNA表达水平之间的关系是与HAMD或HARS分数不相关的。根据在企图自杀者和非自杀患者中PBMC P2RX7 mRNA的表达水平将HAMD或HARS分数绘制出来。在所有测试组中PBMC P2RX7 mRNA表达水平和HAMD或HARS分数之间没有显著相关性。

[0045] 图14描绘了定量实时PCR分析的结果,显示与正常对照对象(control subjects, C)相比,P-11 mRNA水平在企图自杀者(suicide attempters, S)中显著降低,在非企图自杀者(suicide non-attempters, NS)中显著增加。

[0046] 图15示出对照对象、企图自杀者和非企图自杀者的PBMCs中P2RX7 mRNA水平的差异,其中实时定量PCR分析显示与正常对照(C)相比,在企图自杀者(S)和非企图自杀者(NS)中P2RX7 mRNA水平显著降低。

[0047] 图16是体外诊断装置的示意图。

图17为对PTSD患者和健康对照的完整的统计信息表。

### 具体实施方式

[0048] 本发明具有用处作为用于精神疾病例如PTSD和自杀从而允许临床干预的装置和标志物测试。本发明还可以使用用于检测神经损伤或神经疾病,其中提供的神经蛋白标志物可以共存。

[0049] 下面的详细描述在本质上仅仅是示例性的,绝不是为了限制本发明的范围、其应用或用途,其可以变化。本发明根据在这里包括的非限制性的定义和术语进行描述。这些定义和术语不是旨在用作对本发明的范围或实践的限制,而仅用于说明和描述的目的而给出。在整个说明书和权利要求书中使用的各种术语如下所述进行定义,因为它可能有助于理解本发明。

[0050] 在本发明的上下文中的“标志物”是指与从对照对象(例如阴性诊断的人,正常或健康对象)或来自患者的标志物的历史值采集的类似的样品相比,在从具有神经损伤和/或精神疾病的患者采集的样品中差异存在的mRNA、蛋白或降解产物(breakdown product, BDP)或针对上述之一的抗体。

[0051] “降解产物”定义为可检测且具有足够大小以关联基础mRNA或蛋白的mRNA或蛋白的片段。

[0052] 短语“精神疾病”在这里以最广泛的含义进行使用,并表示干扰日常生活中的个人行为、与其它人交互、以及工作方式的精神疾病。精神疾病的诊断与统计手册(Diagnostic and Statistical Manual, DSM),由美国精神病学协会出版,对精神疾病进行分类,例如PTSD、MDD、BP和SCZ。

[0053] 术语“患者”,“个体”或“对象”在这里可互换使用,并且是指要治疗的哺乳动物对象,优选人类患者。在某些情况下,本发明的方法在实验动物、兽医应用、以及脊椎动物疾病模型的发展中发现用途,脊椎动物包括但不限于包括小鼠、大鼠和仓鼠的啮齿动物;鸟类、鱼类爬行动物和灵长类动物。

[0054] 术语“正常对象”是指哺乳动物对象,优选人类患者,在精神方面不是或不具有神经损伤表现,没有过去的神经损伤或任何精神病史。

[0055] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在这里可互换使用用于指氨基酸残基的聚合物。该术

语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的类似物或模拟物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物,具有足够的大小以关联标志物。多肽可以进行修饰,例如通过加入碳水化合物残基而形成糖蛋白。术语“多肽”、“肽”和“蛋白”包括糖蛋白、以及非糖蛋白。

[0056] “抗体”是指由一个免疫球蛋白基因或多个免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽配体,其特异性结合和识别表位(例如,抗原)。所识别的免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链恒定区基因, $\alpha$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ 和 $\mu$ 重链恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。抗体例如作为完整的免疫球蛋白或由各种肽酶消化产生的许多特征明确的片段存在。这包括,例如,Fab'和F(ab)'<sub>2</sub>片段。术语“抗体”,如这里所使用的,还包括通过完整抗体的修饰产生的或那些用重组DNA方法重新合成的抗体片段。它还包括多克隆抗体,单克隆抗体,嵌合抗体,人源化抗体,或单链抗体。抗体的“Fc”部分是指免疫球蛋白重链部分,其包含一个或多个重链恒定区结构域,CH1,CH2和CH3,但并不包括重链可变区。

[0057] 在这里使用的“生物样品”包括多核苷酸、多肽、肽、抗体片段和相关的降解产物,是体液;细胞制剂的可溶部分,或细胞在其中生长的培养基;从细胞中分离或提取的染色体、细胞器或膜;在溶液中或结合到基质的基因组DNA、RNA或cDNA、多肽、或肽;细胞;组织;组织印迹;指纹;皮肤;或毛发;和上述的片段。

[0058] “基质”是指任何刚性或半刚性的支持物,核酸分子或蛋白结合其上,并且包括膜、过滤器、芯片、载玻片、晶片、纤维、磁性或非磁性珠、凝胶、毛细管或其它管件、板、聚合物和具有多种表面形式的包括孔、槽、销、通道和孔隙的微粒。

[0059] “免疫测定”是使用抗体特异性结合抗原或抗原结合抗体(例如,标志物)的测定。免疫测定的特征在于使用特定抗体的特异性结合特性来分离、靶向、和/或定量抗原。应当理解,存在许多免疫测定并且可以互换地使用于本发明。

[0060] 如在这里使用的,术语“创伤性脑损伤(Traumatic Brain Injury)”或“TBI”是本领域公认的并且旨在包括对头部进行创伤性打击造成大脑损害,通常没有穿透颅骨的情况。通常,最初的创伤可能导致血肿(expanding hematoma)、蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage)、脑水肿(cerebral edema)、颅内压上升(raised intracranial pressure,ICP)和脑缺氧(cerebral hypoxia),其可以反过来,由于低脑血流量(cerebral blood flow,CBF)导致严重的继发事件。根据严重程度,TBI也可以分类为严重、轻度或中度的。

[0061] 短语“特异性(或选择性)结合”抗体或“和.....特异性(或选择性)免疫反应”,当指的是蛋白或肽时,是指在蛋白和其它生物制剂的异质群体中确定蛋白存在的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的抗体结合特定的蛋白至少2倍于背景,基本上不以显著量结合存在于样品中的其它蛋白。在这些条件下对抗体的特异性结合可能需要基于其对特定蛋白的特异性进行选择的抗体。例如,除了标志物NF-200的多态变体和等位基因外,可以选择来自特定物种例如大鼠、小鼠或人的针对标志物NF-200培养的多克隆抗体,以仅获得那些与标志物NF-200而不与其它蛋白特异性免疫反应的多克隆抗体。该选择可以通过去除与来自其它物种的标志物NF-200分子交叉反应的抗体来实现。可以使用多种免疫测定形式来选择与特定蛋白发生特异性免疫反应的抗体。例如,常规使用固相ELISA免疫测定用于选择与蛋白发生特异性免疫反应的抗体(见,例如,Harlow & Lane,Antibodies,A

Laboratory Manual(1988), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity)。典型地,特异性或选择性反应将是至少两倍于背景信号或噪声,更典型地超过10至100倍于背景。

[0062] 如在这里使用的,术语“体外诊断装置(in vitro diagnostic)”是指任何形式的诊断测试产品或测试服务,包括但不限于FDA批准的或准许的体外诊断装置(In Vitro Diagnostic, IVD)、实验室开发测试产品(Laboratory Developed Test, LDT)、或直面消费者测试服务(Direct-to-Consumer, DTC),可以使用于测定样品并检测或表明疾病、障碍、状况、感染的存在、倾向、或风险和/或药物治疗反应。在一个具体实施例中,体外诊断装置可以在实验室或其它健康专业环境中使用。在另一个具体实施例中,体外诊断装置可以由消费者在家使用。体外诊断测试包括那些旨在疾病或其它状况的体外诊断中使用的试剂、仪器、和系统,其它状况的体外诊断包括健康状况的确定,以治愈、缓解、治疗或预防疾病或其后遗症。在一个具体实施例中,体外诊断产品可以打算在取自人体的标本采集、制备和检查中使用。在某些具体实施例中,体外诊断测试和产品可以包括一个或多个实验室测试,如一种或多种体外诊断测试。如在这里使用的,术语“实验室测试”是指一个或多个涉及血液、血清、血浆、脑脊液、汗液、唾液或尿、口腔样品或其它人体组织或物质的测试样品的医疗或实验室程序。

[0063] 能够杂交靶向标志物mRNA的核酸探针或引物或使用用于检测和/或定量编码用于PTSD 的标志物蛋白的mRNA。核酸探针可以是至少为10、15、30、50或100个核苷酸的长度并在严谨条件下足够特异性杂交标志物蛋白的mRNA或其互补序列的寡核苷酸。核酸引物可以是至少10、15或20个核苷酸的长度并在严谨条件下足够特异性杂交mRNA或其互补序列的寡核苷酸。

[0064] “互补(complement)”和“互补(complementary)”是指核苷酸之间的Watson-Crick碱基对,专指通过经由两个氢键连接至腺嘌呤残基的胸腺嘧啶或尿嘧啶残基以及通过三个氢键连接的胞嘧啶和鸟嘌呤残基而彼此连接的核苷酸氢。通常,核酸包括描述为对特定的第二核苷酸序列具有“百分比互补性”的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可以对特定的第二核苷酸序列具有80%、90%、或100%的互补性,表示序列的10个核苷酸中8个、9个或10个核苷酸与特定的第二核苷酸序列是互补的。例如,核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-AGCT-3'是100%互补的。进一步地,核苷酸序列3'-TCGA-是与核苷酸序列5'-TTAGCTGG-3'的一个区域是100%互补的。

[0065] “杂交(Hybridization)”和“杂交(hybridizes)”是指互补核酸的配对和结合。杂交在两个核酸之间以不同程度发生,取决于各种因素,如核酸的互补性程度、核酸的解链温度 $T_m$  和杂交条件的严谨性,这是本领域中已知的。

[0066] “杂交条件的严谨性”是指温度、离子强度、以及关于特定常见添加剂如甲酰胺和Denhardt溶液的杂交介质的组成的条件。与特定核酸相关的特定杂交条件的确定是常规的和本领域熟知的,例如,如在J.Sambrook and D.W.Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; 和 P.M.Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002中描述的。高度严谨的杂交条件是那些只允许基本上互补的核酸杂交的条件。通常情况下,具有约85-100%互补性的核酸被认为是高度互补的,在高度严谨条件下杂交。中

等严谨条件通过具有中等互补性,约50-84%的互补性的核酸以及那些具有高度互补性的核酸杂交的条件举例说明。与此相反,低严谨杂交条件是那些具有低互补性的核酸杂交的条件。

[0067] “特异性杂交 (Specific hybridization)”和“特异性杂交 (specifically hybridizes)”是指特定的核酸杂交至样品中靶向核酸而基本上不杂交至除靶向核酸以外的核酸。

[0068] 杂交和洗涤条件的严谨性取决于多个因素,包括探针和靶标的 $T_m$ 和杂交的离子强度和洗涤条件,如本领域技术人员熟知的。对实现期望杂交严谨性的杂交和条件进行了描述,例如,在Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; 和Ausubel, F. et al., (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, Wiley, 2002中。

[0069] 高度严谨杂交条件的一个例子是长度超过约100个核苷酸的核酸在含有Denhardt溶液和相关的化学成分例如30%甲酰胺的溶液中在37℃下温育过夜然后常规洗涤的杂交。

[0070] 体外诊断装置

[0071] 图16示意性地示出本发明的体外诊断装置。发明的体外诊断装置包括至少一个样品采集室1603和使用于检测精神疾病的标志物的检测模块1602。体外诊断装置可以包括手持装置、台式装置或即时护理装置。

[0072] 样品室1603可以是本领域中已知的用于保持生物流体的任何样品采集装置。在一个具体实施例中,样品采集室可以容纳这里考虑的生物流体如全血、血浆、血清、尿液、汗液、唾液或口腔样品中的任何一种。

[0073] 检测模块1602优选包括可以使用用于检测生物样品中的蛋白抗原的测定方法,例如,通过在免疫测定中使用抗体。检测模块1602可以包括目前在本领域中已知的任何测定方法,但是应该优化测定方法用于使用于检测对象中神经损伤、神经疾病或精神疾病的神经标志物的检测。检测模块1602是与样品采集室1603流体连通的。在一个具体实施例中,检测模块1602 包括免疫测定,其中免疫测定可以是放射免疫测定、ELISA (酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、荧光免疫测定、化学发光免疫测定、磷光免疫测定,或阳极溶出伏安法免疫测定的任一项。在一个具体实施例中,也可以使用比色测定法,其可以仅包括样品采集室1603和测定方法的检测模块1602。虽然没有具体示出,这些部件优选容纳在一个组件1607中。在一个具体实施例中,检测模块 1602包含特定用于检测泛素蛋白连接酶E3A (UBE3A)、突触结合蛋白 (STY1)、内皮单核细胞激活多肽 (EMAP-II)、运动神经元存活蛋白结合蛋白 (SIP1)、起始识别复合物、亚基 5-类似物 (ORC5L) 和双皮质;无脑回畸形,X-连锁(双皮质素) (DCX)、P-11、P2RX7或其任何组合片段或降解产物。如这里所描述的,检测模块1602可以包含另外的试剂以检测另外的标志物。由于精神疾病与创伤性脑损伤 (TBI) 的共存,发明的体外诊断装置还可以测量相同的标志物,以将标志物的存在或数量与TBI的存在和严重程度关联。

[0074] 在另一个优选的具体实施例中,发明的体外诊断装置包含电源1601、检测模块1602、样品室1603、和数据处理模块1605。电源1601电连接至检测模块和数据处理模块。检测模块 1602和数据处理模块1605彼此电连通。如上所述,检测模块1602可以包括目前在本

领域中已知的任何测定方法,但是应该优化测定方法用于使用于检测对象中神经损伤、神经疾病或精神疾病的神经标志物的检测。检测模块1602是与样品采集室1603流体连通的。检测模块 1602包括免疫测定,其中免疫测定可以是放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、荧光免疫测定、化学发光免疫测定、磷光免疫测定,或阳极溶出伏安法免疫测定的任一项。生物样品放置在样品室1603中并由检测模块1602分析检测精神疾病的标志物。由检测模块1602测量的标志物的数量然后电传送至数据处理模块1604。数据处理模块1604可以包括本领域中已知的任何熟知的数据处理元件,并且可以包括芯片、中央处理单元(CPU)、或软件包,其处理从检测模块1602所提供的信息。

[0075] 在一个具体实施例中,数据处理模块1604电连通显示器1605、存储装置1606、或外部装置1608或软件包(如实验室和信息管理软件(information management software, LIMS)。在一个具体实施例中,数据处理模块1604使用用于将数据处理成用户定义的可用的格式。这种格式包含在样品中检测的神经标志物的测定量,表示神经损伤、神经疾病、或精神疾病存在,或表示神经损伤、神经疾病或精神疾病的严重程度。来自数据处理模块1604的信息可以在显示器1605上示出,以机器可读格式存储至存储装置,或电连通至外部装置1608用于进行另外的处理或显示。虽然没有特别示出,这些部件优选组装在一个组件1607中。在一个具体实施例中,数据处理模块1604可以进行编程以比较从检测模块1602发送的标志物的检测量和比较器算法。比较器算法可以比较测定量和用户限定的阈值,其可以是对用户非常有用的任何限定。在一个具体实施例中,用户限定的阈值被设置为在对照对象中测量的标志物的量,或对照群体的统计学显著平均值。

[0076] 这里描述的方法和体外诊断测试可以表示在怀疑患有神经损伤、神经疾病或精神疾病的患者中包括在当前诊断评价中的诊断信息。在另一个具体实施例中,这里描述的方法和体外诊断测试可以使用用于筛选从处于风险、可能与精神疾病相关的非特异性症状发展的风险和/或完全诊断的精神疾病。在某些具体实施例中,这里描述的方法和体外诊断测试可以用于排除与精神疾病具有相同症状的疾病和障碍的筛选。

