



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102348798 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201080011989. 6

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 01. 15

(30) 优先权数据

61/145, 294 2009. 01. 16 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/000097 2010. 01. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02010/083044 EN 2010. 07. 22

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 达蒙·西伦·佩奇 姆里甘卡·苏尔

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 顾晋伟 郑斌

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

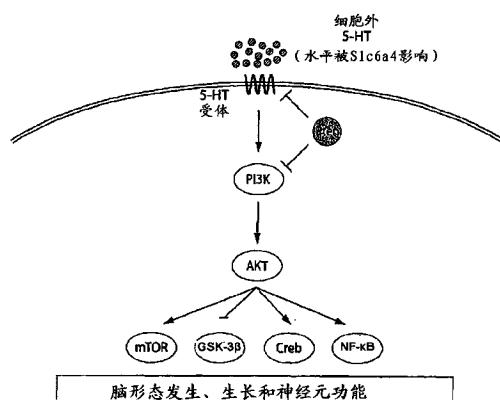
权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 8 页

(54) 发明名称

孤独症谱系障碍的诊断和治疗

(57) 摘要

本发明涉及用于诊断和治疗孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders) 的方法, 尤其是用于诊断和治疗以头部尺寸 (周长) 增加和社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍的方法。



1. 一种用于治疗孤独症谱系障碍的方法,其包括:
对需要该治疗的对象施用一种或多种治疗性分子,所述治疗性分子是 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂是对治疗所述对象有效的量的 (1) 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt、mTOR、Creb 和 / 或 NF- κ B 的拮抗剂或抑制剂,和 / 或 (2) GSK-3 β 激活子的激动剂。
3. 权利要求 2 的方法,其中施用 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂是可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。
5. 权利要求 3 或 4 的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂是 SB242084。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述 SB242084 的施用剂量是约 0.1-1mg/kg/天。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述 SB242084 的施用剂量是约 1-10mg/kg/天。
8. 权利要求 5 的方法,其中所述 SB242084 以约 0.1-10mg/kg 的剂量间歇施用。
9. 权利要求 1 至 4 中任一项的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂并未作为非典型抗精神病药物、选择性血清素再摄取抑制剂 (SSRI) 或 PPAR- γ 激动剂上市 (截至本申请提交日)。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂不是利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀或噻唑烷二酮类。
11. 权利要求 1 的方法,其中施用 PI3K 的拮抗剂或抑制剂。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述 PI3K 的拮抗剂或抑制剂是可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。
13. 权利要求 11 或 12 的方法,其中所述 PI3K 的拮抗剂或抑制剂是舒尼替尼 (SUTENT[®])。
14. 权利要求 1 的方法,其中施用 Akt 的拮抗剂或抑制剂。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述 Akt 的拮抗剂或抑制剂是可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。
16. 权利要求 14 或 15 的方法,其中所述 Akt 的拮抗剂或抑制剂是氯氮平或尼非那韦 (VIRACEPT)。
17. 权利要求 1 的方法,其中施用 mTOR 的拮抗剂或抑制剂。
18. 权利要求 17 的方法,其中所述 mTOR 的拮抗剂或抑制剂是可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。
19. 权利要求 17 或 18 的方法,其中所述 mTOR 的拮抗剂或抑制剂是雷帕霉素 (西罗莫司)。
20. 权利要求 1 的方法,其中施用 Creb 的拮抗剂或抑制剂。
21. 权利要求 1 的方法,其中施用 NF- κ B 的拮抗剂或抑制剂。
22. 权利要求 1 的方法,其中施用 GSK-3 β 激活子的激动剂。
23. 权利要求 1 至 22 中任一项的方法,其中所述对象是人。
24. 权利要求 1 至 23 中任一项的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂经口、静脉内、肌内、鼻内、腹膜内、皮下或鞘内施用。

25. 权利要求 1 至 24 中任一项的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂在诊断为孤独症谱系障碍之后施用。

26. 权利要求 1 至 24 中任一项的方法,其中所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂在诊断为孤独症谱系障碍之前预防性施用。

27. 权利要求 1 至 26 中任一项的方法,其中所述对象没有其他需要用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂治疗的症状。

28. 权利要求 1 至 27 中任一项的方法,其还包括测试所述对象的 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或循环血清素的增加。

29. 权利要求 28 的方法,其中仅在所述测试检测到 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或循环血清素的增加时对所述对象施用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。

30. 权利要求 1 至 29 中任一项的方法,其还包括测试所述对象的巨头畸型(脑过度生长)和 / 或社交行为缺陷,如社交互动缺陷和 / 或社交记忆缺陷。

31. 权利要求 30 的方法,其中仅在所述测试检测到巨头畸型和 / 或社交行为缺陷时对所述对象施用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。

32. 权利要求 1 至 31 中任一项的方法,其还包括对所述对象施用针对孤独症谱系障碍的第二治疗剂,其中所述第二治疗剂和所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂以有效治疗所述对象的组合量施用。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述第二治疗剂是利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀或 PPAR- γ 激动剂。

34. 一种用于治疗孤独症谱系障碍的方法,其包括:

对需要该治疗的对象施用有效量的以下分子来治疗所述对象:一种或多种降低 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt、mTOR、Creb 和 / 或 NF- κ B 表达的分子,和 / 或一种或多种提高 GSK-3 β 表达的分子。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述一种或多种降低表达的分子是一种或多种诱导 RNA 干扰的分子。

36. 权利要求 35 的方法,其中所述一种或多种诱导 RNA 干扰的分子是一种或多种短干扰核酸 (siNA)。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述一种或多种 siNA 分子是短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、小 RNA (miRNA) 和短发夹 RNA (shRNA) 分子。

38. 权利要求 34 至 37 中任一项的方法,其中所述对象是人。

39. 权利要求 34 至 38 中任一项的方法,其中所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种提高表达的分子经口、静脉内、肌内、鼻内、腹膜内、皮下或鞘内施用。

40. 权利要求 34 至 39 中任一项的方法,其中所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子在诊断为孤独症谱系障碍之后施用。

41. 权利要求 34 至 39 中任一项的方法,其中所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子在诊断为孤独症谱系障碍之前预防性施用。

42. 权利要求 34 至 41 中任一项的方法,其中所述对象没有其他需要用所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子治疗的症状。

43. 权利要求 34 至 42 中任一项的方法,其还包括测试所述对象的 PTEN 缺陷和 / 或

SLC6A4 缺陷和 / 或循环血清素的增加。

44. 权利要求 43 的方法, 其中仅在所述测试检测出 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或循环血清素的增加时对所述对象施用所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种提高表达的分子。

45. 权利要求 34 至 44 中任一项的方法, 其还包括测试所述对象的巨头畸型 (脑过度生长) 和 / 或降低的社交能力 (社交接触行为缺陷)。

46. 权利要求 45 的方法, 其中仅在所述测试检测出巨头畸型和 / 或降低的社交能力时对所述对象施用所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种提高表达的分子。

47. 权利要求 34 至 46 中任一项的方法, 其还包括对所述对象施用针对孤独症谱系障碍的第二治疗剂, 其中所述第二治疗剂和所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种提高表达的分子以有效治疗所述对象的组合量施用。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述第二治疗剂是所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。

49. 权利要求 47 的方法, 其中所述第二治疗剂是利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀或 PPAR- γ 激动剂。

50. 一种用于诊断以头部尺寸 (周长) 增加和 / 或社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍的方法, 其包括

分析来自对象的生物样品中孤独症谱系障碍的一种或多种生物标志是否存在, 其中所述一种或多种生物标志是 (1) Pten 基因和 / 或 Slc6a4 基因中一种或多种突变或表观遗传学变化的存在, 和 / 或 (2) 相对于循环血清素水平的正常范围, 循环血清素水平的增加,

其中孤独症谱系障碍的所述一种或多种生物标志的存在表明所述对象患有以头部尺寸 (周长) 增加和 / 或社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍。

51. 权利要求 50 的方法, 其中所述 Pten 基因和 / 或 Slc6a4 基因的一种或多种突变或表观遗传学变化导致 PTEN 的表达或功能降低和 / 或 SLC6A4 的表达或功能降低。

52. 权利要求 50 或 51 的方法, 其还包括准备表明所述对象的孤独症谱系障碍状态的报告。

53. 权利要求 50 至 52 中任一项的方法, 其还包括给对所述患者施用健康护理的临床医生提供所述生物样品的分析。

54. 权利要求 50 至 53 中任一项的方法, 其中所述社交行为缺陷是社交互动缺陷和 / 或社交记忆缺陷。

孤独症谱系障碍的诊断和治疗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求于 2009 年 1 月 16 日提交的美国临时申请序列号 61/145, 294 的权益, 该临时申请的公开内容通过整体引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于诊断和治疗孤独症谱系障碍的方法, 尤其是用于诊断和治疗以头部尺寸 (周长) 增加和社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders, ASD) 是高度遗传的, 在同胞兄弟姐妹中有 2-3% 的再发率, 而在同卵双胞胎中有 60-90% 的一致率。然而, 已知的遗传原因 (例如, 单基因疾病如脆性 X (Fragile-X) 或结节性硬化症, 或者染色体异常) 造成约 10% 的 ASD 病例。因此, 大部分 ASD 病例目前病因不明。目前的估计是许多基因彼此之间以及与环境因素之间的相互作用造成了 ASD 易感性。

[0006] 发明概述

[0007] 根据对 PTEN 和 / 或 SLC6A4 杂合小鼠进行的实验, 本申请人已确定这些基因及其表达产物是孤独症谱系障碍的生物标志。根据 PTEN 和 / 或 SLC6A4 表达产物的生物化学相互作用, 本申请人已确定 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂出人意料地成为人 ASD 治疗的可行候选物。

[0008] 提供了针对孤独症谱系障碍 (ASD) 的生物标志, 尤其是针对以头部尺寸 (周长) 增加和社交行为缺陷为特征的 ASD 的生物标志。所述生物标志是导致 PTEN 表达或功能降低 (PTEN 缺陷) 的遗传学或表观遗传学改变和 / 或导致 SLC6A4 表达或功能降低 (SLC6A4 缺陷) 的遗传学或表观遗传学改变。可以用作生物标志的表观遗传学改变的实例包括导致 TGF- β 上调的炎症 (抑制 PTEN 的转录) 和暴露于花生四烯酸 (抑制 PTEN) (见 Covey 等, *Oncogene*. 26 (39) :578457-92, 2007)。ASD 的另一生物标志是升高的循环血清素水平。

[0009] 还提供了治疗 ASD 的方法。在一些实施方案中, 所述治疗方法包括降低脑血清素的可获得性。在一些具体实施方案中, 用 SLC6A4 的激动剂来降低脑血清素的可获得性。在另一些实施方案中, 所述治疗方法包括降低 PI3 激酶通路的激活或抑制血清素受体类型 5-HT_{2c} 通路。在一些具体实施方案中, ASD 的标志是以下的一个或多个: PTEN 缺陷、SLC6A4 缺陷、头部尺寸 (周长) 增加、循环血清素增加。

[0010] 根据本发明的一方面, 提供了治疗孤独症谱系障碍的方法。所述方法包括对需要该治疗的对象施用一种或多种治疗性分子, 所述治疗性分子为 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。在一些实施方案中, 所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂是对治疗所述对象有效的量的 (1) 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇 -3- 激酶 (PI3K)、Akt、mTOR、Creb 和 / 或 NF- κ B 的拮抗剂或抑制剂, 和 / 或 (2) GSK-3 β 激活子的激动剂。

[0011] 在一些实施方案中, 施用 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂, 优选可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。在某些实施方案中, 所述 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂是 SB242084。在一

些实施方案中,SB242084 的施用剂量是约 0.1-1mg/kg/天。在另一些实施方案中,SB242084 的施用剂量是约 1-10mg/kg/天。在又一些实施方案中,SB242084 是以约 0.1-10mg/kg 的剂量间歇施用的。

[0012] 在一些实施方案中,5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂并未作为非典型抗精神病药物、选择性血清素再摄取抑制剂 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) 或 PPAR- γ 激动剂销售 (截至本申请提交日)。在某些实施方案中,5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂不是利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀或噻唑烷二酮类。

[0013] 在一些实施方案中,施用 PI3K 的拮抗剂或抑制剂,优选可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。在某些实施方案中,所述 PI3K 的拮抗剂或抑制剂是舒尼替尼 (SUTENT[®])。

[0014] 在一些实施方案中,施用 Akt 的拮抗剂或抑制剂,优选可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。在某些实施方案中,Akt 的拮抗剂或抑制剂是氯氮平或尼非那韦 (VIRACEPT)。

[0015] 在一些实施方案中,施用 mTOR 的拮抗剂或抑制剂,优选可以进入脑中的拮抗剂或抑制剂。在某些实施方案中,mTOR 的拮抗剂或抑制剂是雷帕霉素 (西罗莫司)。

[0016] 在一些实施方案中,所述方法包括施用 Creb 的拮抗剂或抑制剂、NF- κ B 的拮抗剂或抑制剂或者 GSK-3 β 激活子的激动剂,优选其中每个可以进入脑中。

[0017] 在一些实施方案中,所述对象是人。

[0018] 在一些实施方案中,所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂经口、静脉内、肌内、鼻内、腹膜内、皮下或鞘内施用。

[0019] 在一些实施方案中,所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂在诊断为孤独症谱系障碍之后施用。

[0020] 在一些实施方案中,所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂在诊断为孤独症谱系障碍之前预防性施用。

[0021] 在一些实施方案中,所述对象没有其他需要用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂治疗的状况。

[0022] 在一些实施方案中,所述方法还包括测试所述对象的 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或循环血清素的增加。在某些实施方案中,仅在所述测试检测到 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或增加的循环血清素时对所述对象施用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。

[0023] 在一些实施方案中,所述方法还包括测试所述对象的巨头畸型 (脑过度生长) 和 / 或社交行为缺陷 (如社交互动缺陷和 / 或在社交记忆缺陷)。在某些实施方案中,仅在所述测试检测到巨头畸型和 / 或社交行为缺陷时对所述对象施用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。

[0024] 在一些实施方案中,所述方法还包括对所述对象施用针对孤独症谱系障碍的第二治疗剂,其中所述第二治疗剂和所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂以有效治疗所述对象的组合量施用。在某些实施方案中,所述第二治疗剂是利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀或 PPAR- γ 激动剂。

[0025] 根据本发明的另一方面,提供了治疗孤独症谱系障碍的方法。所述方法包括向需要该治疗的对象施用有效量的以下分子来治疗所述对象:一种或多种降低 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3-激酶 (PI3K)、Akt、mTOR、Creb 和 / 或 NF- κ B 表达的分子,和 / 或一种或多种升

高 GSK-3 β 表达的分子。

[0026] 在一些实施方案中,所述一种或多种降低表达的分子是一种或多种诱导 RNA 干扰的分子。在某些实施方案中,所述一种或多种诱导 RNA 干扰的分子是一种或多种短干扰核酸 (siNA)。在一些实施方案中,所述一种或多种 siNA 分子是短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、小 RNA (micro-RNA, miRNA) 和短发夹 RNA (shRNA) 分子。

[0027] 在一些实施方案中,所述对象是人。

[0028] 在一些实施方案中,所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子经口、静脉内、肌内、鼻内、腹膜内、皮下或鞘内施用。

[0029] 在一些实施方案中,所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子在诊断为孤独症谱系障碍之后施用。

[0030] 在一些实施方案中,所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子在诊断为孤独症谱系障碍之前预防性施用。

[0031] 在一些实施方案中,所述对象没有其他需要用所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子治疗的状况。

[0032] 在一些实施方案中,所述方法还包括测试所述对象的 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或循环血清素的增加。在某些实施方案中,仅在所述测试检测到 PTEN 缺陷和 / 或 SLC6A4 缺陷和 / 或增加的循环血清素时对所述对象施用所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子。

[0033] 在一些实施方案中,所述方法还包括测试所述对象的巨头畸型 (脑过度生长) 和 / 或社交行为缺陷 (例如在社交互动缺陷和 / 或社交记忆缺陷)。在某些实施方案中,仅在所述测试检测到巨头畸型和 / 或社交行为缺陷时对所述对象施用所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子。

[0034] 在一些实施方案中,所述方法还包括对所述对象施用针对孤独症谱系障碍的第二治疗剂。所述第二治疗剂和所述一种或多种降低表达的分子和 / 或一种或多种升高表达的分子以有效治疗所述对象的组合量施用。在某些实施方案中,所述第二治疗剂是 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。在另一些实施方案中,所述第二治疗剂是利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀或 PPAR- γ 激动剂。

