



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112426538 A

(43) 申请公布日 2021.03.02

(21) 申请号 202011042171.2

(22) 申请日 2012.08.02

(30) 优先权数据

61/514954 2011.08.04 US

(62) 分案原申请数据

201280048952.X 2012.08.02

(71) 申请人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特邮箱95号

(72) 发明人 阿隆.陈 埃兰.霍恩施泰因

欧娜.艾斯勒 沙伦.哈拉马蒂

纳马.福尔克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 林毅斌

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/20 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

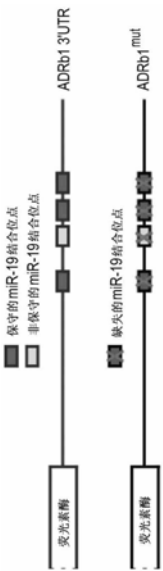
权利要求书1页 说明书62页  
序列表30页 附图71页

(54) 发明名称

微RNA和包含微RNA的组合物

(57) 摘要

本发明涉及微RNA和包含微RNA的组合物。本发明提供了用于治疗与五羟色胺-、肾上腺素-、去甲肾上腺素-、谷氨酸-和促肾上腺皮质激素-释放激素相关的病症的微RNA以及包含微RNA的组合物。



1. miR-19、其前体、编码所述miR-19或所述其前体的外源性多核苷酸、或修饰的miR-19在制造药物中的应用,所述药物经确定用于治疗其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中将所述miR-19、其前体、或编码所述miR-19或所述其前体的外源性多核苷酸在顺式作用调控元件的转录控制下包含在核酸构建体中。

3. 根据权利要求2所述的应用,其中所述顺式作用调控元件在神经胶质细胞或心肌细胞中是活性的。

4. 根据权利要求2或3所述的应用,其中将所述核酸构建体包含在分离的细胞中。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的应用,其中所述miR-19阐述于SEQ ID NO: 72-76。

6. 根据权利要求1所述的应用,其中所述病症选自应激、焦虑、记忆受损和心脏病。

7. 根据权利要求1所述的应用,其中所述修饰的miR-19包含主链修饰。

8. 根据权利要求7所述的应用,其中所述主链修饰选自修饰的核苷间键和修饰的碱基。

9. 根据权利要求7或8所述的应用,其中所述主链修饰包含选自以下的修饰:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基磷酸酯、烷基磷酸酯、手性磷酸酯、亚磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯、硼烷代磷酸酯、磷酸二酯、肽核酸(PNA)、2'-O-甲氧基乙基、2'-O-甲基和2'-氟。

10. 根据权利要求1所述的应用,其中所述修饰的miR-19包含在糖和核苷间键两者上的修饰。

11. 一种多核苷酸,其包含miR-19或其前体,其中所述miR-19包含选自修饰的主链、修饰的核苷间键和修饰的碱基的修饰。

12. 一种核酸构建体,其包含编码miR-19或其前体的核酸序列,所述核酸序列在顺式作用调控元件的转录控制下。

13. 一种药物组合物,其包含根据权利要求11所述的多核苷酸或根据权利要求12所述的核酸构建体以及药用载体或稀释剂。

## 微RNA和包含微RNA的组合物

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2012年8月2日,申请号为201710223993.2,发明名称为“微RNA和包含微RNA的组合物”。

### 技术领域

[0002] 本发明在其一些实施方式中涉及微RNA (microRNA),并且更具体地但不排他地,涉及使用微RNA用于疾病诊断、治疗和监测治疗。

### 背景技术

[0003] 情绪失调如重性抑郁症 (major depression) 是世界范围内最常见和激增的健康问题中的一些问题,其影响约10%的人口。尽管几十年的研究,但抑郁发作、易感性和可用治疗背后的机制仅部分了解。目前仅约三分之一的患者响应于现有的治疗方法,因此,非常需要更好了解病理学。目前的关于抑郁的病因学的学说是在环境因素和遗传易感性之间的复杂的相互作用,提示表观遗传过程的作用机理。

[0004] 五羟色胺 (5HT) 是在脑中由中缝核 (RN) 产生的单胺类神经递质,中缝核在整个脑部广泛突出以调节多种认知、情感和生理功能。在失调的血清素能活性和抑郁之间的关联是公认的 [Michelsen KA. et al., Brain Res Rev (2007) 55 (2) :329-42]。在抑郁中,5HT的水平、以及负责它的生产、分泌、再摄取和失活的遗传环是失调的。此外,目前大多数可用的抗抑郁药物靶向与5HT系统相关蛋白的功能,使得在突触中提高的5HT水平 [Krishnan V and Nestler EJ, Nature (2008) 455:894-902]。可用的疗法需要在观测到症状的缓解以前长期给予。

[0005] 微RNA (miR) 是转录后抑制基因表达的内源性小 (约22个核苷酸) RNA分子的子集。MiR被转录为初级miR分子,它们在细胞核中被加工成具有茎环结构的前体miR,其被输出到细胞质,此处它们被进一步加工成活性的成熟miR。成熟miR随后被并入RNA诱导的沉默复合体并主要通过结合于特异性mRNA分子的3' 非翻译区 (3' UTR) 来发挥作用。借助于种子序列产生结合,种子序列在miR的5' 端的6-8个核苷酸序列,其碱基配对于在靶mRNA 3' UTR上的互补性种子匹配序列。miR的结合导致直接的mRNA失稳或翻译抑制,最终导致降低的靶基因蛋白水平。

[0006] MiR在神经系统中是丰富的,并且最初的研究已主要致力于在发育、癌症和神经变性疾病以及正常过程如可塑性的情况下的神经元 [Kosik KS. Nat Rev Neurosci (2006) 7: 911-20]。另外,已经表明,在人和小鼠模型中,miR在精神障碍如精神分裂症、自闭症以及抑郁和焦虑中发挥作用 [Miller BH and Wahlestedt C, Brain Res (2010) 1338:89-99]。几项研究最近已表明,miR参与调节与5HT相关的基因 [Millan MJ. Curr Opin Pharmacol (2011) 11 (1) :11-22],其揭示了miR在5HT系统的调节中的新出现的作用以及它们的与抑郁相关障碍的潜在关系。

[0007] 美国专利申请号US 20100222413 (授权给Stoffel M. et al.) 公开了用于调节微RNA的表达的化学修饰寡核苷酸。US 20100222413进一步公开了用于沉默微RNA (例如miR-

122、miR-16、miR-192和miR-194) 用于治疗中枢神经系统的疾病的方法。

## 发明内容

[0008] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了用于治疗其中在需要其的受试者中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者,或在受试者的细胞中表达编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸,从而治疗病症,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-26和miR-182组成的组。

[0009] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸在制造确定用于治疗其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症的药物中的应用,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-26和miR-182组成的组。

[0010] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了用于在需要其的受试者的突触间隙中提高五羟色胺水平的方法,该方法包括将编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在五羟色胺能神经元中表达编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸,从而提高在突触间隙中五羟色胺水平,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-26和miR-182组成的组。

[0011] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含在顺式作用调控元件的转录控制下表达至少一种微RNA或其前体的核酸构建体的分离的神经胶质细胞,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-26和miR-182组成的组。

[0012] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码至少一种微RNA或其前体的分离的多核苷酸,用于治疗其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-26和miR-182组成的组。

[0013] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码miR-19或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码miR-19或其前体的外源性多核苷酸,从而治疗病症。

[0014] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码miR-19或其前体的外源性多核苷酸在制造确定用于治疗其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症的药物中的应用。

[0015] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含核酸构建体的分离的细胞,该核酸构建体在顺式作用调控元件的转录控制下表达miR-19或其前体。

[0016] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码miR-19或其前体的分离的多核苷酸,用于治疗其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症。

[0017] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中低促肾上腺皮质素释放激素 (CRH) 水平是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码miR-15或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码miR-15或其前体的外源性多核苷酸,从而治疗病症。

[0018] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码miR-15或其前体的外源性多核苷酸在制造确定用于治疗其中低促肾上腺皮质素释放激素 (CRH) 水平是治疗上有益的病



症的药物中的应用。

[0019] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含核酸构建体的分离的细胞,该核酸构建体在顺式作用调控元件的转录控制下表达miR-15或其前体。

[0020] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码miR-15或其前体的分离的多核苷酸,用于治疗其中低促肾上腺皮质素释放激素 (CRH) 水平是治疗上有益的病症。

[0021] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码miR-181或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码miR-181或其前体的外源性多核苷酸,从而治疗病症。

[0022] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码miR-181或其前体的外源性多核苷酸在制造确定用于治疗其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症的药物中的应用。

[0023] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含核酸构建体的分离的细胞,该核酸构建体在顺式作用调控元件的转录控制下表达miR-181或其前体。

[0024] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了编码miR-181或其前体的分离的多核苷酸,用于治疗其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症。

[0025] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含编码微RNA或其前体的核酸序列的核酸构建体,其中微RNA或其前体选自由miR-135、miR-335、miR-26、miR-27、miR-181、miR-182、miR-19和miR-15组成的组,上述核酸序列是在顺式作用调控元件的转录控制下。

[0026] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含本发明的核酸构建体和药用载体或稀释剂的药物组合物。

[0027] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了用于在神经胶质细胞中调节色氨酸羟化酶2 (Tph2) 基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整微RNA或其前体的活性或表达从而调节Tph2基因的表达,其中微RNA选自由miR-181和miR27组成的组。

[0028] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了用于在神经胶质细胞中调节谷氨酸受体基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-181或其前体的活性或表达,从而调节谷氨酸受体基因的表达。

[0029] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含核酸序列的分离的多核苷酸,用于下调miR-181、miR-27或其前体的表达。

[0030] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了包含用于下调微RNA或其前体的表达的核酸序列的核酸构建体,其中微RNA或其前体选自由miR-181和miR-27组成的组,核酸序列是在顺式作用调控元件的转录控制下。

[0031] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节五羟色胺转运蛋白 (Slc6a4) 基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整微RNA或其前体的活性或表达,其中微RNA选自由miR-135和miR-335组成的组,从而调节Slc6a4基因的表达。

[0032] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节五羟色胺抑制性受体1a (Htr1a) 基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整微RNA或其前

体的活性或表达,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-181、miR-182和miR-26组成的组,从而调节Htr1a基因的表达。

[0033] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节唐氏综合症细胞粘附分子(Dscam)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-182或其前体的活性或表达,从而调节Dscam基因的表达。

[0034] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节细胞粘附分子L1(L1cam)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-182或其前体的活性或表达,从而调节L1cam基因的表达。

[0035] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节Translin相关蛋白X(Tsnax)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-182或其前体的活性或表达,从而调节Tsnax基因的表达。

[0036] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节单胺羟化酶(MaoA)基因的表达的方法,该方法包括调整miR-27的活性或表达,从而调节MaoA基因的表达。

[0037] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞或心肌细胞中调节β肾上腺素能受体1(Adrb1)基因的表达的方法,该方法包括调整miR-19的活性或表达,从而调节Adrb1基因的表达。

[0038] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节大麻素受体1(CB1)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-19或其前体的活性或表达,从而调节CB1基因的表达。

[0039] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节CRH 1型受体基因的表达的方法,该方法包括调整miR-15的活性或表达,从而调节CRH 1型受体基因的表达。

[0040] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节FK506结合蛋白5(FKBP5)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-15或其前体节的活性或表达,从而调节FKBP5基因的表达。

[0041] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节突触趋化素1a(Syntaxin 1a)(Stx1a)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-15或其前体的活性或表达,从而调节Stx1a基因的表达。

[0042] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节血清/糖皮质激素调节激酶(Sgk1)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-15或其前体的活性或表达,从而调节Sgk1基因的表达。

[0043] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在神经胶质细胞中调节β2肾上腺素能受体(Adrb2)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调整miR-15或其前体的活性或表达,从而调节Adrb2基因的表达。

[0044] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了监测抗抑郁药的治疗的方法,该方法包括:(a)用抗抑郁药治疗需要其的受试者;以及(b)在治疗之前和在治疗后,测量受试者的血液中miR-135的表达水平,其中,与在用抗抑郁药进行治疗之前miR-135的表达水平相比,在用抗抑郁药进行治疗后miR-135的较低表达水平表示有效治疗。

[0045] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了在需要其的受试者中诊断五羟色胺相关病症的方法,该方法包括在受试者的血液中测量miR-135的表达水平,其中,与在健康受试者的血液样品中的miR-135的表达水平相比,miR-135的高表达水平表示五羟色胺相关病症。

[0046] 根据本发明的一些实施方式,细胞是神经胶质细胞。

[0047] 根据本发明的一些实施方式,神经胶质细胞是五羟色胺能神经元。

[0048] 根据本发明的一些实施方式,miR-135如在SEQ ID NO:58至SEQ ID NO:62所阐述的。

[0049] 根据本发明的一些实施方式,miR-335是如在SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:64中所阐述的。

[0050] 根据本发明的一些实施方式,miR-26是如在SEQ ID NO:65至SEQ ID NO:69中所阐述的。

[0051] 根据本发明的一些实施方式,miR-182是如在SEQ ID NO:70至SEQ ID NO:71中所阐述的。

[0052] 根据本发明的一些实施方式,病症选自由抑郁、焦虑、应激、疲劳、认知功能受损、惊恐发作、强迫行为、成瘾性、社交恐怖症、睡眠障碍、食物相关障碍、生长障碍以及生殖障碍组成的组。

[0053] 根据本发明的一些实施方式,当微RNA是miR-135时,病症是抑郁或焦虑。

[0054] 根据本发明的一些实施方式,细胞是神经胶质细胞或心肌细胞。

[0055] 根据本发明的一些实施方式,miR-19是如在SEQ ID NO:72至SEQ ID NO:76中所阐述的。

[0056] 根据本发明的一些实施方式,病症选自由应激、焦虑、记忆缺陷和心脏病组成的组。

[0057] 根据本发明的一些实施方式,miR-15是如在SEQ ID NO:77至SEQ ID NO:80中所阐述的。

[0058] 根据本发明的一些实施方式,病症选自由抑郁、焦虑、应激、疲劳、认知功能受损、惊恐发作、强迫行为、成瘾性、社交恐怖症、睡眠障碍、食物相关障碍、生长障碍和生殖障碍组成的组。

[0059] 根据本发明的一些实施方式,在神经胶质细胞中并在顺式作用调控元件的转录控制下多核苷酸是活性的。

[0060] 根据本发明的一些实施方式,在心肌细胞中并在顺式作用调控元件的转录控制下多核苷酸是活性的。

[0061] 根据本发明的一些实施方式,miR-181是如在SEQ ID NO:85至SEQ ID NO:94中所阐述的。

[0062] 根据本发明的一些实施方式,病症选自由癫痫发作、亨廷顿病、精神分裂症、脆性X综合征、广泛性焦虑障碍和癌症组成的组。

[0063] 根据本发明的一些实施方式,在神经胶质细胞或心肌细胞中,顺式作用调控元件是活性的。

[0064] 根据本发明的一些实施方式,受试者是人受试者。

[0065] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括上调Tph2基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中下调miR-181和/或miR-27。

[0066] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞中并在miR-181和/或the miR-27下调后测量Tph2基因的表达。

[0067] 根据本发明的一些实施方式,谷氨酸受体基因选自由代谢型谷氨酸受体1 (Grm1)、谷氨酸受体离子型红藻氨酸3 (Grik3)、代谢型谷氨酸受体5 (Grm5)、谷氨酸受体离子型红藻氨酸2 (Grik2) 和代谢型谷氨酸受体7 (Grm7) 组成的组。

[0068] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调Slc6a4基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中上调miR-135和/或miR-335。

[0069] 根据本发明的一些实施方式,上述方法进一步包括在神经胶质细胞中在上调miR-135和/或miR-335后测量Slc6a4基因的表达。

[0070] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调Htr1a基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中上调miR-135,miR-335,miR-181,miR-182和/或miR-26。

[0071] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞中在上调miR-135、miR-335、miR-181、miR-182和/或miR-26后测量Htr1a基因的表达。

[0072] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调MaoA基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中上调miR-27。

[0073] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞中在上调miR-27后测量MaoA基因的表达。

[0074] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调Adrb1基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞或心肌细胞中上调miR-19。

[0075] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞或心肌细胞中在上调miR-19后测量Adrb1基因的表达。

[0076] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调CB1基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中上调miR-19。

[0077] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞中在上调CB1后测量CB1基因的表达。

[0078] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调CRH 1型受体基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中上调miR-15。

[0079] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞中在上调miR-15后测量CRH 1型受体基因的表达。

[0080] 根据本发明的一些实施方式,当调节包括下调FKBP5基因的表达时,调节包括在神经胶质细胞中上调miR-15。

[0081] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在神经胶质细胞中在上调miR-15后测量FKBP5基因的表达。

[0082] 根据本发明的一些实施方式,方法进一步包括在治疗之前从受试者获得血液样品。

[0083] 根据本发明的一些实施方式,抗抑郁药选自由选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、三环类抗抑郁药和去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI) 组成的组。

[0084] 根据本发明的一些实施方式,五羟色胺相关病症是精神病症。

[0085] 根据本发明的一些实施方式,精神病症选自抑郁、焦虑、应激、疲劳、认知功能受损、惊恐发作、强迫行为、成瘾性、社交恐怖症、睡眠障碍和食物相关障碍组成的组。

[0086] 根据本发明的一些实施方式,miR-135包括miR-135a或miR-135b。

[0087] 除非另有定义,本文中所使用的所有技术和/或科学术语具有如与本发明相关的领域中的技术人员通常理解的相同含义。尽管类似于或等同于本文描述的那些方法和材料的方法和材料可以用于本发明的实施方式的实施或测试,但以下描述示例性的方法和/或材料。在冲突的情况下,以本专利说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。

## 附图说明

[0088] 本文仅通过举例的方式并参照附图来描述本发明的一些实施方式。现在详细地具体参照附图,需要强调的是,示出的细节是通过举例的方式和为便于本发明的实施方式的说明性讨论。在这方面,连同附图一起的描述使得本领域技术人员明了可以如何实施本发明的实施方式。

[0089] 在附图中:

[0090] 图1A-图1I示出微RNA在五羟色胺(5HT)神经元中的表达。图1A是在5HT神经元中差异表达的miRNA的图示说明。Lowess归一化值被描述为斑点强度相对于平均对数强度的ln2倍数变化(MA图);图1B是miR实时PCR的阵列结果的确认,表明与对照相比,在5HT神经元中,miR-375的水平的提高。n=5个5HT细胞,n=4个非5HT。条表示平均值±s.e.m.\*\*P=0.0071;图1C是miR实时PCR的阵列结果的确认,表明与对照相比在5HT神经元中miR-135a的降低水平。N=5个5HT细胞,n=4个非5HT。\*\*P=0.0075;图1D是代表针对Slc6a4的交叉生物信息学预测的维恩图(van图,van diagram),其中具有5HT微阵列结果并且列出选择用于体外测试的miR;图1E是代表针对Htr1a的交叉生物信息学预测的维恩图,其中具有5HT微阵列结果以及并且列出选择用于体外测试的miR;图1F是代表针对Tph2的交叉生物信息学预测的维恩图,其中具有5HT微阵列结果并且列出选择用于体外测试的miR;图1G是代表针对MaoA的交叉生物信息学预测的维恩图,其中具有5HT微阵列结果并且列出选择用于体外测试的miR;图1H是说明荧光素酶报告基因分析结果的图形,表明miR-181c和miR-27b可以靶向Tph2 3'UTR;以及图1I是说明荧光素酶报告基因分析结果的图形,表明miR-27b可以靶向Htr1a MaoA。

[0091] 图2A-图2H示出靶向Slc6a4 3'UTR(SEQ ID NO:25)和Htr1a 3'UTR(SEQ ID NO:27)的微RNA。图2A示出靶向Slc6a4 3'UTR的miR-135a和miR-135b(分别为SEQ ID NO:24和26);图2B示出靶向Htr1a 3'UTR的miR-135a和miR-135b(分别为SEQ ID NO:24和26);图2C是说明荧光素酶报告基因分析结果的图形,表明miR-135a和miR-135b可以靶向Slc6a4 3'UTR。荧光素酶分析数据示出海肾荧光素酶活性,其归一化到在用所描述的基因的3'UTR和空白载体或过表达特定miR的载体转染的HEK293细胞中共转染的萤火虫荧光素酶报告基因的活性。条表示平均值±s.e.m.\*P=0.014,\*\*\*P=0.0002,对于miR-16#,p<0.0535,对于miR-27#,P=0.0967;图2D是说明荧光素酶报告基因分析结果的图形,表明miR-135a、miR-135b、miR-335、miR-181c和miR-26a可以靶向Htr1a 3'UTR。\*\*\*P<0.0001,\*\*P=0.0029;图

2E示出对于miR-135 (SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:41) 的种子匹配的slc6a4 3'UTR保守区;图2F示出用于miR-135 (SEQ ID NO:42-SEQ ID NO:54) 的Htr1a 3'UTR种子匹配,表明种子1仅出现于小鼠3'UTR中,并且种子2是高度保守的;图2G是说明在slc6a4 3'UTR中miR-135种子匹配的突变阻断miR-135a和miR-135b的阻遏效应的图形。\*\*\* $P < 0.0001$ ,\*\* $P = 0.0032$ ;以及图2H是说明单独和两者一起地在Htr1a 3'UTR中miR-135种子匹配的突变的图形,表明miR-135b通过两个种子匹配靶向Htr1a,而miR-135a仅由种子2靶向Htr1a。\*\*\* $P < 0.0001$ 。

[0092] 图3A-图3J示出在不同条件下miR-135a和miR-135b的水平。图3A是说明在急性应激后在RN中miR-135a水平的下降调节的图形。条表示平均值 $\pm$ s.e.m。(在第0组中 $n=8$ ,在第90组中 $n=10$ ,以及在第24组中 $n=9$ ) \*\*\* $P < 0.0001$ ,\* $P = 0.0357$ ;图3B是说明在急性应激后在RN中miR-135b水平的下降调节的图形。\*\*\* $P < 0.0001$ ,\*\* $P = 0.0055$ ;图3C是说明在急性慢性丙咪嗪给予(其独立自小鼠是否暴露于社交失败(social defeat))后在RN中miR-135a水平的上升调节的图形。(对照慢性盐水和对照慢性丙咪嗪, $n=8$ ;急性丙咪嗪, $n=7$ ;社交失败慢性盐水, $n=11$ ;社交失败慢性丙咪嗪, $n=9$ ) \*\* $P = 0.003$ ;图3D是说明在急性慢性丙咪嗪给予(其独立自小鼠是否暴露于社交失败)后在RN中miR-135b水平的上升调节的图形。\*\*\* $P = 0.0093$ ;图3E是说明在急性或慢性给予SSRI、以及不是NRI或盐水后在RN中miR-135a水平的升高的图形。(在每个组中 $n=8$ ,除了急性盐水 $n=7$ ) \*\*\* $P < 0.0001$ ;图3F是说明在急性或慢性给予SSRI或NRI后在RN中未改变的miR-135b水平的图形;图3G是表明当与对照相比时,在接受慢性或急性SSRI的小鼠的血浆中miR-135a水平的降低的图形。(在每个组中 $n=8$ ,除了慢性SSRI和NRI  $n=7$ ) \*\* $P = 0.0004$ ,对于急性SSRI,与急性盐水相比,并且\*\* $P = 0.0006$ ,对于慢性SSRI,与慢性盐水相比;图3H是表明当与对照相比时,在接受慢性或急性SSRI的小鼠的血浆中未改变的miR-135b水平的图形;图3I是显示与血浆相比,在RN中的单个小鼠miR-135a水平的散点图形,表明在接受SSRI或盐水治疗的小鼠中的反向相关性;以及图3J是显示与对照相比,在接受SSRI治疗的小鼠中在RN和血浆中的miR-135b水平之间没有相关性的散点图形。

[0093] 图4A-图4H示出miR-135b的体内过表达。图4A是用于过表达miR-135b的慢病毒的示意图;图4B是说明实时PCR结果的图形,表明在成年小鼠的中缝背核(DRN)中体内过表达miR-135b。条表示平均值 $\pm$ s.e.m。(GFP注射, $n=5$ ,以及miR-135OE, $n=3$ )  $P = 0.0032$ ;图3C-D示出DRN注射部位,其中通过在注射部位处展示GFP染色。(断面图采用自Paxinos);图4E是表明与对照小鼠相比,在过表达miR-135b的小鼠中,在强迫游泳测试中在RN中降低的固定状态时间的图形。(对照, $n=9$ ,miR-135, $n=9$ )  $P = 0.0088$ ,在3分钟中,以及 $P = 0.00330$ ,4分钟;图4F是表明与对照小鼠相比,在悬尾实验中,在过表达miR-135b的小鼠中,在RN中减少的固定状态时间的图形。 $P = 0.07351$ ;图4G-图4H是表明与对照相比,在饲养笼运动中,在过表达miR-135b的小鼠中,在RN中没有差异的图形。

[0094] 图5示出根据荧光素酶基因克隆的ADRB13'UTR。图解:完整ADRB1 3'UTR(顶部),包含4个miR-19结合位点,以及ADRB13'UTR的突变形式(底部),缺少所有4个miR-19结合位点,克隆至在Psicheck2质粒中的荧光素酶基因的下游。

[0095] 图6A-图6E示出miR-19b通过在它的3'UTR上的种子匹配靶向ADRB1 3'UTR;图6A-图6B是说明在HT22细胞中测得的归一化荧光素酶水平的图形,其中上述细胞在用GFP质粒(图6A)或pre-miR-19b过表达(OE)质粒(图6B)转染后表达低内源性miR-19水平;图6C-图6E

是说明在表达高内源性miR-19水平的HEK293T细胞中测得的归一化荧光素酶水平的图形。用对照质粒(图6C),miR-19b敲除(KD)探针(图6D)或杂乱探针(scrambled probe)作为对照转染,以及miR-19b miArrest质粒(图6E)或对照miArrest质粒转染。\*\*\* $P < 0.005$ 。通过萤火虫荧光素酶表达水平来归一化海肾荧光素酶活性并表示为在有对照处理存在的条件下通过Adrb1-3'UTR的突变形式(Adrb1-mut)实现的活性的比率。

[0096] 图7A-图7D示出在杏仁核(amygdale)中miRNA的差异表达。图7A-图7B是表明在杏仁核中在急性应激后90分钟miRNA的差异表达的图形。图7A示出安捷伦(agilent)阵列结果。图7b示出affymetrix阵列结果。归一化值被描述为斑点强度相对于跨越条件( $N=2,2$ )的平均强度的log2比率(应激vs.对照)。每种miRNA的强度被计算为跨越生物学重复的平均归一化强度。miR-15a和miR-15b显示为红色。miR-124(其是并不受到应激方案影响的已确认的神经元标记)显示为白色;图7C示出,miR-15a和miR-15b具有对促肾上腺皮质素释放激素1型受体3'UTR[CRHR1,改变(adapt)自targetscan(dot)org]的半保守种子匹配;以及图7D是说明在用miR-15b-EGFP过表达质粒或GFP表达质粒和荧光素酶报告基因质粒(由CRFR1-3'UTR对照(控制,controlled))共转染的HEK293T细胞中测得的荧光素酶活性。通过萤火虫荧光素酶表达水平来归一化海肾荧光素酶活性。

[0097] 图8是说明荧光素酶报告基因分析结果的图形,表明miR-182可能靶向Htr1a 3'UTR。荧光素酶分析数据示出海肾荧光素酶活性,其归一化到在用所描述的基因的3'UTR和空白载体或过表达特定miR的载体转染的HEK293细胞中共转染萤火虫荧光素酶报告基因的活性。

[0098] 图9是说明在成年小鼠DRN中miR-182表达水平的实时PCR结果的图形,表明在慢性社交失败后降低的表达的趋势。数据表示平均值 $\pm$ SEM,对照 $n=7$ 而在社交失败组中18只小鼠, $\# = p = 0.1$ 。

[0099] 图10是代表对miR-182靶的计算机模拟(在硅上,in silico)生物信息学预测(两种算法)的维恩图,以及与在此预测中出现的正常和病理性神经元功能高度相关的潜在靶基因的列表。

[0100] 图11A-图11C示出miR-182的过表达或敲除。图11A是用于过表达miR-182的慢病毒的示意图;图11B是说明实时PCR结果的图形,表明在N2A细胞系中体外过表达miR-182;并且图11C是用于敲除miR-182的慢病毒的示意图。

[0101] 图12A-图12D示出在给予NRI后在PFC中的miR-19水平。急性(一次)或慢性(18天)给予NRI瑞波西汀。值得注意的,在急性给予NRI后,在PFC中,miR-19a和miR-19b水平降低(分别地图12A和图12B),但在慢性给予NRI后则升高(分别地图12C和图12D)。

[0102] 图13A-图13D示出,在经受社交失败的小鼠的PFC和杏仁核中miR-19的水平。在来自获自小鼠(其经受社交失败范例)的杏仁核的样品中测量miR-19a和miR-19b水平。值得注意的是,相对于对照小鼠,在归类为对社交失败“易感”的小鼠中,在PFC中,miR-19a和miR-19b水平升高(分别为图13A和图13B)。相对于对照小鼠,在归类为对社交失败“易感”的小鼠的杏仁核中miR-19水平也升高(分别为图13C和图13D)。

[0103] 图14示出靶向CB1 3'UTR的miRNA-19b。用CB1 3'UTR和过表达miR-19b或GFP对照的质粒转染HT-22细胞导致归一化荧光素酶水平降低50%。

[0104] 图15A-图15B是小鼠脑的冠状断面的示意图。图15A示出在脑中的若干核,包括BLA

(由Paxinos和Franklin改编自(适应自,adapted from)小鼠脑);图15B显示在脑中的CB1分布(适应自Allen Brain Atlas [www.mouse.brain-map.org/](http://www.mouse.brain-map.org/))。值得注意的是,根据这种分布,显而易见的是,在BLA中CB1是丰富的。

[0105] 图16是在杏仁核(BLA)的基底外侧核中记忆巩固的提出的机制的示意图。皮质酮(CORT)结合于尚未表征的膜结合糖皮质激素受体(mbGR),其激活Gs-cAMP/PKA途径以诱导内源性大麻素(eCB)合成。内源性大麻素被释放到突触,在那里它们结合于抑制GABA释放的GABA能末端上的CB1受体。GABA释放的这种抑制会去抑制去甲肾上腺素(NE)释放并增加突触后 $\beta$ -肾上腺素受体的NE激活,从而增加厌恶情绪记忆的固结。

[0106] 图17A-图17B示出在RISC复合体中的Ago2。图17A是在RISC复合体中Ago2的示意图,其介导在miRNA和mRNA之间的相互作用;图17B示出用抗Ago2抗体进行的蛋白印迹分析。如当将用Ago2抗体沉淀一次和用IgG1对照沉淀一次的全脑样品相比较时可以看到,该IP对于Ago2蛋白具有特异性。值得注意的是,对于用IgG1对照沉淀的样品,没有检测到Ago2蛋白。

[0107] 图18A-图18D示出社交回避试验。单独将小鼠放置在迷宫中3分钟以便于适应(图18A和图18B),然后记录并将它们的运动作图。在3分钟后,将新的ICR小鼠放置在紧邻经检查小鼠的室中(图18C和图18D),然后再次记录并将检查小鼠的运动作图。

[0108] 图19A示出在阵列中上调的所选的miRNA的热点图(heatmap)图解。

[0109] 图19B示出在阵列中下调的所选miRNA的热点图图解。

[0110] 图20A-图20B示出来自微阵列结果的miR-15a(图20A)和FKBP5(图20B)的log2表达。每个红点表示阵列的一次重复。对照组(CNT)具有4次重复,“易感”组(SUSC)具有3次重复以及“回弹”(恢复,Resilient)组(RESIL)具有3次重复。黑线表示在每组中重复的平均值。

[0111] 图20C示出小鼠FKBP5的3'UTR序列(获自targetscan.org)。

[0112] 图21A-图21B示出,相对于对照小鼠,在社交失败后,在“易感”小鼠中,杏仁核miR-15a(图21A)和FKBP5(图21B)的水平。值得注意的是,在经受社交失败和表征为“易感”小鼠的杏仁核中miR-15a水平升高(图21A)。在经受社交失败和表征为“易感”小鼠的杏仁核中FKBP5水平降低(图21B)。

[0113] 图22是Stx1a、Sgk1和Adrb2的3'UTR的示意图,各自包含单miRNA-15结合位点。

[0114] 图23示出,相对于对照小鼠,在经受社交失败的小鼠中,杏仁核miR-181的水平。值得注意的是,在经受社交失败的小鼠的杏仁核中miR-181水平升高。

[0115] 图24示出代表miR-181和谷氨酸受体的交叉生物信息学预测的维恩图。

[0116] 图25是miR-181的6种潜在靶标的完整3'UTR的示意图。

[0117] 图26示出在应激后在中缝核中miR182的表达水平。值得注意的是,当在应激后测试24小时时,如通过实时PCR测得的,急性30分钟固定应激导致在RN中miR182的降低的表达水平。\*\*= $P < 0.01$ ;在每组中, $n = 8$ 。

[0118] 图27A-图27C示出荧光素酶报告基因分析的结果,表明miR182靶向DSCAM、L1CAM和TSNAX 3'UTR。图27A说明荧光素酶分析的数据,它们示出海肾荧光素酶活性,其归一化到在用所描的基因的3'UTR和空白载体或过表达特定miR的载体转染的N2a细胞中共转染萤火虫荧光素酶报告基因的活性。在L1cam(图27B)和Tsnax(图27C)3'UTR中miR182种子匹配的突



变阻断miR182的抑制效应。条表示平均值 $\pm$ s.e.m.\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

[0119] 图28A-图28D示出在杏仁核(AMY)和前额皮质(PFC)中miR135的表达。图28A说明,急性SSRI和NRI提高在AMY中的miR135a水平;图28B说明,与盐水相比,通过急性SSRI或NRI给予,在AMY中的miR135b水平被上调;图28C说明,慢性SSRI降低在PFC中的miR135a水平;以及图28D说明,通过急性SSRI或NRI,在PFC中的miR135b水平被上调以及通过慢性SSRI治疗而降低。在每组中, $n=7-8$ ,\* $=P<0.05$ ;\*\* $=P<0.01$ ;\*\*\* $=P<0.0001$ 。

[0120] 图29A-图29B示出在社交失败后在小鼠循环系统中的提高的miR135水平。与对照小鼠相比,在社交失败后两周,在小鼠的血浆中,miR135a(图29A)和miR135b(图29B)水平显著提高(\*\* $=P<0.01$ , $n=7-16$ ,在每组中)。

[0121] 图30A-图30E示出体外和体内miR135 KD的确认。图30A-B示出荧光素酶报告基因分析的结果,表明miR135b KD构建体阻断miR135靶向Htr1a(图30A)和slc6a4(图30B);图30C是miR135bKD和对照病毒载体的示意图;图30D-图30E示出DRN注射部位(图30D,采用自Paxinos),以及图30E是用miR135 KD慢病毒感染的DRN的GFP染色。

[0122] 图31A-图31G示出,在miR135KD小鼠中,增加的焦虑样行为和对SSRI的减弱的响应。图31A示出,在旷场实验(open field test)中,miR135KD小鼠的行为类似于对照小鼠;图31B示出,与对照小鼠相比,在升高脉冲迷宫中,miR135KD小鼠的增加的焦虑样行为;图31C示出,在基础应激条件下,但并不在急性应激后,与对照小鼠相比,在光暗转换测试中,miR135KD小鼠在明室中花费更多时间;图31D示出,在基础应激条件下,但并不在急性应激后,与对照小鼠相比,miR135KD小鼠更多次探访明室;图31E示出,在基础应激条件下,但并不在急性应激后,与对照小鼠相比,miR135KD小鼠在明室中移动较少距离;图31F示出,在基础条件下和在SSRI给予后,在悬尾实验(tail suspension test)中,在miR135KD小鼠和对照小鼠之间没有差异,然而,在两组中,与基础条件相比,在SSRI治疗后,观测到固定状态时间的减少。(图31F-图31G)。在两组中,通过SSRI来减少固定状态时间,然而,与对照相比,在测试的最后2分钟,在miR135KD小鼠中的减少被减弱。 $\sim =p<0.1$ \* $=p<0.05$ ;\*\* $=p<0.01$ ;\*\*\* $=p<0.001$ 。在每组中 $n=10-11$ 。

[0123] 图32是miR135小鼠可诱导过表达系统的示意图。转基因小鼠在miR135a序列和GFP报告基因之前表达两侧装接交互停止(floxed transactional stop)。突变转基因小鼠仅在5-HT ePet阳性细胞中表达miR135a。

[0124] 图33A-图33C示出在5-HT神经元中过表达miR135的小鼠品系的确认。图33A示出,与对照小鼠相比,在miR135OE小鼠的RN中过表达miR135。图33B-图33C示出,在miR135OE小鼠RN中,miR 135靶基因mRNA被下调,Slc6a4(图33B)和Htr1a(图33C)二者均是。 $\# =p<0.1$ \* $=p<0.05$ ;在每组中, $n=4$ 。

[0125] 图34A-图34E示出,在miR135OE小鼠中,在社交失败后,减少的焦虑和抑郁样行为。图34A示出,在旷场实验中,miR135OE小鼠具有减少的焦虑样行为;图34B示出,在光暗转换测试中,与miR135OE小鼠的对照相比,较少的焦虑样行为;图34C示出,在升高脉冲迷宫中,与miR135OE小鼠的对照相比,减少的焦虑样行为;图34D示出,在悬尾实验中,与对照相比,miR135OE小鼠的减少的固定状态时间的倾向;以及图34E示出,在强迫游泳试验中,与对照相比,在miR135OE小鼠中减少的固定状态时间。 $\# =p<0.1$ \* $=p<0.05$ ;\*\* $=p<0.01$  $n=7-11$ ,在每组中。

## 具体实施方式

[0126] 本发明,在其一些实施方式中,涉及微RNA,并且更具体地但不排外地涉及微RNA应用于疾病诊断、监测和治疗。

[0127] 参照附图和随附说明,可以更好地理解本发明的原理和操作。

[0128] 在详细解释本发明的至少一种实施方式以前,应当理解的是,本发明的应用不一定限于在以下描述中陈述的或通过实施例举例说明的详情。能够以各种方式来实施或实践或进行本发明。另外,应当理解的是,本文中采用的短语和术语是为了说明的目的,而不应该被视为限制性的。

[0129] 先前已经确立在失调的血清素能活性和精神障碍如焦虑和抑郁之间的关联,然而尚未完全了解构成这些疾病的基础的分子机制。微RNA(miR)是小RNA分子的子集,其调节转录后基因表达并且在脑中是丰富的。

[0130] 当实施本发明时,本发明的发明人已经发现,特定微RNA(miR)参与五羟色胺(5HT)神经胶质相关基因的调节,并因此涉及调节与异常五羟色胺水平相关的病症如精神障碍。

[0131] 如在下文中以及在接着的实施例部分中所说明的,本发明的发明人确定了在5HT神经元中的miR表达模式,其获自5HT报告小鼠(ePET-YFP)的中缝核(RN),其中利用miR微阵列(参见在接着的实施例部分中的表2A-表2B)。生物信息分析获自阵列的五羟色胺能神经元的独特的miR表达分布以确定miR,其假定靶向关键的血清素能相关基因,如五羟色胺转运蛋白(Slc6a4,图1D)、五羟色胺自身受体(Htr1a,图1E)、色氨酸羟化酶2(Tph2,图1F)以及单胺羟化酶(MaoA,图1G)。进一步体外测试用于这些基因的3'UTR的miRNA靶向,这说明特定miR(例如,miR-135),其特异性地靶向和调节5HT神经元基因(参见图1H-图1I和图2C-图2D)。本发明的发明人已进一步说明了,在急性应激后(图3A-图3D)以及在使用抗抑郁剂治疗后(图3E-图3J),在RN和血浆中的miR-135表达水平被改变。在社交失败后,在成年小鼠的RN中,体内miR-135过表达减少了抑郁样行为(图4A-图4H)。此外,本发明的发明人已经说明了,miR-182作为神经元活性(通过直接抑制Htr1a,图8)和精神病理行为(图9)的活性的调节子的活性以及miR-15作为应激反应的调节子的活性[通过直接抑制CRH1R(图7A-图7B)、FK506结合蛋白5(FKBP5)(图21A-图21B)以及Stx1a、Sgk1和Adrb2(图22)]。本发明的发明人还已说明,通过miR-19, $\beta$ 肾上腺素能受体(Adrb1)和大麻素受体1(CB1)的特定靶向。miR-19过表达抑制Adrb1(图6A-图6C)而miR-19的敲除则增强Adrb1表达(图6D-图6E)。miR-19过表达还抑制CB1(图14)。本发明的发明人还已发现用于miR-181的靶。具体地说,本发明的发明人已经说明,miR-181特异性地调节谷氨酸受体(图24和图25)。综上,这些结果证实了,将miRNA或调节其的序列如miR-135、miR-335、miR-181、miR-182、miR-26、miR-27、miR-15和miR-19用作治疗模式。

[0132] 因此,依据本发明的一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸。

[0133] 根据一种具体实施方式,用于治疗其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症,上述微RNA包括miR-135、miR-335、miR-26和miR-182。

[0134] 根据本发明的另一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中低肾上腺素或去

甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码微RNA或其前体的外源性多核苷酸。

[0135] 根据一种具体实施方式,用于治疗其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症,上述微RNA包括miR-19。

[0136] 根据本发明的另一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中低促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)水平是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码微RNA或其前体的外源性多核苷酸。

[0137] 根据一种具体实施方式,用于治疗其中低促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)水平是治疗上有益的病症,上述微RNA包括miR-15。

[0138] 根据本发明的另一个方面,提供了在需要其的受试者中治疗其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症的方法,该方法包括将编码微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码微RNA或其前体的外源性多核苷酸。

[0139] 根据一种具体实施方式,用于治疗其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症,上述微RNA包括miR-181。

[0140] 术语“治疗”是指抑制或阻止疾病、障碍或病症的发展和/或引起疾病、障碍或病症的减弱、缓解或消退,或防止在受试者中出现疾病、障碍或病症,其中上述受试者可以具有疾病、障碍或病症的风险,但尚未被诊断为患有疾病、障碍或病症。本领域技术人员将理解,各种方法和测定可以用来评估疾病、障碍或病症的发展,以及类似地,各种方法和测定可以用来评估疾病、障碍或病症的减弱、缓解或消退。

[0141] 如在本文中所使用的,术语“受试者”包括哺乳动物,优选在任何年龄下患有病变的人类。优选地,此术语涵盖具有发展病变的危险的个体。

[0142] 如在本文中所使用的,短语“其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症”是指这样的疾病或障碍:其中提高五羟色胺的水平可以防止疾病或与其相关的医疗症状的发生,或停止疾病进展或与其相关的医疗症状(如在下文中进一步详细说明的)。

[0143] 如在本文中所使用的,术语“五羟色胺”是指单胺类神经递质[还被称为5-羟色胺(5-HT)]。五羟色胺被阐述于例如CAS号50-67-9。

[0144] 根据一种实施方式,提供了用于在突触间隙中提高五羟色胺水平的方法,该方法包括将编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的在神经胶质细胞例如五羟色胺能神经元中表达编码至少一种微RNA或其前体的外源性多核苷酸。

[0145] 如在本文中所使用的,术语“突触间隙”是指在两个神经元之间的区域,电子或化学信号通过其而通过。

[0146] “神经胶质细胞”是指神经元或神经胶质细胞(例如,少突胶质细胞或星形胶质细胞)。

[0147] 如在本文中所使用的,术语“五羟色胺能神经元”是指这样的神经元:其分泌五羟色胺或能够五羟色胺再摄取(即,通过表达在它们的细胞表面上的五羟色胺转运体)。

[0148] 其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症可以包括,例如,任何情绪失调,包括抑郁、焦虑、应激、疲劳、认知功能受损、惊恐发作、强迫行为、成瘾性、社交恐怖症;睡眠障碍、食物相关障碍、生长障碍和生殖障碍。

[0149] 根据一种具体实施方式,其中五羟色胺水平的提高是治疗上有益的病症包括抑郁。

[0150] 根据一种实施方式,当病症是抑郁或焦虑时,微RNA是miR-135。

[0151] 可以理解的是,抑郁或焦虑可能不一定与五羟色胺相关。

[0152] 如在本文中所使用的,短语“其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症”是指这样的疾病或障碍:其中降低肾上腺素或去甲肾上腺素的表达或活性可以防止疾病或与其相关的医疗症状的发生或停止疾病进展或与其相关的医疗症状(如在下文中进一步详细说明书的)。

[0153] 如在本文中所使用的,术语“肾上腺素”是指激素和神经递质(还被称为肾上腺素)。肾上腺素被阐述于例如CAS号51-43-4。

[0154] 如在本文中所使用的,术语“去甲肾上腺素(noradrenaline)”是指作为激素和神经递质的儿茶酚胺(还被称为去甲肾上腺素(norepinephrine))。去甲肾上腺素被阐述于例如CAS号(1) 51-41-2(1)和138-65-8(d1))。

[0155] 其中低肾上腺素或去甲肾上腺素水平是治疗上有益的病症可以包括,例如,应激相关障碍、焦虑、记忆缺陷、心脏病(例如心悸、心动过速、心律失常)、头痛、震颤、高血压、以及急性肺水肿。

[0156] 如在本文中所使用的,短语“其中低促肾上腺皮质素释放激素(CRH)水平是治疗上有益的病症”是指这样的疾病或障碍:其中降低CRH的表达或活性可以防止疾病或与其相关的医疗症状的发生或停止疾病进展或与其相关的医疗症状(如在下文中进一步详细说明书的)。

[0157] 如在本文中所使用的,术语“促肾上腺皮质素释放激素(CRH)”是指多肽激素和神经递质(还被称为促肾上腺皮质素释放因子(CRF)或促肾上腺皮质素释放素)。CRH被阐述于例如NP\_000747.1。

[0158] 其中低CRH水平中治疗上有益的病症可以包括,例如,应激、抑郁、焦虑、应激、疲劳、认知功能受损、惊恐发作、强迫行为、成瘾性、社交恐怖症、睡眠障碍、食物相关障碍、生长障碍、生殖障碍和肥胖症。