[0077] 在一个具体实施例中,体外诊断测试可以包括构造为保持或采集来自个体的生物样品的一个或多个装置、工具和设备。在一个体外诊断测试的具体实施例中,采集生物样品的工具可以包括拭子、手术刀、注射器、刮刀、容器、以及设计成便于采集、贮存,和运输生物样品的其它装置和试剂的一种或多种。在一个具体实施例中,体外诊断测试可以包括用于采集、稳定、存储和处理生物样品的试剂或溶液。用于核苷酸采集、稳定、存储和处理的这样的试剂和溶液是本领域技术人员熟知的,并且可以通过如这里描述的体外诊断测试使用的具体方法进行说明。在另一个具体实施例中,这里披露的体外诊断测试可以包括微阵列装置和试剂、流式细胞仪和试剂、多重核苷酸测序仪和试剂、以及测定遗传样品中某些遗传标志物及检测和可视化某些生物标志物必要的另外的硬件和软件。

[0078] 蛋白生物标志物

[0079] 本发明提供了一种检测性别特异性和非性别特异性的蛋白以检测精神疾病例如PTSD和自杀的方法。这些相同的神经蛋白也可以使用用于检测神经损伤和神经疾病,如TBI,其常常与许多精神疾病共存。在一个优选的具体实施例中,对PTSD特异性的至少一个、多个或所有性别中性蛋白、其肽、变体或片段进行检测,并且选自:突触结合蛋白1、泛素蛋

白连接酶E3A、聚合酶(以DNA为模板的),  $\Delta 1$ , 催化亚基125kDa、微小诱导细胞因子亚家族E, 成员1(内皮单核细胞激活的)、非转移细胞1蛋白(Nm23A)、蛋白激酶C-类似物1、核蛋白, 共济失调-毛细血管扩张症位点、单克隆抗体KI-87鉴定的抗原、磷脂酶C,  $\beta 1$ (磷酸肌醇特异性的)、电压门控钾通道, 亚家族H(eag相关的), 成员6、泛素羧基末端酯酶L-1(ubiquitin carboxyl terminal esterase L-1, UCH-L1)、胶质纤维酸性蛋白(glia1 fibrillary acidic protein, GFAP),  $\alpha 2$ -血影蛋白降解产物( $\alpha 2$ -spectin breakdown products)、突触素(synaptophysin)、 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein)、神经颗粒素(neurogranin)、S-100 $\beta$ 、神经丝蛋白(neurofilament proteins)-F, H和N、微管蛋白(microtubulin proteins)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic proteins)和脑衰蛋白反应调节蛋白(collapsin response mediated proteins, CRMPs)、P-11和P2RX7。

[0080] 雄性特异性PTSD标志物也提供在发明方法中, 其中标志物是选自: 泛素结合酶E2L3, FAS相关死亡结构域蛋白, 蛋白激酶、AMP激活的、 $\beta 1$ 非催化亚基, 激肽释放酶10, 丝裂原活化蛋白激酶4, TAF6 RNA聚合酶II, TATA框结合蛋白(TBP)相关因子、80kDa, 蛋白激酶C、 $\alpha$ , DNA断裂因子、45kDa、 $\alpha$ 多肽, 三角形四肽重复干扰素诱导蛋白4, 纹蛋白、钙调素结合蛋白, 磷酸肌醇-3-激酶、催化 $\alpha$ 多肽, 肿瘤坏死因子受体、超家族、成员6, 核自身抗原精子蛋白(组蛋白结合的), ras同源基因家族、成员A, NIMA(never in mitosis gene a)相关激酶2, SWI/SNF相关的、基质相关的、染色质肌动蛋白依赖性调节子、亚家族a、成员2, 芳香烃受体核转位蛋白, 突触相关膜蛋白、91kDa同源物(小鼠), G1向S期转换蛋白2和整合素、 $\alpha 2$ (CD49B, VLA-2受体的 $\alpha 2$ 亚基)的PTSD特异性的至少一个、多个或所有雄性特异性蛋白、其肽、变体或片段。

[0081] 雌性特异性PTSD标志物也提供在发明方法中, 其中标志物是选自: 运动神经元存活蛋白结合蛋白1, 桥粒斑菲素蛋白2, 分泌蛋白SEC8, 表皮生长因子受体通路底物8, 二酰基甘油激酶、 $\theta 110$ kDa, 中心体相关蛋白2, 通用转录因子IIF、多肽2、30kDa, 神经源素3, 和ADP-核糖转移酶(NAD<sup>+</sup>, 聚(ADP-核糖)聚合酶)的PTSD特异性的至少一个、多个或所有雌性特异性蛋白、其肽、变体或片段。

[0082] 更进一步地用于PTSD的标志物包括泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A), 突触结合蛋白(STY1), 内皮单核细胞激活多肽(EMAP-II), 运动神经元存活蛋白结合蛋白(SIP1), 起始识别复合物、亚基5-类似物(ORC5L)和双皮质; 无脑回畸形, X-连锁(双皮质素)(DCX)。

[0083] 泛素蛋白连接酶E3A(UBE3A)是人大脑的高度相关基因, 因为大脑印迹母本等位基因中的突变导致智力低下以及与安琪儿综合征有关的其它症状。相反, 野生型UBE3A基因的复制与人孤独症有关, 人UBE3A在小鼠大脑中转基因过度表达与树突棘的数量和长度的减少相关。一致地, 小鼠大脑中UBE3A(dUBE3A)的高度保守的果蝇同源物的过度表达导致减少的树突分枝。另外, 印迹UBE3A基因的表达主要在海马、以及在小脑蒲肯野细胞和嗅球中检测到。因此, 在大脑中似乎存在UBE3A表达的最优设定值, 高于或低于该值, 次优的功能变得很明显。因此在PTSD脑脊液、血液、尿液、唾液或组织中UBE3A的高水平是异常中枢突的表现。该功能障碍的重点是在UBE3A的表达在大脑中通常最高的海马上。本发明鉴定了与正常对照或个体的历史水平相比, 在患PTSD的患者中UBE3A在全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、和脑组织如海马或同侧皮层)中的升高的水平。

[0084] 突触结合蛋白-1是57kDa的糖蛋白, 包含与蛋白激酶C相关的两个C2域和用于棕榈

酰化及结合酸性磷脂、钙、和钙调素的位点。突触结合蛋白-1通过诱导细胞质膜的局部Ca<sup>2+</sup>依赖性屈曲而参与小泡运输和胞吐作用的过程。突触结合蛋白-1是突触小泡的跨膜成分,其已牵涉在调节钙依赖性膜融合在胞吐的神经传递中发生的过程中。在人脑脊髓液中已经鉴定出完整的65kDa突触结合蛋白-1 (Davidsson et al,1996),其中发现在来自早期发作阿尔茨海默病(EAD)的患者的CSF中降低。伴随地,已经报道在EAD患者的死后海马和额叶皮质中突触结合蛋白-1的降低的水平。本发明鉴定与正常对照或个体的历史水平相比,SYT1蛋白在患PTSD的患者中在全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、脑组织例如海马和同侧皮质中的降低的水平,并表现了在PTSD大脑的海马中出现的部分保护作用。

[0085] 内皮单核细胞活化蛋白(EMAP-II)是炎性细胞因子。其前EMAP-II前体与氨酰-tRNA合成酶复合体的辅助p43组分是相同的。在用半胱天冬酶7(caspase 7)体外消化之后,p43的EMAP-II域容易从复合物释放,并能诱导人单核吞噬细胞的迁移。P43与触发由细胞凋亡条件下诱导的不可逆的细胞生长/细胞死亡转变的分子融合相比比较吻合。在p43/pro EMAP-II组分的裂解之后,EMAP细胞因子从哺乳动物多酶复合体释放。

[0086] EMAP-II也可以称为微小诱导细胞因子亚家族E,成员1(SCYE1),根据其最初发现作为氨酰-tRNA合成酶复合物的一部分,以及然后作为细胞凋亡诱导并控制血管生成、发炎和伤口愈合的蛋白,具有多个名称和功能。关于在中枢神经系统中的功能,SCYE1是用于人小神经胶质细胞的tol1样受体4(TLR4)-依赖性趋化蛋白,以这种方式介导神经损伤。大鼠中脊髓损伤与SCYE1在损伤部位积累有关,在那里延长的积累导致继发性损伤的病理生理学。因此,我们的意思是,至脑脊液中SCYE1蛋白在大脑的物质中表现成比例表达的程度,SCYE1表达的减少将似乎落入补偿和保护的范围。本发明鉴定与正常对照相比,在患PTSD的患者中,SCYE1或EMAP-II蛋白在全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、脑组织(海马和同侧皮质)中的降低的水平。

[0087] 运动神经元存活蛋白结合蛋白(SIP1;Gemin 2)造成脊髓性肌萎缩,也与运动神经元退行性变有关。运动神经元存活蛋白(SMA)和SIP1两者的生化功能是在mRNA前体的剪接中提供帮助。本发明鉴定与正常对照相比,在患PTSD的患者中,SIP1蛋白在全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、脑组织(海马和同侧皮质)中的降低的水平。

[0088] 起始识别复合物,亚基5-类似物(ORC5L)蛋白功能是与5个其它蛋白形成启动DNA复制的复合物。该蛋白具有许多其它功能,包括在基因沉默和异染色质形成中的作用。这种蛋白在大脑中具有特定功能的原因与它的基因的位置有关,其与染色体7q22上的络丝蛋白(reelin,RELN)紧靠并列。在RELN中的突变对于自闭症具有遗传危险因素。然而,这些研究表明,用于RELN的单核苷酸多态性(SNP),一侧由ORC5L为侧翼和另一侧由第三基因为侧翼,遗传作为与自闭症风险连锁不平衡的单体型。此外,在ORC5L基因中的SNPs本身也与自闭症风险连锁不平衡。络丝蛋白SNPs与自闭症风险之间的关系已经进行了验证。与自闭症对UBE3A的连接一起,ORC5L和UBE3A两者的平行缺失是PTSD的优秀单个和组合指标。本发明鉴定与正常对照相比,在患PTSD的患者中,ORC5L蛋白在全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、脑组织(海马和同侧皮质)中的降低的水平。

[0089] 当神经元长距离迁移到达它们最终分化的部位时,双皮质;无脑回畸形,X-连锁(双皮质素)(DCX)DCX负责在发育皮质中导向神经元。在这个基因中的突变是X-连锁的无脑回畸形的原因。无脑回畸形,由DCX中的突变造成,是严重的人神经元迁移缺陷,其特点是光

滑的脑表面、智力低下和难治性癫痫。与PTSD的睡眠有关的症状相关的可能是在成年大鼠的生物钟功能所在的视交叉上核中DCX的高水平的发现。创伤性脑损伤后,DCX的上调也显示与大鼠和孩子中更好的结果很好地关联。因此,DCX是这些蛋白的又一个,像SIP1/Gemin 2,对于其中的低水平表达,不利于中枢神经系统的功能。本发明鉴定与正常对照或患者中历史水平相比,在患PTSD的患者中,DCX蛋白在全血、血浆、血清、脑脊液、尿液、唾液、脑组织如海马和同侧皮层中的降低的水平。

[0090] P-11(膜联蛋白II轻链)是S-100钙结合蛋白家族的一个成员。P2RX7是人嘌呤受体,其功能是作为配体门控离子通道,通过对大分子可渗透的质膜孔的形成触发巨噬细胞的ATP-依赖性裂解。这种受体的ATP诱导活化可以耦合基因表达的变化。迄今为止,既不是P-11也不是P2RX7蛋白已经鉴定为用于PTSD、BP或自杀的新标志物。在本发明之前,在临床基地还没有使用自杀生物标志物。P-11在PTSD中的作用,限于实验室结果,通过P-11基因的启动子区域中的糖皮质激素结合位点,应激或应激激素、糖皮质激素的表达在应激动物大脑中上调。同时,应激诱导的P-11 mRNA的表达通过糖皮质激素受体拮抗剂RU486减弱,证明了应激诱导的P-11过度表达由糖皮质激素受体介导。在应激中P-11的分子机制的这些发现导致了P-11蛋白在PTSD中的作用的理解以及诊断工具的开发。本发明鉴定生物样品中P-11蛋白或mRNA的水平作为用于创伤后应激障碍(PTSD)的标志物和患PTSD和MDD的对象中自杀的诊断。P2RX7蛋白或mRNA可选地使用用于确定躁郁症(bipolar disorder, BP)和否则客观地精确患者的精神状态。发明方法使用特异性地和独立地结合于蛋白、mRNA或其互补序列的试剂测量P-11和可选地P2RX7的水平。

[0091] 检测方法可选地使用蛋白印迹分析或酶联免疫吸附测定(ELISA)进行。优选地,当使用ELISA时,使用夹心ELISA。P-11蛋白水平与正常或非精神病患者以及患PTSD和BP的非企图自杀者中蛋白或mRNA水平或同一患者的历史水平进行比较。本发明还可以使用用于检测除PTSD或BP外的精神或焦虑疾病,例如MDD和SCZ。P-11标志物与其它标志物,如P2RX7一起的水平使用用于区分这些不同的精神疾病。

[0092] mRNA可选地使用作为和蛋白一起的组合标志物。在本具体实施例中,实时聚合酶链式反应(PCR)测量来自患有精神疾病的企图自杀者的外周血单核细胞(PBMCs)中标志物P-11和P2RX7的mRNA水平,并与来自正常或非精神病患者以及非企图自杀者的样品中mRNA的水平相比较。

[0093] 试剂盒

[0094] 诊断精神疾病的方法也可以包括作为用于使用在ELISA或Western印迹、台式平台、即时护理装置、或手持装置中用于诊断PTSD、自杀或其它精神疾病的试剂盒的一部分。PTSD标志物也可以使用用于筛选用于治疗PTSD的药物治疗靶标以及监测患者的进程或从PTSD的恢复。

[0095] 在某些具体实施例中,诊断方法和试剂盒包括结合至鉴定为对PTSD或自杀群特异的蛋白的一种或多种抗体。诊断方法和试剂盒还包括结合至鉴定为对PTSD群特异的蛋白的2个或更多、3个或更多、4个或更多、5个或更多、6个或更多、7个或更多、8个或更多、9个或更多、或10个或更多的试剂或抗体,以诊断患者中的PTSD。

[0096] 应当理解,虽然在以下例子中以血液和脑脊液举例说明,但是用于PTSD的发明标志物可以使用鉴定的相同的程序来同样地检测,唯一的区别是生物样品如何抽样,因为,如

本领域技术人员应该很容易知道的,不同的生物样品具有不同采集方法。

[0097] 发明试剂盒还提供用于辅助精神疾病的诊断,其中该试剂盒可以使用用于检测本发明的任何数目的诊断蛋白。例如,该试剂盒可以使用用于检测诊断蛋白标志物是否存在于患者和正常对象的样品中。发明试剂盒使用用于通过使用体外或体内动物模型从而鉴定调节一个或多个标志物的表达的化合物以确定治疗的效果。发明试剂盒包括(a)一组或一批标志物;(b) 蛋白基质;以及(c) 检测试剂。这样的试剂盒是由上述材料制备的,并且关于材料(如,抗体、检测试剂、固定化支持物等)的前面的讨论是完全适用于本节的,将不再重复。可选地,试剂盒包括预分馏离心柱。在一些具体实施例中,试剂盒可选地进一步包括用于将试剂与生物样品或其它操作参数进行反应以提供状态的诊断的说明书。说明书,是标签或独立插页的形式。

[0098] 发明诊断试剂盒使用用于筛选本发明的多肽的含血清抗原。诊断试剂盒包括与多肽或多核苷酸抗原特异性免疫反应的分离的抗体,和鉴定多核苷酸或多肽抗原与抗体结合的检测化学物。可以理解,“分离的”包括不妨碍靶向结合的大量杂质或观众物种。可以理解,抗体附着于固相支持物。可以理解,抗体可选地是单克隆抗体。试剂盒的检测化学物可选地是第二标记的单克隆抗体。可选地,或另外地,检测化学物可选地包括标记的竞争抗原。