[0035] 根据本发明的另一方面,提供了用于诊断以头部尺寸 (周长) 增加和 / 或社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍的方法。所述方法包括分析来自对象的生物样品中一种或多种孤独症谱系障碍的生物标志是否存在。所述一种或多种生物标志是,例如 (1) Pten 基因和 / 或 Slc6a4 基因中一种或多种突变或表观遗传学变化的存在,和 / 或 (2) 相对于循环血清素水平的正常范围,循环血清素水平的升高。所述一种或多种孤独症谱系障碍生物标志的存在表明所述对象患有以头部尺寸 (周长) 增加和 / 或社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍。

[0036] 在一些实施方案中,所述 Pten 基因和 / 或 Slc6a4 基因中的一种或多种突变或表观遗传学变化导致 PTEN 的表达或功能降低和 / 或 SLC6A4 的表达或功能降低。

[0037] 在一些实施方案中,所述方法还包括编写表明所述对象的孤独症谱系障碍状态的报告。

[0038] 在一些实施方案中,所述方法包括给对所述患者施用健康护理的临床医生提供生

物样品的分析。

[0039] 在一些实施方案中,所述社交行为缺陷是指社交互动缺陷和 / 或社交记忆缺陷。

[0040] 参照本发明的详细描述,本发明的这些和其他方面以及各种优点和应用将更加明显。本发明的每个方面可以涵盖多种实施方案,其可通过下文的描述来理解。

附图说明

[0041] 图 1. $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠的巨头畸形

[0042] 图 1(A) 雄性 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 、 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 、 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 和 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠脑的代表性背视图。12 周龄时收集脑。

[0043] 图 1(B) 和 (C) 与野生型对照相比, $Pten$ 和 $Slc6a4$ 单倍体不足 (haploinsufficient) 的小鼠显示脑量的显著增加。(B) 与 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠、 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠和 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠相比, 雌性 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠的脑量显著增加 ($F_{3,42} = 20.6; P < 0.001$)。 $n = 10$ 只 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠, 10 只 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠, 10 只 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠和 13 只 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠。(C) 与 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠、 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠和 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠相比, 雄性 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠的脑量显著增加 ($F_{3,33} = 30.0; P < 0.001$)。 $n = 6$ 只 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠, 6 只 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠, 11 只 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠和 11 只 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Tukey HSD 检验)。8-12 周龄。将数据以体重归一化以补偿动物之间的体重差异。

[0044] 图 2. $Pten^{+/-}$ 小鼠的行为表征。

[0045] 图 2(A) 用于测定社交接触行为的装置的静态图像。将社交刺激小鼠放置在室 1 里的丙烯酸笼中, 室 3 的丙烯酸笼子保持空置作为对照。对象小鼠在室 2 开始测定, 对测定录像 10 分钟, 然后量化在每个室中停留时间的百分比。

[0046] 图 2(B) 和 (C) 数据显示在包含装有刺激小鼠笼子的室 (室 1)、空室 (室 2) 或包含没有刺激小鼠的笼子的室 (室 3) 停留时间的百分比。所有测试小鼠为 12 周龄。(B) 在雌性中, 相对于室 3 $Pten^{+/+}$ 小鼠显示对室 1 的显著偏好, 但是在 $Pten^{+/-}$ 小鼠中未见此偏好。(C) 在雄性中, 相对于室 3 $Pten^{+/+}$ 和 $Pten^{+/-}$ 小鼠都显示对室 1 的偏好。* $P < 0.05$, 在室 1 和室 3 之间组内比较方差分析。 $n =$ 每种基因型 17 只雄性, 12 只雌性。误差线表示标准误。在每组的柱中, 顺序是左边柱 = 室 1, 中间柱 = 室 2, 右边柱 = 室 3。

[0047] 图 2(D) $Pten^{+/-}$ 小鼠听觉惊吓应答的前脉冲抑制。所有测试小鼠为 12 周龄。与 $Pten^{+/+}$ 小鼠相比, $Pten^{+/-}$ 小鼠在背景之上 12db 或 16db 的前脉冲有显著的惊吓抑制缺陷。* $P < 0.05$, 给定前脉冲强度的基因型间的比较方差分析。 $n =$ 每种基因型 12 只小鼠 (6 只雌性)。在每组的柱中, 顺序是左边柱 = $Pten^{+/+}$, 右边柱 = $Pten^{+/-}$ 。

[0048] 图 3. $Pten$ 和 $Slc6a4$ 单倍体不足小鼠的社交行为和前脉冲抑制

[0049] 图 3(A) 8 周龄雌性 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠 ($n = 13$)、 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 小鼠 ($n = 13$)、 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠 ($n = 11$) 和 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠 ($n = 13$) 的社交接触数据。* $P < 0.05$, 室 1 和室 3 间组内比较方差分析。误差线表示标准误。在每组的柱中, 顺序是左边柱 = 室 1, 中间柱 = 室 2, 右边柱 = 室 3。

[0050] 图 3(B) 用于基因型间分析中表示为接触回避得分 (approach-avoidance score) 的图 (A) 的社交接触数据。与 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/+}$ 、 $Pten^{+/-}; Slc6a4^{+/+}$ 和 $Pten^{+/+}; Slc6a4^{+/-}$ 小鼠

相比, $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠在室 1 与社交刺激小鼠在一起的时间显著减少 ($F_{3,49} = 25.3$; $P < 0.001$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Tukey HSD 检验)。

[0051] 图 3(C) 8 周龄雄性小鼠的社交接触和认知数据。在试验 1 中, 刺激小鼠 (位于室 1) 和对象小鼠互动 10 分钟。然后将它们隔离 30 分钟。然后进行试验 2, 其中所述对象小鼠和刺激小鼠互动 5 分钟。 $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+}$ 小鼠 ($n = 12$), $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+}$ 小鼠 ($n = 10$), $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠 ($n = 8$) 和 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠 ($n = 8$)。* $P < 0.05$, 室 1 和室 3 间组内比较方差分析。误差线表示标准误。在每组的柱中, 顺序是左边柱 = 室 1, 中间柱 = 室 2, 右边柱 = 室 3。

[0052] 图 3(D) 8 周龄 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠惊吓应答的前脉冲抑制。 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+}$ 小鼠和 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠在背景之上 16db 的前脉冲有显著的惊吓抑制缺陷 ($F_{3,46} = 3.6$; $P < 0.05$)。* $P < 0.05$ (Tukey HSD 检验)。 $n = 11$ 只 $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+}$ 小鼠 (8 只雌性), 10 只 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+}$ 小鼠 (7 只雌性), 13 只 $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠 (7 只雌性) 和 13 只 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ 小鼠 (9 只雌性)。

[0053] 图 4. 基因型间和基因型内脑量和社交能力的相关性

[0054] 图 4(A) 8 周龄雌性 $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+}$ ($n = 7$), $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+}$ ($n = 8$), $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/-}$ ($n = 10$) 和 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ ($n = 11$) 小鼠的脑量群体平均值 (以体重归一化) (X 轴) 和社交接触回避得分 (Y 轴) 的图。 $r = -0.98$ 。

[0055] (B 至 E) 对按照基因型整理的图 (A) 的个体对象所作的脑量 (以体重归一化) (X 轴) 和社交接触回避得分 (Y 轴) 的图。

[0056] 图 4(B) $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+}$: $r = 0.77$; $P < 0.05$ (r 到 P 转换)。

[0057] 图 4(C) $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+}$: $r = 0.70$; $P < 0.05$

[0058] 图 4(D) $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/-}$: $r = 0.60$; $P = 0.07$

[0059] 图 4(E) $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$: $r = 0.65$; $P < 0.05$

[0060] 组的大小与图 3A-B 中报道的那些不同, 因为并未对所有测定了社交接触的動物进行脑量测量。

[0061] 图 5: 5-HT_{2c}R 拮抗剂 SB 242084 对 $Pten$ 单倍体不足小鼠的社交接触行为的影响。测试小鼠是雌性同胞小鼠, 8 周龄。在测定开始前 20 分钟, 向所述小鼠腹膜内注射 0.3mg/kg 的 SB 242084 或载体。将社交刺激小鼠放置于室 1, 而同样的空笼放置于室 3。将所述对象小鼠与刺激小鼠互动花费时间的百分比以 10 分钟量化。用 SB 242084 处理的 $Pten$ 单倍体不足小鼠显示了对与刺激小鼠互动的显著偏好, 相反, 载体处理的该基因型小鼠未显示这种偏好。对载体处理组, $n = 6$; 对 SB 242084 处理组, $n = 8$ 。* $P < 0.05$, 室 1 和室 3 间组内比较方差分析。在每组的柱中, 顺序是: 左边柱 = 室 1, 中间柱 = 室 2, 右边柱 = 室 3。

[0062] 图 6: 对气味识别和辨别的嗅觉习惯化 / 去习惯化的测定显示, $Pten$ 和 $Slc6a4$ 单倍体不足小鼠对新气味的习惯化和去习惯化模式并未改变。方差分析显示每个时间点时基因型之间的差异不显著。动物在 6-9 周龄时进行测试。 $n = 10$ 只 $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+}$ (8 只雌性), 10 只 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+}$ (8 只雌性), 9 只 $Pten^{+/+};Slc6a4^{+/-}$ (4 只雌性), 9 只 $Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-}$ (4 只雌性)。

[0063] 图 7: 血清素和 PI3K 信号通路如何可以通过与 $Slc6a4$ 和 $Pten$ 相互作用来影响脑大小和社交能力的模型。 $Slc6a4$ 影响血清素受体可获得的细胞外血清素 (5-HT) 的量。 $Pten$

结合 5-HT_{2C} 受体并拮抗其作用。血清素信号也可活化 PI3K 通路。推测的下游效应物包括 mTOR、GSK-3 β 、Creb 和 NF- κ B, 所有这些都能力影响脑形态形成、生长和神经元功能。

[0064] 应理解附图仅是示例性的, 并非是实施本发明所必需的。

[0065] 发明详述

[0066] 能增进对特发性孤独症 (idiopathic autism) 的了解的两个基因是 PTEN 和 SLC6A4。PTEN 作为 PI3- 激酶 (PI3K) 通路的负调节物发挥作用 (1)。已在孤独症和巨头畸型的一部分患者个体中鉴定到杂合 PTEN 突变, 从而使得患病个体成为 PTEN 单倍体不足 (2-5)。认知障碍的临床表型表现在 PTEN 单倍体不足个体中是多样的。因此, 已提出携带 PTEN 突变的孤独症谱系障碍 (ASD) 患者个体可能代表了筛选 ASD 临床表型的第二位置遗传修饰物的敏感组 (4)。SLC6A4 编码血清素的膜结合转运蛋白, 它影响该神经递质的细胞外水平。认为 SLC6A4 是 ASD 候选易感性基因和 ASD 的第二位置遗传修饰物 (6,7)。已报道在携带低表达的 Slc6a4 启动子多态性等位基因的 ASD 个体中有脑过度生长 (8) 和严重的社交行为障碍 (9)。此外, SLC6A4 调节细胞外血清素的水平, 而且被重复报道最多的 ASD 外周生物标志之一是患 ASD 个体的细胞外血清素水平的增加 (6)。ELISA 测定和类似的免疫吸附测定可用于测定循环血清素水平。已与 ASD 联系起来的血清素水平 \geq 对照 (非 ASD) 人群平均数的 2 倍标准差。

[0067] 考虑到它们与 ASD 的联系, PTEN 和 SLC6A4 均是潜在的外周生物标志, 因为这两个基因都是多效的并且在 CNS 外表达和发挥作用。然而, 这些标志表达水平变化的作用需要生物和行为测量的验证。有证据提示, 血清素通路 (其中 Slc6a4 发挥作用) 与 PI3K 通路 (Pten 对其起作用) 在脑中有交叉。已发现 Pten 与血清素受体 5-HT_{2c} 之间物理相互作用的证据, Pten 的磷酸酶活性调节该受体的活性 (10)。而且, 对神经细胞和非神经细胞进行的几项研究已证明, 血清素受体激动剂活化 Akt, 而且该活化以 PI3K 依赖的方式发生 ((11) 中综述)。然而, 尽管血清素和 PI3K 通路均与 ASD 的发病机制有很大关联, 这种相互作用对 ASD 相关的生物和行为表型的重要性至今仍未明确。

[0068] 在 Cowden 综合征患者 (ASD 患者的一个亚群) 中, PTEN 的错义突变通常集中在外显子 5 的核心催化磷酸酶结构域, 而这通常使该蛋白质的磷酸酶作用失活 (12)。作为模拟这些遗传病变的小鼠模型, 我们利用了之前生成的 Pten 突变系, 其中外显子 5 缺失, 因而核心催化磷酸酶结构域缺失 (13)。该突变等位基因纯合的小鼠无法存活; 然而, 该等位基因杂合的小鼠可存活至成年, 从而使其成为研究 Pten 单倍体不足的脑结构和功能发育结果和筛选该表型的第二位置遗传和环境修饰物的可靠工具。除 PTEN 外, 也将 PI3- 激酶通路的其他抑制物的突变与 ASD 相关联, 尤其是结节性硬化综合症基因 TSC1 和 TSC2 (14) 以及神经纤维瘤蛋白 1 (15,16)。因此, Pten 单倍体不足小鼠是一种通用工具, 其中富有 ASD 候选基因的信号通路即 PI3- 激酶通路被活化。这些小鼠也提供了探索有关孤独症的基因-环境相互作用对脑尺寸和行为方式之影响的更广泛问题的机会。

[0069] 基于这些发现, 我们确认 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂出人意料地恢复了 Pten 单倍体不足小鼠的功能, 因此它对孤独症谱系障碍的治疗是有用的。

[0070] 因此, 在一些方面, 本发明涉及对患孤独症谱系障碍或被认为患孤独症谱系障碍的对象施用有效量的一种或多种 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂, 以治疗所述对象。术语“治疗”旨在包括对病症的预防、改善、防止或治愈。出现病症之后治疗的目的在于

于减少、改善或完全消除所述病症和 / 或其一种或多种相关症状,或防止其恶化。在开始出现病症之前对对象的治疗(即预防性治疗)旨在降低发生该病症的风险和 / 或减轻其严重性(如果后来发生病症)。本文所用术语“预防”涉及预防性治疗具有发生病症风险的对象,其中所述治疗导致所述对象发生病症的可能性减小,或导致与不进行该治疗相比,所述病症的严重性更低的可能性增加。对于患所述病症的对象,与未如本文所述按照本发明治疗的对象相比,治疗可减少、改善或完全消除患所述病症和 / 或其一种或多种其相关症状,或阻止其恶化。

[0071] “对象”应指人或动物,包括但不限于狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、啮齿动物(例如大鼠和小鼠)以及灵长类动物(例如猴)。优选的对象是人对象。所述人对象可以是儿童、成年或老年对象。

[0072] 所述对象可以已知患有特定的适合此种治疗的孤独症谱系障碍,或可以被认为患有此种障碍。在一些实施方案中,所述对象没有其他需要用所述 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂治疗的症状。

[0073] 在临床上将孤独症谱系障碍(ASD)诊断为有单一病因和复杂的多基因病因。孤独症谱系障碍的特征是交际技能、社交互动的不同程度缺陷,以及受限、重复和固定的行为模式。它包括孤独症、PDD-NOS(pervasive developmental disorder not otherwise specified,未分类广泛发育障碍)、阿斯伯格综合症(Asperger syndrome)、雷特氏综合征(Rett syndrome)和童年瓦解性障碍(childhood disintegrative disorder)(见 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV)。

[0074] 本领域已知几种用于评估对象的社交和交流发展的筛选工具,可以用其来帮助筛选和诊断孤独症谱系障碍。这些工具包括幼儿孤独症对照表(Checklist of Autism in Toddlers, CHAT)、修订的幼儿孤独症对照表(modified Checklist for Autism in Toddlers, M-CHAT)、两岁儿童孤独症的筛选工具(Screening Tool for Autism in Two-Year-Olds, STAT)、社交交流问卷(Social Communication Questionnaire, SCQ)(对四岁及以上儿童)、孤独症谱系筛选问卷(Autism Spectrum Screening Questionnaire, ASSQ)、阿斯伯格综合症的澳大利亚标准(Australian Scale for Asperger's Syndrome)以及儿童阿斯伯格综合征测试(Childhood Asperger Syndrome Test, CAST)。