[0159] 如在本文中所使用的,短语“其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症”是指这样的疾病或障碍:其中降低谷氨酸受体的表达或活性可以防止疾病或与其相关的医疗症状的发生或停止疾病进展或与其相关的医疗症状(如在下文中进一步详细说明书的)。

[0160] 如在本文中所使用的,术语“谷氨酸受体”是指通常位于神经元细胞的膜上的突触受体(例如,Grm1、Grik3、Grm5、Gria2、Grik2和Grm7)。谷氨酸受体被阐述于例如NP\_000822.2[谷氨酸受体离子型红藻氨酸3(Grik3)];NP\_000817.2、NP\_001077088.1、NP\_001077089.1[谷氨酸受体离子型AMPA 2(Gria2)];NP\_001159719.1、NP\_068775.1、NP\_786944.1[谷氨酸受体离子型红藻氨酸2(Grik2)];NP\_000833.1、NP\_001137303.1[代谢型谷氨酸受体5(Grm5)];NP\_000835.1、NP\_870989.1[代谢型谷氨酸受体7(Grm7)];NP\_000829.2、NP\_001107801.1[代谢型谷氨酸受体1(Grm1)]。

[0161] 其中低谷氨酸受体水平是治疗上有益的病症可以包括,例如,癫痫发作(例如癫痫)、亨廷顿病、精神分裂症、脆性X综合征、广泛性焦虑障碍和癌症(例如黑素瘤)。

[0162] 如在本文中所使用的,术语“微RNA或其前体”是指作为转录后调节子的微RNA

(miRNA) 分子。微RNA通常加工自前miR (前微RNA前体)。前miR是由RNA聚合酶III转录的一组前体miRNA分子,其被有效地加工成功能性miRNA,例如,在转染进入培养细胞后。在正常并不表达这种miRNA的细胞类型中,前miR可以用来诱发特定miRNA活性,因此通过在“(miRNA) 获得功能 (gain of (miRNA) function)”实验中下调它的靶的表达来引导(adress) 它的靶的功能。对于列于miRNA注册表中的所有已知的miRNA存在前miR设计并且可以易于设计用于任何研究。可以以本身或编码自连接到核酸构建体中的前体分子(如在下文中进一步描述的) 将微RNA给予细胞。

[0163] 可以理解的是,本教导的微RNA可以结合、连接、调节、加工、干扰、增强、稳定和/或去稳定任何微RNA靶。这样的靶可以是任何分子,包括但不限于DNA分子、RNA分子和多肽,如但不限于五羟色胺相关基因,如五羟色胺转运蛋白(即,SERT或Slc6a4)、五羟色胺抑制性受体1a(Htr1a)、色氨酸羟化酶2(Tph2) 和单胺羟化酶(MaoA);肾上腺素受体或去甲肾上腺素受体(肾上腺素能受体如Adr1);腺苷酸环化酶1型(ADCY1);CRH受体如Crh1R;或任何其他分子,例如FK506结合蛋白5(FKBP5)、大麻素受体1(CB1)、唐氏综合症细胞粘附分子(Dscam)、Translin相关X蛋白(Tsnax) 和细胞粘附分子L1(L1cam)(均进一步详细描述在下文中)。

[0164] 可以理解的是,可以通过各种数据库,包括例如微RNA注册表(<http://wwwdotsangerdotacdotuk/Software/Rfam/mirna/indexdotshhtml>),来确定本发明的微RNA。

[0165] 可以通过将编码微RNA的外源性多核苷酸给予受试者或在受试者的细胞中表达编码微RNA的外源性多核苷酸来实施本发明的方法。

[0166] 术语“多核苷酸”是指核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA) 或它们的模拟物的单链低聚体或双链低聚体或多聚体。此术语包括多核苷酸和/或寡核苷酸,其源自天然存在的核酸分子(例如,RNA或DNA)、合成多核苷酸和/或寡核苷酸分子,其由天然存在的碱基、糖和共价核苷间键(例如,主链) 构成,以及具有非天然存在的部分(其作用类似于相应的天然存在的部分)的合成多核苷酸和/或寡核苷酸。

[0167] 本发明的多核苷酸的长度可选为100个核苷酸或更少、可选为90个核苷酸或更少、可选为80个核苷酸或更少、可选为70个核苷酸或更少、可选为60个核苷酸或更少、可选为50个核苷酸或更少、可选为40个核苷酸或更少、可选为30个核苷酸或更少,例如,29个核苷酸、28个核苷酸、27个核苷酸、26个核苷酸、25个核苷酸、24个核苷酸、23个核苷酸、22个核苷酸、21个核苷酸、20个核苷酸、19个核苷酸、18个核苷酸、17个核苷酸、16个核苷酸、15个核苷酸,可选地12至24个核苷酸,可选地5-15之间,可选地5-25之间,最优选地,约20-25个核苷酸。

[0168] 可以根据在本领域中已知的任何寡核苷酸合成方法,包括酶促合成或固相合成,来产生根据本发明的教导设计的多核苷酸(包括寡核苷酸)。用于进行固相合成的仪器和试剂可商业上获自,例如,Applied Biosystems。还可以采用用于上述合成的任何其他方式,寡核苷酸的实际合成是在本领域技术人员的能力范围内并且可以通过成熟的方法来完成,如详述于,例如: Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001), “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”; Ausubel, R.M. et al., eds. (1994, 1989), “Current Protocols in Molecular Biology,” Volumes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), “A Practical Guide to Molecular Cloning,” John Wiley & Sons, New York; 以及 Gait, M.J., ed. (1984), “Oligonucleotide Synthesis”; 采用固相化学,例如氰乙基氨基磷

酸酯(cyanoethyl phosphoramidite),接着去保护、脱盐和纯化,其通过,例如,自动化三苯甲基方法(trityl-on method)或HPLC。

[0169] 可以理解的是,可以利用表达载体来产生包含RNA分子的多核苷酸(如在下文中进一步描述的)。

[0170] 优选地,本发明的多核苷酸是修饰的多核苷酸。可以利用在本领域中已知的各种方法来修饰多核苷酸。

[0171] 例如,本发明的寡核苷酸或多核苷酸可以包括杂环核苷,其由嘌呤和嘧啶碱基组成,并以3'-至-5'磷酸二酯键键合。

[0172] 优选使用的寡核苷酸或多核苷酸是那些在主链、核苷间键或碱基中被修饰的寡核苷酸或多核苷酸(如在下文中广泛描述的)。

[0173] 根据本发明的此方面可以使用的优选寡核苷酸或多核苷酸的具体实例包括包含修饰主链或非天然核苷间键的寡核苷酸或多核苷酸。具有修饰主链的寡核苷酸或多核苷酸包括那些寡核苷酸或多核苷酸,其主链中保留磷原子,如公开于美国专利号US 4,469,863、US 4,476,301、US 5,023,243、US 5,177,196、US 5,188,897、US 5,264,423、US 5,276,019、US 5,278,302、US 5,286,717、US 5,321,131、US 5,399,676、US 5,405,939、US 5,453,496、US 5,455,233、US 5,466,677、US 5,476,925、US 5,519,126、US 5,536,821、US 5,541,306、US 5,550,111、US 5,563,253、US 5,571,799、US 5,587,361、以及US 5,625,050。

[0174] 优选的修饰寡核苷酸或多核苷酸主链包括,例如:硫代磷酸酯;手性硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯;磷酸三酯;氨基烷基磷酸三酯;甲基和其他烷基磷酸酯,包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯;亚磷酸酯;氨基磷酸酯,包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯;硫代氨基磷酸酯;硫代烷基磷酸酯;硫代烷基磷酸三酯;以及具有正常3'-5'键的硼烷代磷酸酯(boranophosphates),它们的2'-5'键接类似物,以及那些具有反向极性的硼烷代磷酸酯,其中核苷单元的相邻对以3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'的方式连接。还可以使用上述修饰的各种盐、混合盐和游离酸形式。

[0175] 可替代地,其中并不包括磷原子的修饰寡核苷酸或多核苷酸主链具有这样的主链,其是通过短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键所形成。这些主链包括那些具有吗啉代键的主链(部分形成自核苷的糖部分);硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰基和硫代甲酰基主链;亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链;包含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链;磺酸酯和氨基磺酰主链;酰胺主链;以及具有混合的N、O、S和CH<sub>2</sub>组成部分的其他主链,如公开于美国专利号US 5,034,506、US 5,166,315、US 5,185,444、US 5,214,134、US 5,216,141、US 5,235,033、US 5,264,562、US 5,264,564、US 5,405,938、US 5,434,257、US 5,466,677、US 5,470,967、US 5,489,677、US 5,541,307、US 5,561,225、US 5,596,086、US 5,602,240、US 5,610,289、US 5,602,240、US 5,608,046、US 5,610,289、US 5,618,704、US 5,623,070、US 5,663,312、US 5,633,360、US 5,677,437和US 5,677,439。

[0176] 根据本发明可以使用的其他寡核苷酸或多核苷酸是在糖和核苷间键中加以修饰的那些寡核苷酸或多核苷酸,即,核苷酸单元的主链被新基团取代。保持基本单元以与适当的多核苷酸靶互补。这样的寡核苷酸模拟物的实例包括肽核酸(PNA)。PNA寡核苷酸是指其

中糖主链被包含酰胺的主链、特别地是氨基乙基甘氨酸主链取代的寡核苷酸。碱基被保留并直接或间接地结合于主链的酰胺部分的氮杂氮原子。教导PNA化合物的制备的美国专利包括但不限于美国专利号US 5,539,082、US 5,714,331和US 5,719,262,各自以引用方式结合于本文。在本发明中可以使用的其他主链修饰公开于美国专利号US 6,303,374。

[0177] 本发明的寡核苷酸或多核苷酸还可以包括碱基修饰或取代。如在本文中所使用的,“未修饰的”或“天然”碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。“修饰的”碱基包括但不限于其他合成和天然碱基,如:5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物;2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫代尿嘧啶;8-卤基、8-氨基、8-硫羟、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤基,特别地是5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤;以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的修饰碱基包括那些碱基,其公开于:美国专利号US 3,687,808;Kroschwitz,J.I.,ed.(1990),“The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,”pages 858-859,John Wiley&Sons;Englisch et al.(1991),“Angewandte Chemie,”International Edition,30,613;以及Sanghvi,Y.S.,“Antisense Research and Applications,”Chapter 15,pages 289-302,S.T.Crooke and B.Leboule,eds.,CRC Press,1993。上述修饰碱基特别可用于提高本发明的低聚化合物的结合亲和力。这些修饰碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶、以及N-2、N-6和O-6-取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示会提高核酸双链体稳定性达0.6-1.2°C(Sanghvi,Y.S.et al.(1993),“Antisense Research and Applications,”pages 276-278,CRC Press,Boca Raton),并且是目前优选的碱基取代,甚至更特别地当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰结合时。

[0178] 根据一种具体实施方式,本发明的miRNA多核苷酸具有如在SEQ ID NO:58-SEQ ID NO:94中阐述的核酸序列(参见表1A)。

[0179] 表1A:miRNA多核苷酸序列

[0180]

序列	miRNA
SEQ ID NO:77-SEQ ID NO:80	miR-15
SEQ ID NO:72-SEQ ID NO:76	miR-19
SEQ ID NO:65-SEQ ID NO:69	miR-26
SEQ ID NO:81-SEQ ID NO:84	miR-27
SEQ ID NO:58-SEQ ID NO:62	miR-135
SEQ ID NO:85-SEQ ID NO:94	miR-181
SEQ ID NO:70-SEQ ID NO:71	miR-182
SEQ ID NO:63-SEQ ID NO:64	miR-335

[0181] 如上文提到的以及在随后的实施例部分中说明的,微RNA是源自特定前体(即,前miRNA)的加工的分子,利用特定miRNA前体分子可以实现特定miRNA功能的上调。

[0182] 还设想与miRNA和它们的前体同源的序列。对于成熟miRNA,同源性水平应是相对

较高的,但在前体水平允许更高的自由度(more orders of freedom)(例如,至少60%、70%、80%、85%、90%、95%或以上),只要序列改变是在发夹序列中而不是在对应于成熟miR的核酸片段中。

[0183] 通常将这样的前体多核苷酸剂作为表达构建体的一部分给予靶细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)。在这种情况下,多核苷酸剂被连接到核酸构建体中在顺式作用调节元件(例如启动子)的控制下,上述顺式作用调节元件能够在靶细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)中以组成型或诱导型方式引导微RNA的表达。

[0184] 本发明的微RNA多核苷酸剂的实例包括但不限于miR-15(例如GenBank登录号NR\_029485 RNA)、miR-19(例如GenBank登录号NR\_029489.1)、miR-26(例如GenBank登录号NR\_029500和NR\_029499)、miR-27(例如GenBank登录号NR\_029501 RNA)、miR-135(例如GenBank登录号NR\_029677.1)、miR-335(例如GenBank登录号NR\_029899.1)、miR-181(例如GenBank登录号NR\_029611.1)和miR-182(例如GenBank登录号NR\_029614)。

[0185] 神经元细胞特异性启动子的实例包括但不限于神经元特异性烯醇化酶基因启动子、突触蛋白启动子、增强的突触蛋白启动子、钙调蛋白启动子和Thy1启动子。

[0186] 心肌细胞特异性启动子的实例包括但不限于心NCX1启动子和 $\alpha$ -肌球蛋白重链( $\alpha$ MHC)启动子。

[0187] 本发明的表达构建体还可以包括另外的序列,其使它适合于在真核细胞中的复制和整合(例如,穿梭载体)。典型的克隆载体包含转录和翻译起始序列(例如,启动子、增强子)以及转录和翻译终止子(例如,多腺苷酸化信号)。本发明的表达构建体可以进一步包括增强子,其可以邻近或远离启动子序列并可以用来从其上调转录。

[0188] 增强子元件可以刺激从连接的同源或异源启动子转录上达至1,000倍。当放置在转录起始位点的下游或上游时,增强子是活性的。源自病毒的许多增强子元件具有广泛的宿主范围并且在多种组织中是活性的。例如,SV40早期基因增强子适用于许多细胞类型。适用于本发明的其他增强子/启动子组合包括那些组合:其源自多瘤病毒或人或小鼠巨细胞病毒(CMV)以及来自各种逆转录病毒(如小鼠白血病病毒、小鼠或劳氏肉瘤病毒、以及HIV)的长串联重复序列(LTR)。参见Gluzman,Y.and Shenk,T.,eds.(1983).Enhancers and Eukaryotic Gene Expression,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,其以引用方式结合于本文。

[0189] 还可以将多腺苷酸化序列加入本发明的表达构建体以提高可检测部分的表达的效率。为了准确和有效的多腺苷酸化,需要两种不同的序列元件:位于多腺苷酸化位点的下游的富GU或富U的序列;以及6个核苷酸的高度保守序列,即AAUAAA,其位于上述位点的上游的11-30个核苷酸处。适用于本发明的终止和多腺苷酸化信号包括那些源自SV40的终止和多腺苷酸化信号。

[0190] 除已经描述的实施方式以外,本发明的表达构建体通常可以包含其他其用来提高克隆核酸的表达水平或用来促进携带重组DNA的细胞的识别的专门化元件。例如,若干动物病毒包含促进在允许细胞类型中病毒基因组的染色体外复制的DNA序列。游离型复制带有这些病毒复制子的质粒,只要由携带在质粒上的基因或宿主细胞的基因组提供适当的因子。

[0191] 本发明的表达构建体可以或可以不包括真核复制子。如果存在真核复制子,则利



用适当的选择标记,能够在真核细胞中扩增载体。如果构建体并不包含真核复制子,则游离型扩增是不可能的。相反,重组DNA整合到工程细胞的基因组,其中启动子引导所期望的核酸的表达。

[0192] 可以利用适当的基因递送载体/方法(转染、转导等)和适当的表达系统将核酸构建体引入本发明的靶细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)。

[0193] 哺乳动物表达载体的实例包括但不限于pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41和pNMT81,以上可获自Invitrogen;pCI,其可获自Promega;pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV,以上可获自Stratagene;pTRES,其可获自Clontech;以及它们的衍生物。

[0194] 还可以使用包含来自真核病毒如逆转录病毒的调节元件的表达载体。SV40载体包括例如pSVT7和pMT2。源自牛乳头状瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA,并且源自EB病毒的载体包括pHEB0和p205。其他示例性载体包括pMSG、pAV009/A<sup>+</sup>、pMT010/A<sup>+</sup>、pMAMneo-5和杆状病毒pDSVE。

[0195] 基于脂质的系统可以用来将这些构建体递送进入本发明的靶细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)。

[0196] 脂质体包括由脂双层构成的任何合成(即,非天然存在的)结构,其封闭一定容积。脂质体包括乳状液、泡沫、胶团、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、片状层等。可以通过本领域中任何已知的方法来制备脂质体[Monkkonen,J.et al.,1994,J.Drug Target,2:299-308;Monkkonen,J.et al.,1993,Calcif.Tissue Int.,53:139-145;Lasic D D.,Liposomes Technology Inc.,Elsevier,1993,63-105.(chapter 3);Winterhalter M,Lasic D D.,Chem Phys Lipids,1993 September;64(1-3):35-43]。脂质体可以是带正电荷的、中性的或带负电荷的。对于单核吞噬细胞系统(MPS)摄取,脂质体可以是疏水性的,这是因为脂质体膜的亲水性掩蔽(例如,通过利用聚乙二醇连接的脂质和亲水性颗粒)可以是不易发生MPS摄取。还优选的是,脂质体并不包含立体屏蔽脂质如神经节苷脂-GM<sub>1</sub>和磷脂酰肌醇,这是因为这些脂质防止MPS摄取。

[0197] 脂质体可以是单脂质层或可以是多片层。如果治疗剂是亲水的,可以利用较大的单层囊泡进一步改善它的递送,这是由于它们的更大的内部容积。相反地,如果治疗剂是疏水性的,则可以利用多层囊泡进一步改善它的递送。可替代地,治疗剂(例如寡核苷酸)如果不能穿透脂双层,因此将保持吸附于脂质体表面。在这种情况下,增加脂质体的表面积可以进一步改善治疗剂的递送。根据本发明的合适的脂质体是非毒性脂质体如,例如,那些制备自磷脂酰胆碱磷酸甘油和胆固醇的脂质。所使用的脂质体的直径范围可以为0.1-1.0微米。然而,还可以使用适合于通过吞噬细胞的吞噬作用的其他尺寸范围。对于使脂质体定形(sizing liposomes),可以使用均化作用,其依靠剪切能来将较大的脂质体碎裂成较小的脂质体。可以方便使用的均化器包括由Microfluidics of Boston,MA制造的微流化器。在典型的均化程序中,通过标准乳液均化器来再循环脂质体直到观测到选定的脂质体尺寸。可以通过传统激光束颗粒尺寸判别(laser beam particle size discrimination)来监测颗粒尺寸分布。通过小孔聚碳酸酯膜或非对称陶瓷膜挤出脂质体是用于将脂质体尺寸减小到相对明确限定的尺寸分布的有效方法。通常,通过膜一次或多次循环悬浮液,直到实现所

期望的脂质体尺寸分布。可以依次通过更小的孔膜来挤出脂质体以实现脂质体尺寸的逐渐减小。

[0198] 可以使用在本领域中已知的任何方法来将微RNA多核苷酸剂加入脂质体。例如,可以将微RNA多核苷酸剂封装在脂质体内。可替代地,它可以被吸附在脂质体表面上。可以用来将药剂加入本发明的脂质体的其他方法是那些由Alfonso et al.,描述的方法[The science and practice of pharmacy,Mack Publishing,Easton Pa 19<sup>th</sup> ed.,(1995)]以及那些由Kulkarni et al.描述的方法[J.Microencapsul.1995,12(3)229-46]。

[0199] 在本发明的方法中使用的脂质体优选穿过血屏障。因此,本发明的脂质体优选在它们的膜部中并不包含血屏障靶向多糖(例如甘露糖)。优选地,本发明的脂质体在它们的膜部分中并不包含肽,其将脂质体靶向在血屏障上的受体。上述肽的实例包括但不限于运铁蛋白、胰岛素、IGF-1、IGF-2抗运铁蛋白受体抗体、抗胰岛素受体抗体、抗IGF-1受体抗体和抗IGF-2受体抗体。

[0200] 为了确定根据本发明特别适用的脂质体,可以进行筛选测定如这样的测定,其描述于美国专利申请号US 20040266734和美国专利申请号US 20040266734、以及Danenberg et al.,Journal of cardiovascular pharmacology 2003,42:671-9;Circulation 2002,106:599-605;Circulation 2003,108:2798-804。

[0201] 根据本发明的此方面可以使用的其他非脂质类(non-lipid based)的载体包括但不限于聚赖氨酸和树枝状聚合物。

[0202] 表达构建体还可以是病毒。病毒构建体的实例包括但不限于腺病毒载体、逆转录病毒载体、痘苗病毒载体、腺相关病毒载体(adeno-associated viral vectors)、多瘤病毒载体、 $\alpha$ 病毒载体、弹状病毒载体、慢病毒载体和疱疹病毒载体。

[0203] 逆转录病毒载体是特别适用于本发明的一类载体。缺陷型逆转录病毒常规用于将基因转移进入哺乳动物细胞(关于综述,参见Miller,A.D.(1990).Blood 76,271)。可以利用众所周知的分子技术来构建包含本发明的多核苷酸的重组逆转录病毒。可以除去逆转录病毒基因组的部分以赋予逆转录病毒复制机制缺陷,然后复制缺陷型逆转录病毒可以被包装进入病毒颗粒,其可以用来通过使用辅助病毒同时采用标准技术来感染靶细胞。用于用病毒体外或体内生产重组逆转录病毒和用于感染细胞的方案可以参见,例如,Ausubel et al.(1994)Current Protocols in Molecular Biology(Greene Publishing Associates, Inc.&John Wiley&Sons,Inc.)。逆转录病毒已用来将多种基因引入许多不同的细胞类型,包括神经元细胞、上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞、成肌细胞、肝细胞和骨髓细胞。

[0204] 根据一种实施方式,根据本教导使用慢病毒载体(一类逆转录病毒载体)。慢病毒载体被广泛地用作载体,这是由于它们整合到非分裂细胞以及分裂细胞的基因组的能力。当病毒进入细胞,RNA形式的病毒基因组被逆转录以产生DNA时,其然后通过病毒整合酶在随机位置被插入基因组。载体(前病毒)保留在基因组中并当它分裂时被传给细胞的子代。出于安全性原因,慢病毒载体永远不会携带它们的复制所需要的基因。为了产生慢病毒,将若干种质粒转染进入所谓的包装细胞系,通常为HEK293。一种或多种质粒(通常被称为包装质粒)编码病毒颗粒蛋白(如衣壳)和逆转录酶。另一种质粒包含由载体递送的遗传物质。它被转录以产生单链RNA病毒基因组并且特点在于存在 $\Psi$ (psi)序列。此序列用来将基因组包装进入病毒颗粒。

[0205] 用于在神经胶质细胞或心肌细胞中引入和表达本发明的多核苷酸序列的合适的慢病毒载体的具体实施例是慢病毒pLK0.1载体。

[0206] 根据本发明的此方面可以使用的另一种合适的表达载体是腺病毒载体。腺病毒是广泛研究的和常规使用的基因转移载体。腺病毒载体的关键优势包括分裂细胞和休眠细胞的相对较高的转导效率、对范围广泛的上皮组织的天然趋向性以及易于产生高效价 (Russel, W.C. (2000) J Gen Virol 81, 57-63)。腺病毒DNA被运送到细胞核,但并不整合到其中。因而,借助于腺病毒载体的诱变的风险被最小化,同时短期表达特别适用于治疗癌细胞。在实验性癌症治疗中使用的腺病毒载体描述于Seth et al. (1999). "Adenoviral vectors for cancer gene therapy," pp. 103-120, P. Seth, ed., Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy, Landes, Austin, TX)。

[0207] 合适的病毒表达载体还可以是结合有逆转录病毒和腺病毒组成部分的嵌合的腺病毒/逆转录病毒载体。这样的载体可以比用于转导肿瘤细胞的传统的表达载体更加有效 (Pan et al. (2002). Cancer Letts 184, 179-188)。

[0208] 当通过病毒感染将本发明的表达构建体引入靶细胞 (例如神经胶质细胞或心肌细胞) 时,用于感染的病毒剂量是至少 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 或更高pfu或病毒颗粒。

[0209] 不管采用的方法或构建体,提供了包括核酸构建体的分离的细胞,其中上述核酸构建体编码微RNA (如上文所详述)。

[0210] 如在本文中所使用的,术语“分离的”是指至少部分地由自然环境例如人体分离。

[0211] 根据一种实施方式,提供了包含在顺式作用调控元件的转录控制下表达至少一种微RNA或其前体的核酸构建体的分离的细胞,其中微RNA选自miR-135、miR-335、miR-15、miR-19、miR-26、miR-27、miR-181和miR-182组成的组。

[0212] 根据一种具体实施方式,提供了包含在顺式作用调控元件的转录控制下表达至少一种微RNA或其前体的核酸构建体的分离的神经胶质细胞,其中微RNA选自miR-135、miR-335、miR-26和miR-182组成的组。

[0213] 根据一种具体实施方式,提供了包含在顺式作用调控元件的转录控制下表达miR-19或其前体的核酸构建体的分离的细胞。

[0214] 根据一种具体实施方式,提供了包含在顺式作用调控元件的转录控制下表达miR-15或其前体的核酸构建体的分离的细胞。

[0215] 根据一种具体实施方式,细胞是神经胶质细胞或心肌细胞。

[0216] 根据一种具体实施方式,神经胶质细胞是神经元如五羟色胺能神经元。

[0217] 体内 (in vivo) (即,在生物体或受试者内) 或离体 (ex vivo) (例如,在组织培养中),将微RNA或其前体提供给细胞,即,本发明的靶细胞 (例如神经胶质细胞或心肌细胞)。在离体治疗细胞的情况下,上述方法优选地包括以下步骤:将这样的细胞返回给予个体 (离体细胞治疗)。

[0218] 对于离体治疗,优选地用本发明的制剂 (例如,编码微RNA的多核苷酸) 处理细胞,其后将它们给予需要其的受试者。

[0219] 可以利用任何合适的给予途径来给予本发明的体外处理细胞,给予途径如静脉内途径、腹膜内途径、肾内途径、胃肠道内途径、皮下途径、经皮途径、肌内途径、皮内途径、鞘

内途径、硬膜外途径和直肠途径。根据目前优选的实施方式,可以利用静脉内、肾内、胃肠道内和/或腹膜内给予来将本发明的离体处理细胞引入个体。

[0220] 本发明的细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)可以源自自体来源或源自同种异体来源如人尸体或供体。因为当给予身体时,非自体细胞有可能诱发免疫反应,所以已开发若干方法来减少非自体细胞的排斥的可能性。这些方法包括在移植以前抑制受体免疫系统或将非自体细胞封装在免疫分离的、半渗透膜中。

[0221] 封装技术一般分类为微囊化,其涉及小球状载体;以及宏观封装(macroencapsulation),其涉及较大的扁平片材和中空纤维膜(Uludag,H.et al.(2000).Technology of mammalian cell encapsulation.Adv Drug Deliv Rev 42,29-64)。

[0222] 用于制备微胶囊的方法在本领域中是已知的并且包括例如那些方法,其公开于:Lu,M.Z.et al.(2000).Cell encapsulation with alginate and  $\alpha$ -phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine).Biotechnol Bioeng 70,479-483;Chang,T.M.and Prakash,S.(2001)Procedures for microencapsulation of enzymes,cells and genetically engineered microorganisms.Mol Biotechnol 17,249-260;and Lu,M.Z.,et al.(2000).A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine- $\alpha$ -cyanocinnamylideneacetate).J Microencapsul 17,245-521。

[0223] 例如,利用在与甲基丙烯酸2-羟乙基酯(HEMA)、甲基丙烯酸(MAA)和甲基丙烯酸甲酯(MMA)的三元共聚物壳的复合物中的修饰胶原来制备微胶囊,获得2-5 $\mu$ m的胶囊厚度。可以用另外的2-5 $\mu$ m的三元共聚物壳进一步封装上述微胶囊以赋予带负电荷的光滑表面以及使血浆蛋白吸附最小化(Chia,S.M.et al.(2002).Multi-layered microcapsules for cell encapsulation.Biomaterials 23,849-856)。

[0224] 其他微胶囊是基于藻酸盐、海洋多糖(Sambanis,A.(2003).Encapsulated islets in diabetes treatment.Diabetes Technol Ther 5,665-668)或它的衍生物。例如,可以在有氯化钙存在的情况下通过在聚阴离子海藻酸钠和纤维素硫酸钠与聚阳离子聚(亚甲基-胍)氢氯化物之间的聚电解质络合作用来制备微胶囊。

[0225] 可以理解的是,当使用较小的胶囊时可以改善细胞封装。因此,当胶囊尺寸从1mm减小至400 $\mu$ m时,可以改善例如封装细胞的质量控制、机械稳定性、扩散性能和体外活性(Canaple,L.et al.(2002).Improving cell encapsulation through size control.J Biomater Sci Polym Ed 13,783-96)。此外,发现具有良好控制的小至7nm的孔尺寸、定制的表面化学性能和精确的微体系结构的纳米多孔生物胶囊可以成功免疫细胞的微环境(参见Williams,D.(1999).Small is beautiful:microparticle and nanoparticle technology in medical devices.Med Device Technol 10,6-9;and Desai,T.A.(2002).Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation.Expert Opin Biol Ther 2,633-646)。

[0226] 可以连同离体治疗一起使用的免疫抑制剂的实例包括但不限于甲氨蝶呤、环磷酰胺、环孢霉素、环孢素A、氯喹、羟氯喹、柳氮磺吡啶(sulphasalazopyrine)、金盐、D-青霉胺、来氟米特、硫唑嘌呤、阿那白滞、英夫利昔单抗(REMICADE<sup>sup</sup>.R)、依那西普、TNF $\alpha$ 、阻滞剂、靶向炎性细胞因子的生物药剂、以及非甾体抗炎药(NSAID)。NSAID的实例包括但不限于乙

酰水杨酸、水杨酸胆碱镁、二氟尼柳、水杨酸镁、双水杨酯、水杨酸钠、双氯芬酸、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯芬那酸、萘普生、萘丁美酮、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、对乙酰氨基酚、布洛芬、Cox-2抑制剂和曲马多。

[0227] 对于体内治疗,将制剂(例如,编码微RNA的多核苷酸)本身或作为药物组合物的一部分给予受试者。优选地,配制上述组合物以允许穿过血脑屏障(BBB)。

[0228] 用于药物递送到中枢神经系统(CNS)的常规方法包括:神经外科策略(例如,脑内注射或脑室内输注);分子操作制剂(例如,产生嵌合融合蛋白,其包含对于内皮细胞表面分子具有亲合力的转运肽,以及本身不能够穿过BBB的制剂)以试图利用BBB的内源性转运途径的一种;用来增加制剂的脂质溶解度(例如,水溶性剂与脂质或胆固醇载体的连接作用)的药理策略;以及通过高渗性破坏(产生自甘露醇溶液输注进入颈动脉或使用生物活性剂如血管紧张素肽)对BBB的完整性的短暂破坏。

[0229] 用于在BBB后药物递送的方法包括脑内移植(如用针)和对流增强分布。甘露醇可以用于绕过BBB。同样,粘膜(例如,鼻)给予可以用来绕过BBB。

[0230] 还可以,将本发明的微RNA多核苷酸剂以药物组合物(其中微RNA多核苷酸剂与合适的载体或赋形剂混合)给予生物体。

[0231] 如在本文中所使用的,“药物组合物”是指本文描述的一种或多种活性组分与其他化学成分如生理上合适的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的是促进将化合物给予生物体。

[0232] 在本文中,术语“活性组分”是指负责生物学效应的肽。

[0233] 在下文中,可以互换使用的短语“生理用载体”和“药用载体”来指载体或稀释剂,其并不引起对生物体的显著刺激并且并不消除(abrogate)所给予化合物的生物活性和性能。这些短语包括佐剂。

[0234] 在本文中,术语“赋形剂”是指被加入药物组合物以进一步促进活性组分的给予的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种类型的糖和淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0235] 用于配制和给予药物的技术可以参见“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co.,Easton,PA,最新版本,其以引用方式结合于本文。

[0236] 给予的合适途径可以例如包括口服、直肠、经粘膜特别地是经鼻、肠或胃肠道外递送,包括肌内注射、皮下和髓内注射以及鞘内注射、直接心室内注射、静脉内注射、腹膜内注射、鼻内注射或眼内注射。

[0237] 可替代地,可以以局部而不是系统方式来给予药物组合物,例如,通过将药物组合物直接注射到患者的组织区域。

[0238] 可以通过在本领域中众所周知的过程来制备本发明的药物组合物,例如,借助于常规混合、溶解、造粒、糖衣丸制作、磨细、乳化、封装、截留或冻干处理。

[0239] 因此可以以常规方式来配制根据本发明使用的药物组合物,其中利用一种或多种便于将活性组分加工成可以药用的制剂的生理用载体(包括赋形剂和助剂)。适当的制剂取决于所选择的给出途径。

[0240] 为了注射,可以将药物组合物的活性组分配制在水溶液中,优选地在生理相容性缓冲液中如汉克氏溶液、林格氏溶液或生理盐缓冲液。对于经粘膜给予,在制剂中使用适合

于要渗透的屏障的渗透剂。上述渗透剂在本领域中通常是已知的。

[0241] 为了口服给予,可以通过将活性化合物和在本领域中众所周知的药用载体结合来容易地配制药物组合物。上述载体使得能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆、混悬剂等,用于患者的口服摄入。可以利用固体赋形剂来制备用于口服使用的药物制剂,其中在添加合适的助剂(如果需要的话)后,可选地研磨产生的混合物、并加工颗粒的混合物,以获得片剂或糖衣丸核心。合适的赋形剂是,特别地是,填充剂如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂如,例如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理用聚合物如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要的话,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。

[0242] 糖衣丸核心被提供有合适的涂层。为此目的,可以使用浓缩的糖溶液,其可以可选地包含阿拉伯树脂、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、天然漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料加入片剂或糖衣丸涂层,用于识别或用来表征活性化合物剂量的不同组合。

[0243] 可以口服使用的药物组合物包括:由明胶制成的推入配合胶囊剂(push-fit capsules);以及由明胶和增塑剂,如甘油或山梨醇制成的软密封胶囊剂。推入配合胶囊剂可以以与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉、润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁,以及可选地稳定剂的混合物包含活性组分。在软胶囊剂中,可以将活性组分溶解或悬浮于合适的液体,如脂肪油、液状石蜡或液体聚乙二醇。另外,可以添加稳定剂。用于口服给予的所有剂型应具有适合于所选给予途径的剂量。

[0244] 对于口腔给予,组合物可以采用以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0245] 对于通过鼻吸入的给予,可以以来自加压包或雾化吸入器的喷雾剂的形式来方便地递送根据本发明使用的活性组分,其中借助于合适的推进剂,例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳。在加压气雾剂的情况下,可以通过提供用来递送计量的量的阀门来确定剂量单位。用于在分配器中使用的例如明胶的胶囊剂和药筒可以被配制包含化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0246] 本文描述的药物组合物可以被配制用于胃肠道外给予,例如,通过推注或连续输注。可以以单位剂型,例如,以安瓿或以多剂量容器,其可选地具有添加的防腐剂,来提供用于注射的剂型。组合物可以是在油性或水性载体中的混悬剂、溶液或乳剂,并且可以包含配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0247] 用于胃肠道外给予的药物组合物包括水溶性形式的活性制剂的水溶液。另外,活性组分的混悬剂可以被制备为适当的基于油性或水性的注射混悬剂。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油,或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射混悬剂可以包含这样的物质,其提高混悬剂的粘度,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。可选地,混悬剂还可以包含合适的稳定剂或提高活性组分的溶解度的制剂以便于制备高度浓缩溶液。

[0248] 可替代地,使用前,活性组分可以具有粉末形式,用于用合适的载体,例如,无菌、无热原水性溶液来构成。

[0249] 还可以将本发明的药物组合物配制成使用例如常规的栓剂基质如可可脂或其他

甘油酯的直肠组合物如栓剂或滞留型灌肠剂。

[0250] 适用于本发明的药物组合物包括其中包含有效量的活性组分以达到预期目的的组合物。更具体地说,治疗有效量是指有效地预防、减轻或改善障碍(例如,糖尿病)的症状或延长待治疗的受试者的生存期的活性组分(肽)的量。

[0251] 根据本发明的一种实施方式,过表达miR-135具有抗抑郁效应。

[0252] 确定治疗有效量是在本领域技术人员的能力范围内,特别地是鉴于本文提供了详细的公开内容。

[0253] 对于在本发明的方法中使用的任何制剂,可以最初由体外和细胞培养测定估算治疗有效量或剂量。例如,可以在动物模型中配制剂量以实现所期望的浓度或效价。这样的信息可以用来更精确地确定在人类中的有用剂量。

[0254] 可以通过标准制药程序,体外、在细胞培养或实验动物中确定本文描述的活性组分的毒性和治疗功效。获自这些体外和细胞培养测定以及动物研究的数据可以用于配制用于人类的一系列的剂量。剂量可以取决于使用的剂型以及采用的给予途径。可以由个别医生鉴于患者的病情来选择确切的制剂、给予的途径和剂量。(参见例如,Fingl,et al., 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1p.1)。

[0255] 可以单独地调节剂量和间隔以提供活性组分的足够的血浆水平,从而诱导或抑制生物学效应(最小有效浓度,MEC)。MEC会因每种制剂而有所不同,但可以由体外数据估算。为实现MEC所必要的剂量将取决于个体特征和给予途径。检测测定可以用来确定血浆浓度。

[0256] 取决于待治疗病症的严重性和响应性,给药(dosing)可以是单次或多次给予,其中疗程持续若干天至若干周或直到治愈或实现疾病状态的减弱。

[0257] 当然,待给予的组合物的量将取决于待治疗的受试者、痛苦的严重性、给予方式、处方医生的判断等。给予的剂量和时间将响应于个体病情变化的仔细和持续的监测。

[0258] 可以理解的是,存在动物模型,借此,可以在人治疗之前测试本发明的制剂。可以使用例如抑郁、应激、焦虑的动物模型如习得性无助模型(LH)、慢性轻度应激(CMS)模型、社交失败应激(SDS)模型和母爱剥夺模型。

[0259] 如果需要的话,本发明的组合物可以存在于包或分配装置中,如FDA批准的试剂盒,其可以包含含有活性组分的一个或多个单位剂型。上述包可以,例如,包括金属或塑料箔,如泡罩包。包或分配装置可以伴有用于给予的说明书。上述包或分配器还可以容纳有通告,其伴随容器并具有由调节药品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,上述通告可反映机构对组合物或人或兽医给予的形式的批准。上述通告,例如,可以由美国食物和药物管理局批准的处方药的标签或批准的产品插页。配制在相容性药物载体中的包含本发明的制剂的组合物还可以加以制备、放置在适当的容器中,并标示用于治疗指定病症(如上文进一步详述的)。

[0260] 可以理解的是,除微RNA多核苷酸剂以外,本发明的治疗性组合物还可以包含用于治疗抑郁、应激、焦虑、睡眠剥夺等的其他已知的药物,如但不限于选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、五羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)、去甲肾上腺素能和特定血清素能抗抑郁剂(NaSSA)、去甲肾上腺素(去甲肾上腺素)再摄取抑制剂(NRI)、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂、选择性五羟色胺再摄取增强子、去甲肾上腺素-多巴胺去抑制剂、三环类抗抑郁药(例如丙咪嗪)、单胺氧化酶抑制剂(MAOI)。这些药物可以以单个或以单独的

包装包括在制品中。

[0261] 本发明的发明人已经表明,过表达miR-27会导致MaoA的抑制(参见实施例1,在下文中),过表达miR-135会导致Slc6a4的抑制(参见实施例1,在下文中),过表达miR-135、miR-335、miR-26、miR-181或miR-182会导致Htr1a的抑制(参见实施例1,在下文中),过表达miR-19会导致Adrl的抑制(参见实施例2,在下文中)和导致CB1的抑制(参见实施例3B,在下文中),以及过表达miR-15会导致Crh1R的抑制(参见实施例4,在下文中)和导致FKBP5的抑制(参见实施例4B,在下文中)。

[0262] 因此,根据本发明的一种实施方式,提供了用于在神经胶质细胞中调节五羟色胺转运蛋白(Slc6a4)基因的表达的方法,该方法包括调节微RNA或其前体的活性或表达,其中微RNA选自由miR-135和miR-335组成的组。

[0263] 如在本文中所使用的,术语“五羟色胺转运蛋白(Slc6a4)”是指参与自突触间隙再摄取五羟色胺的单胺转运蛋白(还称为SERT)。示例性的Slc6a4阐述于NP\_001036.1。

[0264] 根据另一种实施方式,提供了用于在神经胶质细胞中调节五羟色胺抑制性受体1a(Htr1a)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调节微RNA或其前体的活性或表达,其中微RNA选自由miR-135、miR-335、miR-181、miR-182和miR-26组成的组。

[0265] 如在本文中所使用的,术语“五羟色胺抑制性受体1a(Htr1a)”是指作为在突触前神经元中的自身受体并介导五羟色胺释放的抑制的G蛋白偶联受体。示例性的Htr1a阐述于NP\_000515.2。

[0266] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节单胺羟化酶(MaoA)基因的表达的方法,该方法包括调整miR-27或其前体的活性或表达。

[0267] 如在本文中所使用的,术语“单胺羟化酶(MaoA)”是指降解胺神经递质如多巴胺、去甲肾上腺素和五羟色胺的酶。示例性的MaoA阐述于NP\_000231.1。

[0268] 根据本发明的一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节色氨酸羟化酶2(Tph2)基因的表达的方法,该方法包括在神经胶质细胞中调节微RNA或其前体的活性或表达,其中微RNA选自由miR-181和miR27组成的组。

[0269] 如在本文中所使用的,术语“色氨酸羟化酶2(Tph2)”是指其在五羟色胺的生物合成中催化第一步骤和限速步骤的酶。示例性的Tph2阐述于NP\_NP\_775489.2。

[0270] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞或心肌细胞中调节β肾上腺素能受体1(Adrb1)基因的表达的方法,该方法包括调整miR-19或其前体的活性或表达。

[0271] 如在本文中所使用的,术语“β肾上腺素能受体1(Adrb1)”是指其介导肾上腺素和去甲肾上腺素的生理效应的受体。示例性的Adrb1阐述于NP\_000675.1。

[0272] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节β2肾上腺素能受体(Adrb2)基因的表达的方法,该方法包括调整miR-15或其前体的活性或表达。

[0273] 如在本文中所使用的,术语“β2肾上腺素能受体(Adrb2)”是指其直接与C类L型钙通道Ca(V)1.2相关的受体。Adrb2被阐述于例如NP\_000015.1。

[0274] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节CRH 1型受体基因的表达的方法,该方法包括调整miR-15或其前体的活性或表达。

[0275] 如在本文中所使用的,术语“CRH 1型”是指其结合促肾上腺皮质素释放激素(CRH)的受体。CRH 1型被阐述于例如NP\_001138618.1、NP\_001138619.1、NP\_001138620.1和NP\_



004373.2。

[0276] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节谷氨酸受体基因的表达的方法,该方法包括调整miR-181或其前体的活性或表达。

[0277] 根据另一种实施方式,谷氨酸受体基因包含代谢型谷氨酸受体1 (Grm1)、谷氨酸受体离子型红藻氨酸3 (Grik3)、代谢型谷氨酸受体5 (Grm5)、谷氨酸受体离子型红藻氨酸2 (Grik2) 和代谢型谷氨酸受体7 (Grm7) (如上文进一步详细描述)。

[0278] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节唐氏综合症细胞粘附分子 (Dscam) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-182或其前体的活性或表达。

[0279] 如在本文中所使用的,术语“唐氏综合症细胞粘附分子 (Dscam)”是指其在神经元自我回避 (neuronal self-avoidance) 中发挥作用的细胞粘附分子。Dscam被阐述于例如 NP\_001380.2。

[0280] 根据另一种实施方式,提供了用于在神经胶质细胞中调节细胞粘附分子L1 (L1cam) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-182或其前体的活性或表达。

[0281] 如在本文中所使用的,术语“细胞粘附分子L1 (L1cam)”是指神经元细胞粘附分子。L1cam被阐述于例如NP\_000416.1、NP\_001137435.1、NP\_076493.1。

[0282] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节Translin相关X蛋白 (Tsnax) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-182或其前体的活性或表达。

[0283] 如在本文中所使用的,术语“Translin相关X蛋白 (Tsnax)”是指与translin特异性地相互作用的蛋白。Tsnax被阐述于例如NP\_005990.1。

[0284] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节大麻素受体1 (CB1) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-19或其前体的活性或表达。

[0285] 如在本文中所使用的,术语“大麻素受体1 (CB1)”是指细胞膜受体 (还被称为 CNR1)。CB1被阐述于例如NP\_001153698.1、NP\_001153730.1、NP\_001153731.1、NP\_057167.2、NP\_149421.2。

[0286] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节FK506结合蛋白5 (FKBP5) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-15或其前体的活性或表达。

[0287] 如在本文中所使用的,术语“FK506结合蛋白5 (FKBP5)”是指特异性地结合于免疫抑制剂FK506和雷帕霉素的蛋白。FKBP5被阐述于例如NP\_001139247.1、NP\_001139248.1、NP\_001139249.1、NP\_004108.1。

[0288] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节突触趋化素1a (Syntaxin 1a) (Stx1a) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-15或其前体的活性或表达。

[0289] 如在本文中所使用的,术语“突触趋化素1a (Syntaxin 1a) (Stx1a)”是指神经系统特异性蛋白。Stx1a被阐述于例如NP\_001159375.1、NP\_004594.1。

[0290] 根据另一种实施方式,提供了在神经胶质细胞中调节血清/糖皮质激素调节激酶 (Sgk1) 基因的表达的方法,该方法包括调整miR-15或其前体的活性或表达。

[0291] 如在本文中所使用的,术语“血清/糖皮质激素调节激酶 (Sgk1)”是指丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。Sgk1被阐述于例如NP\_001137148.1、NP\_001137149.1、NP\_001137150.1、NP\_005618.2。