[0099] 在一种诊断配置中,测试血清与具有通过本发明的方法获得的表面结合抗原的固相试剂反应。特异性抗原抗体结合试剂并通过洗涤去除未结合的血清成分后,试剂与化合物与报告分子-标记的抗人抗体反应以将报告分子与固相支持物上结合的抗-抗原抗体的量成比例结合至试剂。再次清洗试剂,以去除未结合的标记抗体,确定与试剂连接的报告分子的数量。通常,报告分子是酶,在合适的荧光、发光或比色底物(Sigma, St. Louis, Mo.)存在下通过温育固相进行检测。

[0100] 在上述测定中的固体表面试剂是由已知技术将蛋白材料连接至固体支持物材料,如聚合物微球、浸棒、96孔板或过滤材料进行制备的。这些连接方法通常包括蛋白至支持物的非特异性吸附,或通常通过自由胺基团共价连接蛋白至固体支持物上的化学反应基团,例如活化的羧基、羟基、或醛基。可选地,链亲和素包被的板可选地使用在与生物素化抗原的结合中。

[0101] 还提供了一种试剂盒,包括(a)其上具有吸附剂的基质,其中吸附剂适于结合标志物,(b)要检测的本发明的任何标志物,以及(c)通过将样品与吸附剂接触并检测吸附剂保留的一个标志物或多个标志物而检测一个标志物或多个标志物的说明书。在某些具体实施例中,试剂盒包括洗脱剂(作为替代或与说明书组合),或用于制备洗脱剂的说明书,其中吸附剂和洗脱剂的组合允许用气相离子光谱法检测标志物。这样的试剂盒是由上述材料制备的,并且这些材料(例如,探针底物、吸附剂、洗涤溶液等)的前面的讨论是完全适用于本节并不再重复。

[0102] 还提供了一种试剂盒,包括其上具有吸附剂的第一基质,如用吸附剂功能化的颗粒,和第二基质,第一基质置于其上以形成可移动和可插入气相离子光谱仪的探针。试剂盒可选地包括单一基质,其是可移动和可插入探针形式,基质上具有吸附剂。试剂盒还可选地包含预分馏离心柱(例如,辛巴蓝琼脂糖柱(Cibacron blue agarose column)、抗HSA琼脂糖柱(anti-HSA agarose column)、体积排阻柱(size exclusion column)、Q-阴离子交换

离心柱 (Q-anion exchange spin column)、单链DNA柱(single stranded DNA column)、外源凝集素柱(lectin column)等)。

[0103] 可选地,试剂盒还可选地包括用于合适的操作参数的以标签或单独插页的形式的说明书。例如,试剂盒可以具有标准说明书,在样品接触探针后通知消费者如何洗涤探针。在另一具体实施例中,试剂盒可以具有用于预分馏样品以减少样品中蛋白的复杂性的说明书。在另一具体实施例中,试剂盒可以具有用于自动化分馏或其它方法的说明书。

[0104] 例子

[0105] 现在将对本发明的示例性的具体实施例进行详细参考。对这些具体实施例进行足够详细地描述以使本领域的技术人员能够实施本发明,可以理解,可以使用其它具体实施例,并且可以进行改变而不脱离本发明的范围。因此,下面的描述仅仅是示例性的。

[0106] 例1

[0107] 患PTSD (n=13)、BP (n=23)、MDD (n=12)、SCZ (n=12) 和对照 (n=14) 的对象由两位精神病医生使用来自精神疾病的诊断和统计手册第四版DSM-IV (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth edition DSM-IV) 的标准进行诊断。从每个患者获得CSF、全血、血浆、血清、唾液和尿液的生物样品。

[0108] 患者

[0109] 选择了14个患有慢性平民PTSD的不用药物治疗的门诊患者 ( $34.9 \pm 10.4$  岁,10名妇女) 和10个非创伤健康对象 ( $35.3 \pm 13.1$  岁,7名妇女)。选择健康对象以在年龄、性别和BMI方面尽可能接近地匹配PTSD患者。前驱PTSD创伤在5个对象中是青春期前的,在9个对象中是成年的。从受到创伤经过的时间在青春期前的创伤中是  $2 \pm 4$  年,在成年受创中是  $10.1 \pm 8.8$  年。患者在其它方面是身体健康的,在腰椎穿刺之前至少三周不使用精神药物,之前至少六个月不符合用于酒精或物质滥用或依赖的标准。但是,对于使用帕罗西汀的患者,用于PTSD 患者所需的不用药物治疗的时间延长至六周。另外,包括4个具有创伤历史但没有后续PTSD 历史的患者(三女一男)。对PTSD患者和健康对照的完整的统计信息总结在图17中。

[0110]

[0111]

[0112] 精神疾病诊断

[0113] 精神疾病诊断通过使用用于DSM-IV) 的结构化临床访谈 (Structured Clinical Interview for DSM-IV, SCID) 而确定,PTSD的严重程度通过使用临床医生专用PTSD量表 (Clinician-Administered PTSD Scale, CAPS) 而确定。抑郁、焦虑和整体症状的严重程度通过分别使用抑郁症状清单 (Inventory of Depressive Symptomatology, IDS)、汉密尔顿焦虑量表 (Hamilton Anxiety Rating Scale, HAMA) 和临床总体印象量表 (Clinical Global Impression -Severity scale, CGI-S) 进行评估。患有PTSD的个体和对照在年龄、性别分布、种族、或身体质量指数 (BMI) 方面没有不同。PTSD的严重程度为中度,CAPS分数为  $73.1 \pm 10.3$ 。抑郁 (IDS  $16.4 \pm 8.2$ ), 焦虑 (HAMA  $13.1 \pm 6.8$ ) 和整体症状严重水平 (CGI-S  $4 \pm 1.2$ ) 也为中度。

[0114] 生物样品采集

[0115] 脑脊液、血液、尿液和唾液的生物样品使用常规采集技术进行采集。对于脑脊液,

腰椎穿刺 (Lumbar Puncture, LP) 在8:00和9:00之间由有经验的医师进行。插入20号引导针,抽取约15毫升脑脊液,分装冷冻于-80℃用于后续的测定。对于血液,样品通过静脉穿刺在 Vacutainer采血管中抽取采集(各10毫升),稍微离心,分离成血清和血浆。所有全血、血浆、血清在-80℃分装存储用于后续的测定。对于尿液和唾液,采集样品,避免污染物进入样品是优选的。使用8至15毫升的尿液分析管用于在-80℃冰箱中存储样品用于以后使用。

#### [0116] 在生物样品中的蛋白

[0117] 生物样品中的蛋白用Cy3荧光染料进行标记,标准样品用Cy5标记,以在所有实验中提供通用标准。混合物与507-复制特征的抗体微阵列 (507-duplicate feature antibody microarray) 一起温育,以及在Perkin-Elmer ScanArray2荧光滑动读取器 (Perkin-Elmer ScanArray2 fluorescence slide reader) 上成像。生物样品还在反向捕获蛋白微阵列平台 (Reverse Capture Protein Microarray platform) 上进行分析。显著性基于t-测验 ( $P < 0.05$ ) 和  $< 10\%$  的局部假阳性率 (local False Discovery Rate)。

#### [0118] 结果

[0119] 基于所有PTSD患者的分析,不论性别,鉴定与对照相比上调或下调的那些蛋白是可能的。表2列出了排名前10位的候选标志物蛋白,其落入t-测验的统计范畴  $> 10^{-4}$ ,假阳性率  $< 10\%$ 。重要地,从而这些蛋白质同时满足对用于矩阵数据的P值的邦费罗尼校正 (Bonferroni correction) ( $0.05/507 = 10^{-4}$ ) 和SAM算法,如上所述。需要指出,还发现UBE3A、STY1、EMAP-II、SIP1、ORC5L、DCX、SCYE标志物是用于PTSD的非性别特异性标志物。

#### [0120] 表2:对所有PTSD患者特异性的蛋白

[0121]

| SwissProt | ID                                      | t测验     | 对数比   | FDR  |
|-----------|-----------------------------------------|---------|-------|------|
| P21579    | 突触结合蛋白1                                 | 5.9E-09 | -0.17 | 0.0% |
| Q05086    | 泛素蛋白连接酶E3A(人类乳头瘤病毒E6相关蛋白,安琪儿综合征)        | 1.7E-07 | 0.48  | 0.0% |
| P28340    | 聚合酶(以DNA为模板的), $\Delta 1$ , 催化亚基125 kDa | 2.1E-06 | -0.13 | 0.3% |
| Q12904    | 微小诱导细胞因子亚家族E, 成员1(内皮单核细胞激活的)            | 2.2E-06 | -0.15 | 0.0% |
| P15531    | 非转移细胞1蛋白, 表达的蛋白(NM23A)                  | 2.4E-05 | 0.26  | 2.8% |
| Q16512    | 蛋白激酶C-类似物1                              | 2.8E-05 | 0.13  | 1.1% |
| Q13632    | 核蛋白, 共济失调-毛细血管扩张症位点                     | 4.0E-05 | 0.19  | 1.5% |
| P46013    | 单克隆抗体KI-67鉴定的抗原                         | 6.2E-05 | -0.20 | 0.2% |
| Q9NQ66    | 磷脂酶C, $\beta 1$ (磷酸肌醇特异性的)              | 6.5E-05 | 0.35  | 1.2% |
| Q9H252    | 电压门控钾通道, 亚家族H(eag相关的), 成员 6             | 1.3E-04 | -0.17 | 0.0% |

[0122] 采用分层聚类算法(hierarchical cluster algorithm),分离仅鉴定男性PTSD患者的e蛋白。作为用于PTSD的候选标志物的一组男性特异性蛋白的前20个列在表3中。这个

列表包括列在表2中所有蛋白,以及仅在来自男性PTSD患者的CSF中唯一升高的其它蛋白。来自表2 的前10的一些蛋白不存在,因为它们在列表中比这20个蛋白低。然而,感兴趣的是几种蛋白已经被其它蛋白挤到较低的位置,包括4个炎性特征的蛋白。这些蛋白包括FADD (#2); MAPKK4 (#5); PKC $\alpha$  (#7); 和TNF6 (#12)。除了FADD,其它三个都升高了,如在对数比这列中用+值标记。与此相反,女性PTSD患者缺乏这些蛋白,但具有其它非发炎特征的蛋白。前9个女性PTSD特异性蛋白显示在表4中。这些标志物包括神经源素1、SMADs、SIP、MYV、TGF $\beta$ 1。

[0123] 表3:对PTSD特异性的蛋白-男性类

[0124]

| SwissProt | ID                          | t测验     | 对数比   | FDR  |
|-----------|-----------------------------|---------|-------|------|
| P51966    | 泛素结合酶 E2L3                  | 1.1E-11 | 0.19  | 0.1% |
| Q13158    | FAS相关死亡结构域蛋白                | 7.4E-09 | -0.19 | 0.0% |
| Q9Y478    | 蛋白激酶、AMP激活的、 $\beta$ 1非催化亚基 | 2.6E-08 | 0.18  | 0.0% |
| O43240    | 激肽释放酶10                     | 5.0E-08 | 0.22  | 0.1% |

[0125]

|        |                                                   |         |       |      |
|--------|---------------------------------------------------|---------|-------|------|
| P45985 | 丝裂原活化蛋白激酶4                                        | 2.5E-06 | 0.24  | 0.0% |
| P49848 | TAF6 RNA聚合酶II， TATA框结合蛋白 (TBP)-<br>相关因子, 80 kDa   | 2.8E-06 | 0.19  | 0.0% |
| P17252 | 蛋白激酶C, $\alpha$                                   | 2.9E-06 | 0.20  | 0.0% |
| O00273 | DNA断裂因子, 45kDa, $\alpha$ 多肽                       | 1.0E-05 | 0.23  | 0.0% |
| O14879 | 三角形四肽重复干扰素诱导蛋白4                                   | 1.2E-05 | 0.21  | 0.0% |
| O43815 | 纹蛋白, 钙调素结合蛋白                                      | 1.8E-05 | 0.18  | 0.0% |
| P42336 | 磷酸肌醇-3-激酶, 催化的, $\alpha$ 多肽                       | 4.2E-05 | 0.26  | 0.0% |
| P25445 | 肿瘤坏死因子受体, 超家族, 成员 6                               | 1.1E-04 | 0.23  | 0.0% |
| P49321 | 核自身抗原精子蛋白 (组蛋白结合的)                                | 1.8E-04 | 0.20  | 0.0% |
| P06749 | ras同源基因家族, 成员A                                    | 2.0E-04 | -0.22 | 0.0% |
| P51955 | NIMA (never in mitosis gene a) 相关激酶2              | 2.5E-04 | 0.25  | 0.0% |
| P51531 | SWI / SNF相关的, 基质相关的, 染色质肌动蛋白依<br>赖性调节子, 亚家族a, 成员2 | 2.7E-04 | 0.53  | 0.0% |
| P27540 | 芳香烃受体核转位蛋白                                        | 3.0E-04 | -0.22 | 0.0% |
| Q61548 | 突触相关膜蛋白, 91 kDa同源物 (小鼠)                           | 9.0E-04 | 0.56  | 0.0% |
| Q9NY44 | G1向S期转换蛋白2                                        | 2.2E-03 | -0.19 | 0.0% |
| P17301 | 整合素, $\alpha$ -2 (CD49B, VLA-2受体的 $\alpha$ 2亚基)   | 2.2E-03 | -0.28 | 0.0% |

[0126] 表4: 对PTSD特异性的蛋白-女性类

[0127]

| SwissProt | ID                    | t测验     | 对数比   | FDR  |
|-----------|-----------------------|---------|-------|------|
| O14893    | 运动神经元存活蛋白结合蛋白1        | 8.2E-06 | -0.36 | 0.0% |
| Q99960    | 桥粒斑菲素蛋白2              | 8.9E-06 | -0.40 | 0.0% |
| Q96A65    | 分泌蛋白SEC8              | 4.5E-05 | -0.15 | 0.7% |
| Q12929    | 表皮生长因子受体通路底物8         | 9.0E-05 | 0.15  | 0.0% |
| P52824    | 二酰基甘油激酶, 0110kDa      | 6.1E-04 | 0.20  | 0.6% |
| O60588    | 中心体相关蛋白2              | 6.9E-04 | -0.29 | 0.4% |
| P13894    | 通用转录因子IIF, 多肽2, 30kDa | 1.5E-03 | -0.51 | 0.0% |
| Q92886    | 神经源素3                 | 1.9E-02 | -0.08 | 0.0% |

[0128]

|        |                                               |         |       |      |
|--------|-----------------------------------------------|---------|-------|------|
| P09874 | ADP-核糖转移酶 (NAD <sup>+</sup> , 聚 (ADP-核糖) 聚合酶) | 2.1E-02 | -0.19 | 4.0% |
|--------|-----------------------------------------------|---------|-------|------|

[0129] 受试者操作条件 (Receiver-Operating Condition, ROC) 分析是基于区分假阳性和假阴性分析值而验证生物测定的传统“金标准”方法。测定的质量基于曲线下面积 (the area under the curve, AUC), 其中100%的值是显著的, 而50%地值表示随机分布。用于性别无关PTSD 的前3个候选蛋白标志物是 (i) 图1: 泛素蛋白连接酶E3A, 对于男性和女性患者, AUC均为100%; (ii) 图2: 突触结合蛋白1, 对于男性, AUC为95%, 对于女性, AUC为88.8%; 及 (iii) 图3: 微小诱导细胞因子亚家族E, 对于男性, AUC为98.1%, 对于女性, AUC为97.9%。图4表示用于在对照和PTSD患者之间限定的发明标志物的复合ROC曲线, 对于样品统计数据, AUC是88%。

