

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101808647 A

(43) 申请公布日 2010.08.18

(21) 申请号 200880023965.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.05.15

A61K 31/70(2006.01)

(30) 优先权数据

60/938,163 2007.05.15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.01.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/063804 2008.05.15

(87) PCT申请的公布数据

W02008/144453 EN 2008.11.27

(71) 申请人 海利空医疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 M·彼得斯 R·E·M·斯科特

T·P·塔利

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

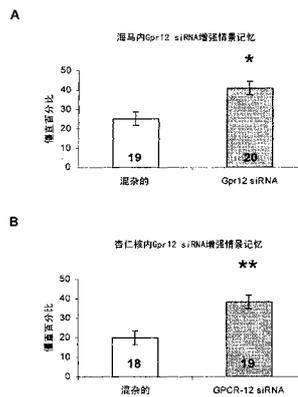
权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图 10 页

(54) 发明名称

通过抑制 Gpr12 治疗认知障碍的方法

(57) 摘要

本发明提供了筛选药剂的方法,所述药剂具有调节长期记忆形成、海马依赖性认知任务执行能力或 Gpr12 功能的能力。本发明也提供了通过调节 Gpr12- 依赖性蛋白质表达从而调节长期记忆形成或者海马依赖性认知任务执行能力的方法。本发明进一步提供了通过抑制 Gpr12 功能治疗长期记忆形成缺陷的方法以及通过抑制 Gpr12 功能治疗海马依赖性认知任务执行能力缺陷的方法。



1. 一种包括给哺乳动物施用有效量的调节哺乳动物中 Gpr12 活性的药剂的方法。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述哺乳动物是成年哺乳动物。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述哺乳动物是人。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述施用导致长期记忆形成调节。
5. 权利要求 4 的方法,其中长期记忆形成被增强。
6. 权利要求 4 的方法,进一步包括检测所述长期记忆形成中的所述调节作用。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述调节作用的所述检测是检测对海马依赖性认知任务的调节作用。
8. 权利要求 6 的方法,其中所述调节作用的所述检测是检测对杏仁核依赖性认知任务的调节作用。
9. 权利要求 6 的方法,其中所述调节作用的所述检测是检测对海马依赖性认知任务和杏仁核依赖性认知任务的调节作用。
10. 权利要求 1 的方法,其中 Gpr12 活性的调节包括调节哺乳动物中 Gpr12 蛋白表达。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述施用导致认知功能增强。
12. 权利要求 1 的方法,进一步包括在足以使得特定认知任务的执行能力(performance)改良的条件下训练所述哺乳动物的步骤。
13. 权利要求 12 的方法,其中相对于在没有所述施用的条件下单独通过训练获得的所述认知任务的执行能力而获得执行能力增益。
14. 权利要求 12 的方法,其中所述训练包括多个训练期。
15. 权利要求 12 的方法,其中所述训练包括有间隔的训练期。
16. 权利要求 12 的方法,其中所述药剂在每个训练期之前和 / 或期间施用。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述药剂包含一或多种有效量的 Gpr12siRNA 分子、有效量的生物学活性 Gpr12 反义片段和 / 或有效量的特异于 Gpr12 蛋白的抗体。
18. 一种方法,其包括如下步骤:(a) 将感兴趣的药剂导入表达 Gpr12 蛋白的宿主细胞中;(b) 确定 Gpr12 功能,其中在 (b) 中确定的 Gpr12 功能与未施用所述药剂的 (a) 的宿主细胞中 Gpr12 功能相对比的差异鉴定所述药剂是能调节 Gpr12 功能的药剂。
19. 一种方法,其包括如下步骤:(a) 给哺乳动物施用调节 Gpr12 功能的药剂;(b) 在足以在所述哺乳动物中产生长期记忆形成的条件下训练步骤 (a) 的哺乳动物和与其相同物种的未给予所述药剂的对照哺乳动物;(c) 评估在步骤 (b) 中训练的哺乳动物中长期记忆形成;(d) 对比步骤 (c) 中评估的哺乳动物中长期记忆形成,其中评估的施用所述药物的哺乳动物中长期记忆形成相对于评估的对照哺乳动物中长期记忆形成的差异确定所述药剂是能调节长期记忆形成的药剂。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述哺乳动物是成年哺乳动物。
21. 权利要求 19 的方法,其中所述哺乳动物是人。
22. 权利要求 19 的方法,其中所述长期记忆形成是海马依赖性长期记忆形成。
23. 权利要求 19 的方法,其中所述长期记忆形成是杏仁核依赖性长期记忆形成。
24. 权利要求 19 的方法,其中所述长期记忆形成是海马依赖性和杏仁核依赖性长期记忆形成。
25. 权利要求 19 的方法,其中 Gpr12 活性的调节包括调节哺乳动物中 Gpr12 蛋白表达。

26. 权利要求 19 的方法,其中所述训练包含多个训练期。
27. 权利要求 19 的方法,其中所述训练包含有间隔的训练期。
28. 权利要求 19 的方法,其中所述药剂在每个训练期之前和 / 或期间施用。
29. 权利要求 19 的方法,其中所述药剂包含一或多种有效量的 Gpr12siRNA 分子、有效量的生物学活性 Gpr12 反义片段和 / 或有效量的特异于 Gpr12 蛋白的抗体。

通过抑制 Gpr12 治疗认知障碍的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U. S. C. §119 要求 2007 年 5 月 15 日提交的美国临时申请系列号 No. 60/938, 163 的权益,其全文和内容并入本文参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及通过抑制 Gpr12 基因或者基因产物治疗认知障碍的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 许多生物体包括人具有对过去事件记忆的属性。对这个属性已经进行几十年的研究,目前可以利用更多的信息解释其许多其支派。例如,已经鉴别了两种基本类型的记忆:转录非依赖性记忆,其包括短期记忆;以及转录依赖性记忆,其包括长期记忆。

[0006] Gpr12 是一种孤儿 (orphan)GPCR。通过原位杂交分析 Gpr12 表达表明 Gpr12 在小鼠 CNS 中广泛表达,在海马和丘脑中具有最高水平的表达 (Ignatov et al. 2003, J. Neurosci. 23 :907-914)。Gpr12 的内源配体还未知。Gpr12 的种系发生分析表明孤儿受体 Gpr3 和 Gpr6 与 Gpr12 同源性最近。包含三个孤儿 GPCR 的亚组与 GPCR 的 Mcr (黑皮色素样肽) 和 Edg (内皮分化) 家族最密切相关。这表明脂质或肽可能是 Gpr12 的配体。鞘氨醇基磷酸胆碱 (SPC) 在异源表达系统中激活 Gpr12。SPC 促进培养的胚胎皮质神经元分化和成熟 (出处同上)。然而,Gpr12 的内源配体及其在成人 CNS 的体内功能还未知。

[0007] 先前结果示出 Gpr12 通过 G α i 依赖性机制发出信号 (出处同上)。在哺乳动物脑中 cAMP/PKA 途径调节 CREB 活性和长期记忆 (Abel et al., 1997, Cell 88 :615-626)、(Bourtchouladze et al, 1998. Learn Mem. 5 :365-374)、(Baradet et al., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci USA 95 :15020-15025)、(Bourtchouladze et al., 2003, Proc. Natl Acad. Sci USA 100 :10518-10522)。

[0008] 发明概述

[0009] 已经揭示 G-偶联蛋白受体 Gpr12 在介导哺乳动物记忆形成的细胞事件中起重要作用。如本文所述,海马内 Gpr12 介导的 mRNA 运输在哺乳动物情景长期记忆形成中是重要的。已经揭示海马 Gpr12 功能的破坏或抑制增强哺乳动物转录依赖性记忆形成 (如长期记忆形成)。本申请涉及例如通过抑制 Gpr12 基因或基因产物治疗长期记忆缺陷或者认知障碍的方法。

[0010] 本发明提供了调节哺乳动物认知功能的方法。

[0011] 本发明的一个实施方案涉及一种方法,该方法包括给予哺乳动物施用有效量的调节哺乳动物中 Gpr12 活性的药剂。

[0012] 在另一实施方案中,所述哺乳动物是成年哺乳动物。在另一实施方案中所述哺乳动物是人。

[0013] 在另一实施方案中,所述施用导致长期记忆形成调节。在另一实施方案中长期记忆形成被增强。

[0014] 在另一实施方案中,所述方法进一步包括检测长期记忆形成中的调节作用。在另

一实施方案中,所述调节作用的检测是检测对海马依赖性认知任务的调节作用。在另一实施方案中,所述调节作用的检测是检测对杏仁核依赖性认知任务的调节作用。在另一实施方案中,所述调节作用的检测是检测对海马依赖性认知任务和杏仁核依赖性认知任务的调节作用。

[0015] 在特定实施方案中,对 Gpr12 活性的调节包括调节哺乳动物中 Gpr12 蛋白表达。在另外的实施方案中,所述施用导致认知功能增强。

[0016] 在另一实施方案中,所述方法进一步包括在足以导致执行特定认知任务的能力改善的条件下训练所述哺乳动物。在另一实施方案中,相对于在不施用条件下单独训练达到的执行认知任务的能力得到了能力改善。

[0017] 在另一实施方案中,所述训练包含多个训练期。在另一实施方案中,所述训练包含有间隔的训练期。

[0018] 在另一实施方案中,所述药剂在每个训练期之前和 / 或期间施用。

[0019] 在另一实施方案中,所述药剂包含一或多种有效量的 Gpr12 siRNA 分子、有效量的生物学活性 Gpr12 反义片段和 / 或有效量的特异于 Gpr12 蛋白的抗体。

[0020] 本发明的另一方法包括如下步骤:(a) 将感兴趣的药剂导入表达 Gpr12 蛋白的宿主细胞中;和 (b) 确定 Gpr12 功能,其中在 (b) 中确定的 Gpr12 功能与未施用所述药剂的 (a) 宿主细胞中 Gpr12 功能相比的差异确定所述药剂能调节 Gpr12 功能。

[0021] 本发明的另一方法包括如下步骤:(a) 给哺乳动物施用调节 Gpr12 功能的药剂;(b) 在足以在哺乳动物中产生长期记忆形成的条件下训练步骤 (a) 的哺乳动物和相同物种的未施用所述药剂的对照哺乳动物;(c) 评估在步骤 (b) 中训练的哺乳动物中的长期记忆形成情况;和 (d) 对比在步骤 (c) 中评估的哺乳动物中长期记忆形成情况,其中在施用所述药剂的哺乳动物中评估的长期记忆形成相对于在对照哺乳动物中评估的长期记忆形成的差异确定所述药剂能调节长期记忆形成。

[0022] 在一特定实施方案中,所述哺乳动物是成年哺乳动物。在另一特定实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0023] 在另一实施方案中,所述长期记忆形成是海马依赖性长期记忆形成。在另一实施方案中,所述长期记忆形成是杏仁核依赖性长期记忆形成。在另一实施方案中,所述长期记忆形成是海马依赖性和杏仁核依赖性记忆形成。

[0024] 在另一实施方案中,对 Gpr 12 活性的调节包括调节哺乳动物中 Gpr12 蛋白表达。

[0025] 在另一实施方案中,所述训练包含多个训练期。在另一实施方案中,所述训练包含有间隔的训练期。

[0026] 在又一实施方案中,所述药剂在每个训练期之前和 / 或期间施用。

[0027] 在另一实施方案中,所述药剂包含一或多种有效量的 Gpr 12 siRNA 分子、有效量的生物学活性 Gpr12 反义片段和 / 或有效量的特异于 Gpr12 蛋白的抗体。

[0028] 参考下文详细描述和附图可以更加明了本发明的这些及其它方面。应理解在不偏离本发明基本精神和范围的前提下可以对本文揭示的特定实施方案进行各种改变、更改和替代。此外,应进一步理解附图只是举例及以图示表述本发明举例的实施方案,其它未举例的实施方案也包含在本发明范围内。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1a 是示出实验数目对情景记忆形成的作用的柱状图。用增多数目的成对 CS-US 训练小鼠,4 天后评估情景记忆。

[0031] 图 1b 是示出痕迹间隔对于时间记忆形成的作用的柱状图。使用与延迟条件反射 (delay conditioning) 相比逐渐增加的长痕迹间隔和音调 (tone) 记忆在痕迹恐惧条件反射中训练小鼠。

[0032] 图 2a 是通过实时 PCR 测量的小鼠 CNS 中 Gpr12 mRNA 表达水平表。

[0033] 图 2b 是通过实时 PCR 测量的小鼠 CNS 中 Gpr12 mRNA 表达水平表。

[0034] 图 3 是 Neuro2A 细胞中在 siRNA 处理后 24 小时的 Gpr12 mRNA 水平的柱状图。

[0035] 图 4a 是小鼠海马中 Gpr12 siRNA 对情景记忆的作用的柱状图。

[0036] 图 4b 是小鼠杏仁核中 Gpr12 siRNA 对情景记忆的作用的柱状图。

[0037] 图 5 是小鼠海马中 Gpr12 siRNA 对痕迹恐惧记忆的作用的柱状图。

[0038] 图 6 是被灌注海马中非靶向 siRNA (A) 与 Gpr12 siRNA (B) 的 Nissl 染色图。图中示出插管插入部位背侧和腹侧的海马切片。

[0039] 图 7 是在 Gpr12 siRNA 处理后 2 天和 3 天的海马 Gpr12 mRNA 水平的柱状图。

[0040] 图 8a 示出 Gpr12^{-/-}、Gpr12^{+/-} 小鼠和 WT 对照同窝出生小鼠中 Gpr12、Creb1 和 Grin1 mRNA 水平的 qPCR 分析。在 Gpr12^{+/-} 小鼠中 Gpr12 mRNA 降低至对照的 51%, 在纯合 KO 小鼠中不可检测到。相反, Creb1 和 Grin1 mRNA 不受影响。

[0041] 图 8b 示出对 Gpr12^{+/-} 和 WT 海马形态学 (Cresyl violet 染色) 的大体分析。在 Gpr⁺ 小鼠中观测到无显著异常。

[0042] 图 9a 示出 Gpr12^{+/-} 小鼠 (n = 9) 和 WT 对照 (n = 8) 在开放场所的一般运动和试探性活动以及特定水平活动 (走动)。

[0043] 图 9b 示出 Gpr12^{+/-} 小鼠 (n = 9) 和 WT 对照 (n = 8) 在开放场所的一般运动和试探性活动以及特定垂直活动 (用后腿站起)。

[0044] 图 10 示出 WT 小鼠 (n = 19) 中作为目标识别记忆的长期保持的 NOR 记忆依赖于训练时间。

[0045] 图 11a 示出在 Gpr12^{+/-} 小鼠 (n = 15) 和 WT 对照 (n = 165) 中 NOR 记忆的 24 小时保持。

[0046] 图 11b 示出在 Gpr12^{+/-} 小鼠和 WT 对照中检测期间的检测时间。

[0047] 图 12a 示出在 Gpr12^{+/-} 小鼠 (n = 6) 和 WT 对照 (n = 8) 中 NOR 记忆的 3 小时保持。

[0048] 图 12b 示出在检测期间的检测时间。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明涉及这样的发现, 即抑制 Gpr12 可促进长期记忆形成。

[0051] 转录非依赖性记忆包括各种“记忆阶段 (memory phase)”, 如短期记忆、中期记忆和 (在飞蝇中) 抗麻醉记忆 (anesthesia-resistant memory)。这些形式的共同之处是 RNA 转录的药理学抑制剂不破坏这些记忆。转录依赖性记忆通常称作长期记忆且 RNA 合成的抑制剂阻断其显现。

[0052] 这种特定的实验性经历的记忆形成可以两种一般形式存在: 转录非依赖性形式和转录依赖性形式。前者包括各种“记忆阶段”, 如短期记忆和中期记忆。这些形式的共同之