[0292] 本教导设想上调(即提高)或下调(即降低)上述基因的表达水平。

[0293] 通常通过将微RNA多核苷酸给予靶细胞或在靶细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)中表达微RNA多核苷酸来下调根据本教导的基因表达(如在上文中进一步详细描述)。

[0294] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调Slc6a4基因的表达时,调节包括上调miR-135和/或miR-335。

[0295] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调Htr1a基因的表达时,调节包括上调miR-135、miR-335、miR-181、miR-182和/或miR-26。

[0296] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调MaoA基因的表达时,调节包括上调miR-27。

[0297] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调Adrb1基因的表达时,调节包括上调miR-19。

[0298] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调CRH 1型受体基因的表达时,调节包括上调miR-15。

[0299] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调CB1基因的表达时,调节包括上调miR-19。

[0300] 根据一种具体实施方式,当调节包括下调FKBP5基因的表达时,调节包括上调miR-15。

[0301] 可替代地,根据本发明的另一种实施方式,通过给予能够下调微RNA的表达的制剂或在靶细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)中表达能够下调微RNA的表达的制剂来上调基因表达。

[0302] 可以利用多种分子,其干扰转录和/或翻译(例如,RNA沉默剂、核酶、DNA酶和反义),在基因组水平和/或转录水平上进行微RNA的下调。

[0303] 下调微RNA表达的方法在本领域中是已知的。

[0304] 下调miR活性的核酸剂包括但不限于靶模拟物、微RNA抗性基因和miRNA抑制剂。

[0305] 靶模拟物或微RNA抗性靶基本上与微RNA互补,条件是允许一个或多个以下错配:

[0306] (a) 在微RNA的5'端处的核苷酸和在靶模拟物或微RNA抗性靶中的相应核苷酸序列之间的错配;

[0307] (b) 在微RNA的位置1至位置9处的任何一个核苷酸和在靶模拟物或微RNA抗性靶中的相应核苷酸序列之间的错配;以及

[0308] (c) 在微RNA的位置12至位置21处的任何一个核苷酸和在靶模拟物或微RNA抗性靶中的相应核苷酸序列之间的三个错配,条件是不存在两个以上的连续错配。

[0309] 靶模拟RNA基本上类似于靶RNA,其被修饰以使得它耐miRNA诱导的切割,例如通过修饰其序列使得将变异引入与miRNA的核苷酸10或11互补的靶序列的核苷酸,从而导致错配。

[0310] 可替代地,可以实施微RNA抗性靶。因此,可以在靶基因的微RNA结合位点处引入沉默突变,使得以某种方式改变DNA和产生的RNA序列,从而防止微RNA结合,但蛋白质的氨基酸序列并未改变。因此,可以合成新序列而不是现有的结合位点,其中DNA序列被改变,导致缺乏结合于它的靶的miRNA。

[0311] 根据一种具体实施方式,将靶模拟物或微RNA抗性靶连接至天然与识别靶基因的前miRNA相关的启动子并被引入植物细胞。以这种方式,miRN的靶模拟物或微RNA抗性靶RNA

将在和miRNA相同的情况下被表达,并且靶模拟物或微RNA抗性靶RNA将替代由miRNA诱导切割而降解的非靶模拟物/微RNA抗性靶RNA。

[0312] 还可以通过同源重组引入非功能性miRNA等位基因或miRNA抗性靶基因以替代miRNA编码等位基因或miRNA敏感靶基因。

[0313] 通过在植物启动子的表达下将目标核酸(例如,miRNA、靶基因、沉默剂等)克隆进入核酸表达构建体来进行重组表达。

[0314] 在本发明的其他实施方式中,将合成的单链核酸用作miRNA抑制剂。miRNA抑制剂的长度通常为约17至25个核苷酸并且包含与成熟miRNA的5'至3'序列至少90%互补的5'至3'序列。在某些实施方式中,miRNA抑制剂分子在长度上是17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸,或可从其衍生的任何范围。此外,miRNA抑制剂具有与成熟miRNA,特别地是成熟的天然存在的miRNA的5'至3'序列或至少是90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9或100%,或从其可衍生的任何范围互补的序列(从5'至3')。

[0315] 可以利用瞬时转染技术使miRNA抑制剂接触细胞。miRNA抑制剂可商业上获自如Applied Biosystems等公司。

[0316] 可替代地,miRNA抑制剂可以是表达载体的一部分(如上文描述的)。在这种情况下,可以用载体瞬时或稳定转染细胞。

[0317] 根据一种具体实施方式,当调节包括上调Tph2基因的表达时,调节包括下调miR-181和/或miR-27。

[0318] 根据一种实施方式,通过使用特异性地结合微RNA和下调微RNA的表达的核酸序列来下调微RNA的表达。根据本发明可以使用的示例性核酸序列可以购自任何制造商,如,例如购自Genecopoeia(miArrest,基于微RNA载体的抑制剂)。

[0319] 因此,根据另一种实施方式,提供了包含用于下调miR-181、miR-182、miR-26、miR-27、miR-135、miR-335、miR-15和miR-19或它们的前体的表达的核酸序列的分离的多核苷酸。

[0320] 根据本发明可以用来下调miR-181的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:134-SEQ ID NO:137和SEQ ID NO:154-SEQ ID NO:157的多核苷酸。

[0321] 根据本发明可以用来下调miR-182的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:138-SEQ ID NO:141和SEQ ID NO:147的多核苷酸。

[0322] 根据本发明可以用来下调miR-26的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:126-SEQ ID NO:129和SEQ ID NO:145-SEQ ID NO:146的多核苷酸。

[0323] 根据本发明可以用来下调miR-27的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:130-SEQ ID NO:133和SEQ ID NO:152-SEQ ID NO:153的多核苷酸。

[0324] 根据本发明可以用来下调miR-135的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:110-SEQ ID NO:113和SEQ ID NO:142-SEQ ID NO:143的多核苷酸。

[0325] 根据本发明可以用来下调miR-335的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:114-SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:144的多核苷酸。

[0326] 根据本发明可以用来下调miR-15的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:118-SEQ ID NO:121和SEQ ID NO:150-SEQ ID NO:151的多核苷酸。

[0327] 根据本发明可以用来下调miR-19的表达的示例性多核苷酸包括但不限于那些阐述于SEQ ID NO:122-SEQ ID NO:125和SEQ ID NO:148-SEQ ID NO:149的多核苷酸。

[0328] 上述核酸序列可以进一步被包含在表达载体中(如上文中进一步详细描述)。

[0329] 本发明进一步设想,在细胞(例如神经胶质细胞或心肌细胞)中,在下调或上调microRNA水平后,评估靶基因(例如转录本或多肽)的表达。

[0330] 因此,可以利用分离的多核苷酸(例如,多核苷酸探针、寡核苷酸探针/引物)来确定靶基因(例如Slc6a4、Htr1a、MaoA、Adrb1、Adrb2、CRH1型受体、CB1、FKBP5、Tph2、Grm1、Grik3、Grm5、Grik2、Grm7、Gria2、Dscam、Llcam、Tsnax、Sgk1和/或Stx1a)核酸序列(例如转录本)的存在和/或水平,上述分离的多核苷酸能够杂交至靶基因的核酸序列(例如,如阐述于例如NM\_001045.4中的Slc6a4或其部分;如阐述于例如NM\_000524.3中的Htr1a或其部分;如阐述于例如NM\_000240.3或NM\_001270458.1中的MaoA或其部分;如阐述于例如NM\_000684.2中的Adrb1或其部分;如阐述于例如NM\_000024.5中的Adrb2或其部分;如阐述于例如NM\_001145146.1、NM\_001145147.1中的CRH 1型受体或其部分;如阐述于例如NM\_001160226.1、NM\_033181.3中的CB1或其部分;如阐述于例如NM\_001145775.1、NM\_001145777.1中的FKBP5或其部分;如阐述于例如NM\_173353.3中的Tph2或其部分;如阐述于例如NM\_000838.3、NM\_001114329.1中的Grm1或其部分;如阐述于例如NM\_000831.3中的Grik3或其部分;如阐述于例如NM\_000842.3、NM\_001143831.2中的Grm5或其部分;如阐述于例如NM\_001166247.1、NM\_021956.4中的Grik2或其部分;如阐述于例如NM\_000844.3、NM\_181874.2中的Grm7或其部分;如阐述于例如NM\_000826.3、NM\_001083619.1中的Gria2或其部分;如阐述于例如NM\_001389.3中的Dscam或其部分;如阐述于例如NM\_000425.3、NM\_001143963.1、NM\_024003.2中的Llcam或其部分;如阐述于例如NM\_005999.2中的Tsnax或其部分;如阐述于例如NM\_001143676.1、NM\_001143677.1、NM\_001143678.1中的Sgk1或其部分;和/或如阐述于例如NM\_001165903.1、NM\_004603.3中的Stx1a或其部分)。这样的多核苷酸可以是任何尺寸,如短多核苷酸(例如,具有15-200个碱基)和中等多核苷酸(例如,200-2000个碱基)或大于2000个碱基的长多核苷酸。

[0331] 本发明使用的分离的多核苷酸探针可以是任何直接或间接标记的RNA分子(例如, RNA寡核苷酸、体外转录RNA分子)、DNA分子(例如,寡核苷酸、cDNA分子、基因组分子)和/或它们的类似物[例如,肽核酸(PNA)],其对于本发明的靶基因RNA转录本是特异的。

[0332] 可以根据在本领域中已知的任何寡核苷酸合成方法来产生根据本发明的教导设计的寡核苷酸(如上文中详细描述的)。

[0333] 本发明的寡核苷酸具有至少17、至少18、至少19、至少20、至少22、至少25、至少30或至少40个碱基,其可特异性地与上文描述的序列改变杂交。

[0334] 本发明的寡核苷酸可以包含由嘌呤和嘧啶碱基组成、并以3'至5'磷酸二酯键键合的杂环核苷。

[0335] 优选使用的寡核苷酸是那些在主链、核苷间键或碱基上被修饰的寡核苷酸(如上文中广泛描述的)。

[0336] 可以利用标签或标记分子来直接或间接地标记本发明使用的分离的多核苷酸。这样的标记可以是,例如,荧光分子(例如,荧光素或得克萨斯红)、放射性分子(例如, $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP或 $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -ATP)和生色底物[例如,固红、BCIP/INT,可获自(ABCAM,Cambridge,MA)]。可以

通过将标记分子共价连接至多核苷酸(例如,利用固相合成)或通过经由聚合的加入(例如,利用体外转录反应或随机引发标记)来实现直接标记。可以通过将多核苷酸共价连接或结合至非标记的标签分子(例如,地高辛(异羟洋地黄毒甙元)或生物素)并随后使多核苷酸经受能够特别识别非标记的标签的标记分子(例如,抗地高辛抗体或链霉亲和素)来实现间接标记。

[0337] 上述多核苷酸可以用于多种RNA检测方法如Northern印迹分析、逆转录PCR(RT-PCR)[例如,半定量RT-PCR、定量RT-PCR,利用例如,Light Cycler™(Roche)]、RNA原位杂交(RNA-ISH)、原位RT-PCR染色[例如,如描述于Nuovo GJ, et al.1993, Intracellular localization of polymerase chain reaction(PCR)-amplified hepatitis C cDNA. Am J Surg Pathol.17:683-90, and Komminoth P, et al.1994, Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) and in situ RT-PCR. Pathol Res Pract., 190: 1017-25]和寡核苷酸微阵列分析[例如,利用Affymetrix微阵列(Affymetrix®, Santa Clara, CA)]。

[0338] 可以利用例如特异性抗体并通过免疫复合物的形成[即,在存在于生物样品中的靶基因抗原(氨基酸序列)和特异性抗体之间形成的复合物]来确定靶基因(例如,Slc6a4、Htr1a、MaoA、Adrb1、Adrb2、CRH 1型受体、CB1、FKBP5、Tph2、Grm1、Grik3、Grm5、Grik2、Grm7、Gria2、Dscam、L1cam、Tsnax、Sgk1和/或Stx1a)氨基酸序列(例如蛋白质)的存在和/或水平。

[0339] 可以在多种温度、盐浓度和pH值(其可以取决于方法和使用的生物样品)下形成本发明的免疫复合物,并且本领域技术人员能够调节适用于形成每种免疫复合物的条件。

[0340] 如在本发明中使用的,术语“抗体”包括完整分子以及其功能片段,如Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单域分子如对抗原的表位的VH和VL。这些功能性抗体片段的定义如下:(1)Fab,包含抗体分子的单价抗原结合片段的片段,可以通过用木瓜蛋白酶消化全抗体以产生完整轻链和一个重链的一部分来产生;(2)Fab',抗体分子的片段,其可以通过用胃蛋白酶处理全抗体、随后还原以产生完整轻链和重链的一部分来获得;每个抗体分子获得两个Fab'片段;(3)(Fab')<sub>2</sub>,抗体的片段,其可以通过用胃蛋白酶处理全抗体而没有随后还原来获得;F(ab')<sub>2</sub>是借助于两个二硫键保持在一起的两个Fab'片段的二聚体;(4)Fv,定义为基因工程片段,其包含轻链的可变区和重链的可变区,表达为两个链;(5)单链抗体(“SCA”),基因工程分子,其包含轻链的可变区和重链的可变区,通过合适的多肽接头(作为基因融合的单链分子)加以连接;以及(6)单域抗体,由单VH或VL域构成,其呈现相对于抗原的足够的亲和力。

[0341] 用于产生多克隆和单克隆抗体以及它们的片段的方法在本领域中是众所周知的(参见例如,Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 以引用方式加入本文)。

[0342] 可以通过蛋白水解抗体或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其他蛋白表达系统)中表达编码片段的DNA来制备根据本发明的抗体片段。可以通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全抗体(通过常规方法)来获得抗体片段。例如,可以通过借助于胃蛋白酶的抗体的酶促切割以提供5S片段表示的F(ab')<sub>2</sub>来产生抗体片段。可以利

用硫醇还原剂和可选地用于巯基的封闭基团(产生自二硫键的切割)来进一步切割此片段,以产生3.5S Fab'单价片段。可替代地,利用胃蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价Fab'片段和Fc片段。这些方法描述于,例如,Goldenberg,美国专利号US 4,036,945和US 4,331,647,以及其中包括的参考文献,上述专利的全部内容以引用方式结合于本文。还参见Porter,R.R.[Biochem.J.73:119-126(1959)]。还可以使用切割抗体的其他方法,如重链的分离以形成单价轻重链片段,进一步切割片段,或其他酶促、化学或基因技术,只要片段结合至由完整抗体识别的抗原。

[0343] Fv片段包含VH和VL链的缔合。这种缔合可以是非共价的,如描述于Inbar et al.[Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 69:2659-62(19720)]。可替代地,可以通过分子间二硫键或通过化学物质如戊二醛的交联来连接可变链。优选地,Fv片段包含由肽接头连接的VH和VL链。通过构建结构基因来制备这些单链抗原结合蛋白(scFv),其中上述结构基因包含编码由寡核苷酸连接的VH和VL结构域的DNA序列。将结构基因插入表达载体,其随后被引入宿主细胞如大肠杆菌。重组宿主细胞合成单个多肽链,其中接头肽桥接两个V结构域。用于产生scFv的方法描述于,例如,Whitlow and Filpula,Methods 2:97-105(1991);Bird et al.,Science 242:423-426(1988);Pack et al.,Bio/Technology 11:1271-77(1993);以及美国专利号US 4,946,778,其全部内容以引用方式结合于本文。

[0344] 另一种形式的抗体片段是编码单互补决定区(CDR)的肽。可以通过构建编码目标抗体的CDR的基因来获得CDR肽("最小识别单位")。例如,通过利用聚合酶链反应以自产生抗体的细胞的RNA合成可变区来制备这样的基因。参见,例如,Larrick and Fry[Methods, 2:106-10(1991)]。

[0345] 还可以利用在本领域中已知的各种技术,包括噬菌体展示文库来产生抗体[Hoogenboom and Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks et al.,J.Mol.Biol.,222:581(1991)]。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole et al.,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77(1985)和Boerner et al.,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)]。相似地,可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如,小鼠(其中内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全失活)来制备人抗体。在激发(challenge)后,观测到人抗体生产,其在所有方面非常类似于在人类中看到的,包括基因重排、装配和抗体谱。这种方式描述于,例如,美国专利号US 5,545,807、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016,以及描述于以下科学出版物:Marks et al.,Bio/Technology 10,:779-783(1992);Lonberg et al.,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368 812-13(1994);Fishwild et al.,Nature Biotechnology 14,845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14:826(1996);以及Lonberg and Huszar,Intern.Rev.Immunol.13,65-93(1995)。

[0346] 根据本发明可以使用的示例性抗体包括例如抗Slc6a4抗体,例如可获自Abnova Corporation、Abgent and MBL International;抗Htr1a抗体,例如可获自Novus Biologicals、Acris Antibodies GmbH and Abnova Corporation;抗MaoA抗体,例如可获自Abnova Corporation、Proteintech Group,Inc.和Abgent;抗Adrb1抗体,例如可获自Biorbyt、Abgent和抗体在线;抗Adrb2抗体,例如可获自Tocris Bioscience、Abnova Corporation和抗体在线;抗CRH 1型受体抗体,例如可获自MyBioSource.com、Abcam

andNovus Biologicals;抗CB1抗体,例如可获自Santa Cruz Biotechnology,Inc.和Epitomics,Inc.;抗FKBP5抗体,例如可获自BD Biosciences和Abnova Corporation;抗Tph2抗体,例如可获自Novus Biologicals和Acris Antibodies GmbH;抗Grm1抗体,例如可获自Novus Biologicals和Biorbyt;抗Grik3抗体,例如可获自Acris Antibodies GmbH和Atlas Antibodies;抗Grm5抗体,例如可获自Biorbyt和Acris Antibodies GmbH;抗Grik2抗体,例如可获自Proteintech Group,Inc.、Aviva Systems Biology和Abgent;抗Grm7抗体,例如可获自Acris Antibodies GmbH和抗体在线;抗Gria2抗体,例如可获自Proteintech Group,Inc.和Abnova Corporation;抗Dscam抗体,例如可获自Novus Biologicals和R&D Systems;抗Llcam抗体,例如可获自GeneTex、Novus Biologicals和Acris Antibodies GmbH;抗Tsnax抗体,例如可获自BD Biosciences和GenWay Biotech, Inc.;抗Sgk1抗体,例如可获自Epitomics,Inc.和Acris Antibodies GmbH;和/或抗Stx1a抗体,例如可获自MBL International and Spring Bioscience。

[0347] 多种方法可以用来检测本发明的免疫复合物的形成并且本领域技术人员能够确定何种方法适用于每种免疫复合物和/或用于诊断的细胞类型。

[0348] 可以利用在本领域中已知的方法来标记在本发明的免疫复合物中使用的特异性抗体(例如,抗Slc6a4抗体、抗Htr1a抗体、抗MaoA抗体、抗Adrb1抗体、抗Adrb2抗体、抗CRH 1型受体抗体、抗CB1抗体、抗FKBP5抗体、抗Tph2抗体、抗Grm1抗体、抗Grik3抗体、抗Grm5抗体、抗Grik2抗体、抗Grm7抗体、抗Gria2抗体、抗Dscam抗体、抗Llcam抗体、抗Tsnax抗体、抗Sgk1抗体和/或抗Stx1a抗体)。可以理解的是,标记抗体可以是一抗(即,其结合于特异性抗原,例如,靶基因特异性抗原)或二抗(例如,标记的羊抗兔抗体、标记的小鼠抗人抗体),其结合于一抗。可以将抗体直接连接至标记或酶。

[0349] 本发明的抗体可以被荧光标记(利用连接至抗体的荧光染料)、放射性标记(利用放射性标记例如, $^{125}\text{I}$ ,抗体)或连接至酶(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)并且连同生色底物一起用来产生比色反应。由本发明的酶连接抗体采用的生色底物包括但不限于AEC、固红、ELF-97底物[2-(5'-氯-2-磷酸氧基苯基)-6-氯-4(3H)-喹唑啉酮]、磷酸对硝基苯酯(PNPP)、酚酞二磷酸酯和ELF 39-磷酸酯、BCIP/INT、Vector Red (VR)、用于碱性磷酸酶的淡红色和洋红色磷酸酯(Avivi C., et al., 1994, J Histochem. Cytochem. 1994; 42: 551-4), 以及Nova Red、二氨基联苯胺(DAB)、Vector (R) SG底物、用于过氧化物酶的鲁米诺类化学发光底物。这些酶底物可商业上获自Sigma (St Louis, MO, USA)、Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA)、Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)、Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA)、Dako Cytomation (Denmark)。

[0350] 可以利用荧光激活细胞分选(FACS)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹和放射性免疫测定(RIA)分析、免疫沉淀(IP)或通过基于分子量的方法来检测生物样品中的免疫复合物,生物样品如血液样品或血清,其可以包含可溶性(例如,分泌的、脱落的)靶基因多肽。

[0351] 对于蛋白质印迹,蛋白质提取自细胞样品并经受电泳(例如,SDS-PAGE)并印迹至膜(例如,尼龙或PVDF)。然后使上述膜与特异性抗体(例如,抗Slc6a4抗体、抗Htr1a抗体、抗MaoA抗体、抗Adrb1抗体、抗Adrb2抗体、抗CRH 1型受体抗体、抗CB1抗体、抗FKBP5抗体、抗Tph2抗体、抗Grm1抗体、抗Grik3抗体、抗Grm5抗体、抗Grik2抗体、抗Grm7抗体、抗Gria2抗

体、抗Dscam抗体、抗L1cam抗体、抗Tsnax抗体、抗Sgk1抗体和/或抗Stx1a抗体)相互作用,其可以是直接标记或进一步经受二级标记的抗体。检测可以通过放射自显影、比色反应或化学发光。这种方法允许其中通过在膜上的相对位置(其表示在电泳期间在丙烯酰胺凝胶中的迁移距离)量化底物的量以及确定它的特性。

[0352] 在生物样品中抗原的浓度较低的情况下,可以通过免疫沉淀(IP)来检测抗原(靶基因氨基酸序列)。对于免疫沉淀分析,特异性抗体(例如抗Slc6a4抗体、抗Htr1a抗体、抗MaoA抗体、抗Adrb1抗体、抗Adrb2抗体、抗CRH 1型受体抗体、抗CB1抗体、抗FKBP5抗体、抗Tph2抗体、抗Grm1抗体、抗Grik3抗体、抗Grm5抗体、抗Grik2抗体、抗Grm7抗体、抗Gria2抗体、抗Dscam抗体、抗L1cam抗体、抗Tsnax抗体、抗Sgk1抗体和/或抗Stx1a抗体)可以与包含靶基因多肽的样品(例如,细胞裂解液)直接相互作用,并且可以利用连接至珠的二抗来进一步检测形成的复合物(例如,如果特异性抗体是小鼠单克隆抗体,则二抗可以是连接至例如琼脂糖珠的抗小鼠抗体)。然后通过离心作用来沉淀珠,其后,可以自珠分离沉淀的蛋白质(例如,靶基因多肽和特异性抗体)(例如,利用在95℃下的变性)并利用抗体进一步经受蛋白印迹分析。可替代地,可以将特异性抗体和珠连接的二抗加入包含抗原(靶基因多肽)的生物样品从而形成免疫复合物。可替代地,如果靶基因多肽是高度糖基化蛋白,则还可以利用能够结合糖基化多肽如伴刀豆凝集素A(GE Healthcare Bio-Sciences,Uppsala,瑞典)(其还可以被连接至珠)的底物来沉淀它,接着蛋白印迹分析特异性抗体(如上所述)。

[0353] FACS分析使得能够检测存在于细胞膜上的抗原。简要地,将特异性抗体(如上所述)连接至荧光团并借助于细胞分选机进行检测,其中当光束穿过其时,上述细胞分选机读取由每个细胞发射的光的波长。这种方法可以同时采用两种或更多种抗体。

[0354] 还可以利用ELISA来确定靶基因多肽的存在和/或水平。简要地,将包含靶基因抗原的样品固定于表面如微量滴定板的孔。施用耦合于酶的抗原特异性抗体(例如抗Slc6a4抗体、抗Htr1a抗体、抗MaoA抗体、抗Adrb1抗体、抗Adrb2抗体、抗CRH 1型受体抗体、抗CB1抗体、抗FKBP5抗体、抗Tph2抗体、抗Grm1抗体、抗Grik3抗体、抗Grm5抗体、抗Grik2抗体、抗Grm7抗体、抗Gria2抗体、抗Dscam抗体、抗L1cam抗体、抗Tsnax抗体、抗Sgk1抗体和/或抗Stx1a抗体)并允许结合抗原。然后通过比色反应并采用耦合于抗体的酶来检测和量化抗体的存在。在这种方法中通常采用的酶包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。如果很好校准并在响应的线性范围内,则在样品中存在的底物的量与产生的颜色的量成正比。底物标准通常用来改善定量的准确性。

[0355] 还可以利用放射性免疫测定(RIA)来确定靶基因多肽的存在和/或水平。在一种形式中,此方法涉及用固定在可沉淀载体如琼脂糖珠上的特异性抗体和放射性标记抗体结合蛋白(例如,用I<sup>125</sup>标记的蛋白A)来沉淀所期望的抗原(靶基因多肽)。在沉淀颗粒中计数的数目与抗原的量成正比。

[0356] 在RIA的可替代形式中,采用标记抗原和未标记抗体结合蛋白。以不同量添加包含未知量抗原的样品。自标记抗原的沉淀计数的减少与在添加样品中抗原的量成正比。

[0357] 还可以利用基于分子量的方法来确定靶基因多肽的存在和/或水平。因为免疫复合物表现出比它的组分更高的分子量,所以还可以采用能够检测分子量的变化的方法。例如,可以通过凝胶阻滞试验来检测免疫复合物。简要地,用样品加载非变性丙烯酰胺凝胶。和其组分相比,蛋白质产物的尺寸(分子量)的移动(shift)表示免疫复合物的存在。利用非



特异性蛋白质染色如银染色或考马斯蓝染色可以观测到向更高的分子量的移动。

[0358] 可以利用原位检测在细胞上的抗体的结合的免疫染色方法来原位检测在生物样品如组织切片(例如,石蜡包埋切片或冷冻切片)中的靶基因多肽。免疫染色程序的实例包括但不限于荧光标记免疫组化法(利用连接至抗体的荧光染料)、放射性标记免疫组化法(利用放射性标记例如,<sup>125</sup>I,抗体)和免疫细胞化学法[利用酶(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)和生色底物来产生比色反应]。可以理解的是,连接至抗体的酶可以使用各种生色底物(如上文描述的)。

[0359] 优选地,本发明使用的免疫染色是免疫组化法和/或免疫细胞化学法。

[0360] 免疫染色优选随后是利用染料(其结合于非染色细胞小室)来复染细胞。例如,如果标记抗体结合于在细胞质,上存在的抗原,则核染剂(例如,苏木精-伊红染色剂)是适当的复染。

[0361] 根据一种实施方式,上述方法包括在下调miR-181和/或miR-27后测量Tph2基因的表达。

[0362] 根据一种实施方式,上述方法包括在下调miR-181和/或miR-27后测量Tph2基因的表达。

[0363] 根据一种实施方式,上述方法包括在上调miR-135、miR-335、miR-181、miR-182和/或miR-26后测量Htr1a基因的表达。

[0364] 根据一种实施方式,上述方法包括在上调miR-27后测量MaoA基因的表达。

[0365] 根据一种实施方式,上述方法包括在上调miR-19后测量Adrb1基因的表达。

[0366] 根据一种实施方式,上述方法包括在上调CB1后测量CB1基因的表达。

[0367] 根据一种实施方式,上述方法包括在上调miR-15后测量CRH 1型受体基因的表达。

[0368] 根据一种实施方式,上述方法包括在上调miR-15后测量FKBP5基因的表达。

[0369] 本发明的发明人已经进一步认识到,在患有五羟色胺相关病症(以上所述)的受试者中,mR135被上调。

[0370] 因此,提供了用于在需要其的受试者诊断五羟色胺相关病症的方法,该方法包括测量在受试者的血液中miR-135的表达水平,其中,和健康受试者的血液样品相比,miR-135的高表达水平表示五羟色胺相关病症。

[0371] 分析在血液样品中的miR的方法在本领域中是众所周知的并且描述于下文。

[0372] 可以利用金标准方法来进一步评估和确定诊断。通常,全部患者医疗史、身体评估和症状的全面评估中的至少一种有助于确定抑郁的原因。标准化的问卷调查可以是有益的,如用于抑郁的Hamilton等级量表,和Beck抑郁调查表。

[0373] 本发明的发明人已进一步表明,在用抗抑郁药如氟西汀(SSRI类的抗抑郁剂)治疗的受试者中,miR-135a血浆水平降低,而在这些相同受试者中脑的miR-135a水平则提高(参见图3E-J)。

[0374] 因此,根据本发明的另一种实施方式,提供了监测抗抑郁药的治疗的方法,该方法包括:(a)用抗抑郁药治疗需要其的受试者;以及(b)在治疗之前和以治疗后,在受试者的血液中测量miR-135的表达水平,其中,和在用抗抑郁药治疗之前miR-135的表达水平相比,在用抗抑郁药治疗后,miR-135的较低的表达水平表示有效治疗。

[0375] 如在本文中所使用的,术语“抗抑郁药”是指用来缓解情绪失调如重性抑郁症和抑

郁症,以及焦虑性障碍如社交焦虑障碍的任何药物。示例性抗抑郁药包括但不限于选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRI,如西酞普兰、依他普仑、氟西汀、氟伏沙明、帕罗西汀和舍曲林);五羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI,如去甲文拉法辛(Desvenlafaxine)、度洛西汀、米那普仑和文拉法辛);去甲肾上腺素能和特定血清素能抗抑郁剂(如米安色林和米氮平);去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI,如阿托西汀、马吲哚、瑞波西汀和维洛沙秦);去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(如安非他酮);选择性五羟色胺再摄取增强子(如噻奈普汀);去甲肾上腺素-多巴胺去抑制剂(NDDI如阿戈美拉汀);三环类抗抑郁药(包括叔胺三环类抗抑郁药和仲胺三环类抗抑郁药);以及单胺氧化酶抑制剂(MAOI)。

[0376] 根据一种具体实施方式,抗抑郁药包括选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)或去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI)。

[0377] 通常在获自受试者的血液样品中测量miR-135的表达水平。

[0378] 如在本文中所使用的,术语“血液样品”是指新鲜全血、分级的(fractionated)全血和血浆。血液样品通常获自用抗抑郁药治疗后的受试者,然而,血液样品还可以获自在治疗之前的受试者用于进一步比较miR-135水平。

[0379] 和在治疗之前的miR-135表达水平相比,当在治疗后获得miR-135的较低表达水平时,则确定有效的抗抑郁药治疗。

[0380] 根据另一种实施方式,提供了用于在需要其的受试者中监测精神病症的方法,该方法包括在受试者的血液中测量miR-135的表达水平,其中,和健康受试者相比,miR-135的高表达水平表示精神病症。

[0381] 根据另一种实施方式,精神病症包括抑郁、焦虑、应激、疲劳、认知功能受损、惊恐发作、强迫行为、成瘾性、社交恐怖症、睡眠障碍和食物相关障碍。

[0382] 根据一种具体实施方式,miR-135包括miR-135a。

[0383] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法,如例如,通过northern分析、RNA酶保护测定和PCR(例如实时PCR)来测量miR-135的表达水平。

[0384] 还可以通过评估患者的健康,以及另外或可替代地,通过对受试者进行行为测试、MRI或本领域技术人员已知的任何其他方法来监测治疗。

[0385] 预期,在成熟自本申请的专利的有效期内,将开发miRNA的许多相关抑制剂或可替代地miRNA修饰,以及术语微RNA的范围旨在演绎地(a priori)包括所有这类新技术。

[0386] 如在本文中所使用的,术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0387] 术语“包含”、“包括”、“含有”、“包含有”、“具有”以及它们的变化形式是指“包括但不限于”。

[0388] 术语“由组成”是指“包括并限于”。

[0389] 术语“基本上由组成”是指,组合物、方法或结构可以包括另外的成分、步骤和/或部分,但只要另外的成分、步骤和/或部分并不重大改变声称的组合物、方法或结构的基本和新颖特征。

[0390] 如在本文中所使用的,除非上下文另有明确规定,单数形式“一”、“一种”和“该”包括复数指称。例如,术语“化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括它们的混合物。

[0391] 在整个本申请中,可以以范围形式(range format)来提供本发明的各种实施方

式。应当理解的是,以范围形式进行的描述仅是为了方便和简洁起见,而不应该被解释为对本发明的范围的硬性限制。因此,范围的描述应被视为已经具体公开了所有可能的子范围以及在上述范围内的个别数值。例如,范围的描述如1至6应被视为已经具体公开了子范围如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及在上述范围内的个别数值,例如,1、2、3、4、5和6。这是适用的,而不管范围的宽度。

[0392] 每当在本文中指定数值范围时,它是指包括在指定范围内的任何引用数字(分数或整数)。短语在第一指定数和第二指定数“之间的范围”以及第一指定数“至”第二指定数“的范围”在本文中可互换使用并且旨在包括第一和第二指定数以及其间的所有分数和整数。

[0393] 如在本文中所使用的,术语“方法”是指用来完成给定任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于那些其是化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业人员已知的方式、手段、技术和程序,或由化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业人员从已知的方式、手段、技术和程序容易开发的方式、手段、技术和程序。

[0394] 可以理解的是,为清楚起见而在分开的实施方式的情况下加以描述本发明的某些特点还可以以组合方式提供在单个实施方式中。相反地,为简洁起见而在单个实施方式的情况下加以描述的本发明的各种特点还可以分开地或以任何合适的亚组合或当适合时以本发明的任何其他描述的实施方式加以提供。在各种实施方式的情况下描述的某些特点并不被认为是那些实施方式的基本特点,除非在没有那些要素的情况下实施方式是不起作用的。

[0395] 如上文描述的和如在以下权利要求部分中声称的本发明的各种实施方式和方面在以下实施例中发现实验支持。

[0396] 实施例

[0397] 现参照以下实施例,其连同以上描述一起,以非限制性方式说明本发明。

[0398] 通常,本文中使用的术语和在本发明中采用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。在文献中充分解释了这样的技术。参见,例如,“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook et al.,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes I-III Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel et al.,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley& Sons,New York(1988);Watson et al.,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren et al.(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,Vols.1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);方法,如阐述于美国专利号4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659和5,272,057;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,Volumes I-III Cellis,J.E.,ed.(1994);“Current Protocols in Immunology”Volumes I-III Coligan J.E.,ed.(1994);Stites et al.(eds),“Basic and Clinical Immunology”(8th Edition),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell and Shiigi(eds),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H.Freeman and Co.,New York(1980);可用的免疫测定广泛地描述于专利和科学文献,参见,例如,美国专利号3,791,932、US 3,839,153、US 3,850,752、US 3,850,578、US 3,

853,987、US 3,867,517、US 3,879,262、US 3,901,654、US 3,935,074、US 3,984,533、US 3,996,345、US 4,034,074、US 4,098,876、US 4,879,219、US 5,011,771和US 5,281,521;”Oligonucleotide Synthesis”Gait,M.J.,ed.(1984);”Nucleic Acid Hybridization”Hames,B.D.,and Higgins S.J.,eds.(1985);”Transcription and Translation”Hames,B.D.,and Higgins S.J.,Eds.(1984);”Animal Cell Culture”Freshney,R.I.,ed.(1986);”Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,(1986);”A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal,B.,(1984)and”Methods in Enzymology”Vol.1-317,Academic Press;”PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak et al.,”Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHLPRESS(1996);所有上述的全部内容以引用方式结合于本文。在整个本文件中提供了其他一般参考文献。其中的程序被认为是本领域中众所周知的并为方便读者加以提供。其中包含的所有信息以引用方式加入本文。

[0399] 实施例1

[0400] 在五羟色胺神经元中miR的差异表达

[0401] 材料与实验程序

[0402] 5HT神经元微RNA微阵列

[0403] 培养和分选来自胎龄为12天的ePET YFP小鼠的后脑细胞以从周围非5HT神经元区分5HT神经元。根据制造商说明书,在Agilent小鼠miRNA微阵列(Agilent Tech, Mississauga,ON,加拿大)设计号021828(基于Sanger miRBase释放12.0)上纯化、标记和杂交总RNA(包括miRNA群体)。扫描微阵列并利用Feature Extraction软件(Agilent Technologies)来提取和处理数据。在扫描后,利用Partek®Genomics Suite(Partek Inc.,St.Louis,MO)分析GeneView.txt文件的强度输出数据以量化微RNA的差分相对表达。根据在GeneView文件中的标志“gIsGeneDetected”来log2转换、分位数归一化和过滤数据。在666个小鼠miR中,保留198个,用于在过滤步骤后进一步分析。然后通过利用根据ANOVA具有显著性的1.5倍数变化的阈值来确定差异表达的miR。在ANOVA测试中计算对比。Benjamini和Hochberg校正用于假阳性减少(多重检验校正)。

[0404] 将3'UTR克隆进入Psicheck2荧光素酶表达质粒

[0405] 从小鼠基因组DNA或总脑cDNA PCR扩增Slc6a4、Htr1a、MaoA和Tph2的3'UTR序列。根据制造商的指导,将3'UTR PCR片段连接到pGEM-T easy载体(Promega),并进一步亚克隆到Psicheck2报告质粒(Promega)中并在荧光素酶的3'端处的单NotI位点。借助于穿过种子匹配序列的引物突出端合成突变的3'UTR序列(缺少miR-135种子序列)。通过诊断切割并通过测序来证实克隆取向。

[0406] 转染和荧光素酶分析

[0407] 以48孔格式用聚-L-赖氨酸生长HEK293T细胞至70-85%汇合并利用聚乙烯亚胺借助于以下质粒转染:5ng的Psicheck2-3'UTR质粒和215ng的过表达载体(用于特定miRNA),或空miR-vec过表达质粒。在转染后24小时,裂解细胞并测定荧光素酶报告基因活性(如先前所描述的)[Chen A.et al.Mol Endocrinol(2005)19:441-58]。将海肾荧光素酶值归一化到对照萤火虫荧光素酶水平(转录自相同载体,但并不受到测试的3'UTR的影响)并对每

种条件下的6孔重复加以平均。

[0408] 动物和住处

[0409] 将10周龄的成年C57BL/6J雄性小鼠 (Harlan, Jerusalem, 以色列) 安置在具有颠倒的12小时光照/黑暗周期的控温室 ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 中。可随意 (ad libitum) 获得食物和水。所有实验方案得到Institutional Animal Care and Use Committee of The Weizmann Institute of Science的批准。

[0410] 急性固定应激范例 (paradigm)

[0411] 在它们的黑暗周期期间将成年小鼠引入50ml通风管30分钟。

[0412] 慢性社交失败

[0413] 小鼠经受社交失败方案 (如先前所描述的) [Krishnan V. et al. Cell (2007) 131: 391-404]。简要地, 将小鼠放入攻击性ICR小鼠的饲养笼中并且它们身体相互作用5分钟。在此期间, ICR小鼠攻击入侵的小鼠并且侵入者显示服从姿态。然后将穿孔的透明的有机玻璃分隔物放置在动物之间并将小鼠保持在相同笼中24小时以允许感觉接触。然后在接下来的10天中, 用陌生的ICR小鼠重复上述程序。

[0414] 抗抑郁剂治疗

[0415] 小鼠接受i.p.注射三环类-丙咪嗪或SSRI-氟西汀或NRI-瑞波西汀 (20mg/kg, 在盐水中) 或盐水。进行慢性注射连续18-21天, 并在脑显微解剖之前24小时进行急性注射。

[0416] 显微解剖中缝核和血浆采集

[0417] 在除去脑并将它放置在丙烯酸大脑基质 (Stoelting) 上后, 自小鼠中缝核 (RN) 获得脑样品。利用标准刀片 (GEM) 并基于指定解剖标志物来获得切片。平端14G注射器用来自从基质除去的3mm切片提取RN区。另外, 在包含EDTA的管中采集躯干血液以避免凝固作用。在3,500g和4℃下离心作用30分钟后, 分离血浆并保持在-70℃下直到RNA纯化。

[0418] 微RNA纯化和定量RT-PCR表达分析

[0419] 利用miRNeasy微型试剂盒 (Qiagen) 并根据制造商说明书, 从分类的神经元、冷冻脑切块 (brain punches) 和血浆分离mRNA (包括微RNA), 并使用miScript Reverse转录试剂盒处理miRNA以产生cDNA。然后, 使用SYBR<sup>®</sup>Green PCR试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的指导, 在AB 7500热循环器 (Applied Biosystems) 中分析cDNA样品。连同商用通用引物一起使用对于每种miR的特异性引物, 同时将U6 snRNA用作内参。

[0420] 表1B: 用于实时PCR的引物序列

[0421]

SEQ ID NO.	引物序列	基因
1	TATGGCTTTTATTCCTATGTGA	miR135a
2	TATGGCTTTTCATTCCTATGTGA	miR135b
3	TTTGTTTCGTTTCGGCTCGCGTGA	miR375
4	GATGACACGCAAATTCGTGAA	U6
5	TAAGGCACGCGGTGAATGCC	miR124

[0422] 表1C: 用于分子克隆的引物序列

[0423]

引物序列	取向	产物尺寸	基因	
AGTTCTGCCGCTGATGATG (SEQ ID NO: 6)	正义	2600 具有 2	Htr1a 3' UTR	1
GCACAAATGGAGAGTCTGATT AAA (SEQ ID NO: 7)	反义		Htr1a 3' UTR	2
TGCCTTTAATGCAAAACAGC (SEQ ID NO: 8)	正义	2000 具有 4	MaoA 3'UTR	3
CCAAGTTTACAACCATCAAGC A (SEQ ID NO: 9)	反义		MaoA 3'UTR	4
ATCCGCATGAATGCTGTGTA (SEQ ID NO: 10)	正义	760 具有 6	Slc6a4 3'UTR	5
GTGGGTGGTGGGAAGAGACAC (SEQ ID NO: 11)	反义		Slc6a4 3'UTR	6
CCTACACGCAGAGCATTGAA (SEQ ID NO: 12)	正义	870 具有 8	Tph2 3' UTR	7
ACATCCCTGTGGGATTTGAG (SEQ ID NO: 13)	反义		Tph2 3' UTR	8
TGTCTTGCTTATATTTTCTCAG TAG (SEQ ID NO: 14)	正义	320 具有 6	突变的 Slc6a4 'UTR	9
GAAAATATAAGCAAGACATCC CTGTT (SEQ ID NO: 15)	反义	440 具有 5	突变的 Slc6a4 'UTR	10
AAAGATCCCTTTCCCCAATG (SEQ ID NO: 16)	正义	1400 具有 12	短 Htr1a 3' UTR	11

[0424]

CAGTGCCTCTTCTCCACAGA (SEQ ID NO: 17)	反义		短 Htr1a 3' UTR	12
ATAAGCAAGGGCCCAAAAGG AAGA (SEQ ID NO: 18)	正义	1300 具有 12	Htr1a 3' UTR 突 变种子 1	13
TTTTGGGCCCTTGCTTATAAGT CC (SEQ ID NO: 19)	反义	120 具有 11	Htr1a 3' UTR 突 变种子 1	14
CTGCCCTGCCACATGTGTTTTT AT (SEQ ID NO: 20)	正义	170 具有 12	Htr1a 3' UTR 突 变种子 2	15
TAACAAATAAAAACACATGTG GCA (SEQ ID NO: 21)	反义	1260 具有 11	Htr1a 3' UTR 突 变种子 2	16
ACCGGTCATATGATTCCCCAGT TTCCTGCTTT (SEQ ID NO: 22)	正义	199 具有 18	前-mmu-miR135b	17
ACCGGTCCTCTGTGGCTGGTC CTTAG (SEQ ID NO: 23)	反义		前-mmu-miR135b	18

[0425] 克隆miR135b过表达病毒载体

[0426] 通过PCR从小鼠基因组DNA扩增前miR-135b,其中引物添加限制酶AgeI位点,然后被内Slc6a4化(inSlc6a4ed)到pGEM-T Easy载体(Promega, Madison, WI)。在测序pGEM-T Easy并用AgeI消化pGEM-T Easy和pEGFP载体(Clontech laboratories Inc., Mountain View, CA)后,将未成熟的miR-135b序列连接至pEGFP载体以构建表达质粒pEGFP-miR-135b。然后,由BamHI和BsrGI来切割pEGFP-miR-135b,平行于用相同酶切割pCSC-E/Syn-eGFP质粒,然后将miR-135b-eGFP序列连接至pCSC-E/Syn以构建pCSC-eSNY-前miR-

135b-eGFP质粒,其是通过限制性内切核酸酶分析和DNA测序加以确认。

[0427] 生产慢病毒载体

[0428] 通过在HEK293T细胞中的瞬时转染来产生重组慢病毒(如先前所描述的)[Naldini L et al.,Proc Natl Acad Sci U S A(1996) 93:11382-8]。简要地,在转染后48和72小时收获感染性慢病毒,过滤通过0.45 $\mu$ m孔纤维素乙酸酯过滤器,并通过超速离心浓缩。

[0429] 脑内注射慢病毒

[0430] 为了对立体定向手术和慢病毒递送的部位提供精确控制,发明人使用了计算机引导的立体定位仪和机动的纳米注射器(Angle Two<sup>TM</sup> Stereotaxic Instrument, myNeurolab)。如先前所描述的[Singer O. et al. Nat Neurosci (2005) .8,1343-9],在全身麻醉下将小鼠放置在立体定向仪器上,并确定坐标,如由Franklin和Paxinos地图(atlas)所定义的。利用连接至机动的纳米注射器系统的Hamilton注射器来递送慢病毒制剂,并以0.2 $\mu$ l/分钟的速率来注射溶液。在两周恢复期后,小鼠经受行为和生理研究,然后被麻醉和灌注磷酸盐缓冲的4%多聚甲醛。连续切片固定脑为30 $\mu$ 切片以证实注射部位的精确性(利用免疫组化法)。