[0130] 发现几种蛋白质显著区别PTSD患者和健康对照, 与性别无关。在发现的排名靠前的蛋白中发现 (i) 突触结合蛋白 (SwissProt P21579) [ $p=6\text{EXP}(-9)$ ], 一种与钙依赖性神经递质胞吐作用相关的蛋白。与健康对照相比, 在PTSD患者的生物样品中STY1减少约33% ( $P=6\times 10^{-9}$ ); (ii) 泛素E3连接酶 (SwissProt Q05086) [ $p=2\text{EXP}(-7)$ ], 一种其中突变与智力迟钝形式有关的蛋白。与健康对照相比, 在PTSD患者的生物样品中UBE3A升高约3 倍 ( $P=2\times 10^{-7}$ ); (iii) 微小诱导细胞因子亚家族E, 成员1 (SCYE1/EMAPII; SwissProt Q12904) [ $p=2\text{EXP}(-6)$ ], 一种用于小神经胶质细胞的趋化蛋白, 发现在脊髓损伤中升高。与健康对照相比, 在PTSD患者的生物样品中SCYE1减少约55% ( $P=\text{约}5\times 10^{-13}$ ); (iv) 与健康对照相比, 在PTSD患者的生物样品中ORC5L减少约30%, 并且还具有不同于健康对照的最高显著性 ( $P=5\times 10^{-14}$ ); (v) 与健康对照相比, 在PTSD患者的生物样品中SIP1减少约52% ( $P=\text{约}2\times 10^{-11}$ ); 以及 (vi) 与健康对照相比, 在PTSD患者的生物样品中双皮质 (Doublecortex, DCX) 减少约50% ( $P=\text{约}9\times 10^{-6}$ )。

[0131] 此外, 我们已经鉴定了显著区别男性和女性PTSD患者的不同的蛋白组。来自男性PTSD 患者的生物样品的显著特点是具有与促炎信号通路相关的许多蛋白。重要地, 这些蛋白不区别男性和女性健康对照。

[0132] 这些结果通过实时RT-PCR进行的mRNA的定量进行证实。约1.5微克总mRNA从对象的血液样品中分离并在20微升反应体积中使用Omniscrypt逆转录试剂盒和随机引物进行反转录。将产物稀释至150微升体积, 6微升等分试样使用用作采用常规的PCR试剂盒组分和基因特异性引物扩增的模板。mRNA检测与用于确定PTSD的相应蛋白的检测关联。

[0133] 例2

[0134] 血液样品从26个患创伤后应激障碍 (PTSD) 和重度抑郁症 (MDD) 的精神病患者获得, 包括11个企图自杀的患者, 15个没有表现出自杀行为的患者和14个没有患PTSD的正常对照。对象没有服用抗精神病的药物。然后用定量实时PCR分析样品中在外周血单核细胞 (PBMCs) 中P-11的mRNA和P2RX7的mRNA。来自进行自杀的患者 ( $n=56$ ) 和非自杀对照 ( $n=61$ ) 的死后前额皮质 (prefrontal cortex, PFC) 的P-11, P2RX7和S100B的微阵列数据的荟萃分析也进行了试验。

[0135] 与正常对照相比, PBMC P-11 mRNA水平在企图自杀者中显著降低, 在非企图自杀

者中显著升高。PFC P-11 mRNA水平在自杀死亡者中也比非自杀对照低。当在PBMCs和PFC中均测量时,不像P-11,P2RX7 mRNA水平在包括企图自杀者、非企图自杀者和自杀死亡者的所有患者中比正常对照显著降低。另外,当在PFC中测量时,在PFC中S100B表达水平在自杀死亡者和非自杀对照之间没有不同。发现这里详述的在mRNA水平中的这些趋势与从对象采集的其它样品关联;其它样品包括脑脊髓液(cerebral spinal fluid,CSF)、血浆、血清、尿液和唾液。通过对用于测试mRNA水平的样品的等分试样采用ELISA法测量蛋白水平,也证实P-11蛋白和P2RX7蛋白水平具有如用于mRNA的上述详细描述的趋势。

[0136] 表5:PTSD与健康对照之间的统计数据和对照水平

|          | PTSD (N=13)     | 健康对照(N=14)     | F    | P  |
|----------|-----------------|----------------|------|----|
| 年龄       | 43.15 (SD=12.8) | 42.2 (SD=12.6) |      | NS |
| 性别 (M:F) | 1:12            | 1:10           |      | NS |
| 教育       |                 |                |      |    |
| < 12岁    | 9 (69%)         | 7 (64%)        |      | NS |
| > 12岁    | 4 (31%)         | 4 (36%)        |      |    |
| 婚姻状况     |                 |                |      |    |
| 单身的      | 4 (31%)         | 4 (36%)        |      | NS |
| 结婚的      | 6 (46%)         | 7 (64%)        |      |    |
| 离婚的      | 3 (23%)         |                |      |    |
| 唾液皮质醇    |                 |                |      |    |
| Auc      | 15.6 (SD=7.5)   | 18.7 (SD=8.3)  | 0.94 | NS |

[0138] AD=标准差;AUC=曲线下面积,第1天和第2天AUC的平均值。对照和PTSD的血浆皮质醇水平的平均浓度分别为 $3.86 \pm 2.33 \text{ ng/ml}$ ,和 $2.96 \pm 1.88 \text{ ng/ml}$ ;每个AUC计算4次(上午8点,上午10点,下午4点,下午10点)唾液皮质醇水平。

[0139] 对于mRNA标志物,使用全血样品进行定量实时PCR分析。PBMC mRNA的纯化、cDNA合成和定量实时PCR根据制造商的说明书进行。在P-11 mRNA、GR mRNA和皮质醇的水平上的差异由双因素方差分析(analysis of variance,ANOVA)进行评估。显著差异定义为0.05或更小的P值。2小时静置以使红血细胞溶血后,全血(2.5毫升)转移到含6.9毫升稳定剂的PAXgene管中,并冷冻储存于 $-70^\circ\text{C}$ 。总RNA的量使用Nano Drop分光光度计定量。质量在安捷伦生物分析仪(Agilent BioAnalyzer)上使用RNA 6000 Pico assay进行电泳控制。从所有样品中估计并获得RNA比值(28S/18S)。然后总RNA(2.5 $\mu\text{g}$ ) 在45 $\mu\text{L}$ 最终反应体积中采用随机六聚体(Eurogentec)和SuperScript RT RNase H-逆转录酶(Life Technologies公司)进行反转录。数据显示为平均值 $\pm$ SEM,\* $P < 0.05$ (对照与PTSD)并进行了分析。

[0140] 在PTSD患者和对照中血浆和唾液皮质醇的基础水平,以及在患PTSD的患者和对照的PBMC中P-11和GR mRNA的水平在样品中进行测量。

[0141] 图5显示血浆皮质醇的基础水平在PTSD( $n=13$ )和对照对象( $n=11$ )之间没有显著

差异 ( $P > 0.05$ )。

[0142] 图6显示GR mRNA水平在PTSD的PBMCs中比对照对象显著降低。

[0143] 图7显示与对照 ( $n=14$ ) 相比,在患有PTSD的患者 ( $n=13$ ) 中显著较低的P-11 mRNA水平。 ( $P < 0.05$ )。躁郁症,BP ( $n=24$ )、重度抑郁症,MDD ( $n=24$ )、精神分裂症,SCZ ( $n=12$ ) 的PBMC P-11 mRNA水平显著高于对照对象 ( $n=14$ ) ( $P < 0.001$ )。

[0144] 发现这里详述的在mRNA水平中的这些趋势与从对象采集的其它样品关联;其它样品包括脑脊髓液(CSF)、血浆、血清、尿液和唾液。通过对用于测试mRNA水平的样品的等分试样采用ELISA法测量蛋白水平,也证实P-11蛋白和P2RX7蛋白水平具有如用于mRNA的上述详细描述的趋势。

[0145] 例3

[0146] 本发明的对化学和治疗药物干预有效性提供反馈的能力提供在这个例子中,其中生物样品从总共49个对象获得。14个对象确定为患有PTSD,其中9个是自杀性的,其余5个是非自杀性的。21个对象确定为患有BP,其中7个是自杀性的,其余14个是非自杀性的。其余的14个对象是健康对照对象。对于性别没有显著组间差异(见表6)。在年龄、性别比例、教育程度或婚姻状况方面,BP或PTSD患者和对照对象之间无统计学显著差异。表6显示,BP和PTSD患者,有和没有自杀企图,分别具有类似的平均发病年龄。

[0147] 所有PTSD对象用药物治疗,66%的患PTSD的企图自杀者服用利福全(氯硝西泮,一种苯二氮)(rivotril (Clonazepam, a benzodiazepine)),而55%服用德巴金(depakine)。22%服用欣百达(cymbalta)、恋多眠(lendormin)、美得眠(modipanol)、舒眠诺思(semi-nax)或赛乐特(seroxat)。11%服用赛乐特、安立复(abilify)、安克痊(akineton)、安定文(ativan)、怡诺思(effexor)、唑替平(lodopin)、nil、奥氮平(olanzapine)、瑞美隆(remeron)、神宁健(sinequan)、思诺思(stilnox)、特定脑(tryptanol)、威博隼(wellbutrin)或赞安诺(xanax)。

[0148] 60%的患PTSD的非自杀患者服用愈利舒盼(erispan),而40%服用怡诺思或思诺思。20%服用安立复、德巴金、心得安(Inderal)、恋多眠、美舒郁(mesyrel)、nil、利福全或赛乐特。没有BP患者用药物治疗。

[0149] 表6:患BP或PTSD的企图自杀者和非自杀患者和对照对象的统计数据。

[0150]

| 患者组            | 组                 |                   | 差异                   |
|----------------|-------------------|-------------------|----------------------|
|                | 企图自杀者             | 非自杀患者             |                      |
| PTSD (年龄)      | 38.57±4.8 (20-56) | 47.56±3.0 (42-69) | P=0.452,df=3,31,NS   |
| BP (年龄)        | 42.71±4.3 (29-57) | 50.15±3.9 (23-80) |                      |
| PTSD 的性别 (m/f) | 1:8               | 1:4               | P=0.604,(df=8,4)NS   |
| BP 的性别 (m/f)   | 0:7               | 1:13              | P=0.667,(df=6,13),NS |

[0151] NS,不显著

[0152] 测试对象的诊断由两位精神病医生使用简明国际神经精神访谈(Mini International Neuropsychiatric Interview,MINI)和DSM-IV为所有研究对象进行确定。

所有患者均符合用于BP或PTSD的DSM-IV诊断标准。排除标准是当前的医疗问题,严重身体疾病,神经系统疾病,头部创伤伴随意识丧失的历史,物质滥用的历史和目前的酒精滥用(6个月内)。非精神病对照对象和PTSD和BP患者在年龄、性别、教育和种族上匹配为一组。企图自杀者的一生历史通过使用半结构式访谈并结合病历回顾进行评估。

[0153] 为了定量情绪和焦虑症状的临床结果,分别使用汉密尔顿抑郁量表(Hamilton Rating Scale for Depression,HAMD)和汉密尔顿焦虑量表(Hamilton Anxiety Scale,HARS)。

[0154] 肝素化和非肝素化血液样品(各10毫升)通过静脉穿刺在真空采血管中采集。外周血单核细胞(PBMCs)通过葡聚糖泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)(Invitrogen公司)密度梯度离心分离。血液样品储存在-80℃。

[0155] 全血样品在1300xg下在4度离心10分钟。然后将血浆转移到标记的清洁的Eppendorf管中并储存于-80℃。P-11的血浆水平由高度敏感的ELISA测定。使用单克隆抗人-P-11抗体。P-11的浓度从用于在每个测定中在相似条件下绘制的P-11标准曲线的回归线确定。

[0156] 使用PAXgen blood RNA validation Kit(PreAnalytiX a Qiagen/BD company, Valencia,CA)从人血裂解物中提取RNA。使用Superscript III RT(逆转录酶)和寡聚(dT)引物(Invitrogen)从3毫克总RNA生成cDNA。对生成的cDNA产物在IQ5序列检测系统(IQ5 sequence detection system)中使用SYBR Green(Bio-Rad公司)进行实时PCR。下面的序列使用用于人P-11 mRNA分析:正向5'AAATTCGCTGGGATAAAGG-3'(SEQ.ID.NO.1)和反向5'AGCCCACTTTGCCATCTCTA-3'(SEQ.ID.NO.2)引物。用于P2RX7 mRNA分析的序列是正向5'AGATCGTGGAAGAATGGAGTG-3'(SEQ.ID.NO.3)和反向5'-TTCTCGTGGTGTAGTTGTGG-3'(SEQ.ID.NO.4)引物。在对照和实验样品中 $\beta$ -actin mRNA的水平使用作为内部参照,用于标准化P-11或P2RX7 mRNA水平。用于 $\beta$ -actin引物的序列是5'-ACCTGTACGCCAACACAGTG-3'(SEQ.ID.NO.5)和5'-ACACGGAGTACTTGCGCTCA-3'(SEQ.ID.NO.6)(Applied Biosystems)。稀释曲线使用用于确认阈值循环数对模板RNA的浓度的线性依赖性。

[0157] 在对照和实验样品中P-11或P2RX7 mRNA的相对定量使用标准曲线方法获得。

[0158] 所有数据以平均数±标准偏差给出。在患PTSD、BP的企图自杀者和非自杀患者和对照对象之间PBMC P-11或P2RX7表达的差异通过单因素方差分析(one-way ANOVA)进行分析。还进行了相关系数和P值的分析。使用GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc. San Diego, CA)、SPSS(SPSS Inc. Chicago, Illinois)和Microsoft Excel进行统计。

[0159] 对每个样品测量PBMC P-11 mRNA和P2RX7 mRNA的表达水平,并对结果进行比较。

[0160] 图8A证明对照对象、患PTSD的企图自杀者和非自杀患者中PBMC P-11 mRNA表达水平的差异。实时PCR数据表明对于具有BP的PBMC中P-11 mRNA水平在组间的显著差异。患PTSD的企图自杀者比对照对象和非自杀患者具有显著更低水平的PBMCs中的P-11 mRNA。

[0161] 图8B证明对照对象、患BP的企图自杀者和非自杀患者中PBMC P-11表达水平的差异。实时PCR数据表明对于PBMC中P-11 mRNA水平在组间的显著差异。企图自杀者和非自杀患者均比对照对象具有显著更高水平的PBMCs中的P-11 mRNA,而在企图自杀者和非自杀患者之间在P-11 mRNA水平上没有显著差异。

[0162] 在药物治疗组中在有或没有自杀企图的患者中,PBMC P-11 mRNA的表达水平不再

与 PTSD 的症状关联。在具有通过汉密尔顿量表测量抑郁量表 (HAMD) 和汉密尔顿焦虑量表 (HARS) 测量的抑郁和焦虑的 PTSD 患者中进行 P-11 水平的相关分析。在患 PTSD 的企图自杀者 (图 9A-B) 或非自杀患者 (图 9C-D) 中, PBMC P-11 mRNA 的表达与 HAMD 或 HARS 分数不相关。

[0163] 在药物治疗组中在有或没有自杀企图的患者中, PBMC P-11 mRNA 的表达水平不再与 BP 的症状关联。在具有通过 HAMD 和 HARS 测量的抑郁和焦虑的 BP 患者中进行 P-11 水平的相关分析。在患 BP 的企图自杀者 (图 10A-B) 或非自杀患者 (图 10C-D) 中, PBMC P-11 mRNA 的表达与 HAMD 或 HARS 分数不再相关。

[0164] 有无自杀企图的 PTSD 患者和没有企图的 BP 患者的 PBMC P2RX7 mRNA 的表达水平显著低于对照对象的 PBMC P2RX7 mRNA 的表达水平。图 11A 证明在对照对象和有无自杀企图的 PTSD 患者中 PBMC P2RX7 表达水平的差异。实时 PCR 数据表明对于 PBMC 中 P2RX7 mRNA 水平在组间的显著差异。患有 PTSD 的企图自杀者和非自杀患者均比对照具有显著更低水平的 PBMCs 中的 P2RX7 mRNA。