[0075] 通常,诊断性评价可包括神经和遗传评估以及深度认知和语言测试。专门为诊断孤独症开发的另外的检测包括修订的孤独症诊断访谈(Autism Diagnosis Interview-Revised, ADI-R)、孤独症诊断观察时间表(Autism Diagnostic Observation Schedule, ADOS-G)和儿童孤独症分级标准(Childhood Autism Rating Scale, CARS)。

[0076] 本文所述方法对除孤独症谱系障碍外的其他疾病有更广泛的应用。所述方法还可用于治疗躁狂症、精神分裂症、强迫症以及一系列相关的人格和情绪障碍。

[0077] 如本文所述,用 5-HT_{2c}(血清素)受体通路的拮抗剂或抑制剂(在本文中可等价地单独地称为拮抗剂或抑制剂)来治疗孤独症谱系障碍。本文所用的“5-HT_{2c}受体信号通路的拮抗剂或抑制剂”是部分或全部阻断、抑制或中和 5-HT_{2c}受体信号通路或 PI3K 信号通路的生物活性的任何分子。这些拮抗剂或抑制剂可以降低或升高 5-HT_{2c}受体信号通路或 PI3K 信号通路的个体多肽活性的方式作用于所述个体多肽,效果是对经 5-HT_{2c}受体信号通路或 PI3K 信号通路传导的信号进行拮抗或抑制。例如,5-HT_{2c}受体信号通路或 PI3K

信号通路的拮抗剂或抑制剂可以是 (1) 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 的拮抗剂或抑制剂, 或 (2) GSK-3 β 的激动剂或活化剂。所述拮抗剂或抑制剂还可以是逆向激动剂, 例如对 5-HT_{2c} 受体信号通路的多肽 (例如 5-HT_{2c} 受体) 有负效应的分子。见图 7 的 5-HT_{2c} 受体信号通路示意图。

[0078] 尽管 5-HT_{2c} 的活化 (抑制) 是 PI3K 信号通路的重要活化要素 (抑制要素), 本领域已知该通路包括比图 7 所示的更多的要素。PI3K 信号通路的另外的活化要素是 IGF1 对 IGF1 受体的活化。因此, IGF1 和相关分子可以以本文描述的方式用于治疗孤独症谱系障碍, 特别是本文指出的孤独症谱系障碍中的亚类。合适的 IGF1 和相关治疗性分子在 WO2008/153929 (公开内容通过参考并入本文) 中有描述, 例如在 12-17 页。

[0079] 在另外的实施方案中, 可以本文所述的方法中使用 (作为主要治疗, 特别是对本文指出的 ASD 亚类, 或作为第二治疗) PPAR- γ 激动剂 (例如噻唑烷二酮类 (TZDs), 包括罗格列酮 (Avandia)、吡格列酮 (Actos)、曲格列酮 (Rezulin)、MCC-555、来格列酮和环格列酮) 来治疗 PTEN 或 SLC6A4 缺陷的个体, 这是因为这些分子通过对 PTEN 转录的上调来拮抗 PI3K 通路 (见例如 Zhang 等, *Cancer Biol Ther.* 2006. (8) :1008-14; Teresi 等, *Int J Cancer.* 2006. 118(10) :2390-8; Patel 等, *Curr Biol.* 2001. 11(10) :764-8)。

[0080] 合适的拮抗剂或抑制剂包括小分子 (特别是有机小分子)、拮抗剂抗体或其抗原结合片段、5-HT_{2c} 受体信号通路天然组分的片段或氨基酸序列变体、肽、诱导降低 5-HT_{2c} 受体信号通路之多肽表达的 RNA 干扰的核酸、反义寡核苷酸等。鉴定拮抗剂或抑制剂的方法包括将 5-HT_{2c} 受体信号通路的多肽与候选分子接触, 测量一种或多种通常与该多肽相关的生物活性的可测变化。其他鉴定拮抗剂或抑制剂的方法包括将细胞与候选分子接触, 测量 5-HT_{2c} 受体信号通路的多肽或编码 5-HT_{2c} 受体信号通路多肽的核酸的表达的可测变化。

[0081] 5-HT_{2c} 受体的示例性拮抗剂或抑制剂包括 SB 242084 (6-氯代-5-甲基-1-[[2-(2-甲基吡啶-3-基氧基)吡啶-5-基]氨基甲酰基]二氢吲哚) (见例如 Bromidge 等, *J. Med. Chem.* 40 :3494-3496, 1997; Kennett 等, *Neuropharmacology* 36 :609-620, 1997)、SB 243213 (5-甲基-1-[[2-[(2-甲基-3-吡啶基)氧基]-5-吡啶基]氨基甲酰基]-6-三氟甲基二氢吲哚盐酸盐) (见例如 Wood 等, *Neuropharmacology.* 41(2) :186-199, 2001)、RS 102221 (N-{5-[5-(2,4-二氧代-1,3,8-三氮杂螺[4.5]癸-8-基)戊酰基]-2,4-二甲氧基苯基}-4-(三氟甲基)苯磺酰胺) (见例如 Bonhaus 等, *Neuropharmacology.* 36 :621-629, 1997)、SB 206553、SB 200646A、SB 221284、SB 204741、SB 228357、SB 200646、VALDOXAN[®] (阿戈美拉汀, S 20098) (见例如 Loo 等, *Int Clin Psychopharmacol* 2002 Sep ;17(5) :239-47)、酮色林 (Bonanno 等, *Eur J Pharmacol* 126 :317-321)、利坦丝林、azamianserine、(+)-反式-1-(5-氯代-3-(4-氟代苯基)-1-茛满基)-4-(2-(3-异丙基-2-咪唑啉酮-1-基)乙基)-哌嗪、2,5-二甲基-3-(4-氟代苯基)-1-[1-[2-咪唑啉-2-酮-1-基)乙基]-哌啶-4-基]-1H-吲哚、氟西汀、德伦环烷、mirtazepine、米安色林、萘法唑酮、曲拉唑酮、YM 35992、Ro 60-0759 ((+)-反式-8-乙基-7-羟基-9-甲氧基-2-甲基-1,3,4,4a,5,10b-六氢苯并[h]异喹啉-6(2H)-酮)、Org 38457、Org 12962、EGIS 8465、EGIS-9933, 对 5-HT_{2c} 受体起作用的抗精神病药如舍吲哚、奥氮平和利培酮, LY 53857、麦角苄酯、美舒麦角、pireperone、spiroperone、氯氮平、达泊

西汀、美西麦角、舍氮平、Ro 60-0491(N-(2-萘基)-N'-(3-吡啶基)脲 1:1HCl、N-(2-萘基)-N'-(3-吡啶基)-盐酸脲)、S16924、氟美马嗪、naphtoxazine(SDZ NVI-085)、S32006(Dekeyne 等, *Psychopharmacologia* 199:549-568, 2008) 和以下所述的另外的拮抗剂或抑制剂分子:WO 96/23783、WO 97/48699、W097/48700、WO 2002/014273、EP1782813、Hamprecht 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(2):424-7(2007)、Hamprecht 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(2):428-33(2007) 和 Bromidge 等, *Bioorg Med Chem Lett.* 10(16):1867-1870(2000)。

[0082] 应注意之前所述的用于治疗孤独症谱系障碍的一些分子可作为 5-HT_{2c} 受体信号通路或 PI3K 信号通路的拮抗剂或抑制剂发挥作用。这些分子(例如利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀和 PPAR- γ 激动剂(例如本文所述的))在本文所述的治疗孤独症谱系障碍的某些方法中不被使用。这些分子(例如利培酮、奥氮平、齐拉西酮、氟西汀和 PPAR- γ 激动剂(例如本文所述的))在本文所述的治疗孤独症谱系障碍的某些方法中不被使用(作为第二治疗性分子除外)。因此在某些实施方案中,将这些分子用作 Pten 或 Slc6a4 单倍体不足的 ASD 个体的主要治疗和/或用作治疗任何 ASD 个体的第二治疗性分子。

[0083] 在某些实施方案中,5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂是 SB 242084 或 RS 102221。

[0084] 在一些实施方案中,所述 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂对 5-HT_{2a} 和/或 5-HT_{2b} 受体有超过 5 倍的选择性、超过 10 倍的选择性、超过 20 倍的选择性、超过 30 倍的选择性、超过 40 倍的选择性、超过 50 倍的选择性、超过 60 倍的选择性、超过 70 倍的选择性、超过 20 倍的选择性、超过 80 倍的选择性、超过 90 倍的选择性、超过 100 倍的选择性,或超过 150 倍的选择性。在某些实施方案中,所述 5-HT_{2c} 受体的拮抗剂或抑制剂对其他 5-HT、多巴胺和肾上腺素受体有相似的选择性。

[0085] 磷酸肌醇-3-激酶(PI3K)的示例性拮抗剂或抑制剂包括:LY294002(2-(4-吗啉基)-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、渥曼青霉素、SU6668(3-[2,4-二甲基-5-(2-氧代-1,2-二氢-吡咯-3-基亚基甲基)-1H-吡咯-3-基]-丙酸)、苹果酸舒尼替尼(SU11248, SUTENT[®])、染料木黄酮(4',5,7-三羟基异黄酮)、PX-866(Ihle 等, *Mol Cancer Ther.* 4(9),1349-1357, 2005)、XL147(Exelixis) 和在美国公布的申请 2008/0306057A1(见例如 [0079] 段和 [0106]-[0288] 段、权利要求和其中引用的公布的申请) 和 2008/0293706A1(见例如, [0493]-[0494] 段和权利要求) 中描述的另外的 PI3K 拮抗剂。

[0086] Akt 也被称为蛋白激酶 B(PKB)。Akt 的拮抗剂或抑制剂可是 Akt1、Akt2 和/或 Akt3 的拮抗剂或抑制剂。示例性拮抗剂或抑制剂包括:LY294005(1L-6-羟甲基-手性-肌醇 2(R)-2-O-甲基-3-O-十八烷基碳酸盐)、氯氮平、ALX-349(Alexis Biochemical; San Diego, CA)、VQD-002(一水合磷酸曲西立滨, VioQuest Pharmaceuticals)、磷脂酰肌醇醚脂类似物、奈非那韦(VIRACAPT)、Akt/蛋白激酶 B 信号抑制剂-2(Yang 等, *Cancer Res.* 64(13),4394-4399, 2004) 和 WO 2006/113837、Zhu 等, *Bioorg. Med Chem Lett.* 16:3150-3155(2006) 和 Lindsley 等, *Current Cancer Drug Targets.* 8(1):7-18(2008) 中描述的另外的 Akt 拮抗剂。

[0087] mTOR 拮抗剂包括纳巴霉素(西罗莫司)、temsirolimus(CCI-779, Wyeth; *Nat Genet.* 2004;36:585-95; *J Clin Oncol.* 2004;22:2336-47)、依维莫司(RAD001,

Novartis)、deforolimus(AP23573, ARIAD Pharmaceuticals)、佐他莫司 (ABT 578)、SDZ RAD(40-O(2-羟乙基)-雷帕霉素)和雷帕霉素前药以及 WO 2008/027013 中描述的类似物。

[0088] NV-128(Novogen Limited) 使 Akt-mTOR/p70s6k 信号转导级联解耦联。

[0089] Creb 拮抗剂、NF- κ B 拮抗剂和 GSK-3 β 激动剂也可用于本文描述的治疗方法。

[0090] 在所有实施方案中,可进入脑中(例如穿过血脑屏障)的拮抗剂是优选的。

[0091] 各种替代形式的 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂(例如本文所述的盐、溶剂化物、或小有机的多晶形物)也用于治疗本文所述的孤独症谱系障碍。这些替代形式是本领域技术人员已知的。

[0092] 在某些实施方案中,5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂是诱导 RNA 干扰的分子,例如对 5-HT_{2c} 受体信号通路中的多肽的基因转录本具有特异性的短干扰核酸(siNA)。例如,本文所述的治疗性方法中适于被拮抗或被抑制的基因的基因产物(例如 5-HT_{2c} 受体、PI3K、Akt、mTOR、Creb 和 NF- κ B) 可以用这种方式抑制。所述 siNA 减少 5-HT_{2c} 受体信号通路中多肽的 mRNA 和蛋白质的量,从而抑制 5-HT_{2c} 受体信号通路。

[0093] 作为短干扰核酸(siNA)的抑制剂分子包括短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、小 RNA(miRNA)和短发夹 RNA(shRNA)分子,用这些分子来抑制靶基因的表达。本发明的 siNA(例如 siRNA)通常通过靶 RNA 转录本的剪切/降解或靶信使 RNA(mRNA)的翻译抑制来对基因表达进行调节。在一个实施方案中,siRNAs 是外源递送至细胞的。在一个具体实施方案中,siRNA 分子是专门针对 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)、Akt(蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 产生的。

[0094] 本发明的短干扰核酸(siNA)可不进行修饰或被化学修饰。本发明的 siNA 可以化学合成、从载体中表达或酶学合成。本发明还提出了能通过 RNA 干扰(RNAi)抑制细胞中基因表达或活性的多种化学修饰的合成的短干扰核酸(siNA)分子。使用化学修饰的 siNA 改进了天然 siNA 分子的多种特性,例如通过对体内核酸酶降解的抗性增加和/或改进的细胞摄取。而且,有多种化学修饰的 siNA 可保留其 RNAi 活性。例如,在一些情况下,修饰 siRNA 以改变效力、靶亲和力、安全性和/或稳定性(使它们对细胞内降解能借具有抗性或部分抗性)。例如,可将 siRNA 进行修饰(例如硫代磷酸化)以增加对核酸酶降解的抗性、结合亲和力和/或摄取。另外,疏水化和生物缀合增强了 siRNA 的递送和靶向性(De Paula 等, RNA. 13(4):431-56, 2007),而具有核糖二氟代甲苯甲酰基(ribo-difluorotoluy)核苷酸的 siRNA 保持基因沉默活性(Xia 等, ASCChem. Biol. 1(3):176-83, 2006)。已产生了对 S1 核酸酶降解更具抗性的具有酰胺连接的寡核糖核苷的 siRNA(Iwase R 等 2006 Nucleic Acids Symp Ser 50:175-176)。另外,对 siRNA 的 2'-糖位置和磷酸二酯键的修饰提高了血清稳定性而不损失效力(Choung 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 342(3):919-26, 2006)。在一个研究中,包含 2'-脱氧-2'-氟代- β -D-阿拉伯糖核酸(FANA)的反义寡核苷酸在抑制效力和对降解的抗性方面比硫代磷酸酯寡核苷酸、2'-O-甲基-RNA/DNA 嵌合寡核苷酸和 siRNA 更佳(Ferrari N 等 2006 Ann N Y Acad Sci 1082:91-102)。

[0095] 在一些实施方案中,siNA 是由基因组整合的转基因或基于质粒的表达载体编码和表达的 shRNA 分子。因此,在一些实施方案中,能够抑制基因表达的分子是编码小干扰核酸的转基因或基于质粒的表达载体。这些转基因和表达载体可利用聚合酶 II 或聚合酶 III 启动子来使这些 shRNA 表达并且在细胞中生成功能性 siRNA。前一种聚合酶允许使用

经典的蛋白表达策略,包括可诱导的和组织特异性表达系统。在一些实施方案中,转基因和表达载体受控于组织特异性启动子。在另一些实施方案中,转基因和表达载体受控于可诱导的启动子,例如四环素诱导表达系统。制作和使用这些发夹 RNA 以在哺乳动物细胞中进行基因沉默的实例在以下文章中描述,例如,(Paddison 等, *Genes Dev*, 2002, 16 :948-58 ; McCaffrey 等, *Nature*, 2002, 418 :38-9 ;McManus 等, *RNA* 2002, 8 :842-50 ;Yu 等, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 :6047-52)。

[0096] 本文的一个实施方案给出了使用基因治疗来递送编码一种或多种小干扰核酸的一种或多种表达载体(例如基于病毒的基因治疗),其能抑制例如 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 的表达。本文所用的基因治疗是着眼于通过递送一种或多种编码治疗性基因产物(包括 shRNA) 的表达载体至病变细胞来治疗基因疾病(例如癌症)的治疗。构建和递送表达载体的方法是本领域普通技术人员已知的。

[0097] 因此,本发明给出了特异性靶向编码例如 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 的核酸的 siRNA (shRNA 等) 的体外应用和包含 siRNA (shRNA 等) 和可药用载体的体内药物制剂,所述 siRNA (shRNA 等) 可以是修饰的 siRNA (shRNA 等) 以增加他们在生理条件下的稳定性和 / 或细胞摄取。