[0431] 免疫组化法

[0432] 如先前所描述的,进行用于免疫组化法的程序[Chen A et al. J Neurosci (2006) 26:5500-10]。对于GFP免疫染色,发明人使用了在兔中上升的生物素化抗GFP抗体作为一抗(Abcam, Cambridge, UK),以及链霉亲和素连接的Cy2作为二抗(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, USA)。

[0433] 行为评估

[0434] 在每次测试以前在适应测试室2小时后,在黑暗阶段中进行所有行为评估。

[0435] 悬尾实验

[0436] 在TSE Tail Suspension Monitor (TSE Systems, Bad Homburg, 德国) 中进行悬尾实验。通过尾尖用带子将每只小鼠捆起来,然后由力传感器悬挂10分钟。通过基于预先设定阈值的软件来计算和记录至不动花费的时间和挣扎花费的时间。

[0437] 改进的强迫游泳试验

[0438] 如先前所描述的进行悬尾实验[Krishnan V and Nestler EJ, Nature (2008) 455: 894-902]。简而言之,使用的仪器是直径为18cm的塑料桶,其充满25 $^{\circ}$ C的水至15cm的深度。将每只小鼠放置在桶的中心以开始6分钟视频记录测试阶段。在2-6分钟的测试期间利用EtoVision XT (Noldus, Wageningen, 荷兰) 来自动评分至不动花费的持续时间。

[0439] 运动活性

[0440] 为了控制源自动态运动的差异的行为效应的可能性,在48小时内检查小鼠的运动活性,其进行数天的适应。将小鼠单独安置在专门的饲养笼中并利用InfraMot系统 (TSE Systems, Bad Hamburg, 德国) 来测量行进(locomotion)。

[0441] 统计分析

[0442] 数据表示为平均值 $\pm$ SEM。为了测试统计显著性,在其中仅比较两组(如在微阵列验证qPCR之间)的情况下使用t检验。单向ANOVA用来在多组之间进行比较,如在荧光素酶分析中在不同治疗之间。在2个独立变量如SSRI NRI注射(在急性和慢性持续时间中)的情况下使用双向ANOVA。必要时,使用事后(post hoc) t检验以揭示统计显著性。当 $P < 0.05$ 时认为

组之间的差异是显著的。

[0443] 结果

[0444] 由ePET YFP胚胎的RN分离5HT神经元,并且使用miR微阵列将它们的miR表达分布与非5HT神经元(获自相同细胞核)相比(图1A)。与非5HT神经元相比,发现在5HT神经元中14种miR被上调而27种被下调超过2倍(参见以下表2A-表2B)。利用实时PCR进行阵列结果的代表性验证,针于在5HT神经元中上调的miR如miR-375 ( $P=0.0071$ ;图1B)以及下调的miR如miR-135a ( $P=0.0075$ ;图1C)。为了进一步研究miR作为5HT神经元的调节剂的作用,以假设驱动方式进行广泛的生物信息学分析。将已知的五羟色胺相关基因(其先前已被证明是与精神病理学相关)的靶向预测与微阵列结果相交叉(crossed with)。选择以下4种编码在RN中的5HT神经元中表达的靶基因的蛋白用于测试:五羟色胺转运体,其负责5HT再摄取(还被称为SERT或Slc6a4);五羟色胺抑制性受体1a(还被称为Htr1a);色氨酸羟化酶2(Tph2),在脑中5HT合成的限速酶;以及单胺羟化酶(MaoA),其失活5HT。使用两种不同的基于网络的算法进行对于这些基因的微RNA靶向预测:Target Scan[www(dot)targetscan(dot)org]和Miranda[www(dot)microrna(dot)org],并且与非5RH细胞相比,与在5HT神经元miR阵列中改变达至少 $\pm 1.5$ 的91种miR的列表相交叉。基于miR阵列数据和生物信息分析,8种miR被选择用于进一步体外研究(图1D-G)。

[0445] 表2A:与非血清素能相比,在5HT神经元中上调(超过2倍)的miR的列表。

[0446]

倍数变化	微RNA名称
20.72	mmu-miR-375
11.73	mmu-miR-376c
4.44	mmu-miR-7a
2.87	mmu-miR-137
2.79	mghev-miR-M1-2
2.61	mmu-miR-709
2.51	mmu-miR-291b-5p
2.40	mmu-miR-1224
2.37	mmu-miR-1892
2.31	mmu-miR-702
2.25	mmu-miR-139-3p
2.24	mmu-miR-762
2.10	mmu-miR-671-5p

[0447]

2.04	mmu-miR-483*
------	--------------

[0448] 表2B:与非血清素能相比,在5HT神经元中下调的(超过2倍)miR的列表。

[0449]

倍数变化	微RNA名称
-5.10	mmu-miR-691
-4.11	mmu-miR-4661
-3.95	mmu-miR-17
-3.18	mmu-miR-376b
-3.13	mmu-miR-124
-3.08	mmu-miR-218



-2.99	mmu-miR-128
-2.92	mmu-miR-140*
-2.86	mmu-miR-148a
-2.86	mmu-miR-340-5p
-2.82	mmu-miR-181c
-2.72	mmu-miR-210
-2.69	mmu-miR-135a
-2.66	mmu-miR-27a
-2.45	mmu-miR-452
-2.20	mmu-miR-370
-2.19	mmu-miR-300
-2.17	mmu-miR-376a
-2.13	mmu-miR-127
-2.12	mmu-miR-15b
-2.07	mmu-miR-101a
-2.06	mmu-miR-16
-2.05	mmu-miR-324-5p
-2.05	mmu-miR-434-5p
-2.03	mmu-miR-92a
-2.00	mmu-miR-669i

[0450] 进行体外荧光素酶分析以测试在测试的5HT相关基因的3' UTR和预测假定靶向它的miR之间的miR-靶相互作用。发明人发现,Tph2 3'UTR被miR-27b ( $P=0.0051$ ) 和miR-181c ( $P=0.0305$ ,图1H) 轻度抑制(约20%)并且MaoA 3'UTR还被miR-27b抑制( $P=0.0008$ ,图1I)。miR-135靶向Slc6a4 3'UTR(图2A和图2C)和Htr1a 3'UTR(图2B和图2D) 导致这些转录本的翻译的强压制。虽然miR-135a导致对Slc6a4 ( $P=0.014$ ) 和Htr1a ( $P<0.0001$ ) 约30%抑制,但miR-135b引起对Slc6a4 ( $P=0.0002$ ) 和Htr1a ( $P<0.0001$ ) 约50%抑制。另外,由miR-335 ( $P<0.0001$ )、miR-181c ( $P=0.0029$ ) 和miR-26a ( $P<0.0001$ ,图2D) 产生Htr1a 3'UTR的另外的抑制。进一步的基因组方式生物信息分析揭示在slc6a4 3'UTR中miR-135种子匹配(图2E) 以及在Htr1a 3'UTR中在两种确定种子匹配之一(图2F) 的强烈保守。Slc6a4转录本的3'UTR(其除去miR-135的miR种子匹配) 中的突变研究揭示Slc6a4的miR-135a和miR-135b靶向均为通过它的种子匹配序列介导。由miR-135诱导的抑制被在Slc6a4 3'UTR中的突变完全阻断(图2G)。使Htr1a miR-135种子匹配突变单独或同时揭示miR-135a通过远侧种子匹配而不是近侧种子匹配抑制Htr1a 3'UTR,而miR-135b则通过两种预测位点发挥作用(图2H)。

[0451] 发明人进一步测试在不同的环境激发或药物治疗后RN-miR-135体内表达的调节。在操作小鼠(即,急性固定应激)后移除RN,提取RNA,并使用实时PCR测试miR-135水平。因为已知通过急性应激会改变5HT水平,所以发明人测试在急性限制性应激后在不同时间点的miR-135水平,并发现在急性应激后miR-135a和miR-135b均被下调90分钟( $P<0.0001$ )。与对照小鼠相比,在应激后这些miR的降低的水平仍然保持24小时(对于miR-135a, $P=0.0357$ ,图3A;对于miR-135b, $P=0.0055$ ,图3B)。此外,因为已知在抑郁患者中并在抗抑郁剂药物治

疗后5HT神经元功能以及Slc6a4和Htr1a表达水平受到强烈影响,所以发明人测试了在暴露于用于诱导抑郁样行为的环境模型(慢性社交失败模型)和暴露于三环类抗抑郁药丙咪嗪的小鼠中两种miR变异体的水平。有趣的是,慢性社交失败应激并不改变在中缝核中的miR-135水平,然而,在应激和非应激小鼠中,急性或慢性给予的丙咪嗪均提高RN中的miR-135a ( $P=0.003$ ;图3C)和miR-135b ( $P=0.0093$ ;图3D)表达水平。因为丙咪嗪并不是特异性5HT再摄取抑制剂,所以发明人进一步测试了急性或慢性选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)氟西汀和去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI)瑞波西汀的影响,并且发现,在急性或慢性SSRI治疗后miR-135a水平的强烈增长( $P<0.0001$ ,图3E),而在RN中则没有miR-135b水平的强烈增长(图3F)。出于由在SSRI治疗后在RN中miR-135水平的变化激起的兴趣,发明人测试了在小鼠血浆中循环miR-135的水平,并且发现,在急性或慢性SSRI给予后,miR-135a水平的强烈降低(药物的主要影响, $P<0.0001$ ,图3G)而对于循环miR-135b水平则没有影响(图3H),这提示在SSRI给予后在RN和血浆的miR-135a水平之间的强反向相关性(图3I和3J)。

[0452] 为了进一步探索在整个动物方面miR-135水平的重要性,发明人特别地在成年小鼠的RN中体内操作miR-135水平并测试其对小鼠抑郁样行为的影响。为此,发明人使用增强的突触蛋白启动子构建了特别地在神经元中过表达miR-135b的重组慢病毒,其还同时表达GFP报告基因(参见以上材料与实验程序部分和图4A)。发明人通过将慢病毒注射进入成年小鼠的RN,并与对照慢病毒注射的小鼠比较在RN中的miR-135b水平测试了体内慢病毒。miR-135b水平的实时PCR分析揭示与对照慢病毒注射小鼠相比的10倍诱导( $P=0.0032$ ,图4B)。将注射过miR-135b过表达的成年小鼠暴露于慢性社交失败,以引发抑郁样行为,并随后进行行为测试。在行为测试后,灌注小鼠并分析脑的注射部位的位置(图4C-D)。RN miR-135过表达小鼠显示在强迫游泳(第3分钟, $P=0.0088$ ;以及第4分钟, $P=0.00330$ ;图4E)中和在悬尾实验(在测试的最后5分钟中, $P=0.07356$ ,图4F)中减少的固定状态时间而在它们的饲养笼运动中则没有任何观测到的变化(图4G-图4H),提示miR-135过表达的抗抑郁效应。

[0453] 综上,本发明的发明人确定了RN血清素能和非五羟色胺能神经元的特异性miR表达指纹图谱。本发明的发明人将这种独特的数据集与对于靶向5HT相关基因的miR的生物信息学预测相交叉。使用3' UTR的荧光素酶分析和在突变研究中本发明的发明人体外测试了对于Tph2、MaoA、Slc6a4和Htr1a的靶向预测,并且除了miR-靶相互作用以外,还揭示了miR-135对Slc6a4和Htr1a 3' UTR的强抑制作用。此外,发明人证明通过急性应激在RN中的miR-135被下调,而通过抗抑郁剂给予、特别地是通过SSRI药物被上调。此外,本发明的发明人确定了在SSRI给予后在RN中的miR-135a水平和在血浆中其水平之间的反向相关性。最后,本发明的发明人证明在成年小鼠RN中位点特异性过表达miR-135导致在社交失败后减少的抑郁样行为。

[0454] 实施例2

[0455] miR-19特异性地靶向1型 $\beta$ 肾上腺素能受体(Adrb1)

[0456] 材料与实验程序

[0457] 将3'UTR克隆进入Psicheck2荧光素酶表达质粒

[0458] 由小鼠基因组DNA PCR扩增ADRB1的3'UTR序列。由Epoch Biolabs, Inc. (TX, USA)合成缺少所有4种miR-19种子匹配的突变的3'UTR序列。根据制造商的指导将3'UTR PCR片

段连接至pGEM-T easy载体(Promega),并进一步亚克隆到在Psicheck2报告质粒(Promega)中的荧光素酶的3'端处的单NotI位点。通过诊断切割并通过测序来证实克隆取向。

#### [0459] 转染和荧光素酶分析

[0460] 以48孔格式用聚-L-赖氨酸生长HEK293T细胞或HT22神经元细胞至70-85%汇合并使用聚乙烯亚胺用以下质粒转染:Psicheck2-3'UTR质粒,在pEGFP质粒中的前-mmu-miR-19b过表达或单独pEGFP质粒(clontech),miR-19b敲除(KD)质粒(Genecopoeia)或对照-KD质粒(Genecopoeia)。在转染后24小时裂解细胞并测定荧光素酶报告基因活性(如先前所描述的)[Chen A. et al. Mol Endocrinol (2005) 19:441-58]。将海肾荧光素酶值归一化到对照萤火虫荧光素酶水平(转录自相同载体,但并不受到测试的3'UTR的影响)并对每种条件下的6孔重复加以平均。

#### [0461] 结果

[0462] 具有不同的、进化上保守的miRNA靶序列(其包含在它们的3'UTR中的若干重复单位)的应激相关基因的生物信息分析揭示miR-19作为用于靶向1型 $\beta$ 肾上腺素能受体(Adrb1)的强候选者,其中在Adrb1 3'UTR上具有三个强保守的和一個较低保守的miR-19种子匹配。Adrb1是肾上腺素能受体,其被表达在脑的不同区中,包括杏仁核、海马和室旁核(PVN)。杏仁核Adrb1先前被描述为影响焦虑样行为[Fu A et al., Brain Res (2008) 1211: 85-92; Rudoy CA and Van Bockstaele EJ, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry (2007) 31:1119-29]和恐惧记忆[Roozendaal B et al., J Neurosci (2004) 24: 8161-9; Roozendaal B et al., Neuroscience (2006) 138:901-10]。有趣的是,Adrb1被发现位于杏仁核的CRF阳性细胞上并且是G蛋白耦联受体(GPCR),其经由Gs来施加它的影响以进一步激活腺苷酸环化酶(AC)。存在10种已知的编码AC的基因,即ADCY1-ADCY10。生物信息学预测它们中的三种(ADCY1、ADCY7和ADCY9)被miR-19所靶向。ADCY1具有脑特异性表达并且先前的研究表明,在小鼠前脑中ADCY1的过表达会增强再识别记忆(recognition memory)和LTP[Wang H et al., Nat Neurosci (2004) 7:635-42]。

[0463] 为了研究miR-19是否确实通过它的在Adrb1-3'UTR或ADCY1-3'UTR上的假定靶序列来调节Adrb1或ADCY1表达,将完整或突变形式的Adrb1-3'UTR(图5)或ADCY1-3'UTR的克隆至Psicheck2表达质粒中的荧光素酶基因的下游。在突变形式的ADRB1-3'UTR中,缺乏用于miR-19b的所有4种种子匹配(图5)。在突变形式的部分ADCY1-3'UTR中,仅缺乏保守种子匹配(在3种中)。

[0464] 荧光素酶分析用来确定miR-19和Adrb1-3'UTR之间以及miR-19和ADCY1-3'UTR之间的相互作用的性质。在内源性地表达低水平的miR-19的HT22细胞中,在由完整或突变形式的ADRB1-3'UTR控制的荧光素酶水平之间没有发现差异(图6A)。然而,当在HT22细胞中过表达miR-19b时,当由完整形式驱动时,相对于突变形式的ADRB1-3'UTR,荧光素酶水平显著(约2倍)降低(除在归一化荧光素酶表达中一般的、似乎非特异性减少以外)(图6B)。在内源性地表达高水平的miR-19b的HEK293T细胞中,由ADRB1-3'UTR调节的荧光素酶表达水平低于当由突变形式的ADRB1-3'UTR调节时表达的荧光素酶表达水平2-4倍(图6C)。

[0465] 使用MiR敲除(KD)体系以在HEK293T细胞中操作miR-19水平。即,(1)miRCURY LNA KD探针(Exiqon, MA, USA, 图6D),和(2)基于质粒的敲除序列miArrest(Genecopoeia, Rockville, MD, USA, 图6E)。相对于对照杂乱的KD探针,LNA-抗miR-19b增强当由ADRB1-3'

UTR调节时表达的荧光素酶水平约20%，并且对突变形式的ADRB1-3' UTR没有影响(图6D)。然而，相对于对照KD序列，在由完整形式的ADRB1-3' UTR调节的荧光素酶表达中，基于质粒的miR-19b KD引起上达至2倍的增强(图6E)。相对于由突变形式的ADRB1-3' UTR驱动的荧光素酶水平，并没有实现荧光素酶水平的完整拯救。这可以通过探针/基因组序列的miR-19b特异性(用矛刺(spearing)miR-19a调节)、在HEK293T细胞中可能难以充分下调的高miR-19水平或在HEK293T细胞中表达的其他可能的miRNA(其可以结合于在ADRB1-3' UTR上的相同种子匹配序列)的影响来解释。

[0466] 实施例3A

[0467] 在慢性应激后，PFC和杏仁核中MiR-19a和MiR-19b被上调

[0468] 材料与实验程序

[0469] 动物和住处

[0470] 用CamKIIa-Cre小鼠[Dragatsis I et al Genesis. (2000) 26 (2) :133-5]杂交育种miR 17~92 flx/flx小鼠[Ventura A et al, Cell (2008) 86-875: (5) 132;7]。将转基因小鼠或成年C57BL/6J雄性小鼠安置在具有颠倒的12小时光照/黑暗周期的控温室(22±1℃)中。食物和水可随意获得。所有实验方案由Institutional Animal Care and Use Committee of The Weizmann Institute of Science批准。

[0471] 产生用于在成年脑中的miR-19b操作的慢病毒

[0472] 将MiR-19b KD序列克隆进入慢病毒质粒，在RNA聚合酶III-H1启动子后。另外，在慢病毒质粒中，在神经元特异性启动子(增强的突触蛋白，ESyn)后克隆前-miR-19b序列。对体内miR-19b-KD和前-miR-19b-过表达(OE)实验产生慢病毒。这些慢病毒用来在靶区中操作miR-19b水平，其中发现在行为/药物激发后miR-19水平被改变。

[0473] 产生在前脑中缺少miR-19的小鼠

[0474] 为了产生在前脑中缺少miR-19的小鼠，发明人正在育种携带在CamKIIa启动子下编码Cre重组酶的基因的小鼠，其中小鼠携带条件形式(conditional form)的miR簇miR17~92。MiR-19家族包括miR-19a和miR-19b。在小鼠基因组中，miR-19b具有两个相同拷贝，miR-19b-1和miR-19b-2。MiR19a和miR-19b-1位于相同的miRNA簇上，即miR17~92，而miR-19b-2则位于不同的基因组基因座，miR106a~363。后者似乎在小鼠组织中具有很少或没有表达，因此敲除miR17~92簇预计将足以对在前脑中的miR-19a和miR-19b表达水平产生深远影响。

[0475] 行为/药物激发

[0476] 将检查在前脑中缺少miR-17~92簇的小鼠或其中特别操作(在特定脑区中过表达或下调(KD))miR-19的小鼠的ADRB1、ADCY1以及其他转录本和基因产物的表达水平。还将测试这些动物的焦虑样行为、运动活性和记忆性能。此外，在WT小鼠中，在用去甲肾上腺素再摄取抑制剂瑞波西汀进行急性和慢性全身治疗后，在不同的目标区(E.G、海马、杏仁核和前脑)中检查miR-19a和miR-19b的表达水平。

[0477] 结果

[0478] 通过评估用去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI)瑞波西汀急性或慢性注射的小鼠的前额皮质(PFC)中的miR-19a/b水平，研究miRNA-19和Adrb1之间的生理性关联(图12A-图12D)。如图12A-图12D所示，在急性给予瑞波西汀后miR-19 a/b水平被下调(图12A、图12B)

而在慢性给予瑞波西汀后则被上调(图12C、图12D)。

[0479] 接着,在应激后,通过测量在经受社交失败方案的小鼠的PFC和杏仁核中的miR-19 a和miR-19 b的水平来评估miR-19的水平(图13A-图13D)。如图13A-图13D所示,在慢性应激后,在PFC和杏仁核中,miR-19 a和miR-19 b的水平均升高。这些结果说明,miR-19参与中央应激反应的调节。

[0480] 实施例3B

[0481] miRNA-19和大麻素受体1 (CB1)

[0482] 材料与实验程序

[0483] 动物和住处

[0484] 如描述于以上实施例3A。

[0485] 在成年脑中产生用于miRNA-19b操作的慢病毒

[0486] 如描述于以上实施例3A。

[0487] 结果

[0488] CB1是在脑中最丰富表达的GPCR的一种并且特别富集于皮质、杏仁核、海马、基底神经节和小脑(图15A-B) [Herkenham M.et al.,The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience(1991)11:563-583;Mackie, K.Handbook of experimental pharmacology(2005) 299-325]。CB1受体被高度表达在轴突和轴突末端上,其中它们被很好定位以调节神经传递。发明人发现CB1包含与miRNA-19相容的2个种子位点。

[0489] 使用荧光素酶分析来确定miRNA-19和CB1-3'UTR之间的相互作用的性质。当在HT22细胞(连同CB1的3'UTR)中miRNA-19b被过表达时,当与借助于相同3'UTR被过表达的GFP相比时,荧光素酶水平显著(50%)较低(图14),其支持miR-19在调节CB1水平中可能发挥的作用。进行另外的突变实验以证实预测的miR-19种子序列对观测到的调节的作用(如上文针对Adrb1所描述的)。

[0490] 有趣的是,先前的研究已令人信服地显示通过在杏仁核(BLA)的基底外侧核中在糖皮质激素、去甲肾上腺素能和大麻素信号之间的通讯会促进厌恶记忆的固结 [Roosendaal,B.et al.Neurobiology of learning and memory(2006) 86:249-255]。由Hill和McEwen提出的模型[Hill M.N.and McEwen B.S.Proc of the Nat Acad of Sci of the USA(2009) 106:4579-4580]说明BLA中用于记忆巩固的可能的作用机制(图16)。

[0491] 如目前的结果所说明的,miRNA-19似乎体外地调节Adrb1和CB1。使用例如特别递送到BLA的慢病毒(在那里它可以改变Adrb1和CB1的水平)进行miR-19的过表达和敲除并且进行检查在学习和记忆范例中小鼠的表现(如在有和没有暴露于充满压力的激发的情况下的恐惧条件反射(fear conditioning))的测试。

[0492] 实施例3C

[0493] 识别经受慢性应激的小鼠中差异表达的miRNA

[0494] 材料与实验程序

[0495] Ago2蛋白的免疫沉淀

[0496] 在补充有RNA酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和磷酸酯酶抑制剂(phosphatase inhibitor)的NP40缓冲液中,均化来自3只动物的3个杏仁核的池,其中上述动物来自相同

组(“易感”、“回弹”或对照)。在4℃下不断搅拌样品2小时。然后在微型离心机中在12,000rpm和4℃下离心样品20分钟,将上清放置在保持在冰上的保鲜管中并弃去沉淀物。在旋转和室温下,用Ago2单克隆抗体(WAKO)孵育磁性蛋白G珠(Dynabeads, Invitrogen)10分钟。在多次洗涤后将样品加入Ago2涂覆的蛋白G珠并4℃和搅拌下孵育过夜。次日,用PBS洗涤珠3次。对于RNA纯化,在RLT缓冲液中均化珠(RNeasy试剂盒,miRNA补充方案)。对于蛋白印迹分析,在样品缓冲液中煮沸珠以从珠释放蛋白质。

#### [0497] RNA纯化和微阵列

[0498] 使用RNeasy plus试剂盒(Qiagen),根据Qiagen补充方案1:纯化包含miRNA的总RNA,由Ago2免疫沉淀样品分离RNA。使用miRNeasy微型试剂盒(Qiagen)并根据制造商的建议从冷冻的脑切块分离用于所有其他目的的RNA,并且使用Agilent 2100生物分析仪来评价RNA完整性。在Ago2免疫沉淀后,用Affymetrix miRNA 2.0阵列(富含RNA方案)和Affymetrix小鼠基因1.0ST阵列进一步分析源自应激小鼠的组织的RNA。

#### [0499] 结果

[0500] 为了确定和研究分离自经受慢性应激范例和/或与“回弹”或“易感”行为表型相关的小鼠的杏仁核的差异表达的miRNA,使用了社交失败方案(参见方法部分)。

[0501] 为了识别miRNA和它们的靶基因的3'UTR之间的真实的连接(根据社交失败范例),进行Ago2复合物的免疫沉淀(IP)并分析共沉淀的miRNA和mRNA的群体。当成熟的miRNA形成时,将它并入RISC复合体。在RISC复合体中时Ago2可以促进特定miRNA和它的靶mRNA 3'UTR之间的相互作用[Meister G.et al.,Molecular cell(2004)15:185-197](图17A)。

[0502] 为了验证确实可以用其结合的RNA沉淀Ago2复合物,对幼龄小鼠的杏仁核进行IP。使用与单克隆Ago2抗体反应的蛋白G磁珠来进行IP。如图17B所示,从NIH 3T3细胞的提取物(图17B,泳道1)或杏仁核组织的提取物(图17B,泳道2)沉淀出特定的Ago2带。

[0503] 为了表明IP的特异性,将全脑样品分为两个部分,其中用抗Ago2来沉淀一部分,并用对照IgG1非特异性抗体来沉淀另一部分。特定的Ago2带仅存在于Ago2沉淀物中(图17B,泳道3、4)。

[0504] 因此,通过拉下(pulling down)Ago2复合物并分析在沉淀物质中的miRNA以及mRNA群体,则存在更多的机会发现在特定脑区中在给定miRNA和它的靶向的mRNA 3'UTR之间的正确连接。

#### [0505] 从经受社交失败范例的小鼠杏仁核分离Ago 2相关RNA

[0506] 接着,基于Ago2 IP实验的具体结果,实施同样的策略以揭示在经受社交失败方案的小鼠的脑中miRNA和它们的靶mRNA中的潜在差异。

[0507] 在社交失败范例10天后,将小鼠分为3组:对照、“易感”和“回弹”。当小鼠遇到来自相同品系并社交失败范例中攻击他的新小鼠而表现出社交回避时,则小鼠被表征为“易感”。如果小鼠并不逃避新的攻击性小鼠并与它相互接触,则小鼠被表征为“回弹”。大多数的经受社交失败的小鼠通常表现出社交回避,因而应被分类为“易感”。在实验中约仅10-20%的小鼠预计是“回弹”。以下示出是所进行的社交回避试验的实例。

[0508] 如图18A所示,将小鼠单独放置在社交迷宫中3分钟以便于适应。相机跟踪小鼠在整个迷宫中的移动。在图18C中,将相同小鼠暴露于隔开地放置的新ICR小鼠。相机跟踪在远离新小鼠的位置的场所的最远角中的小鼠。这种反应被认为是社交回避,因此此小鼠被分

类为“易感”。相比之下,在图18B和图18D中,小鼠并不表现出社交回避,因此被分类为“回弹”。

[0509] 40只小鼠经历社交失败范例而40只小鼠作为对照。在社交回避试验后,9只“回弹”小鼠、9只“易感”小鼠和12只对照小鼠被选择用于脑显微解剖。在社交回避试验后8天自杏仁核、BNST、PFC、中缝背核和海马采集脑样品以及躯干血液。

[0510] 合并获自3只不同鼠的3个杏仁核切块的池,并借助于抗Ago2进行免疫沉淀。在IP后,自沉淀物质提取RNA。在自每组拉出3个杏仁核后,存在来自“回弹”小鼠的3个RNA样品、来自“易感”小鼠的3个RNA样品和来自对照小鼠的4个RNA样品,总计10个RNA样品。用小鼠ST微阵列以及用miRNA阵列(均来自Affymetrix)来测试每个样品。检查了基因和miRNA,相对于对照组,在2组“易感”或“回弹”的每组中其被上调或下调。如果在某种miRNA和靶基因之间发生相互作用,则发明人预计在它们的总水平方面的相反的相关性。然而,在RISC复合体(用抗Ago2沉淀)中存在的mRNA预期具有高水平,这是因为它们仍未被片断化,因此当查看阵列数据时,发明人还检查相对于对照样品升高或下调的miRNA和潜在的mRNA靶,因为这指示它们在RISC复合体中相互作用。

[0511] 微阵列结果

[0512] 表3,在下文中,示出使用常规过滤器分析的初步阵列结果。

[0513] 表3A-表3B:在用Ago2进行IP后上调(表3A)或下调(表3B)的杏仁核miRNA的列表。

[0514]

上调	倍数变化 易感	倍数变化 回弹
mmu-miR-301a_st	1.96	2.11
mmu-miR-15a_st	1.66	1.87
mmu-miR-29a_st	1.42	1.82
mmu-miR-19b_st	1.97	2.34
mmu-miR-146b_st	1.55	1.94
mmu-miR-181d_st	1.54	1.64
mmu-miR-146a_st	1.41	1.60
mmu-miR-27b_st	1.45	1.91
mmu-miR-20a_st	1.57	1.52
mmu-miR-30a_st	1.34	1.65
mmu-miR-100_st	1.41	1.55
mmu-miR-153_st	1.44	1.92
mmu-miR-194_st	1.57	1.78
mmu-miR-30c_st	1.40	1.66
mmu-miR-23a_st	1.51	1.70
mmu-miR-106a_st	1.62	1.61
mmu-miR-30b_st	1.43	1.70
mmu-miR-195_st	1.59	1.98
mmu-miR-30e_st	1.36	1.56
mmu-miR-126-3p_st	1.58	1.76
mmu-let-7i_st	1.49	1.57
mmu-miR-434-5p_st	1.30	1.55
mmu-miR-376b_st	1.64	1.99

[0515]

mmu-miR-495_st	1.45	1.82
mmu-miR-369-5p_st	1.60	1.77
mmu-miR-421_st	1.71	1.53
mmu-miR-543_st	1.52	1.69
mmu-miR-410_st	1.44	1.76
mmu-miR-34b-5p_st	2.18	1.53

[0516] (表3A)



[0517]

下调	倍数变化 易感	倍数变化 回弹
mmu-miR-210_st	-1.59	-2.13
mmu-miR-298_st	-1.75	-2.08
mmu-miR-423-5p_st	-1.68	-1.94
mmu-miR-346_st	-1.74	-1.96
mmu-miR-139-3p_st	-1.71	-2.13
mmu-miR-320_st	-1.74	-2.03
mmu-miR-485_st	-1.53	-1.88
mmu-miR-491_st	-1.53	-2.01
mmu-miR-31_st	-1.30	-1.53
mmu-miR-92b_st	-1.20	-1.53
mmu-miR-93_st	-1.36	-1.50
mmu-miR-125a-3p_st	-1.32	-1.55
mmu-miR-134_st	-1.47	-1.63
mmu-miR-323-5p_st	-1.43	-1.76
mmu-miR-345-5p_st	-1.30	-1.62
mmu-miR-341_st	-1.36	-1.89
mmu-miR-370_st	-1.33	-2.04
mmu-miR-433_st	-1.49	-1.75
mmu-miR-455_st	-1.40	-1.61

[0518] (表3B)

[0519] \*对于表3A-表3B,数据被表示为对于“易感”或“回弹”小鼠与对照相比的倍数变化。粗体数值被显著改变。

[0520] 若干miRNA,其在小鼠的“易感”和“回弹”组中已被显著上调,已被选择和示于热点图(参见图19A-图19B)。

[0521] 基因表达阵列(mRNA)

[0522] 表4:在用Ago2进行IP后上调的杏仁核mRNA的列表。

[0523]

上调	倍数变化 易感	倍数变化 回弹
Tnrc18	1.36	1.23
Ifi30	1.34	1.21
Adamts9	1.79	1.52
Fkbp5	1.35	1.26
Adh1	1.42	1.05
Pxdn	1.32	1.19
Impdh2	1.41	1.02
Pdzd2	1.31	1.31
Csmd3	1.33	1.44
Usf1	1.33	1.20
A2m	1.71	1.09
Ccnd3	1.34	1.10
Rrh	1.33	1.02
Wfikkn2	1.40	1.07
Fras1	1.48	1.34
Notch2	1.50	1.22
Fam38a	1.33	1.18
Hist1h3f	1.31	1.19
Fam167a	1.31	1.05
Calml4	1.68	1.11
Tspan4	1.30	1.21
Dnahc6	1.38	1.07
Jag2	1.31	1.19
Shank2	1.60	1.42
Dock6	1.33	1.10
Mamdc2	1.30	1.20
Sgms2	1.39	1.13
Iqub	1.51	1.11
Ubxn11	1.36	1.06
Wfdc2	1.53	1.11
Spef2	1.33	1.16
Fggy	1.31	1.14
Pcolce2	1.37	1.16
Thbs1	1.32	1.13
Dnahc7b	1.40	1.13
Nt5dc2	1.41	1.12
Slc4a2	1.34	1.07
Adamts17	1.40	1.35
Plscr2	1.34	1.21
Clic6	1.43	1.13

[0524]

St6galnac2	1.38	1.08
Amigo2	1.33	1.06
Trio	1.33	1.15
Lamb1-1	1.35	1.20
Sema3b	1.40	1.01
Fap	1.39	1.10
Frem1	1.51	1.20
Pon1	1.34	1.03
Plin4	1.43	1.24
Steap1	1.36	1.10
Rdh5	1.52	1.13
Cldn2	1.56	1.11
Frrs1	1.37	1.10
Spef2	1.36	1.07
Slco1a5	1.31	1.13
Ltc4s	1.35	1.17
Mfsd7c	1.37	1.14
Acss3	1.32	1.16
Hif3a	1.36	1.17
丝氨酸蛋白酶抑制 蛋白 b8	1.40	1.18
Pcolce	1.36	1.16
Dnmt3a	1.20	1.19
GILZ (Tsc22d3)	1.19	1.15
Sdk2	1.29	1.36
Prg4	1.16	1.72
Fbn1	1.24	1.10
Slitrk6	1.11	1.28
Plxna1	1.30	1.16
Plxnb2	1.25	1.10
Sema4b	1.29	1.14

[0525] \*数据被表示为,“易感”或“回弹”小鼠与对照相比的倍数变化。粗体数值被显著改变。

[0526] 表5:在IP (借助于Ago2) 后下调的杏仁核mRNA的列表。

[0527]

下调	倍数变化 易感	倍数变化 回弹
Cyp2d10	-1.22	-1.34
Lonrf1	-1.32	-1.31
Btnl5	-1.64	-1.54
B2m	-1.33	-1.20
Tekt5	-1.36	-1.10

[0528]	Prp2	-1.51	-1.02
	Krtap5-1	-1.34	-1.10
	Krtap5-4	-1.33	-1.10
	Klhl38	-1.38	-1.07
	Th	-1.42	-1.03
	Pcsk9	-1.33	-1.20
	Dnahc3	-1.39	-1.22
	Sgpp2	-1.37	-1.03
	Opalin	-1.49	-1.28

[0529] 分析了在脑中若干潜在的miRNA和它们的假定靶。

[0530] 实施例4A

[0531] miR-15a和miR-15b作为应激反应的调节子

[0532] 材料与实验程序

[0533] 总RNA提取

[0534] 在急性应激程序后90分钟切开杏仁核组织。使用miRNeasy试剂盒 (Qiagen) 来分离总RNA以保存miRNA。将冷冻脑切块转移到裂解缓冲液并立即均化。在孔内 (in-well) 并在冰上裂解神经元原代培养物或N2a细胞培养物。根据制造商的建议进行进一步加工。将RNA提取物存储在-80℃下直到使用。

[0535] miRNA阵列

[0536] 通过Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 或Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) miRNA微阵列并根据制造商的说明书来测定miRNA差异表达。为了使用Agilent阵列来评估miRNA差异表达, 根据制造商的说明书, 各自标记和杂交100ng总RNA/样品 (3个对照样品和两个急性应激样品)。使用Agilent微阵列扫描仪来扫描阵列。使用Agilent Feature Extraction软件v9来提取数据并使用Partek® Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, Missouri, USA) 加以分析。对来自GeneView.txt文件的数据进行对数变换和分位数归一化。对于使用Affymetrix阵列来评估miRNA差异表达, 根据制造商的说明书, 分别标记和杂交1μg总RNA/样品 (两个对照样品和两个急性应激样品)。使用Affymetrix微阵列扫描仪来扫描阵列。使用Affymetrix扫描仪软件来提取数据并使用Affymetrix miRNAQCtool软件的默认参数归一化 (背景调整、分位数归一化、对数变换和阈值确定)。将来自4个文件的归一化数据输入Partek Genomics软件。过滤掉不存在于任何微阵列中的基因。由于miRNA分布的差异, 所以为每个阵列选择不同的对数比截止 (对于每个阵列, 对应于至约1个标准误差): 对于Agilent, 0.2, 而对于Affymetrix, 0.4。在阵列之间比较对数比大于截止的miRNA并报告共同的miRNA。

[0537] 将3'UTR克隆进入Psicheck2荧光素酶表达质粒

[0538] 从小鼠基因组DNA PCR扩增CRFR1的3'UTR序列。根据制造商的指导将3'UTR PCR片段连接到pGEM-T easy载体 (Promega), 并进一步亚克隆到Psicheck2报告质粒 (Promega) 中的荧光素酶的3'端处的单NotI位点。通过诊断切割并通过测序来证实克隆取向。

[0539] 转染和荧光素酶分析

[0540] 以48孔格式, 在聚-L-赖氨酸上生长HEK293T细胞至70-85%汇合, 并使用聚乙烯亚

胺用以下质粒转染:Psicheck2-3'UTR质粒,在pEGFP质粒中的前-mmu-miR-15过表达或单独pEGFP质粒(clontech)。在转染后24小时,裂解细胞并测定荧光素酶报告基因活性(如先前所描述的)[Chen A.et al.Mol Endocrinol (2005) 19:441-58]。将海肾荧光素酶值归一化到对照萤火虫荧光素酶水平(转录自相同载体,但并不受到测试的3'UTR的影响)并对每种条件下的6孔重复加以平均。

[0541] 结果

[0542] 在急性限制性应激后90分钟,miR-15a和miR-15b成为上调的(图7A-B)。生物信息学预测miR-15a和miR-15b均靶向CRFR1-3'UTR(图7C)。在HEK293T细胞中体外过表达miR-15b显著降低受控于CRFR1-3'UTR的荧光素酶表达的水平(图7D)。

[0543] 实施例4B

[0544] miR15对FKBP5的影响

[0545] 材料与实验程序

[0546] 如说明于上文的实施例4A。

[0547] 结果

[0548] 根据阵列结果,相对于对照组,在“易感”和“回弹”小鼠中,miR-15a和FK506结合蛋白5(还被称为FKBP5)均被上调(图20A-B),这提示它们在RISC复合体中的上调是慢性应激的结果。

[0549] 基因研究已确定了FKBP5在创伤后应激障碍、抑郁和焦虑中的作用。例如,已发现在FKBP5中的单核苷酸多态性(SNP)与童年创伤相互作用,以预测成年创伤后应激障碍(PTSD)的严重性[Binder,E.B.et al.,Nature genetics (2004) 36:1319-1325]。这些发现表明具有这些SNP的被虐待(abused as)儿童个体比成年更易感PTSD。还已发现,FKBP5较少表达在目前患有PTSD的个体中[Yehuda,R.et al.,Biological psychiatry (2009) 66:708-711]。FKBP5基因已被发现具有多个多腺苷酸化位点并且统计上与较高比率的抑郁症相关[Binder et al,上文]。

[0550] 进一步分析FKBP5的3'UTR揭示它具有相对于miR-15的一个保守的种子匹配序列(图20C)。

[0551] 如果miR-15a确实调节FKBP5 mRNA,则预期虽然在Ago-2沉淀物中miR-15a和FKBP5将均被上调(如微阵列结果所示,图20B),但在杏仁核样品中mRNA或FKBP5的蛋白质的总水平将降低。

[0552] 为了检查在杏仁核中在miR-15a和FKBP5之间是否发生相互作用,对获自“易感”和对照小鼠的杏仁核的总RNA样品进行实时PCR分析。如图21A-图21B所示,获自易感小鼠的总RNA提取物中miR-15a水平升高,而FKBP5水平降低。这些结果表明,在慢性应激条件后miR-15a抑制在杏仁核中的FKBP5水平。

[0553] 克隆用于荧光素酶测定分析的完整和突变3'UTR形式的FKBP5以发现在miR-15a和FKBP5之间是否体外发生直接相互作用。

[0554] 除FKBP5以外,miR-15可以潜在地调节参与应激反应的若干基因,包括Stx1a(突触趋化素1a(Syntaxin 1a))、Sgk1(血清/糖皮质激素调节激酶)和Adrb2(图22)。

[0555] 实施例4C

[0556] miR-181调节谷氨酸受体

[0557] 材料与实验程序

[0558] 将3'UTR克隆进入Psicheck2荧光素酶表达质粒

[0559] 从小鼠基因组DNA PCR扩增Grm1、Grik3、Grm5、Grik2和Grm7的3'UTR序列。根据制造商的指导,将3'UTR PCR片段连接到pGEM-T easy载体 (Promega) 或pJET1.2载体 (Fermentas),并进一步亚克隆到在Psicheck2报告质粒 (Promega) 中的荧光素酶的3'端处的单NotI或XhoI位点。通过诊断切割和通过测序来证实克隆取向。

[0560] 慢性社交失败

[0561] 使小鼠经受社交失败方案(如先前所描述的) [Krishnan V. et al. Cell (2007) 131:391-404]。简要地,将小鼠放入攻击性ICR小鼠的饲养笼中并且在那里它们身体相互作用5分钟。在此期间,ICR小鼠攻击入侵小鼠并且侵入者显示服从姿态。然后将穿孔的透明的有机玻璃分隔物放置在动物之间并将小鼠保持在相同笼中24小时以允许感觉接触。然后在接下来的10天中,用陌生的ICR小鼠重复上述程序。

[0562] 结果

[0563] 在遭受慢性应激的小鼠中miR-181d水平显著提高(图23)。为了发现在miR-181和潜在mRNA靶之间的相互作用,发明人发现miR-181可以潜在地调节许多类型的谷氨酸受体。一般来说,谷氨酸受体可以被分为两组:离子型谷氨酸受体 (iGluR),当谷氨酸结合于受体时,其形成激活的离子通道孔;以及代谢型谷氨酸受体 (mGluR),通过涉及G蛋白的信号级联放大,其间接激活在血浆膜上的离子通道。

[0564] 在谷氨酸受体的许多特定亚型中,通常指通过化学 (by a chemical) 的主要亚型,其比谷氨酸更加选择性地结合于它。虽然本研究正在进行中,因为确定了亚型以及测量了化学亲和力。若干化合物常规用于谷氨酸受体研究并与受体亚型相关。

[0565] 表6:分为亚组的谷氨酸受体

[0566]	名称	类型
	NMDA 受体	离子型
	Kainate 受体	
	AMPA 受体	
	mGluR	代谢型

[0567] 如图24和图25所示,在miR-181的所有保守的预测靶中,存在6种谷氨酸受体 (Grm1、Grik3、Grm5、Gria2、Grik2和Grm7)。

[0568] 先前已表明,在海马神经元中,miR-181a调控Gria2表面表达 [Saba.R. et al., Molecular and Cellular Biology (2012) 32 (3):619-32]。正进行荧光素酶分析以证实miRNA-mRNA相互作用。此外,将条件miR-181 KO小鼠品系与特定cre品系杂交从而获得在特定脑细胞核 (brain nuclei) 中miR-181的缺失。

[0569] 实施例5A

[0570] MiR-182a,正常神经元活性和精神病理行为的微调物

[0571] 材料与实验程序

[0572] 将3'UTR克隆进入Psicheck2荧光素酶表达质粒

[0573] 从小鼠基因组DNA PCR扩增Htr1a的3'UTR序列。根据制造商的指导,将3'UTR PCR片段连接到pGEM-T easy载体 (Promega),并进一步亚克隆到在Psicheck2报告质粒 (Promega)

中的荧光素酶的3'端处的单NotI位点。通过诊断切割并通过测序来证实克隆取向。

[0574] 转染和荧光素酶分析

[0575] 以48孔格式,在聚-L-赖氨酸上生长HEK293T细胞至70-85%汇合并使用聚乙烯亚胺用以下质粒转染:Psicheck2-3'UTR质粒、在pEGFP质粒中的前-mmu-miR-182过表达质粒或单独pEGFP质粒(clontech)。在转染后24小时,裂解细胞并测定荧光素酶报告基因活性(如先前所描述的)[Chen A.et al.Mol Endocrinol (2005) 19:441-58]。将海肾荧光素酶值归一化到对照萤火虫荧光素酶水平(转录自相同载体,但并不受到测试的3'UTR的影响)并对每种条件下的6孔重复加以平均。

[0576] 慢性社交失败

[0577] 小鼠经受社交失败方案(如先前所描述的)[Krishnan V.et al.Cell (2007) 131:391-404]。简要地,将小鼠放入攻击性ICR小鼠的饲养笼中并且它们身体相互作用5分钟。在此期间,ICR小鼠攻击入侵小鼠并且侵入者显示服从姿态。然后将穿孔的透明的有机玻璃分隔物放置在动物之间并将小鼠保持在相同笼中24小时以允许感觉接触。然后在接下来的10天中,用陌生的ICR小鼠重复上述程序。

[0578] 显微解剖中缝核和血浆采集

[0579] 在移除脑并将它放置在丙烯酸大脑基质(acryl brain matrix) (Stoelting) 上后,自小鼠中缝核(RN)获得脑样品。使用标准刀片(GEM)并基于指定解剖标志物来获得切片。平端14G注射器用来自从基质除去的3mm切片提取RN区。

[0580] 微RNA纯化和定量RT-PCR表达分析

[0581] 使用miRNeasy微型试剂盒(Qiagen) (根据制造商说明书)从分类的神经元、冷冻脑切块和血浆分离mRNA(包括微RNA),并使用miScript Reverse转录试剂盒处理miRNA以产生cDNA。然后,使用SYBR<sup>®</sup>Green PCR试剂盒(Qiagen)根据制造商的指导在AB 7500热循环器(Applied Biosystems)中分析cDNA样品。连同商用通用引物一起使用对于每种miR的特异性引物,同时将U6 snRNA用作内参。