[0165] 图 11B 证明在对照对象、患 BP 的企图自杀者和非自杀患者中 PBMC P2RX7 表达水平的差异。实时 PCR 数据表明, 与对照对象和具有自杀企图的 BP 患者相比, 无自杀企图的 BP 患者具有显著更低水平的 PBMCs 中的 P2RX7 mRNA。

[0166] PBMC P2RX7 mRNA 的表达水平与患有 PTSD 的非自杀患者 (图 12C-D) 而不是企图自杀者 (图 12A-B) 的症状是高度相关的。

[0167] PBMC P2RX7 mRNA 的表达水平与有无自杀企图的 BP 患者的症状不相关。有无自杀企图的 BP 患者的 PBMCs 中 P2RX7 mRNA 水平与 HAMD 或 HARS 分数不显著相关 (图 13)。

[0168] 发现这里详述的在 mRNA 水平中的这些趋势与从对象采集的其它样品关联; 其它样品包括脑脊髓液 (CSF)、血浆、血清、尿液和唾液。通过对用于测试 mRNA 水平的样品的等分试样采用 ELISA 法测量蛋白水平, 也证实 P-11 蛋白和 P2RX7 蛋白水平具有如用于 mRNA 的上述详细描述的趋势。

[0169] 例 4

[0170] 生物样品是从诊断患有 PTSD ( $n=14$ ) 或 MDD ( $n=12$ ) 和 14 例正常对照的 40 名对象获得的。11 名精神病患者曾试图自杀。可用的临床记录, 包括住院和门诊, 进行回顾, 所有对象都经过精心访谈有关精神病史、精神疾病的家族史、物质滥用史。诊断由两位精神病医生使用简明国际神经精神访谈 (Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI)) 和 DSM-IV 对所有研究对象进行确定。所有患者均符合用于 PTSD 或 MDD 的 DSM-IV 诊断标准。排除标准是当前的医疗问题, 严重身体疾病, 神经系统疾病, 头部创伤伴随意识丧失的历史, 物质滥用的历史和目前的酒精滥用 (6 个月内)。正常对照与 PTSD 和 MDD 患者在年龄、性别、教育和种族上匹配为一组。

[0171] 在研究设计已经充分解释之后, 以及在接受精神评估和采血前, 提供所有对象书面知情同意书。企图自杀者的一生历史是通过使用半结构式访谈并结合病历回顾进行评估。用于每个组的临床诊断显示于表 7 中。结果表明, 曾企图自杀 ( $n=11$ ) 和曾没有企图自杀的 ( $n=15$ ) 患者的年龄之间没有统计学上的显著差异。由所有组使用的药物显示于表 8 中。

[0172] 表 7: 企图自杀者、非企图自杀者和对照的统计数据。

[0173]

|                | 企图自杀者<br>(N=11) | 非企图自杀者<br>(N=15) | 对照 (N=14) | P     |
|----------------|-----------------|------------------|-----------|-------|
| 年龄             | 41.27±3.39      | 46.53±3.81       | 42.2±12.9 | NS    |
| 性别比<br>(女性:男性) | 10:1            | 11:4             | 13:1      | NS    |
| 婚姻状况           |                 |                  |           |       |
| 单身的            | 1 (10%)         | 1 (7%)           | 4 (29%)   | <0.05 |
| 结婚的            | 5 (45%)         | 9 (60%)          | 10 (71%)  | NS    |
| 离婚的            | 5 (45%)         | 5 (33%)          | 0 (0%)    | NS    |
| 发作年龄           | 34.64±3.46      | 31.27±3.87       | NA        | NS    |
| 持续时间           | 6.7±1.91        | 10.3±2.65        | N/A       | NS    |
| 诊断             |                 |                  |           |       |
| PTSD           | 9 (82%)         | 5 (33%)          |           |       |
| MDD            | 2 (18%)         | 10 (67%)         |           |       |

[0174] 表8:企图自杀者和非企图自杀者中的药物。

[0175]

|                 | 抗抑郁剂<br>N (%) | 情绪稳定剂<br>N (%) | 抗精神病药<br>N (%) | 抗焦虑药<br>N (%) |
|-----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|
| 企图自杀者<br>(N=11) | 9 (45)        | 7 (70)         | 8 (50)         | 9 (39)        |
| 非企图自杀者          | 11 (55)       | 3 (30)         | 8 (50)         | 14 (61)       |

[0176]

|        |  |  |  |  |
|--------|--|--|--|--|
| (N=15) |  |  |  |  |
|--------|--|--|--|--|

[0177] 使用来自斯坦利医学研究所 (Stanley Medical Research Institute, SMRI) 的3个死后大脑采集标本, 包括神经病理学组 (Neuropathology Consortium)、矩阵组 (Array Collection)、及抑郁组 (Depression Cohort)。对象在年龄、性别、种族、大脑pH (表9)、死后间隔 (post-mortem interval, PMI)、大脑侧和mRNA质量上匹配。使用背外侧前额皮质 (dorsolateral prefrontal cortex, PFC) 用于所有微阵列研究。RNA处理实验方案由微阵列制造商Affymetrix推荐。对于自杀的分析, 对象分成两组, 包括那些进行过自杀的患精神病的对象 (n=56) 和无精神疾病的正常对照 (n=61)。精神疾病和药物治疗效果在个体研究分析中使用多元回归模型进行了调整。

[0178] 表9:非自杀对照和自杀对象的统计数据。

[0179]

|        | 非自杀对照    | 自杀       |
|--------|----------|----------|
| 对象     | 61       | 56       |
| 躁郁症    | 0        | 23       |
| MDD    | 0        | 22       |
| 精神分裂症  | 0        | 11       |
| 平均年龄   | 45       | 41       |
| 性别(男性) | 42 (70%) | 31 (55%) |
| 平均大脑pH | 6.5      | 6.4      |

[0180] 所有的微阵列的原始数据使用MAS5.0归一化算法进行转换。在进行统计分析之前进行一系列质量控制 (quality control, QC) 分析以鉴定微矩阵样品异常值。简单地说, 每个微阵列芯片采用用于芯片级参数例如比例因子、探针完美匹配/不匹配差异计数、存在访问百分数、对照基因 (GAPDH和 $\beta$ -actin) 50/30比例、以及相对于用于整个阵列的那些参数的参考分布的平均相关性的Affymetrix QC衡量标准进行衡量。

[0181] 对于个体研究分析, 通过在每项研究中使用线性模型, 评估每个统计和临床变量以鉴定潜在的混杂因素。这些统计数据分析之后, 对自杀组进行分析, 以鉴定因混杂因素调整的区别基因的列表。多元回归分析为每个研究中的每个基因提供调整后的倍数变化、标准误差 (SE)、以及p值。对于交叉研究分析, 包括Affymetrix微矩阵研究 (研究IDs: 1、2、3、4、5、7、14、15和21)。交叉研究的比较基于研究中个体研究水平的比例图像显示以提取生物模式和关系。基于个体倍数变化和用于定位至所有研究中每个基因的Affymetrix探针组的SEs的加权组合为每个基因计算共有的倍数变化。以探针特异性方式确定权重来解释与定位至所有平台中给定基因的每个探针组相关的不同精度等级。权重等于1个SEs, 其中SE<sub>i</sub>是用于所有研究的基因的第i个探针组的标准误差。

[0182] 为了定量情绪和焦虑症状的临床表现, 分别使用汉密尔顿抑郁量表 (HAMD) 和汉密尔顿焦虑量表 (HARS)。

[0183] 肝素化和非肝素化血液样品 (各10毫升) 通过静脉穿刺在真空采血管中采集。外周血单核细胞通过葡聚糖泛影葡胺 (Ficoll-Hypaque) (Invitrogen公司) 密度梯度离心分离。血液样品储存在-80℃。

[0184] 实时PCR分析的P-11或P2RX7基因表达RNA使用PAXgen blood RNA validation Kit (PreAnalytiX, Qiagen/BD Company, Valencia, CA) 从人血裂解物中提取。使用Superscript III RT (逆转录酶) 和寡聚 (dT) 引物 (Invitrogen) 从3毫克总RNA生成cDNA。生成的cDNA产物在IQ5序列检测系统 (IQ5 sequence detection system) 中使用SYBR Green (Bio-Rad公司) 进行实时PCR。使用例3的序列SEQ ID NOs 1-6用于分析。稀释曲线确认阈值循环数对模板RNA的浓度的线性依赖性。在对照和实验样品中P-11或P2RX7 mRNA的相对定量使用标准曲线方法获得。

[0185] 所有数据以平均S.D或S.E给出。在曾企图自杀的患者、曾没有企图自杀的患者和对照对象之间PBMC P-11或P2RX7表达水平的差异通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行分析。还使用Microsoft Excel进行了相关系数和P值的分析。使用GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) 进行统计。

[0186] 在企图自杀者的PBMCs中和在自杀死亡者的PFC中的P-11 mRNA表达水平的差异,在对照对象、企图自杀者和非企图自杀者的PBMCs中的P-11 mRNA水平显示在图10中。与对照对象相比,P-11 mRNA水平在企图自杀者中显著下降,而在非企图自杀者中P-11 mRNA水平显著高于对照对象或企图自杀者。

[0187] 企图自杀者和非企图自杀中的HAMD和HARS分数和P-11 mRNA水平的相关性进行了研究。药物治疗企图自杀者中的HAMD或HARS和P-11 mRNA水平之间没有显著相关性。然而,在药物治疗企图自杀者和非企图自杀者中的HARS分数之间具有显著差异。最后,在药物治疗企图自杀者和药物治疗非企图自杀者之间的HAMD分数的第3项评分之间具有显著差异。这些结果对相对于没有药物治疗PTSD对象治疗作为整体在改变标志物水平中的功效提供反馈。

[0188] 如图11所示,与对照对象相比,PBMC P2RX7 mRNA水平在企图自杀者和非企图自杀者中均显著下降。9个Affymetrix基因表达微阵列研究的综合分析表明,与非自杀对照相比,P2RX7 mRNA水平在自杀案例的PFC中持续下降(校正的 $P=0.03$ )。

[0189] 在PTSD和MDD的企图自杀者和非企图自杀者的HAMD或HARS分数和P2RX7 mRNA水平之间没有显著相关性。

[0190] 例5

[0191] 选择每只重150-200克的成年雄性SD大鼠。一些大鼠在它们的饲养笼中保持原状作为对照,而同等数量的大鼠暴露于不可逃避的尾巴冲击(应激)。

[0192] 应激实验方案涉及将大鼠实验组放在有机玻璃约束管(23.4厘米长,直径7厘米)中,并将它们暴露于100次不可逃避的电击(2.0毫安),每次5秒,平均试验间隔60秒。冲击通过贴在尾巴上的电极施加。优化冲击的数量和强度,以产生通过行为变化和升高的血浆皮质酮水平测定的不可逃避的应力的模型。使用的动物的数量和它们的痛苦降到最低。总应激时间持续约100分钟。应激或终止后,所有的动物返回它们的饲养笼。

[0193] 通过不可逃避的尾巴冲击后立即或48h后短暂暴露于异氟醚麻醉所有大鼠。斩首后迅速取出它们的大脑。所有的解剖在放置于碎冰上的磨砂玻璃板上进行。大脑样品,如前额皮质、海马、扁桃体和大脑迅速在干冰上冷冻并储存在 $-70^{\circ}\text{C}$ 直至使用时。采集并冷动血液。

[0194] 无应激对照组或应激组的血浆皮质酮使用适当的酶免疫测定试剂盒,如DSL-10-81100 ACTIVE Rat Corticosterone (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA) 进行测定。

[0195] 使用羊抗鼠IgG微孔板(R&D Systems)测定血浆P-11蛋白。为了制备板,首先,将100 $\mu\text{l}$ 的1:1000稀释的鼠抗人S100A10(P-11)单克隆抗体(Abcam, Ab52272)转移到ELISA板的每个孔中。将板用膜密封,在室温下温育过夜。其次,100 $\mu\text{l}$ 的未知蛋白和标准品的稀释液加入到板中,在室温下孵育2小时。第三,100 $\mu\text{l}$ 的兔抗人P-11抗体(1:1000稀释)(Proteintech Group, Cat.#:11250-1-AP)加入板中并在 $4^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第四,将100 $\mu\text{l}$ 链亲和素-HRP(抗兔IgG, R&D Systems, Cat.#:DY998)在室温下温育20分钟。上述步骤之间,将板洗涤三次。第五,在每个孔加入100 $\mu\text{l}$ 底物溶液(R&D Systems, Cat.#:DY999),并在室温下孵育20分钟。第六,加入50 $\mu\text{l}$ 终止液,在30分钟内通过酶标仪测定每个孔的光密度(OD)。

[0196] 使用TRIzol从组织或血细胞裂解液中提取RNA。对每个样品通过使用Superscript

III RT (逆转录酶) 和寡聚 (dT) 引物从5微克总RNA产生cDNA,以排除RNA含量的差异可能也来自样品重量的差异的可能性。对生成的cDNA产物进行实时PCR。下面的序列使用用于人P-11 mRNA分析:SEQ ID NOs.1和2引物。使用用于大鼠的P-11 mRNA分析的序列是:正向5'-TGCTCATGGAAAG GGAGTTC-3' (SEQ ID NO.7) 和反向5'-CCCCGCCACTAGTGATAGAA-3' (SEQ ID NO.8) 引物。在对照和实验样品中,采用例3 的SEQ ID NOs.5和6,使用 $\beta$ -actin mRNA的水平作为内部参照,用于标准化P-11 mRNA 水平。稀释曲线确认阈值循环数对模板RNA的浓度的线性依赖性。在对照和实验样品中P-11 mRNA的测量通过使用标准曲线方法获得。

[0197] 发现这里详述的在mRNA水平中的这些趋势与从对象采集的其它样品关联;其它样品包括全血、脑脊髓液 (CSF)、血浆、血清、尿液和唾液。通过对用于测试mRNA水平的样品的等分试样采用ELISA法测量蛋白水平,也证实P-11蛋白和P2RX7蛋白水平具有如用于 mRNA 的上述详细描述的趋势。

[0198] 用于PTSD和对照组的大鼠数据与例1中人的数据相关,证实本实验方案作为用于人非自杀PTSD的动物模型。

[0199] 应当理解,虽然本发明已结合其详细说明进行了描述,前述描述旨在说明而不是限制本发明的由所附的权利要求的范围所限定的范围。其它方面、优点和改变落在以下权利要求的范围之内。

[0200] 尽管至少一个示例性具体实施例已经在前面的详细描述中给出,但应理解存在大量的变体。还应当理解,单个示例性的具体实施例或多个示例性的具体实施例仅仅是例子,并不旨在以任何方式限制所描述的具体实施例的范围、适用性、或构成。相反,前面的详细描述将提供本领域技术人员实施单个示例性的具体实施例或多个示例性的具体实施例的方便的指南。应当理解,在元件的功能和设置上可以进行各种变化,而不背离如所附的权利要求及其法律等同物设定的范围。

[0201] 在本说明书中提到的专利文献和出版物表明本发明所属领域的技术人员的水平。这些文献和出版物在这里通过参考并入至犹如每单份文献或出版物具体地及单独地在这里通过参考并入的相同的程度。