处是 RNA 转录的药理学抑制剂不破坏这些记忆。后一形式通常被称作长期记忆且 RNA 合成的抑制剂阻断其显现。

[0053] 本领域已经发现 G-偶联蛋白受体 Gpr12 在介导哺乳动物记忆形成的分子事件中起重要作用。如本文所述,已经发现海马内 Gpr12-介导的 mRNA 运输在哺乳动物情景长期记忆形成中是重要的。本领域已经发现海马 Gpr12 功能的破坏或抑制增强哺乳动物转录依赖性记忆形成(如长期记忆形成)。本发明涉及通过抑制 Gpr12 基因或基因产物治疗长期记忆缺陷或者认知障碍的方法。

[0054] 除非另外定义,本文所用技术和科学术语均具有本发明所属领域技术人员通常理解的相同含义。

[0055] 本领域技术人员意识到有许多方法和材料与本文所述那些方法和材料相似及相当,其可用于实践本发明。事实上,本发明非限于本文所述方法和材料。针对本发明,定义了如下术语。

[0056] 定义

[0057] 如本文所用,术语“动物”包括哺乳动物以及其它动物,脊椎动物和无脊椎动物(例如鸟类、鱼类、爬行类、昆虫(例如果蝇)、海螺)。如本文所用,术语“哺乳动物”是指任何脊椎动物,包括单孔类、有袋动物和有胎盘动物,为其幼仔哺乳以及分娩出活的幼仔(真哺乳亚纲(eutherian)或者有胎盘哺乳动物)或者是卵生动物(后兽亚纲(metatharian)或者非胎盘哺乳动物)。哺乳动物的例子包括人和其它灵长类动物(例如猴子、黑猩猩)、啮齿类动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠)和反刍动物(例如牛、猪、马)。优选所述哺乳动物是人。

[0058] 如本文所用,“对照动物”或者“正常动物”是与在一定条件下训练的动物相同物种及其它方面相当(例如相似年龄、性别)的动物,所述条件是足以在所述动物中诱导转录依赖性记忆形成的条件。

[0059] “Gpr12 功能”是指 Gpr12 的生物学活性。生物学活性是指生物学功能或作用。

[0060] 术语“Gpr12 抑制剂或者 GPR12 抑制剂化合物或制剂”是指这样的化合物,其能作为 Gpr12 多肽的拮抗剂且能直接或间接抑制 Gpr12 多肽的功能。这种化合物包括特异于 Gpr12 基因的干扰 RNA(siRNA)、特异于 Gpr12 基因的反义核苷酸、特异于 Gpr12 蛋白的抗体以及小分子,包括肽。

[0061] 小鼠和人的 Gpr12 基因和蛋白质序列在表 1 中示出。

[0062]

表 1: GRP 12 基因和蛋白质

名称	登录号	SEQ ID NO:	序列
小鼠 Gpr12 蛋白	NP_001010941	1	mnedpkvnls glprdcidag apenisaavp sggsvaesep elvvpwdiv lcssgtlicc enavvliif hpslrapmf lligslalad llaglgliin fvfallqse atklvtigli vasfsasvcs llaitvdryl slyyaltys ertvtftvym lvmlwgtstic lgllpvmgwn clrdestcsv vrpltknaa ilsiflflmf almlqlyiqi ckivmrhahq ialqhhflat shyvtrkgv stlalilgtf aacwmpftly sliadytys iytyatllpa tynsiinpvi yafrnqeiqk alcllicgci psslsqrars psdv
小鼠变体 1 mRNA	NM_001010941	2	aagggaacaa taatttgtag accggccaac tgcfaatctaa gagaggaggt cgcttgctgt tgtaagtctc ctccgccagc cctaacctgc ttaccccga ttctctctgt tcatcccga aacccggccg tttacaattc tttaggggaa agcataagaa gccgagcccc agggccaagg gcgcctcggg gaagccacag gatcaaaagta ggtcgccaga ctctccggcc gttcagagtgg gtcttcgcat gactgttgca ggcggcgctc caccgtggcg ggctcccgcc cctcacgcag ctgcgacctg cggggggcgg cgcagcctcg tggggttccc gcgatgccc gcccgggcggg gagcgggag ggcggagagc cgggcggcag caccgagct cacctgcgc gggcggccacc acggacgtgc cacgcgggtg gcccgagcta ttcggcagca ctgaaggagc caccctcgg ccaggcgtg ccaaggacag gggttaaaat gaacgaagac ccgaaggta atttaagcgg gctgcctcgg gactgtatag atgcgggtgc tccagagaac atctcagccc ctgtcccctc ccagggctct gttgcggagt cagaacccga gctcgtgtc aaccctggg acattgtctt gtgcagctca ggaaccctca tctgctgtga aaatgccgtt gtggtcctta tcatctcca cagccccagc ctgcgagccc ccatgttctt actgatagc agcctggctc ttgcagacct gctggctggc ctgggactca tcatcaattt tgtttttgcg tacctgcttc agtcagaagc caccaagctg gtcaccatcg gactcattgt cgcctctttc tctgcctctg tctgcagttt gctggctatt actgtggacc gctacctctc gctatattac gccctgacct accactccga gaggaccgtc acctttacct atgtcatgct agtgatgctc tggggaaacct ccatctgcct ggggctgctg cccgtcatgg gctggaactg cttgagggac gagtccacct gcagcgtggt

[0063]

名称	登录号	SEQ ID NO:	序列
小鼠变体 2 mRNA	NM_008151	3	cagacctc actaagaaca acgctgccat cctctccatc tccttccctc tcatgtttgc tctgatgctt cagctctaca tccagatttg taagatttg atgaggcagc cccatcagat agccctgcag caccacttcc tggctacatc gcactatgtg actaccogga aaggggtctc gaccctggct ctcatcctag ggacccttgc tgcctgctgg atgccttca cctctattc ctgatcgcc gattacacct acccttgat ctatacctat gccaccctcc tgcccgccac ctacaattcc atcatcaacc ctgtcattta cgtttcaga aaccaagaga tccagaaagc cctctgcctc atttgctgtg ggtgcacccc ttcctcctgt tctcagagag ctcggtctcc cagcgatgtg tagcagcctt ctccctcatag gacgtgctt ctaccaagcg ctcccacctc ccagggcggc cagtgatttc ctccctttaa ttctttgac tggatctcac aagcagaagc aatgacatct tttagacacg tattgacagt ggaaatcacc ttaccagtgt tttttaaaaa aaaaaaaaa caaaactcga cttctcggct cagcattctg ttgtttggtt tgggagttag gatttgtttg tttgtttgct tgtttgtttg tttggagggt gtaatgggac ctcatgtggc catgaaatta taaaaagtc tggggatttt taaacctagg cttgaaaaata aatcaaaagt ttaaaggaaa ctggagaagg aaatactttt tctgaaggaa atactttttt tttttaatc aaggtagatc ttccattctg tatgtatcta acaggatagg agcttttgcca tataacccaa atagtttata taattacatt tggaaaggct tgtgtttatt tctaggaatt cagtaataag tgaccagtaa cagaggcgcg aactcctttc tttcctttca gcagtagtga ctgctcttaa gaatcacttt gcagttctc tgtgttacag tttggtatgc atggttacct gtggtagtca gatcactaat tgcaatattg ccatgtttaa cccagaatta aaagagtcac tttttcttca atacagtttt tgaatatcc tttccaaagt gactcatgaa aaaaatgttt ccaattacat atgagatagc actgggttaga tttgtcattg tgatttttaa aactctagac tgggtggtttt cagaaaaaaa aagagaaaaa attaacagca tctattgaaa gaagatttta tttattttta atatatctctg agagaataaa tgggtgtgata ctattaagaa atatacaaac atgacttttc aaatctctaa aaaaaaaaa aaaaa
			cggcatggga gatgcaatta gccaatgtcg gttttcagcg ttttggcaag tgtgcgagtg tgcattgtcc gcctcgggag tcctgatccg tgtttccctc agagacaaa agcatttcgg

[0064]

名称	登记号	SEQ ID NO:	序列
			ttgcagact tagcttttgt ttttaattcc tgaagctcgt ggcattttga cactgatagc tgagcccagg gttgtctgtc tttctctgtg tgttttgcac gatcttggat tggcaccccta ctgtacccaa acattaaaaa gcctgtcttt ccglttgaaga ggacaggggt taaaatgaac gaagacccga aggtcaattt aagcgggctg cctcgggact gtatagatgc cgggtgctcca gagaacatct cagccgctgt cccctcccag ggctctgttg cggagtcaga acccgagctc gttgtcaacc cctgggacat tgtcttctgc agctcaggaa cccctcatctg ctgtgaaaaa gccgttctgg tccctatcat ctccacacgc cccagcctgc gagcccccat gttcctactg ataggcagcc tggctcttgc agacctgctg gctggcctgg gactcatcat caattttgtt tttgcgtacc tgccttcagtc agaagccacc aagctgggtca ccatcggact cattgtcgcc tctttctctg cctctgtctg cagtttctg gctattactg tggaccgcta cctctcgcta tattaagccc tgacgtacca ctccgagagg accgtcacct ttacctatgt catgctagtg atgctctggg gaacctccat ctgctggggg ctgctgcccg tcatgggctg gaactgcttg agggacgagt ccacctgcag cgtggtcaga cctctcacta agaacaacgc tggcatcctc tccatctcct tcccttctcat gtttctctg atgcttcagc tctacatcca gatttgaag attgtgatga ggcacgcccc tcagatagcc ctgcagcacc acttccctggc tacatcgcac tatgtgacta cccggaaaagg ggtctcgacc ctggctctca tccctaggac ctttgcctgcc tgctggatgc ctttcacct ctattccttg atcggcgtt acacctaccc ttcgatctat acctatgcca cctcctgccc cgccacctac aattcccatca tcaacctgt catttacgct ttcagaaacc aagagatcca gaaagccctc tgcctcattt gctgtgggtg catcccttcc tcgctgtctc agagagctcg gctctcccagc gatgtgtagc agccttctcc tcataggacg ctgcctctac caagcgtcc cacctcccag ggcggccagt gatttccctc cttaaattct ttgcactgga tctcaaacg agaagcaatg acatcttcta gacacgtatt gacagtggaa atcatcttac cagtgttttt taaaaaaaaa acaaaacaaa actcgacttc tcggctcagc attctgtgtg ttggtttggg agttaggatt tgtttgtttg tttgtctgtt tgtttgtttg gaggtgttaa tgggacctca tgtggccatg aaattatata aaagtctcgg gattttttaa cctaggcttg aaaataaatc aaagttttaa aggaaactgg agaagaaaat actttttctg

[0065]

名称	登录号	SEQ ID NO:	序列
小鼠 Gpr12 蛋白	NP_032177	4	<p>aaggaaatac tttttttttt ttaatcaagg tagatcttcc attctgtatg tatctaacag gataggagct ttgccatata accaaaatag ttatataat tacatttggg agggcttgtg tttatttcta ggaattcagt aataagtgc cagtaacaga ggcggaact cctttctttc ctttcagcag tagtgactgc tcttaagaat cactttgcag tttctctgtg ttacagtttg gtatgcatgg ttacctgtgg tagtcagatc actaattgca atattgccat gttaaaccca gaattaaaag agtcattttt tcttcaatac agttttttaa atatacctttc caaagtgagt catgaaaaaa atgtttccaa ttacatatga gatagcactg gttagatttg tcattgtgat ttttaaaact ctagactggt ggttttcaga aaacaaaaa gaaaatatta acagcatcta ttgaaagaag attttattta tttttaatat attctgagag aataaatggt gtgatactat taagaaatat acaaacatga cttttcaaat ctctaaaaa aaaaaaaaa a</p> <p>mnedpkvnls glprdcidag apenisaavp sqgsvaesep elvnpwdiv lcsgstlicc enavvvlif hpslrapmf lligslalad llaglgliin fvfallqse atklvtigli vasfsasvcs llaitvdryl slyyaltyhs ertvtftvym lvmlwgt sic lgllpvmgwn clrdestcvs vrpltknaa ilsiflflmf almlqlyiqi ckivmrhahq.ialqhhflat shyvttrkgv stlalilgtf aacwmpftly sliadytyps iytyatllpa tynsiinpvi yafnrqeiqk alcliccgc i psslsqrars psdv</p>
人 Gpr12 mRNA	NM_005288	5	<p>atgaatgaag acctgaaggt caatttaagc gggctgcctc gggattatttt agatgcccgt gctgaggaga acatctcggc tgctgtctcc tccccgggttc ctgccgtaga gccagagcct gagctcgtag tcaaccctcg ggacattgtc ttgtgtacct cgggaaccct catctcctgt gaaaatgcca ttgtggctct tatcatcttc cacaaaccca gcctgcgagc acccatgttc ctgctaataag gcagcctggc tcttgacagc ctgctggccg gcattggact catccaat tttgtttttg cctacctgct tcagtcagaa gccaccaagc tggtcacgat cggcctcatt gtgcctcttt tctctgcctc tgtctgcagc ttgctggcta tcaactgttg cgcctacctc tcaactgtact acgctctgac gtaccattcg gagaggacgg tcacggtttac ctatgtcatg ctctcatgc tctgggggac ctccatctgc ctggggctgc tgccccctcat gggctggaac tgcctccgag acgagttccac ctgcagcgtg gtcagaccgc tcaccaagaa caacgcggcc</p>

[0066]

名称	登录号	SEQ ID NO:	序列
人 Gpr12 蛋白	NP_005279	6	atcctctcgg tgtccttccct cttcatgttt gcgctcatgc ttcagctcta catccagatc tgtaagattg tgatgaggca cgcccatcag atagccctgc agcaccactt cctggcccaag tcgcactatg tgaccacccg gaaaggggtc tccaccctgg ctatcatcct ggggacgttt gctgcttgct ggatgccttt caccctctat tccttgatag cggattacac ctaccctccc atctatacct acgccaccct cctgcccgcc acctacaatt ccatcatcaa ccctgtcata tatgctttca gaaaccaaga gatccagaaa gcgctctgtc tcatttgctg cggctgcatac ccgtccagtc tcgcccagag agcgcgctcg cccagtgatg tgtag mnedlkvnls glprdyldaa aenisaavs srpvavep elvnpwdiiv lctsgtliisc enaivvliif hnpslrapmf lligslalad llagigliitn fvfayllqse atklvtigli vasfsasvcs llaitvdryl slyyaltys ertvtftym lvmwgtstic lgllpvmgwn clrdestcsv vrpltknnaa ilsvsflmf almlglyiqi ckivmrhahq ialqhhflat shyvttrkgv stlaiilgtf aacwmpftly sliadytys iytyatlipa tynsiinpvi yafrnqeiqk alclliccgci psslaqrars psdv

[0067] 在各个物种中,长期记忆 (LTM) 由两个主要生物学性质定义。首先,长期记忆的形成需要新蛋白质合成。其次,其包含 cAMP- 应答性转录且由 cAMP- 应答元件结合蛋白 (CREB)

家族转录因子介导。

[0068] “认知障碍、缺陷或病症”包括年龄相关记忆缺陷,神经变性疾病(例如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病(舞蹈病)、其它老年性痴呆),精神疾病(例如抑郁症、精神分裂症、孤独症、注意力不足症),创伤依赖性功能丧失(例如脑血管疾病(例如卒中、缺血)、脑肿瘤、头或脑损伤),遗传缺陷(例如鲁宾斯坦-泰比综合征、唐氏综合征、Angelman 综合征、神经纤维瘤、Coffin-Lowry 综合征、Rett 综合征、强直性肌营养不良、脆性 X 染色体综合症(例如脆性 X-1 染色体综合症、脆性 X-2 染色体综合症)、William's 综合征)以及学习障碍。

