



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107922485 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680044992.5

(22)申请日 2016.06.14

(30)优先权数据

62/175,828 2015.06.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/037415 2016.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/205226 EN 2016.12.22

(71)申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 H·艾其尔 S·沃森 C·特纳

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 徐迅 崔佳佳

(51)Int.Cl.

G07K 16/22(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 38/39(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

G12N 15/113(2006.01)

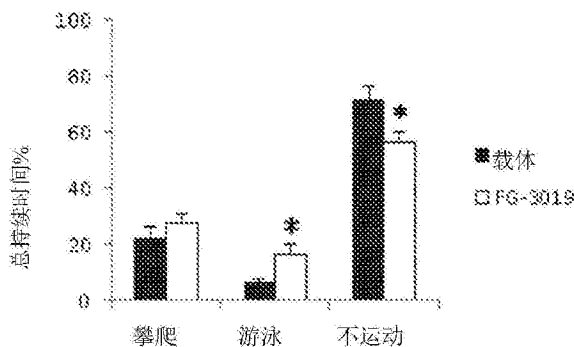
权利要求书2页 说明书29页 附图1页

(54)发明名称

诊断和治疗情绪障碍的方法

(57)摘要

通过检测生物样品中的结缔组织生长因子(CTGF)的表达水平,本发明的方法可用于来确定个体是否患有情绪障碍或有发展为情绪障碍的风险。本发明的方法也可用于鉴定调节(例如降低)CTGF表达水平或活性的化合物。本发明还提供了靶向CTGF以治疗情绪障碍的治疗方法。



1. 一种用于确定个体是否患有情绪障碍或处于发展为情绪障碍的风险中的方法,所述方法包括:

- (a) 检测来自个体的生物样品中结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达水平;
- (b) 比较生物样品中检测到的CTGF的表达水平与CTGF的对照表达水平;和
- (c) 与CTGF的对照表达水平相比,在生物样品中检测到CTGF的表达水平升高时,确定个体患有情绪障碍或处于发展为情绪障碍的风险。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述情绪障碍是情感障碍,焦虑症或焦虑障碍。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述情感障碍是重度抑郁症或双相性精神障碍。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述表达水平是CTGF的mRNA水平。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述生物样品是全血,血清,血浆,唾液,尿液,脑脊液,羊水,乳头抽吸液或组织样品。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述组织样本是脑组织。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述对照表达水平是没有患所述情绪障碍的个体或一群个体中CTGF的表达水平。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中与所述CTGF的对照表达水平相比,所述生物学样品中检测到的CTGF的表达水平高约1倍至约5倍。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述方法还包括检测所述生物样品中CTGF通路成员的表达水平。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述CTGF通路成员选自:ECM2,EGR1,BCL2L2,IGFBP7,P4HA1,PDGFB,MAPKAPK5,MAPK8IP3,PKN1,PRKAG1,CREB1,RHOG,RHOA,SORL1,SOX4,STK3及其组合。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述方法还包括给予所述个体治疗有效量的CTGF抑制剂。

12. 一种鉴定用于治疗情绪障碍的化合物的方法,所述方法包括:

- (a) 使化合物与结缔组织生长因子 (CTGF) 接触;和
- (b) 确定所述化合物是否降低CTGF的表达水平或活性,由此鉴定用于治疗情绪障碍的化合物。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述情绪障碍是情感障碍,焦虑症或焦虑障碍。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述情感障碍是重度抑郁症或双相性精神障碍。

15. 如权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所述化合物与表达CTGF的细胞接触。

16. 如权利要求12至15中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括:

- (c) 将该化合物向动物模型给药。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述方法还包括:

- (d) 确定该化合物对动物模型中CTGF表达水平或活性的影响。

18. 如权利要求16所述的方法,其中所述方法还包括:

- (d) 确定化合物在动物模型中的抗抑郁和/或抗焦虑作用。

19. 一种治疗有需要的个体的情绪障碍的方法,所述方法包括:

- (a) 给予该个体采用权利要求16至18中任一项所述方法鉴定的治疗有效量的化合物。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述情绪障碍是情感障碍,焦虑症或焦虑障碍。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述情感障碍是重度抑郁症或双相性精神障碍。
22. 如权利要求19至21中任一项所述的方法,其中所述化合物通过静脉内,颅内,脑室内,鞘内,脊柱内,腹膜内,肌内,病灶内,鼻内,口服或皮下施用。
23. 一种治疗有需要的个体的情绪障碍的方法,所述方法包括:
 - (a) 向该个体施用治疗有效量的结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂。
24. 如权利要求23所述的方法,其中所述情绪障碍是情感障碍,焦虑症或焦虑障碍。
25. 如权利要求24的方法,其中所述情感障碍是重度抑郁症或双相性精神障碍。
26. 如权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述CTGF抑制剂选自:抗体,干扰RNA,小分子化合物及其组合。
27. 如权利要求26所述的方法,其中所述抗体是人,人源化或嵌合抗-CTGF单克隆抗体或其抗原结合片段。
28. 如权利要求27所述的方法,其中所述人抗CTGF单克隆抗体是FG-3019。
29. 如权利要求23至28中任一项所述的方法,其中所述CTGF抑制剂实质性减轻与所述情绪障碍相关的抑郁症和/或焦虑症的一种或多种症状。
30. 如权利要求23至29中任一项所述的方法,其中所述CTGF抑制剂的治疗有效量是足以降低个体中抑郁症(抗抑郁效果)的量。
31. 如权利要求23至30中任一项所述的方法,其中所述CTGF抑制剂的治疗有效量是足以降低所述个体的焦虑(抗焦虑作用)的量。
32. 如权利要求23至31中任一项所述的方法,其中所述CTGF抑制剂通过静脉内,颅内,脑室内,鞘内,脊柱内,腹膜内,肌内,病灶内,鼻内,口服或皮下施用。

诊断和治疗情绪障碍的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年6月15日提交的美国临时申请号.62/175,828的优先权,为了所有目的将其公开内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 精神疾病包括任何干扰个人行为方式、与人交往方式、和/或日常生活中功能的精神障碍或疾病。美国精神病学协会出版的《精神疾病诊断与统计手册》(DSM)对精神疾病进行分类。最新版本,DSM-5(第五版)列出了以下几类精神障碍:适应障碍、焦虑性障碍、谵妄、痴呆、遗忘和其他认知障碍。通常在婴儿期、孩童时期和成人时期首先诊断的病症,比如学习障碍或沟通障碍、裂性障碍、饮食障碍、人为障碍、冲动控制障碍、由于一般的医疗状况而导致的障碍、情感障碍、临床重要性的其他状况、人格障碍、精神分裂症和其他精神病、性障碍与性别认知障碍、睡眠障碍、躯体形式障碍、和药物性精神障碍。另请参阅<http://www.dsm5.org>。

[0004] 大多数精神障碍的确切原因尚不清楚。心理健康专家认为,精神疾病通常是由基因或遗传性情和触发事件结合。触发事件可能包含环境因素、各种各样的压力,甚至包含身体健康问题。精神疾病在美国很常见。事实上,根据美国精神病学协会,在任何给定的一年,美国五分之一的人口都有某种精神障碍。

[0005] 目前缺乏生物标志物以及诊断的无效性和可靠性和发病率是治疗精神疾病的重要问题。比如,大约15%的人口患有重度抑郁症、大约有1%的人患有双相情感障碍。然而,区分这两种疾病是困难的并且导致至少10-15%的双相情感障碍患者被误诊为重度抑郁症。这种误诊的后果包括,用情绪稳定剂有效治疗延迟,以及寻求或获得双相情感障碍咨询的延迟。

[0006] 药物被广泛用于治疗各种精神疾病。例如,抗抑郁药物用于治疗临床抑郁症以及焦虑症和其他疾病。抗焦虑药用于焦虑症和例如失眠等相关问题。情绪稳定剂主要用于双相情感障碍,主要针对躁狂症而不是抑郁症。抗精神病药物用于精神障碍,例如精神分裂症。兴奋剂是常用的,特别是关注缺陷多动障碍(ADHD)。然而,人们担心缺乏有效性,服用药物的长期性(long onset of action),和与使用这种药物相关的副作用。

[0007] 正因如此,本领域需要改进的方法来精确和可靠地诊断精神疾病,尤其情绪障碍,如情感障碍(例如,重度抑郁症)。此外,尽管存在各种不同的药物,但是本领域需要改进的药物来治疗精神障碍,特别是情绪障碍,例如情感障碍(例如重度抑郁症)及其症状。本发明满足了这些需求并提供了相关的优点。

发明内容

[0008] 本发明的方法可用于通过检测生物样品中的结缔组织生长因子(CTGF)的表达水平来确定个体是否具有或有发展为情绪障碍的风险。本发明的方法也可用于鉴定调节(例如降低)CTGF表达水平或活性的化合物。本发明进一步提供了靶向CTGF以治疗情绪障碍的

治疗方法。

[0009] 在一个方面,本发明提供了一种用于确定个体是否具有或有风险发展为情绪障碍的方法,所述方法包括:

[0010] (a) 检测来自个体的生物样品中CTGF的表达水平;

[0011] (b) 比较生物样品中检测到的CTGF的表达水平与CTGF的对照表达水平;和

[0012] (c) 与CTGF的对照表达水平相比,当在生物样品中检测到CTGF的表达水平升高时,确定个体患有情绪障碍或处于发展情绪障碍的风险中。

[0013] 另一方面,本发明提供了鉴定用于治疗情绪障碍的化合物的方法,所述方法包括:

[0014] (a) 使化合物与结缔组织生长因子 (CTGF) 接触;和

[0015] (b) 确定所述化合物是否降低CTGF的表达水平或活性,由此鉴定用于治疗情感障碍的化合物。

[0016] 另一方面,本发明提供了治疗有需要个体的情绪障碍的方法,所述方法包括:

[0017] (a) 向个体施用治疗有效量的结缔组织生长因子 (CTGF) 抑制剂。

[0018] 从下面的详细描述和附图中,本发明的其它目的,特征和优点对于本领域技术人员将是显而易见的。

附图说明

[0019] 图1显示,在急性给药抗-CTGF抗体后的强迫游泳试验 (FST) 中,动物不运动的总持续时间百分比显著降低,游泳的总持续时间百分比显著增加。

[0020] 图2显示,在长期给药抗-CTGF抗体后的强制游泳试验 (FST) 中,动物不运动的总持续时间百分比显著降低,攀爬的总持续时间百分比显著增加。

具体实施方式

[0021] I. 介绍

[0022] 本发明是基于这样的发现,即,相对于对照,在重度抑郁症 (MDD) 个体的杏仁核中结缔组织生长因子 (CTGF) 显著上调。因此,本发明的方法可用于通过检测从该个体获得的生物样品中CTGF的表达水平来确定该个体是否具有或有风险发展为情绪障碍的风险。

[0023] 本发明还基于以下发现:在动物模型中施用抗-CTGF抗体降低了抑郁样行为。因此,本发明的方法也可用于靶向CTGF表达或活性以治疗情感障碍,例如MDD。在具体的实施方案中,本文所述的治疗方法包括抗-CTGF抗体疗法,以便在患有例如MDD的情感障碍个体中产生抗抑郁作用。

[0024] II. 定义

[0025] 这里使用的术语“一 (a)”,“一个 (an)”或“该 (the)”不仅包括具有一个成员的方面,而且还包括具有多于一个成员的方面。例如,除非上下文明确地指示其他情况,否则单数形式“一 (a)”,“一个 (an)”或“该 (the)”包括复数指示物。因此,例如,对“一个细胞”的引用包括多个这样的细胞,并且对“药剂”的引用包括对本领域技术人员已知的一种或多种药剂的引用,等等。

[0026] 术语“受试者”,“患者”或“个体”在本文中可互换适用于人或动物。例如,动物受试者可以是哺乳动物、灵长类动物 (例如猴)、家畜 (例如马、牛、绵羊、猪或山羊)、伴侣动物 (例

如狗、猫)、实验室试验动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、鸟)、具有兽医意义的动物或具有经济意义的动物。

[0027] 术语“结缔组织生长因子”或“CTGF”是指细胞外基质相关的肝素结合蛋白的CCN家族的基质细胞蛋白。CTGF在许多生物学过程中具有重要作用,包括细胞粘附,迁移,增殖,血管生成,骨骼发育和组织创伤修复,并且重要参与纤维化疾病和多种形式的癌症。包括CTGF在内的CCN蛋白家族的成员在结构上具有四个保守的、富含半胱氨酸结构域。这些结构域是从N-端到C-末端的胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)结构域,血管性血友病C型重复序列(vWC)结构域,血小板反应蛋白1型重复序列(TSR)结构域以及含有半胱氨酸基序的C末端结构域。CTGF以环境依赖的方式与各种细胞表面受体,例如整联蛋白受体、细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPGs),LRPs和TrkA结合以发挥其功能。另外,CTGF结合生长因子和细胞外基质蛋白。CTGF的N-末端一半与聚集蛋白聚糖相互作用,TSR结构域与VEGF相互作用,以及C末端结构域与TGF- β 超家族成员,纤维粘连蛋白,基底膜聚糖,衰老关键蛋白抗原(fibulin-1),狭缝和粘蛋白相互作用。智人CTGF mRNA序列描述在,例如,GenBank登记号NM_001901.2。智人CTGF多肽序列描述在,例如,GenBank登记号NM_001892.1。CTGF也称为CCN家族成员2(CCN2),NOV2,肥厚性软骨细胞特异性蛋白24(HCS24),和胰岛素样生长因子结合蛋白8(IGFBP8)。

[0028] 术语“情绪障碍”是指以情绪,感觉或情感的异常紊乱为特征的任何精神障碍。情绪障碍的非限制性实例包括情感障碍(例如所有形式和/或类型的抑郁症,双相情感障碍等),焦虑症和焦虑性障碍,如,例如精神障碍的心理诊断和统计手册(DSM),第五版(DSM-5)。

[0029] “情感障碍”包括个人长时间经历的感觉,健康状态或情绪状态的中断。情感障碍包括但不限于抑郁症(即抑郁症),双相情感障碍,物质诱发的情感障碍,酒精诱发的情感障碍,苯二氮卓类诱发的情感障碍,由于一般医学状况导致的情感障碍,也有很多其他。参见例如DSM-5。