[0098] 在某些实施方案中,5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂是反义核酸。反义核酸包括短寡核苷酸和较长的核酸。优选地,所述反义核酸与 5-HT_{2c} 受体信号通路中一种或多种多肽的编码序列或 5' 非翻译序列部分互补并结合,从而抑制功能性多肽的翻译。其他降低或阻止转录的反义核酸也是有用的。

[0099] 因此本发明包括反义寡核苷酸,其与编码 5-HT_{2c} 受体信号通路中多肽的核酸分子选择性结合以降低所述多肽的表达(转录或翻译)。本文所用术语“反义寡核苷酸”描述寡核苷酸,其是寡核糖核苷酸、寡脱氧核糖核苷酸、修饰的寡核糖核苷酸或修饰的寡脱氧核糖核苷酸,其在生理条件下与包含编码 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 基因的 DNA 杂交,从而抑制该基因的转录和 / 或该 mRNA 的翻译。

[0100] 本领域技术人员会认识到,反义寡核苷酸的确切长度及其与靶点的互补程度取决于所选的特定靶点,包括靶点的序列以及组成该序列的具体碱基。优选地,构建和排列所述反义寡核苷酸以使其在生理条件下与靶点选择性结合,即在生理条件下,与靶序列的杂交比与靶细胞内的任何其他序列的杂交显著更高。根据 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 的核酸序列(包括等位或同源基因组和 / 或 cDNA 序列),本领域的技术人员可以容易地选择以及合成多个本发明所用的合适的反义分子的任一种。为了具有充分的选择性和强抑制作用,这些反义寡核苷酸应包含至少 10 个(更优选至少 15 个)与靶点互补的连续碱基,但在某些情况下,短至 7 个碱基长度的经修饰寡核苷酸已成功地用作反义寡核苷酸(Wagner 等, *Nature Biotechnol.* 14 :840-844, 1996)。最优选地,所述反义寡核苷酸包含 20-30 个碱基的互补序列。

[0101] 尽管可选择对基因或 mRNA 转录本的任何区域反义的寡核苷酸,在一些优选的实施方案中,所述反义寡核苷酸对应 N 端或 5' 上游位点,例如翻译起始、转录起始或启动子位点。另外,3' 非翻译区域可作为靶点。以 mRNA 剪切位点作为靶点也在本领域中使用,但是

如果发生选择性 mRNA 剪切则可能更不优选。另外,反义优选以预计不会有 mRNA 二级结构的位点(见例如 Sainio 等, Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994)和预计蛋白质不会结合的位点作为靶点。最后,本领域普通技术人员可以容易地从数据库和已发表的文献中得到对应于 5-HT_{2c} 受体信号通路中多肽的 cDNA 序列和基因组 DNA。因此,本发明还提供了这样的反义寡核苷酸,其与对应于编码 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 核酸的基因组 DNA 互补。类似地,不用过多实验,能使用与等位或同源 cDNA 和基因组 DNA 的反义作用。

[0102] 在一组实施方案中,本发明的反义寡核苷酸可由“天然”脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或任何其组合构成。即一个天然核苷酸的 5' 端和另一个天然核苷酸的 3' 端可如天然系统中那样通过磷酸二酯核苷间键连接进行共价连接。这些寡核苷酸可通过本领域公认的方法制备,其可以人工或通过自动合成仪进行。它们也可通过载体重组产生。

[0103] 然而,在一些优选的实施方案中,本发明的反义寡核苷酸还可以包括“修饰的”寡核苷酸。即所述寡核苷酸可以用多种方法修饰,这些方法不会阻止它们与它们的靶点杂交,但是增强它们的稳定性或靶向性,或者以另外方式增强它们治疗的效果。

[0104] 本文所用的术语“修饰的寡核苷酸”描述了一种寡核苷酸,其中 (1) 至少两个其核苷酸通过合成的核苷间键共价连接(即一个核苷酸的 5' 端和另一核苷酸的 3' 端之间除磷酸二酯键之外的键)和 / 或 (2) 将通常不与核酸相关的化学基团与寡核苷酸共价连接。优选的合成的核苷间键是硫代磷酸酯、磷酸烷基酯、二硫代磷酸酯、磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯和肽。

[0105] 术语“修饰的寡核苷酸”也涵盖有共价修饰的碱基和 / 或糖的寡核苷酸。例如,修饰的寡核苷酸包括具有这样的骨架糖的寡核苷酸,其在 3' 位置共价连接到除羟基外的低分子量有机基团,在 5' 位置共价连接到除磷酸基团以外的有机基团。因此修饰的寡核苷酸可包括'-O- 烷基化核糖基团。另外,修饰的寡核苷酸可包括如阿拉伯糖的糖来代替核糖。因此本发明给出了在生理条件下与编码 5-HT_{2c} 受体、磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K)、Akt (蛋白激酶 B/PKB)、mTOR、Creb 或 NF- κ B 的核酸互补并且杂交的反义分子的体外用途以及包含修饰的所述反义分子和可药用载体的体内药物制剂。

[0106] 在另一实施方案中,本发明的反义核酸可由在细胞内引入的表达载体在细胞中表达产生。合适载体的选择和设计是在本领域普通技术人员能力和判断范围内的。

[0107] 包含所有表达必需元件的表达载体可购得而且是本领域技术人员已知的。见例如 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。根据该实施方案,细胞通过将编码反义核酸的异源 DNA (RNA) 引入到细胞中而进行遗传改造。所述反义核酸放置于转录元件的可操作控制下,以允许反义核酸在宿主细胞中表达。递送反义核酸的其他载体是本领域普通技术人员已知的。

[0108] 可使用多种技术将本发明反义核酸引入细胞,这取决于核酸是在体外还是体内引入宿主。这些技术包括核酸-CaPO₄ 沉淀转染、核酸与 DEAE 相联系的转染、用包含目的核酸的病毒转染或感染、脂质体介导的转染等等。对于某些用途,优选将核酸靶向至特定细胞。在这种情况下,用于将本发明的核酸递送至细胞内的运载体(例如逆转录病毒、腺病毒或其他病毒;脂质体)可以具有与其连接的靶分子。例如,分子(例如对靶细胞表面膜蛋白具有特异性的抗体或靶细胞上受体的配体)可结合或并入所述核酸递送运载体中。在使用脂

质体来递送本发明的核酸时,可以将与内吞相关的表面膜蛋白结合的蛋白质整合入脂质体制剂中,以靶向和 / 或促进摄取。这些蛋白质包括针对特定细胞类型的衣壳蛋白或其片段、在循环中经历内化的蛋白质的抗体、靶向细胞内定位并增长细胞内半衰期的蛋白质等等。如本领域的技术人员已知的,聚合物递送系统也已成功用于将核酸递送至细胞内。这些系统甚至允许核酸的口服递送。

[0109] 在某些实施方案中,5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂是特异性结合该通路多肽的抗体或其抗原结合片段,其导致该多肽的催化活性降低。

[0110] 本发明的抗体由多种方法的任一种制备,所述方法包括对动物施用蛋白质、蛋白质片段、表达蛋白质或其片段的细胞等等,以诱导多克隆抗体。单克隆抗体的生产是根据本领域公知技术实施的。本领域公知的是,仅抗体分子的一小部分(互补位)参与了抗体与其表位的结合(一般参见 Clark, W. R., 1986, *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley&Sons, Inc., New York; Roitt, I., 1991, *Essential Immunology*, 第7版, Blackwell Scientific Publications, Oxford)。例如, pFc' 和 Fc 区域是补体级联的效应物,但不参与抗原结合。已酶切掉 pFc' 区域的抗体或产生时无 pFc' 区域的抗体(称为 F(ab')₂ 片段)保留了完整抗体的两个抗原结合位点。类似地,已酶切掉 Fc 区域的抗体或产生时无 Fc 区域的抗体(称为 Fab 片段)保留了完整抗体分子的一个抗原结合位点。Fab 片段由共价结合的抗体轻链和抗体重链的一部分(称为 Fd)组成。Fd 片段是抗体特异性的主要决定因素(一个 Fd 片段可与多达 10 个不同的轻链联系而不改变抗体特异性),而且 Fd 片段独立地保留了表位结合能力。

[0111] 如本领域公知的,抗体的抗原结合部分内含有直接与抗原表位相互作用的互补决定区(CDR)和维持互补位三级结构的构架区(FR)(一般参见 Clark, 1986; Roitt, 1991)。在 IgG 免疫球蛋白的重链 Fd 片段和轻链内均有四个构架区(FR1 至 FR4),它们分别被三个互补决定区(CDR1 至 CDR3)分隔开。CDR(尤其是 CDR3 区域,更尤其是重链 CDR3)很大程度上决定了抗体的特异性。

[0112] 本领域公认的是哺乳动物抗体的非 CDR 区可用非特异性或异种特异性抗体的类似区域替换,而保持原来抗体的表位特异性。这最明显地体现在“人源化”抗体的开发和利用中,其中将非人 CDR 共价接入人 FR 和 / 或 Fc/pFc' 区域,来产生功能性抗体。见例如美国专利 4,816,567、5,225,539、5,585,089、5,693,762 和 5,859,205。完全的人单克隆抗体也可通过对转入了人免疫球蛋白重链和轻链基因座的大部分的转基因小鼠进行免疫来制备。免疫这些小鼠(例如 XenoMouse (Abgenix), HuMAb 小鼠 (Medarex/GenPharm))之后,单克隆抗体可根据标准杂交瘤技术来制备。这些单克隆抗体含有人免疫球蛋白的氨基酸序列,因此当施用于人时不会引起人抗小鼠抗体(HAMA)反应。因此,对本领域的普通技术人员将是显而易见的是,本发明也提供 F(ab')₂、Fab、Fv 和 Fd 片段;Fc 和 / 或 FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 和 / 或轻链 CDR3 区域用同源的人或非人序列替换的嵌合抗体;FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 和 / 或轻链 CDR3 区域用同源的人或非人序列替换的嵌合 F(ab')₂ 片段抗体;FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 和 / 或轻链 CDR3 区域用同源的人或非人序列替换的嵌合 Fab 片段抗体;和 FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 区域用同源的人或非人序列替换的嵌合 Fd 片段抗体。本发明还包括所谓的单链抗体、结构域抗体以及重链抗体。

[0113] 因此,本发明涉及特异结合 5-HT_{2c} 受体信号通路的多肽并且抑制功能活性的多

种大小和类型的多肽。这些多肽也可从抗体技术外的来源取得。例如,这些多肽结合剂可以通过可易于在溶液、固定化形式中制备的简并肽文库来提供,或作为噬菌体展示文库提供。也可合成由包含一种或多种氨基酸的肽合成的组合文库。还可合成肽和非肽合成结构的文库。

[0114] 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂以有效治疗对象的孤独症谱系障碍的量施用。有效量是足以提供医学上期望的的治疗性分子的剂量。例如,期望的反应可以是抑制孤独症谱系障碍的进展。这可涉及仅暂时减缓孤独症谱系障碍的进展,尽管更优选地,它涉及永久阻止孤独症谱系障碍的进展。这可通过本领域普通技术人员已知的常规诊断方法监测。

[0115] 应理解,本发明的治疗性分子用于治疗或预防孤独症谱系障碍,即它们可预防性地用于有发生孤独症谱系障碍风险的对象。因此,有效量是指可以降低孤独症谱系障碍发生风险、降低其严重性或可能完全防止其发生的量。

[0116] 涉及确定有效量的因素是本领域普通技术人员公知的,而且可以仅用常规试验完成。通常优选地,使用本发明治疗性分子(单独或者与其他治疗性分子或治疗方案组合)的最大剂量,即根据合理医疗判断的最高安全量。然而本领域普通技术人员应理解,患者可由于医疗原因、生理原因或几乎任何其他原因坚持要求更低剂量或可忍受剂量。

[0117] 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂可通过单独施用、在药物组合物内或者与其他治疗性分子或治疗方案组合施用。任选的,其他治疗性分子可同时或顺次施用。当同时施用所述其他治疗性分子时,它们可在相同的或独自的制剂中施用,但是同时施用。当所述其他治疗性分子和 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂的施用在时间上分开时,所述其他治疗性分子之间以及与 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂之间可以顺次施用。施用这些分子之间的时间间隔可是几分钟或可以更长,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 小时,或更长,包括 1、2、3、4、5、6、7 天或更长。

[0118] 本发明方法中使用的药物组合物优选无菌,而且在适于施用给对象的单位重量或体积中包含有效量的 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂以产生期望的反应。施用于对象的 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂的剂量可根据不同参数选择,尤其是根据使用的施用方式和对象的状态。其他因素包括期望的治疗时长。如果在应用的起始量时对象的反应不充分,可使用患者耐受力允许范围的更高量(或通过不同的、更局部的递送方式地递送的有效的更高量)。一种或多种 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂的剂量可由医生或兽医个人来调整,尤其是在任何并发症的情况下。通常治疗有效量在 0.01mg/kg 至约 1000mg/kg 之间,优选在约 0.1-10mg/kg 之间,例如约 0.1-1mg/kg/天之间,或在约 1-10mg/kg/天之间,每天一个或多个施用量,施用一天或多天。

[0119] 将药剂有效递送至期望的组织、细胞或体液的多种施用方式是本领域普通技术人员已知的。本发明分子的施用包括但不限于经口、静脉内、皮下、肌内、外用、积存注射、植入、释放时间模式、腔内、鼻内、吸入、鞘内、眼内和受控释放。在一些实施方案中,本发明的药物组合物通过肠胃外、经粘膜(例如经口)、鼻、鞘内、直肠、阴道内、舌下、粘膜下或透皮引入。肠胃外施用是不通过消化道而是通过一些其他途径(例如静脉内、皮下、肌内、鞘内、腹膜内、眶内、囊内、脊椎内、胸骨内、动脉内或皮内施用)施用。对于本文所述的有机小分子,优选经口施用。技术人员可领会选择施用模式需考虑的具体有利条件和不利条件。

[0120] 本发明不限于本文公开的具体施用模式。本领域的标准参考文献（例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 20 版, Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore MD, 2001）提供了用于递送多种药物制剂和药物载体制剂的施用方式和制剂。其他用于本发明的药剂施用的方案是本领域普通技术人员已知的, 其中剂量、施用方案、施用位点、施用方式等与本文介绍的不同。

[0121] 对非人哺乳动物施用本发明的药剂（例如为测试目的或兽用治疗目的）以与上述基本相同的条件实施。本领域的普通技术人员应理解本发明对人和动物疾病均适用。

[0122] 施用时, 本发明的药物制剂以可药用的量和可药用的组合物使用。术语“可药用”是指不干扰活性成分的生物活性效力的无毒物质。这些制剂可常规地包括盐、缓冲剂、防腐剂、可相容载体和任选的其他治疗性分子。当用在药物中时, 盐应是可药用的, 但不可药用的盐可方便地用于制备其可药用的盐, 因而未排除在本发明的范围外。这些药理可接收盐和可药用盐包括但不限于从以下酸中制备的那些: 盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、醋酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。而且, 可药用的盐可作为碱金属盐或碱土盐（例如钠、钾或钙盐）制备。

[0123] 如期望, 药剂或组合物可与可药用载体组合。本文所用术语“可药用载体”是指一种或多种适合对人施用的可相容固体或液体填充物、稀释剂或包封物质。术语“载体”表示有机或无机成分, 是天然的或合成的, 活性成分与其组合以方便应用。药物组合物的成分还能以没有很大地削弱所期望的药效的相互作用的方式与本发明的药剂混合, 并且相互之间混合。

[0124] 药物组合物可包含如上所述的合适的缓冲剂, 包括醋酸、磷酸、柠檬酸、甘氨酸、硼酸、碳酸、重碳酸、氢氧化物（和其他碱）以及上述化合物的可药用盐。任选地, 药物组合物还可包含合适的防腐剂, 例如: 苯扎氯铵、氯代丁醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0125] 药物组合物可方便地以单位剂型存在, 而且可通过制药领域公知的任何方法制备。所有方法包括将活性剂与包含一种或多种辅助成分的载体相结合的步骤。一般来说, 组合物通过均一和紧密地将活性化合物与液体载体、精细分割的固体载体或二者相结合而制备, 之后如有需要, 将产品塑形。