[0069] 本领域已知且可易于获得正规的认知训练方案。见例如 Kami, A. and Sagi, D., "Where practice makes perfect in text discrimination: evidence for primary visual cortex plasticity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4966-4970 (1991); Kami, A. and Sagi, D., "The time course of learning a visual skill", Nature, 365:250-252 (1993); Kramer, A. F. et al., "Task coordination and aging: explorations of executive control processes in the task switching paradigm", Acta Psychol. (Amst), 101:339-378 (1999); Kramer, A. F. et al., "Training for executive control: Task coordination strategies and aging", In Aging and Skilled Performance: Advances In Theory and Applications, W. Rogers et al, eds. (Hillsdale, NJ.: Erlbaum) (1999); Rider, R. A. and Abdulahad, D. T., "Effects of massed versus distributed practice on gross and fine motor proficiency of educable mentally handicapped adolescents", Percept. Mot. Skills, 73:219-224 (1991); Willis, S. L. and Schaie, K. W., "Training the elderly on the ability factors of spatial orientation and inductive reasoning", Psychol. Aging, 1:239-247 (1986); Willis, S. L. and Nesselroade, C. S., "Long-term effects of fluid ability training in old-old age", Develop. Psychol, 26:905-910 (1990); Wek, S. R. and Husak, W. S., "Distributed and massed practice effects on motor performance and learning of autistic children", Percept. Mot. Skills, 68:107-113 (1989); Verhaegen, P. et al., "Improving memory performance in the aged through mnemonic training: a meta-analytic study", Psychol. Aging, 7:242-251 (1992); Verhaeghen, P. and Salthouse, T. A., "Meta-analyses of age-cognition relations in adulthood: estimates of linear and nonlinear age effects and structural models", Psychol Bull, 122:231-249 (1997); Dean, C. M. et al., "Task-related circuit training improves performance of locomotor tasks in chronic stroke: a randomized, controlled pilot trial", Arch. Phys. Med, Rehabil., 81:409-417 (2000); Greener, J. et al., "Speech and language therapy for aphasia following stroke", Cochrane Database Syst. Rev., CD000425 (2000); Hummelsheim, H. and Eickhof, C., "Repetitive sensorimotor training for arm and hand in a patient with locked-in syndrome", Scand. J. Rehabil. Med., 31:250-256 (1999); Johansson, B. B., "Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture", Stroke, 31:223-230 (2000); Ko Ko, C., "Effectiveness of rehabilitation for

multiple sclerosis ”, Clin. Rehabil., 13(Suppl. 1) :33-41(1999) ;Lange. G. et al, ” Organizational strategy influence on visual memory performance after stroke :cortical/subcortical and left/right hemisphere contrasts ”, Arch. Phys. Med. Rehabil., 81 :89-94(2000) ;Liepert, J. et al, ” Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans ”, Stroke, 31 :1210-1216(2000) ;Lotery, A. J. et al, ” Correctable visual impairment in stroke rehabilitation patients ”, Age Ageing, 29 :221-222(2000) ;Majid, M. J. et al, ” Cognitive rehabilitation for memory deficits following stroke ” (Cochrane review), Cochrane Database Syst. Rev., CD002293(2000) ;Merzenich, M. et al, ” Cortical plasticity underlying perceptual, motor, and cognitive skill development :implications for neurorehabilitation ”, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 61 :1-8(1996) ;Merzenich, M. M. et al, ” Temporal processing deficits of language-learning impaired children ameliorated by training ”, Science, 271 :77-81(1996) ;Murphy, E., ” Stroke rehabilitation ”, J. R. Coll. Physicians Lond., 33 :466-468(1999) ;Nagarajan, S. S. et al, ” Speech modifications algorithms used for training language learning-impaired children ”, IEEE Trans. Rehabil. Eng., 6 :257-268. (1998) ;Oddone, E. et al, ” Quality Enhancement Research Initiative in stroke :prevention, treatment, and rehabilitation ”, Med. Care 38 :1192-1104(2000) ;Rice-Oxley, M. and Turner-Stokes, L., ” Effectiveness of brain injury rehabilitation ”, Clin. Rehabil., 13(Suppl 1) :7-24(1999) ;Tallal, P. et al, ” Language learning impairments :integrating basic science, technology, and remediation ”, Exp. Brain Res., 123 :210-219(1998) ;Tallal, P. et al, ” Language comprehension in language-learning impaired children improved with acoustically modified speech ”, Science, 271 :81-84(1996) ;Wingfield. A. et al, ” Regaining lost time :adult aging and the effect of time restoration on recall of time-compressed speech ”. Psychol. Aging, 14 :380-389(1999), 所述文献以其全部内容并入本文作参考。

[0070] 训练可以包含一或多个训练期,且是适于使得执行感兴趣的认知任务的能力改善的训练。例如,如果希望语言习得改善,则训练针对语言习得进行。如果希望学习乐器的能力改善,则针对学习乐器的能力进行训练。如果希望特定运动技能改善,则针对该特定运动技能习得进行训练。感兴趣的特定认知任务与适当训练相匹配。

[0071] “多个训练期”是指两或更多个训练期。Gpr12 抑制剂可以在一或多个训练期之前、期间或之后施用。在特定的实施方案中,Gpr12 抑制剂在每个训练期之前和期间施用。“训练”是指认知训练。

[0072] “调节”是指基因的表达、或者编码一或多种蛋白质或蛋白质亚基的 RNA 分子或等价 RNA 分子的水平或者一或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性被上调或下调,由此所述表达、水平或活性高于或低于在无所述调节剂的条件下的观测结果。例如,术语“调节”可以是指“抑制”,但是术语“调节”的用法非限于该定义。

[0073] “抑制”、“下调”或者“降低”是指基因的表达、或者编码一或多种蛋白质或蛋白质亚基的 RNA 分子或等价 RNA 分子的水平或者一或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性被降低至

低于在无本发明核酸分子（例如 siNA）的条件下的观测结果。在一个实施方案中，siNA 分子的抑制、下调或者降低低于在存在无活性或弱化 siRNA 分子条件下的观测水平。在另一实施方案中，siNA 分子的抑制、下调或者降低低于在存在例如具有混杂的序列或者具有错配的 siNA 分子条件下的观测水平。在另一实施方案中，siRNA 分子的抑制、下调或者降低是指靶 RNA 分子或者等价 RNA 分子的表达水平与无所述 siRNA 分子的条件下的水平相比降低至少 20%、30%、40%、50%、60% 或者 70%。

[0074] “增强”是指相对于正常的生物化学或者生理学作用或效果加强、增加、改善或者更大或更好的能力。例如，增强长期记忆形成是指相对于动物的正常长期记忆形成加强或增加动物的长期记忆形成的能力。结果，长期记忆习得更快速或更好地保留。增强执行认知任务能力是指相对于动物正常的认知任务执行能力 (performance) 加强或改善动物的特定认知任务执行能力的的能力。

[0075] 术语“海马依赖性认知任务”是指与脑的海马区相关的认知任务。

[0076] 术语“杏仁核依赖性认知任务”是指与脑的杏仁核区相关的认知任务。

[0077] 术语“靶基因”或者“基因”是指编码 RNA 的核酸，例如包括但不限于编码多肽的结构基因的核酸序列。靶基因可以是衍生自细胞的基因或内源基因。“靶核酸”是指其表达或活性被调节的任何核酸序列。所述靶核酸可以是 DNA 或 RNA。

[0078] “同源序列”是指由一或多个多核苷酸序列如基因、基因转录物和 / 或非编码多核苷酸共有的核苷酸序列。例如，同源序列可以是由编码相关但不同的蛋白质的两或多个基因共有的核苷酸序列，例如基因家族不同成员、不同蛋白质表位、不同蛋白质同种型或者完全趋异 (divergent) 的基因，如细胞因子及其相应受体。同源序列可以是由两或多个非编码多核苷酸共有的核苷酸序列，如非编码 DNA 或 RNA、调节序列、内含子以及转录控制或调节位点。同源序列也可包含由一个以上多核苷酸序列共有的保守序列区域。同源非必须是完全同源（例如 100%），本发明也包含部分同源序列（例如 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80% 等）。

[0079] “保守序列区域”是指多核苷酸中一或多个区域的核苷酸序列在世代之间或者从一个生物学系统、对象或生物体至另一个生物学系统、对象或生物体无明显变化。所述多核苷酸可包含编码和非编码 DNA 和 RNA 二者。

[0080] “有义区”是指与 siNA 分子的反义区具有互补性的 siNA 分子的核苷酸序列。此外，siNA 分子的反义区可包含与靶核酸序列具有同源性的核酸序列。

[0081] “反义区”是指与靶核酸序列具有互补性的 siNA 分子的核苷酸序列。此外，siNA 分子的反义区可任选包含与 siNA 分子的反义区具有互补性的核酸序列。

[0082] “互补性”是指核酸可与另一核酸序列通过传统的 Watson-Crick 或者其它非传统类型形成氢键。关于本发明的核酸分子，核酸分子与其互补序列的结合自由能足以使得所述核酸的相关功能例如 RNAi 活性进行下去。核酸分子的结合自由能的确定为本领域熟知（见例如 Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp. 123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83 :9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109 :3783-3785）。互补性百分比表示核酸分子中可以与另一核酸序列形成氢键（例如 Watson-Crick 碱基配对）的连续残基的百分比（例如第一个寡核苷酸中共 10 个核苷酸

中的 5、6、7、8、9 或 10 个核苷酸与具有 10 个核苷酸的第二个核酸序列碱基配对分别代表 50%、60%、70%、80%、90%、和 100% 互补性)。“完全互补”是指核酸序列的所有连续残基与另一个核酸序列中相同数目的连续残基形成氢键。

[0083] “RNA”是指包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”是指在 β -D- 呋喃核糖部分的 2' 位置具有羟基的核苷酸。该术语包括双链 RNA、单链 RNA、分离的 RNA 如部分纯化的 RNA、基本纯的 RNA、合成 RNA、重组产生的 RNA, 以及通过添加、缺失、取代和 / 或改变一或多个核苷酸而与天然发生的 RNA 不同的改变的 RNA。这种改变可包括如在 siRNA 末端或者例如在 RNA 的一或多个核苷酸内部添加非核苷酸材料。本发明的 RNA 分子中的核苷酸也可以包含非标准核苷酸, 如非天然发生的核苷酸或者化学合成的核苷酸或者脱氧核苷酸。这些改变的 RNA 可以被称作类似物或天然发生的 RNA 的类似物。

[0084] 如本文所用, 术语“硫代磷酸酯”是指 RNA 分子中的核苷酸间的键, 其中两个核苷酸之间的至少一个键包含硫原子。因此, 术语硫代磷酸酯是指硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯核苷酸间键二者。

[0085] 如本文所用, 术语“磷酸酯键”是指 RNA 分子中核苷酸间键, 其中两个核苷酸之间至少一个键包含乙酰基或者保护的乙酰基。见例如 Sheehan et al., 2003 Nucleic Acids Research 31, 4109-4118 或者美国专利出版物 No. 2006/0247194 所述。

[0086] 如本文所用, 术语“硫代磷酸酯键”是指包含至少一个核苷酸间键的 RNA 分子, 所述键包含乙酰基或者保护的乙酰基和硫原子。见例如 Sheehan et al., 2003 Nucleic Acids Research 31, 4109-4118 或者美国专利出版物 No. 2006/0247194 所述。

[0087] 如本文所用, “治疗”是指改善不良长期记忆形成的临床症状。改善临床症状包括例如与预处理水平或者无长期记忆形成缺陷的个体相比增加或改善长期记忆, 增加的执行认知任务的能力。

[0088] 如本文所用, 术语“预防”是指阻止不良长期记忆形成的临床症状出现。

[0089] 如本文所用, 术语“治疗效力”是指药物或候选药物在治疗长期记忆形成缺陷、改善长期记忆形成、改善执行认知任务能力中的治疗作用。所述治疗效力可以通过监测患者执行认知任务的能力而测量。

[0090] RNA 分子

[0091] 合适的 siRNA 可以通过例如合成或者通过在细胞中表达而产生。在一个实施方案中, 编码 siRNA 分子的反义链的 DNA 序列可以通过 PCR 产生。在另一实施方案中, 将 siRNA 编码 DNA 克隆进载体如质粒或病毒载体中以便于转移进哺乳动物中。在另一实施方案中, 可以使用化学或者酶学手段合成 siRNA 分子。

[0092] 在本发明的一个实施方案中, 本发明 siRNA 分子的每个序列的长度单独地为大约 18 到大约 30 个核苷酸, 在特定的实施方案中其长度是大约 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或者 30 个核苷酸。在一个实施方案中, 所述 siRNA 分子含有大约 19-23 个碱基对, 优选大约 21 个碱基对。在另一实施方案中, 所述 siRNA 分子含有大约 24-28 个碱基对, 优选大约 26 个碱基对。各个 siRNA 分子可以是单链形式以及成对的双链形式 (“有义”和 “反义”) 且可以包含二级结构如发夹环。各个 siRNA 分子也可以作为前体分子输送, 其随后被改变产生活性分子。举例的单链形式的 siRNA 分子包括抗 DNA 序列非转录区 (例如启动子区) 的单链反义 siRNA。在再一个实施方案中, 包含发夹或者环形结构的本发明的 siRNA

分子的长度为大约 35 到大约 55 (例如大约 35、40、45、50 或 55) 个核苷酸, 或者长度为大约 38 到大约 44 (例如大约 38、39、40、41、42、43 或 44) 个核苷酸, 且包含大约 16 到大约 22 (例如大约 16、17、18、19、20、21 或 22) 个碱基对。

[0093] 所述 siRNA 分子可包含这样的核苷酸片段, 其是编码天然小鼠或人 Gpr12 蛋白质序列的 DNA 序列的有义链或反义链。优选所述小鼠或人 Gpr12 蛋白质序列包含表 1 所示那些序列, 选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :6。本发明的 siRNA 分子可以是如表 1 所示选自 SEQ IDNO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5 的天然小鼠或人 Gpr12mRNA 的 mRNA 序列的有义链的核苷酸片段。本发明的 siRNA 分子可以是与如表 1 所示选自 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5 的天然小鼠或人 Gpr12 mRNA 的 mRNA 序列反义的序列。

[0094] 下文讨论了目前已知由短干扰 RNA 介导的 RNA 干扰的机制, 其不意味着是限制性的及承认是现有技术。化学修饰的短干扰核酸具有与 siRNA 分子相似或改善的介导 RNAi 的能力且预期具有改善的体内稳定性和活性。因此。这个讨论非仅限于 siRNA, 也可以用于 siNA。“改善的介导 RNAi 的能力”或者“改善的 RNAi 活性”是指包括在体外和 / 或在体内测量的 RNAi 活性, 其中 RNAi 活性是 siNA 介导 RNAi 的能力以及本发明 siNA 的稳定性二者的反映。

[0095] RNA 干扰是指由短干扰 RNA (siRNA) 介导的动物中序列特异性转录后基因沉默过程 (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物中的相应过程通常被称作转录后基因沉默或者 RNA 沉默, 且在真菌中也被称作压抑 (quelling)。转录后基因沉默过程被认为是进化保守的细胞防御机制, 用于阻止由不同区系 (flora) 和门 (phyla) 共有的外源基因表达 (Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。这种阻止外源基因表达的保护机制也许已经进化应答衍生自病毒感染的双链 RNA (dsRNA) 的产生或者转座子元件通过特异性破坏同源单链 RNA 或者病毒基因组 RNA 的细胞应答向宿主基因组的随机整合。细胞中 dsRNA 的存在通过目前未完全鉴定的机制触发 RNAi 应答。这个机制看起来与干扰素应答不同, 所述干扰素应答得自蛋白激酶 PKR 和 2', 5' - 寡腺苷酸合成酶的 dsRNA- 介导的活化, 导致核糖核酸酶 L 对 mRNA 的非特异性裂解。

[0096] 细胞中长 dsRNA 的存在刺激称作 Dicer 的核糖核酸酶 III 的活性。Dicer 参与 dsRNA 加工为 dsRNA 短片段, 称作短干扰 RNA (siRNA) (Berstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。衍生自 Dicer 活性的短干扰 RNA 的长度典型为大约 21 至大约 23 个核苷酸, 且包含大约 19 个碱基对双链体。Dicer 也参与 21- 和 22- 个核苷酸的小时间 RNA (stRNA) 从参与翻译控制的保守结构的前体 RNA 中切除 (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi 应答的特征还在于通常称作 RNA 诱导性沉默复合物 (RISC) 的含有 siRNA 的核酸内切酶复合物, 其介导具有与所述 siRNA 同源的序列的单链 RNA 裂解。靶 RNA 的裂解在与 siRNA 双链体的引导序列互补的区域的中间发生 (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。此外, RNA 干扰也可包含小 RNA (例如微小 RNA 或 mRNA) 介导的基因沉默, 可能是通过调节染色质结构的细胞机制且从而阻止靶基因序列转录而介导 (见例如 Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237)。