[0582] 克隆miR182过表达病毒载体

[0583] 通过PCR自小鼠基因组DNA扩增前-miR-182,其中引物添加限制酶AgeI位点,然后被内S1c6a4化(inS1c6a4ed)到pGEM-T Easy载体(Promega, Madison, WI)。在测序pGEM-T Easy以及消化pGEM-T Easy和pEGFP载体(Clontech laboratories Inc., Mountain View, CA)后,用AgeI将未成熟的miR-182序列连接至pEGFP载体以构建表达质粒pEGFP-miR-182。然后,由BamHI和BsrGI来切割pEGFP-miR-182,其平行于用相同酶来切割pCSC-E/Syn-eGFP质粒,然后将miR-182-eGFP序列连接至pCSC-E/Syn以构建pCSC-eSNY-前-miR-182-eGFP质粒,其通过限制性内切核酸酶分析和DNA测序加以确认。

[0584] 生产慢病毒载体

[0585] 通过在HEK293T细胞中的瞬时转染来产生重组慢病毒(如先前所描述的)[Naldini L et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93:11382-8]。简要地,在转染后48和72小时收获感染性慢病毒,过滤通过0.45μm孔纤维素乙酸酯过滤器,并通过超速离心加以浓缩。

[0586] 结果

[0587] 到目前为止,主要在癌症相关研究中如人肺腺癌细胞、胶质瘤、乳癌、膀胱癌、黑色素瘤和DNA修复中报道了miR-182。另外,发现miR-182涉及发育过程,如内耳和视网膜发育,并

且涉及免疫系统,涉及T淋巴细胞的激活,以及涉及狼疮病。在神经系统中,mi-R182涉及感觉器官特异性大鼠背根神经节,以及作为生物钟调节剂,同时在重性抑郁症患者中发现在前-miR-182的遗传变异之间的相关性[Saus E et al.,Hum Mol Genet. (2010) 19 (20): 4017-25]。另外,在回弹至习得的无助行为雄性大鼠前额皮质中,除了12种miR以外,还列出miR-182为下调的[Smalheiser NR et al.,Int J Neuropsychopharmacol. (2011) 1-11]。

[0588] 作为5HT miR微阵列分析的一部分进行的Htr1a 3'UTR的生物信息学分析暗示miR-182可能靶向此基因。因而,借助于荧光素酶分析发明人进行体外测试,其显示miR-182对Htr1a 3'UTR的强抑制(图8)。用于miR-182的两种保守的种子匹配序列出现在Htr1a小鼠3'UTR中。

[0589] 调节研究表明,与对照相比,在暴露于慢性社交失败的成年雄性小鼠的RN中miR-182表达水平的下降调节的强倾向(图9),这提示miR-182参与对已知抑郁样行为的环境刺激的分子响应。

[0590] 对于在两个数据库中的miR-182产生靶向预测的进一步的生物信息学分析揭示了潜在靶的长列表,包括在正常和病理状态下与神经元活性相关的基因(图10)。

[0591] 为了进一步体外测试miR-182用于识别特定miR靶相互作用,以及为了揭示在正常和病理行为的体内调节中miR-182的角色,开发了用于操作miR-182的质粒和慢病毒系统。制备神经元特异性过表达慢病毒(图11A)并在神经元细胞系N2a中体外测试。这些结果显示,与对照相比,在用miR-182过表达慢病毒感染的细胞中升高的miR-182水平(图11B)。购买对于miR-182特异的敲除质粒序列,称作miArrest (Genecopoeia, Rockville, MD, USA, 图11C)并亚克隆到病毒构建体(图11C)。在细胞培养物中并通过部位特定注射到成年小鼠脑来测试这些系统。

[0592] 开发了用于miR-182的裸鼠以研究miR在视网膜发育中的作用。最近,发明人获得此品系的培育对,并在生成群体后,行为和生理上表型分析了miR-182KO和它们的WT同窝幼畜。

[0593] 实施例5B

[0594] 通过急性应激调整miR182表达水平

[0595] 材料与实验程序

[0596] 如描述于上文的实施例5A。

[0597] 结果

[0598] 检查了急性应激对miR182水平的影响。如图26所示,在诱导应激后24小时,急性固定应激导致在小鼠中缝核(RN)中降低的miR182表达水平( $P < 0.01$ )。miR182显示在急性和慢性应激后在中缝核中降低的表达水平,这提示它对于在中缝核中的应激具有调节分子反应的作用,可能通过在突触中影响它的调节5-HT水平的靶基因Htr1a。

[0599] 对miR182预测靶基因的miR-靶相互作用测定

[0600] 使用荧光素酶分析,检查了基于广泛的生物信息所选择的miR182的11种预测靶基因(图27A)。如通过连接报告基因荧光素酶的活性所测得的,体外测试靶基因的3'UTR以检查miR182是否具有抑制效应。在11种测试的基因中,三种基因:Dscam(唐氏综合症细胞粘附分子)、L1cam(细胞粘附分子L1)和Tsnax(Translin相关X蛋白)已显示由miR182的抑制效应,如在荧光素酶分析中(图27A)。当测试以上所列的miR182的靶基因的3'UTR时,在Tsnax、



L1cam和Dscam中均观测到用于miR182的保守的种子匹配序列,提示该miR-靶相互作用具有功能性作用(数据未示出)。

[0601] 接着,验证了miR182对上述三种基因的直接抑制效应。因此,3'UTR被突变以除去miR182种子匹配序列,然后通过荧光素酶分析,将常规3'UTR和突变3'UTR体外比较。当突变它的种子匹配序列时,消除了miR182对L1cam 3'UTR的抑制效应(图27B),以及相似地,在突变3'UTR中,消除了miR182对Tsnax的影响(图27C),表明miR182直接靶向此基因。对具有突变的3'UTR的Dscam和Htr1a进行了类似的验证。

[0602] 将缺少miR182的小鼠模型用来体内研究miR182和它的靶基因之间的相互作用。发明人正检查在社交行为、学习和记忆、以及精神分裂症样行为的测试中miR182K0小鼠的行为表型。

[0603] 实施例6

[0604] 在成年小鼠的血浆和脑中调整miR135水平

[0605] 材料与实验程序

[0606] 克隆miR135过表达病毒载体和miR135 KD病毒载体

[0607] miR135b KD质粒pEZX-H1-miR135KD-CMV-mCherry和对照pEZX-H1-对照KD-CMV-mCherry购自GeneCopeia (USA)。使用具有侧接NheI位点的引物来扩增H1启动子和KD序列,并连接至pGEM-T Easy。在测序pGEM-T Easy以及消化pGEM-T Easy和p156-pRRL-CMV-GFP(具有NheI位点)后,将H1-KD miR和带切口p156连接以产生p156-pRRL-H1-miR135bKD-CMV-GFP和p156-pRRL-H1-对照KD-CMV-GFP。

[0608] 行为评估

[0609] 在适应试验室2小时后,在每个测试以前在黑暗阶段期间进行所有行为评估。

[0610] 光照/黑暗转移测试

[0611] 光照/黑暗转移测试仪器和实验条件是如先前所描述的。简要地,上述仪器包括2个室:黑暗覆盖的室,在测试开始时将小鼠放入其中;以及光照明亮室,在5分钟测试期间小鼠可以自由地转移到其中。借助于视频跟踪系统 (VideoMot2;TSE Systems,Bad Hamburg,德国) 来量化在光照室中花费的时间、在光照中移动的距离、访问明室的等待时间以及明暗转换的次数。

[0612] 旷场实验

[0613] 在以120勒克斯光照的50x50x22 cm白盒中进行旷场实验,将小鼠放入其中以进行10分钟测试。使用视频跟踪系统 (VideoMot2;TSE Systems,Bad Hamburg,德国) 来量化在中心处花费的时间、访问中心的次数、访问中心的等待时间、用后肢站起的次数和移动的总距离。

[0614] 升高加迷宫测试

[0615] 测试仪器具有加号形状并包括2个阻挡壁和2个非常低光照 (6勒克斯) 的开臂。在5分钟测试期间,使用视频跟踪系统 (VideoMot2;TSE Systems,Bad Hamburg,德国) 来自动评分进入的次数、移动的距离和在开臂中花费的时间。

[0616] 结果

[0617] 在已知受来自RN的五羟色胺能神经元神经支配并参与情绪调节的脑部位、杏仁核 (AMY) 和前额皮质 (PFC) 中,测试了抗抑郁剂给予对miR135水平的影响。在AMY中,通过急性

给予五羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI) 和去甲肾上腺素再摄取抑制剂 (NRI) 而非通过慢性给予这些药物,两种miR135变异体均被上调(对于SSRI, $P=0.0001$ ,对于用于miR135a的NRI, $p=0.003$ ,图28A;对于SSRI, $p=0.0001$ ,以及对于用于miR-135b的NRI, $p=0.003$ ,图28B)。

[0618] 在PFC处,通过急性SSRI和NRI,miR135b水平被上调(对于SSRI, $P=0.0183$ ,以及对于NRI, $0.0013$ ,图28c)但miR135a水平没有显著改变(图28D)。另外,在PFC中,慢性SSRI导致降低的miR135a和miR135b水平(对于miR135a, $P=0.0241$ ,图28C,以及对于miR135b, $P=0.0067$ ,图28D)。

[0619] 另外,在社交失败范例后,测试了在循环中的miR135水平。如通过实时PCR测得的,与对照小鼠相比,在暴露于慢性社交失败的小鼠的血浆中,miR135a ( $P=0.0089$ ;图29A) 和miR135b ( $P=0.0033$ ;图29B) 水平升高。因此,目前的结果说明在慢性应激(已知在小鼠中诱导抑郁样行为)后,在血浆中的miR135被上调,以及通过抗抑郁剂给予则显著降低。这些发现提示,在血浆中的miR135水平作为用于血清素能相关的抑郁状态的生物标志物。

[0620] 实施例7

[0621] 构建miR135敲除系统;克隆、慢病毒生成以及体外和体内确认材料与实验程序

[0622] 克隆miR135 KD病毒载体

[0623] miR135b KD质粒pEZX-H1-miR135KD-CMV-mCherry和对照pEZX-H1-对照KD-CMV-mCherry购自GeneCopeia (USA)。使用具有侧接NheI位点的引物来扩增H1启动子和KD序列,然后连接至pGEM-T Easy。在测序pGEM-T Easy以及消化pGEM-T Easy和p156-pRRL-CMV-GFP(具有NheI位点),将H1-KD miR和带切口p156连接以产生p156-pRRL-H1-miR135bKD-CMV-GFP和p156-pRRL-H1-对照KD-CMV-GFP。

[0624] 结果

[0625] 为了评估在RN中的降低的miR135水平对小鼠5-HT相关行为的影响,采用基于质粒的miR135b抑制剂,并通过荧光素酶分析来测试它的效率。在此测定中,用miR135OE、miR135KD和3'UTR质粒来共转染HEK293T细胞,并测试miR135bKD质粒阻断miR135对Slc6a4和Htr1a 3'UTR的抑制效应的能力。通过miR135KD质粒来阻断Htr1a 3'UTR的miR135b抑制效应(图30A)。相似地,通过miR135KD来阻断miR135b对Slac6a4 3'UTR的影响(图30B)。这些结果表明,miR135KD质粒确实阻断miR135的生物活性。

[0626] 将miR135KD序列和对照序列亚克隆到病毒载体(图30C)并产生表达不同敲除(KD)序列的慢病毒。为了测试慢病毒感染脑组织的能力,用任何一种慢病毒感染鼠RN。确实,感染引起GFP的表达(图30D-E)表明miR135bKD慢病毒感染脑组织的能力。

[0627] 实施例8

[0628] 在成年小鼠RN中miR135敲除的行为效应

[0629] 材料与实验程序

[0630] 行为评估

[0631] 使用用于焦虑和抑郁样行为的测试(如描述于以上实施例6)来行为上表征小鼠。

[0632] 结果

[0633] 在体外和体内验证miR135KD慢病毒后,将它们用来在RN中操作miR135水平以及用来测试它们对小鼠行为的影响。将miR135KD慢病毒或KD对照慢病毒注射到成年小鼠的RN,并在恢复期后测试焦虑和抑郁样行为。因为miR135抑制5-HT的负调节子,所以申请人预期

miR135KD会导致在突触中降低5-HT水平,并从而增加焦虑和抑郁样行为。

[0634] 在旷场实验中,在组之间没有观测到差异(图31A),然而在升高脉冲迷宫测试中,miR135KD小鼠显示较高的焦虑样行为:通过显示在开臂中花费较少的时间( $P=0.0644$ )和在开臂中访问较少次( $P=0.0572$ ,图31B)的倾向。另外,miR135KD小鼠在开臂中行走显著较少距离( $P=0.0433$ )并具有在开臂中较长访问的倾向( $P=0.0124$ ,图31B)。相似地,在基础应激条件下进行的暗光测试中,与对照相比,miR135KD小鼠显示显著增加的焦虑样行为:在光照中花较少时间( $P=0.0454$ ,图31C)、在明室中访问较少次( $P=0.0107$ ,图31D)和在明室中行走较小距离( $P=0.0402s$ ,图31E)。结果说明,在急性应激后40分钟或24小时,miR135水平降低(图30A-B),因此,目前的理论是,当在急性应激后测试时,在焦虑样行为方面,应激的miR135KD小鼠将不会不同于它们的对照,这是因为对照小鼠也将具有降低的miR135水平(由于应激)。事实上,当在光暗转换测试中重新测试时,当在急性应激后40分钟或24小时测试时,在任何参数方面,在组之间没有差异(图31C-图31E)。

[0635] 在基础条件下以及在药理操作后测试miR135KD的抑郁样行为。因为在RN中在SSRI给予后,miR135水平显示提高(图31E),所以猜测是,miR135水平的降低可以导致对SSRI的降低的响应。在基础水平上和SSRI给予后进行的悬尾实验中,在固定状态时间方面,在miR135b KD小鼠和对照KD小鼠之间没有差异(图31F),并且观测到由于SSRI治疗的固定状态时间的预期减少( $P<0.0008$ )。然而,在强迫游泳试验中,除SSRI注射的主要影响( $P<0.0001$ )以外,与对照KD小鼠相比,在测试的最后2分钟内,注射有SSRI的miR135KD小鼠是更加静止的( $P=0.0141$ ,5分钟, $P=0.0404$ ,6分钟;图31G),提示SSRI抗抑郁效应(通过降低在RN中的miR135水平)的衰减。此结果意味着,miR135是内源性代替物的一部分,其导致由SSRI引起的行为变化。

[0636] 实施例9

[0637] 在5-HT神经元中miR135过表达

[0638] 材料与实验程序

[0639] 在miR135和它的靶基因的表达水平以及行为方面,将在5-HT神经元中过表达miR135a的小鼠与三只同窝幼畜对照相比。

[0640] 结果

[0641] 测试了特别是在小鼠的RN的5-HT神经元中操作miR135水平对焦虑和抑郁样行为的影响。为此目的,使用Cre-loxP系统开发了一种基因系统。特别是,使用表达Cre重组酶(特别是在5-HT RN阳性神经元中)的ePet Cre小鼠来获得5-HT特异性,并且通过使5-HT-特异性Cre品系(ePet Cre)与具有miR135a的条件过表达的转基因小鼠品系杂交来进行miR135过表达(图32)。

[0642] 通过针对miR135的实时PCR来测试在过表达miR135的小鼠的RN中(特别是在5-HT神经元中)(miR135OE)的miR135表达水平,然后与对照小鼠相比:对于miR135条件过表达等位基因为阳性,但对于ePet CRE为阴性。miR135OE小鼠显示,与对照小鼠相比接近2倍的过表达(图33A; $P<0.05$ )。miR135的过表达水平类似于在SSRI给予后在小鼠的RN中测定的水平,提示该小鼠品系是用于研究miR135抗抑郁剂特征的良好模型。另外,与对照相比,在miR135OE小鼠的RN中,miR135靶基因mRNA、Slc6a4(图33B; $P<0.05$ )和Htr1a(图33C; $P<0.1$ )被下调,表明miR135对其靶基因的体内抑制。

[0643] 为了测试miR135过表达(特别是在5-HT神经元中),将miR135OE小鼠和它们的同窝幼畜对照暴露于慢性社交失败范例(一种程序,已知会诱导抑郁和焦虑样行为),并随后测试焦虑和抑郁样行为。

[0644] 与对照同窝幼畜相比,在社交失败后,miR135OE小鼠显示增加的焦虑样行为。在旷场中,基于在中心的时间和访问中心的次数,在miR135OE小鼠中观测到增加的焦虑的倾向( $P<0.1$ ,图34A)。而在光暗转换测试中,miR 135OE小鼠在光照中花费更多时间( $P<0.05$ ,图34B)以及在明室中花费较少时间( $P<0.01$ ,图34B)。在升高脉冲迷宫中,观测到类似的结果( $P<0.05$ ,图34B),miR135OE小鼠在开臂中花费更多时间( $P<0.05$ ,图34C)并在开臂中移动较大距离( $P<0.05$ ,图34C)。

[0645] 在社交失败后,miR135OE小鼠的抑郁样行为低于对照同窝幼畜。与对照相比,在悬尾实验中观测到miR135OE小鼠的减少的固定状态时间的倾向( $P<0.1$ ,图34D),以及在强迫游泳试验中,显著减少的固定状态时间( $P<0.05$ ,图34E)。

[0646] 虽然已连同其具体实施方式一起描述了本发明,但显而易见的是,许多替代、改进和变化对于本领域技术人员而言将是显而易见的。因此,它旨在包括所有这样的替代、改进和变化,其属于所附权利要求的精神和广泛范围。

[0647] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请的全部内容以引用方式结合于本文。另外,在本申请中任何参考文献的引用或识别不应当被解释为承认这样的参考文献可作为本发明的在先技术。在使用章节标题的范围内,它们不应该被解释为一定是限制性的。

<110> 耶达研究及发展有限公司(Yeda Research and Development Co. Ltd.)	
Chen, Alon	
Hornstein, Eran	
Issler, Orna	
Haramati, Sharon	
Volk, Naama	
<120> 微RNA和包含微RNA的组合物	
<130> 54322	
<150> US 61/514,954	
<151> 2011-08-04	
<160> 157	
<170> PatentIn version 3.5	
<210> 1	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 1	
tatggctttt tattcctatg tga	23
<210> 2	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 2	
tatggctttt cattcctatg tga	23
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 3	
tttgttcgtt cggctcgcgt ga	22
<210> 4	
<211> 21	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 4	
gatgacacgc aaattcgtga a	21
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 5	
taaggcacgc ggtgaatgcc	20
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 6	
agttctgccg ctgatgatg	19
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 7	
gcacaaatgg agagtctgat taaa	24
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 8	
tgcctttaat gcaaaacagc	20
<210> 9	

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	9	
	ccaagtttac aaccatcaag ca	22
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	10	
	atccgcatga atgctgtgta	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	11	
	gtgggtggtg gaagagacac	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	12	
	cctacacgca gagcattgaa	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	13	
	acatccctgt gggatttgag	20

<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	14	
	tgtcttgctt atatTTTctc agtag	25
<210>	15	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	15	
	gaaaatataa gcaagacatc cctgtt	26
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	16	
	aaagatccct ttccccaatg	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	17	
	cagtgcgtct tctccacaga	20
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	单链DNA寡核苷酸	
<400>	18	



ataagcaagg gcccaaaagg aaga	24
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 19	
ttttgggccc ttgcttataa gtcc	24
<210> 20	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 20	
ctgccctgcc acatgtgttt ttat	24
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 21	
taacaaataa aaacacatgt ggca	24
<210> 22	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	
<400> 22	
accggtcata tgattcccca gtttcctgct tt	32
<210> 23	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 单链DNA寡核苷酸	

<400> 23	
accggtcctc tgtggctggt ccttag	26
<210> 24	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 24	
aguguauccu uauuuuucgg uau	23
<210> 25	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 25	
acagggaugu cuugcuagcc aua	23
<210> 26	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 26	
aguguauccu uacuuuucgg uau	23
<210> 27	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 27	
cugcccugcc acaugaagcc auu	23
<210> 28	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 28	
cuugcuagcc auauauauuu u	21
<210> 29	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 29	
uuucuauagc cauacucgcu	20
<210> 30	

<211> 20	
<212> RNA	
<213> 泛类人猿	
<400> 30	
cucgcuagcc auauauuuuc	20
<210> 31	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 大鼠	
<400> 31	
agccauacuu gcuuauuuu u	21
<210> 32	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 豚鼠	
<400> 32	
cuugcuagcc auauauuuuc	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 魮鲮	
<400> 33	
cuugcuagcc auauauuuuc	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 刺猬	
<400> 34	
cucacuagcc auauauuuuu	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 家犬	
<400> 35	
uuugcuagcc auauauuuuc	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 家猫	

<400> 36	
uuugcuagcc auauauuuuc	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 马	
<400> 37	
cuugcuagcc auauauuuuc	20
<210> 38	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 牛	
<400> 38	
cuugcuagcc auauguuuu	19
<210> 39	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 负鼠	
<400> 39	
ucggauagcc auauauucuc	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 鸭嘴兽	
<400> 40	
ucugauagcc auauauuauuc	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 鸡	
<400> 41	
uccaauagcc auauauuacu	20
<210> 42	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 42	
uuauaagcaa gaagccaggc cc	22
<210> 43	

<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	小鼠	
<400>	43	
gccacaugaa gccauguuu u		21
<210>	44	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	大鼠	
<400>	44	
gucacaugaa gccauuguuu		20
<210>	45	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	豚鼠	
<400>	45	
agcacuugaa gccauuguau		20
<210>	46	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	家兔	
<400>	46	
aucacuugaa gccauuuuau		20
<210>	47	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	47	
gucaguugaa gccauuuuau		20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	泛类人猿	
<400>	48	
gucacuugaa gccauuuuau		20
<210>	49	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	恒河猴(普通猕猴)	

<400> 49	
gucacuugaa gccauuuau	19
<210> 50	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 刺猬	
<400> 50	
auuacuugaa gccauuuuau	20
<210> 51	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 家犬	
<400> 51	
aucacugagc cauuuuuac	19
<210> 52	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 家猫	
<400> 52	
uaucaugaa gccauuuuau	20
<210> 53	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 马	
<400> 53	
ucacuugaag ccauuuuau	19
<210> 54	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> 象	
<400> 54	
aucacugaag ccauuuuu	18
<210> 55	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 55	
uggaaagccc ugccuugcug cuu	23
<210> 56	

<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	小鼠	
<400>	56	
	guguuuggua auacacgacg au	22
<210>	57	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	小鼠	
<400>	57	
	acauuuggua cuacacgacg au	22
<210>	58	
<211>	90	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	58	
	aggccucgcu guucucuaug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuacugcuc acucauauag	60
	ggauuaggagc cguggcgcac ggcggggaca	90
<210>	59	
<211>	100	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	59	
	agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauccua ugugauagua auaaagucuc	60
	auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca	100
<210>	60	
<211>	97	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	60	
	cacucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag	60
	ggcuaaaaagc caugggcuac agugaggggc gagcucc	97
<210>	61	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	61	
	uauggcuuuu uuauccuaug uga	23
<210>	62	

<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 62	
uauggcuuuu cauuccuaug uga	23
<210> 63	
<211> 94	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 63	
uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaauguuu gucauaaacc guuuuucauu	60
auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca	94
<210> 64	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 64	
ucaagagcaa uaacgaaaaa ugu	23
<210> 65	
<211> 77	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 65	
guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu	60
uacuugcacg gggacgc	77
<210> 66	
<211> 84	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 66	
ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu	60
gauuacuugu uucuggaggc agcu	84
<210> 67	
<211> 77	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 67	
ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua	60
cuuggcucgg ggaccgg	77



<210> 68	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 68	
uucaaguaau ccaggauagg cu	22
<210> 69	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 69	
uucaaguaau ucaggauagg u	21
<210> 70	
<211> 110	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 70	
gagcugcuug ccucggggcg uuuuuggcaa ugguagaacu cacacuggug agguaacagg	60
auccgguggu ucuagacuug ccaacuaugg ggcgaggacu cagccggcac	110
<210> 71	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 71	
uuuggcaaug guagaacuca caccg	25
<210> 72	
<211> 82	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 72	
gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua	60
ugcaaaacug augguggccu gc	82
<210> 73	
<211> 87	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 73	
cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa	60
auccaugcaa aacugacugu gguagug	87

<210>	74	
<211>	96	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	74	
acauugcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg		60
cugugcaaaau ccaugcaaaa cugauuguga uaaugu		96
<210>	75	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	75	
ugugcaaauc uaugcaaaac uga		23
<210>	76	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	76	
ugugcaaauc caugcaaaac uga		23
<210>	77	
<211>	83	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	77	
ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau		60
ugugcugccu caaaaauaca agg		83
<210>	78	
<211>	98	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	78	
uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caaugcga		60
aucauuauuu gcugcucuag aaauuaagg aaauucau		98
<210>	79	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	79	
uagcagcaca uaaugguuug ug		22

<210>	80	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	80	
uagcagcaca ucaugguuuu ca		22
<210>	81	
<211>	78	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	81	
cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg		60
cuaaguuccg cccccag		78
<210>	82	
<211>	97	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	82	
accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuug		60
uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug		97
<210>	83	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	83	
uucacagugg cuaaguuccg c		21
<210>	84	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	84	
uucacagugg cuaaguucug c		21
<210>	85	
<211>	110	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	85	
ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguugg aauuaaauc		60
aaaaccaucg accguugauu guaccuauug gcuaaccauc aucuacucca		110

<210>	86	
<211>	110	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	86	
agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag	60	
uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuua	110	
<210>	87	
<211>	110	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	87	
ccugugcaga gauuauuuuu uaaaaggguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug	60	
aacugugugg acaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu	110	
<210>	88	
<211>	89	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	88	
cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug	60	
aucaaugaa u gcaaacugcg gaccaaaca	89	
<210>	89	
<211>	110	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	89	
cggaaaauuu gccaaggguu ugagggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca	60	
ggcaaaccuau cgaccguuga guggaccug aggccuggaa uugccauccu	110	
<210>	90	
<211>	137	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	90	
gucccccucc cuaggccaca gccgaggguca caaucaacau ucauuguugu cgguggguug	60	
ugaggacuga ggccagaccc accgggggau gaaugucacu guggcugggc cagacacggc	120	
uuuaggggaa uggggac	137	
<210>	91	
<211>	23	
<212>	RNA	

<213> 人	
<400> 91	
aacauucaac gcugucggug agu	23
<210> 92	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 92	
aacauucauu gcugucggug ggu	23
<210> 93	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 93	
aacauucaac cugucgguga gu	22
<210> 94	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 94	
aacauucauu guugucggug ggu	23
<210> 95	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 小鼠	
<400> 95	
ugaccaccug cugcugcggg ggggu	25
<210> 96	
<211> 26	
<212> RNA	
<213> 家兔	
<400> 96	
cagccacccu gcugcugccc aguggg	26
<210> 97	
<211> 26	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 97	
cagccccccu gcugcugccc ggaggg	26

<210>	98	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	泛类人猿	
<400>	98	
cagccccccu	gcugcugccc	ggaggg
		26
<210>	99	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	恒河猴(普通猕猴)	
<400>	99	
cagccccccu	gcugcugccc	agaggg
		26
<210>	100	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	婴猴	
<400>	100	
cagccacccu	gcugcugccc	agugag
		26
<210>	101	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	刺猬	
<400>	101	
ccaccacccu	gcugcugccc	agagcu
		26
<210>	102	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	家犬	
<400>	102	
cagccacccu	gcugcugccc	agcgug
		26
<210>	103	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	马	
<400>	103	
cagccacccu	gcugcugccc	agugcu
		26
<210>	104	
<211>	25	
<212>	RNA	

<213>	牛	
<400>	104	
caccacccug	cugcugccca	gaggu
<210>	105	25
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	狢猯	
<400>	105	
aagcaaccug	cugcugccca	gcaca
<210>	106	25
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	象	
<400>	106	
caaccacccu	gcugcugccc	agugca
<210>	107	26
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	马岛狨	
<400>	107	
caucucccug	cugcugccca	gcaca
<210>	108	25
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	负鼠	
<400>	108	
uagccccug	cugcuaccca	uugcc
<210>	109	25
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	鸡	
<400>	109	
ccagcccagu	gcugcugccg	gcugcg
<210>	110	26
<211>	143	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR135的敲低序列	

<400> 110	
gacggcgcta ggatcatcaa ctacatagga aatgatctaa aagccataca agtattctgg	60
tcacagaata caactcacat aggaatgatc taaaagccat acaagatgat cctagcgccg	120
tcttttttga attcgcggcc cta	143
<210> 111	
<211> 105	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR135的敲低序列	
<400> 111	
tcacatagga atgaaaagcc atacgattca cataggaatg aaaagccata accggtcaca	60
taggaatgaa aagccatatc actcacatag gaatgaaaag ccata	105
<210> 112	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR135的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400> 112	
tcacatagga agcaaagcca taatcgtcac ataggaagca aagccataat cgtcacatag	60
gaagcaaagc cataatcgtc acataggaag caaagccata	100
<210> 113	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR135的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400> 113	
tatggctttg cttcctatgt gacgattatg gctttgcttc ctatgtgacg attatggctt	60
tgcttcctat gtgacgatta tggctttgct tcctatgtga	100
<210> 114	
<211> 143	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR335 5p的敲低序列	
<400> 114	
gacggcgcta ggatcatcaa cacatttttc gttaatcttt gctcttgaca agtattctgg	60



tcacagaata caacacattt ttcgttaatc tttgctcttg acaagatgat cctagcgccg	120
tctttttttga attcgcggcc cta	143
<210> 115	
<211> 105	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR335 5p的敲低序列	
<400> 115	
acattttttcg ttattgctct tgacgataca tttttcgta ttgctcttga accggacatt	60
tttcgttatt gctcttgatc acacattttt cgttattgct cttga	105
<210> 116	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR335-5p的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400> 116	
acattttttcg agctgctctt gaatcgacat ttttcgagct gctcttgaat cgacattttt	60
cgagctgctc ttgaatcgac atttttcgag ctgctcttga	100
<210> 117	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR335-5p的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400> 117	
tcaagagcag ctcgaaaaat gtcgattcaa gagcagctcg aaaaatgtcg attcaagagc	60
agctcgaaaa atgtcgattc aagagcagct cgaaaaatgt	100
<210> 118	
<211> 141	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR15a的敲低序列	
<400> 118	
gacggcgcta ggatcatcaa ccacaaacca ttaatcttgt gctgctacaa gtattcttgt	60
cacagaatac aaccacaaac cattaatctt gtgctgctac aagatgatcc tagcgccgtc	120
ttttttgaat tcgcggccct a	141

<210>	119	
<211>	101	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR15a的敲低序列	
<400>	119	
	cacaaacat tatgtgctgc tacgatcaca aaccattatg tgctgctaac cggcacaaac	60
	cattatgtgc tgctatcacc acaaaccatt atgtgctgct a	101
<210>	120	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR15a的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400>	120	
	cacaaaccaa gcgtgctgct aatcgacaaa accaagcgtg ctgctaatac cacaaccaa	60
	gcgtgctgct aatcgacaaa accaagcgtg ctgcta	96
<210>	121	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR15a的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400>	121	
	tagcagcacg cttggtttgt gcgattagca gcacgcttgg tttgtgcgat tagcagcacg	60
	cttggtttgt gcgattagca gcacgcttgg tttgtg	96
<210>	122	
<211>	143	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR19的敲低序列	
<400>	122	
	gacggcgcta ggatcatcaa ctacgttttg catgatctga tttgcacaca agtattctgg	60
	tcacagaata caactcagtt ttgcatgac tgatttgcac acaagatgat cctagcgccg	120
	tcttttttga attcggcgcc cta	143
<210>	123	
<211>	105	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR19的敲低序列	
<400>	123	
	tcagttttgc atggatttgc acacgattca gttttgcatg gatttgcaca accggtcagt	60
	tttgcattgga tttgcacatc actcagtttt gcatggattt gcaca	105
<210>	124	
<211>	100	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR19的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400>	124	
	tcagttttgc atgattttgca caatcgtcag ttttgcattga tttgcacaat cgtcagtttt	60
	gcatgattttg cacaatcgtc agttttgcat gatttgcaca	100
<210>	125	
<211>	97	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR19的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400>	125	
	tgtgcaaatac atgcaaaaact gacgattgtg caaatcatgc aaaactgcga ttgtgcaaatac	60
	catgcaaaaac tgcgattgtg caaatcatgc aaaactgc	97
<210>	126	
<211>	141	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR26的敲低序列	
<400>	126	
	gacggcgcta ggatcatcaa cagcctatcc tggatctatt acttgaacaa gtattctggt	60
	cacagaatac aacagcctat cctggatcta ttacttgaac aagatgatcc tagcgccgctc	120
	ttttttgaat tcgcgccct a	141
<210>	127	
<211>	101	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	用于miR26的敲低序列	
<400>	127	
	agcctatcct ggattacttg aacgatagcc taticctggat tacttgaaac cggagcctat	60
	cctggattac ttgaatcaca gcctatcctg gattacttga a	101
<210>	128	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR26的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400>	128	
	agcctatcct ggttacttga aatcgagcct atcctgggta cttgaaatcg agcctatcct	60
	ggttacttga aatcgagcct atcctgggta cttgaa	96
<210>	129	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR26的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400>	129	
	ttcaagtaac caggataggc tcgatttcaa gtaaccagga taggctcgat ttcaagtaac	60
	caggataggc tcgatttcaa gtaaccagga taggct	96
<210>	130	
<211>	140	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR27的敲低序列	
<400>	130	
	gacggcgcta ggatcatcaa ctgctcacia gcaatctgct aagccctcaa gtattctggt	60
	cacagaatac aactgctcac aagcaatctg ctaagcccta agatgacatcct agcgccgtct	120
	tttttgaatt cgcgcccta	140
<210>	131	
<211>	101	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR27的敲低序列	

<400> 131	
tgctcacaag cagctaagcc ctcgattgct cacaagcagc taagccctac cggtgctcac	60
aagcagctaa gcccttcact gtcacaagc agctaagccc t	101
<210> 132	
<211> 92	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR27a的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400> 132	
gcggaactta gcactgtgaa atcggcggaa cttagcactg tgaaatcggc ggaacttagc	60
actgtgaaat cggcgggaact tagcactgtg aa	92
<210> 133	
<211> 92	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR27a的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400> 133	
ttcacagtgc taagttccgc cgatttcaca gtgctaagtt ccgccgattt cacagtgcta	60
agttccgccg atttcacagt gctaagttcc gc	92
<210> 134	
<211> 141	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR181的敲低序列	
<400> 134	
gacggcgcta ggatcatcaa cactcaccga cagatctggt gaatgttcaa gtattctggt	60
cacagaatac aacactcacc gacagatctg ttgaatgttc aagatgatcc tagcgccgtc	120
ttttttgaat tcgcggccct a	141
<210> 135	
<211> 101	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR181的敲低序列	
<400> 135	
actcaccgac aggttgaatg ttcgatactc accgacaggt tgaatgttac cggactcacc	60

gacaggttga atgtttcaca ctcaccgaca ggttgaatgt t	101
<210> 136	
<211> 100	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR181d的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400> 136	
acccaccgac agcatgaatg ttatcgaccc accgacagca tgaatgttat cgaccaccg	60
acagcatgaa tgttatcgac ccaccgacag catgaatggt	100
<210> 137	
<211> 102	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR181d的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400> 137	
aacattcatg ctgtcggtag gtcgataaca ttcatgctgt cggtaggtac gataacattc	60
atgctgtcgg tgggtcgatt aacattcatg ctgtcggtag gt	102
<210> 138	
<211> 147	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR182的敲低序列	
<400> 138	
gacggcgcta ggatcatcaa ccggtgtgag ttctacatct cattgccaaa caagtattct	60
ggtcacagaa tacaaccggt gtgagttcta catctcattg ccaaacaaga tgatcctagc	120
gccgtctttt ttgaattcgc ggcccta	147
<210> 139	
<211> 113	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于miR182的敲低序列	
<400> 139	
cgggtgtgagt tctaccattg ccaaacgac ggtgtgagtt ctaccattgc caaaaccggc	60
ggtgtgagtt ctaccattgc caaatcaccg gtgtgagttc taccattgcc aaa	113
<210> 140	

<211>	108	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR182的敲低序列 - 反义构建体 (正向)	
<400>	140	
	cggtgtgagt tagccattgc caaaatcgcg gtgtgagtta gccattgcc aaatcgcggt	60
	gtgagttagc cattgccaaa atcgcggtgt gagttagcca ttgccaaa	108
<210>	141	
<211>	108	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于miR182的敲低序列 - 反义构建体 (反向)	
<400>	141	
	tttggcaatg gctaactcac accgcgattt tggcaatggc taactcacac cgcgattttg	60
	gcaatggcta actcacaccg cgattttggc aatggctaac tcacaccg	108
<210>	142	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗miR-135a寡核苷酸	
<400>	142	
	ucacauagga auaaaaagcc aua	23
<210>	143	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗miR-135b寡核苷酸	
<400>	143	
	ucacauagga augaaaagcc aua	23
<210>	144	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗miR-335寡核苷酸	

<400> 144	
acauuuuucg uuauugcucu uga	23
<210> 145	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-26a寡核苷酸	
<400> 145	
agccuauccu ggauuacuug aa	22
<210> 146	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-26b寡核苷酸	
<400> 146	
accuauccug aaauacuuga a	21
<210> 147	
<211> 25	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-182寡核苷酸	
<400> 147	
cggugugagu ucuaccuug ccaaa	25
<210> 148	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-19a寡核苷酸	
<400> 148	
ucaguuuugc auagauuugc aca	23
<210> 149	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	



<223> 抗miR-19b寡核苷酸	
<400> 149	
ucaguuuugc auggauuugc aca	23
<210> 150	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-15a寡核苷酸	
<400> 150	
cacaaacc au uaugugcugc ua	22
<210> 151	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-15b寡核苷酸	
<400> 151	
uguaaacc au gaugugcugc ua	22
<210> 152	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-27a寡核苷酸	
<400> 152	
gcggaacuua gccacuguga a	21
<210> 153	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 抗miR-27b寡核苷酸	
<400> 153	
gcagaacuua gccacuguga a	21
<210> 154	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	抗miR-181a寡核苷酸	
<400>	154	
acucaccgac	agcguugaau guu	23
<210>	155	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗miR-181b寡核苷酸	
<400>	155	
acccaccgac	agcaaugaau guu	23
<210>	156	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗miR-181c寡核苷酸	
<400>	156	
acucaccgac	agguugaaug uu	22
<210>	157	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	抗miR-181d寡核苷酸	
<400>	157	
acccaccgac	aacaugaau guu	23

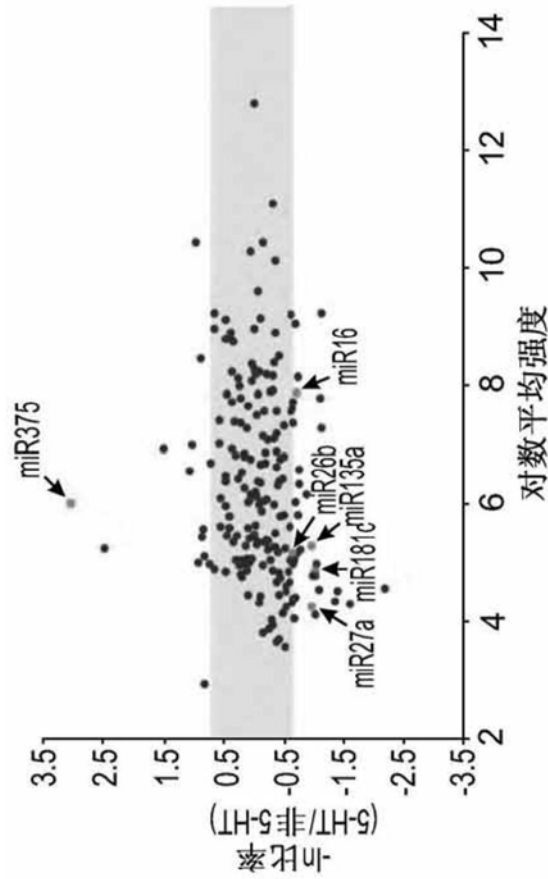


图1A

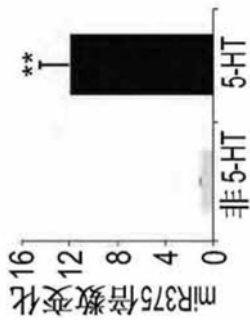


图1B

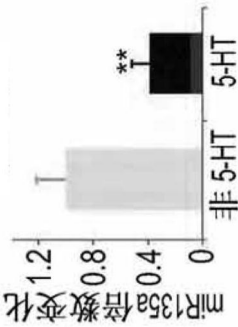


图1C

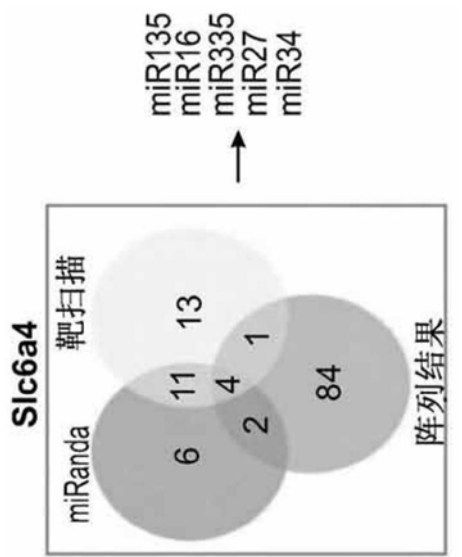


图1D

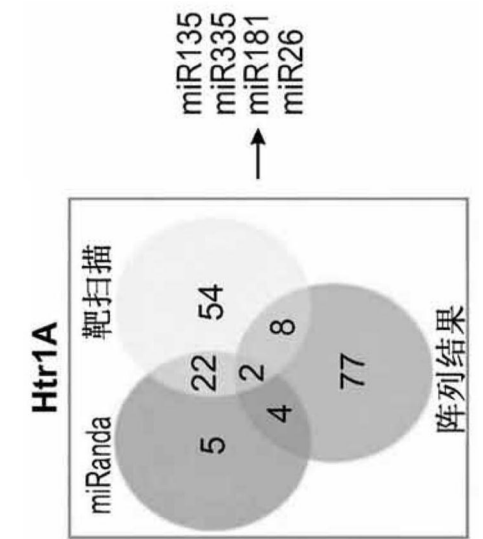


图1E

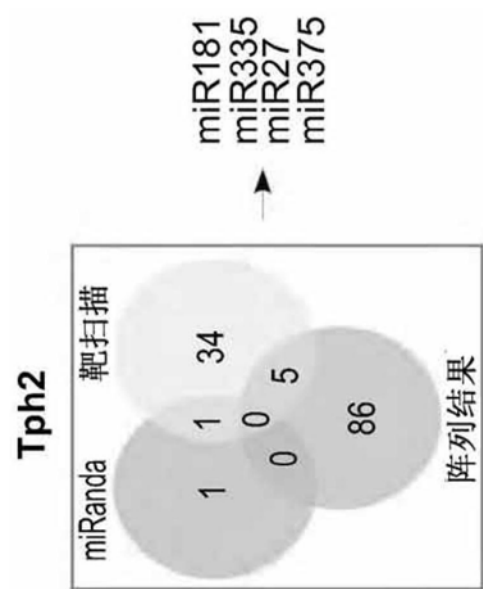


图1F

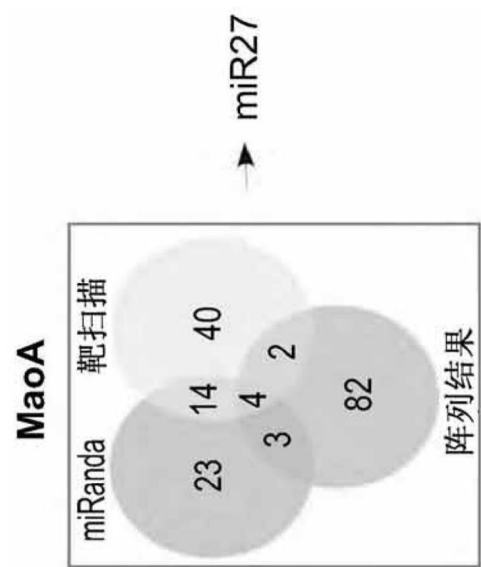


图1G

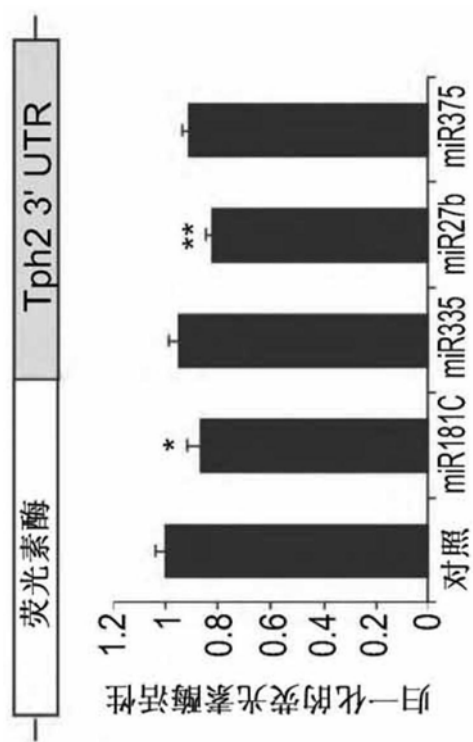


图1H

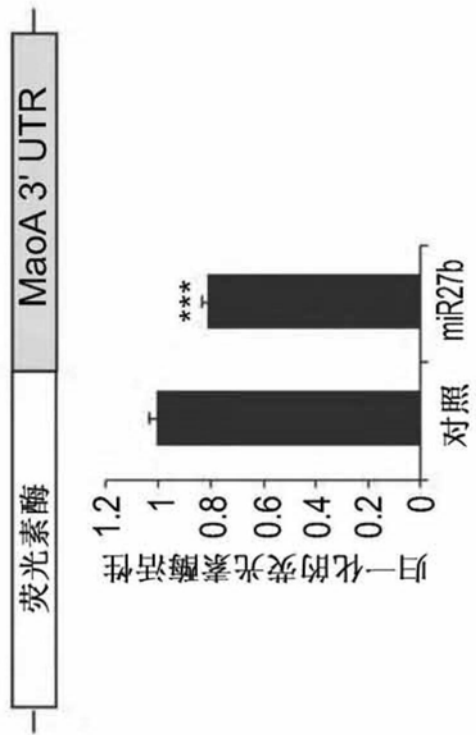


图1I

3' aguguauccuuuuuuUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 24
402	:5' acagggaugucugcuAGCCAUa 3'	mmU-miR-135a
3' aguguauccuuuuuuUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 25
402	:5' acagggaugucugcuAGCCAUa 3'	Sic6a4
3' aguguauccuuuuuuUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 26
402	:5' acagggaugucugcuAGCCAUa 3'	mmU-miR-135b
		SEQ ID NO: 25
		Sic6a4