[0126] 当期望将其全身递送时, 可将 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂配制为肠胃外注射施用, 例如通过推注或连续输注。注射制剂可与额外的防腐剂一起以单位剂型存在, 例如在安瓿内或多剂量容器内。组合物可为悬液、溶液或油中的乳化液或水性运载体中的乳化液的形式, 而且可包含制备剂 (formulatory agent) 如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0127] 肠胃外施用的药物制剂包括水溶形式的活性化合物的水溶液。另外, 活性化合物的悬液可作为合适的油性注射悬液制备。合适的亲脂性溶剂或运载体包括脂肪油（例如芝麻油）或合成的脂肪酸酯（例如油酸乙酯或甘油三酯）, 或脂质体。水性注射悬液可包含增加悬液粘度的物质, 例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地, 所述悬液还可包含合适的稳定剂或增加化合物的溶解性以制备更浓缩溶液的试剂。

[0128] 或者, 所述化合物可以是粉末形式, 并且在使用前与合适的运载体（例如盐水、缓冲液或无菌无热原的水）重构。

[0129] 适合口服施用的组合物可以分离的单位存在, 例如胶囊、片剂、丸剂、锭剂, 每个包

含预定量的活性化合物。其他组合物包括水性液体或非水性液体中的悬液（例如糖浆、酞剂、乳液）或凝胶。

[0130] 用于口服的药物制剂可作为固体赋形剂获得，任选地将产生的混合物磨碎并且将颗粒混合物加工，如期望在加入合适的辅剂后获得药片或糖衣药丸核。特别地，合适的赋形剂是填充剂，例如糖（包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨醇）或纤维素制剂（例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)）。如期望可加入崩解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐（例如藻酸钠）。任选地，口服制剂也可在盐水或缓冲液中配制，即用 EDTA 来中和内部酸性环境，或可不用任何载体而施用。

[0131] 还特别提出的是上述组分的口服剂型。所述组分可经化学修饰以使该衍生物的口服递送有效。通常，使用的化学修饰是将至少一个结构连接至组分分子本身，其中所述结构允许 (a) 抑制蛋白水解，和 (b) 从胃或肠摄取入血流。还期望的是增加组分的总体稳定性以及增加体内的循环时间。

[0132] 对于组分（或衍生物），释放位置可以是胃、小肠（十二指肠、空肠或回肠）或大肠。本领域技术人员有可用的制剂，其不会在胃里溶解，而会在十二指肠或肠内的其他位置释放物质。优选地，该释放会通过保护所述分子或在胃环境外（例如肠内）释放生物活性分子而避免胃环境的不利作用。

[0133] 为了确保充分的胃抗性，对至少 pH 5.0 不渗透的包衣是必需的。用作肠包衣的更常见的惰性成分的实例是醋酸纤维素酯 (CAT)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸 (HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、聚醋酸乙烯酯邻苯二甲酸 (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、邻苯二甲酸醋酸纤维素 (CAP)、Eudragit L、Eudragit S 和虫胶。这些包衣可用作混合的膜。

[0134] 包衣或包衣混合物也可用在片剂上，其目的并不在于针对胃的防护。这可包括糖衣或使片剂更容易吞咽的包衣。胶囊可由硬壳（如明胶）组成，以递送干燥的治疗剂（即粉末）；对液体形式，可用明胶软壳。优良的壳材料可是稠淀粉或其他可食用纸。对于丸剂、锭剂、模压片剂或研磨片剂，可以使用湿块化技术 (moist massing technique)。

[0135] 用惰性材料可稀释或增加治疗性分子的体积。这些稀释剂可包括碳水化合物，尤其是甘露糖醇、 α -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、修饰的葡聚糖和淀粉。某些无机盐也可用作填充剂，包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠。一些市售的稀释剂是 Fast-FLO、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress 和 Avicell。

[0136] 可以将崩解剂包含在将治疗剂制成固体剂型的制备中。用作崩解剂的物质包括但不限于淀粉，包括基于淀粉的商品化崩解剂 Explotab。羟基乙酸淀粉钠、苯酚甲醛离子交换树脂、羧甲基纤维素钠、ultramylopectin、藻酸钠、明胶、橙皮、羧甲基纤维素酸、天然海绵和膨润土均可使用。另一种形式的崩解剂是不溶性阳离子交换树脂。粉末状树胶可作用崩解剂和粘合剂，而且这些可包括粉末状树胶如琼脂、Karaya 或黄耆胶。藻酸及其钠盐也可用作崩解剂。

[0137] 还可以用粘合剂将治疗性分子保持在一起以形成硬片剂，它包括来自天然产物（例如阿拉伯橡胶树、黄耆胶、淀粉和明胶）的物质。其他的包括甲基纤维素 (MC)、乙基纤维素 (EC) 和羧甲基纤维素 (CMC)。聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 均可用于颗粒化所述治疗剂的醇溶液中。

[0138] 抗摩擦剂可包含于治疗性制剂中以防止配制过程中的粘连。润滑剂可用作治疗剂和模壁之间的层,这些可包括但不限于硬脂酸(包括其镁盐和钙盐)、聚四氟乙烯(PTFE)、液体石蜡、植物油和蜡。也可使用可溶性润滑剂,例如十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠镁、各种分子量的聚乙二醇、Carbowax 4000 和 Carbowax 6000。

[0139] 可添加在配制过程中可改善药物流动性并且在压制过程中帮助重排的助流剂。助流剂可包括淀粉、滑石、气相白炭黑和水合硅铝化合物。

[0140] 为了帮助治疗剂溶解到水性环境中,可添加表面活性剂作为润湿剂。表面活性剂可包括阴离子去污剂,例如十二烷基硫酸钠、琥珀磺酸二辛钠和二辛酯磺酸钠。可使用阳离子去污剂,可包括苯扎氯或苜索氯铵。可作为表面活性剂包含在制剂内的可能的非离子型去污剂的名单是:聚桂醇 400、聚氧基-40-硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油 10,聚氧乙烯氢化蓖麻油 50 和聚氧乙烯氢化蓖麻油 60、单硬脂酸甘油酯、多山醇酯 40、多山醇酯 60、多山醇酯 65 和多山醇酯 80、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。这些表面活性剂可单独或以不同比例的混合物存在于制剂中。

[0141] 可用于口服的药物制剂包括由明胶制成的推入装配胶囊(push-fit capsule),以及用明胶和增塑剂(例如甘油或山梨醇)制成的软密封胶囊。推入装配胶囊可包含活性成分与以下物质的混合:填充剂(例如乳糖),粘合剂(例如淀粉),和/或润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)以及任选的稳定剂。在软胶囊里,活性化合物可溶解于或悬浮于合适的液体中,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,可添加稳定剂。

[0142] 对于鼻内或吸入施用,5-HT_{2c}受体信号通路的拮抗剂或抑制剂可以以加压包装或喷雾器提供的喷雾的形式与合适的抛射剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体)一起方便地递送。在加压喷雾的情况下,剂量单位可通过提供阀门以递送计量的量来确定。在吸入器或吹入器中所用的胶囊和药筒(例如明胶的)可被配制成包含化合物和合适粉末基料(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0143] 本文还给出了5-HT_{2c}受体信号通路的拮抗剂或抑制剂的肺部递送。在吸入时所述分子被递送至哺乳动物的肺部,并转运穿过肺上皮的壁进入血流。

[0144] 所给出的用于本发明实施的是设计用于治疗性产品肺部递送的多种医疗装置,其包括但不限于喷雾器、计量吸入器和粉末吸入器,所有这些都是本领域技术人员熟悉的。

[0145] 还给出了对本发明药物组合物的鼻(或鼻内)递送。对鼻施用治疗性产品之后,鼻递送允许本发明的药物组合物通过鼻直接进入血流,而不需要使所述产品在肺部沉积。

[0146] 对于鼻施用,有用的设备是连接有计量喷雾器的小硬瓶。在一个实施方案中,计量剂量的递送是通过将本发明的药物组合物溶液吸入一定体积的室内,该室具有其大小能在室内的液体被压缩时通过形成喷雾来雾化和喷雾制剂的孔。压缩所述室以施用本发明的药物组合物。在一个具体实施方案中,所述小室是活塞装置。这些设备是市售的。

[0147] 或者,使用带有孔或开口的塑料挤压瓶,所述孔或开口的大小能在挤压时通过形成喷雾来雾化喷雾制剂。开口通常在瓶子顶部,而且顶部通常逐渐变细以部分适应喷雾制剂在鼻腔中的有效施用。优选地,鼻吸入器会提供计量的量的喷雾制剂以施用定量剂量的药物。

[0148] 除前面描述的制剂外,化合物也可作为积存(depot)制剂配制。这种长效制剂可与合适的聚合物或疏水材料(例如在可接受油中的乳化剂)或离子交换树脂一起或作为微

溶的衍生物（例如作为微溶的盐）配制。

[0149] 药物组合物也可包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。这种载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物（例如聚乙二醇）。

[0150] 5-HT_{2c}受体信号通路的抑制剂或拮抗剂适用于多种药物递送系统。关于药物递送方法的简要综述，见 Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990, 通过引用并入本文。

[0151] 5-HT_{2c}受体信号通路的抑制剂或拮抗剂可包含于控制释放系统中。术语“控制释放”是指任何含有药物的制剂，药物从制剂中释放的方式和曲线是受控的。这是指立即以及非立即释放制剂，其中非立即释放包括但不限于持续释放和延迟释放制剂。所用术语“持续释放”（也被称为“延长释放”），是其惯用意义，指药物制剂在延长的时间内提供药物的逐步释放，优选但非必需地，这导致在延长的时间内血中的药物水平基本稳定。所用术语“延迟释放”是其惯用意义，指一种药物制剂，其中所述制剂的施用和药物从中释放之间有时间延迟。“延迟释放”可以或不涉及在延长的时间内药物的逐步释放，因此可以或不“持续释放”。

[0152] 使用长期的持续释放植入物可尤其适用于治疗慢性病症。本文所用的“长期”释放是指构建和安排植入物以在至少 7 天（优选 30-60 天）中递送活性成分的治疗性水平。长期持续释放植入物是本领域普通技术人员公知的，而且包括以上所述释放系统中的一些。

[0153] 本发明还涉及使用药盒。在本发明的某些方面，所述药盒可以包括药物制剂瓶、药物制剂稀释剂瓶和本文所述的 5-HT_{2c}受体信号通路的拮抗剂或抑制剂。含有药物制剂稀释剂的瓶是任选的。稀释剂瓶包含稀释剂（例如生理盐水）用于稀释所述分子的浓缩溶液或冻干粉末。说明书可包括将特定量的稀释剂与特定量的浓缩药物制剂混合从而制备用于注射或输注的最终制剂的说明。说明书可包括用有效量的分子治疗对象的说明。应理解，包含制剂的容器（不论容器是罐、有间隔的瓶、有间隔的安瓿、输液袋等等）可包含标记，例如当制剂已高压灭菌或以其他方式灭菌时颜色改变的常规标记。

[0154] 还根据本文对孤独症谱系障碍生物标志的鉴定提出了诊断方法和这种诊断方法与治疗的联合使用。所述诊断方法可用于帮助选择适当的治疗和/或患者群（例如用于临床试验）。

[0155] 所述诊断方法包括评估对象中是否存在孤独症谱系障碍生物标志，特别是对以头部尺寸（周长）增加和/或社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍。如本文所述，在一些实施方案中，社交行为缺陷是社交互动缺陷和/或社交记忆缺陷。

[0156] 例如，如本文所述，以头部尺寸（周长）增加和社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍与以下相关和/或由其引起：Pten 基因和/或 Slc6a4 基因突变或变化，其导致如本文所述的该基因单倍体不足。因此，可筛选对象是否具有这些突变、变化或单倍体不足。所述诊断方法还可包括测试对象的巨头畸型（脑过度生长）和/或社交能力降低（社交接触行为缺陷）。

[0157] 更具体地，所述诊断方法包括分析生物样品是否存在导致 PTEN 的表达或功能降低（PTEN 缺陷）的遗传学或表观遗传学变化，和/或导致 SLC6A4 的表达或功能降低（SLC6A4 缺陷）的遗传学或表观遗传学变化。

[0158] 另外或可选地，所述诊断方法包括分析对象生物样品中循环血清素的增加。ELISA

测定和类似的免疫吸附测定可用于测定循环血清素的水平。与 ASD 相关的血清素的水平 \geq 对照（非 ASD）人群平均数之上的 2 倍标准差。此外，HPLC、质谱和蛋白质阵列也可用来测定循环血清素的水平。

[0159] 所述诊断方法还可与本文所述的治疗方法联合。诊断和治疗方法的联合可用于指导治疗，例如在治疗之前使用诊断方法以确定治疗对象。诊断和治疗方法的联合也可用于监测治疗过程和 / 或病症过程，例如在治疗期间或治疗之后使用诊断方法以确定对对象的治疗效果。诊断方法与治疗方法的这种应用在医药领域常规进行。

[0160] 可在治疗之前实施诊断方法以确定对对象用本文所述的 5-HT_{2c} 受体信号通路的拮抗剂或抑制剂进行治疗的合适性。患有其他有此种遗传基础并且适于本文所述治疗的疾病、病症和障碍的对象也可用相同的方法诊断和治疗。尤其是携带 Pten 基因和 / 或 Slc6a4 基因所靶向的基因或 5-HT_{2c} 受体下游基因的突变或变化的对象适于本文所述的治疗，而且可用相同的方法诊断和治疗。

[0161] 标准的临床诊断方法在本领域是公知的。通常这些方法包括从对象获取样品，该样品可以是（但不限于）组织样品、活检样品、流体样品（例如血液、尿液、唾液、脑脊液）等，然后对样品进行诊断程序。专业人员能使用许多公知的方法学来分析样品，例如多种核酸检测和扩增方法（包括以聚合酶链式反应为基础的方法）和多种蛋白质检测方法（包括以抗体为基础的检测方法）。在其他情况下，可以使用成像技术以进行非侵入性诊断。

[0162] 通过下述实施例进一步说明本发明，所述实施例不应当以任何方式解释为对本发明的进一步限制。

实施例

[0163] 实施例 1 :Pten 和血清素转运蛋白的单倍体不足共同影响脑尺寸和社交行为

[0164] 材料和方法

[0165] 动物 :所用的品系为 B6.129-Pten^{tm1Rps}(13) (来自 Frederick 的国家癌症研究所) 和 B6.129-Slc6a4^{tm1Kp1}(23) (来自 Taconic)。在它们各自的机构中，每个品系与 C57BL/6 背景杂交 10 代以达到遗传同质 (congenicity)。我们通过两种交配得到本研究的小鼠：Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+} × Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+} 小鼠以产生 Pten^{+/+};Slc6a4^{+/+} (“野生型”) 和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+} (“Pten 单倍体不足”) 小鼠，和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/+} × Pten^{+/+};Slc6a4^{-/-} 小鼠以产生 Pten^{+/+};Slc6a4^{+/-} (“Slc6a4 单倍体不足”) 和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} (“Pten 和 Slc6a4 单倍体不足”) 小鼠。我们发现由于 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠在胚胎期和产后早期的高死亡率，这种方法比 Pten^{+/-} × Slc6a4^{+/-} 交配策略更具优势。

[0166] 行为测试在 8 周龄或 12 周龄进行。所有动物以每笼 2-5 只小鼠成组饲养，基因型之间的饲养没有差异。自由获取食物和水，对动物保持 12 小时的光 / 暗周期。所有行为测试在光周期将要结束时实施。实验根据麻省理工学院动物保护委员会批准的协议并且按照 NIH 的指南来实施。

[0167] 社交接触 :将小鼠放置在顶部开口的具有不透明壁的丙烯酸盒中 (24”长 × 12”宽 × 12”高)。盒子分为三个室 (8”长 × 12”宽)，通过不透明的丙烯酸板隔开，板上有孔以供室之间通行。作为标记，将室由左到右编号为 1、2 和 3。室 1 中，将不熟悉的野生型性别和品系匹配小鼠放置在透明圆柱型丙烯酸笼内 (直径 4” × 8”高)，其上具有很多孔以允

许适当通风以及两只小鼠之间的视觉、触觉和嗅觉接触。将相同的空笼置于室 3。保持试验之间测试房间中的设备方向不变。我们之前发现,随机放置设备相对于测试房间的方向不会改变结果。测试之前,每天使刺激小鼠和对象小鼠单独习惯社交接触设备 5 分钟,持续 3 天。在测试当天,小鼠再次习惯设备 5 分钟。在此期间,观察对象小鼠对室 1 或 3 的偏好性——任何基因型都未观察到这种偏好性。之后将刺激小鼠放置到设备中,并进行 10 分钟的试验录像。将得到的视频导入到 ImageJ 软件 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>),用计算机辅助评分,其中用自行编写的脚本将每个室定义为目的区域,定量小鼠在每个目的区域里时的帧数。由不知道基因型的受训观察员将所有数据集进行手工检查以确保准确性。

