



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102099489 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 15

(21) 申请号 200980128132. X

(22) 申请日 2009. 05. 15

(30) 优先权数据

0808832. 0 2008. 05. 15 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/055944 2009. 05. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02009/138500 EN 2009. 11. 19

(71) 申请人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 P·汉森 D·希斯科克 C·莫里斯

A·托马斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李进 林毅斌

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 1 页

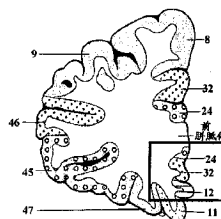
(54) 发明名称

抑郁症的 GABA 生物标记

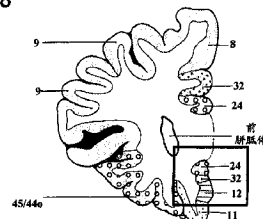
(57) 摘要

已经证明了在患有迟发性抑郁症的患者脑中核酸的差异表达。本发明提供可用于判定迟发性抑郁症的方法。本发明也提供用于鉴定用于治疗、预防或诊断迟发性抑郁症的化合物的筛选方法。

7



8



通过成人前脑胼胝体前界限的冠状面。
方框区(黑色)标出膝下前扣带回皮层。

1. 一种用于判定受试者是否患有或易患迟发性抑郁症的体内成像方法,所述方法包括下列步骤:

(i) 将体内成像剂给予所述受试者,其中所述体内成像剂包含与多核苷酸或多肽选择性缔合的化合物,所述多核苷酸或多肽是由 GABA 能受体基因所编码,并且其中所述化合物用体内成像部分标记;

(ii) 让所述体内成像剂与在所述受试者组织中表达的所述多核苷酸和 / 或所述多肽选择性缔合;

(iii) 通过体内成像方法检测由所述体内成像部分所发射的信号 ;和,

(iv) 产生图像,该图像代表所述信号的位置和 / 或数量。

2. 权利要求 1 的体内成像方法,其中所述 GABA 能受体基因是编码以下受体的基因:GABA_A 受体亚单位 α_1 (GABRA1);GABA_A 受体亚单位 α_4 (GABRA4);GABA_A 受体亚单位 α_5 (GABRA5);GABA_A 受体亚单位 β_3 (GABRB3);GABA_A 受体亚单位 γ_1 (GABRG1)、GABA_A 受体亚单位 γ_2 (GABRG2);GABA_A 受体亚单位 ρ_1 (GABRR1);GABA_A 受体亚单位 δ (GABRD);GABA_B 受体 2 (GABBR2);或者,甘氨酸受体 β (GLRB)。

3. 权利要求 1 或 2 的体内成像方法,其中所述受试者是完整的哺乳动物体内。

4. 权利要求 1-3 中任一项的体内成像方法,其中所述组织是脑组织。

5. 权利要求 4 的体内成像方法,其中所述脑组织是在前扣带中。

6. 权利要求 5 的体内成像方法,其中所述 GABA 能受体基因是 GABBR2、GABRG1 或 GABRR1 的编码基因。

7. 权利要求 6 的体内成像剂,其中所述 GABA 能受体基因是 GABBR2 或 GABRR1 的编码基因。

8. 权利要求 4 的体内成像方法,其中所述脑组织是在伏隔核中。

9. 权利要求 8 的体内成像方法,其中所述 GABA 能受体基因是 GABRA4、GABRB3 或 GABRG2 的编码基因。

10. 权利要求 9 的体内成像方法,其中所述 GABA 能受体基因是 GABRB3 的编码基因。

11. 权利要求 1-10 中任一项的体内成像方法,其中所述体内成像部分选自:

(i) 放射性金属离子;

(ii) 顺磁性金属离子;

(iii) 发射 γ 射线的放射性卤素;

(iv) 发射正电子的放射性非金属 ;和,

(v) 超极化 NMR- 活性核。

12. 权利要求 11 的体内成像方法,其中所述体内成像部分是 (i)、(iii) 或 (iv) 之一。

13. 一种用于迟发性抑郁症诊断的方法,所述方法包括:

(a) 权利要求 1-12 中任一项的体内成像方法 ;和,

(b) 将步骤 (a) 产生的图像与体内图像比较,所述体内图像代表当在非抑郁受试者中进行所述体内成像方法时,所述体内成像剂的摄取模式。

14. 一种用于迟发性抑郁症患者治疗的方法,所述方法包括给予药用组合物,所述药用组合物包含:

(a) 药物有效量的通过与多核苷酸或多肽选择性缔合而调节 GABA 能受体活性的化合

物,所述多核苷酸或多肽由 GABA 能受体基因所编码,所述 GABA 能受体基因同权利要求 2 的方法中所定义;和,

(b) 生物相容性载体。

15. 权利要求 1、2、11 或 12 中任一项的方法中定义的体内成像剂,所述体内成像剂用于权利要求 13 中定义的诊断方法。

16. 权利要求 1、2、11 或 12 中任一项的方法中定义的体内成像剂,所述体内成像剂用于决定是否实施权利要求 14 中定义的治疗方法的方法中,所述决定方法包括:

(a) 权利要求 1-12 中任一项的体内成像方法;和,

(b) 评价步骤 (a) 的体内成像方法所产生的图像,以决定是否实施所述治疗方法。

17. 一种用于鉴定与多核苷酸或多肽选择性缔合的化合物的筛选方法,所述方法包括:

(i) 使所述化合物与多肽或多核苷酸接触,所述多核苷酸或多肽同权利要求 1、2、6、7、9 或 10 中任一项的方法中所定义;和,

(ii) 测定所述化合物对所述多肽或所述多核苷酸的效应。

18. 权利要求 17 的筛选方法,其中所述效应是所述化合物与所述多肽或所述多核苷酸的结合。

19. 权利要求 17 或 18 的筛选方法,其中所述多肽或多核苷酸是分离的。

20. 权利要求 17 或 18 的筛选方法,其中所述多肽或多核苷酸在体外细胞中表达。

21. 权利要求 17 或 18 的筛选方法,其中所述接触步骤包括将所述化合物给予迟发性抑郁症的动物模型,并且其中所述多肽或所述多核苷酸在所述动物模型的组织中表达。

22. 权利要求 21 的筛选方法,其中所述迟发性抑郁症动物模型是迟发性抑郁症的灵长类动物模型、小鼠模型或大鼠模型。

23. 权利要求 17-22 中任一项的筛选方法,其中所述化合物与所述多肽接触。

抑郁症的 GABA 生物标记

[0001] 发明的技术领域

[0002] 已经鉴定了与非抑郁受试者的脑组织样品相比,在患有迟发性抑郁症 (late-onset depression) 的受试者脑组织样品中被上调或被下调的生物标记。本发明提供了筛选方法,以鉴定可用于治疗、预防和诊断迟发性抑郁症的化合物。本发明也提供可用于治疗、预防和诊断迟发性抑郁症的方法。

[0003] 相关技术的描述

[0004] 有 15% 的美国人在其生命中的某一点受到抑郁症的影响,在任意给定的某一天就有 1 亿人受到影响。发病年龄分布相当均匀并可突然在某些天发病或持续数年。超过半数经历重性抑郁症的人仅有一次发作。然而,随着每次连续发作,下次发作时有 15% 的危险将成为躁狂症,诊断变为双相性精神障碍。最终,大约 15-20% 重性抑郁症患者变为慢性抑郁并且约 15% 重性抑郁症患者可能自杀;男性自杀率通常是女性的 2 倍。

[0005] 目前,对于涉及抑郁症的神经生物学仅有有限的了解,但是日益明确的是,该疾病是多层面的并且可能涉及大量因素,这些因素或协同作用或独立作用而导致情感变化。抑郁症是一种复杂障碍,并非受控于单一病理学,这样单一病理学可用作标记,用于治疗、诊断和筛选的目的。涉及了许多神经递质系统,对若干靶标已经进行了广泛研究并导致产生一定范围的治疗选项。目前可用的治疗包括单胺氧化酶抑制剂 (MAOI)、三环抗抑郁药 (TCA)、特异性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI)、去甲肾上腺素能再摄取抑制剂 (NRI)、5-羟色胺去甲肾上腺素能再摄取抑制剂 (SNRI) 和去甲肾上腺素多巴胺再摄取抑制剂 (NDRI)。然而,现有抗抑郁药并不令人满意,因为它们有许多副作用,而且因患者病史和所治疗的确切病症的不同而具有不同功效。

[0006] γ -氨基丁酸 (GABA) 受体是一类响应神经递质 GABA 的受体,所述神经递质 GABA 是脊椎动物中枢神经系统中的主要抑制性神经递质。GABA 受体的综述参见 Bormann (2000 Trends Pharm. Sci. ;1(1):16-19)。有 3 类 GABA 受体:GABA_A、GABA_B 和 GABA_C。GABA_A 受体和 GABA_C 受体是离子型受体 (也称为配体-门控离子通道),而 GABA_B 受体是代谢型受体 (也称为 G 蛋白偶联受体)。GABA_A 受体直接门控 Cl⁻ 离子载体并具有苯并二氮杂草类、巴比妥类、神经类固醇类和乙醇的调节结合位点。GABA_C 受体是对药物荷包牡丹碱和巴氯芬不敏感的 Cl⁻ 孔。相反, GABA_B 受体通过 G 蛋白和第二信使系统与 Ca²⁺ 通道和 K⁺ 通道偶联;它们由激动剂巴氯芬激活并对调节 GABA_A 受体的药物具有抗性。