图2A

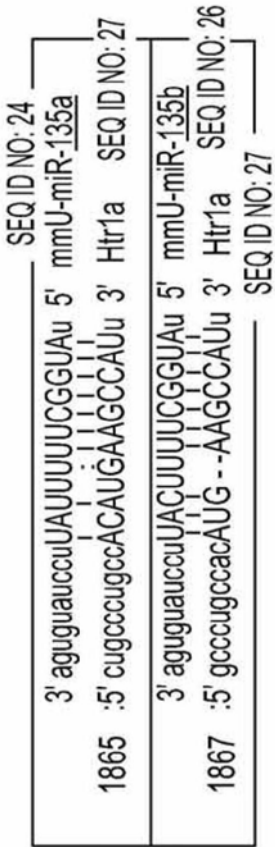


图2B



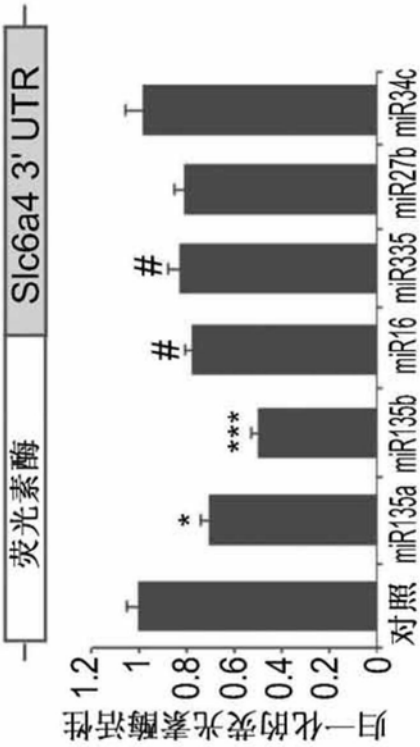


图2C

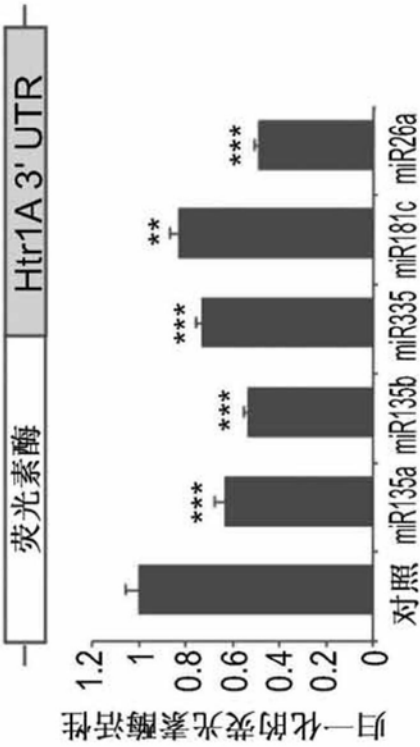


图2D

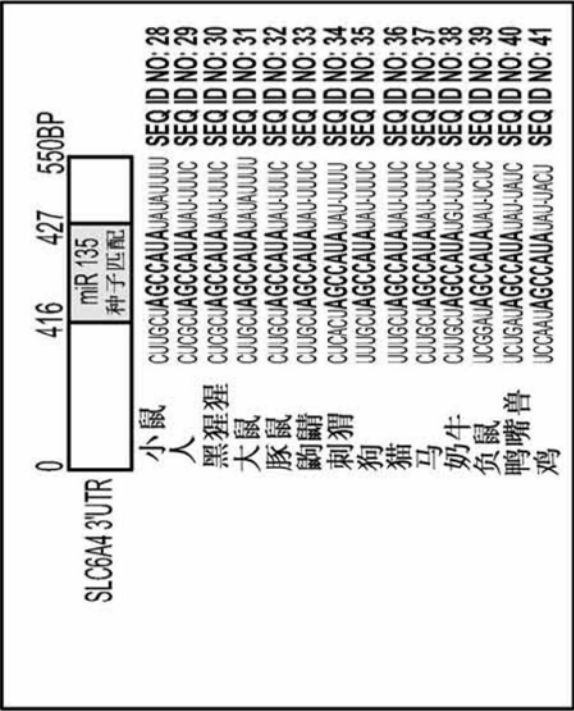


图2E

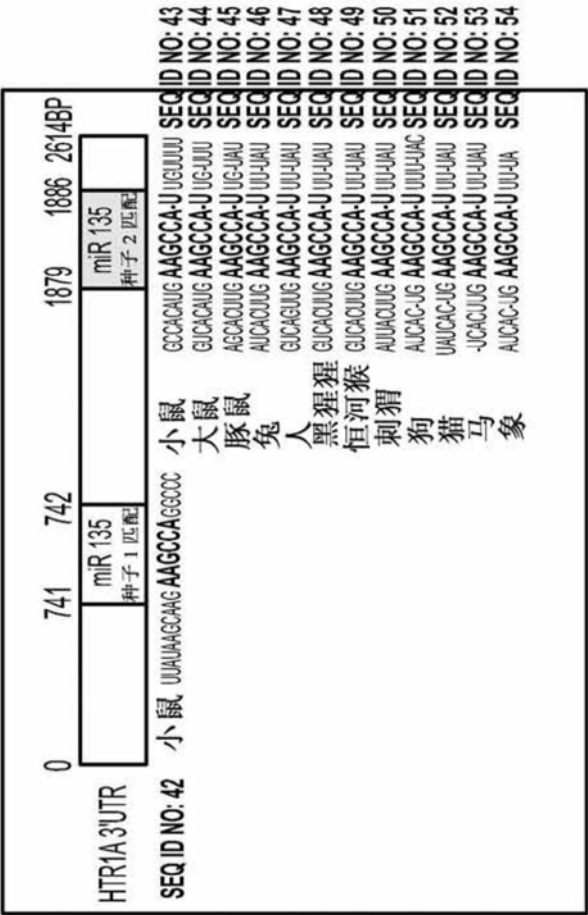


图2F

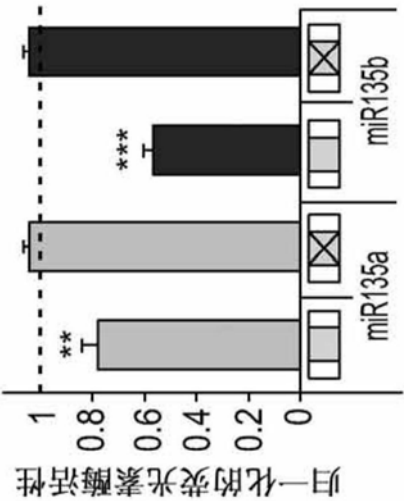


图2G

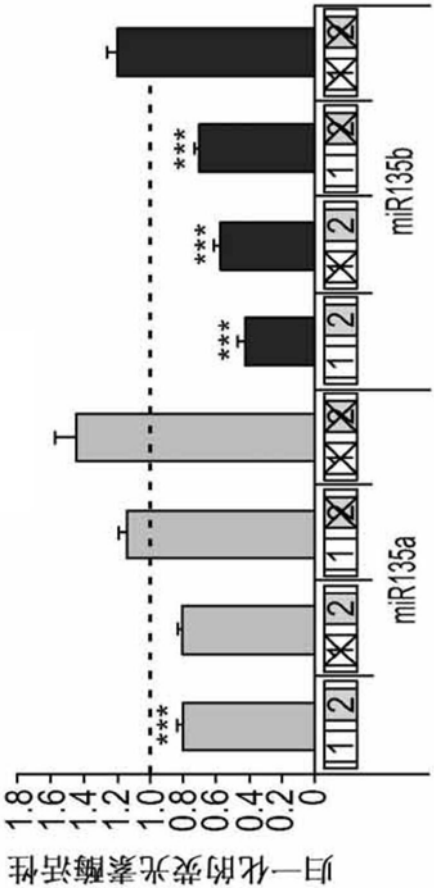


图2H

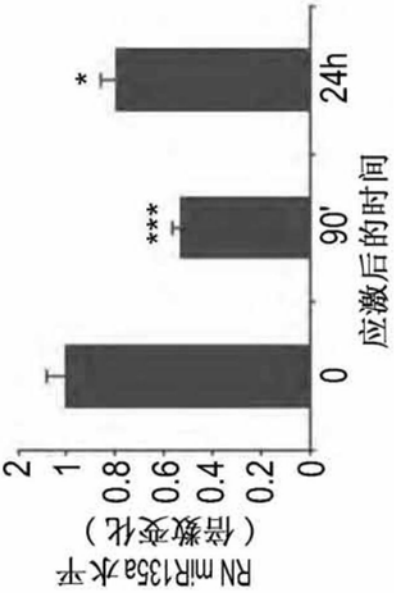


图3A

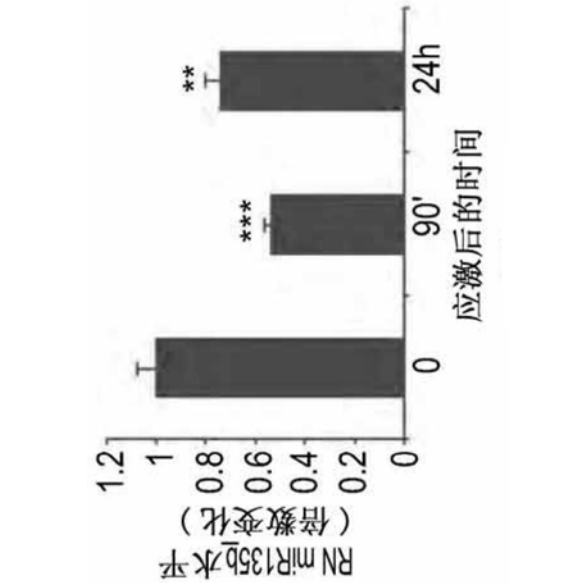


图3B

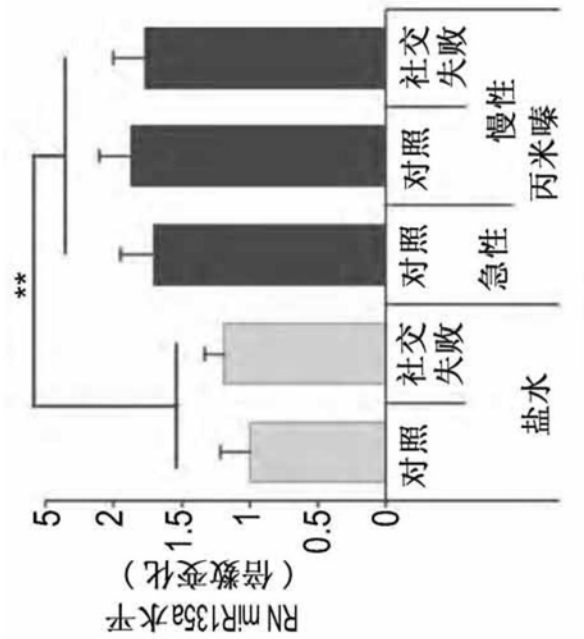


图3C

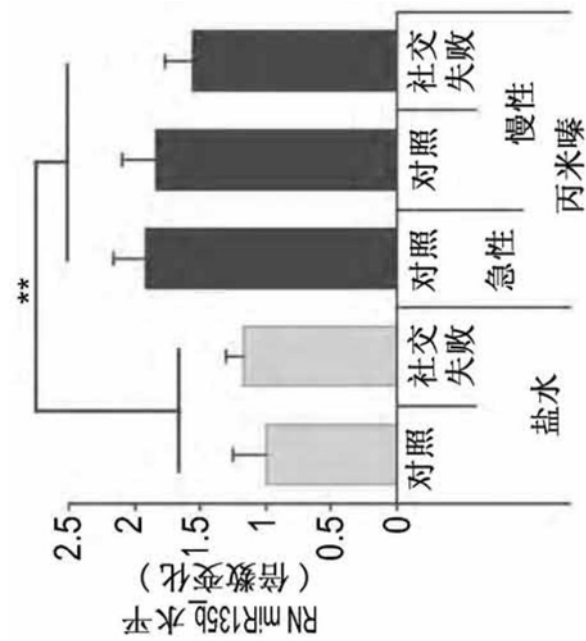


图3D

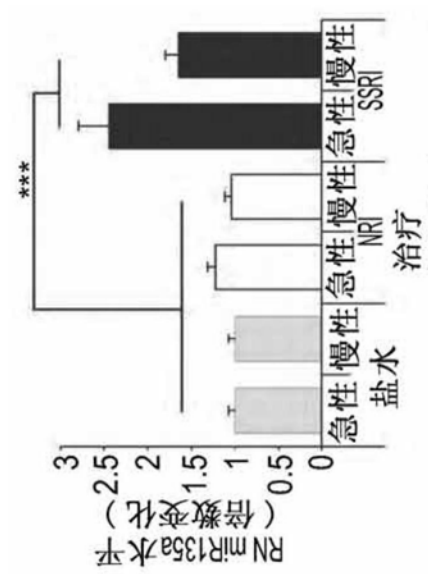


图3E

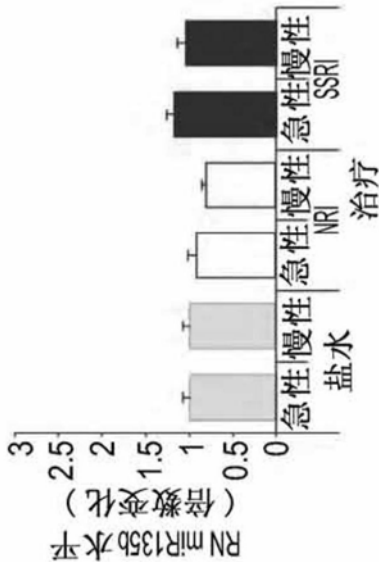


图3F

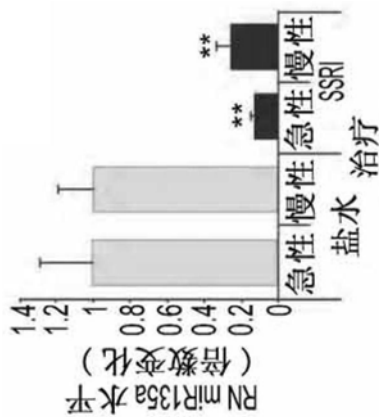


图3G

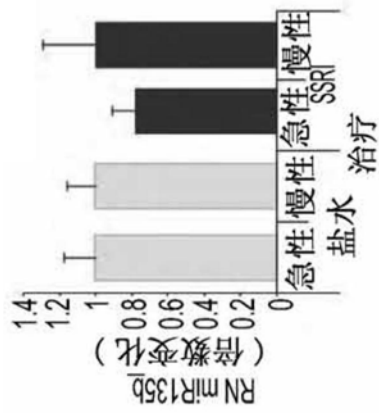


图3H

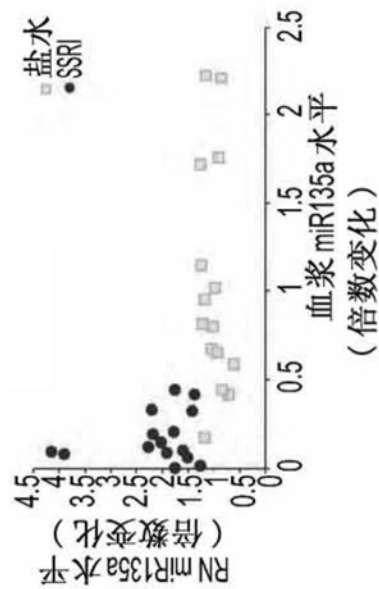


图3I

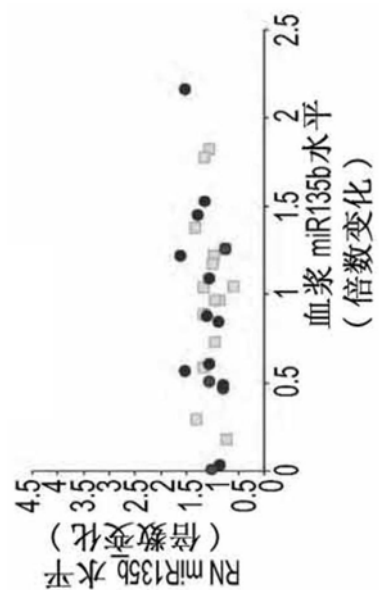


图3J





图4A

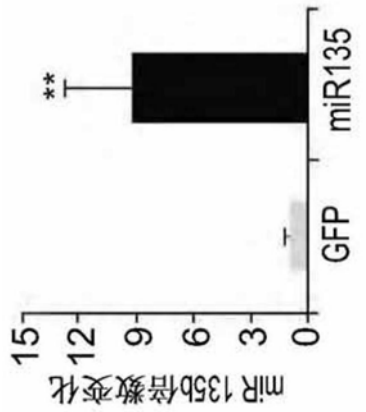


图4B

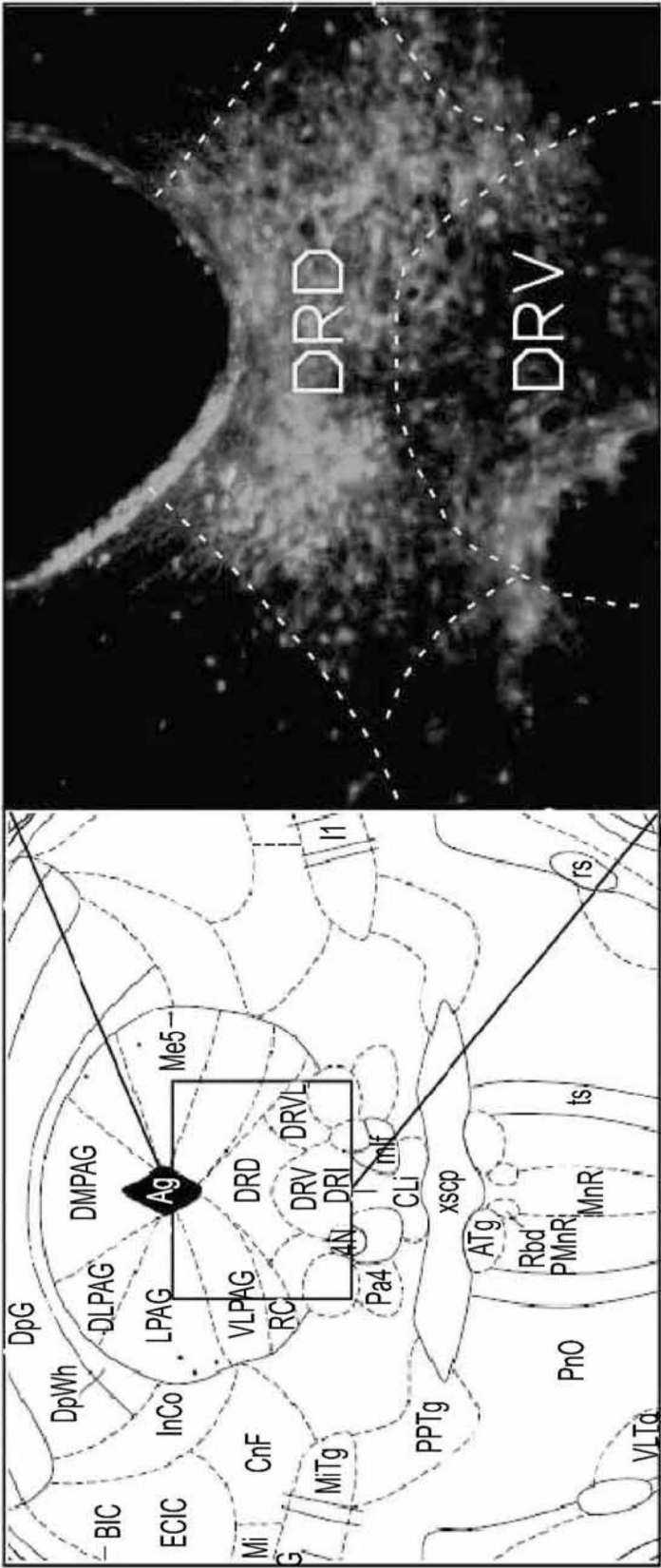


图 4C

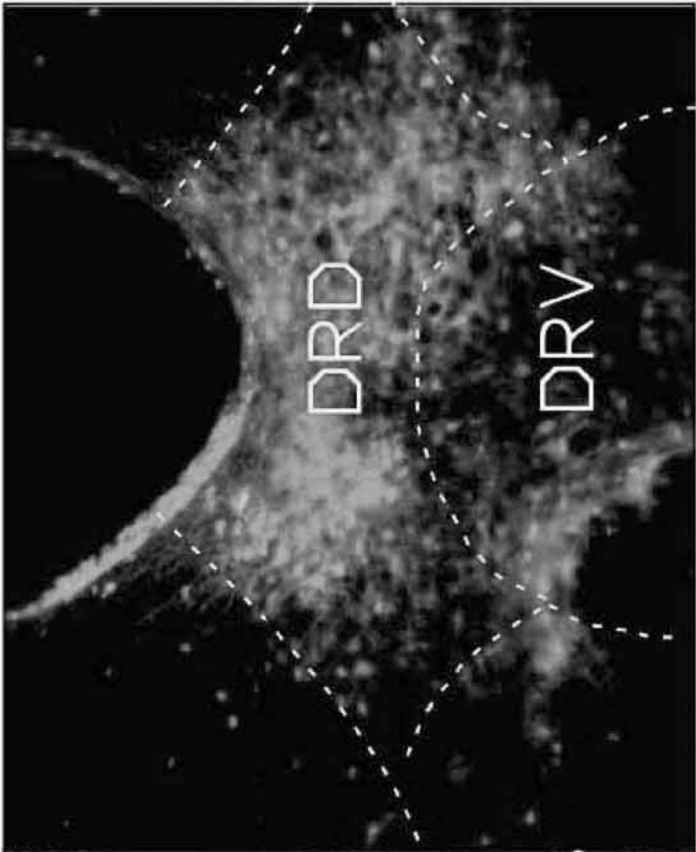


图 4D

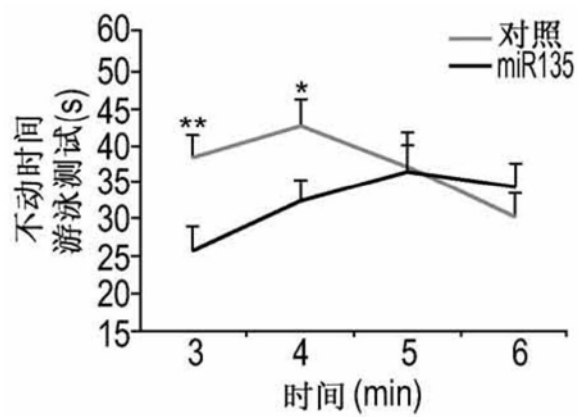


图4E

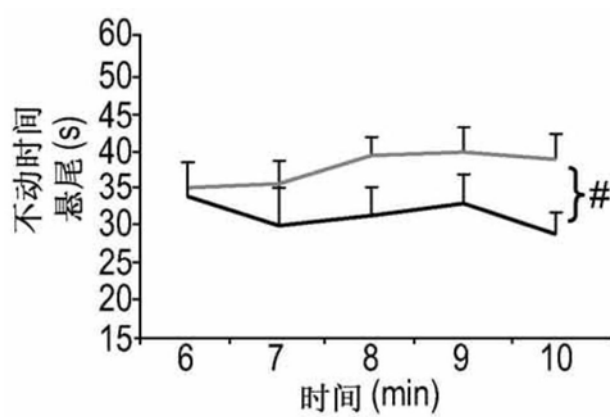


图4F

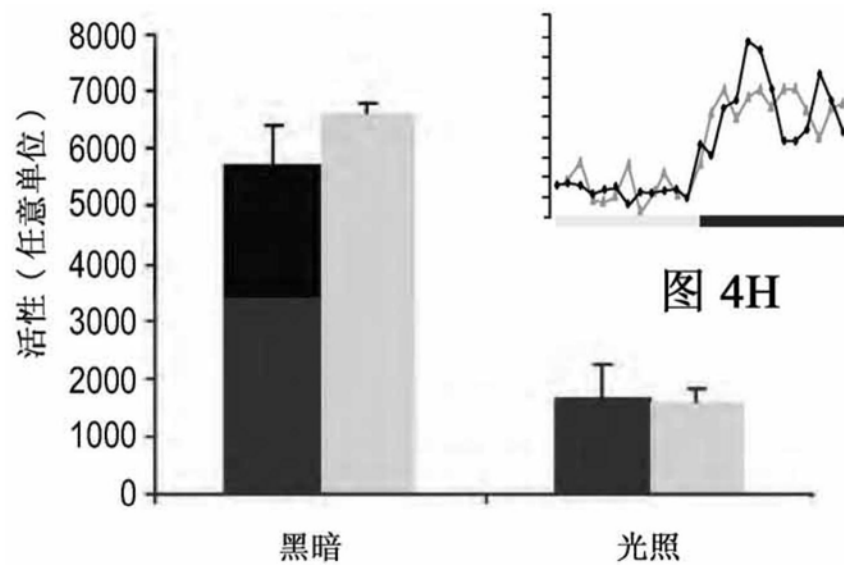


图 4G

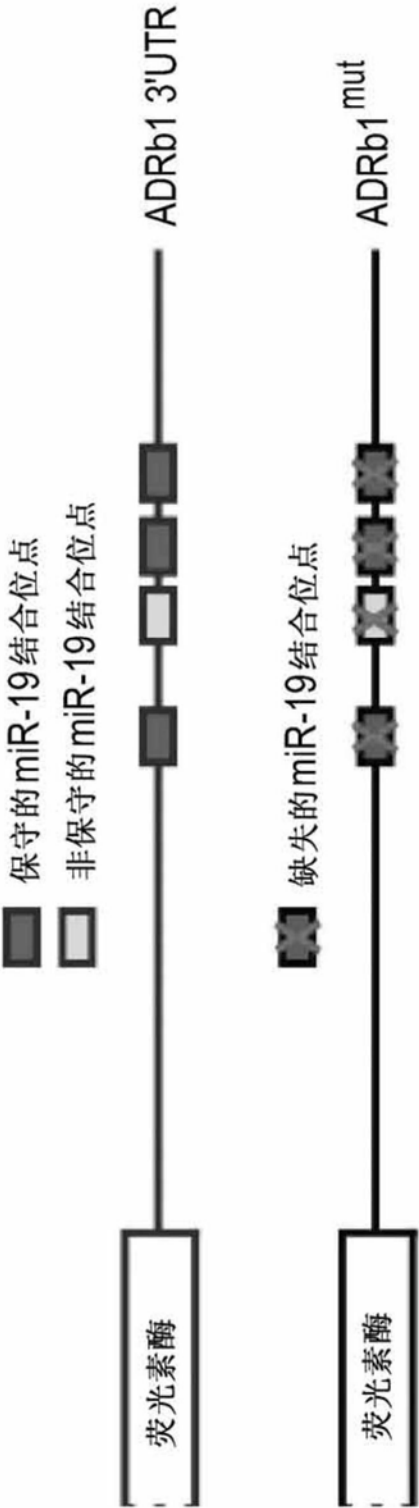


图5

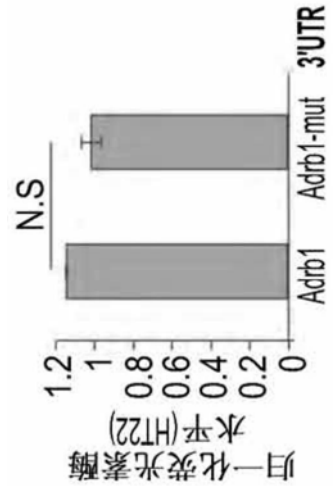


图6A

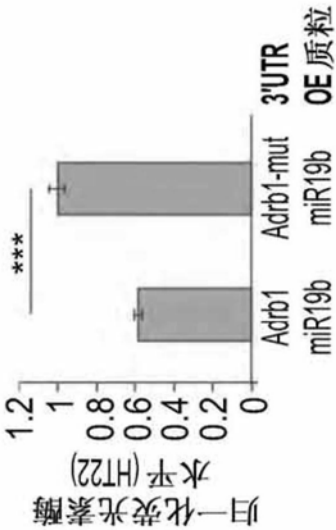


图6B

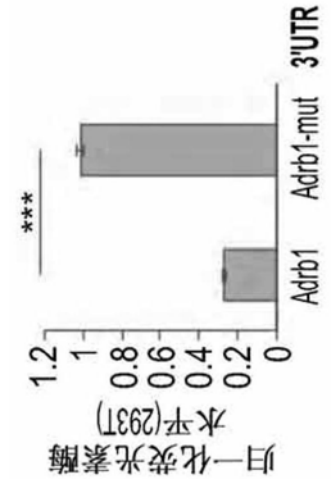


图6C

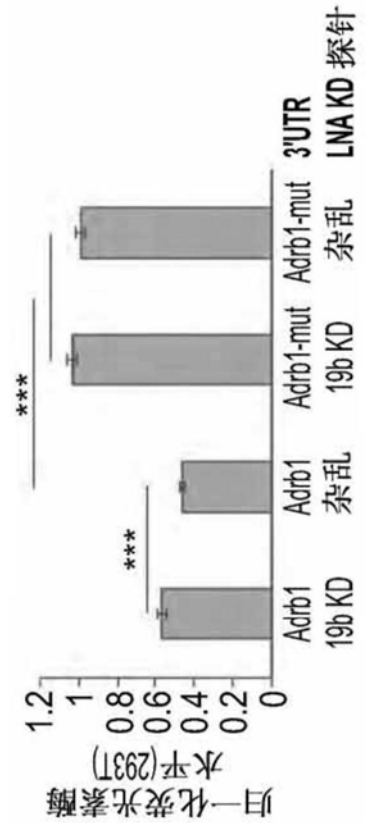


图6D



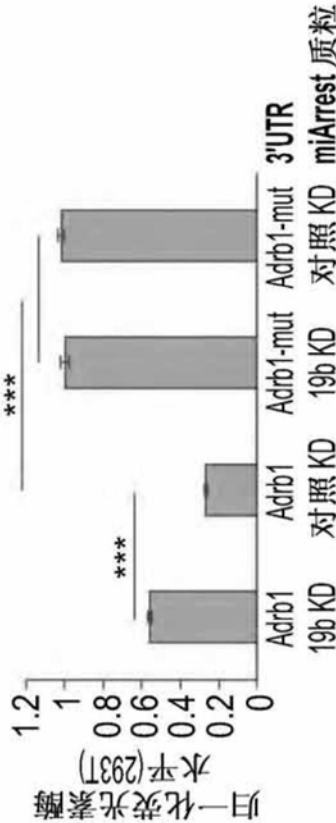


图6E

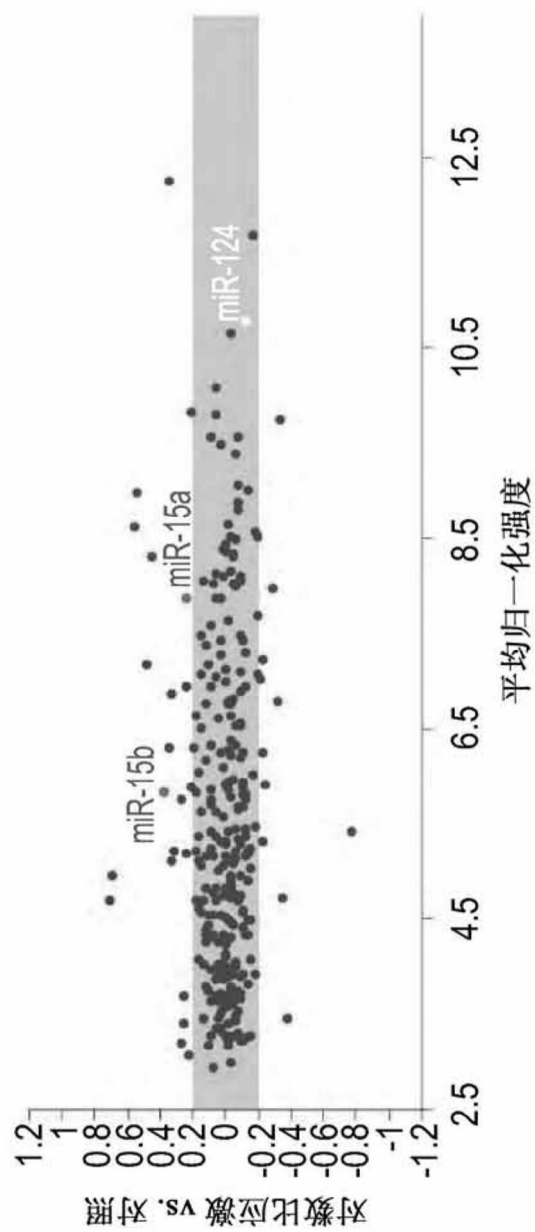


图7A

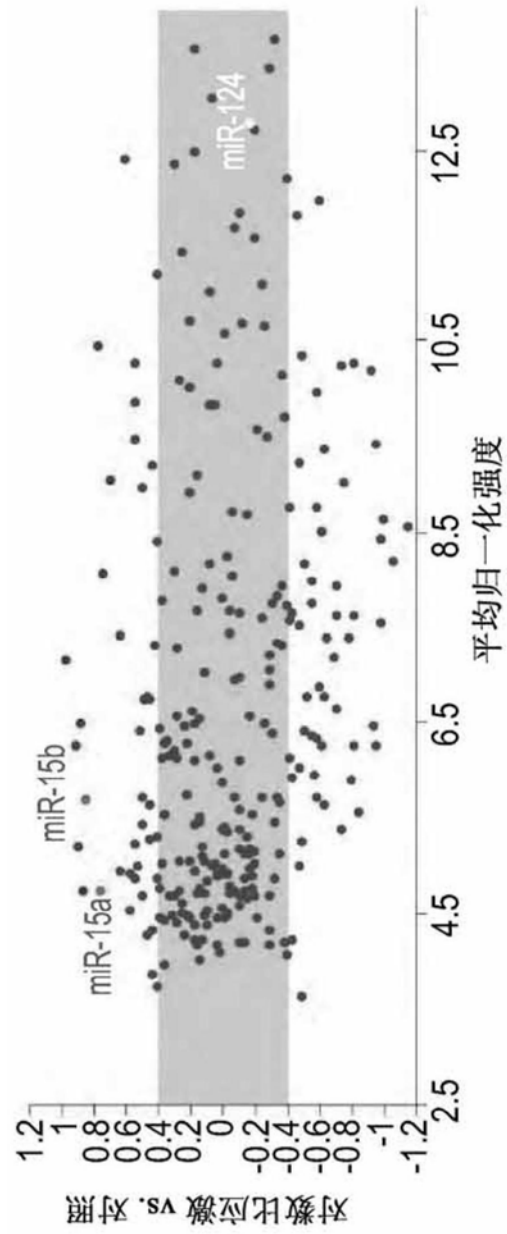


图7B

Crhr 3' UTR 的位置 554-560 mmu-miR-15a	5' ... UGGAAGCCCCUGCCCUUGCUCUU ...	SEQ ID NO: 55
	3' GUGUUUGGUAAUACACGACGAU	SEQ ID NO: 56
Crhr 3' UTR 的位置 554-560 mmu-miR-15b	5' ... UGGAAGCCCCUGCCCUUGCUCUU ...	SEQ ID NO: 55
	3' ACAUUUGGUACUACACGACGAU	SEQ ID NO: 57