[0168] 嗅觉:操作方法修改自 (30,59)。每只小鼠放置入与饲养笼相同的干净塑料笼内,并允许适应环境 5 分钟。将用 10 μ l 蒸馏水润湿的棉签通过笼盖在 10cm 的高度插入一分钟。用新棉签将棉签更换两次,共提供三次,随后用 10 μ l 香草提取物 (Frontier,Norway, IA) 润湿的棉签进行 3 次 1 分钟的插入。提供香草之后,将 5 μ l 柠檬提取物 (Simply Organic,Boulder,CO) 润湿的棉签提供三次,每次一分钟。每次提供棉签,记录距离棉签小于 3cm 的嗅闻的频率和持续时间 (秒)。

[0169] 前脉冲抑制:我们使用了 ASR-PR01 听觉惊吓反射测试设备 (Med Associates, St. Albans,VT)。测试之前,将小鼠放入测试室 1 小时以适应环境。开始试验前,使小鼠适应设备 2 分钟。试验以 3-8 秒 (随机) 的间隔进行。试验由 40ms 的单独惊吓刺激 (110db 白噪声) 或 100ms 之前有 20ms 白噪声前脉冲 (背景 (60bd 白噪声) 之上 8db、12db 或 16db) 的惊吓刺激组成。用惊吓反射软件 (Med Associates,St. Albans,VT) 记录每种刺激设置的 5 个试验。

[0170] 结果

[0171] 为了测试 Pten 和 Slc6a4 之间潜在的相互作用,我们首先需要确定与 ASD 相关的表型读出。ASD 中最广泛报道的神经解剖学异常之一是巨头畸型,其在成人中有 10-30% 的发病率,发育中发病率高达 60% (17)。对 ASD 患者的研究表明,脑尺寸与 ASD 相关测量中的行为表型严重性呈正相关 (18,19)。小鼠脑内 Pten 的条件性敲除的报告描述了巨头畸型表型,其中细胞体大小和轴突肥大的增加可能引起了这些表型 (20-22)。我们通过将 Pten 单倍体不足小鼠与携带有前述 Slc6a4 功能丧失等位基因的品系杂交而产生了 Pten 和 Slc6a4 复合杂合突变小鼠 (23)。我们集中研究生殖细胞杂合小鼠以将临床相关性最大化。为了检查 Pten 或 Slc6a4 单倍体不足小鼠是否表现出脑过度生长,我们获得了总脑量的测量值,以体重归一化以说明身体大小的变化。这些数据表明, Pten 或 Slc6a4 的单倍体不足雄性或雌性中均导致了巨头畸形表型 (图 1A-C)。而且, Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠有额外的脑过度生长表型,该表型比 Pten 或 Slc6a4 单倍体不足小鼠中观察到的更严重 (图 1A-C)。尽管对生长的作用的细胞机制还有待确定,这些数据表明 Pten 和 Slc6a4 共同作用以影响与 ASD 相关的表型,即脑过度生长。

[0172] 上述结果证明, Pten 单倍体不足小鼠可以是检查以与多基因 ASD 相关的方式与 Pten 相互作用的第二位点遗传修饰物以及测试环境改变的影响和治疗性化合物的影响的有用工具。为研究 Pten 单倍体不足小鼠是否具有对 ASD 相关行为表型的表面有效性 (surface validity),我们用几个行为测定来测试 12 周龄小鼠。我们所用的测定测试社交能力 (这反映了患 ASD 个体中所见的主要诊断性缺陷 (24)) 以及前脉冲抑制 (对感觉运动

门控的测量,据报道这在患 ASD 的个体中是异常的 (25-217))。为了测试社交行为中可能起混淆作用的因素 (嗅觉功能),我们对 Pten 单倍体不足小鼠和对照进行在习惯化 - 去习惯化测试,结果发现这些小鼠反应正常 (图 6),这表明他们嗅觉功能没有重大障碍。为测试社交接触行为,我们使用一种设备的改变形式,其中小鼠要选择与不熟悉的性别和年龄匹配的刺激小鼠还是无生命物体互动 (28, 29) (图 2A)。尽管两种性别的野生型小鼠对在社交室内存留均显示了明显的偏好, Pten 单倍体不足的雌性小鼠未显示出这种偏好,而且它们在社交和非社交室存留的时间大致相等 (图 2B)。雄性 Pten 单倍体不足小鼠在社交接触行为上未表现出同样的缺陷 (图 2C)。在 Pten 单倍体不足小鼠和对照的感觉运动门控测试中,我们发现两种性别均在听觉惊吓反应的前脉冲抑制中存在缺陷 (图 2D)。我们关于 Pten 单倍体不足小鼠的结果与 CNS 特异 Pten 条件性敲除小鼠 (其中对动物做了多种 ASD 相关表型测试) 的行为结果大体一致 (21)。不同之处是在雄性中所见的社交接触的最初倾向,其中条件性敲除显示缺陷,而 Pten 单倍体不足小鼠并未显示。这些差异最有可能是由于这两个回补模型中遗传操作的不同性质。鉴定这些模型中不同行为表型的神经生物学基础应对 Pten 如何影响与 ASD 相关的神经回路发展提供更深入理解。

[0173] 为了测试我们在 Pten^{+/-} 雌性小鼠中观察的社交接触表型是否可被 Slc6a4 单倍体不足改变 (如同对脑尺寸那样),我们检查了 8 周龄雌性野生型、Pten 单倍体不足、Slc6a4 单倍体不足和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 复合突变小鼠。Slc6a4 单倍体不足和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠在嗅觉习惯化 - 去习惯化测试中反应正常 (图 6),这提示这些小鼠的嗅觉没有重大障碍。我们发现 Slc6a4 单倍体不足小鼠与野生型小鼠相比,在社交接触测定中显示出对与刺激小鼠互动偏好的下降,尽管这没有低于显著性阈值。然而, Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠对与刺激小鼠互动没有表现出显著的偏好 (图 3A)。用社交接触回避得分 (28) (在社交室 1 的时间减去在非社交室 3 的时间) 来分析这些数据,我们发现 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠与刺激小鼠互动时间比野生型、Pten 单倍体不足、或 Slc6a4 单倍体不足小鼠显著减少 (图 3B)。该结果与以下结论一致,即 Pten 和 Slc6a4 的单倍体不足加合性作用以影响与 ASD 相关的行为表型 —— 社交接触。

[0174] 为了进一步检查 Pten^{+/-} 雄性小鼠的社交接触,我们测试了 8 周龄雄性野生型、Pten 单倍体不足、Slc6a4 单倍体不足和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠的社交接触和认知行为。为此,我们根据用于测试 Oxytocin 敲除小鼠 (其显示了正常的起始社交调查行为,但是 30 分钟后的再暴露时未能认出相同的社交目标) 的社交认知的试验方案调整我们的 3 室装置 (30-32)。与我们在 12 周龄雄性野生型和 Pten 单倍体不足小鼠中的发现一致 (图 2C),在第一个 10 分钟试验中 (试验 1),我们没有观察到雄性组中任一基因型的社交互动偏好的显著变化 (图 3C)。在对相同社交目标的再接触的试验 2 中 (5 分钟),野生型小鼠在调查对照和含有刺激小鼠的室时表现出同样的兴趣,据推测该作用是由于习惯 (图 3C)。相反, Pten 单倍体不足、Slc6a4 单倍体不足和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小鼠在第一次和第二次试验中没有显示出社交调查偏好的减弱 (图 3D)。这一发现提示 Pten 和 Slc6a4 单倍体不足可能有损雄性小鼠的社交认知;然而,有必要进行进一步测试以将社交认知通路 (即催产素 - 后叶加压素 - 多巴胺) 中的特异性缺陷和社交互动中的持续兴趣区分开。

[0175] 在前脉冲抑制测试中, Pten 和 Slc6a4 单倍体不足之间关系似乎是显性上位的 (epistatically dominant) 而不是叠加的,其中 Pten 单倍体不足和 Pten^{+/-};Slc6a4^{+/-} 小

鼠与野生型相比均有显著的损害,而相互比较则没有(图 3D)。这提示对于行为背后的脑环路发育而言,Pten 和 Slc6a4 之间的相互作用可能有一定程度的特异性。我们推测,Pten 和 Slc6a4 的共同作用对涉及社交行为的环路的组装和功能尤其重要,与对脑尺寸的控制一样,但对参与其他与 ASD 相关的行为(例如感觉运动门控)的环路并不是必需的。

[0176] 我们接下来研究了在基因型之间和在每个基因型内社交接触表型是否与脑尺寸相关。分析群平均值揭示了脑尺寸(相对于体重)与基因型之间的社交接触回避得分之间呈负相关(图 4A)。出人意料的,每个基因型中单个对象的分析显示了每组的这些测量值之间明显正相关,而 Slc6a4 单倍体不足小鼠可能是个例外,其表现出更多的变化性(图 4B 至 E)。这表明 Pten 和 Slc6a4 的单倍体不足导致伴随脑尺寸增加的社交能力降低。然而,在每一个这些基因型中,组内因素似乎引起了伴随脑尺寸增加的社交能力升高。

[0177] 血清素信号(包括 Slc6a4)和 PI3K 通路(包括 Pten)可相互作用而影响脑发育的机制在图 7 中说明。一种可能性是 Pten 和血清素受体可以调节方式进行物理相互作用,从而影响脑发育。在神经元中,Pten 结合 5-HT_{2c} 受体,并通过其磷酸酶活性限制该受体的激动剂诱导活化,并且调节在腹侧被盖区多巴胺能神经元的激发率(10)。我们进行了 5-HT_{2c} 受体的特异性拮抗剂 SB 242084(33)对雌性 Pten 单倍体不足小鼠的社交接触行为影响的初步测试,发现这种药物可补偿社交接触行为的缺陷(图 5)。有趣的是,已报道的减轻孤独症症状的三种药(非典型抗精神病药物利培酮(34)和奥氮平(35)和抗抑郁药氟西汀(36))除对血清素和多巴胺通路的其他成员有公知的作用外,均对 5-HT_{2c} 受体有拮抗作用。根据我们在本文中报道的发现,我们提出对 5-HT_{2c} 受体的拮抗可能与这些药物在孤独症中的作用相关。

[0178] 讨论

[0179] 关于脑的结构和功能,我们发现两种性别的 Pten 单倍体不足小鼠都有脑过度生长,而且雌性在社交接触行为方面有缺陷。我们发现这些表型可以叠加方式被 Slc6a4 单倍体不足改变。这些发现是惊人的,因为孤独症影响雄性超过雌性,比例约为 4 : 1。目前我们不知道为何在 Pten 单倍体不足小鼠的社交行为中观察到性别的不同作用。重要的是要强调,我们使用的社交接触测定仅涉及了啮齿动物中可能与 ASD 相关的社交行为的一方面。有必要进行进一步的行为测试(例如超声发声或社交奖励)以充分表征这些小鼠社交缺陷的程度和性质;可能这些测试还可揭示雄性 Pten 单倍体不足小鼠的缺陷。然而,在我们测定中这些性别差异的一个有趣的可能线索来自免疫系统功能障碍(特别是自身免疫)与 ASD 之间联系的证据报告(19,37,38)。尸检研究还显示 ASD 中几个神经性炎症的标志的表达升高(39)。重要的是,Pten^{+/-} 小鼠有免疫系统异常(包括自身免疫)而且与雄性小鼠相比,这些作用在雌性小鼠更加明显(40)。这表明 Pten 单倍体不足小鼠会是研究性别和免疫系统功能紊乱对神经系统发育的影响的有用模型。

[0180] 我们提出血清素受体 5-HT_{2c}R 的调节是 ASD 潜在治疗性靶点。除 SB 24208 外,已经开发了其他几种药物,其对 5-HT_{2c}R 的拮抗作用比利培酮(34)、奥氮平(35)和氟西汀(36)更具特异性;我们预计这些也可用作 ASD 的治疗剂。这些药物的实例包括 FR 260010(41)和 RS 102221(42)。除作用于血清素受体 5-HT_{2c}R 外,还有可能的是 PI3K/Akt 通路直接由血清素信号调节。在培养的啮齿动物海马神经元中,加入 5-HT_{1A} 受体激动剂可激活 Akt,而且该激活可通过 PI3K 的药理抑制而被阻止(43)。早在胚胎发育中期,5-HT_{1A}

受体就在脑中表达 (44), 这提示甚至从形态发生的早期阶段, 该受体的活性改变可更改脑发育的过程。5-HT_{1B} 受体的刺激也能激活 Akt (45)。有证据表明, 这种受体调节轴突对新脑皮层发育的导向因子的应答 (46), 并且作用于该受体的过量的血清素是 Slc6a4 敲除小鼠中特异性细胞构筑异常的原因 (47)。这两种机制均指向能够影响形态发生、生长和神经元功能的分子, 包括 mTOR、GSK-3 β 、Creb 和 NF- κ B。有趣的是, 血清素刺激增加小鼠脑中 GSK-3 β 在 Ser9 位磷酸化水平 (48), 以及血清素缺陷降低了小鼠脑中 GSK-3 β 在 Ser9 位磷酸化水平 (49)。GSK-3 β 在 Ser9 位由 Pten 通过 Akt 调节参与了神经元极性的建立和维持 (50), 据报道磷酸化 GSK-3 β 升高的水平与 CNS 中条件性敲除 Pten 的小鼠脑中的水平一样 (21)。虽然将需要进一步的实验来验证这个模型, 但对于一部分患有 ASD 的个体而言, 血清素和 Pten-PI3K 通路共同指向的分子可能被证明是有用的生物标志和治疗性靶点。

[0181] 我们的数据还提示, 本研究所检查基因型间的脑尺寸与社交能力之间存在负相关。然而, 在给定的基因型组内的动物个体水平上, 我们发现在脑尺寸和社交能力之间有显著的正相关。我们将这一发现解释为社交能力在改变脑尺寸上是有益和有害的两种方式。我们已确定 Pten 和 Slc6a4 单倍体不足叠加地导致脑尺寸的相关增加以及社交能力的降低。可能作为其继发作用并且可能反映环境对神经可塑性的影响, 我们推测特异性的通路以有关社交能力的有益方式影响脑尺寸。而在孤独症中, 临床数据表明了头围和社交能力之间的负相关 (18, 19), 许多研究的证据表明, 灵长类动物和其他动物的脑尺寸和社交复杂性之间存在正相关 (在 (51) 中综述)。不同的生物学通路影响脑尺寸并导致关于社交能力的不同结果的可能性可能有助于解释这一悖论。我们提出这一假说, 即这些通路可作为物种内及物种间社交行为改变的进化基础发挥作用。

[0182] 我们的结果还表明, 总体脑尺寸可作为筛选与血清素与 PI3K 通路的相互作用的方便的表型读出。今后的研究将旨在表征引起本文报告的解剖学和行为表型的机制, 以及遗传、环境和药理操作如何影响这些表型。会令人感兴趣的是检查所提出的 ASD 病理生理机制 (包括刺激 / 抑制率的增加 (52) 和额叶皮质中局部相对于长距离连接性的改变 (53)) 在这个模型中是否明显。ASD 中已观察到从头基因组拷贝数的变异率升高 (54)。由于 Pten 具有维持基因组稳定性的作用, 而且 Pten 缺失导致双链 DNA 碎片的累积 (55, 56), PTEN 单倍体不足的背景可增加继发改变事件发生的可能性, 例如与 ASD 相关基因的拷贝数异化。至于环境改变因素, 多氯联苯 (PCB) 是一类能干扰新皮层发育的有机化合物, 并且它是 ASD 病因中与遗传易感性相互作用的候选因素 (57)。有实验证据表明一种 PCB (PCB77) 通过 PI3K 通路改变一氧化氮信号和 NF- κ B 的活性, 而且这种作用可通过抑制 PI3K 而抵消 (58)。鉴于 PTEN 作为 PI3K 信号的负调节子的作用, 我们提出这一假说, 即 PTEN 单倍体不足可能是对暴露于环境毒素 (影响 PI3K 通路 (例如 PCB)) 应答的 ASD 易感性的遗传风险因子反应。

[0183] 参考文献

[0184] 1. Cully, M., You, H., Levine, A. J., & Mak, T. W. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 184-192.