[0007] GABA 受体与心境障碍 (包括抑郁症) 相关。

[0008] Emrich 等 (Archiv Psychiatrie Nervenkrankheiten 1980 ;229 :1-16) 证明了丙戊酸盐在治疗躁狂抑郁患者中的功效。他们提出,丙戊酸盐通过提高 GABA 脑浓度,可补偿潜在的 GABA 能缺乏。在 Emrich 的假说之后,一些动物和人类研究评价了 GABA 能异常在抑郁症病理生理学中的可能作用 (Krystal 等,2002 Mol. Psychiatry ;2 :S71-S80 ; Merali 等,2004 J. Neurosci. ;24(6) :1478-1485 ;Bipolar Disorders, Basic Mechanisms and Therapeutic Implication. Marcel Dekker ;New York,2000,第 143-165 页)。正如 Brambilla 等 (2003 Molecular Psychiatry ;8 :721-737) 的综述,动物和临床研究已经表明

GABA 能活性的缺乏可能涉及抑郁症的病理生理学。

[0009] US 2005/0209181 公开了经诊断患有精神分裂症的病人尸体解剖脑的表达谱并提出所鉴定的标记也可用于靶向抑郁症。在其它靶标中,该专利出版物提出了 GABA_A 受体的各种亚单位(即 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 2$ 、 δ)与抑郁症的关系。

[0010] 在 WO 2008/020435 中,发现在抑郁症的动物模型中 GABA_A 受体各种亚单位(即 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 δ 、 $\rho 3$ 、 θ)的改变的表达。也发现了 GABA_B 受体的改变的表达。

[0011] 在 WO 02/20492 中,教导四氢吡唑衍生物类在其它疾病中可用于诊断和治疗抑郁症。WO 02/20492 教导,四氢吡唑衍生物作为激动剂在 $\alpha 2$ 或 $\alpha 3$ 起作用并因此可用于治疗抑郁障碍或双相性精神障碍。

[0012] 然而,这些已报告的异常可能并非是抑郁症所特有的,因为 GABA 能的改变也已经在例如焦虑障碍(Kose1 等,2004Neuropsychopharmacol ;29 :347-50)、精神分裂症(Int J Neuropsychopharmacol 2002 ;5 :159-179)和惊恐障碍(Biol Psychiatry 2000 ;47 :96-106)的相关病理学中提出。此外,在 Kugaya 等(2003 Biol Psychiatry ;54 :792-9)检查抑郁患者中 GABA_A 结合 [¹²³I] 碘西尼(iomazenil)的结合研究中,与非抑郁受试者相比,在抑郁患者中并无显著差异。

[0013] 迟发性抑郁症的神经生物学基础仍有大部分尚未研究过,阻碍了对有效治疗的开发。在老年人中,抑郁症是仅次于痴呆的第二大最常见精神障碍,影响大约 3% 的 65 岁以上的老人,还有 12% 罹患较轻的但仍会令人衰弱的抑郁症(Beekman 等,British Journal of Psychiatry 174,307-311(1999))。大约有三分之一的患者对初期抗抑郁药治疗无反应,同时他们仍然对复发、慢性和痴呆具有非常高的危险(Cole 等,American Journal of Psychiatry 156,1182-1189(1999))。因此,就发病率和致死率以及健康和社会护理负担而言,迟发性抑郁症涉及相当高的费用。已经提出,与年轻患者的抑郁症相比,对迟发性抑郁症的临床管理应当根据其具体病理生理特征而定制(Thomas 等,American Journal of Psychiatry 157,1682-1684(2000);Thomas 等,British Journal of Psychiatry 181,129-134(2002))。

[0014] 因此,需要在迟发性抑郁症的治疗和诊断中具有特定应用的临床策略。

[0015] 发明概述

[0016] 目前已经证明,与非抑郁受试者相比,在患有迟发性抑郁症的患者脑中涉及 GABA 系统的基因存在差异表达。提供筛选方法,用于鉴定可用于治疗、预防或诊断迟发性抑郁症的化合物。也提供可用于治疗、预防和诊断迟发性抑郁症的方法。本发明具有如下优势:其提供了与迟发性抑郁症病理生理学特异性相关的生物标记。

[0017] 发明详述

[0018] 体内成像方法

[0019] 本发明提供用于判定受试者是否患有或易患迟发性抑郁症的体内成像方法,所述方法包括下列步骤:

[0020] (i) 将体内成像剂给予所述受试者,其中所述体内成像剂包含与多核苷酸或多肽选择性缔合的化合物,所述多核苷酸或多肽是由 GABA 能受体基因所编码,并且其中所述化合物用体内成像部分标记;

[0021] (ii) 让所述体内成像剂与在所述受试者组织中表达的所述多核苷酸和 / 或所述多肽选择性缔合 ;

[0022] (iii) 通过体内成像方法检测由所述体内成像部分所发射的信号 ;和,

[0023] (iv) 产生代表所述信号的位置和 / 或数量的图像。

[0024] 本文所用的术语“体内成像”是指这样的无创性技术 :该技术在给予体内成像剂之后,产生受试者内部的全部或部分的图像。

[0025] 本发明的“受试者 (患者)”优选是哺乳动物,最优选是完整的哺乳动物机体体内。在一个特别优选的实施方案中,受试者是人,尤其是疑似患有或易患迟发性抑郁症的人。术语“易患”是指受试者完全因为遗传因素而具有发展疾病状态的易感性 ;按照一般的说法是“天然”而非“后天 (nurture)”的。

[0026] “迟发性抑郁症”是指首发于 60 岁及以上人群的重性抑郁障碍。术语“重性抑郁障碍”是指涉及任何下列症状的心境障碍 :持续悲伤、焦虑或“空虚”感 ;绝望感或悲观感 ;负罪感、无价值感或无助感 ;对曾经享受的嗜好和活动 (包括性) 丧失兴趣或愉悦、活力下降,疲劳,“慢下来”,难以集中注意力、回忆或做决定,失眠、过早觉醒或嗜睡,食欲和 / 或体重减轻或者过度饱食和体重增加,想死或自杀或有自杀企图,烦躁或易激怒,或者对治疗无反应的持续的身体症状,例如头痛、消化失调和慢性疼痛。

[0027] “给予”体内成像剂优选通过胃肠外进行,最优选通过静脉内进行。静脉内途径代表向所述受试者全身递送体内成像剂的最有效方式。本发明的体内成像剂优选以药用组合物形式来给予,所述组合物包含体内成像剂以及生物相容性载体。“生物相容性载体”是流体,尤其是液体,其中悬浮或溶解了体内成像剂,使组合物是生理上可耐受的,即可给予哺乳动物体内而没有毒性或过度不适感。生物相容性载体介质适宜是注射用载体液,例如无菌的、无热原的注射用水 ;水溶液,例如盐水 (其可最好是经过平衡的,使注射用终产物是等渗或不是低渗的);一种或多种以下物质的水溶液 :张力调节剂 (例如血浆阳离子与生物相容性抗衡离子的盐)、糖 (例如葡萄糖或蔗糖)、糖醇 (例如山梨醇或甘露醇)、二醇 (例如甘油) 或其它非离子型多元醇物质 (例如聚乙二醇、丙二醇等)。生物相容性载体介质也可包括生物相容性有机溶剂,例如乙醇。这些有机溶剂可用于溶解更亲脂的化合物或制剂。优选,生物相容性载体介质是无热原的注射用水、等渗盐水或乙醇水溶液。供静脉内注射用生物相容性载体介质的 pH 的合适范围是 4.0-10.5。

[0028] 体内成像剂所包含的“化合物”可以是生物分子、小分子、适体、反义 mRNA、小干扰 RNA 或抗体。术语“生物分子”包括例如以下分子 :如脂质、核苷酸、多核苷酸、氨基酸、肽、多肽、蛋白质、碳水化合物和无机分子。术语“小分子”是指分子量介于 100-1000 道尔顿之间的有机化合物。术语“抗体”是指由免疫系统细胞产生的蛋白质或是指其与抗原结合的片段。术语“反义 mRNA”是指与正常加工为 mRNA 并翻译的链互补、或其区域互补的 RNA 分子。术语“适体”是指人工核酸结合剂 (参见例如 Ellington 和 Szostak (1990) Nature 346 : 818-822)。术语“小干扰 RNA”是指诱导序列特异性转录后基因沉默的双链 RNA (参见例如 Elbashir 等 (2001) Genes Dev. 15 :188-200)。优选,体内成像剂所包含的化合物是小分子或生物分子,最优选小分子。适用于脑组织成像的体内成像剂的具体特征在以下有更详细讨论。

[0029] 术语“选择性缔合”是指体内成像剂与目标靶标的结合,所述目标靶标即由 GABA

能受体基因优先于其它组织而编码的多核苷酸或多肽,以便有利于通过本发明的方法来鉴别靶组织和非靶组织。可采用结合测定,例如下述涉及本发明筛选方法的那些测定,来测定体内成像剂与目标靶标的结合。