[0030] 术语“抑郁症”或“抑郁障碍”是指涉及以下任何症状的情感障碍:持续的悲伤、焦虑和/或“空虚”情绪、感到绝望和/或悲观、内疚感、毫无价值,和/或无助、失去兴趣或兴趣爱好和曾经享有的活动:包括性、能量下降、疲劳和/或“减慢”、难以集中注意力、回忆和/或作出决定、失眠、清晨觉醒和/或睡过头、食欲不振和/或体重减轻、暴饮暴食和/或体重增加、死亡和/或自杀的想法、自杀企图、烦躁不安和/或易怒、对治疗无反应的持久性身体症状,如头痛、消化系统疾病和/或慢性疼痛及其组合。参见例如DSM-5。抑郁症的非限制性实例包括重度抑郁症(MDD),非典型抑郁症,抑郁型忧郁,重型精神病性抑郁症或精神病性抑郁症,紧张性抑郁症,产后抑郁症,季节性情感障碍(SAD),慢性抑郁症(dysthymia),双重抑郁症,没有其他特别的抑郁症,抑郁性格障碍(DPD),反复短暂性抑郁症(RBD),轻微抑郁症(轻度抑郁症),经前期综合症,由慢性医疗条件引起的抑郁症(如癌症,慢性疼痛,化疗,慢性压力),及其组合。在例如DSM-5中描述了各种抑郁症的亚型。在具体的实施方案中,抑郁症是重度抑郁症(MDD)。

[0031] “双相情感障碍”包括以极端情绪交替期为特征的情感障碍。患有双相情感障碍的人经历的情绪循环通常从过度兴奋或易怒(躁狂)转变为悲伤和绝望(抑郁),然后再返回,其间具有正常情绪。在例如DSM-5中描述了双相情感障碍的诊断。双相情感障碍包括双相情

感障碍I (伴有或不伴有严重抑郁症的躁狂症), 双相型精神障碍II (伴有严重抑郁症的轻躁狂症) 和循环性精神。参见例如DSM-5。双相情感障碍也被称为躁郁症。

[0032] “焦虑”包括以担心, 神经质, 不安和/或紧张为特征的情况, 通常是关于即将发生的事件或一些结果不确定的事情。焦虑的症状包括但不限于恐惧, 恐慌, 心悸, 呼吸短促, 疲劳, 恶心, 头痛 (例如紧张性头痛), 心动过速, 肌肉无力和/或紧张, 胸痛, 胃痛, 脸色苍白, 出汗, 颤抖, 瞳孔扩张, 惊恐发作及其组合。参见例如DSM-5。在某些情况下, 本发明的方法治疗或缓解一种或多种焦虑症状。在其他情况下, 本发明的方法治疗焦虑症或焦虑性障碍症。焦虑性障碍症的非限制性实例包括广泛性焦虑症, 强迫症, 恐慌症, 广场恐怖症, 创伤后应激障碍 (PTSD), 社交焦虑症及其组合。

[0033] 术语“生物样品”是指包含来自任何生物资源的生物材料的任何样品, 其可能含有感兴趣的分析物 (例如CTGF)。例如, “生物样品”可以包括全血, 血清, 血浆, 唾液, 尿液, 脑脊髓液, 羊水, 乳头吸出物, 粪便, 胆汁, 眼泪, 汗液, 精子, 阴道液或组织样品 (例如脑组织)。在一些实施方案中, 生物样品例如来自细胞, 组织或器官的活组织检查。在某些情况下, 生物样品是来自特定脑区如杏仁核 (例如杏仁核的附属基底核 (AB)) 的组织样品。

[0034] 结合, 活性或表达的“抑制剂”, “激活剂”和“调节剂”分别包括使用体外和体内测定法来鉴定结合, 活性或表达的抑制, 激活或调节分子, 例如配体, 激动剂, 拮抗剂, 其同系物和模拟物。术语“调节剂”包括抑制剂和活化剂。抑制剂是例如与多肽结合并抑制, 部分或完全阻断刺激或酶活性, 降低, 预防, 延迟激活, 失活, 脱敏或下调多肽的活性或表达的药剂; 或降低, 减少或下调编码多肽的mRNA的表达, 例如拮抗剂, 活化剂是例如结合, 刺激, 增加, 打开, 激活, 促进, 增强激活或酶活性, 致敏或上调多肽的活性或表达的试剂; 或增加, 增强或上调编码多肽的mRNA的表达, 例如激动剂。调节剂包括天然存在的和合成的配体, 拮抗剂, 激动剂, 小分子化合物等。

[0035] 术语“测试化合物”或“候选药物”包括天然存在或合成的任何分子, 例如蛋白质, 多肽, 肽, 小有机分子, 多糖, 脂质, 脂肪酸, 多核苷酸, 寡核苷酸等, 测试化合物可以是测试化合物文库的形式, 例如提供足够范围的多样性的组合或随机文库。测试化合物任选连接至融合伴侣, 例如靶向化合物, 拯救化合物 (rescue compound), 二聚化合物, 稳定化合物, 可寻址化合物 (addressable compound) 和其他功能部分。通常, 通过鉴定具有某些所需性质或活性的测试化合物 (称为“先导化合物”), 例如抑制活性, 产生先导化合物的变体, 并评估那些变体的特性和活性, 在某些实施方案中, 高通量筛选 (HTS) 方法用于这样的分析。

[0036] 当应用于核酸或蛋白质时, 术语“分离的”表示该核酸或蛋白质基本上不含与天然状态相关的其他细胞组分。虽然它可以在干燥或水溶液中, 但优选处于均匀状态。纯度和均一性通常使用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱来确定。作为存在于制剂中主要物质的蛋白质基本上被纯化。具体而言, 分离的基因与侧接该基因并编码蛋白质的开放读框分开, 而非感兴趣基因。术语“纯化的”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一条带。特别地, 这意味着所述核酸或蛋白质具有至少85%的纯度、至少95%的纯度或至少99%的纯度。

[0037] 术语“核酸”或“多核苷酸”包括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。除非特别限定, 否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸, 其具有与参照核酸相似的结合特性, 并且以类似于天然存在的核苷酸的方式被代谢。除非另外指

出,否则特定的核酸序列也隐含地包括其保守修饰的变体(例如简并密码子取代),等位基因,同源序列,SNP,和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可通过产生序列来实现,该序列一个或多个所选(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代。(Batzer等.,*Nucleic Acid Res.*19:5081(1991);Ohtsuka等.,*J.Biol.Chem.*260:2605-2608(1985);和Cassol等.(1992);Rossolini等.,*Mol.Cell.Probes* 8:91-98(1994))。术语核酸可以与由基因,cDNA和基因编码的mRNA互换使用。

[0038] 术语“多肽”,“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以包括氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于氨基酸聚合物,其中氨基酸聚合物的一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物的人造化学模拟物。如本文所用,术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质(即抗原),其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0039] 术语“氨基酸”包括天然存在的和合成的氨基酸,以及与天然存在的氨基酸起类似作用方式的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是那些由遗传密码编码的氨基酸,以及那些后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸, γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物包括具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢,羧基,氨基和R基团结合的 α 碳,例如高丝氨酸,正亮氨酸,甲硫氨酸亚砷,甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”包括具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。

[0040] 氨基酸在本文中可以通过公知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来表示。同样,核苷酸可以用它们通常接受的单字符编码来表示。

[0041] 适用于氨基酸和核酸序列的“保守性修饰的变体”。就特定的核酸序列而言,“保守性修饰的变体”包括那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸,或者其中不编码氨基酸序列的核酸,实质上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA,GCC,GCG和GCU都编码丙氨酸。因此,在每一个位置上,一个丙氨酸是由一个密码子指定的,密码子可以被修改为任何的所描述的密码子,而不需要改变编码的多肽。这种核酸的变异是“沉默的变异”(silent variations),是一种保守的改良变种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了通常AUG是甲硫氨酸的唯一密码子和TGG通常是色氨酸的唯一密码子外)可被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都隐含在每个描述的序列中。

[0042] 就氨基酸序列而言,技术人员将认识到,对核酸,肽,多肽或蛋白质序列的单个取代,缺失和/或添加能够改变,添加或缺失一个氨基酸或一小部分序列是“保守性修饰的变体”的编码,其中改变导致用化学上相似的氨基酸取代氨基酸。

[0043] 以下八组各自含有彼此保守替换的氨基酸:

[0044] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0045] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0046] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0047] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0048] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),蛋氨酸(M),缬氨酸(V);

[0049] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0050] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0051] 8) 半胱氨酸(C),蛋氨酸(M)

[0052] (参见例如Creighton,Proteins(1984))。

[0053] 当用于例如细胞或核酸,蛋白质或载体时,术语“重组”表示该细胞,核酸,蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而被修饰或者源自如此修饰的细胞的细胞。例如,重组细胞表达的基因,该基因在天然(非重组)形式的细胞内未发现,或表达天然基因,所述天然基因表达异常,表达不足或完全不表达。

[0054] 术语“抗体”是指实质上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因编码的多肽,或其特异性结合和识别分析物(抗原)的片段。公认的免疫球蛋白基因包括 κ (kappa), λ (lambda), α (alpha), γ (gamma), δ (delta), ϵ (epsilon)和 μ (mu)恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ (kappa)或 λ (lambda),重链分为 γ (gamma), μ (mu), α (alpha), δ (delta)或 ϵ (epsilon),其又定义了免疫球蛋白类别,分别为IgG,IgM,IgA,IgD,and IgE。示例性的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一个“轻”链(约25kD)和一个“重”链(约50-70kD)。每条链的N端限定了主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别是指这些轻链和重链。可变区氨基酸序列的变化是抗原结合位点的巨大差异的原因,发生在三个高度可变区中最大的变异性,称为互补决定区(CDRs)。抗体的尾区域,被称为Fc区域,由每个重链组成的两个恒定区(C_H2,和C_H3)组成。Fc区域负责通过与中性粒细胞和大噬细胞的Fc受体的结合来吸收效应功能(recruiting effector functions)。

[0055] 抗体作为,例如完整的免疫球蛋白或通过各种肽酶消化产生的许多良好表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区二硫键下方消化抗体以产生F(ab)'₂,即其本身是通过二硫键将V_H-C_H1连接的轻链的Fab二聚体。F(ab)'₂可以在温和的条件下被还原以打断铰链区中的二硫键,从而将F(ab)'₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体实质上是具有部分铰链区的Fab(参见Paul(编)《基础免疫学》(Fundamental Immunology),第三版,雷文出版社(Raven Press),纽约(1993))。尽管根据完整抗体的消化来确定各种抗体片段,但本领域技术人员将会理解,这样的片段可以以化学方式或通过利用重组DNA方法从头合成。因此,本文使用的术语“抗体”还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段或使用重组DNA方法从头合成的抗体片段(例如单链F_v产生)。

[0056] 术语“人源化抗体”是指包含至少一个链的抗体,所述链包含基本上来自人体抗体链(称为受体免疫球蛋白或抗体)的可变区框架残基和基本上来自小鼠抗体(称为供体免疫球蛋白或抗体)的至少一个互补决定区(CDRs)。参见,例如,Queen等., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989),美国专利号5,530,101,美国专利号5,585,089,美国专利号5,693,761,WO 90/07861,和美国专利号5,225,539。恒定区(如果存在的话)也可以基本上或完全来自人体免疫球蛋白。制备人源化抗体的方法是本领域已知的。参见例如,美国专利号7,256,273。

[0057] 在描述特定分子与蛋白质或肽的结合关系的语境时,短语“特异性结合”,是指决定蛋白质和其他生物制品的异质群体(heterogeneous population)中某蛋白质是否存在

的结合反应。因此,在指定的结合试验条件下,特定的结合剂(例如抗体)与特定的蛋白质结合是背景(background)的至少两倍,并且不显著地结合样品中存在的其它大量存在的蛋白质。在这样的条件下抗体的特异性结合可能需要因其对特定蛋白质或某蛋白而非其相似的“姊妹”蛋白的特异性而选择的抗体。可以使用各种免疫测定形式来选择抗体或其片段,它们与特定蛋白质特异性免疫反应或是特定的形式。例如,常规使用固相ELISA免疫测定来选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体,(参见,例如.,Harlow和Lane,《抗体,实验室手册》(Antibodies,A Laboratory Manual)(1988)用于描述可用于确定特异性免疫的免疫测定形式和条件)。典型地,特异性或选择性的结合反应将是背景信号或噪声的至少两倍,更典型地超过背景的10至100倍。

[0058] 术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”包括单链RNA(例如,成熟miRNA,ssRNAi寡核苷酸,ssDNAi寡核苷酸),双链RNA(即,双链RNA如小干扰RNA(siRNA),Dicer-底物dsRNA,shRNA,aiRNA或pre-miRNA),DNA-RNA杂合体或能够减少或抑制靶基因或序列表达的DNA-DNA杂合体(例如通过介导降解或抑制和干扰与RNA序列互补的mRNA的翻译),当干扰RNA与靶基因或序列处于同一细胞时,干扰RNA因此是指与靶mRNA序列互补的单链RNA或与由两条互补链形成的双链RNA或通过单一的自互补链互补的单链RNA。干扰RNA可以与靶基因或序列或者可以包含错配区域(即,错配基序)具有实质或完全的同源性。干扰RNA的序列可以对应于全长靶基因或其子序列。在一些实施方案中,干扰RNA分子是化学合成的。干扰RNA分子还可以通过用大肠杆菌RNA酶III或Dicer酶裂解较长的dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生。在其他实施方案中,干扰RNA分子可以由质粒编码(例如,被转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。

[0059] 在一般或控制人口中,“患情绪障碍的风险”的个体是指与普通人群或对照人群中的平均个体(例如人)相比,具有患例如:情绪障碍、焦虑症或焦虑障碍等情绪障碍倾向更高可能性的个体(例如,人类)。

[0060] “治疗有效量”包括在必要的剂量和时间内获得期望的治疗或预防结果的量或有效量。

[0061] III.具体实施例详述

[0062] 在一个方面,本发明提供了一种用于确定个体是否具有或有风险发展为情感障碍的方法,所述方法包括:

[0063] (a)检测来自个体的生物样品中CTGF的表达水平;

[0064] (b)比较生物样品中检测到的CTGF的表达水平与CTGF的对照表达水平;和

[0065] (c)与CTGF的对照表达水平相比,当在生物样品中检测到CTGF的表达水平升高时,确定个体是否具有或有风险发展为情感障碍。

[0066] 在一些实施方案中,情感障碍是情绪障碍,焦虑症或焦虑障碍。在某些情况下,情绪障碍是重度抑郁症(MDD)或躁郁症(BP)。在优选的实施方案中,个体是人。

[0067] 在一些实施方案中,CTGF的表达水平是CTGF的mRNA水平。mRNA水平可以用例如杂交测定法或基于扩增测定的测定方法来检测或测量。在某些情况下,通过使用包含诸如5'-CAGTGTCTTGGCAGGCTGATTTCTAGGTAGGAAATGTGGTAGCTCACGC-3'(SEQ ID NO:1)或其片段序列的探针检测杂交来进行微阵列分析以检测或测量CTGF mRNA水平。在某些其它情况下,通过使用包含正向引物序列如5'-TGGAGTTCAAGTGCCCTGAC-3'(SEQ ID NO:2)或其片段和反向

引物序列如5'-ACTGCTCCTAAAGCCACACC-3' (SEQ ID NO:3) 或其片段的引物对检测扩增来进行逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 以确定和量化CTGF mRNA水平。

[0068] 在其他实施方案中,CTGF的表达水平是CTGF的蛋白水平。蛋白质水平可以用例如免疫测定法(例如ELISA),免疫组织化学测定法或多重免疫阵列的测定法来检测或测量。