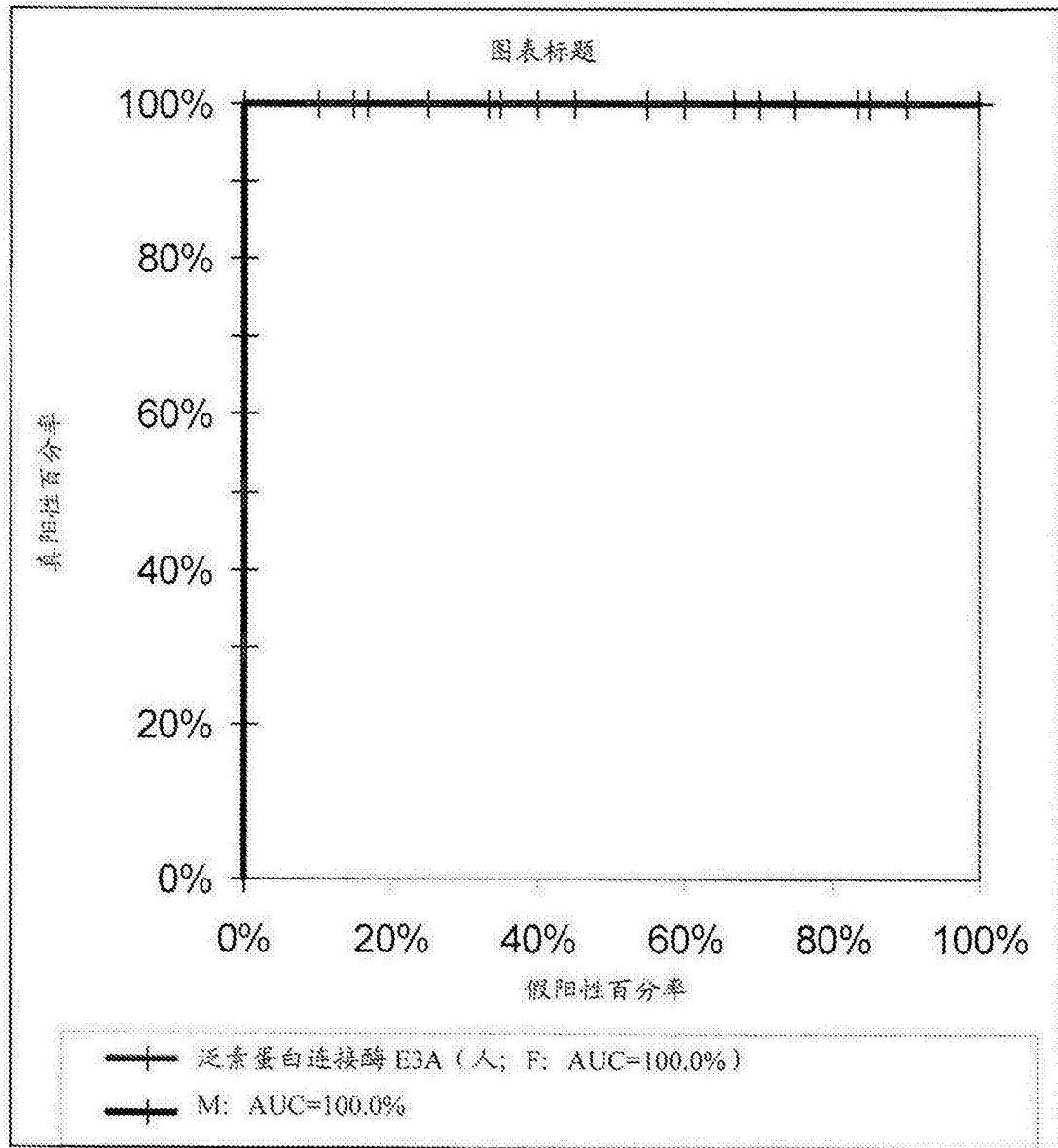


图1

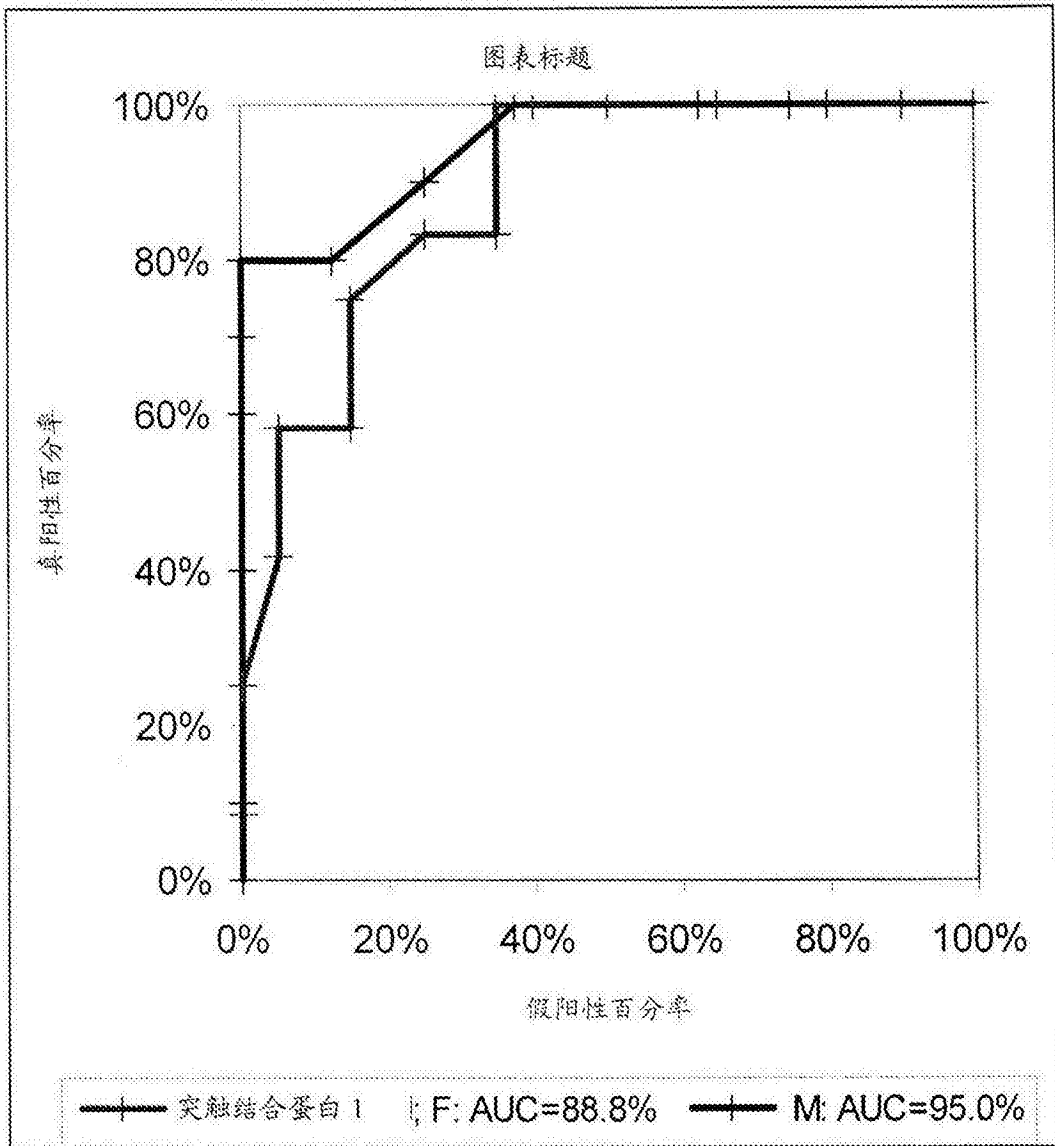


图2

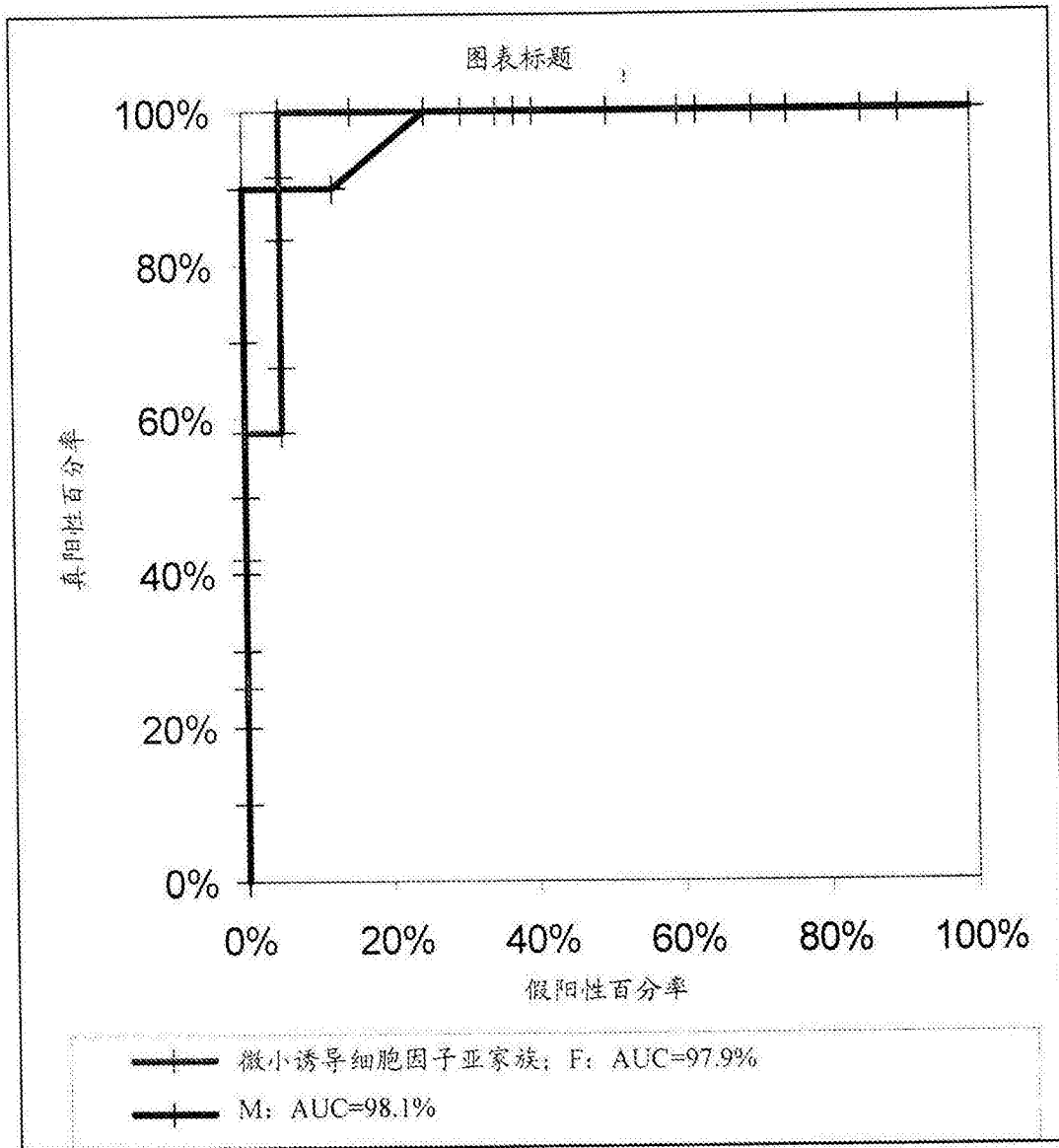


图3

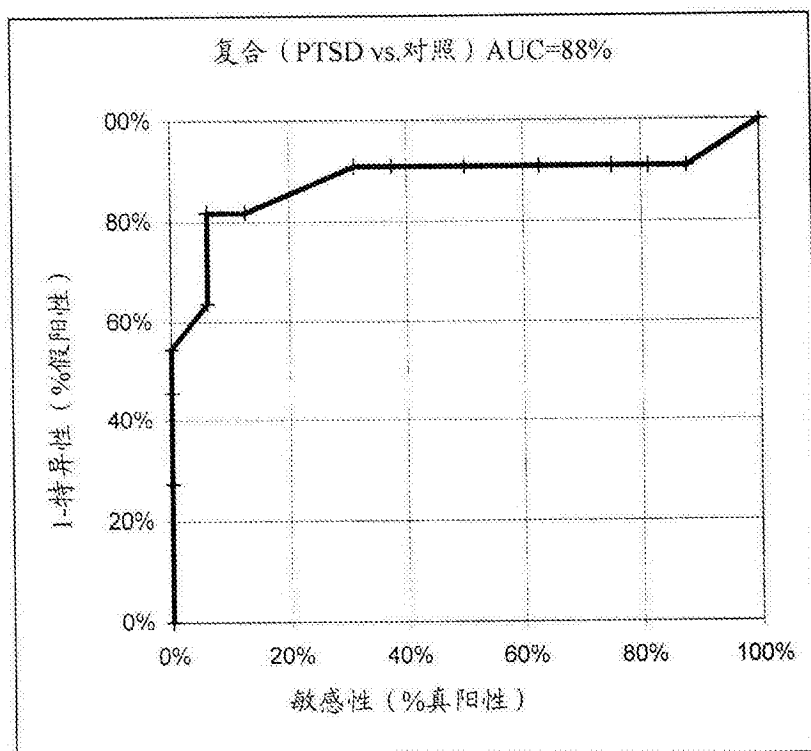


图4

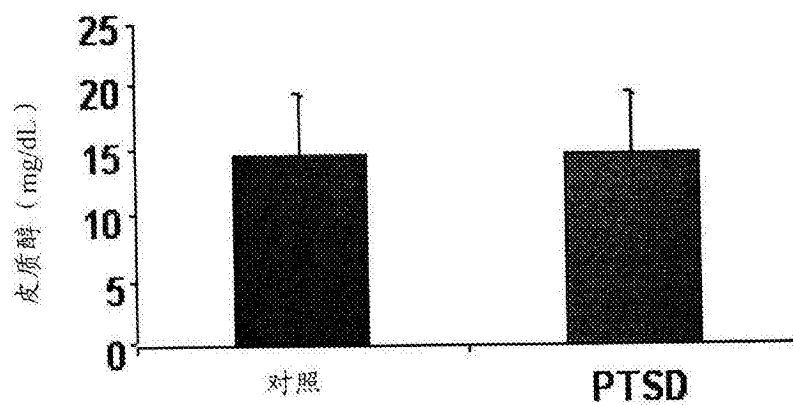


图5

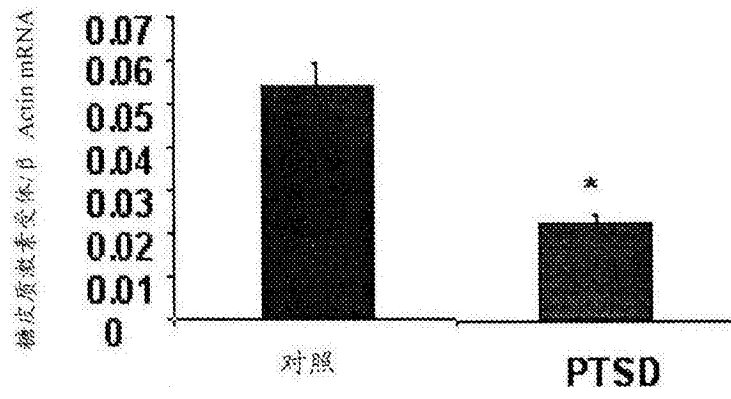


图6

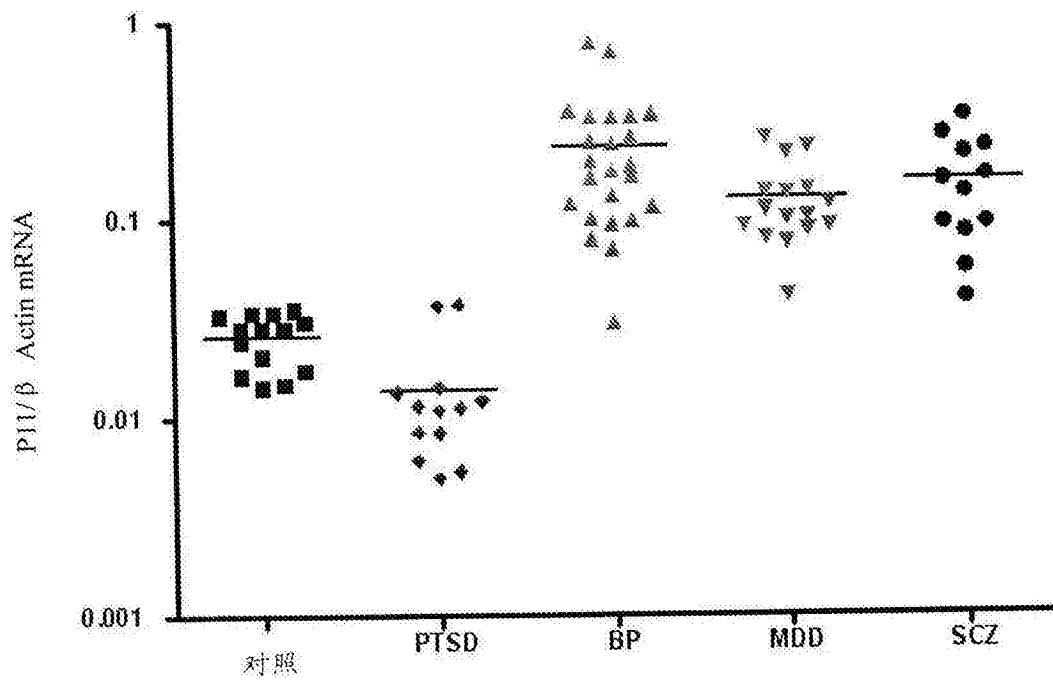


图7

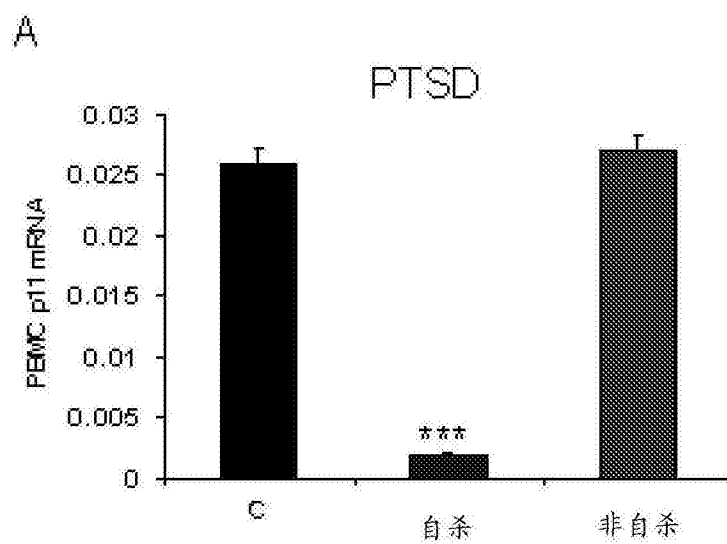


图8A

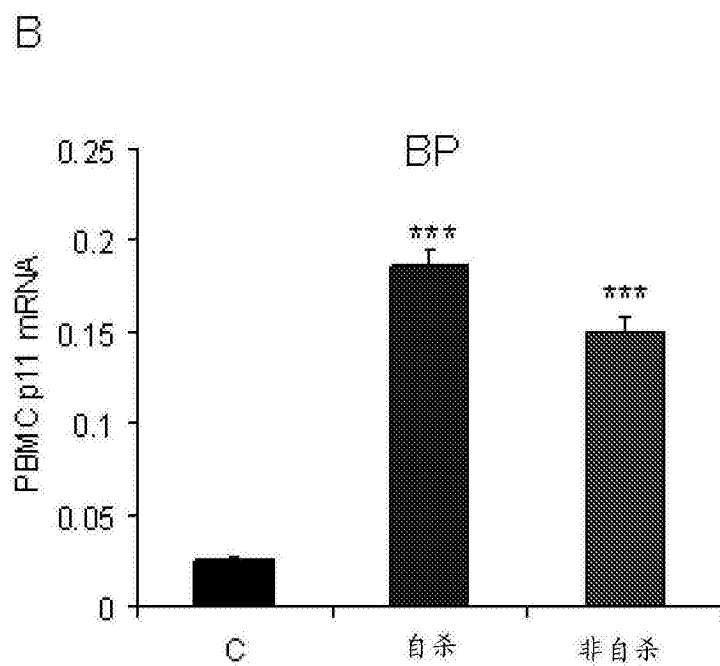


图8B

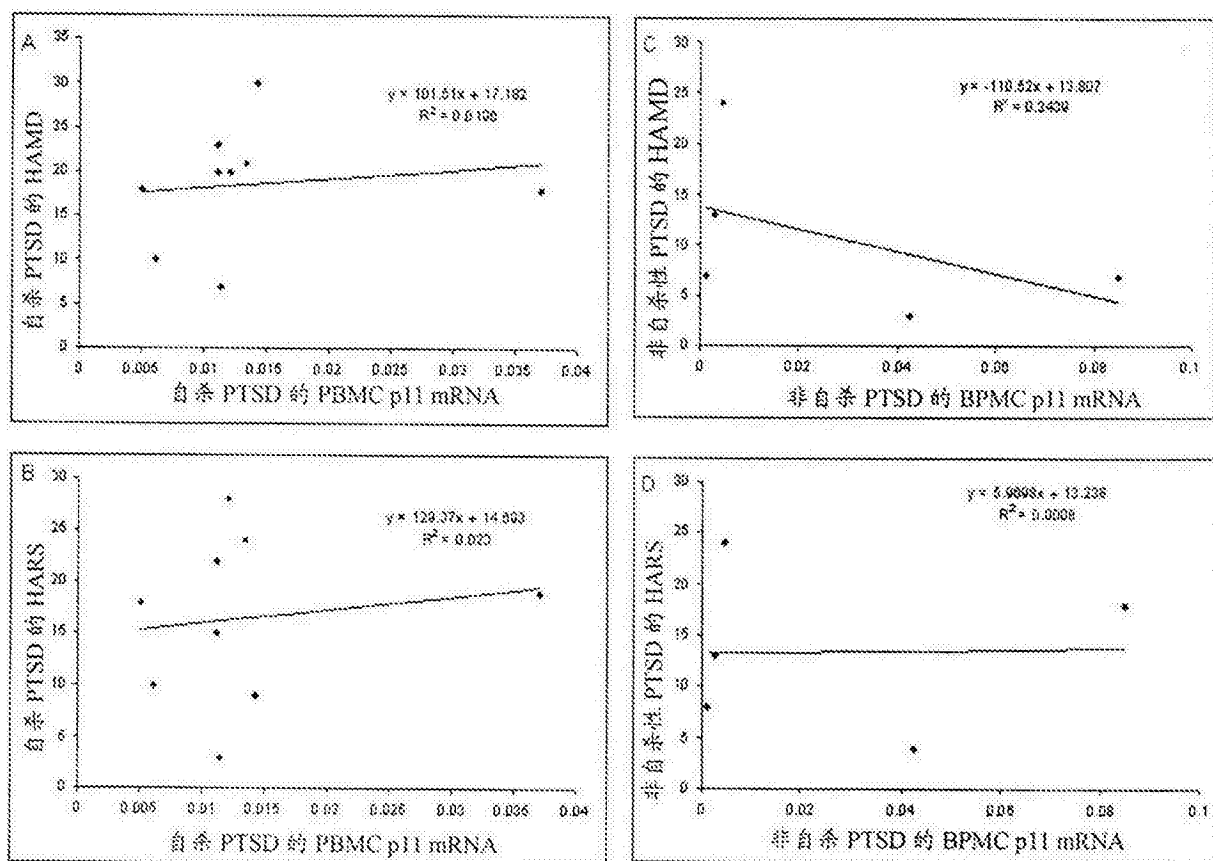


图9

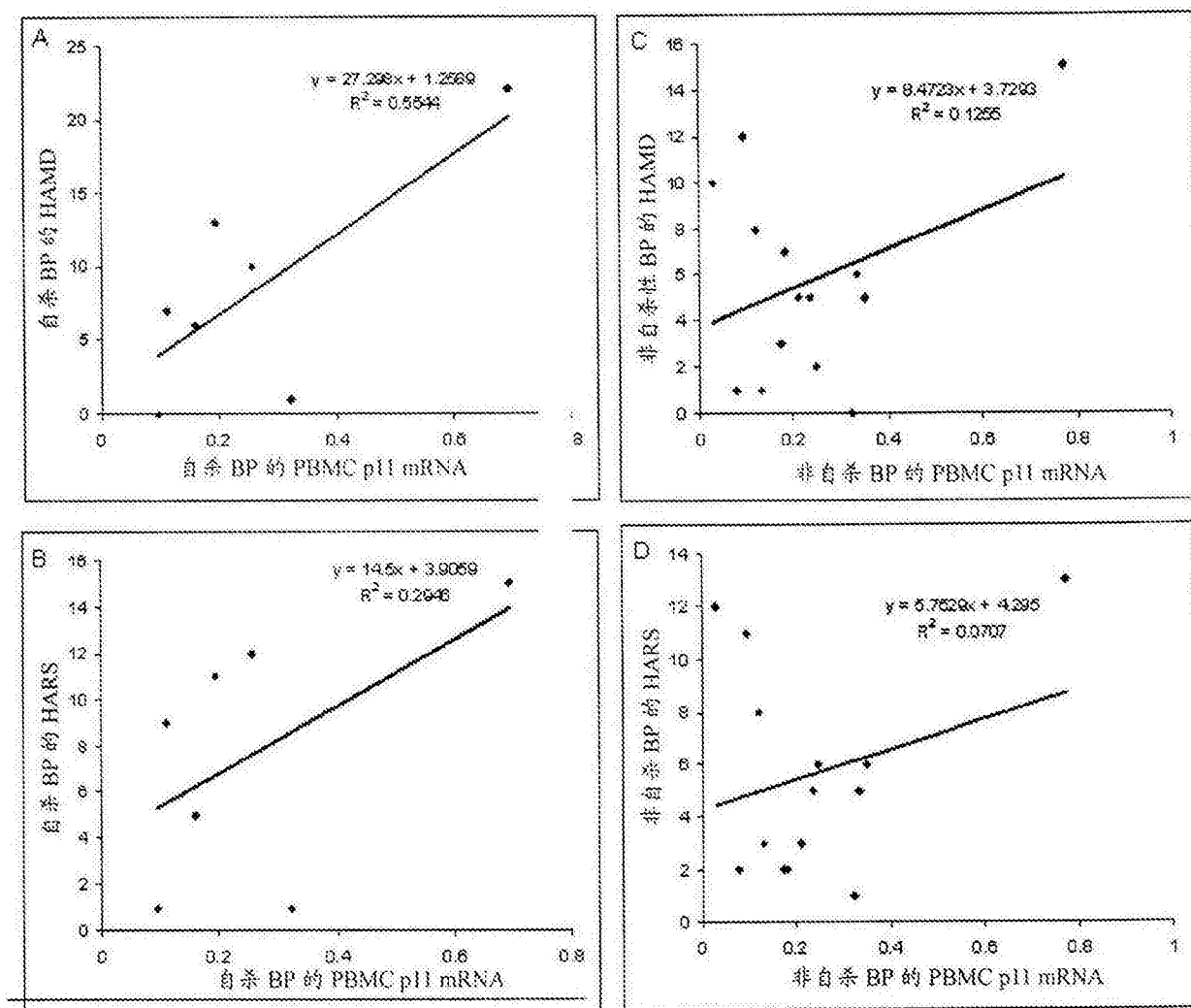


图10

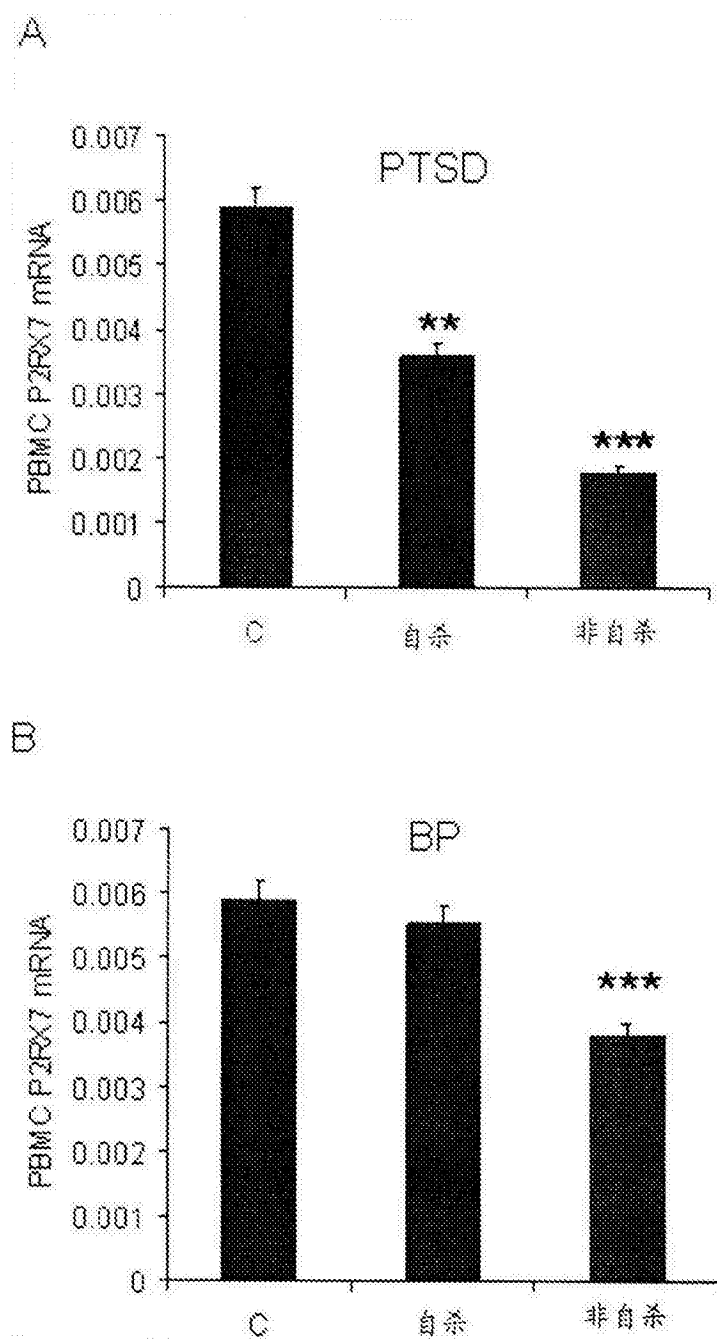


图11

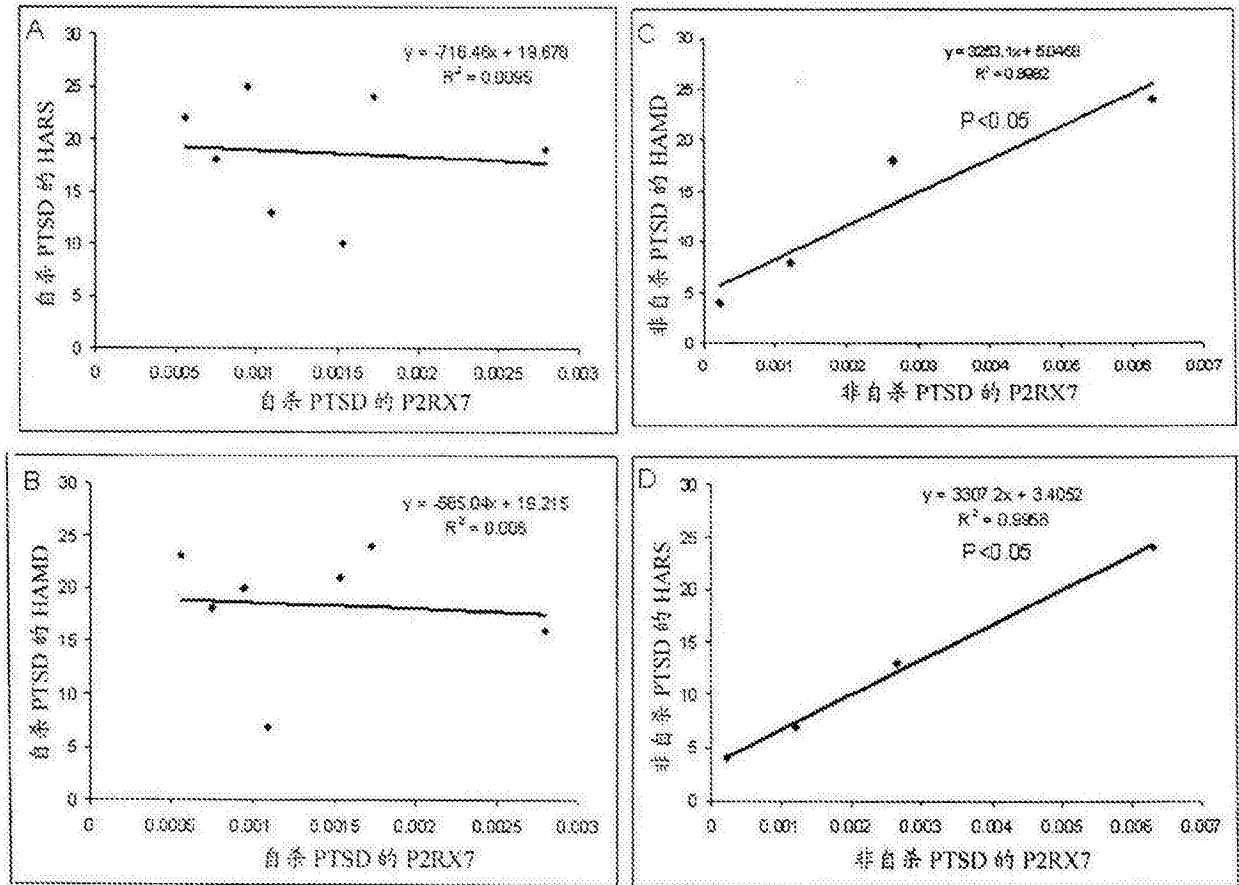


图12

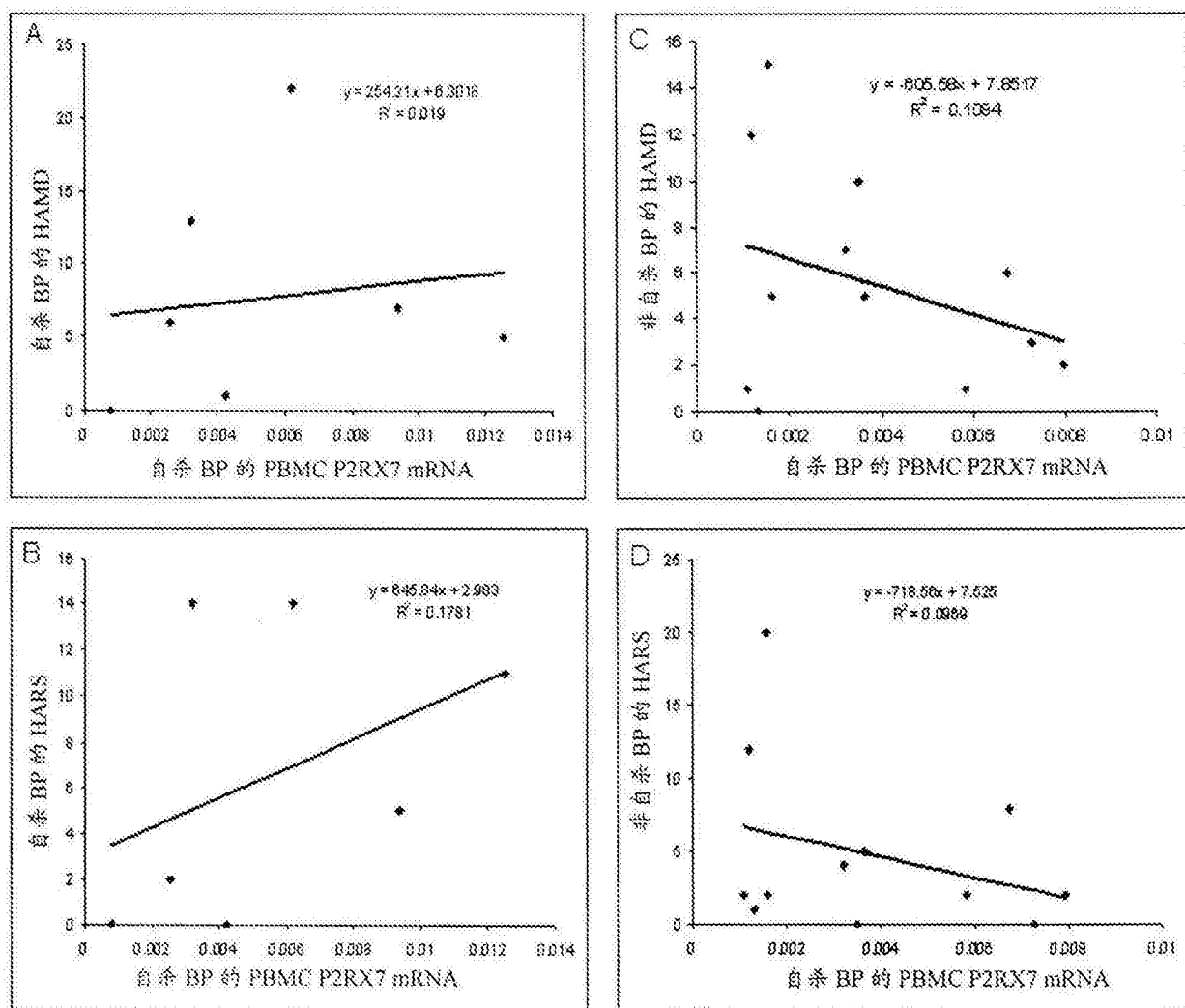


图13

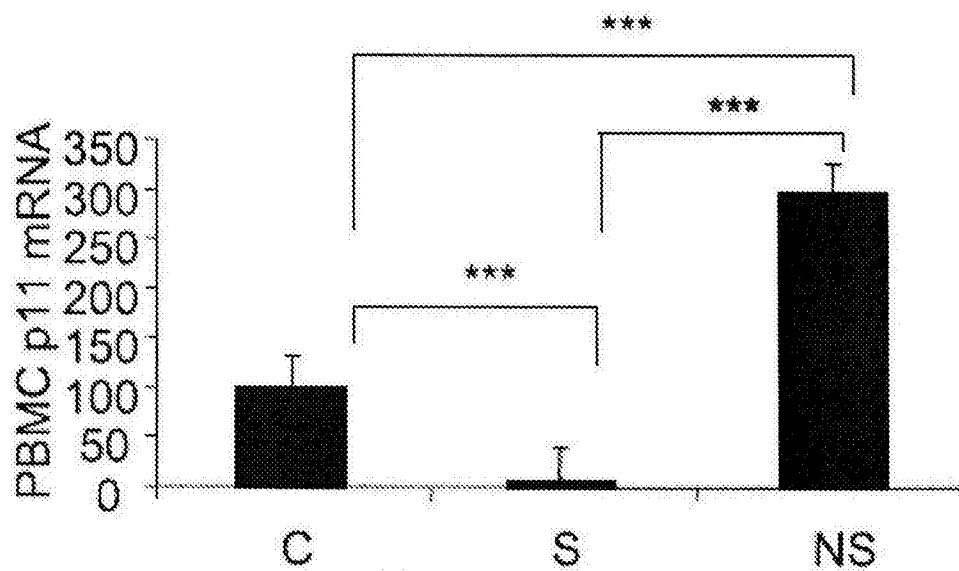


图14

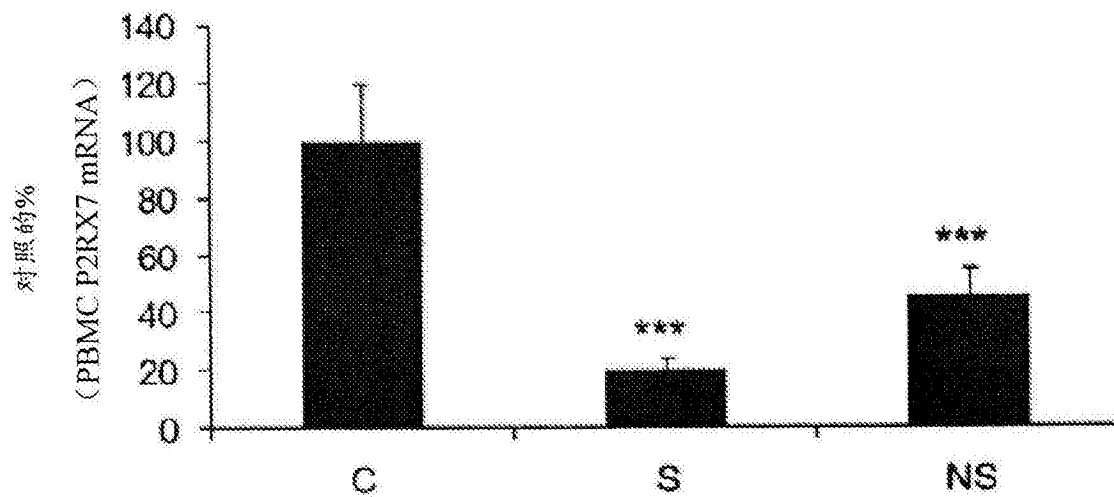


图15

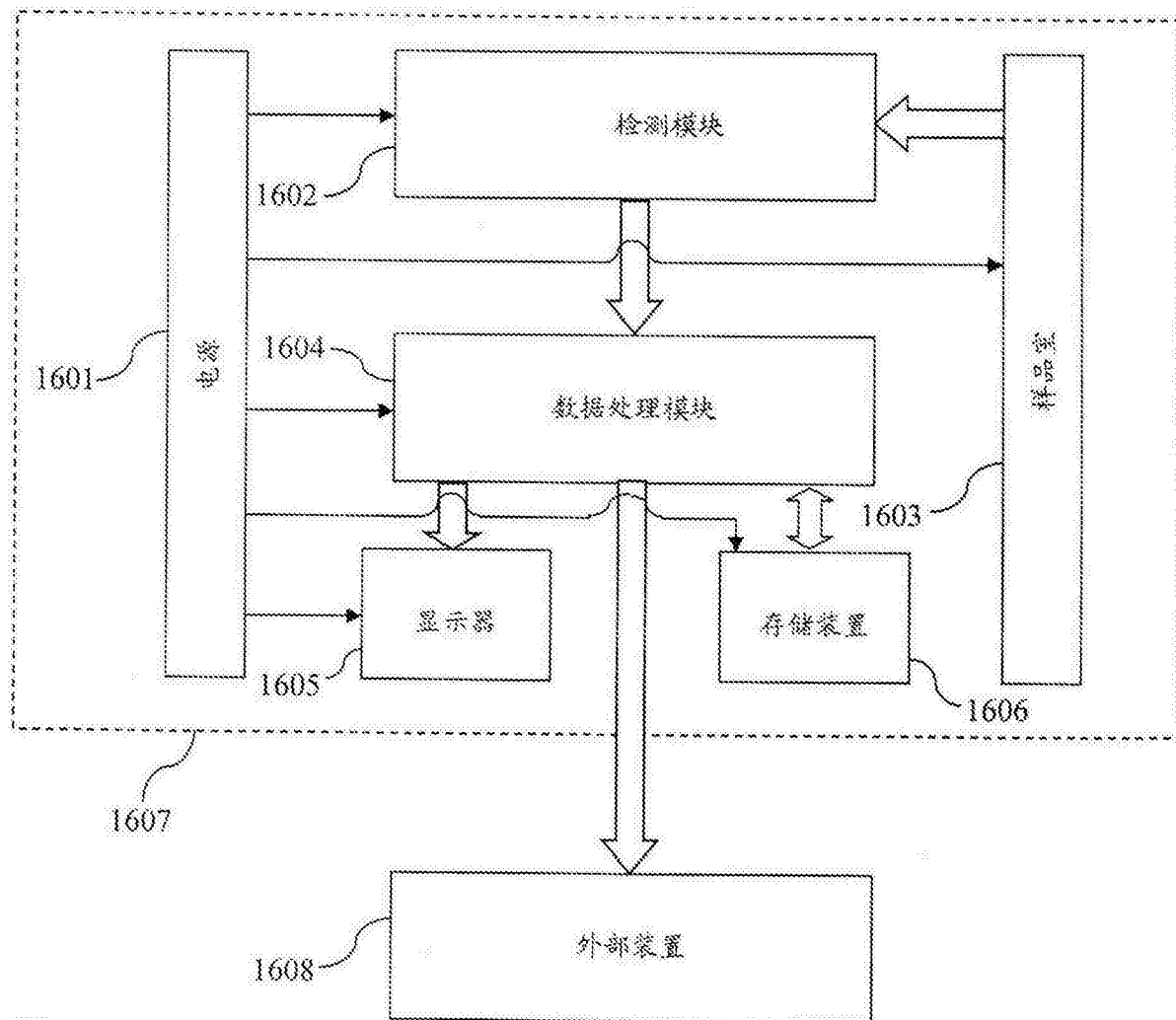


图16

16个PTSD患者

| 患者编号  | 组    | 性别 | 年龄 | 事件类型       | 事件时的年龄 | 种族  |