[0030] 术语“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。具体的核酸序列也包括其保守修饰的变体,例如简并密码子取代、等位基因、直向同源物、单核苷酸多态性和互补序列以及明确指出的序列。具体地讲,可通过产生一个或多个所选(或所有)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列,达到简并密码子取代(Batzer等, *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); Rossolini等, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。术语“核酸”可用于指基因、互补脱氧核糖核酸(cDNA)和由基因编码的信使核糖核酸(mRNA)。

[0031] 术语“多肽”是指氨基酸残基的聚合物。该术语用于这样的氨基酸聚合物:其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物;以及用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。本文所用的该术语包括任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸、以及氨基酸类似物和氨基酸模拟物,后者以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。天然存在的氨基酸是由遗传密码所编码的那些,以及后期被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸盐和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即 α -碳与氢、羧基、氨基和R基结合)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。这些类似物具有修饰的R基(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但仍保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸在本文中可以用公知的三字母符号或IUPAC-IUB生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)所推荐的单字母符号来表示。

[0032] 当多核苷酸是由基因“编码”时,这是指该基因包含以下所需的信息:(i)通过复制获得脱氧核糖核酸(DNA)互补链,或(ii)通过转录获得mRNA。也包括从mRNA逆转录到cDNA。当多肽是由基因“编码”时,这是指该基因包含以下所需信息:(i)通过转录获得mRNA,和(ii)通过翻译从所述mRNA获得所述多肽。术语“复制”、“转录”和“翻译”采用它们在本发明领域中所接受的含义。也就是说,复制是DNA拷贝成DNA的过程,转录是DNA拷贝成mRNA的过程,而翻译则是当mRNA的信息用作蛋白质合成的模板时。

[0033] “GABA能受体”是与 γ -氨基丁酸(GABA)结合的受体。因此,“GABA能受体基因”是编码一部分GABA能受体的基因。优选,所述GABA能受体基因是编码以下受体的基因:GABA_A受体亚单位 α_1 (GABRA1);GABA_A受体亚单位 α_4 (GABRA4);GABA_A受体亚单位 α_5 (GABRA5);GABA_A受体亚单位 β_3 (GABRB3);GABA_A受体亚单位 γ_1 (GABRG1),GABA_A受体亚单位 γ_2 (GABRG2);GABA_A受体亚单位 ρ_1 (GABRR1);GABA_A受体亚单位 δ (GABRD);GABA_B受体2(GABBR2);或者,甘氨酸受体 β (GLRB)。

[0034] 术语“基因”是指涉及产生多肽链的DNA区段;它包括前导区和随后的编码区(前导区和拖曳区)以及介于各编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。仅有少数例外,体内每个细胞都含有一整套染色体和相同的基因。然而,这些基因仅有一部分开启,正是这些“表达”的亚类给每种细胞类型赋予独特性质。“基因表达”是这样的术语:它用于描述DNA内所含信息(储存的遗传信息)转录成为信使RNA(mRNA)分子,然后再翻译为蛋白

质而行使大部分关键性的细胞功能。细胞所产生的 mRNA 的种类和数量反映了哪些基因被表达,这又提供了细胞对其改变的需求是如何反应的相关信息。基因表达是一种高度复杂并受到严格控制的过程,允许细胞对环境刺激和其自身变化需求产生动态反应。该机制起到开/关转换作用,以控制在细胞中哪些基因被表达以及体量控制,即如有必要,增加或降低特定基因的表达水平。

[0035] “体内成像部分”是在将其给予所述受试者之后,可在该受试者机体外部检测的任何物质。体内成像部分的存在提供了所成像的组织中多肽或多核苷酸数量的检测指标。术语“用体内成像部分来标记”是指体内成像部分可以是化合物的组成部分,或者可以是与化合物缀合的单独实体。当体内成像部分与化合物缀合时,任选的接头部分将载体和体内成像部分连接在一起。

[0036] 在给予步骤之后和检测步骤之前,允许体内成像剂与所述多核苷酸和/或所述多肽选择性缔合。例如,当受试者是完整哺乳动物时,体内成像剂将会在哺乳动物体内动态移动,与其中的不同组织接触。一旦体内成像剂接触表达所述多核苷酸和/或所述多肽的组织时,就会发生特异性相互作用,使体内成像剂从所述组织中清除比从其它组织中清除需要更长时间,因此确保产生代表特异性缔合的体内成像剂的图像。

[0037] 术语“组织”用于描述缔合在一起,以行使特定生物学功能的细胞集合。本发明受试者的基本组织类型是上皮组织、神经组织、结缔组织、肌肉组织和脉管组织。本发明体内成像方法上下文中优选的组织是脑组织。

[0038] 通过所述体内成像部分的存在,来保证与所述受试者的所述多核苷酸或多肽选择性缔合的体内成像剂水平的“检测”步骤。合适的体内成像技术是这样的技术:该技术可检测由所述体内成像部分发射的信号,并产生表示所述受试者所述组织中存在的体内成像部分的位置和/或数量的数据。例如,SPECT 可用作体内成像部分发射 γ 射线的检测技术。

[0039] 本发明体内成像方法上下文中优选的脑组织位于前扣带和伏隔核中。这两个脑区都与抑郁症的临床症状相关,并且在本文被证明与迟发性抑郁症中改变的 GABA 能基因的表达有关。当成像的脑组织是在前扣带中时,优选的 GABA 能受体基因是 GABBR2、GABRG1 或 GABRR1 的编码基因,最优选的是 GABBR2 或 GABRR1 的编码基因。当成像的脑组织是在伏隔核中时,优选的 GABA 能受体基因是 GABRA4、GABRB3 或 GABRG2 的编码基因,最优选的是 GABRB3 的编码基因。

[0040] 具体的需求要求体内成像剂适用于成像脑组织。与身体的其它部分相比,在脑中,内皮细胞通过“紧密连接(tight junction)”的方式更紧密地包裹在一起,所述紧密连接是形成相邻上皮细胞间的密封,阻止大部分溶解分子从上皮层的一侧跨越到另一侧的多功能复合物。这个所谓的血脑屏障(BBB)阻止所有分子运动,除了通过脂溶性方式跨越细胞膜的那些分子(例如氧气、二氧化碳、乙醇和甾体激素)和通过特殊转运系统而允许的那些分子(例如糖和某些氨基酸)之外。分子量大于 500 道尔顿的物质通常不能通过被动扩散方式跨越 BBB,而较小分子通常是可以的。除了紧密连接的作用阻止了在内皮细胞间的转运之外,还有两种机制可阻止被动扩散。在脑内围绕毛细血管的神经胶质细胞是亲水性分子的第二屏障,而且脑内的低浓度间隙蛋白也能阻止亲水性分子通过。

[0041] 通过测定辛醇-水的分配系数(P),通常可评价脂溶性,通常表示为 $\log_{10}$ 值,在本文中称为“ $\log P$ ”。辛醇-水的分配系数表示物质在有机相与水相之间的分布。 $\log P$ 提供

了测定化合物的亲脂性或亲水性的简单方式。

[0042] 比例定义为：

[0043] 分配 = [辛醇中存在的化合物] / [水中存在的化合物]

[0044] 该等式可表示为：

[0045] $\text{Log 分配} = \log_{10} [\text{辛醇中存在的化合物}] / [\text{水中存在的化合物}]$

[0046] 简而言之，logP 计算的正数越大，化合物亲脂性就越大。对于潜在的新型药用化合物而言，通常求出 logP 的计算值，因为它提供了化合物在给予后在体内将会怎样分配到各区室 (compartmentalised) 的相关知识。

[0047] 适用于本发明的体内成像剂的 logP 范围为 1.0-4.5，优选范围为 1.0-3.5，最优选范围为 2.0-3.5。在体外和体内评价之前，可以先获取估计 logP 值 (AlogP98)，例如使用 DS MedChem Explorer 软件 (Accelrys)。除了有利于 CNS 穿透之外，该范围内的亲脂性还允许体内成像的快速清除，这在放射性卤素是相对短寿命的放射性同位素例如 ^{18}F 时特别重要。

[0048] 可通过使用 Accelrys DS MedChem Explorer 软件，与文献比较体内脑穿透数据，用计算机 (in silico) 评价特定体内成像剂的 BBB 穿透特性。“logBbR”是 [脑浓度] / [血浓度] 的 $\log_{10}$ 。用于本发明方法的体内成像剂的 logBbR 的合适范围为 0.0-1.0，优选范围为 0.3-1.0，最优选范围为 0.5-0.7。

[0049] 用于本发明体内成像方法的优选的体内成像部分选自：

[0050] (i) 放射性金属离子；

[0051] (ii) 顺磁性金属离子；

[0052] (iii) 发射 γ 射线的放射性卤素；

[0053] (iv) 发射正电子的放射性非金属；和，

[0054] (v) 超极化 NMR- 活性核。

[0055] 当体内成像部分是放射性金属离子即射电金属时，合适的射电金属可以是正电子发射体，例如 ^{64}Cu 、 ^{48}V 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{68}Ga ；或者 γ -发射体，例如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 或 ^{67}Ga 。优选的射电金属是 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 和 ^{111}In 。最优选的射电金属是 γ -发射体，尤其是 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

[0056] 当体内成像部分是顺磁性金属离子时，合适的这类金属离子包括： Gd(III) 、 Mn(II) 、 Cu(II) 、 Cr(III) 、 Fe(III) 、 Co(II) 、 Er(II) 、 Ni(II) 、 Eu(III) 或 Dy(III) 。优选的顺磁性金属离子是 Gd(III) 、 Mn(II) 和 Fe(III) ，尤其优选 Gd(III) 。