[0069] 在一些实施方案中,生物样品是全血,血清,血浆,唾液,尿液,脑脊髓液,羊水,乳头吸出物或组织样品。在某些情况下,组织样品是脑组织。脑组织可以来自任何脑区,包括额叶皮层(例如背外侧前额叶皮层),前扣带皮层,小脑皮层,颞上回,顶叶皮质,伏隔核,杏仁核或其组合。在其他实施方案中,该方法还包括在步骤(a)之前从个体获得生物样品。

[0070] 在某些实施方案中,对照表达水平是没有情感障碍的个体或个体群体(即年龄和/或性别匹配的对照个体或群体)中CTGF的表达水平(例如mRNA或蛋白水平)。在具体的实施方案中,生物样品中检测到的CTGF的表达水平(例如mRNA或蛋白水平)与CTGF的对照表达水平相比增加超过1倍。例如,与对照表达水平的CTGF相比较,在生物样品中检测到的CTGF的表达水平(例如,mRNA或蛋白水平)可以增加超过约1.1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10倍,或约1至2、1至3、1至4、1至5、1至6、1至7、1至8、1至9、1至10、2至3、2至4或2至5倍。在某些情况下,将CTGF的表达水平(例如mRNA或蛋白水平)根据一个或多个管家基因标准化,然后与没有情感障碍对照个体或群体中CTGF的标准化表达水平(例如mRNA或蛋白水平)比较,以确定CTGF表达水平的倍数差异。在具体的实施方案中,具有或有风险发展为情感障碍(例如,严重抑郁障碍)的个体(例如:人)的杏仁核或其核(例如,附属基底(AB),AAA,AHA,基底和/或横向细胞核)中检测到CTGF的表达水平(例如mRNA或蛋白水平),比CTGF的对照表达水平相比高1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2或2.1倍,或约1至2、1至3、1.5至2.5或1.5至2倍。

[0071] 在其他实施方案中,所述方法还包括在生物样品中检测CTGF通路成员,例如ECM2, EGR1, BCL2L2, IGFBP7, P4HA1, PDGFB, MAPKAPK5, MAPK8IP3, PKN1, PRKAG1, CREB1, RHOG, RHOA, SORL1, SOX4, STK3和/或本领域已知的CTGF通路的任何其他成员的表达水平。

[0072] 在一个相关方面,本发明提供了用于诊断和治疗个体(例如人)的情感障碍(例如,重性抑郁症)的方法,所述方法包括:

[0073] (a) 检测来自个体的生物样品中结缔组织生长因子(CTGF)的表达水平;

[0074] (b) 比较生物样品中检测到的CTGF的表达水平与CTGF的对照表达水平;

[0075] (c) 当生物样品中检测到的CTGF的表达水平与CTGF的对照表达水平相比增加时,诊断个体具有情感障碍;和

[0076] (d) 向诊断的个体施用治疗有效量的CTGF抑制剂。

[0077] 另一方面,本发明提供了鉴定用于治疗情感障碍的化合物的方法,所述方法包括:

[0078] (a) 使化合物与结缔组织生长因子(CTGF)接触;和

[0079] (b) 确定所述化合物是否降低CTGF的表达水平或活性,由此鉴定用于治疗情感障碍的化合物。

[0080] 在一些实施方案中,情感障碍是情绪障碍,焦虑症或焦虑症。在某些情况下,情感障碍是重度抑郁症(MDD)或躁郁症(BP)。在优选的实施方案中,个体是人。

[0081] 在某些实施方案中,化合物与表达CTGF的细胞接触。在具体的实施方案中,与未接

触化合物的CTGF的表达水平或活性相比,所述化合物使CTGF的表达水平或活性降低超过1倍。例如,与化合物接触的CTGF的表达水平或活性可以降低超过约1.1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10倍或约1至2、1至3、1至4、1至5、1至6、1至7、1至8、1至9、1至10、2至3、2至4或2至5倍。在某些情况下,将与化合物接触的CTGF的表达水平或活性根据一种或多种管家蛋白标准化,然后与未与化合物接触的标准化CTGF水平进行比较,以确定CTGF水平或活性的倍数差异。

[0082] 在其它实施方案中,所述方法还包括将化合物与CTGF通路成员接触,例如ECM2, EGR1, BCL2L2, IGFBP7, P4HA1, PDGFB, MAPKAPK5, MAPK8IP3, PKN1, PRKAG1, CREB1, RHOG, RHOA, SORL1, SOX4, STK3和/或本领域已知的CTGF通路的任何其他成员。在相关的实施方案中,细胞进一步表达一种或多种CTGF通路成员。

[0083] 在一些实施方案中,该方法还包括将该化合物施用于动物模型。在具体的实施方案中,动物模型能够鉴定和评估感兴趣行为,例如焦虑样行为和/或抑郁样行为的个体差异。在某些情况下,动物模型包括远交系大鼠。在某些其他情况下,动物模型选自具有高度焦虑和抑郁样行为的大鼠模型(“高反应者”或bLR),具有低焦虑和抑郁样行为的大鼠模型(“低反应者”或bHR)及其组合。参见例如Clinton等, *Eur. J. Neurosci.*, 34:994-1005 (2011); Fligel等, *Neuropharmacology*, 76:425-436 (2014); Jama等, *Psychopharmacology*, 198:333-340 (2008); 和Stead等, *Behavior Genetics*, 36:697-712 (2006)。在某些实施方案中,该方法还包括确定化合物对动物模型中CTGF的表达水平或活性的影响。在其他实施方案中,该方法还包括确定化合物在动物模型中的抗抑郁和/或抗焦虑作用。

[0084] 另一方面,本发明提供了一种治疗有需要的个体的情感障碍的方法,所述方法包括:

[0085] (a) 向个体施用治疗有效量的使用本文所述方法鉴定的化合物。

[0086] 在一些实施方案中,情感障碍是情绪障碍,焦虑症或焦虑障碍。在某些情况下,情感障碍是重度抑郁症(MDD)或躁郁症(BP)。在优选的实施方案中,个体是人。

[0087] 在其它实施方案中,静脉内,颅内,脑室内,鞘内,脊柱内,腹膜内,肌内,病灶内,鼻内,口服或皮下施用所述化合物。

[0088] 另一方面,本发明提供了一种治疗有需要的个体的情感障碍的方法,所述方法包括:

[0089] (a) 向个体施用治疗有效量的结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂。

[0090] 在一些实施方案中,情感障碍是情绪障碍,焦虑症或焦虑症。在某些情况下,情感障碍是重度抑郁症(MDD)或躁郁症(BP)。在优选的实施方案中,个体是人。

[0091] 在某些实施方案中,CTGF抑制剂选自抗体或其片段,干扰RNA,小分子化合物及其组合。

[0092] 在一些实施方案中,抗体是人抗体,人源化抗体或嵌合抗CTGF单克隆抗体或其抗原结合片段。在具体的实施方案中,抗CTGF抗体是中和抗体。在某些实施方案中,抗CTGF抗体是如美国专利号7,405,274和国际专利公开号WO2004/108764中所述的重组人IgG1 κ 单克隆抗体FG-3019(CLN-1)。在具体的实施方案中,抗CTGF抗体识别人CTGF(例如FG-3019)的结构域2内的表位。适用于治疗情感障碍(例如通过阻断CTGF的结合或活性)的其它抗CTGF抗

体的非限制性实例包括美国专利号5,408,040、6,562,618、7,541,438、7,871,617和8,865,173中所述的抗CTGF抗体;国际专利公开号WO 99/33878、WO1999/00740、WO2000/035936、WO2007/066823、WO2012/100262和WO2013/094723;和日本专利公开号JP-A-2000-232884。适用于治疗情感障碍(例如,通过阻断CTGF的结合或活性)的另外的抗CTGF抗体的非限制性实例包括Ikawa等人描述的抗CTGF中和性单克隆抗体(J. Cell Physiol, 216:680-7 (2008)), Gao等人描述的抗CTGF人源化单链可变片段抗体(scFv)单体和二聚体(PLoS ONE, 9 (12): e113980 (2014))和PeproTech(目录号500-P252;伦敦,英国)的抗CTGF中和抗体。

[0093] 适用于治疗情感障碍(例如通过减少或抑制CTGF表达)的干扰RNA构建体的非限制性实例包括RXI-109(减少CTGF表达的自递送RNAi,可从RXi药物公司获得),病毒CTGF复制小发夹RNA(shRNA)(Ann. Hematol, 93:485-492 (2014)), Winkler等人描述的CTGF特异性小干扰RNA(siRNA)序列(Mol Vis, 18:874-86 (2012);参见Winkler等人的表1), Luo等人描述的siRNA靶向CTGF分子(Transplant Proc, 40:2365-9 (2008)),可从Biognostik GmbH(哥廷根,德国)获得的CTGF反义寡核苷酸,美国专利号7,709,630中描述的反义寡核苷酸,Croci等所述的相对于CTGF mRNA(GenBank登录号NM_001901)的起始密码子的第一个核苷酸的靶向编码区360-380位核苷酸的CTGF siRNA序列(Cancer Res, 64:1730-1736 (2004)),以及使用公开的技术设计的任何干扰RNA构建体,例如本文所述的靶向CTGF mRNA序列(例如, GenBank登录号NM_001901.2)并敲减CTGF表达(knocksdown the expression of CTGF)的方法。

[0094] 用于治疗情感障碍(例如通过阻断CTGF的结合或活性或通过减少或抑制CTGF的表达)的小分子抑制剂的非限制性实例包括PBI-4050(ProMetic Life Sciences Inc.), DN-9693(Daiichi Pharmaceutical Co.Ltd.),美国专利号7,351,407中公开的小分子化合物(例如:GW-8510, purvalanol A, roscovitine, SB-216763, alsterpaullone, 9-氰基丙酮, kenpaullone, 曲格列酮, ciglitazone),美国专利公开号2012/0156216中描述的HMG-CoA还原酶抑制剂化合物,(例如阿托伐他汀,贝伐斯他汀,西立伐他汀,美伐他汀,达伐他汀,二氢维乙酸,氟伐他汀,格仑伐他汀,洛伐他汀,美伐他汀,尼伐他汀(nisvastatin),普伐他汀,匹伐他汀,利伐他汀,罗苏伐他汀,辛伐他汀,维斯他汀等)和使用本文所述筛选方法鉴定的降低CTGF表达水平或活性的任何化合物,以及它们的衍生物,类似物和前药。

[0095] 在一些实施方案中,静脉内,颅内,脑室内,鞘内,脊柱内,腹膜内,肌内,病灶内,鼻内,口服或皮下施用CTGF抑制剂。在其他实施方案中,CTGF抑制剂被急性或长期给予个体。在具体的实施方案中,本发明的方法包括向个体急性或长期施用治疗有效量的抗CTGF抗体(例如FG-3019)。

[0096] 在某些实施方案中,CTGF抑制剂的治疗有效量包含约0.5、1、2、5、10、20、40、50、75、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、750、800或900mg,或约1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10克(g)抑制剂,例如每天。在某些其他实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂包含约0.001mg/kg至约1,000mg/kg,约0.01mg/kg至约1,000mg/kg,约0.1mg/kg至约1,000mg/kg,约0.1mg/kg至约100mg/kg,约1至约10mg/kg,约1mg/kg,约5mg/kg,约10mg/kg,约50mg/kg,约100mg/kg,约200mg/kg,约300mg/kg,约400mg/kg,约500mg/kg,约600mg/kg,约700mg/kg,约800mg/kg,约900mg/kg或约1,000mg/kg抑制剂,例如每天。期望的剂量可以以单剂量(in a single dose)方便施药,或以适当的时

间间隔施用多次剂量,例如每天两次,三次,四次或更多次亚剂量。

[0097] 在一些实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂急性给药,例如在短时间内(例如:跨越少于约24小时的时间),单剂量或多剂量给予个体。在其它实施方案中,将治疗有效量的CTGF抑制剂长期给药,例如跨越数小时(例如每24、48或72小时),数天,数周,数月或数年的重复剂量给予个体。作为非限制性实例,包含本文描述的CTGF抑制剂的药物组合物可以每天至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次给予;至少每周1、2、3、4、5、6或7天给予;至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、18、19、20天或更多周或数月给予。在某些情况下,可引入几天(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多天)到几周(例如1、2、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多周)的停药期(a rest period),以改善治疗的耐受性和/或功效。

[0098] 在某些实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂基本上减轻与情感障碍相关的抑郁症和/或焦虑症的一种或多种症状,例如给药后约15分钟或更多、约30分钟或更多、约1小时或更多、约1天或更多、约1周或更多、约2周或更多、或约4周或更多。在一些实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂是足以降低个体抑郁症(抗抑郁效果)的量。在其他实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂是足以减少个体的焦虑(抗焦虑效果)的量。

[0099] 在一些实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂包含足以产生抗抑郁作用而基本上没有任何分离副作用的量。在其它实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂包含足以产生抗抑郁效果而基本上不镇静的量。在又一些实施方案中,治疗有效量的CTGF抑制剂包含不具有滥用可能性的量(例如可能不是习惯形成)。

[0100] 在一些实施方案中,本文描述的CTGF抑制剂提供改善的血脑屏障(BBB)穿透并且能够容易地穿过血脑屏障BBB。在其他实施方案中,本文描述的CTGF抑制剂提供改善的体内效力和/或脑水平浓度,例如相对于血浆水平。在其他实施方案中,本文描述的CTGF抑制剂具有广泛的治疗指数,提供高治疗指数或其组合。

[0101] IV. 基因表达的检测

[0102] 根据本发明,编码结缔组织生长因子(CTGF)多肽的多核苷酸的表达水平的检测对于诊断应用可用于,例如确定个体是否具有或有风险发展为情感障碍。此外,基因表达的检测对于鉴定CTGF多肽或编码相同多核苷酸的表达水平的调节剂是有用的。

[0103] 在某些情况下,用例如杂交测定法或基于扩增测定法的测定法在核酸(例如,mRNA)表达的水平检测CTGF的存在或水平。在某些其他情况下,使用例如免疫测定法(例如ELISA),免疫组织化学测定法或复合免疫阵列,在蛋白质表达水平检测CTGF的存在或水平。

[0104] 本领域技术人员已知使用核酸杂交技术的多种特定DNA和RNA测量方法。一些方法涉及电泳分离(例如,用于检测DNA的Southern印迹和用于检测RNA的Northern印迹),但是也可以在不存在电泳分离的情况下(例如通过斑点印迹)测量DNA和RNA。

[0105] 核酸杂交形式的选择并不重要。各种核酸杂交形式是本领域技术人员已知的。例如,常见的形式包括夹心分析和竞争或置换分析。杂交技术通常描述于Hames和Higgin,《核酸杂交,实用方法》(Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach), IRL出版社(1985); Gall和Pardue, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 63:378-383 (1969); 和John等, Nature, 223:582-587 (1969)。