[0097] 已经在许多系统中研究了 RNAi。Fire et al., 1998, Nature, 391, 806 首先在线虫 (*C. elegans*) 中观测 RNAi。Wianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70 描述了在小

鼠胚胎中由 dsRNA 介导的 RNAi。Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293 描述了在用 dsRNA 转染的果蝇细胞中的 RNAi。Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494 描述了通过在培养的哺乳动物细胞中导入合成的 21 个核苷酸 RNA 双链体诱导的 RNAi, 所述哺乳动物细胞包括人胚胎肾细胞和 HeLa 细胞。近来在果蝇胚胎裂解产物中进行的研究揭示了介导有效 RNAi 活性必需的 siRNA 长度、结构、化学成分以及序列的某些必要条件。这些研究已经示出 21 个核苷酸的 siRNA 双链体当含有两个 2'-核苷酸 3'-末端核苷酸突出端时是最具活性的。此外, siRNA 的一或两个链由 2'-脱氧核苷酸或者 2'-O-甲基核苷酸的取代会消除 RNAi 活性, 而 siRNA 的 3'-末端核苷酸由脱氧核苷酸取代是容许的。siRNA 双链体中心的错配序列也示出消除 RNAi 活性。此外, 这些研究还表明靶 RNA 中裂解位点的位置由 siRNA 引导序列的 5'-末端而不是 3'-末端限定 (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。其它研究表明在 siRNA 双链体的靶互补链上的 5'-磷酸酯是 siRNA 活性必需的, 且 ATP 用于维持 siRNA 上的 5'-磷酸酯部分 (Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309); 然而, 缺少 5'-磷酸酯的 siRNA 分子当被外源导入时是活性的, 提示 siRNA 构建体的 5'-磷酸化可以在体内发生。

[0098] 在一个实施方案中, 本发明涉及修饰的 siRNA 分子。举例的预期对磷酸酯主链的修饰包括这样的磷酸酯主链修饰, 其包含一或多个硫代磷酸酯, 二硫代磷酸酯, 膦酸酯, 包括甲基膦酸酯, 磷酸三酯, 包括烷基磷酸三酯, 吗啉代, 酰胺氨基甲酸酯 (amidate carbamate), 羧甲基, 乙酰胺, 聚酰胺, 磺酸酯, 氨磺酰, 氨基磺酸酯 (sulfamate), formacetal, thioformacetal 和 / 或烷基甲硅烷基取代。关于寡核苷酸主链修饰的回顾见 Hunziker and Leumann, 1995, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417 以及 Mesmaeker et al., 1994, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39 所述。

[0099] 举例的预期对糖部分的修饰包括 2'-烷基嘧啶, 如 2'-O-甲基、2'-氟、氨基和脱氧修饰等 (见例如 Amarzguioui et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31 :589-595, 美国专利出版物 No. 2007/0104688)。举例的预期对碱基基团的修饰包括无碱基糖 (abasic sugars), 2-O-烷基修饰的嘧啶, 4-硫尿嘧啶, 5-溴尿嘧啶, 5-碘尿嘧啶和 5-(3-氨基烯丙基)-尿嘧啶等。也可以掺入锁定核酸或者 LNA's。本领域已知许多其它修饰, 只要符合上述标准即可使用。举例的修饰也在美国专利 No. 5, 684, 143、5, 858, 988 和 6, 291, 438 以及在美国出版的专利申请 No. 2004/0203145A1 中揭示, 所述文献并入本文参考。其它修饰在 Herdewijn (2000), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10 :297-310, Eckstein (2000) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10 :117-21, Rusckowski et al. (2000) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10 :333-345, Stein et al. (2001) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11 :317-25 以及 Vorobjev et al. (2001) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11 :77-85 中揭示, 所述文献并入本文参考。

[0100] RNA 可以通过酶处理或者通过部分 / 全部有机合成方法而产生, 修饰的核糖核苷酸可以通过体外酶或有机合成方法导入。在一个实施方案中, 每个链均是化学制备的。合成 RNA 分子的方法为本领域已知。

[0101] 抗体

[0102] 举例的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、双特异性抗体以及异源缀合 (heteroconjugate) 抗体。

[0103] 术语“抗体”以其最广泛的含义使用,特别包含例如单链抗 Gpr12 单克隆抗体(包括拮抗剂和中和抗体)、具有多肽表位特异性的抗-Gpr12 抗体组合物、单链抗-Gpr12 抗体,以及抗-Gpr12 抗体的片段。如本文所用,术语“单克隆抗体”是指得自一群充分均质的抗体的抗体,即该群包含的各个抗体除了也许少量存在的可能天然发生的突变之外均相同。

[0104] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合或可变区。举例的抗体片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体(Zapata et al, Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子;以及从抗体片段中形成的多特异性抗体。

[0105] “特异性结合”或者“特异于”特定多肽或者特定多肽上表位的抗体是结合该特定多肽或者特定多肽上表位的抗体,其基本上不结合任何其它多肽或多肽表位。

[0106] 抗-Gpr12 抗体可包含多克隆抗体。本领域技术人员已知制备多克隆抗体的方法。多克隆抗体可以在哺乳动物中产生,例如通过一或多次注射免疫制剂以及如果需要的佐剂而产生。典型地,所述免疫制剂和/或佐剂通过多次皮下或腹膜内注射而注射进哺乳动物中。所述免疫制剂可包含 Gpr12 多肽或者其融合蛋白。有益的是将所述免疫制剂与已知在被免疫的哺乳动物中是免疫原性的蛋白质缀合。举例的这种免疫原性蛋白包括但不限于匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。可以使用的佐剂的例子包括 Freund's 完全佐剂和 MPL-TDM 佐剂(一磷酸脂质 A,合成的 trehalose dicorynomycolate)。所述免疫方案可以由本领域技术人员选择而不需要过多的实验。

[0107] 所述抗-Gpr12 抗体或者可以是单克隆抗体。单克隆抗体可以通过使用杂交瘤方法制备,如 Kohler and Miistein, Nature, 256:495(1975) 所述方法。在杂交瘤方法中,将小鼠、仓鼠或者其它合适的宿主动物典型用免疫制剂免疫以诱导淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或者能产生特异性结合所述免疫制剂的抗体。或者,所述淋巴细胞可以在体外免疫。

[0108] 如本领域技术人员所理解,本发明可以使用多种其它基因破坏技术。非限制性的例子是可以使用同源重组、显性-阴性基因构建体的转基因表达、正常基因构建体的转基因表达以及靶基因中氨基酸序列的任何其它修饰。病毒载体也可以适当应用以输送各种这样的基因构建体至脑细胞,且这种构建体包括通过 RNAi 途径起作用的一些构建体(短发夹 RNA, 双链 RNA 等)。

[0109] 配制物

[0110] 可以适当配制 Gpr12 抑制剂化合物样品并通过任何方式将其导入哺乳动物中使得样品的足够部分进入细胞中。例如,所述抑制剂可以在缓冲液中配制,所述缓冲液如磷酸盐缓冲盐水溶液、脂质体、胶束结构和壳体。具有阳离子脂质的 siRNA 配制物可用于促进 dsRNA 转染进细胞中。例如,可以使用阳离子脂质如 lipofectin(美国专利 No. 5,705,188,并入本文参考),阳离子甘油衍生物以及聚阳离子分子如聚赖氨酸(出版的 PCT 国际申请 W097/30731,并入本文参考)。合适的脂质包括 Oligofectamine、Lipofectamine(Life Technologies)、NC388(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.) 或者 FuGene 6(Roche),所有这些脂质均可以根据厂商指导使用。

[0111] 在一个实施方案中,本发明的 Gpr12 特异性 siNA 分子与聚乙烯亚胺(例如线性或分支 PEI) 和/或聚乙烯亚胺衍生物一起配制或复合,所述衍生物包括例如接枝的

(grafted)PEI 如半乳糖 PEI、胆固醇 PEI、抗体衍生的 PEI 以及聚乙二醇 PEI (PEG-PEI) 衍生物 (见例如 Ogris et al., 2001, AAPA PharmSci, 3, 1-11; Furgeson et al., 2003, Bioconjugate Chem., 14, 840-847; Kunath et al., 2002, Pharmaceutical Research, 19, 810-817; Choi et al., 2001, Bull. Korean Chem. Soc, 22, 46-52; Bettinger et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 558-561; Peterson et al., 2002, Bioconjugate Chem., 13, 845-854; Erbacher et al., 1999, Journal of Gene Medicine Preprint, 1, 1-18; Godbey et al., 1999, PNAS USA, 96, 5177-5181; Godbey et al., 1999, Journal of Controlled Release, 60, 149-160; Diebold et al., 1999, Journal of Biological Chemistry, 274, 19087-19094; Thomas and Klivanov, 2002, PNAS USA, 99, 14640-14645; 及 Sagara, U. S. Pat. No. 6, 586, 524, 所述文献并入本文参考)。

[0112] 本领域技术人员可意识到将 Gpr12 抑制剂分子导入细胞环境中的方法依赖于细胞类型及其环境的组成。例如, 当所述细胞在液体内存在时, 一种优选的配制物是液体配制物如 lipofectamine 中且所述抑制剂可以直接加入细胞的液体环境中。脂质配制物也可以给动物如通过静脉内、肌内或者腹膜内注射施用, 或者通过口服或通过吸入或本领域已知的其它方法施用。当所述配制物适于给动物如哺乳动物及更特别是人施用, 所述配制物也是药理学可接受的。本领域已知且可以使用施用寡核苷酸的药理学可接受的配制物。在一些情况中, 优选在缓冲液或盐水溶液中配制所述抑制剂并且将配制的抑制剂直接注射至细胞中。也可以直接注射 dsRNA 双链体。关于导入 siRNA 的合适方法见美国公布的专利申请 No. 2004/0203145A1, 所述专利并入本文参考。

[0113] 所述 Gpr12 抑制剂包含药理学有效量。药理学或治疗有效量是指有效产生指定药理学、治疗或预防结果的抑制剂的量。短语“药理学有效量”和“治疗有效量”或者简单地“有效量”是指有效产生指定药理学、治疗或预防结果的抑制剂的量。例如, 如果当与疾病或病症相关的可测量参数有至少 20% 的降低则认为指定的临床处理是有效的时候, 则治疗该疾病或病症的药物的治疗有效量是实现该参数至少 20% 降低必需的量。

[0114] 必须导入适量抑制剂且这些量可以通过使用标准方法根据经验确定。典型地, 细胞环境中各种 siRNA 的有效浓度是大约 50 纳摩尔或者低于 10 纳摩尔或更低, 或者可以使用其中大约为 1 纳摩尔或更低浓度的组合物。在其它实施方案中, 在许多情况中可以使用利用大约 200 皮摩尔或更低以及甚至大约 50 皮摩尔或更低浓度的方法。

[0115] 通常地, siRNA 的合适剂量单位是在每个受体大约 0.001 至大约 0.25mg/kg 体重 / 天的范围, 或者在大约 0.01 至大约 20 μ g/kg 体重 / 天的范围, 或者在大约 0.01 至大约 10 μ g/kg 体重 / 天的范围, 或者在大约 0.10 至大约 5 μ g/kg 体重 / 天的范围, 或者在大约 0.1 至大约 2.5 μ g/kg 体重 / 天的范围。

[0116] 在本发明的一个实施方案中, Gpr12 抑制剂可以一天施用一次。然而, 该配制物也可以含有在一天中以适当间隔施用的 2、3、4、5、6 或更多个亚剂量的剂量单位给予。在这种情况下, 在一个实施方案中, 每个亚剂量中含有的抑制剂必须相应较少以达到总计每天剂量单位。该剂量单位也可以是几天的单次剂量的复合剂量, 例如使用常规缓释配制物, 在几天内持续及一致地释放 siRNA。缓释配制物为本领域熟知。在这个实施方案中, 剂量单位含有相应的多个每日剂量。无论配制物如何, 所述药物组合物必须含有足够量的抑制剂以抑制 Gpr12 基因在动物中的表达。

[0117] 数据可以得自细胞培养物测定以确定合适的剂量范围。本发明组合物的剂量在较低或无毒性的循环浓度包括 ED_{50} (通过已知方法确定) 的范围内。根据应用的剂型以及施用途径, 剂量可以在此范围内变化。对于本发明方法中使用的任何化合物, 治疗有效剂量可以从细胞培养物测定中估算。血浆中抑制剂的水平可以通过标准方法测量, 例如通过高效液相层析测量。

[0118] 所述方法可通过将所述 siRNA 组合物加入细胞可生活的任何细胞外基质中而进行, 条件是配制所述 siRNA 组合物以便足够量的 siRNA 可以进入细胞发挥其作用。例如, 所述方法可用于存在于液体如液体培养物或者细胞生长培养基中、在组织外植体中或者在完整生物体包括动物如哺乳动物、特别是人中的细胞。

[0119] 输送方法

[0120] 编码特异于基因靶序列的反义链或 siRNA 的 DNA 序列被导入哺乳动物细胞中表达。为了靶向基因中一个以上的序列 (如不同的启动子区序列和 / 或编码区序列), 可以将特异于每个靶向基因序列的单独的 siRNA 编码 DNA 序列同时导入细胞中。根据另一个实施方案, 哺乳动物细胞可以暴露于靶向基因中多个序列的多个 siRNA。

[0121] 本发明的 Gpr12 抑制剂可以通过本领域已知的任何方式施用, 例如通过胃肠外途径, 包括静脉内、肌内、腹膜内、皮下、经皮、气道 (气雾剂)、直肠、阴道和局部 (包括口腔和舌下) 施用方式。在一些实施方案中, 所述药物组合物通过静脉内或者腹膜内灌注或注射方式施用。

[0122] 在一个实施方案中, 本发明特征在于使用将本发明的核酸分子输送至中枢神经系统和 / 或周围神经系统的方法。实验已经证实神经元在体内对核酸的有效摄取。作为将核酸局部施用给神经细胞的实例, Sommer et al., 1998, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 8, 75 描述了这样的研究, 其中将 c-fos 的 15 聚体硫代磷酸酯反义核酸分子通过显微注射大脑施用给大鼠。作为将核酸系统施用给神经细胞的实例, Epa et al., 2000, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 10, 469 描述了体内小鼠研究, 其中 β -环糊精-金刚烷-寡核苷酸缀合物用于靶向神经元分化的 PC12 细胞中的 p75 神经营养因子受体。在 IP 施用两周后, 在背根神经节 (DRG) 细胞中观测到 p75 神经营养因子受体反义核酸的显著摄取。此外, 在 DRG 神经元中观测到 p75 的明显和一致的下调。将核酸靶向神经元的其它方法在 Broaddus et al., 1998, J. Neurosurg., 88(4), 734; Karle et al., 1997, Eur. J. Pharmacol., 340(2/3), 153; Bannai et al., 1998, Brain Research, 784(1, 2), 304; Rajakumar et al., 1997, Synapse, 26(3), 199; Wu-ponget al., 1999, BioPharm, 12(1), 32; Bannai et al., 1998, Brain Res. Protoc, 3(1), 83; Simantov et al., 1996, Neuroscience, 74(1), 39 中描述。本发明的核酸分子因此适于输送至神经细胞并且被其摄取。

[0123] 通过各种不同策略输送靶向候选基因的本发明的核酸分子。可以使用的传统 CNS 输送方法包括但不限于鞘内和脑室内施用, 植入导管和泵, 在损伤或损害部位直接注射或灌注, 注射进脑动脉系统, 或者通过化学或渗透性方式使血脑屏障开放。其它方法可包括使用各种转运和载体系统, 例如通过使用缀合物和生物可降解的聚合物。此外, 基因治疗方法如 Kaplitt et al., U. S. Pat. No. 6, 180, 613 和 Davidson, WO 04/013280 所述方法可用于在 CNS 中表达核酸分子。