[0057] 当体内成像部分是发射 γ 射线的放射性卤素时，放射性卤素适宜选自 ^{123}I 、 ^{131}I 或 ^{77}Br 。 ^{125}I 虽然在本文所述的体外筛选方法适用于作为可检测标记，但不适用于作为体内成像部分。优选的发射 γ 射线的放射性卤素是 ^{123}I 。

[0058] 当体内成像部分是发射正电子的放射性非金属时，合适的这类正电子发射体包括： ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{17}F 、 ^{18}F 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 或 ^{124}I 。优选的发射正电子的放射性非金属是 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{18}F 和 ^{124}I ，尤其是 ^{11}C 和 ^{18}F ，最尤其是 ^{18}F 。

[0059] 当体内成像部分是超极化 NMR- 活性核时，这类 NMR- 活性核具有非零核自旋，包括 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{19}F 、 ^{29}Si 和 ^{31}P 。这其中，优选 ^{13}C 。术语“超极化”是指 NMR- 活性核的极化度增强，超出了它的饱和极化 (equilibrium polarisation)。 ^{13}C 的天然丰度 (相对于 ^{12}C) 约为 1%，在超极化之前，合适的 ^{13}C 标记的化合物可适当地富集到至少 5% 的丰度，优选至少 50%，最优选至少 90%。本发明体内成像剂的至少一个碳原子适宜富集 ^{13}C ，然后再超极化。

[0060] 本发明优选的体内成像部分是在以无创性方式体内给予之后,能够在外部检测的那些,例如通过 SPECT、PET 和 MRI。体内成像用的最优选的体内成像部分是放射性的,尤其是放射性金属离子、发射 γ 射线的放射性卤素和发射正电子的放射性非金属,尤其是那些适合用 SPECT 或 PET 来成像的那些。

[0061] 本发明优选的体内成像剂在体内不容易进行代谢,因此最优选在人体内的半衰期为 60-240 分钟。体内成像剂优选通过肾脏排泄(即表现出尿排泄)。体内成像剂在患病病灶处的优选信号-背景比至少为 1.5,最优选至少为 5,尤其优选至少为 10。当体内成像剂包含放射性同位素时,体内成像剂(其是非特异性结合或在体内游离)峰水平的一半的清除,优选发生的时间周期小于等于体内成像部分的放射性同位素的放射性衰变半衰期。

[0062] 此外,体内成像剂的分子量适宜至多为 5000 道尔顿。优选,分子量范围为 100-3000 道尔顿,最优选为 200-1000 道尔顿。此外,和如上所述,对于适用于脑组织成像的体内成像剂而言,需要体内成像剂的分子量小于 500 道尔顿。体内成像剂的尤其优选的分子量范围因此为 200-500 道尔顿。

[0063] 当体内成像剂包含多肽和体内成像部分时,体内成像部分通过多肽的 N-端或 C-端、或者通过任何氨基酸侧链来缀合。优选,体内成像部分通过 N-端或 C-端与多肽缀合,任选通过接头,例如聚乙二醇接头。

[0064] 或者,体内成像剂的官能团可包含体内成像部分。当官能团包含体内成像部分时,这表明体内成像部分构成体内成像剂的部分化学结构。例如,体内成像部分可以是其水平显著超过所述同位素天然丰度水平的放射性同位素。同位素的这类升高或富集水平适宜为所述同位素天然丰度水平的至少 5 倍,优选至少 10 倍,最优选至少 20 倍,和理想的是至少 50 倍;或以这样的水平存在:其中所述同位素富集水平为 90-100%。这类官能团的实例包括具有升高水平的 ^{123}I 的碘代苯基,具有升高水平的 ^{11}C 的 CH_3 基团,和具有升高水平的 ^{18}F 的氟代烷基,使得成像部分是在化学结构内的同位素标记的 ^{11}C 原子或 ^{18}F 原子。

[0065] 可使用本发明的筛选方法,鉴定并获取与由 GABA 能受体基因所编码的多核苷酸或多肽选择性缔合的化合物,所述方法在下文有更详细描述。当所述筛选方法是结合测定时,需要化合物与目标靶标的结合具有纳摩尔浓度的效力,即其解离常数 (K_d) 介于 0.01-100nM 之间,优选介于 0.01-10nM 之间,和最优选介于 0.01-1.0nM 之间。可便利地通过使前体化合物与合适来源的所需体内成像部分反应,进行这样的化合物标记,以提供体内成像剂。“前体化合物”包括成像剂的未标记衍生物,其经设计使得与体内成像部分的便利化学形式的化学反应以位点特异性方式发生;可以在最少数量的步骤中进行(理想的是单个步骤);和无需显著的纯化(理想的是无需进一步纯化),以得到所需的体内成像剂。这类前体化合物是合成的,并可便利地以良好的化学纯度而获取。前体化合物可任选包含保护基团,用于保护前体化合物的某些官能团。

[0066] 术语“保护基团”导指这样的基团:所述基团可抑制或阻止不想要的化学反应,但其经设计具有足够的反应性,使其可在不改变分子的其它部分的足够温和的条件下,从所述官能团上裂解下来。脱保护后,就得到所需体内成像剂。保护基团是本领域技术人员众所周知的并适宜选自:对于氨基,Boc(其中 Boc 是叔丁氧基羰基)、Fmoc(其中 Fmoc 是芴基甲氧基羰基)、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基、Dde[即 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基]或 Npys(即 3-硝基-2-吡啶亚磺酰基);和对于羧基,甲酯、叔丁酯或苄酯。对于羟基,

合适的保护基团是：甲基、乙基或叔丁基；烷氧基甲基或烷氧基乙基；苄基；乙酰基；苯甲酰基；三苯甲基 (Trt) 或三烷基甲硅烷基，例如四丁基二甲基甲硅烷基。对于巯基，合适的保护基团是：三苯甲基和 4-甲氧基苄基。其它保护基团的使用描述于 ‘Protective Groups in Organic Synthesis’, Theodor W. Greene 和 Peter G. M. Wuts, (第 3 版, John Wiley & Sons, 1999)。

[0067] 当体内成像部分是金属离子（例如用于 SPECT 的 ^{99m}Tc 或用于 MRI 的 Gd(III) ）时，体内成像剂优选包含放射性金属离子与合成配体的金属络合物。术语“金属络合物”是指金属离子与一个或多个配体的配位络合物。强烈优选金属络合物是“抗转移整合 (transchelation)”的，即不容易与其它可能的竞争性配体对金属配位位置进行配体交换。可能的竞争性配体包括在体外制备中的其它赋形剂（例如用于制备的辐射防护剂或抗微生物防腐剂），或体内的内源化合物（例如谷胱甘肽、转铁蛋白或血浆蛋白）。术语“合成”具有其常规含义，即人造的，与从天然来源例如从哺乳动物体内分离的相反。这类化合物具有这样的优势：它们的制备和杂质分布可以完全控制。

[0068] 可用于本发明的形成抗转移整合的金属络合物的合适配体包括：螯合剂，其中 2-6 个、优选 2-4 个金属供体原子是这样排列的：使得 5 元或 6 元螯合环产生（通过具有连接碳原子或非配位杂原子的金属供体原子的非配位主链）；或包含与金属离子强烈结合的供体原子的单齿配位体，例如异腈类、膦类或二氮烯化物 (diazenides)。可与金属良好结合成为螯合剂组成部分的供体原子类型的实例是：胺、硫醇、酰胺、脒和膦。膦形成这类强金属络合物，甚至单齿或二齿膦都形成合适的金属络合物。异腈和二氮烯化物的线性几何构型使它们自身不容易结合到螯合剂中，因此通常用作单齿配位体。合适的异腈的实例包括简单的烷基异腈例如叔丁基异腈，以及醚取代的异腈例如 MIBI（即 1-异氰基-2-甲氧基-2-甲基丙烷）。合适的膦类的实例包括替曲膦和单齿膦类例如三（3-甲氧基丙基）膦。合适的二氮烯化物的实例包括 HYNIC 系列配体，即脒取代的吡啶或烟酰胺。

[0069] 上述配体特别适合于络合锝例如 ^{94m}Tc 或 ^{99m}Tc ，更充分的描述可参见 Jurisson 等 [Chem. Rev., 99, 2205-2218 (1999)]。配体也可用于其它金属，例如铜 (^{64}Cu 或 ^{67}Cu)、钒（例如 ^{48}V ）、铁（例如 ^{52}Fe ）或钴（例如 ^{55}Co ）。

[0070] 其它合适的配体描述于 Sandoz WO 91/01144，其包括特别适于铟、钇和钆的配体，尤其是大环氨基酸酯配体和氨基膦酸配体。形成钆的非离子型（即中性）金属络合物的配体是已知的并描述于 US4885363。对于钆，特别优选的是包括以下物质的螯合物：DTPA、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三亚乙基四胺六乙酸 (TTHA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)、10-(2-羟基丙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸 (DO3A) 和这些物质的衍生物。

[0071] 当体内成像部分是放射性卤素时，优选的前体化合物是包含经历亲电或亲核的放射性卤化或者经历与带标记的醛或酮的缩合的衍生物的那些。第一类的实例是：

[0072] (a) 有机金属衍生物例如三烷基锡烷（例如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基）或三烷基硅烷（例如三甲基甲硅烷基），或有机硼化合物（例如硼酸酯 (boronate ester) 或有机三氟硼酸酯 (organotrifluoroborate)）；