[0106] 杂交复合物的检测可能需要信号生成复合物与靶和探针多核苷酸或靶和核酸的双链体结合。通常,这种结合通过配体和抗配体相互作用发生,就像在配体缀合的探针和与

信号缀合的抗配体之间。信号产生复合物的结合也容易顺从通过暴露于超声波能量而加速。

[0107] 标记物也可以允许间接检测杂交复合物。例如,在标记物是半抗原或抗原的情况下,可以通过使用抗体来检测样品。在这些系统中,信号是通过将荧光或酶分子连接到抗体上产生的,或者在某些情况下通过附着到放射性标记物上而产生。(参见,例如:Tijssen,“酶免疫测定的实践和理论”Practice and Theory of Enzyme Immunoassays,《生物化学和分子生物学的实验室技术》(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology),Burdon和van Knippenberg编.,Elsevier(1985),第9-20页)。

[0108] 探针通常直接标记,如用同位素、发色团、荧光染料、色团;或间接地标记,例如用生物素,链霉抗生物素蛋白复合物随后可能与之结合。因此,可检测标记物可以是主要标记物(其中标记物包括直接检测的元件或产生可直接检测元件的元件)或次要标记物(其中检测到的标记物结合主要标记物,例如免疫学标记中常见的),通常,使用标记物的信号核酸来检测杂交。典型地,互补核酸或信号核酸可以通过用于检测杂交多核苷酸存在的几种方法中的任何一种进行标记。最常见的检测方法是使用 ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C ,或 P^{32} 标记的探针等进行放射自显影。

[0109] 其他标记包括例如结合标记抗体的配体、荧光团、化学发光剂、酶和可用作标记配体的特异性结合对成员的抗体。标记物,标记程序和标记检测的介绍可见Polak和Van Noorden《免疫细胞化学介绍》(Introduction to Immunocytochemistry),第2版,Springer Verlag,纽约(1997);和《荧光探针和研究化学物质豪格兰手册》(Haugland Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals),由Molecular Probes,Inc.(1996)出版的联合手册和目录。

[0110] 通常,使用监测特定探针或探针组合的检测器来检测检测试剂标签。典型的检测器包括分光光度计,光电管和光电二极管,显微镜,闪烁计数器,照相机,胶片等,以及它们的组合。合适的检测器的实例可从本领域技术人员已知的各种商业来源广泛获得。通常,将包含结合的标记部分的底物的光学图像数字化以用于随后的计算机分析。

[0111] 最典型地,通过量化标记物的量来测量RNA的量,标记物通过与检测试剂的结合固定在固体支持物上。与不包含调节剂的对照温育或与针对特定反应类型建立的基线相比,温育过程中调节剂的存在通常将增加或减少固体支持物上的标记物的量。检测和量化标记的手段是本领域技术人员所熟知的。

[0112] 在优选的实施方案中,靶核酸或探针固定在固体支持物上。适用于本发明测定的固体支持物是本领域技术人员已知的。如本文所用,固体支持物是基本固定排列的材料基质。

[0113] 各种自动化的固相分析技术也是合适的。例如,可从Affymetrix,Inc.(Santa Clara,CA)获得的超大规模固定化聚合物阵列(VLSIPSTM),VLSIPSTM可用于同时检测参与相同调节途径的多个基因的表达水平的变化。参见:Tijssen, supra., Fodor等人.(1991) Science, 251:767-777; Sheldon等人.(1993) Clinical Chemistry 39(4):718-719,和 Kozal等人.(1996) Nature Medicine 2(7):753-759。

[0114] 例如,可以通过使用与双链核酸特异性结合的检测标记部分(例如RNA-DNA双链体的特异性抗体)来完成检测。一个优选实例,使用识别DNA-RNA异源双链体的抗体,抗体与酶

连接(通常通过重组或共价化学键合)。当酶与其底物反应时,产生可检测的产物,检测到抗体。在Coutlee等人,(1989) *Analytical Biochemistry* 181:153-162;Bogulavski (1986) 等人, *J. Immunol. Methods* 89:123-130;Prooijen-Knegt (1982) *Exp. Cell Res.* 141:397-407;Rudkin (1976) *Nature* 265:472-473,Stollar (1970) *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 65:993-1000;Ballard (1982) *Mol. Immunol.* 19:793-799;Pisetsky和Caster (1982) *Mol. Immunol.* 19:645-650;Viscidi等人.(1988) *J. Clin. Microbiol.* 41:199-209;和Kiney等人,(1989) *J. Clin. Microbiol.* 27:6-12中,描述针对RNA双链体的抗体,包括同源和异源双链体,包含对DNA:RNA杂交体的特异性的试剂盒是可获得的,如:来自Digene Diagnostics, Inc. (贝尔茨维尔,马里兰州)。

[0115] 除了可获得的抗体之外,本领域技术人员通过使用现有技术或修饰商业上或公众上可获得的那些抗体,很容易地制备核酸双链体的特异性抗体。除了上面提到的技术之外,制备多克隆和单克隆抗体的一般方法是本领域技术人员已知的。(参见,例如Paul (第3版)《基础免疫学》(*Fundamental Immunology*) Raven Press, Ltd, NY (1993); Coligan《最新免疫学方案》(*Current Protocols in Immunology*) Wiley/Greene, NY (1991); Harlow和Lane《抗体:实验室手册》(*Antibodies: A Laboratory Manual*) 冷泉港出版社,纽约(1988); Stites等人.(编)《基础和临床免疫学》(*Basic and Clinical Immunology*) (第4版) Lange Medical Publications, 洛斯阿尔托斯,加利福尼亚州,和其中引用的对比文件;Goding《单克隆抗体:原理和实践》(*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*) (第2版) 学术出版社,纽约,纽约,(1986);以及Kohler和Milstein *Nature* 256:495-497 (1975))。用于制备抗体的其他合适技术包括选择噬菌体或类似载体中的重组抗体的文库(参见,Huse等人.*Science* 246:1275-1281 (1989);和Ward等人.*Nature* 341:544-546 (1989)), 特定的单克隆和多克隆抗体和抗血清结合的 K_D 通常为至少约0.1 μ M,优选至少约0.01 μ M或更好,最典型且优选0.001 μ M。

[0116] 用于本发明的核酸可以是阳性或阴性探针。阳性探针与其靶标结合,双链体形成的存在是靶标存在的证据。阴性探针不能与可疑靶标结合,并且不存在双链体形成是靶标存在的证据。例如,在仅存在感兴趣的核苷酸序列的测定样品中,野生型特异性核酸探针或PCR引物可以用作负探针。

[0117] 杂交测定的灵敏度可以通过使用倍增所检测靶核酸的核酸扩增系统来提高。这样的系统的实例包括聚合酶链式反应(PCR)系统,特别是RT-PCR或实时定量聚合酶链(real time PCR)和连接酶链式反应(LCR)系统。本领域最近描述的其他方法是基于核酸序列的扩增(NASBA, Cangene, 米西索加, 安大略省)和QB复制酶系统(Q Beta Replicase systems)。这些系统可以用来直接鉴定突变体,其中PCR或LCR引物被设计为仅在选择的序列存在时延伸或连接。或者选择的序列通常可以利用,例如非特异性PCR引物扩增,随后探测扩增的靶区域中表明突变的特定序列。

[0118] 测定本发明核酸表达水平的另一种方法是原位杂交。原位杂交测定法是众所周知的,通常在Angerer等人., *Methods Enzymol.* 152:649-660 (1987) 所描述。在原位杂交测定中,细胞,优选来自脑区如杏仁核的人类细胞被固定到固体支持物,固体支持物通常是载玻片。如果要探测DNA,则用热或碱将细胞变性。然后使细胞在中等温度下与杂交溶液接触以允许标记的特异性探针退火。探针优选用放射性同位素或荧光报道分子标记。

[0119] 含有核酸的物质通常从个体获得。这种材料是可以从其制备核酸的任何生物物质。作为非限制性实例,材料可以是全血,血清,血浆,唾液,脸颊拭子(cheek swab),痰液或含有核酸的其他体液或组织。在一个实施方案中,本发明的方法使用全血来实施,全血可以通过非侵入性手段容易地获得并用于制备总RNA或基因组DNA。在另一个实施方案中,检测CTGF的表达水平涉及使用聚合酶链式反应(PCR)扩增个体的核酸。使用PCR来扩增核酸是本领域熟知的(参见,例如,Mullis等人(编辑),《聚合酶链式反应》(The Polymerase Chain Reaction), Birkhäuser, 波士顿, (1994))。在又一个实施方案中,使用一种或多种荧光标记的引物进行PCR扩增。在另一个实施方案中,使用一种或多种含有DNA小沟粘合剂(DNA minor groove binder)的标记或未标记的引物进行PCR扩增。

[0120] 为了在本发明的方法中检测CTGF的表达水平,可以使用各种不同的引物中的任一种引物以便通过PCR扩增个体的核酸。通常将这样的引物设计成具有足够的鸟嘌呤和胞嘧啶含量以获得高解链温度,这允许在扩增反应中进行稳定的退火步骤。有几个计算机程序,如Primer Select,可以帮助设计PCR引物。

[0121] 在Ausubel等人.,《最新分子生物学方案》(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley和Sons, Inc. 纽约(1999), 第7章, 补充47, Theophilus等人,《PCR突变检测方案》(PCR Mutation Detection Protocols), Humana Press, (2002); 和Innis等人.,《PCR方案》(PCR Protocols), 圣迭戈, 学术出版社(1990) 描述了适用的PCR扩增技术。一般核酸杂交方法描述于Anderson,《核酸杂交》(Nucleic Acid Hybridization), BIOS Scientific出版社, 1999。多个转录的核酸序列(例如,mRNA或cDNA)的扩增或杂交也可以从排列在微阵列中的mRNA或cDNA序列进行。微阵列方法一般描述于Hardiman,《微阵列方法和应用,基本知识》(Microarrays Methods and Applications:Nuts&Bolts), DNA Press, 2003; 和Baldi等人”,《DNA微阵列和基因表达:从实验到数据分析和建模》(DNA Microarrays and Gene Expression:From Experiments to Data Analysis and Modeling), 剑桥大学出版社, 2002。

[0122] 本领域技术人员已知使用各种基于抗体的技术的特定蛋白质,多肽和肽测量多种方法(参见Sambrook,同上)。在某些情况下,可以使用各种免疫测定技术,包括竞争性和非竞争性免疫测定法,根据本文所述的方法检测CTGF的存在或水平。术语免疫测定包括技术,包括但不限于酶免疫测定(EIA)如酶联免疫分析技术(EMIT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、抗原捕获ELISA、夹心ELISA、IgM抗体捕获ELISA(MAC ELISA)和微粒酶免疫分析(MEIA)、毛细管电泳免疫分析(CEIA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射测定法(IRMA)、荧光偏振免疫分析(FPIA)、和化学发光测定(CL)。如果需要,这种免疫测定可以是自动的。免疫分析也可以与激光诱导荧光结合使用(参见,例如,Schmalzing和Nashabeh, Electrophoresis, 18: 2184-2193 (1997); Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci., 699: 463-480 (1997))。脂质体免疫测定如流动注射脂质体免疫测定和脂质体免疫传感器也适用于本发明(参见,例如Rongen等人., J. Immunol. Methods, 204: 105-133 (1997))。另外,浊度测定法测定,其中形成蛋白质/抗体复合物导致光散射增加,根据标记物浓度转化为峰值速率信号适用于本发明。浊度测定可从Beckman Coulter (Brea, 加利福尼亚州CA; Kit#449430) 商购获得,并可使用Behring浊度计分析仪(Fink等人, J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem., 27: 261-276 (1989))。

[0123] 根据本文所述的方法,抗原捕获ELISA可用于检测CTGF的存在或水平。例如,在抗

原捕获ELISA中,针对CTGF的抗体结合到固相上,加入样品使得CTGF与抗体结合。通过洗涤除去未结合的蛋白质后,可以使用例如放射免疫测定法测定定量结合的CTGF的量(参见,例如Harlow和Lane,《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室,纽约,1988))。夹心ELISA也适用于本发明。例如,在双抗体夹心测定法中,将第一抗体与固体支持物结合,使CTGF与第一抗体结合。通过测量与CTGF结合的第二抗体量来定量CTGF的量。可将抗体固定在各种固体支持物上,例如磁石或色谱基质颗粒,测定板(例如微量滴定孔)的表面,固体基质材料或膜(例如塑料,尼龙,纸)等等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列涂布在固体支持物上来制备测定条。然后可以将该条浸入测试样本中,并通过清洗和检测步骤快速处理以产生可测量的信号,例如有色斑点。

[0124] 利用,例如碘-125 (^{125}I) 标记的二抗的放射性免疫测定(Harlow和Lane,同上)也适用于本发明。用化学发光标记物标记的二抗也可适用于本发明。利用化学发光二抗的化学发光测定适用于表达水平的灵敏的非放射性检测。此类二抗可以从各种来源市售获得,例如Amersham Lifesciences, Inc. (Arlington Heights, 伊利诺伊州)。

[0125] 可直接或间接检测抗体与CTGF的特异性免疫结合。直接标记物包括附着于抗体的荧光或发光标志,金属,染料,放射性核素等。碘-125 (^{125}I) 标记的抗体可用于测定样品中的CTGF水平。使用CTGF的特异性化学发光抗体的化学发光测定法适合CTGF水平的敏感性,非放射性检测。用荧光染料标记的抗体也适用于确定样品中的CTGF水平。荧光染料的实例包括但不限于DAPI,荧光素,Hoechst 33258,R-藻蓝蛋白(phycoerythrin),B-藻红蛋白(phycoerythrin),R-藻红蛋白,罗丹明,德克萨斯红(Texas red)和丽丝胺(lissamine)。连接到荧光染料的二抗可以商业获得,例如山羊F(ab')₂抗人体IgG-FITC可得自Tago Immunologicals(伯灵格姆,加利福尼亚州)。

[0126] 间接标记物包括本领域众所周知的各种酶,例如辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶(AP), β -半乳糖苷酶,尿素酶等。例如,可以使用带有显色底物四甲基联苯胺(TMB)的辣根过氧化物酶检测系统,在过氧化氢存在下,其在450nm处可检测到的产生可溶性产物。碱性磷酸酶检测系统可以与发色底物对硝基苯磷酸酯一起使用,例如,其产生在405nm处容易检测到的可溶性产物。类似地, β -半乳糖苷酶检测系统可以与显色底物邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)一起使用,其产生在410nm处可检测到的可溶性产物。尿素酶检测系统可与例如脲-溴甲酚紫(Sigma Immunochemicals;圣路易斯,密苏里州)的底物一起使用。与酶连接的有用的第二抗体可以从许多商业来源获得,例如山羊F(ab')₂抗人体IgG-FITC可得自Tago Immunologicals(伯灵格姆,加利福尼亚州)。