[0124] 术语“导入”包含在体外或在体内将 DNA 导入细胞中的各种方法。这种方法包括转

化、转导、转染和感染。载体是可用且优选的将编码 siRNA 分子的 DNA 导入细胞中的物质。所述导入可以通过使用至少一种载体而实现。可能的载体包括质粒载体和病毒载体。病毒载体包括逆转录病毒载体、慢病毒载体, 或者其它载体如腺病毒载体或者腺伴随病毒载体。

[0125] 本发明也可以使用将 siRNA 分子或者编码 siRNA 分子的 DNA 输送至细胞或组织中的另一输送系统, 包括脂质体、化学溶剂、电穿孔、病毒载体、胞饮作用、吞噬作用及其它形式自发或诱导的外源物质的细胞摄取, 以及本领域已知的其它输送系统。

[0126] 合适的启动子包括这样的启动子, 其一旦与编码干扰 RNA 分子的序列可操纵地结合或连接则促进所述干扰 RNA 分子表达。如本领域所已知, 这种启动子包括细胞启动子和病毒启动子。在一个实施方案中, 所述启动子是 RNA Pol III 启动子, 其优选位于编码干扰 RNA 分子的 DNA 序列的立即上游。如本领域所已知, 可以使用各种病毒启动子, 包括但不限于病毒 LTR, 以及腺病毒、SV40 和 CMV 启动子。

[0127] 在一个实施方案中, 本发明使用哺乳动物 U6RNA Pol III 启动子, 更优选使用人 U6snRNA Pol III 启动子, 其先前已经用于在人细胞中表达短的指定核酶转录物 (Bertrand et al., 1997; Good et al., 1997)。发现所述 U6Pol III 启动子及其简单的终止序列 (4-6 个尿苷) 在细胞中表达 siRNA。可以将适当选择的干扰 RNA 或 siRNA 编码序列插入转录盒中, 提供检测 RNA 分子的内源表达和功能的最佳系统。

[0128] 表达测量

[0129] Gpr12 基因的表达可以通过本领域已知的及后来揭示的任何合适方法确定。可以意识到用于测量靶基因表达的方法依赖于靶基因的性质。例如, 当靶基因编码蛋白质时, 术语“表达”可以是指衍生自所述基因的蛋白质或转录物。在这种情况下, 靶基因的表达可以通过测量相应于靶基因的 mRNA 的量或者通过测量该蛋白质的量而确定。蛋白质可以在蛋白质测定中测量, 如通过染色或者免疫印迹, 或者如果所述蛋白质催化可以测量的反应, 在通过测量反应速度而确定。所有这些方法均为本领域已知且可以使用。在基因产物是 RNA 的情况下, 表达可以通过确定相应于基因产物的 RNA 的量而测量。所述测量可以对细胞、细胞提取物、组织、组织提取物或者任何其它合适源材料进行。

[0130] Gpr12 基因的表达是否降低的确定可以通过能可靠地检测基因表达变化的任何合适方法进行。

实施例

[0131] 实施例 1- 情景和痕迹条件反射 (trace conditioning)

[0132] 用诱导微弱记忆的情景条件反射范式 (contextual conditioning paradigm) 训练小鼠 (图 1, 也见 Tully, T., et al, Nat Rev Drug Discov 2, 267-77 (2003))。图 1a 示出了训练次数对于情景记忆形成的作用。用逐渐增加次数的成对 CS-US 训练小鼠, 4 天后评估情景记忆。用 1× 或 2× 成对 CS-US 训练诱导次最大记忆。

[0133] 痕迹条件反射随着 CS 与 US 之间时间间隔延长而变得越来越难。在痕迹恐惧条件反射 (trace fear conditioning) 中使用逐渐延长的长痕迹间隔 (long trace interval) 训练小鼠并与延迟条件反射对比音调记忆。图 1b 示出痕迹间隔对于时间记忆形成的作用。30 秒或更长的痕迹间隔导致对于音调 CS 的长期记忆不佳 (5、15、30、60、100 和 120 秒的延迟条件反射和痕迹间隔分别为 n = 29、n = 20、n = 25、n = 18、n = 28、n = 16 和 n =

12)。事实上,如果 CS 与 US 之间的痕迹间隔是 60 秒或更长,则 C57BL/6 小鼠示出不佳的记忆(图 1b)。

[0134] 实施例 2:训练后海马中 Gpr12 RNA 水平

[0135] 为了评估情景记忆,使用最初为了评估 CREB 敲除小鼠记忆开发的标准化情景恐惧条件反射任务 (Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68)。在训练当天,将小鼠置于条件反射室 (Med Associates, Inc., VA) 中 2 分钟,之后给予非条件刺激 (US),持续 2 秒的 0.5mA 足部电击。对于微弱训练 (2 个训练实验),在电击之间以 1 分钟试验间隔重复两次 US。对于强力训练 (5 个训练实验),在电击之间以 1 分钟试验间隔给予 5 次足部电击 (Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374.)、(Scott et al., 2002 J Mol Neurosci 19, 171-177)、(Tully et al., 2003 Nat Rev Drug Discov 2, 267-277)。使用自动化软件包进行训练 (Med Associates, Inc., VA)。在最后一个训练实验后,将小鼠置于条件反射室中额外 30 秒,然后返回其自己笼子中。训练后 24 小时检测情景记忆。将小鼠置于相同训练室中,通过对僵直行为评分评估条件反射。僵直 (freezing) 定义为在 5 秒期间完全没有运动 ((Fanselow and Bolles, 1979 J Comp Physiol Psychol 93, 736-744.)、(Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68)、(Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374))。全部检测时间持续 3 分钟。在检测每个实验对象之后,用 75%乙醇、水对实验设备进行彻底清洁及干燥、通风。拍摄每个实验过程。所有实验者均为药物和训练条件双盲。

[0136] 设计所有行为实验并以平衡方式进行,意味着 (i) 每个实验条件均使用等量实验小鼠和对照小鼠;(ii) 每个实验条件均重复多次,累加重复天数产生最终对象数目。拍摄每个期间的行进。在每个实验中,实验者不知道(不知情)在训练和检测期间对象的处理情况。使用软件包 (StatView 5.0.1; SAS Institute, Inc) 通过 Student' s 不成对 t 检验分析数据。除非特别指出,文中和图中所有数值均以平均值 \pm 标准差表示。

[0137] 对于痕迹条件反射训练,使用标准化小鼠情景恐惧条件反射设备 (Med Associates, Inc., VA; (Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68)、(Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374)。在训练当天,将小鼠置于条件反射室中 2 分钟,之后给予条件刺激 (CS),在 75dB 持续 20 秒的 2800Hz 音调。在该音调结束后 60 秒,给予动物 0.5mA 电击非条件刺激 (US) 2 秒。先前的实验已经表明这个训练范式在 C57BL/6 小鼠中诱导不佳的痕迹恐惧记忆,且这种记忆可以通过 CREB 途径的增强剂而促进。在室内额外 30 秒之后,将小鼠返回其自己的笼子中。在检测每个实验对象之后,用 75%乙醇、水对实验设备彻底清洁,并干燥和通风几分钟。

[0138] 在位于另一操作室内的新室内进行检测以避免情景条件反射的混淆影响。除去内部的条件反射室,用小鼠笼子代替。将不同颜色带子置于每个笼子的后面以彼此区分。交替使用三个不同笼子以降低对象之间气味污染的可能性。将 30 瓦的灯置于室内以保证训练和检测之间的照明差异。将笼子使用肥皂溶液而非乙醇进行清洁。每次检测以仅 2 分钟光照开始 (pre-CS),然后给予 20 秒音调 (CS),随后再仅光照 30 秒 (post-CS)。以与训练期间相同方式,每次对一只小鼠在 5 秒期间的“僵直”评分,由避免此上述的情景条件反射。拍摄每个实验的进程。特异于听觉记忆的僵直应答的比例通过从 CS 僵直中减去 preCS 僵直 (非特异性) 而确定。

[0139] 在训练和检测后,收集小鼠海马组织。使用 QIAGEN RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商指导进行各个 RNA 制备。使用 TaqMan 逆转录酶试剂盒 (Applied Biosystems) 产生 cDNA。使用 Affymetrix Gene 芯片分析法分析 cDNA, 获得对初次实验小鼠的相对表达水平。通过 Affymetrix 芯片分析鉴别的在痕迹恐惧条件反射之后 1 小时的表达变化通过 Nimble- 芯片分析 (NimbleGen Systems, Madison, WI, USA) 证实。通过 Affymetrix- 芯片分析鉴别的情景恐惧条件反射 (5 个训练实验) 1 小时后的表达变化通过另一个 Affy- 芯片分析以及 qPCR 证实。

[0140] 表 2

[0141]

比较	时间点	P 值 ($p < 0.05$ 显著)	ES 值	pPCR 相对定量 (训练的与初次实验的)
延迟条件反射的与初次实验的	6h	0.0008	-1.81	0.75
痕迹条件反射的与初次实验的	6h	0.0383	NS(从 qPCR 验证的 p 值)	0.70

[0142] 表 2: 鉴定 Gpr12 作为海马中记忆调节基因。示出 P 值和 ES 值 (Affymetrix 基因 - 芯片分析) 和对初次实验的相对表达 (pPCR 验证)

[0143] 实施例 3: 使用 Neuro 2A 细胞筛选靶向 Gpr12 的 siRNA

[0144] 实时 PCR 的表达谱表明 Gpr12 mRNA 在小鼠和人 CNS 中表达, 在周围组织中几乎无表达 (图 2)。

[0145] Gpr12 广泛存在于小鼠 CNS 中 (图 2a), 在丘脑、脑干和小脑中具有最高表达水平, 这些脑区域参与摄食和感觉信息整合 (丘脑)、运动控制 (小脑) 和自主功能 (脑干)。高水平的 Gpr12 也在海马和新皮质中观测到, 这是记忆形成的两个关键脑部区域 (Fanselow 2005 J Comp Physiol Psychol 93, 736-744)。这些结果与在小鼠 CNS 中原位杂交观测的结果相似 (Ignatov 2003 J Neurosci 23, 907-914)。在小鼠中, Gpr12 表达在除了肝之外的大多数周围组织中低于检测水平。

[0146] 在人 CNS 中, Gpr12 表达在海马、新皮质和小脑中最高 (图 2b)。

[0147] 与 Gpr12 最近同源的 Gpr3 和 Gpr6 存在于小鼠和人的 CNS 中 (图 2a/b)。然而, 人 CNS 中 Gpr12 mRNA 水平比 Gpr3 和 6 的高很多。这与在小鼠中的情况相反, 其中在海马、丘脑和新皮质中 Gpr6 表达极为显著。

[0148] 体内级 siSTABLE siRNA (Dharmacon Inc., Lafayette, USA) 用于评估小鼠 CNS 中的 Gpr12 功能。对 siRNA 进行化学修饰以增强稳定性。21 聚体 siSTABLE 非靶向 siRNA 用作对照。

[0149] 为了评估 siRNA 效力, 使用 siGENOME siRNA 和 Dharmafect 3 (Dharmacon, Lafayette, USA) 转染 Neuro2A 细胞。如针对海马组织所述, 转染 24 小时后分离 RNA 及合成 cDNA。每次处理进行三个单独的 RNA 制备和 cDNA 合成。对每次 cDNA 复制以一式两份确定靶 mRNA 水平, 平均每个重复实验的 ΔCT 值 ($n = 3\text{RNA}/\text{cDNA}$ preps; 每个数值均代表两次 qPCR 确定的平均值)。

[0150] 鉴别了在体外有效降低 Gpr12 mRNA 的三个 siRNA (图 3)。在处理 24 小时后, siRNA2 使 Gpr12 mRNA 水平降低为载体对照组的 31%, 选择其在体内评估 Gpr12。Gpr12-2 siRNA 的体内级 siSTABLE siRNA 得自 Dharmacon (Lafayette, USA)。

[0151] 使用 Neuro 2a 细胞在体外通过 bDNA 测定 (QuantiGene bDNA 测定试剂盒, Bayer) 检测对 Gpr12 的一些未修饰的 (siGENOME) siRNA。使用多成分合理设计算法 (Reynolds et al., (2004). Nat Biotechnol 22, 326-330) 设计 siRNA 并通过 BLAST 检索控制对于 Gpr12 的特异性。

[0152] 选择如下 siRNA 进行进一步体内鉴定:

[0153] Gpr12 siRNA2 有义链 GAGGCACGCCCAUCAGAUUU; SEQ ID NO:7

[0154] Gpr12 siRNA2 反义链 UAUCUGAUGGGCGUGCCUCUU; SEQ ID NO:8

[0155] 非靶向 siRNA 有义链 UAGCGACUAAACACAUAUU; SEQ ID NO:9

[0156] 非靶向 siRNA 反义链 UUGAUGUGUUUAGUCGUAUU; SEQ ID NO:10

[0157] 实施例 4:合成的 Gpr12 siRNA 在小鼠中的体内输送

[0158] 动物和环境使用年轻成年 (10-12 周龄) C57BL/6 雄性小鼠 (Taconic, NY)。在达到时, 将小鼠分组 (5 只) 在标准实验室笼子中饲养, 保持 12:12 小时光照 - 黑暗周期。实验总是在光照阶段进行。在手术插管之后, 将小鼠单独圈养在单独的笼子中并饲养至实验结束。除了训练和检测时间, 小鼠自由摄食和饮水。在与美国国立卫生研究院 (NIH) 的指导方针一致且由美国实验动物管理及使用委员会 (the Institution Animal Care and Use Committee) 许可的标准条件下饲养和繁殖小鼠。

[0159] 动物手术与 siRNA 注射为了注射 siRNA, 用 20mg/kg Avertin 麻醉小鼠并将 33 号导管双侧植入背侧海马 (坐标: A = -1.8mm, L = +/-1.5mm, 深度 1.2mm) 或者植入杏仁核 (坐标: A = -1.58mm, L = +/-2.8mm, 深度 4.0mm) (Franklin and Paxinos, 1997 The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates)。在手术恢复后 5-9 天, 为动物注射 siRNA。将 siRNA 在 5% 葡萄糖中稀释为 0.5 μ g/ μ l 并与 6 当量的 22kDa 线性聚乙烯亚胺 (Fermentas) 混合。在室温保温 10 分钟后, 将 2 μ l 通过经聚乙烯管与显微注射器连接的灌注管注入每个海马中。全部灌注程序需要 ~ 2 分钟, 轻轻手持动物以使得应激 (stress) 最小化。在 3 天内共灌注 3 次 siRNA (1 μ g siRNA/海马/天)。

[0160] siRNA 介导的 Gpr12 敲低 (knockdown) 可导致海马结构损害。评估 siRNA 处理的脑的海马形态学。

[0161] 在行为实验后一天处死注射了 siRNA 的动物。将冷冻的脑切片成 15 μ m 切片并用甲酚紫染色。在连续切片的照片上评估海马形态学。为了进行插管检验, 为动物注射 1 μ l 甲基蓝染料, 之后立即处死。将冷冻的脑切片成 15 μ m 切片。利用显微镜确定染料染色的位置并对比 (Franklin and Paxinos, 1997 The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates)。插管检验是在对于对象的处理不清楚的情况下进行的。

[0162] 在非靶向 siRNA (图 6a) 与 Gpr12 siRNA 处理的小鼠 (图 6b) 之间海马形态学无明显差异。因此, Gpr12 siRNA 不导致脑形态学的任何明显改变。对于锥体细胞层的损害限于插管区域。注意, 图 6 中可见的损害 (中间部分) 是由于除去海马插管引起的。其不代表海马形态学中实际手术导致的改变, 其被认为是最小的损害且不影响实验对象的行为能力。

[0163] 为了证实 siRNA 在体内的靶敲低作用, 在海马内用 siRNA 处理小鼠 3 天, 在最后一次 siRNA 灌注后 2 天和 3 天确定 Gpr12 mRNA 水平 (图 7)。