[0073] (b) 用于卤素交换的非放射性烷基溴或者用于亲核碘化反应的对甲苯磺酸烷基酯、甲磺酸烷基酯或三氟甲磺酸烷基酯；

[0074] (c) 向亲核碘化活化的芳环（例如芳基碘鎓盐、芳基重氮物、芳基三烷基铵盐或硝基芳基衍生物）。

[0075] 前体优选包括：非放射性卤原子，例如芳基碘或芳基溴（以允许放射性卤素交换）；有机金属前体化合物（例如三烷基锡、三烷基甲硅烷基或有机硼化合物）；或有机前体，例如三氮烯或用于亲和取代的良好离去基团例如碘鎓盐。对于放射性碘化，优选的前体包括有机金属前体化合物，最优选三烷基锡。

[0076] 前体和将放射性碘导入有机分子中的方法描述于 Bolton [J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]。合适的硼酸酯有机硼化合物和它们的制备方法描述于 Kabalka 等 [Nucl. Med. Biol., 29, 841-843 (2002) 和 30, 369-373 (2003)]。合适的有机三氟硼酸酯和它们的制备方法描述于 Kabalka 等 [Nucl. Med. Biol., 31, 935-938 (2004)]。

[0077] 可采用 ^{18}F -氟化物与具有良好离去基团（例如烷基溴、烷基甲磺酸酯基或烷基甲磺酸酯基）的前体中的合适化学基团进行反应，通过直接标记，进行放射性氟化反应。也可通过 N-卤代乙酰基与 $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 反应物的烷基化反应，产生 $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3^{18}\text{F}$ 衍生物，来将 ^{18}F 导入。对于芳基系统，从芳基重氮盐、芳基硝基化合物或芳基季铵盐的 ^{18}F -氟化物亲核置换是产生芳基 ^{18}F 衍生物的合适途径。

[0078] ^{18}F 标记的体内成像剂可通过如下方式获得：形成 ^{18}F 氟代二烷基胺，随后当 ^{18}F 氟代二烷基胺与含有例如氯、 $\text{P}(\text{O})\text{Ph}_3$ 或活化酯的前体反应时形成酰胺。更多的放射性氟化方法，尤其是适用于肽的放射性氟化方法，描述于 WO 03/080544（其使用巯基偶联）和描述于 WO04/080492（其使用氨基氧基偶联）。 ^{18}F 标记衍生物合成途径的更多细节描述于 Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)。

[0079] 本发明方法的体内成像剂可通过试剂盒而容易地获取。这样的试剂盒包括合适的前体化合物，优选呈无菌无热原形式，使得与无菌来源的体内成像部分的反应使用最少数量的操作就产生所需的体内成像剂。这类考虑在放射性体内成像剂的情况下特别重要，尤其是当放射性同位素具有相对短的半衰期时，可便于操作并因此降低对放射性药物学家的辐射剂量。

[0080] 重建这类试剂盒的反应介质优选是生物相容性载体，如本文先前所定义，从而得到包含所述体内成像剂的药用组合物。

[0081] 在本发明的体内成像方法中，检测步骤之后是产生图像的步骤，该图像表示由体内成像部分所发射的信号。本发明方法中的这个产生步骤通过计算机来进行，计算机将重建算法用于所获取的信号数据以得到数据集。然后处理该数据集，产生显示受试者体内目标区域的图像。这些图像提供可用于迟发性抑郁症的诊断方法的信息。

[0082] 诊断方法

[0083] 另一方面，本发明提供上述关于体内成像方法所定义的体内成像剂，用于迟发性抑郁症的诊断方法。

[0084] 此外，本发明提供用于诊断迟发性抑郁症的方法，所述方法包括：

[0085] (a) 如上定义的体内成像方法；和，

[0086] (b) 将步骤 (a) 所产生的图像与体内图像比较，该体内图像表示当在非抑郁受试者中进行所述体内成像方法时，所述体内成像剂的摄取模式 (pattern of uptake)。

[0087] 诊断方法的组织和受试者的合适和优选的实施方案的定义同上述体内成像方法。

[0088] 代表非抑郁受试者的图像中,本文所述多肽或多核苷酸的水平变化(向上或向下)表明,该受试者患有迟发性抑郁症或处于发展迟发性抑郁症的至少某些方面的危险中。

[0089] 当在非抑郁受试者中进行所述体内成像方法时,通过以下方法得到代表所述体内成像剂的摄取的图像:在非抑郁受试者的适当匹配组上进行如上定义的体内成像方法,并且产生代表所有得到的图像的平均水平的图像。

[0090] 治疗方法

[0091] 可将调节 GABA 能受体活性的化合物给予受试者,用于治疗迟发性抑郁症。因此,本发明提供用于治疗迟发性抑郁症患者的方法,所述方法包括给予药用组合物,所述药用组合物包含:

[0092] (a) 药物有效量的通过与多核苷酸或多肽选择性缔合而调节 GABA 能受体活性的化合物,所述多核苷酸或多肽由 GABA 能受体基因所编码,所述 GABA 能受体基因是上述有关本发明体内成像方法所定义的优选的 GABA 能受体基因;和,

[0093] (b) 生物相容性载体。

[0094] 生物相容性载体是广泛的,如本说明书先前所定义。所选的具体生物相容性载体部分是由有待给予的具体药用组合物、以及用于给予组合物的具体方法而决定的。因此,有各种各样的合适药用组合物制剂(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 17 版,1985)。适于给药的制剂包括水和非水溶液、等渗无菌溶液,它们可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和赋予制剂等渗性的溶质;以及水和非水无菌混悬剂,其可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0095] 用于治疗的给药可通过使药物化合物接触有待治疗的组织的任何常用途径来进行,这是本领域技术人员众所周知的。尽管多于一种途径可用于给予特定组合物,但是一种特定途径通常可比另一途径提供更直接和更有效的反应。在本发明的实践中,药用组合物可通过例如以下方式给予:口服、鼻内、局部、静脉内、腹膜内或鞘内。可将药用组合物装入单剂量或多剂量的密封容器例如安瓿和小瓶中。可从上述种类的无菌粉末、颗粒和片来制备溶液剂和混悬剂。药用组合物也可作为预制食物或药物的一部分来给予。化合物的“药物有效量”是在一段时间内在受试者中足以起到有益反应的剂量。任何患者的最佳剂量水平将会因各种各样的因素(包括所用的特异性调节剂的功效、患者的年龄、体重、身体活动和膳食)的不同而异,也取决于与其它药物的可能组合并取决于精神障碍的严重程度。剂量大小也可由伴随将特定药用组合物给予特定受试者的任何不良副作用的存在、特性和程度来决定。

[0096] 在确定有待给予的药用组合物的有效量时,医生可评价药用组合物的循环血浆水平、药用组合物毒性和抗药用组合物抗体的产生。一般而言,对于典型受试者,化合物的剂量当量为约 1ng/kg 至 10mg/kg。为了给予,药用组合物可以按照化合物的 LD-50 所决定的速率和化合物在不同浓度时的副作用来给予,当用于群体(mass)和总体健康的受试者时。

[0097] 术语“调节 GABA 能受体活性”是指化合物对所述 GABA 能受体具有效应,其作用是使所述受体的活性接近于在非抑郁受试者中所观察到的活性。

[0098] 此外,上述关于本发明体内成像方法所定义的体内成像剂可用于决定是否实施如上定义的治疗的方法,所述决定方法包括:

[0099] (a) 如本文中定义的体内成像方法 ;和,

[0100] (b) 评价步骤 (a) 的体内成像方法所产生的图像,以决定是否实施所述治疗方法。

[0101] 筛选方法

[0102] 另一方面,本发明提供鉴定与多核苷酸或多肽选择性缔合的化合物的筛选方法,所述方法包括:

[0103] (i) 使所述化合物与多肽或多核苷酸接触,所述多核苷酸或多肽是由 GABA 能受体基因所编码的 ;和,

[0104] (ii) 测定所述化合物对所述多肽或所述多核苷酸的效应 ;

[0105] 其中所述 GABA 能受体基因是上述本发明体内成像方法所定义的基因,优选编码 GABA 能受体的基因,所述 GABA 能受体选自 :GABA_A 受体亚单位 α_1 (GABRA1) ;GABA_A 受体亚单位 α_4 (GABRA4) ;GABA_A 受体亚单位 α_5 (GABRA5) ;GABA_A 受体亚单位 β_3 (GABRB3) ;GABA_A 受体亚单位 γ_1 (GABRG1),GABA_A 受体亚单位 γ_2 (GABRG2) ;GABA_A 受体亚单位 ρ_1 (GABRR1) ;GABA_A 受体亚单位 δ (GABRD) ;GABA_B 受体 2 (GABBR2) ;或者,甘氨酸受体 β (GLRB)。

[0106] 可用于治疗、预防或诊断迟发性抑郁症的“化合物”可以是生物分子、小分子、适体、反义 mRNA、小干扰 RNA 或抗体。术语“生物分子”、“小分子”、“抗体”、“反义 mRNA”、“适体”、“小干扰 RNA”采用本说明书早前所提供的含义。