[0127] 可以分析来自直接或间接标记的信号,例如,使用分光光度计检测来自显色底物的颜色;检测辐射的辐射计数器,例如用于检测 ^{125}I 的 γ 计数器;或荧光计在特定波长的光存在下检测荧光。为了检测酶联抗体,可以使用如EMAX微板读数器(Molecular Devices;门洛帕克,加利福尼亚州)的分光光度计根据制造商的说明书进行CTGF水平量的定量分析。如果需要的话,本文描述的测定可以是自动的或者是机器人执行的,并且可以同时检测来自多个样品的信号。

[0128] 流式细胞术可用于检测CTGF的存在或水平。这样的流式细胞术测定法包括基于珠的免疫测定法(参见例如Bishop和Davis, J. Immunol. Methods, 210: 79-87 (1997); McHugh等, J. Immunol. Methods, 116: 213 (1989); Scillian等, Blood, 73: 2041 (1989))。

[0129] 也可以使用用于表达CTGF的特异性重组抗原的噬菌体展示技术。如果需要,表达CTGF特异性抗原的噬菌体颗粒可以使用抗体如抗噬菌体单克隆抗体被锚定到多孔板。

[0130] 如果需要,表达CTGF的特异性抗原的噬菌体颗粒可以使用抗体,例如抗噬菌体单克隆抗体被锚定于多孔板((Felici等人,“噬菌体展示肽作为表征人血清的工具(Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera)”刊于Abelson(编),《酶学方法》(Methods in Enzymol).,267,圣地亚哥:学术出版社公司(1996)))。

[0131] 定量蛋白质印迹也可用于检测或确定样品中CTGF的存在或水平。蛋白质印迹可以通过众所周知的方法定量,如扫描测密度术或磷光体成像(phosphorimaging)。作为非限制性实例,将蛋白质样品在10%SDS-PAGE Laemmli凝胶上进行电泳。第一鼠单克隆抗体与印迹反应,并且可以使用初步狭缝印迹实验(preliminary slot blot experiment)确认抗体结合是线性的。使用山羊抗小鼠辣根过氧化物酶偶联抗体(BioRad)作为二抗,使用化学发光进行信号检测,比如,Renaissance化学发光试剂盒(New England Nuclear;波士顿,马萨诸塞州)根据制造商的说明。使用扫描密度计(Molecular Dynamics;森尼韦尔,加利福尼亚州)分析印迹的放射自显影图,并根据阳性对照归一化。报告数值,例如作为实际值与阳性对照(密度指数)之比。这样的方法在本领域中是众所周知的,例如,描述于Parra等人,J.Vasc.Surg.,28:669-675(1998)。

[0132] 或者,可使用多种免疫组织化学测定技术来检测或确定样品中CTGF的存在或水平。术语“免疫组织化学测定”包括利用荧光显微术或光学显微镜视觉检测与CTGF反应的抗体偶联(即缀合)的荧光染料或酶的技术,包括但不限于直接荧光抗体测定,间接荧光抗体(IFA)测定,反补体免疫荧光,亲和素-生物素免疫荧光和免疫过氧化物酶测定。

[0133] 或者,CTGF的存在或水平可通过检测或定量纯化CTGF的量来确定。CTGF的纯化可以通过例如单独的高压液相色谱(HPLC),或与质谱结合来实现(例如.,MALDI/MS,MALDI-TOF/MS,SELDI-TOF/MS,tandem MS,等等.)。CTGF的定性或定量检测也可以通过众所周知的方法来确定,包括但不限于Bradford测定,考马斯蓝染色,银染,放射性标记蛋白的测定和质谱。

[0134] CTGF和一种或多种CTGF通路成员的分析可以与一个测试样品分开或同时进行。对于CTGF和一种或多种CTGF通路成员的分开或顺序测定,合适的装置包括临床实验室分析仪,例如,ElecSys (Roche),AxSym (Abbott),Access (Beckman),ADVIA®,CENTAUR® (Bayer),和NICHOLSADVANTAGE® (Nichols Institute)免疫分析系统,优选的装置或蛋白质芯片在单个表面上同时测定CTGF和一种或多种CTGF通路成员。特别有用的物理格式包括具有用于检测CTGF和一个或多个CTGF通路成员的多个离散的可寻址位置的表面。这种格式包括蛋白质微阵列,或蛋白质芯片。(参见例如.,Ng等人.,J.Cell Mol.Med.,6:329-340(2002)),和某些毛细管设备(参见例如.,美国专利号6,019,944).,在这些实施方案中,每个离散表面位置可以包含抗体以固定CTGF和一个或多个CTGF通路成员,用于在每个位置进行检测。或者,表面可包含固定在表面的离散位置的一个或多个离散颗粒(例如,微颗粒或纳米颗粒),其中微颗粒包含抗体以固定CTGF和一个或多个CTGF路径成员用于检测。

[0135] V. 治疗性抗体的选择

[0136] 在某些方面,本发明提供了一种通过施用充当结缔组织生长因子(CTGF)抑制剂的抗体或其片段来治疗个体中的情绪障碍的方法。在具体的实施方案中,CTGF抑制剂是中和

CTGF蛋白的抗体或其片段,所述抗体结合并抑制,部分或完全阻断刺激或活性,降低,预防或延迟活化,或失活,减敏或下调CTGF蛋白的活性或表达。

[0137] 术语“抗体”包括完整抗体和其任何抗原结合片段或单链。因此,抗体包括任何蛋白质或含有肽的分子,蛋白质或含有肽的分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,例如但不限于重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分,重链或轻链可变区,重链或轻链恒定区,框架(FR)区或其任何部分。抗体包括完整的免疫球蛋白分子及其片段,如Fab,F(ab')₂和Fv片段,以及能够结合抗原决定簇的重组,合成的和遗传工程改造的形式,以及包括多克隆和单克隆抗体。

[0138] 可以使用完整的CTGF多肽或使用含有感兴趣小肽的片段作为免疫抗原来制备抗-CTGF抗体(例如,结合CTGF或CTGF片段的抗体)。用于免疫动物(例如,小鼠,大鼠,兔,鸡,火鸡,山羊等)的多肽或寡肽可以来自例如CTGF蛋白的蛋白水解,CTGF mRNA的翻译或化学合成,如果需要,可以与载体蛋白缀合。与肽化学偶联的常用载体包括,例如牛血清白蛋白(BSA),甲状腺球蛋白和钥孔戚血蓝蛋白(KLH)。选择具有所需特异性的抗体的其他方法(例如噬菌体展示)在本领域中是众所周知的。

[0139] 术语“抗体”还旨在涵盖抗体,其蛋白酶消化片段,其特定部分和变体,包括抗体模拟物或包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的部分的抗体,包括单链抗体及其抗原结合片段。抗体的抗原结合片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,由VL,VH,CL和CH结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含在铰链区由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(参见例如:Ward等人.,*Nature*,341:544-546(1989),它由一个VH域构成;(vi) 一个分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,但是可以使用重组方法通过合成接头连接,使得它们可以制成单一蛋白质链,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv),参见,例如Bird等人.,*Science*,242:423-426(1988);和Huston等人.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,85:5879-5883(1988))。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体的相同方式筛选片段的实用性。

[0140] 如本文所用,术语“中和抗体”是指能够基本上抑制或消除CTGF的生物学活性的抗体,优选单克隆抗体。通常,中和抗体将抑制CTGF与辅因子如TGF的结合,与靶细胞或另一种生物学靶标相关的CTGF特异性受体。

[0141] 术语“抗-CTGF抗体”是指与CTGF特异性结合的抗体(例如,识别CTGF蛋白或其片段的表位)。如本文所用,“特异性结合”是指抗体以高亲和力与预定抗原结合。通常,抗体以约 10^{-7} M或更小的解离常数(K_D)结合抗原,并以比结合非特异性抗原(例如,BSA,酪蛋白)而非预定抗原或紧密相关抗原的 K_D 低至少约1.5倍(例如低至少约2倍,至少约5倍等)的 K_D 与预定抗原结合。高亲和力抗体通常具有至少 10^{-8} M, 10^{-9} M或 10^{-10} M的亲和力。在具体的实施方案中,用于本发明方法的抗体对CTGF的亲和力为约 10^{-8} M至约 10^{-10} M之间,约 10^{-8} M至 10^{-9} M之间或约 10^{-9} M至 10^{-10} M之间。在特定的实施方案中,用于本发明方法中的抗CTGF抗体对CTGF的 K_D 约 10^{-8} M或更小。

[0142] 如本文所用的术语“裸抗体”是不与细胞毒性部分或放射性标记缀合的抗体。在一些实施方案中,抗CTGF抗体是裸抗体。

[0143] 在一些实施方案中,抗CTGF抗体是国际专利公开号W02004/108764和美国专利号7,405,274和8,865,173中描述的FG-3019 (CLN-1) 或mAb1,结合相同表位的抗体或基本上与其等同或由其衍生的抗体。在其他实施方案中,抗CTGF抗体是如日本专利公开号JP-A-2000-232884中所述的人单克隆抗体M84或M320,或如国际专利公开号W02007/066823中所述的小鼠单克隆抗体CTGF-m2-1。用于本发明方法的另外的示例性抗体被描述在,例如美国专利号5,408,040,6,562,618,7,541,438和7,871,617;和国际专利公开号W0 99/33878, W01999/007407, W02000/035936, W02012/100262和W02013/094723。在一些实施方案中,抗CTGF抗体具有由ATCC登录号PTA-6006鉴定的细胞系产生的抗体的氨基酸序列。在其他实施方案中,抗CTGF抗体与由ATCC登录号PTA-6006鉴定的细胞系产生的抗体竞争性地结合CTGF。在进一步的实施方案中,抗CTGF抗体与ATCC登录号PTA-6006产生的抗体结合相同的表位。

[0144] 在某些实施方案中,抗CTGF抗体是抗体模拟物。抗体模拟物是通常在3-25kDa范围内的蛋白,其被设计成像抗体那样以高特异性和亲和力结合抗原,但在结构上与抗体无关。典型地,抗体模拟物基于结构基序或支架,结构基序或支架可以从较大生物分子作为单个或重复结构域而被发现的。

[0145] VI. 干扰RNA分子的选择

[0146] 在某些方面,本发明提供了通过施用减少或抑制结缔组织生长因子 (CTGF) 表达的干扰RNA分子来治疗个体中的情绪障碍的方法。干扰RNA的非限制性实例包括单链RNA (例如成熟miRNA, ssRNAi寡核苷酸, ssDNAi寡核苷酸), 双链RNA (即双链RNA, 例如小干扰RNA (siRNA), Dicer-底物dsRNA, 小发夹RNA (shRNA), aiRNA或pre-miRNA), 或能够减少或抑制CTGF表达 (例如通过介导CTGFmRNA的降解或抑制翻译) 的DNA-DNA杂交体。在具体的实施方案中,干扰RNA是siRNA或shRNA。

[0147] 可以使用本领域已知的任何手段来鉴定合适的siRNA序列。典型地,在Elbashir等人, Nature, 411:494-498 (2001) 和Elbashir等人, EMBO J., 20:6877-6888 (2001) 中描述的方法与Reynolds等人 Nature Biotech., 22 (3) :326-330 (2004) 所述的理性设计规则相结合。

[0148] 作为非限制性实例,可以扫描来自感兴趣的靶基因的转录物的AUG起始密码子的3'核苷酸序列的二核苷酸序列 (例如, AA、NA、CC、GG或UU, 其中N=C、G或U)。(参见,例如., Elbashir等人., EMBO J., 20:6877-6888 (2001))。紧接着该二核苷酸重复序列3'的核苷酸被鉴定为潜在的siRNA序列 (即靶序列或有义链序列)。典型地,紧接着该二核苷酸序列3'的19、21、23、25、27、29、31、33、35或更多个核苷酸被鉴定为潜在的siRNA序列。在一些实施方案中,二核苷酸序列是AA或NA序列,并且AA或NA二核苷酸3'端的19个核苷酸被鉴定为潜在的siRNA序列。siRNA序列通常沿靶基因长度的不同位置被隔开。为了进一步增强siRNA序列的沉默效率,可以分析潜在的siRNA序列以鉴定不包含与其他编码 (例如靶细胞或生物体) 序列同源性的位点,例如,在靶细胞或有机体中。例如,约21个碱基对的合适的siRNA序列通常不会具有超过16-17个连续的碱基对与靶细胞或有机体中的编码序列有同源性。如果要从RNA Pol III启动子表达siRNA序列,选择缺少超过4个连续的A或T的siRNA序列。

[0149] 一旦鉴定出潜在的siRNA序列,就可以设计互补序列 (即反义链序列)。也可以使用本领域已知的多种标准来分析潜在的siRNA序列。例如,提高他们的沉默效率,可以通过理

性设计算法分析siRNA序列以鉴定具有一个或多个以下特征的序列：(1) G/C含量为约25%至约60%G/C；(2) 在有义链的15-19位至少有3个A/U；(3) 没有内部重复；(4) 有义链19位的A；(5) 有义链3位的A；(6) 有义链的10位的U；(7) 有义链19位没有G/C；和(8) 在有义链的13位没有G。包含算法的siRNA设计工具可见于例如<http://ihome.ust.hk/~bokcmho/siRNA/siRNA.html>，这些算法可以为每个特征分配合适的值，并且可用于选择siRNA。本领域技术人员将会理解，可以选择具有一个或多个前述特征的序列作为潜在的siRNA序列作进一步分析和测试。

[0150] 另外，具有一个或多个以下标准的潜在siRNA序列通常可以作为siRNA被消除：(1) 在一行包含连续4个或更多个相同碱基的序列；(2) 包含G的均聚物的序列（即为了减少由于这些聚合物的结构特性而可能造成的非特异性效应）；(3) 包含三碱基基序（例如，GGG，CCC，AAA或TTT）；(4) 在一行包含7个或更多个连续G/C片段的序列；和(5) 在候选内包含4个或更多个碱基的直接重复（direct repeats）的序列，导致内部折回结构。然而，本领域技术人员将会理解，具有一个或多个前述特征的序列仍然可以被选择用于进一步分析和测试，作为潜在的siRNA序列。

[0151] 在一些实施方案中，可以基于siRNA双链体不对称性进一步分析潜在的siRNA序列，描述在例如Khvorova等人.，*Cell*，115:209-216 (2003)；和Schwarz等人；*Cell*，115:199-208 (2003)。在其他实施方案中，可以基于靶位点处的二级结构进一步分析潜在的siRNA序列，如在Luo等人.，*Biophys. Res. Commun.*，318:303-310 (2004) 有描述。例如，可以使用Mfold算法（可从http://mfold.burnet.edu.au/rna_form获得）对目标位点处的二级结构建模以选择有利于接近靶位点的siRNA序列，在该处存在碱基配对和茎环形式的较少的二级结构。

[0152] “小发夹RNA”或“短发夹RNA”或“shRNA”包括短的RNA序列，使造成紧密发夹转角，可用于通过RNA干扰沉默基因表达。shRNA可以化学合成或从DNA质粒中的转录盒转录。shRNA发夹结构被细胞机器切割成siRNA，然后与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合。