|-------|------|----|----|------------|--------|-----|
| 101   | PTSD | F  | 37 | 性虐待        | 9      | 1&2 |
| 102** | PTSD |    |    |            |        |     |
| 103   | PTSD | F  | 28 | 性虐待        | 10     | 2   |
| 132   | PTSD |    |    |            |        |     |
| 133   | PTSD | F  | 26 | 性虐待        | 10~12  | 0   |
| 134   | PTSD | F  | 40 | 车祸 妻/儿(死亡) | 36     | 0   |
| 135** | PTSD | F  | 57 | 交通事故       | 42~43  | 0   |
| 136   | PTSD | F  | 23 | 被最好的朋友强奸   | 21     | 0   |
| 137   | PTSD | M  | 32 | 车祸         | 27     | 1   |
| 139** | PTSD | F  | 31 | 身体虐待       | 5~17   | 1   |
| 142   | PTSD | F  | 35 | 车祸         | 34     | 1   |
| 143   | PTSD | F  | 42 | 身体虐待       | 22~25  | 1   |
| 145   | PTSD | M  | 29 | 车祸 妻/友(死亡) | 28     | 1   |
| 148   | PTSD | M  | 21 | 身体虐待       | 8~13   | 1   |
| 150   | PTSD | F  | 44 | 强奸(鸡奸)     | 15     | 0   |
| 151   | PTSD | M  | 23 | 精神/身体虐待    | 十多岁    | 1   |