[0185] 2. Butler, M. G., et al. (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour

- suppressor gene mutations. *J Med Genet* 42,318-321.
- [0186] 3. Goffin, A., Hoefsloot, L. H., Bosgoed, E., Swillen, A., & Fryns, J. P. (2001) PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and autism. *Am J Med Genet* 105, 521-524.
- [0187] 4. Herman, G. E., et al. (2007) Increasing knowledge of PTEN germline mutations: Two additional patients with autism and macrocephaly. *Am J Med Genet A* 143,589-593.
- [0188] 5. Herman, G. E., et al. (2007) Genetic testing in autism: how much is enough? *Genet Med* 9,268-274.
- [0189] 6. Bartlett, C. W., Gharani, N., Millonig, J. H., & Brzustowicz, L. M. (2005) Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J Dev Neurosci* 23,221-234.
- [0190] 7. Hessler, D., et al. (2007) Brief Report: Aggression and Stereotypic Behavior in Males with Fragile X Syndrome—Moderating Secondary Genes in a "Single Gene" Disorder. *J Autism Dev Disord*.
- [0191] 8. Wassink, T. H., et al. (2007) Cerebral cortical gray matter overgrowth and functional variation of the serotonin transporter gene in autism. *Arch Gen Psychiatry* 64,709-717.
- [0192] 9. Brune, C. W., et al. (2006) 5-HTTLPR Genotype-Specific Phenotype in Children and Adolescents With Autism. *Am J Psychiatry* 163,2148-2156.
- [0193] 10. Ji, S. P., et al. (2006) Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse. *Nat Med* 12, 324-329.
- [0194] 11. Cowen, D. S. (2007) Serotonin and neuronal growth factors—a convergence of signaling pathways. *J Neurochem* 101,1161-1171.
- [0195] 12. Eng, C. (2003) PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 22,183-198.
- [0196] 13. Podsypanina, K., et al. (1999) Mutation of Pten/Mma1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96,1563-1568.
- [0197] 14. Muhle, R., Trentacoste, S. V., & Rapin, L. (2004) The genetics of autism. *Pediatrics* 113, e472-486.
- [0198] 15. Marui, T., et al. (2004) Association between the neurofibromatosis-1 (NF1) locus and autism in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 131,43-47.
- [0199] 16. Mbarek, O., et al. (1999) Association study of the NF1 gene and autistic disorder. *Am J Med Genet* 88,729-732.
- [0200] 17. Courchesne, E. & Pierce, K. (2005) Brain overgrowth in autism during a critical time in development: implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity. *Int J Dev Neurosci* 23,153-170.
- [0201] 18. Courchesne, E., Carper, R., & Akshoomoff, N. (2003) Evidence of brain

overgrowth in the first year of life in autism. *Jama* 290,337-344.

[0202] 19. Sacco, R., et al. (2007) Clinical, morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism. *Biol Psychiatry* 62,1038-1047.

[0203] 20. Backman, S. A., et al. (2001) Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* 29,396-403.

[0204] 21. Kwon, C. H., et al. (2006) Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* 50,377-388.

[0205] 22. Kwon, C. H., et al. (2001) Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* 29,404-411.

[0206] 23. Bengel, D., et al. (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (" Ecstasy ") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* 53,649-655.

[0207] 24. Crawley, J. N. (2004) Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10,248-258.

[0208] 25. Frankland, P. W., et al. (2004) Sensorimotor gating abnormalities in young males with fragile X syndrome and Fmr1-knockout mice. *Mol Psychiatry* 9, 417-425.

[0209] 26. McAlonan, G. M., et al. (2002) Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome. *Brain* 125,1594-1606.

[0210] 27. Perry, W., Minassian, A., Lopez, B., Maron, L., & Lincoln, A. (2007) Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol Psychiatry* 61,482-486.

[0211] 28. Brodtkin, E. S., Hagemann, A., Nemetski, S. M., & Silver, L. M. (2004) Social approach-avoidance behavior of inbred mouse strains towards DBA/2 mice. *Brain Res* 1002,151-157.

[0212] 29. Nadler, J. J., et al. (2004) Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav* 3,303-314.

[0213] 30. Crawley, J. N., et al. (2007) Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides* 41,145-163.

[0214] 31. Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 21,8278-8285.

[0215] 32. Ferguson, J. N., et al. (2000) Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 25,284-288.

[0216] 33. Kennett, G. A., et al. (1997) SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36,609-620.

[0217] 34. McCracken, J. T., et al. (2002) Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *N Engl J Med* 347,314-321.

- [0218] 35. Malone, R. P. , Cater, J. , Sheikh, R. M. , Choudhury, M. S. , & Delaney, M. A. (2001) Olanzapine versus haloperidol in children with autistic disorder :an open pilot study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40,887-894.
- [0219] 36. Cook, E. H. , Jr. , Rowlett, R. , Jaselskis, C. , & Leventhal, B. L. (1992) Fluoxetine treatment of children and adults with autistic disorder and mental retardation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 31,739-745.
- [0220] 37. Cabanlit, M. , Wills, S. , Goines, P. , Ashwood, P. , & Van de Water, J. (2007) Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci* 1107,92-103.
- [0221] 38. Sweeten, T. L. , Bowyer, S. L. , Posey, D. J. , Halberstadt, G. M. , & McDougle, C. J. (2003) Increased prevalence of familial autoimmunity in probands with pervasive developmental disorders. *Pediatrics* 112,e420.
- [0222] 39. Vargas, D. L. , Nascimbene, C. , Krishnan, C. , Zimmerman, A. W. , & Pardo, C. A. (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57,67-81.
- [0223] 40. Di Cristofano, A. , et al. (1999) Impaired Fas response and autoimmunity in *Pten*^{+/-} mice. *Science* 285,2122-2125.
- [0224] 41. Harada, K. , et al. (2006) Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT_{2C} receptor antagonist FR260010 :a comparison with diazepam and buspirone. *Eur J Pharmacol* 553,171-184.
- [0225] 42. Bonhaus, D. W. , et al. (1997) RS-102221 :a novel high affinity and selective, 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36,621-629.
- [0226] 43. Cowen, D. S. , Johnson-Farley, N. N. , & Travkina, T. (2005) 5-HT receptors couple to activation of Akt, but not extracellular-regulated kinase (ERK), in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 93,910-917.
- [0227] 44. Bonnin, A. , Peng, W. , Hewlett, W. , & Levitt, P. (2006) Expression mapping of 5-HT₁ serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience* 141,781-794.
- [0228] 45. Hsu, E. H. , Lochan, A. C. , & Cowen, D. S. (2001) Activation of Akt1 by human 5-hydroxytryptamine (serotonin) 1B receptors is sensitive to inhibitors of MEK. *J Pharmacol Exp Ther* 298,825-832.
- [0229] 46. Bonnin, A. , Torii, M. , Wang, L. , Rakic, P. , & Levitt, P. (2007) Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat Neurosci* 10,588-597.
- [0230] 47. Salichon, N. , et al. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *J Neurosci* 21,884-896.
- [0231] 48. Li, X. , et al. (2004) In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) by serotonergic activity in mouse brain.

Neuropsychopharmacology 29,1426-1431.

[0232] 49. Beaulieu, J. M., et al. (2008) Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 1333-1338.

[0233] 50. Jiang, H., Guo, W., Liang, X., & Rao, Y. (2005) Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. Cell 120, 123-135.

[0234] 51. Dunbar, R. I. & Shultz, S. (2007) Evolution in the social brain. Science 317, 1344-1347.

[0235] 52. Rubenstein, J. L. & Merzenich, M. M. (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. Genes Brain Behav 2, 255-267.

[0236] 53. Courchesne, E. & Pierce, K. (2005) Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. Curr Opin Neurobiol 15, 225-230.

[0237] 54. Sebat, J., et al. (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. Science 316, 445-449.

[0238] 55. Puc, J. & Parsons, R. (2005) PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. Cell Cycle 4, 927-929.

[0239] 56. Shen, W. H., et al. (2007) Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. Cell 128, 157-170.

[0240] 57. Kenet, T., Froemke, R. C., Schreiner, C. E., Pessah, I. N., & Merzenich, M. M. (2007) Perinatal exposure to a noncoplanar polychlorinated biphenyl alters tonotopy, receptive fields, and plasticity in rat primary auditory cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 7646-7651.

[0241] 58. Lim, E. J., Smart, E. J., Toborek, M., & Hennig, B. (2007) The role of caveolin-1 in PCB77-induced eNOS phosphorylation in human-derived endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293, H3340-3347.

[0242] 59. Luo, A. H., et al. (2002) Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). Brain Res 941, 62-71.

[0243] 所用的术语和表达是用作描述的术语,而不是限制的术语,并且并非意在使用这些术语和表达排除所示和所述特征或其部分的任何等价物,应认为可在本发明范围内进行多种改动。