[0107] 按照其最广泛含义,所述化合物与多肽或多核苷酸的“接触”步骤是指使所述化合物与所述多肽或多核苷酸彼此进行物理接触。这可在体外或体内完成,更多细节如下所述。

[0108] “化合物的效应”是所述化合物与所述多核苷酸或所述多肽之间的任何特异性相互作用。这样的特异性相互作用包括所述化合物与所述多核苷酸或所述多肽的特异性结合,并包括由所述化合物诱导的对所述多核苷酸或多肽的表达水平或活性的任何调节。

[0109] “测定”化合物效应的步骤可通过本领域众所周知的方法来进行。这种众所周知的筛选方法的一个实例是,在测定步骤中所测的效应是所述化合物与所述多肽或多核苷酸的结合。这样的结合测定优选涉及本文所述的分离的多肽或多核苷酸与一种或多种化合物接触,并允许有足够时间让多肽或多核苷酸与化合物形成结合复合物。术语“分离”是指从其它细胞组分中分离出来,并且也可包括合成的多核苷酸和多肽。可以使用多种已建立的分析技术中的任一种来检测所形成的任何结合复合物。蛋白质结合测定包括但不限于测定共沉淀的方法、在非变性 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上测定共迁移的方法和基于蛋白质印迹测定共迁移的方法 (参见例如 Bennet 和 Yamamura, (1985) “Neurotransmitter, Hormone or Drug Receptor Binding Methods (神经递质、激素或药物受体的结合方法)”载于 Neurotransmitter Receptor Binding (Yamamura, H. I. 等编著,第 61-89 页)。用于这类测定的蛋白质可以是天然表达的、克隆的或合成的。结合测定也可用于例如鉴定与多肽相互作用的内源蛋白。例如,在结合测定中可鉴定与多肽结合的抗体、受体或其它分子。在许多情况下,在结合测定中的至少一种反应物包含可检测标记。在该上下文中的术语“反应物”包括化合物、多肽、多核苷酸或用于特异性检测它们的任何抗体。“可检测标记”可以是具有可检测理化性质的任何物质。因此,可检测标记的存在提供了结合反应物数量的检测指标。根据所用的具体可检测标记,合适的检测技术用于测定选择性结合的可检测标记的数量。适用于本发明筛选方法的可检测标记包括通过光谱法、光化学法、生化法、免疫化学法、电学方法、光学或化学方法在体外可检测的那些,包括:

- [0110] (i) 磁珠 (例如 Dynabeads™) ;
- [0111] (ii) 荧光染料 (例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明等) ;
- [0112] (iii) 放射性标记 (例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P) ;
- [0113] (iv) 酶 (例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 ELISA 中常用的其它酶) ;和,
- [0114] (v) 量热标记,例如胶体金或有色玻璃或塑料 (例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等) 珠。

[0115] 检测这些可检测标记的方式是本领域技术人员众所周知的。因此,例如,当可检测标记是放射性标记时,是指用于包括闪烁计数器或如在放射自显影术中的照相胶片在内的检测。当可检测标记是荧光标记时,可通过用合适波长的光激发荧光染料并检测所得荧光,对其进行检测。可对荧光进行目测,通过照相胶片、通过使用电子检测器例如电荷耦合器件 (CCD) 或光电倍增管等。类似的,可通过提供酶合适底物并检测所得反应产物,来检测酶学可检测标记。

[0116] 本发明的筛选方法也可优选在体外进行,其中所述多肽或多核苷酸在细胞中表达并使细胞与化合物接触。这类方法通常涉及进行基于细胞的测定,其中使化合物与表达本文所述的多肽或多核苷酸的一个或多个细胞接触,然后检测转录产物、翻译产物表达的增加或减少或者催化产物的增加或减少。本文所述的多核苷酸在细胞中的表达水平可测定如下:通过用与所述多核苷酸的转录物 (或互补核酸) 特异性杂交的化合物,来测定细胞中表达的 mRNA。可通过裂解细胞并进行 RNA 印迹或者不裂解细胞而用原位杂交技术,进行测定。

[0117] 可使用免疫学方法对多肽进行测定,其中用化合物探测细胞裂解物,所述化合物是与所述多肽特异性结合的抗体。

[0118] 可通过测定酶的产物的产生或通过测定底物的消耗,测定多肽的催化活性。活性是指催化速率或者多肽结合底物 (K_m) 或释放催化产物 (K_d) 的能力。

[0119] 可按照通用生化分析进行多肽的活性分析。这类测定包括基于细胞的测定以及涉及纯化或部分纯化的多肽或粗制细胞裂解物的体外测定。测定通常涉及提供已知数量的底物并以时间的函数定量产物。

[0120] 也可进行筛选方法,其中所述接触步骤包括将所述化合物给予迟发性抑郁症的动物模型。所用的动物模型通常是任何种类的哺乳动物。优选动物的具体实例包括但不限于灵长类动物、小鼠和大鼠。在一个实施方案中,将抑郁症 (慢性和急性) 的大鼠模型 (其中大鼠经历应激) 用于筛选。在一个实施方案中,可使用无脊椎动物模型例如果蝇模型,筛选本文所公开的人类基因的果蝇直向同源物的调节剂。在另一个实施方案中,包括基因敲除技术在内的转基因动物技术 (例如作为与合适的基因打靶载体同源重组的结果),或基因过量表达,将会导致多核苷酸或多肽表达的缺失、减少或增加。发现由这些方法所产生的转基因动物可用作精神障碍的动物模型,并可用于筛选精神障碍的调节剂。

[0121] 可通过同源重组,将标记基因或其它异源基因插入到小鼠基因组的内源基因位点,制备敲除细胞和转基因小鼠。也可通过用多核苷酸突变形式取代内源多核苷酸,或通过例如暴露给致癌剂而使内源多核苷酸突变,制备这样的小鼠。

[0122] 在一个优选的实施方案中,在上述任何实施方案中所述的筛选方法涉及使所述化合物与所述多肽接触,并测定所述化合物对所述多肽的效应。

[0123] 用于本发明的方法

[0124] 本文描述了对在迟发性抑郁症患者脑组织中特异性差异表达的基因表达模式进行的研究。与抑郁症相关的大的症状谱反映出复杂的遗传学基础和这些受试者中复杂的基因表达模式。此外,脑途径或通路以及亚细胞途径对于理解精神障碍的发展和诊断而言是重要的。经选择用于评价的脑区(前扣带(cingulate)(AC)和伏隔核(nucleus accumbens)(NA))涉及抑郁症的临床症状。脑区中细胞结构的改变、关键性神经递质或相关分子在脑区的表达、以及脑区中的亚细胞途径,都涉及到抑郁症的发展。

[0125] 通过微阵列表达分析,获取本发明所依据的数据。用于这类分析的阵列称为“表达芯片”。固定化 DNA 是从已知基因的 mRNA 逆转录而来的 cDNA,而且至少在某些实验中,与芯片杂交的对照和样品 DNA 分别是来自正常和患病组织的 mRNA 逆转录而来的 cDNA。如果一个基因在某种疾病状态中过量表达,则与对照 cDNA 相比有更多样品 cDNA 与代表该表达基因的点杂交。结果,该点发出的红色荧光比绿色荧光的强度更大。一旦研究人员表征了涉及多种疾病的多个基因的表达模式之后,就可使来自任何个体的患病组织的 cDNA 杂交,以确定来自个体的基因的表达模式是否与已知疾病的表达模式匹配。如果是这样,则可启动适用于该疾病的治疗。

[0126] 微阵列方法的有用综述可参见 Nature Genetics, 1999 年 1 月增刊。与本发明最相关的是 Botwell 的文章,在第 25-32 页,其中描述了如何采用微阵列技术来获取表达数据。现在提供该技术的概述。

[0127] DNA “微阵列”是将来自上千个不同基因的序列在固定位置上固定或连接的小的固体支持物。支持物本身通常是显微镜载玻片,但也可以是硅片或尼龙膜。将 DNA 印刷、印渍或甚至直接合成在支持物上。重要的是,微阵列中的基因序列以有序或固定方式连接在它们的支持物上,因为阵列中各点的位置用于鉴定特定基因序列。各点本身可以是 DNA、cDNA 或寡核苷酸。微阵列可由研究人员制备或来自市售,取决于例如可用的成本、时间和人力资源的问题。**Genechip[®]**阵列是市售阵列,是使用结合了光版印刷和组合化学的技术而制备的(www.affymetrix.com)。每个阵列上至多合成 130 万个不同的寡核苷酸探针。每个寡核苷酸位于阵列的特定区域,称为探针室(probe cell)。每个探针室都含有成百上千个至数百万个给定寡核苷酸的拷贝。

[0128] 为了从 mRNA 得到 cDNA,采用逆转录,这是 DNA 聚合酶(称为逆转录酶)将单链核糖核酸(RNA)转录成为双链 DNA 的过程。通常,在该反应中,聚-T(胸苷)引物用作引物,因为 mRNA 具有聚-A(腺苷)尾。