[0153] shRNA的非限制性实例包括由单链分子组装而成的双链多核苷酸分子，其中有义区和反义区通过基于核酸或非核酸的接头或环结构连接；和具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子，所述发夹二级结构具有自我互补有义和反义区域。另外的shRNA序列包括但不限于不对称的shRNA前体多核苷酸，例如PCT公开号WO 2006/074108和WO 2009/076321中所述的那些。

[0154] “Dicer-底物dsRNA”或“前体RNAi分子”包括由Dicer在体内处理以产生活性siRNA的任何前体分子，其被并入用于靶基因的RNA干扰的RISC复合物中。例如，在美国专利公开号20050244858、20050277610和20070265220中描述了设计和合成Dicer-底物dsRNA的方法。

[0155] 与siRNA相似，不对称干扰RNA(aiRNA)可招募RNA诱导的沉默复合物(RISC)，并通过介导相对于反义链的5'末端的核苷酸10和11之间靶序列的序列特异性切割导致哺乳动物细胞中多种基因的有效沉默(Sun等人，*Nat. Biotech.*，26:1379-1382 (2008))。通常，aiRNA分子包含具有有义链和反义链的短RNA双链体，其中双链体在反义链的3'和5'端包含突出端。aiRNA通常是不对称的，因为与互补的反义链相比，有义链在两端较短。在一些方面，可以在与siRNA分子所用类似的条件下设计，合成和退火aiRNA分子。作为非限制性实

例,可以使用上述用于选择siRNA序列的方法来选择和产生aiRNA序列。

[0156] 通常,微小RNA(miRNA)是约21-23个核苷酸长度的单链RNA分子,其调控基因表达。miRNA由基因编码,从这些基因的DNA转录,但miRNA不翻译成蛋白质(非编码RNA)。相反,每个初级转录物(pri-miRNA)被加工成称为pre-miRNA的短茎环结构,并最终成为功能性成熟miRNA。成熟的miRNA分子与一个或多个信使RNA(mRNA)分子部分或完全互补,其主要功能是下调基因表达。miRNA分子的鉴定在如Lagos-Quintana等人., Science, 294:853-858; Lau等人, Science, 294:858-862; 和Lee等人., Science, 294:862-864描述。

[0157] 编码miRNA的基因比加工的成熟miRNA分子长得多。首先将miRNA转录成具有帽和多聚腺苷酸尾的初级转录物或pri-miRNA,并在细胞核中处理成称为pre-miRNA的约70个核苷酸的茎环结构。这个过程是在动物中通过称为微处理器复合物的蛋白复合物进行的,该复合物由核酸酶Drosha和双链RNA结合蛋白Pasha构成(Denli等人, Nature, 432:231-235 (2004))。然后通过与内切核酸酶Dicer相互作用,将这些pre-miRNA加工成细胞质中的成熟miRNA,其也启动形成RNA诱导的沉默复合物(RISC)((Bernstein等人., Nature, 409:363-366 (2001))。DNA的正义链或反义链都可以作为模板来产生miRNA。

[0158] 当Dicer切割pre-miRNA茎环时,形成两个互补的短RNA分子,但只有一个整合到RISC复合物中。该链被称为引导链,并且在5'端稳定的基础上被argonaute蛋白,RISC复合物中的催化活性RNA酶选择(Preall等人, Curr. Biol., 16:530-535 (2006))。剩余链被称为反引导或过客链,被降解为RISC复合物基质(Gregory等人, Cell, 123:631-640 (2005))。在整合到活性RISC复合物中后,miRNA与其互补的mRNA分子碱基配对并诱导靶mRNA降解和/或翻译沉默。

[0159] 哺乳动物miRNA分子通常与靶mRNA序列的3'UTR中的一个位点互补。在某些情况下,miRNA与靶mRNA的退火通过阻断蛋白质翻译机制来抑制蛋白质翻译。在某些其他情况下,miRNA与靶mRNA的退火通过类似于RNA干扰(RNAi)的过程来促进靶mRNA的切割和降解。miRNA也可以靶向对应于靶向mRNA的基因组位点甲基化。通常,miRNA功能与统称为miRNP的蛋白质补体相关。

[0160] 术语“反义寡核苷酸”或“反义”包括与靶向的多核苷酸序列互补的寡核苷酸。反义寡核苷酸是与所选序列互补的DNA或RNA单链。反义RNA寡核苷酸通过与RNA结合来阻止互补RNA链的翻译。反义DNA寡核苷酸可用于靶向特定的互补(编码或非编码)RNA。如果发生结合,这种DNA/RNA杂交体可以被RNA酶H降解。在具体的实施方案中,反义寡核苷酸包含约10至约60个核苷酸,更优选约15至约30个核苷酸。该术语还包括可能与所需靶基因不完全互补的反义寡核苷酸。因此,本发明可用于这样的情况,即,用反义序列发现非靶标特异性活性的情况,或者对于特定用途而言,含有与靶序列一个或多个错配的反义序列是最优选的情况。

[0161] 生产反义寡核苷酸的方法是本领域已知的,并且可以容易地改进以产生靶向任何多核苷酸序列的反义寡核苷酸。选择对给定靶序列的特异性反义寡核苷酸序列是基于对所选择的靶序列的分析,以及二级结构, T_m 结合能和相对稳定性的确定。反义寡核苷酸可以基于它们相对不能形成二聚体,发夹或其他二级结构来选择,这些二级结构将减少或阻止宿主细胞中靶mRNA的特异性结合。mRNA的高度优选的靶标区域包括在AUG翻译起始密码子处或附近的那些区域以及基本上与mRNA的5'区域互补的那些序列。这些二级结构分析和目标

位点选择的考虑可以,例如,使用OLIGO引物分析软件(Molecular Biology Insights)的v.4和/或BLASTN 2.0.5算法软件实施。

[0162] VII. 筛选CTGF表达调节剂

[0163] 在细胞中,特别是哺乳动物细胞,尤其是人细胞中,可利用许多不同的筛选方案来鉴定调节细胞结缔组织生长因子(CTGF)的表达水平或活性的化合物。一般而言,筛选方法涉及筛选多种化合物以鉴定通过结合CTGF,通过抑制CTGF的表达,通过抑制另一种分子与CTGF的结合等等来调节(例如中和)CTGF表达水平或活性的化合物。

[0164] A. 结合测定

[0165] 初步筛选可以通过筛选能够结合CTGF的化合物来进行,因为如此鉴定的至少一些化合物可能是CTGF表达和/或活性的调节剂。结合测定通常涉及使CTGF与一种或多种测试化合物接触,并使CTGF和测试化合物具有足够的时间以形成结合复合物。任何形成的结合复合物都可以使用许多建立的分析技术中的任何一种来检测。蛋白质结合分析包括但不限于测量共沉淀,非变性SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的共迁移和Western印迹上的共迁移的方法。用于这种测定的CTGF可以被天然表达,克隆或合成。结合分析也可用于例如鉴定结合CTGF的抗体,受体或其它分子。

[0166] B. 表达分析

[0167] 某些筛选方法包括筛选上调或下调CTGF表达(例如,mRNA或蛋白水平)的化合物。这样的方法通常涉及进行基于细胞的测定,其中使测试化合物与一种或多种表达CTGF的细胞接触,然后检测表达(转录物,翻译产物或催化产物)的增加或减少。用表达内源性CTGF的外周细胞或其他细胞进行一些测定。

[0168] 多肽或多核苷酸表达可以以多种不同的方式检测。作为非限制性实例,多核苷酸的表达水平可以通过用与CTGF的转录物(或由其衍生的互补核酸)特异性杂交的探针探测在细胞中表达的mRNA来确定。可以通过裂解细胞并进行Northern印迹或使用原位杂交技术不溶解细胞来进行探测。或者,可以使用免疫学方法检测多肽的表达水平,其中用特异性结合CTGF的抗体探测细胞裂解物。

[0169] 其他基于细胞的测定是用不表达CTGF的细胞进行的报告分析。这些测定法由异源核酸构建体进行,异源核酸构建体包含编码CTGF的多核苷酸的启动子,其可操作地连接于编码可检测产物的报告基因。可以使用许多不同的报告基因。有些报告物本来就是可以检测的。这种报告物的一个例子是发射可以用荧光检测器检测荧光的绿色荧光蛋白。其他报告物产生一个可检测的产物。通常这样的报告物是酶。示例性酶报道分子包括但不限于 β -葡糖醛酸糖苷酶,氯霉素乙酰转移酶(CAT);Alton和Vapnek(1979)Nature 282:864-869,萤光素酶, β -半乳糖苷酶,绿色荧光蛋白(GFP)和碱性磷酸酶(Tohet等.(1980)Eur.J.Biochem.182:231-238;和Hall等人(1983)J.Mol.Appl.Gen.2:101)。

[0170] 在这些测定中,携有报告构建体的细胞与测试化合物接触。测试化合物通过与启动子结合启动启动子或触发产生级联反应,从而激活启动子引起可检测报道分子的表达。某些其他的报告分析是用含有异源构建体的细胞进行的,所述异源构建体包括转录控制元件,其激活编码CTGF的多核苷酸和与之可操作连接的报告子的表达。这里,结合转录调控元件以激活报道分子表达的化合物,或者触发与转录调控元件结合以激活报道基因表达的化合物形成的化合物也可以通过与报告子表达相关的信号生成来鉴定。

[0171] 可将CTGF的表达或活性水平与基线值比较。如上所述,基线值可以是对照样品的值或代表对照群体(例如,不具有情绪障碍或处于患情绪障碍风险中的健康个体)表达水平的统计值。也可以测定不表达CTGF的细胞的表达水平作为阴性对照。这样的细胞通常在其他方面基本上与测试细胞基因相同。

[0172] 报道分析中可以使用多种不同类型的细胞。表达内源性CTGF的细胞包括,来自额叶皮层(例如背外侧前额叶皮质),小脑,前扣带皮层,杏仁核,海马或伏隔核的细胞。不内源表达CTGF的细胞可以是原核的,但优选真核生物。真核细胞可以是通常用于产生具有重组核酸构建体的细胞的任何细胞。示例性的真核细胞包括但不限于酵母,以及各种高等真核细胞如COS,CHO和HeLa细胞系。

[0173] 可以进行各种对照以确保观察到的活性是可信的,包括用缺乏报告构建体的细胞进行平行反应,或通过不携有报告构建体的细胞与测试化合物接触。化合物也可以进一步验证,如下所述。

[0174] C. 验证

[0175] 由任何上述筛选方法最初鉴定的化合物可以进一步测试以验证表观活性。优选地,这样的研究是用合适的动物模型进行。这种方法的基本格式包括将在初始筛选期间,将鉴定的先导化合物给予作为人类模型的动物,然后确定CTGF的表达或活性是否实际上被调节(例如增加或减少)。验证研究中使用的动物模型通常是任何种类的哺乳动物。合适的动物的具体例子包括但不限于灵长类动物(例如猴)、小鼠和大鼠。

[0176] 在具体的实施方案中,动物模型选自远交系大鼠,具有高焦虑和抑郁样行为(bLR)的大鼠模型,具有低焦虑和抑郁样行为(bHR)的大鼠模型,以及它们的组合。在某些实施方案中,化合物对CTGF表达水平或活性的影响在动物模型中确定。在其他实施方案中,化合物的抗抑郁和/或抗焦虑作用在动物模型中测定。

[0177] D. 示范性的调节剂

[0178] 作为CTGF调节剂测试的化合物可以是任何小的化合物或生物实体,例如蛋白质,多肽,肽,抗体或它的抗原结合片段,糖、多糖、低聚糖、多核苷酸、寡核苷酸或脂质。通常,测试化合物将是小的化学分子,蛋白质或多肽,或抗体或其抗原结合片段。基本上,任何化合物都可以用作本发明测定法中的潜在调节剂或配体,尽管大多数情况下使用可以溶于水性或有机(特别是基于DMSO的)溶液的化合物。通过自动化进行分析步骤,和从任何方便的来源为分析化合物,这通常是并行运行的(例如,在机器人测定法中的微量滴定板上的微量滴定形式),这些分析被设计来筛选大型化学文库。可以理解,有许多化学化合物的供应商,包括Sigma(St.Louis,MO),Aldrich(St.Louis,MO),Sigma-Aldrich(St.Louis,MO),Fluka Chemika-Biochemica Analytika(Buchs,瑞士)等。调节剂还包括设计用于降低CTGF mRNA水平或来自mRNA翻译水平的试剂(例如,siRNA分子,shRNA分子,反义分子,核酶,脱氧核酶等)。

[0179] 在某些实施方案中,高通量筛选方法涉及提供含有大量潜在治疗化合物(潜在调节剂或配体化合物)的组合化学或肽文库。然后,如本文所述,在一个或多个测定中筛选此类“组合化学文库”或“配体文库”,以鉴定显示期望特征活性的文库成员(特定化学物种或亚类)。如此确定的化合物可以用作常规的“先导化合物”或者本身可以用作潜在的治疗剂。

[0180] 组合化学文库是通过化学合成或生物合成,通过结合许多化学“构筑块”如试剂产生的多种化学化合物的集合。例如,在给定的化合物长度下(即多肽化合物中的氨基酸数目),线性组合化学库比如一个多肽库通过以各种可能的方式组合一组化学结构单元(氨基酸)形成。数以百万计的化合物可以通过此种化学结构的组合混合来合成。

[0181] 组合化学文库的制备和筛选是本领域技术人员熟知的。这样的组合化学文库包括但不限于肽文库(参见例如美国专利5,010,175,Furka,Int.J.Pept.Prot.Res.37:487-493(1991)和Houghton等,Nature 354:84-88(1991))。也可以使用其他用于产生化学多样性文库的化学方法。这样的化学物质包括但不限于类肽(例如PCT公开号W0 91/19735),编码的肽(例如PCT公开W0 93/20242),随机生物低聚物(例如PCT公开号W0 92/00091),苯并二氮杂卓(例如,美国专利号5,288,514),诸如乙内酰脲、苯并二氮杂卓和二肽之类的多种异构体(Hobbs等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6909-6913(1993)),插烯多肽(Hagihara等,J.Amer.Chem.Soc.114:6568(1992)),葡萄糖支架非肽类肽(nonpeptidal peptidomimetics with glucose scaffolding)(Hirschmann等.,J.Amer.Chem.Soc.114:9217-9218(1992)),小化合物文库的类似有机合成(Chen等,J.Amer.Chem.Soc.116:2661(1994)),寡聚氨基甲酸酯(Cho等,Science 261:1303(1993)),肽基磷酸酯(Campbell等.,J.Org.Chem.59:658(1994)),核酸文库(参见Ausubel,Berger和Sambrook,所有上述),肽核酸文库(参见,例如,美国专利号5,539,083),抗体文库(参见例如Vaughn等,Nature Biotechnology,14(3):309-314(1996)和PCT/US96/10287),碳水化合物库(参见例如Liang等,Science,274:1520-1522(1996)和美国专利5,593,853),和小有有机分子库。