图7C

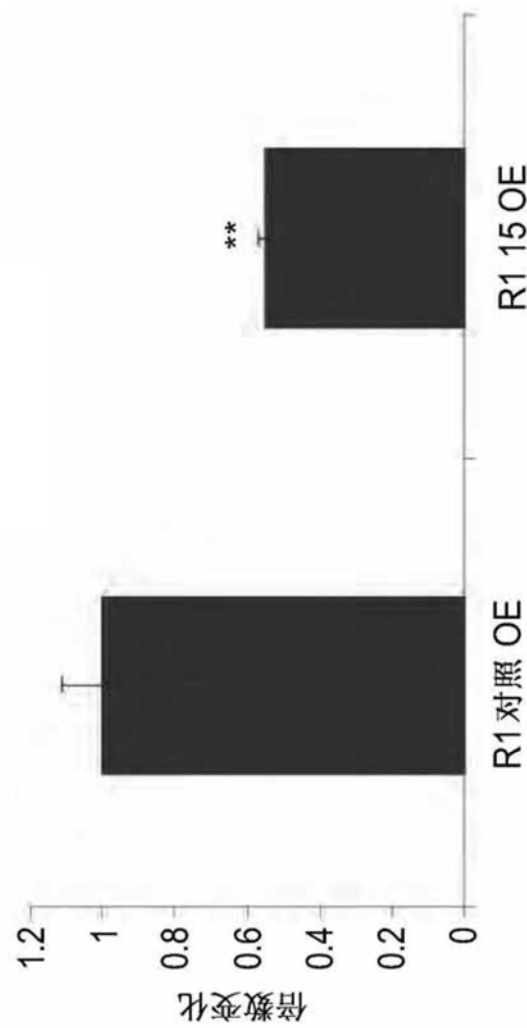


图7D

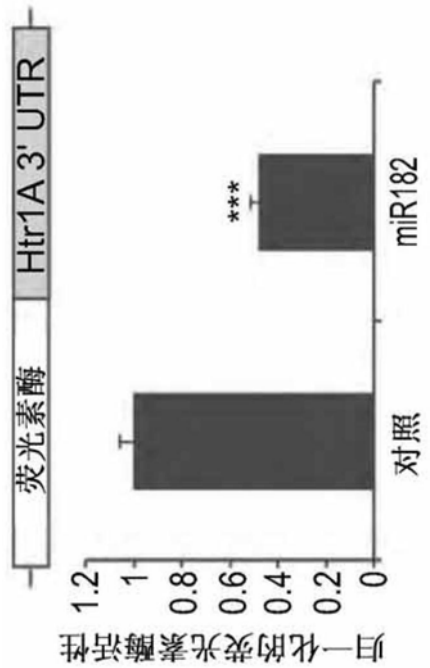


图8

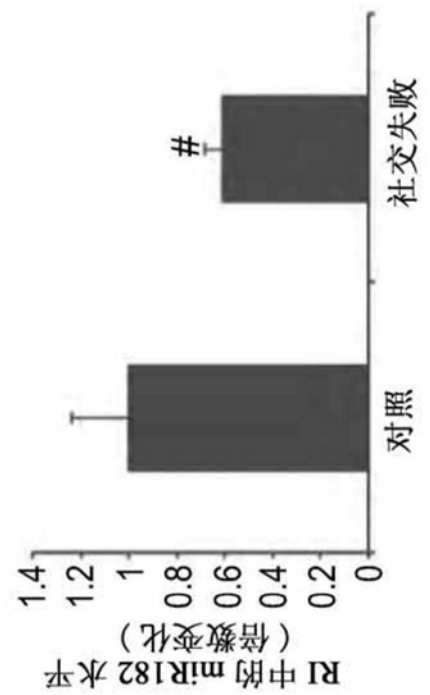


图9

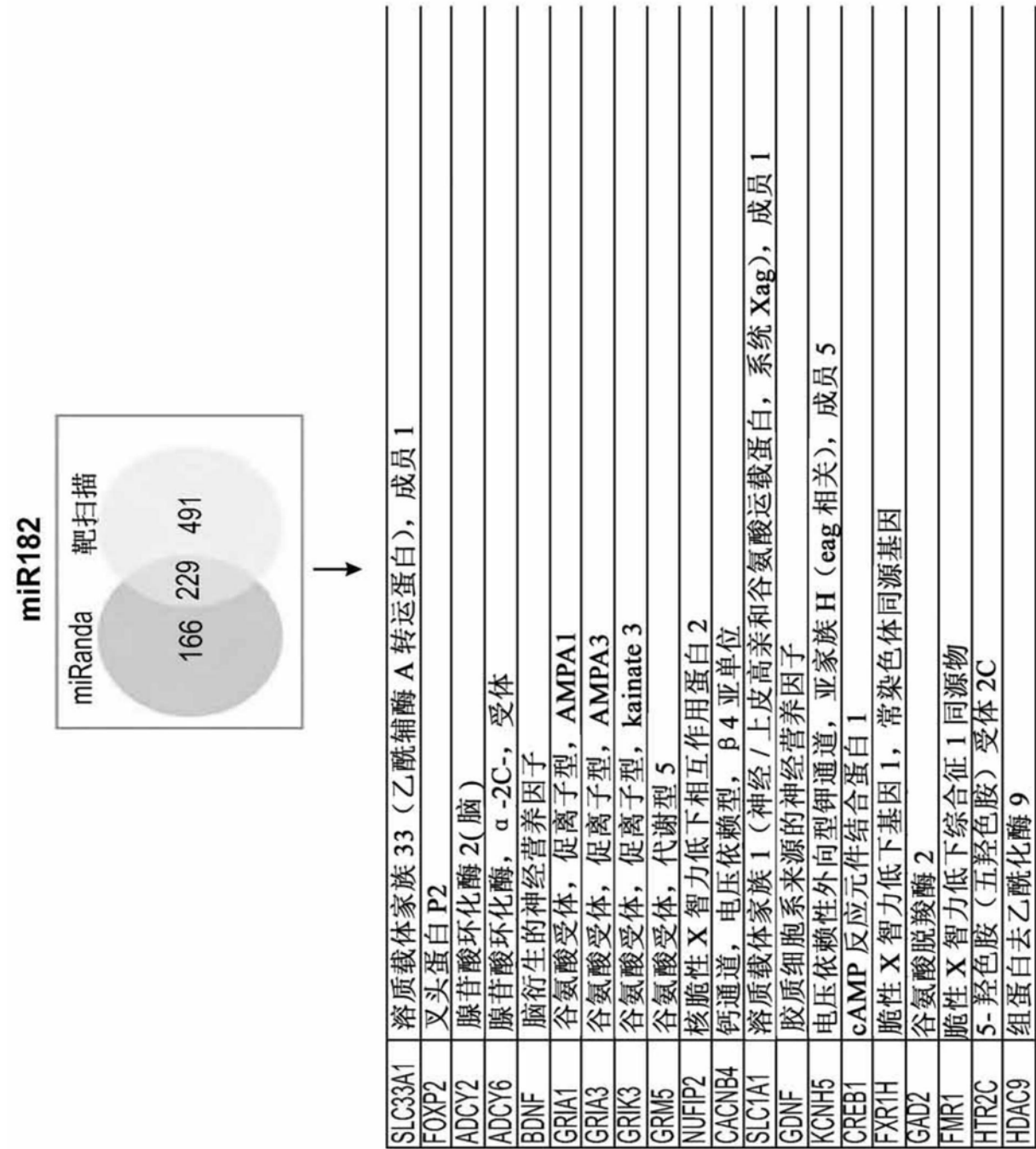


图10



图11A

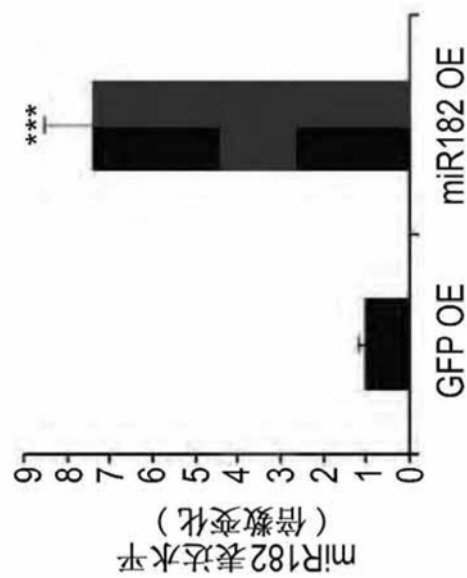


图11B





图11C

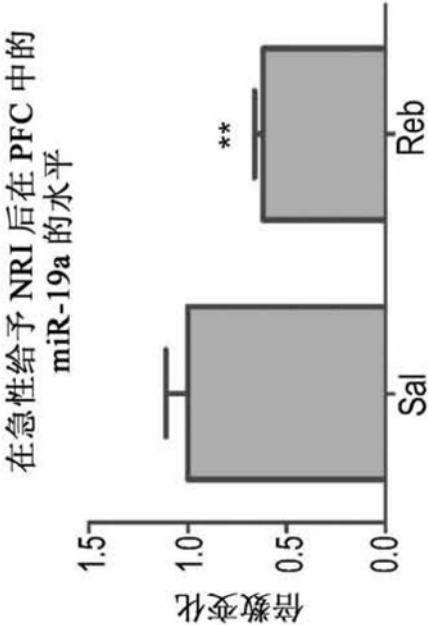


图12A

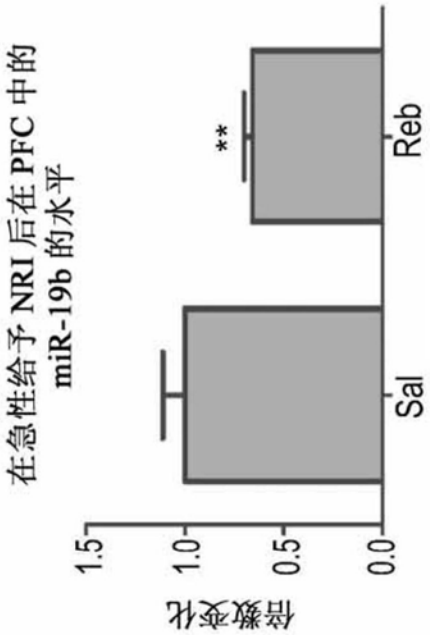


图12B

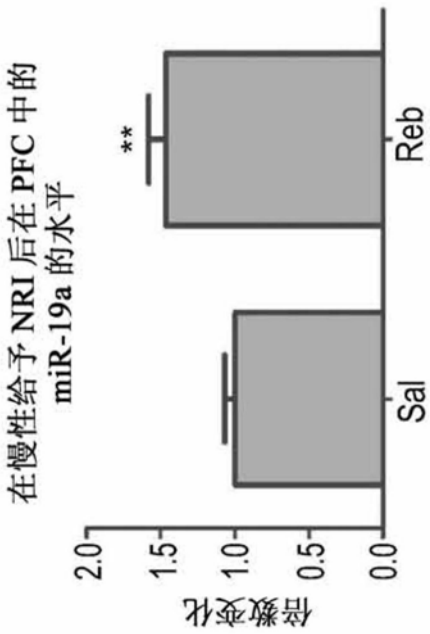


图12C

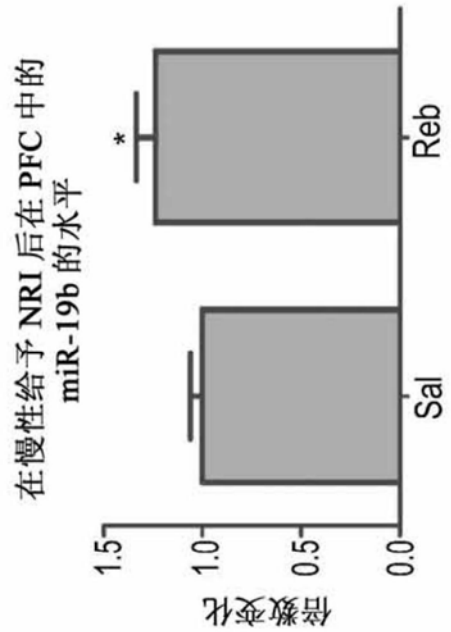


图12D

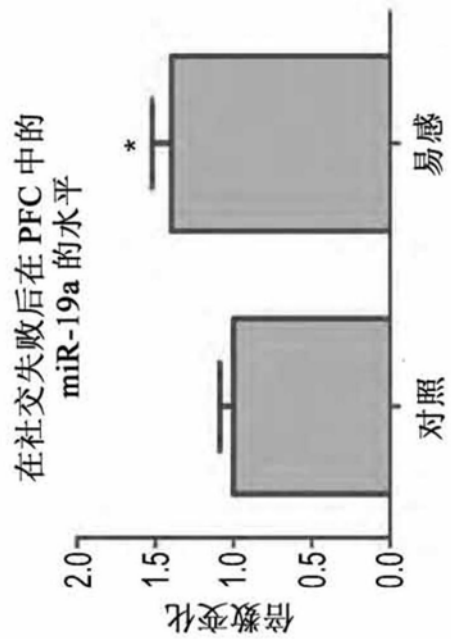


图13A

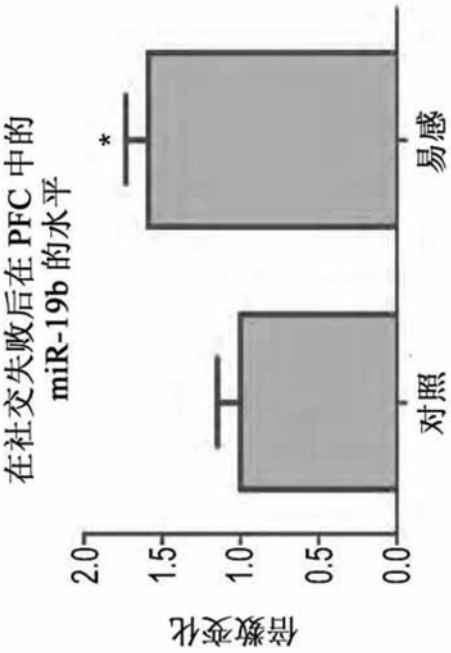


图13B

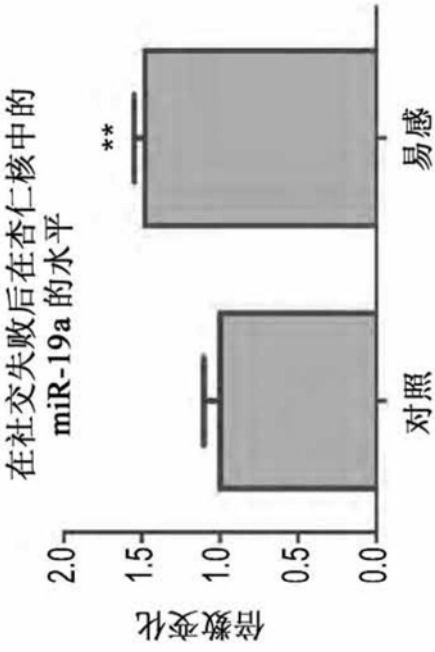


图13C

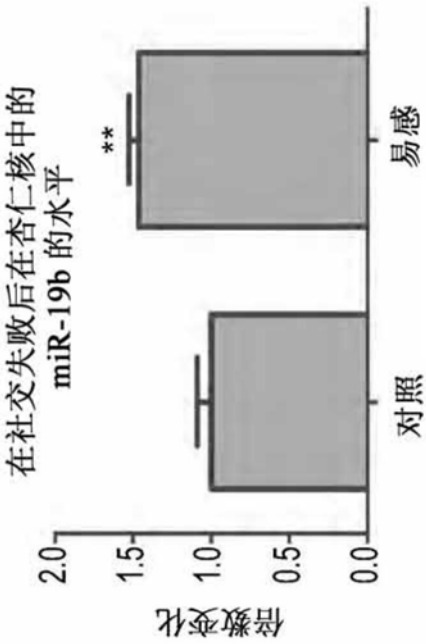


图13D

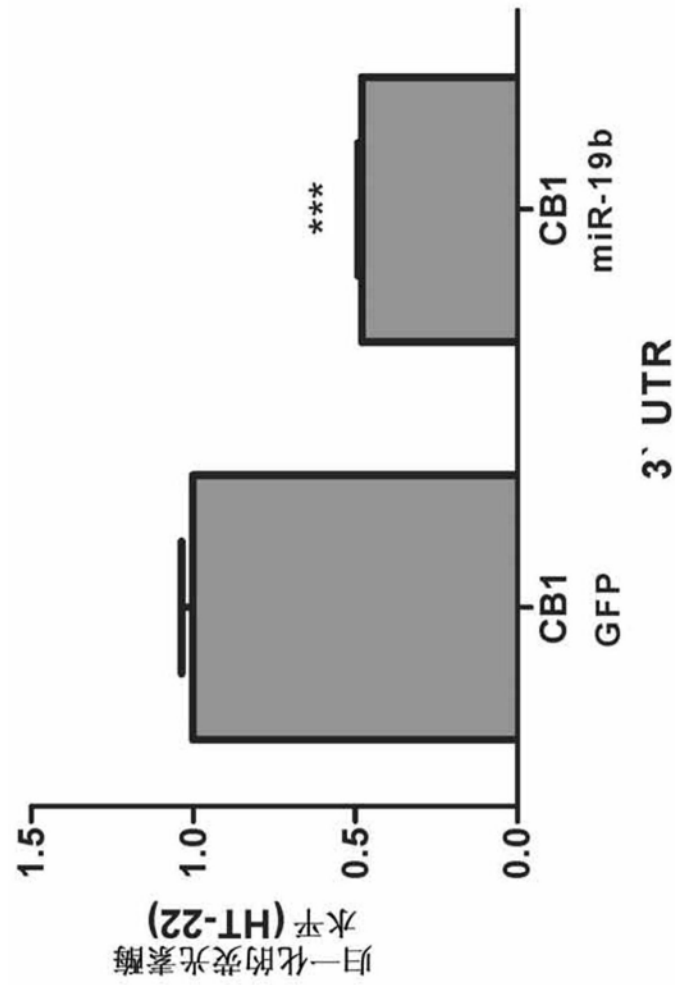


图14

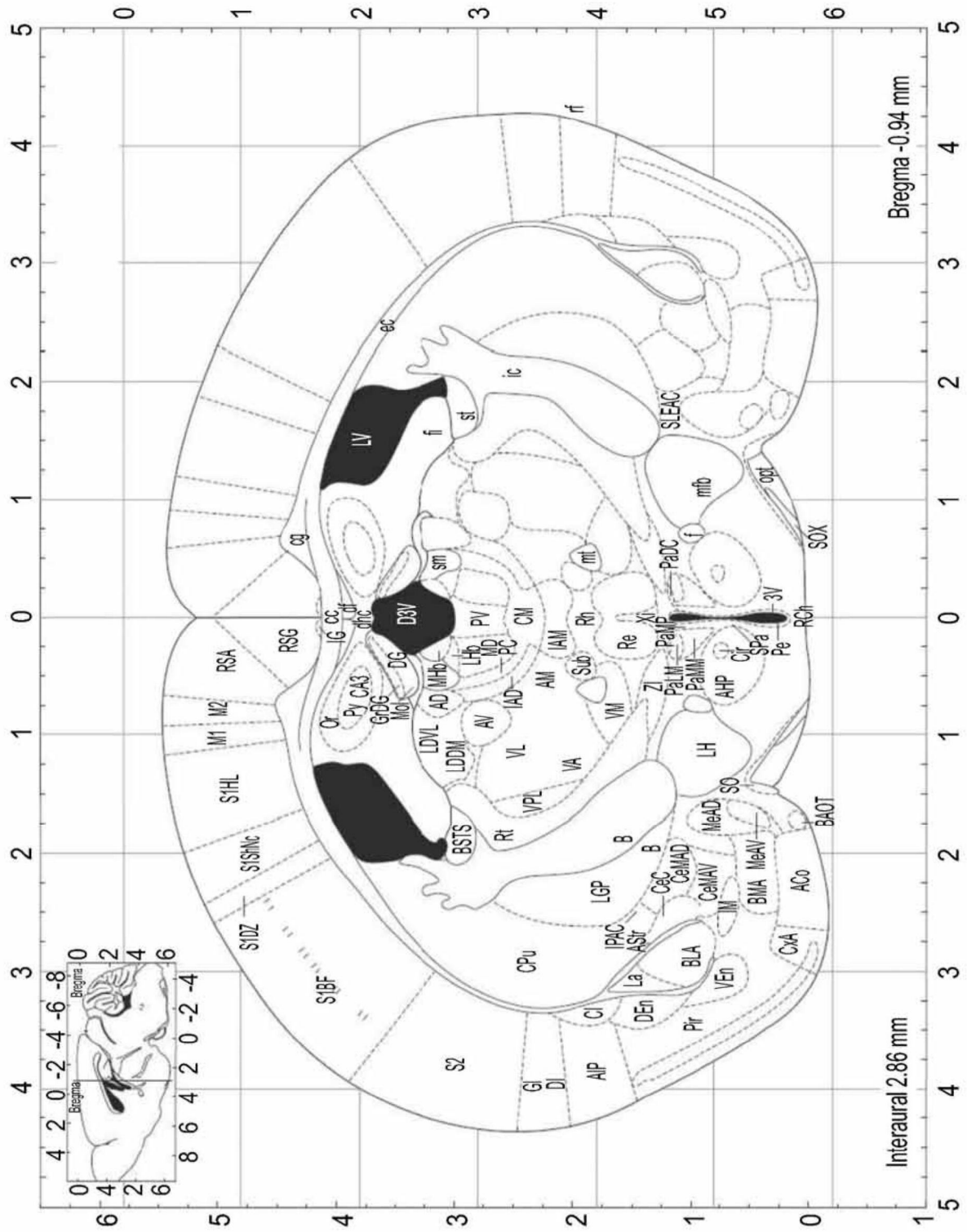


图15A

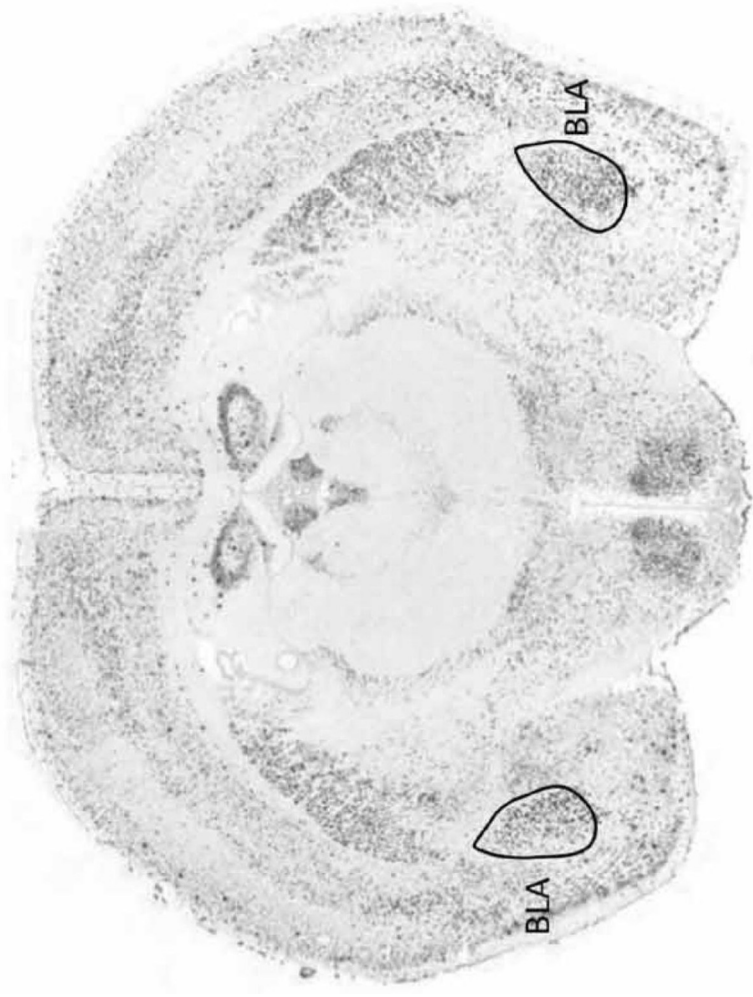


图15B



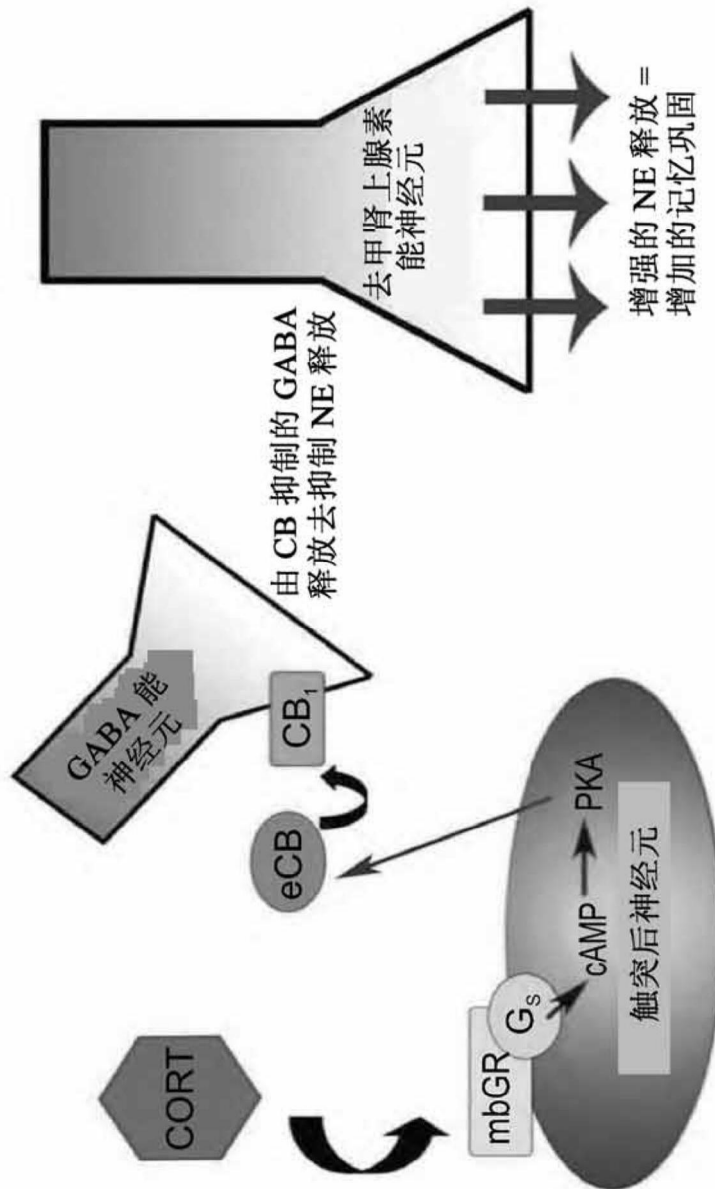


图16

来自 Hill M.N. and McEwen B.S. Proc of the Nat Acad of Sci of the USA (2009) 106:4579-4580