[0244] 本申请全文所引用的所有参考文献的全部内容(包括文献、授权专利、公布的专利申请)或其相关部分均以本文所引用的目的通过参考明确并入本文。

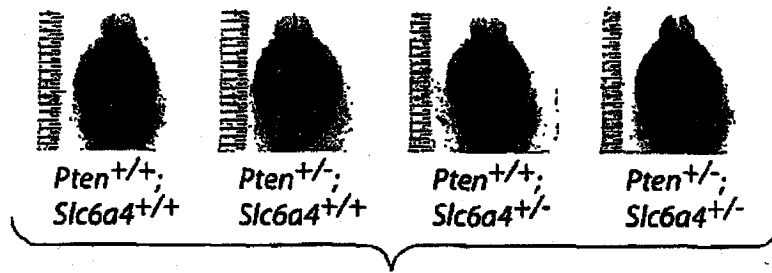


图 1A

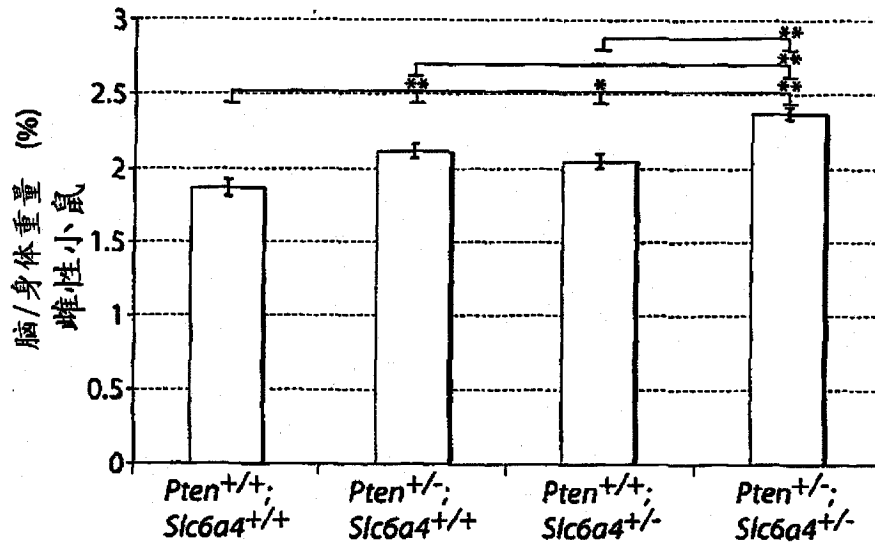


图 1B

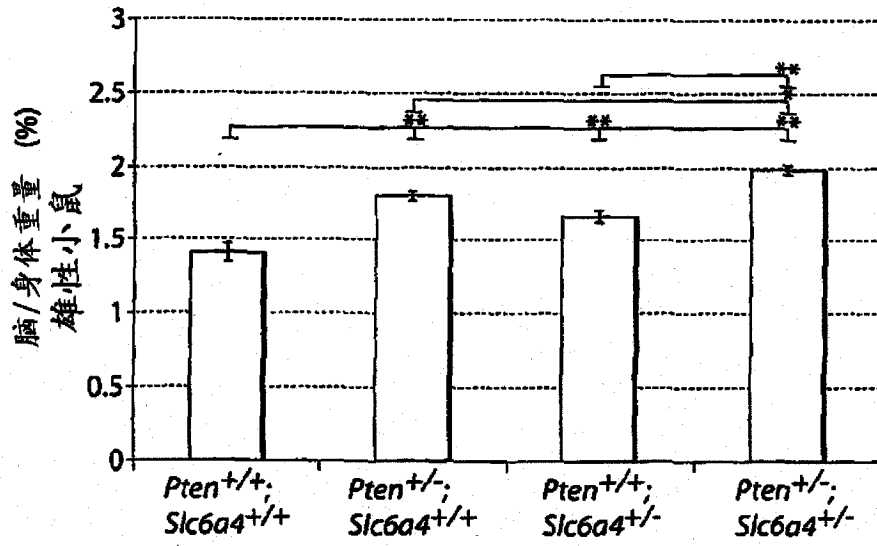


图 1C

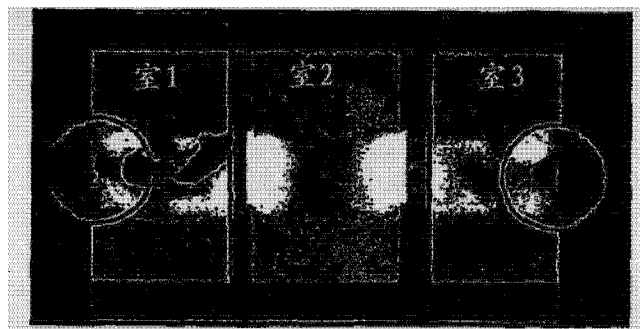


图 2A

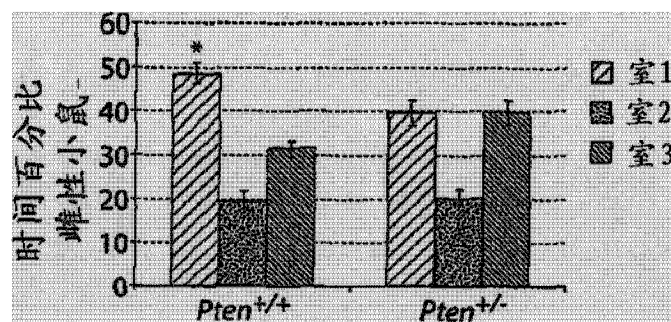


图 2B

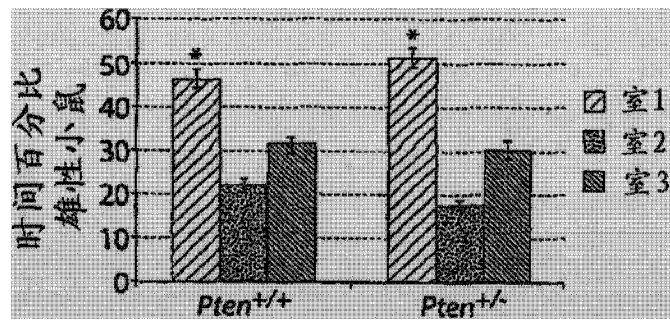


图 2C

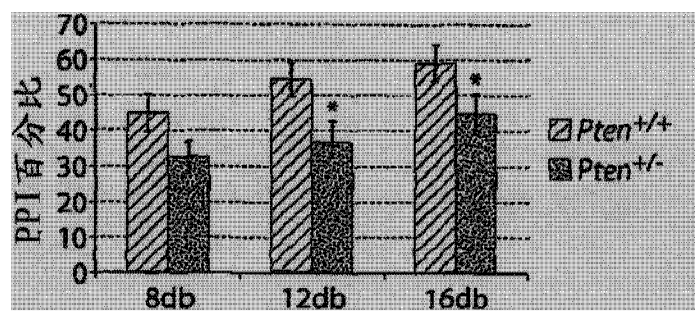


图 2D

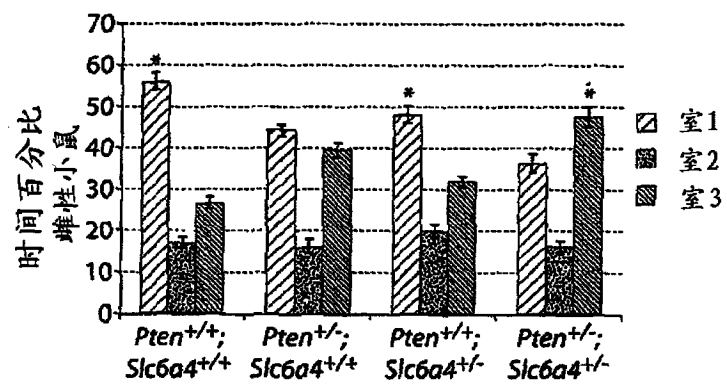


图 3A

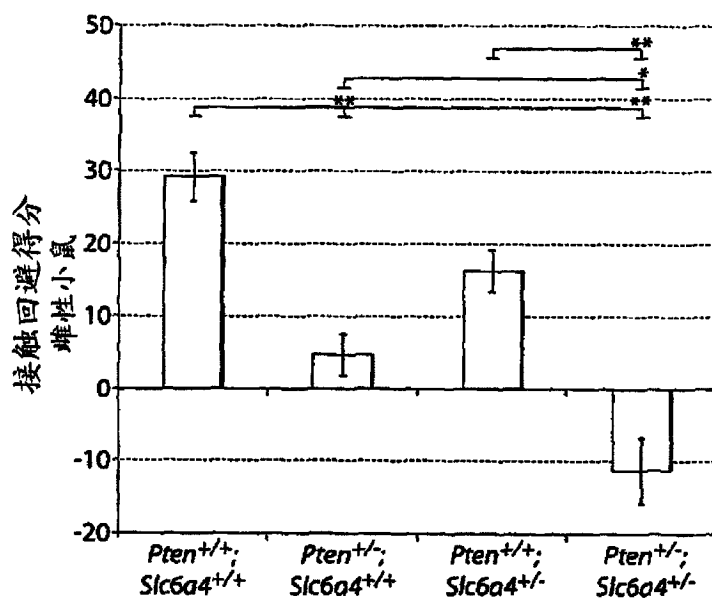


图 3B

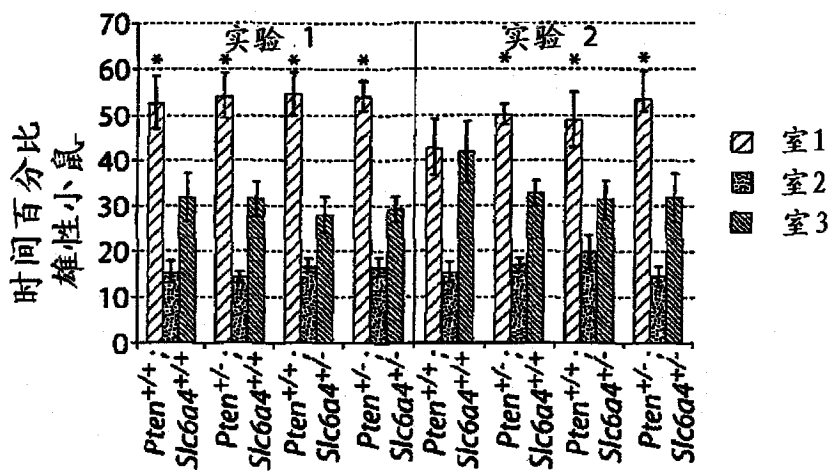


图 3C

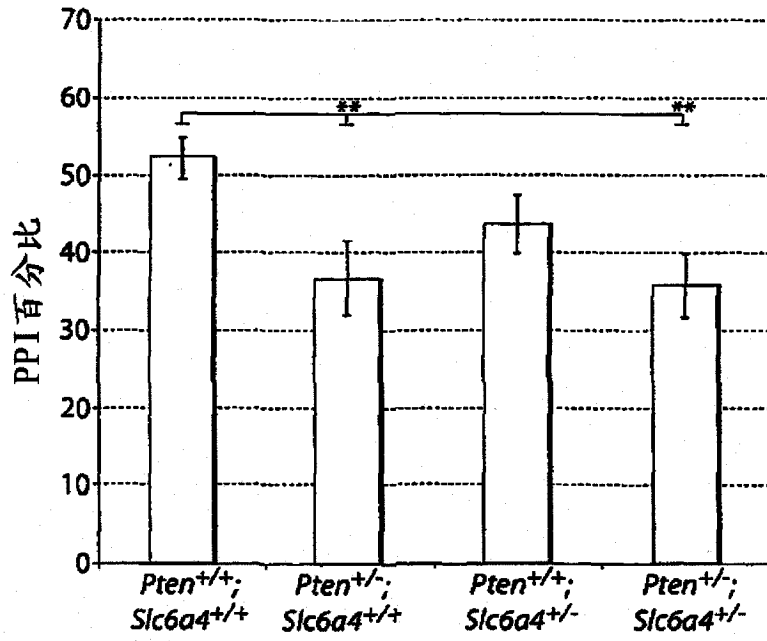


图 3D

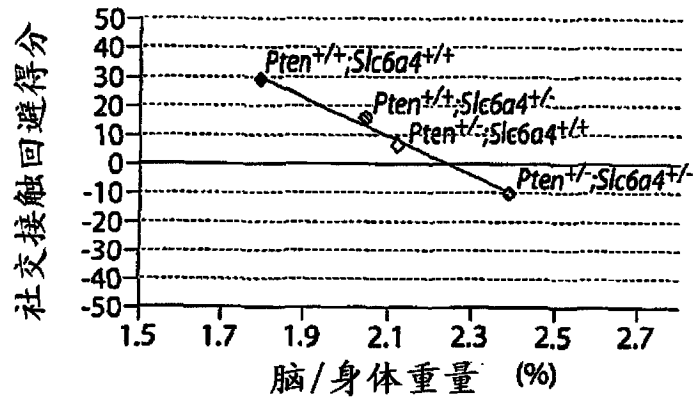


图 4A

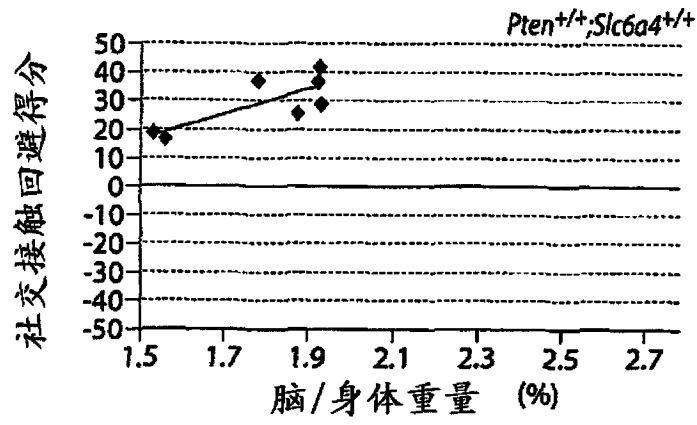


图 4B

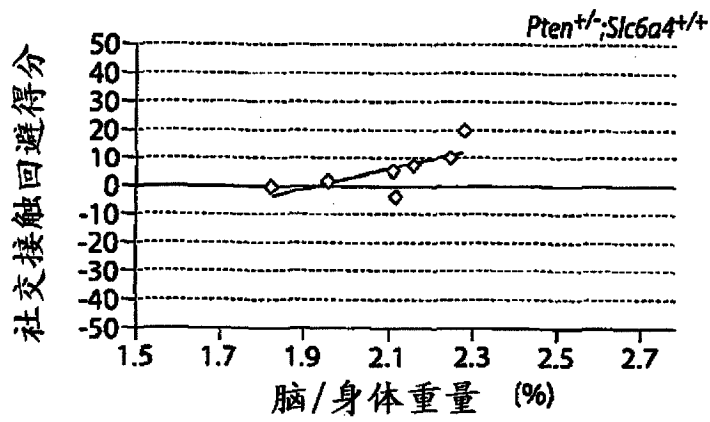


图 4C

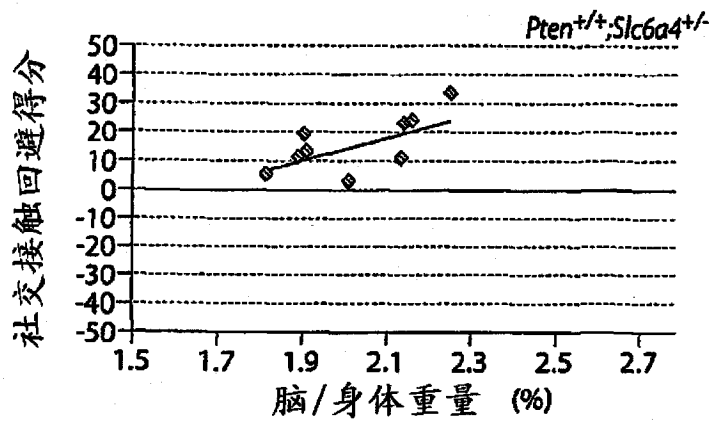


图 4D

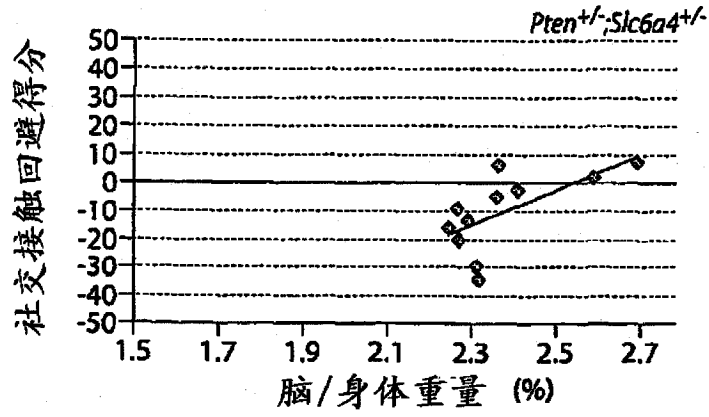


图 4E

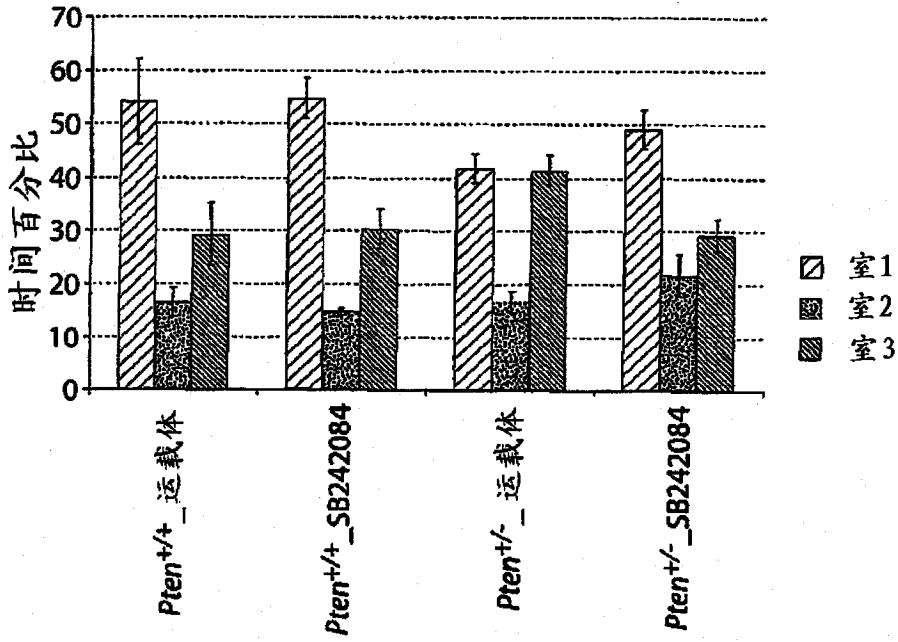


图 5

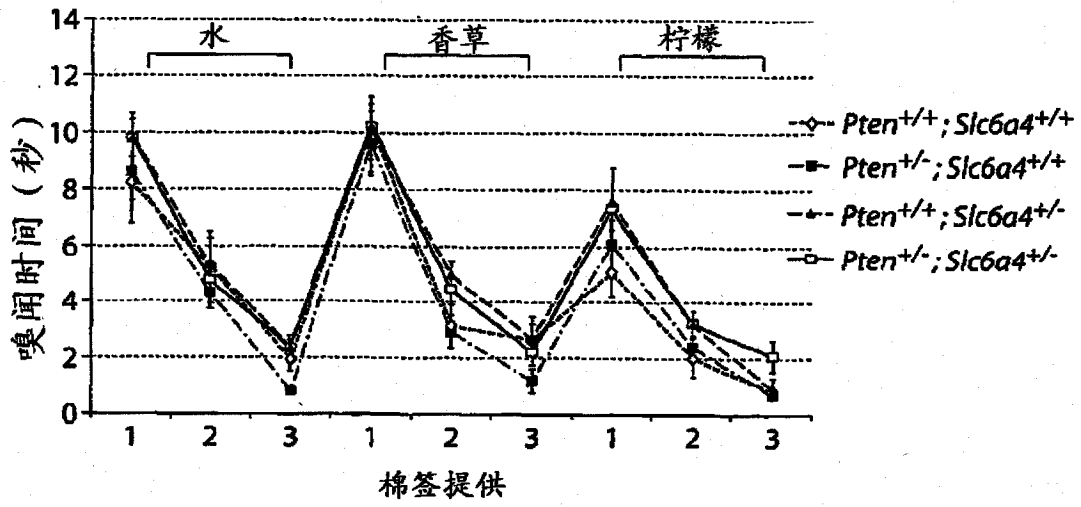


图 6

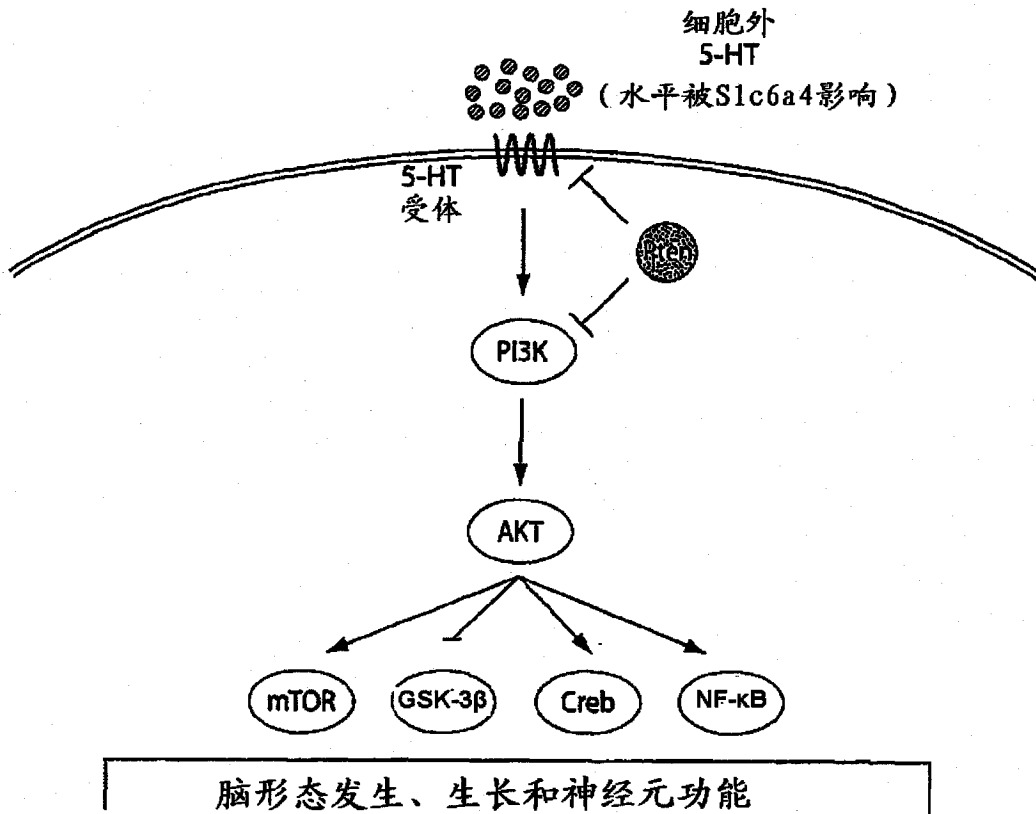


图 7

专利名称(译)	孤独症谱系障碍的诊断和治疗		
公开(公告)号	CN102348798A	公开(公告)日	2012-02-08
申请号	CN201080011989.6	申请日	2010-01-15
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
当前申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
[标]发明人	达蒙西伦佩奇 姆里甘卡苏尔		
发明人	达蒙·西伦·佩奇 姆里甘卡·苏尔		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/138 A61K31/403 A61K31/435 A61K31/444 A61K31/517 A61K31/519 A61K31/5513 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/28 C12N15/1136 C12N15/1138 C12N2310/14 C12Q1/6883 C12Q2600/156		
代理人(译)	郑斌		
优先权	61/145294 2009-01-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断和治疗孤独症谱系障碍(autism spectrum disorders)的方法，尤其是用于诊断和治疗以头部尺寸(周长)增加和社交行为缺陷为特征的孤独症谱系障碍的方法。