8个PTSD患者在8周百忧解治疗后

|       |              |
|-------|--------------|
| 101-2 | PTSD-8周(氟西汀) |
| 103-2 | PTSD-8周      |
| 131D  | PTSD-8周      |
| 137D  | PTSD-8周      |
| 139-2 | PTSD-8周      |
| 143-2 | PTSD-8周      |
| 148-2 | PTSD-8周      |
| 150-2 | PTSD-8周      |

11个健康对照

|     |      |   |    |
|-----|------|---|----|
| 301 | 健康对照 |   |    |
| 331 | 健康对照 | M | 38 |
| 332 | 健康对照 | M | 30 |
| 333 | 健康对照 | F | 41 |
| 336 | 健康对照 | M | 28 |
| 337 | 健康对照 | F | 60 |
| 340 | 健康对照 | M | 23 |
| 344 | 健康对照 | M | 21 |
| 345 | 健康对照 | F | 29 |
| 347 | 健康对照 | F | 21 |
| 348 | 健康对照 | F | 24 |
| 349 | 健康对照 | F | 35 |

4个创伤对照

|     |      |   |    |     |       |   |
|-----|------|---|----|-----|-------|---|
| 201 | 创伤对照 | F | 44 |     |       | 2 |
| 231 | 创伤对照 | F | 41 | 性虐待 | ~9~11 | 1 |
| 232 | 创伤对照 | F | 26 |     |       | 0 |
| 233 | 创伤对照 | F | 27 |     |       | 3 |

图17