[0129] 输入 mRNA 的质量是至关重要的,以获得适用于微阵列分析的 cDNA。尸体解剖采样中的 RNA 完整性可受到死亡前后(pre-mortem and post-mortem)事件的影响,也受到表达水平与例如以下混淆因素之间相互关系的影响:供体死亡年龄、死前低氧、濒死事件和濒死期持续时间、脑 pH、采样前的死后时间间隔和 RNA 完整性(Stan 等, 2006 ;Brain Research ; 1123(1) :1-11)。因此,重要的是筛选 RNA 样品,以选择适用于微阵列分析的那些。在评价 RNA 质量之前,对样品可以进行简单的 pH 测定,作为濒死状态的指标。然后,多种方法可用于测定 RNA 质量(Copois 等, 2007 J Biotechnol ;127(4) :549-59),其中之一就是 RNA 完整性数(RIN, Agilent Technologies)。使用在显微制造的芯片上进行的电泳分离,分离 RNA 样品,然后通过激光诱导的荧光检测来测定。生物分析仪软件产生电泳图谱和凝胶类图像并显示出结果,例如样品浓度和所谓的核糖体比(18S 与 28S 核糖体条带之比)。使用 RIN

软件算法进行 RNA 完整性数据的标准化解释,该算法允许基于从 1 到 10 的计数系统,对真核的总核 RNA(riboeukaryotic total RNA)进行分类,其中 1 是降解最多的分布类型,而 10 是最完整的。

[0130] DNA 微阵列技术促进了对 DNA 序列信息的鉴定和分类,以及这些新基因的功能分配。微阵列是通过利用给定 mRNA 分子与其来源的 DNA 模板特异性结合或杂交的能力而起作用的。术语“杂交”是指互补的单链核酸结合或退火成一个双链分子的过程。通过使用含有多种 DNA 样品的阵列,就可以通过测定与阵列上各位点结合的 mRNA 数量,而在单一实验中测定细胞内成百上千个基因的表达水平。借助于计算机,就可准确测定出结合在微阵列各点上的 mRNA 数量,产生细胞中基因表达的分布图。

[0131] 有关核酸杂交的一般性指南可参见 Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes,“Overview of principles of Hybridization and the strategy of nucleic acid assays(杂交原则和核酸测定策略的综述)”(1993)。通常,选择严格性条件是在指定离子强度、pH 下,比特定序列的热解链温度(T_m)低约 5–10°C。 T_m 是(在指定离子强度、pH 和核浓度下)在平衡时,50%探针与靶标杂交形成靶序列的温度(当靶序列过量存在时,在 T_m 下,在平衡时有 50%探针被占据)。“严格性”条件将是以下哪些条件:其中盐浓度小于约 1.0M 钠离子,通常约 0.01–1.0M 钠离子浓度(或其它 10 种盐),在 pH 7.0–8.3,温度至少约为 30°C(对于短探针,例如 10–50 个核苷酸)和至少约为 60°C(对于长探针,例如大于 50 个核苷酸)。

[0132] 严格性条件也可通过加入去稳定剂例如甲酰胺而达到。对于选择性或特异性杂交,阳性信号至少是背景的 2 倍,任选是背景杂交的 10 倍。示例性的严格性杂交条件可以如下:50%甲酰胺、5X SSC 和 1% SDS,在 42°C 孵育,或 5X SSC、1% SDS,在 65°C 孵育,并在 0.2XSSC 和 0.1% SDS 中在 65°C 洗涤。这样的洗涤可以进行 5、15、30、60、120 分钟或更长时间。

[0133] 在严格性条件下彼此不杂交的核酸仍然是基本相同的,如果它们所编码的多肽基本相同时。这发生在例如当使用遗传密码所能允许的最大密码子简并而产生核酸拷贝时。在这类情况下,核酸通常在适度的严格性杂交条件下杂交。示例性的“适度的严格性杂交条件”包括在 40%甲酰胺、1M NaCl、1% SDS 的缓冲液中,在 37°C 杂交,并在 1XSSC 中在 45°C 洗涤。这样的洗涤可以进行 5、15、30、60、120 分钟或更长时间。阳性杂交至少是背景的 2 倍。普通技术人员将会容易地理解,可使用替代性杂交和洗涤条件以提供类似的严格性条件。

[0134] 杂交步骤完成之后,将微阵列放入由一些激光器、专用显微镜和照相机组成的“阅读器”或“扫描仪”中。实例包括 Packard BioChip 成像器、Molecular Dynamics Avalanche 和 Genetic Microsystems GMS 418 阵列扫描仪。荧光标签受到激光器的激发,显微镜和照相机共同工作而产生数字化阵列图像。典型的微阵列实验产生上千个数据点,这表明需要用于存储和处理数据的成熟技术。所使用的工具可包括对来自阅读器的数据进行图像分析的软件,存储和链接信息的数据库,以及将单个克隆(clone)的数据与网络数据库例如 GenBank 链接的软件。GenBank 序列数据库是开放性入口,是所有公众可得的核苷酸序列和它们的蛋白质翻译的注释集合(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=核苷酸>)。该数据库是在国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)产生的,作为国际核苷酸序列数据库合作项目(International

Nucleotide Sequence Database Collaboration,或 INSDC) 的部分。

[0135] 微阵列目前已用于分析采自患有迟发性抑郁症患者脑的尸体解剖样品的 mRNA 表达谱。选择前扣带和伏隔核用于分析,因为已知这些脑区与抑郁症的病理生理学相关。与正常个体相比,在经诊断患有抑郁症的患者的所选脑区中,在 mRNA 水平上,已经显示了与 GABA 能系统有关的基因表达的改变(以下实施例中的表 2 和表 4)。现在详细描述用于获取本发明所依据数据的具体方案。

[0136] 实施例简述

[0137] 实施例 1 描述了用于对来自抑郁和非抑郁受试者的前扣带样品进行转录组学分析的方法。

[0138] 实施例 2 描述了用于对来自抑郁和非抑郁受试者的伏隔核样品进行转录组学分析的方法。

实施例

[0139] 实施例 1:前扣带转录组学

[0140] 实施例 1(i) 样品选择

[0141] 冷冻脑组织(贮存在 -80℃)是来自 10 名迟发性抑郁症患者的额叶皮层,并且与 10 名精神病学上健康的对照受试者在年龄、性别、死后时间间隔和濒死状态上相匹配。所有受试者都是突然死亡,濒死状态的平均持续时间约 7 小时(Li 等, Hum Mol Genet 13, 609-616 (2004))。选择这些数字是为了在微阵列上,在 > ±2SD 的常规显著性水平上足以检测组间差异,或使用基于 DIGE 的蛋白质组学分析。抑郁受试者全都患有 DSM-IV 重性抑郁症,而且病例记录回顾证明了这一点,而且他们没有其它精神病。筛选了对照的病例记录,以确保他们没有任何精神疾病。所有受试者接受尸检和神经病理学检查,没有人具有与痴呆相符的变化。

[0142] 通过作为濒死状态标志评价 pH,筛选组织的适用性。在 -80℃ 贮藏库中获取样品,再切碎(subdissected),融化并通过使用 UltraTurrax 匀浆器以全速匀浆 10 秒而制备 10% 匀浆(例如 1 克组织加 9ml 水)。使用经含水标准品标定的氯化银电极,测定样品的 pH。

[0143] 实施例 1(ii) 微阵列分析

[0144] 评价之后,有限的样品组可用于分析(参见下表 1)。从该样品组,选择膝下前扣带回皮层(subgenual anterior cingulate cortex)(参见图 1)并在 -20℃ 进行显微解剖。将这些样品冻存在 -80℃,然后经处理用于 RNA 分析。为了 RNA 的制备,将样品融化,通过使用 UltraTurrax 匀浆器以全速匀浆 10 秒而制备 10% 匀浆。测定样品 pH,再用基于胍的提取(Trizol)来提取 RNA,并在分离之后在柱(RNEasy, Qiagen)上纯化,以除去低分子量 RNA。使用 Agilent 生物分析仪,根据清晰的 18/26S 核糖体条带,测定 RNA 的质量。

[0145] 表 1:经提取用于微阵列分析的前扣带 RNA 样品

[0146]

样品号	RIN *	微阵列
AC1	6.5	是

AC2	6.2	是
AC3	6.7	是
AC4	5.5	否
AC5	4.6	否
AC6	6.3	是
AC7	4.1	否
AC8	6.2	是
AC9	4.8	否
AC10	5.0	是
AC11	6.5	是
AC12	4.5	否
AC13	7.9	是
AC14	6.9	是
AC15	7.2	是
AC16	7.3	是
AC17	5.6	是
AC18	7.3	是
AC19	5.3	是
AC20	6.7	是
AC21	5.9	是
AC22	6.5	是
AC23	7.5	是
AC24	6.8	是
AC25	7.4	是

AC26	6.4	是
AC27	6.2	是
AC28	5.8	是
AC29	2.6	否
AC30	3.1	否
AC31	6.8	是
AC32	6.8	是

[0147]

[0148] *RIN = RNA 完整性数

[0149] 使用 Agilent 2100 生物分析仪对样品进行初步分析, 以提供 RNA 完整性数 (RIN), 来评价总 RNA 样品的完整性。Agilent 2100 软件根据样品的电泳追踪, 将完整性数自动赋值给真核总 RNA 样品, 以表明降解产物的存在或不存在。根据该初步分析 (参见表 1), 通过 2 轮扩增采集样品, 然后放在 Affymetrix Plus 2.0 微阵列上。