[0182] 用于制备组合文库的设备可商购获得(参见,例如.,357MPS,390MPS,Advanced Chem Tech,路易斯维尔肯塔基州;Symphony,Rainin,沃本,马萨诸塞州;433A Applied Biosystems,福斯特城,加利福尼亚州;9050Plus,Millipore,贝德福德,马萨诸塞州)。另外,许多组合文库本身可商购,(参见,例如,ComGenex,Princeton,新泽西州;Tripos,Inc.,圣路易斯,密苏里州;3D Pharmaceuticals,埃克斯顿,宾夕法尼亚州;Martek Biosciences,哥伦比亚,马里兰州等)。

[0183] E. 固态和可溶性高通量测定

[0184] 在本发明的高通量测定中,可能在一天内筛选数千种不同的调节剂或配体。具体而言,可以使用微量滴定板的每个孔对选定的潜在调节剂进行单独的测定,或者如果要观察浓度或温育时间效应,则每5-10个孔可以测试单一调节剂。因此,单个标准微量滴定板可以测定约100(例如96)个调节剂。如果使用1536孔板,则单个板可以容易地测定约100至约1500种不同的化合物。每天检测几种不同的平板是可能的;使用本发明的集成系统可以测定高达约6,000-20,000种不同化合物。最近,已经开发了微流体处理试剂的方法。

[0185] 感兴趣的分子可以通过共价键或非共价键直接或间接地与固态组分结合,例如,通过一个标记物。标记物可以是各种各样的组分。通常,将结合标记物的分子(标记物结合物)固定在固体支持物上并且所标记的感兴趣分子通过标记物和标记物结合物的相互作用而连接至固体支持物。

[0186] 基于文献中充分描述的已知分子相互作用,可以使用许多标记物和标记物结合物,例如,在标记物具有天然结合剂(例如生物素,A蛋白或G蛋白)的情况下,其可以与适当的标记物结合物(例如抗生物素蛋白,抗生蛋白链菌素,中性抗生物素蛋白,免疫球蛋白的

Fc区等)。具有天然结合剂如生物素的分子的抗体也是广泛可得的并且是适当的标记物结合物(参见SIGMA Immunochemicals 1998目录SIGMA,圣路易斯,密苏里州)。

[0187] 类似地,任何半抗原或抗原性化合物可以与适当的抗体组合使用以形成标记物/标记物结合物对。成千上万的特异性抗体是可商购的,并且在文献中描述了许多另外的抗体。例如,在一种常见构型中,标记物是第一抗体,标记物结合物是识别第一抗体的第二抗体。除抗体-抗原相互作用外,受体-配体相互作用也适合作为标记物和标记物-结合物对,例如细胞膜受体的激动剂和拮抗剂(例如细胞受体-配体相互作用,例如转铁蛋白,c-kit,病毒受体配体,细胞因子受体,免疫球蛋白受体,钙粘蛋白家族,整联蛋白家族,选择蛋白家族等;参见例如Pigott和Power,Adhesion Molecule Facts Book I(1993))。同样,毒素和毒液,病毒抗原决定簇,激素(例如,鸦片,类固醇,等等),细胞内受体(例如介导各种小配体(包括类固醇,甲状腺激素,类维生素A和维生素D;肽)的作用),药物,凝集素,糖,核酸(直链和环状聚合物构型),寡糖,蛋白质,磷脂和抗体都可以与各种细胞受体相互作用。

[0188] 诸如聚氨酯,聚酯,聚碳酸酯,聚脲,聚酰胺,聚乙烯亚胺,聚亚芳基硫醚,聚硅氧烷,聚酰亚胺和聚乙酸酯的合成聚合物也可以形成适当的标记物或标记物结合物。许多其他标记物/标记物结合物对在本文所述的测定系统中也是有用的,这对于本领域技术人员在阅读本公开内容时将是显而易见的。

[0189] 常见的接头如肽,聚醚等也可以用作标记物,并且包括多肽序列,例如约5-200个氨基酸的poly-Gly序列。这种灵活的接头是本领域技术人员已知的。例如,聚(乙二醇)接头可从阿拉巴马州亨茨维尔的Shearwater聚合物股份有限公司获得。这些接头可选具有酰胺键,巯基键或杂官能功能键。

[0190] 使用目前可获得的任何各种方法,标记物结合物固定到固体基材上。通常,通过将全部或部分底物暴露于化学试剂,化学试剂与标记物结合物的一部分反应,固体底物被衍生或功能化。例如,适合连接到较长链部分的基团将包括胺,羟基,巯基和羧基。氨基烷基硅烷和羟基烷基硅烷可用于官能化各种表面,如玻璃表面。文献中很好地描述了这种固相生物聚合物阵列的构建(参见例如.,Merrifield;J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154(1963)(描述固相合成,例如,缩氨酸);Geysen等人,J. Immun. Meth. 102:259-274(1987)(描述在别针上的固相组件的合成);Frank和Doring,Tetrahedron 44:60316040(1988)(描述纤维素盘上各种肽序列的合成)。Fodor等人,Science, 251:767-777(1991);Sheldon等人Clinical Chemistry 39(4):718-719(1993);和Kozal等人,Nature Medicine 2(7):753759(1996)(都描述了固定在固体底物上的生物聚合物阵列)。用于将标记物结合物固定到基底上的非化学方法包括其他常用方法,例如加热,通过UV辐射交联等。

[0191] 在某些方面,本发明提供了用于以高通量形式鉴定可以调节CTGF表达或活性的化合物的体外测定法。在一些实施方案中,本发明的方法包括对照反应。对于所描述的每种测定形式,不包含调节剂的“无调节剂”对照反应提供结合活性的背景水平。

[0192] 在一些测定中,需要具有阳性对照以确保测定的组分正常工作。至少有两种类型的阳性对照是合适的。首先,将已知的CTGF活化剂与一个测定样品一起温育,并根据本文所述的方法确定由CTGF的表达水平或活性增加所导致的信号增加。其次,可以加入已知的CTGF抑制剂,并可类似地检测得到的表达或活性信号的随之减少。

[0193] F. 基于计算机的检测

[0194] 调节CTGF表达或活性的化合物的另一种分析包括计算机辅助药物设计,其中使用计算机系统产生CTGF的三维结构,CTGF的三维结构基于其氨基酸或核苷酸序列编码的结构信息。在一个计算机程序,输入序列与一个预先建立的算法直接和主动相互作用,以产生分子的二级,三级和四级结构模型。可以对CTGF的潜在配体或结合伴侣进行类似的分析。然后检查蛋白质或核苷酸结构的模型以鉴定具有结合CTGF能力的结构区域。然后这些区域用于鉴定结合CTGF的多肽。

[0195] 通过在计算机系统中输入至少10个氨基酸残基的蛋白质氨基酸序列或编码CTGF的相应核酸序列来产生蛋白质的三维结构模型。由核酸序列编码的氨基酸序列代表编码蛋白质结构信息的蛋白质的主序列或子序列。从计算机键盘输入至少10个氨基酸序列残基(或编码10个氨基酸的核苷酸序列)。计算机可读基板包括但不限于电子存储介质(例如,磁盘,磁带,盒式磁带和芯片)、光学介质(例如CD ROM)、由互连网站以及RAM发布的信息。然后使用本领域技术人员已知的软件,通过氨基酸序列与计算机系统的相互作用产生蛋白质的三维结构模型。

[0196] 氨基酸序列代表编码形成感兴趣蛋白质二级,三级和四级结构所需信息的一级结构。软件查看一级序列编码的某些参数以生成结构模型。这些参数被称为“能量术语”,主要包括静电势,疏水电势,溶剂可及表面和氢键。二次能量术语包括范德华势。生物分子以累积方式形成使能量项最小化的结构。因此,计算机程序使用由一级结构或氨基酸序列编码的这些术语来创建二级结构模型。

[0197] 通过基于二级结构的能量项形成二级结构编码的蛋白质的三级结构。此时使用者可以输入附加变量,例如蛋白质是否是膜结合的或可溶的,其在体内的位置以及其细胞位置,例如细胞质,表面或核。这些变量连同二级结构的能量术语被用来形成三级结构的模型。在对三级结构建模时,计算机程序将二级结构的疏水面与类似的二级结构的疏水面、二级结构的亲水面相匹配。

[0198] 一旦产生了结构,计算机系统就能识别潜在的配体结合区。通过输入如上所述化合物的氨基酸或核苷酸序列或化学式来产生潜在配体的三维结构。然后将潜在配体的三维结构与CTGF的三维结构进行比较以鉴定CTGF的结合位点。CTGF与配体之间的结合亲和力使用能量术语来确定,以确定哪些配体具有增强与CTGF结合的可能性。

[0199] VIII. 给药和药物组合物

[0200] 在某些方面,本文描述的治疗剂(例如CTGF抑制剂)直接向个体(例如人)给药。通过引入药剂与待治疗的组织接触常规采用的任何途径进行给药,并且是本领域技术人员熟知的。尽管可以使用多途径给予特定组合物,一条特定的途径通常可以提供比另一条途径更直接和更有效的反应。

[0201] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂可以与用于治疗情绪障碍或治疗情绪障碍症状的其他药物组合。在一些实施方案中,本发明的药物组合物可以包含一种或多种CTGF抑制剂和至少一种可用于治疗治疗情绪障碍或治疗情绪障碍症状的另外的化合物。

[0202] 本发明的药物组合物可以包含药学上可接受的载体。在某些方面,药学上可接受的载体部分由所给予的特定组合物以及用于组合物给药的具体方法确定。因此,本发明有各种合适的药物组合物制剂(参见,例如,《雷明顿药物科学》(REMLINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES),第18版,Mack Publishing Co,伊斯顿,宾夕法尼亚(1990))。

[0203] 本发明的药物组合物以一种与剂量配方相容的方式给药,并且数量将会是治疗有效量。要给药的数量取决于各种因素,因素包括例如个体的年龄,体重,身体活动和饮食,要治疗的情绪障碍,以及情绪障碍的阶段或严重程度。在某些实施方案中,伴随在特定个体中用特定治疗剂给药,药物剂量的大小还可以通过的任何不良副作用的存在,性质和程度来确定。通常,对于典型的个体而言,治疗剂的剂量当量为约1ng/kg至约10mg/kg。

[0204] 在某些实施方案中,剂量可以采取固体,半固体,冻干粉末或液体剂型的形式,例如片剂,丸剂,丸剂,胶囊剂,粉剂,溶液剂,混悬剂,乳剂,栓剂,灌肠剂,乳膏剂,软膏剂,洗剂,凝胶剂,气雾剂,泡沫剂等,优选采用以精确剂量简单给药的单位剂量形式。

[0205] 在本发明的实践中,组合物可以通过,例如静脉内,颅内,鞘内,脊柱内,腹膜内,肌内,病灶内的(intralesionally),鼻内,皮下,脑室内,口服,局部和/或吸入给药。

[0206] 如本文所用,术语“单位剂型”是指作为人和其他哺乳动物适合单位剂量的物理离散单位,每个单位含有预定量的治疗剂,所述治疗剂被计算以产生期望的起效,耐受性和/或治疗效果,与合适的药物赋形剂(例如安瓿)联合使用。另外,可以制备更浓的剂型,然后可以从其中制备更稀的单位剂型。因此,更浓缩的剂型将包含显著多于例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多倍治疗剂的量。

[0207] 制备这种剂型的方法是本领域技术人员已知的。(参见,例如《雷明顿药物科学》,第18版.,Mack Publishing Co,伊斯顿,宾夕法尼亚州(1990))。剂型通常包括常规的药物载体或赋形剂,并且可以另外包含其它药剂,载体,佐剂,稀释剂,组织渗透促进剂,增溶剂等。可以通过本领域公知的方法为具体剂型和给药途径调整适合的赋形剂(参见,例如《雷明顿药物科学》,同上)。

[0208] 合适的赋形剂的实例包括但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄耆胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和聚丙烯酸,例如Carbopol等,Carbopol 941,Carbopol 980,Carbopol 981等。剂型还可以包括润滑剂如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂如甲基-、乙基-和丙基-羟基-苯甲酸酯(即对羟基苯甲酸酯),pH调节剂如无机和有机酸和碱、甜味剂、和调味剂。剂型还可以包含可生物降解的聚合物珠、葡聚糖和环糊精包合物。

[0209] 对于口服给药,治疗有效剂量可以是片剂、胶囊剂、乳剂、混悬剂、溶液剂、糖浆剂、喷雾剂、锭剂、粉剂和缓释制剂的形式。口服给药的合适赋形剂包括药用级别的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0210] 在一些实施方案中,治疗有效剂量采取丸剂、片剂或胶囊的形式,因此剂型包含有治疗作用的药物有下列:稀释剂如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等;崩解剂如淀粉或其衍生物;润滑剂如硬脂酸镁等;和粘合剂如淀粉、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素及其衍生物。治疗剂也可以配制成例如置于聚乙二醇(PEG)载体中的栓剂。

[0211] 通过将治疗剂和任选的一种或多种药学上可接受的佐剂溶解或分散于例如盐水的载体,液体剂型可被制备((例如,0.9%w/v氯化钠))。葡萄糖水溶液、甘油、乙醇等形成溶液或混悬液、例如用于口服、局部或静脉内给药。治疗剂也可以配制成保留灌肠剂。

[0212] 对于局部给药,治疗有效剂量可以是乳剂、洗剂、凝胶剂、泡沫剂、乳膏剂、凝胶剂、溶液剂、混悬剂、软膏剂和透皮贴剂的形式。对于通过吸入给药,治疗剂可以作为干粉递送

或者通过喷雾器以液体形式递送。气溶胶制剂可以放入加压的可接受的推进剂如二氯二氟甲烷中。对于胃肠外给药,治疗有效剂量可以是无菌注射溶液和无菌包装粉末的形式。优选地,可注射溶液在约4.5至约7.5的pH下配制。

[0213] 治疗有效剂量也可以以冻干形式提供。这样的剂型可以包括用于在给药前重建的缓冲剂,例如碳酸氢盐,或者可以包含在冻干剂型中例如用水重建的缓冲剂。冻干剂型还可以包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。可以将冻干剂型提供在注射器中,任选地与用于重构的缓冲剂组合包装,使得重构的剂型可以立即向个体施药。

[0214] IX实施例

[0215] 提供以下实例来说明,而不是限制要求保护的发明。

[0216] 实施例1.抗CTGF抗体的急性和慢性给药降低了抑郁样行为。

[0217] 该实施例说明,在动物模型中,抗CTGF抗体的急性和慢性给药降低了抑郁样行为,表明抗CTGF抗体疗法用于提供抗抑郁作用。

[0218] 实验步骤

[0219] 体内试验系统:用重组人IgG1 κ (kappa) 单克隆抗体 (FG-3019) 给药,并在远交系大鼠中测试抑郁样行为和焦虑样行为。对抑郁样行为和焦虑样行为为进行急性和慢性研究。