[0164] 为了评估体内 Gpr12 敲低, 集合每组 6 只小鼠的注射 siRNA 的海马组织。使用

QIAGEN RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商指导进行 6 次单独的 RNA 制备。使用 TaqMan 逆转录酶试剂盒 (Applied Biosystems) 产生 cDNA。使用 ABI prism 和 SDS 2.1 软件对每次 RNA/cDNA 复制进行 2 个实时 PCR 反应。请求式 ABI 测定 (Applied Biosystems) 用于检测 Gpr12 的 mRNA 水平。确定每个 cDNA 样品的平均 CT 值。然后将数据根据 TATA 结合蛋白 (TBP) 标准化并确定 ACT 值。根据非靶向对照 siRNA 处理的对照组标准化 mRNA 水平。

[0165] 当与非靶向对照 siRNA ($n = 6$) 对比时, 在处理 2 天后 Gpr12 siRNA ($n = 6$) 显著降低海马 Gpr12 的 mRNA 水平 ($p < 0.01$)。在处理 3 天后, Gpr12 siRNA 无显著作用, 表明 Gpr12 mRNA 敲低是短暂的 ($p = 0.25$)。这些结果证实 siRNA 在体内降低海马中 Gpr12 mRNA。然而, 靶 mRNA 和蛋白质水平也许受到 Gpr12 siRNA 的不同影响。在 siRNA 处理后, Gpr12 的实际蛋白质水平可以极大程度降低且持续较长时间。

[0166] 实施例 5: siRNA 介导的 Gpr12 敲低对情景和痕迹条件反射的影响

[0167] 为了评估情景记忆, 使用最初为了评估 CREB 敲除小鼠记忆而开发的标准化情景恐惧条件反射任务 (Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68)。在训练当天, 将小鼠置于条件反射室 (Med Associates, Inc., VA) 中 2 分钟, 之后给予非条件刺激 (US), 持续 2 秒的 0.5mA 足部电击。对于微弱训练 (2 个训练实验), 在电击之间以 1 分钟试验间隔重复两次 US。对于强力训练 (5 个训练实验), 在电击之间以 1 分钟试验间隔给予 5 次足部电击 (Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem J, 365-374.)、(Scott et al., 2002 J MoI Neurosci 19, 171-177)、(Tully et al., 2003 Nat Rev Drug Discov 2, 267-277)。使用自动化软件包进行训练 (Med Associates, Inc., VA)。在最后一个训练实验后, 将小鼠置于条件反射室中额外 30 秒, 然后返回其自己笼子中。训练后 24 小时检测情景记忆。将小鼠置于相同训练室中, 通过对僵直行为评分评估条件反射。僵直定义为在 5 秒期间完全没有运动 ((Fanselow and Bolles, 1979 J Comp Physiol Psychol 93, 736-744.)、(Bourtchuladze et al., 1994 Cell 79, 59-68)、(Bourtchouladze et al., 1998 Learn Mem 5, 365-374))。全部检测时间持续 3 分钟。在检测每个实验对象之后, 用 75% 乙醇、水对实验设备进行彻底清洁及干燥、通风。拍摄每个实验。所有实验者均为药物和训练条件双盲。

[0168] 设计所有行为实验并以平衡方式进行, 意味着 (i) 每个实验条件均使用等量实验小鼠和对照小鼠; (ii) 每个实验条件均重复多次, 累加重复天数产生最终对象数目。拍摄每个期间的行进。在每个实验中, 实验者不知道 (不知情) 在训练和检测期间对象的处理情况。使用软件包 (StatView 5.0.1; SAS Institute, Inc) 通过 Student's *t* 检验分析数据。除非特备指出, 文中和图中所有数值均以平均值 \pm 标准差表示。

[0169] 首先研究情景记忆中海马 Gpr12 的功能。将非靶向 siRNA ($n = 19$) 或 Gpr12 siRNA ($n = 20$) 注入小鼠海马中。在最后一次注射 siRNA 之后 3 天, 用设计的情景条件反射范式训练动物以诱导弱情景记忆 (Scott et al., 2002 J MoI Neurosci 19, 171-177.)、(Tully et al., 2003 Nat Rev Drug Discov 2, 267-277)。在训练 24 小时后, Gpr12 DM-2siRNA 处理的动物证实显著增强的情景记忆 (24 小时记忆: $p < 0.05$, 图 4a)。

[0170] 接下来研究杏仁核中 Gpr12 对于情景记忆形成的功能。在小鼠杏仁核中灌注非靶向 siRNA ($n = 20$) 或者 Gpr12 siRNA ($n = 21$) 并检测情景记忆。正如海马中 Gpr12 敲低一样, 在训练后 24 小时, Gpr12 siRNA 处理的动物证实显著增强的情景记忆 (24 小时记忆: $p < 0.01$, 图 4b)。有 4 只小鼠由于错误插管而排除在该分析之外 ($2 \times$ 非靶向 siRNA,

2×Gpr12-2 siRNA)。

[0171] 对于痕迹条件反射训练,使用标准化小鼠情景恐惧条件反射设备(MedAssociates, Inc., VA;(Bourtchouladze et al.,1994 Cell 79,59-68)、(Bourtchouladze et al.,1998 Learn Mem 5,365-374)。在训练当天,将小鼠置于条件反射室中 2 分钟,之后给予条件刺激(CS),在 75dB 持续 20 秒的 2800Hz 音调。在该音调结束后 60 秒,给予动物 0.5mA 电击非条件刺激(US)2 秒。先前的实验已经表明这个训练范式在 C57BL/6 小鼠中诱导不佳的痕迹恐惧记忆,且这种记忆可以通过 CREB 途径的增强剂而促进。在室内额外 30 秒之后,将小鼠返回其自己的笼子中。在检测每个实验对象之后,用 75%乙醇、水对实验设备彻底清洁,并干燥和通风几分钟。

[0172] 在位于另一操作室内的新室内进行检测以避免情景条件反射的混淆影响。除去内部条件反射室,用小鼠笼子代替。将不同颜色带子置于每个笼子的后面以彼此区分。交替使用三个不同笼子以降低对象之间气味污染的可能性。将 30 瓦的灯置于室内以保证训练和检测之间的照明差异。将笼子使用肥皂溶液而非乙醇进行清洁。每次检测以仅 2 分钟光照开始(pre-CS),然后给予 20 秒音调(CS),随后再仅光照 30 秒(post-CS)。以与训练期间相同方式,每次对一只小鼠在 5 秒期间的“僵直”评分,由避免此上述的情景条件反射。拍摄每个实验的进程。特异于听觉记忆的僵直应答的比例通过从 CS 僵直中减去 preCS 僵直(非特异性)而确定。

[0173] 研究了海马 Gpr12 在痕迹恐惧记忆中的功能。如情景条件反射所述,在小鼠海马中灌注非靶向 siRNA(n = 20) 或者 Gpr12 siRNA(n = 23)。当用一组 CS/US 配对和 60 秒痕迹间隔训练时,Gpr12 DM-2 siRNA 处理的动物证实显著增加的痕迹条件反射(CS-preCS :p < 0.01,图 5)。重要地,Gpr12 siRNA 而非对照 siRNA 处理的动物增加其对于呈现的音调 CS 的僵直应答。因此,与情景条件反射相似,siRNA-介导的海马 Gpr12 敲低促进痕迹条件反射。在痕迹恐惧条件反射期间,Gpr12 siRNA 不显著影响即时僵直(immediatefreezing)(非靶向 siRNA :3.3±1.5%;Gpr12 siRNA :5.1±1.6%;p = 0.44;数据未示出)。

[0174] 综合这些结果示出 Gpr12 在海马和杏仁核中均是记忆形成的负调节物,这是小鼠以及人记忆形成中关键的两个颞叶结构。重要地,Gpr12 siRNA 诱导“功能增益(gain of function)”(即记忆形成增强)。这种对于行为可塑性的作用不太可能是由 Gpr12siRNA 的副作用诱导的。因此,Gpr12 是海马和杏仁核中记忆的关键调节物。

[0175] 实施例 6 :Gpr12 敲除小鼠

[0176] Gpr12 敲除小鼠 Gpr12 敲除小鼠得到 Deltagen(San Carlos, CA 94070, U. S. A) 许可。通过雄性 Gpr12+/- 小鼠与雌性 C57B1/6 小鼠(Taconic Farms, USA) 繁殖产生优势 C57B1/6 背景(C57B1/6 中 5 次回交)中杂合 Gpr12K0 小鼠(称作 Gpr12+/- 小鼠)以及 WT 同窝出生的对照小鼠。通过聚合酶链反应确定小鼠基因型。将性别平衡的 3-6 月龄的雄性和雌性小鼠用于行为分析。

[0177] 评估 Gpr12+/- 小鼠海马中 Gpr12 和对照 mRNA 水平海马分离自 Gpr12+/- 小鼠(n=3)、Gpr12-/- 小鼠(n = 2) 和 WT 同窝出生的对照小鼠(n = 3)。使用 QIAgen RNeasy 试剂盒(Qiagen) 分离 RNA。使用 TagMan 逆转录酶试剂盒(Applied Biosystems) 产生 cDNA。使用请求式 ABI 测定(AppliedBiosystems) 确定 Gpr12、Creb1 和 Grin1 的 mRNA 水平并根据 TATA 结合蛋白(TBP) 标准化。

[0178] 新目标识别训练与检测手持动物 3-5 分钟,进行 3 天。在训练前一天,将各个动物置于位于暗光房间的训练设备中 (Plexiglas 箱, L = 48cm, W = 38cm, H = 20cm),使其习惯环境 15 分钟 (也见 Bourtchouladze, 2003 所述)。在习惯环境后 24 小时开始训练。将动物置于含有两个相同目标 (例如小圆锥形目标) 的训练箱中,使其探查这些目标。将目标置于箱子中心区,在对象之间均衡目标的空间位置 (左 - 右侧)。训练动物 10、15 或 20 分钟。将花费少于 2 秒探查的小鼠从该分析中排除。

[0179] 为了检测长期记忆保持,在训练后 24 小时观测小鼠 10 分钟。为了检测短期 (转录非依赖性) 记忆,在训练后 3 小时观测小鼠 10 分钟 (Bourtchouladze, 2003)。为动物呈现两个目标,一个目标在训练期间使用, - 并因此是“熟悉的”,另一目标是新的 (例如小锥形目标)。确定目标记忆指数为 ((新探查 - 熟悉探查) / 总探查 × 100)。为了控制对于探查的非特异性作用,也计算检测期间总探查时间。

[0180] 为了保证辨别目标无气味差异,在每次实验后,用 90% 乙醇彻底清洁设备和目标、干燥并通风几分钟。

[0181] 开场 (Open field) 这是测量动物运动活性和探查性的常用检测方法 (Logue, 1997, Barad, 1998)。在开始检测之前 1 小时将动物从一般动物居处移至实验室中。与先前所述 (Barad, 1998) 相似地进行实验。将小鼠置于标准开放场所中,使用计算机跟踪系统 (Etho Vision by Noldus, Inc., VA) 观测 30 分钟。两个箱子同时进行,对动物行进距离 (步行) 和直立行为评分。在各个动物实验之间,用 75% 乙醇彻底清洁设备、干燥并通风几分钟。由不知情的实验人员进行实验,对每个实验的行进均录像。量化如下测量: 1) 在开放场地的水平活动 (步行), 2) 垂直活动 (直立)。

[0182] 表 3 示出结果证实 Gpr12 是海马中记忆调节基因。图中示出 Affymetrix 基因 - 芯片分析的 p 值和 delta (相对表达的 log2)。痕迹条件反射数据通过 Nimble- 芯片分析独立地证实。情景条件反射数据通过重复 Affymetrix- 芯片及通过 qPCR 证实。

[0183] 表 3

[0184]

比较	时间点	P 值 (p < 0.05 限制性)	Delta (log2 值)	证实
痕迹条件反射的 与初次实验的 (笼养)	1h	0.033	-0.14	Nimble- 芯片
情景条件反射与 初次实验 (笼养)	1h	0.0003	-0.28	Affy- 芯片, qPCR

[0185] Gpr12 在杂合 KO 小鼠 (Gpr12+/- 小鼠) 中的慢性抑制作用 siRNA 数据表明在完整的成年小鼠中 Gpr12 的急性抑制作用促进长期记忆。为了检测 Gpr12 的慢性系统性广泛的抑制作用对于长期记忆的影响,分析 Gpr12+/- 小鼠。

[0186] 先前已经分析了纯合 Gpr12 敲除小鼠 (Gpr12-/- 小鼠)。纯合敲除小鼠呈现出削弱的运动、削弱的在 Rotarod 上的运动能力、在莫里斯水迷宫 (Morris Water Maze) 中削弱的运动功能和学习 (游泳) 能力、痛觉过敏 (hyperanalgesia), 且其示出肝肾疾病的迹象 (专利申请 WO 2005/027628, Carlton, 2005)。另一项研究证实纯合 Gpr12 敲除小鼠发生血脂异常和肥胖 (Bjursell, 2006)。总之,这些发现示出纯合 Gpr12 敲除小鼠具有许多一般性和发展性诱导的健康问题。预期在这些突变体中由于一般健康问题而发生认知功能削弱。

[0187] 虽然未获得关于杂合 Gpr12KO 小鼠 (Gpr12+/-) 的数据,但是从先前的这些研究

(Carlton, 2005 ;Bjursell, 2006) 中预期在这些小鼠中长期记忆被削弱, 尽管程度较纯合突变体低。然而, 未曾预料的结果是在 Gpr12+/- 小鼠中长期记忆是否被加强。

[0188] 两个 Gpr12 等位基因在 Gpr12-/- 小鼠中均是无活性的, 这些小鼠无可检测的 Gpr12mRNA 表达 (WT 对照组 0%), Creb1 表达略降低, 而 Grin1 水平正常 (分别为 $81 \pm 1\%$ 和 $102 \pm 2\%$ 对照组; 图 8a)。

[0189] 两个 Gpr12 等位基因中仅一个基因在 Gpr12+/- 小鼠中是无活性的, 这些小鼠呈现 $51 \pm 8\%$ 的 WT Gpr12mRNA。Gpr12mRNA 水平因此与纯合敲除小鼠不同。在 Gpr12+/- 小鼠中, Creb1 和 Grin1 的 mRNA 不受影响 (分别为 $102 \pm 8\%$ 和 $101 \pm 4\%$; 图 8a)。通过甲酚紫染色对 Gpr12+/- 海马进行总体组织学分析未表明杂合突变体与 WT 对照之间的任何明显差异 (图 8b)。

[0190] 杂合 Gpr12 敲除小鼠中一般运动活性和开放场所探查性进行开放场所检测以检测是否如先前从纯合 KO 小鼠的结果中预期的那样 Gpr12+/- 小鼠中一般运动活性和探查性被削弱。测量开放场所中的水平活动 (步行), 发现杂合突变体与 WT 小鼠之间运动活性无差异 (所有时间点 $p > 0.05$; student' s t- 检验; 图 9a)。在 Gpr12+/- 小鼠和 WT 对照之间垂直活动 (直立) 也无差异 (所有时间点 $p > 0.05$; student' s t- 检验; 图 9b)。这些结果表明在杂合 Gpr12 突变小鼠中运动活性和探查性是正常的。

[0191] 在杂合 Gpr12 敲除小鼠中新目标识别记忆目标识别是小鼠和大鼠的行为学相关任务, 其非得自负性强化 (足部电击)。这个任务依赖于啮齿动物探查其环境中的新目标而非熟悉目标的天然好奇心。显然, 对于目标是“熟悉的”, 则动物必须在之前已经经历其并记住。因此, 具有较好记忆的动物将致力于并探查新目标而非熟悉目标。近来在人体中进行的神经影像学研究证实目标识别中的记忆包含前额皮层 (Deibert, 1999), 这是由于年老而受显著影响的结构 (Hedden, 2004)。对猴子和啮齿动物进行的其它研究提示海马在新目标识别中是重要的 (Teng, 2000 ;Mumby, 2001)。因此, 新目标识别提供了良好的行为学模型以评估药物 - 化合物对于与实验动物海马和皮质功能相关认知任务的影响。