[0150] 原始数据筛选表明, 4 例 (样品 AC17、AC19 和 AC21) 可能不适用于进一步分析, 因为低 3' / 5' 比率和低于平均 % 的要求 (present call)。进行统计学分析, 以确定任何样品是否是异常值。使用斯皮尔曼等级相关方法, 3 个样品提供的基因芯片结果是在主要分组 (main grouping) 之外, 因此是可能的混淆者 (样品 AC17、AC19 和 AC21), 还有一例可能也在主要分组之外 (样品 AC26)。去除偏离的样品, 证明样品 AC17、AC19 和 AC21 可能是异常值, 但样品 AC26 大概可以保留。

[0151] 使用总数据集以及已滤出样品 AC17、AC19 和 AC21 的数据集, 用严格的或严格性稍低的方法进行统计学分析, 最多鉴定了 664 个显著改变的基因。表 2 列出了在迟发性抑郁症中发现显著改变的 GABA 能受体基因。

[0152] 表 2 : 与非抑郁受试者相比, 在迟发性抑郁症患者的前扣带样品中转录的 GABA 能基因存在显著不同

[0153]

倍数变化	基因名称	图谱	描述	DEP t-检验 P-值
1.8	GABRA1	5q34-q35	γ -氨基丁酸(GABA) A 受体, α 1	0.1204
2.1	GABRA5	15q11.2-q12	γ -氨基丁酸(GABA) A 受体, α 5	0.0
1.6	GABRB3	15q11.2-q12	γ -氨基丁酸(GABA) A 受体, β 3	0.1029
0.54	GABRG1	4p12	γ -氨基丁酸(GABA) A 受体, γ 1	0.082
1.6	GABRG2	5q31.1-q33.1	γ -氨基丁酸(GABA) A 受体, γ 2	0.7756
2.44	GABRR1	6q14-q21 6q13-q16.3	γ -氨基丁酸(GABA) A 受体, ρ 1	0.094
2.74	GABBR2	9q22.1-q22.3	γ -氨基丁酸(GABA) B 受体, 2	0.005
1.7	GLRB	4q31.3	甘氨酸受体, β	0.0062

[0154] 实施例 2: 伏隔核转录组学

[0155] 实施例 2(i) 样品选择

[0156] 通过作为濒死状态标志评价 pH, 对来自患有迟发性抑郁症的个体和没有已知神经精神病史的个体的尸体解剖的脑组织, 筛选其适用性。在 -80°C 贮藏库中获取来自额叶皮层的样品 (BA 45), 再切碎, 融化并通过使用 UltraTurrax 匀浆器以全速匀浆 10 秒而制备 10% 匀浆 (1 克组织加 9ml 水)。使用经含水标准品标定的氯化银电极, 测定样品 pH。

[0157] 实施例 2(ii) 微阵列分析

[0158] 样品选择之后, 有限的样品组可用于分析 (参见下表 3)。从该样品组, 选择伏隔核 (参见图 2) 并在 -20°C 进行显微解剖。将这些样品冻存在 -80°C , 然后经处理用于 RNA 分离和微阵列分析。

[0159] 表 3: 经提取用于微阵列分析的伏隔核 RNA 样品

[0160]

样品号	RIN *	微阵列
NA1	8.5	是
NA2	N/A	否
NA3	6.6	是

NA4	6.1	是
NA5	8.7	是
NA6	8.3	是
NA7	7.1	是
NA8	8.1	是
NA9	7.4	是
NA10	N/A	否
NA11	6.9	是
NA12	7.8	是
NA13	7.9	是
NA14	7.3	是
NA15	N/A	是
NA16	7.6	是
NA17	7.7	是
NA18	N/A	否
NA19	6.7	是
NA20	8.0	是
NA21	6.9	是
NA22 ^{**}	7.0	是
NA23	6.1	是
NA24	7.6	是
NA25	5.9	否
NA26	7.8	是
NA27	7.3	是

NA28	8.2	是
NA29	7.4	是
NA30	6.5	是
NA31	6.2	是

[0161]

[0162] *RIN = RNA 完整性数

[0163] ** 壳 (Putamen) 样品用于与先前的前扣带实验进行比较的目的

[0164] 使用 Agilent 2100 生物分析仪对样品进行初步分析,并在此基础上(参见表 3),样品 NA2、NA10、NA18 和 NA25 未经处理而用于进一步分析。通过 2 轮扩增采集其它样品,然后放在 Affymetrix Plus 2.0 微阵列上。

[0165] 根据聚类分析的结果,样品 NA20 和 NA26 具有与其它样品显著不同的表达模式。在主成分分析 (PCA) 分析的结果中,这些样品也汇集在一起。因此,除去样品 NA20 和 NA26,并通过分层聚类 and PCA 对数据进行重新分析。

[0166] 使用已滤出样品 NA20 和 NA26 的数据集,用严格的和严格性稍低的方法进行统计学分析,与非抑郁受试者相比,在抑郁患者中有 121 个基因的表达是显著不同的。表 4 列出了在迟发性抑郁症中发现最显著改变的 GABA 能受体基因。

[0167] 表 4:与非抑郁受试者相比,在迟发性抑郁症患者的伏隔核样品中转录的 GABA 能基因存在显著不同

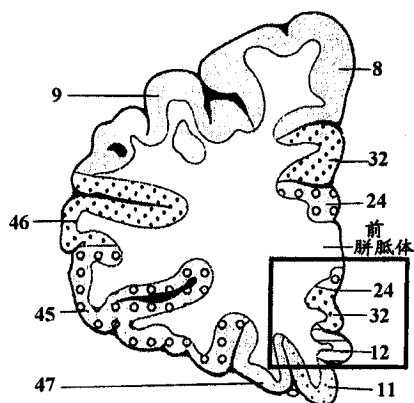
[0168]

倍数变化	基因名称	图谱	描述	DEP t-检验 P-值
1.9	GABRA1	5q34-q35	γ -氨基丁酸 (GABA) A 受体, $\alpha 1$	0.0003
0.70	GABRA4	4p12	γ -氨基丁酸 (GABA) A 受体, $\alpha 4$	0.106
2.0	GABRA5	15q11.2-q12	γ -氨基丁酸 (GABA) A 受体, $\alpha 5$	0.0066

[0169]

1.6	GABRB3	15q11.2-q12	γ -氨基丁酸 (GABA) A 受 体, β 3	0.014
1.6	GABRG2	5q31.1-q33.1	γ -氨基丁酸 (GABA) A 受 体, γ 2	0.0462
2.3	GABRD	1p1p36.3	γ -氨基丁酸 (GABA) A 受 体, δ	0.0011
1.8	GABBR2	9q22.1-q22.3	γ -氨基丁酸 (GABA) B 受 体, 2	0
1.7	GLRB	4q31.3	甘氨酸受体, β	0.0001

7



8

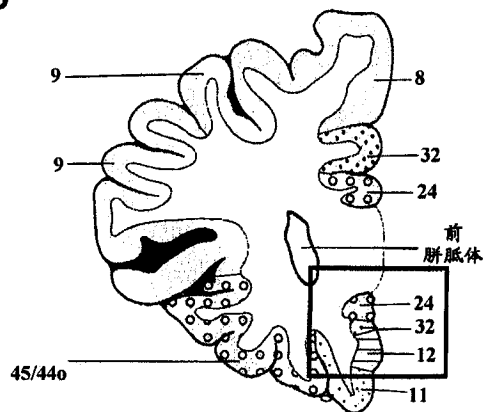


图 1：通过成人前脑胼胝体前界限的冠状面。方框区（黑色）标出膝下前扣带回皮层。

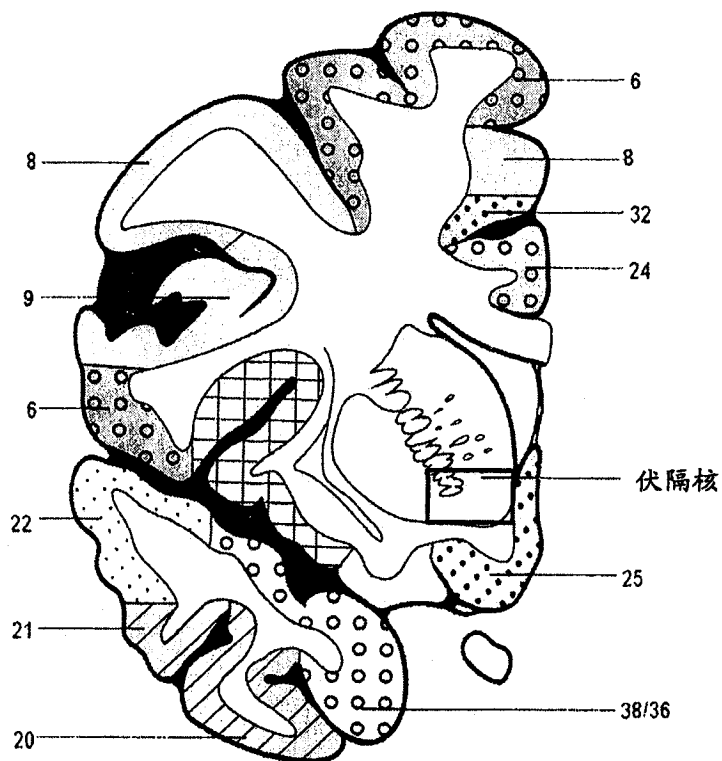


图 2：通过成人前脑纹状体前界限的示意性冠状面。方框区（黑色）标出伏隔核。