[0220] 强迫游泳试验 (FST)

[0221] 强迫游泳试验在0800至1130之间进行评估抑郁样行为。将大鼠置于25°C注满水的圆筒中,使其尾巴不触及底部。在第一天,试验包括15分钟,第二天试验包括5分钟。这些动物在第一天立即进行注射。用摄像机记录测试结果,并且游泳,攀爬和不运动是由一个对实验组完全不了解的观察者使用Observer软件 ((Noldus信息技术) 进行评分。游泳和攀爬分别定义为动物的水平和垂直运动。不运动被定义为保持动物漂浮所需的最小量的运动。

[0222] 高架十字迷宫 (EPM)

[0223] 高架十字迷宫由黑色有机玻璃构成,四个高架臂(距地面70厘米,长45厘米,宽12厘米)。诸臂被放置在一个十字架上,两个相对的臂由45厘米高的壁包围,另外两个臂开放。在开放和闭合的手臂的交叉点,有一中央12×12厘米的平台,提供所有臂的入口。测试室昏暗(大约40勒克斯),并通过计算机视频跟踪系统(Noldus Ethovision, 利斯堡,弗吉尼亚州)监测行为。在5分钟测试开始时,将每只大鼠放置在面向闭合臂的中央正方形中。计算机化的跟踪系统记录第一次进入开放臂的延迟时间,在5分钟测试过程中在开放臂,闭合臂和中心平台花费的时间量。测试在0800和1130之间进行。

[0224] 附加方法

[0225] 终止动物的方法:断颈。

[0226] 尸检分析:对海马体的连续脑切片进行了微阵列分析和mRNA原位杂交,对解剖的海马体进行qRT-PCR。

[0227] 体内试验的实验终点:FST:攀爬的总持续时间、游泳和不运动百分比;EMP:花在开放臂、闭合臂和中心平台的时间。以及每个象限的次数;LDB:在光明和黑暗象限中花费的时间,以及进入光亮的延迟时间。

[0228] 尸检分析的实验终点:归一化基因表达,整合光密度和倍数变化。

[0229] 数据分析方法:使用适当的统计分析,在SPSS中各组之间分析各组的每个受试者的值。

[0230] 统计学评价方法:学生t检验、单向方差分析、多重比较的双向方差分析。

[0231] 结果

[0232] FG-3019对情绪的急性研究

[0233] 在套管植入左侧脑室5天后,给动物脑室内(i.c.v.)注射FG-3019或对照huIgG,剂量为20 μ g,体积为1 μ l,流速为1 μ l/min。五到十分钟后,将动物在高架十字迷宫(EPM)上测试五分钟,在中心平台、开放臂和闭合臂的频率和持续时间被量化。五天后,动物进行了15分钟的游泳。游泳1小时后,给动物注射FG-3019或huIgG。然后在注射后24小时(第2天),对动物进行5分钟的强迫游泳试验(FST),测试攀爬,游泳和不运动。在EPM上,在中心平台、开放臂和闭合臂花费的时间没有显著差异。在FST上,动物不运动的总持续时间百分比显著下降,总游泳持续时间显著增加(图1)。这些结果表明,这种FG-3019的剂量降低了抑郁样行为,表明它作为一种抗抑郁药。

[0234] FG-3019对情绪的慢性研究

[0235] 在套管植入左侧脑室五天后,以1 μ l/分钟的流速,1 μ l体积将20 μ g剂量给动物脑室内(i.c.v.)注射FG-3019或对照huIgG。大鼠每48小时注射一次,共14天,共7次注射。在第11天测试大鼠的运动活性,在第12天采用EPM测试大鼠的运动活性,在第13和14天采用FST测试大鼠的运动活性。不运动性总持续时间百分比显著下降(图2)。这一结果与急性研究结果一致,证明FG-3019能降低抑郁样行为,表明它可以作为抗抑郁药物。用FG-3019(icv)进行慢性治疗也可显著降低在海马体的齿状回中CTGF 14.6%的表达。

[0236] 实施例2.尸检人杏仁核中增加的CTGF表达

[0237] 这个例子说明,与对照组相比,重性抑郁症(MDD)患者的杏仁核中CTGF显著上调。首先通过Illumina Human Expression BeadChip在不同杏仁核中评估CTGF基因表达,并通过BeadStudio进行分析。用于微阵列分析的探针序列是:5'-CAGTGTCCCTGGCAGGCTGATTTCTAGGTAGAAATGTGGTAGCTCACGC-3'(SEQ ID NO:1)。在微阵列实验之后,使用从不同杏仁核提取的新鲜RNA进行RT-PCR。将等量的高质量RNA加载到cDNA合成中。然后将cDNA 1:10稀释并用于PCR反应。之前使用标准曲线和熔解曲线验证了PCR引物。引物序列如下:正向,5'-TGGAGTTCAAGTGCCCTGAC-3'(SEQ ID NO:2);和反向5'-ACTGCTCCTAAAGCCACACC-3'(SEQ ID NO:3)。

[0238] 在杏仁核的附基底核(AB)中,CTGF与MDD之间的关系相当强,一个探针显示p值为2.44E-11,另一个探针p值为1.61E-08。见表1。其他几个杏仁核的CTG在MDD(AAA, AHA, 基底, 外侧)中具有相似的显著上调。见表1。值得注意的是,在杏仁核中,MDD个体的CTGF表达显著高于依赖于杏仁核的对照组(即,1.59倍至2.06倍)。

[0239] 表1.分布在杏仁核上的CTGF表达

[0240]

标志	AAA	AB	AHA	基底	中心	CO	外侧	中	PAC	PL	中值P
CTGF	0.022	2.44E-11	4.92E-04	0.094	0.003	0.003	4.07E-04	0.043	0.004	0.228	0.069
CTGF	0.022	1.61E-08	1.24E-04	0.014	0.021	0.763	7.70E-04	0.117	0.381	0.344	0.069

[0241] 实施例3. CTGF途径成员在低焦虑与高焦虑动物中改变的表达

[0242] 该实施例说明高度焦虑的大鼠(LRs)具有比较少焦虑的大鼠(HRs)在海马中更高的CTGF表达(即1.95倍)。齿状回中的CTGF基因表达首先通过Illumina Rat Expression BeadChip评估并通过BeadStudio分析。微阵列分析显示LRs齿状回的CTGF表达显著高于

HRs。用于微阵列分析的探针序列是：

[0243] 5'-CCACGAGGAAGTGTGGCTGCTTCTTTGACTATGACTGGTTTGGGAGGCA-3' (SEQ ID NO: 4)。在微阵列实验之后,使用从LRs和HRs的整个海马提取的新鲜RNA进行RT-PCR。将等量的高质量RNA加载到cDNA合成中。然后将cDNA以1:10稀释并用于PCR反应。之前使用标准曲线和熔解曲线验证了PCR引物。引物序列如下:正向,5'-AGAGTGGAGATGCCAGGAGA-3' (SEQ ID NO:5);和反向5'-CACACACCCAGCTCTTGCTA-3' (SEQ ID NO:6)。

[0244] 该实施例还显示用载体 (HR-VEH) 处理的低焦虑动物比用载体 (LR-VEH) 处理的高焦虑动物显着更少的CTGF表达 (p<0.001)。见表2。另外,该实施例说明,与用载体 (LR-VEH) 处理的高焦虑动物相比,用减少焦虑的药物如FGF2 (LR-FGF2) 处理的高焦虑动物具有显著降低的CTGF表达 (p<0.001)。见表2。该实施例进一步说明CTGF通路成员,如ECM2、EGR1、BCL2L2、IGFBP7、P4HA1、PDGFB、MAPKAPK5、MAPK8IP3、PKN1、PRKAG1、CREB1、RHOG、RHOA、SOX4和STK3在LR-FGF2与LR-VEH动物,HR-VEH与LR-VEH动物之间差异表达。见表2。相对于对照,ECM2在具有严重抑郁症 (MDD) 的人个体的杏仁核中显着上调。相对于对照,RHOG在患有MDD的人个体的杏仁核中显着下调。

[0245] 表2. CTGF通路成员的表达

	LR-FGF2 vs. LR-VEH	HR-VEH vs. LR-VEH
CTGF	下调	下调
ECM2	下调	***
EGR1	下调	***
BCL2L2	下调	下调
IGFBP7	下调	下调
P4HA1	下调	***
PDGFB	***	下调
MAPKAPK5	***	下调
MAPK8IP3	***	下调
PKN1	***	下调
PRKAG1	***	下调
Creb/CREB1	上调	***
RHOG	***	上调
RHOA	上调	上调
SOX4	上调	***
STK3	上调	***

[0246] 出于清楚理解的目的,尽管已经通过举例说明和实例详细描述了前述发明,但是本领域技术人员将会理解,在所附权利要求的范围内可以实施某些改变和修改。此外,本文提供的每篇参考文献通过引用整体并入,如同每篇参考文献单独引入作为参考一样。

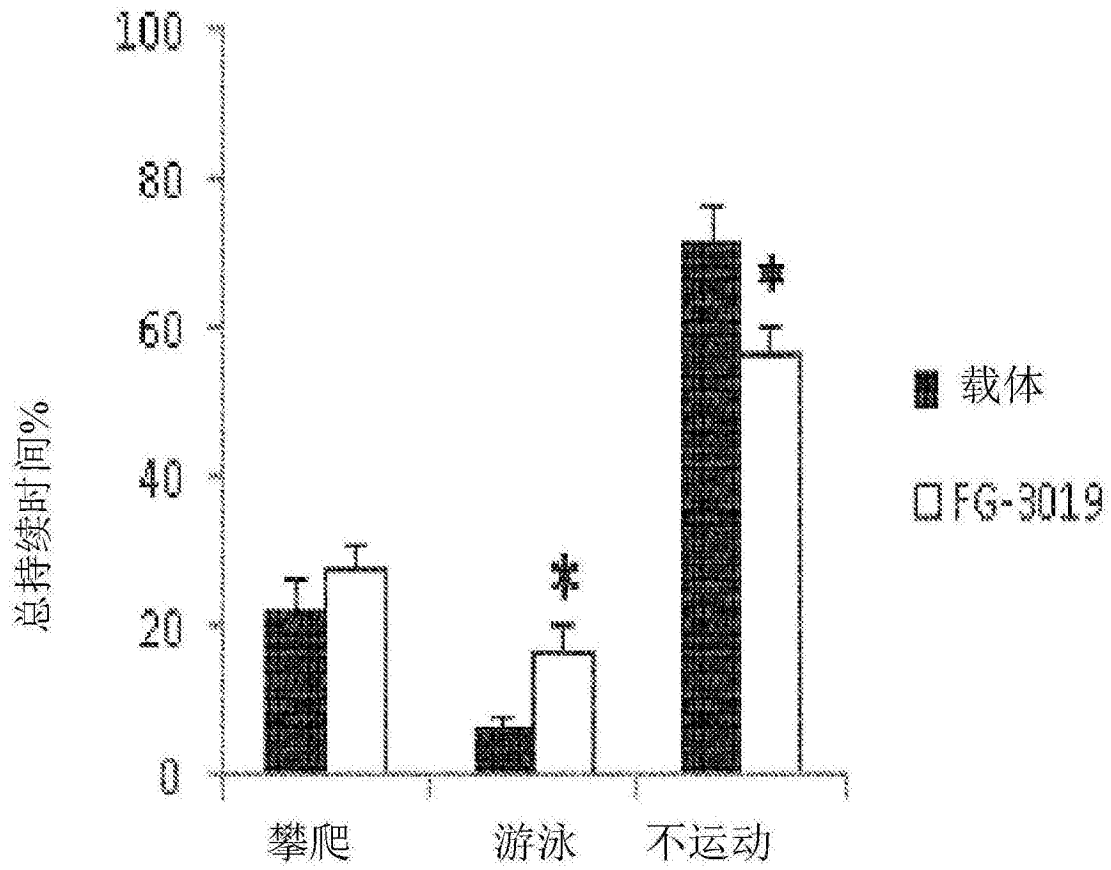


图1

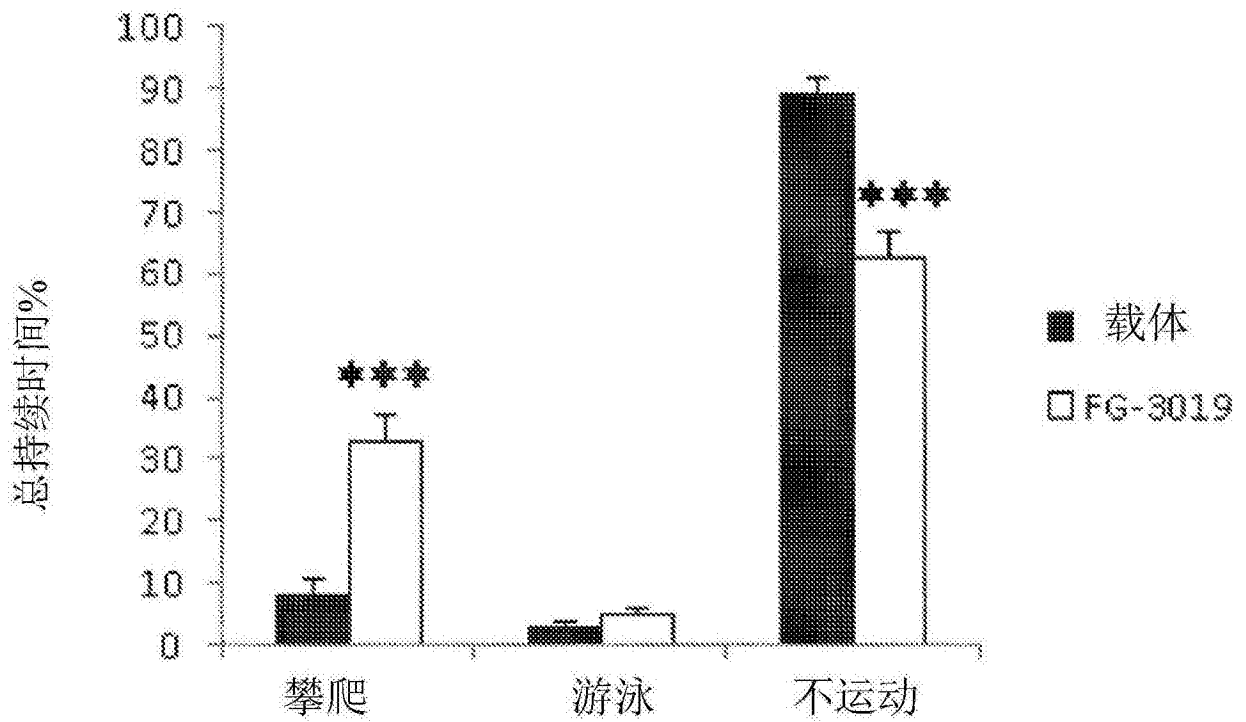


图2