[0192] 与情景和痕迹条件反射一样, 目标识别的长期记忆依赖于训练条件 (Bourtchouladze, 2003)。为了建立保持对于目标识别训练的短期记忆而非长期记忆的条件, 对与 Gpr12 突变小鼠相同遗传背景的 WT 小鼠 ($n = 19$) 训练 10 分钟、15 分钟或 20 分钟 (图 10)。当 24 小时后检测时, 训练 10 分钟的小鼠示出对于新目标无优选性 (记忆评分: 2.2 ± 8.0), 而训练 15 分钟或 20 分钟的小鼠证实对于新目标的优选性 (记忆评分: 训练 15 分钟和 20 分钟分别为 21.0 ± 7.0 和 34.3 ± 4.9)。因此, 10 分钟的训练不足以诱导长期目标识别记忆。

[0193] 接着, 检测 Gpr12+/- ($n = 15$) 和 WT 同窝出生小鼠 ($n = 16$) 中在训练 10 分钟后的长期目标识别记忆 (图 11)。当在 24 小时后检测时, Gpr12+/- 小鼠而非 WT 对照小鼠证实长期目标识别记忆 (记忆评分: WT 小鼠与 Gpr12+/- 小鼠分别为 6.0 ± 8.2 与 28.7 ± 4.9 ; $p < 0.05$, student' s 不成对 t- 检验; 图 11a)。训练 ($p = 0.34$) 和检测 ($p = 0.63$) 期间总探查性无差异, 表明 Gpr12+/- 小鼠中长期记忆的促进不是由于探查活性的一般性增加所致 (图 11b)。

[0194] 在 Gpr12+/- 小鼠 ($n = 6$) 和 WT 同窝出生小鼠 ($n=8$) 中也进行短期目标识别记忆 (图 12)。当在训练后 3 小时检测时, 突变体与对照之间短期目标识别记忆相似 (记忆评

分:WT 小鼠与 Gpr12+/- 小鼠分别为 25.6 ± 6.6 与 18.2 ± 4.8 ; $p = 0.41$, student's *t*-检验;图 12a)。在检测期间组间总探查性无差异 ($p = 0.28$;图 12b)。重要地且与先前的研究 (Bourtchouladze, 2003) 一致的是:WT 小鼠证实在训练 10 分钟后目标记忆的显著短期保持。然而,仅 Gpr12+/- 小鼠示出长期保持(图 11),表明 Gpr12 的杂合敲低特异性增强长期记忆。

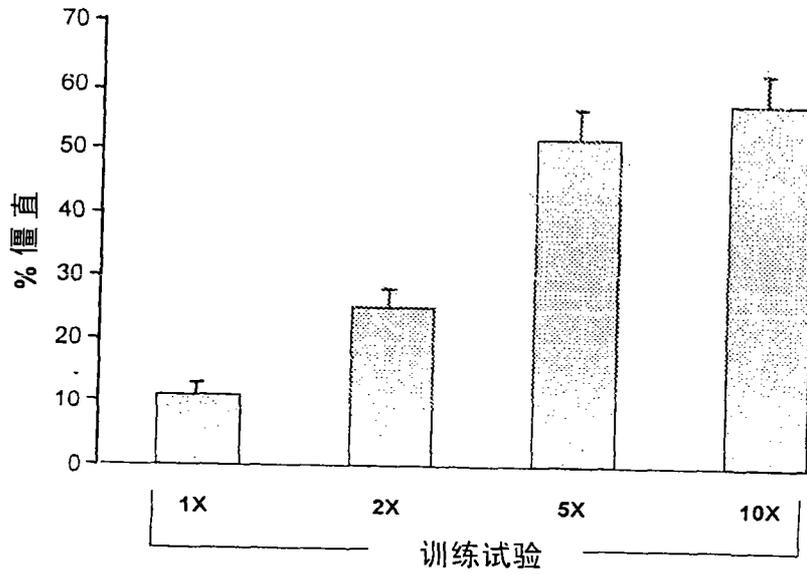
[0195] 因此,杂合 Gpr12 突变小鼠(具有一个功能性 Gpr12 等位基因)的运动活性和探查性不具有明显缺陷。对长期目标识别记忆的分析揭示了未曾预料的发现,即在杂合 Gpr12 敲除小鼠中长期记忆巩固是增强的。相反,短期记忆正常。这些发现与在海马和杏仁核中 siRNA 对 Gpr12 抑制作用之后的情景和时间记忆的促进是一致的。

[0196] 本说明书中用于阐明本发明背景以及在特定情况中提供关于实施的额外详细描述而提及的所有出版物、专利和专利申请在此以每个单独的出版物、专利或专利申请特定和单独并入参考的相同程度并入本文作参考。

[0197] 虽然结合优选的实施方案特别揭示和描述了本发明,但是本领域技术人员理解在不偏离所附权利要求书包含的本发明范围的前提下可以对本发明进行各种改变。

A

试验次数对情景记忆的影响



B

痕迹间隔对时间记忆的影响

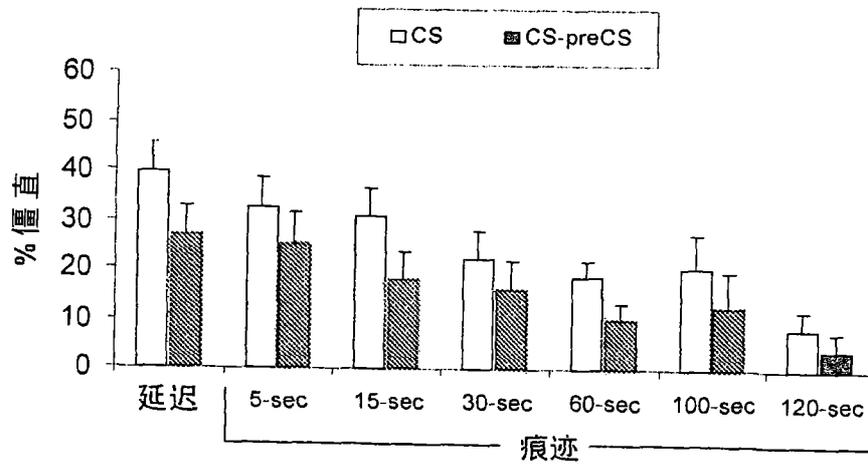


图 1

A

小鼠

脑	GPR3	GPR6	GPR12
全脑	222	1894	173
海马	123	2075	210
额皮质	124	844	245
大脑皮质	109	811	172
丘脑	75	1123	827
小脑	97	13	414
下丘脑	49	544	157
脑桥	88	38	263
脑干	106	610	725
髓质	1	1	2

非脑			
睾丸	38	189	0
卵巢	19	7	1
子宫	3	1	2
小肠	1	8	0
心	11	23	0
肾	6	9	0
肺	3	3	0
肝	1	4	68
脾	3	33	1
胸腺	10	2	0

B

人

脑	GPR3	GPR6	GPR12
全脑	82	51	255
海马	65	34	234
额皮质	99	73	203
大脑皮质	108	54	182

小脑	96	4	201
----	----	---	-----

脑桥	230	3	48
----	-----	---	----

髓质	86	2	55
----	----	---	----

非脑			
睾丸	7	15	15
卵巢	5	29	0
子宫	2	2	1
胎盘	4	15	9
小肠	6	0	31
骨骼肌	1	0	4
胸腺	5	2	1
血液	19	0	1
胰腺	1	1	0

图 2

体外Neuro2A细胞中的Gpr12 mRNA敲低

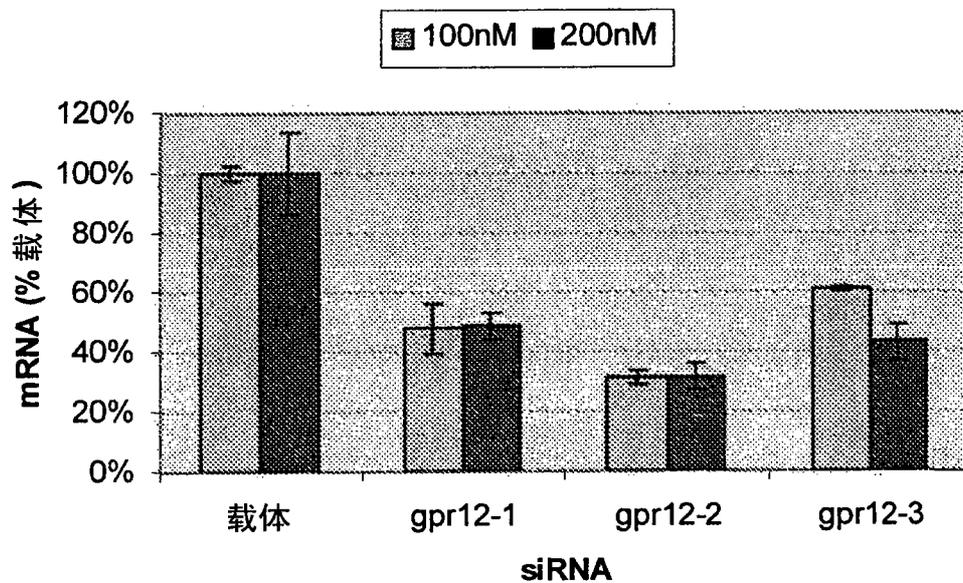
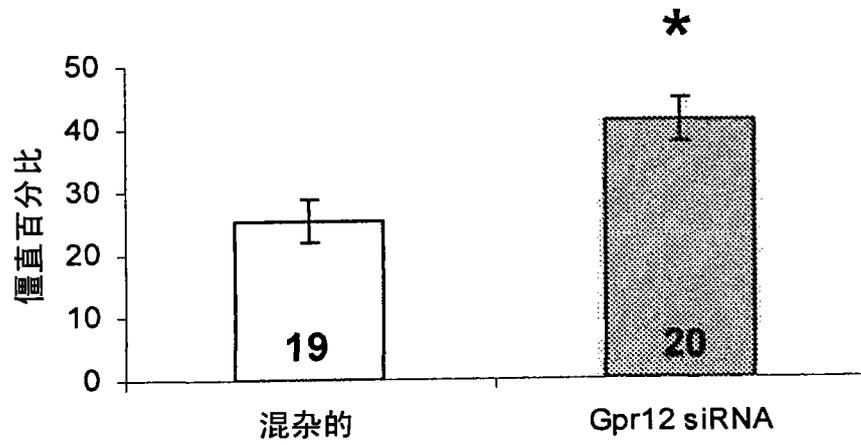


图 3

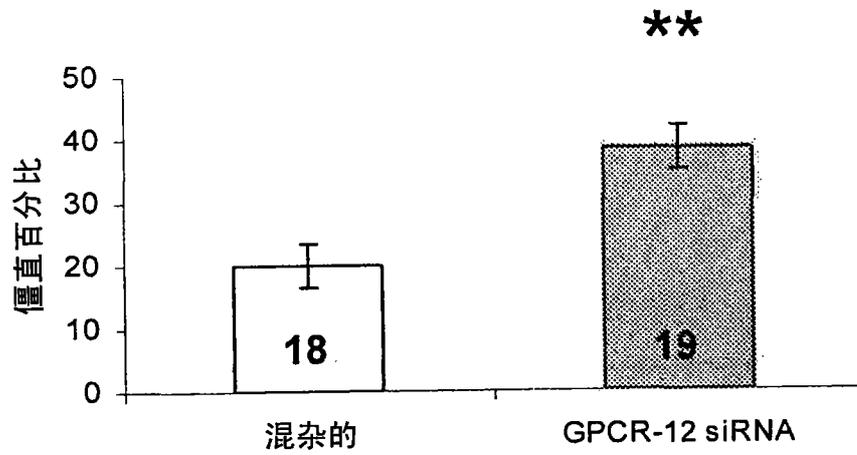
A

海马内Gpr12 siRNA增强情景记忆



B

杏仁核内Gpr12 siRNA增强情景记忆



海马 (A) 和杏仁核 (B) 中Gpr12敲低对情景恐惧记忆的影响

图 4

海马内GPCR-12 siRNA增强痕迹记忆

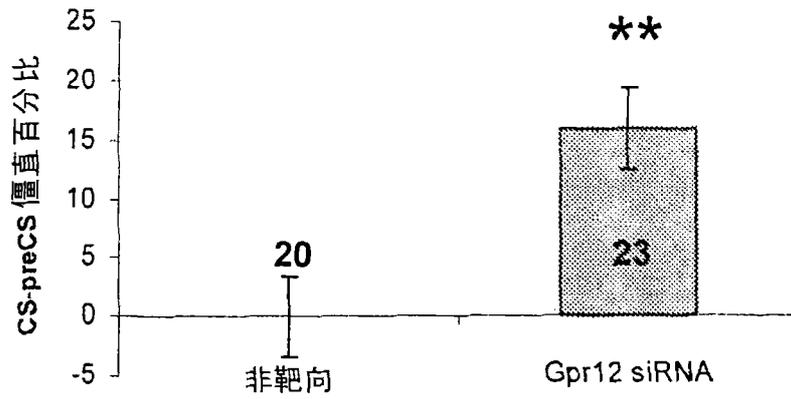
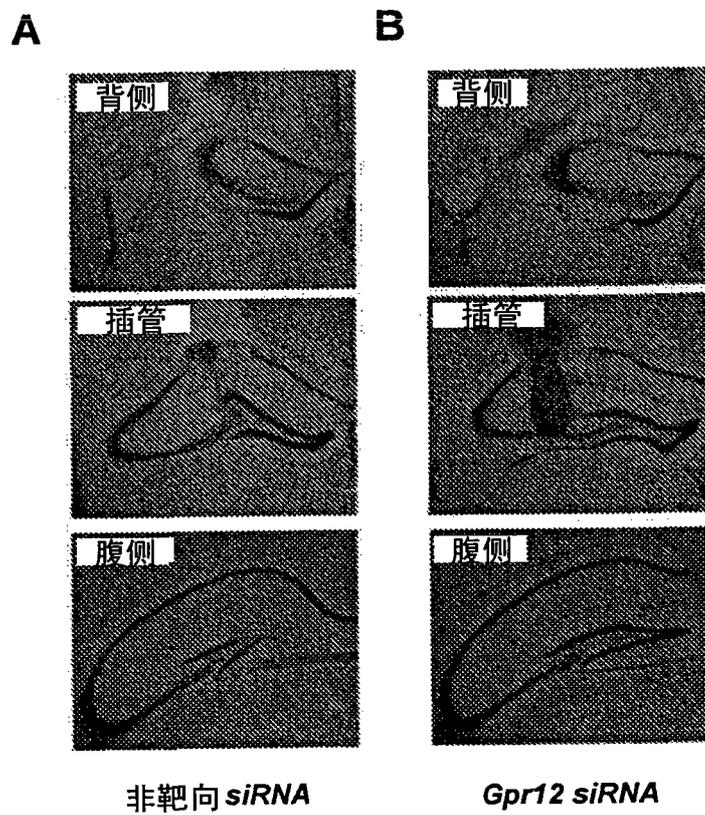


图 5



非靶向和Gpr12 siRNA灌注的海马的Nissl染色。示出插管插入位点的海马切片背侧和腹侧。

图 6

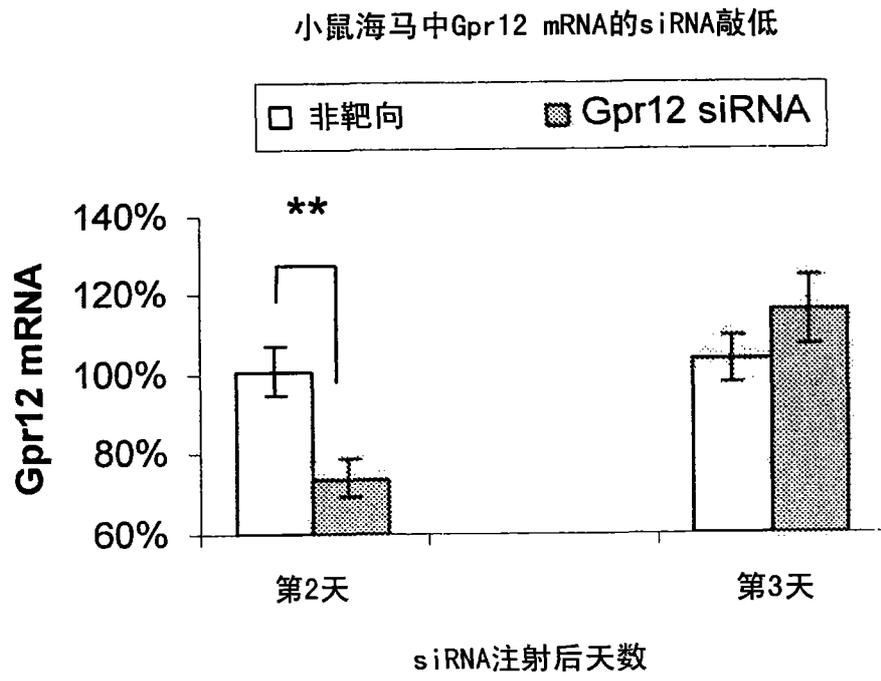
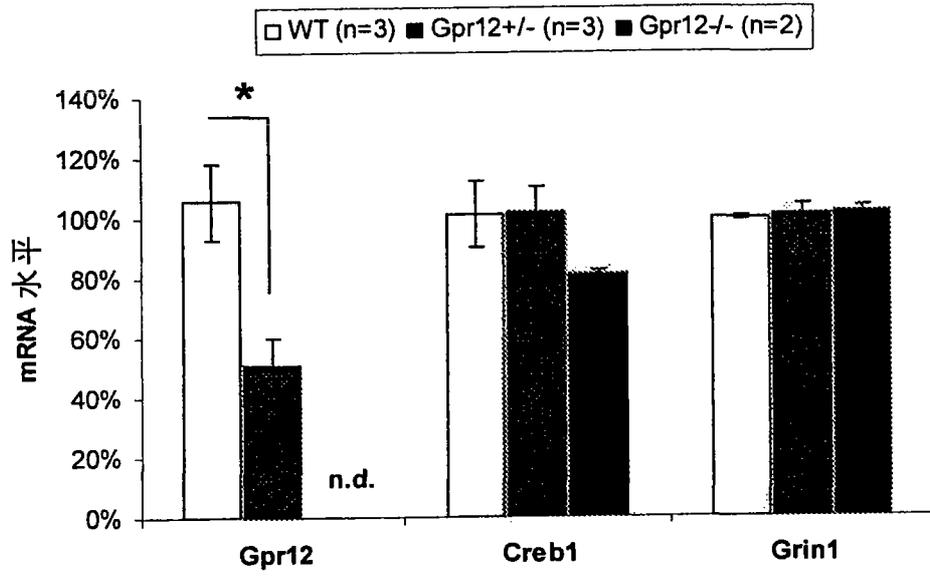


图 7

A

Gpr12 KO动物海马中mRNA水平



B

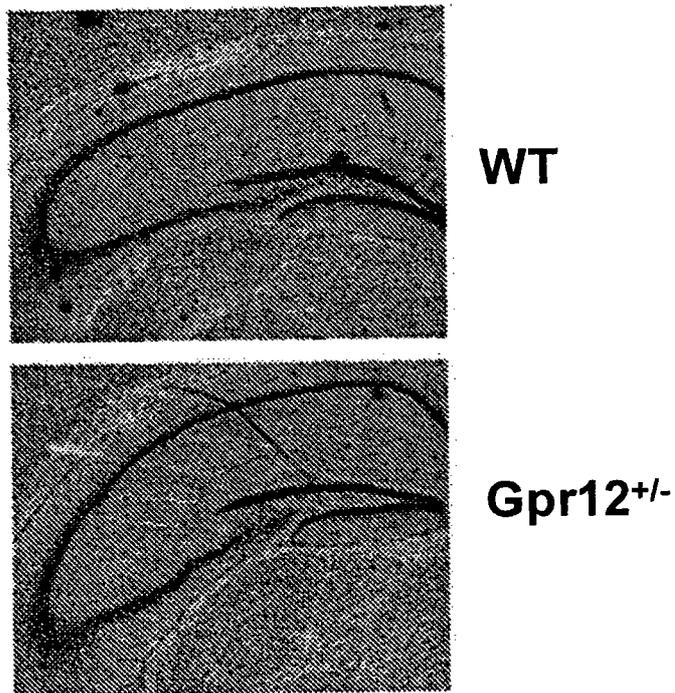
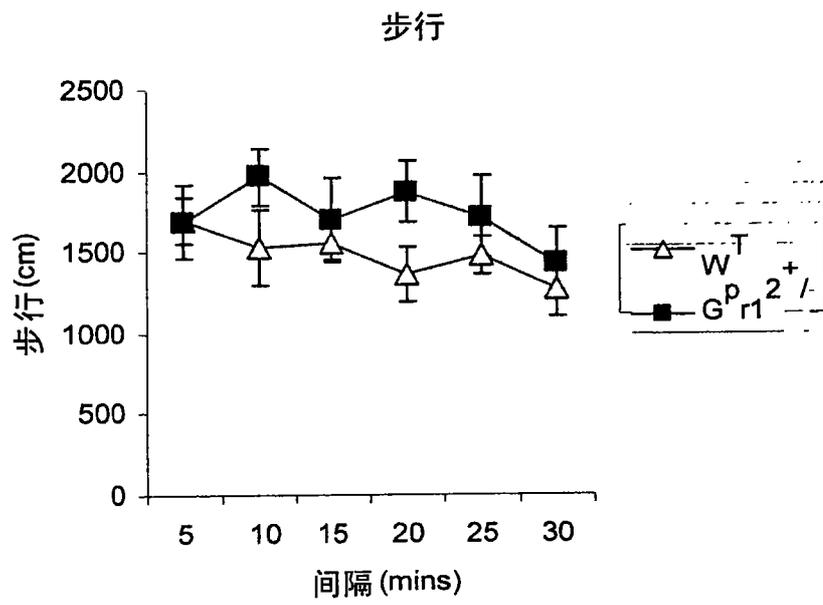


图 8

A



B

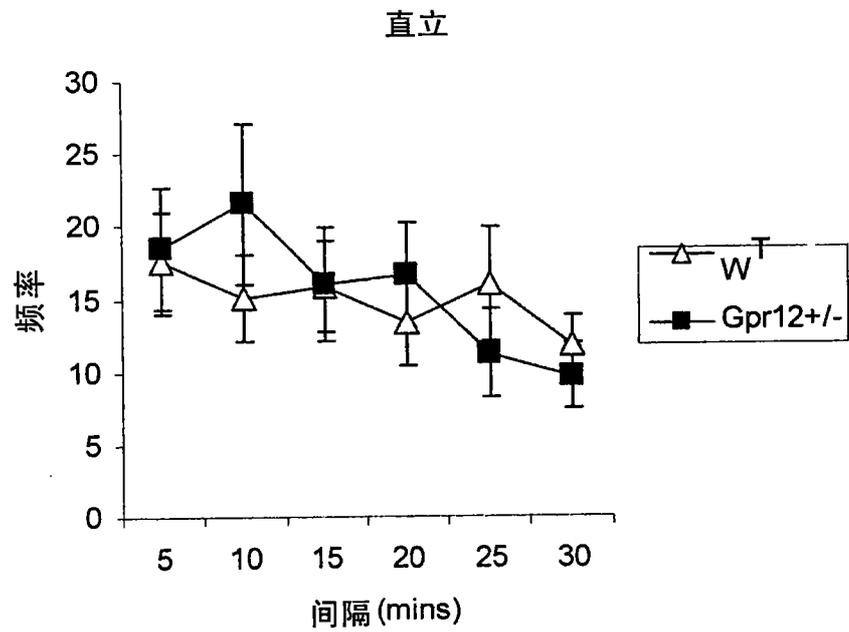


图 9

24h NOR 记忆

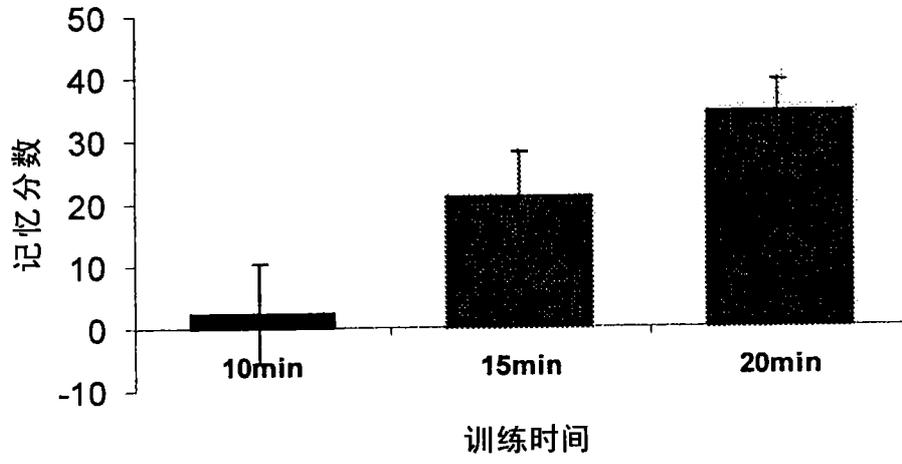


图 10

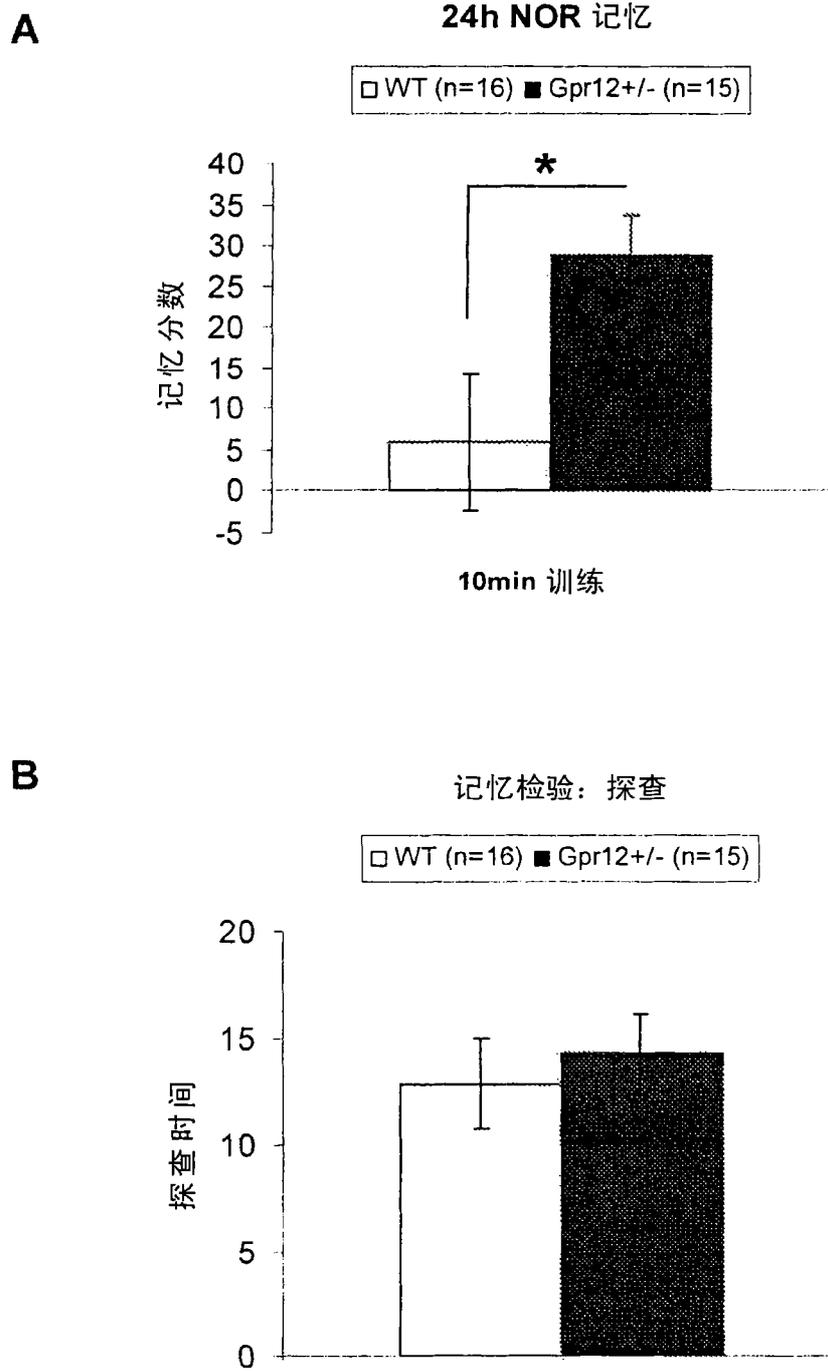


图 11

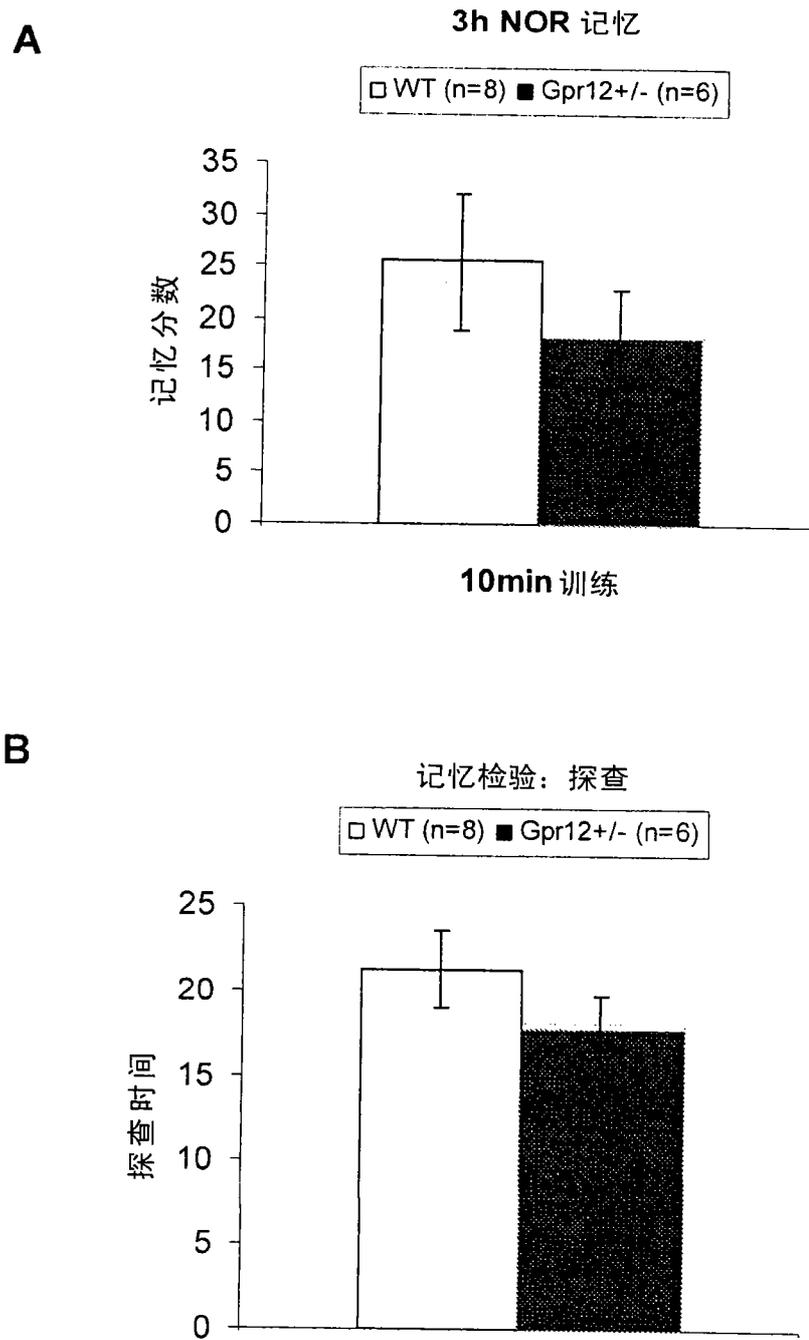


图 12