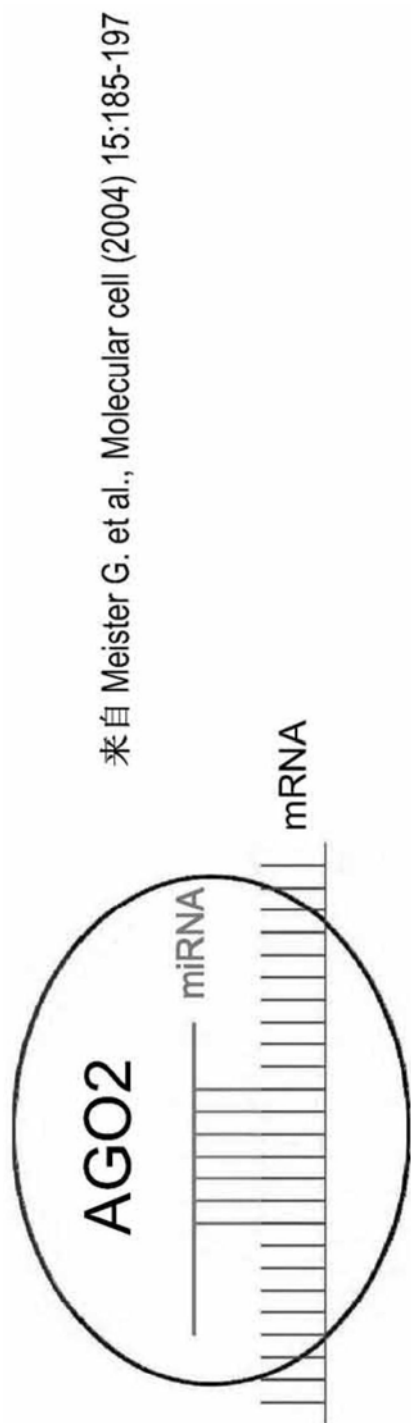


图17A

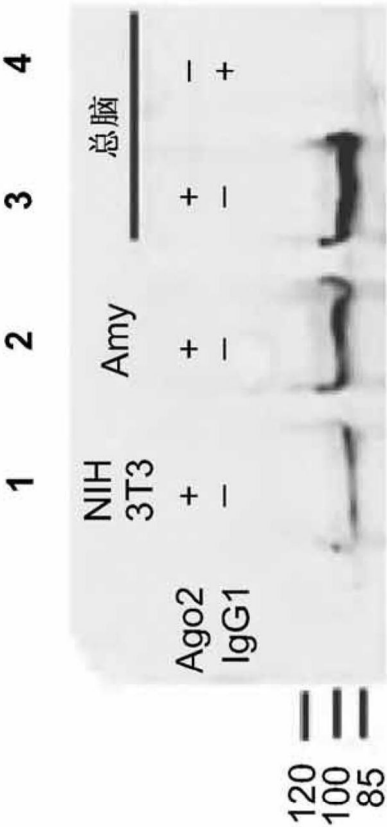


图17B



图18A

回弹



图18B



陌生小鼠

图18C



图18D

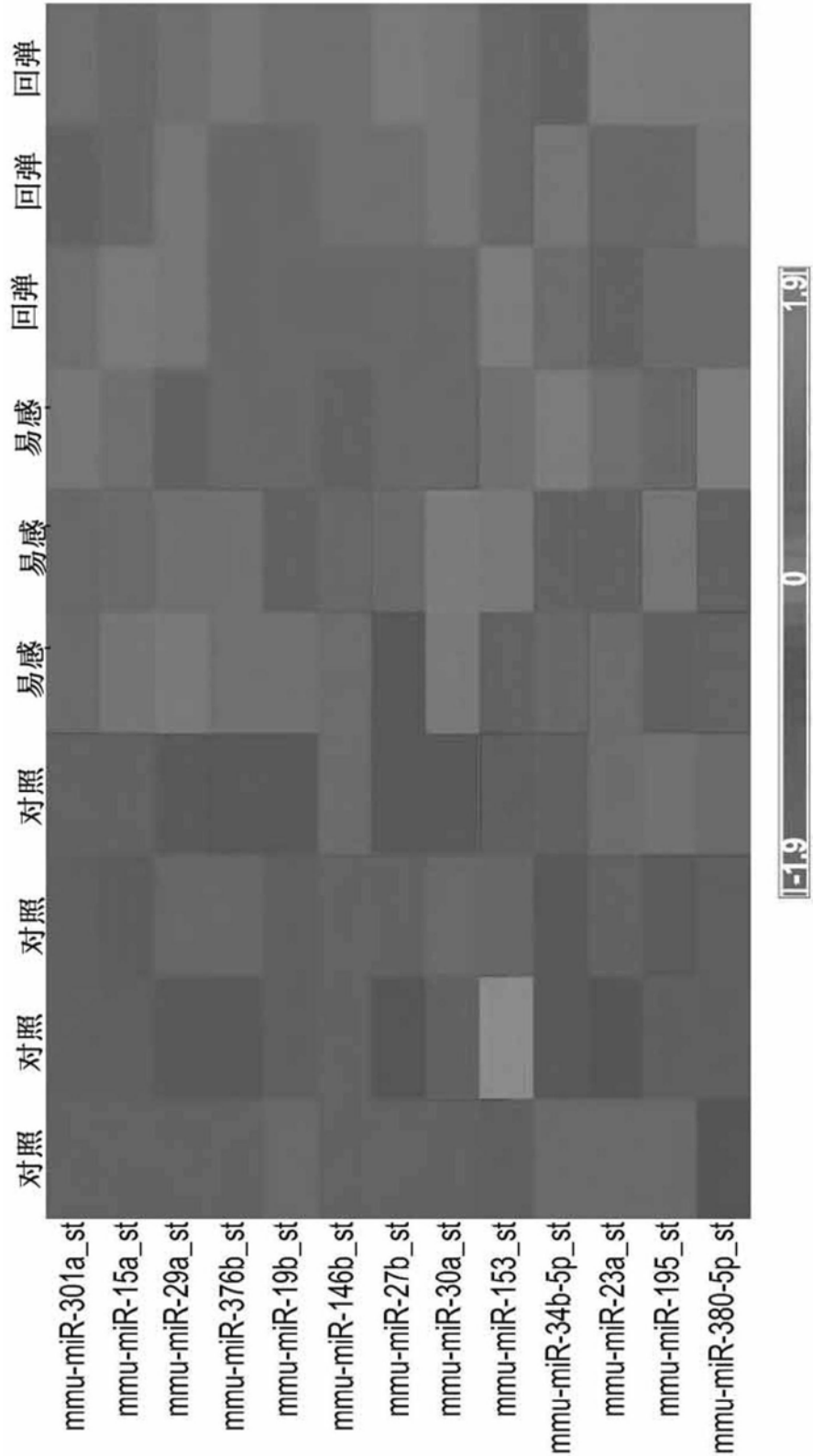


图19A

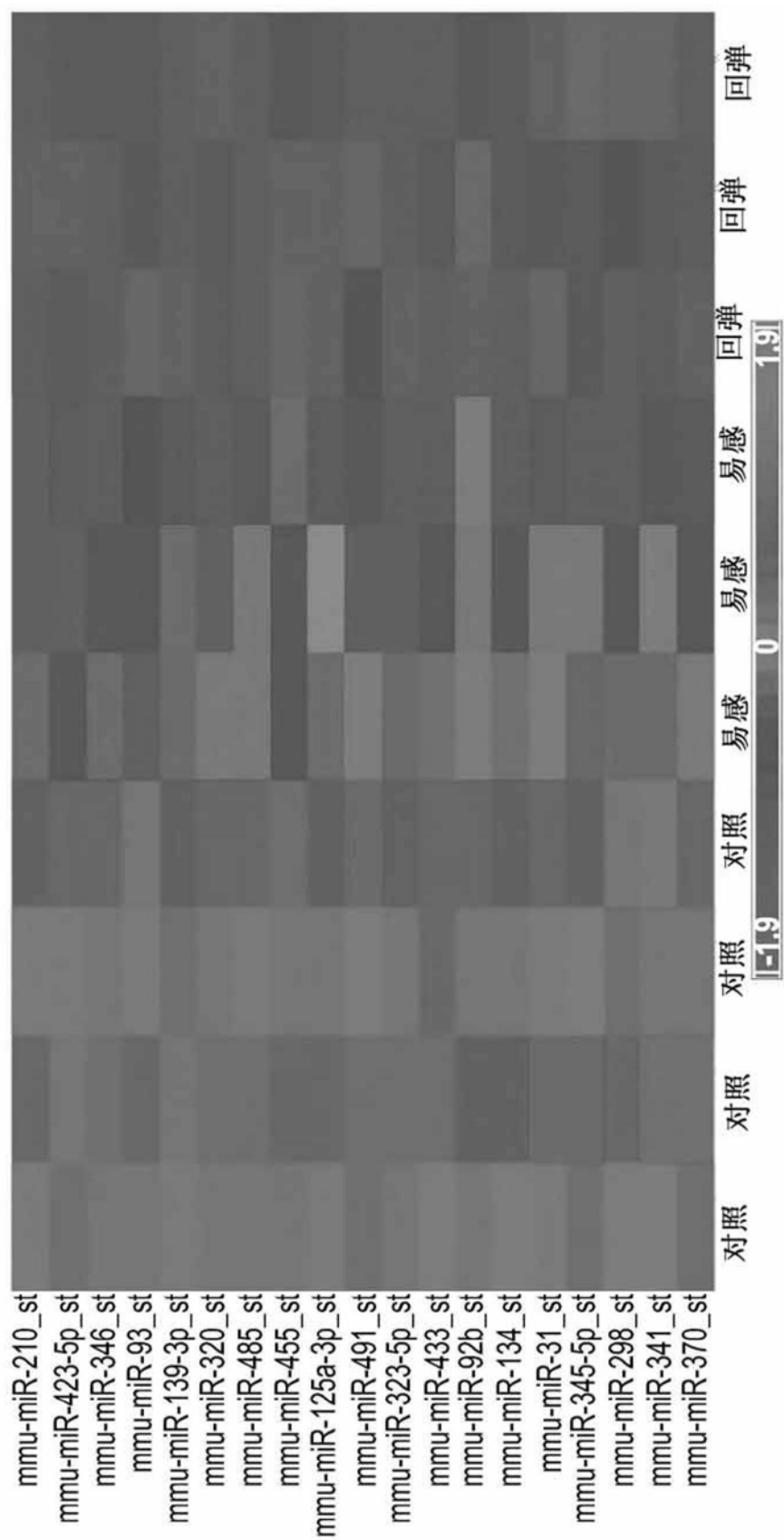


图19B

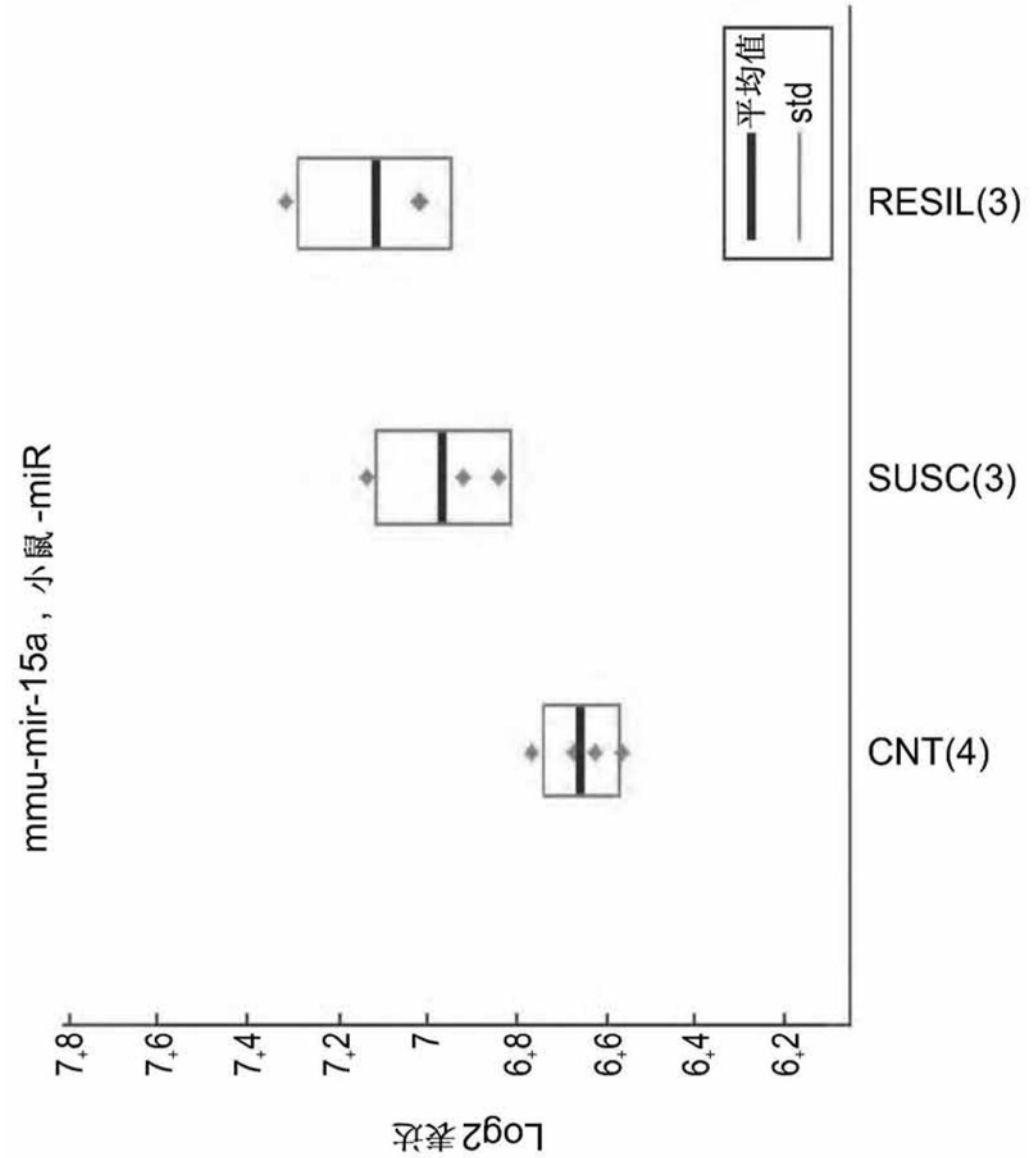


图20A



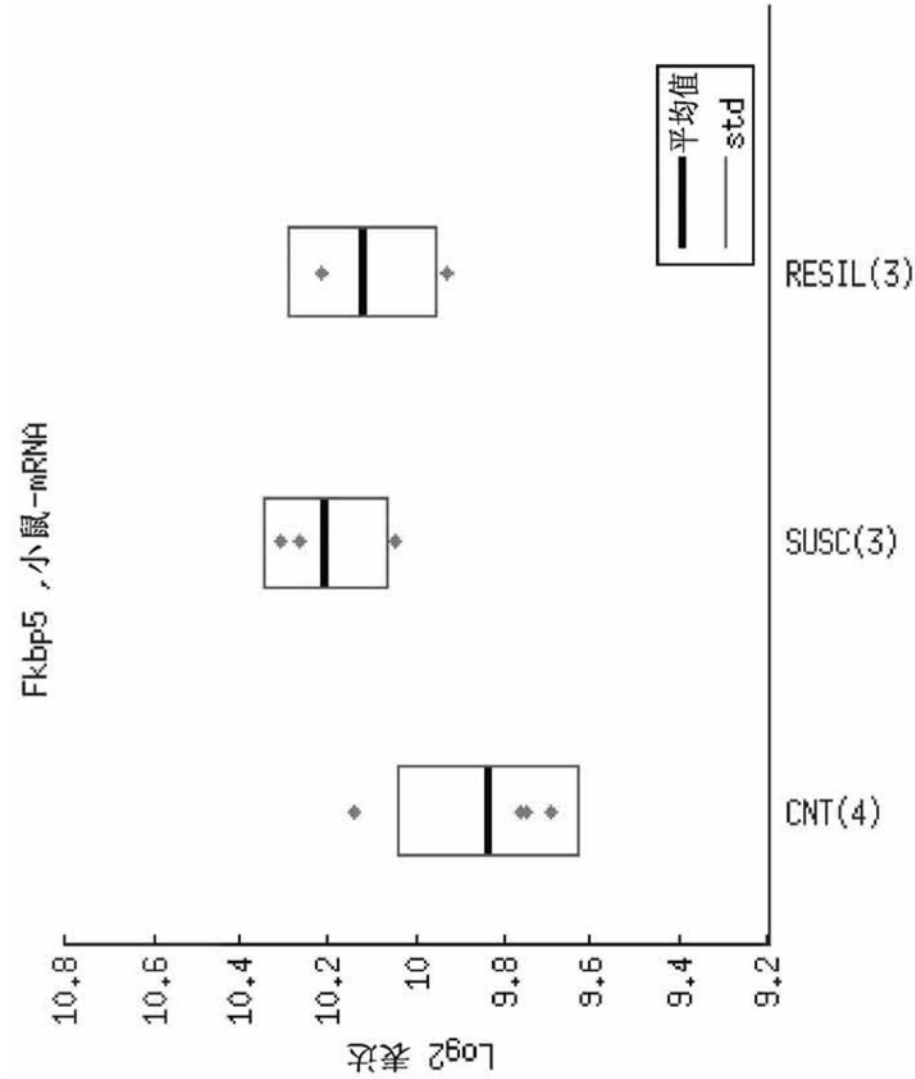


图20B

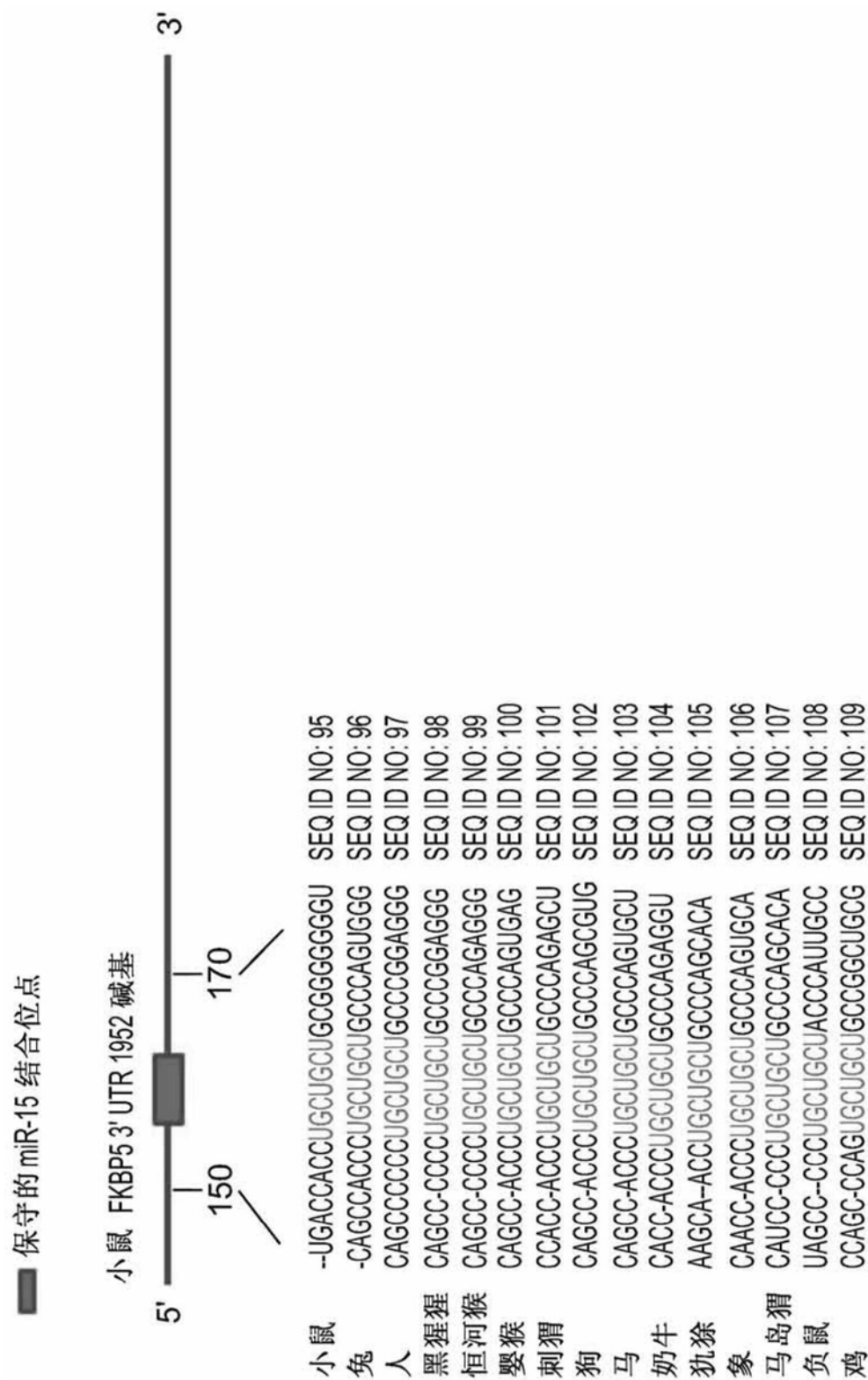


图20C

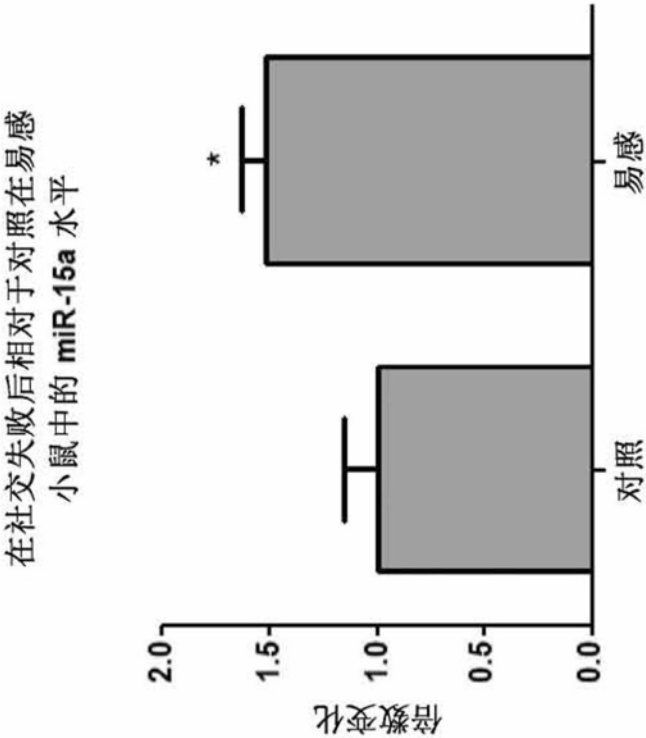


图21A

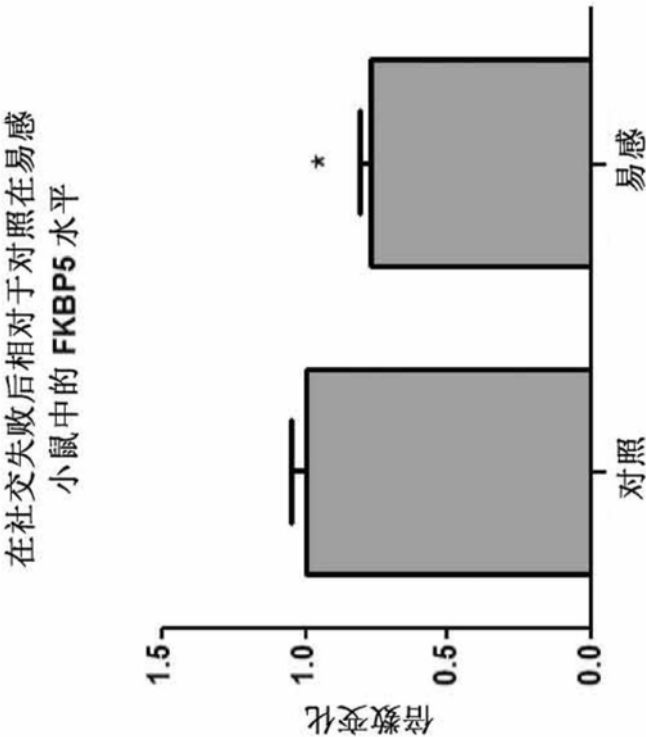


图21B

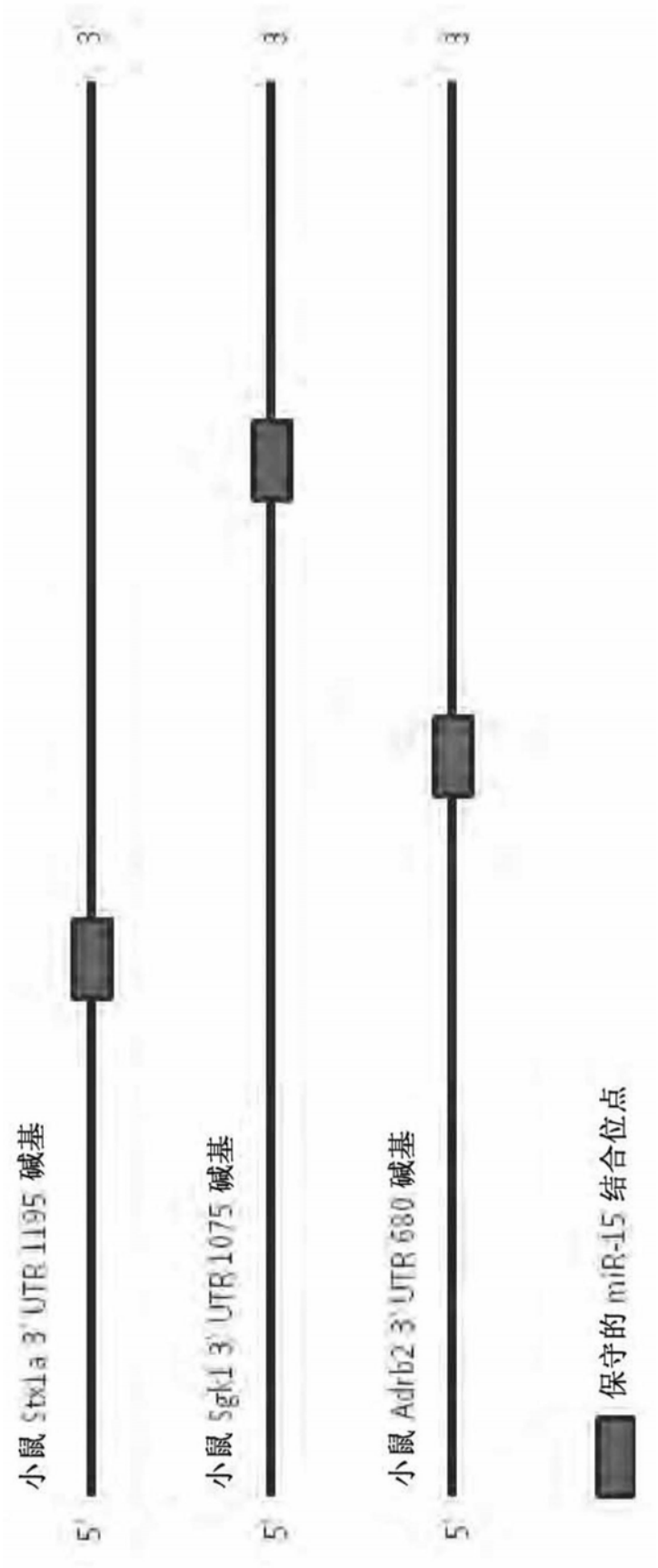


图22

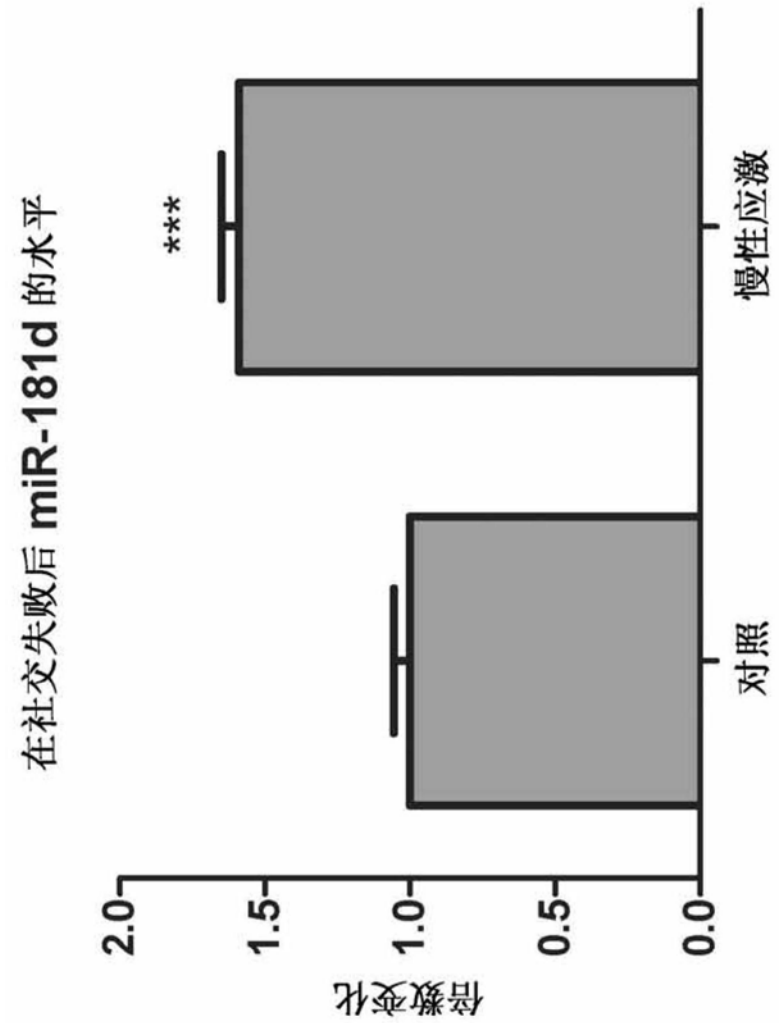


图23

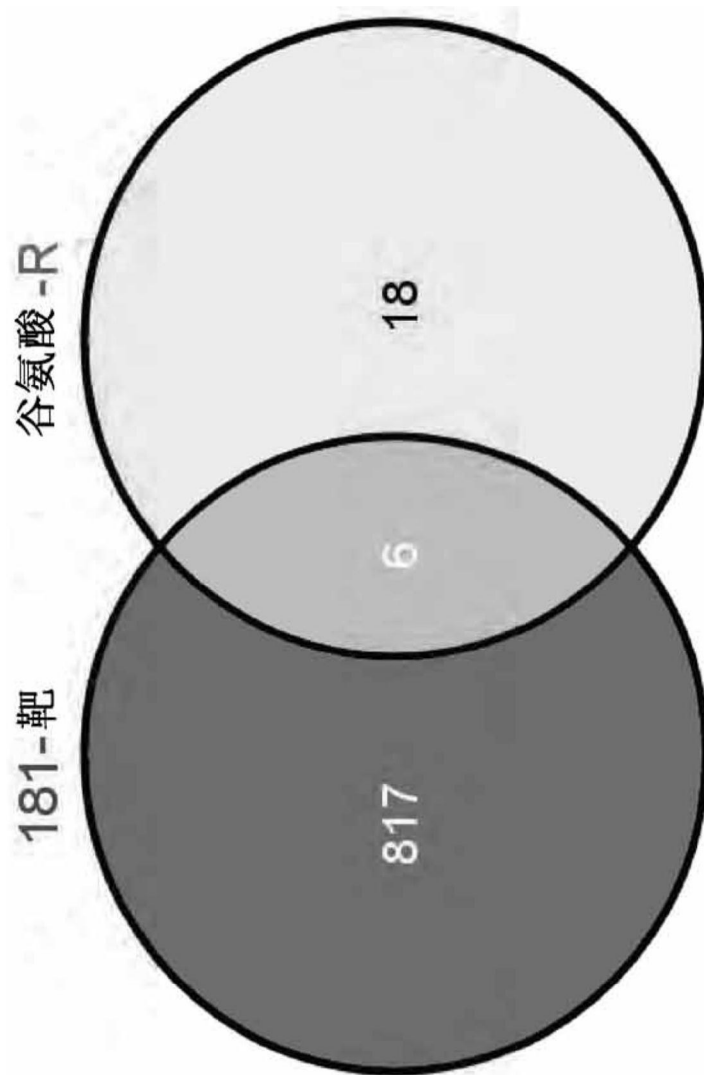


图24

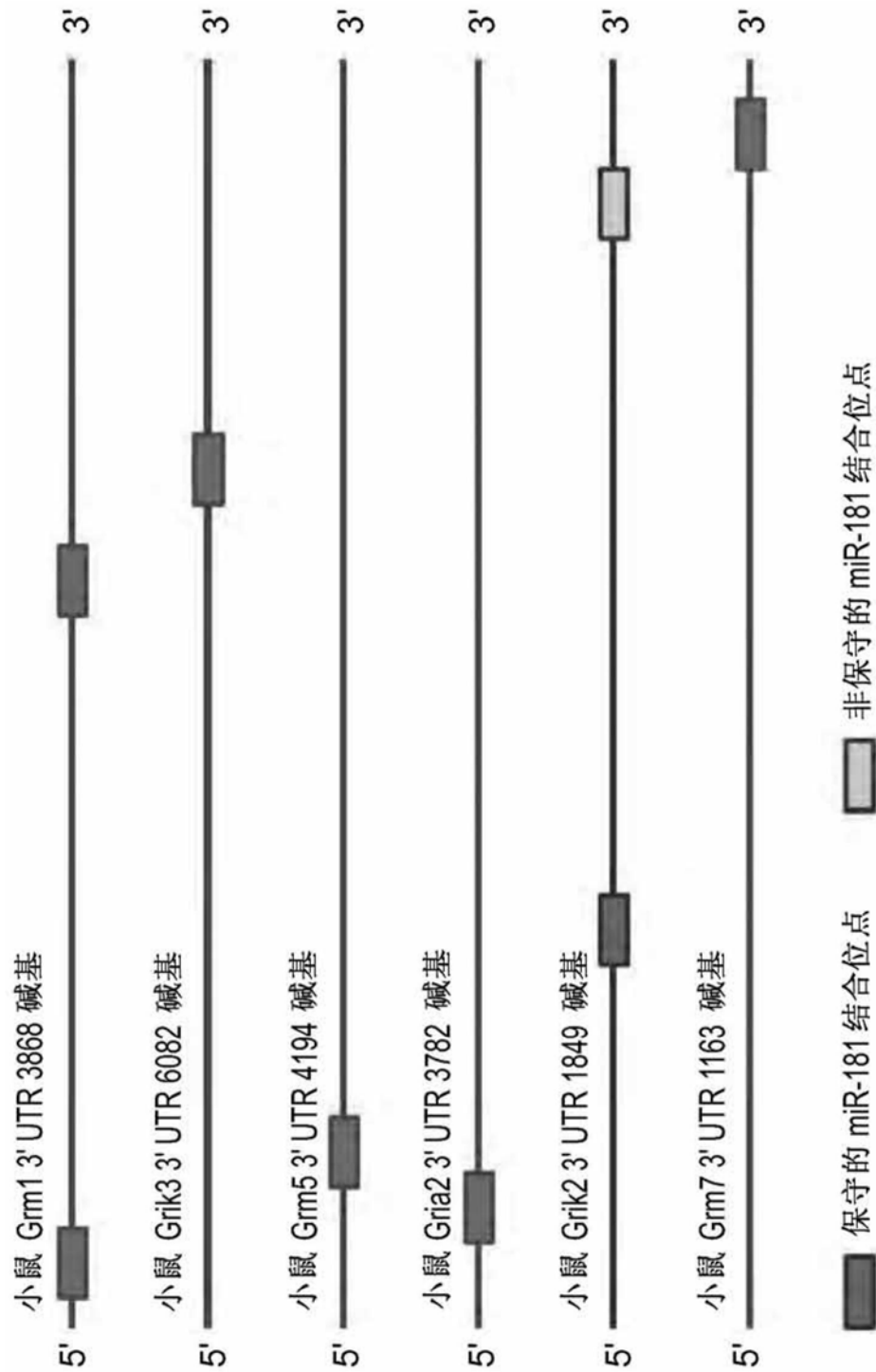


图25

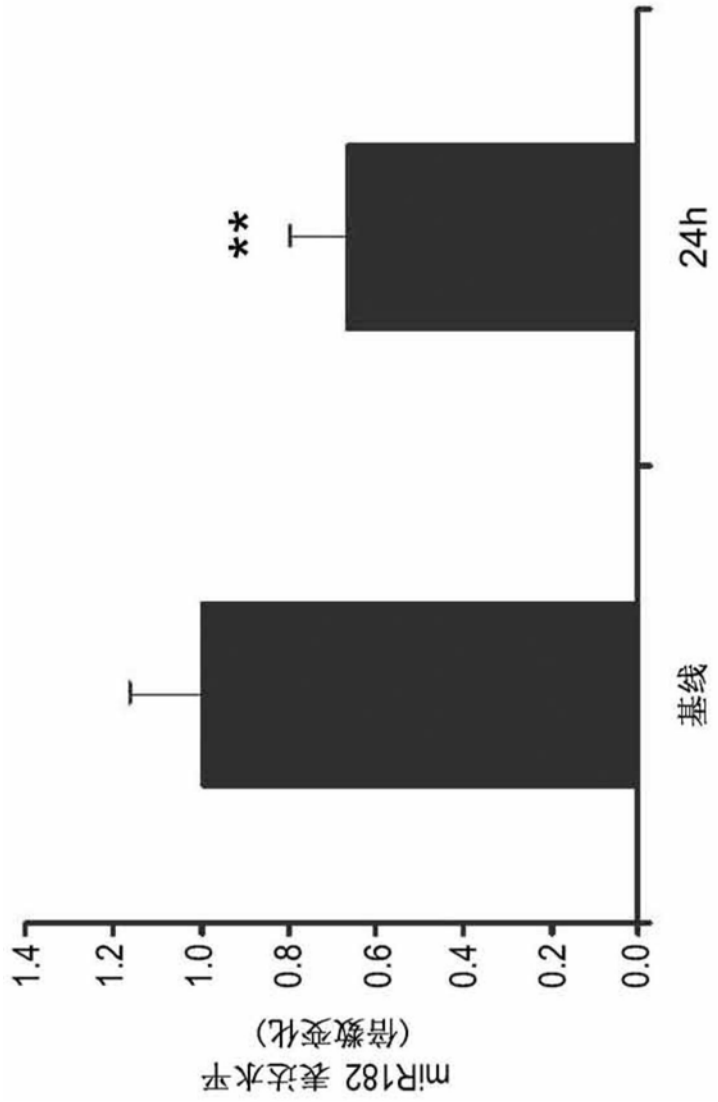


图26



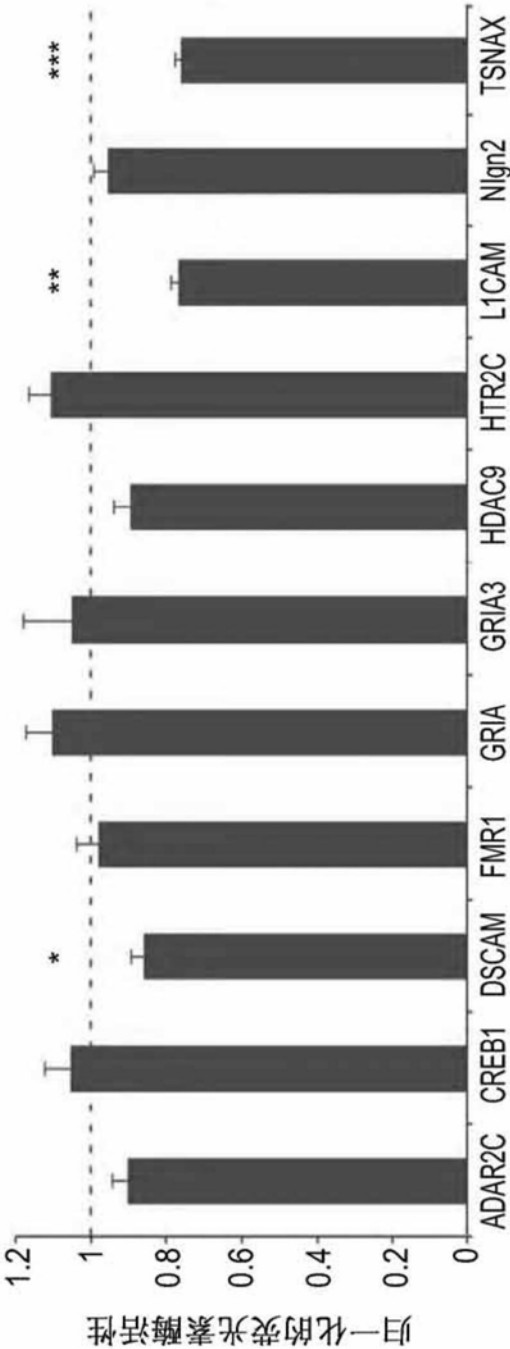


图27A

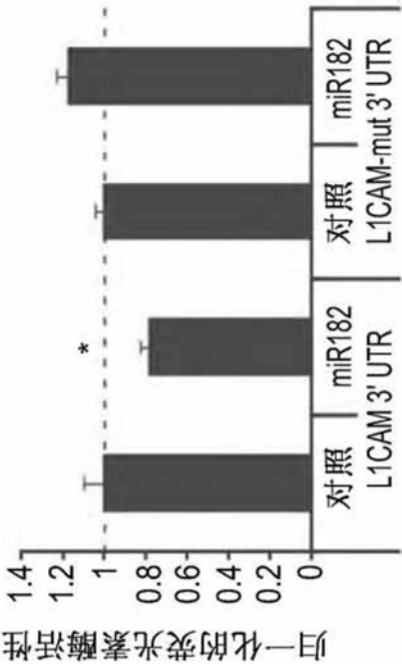


图27B

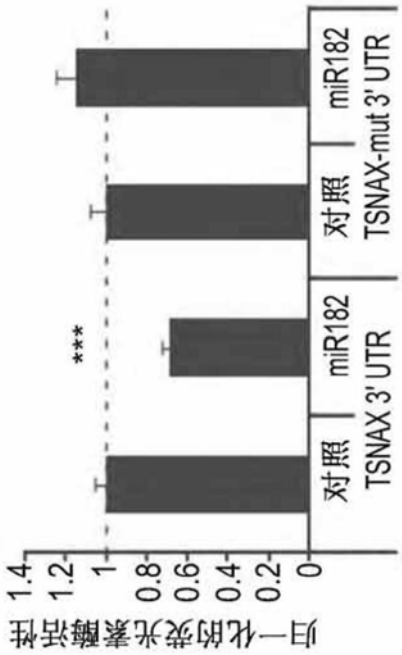


图27C

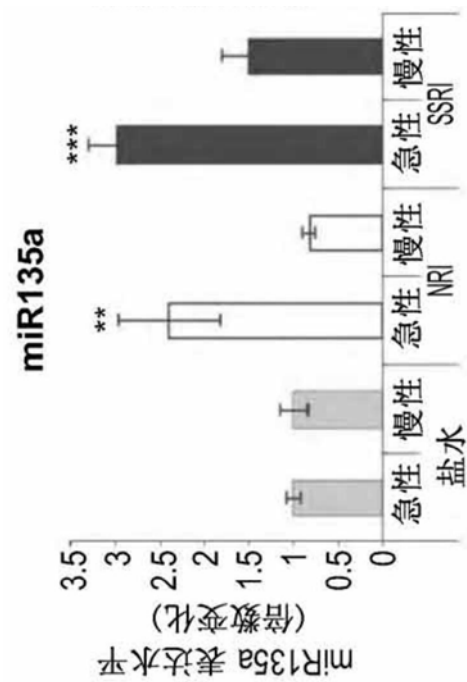


图28A

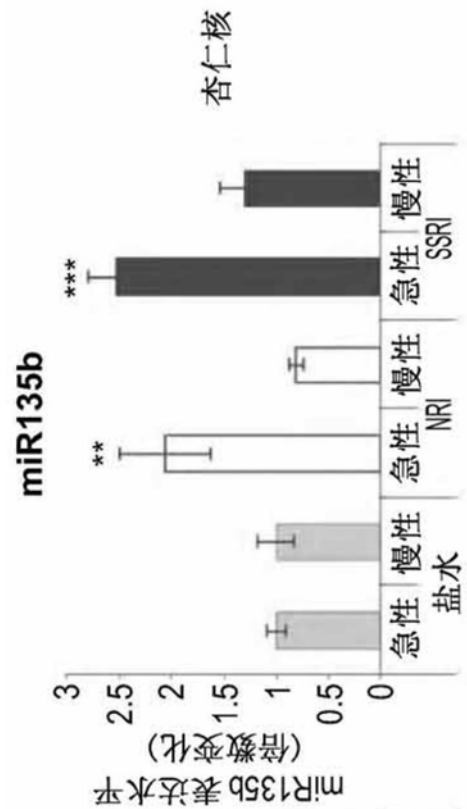


图28B

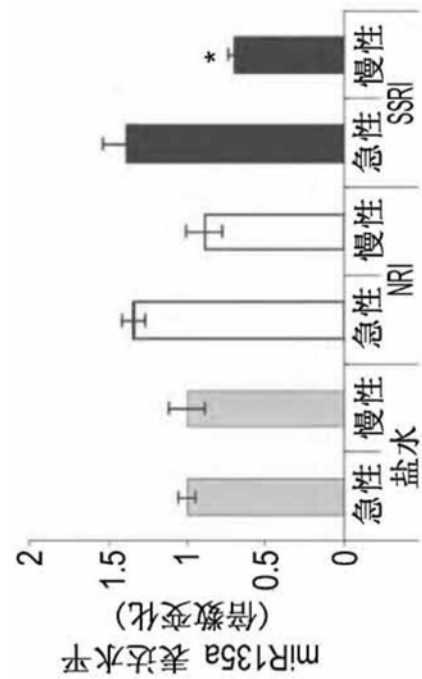


图28C

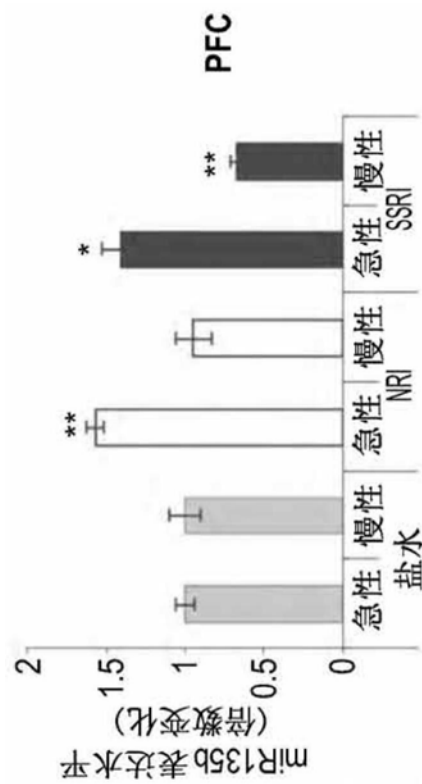


图28D

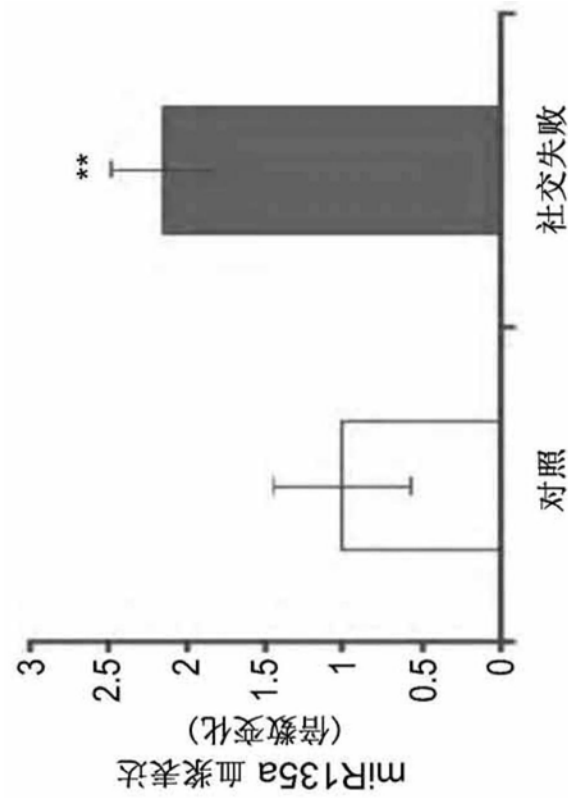


图29A

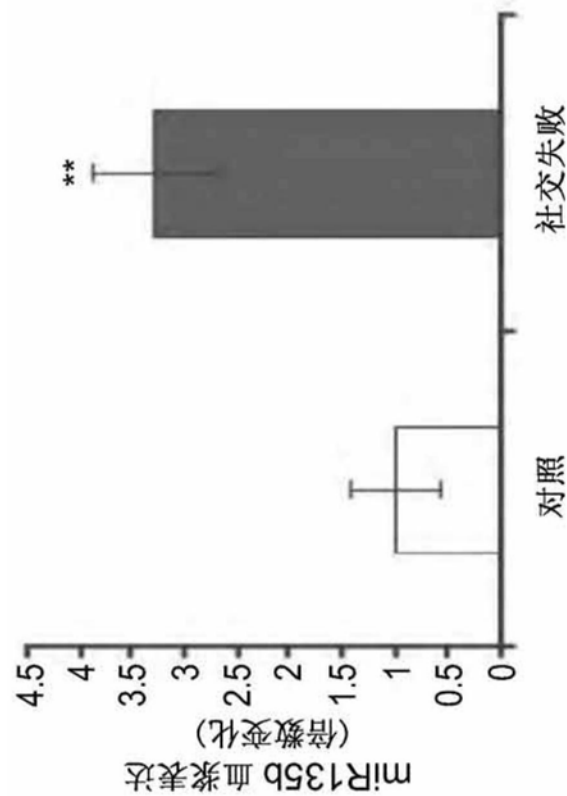


图29B

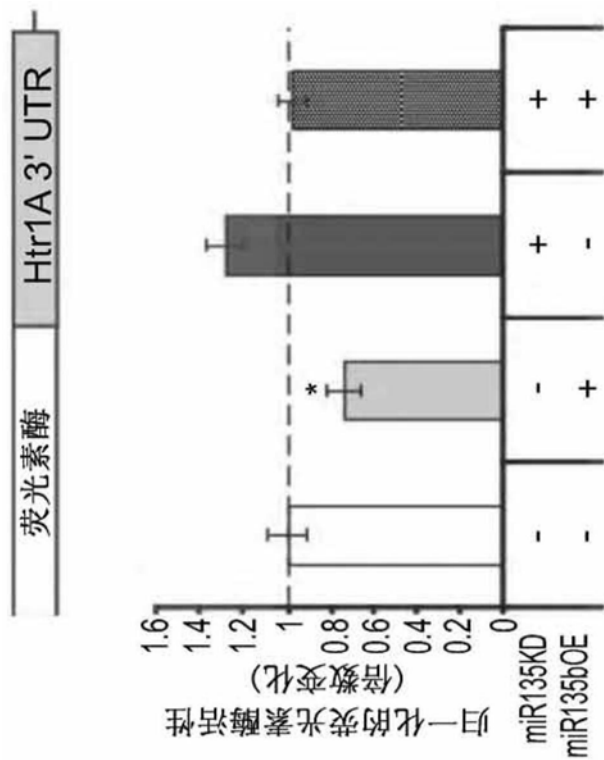


图30A

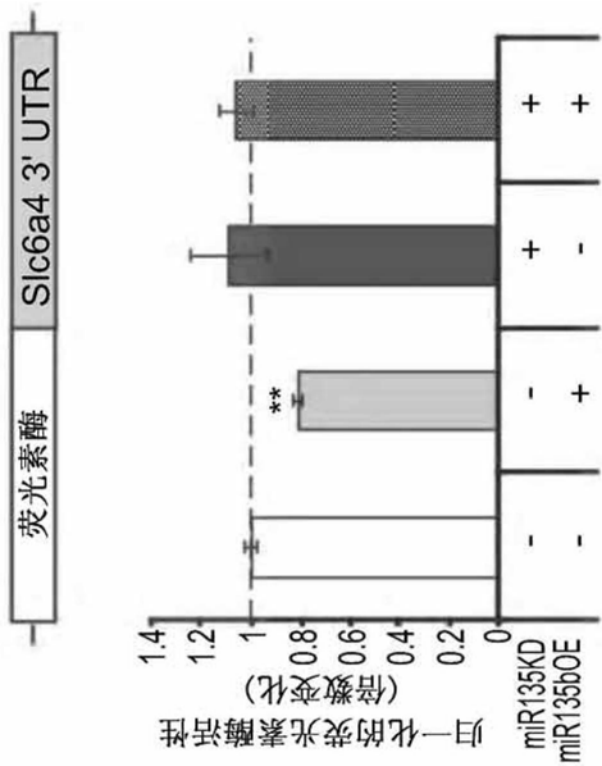


图30B

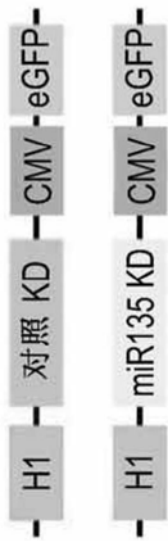


图30C

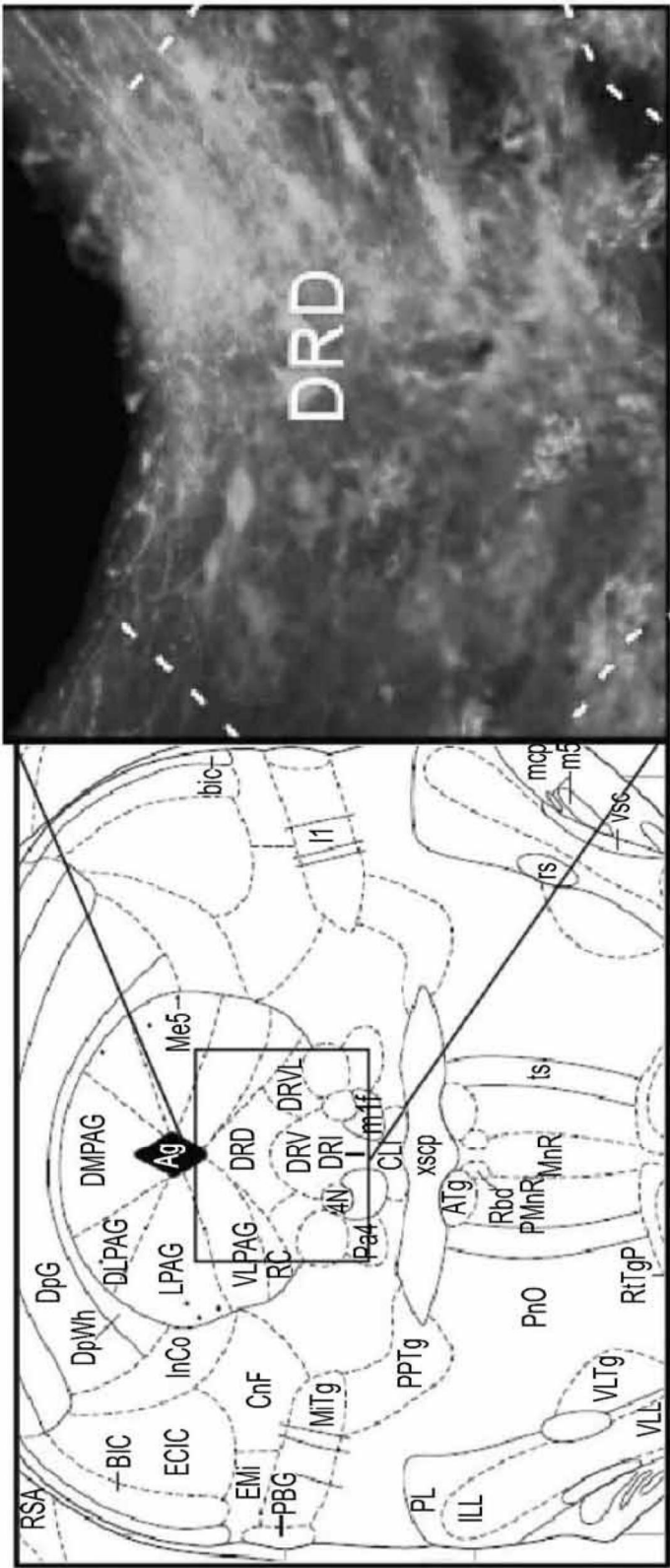


图30D

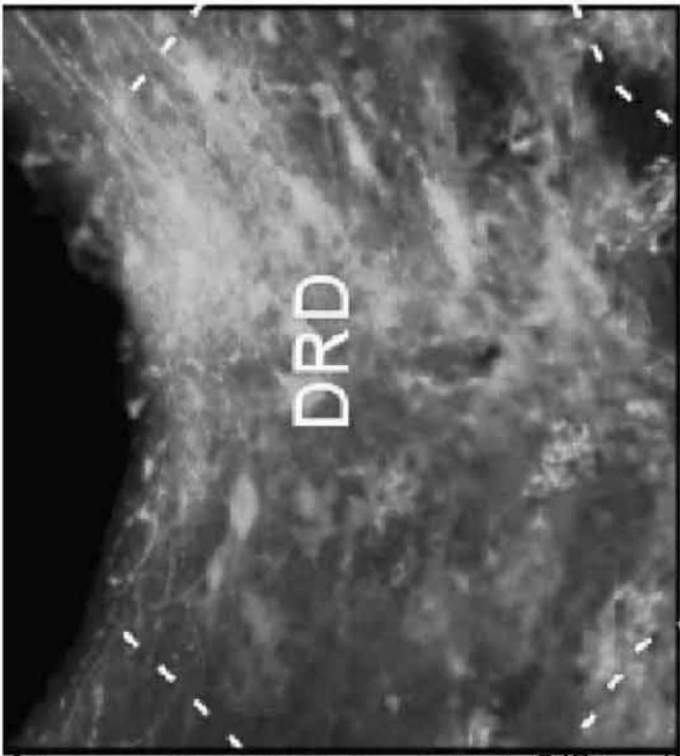


图30E



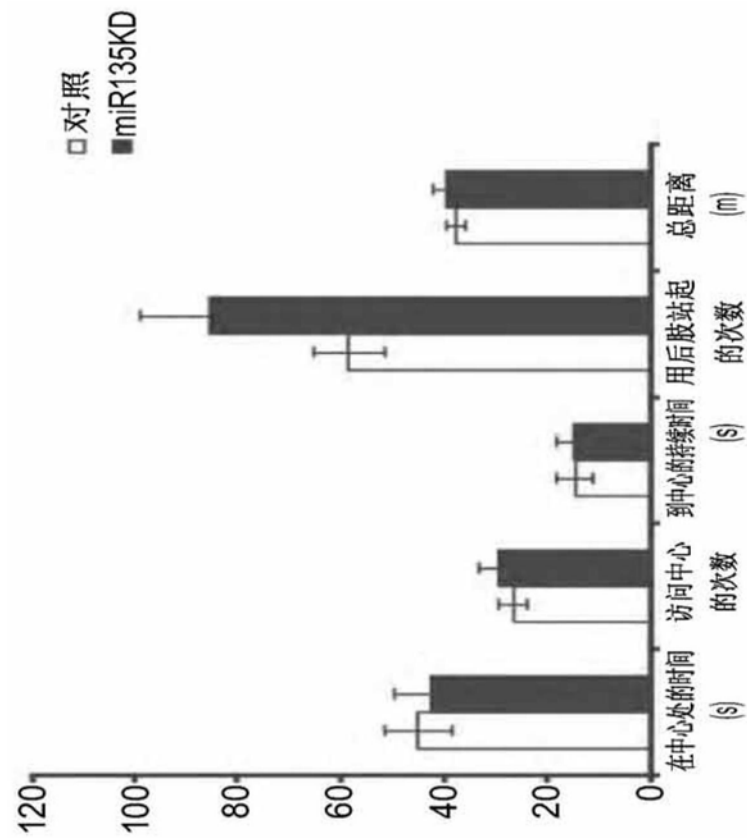


图31A

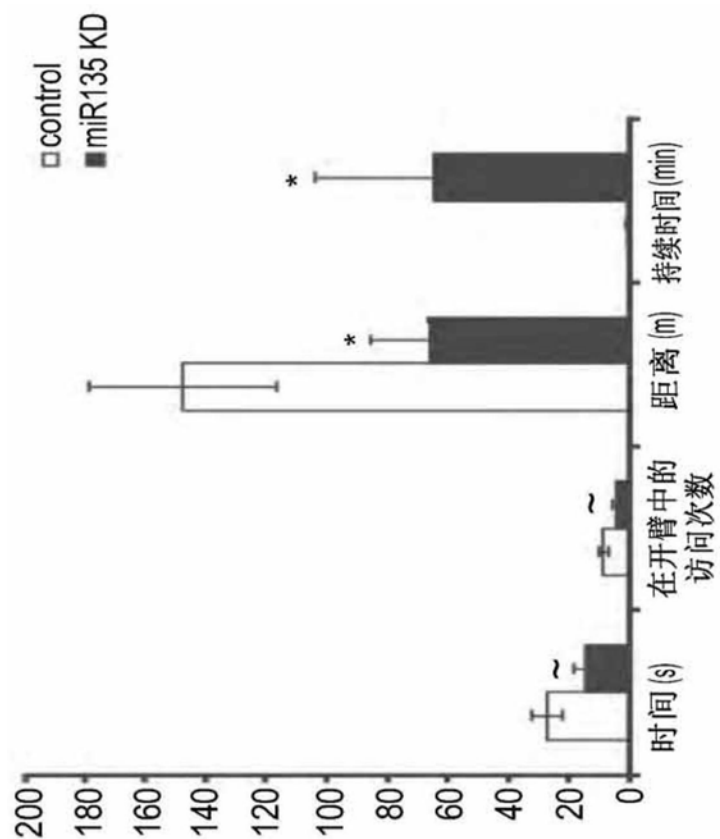


图31B

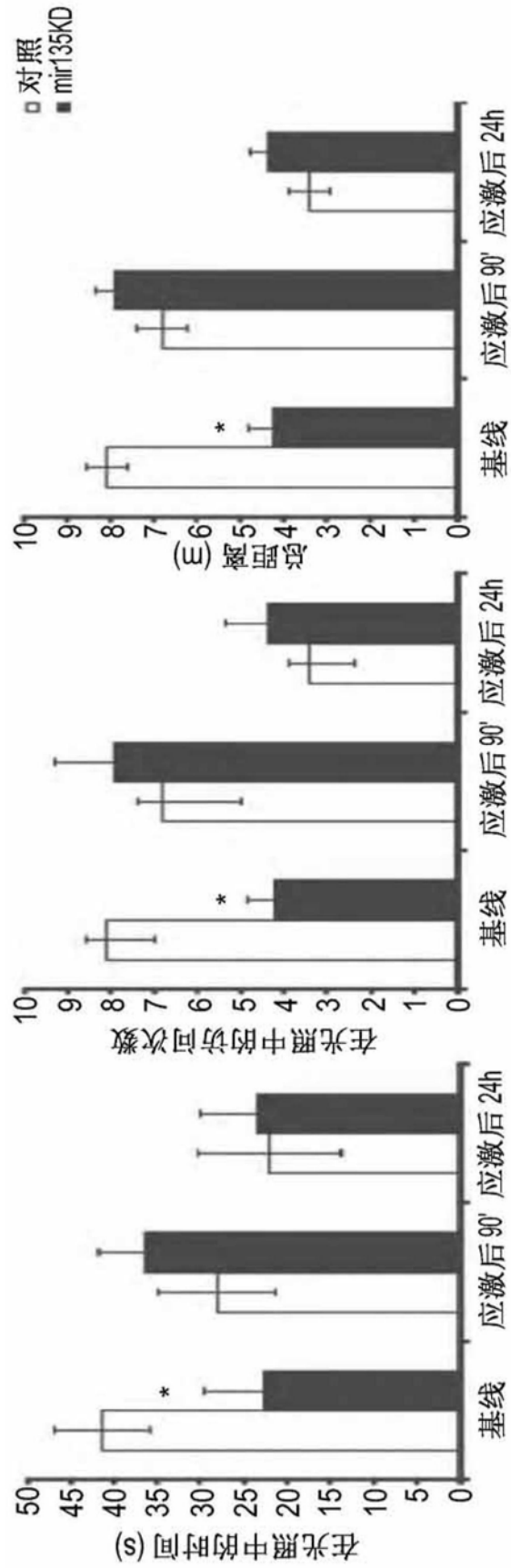


图31C

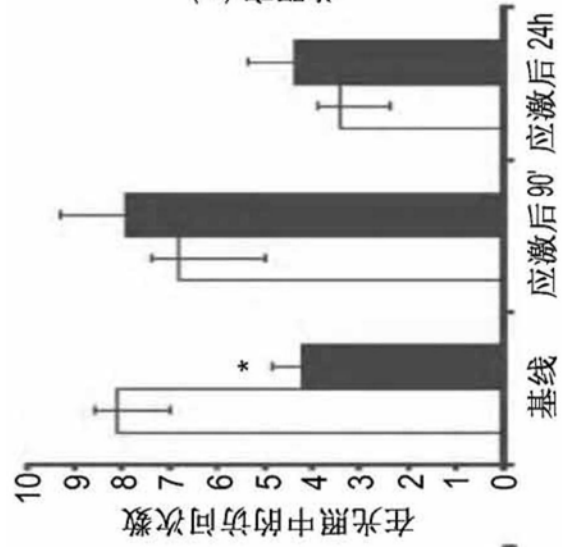


图31D

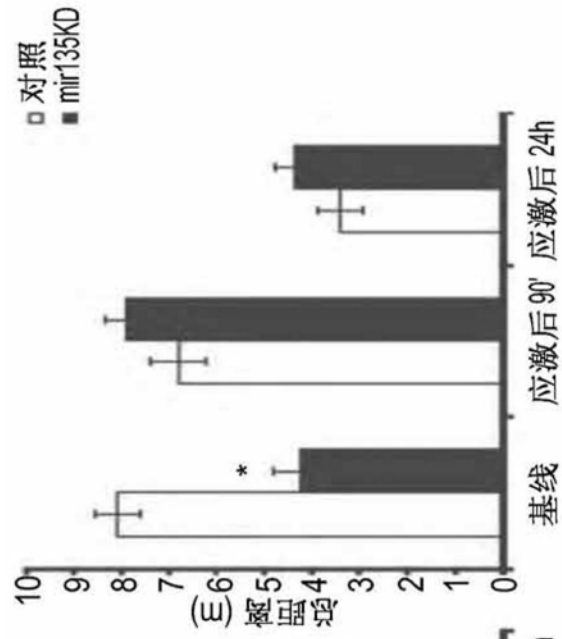


图31E

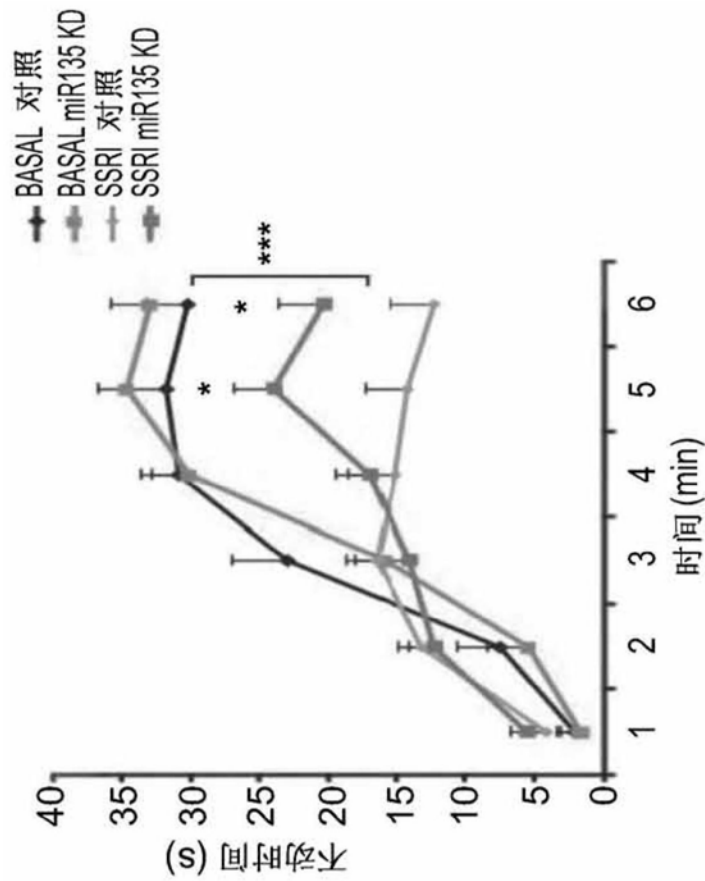


图31G

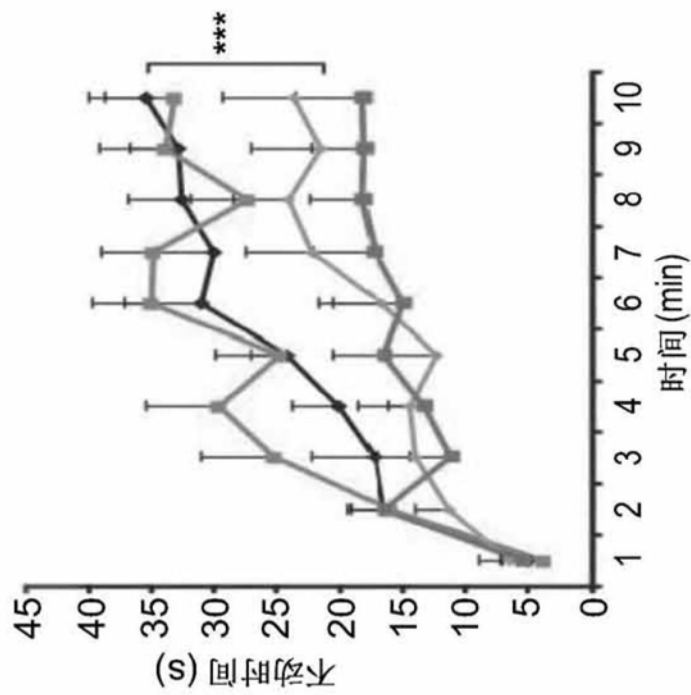


图31F

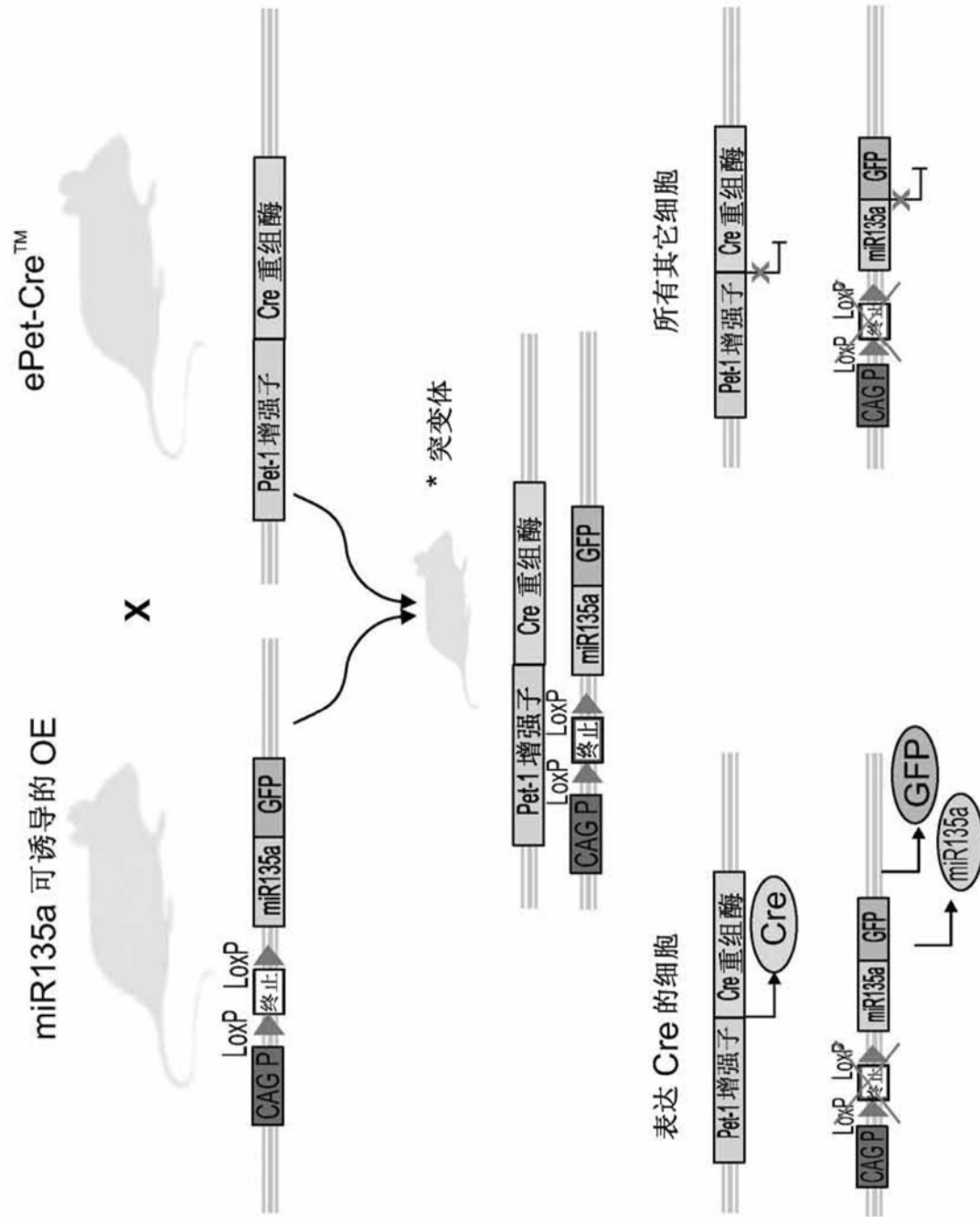


图32

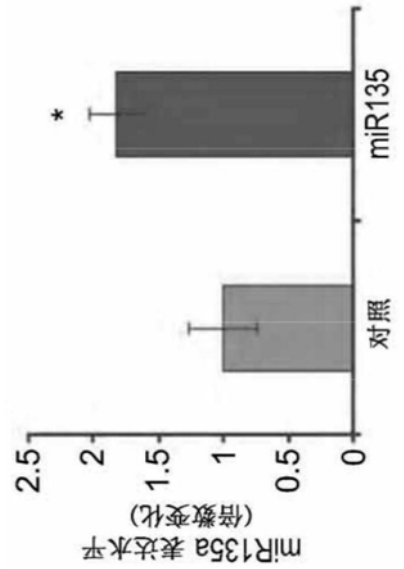


图33A

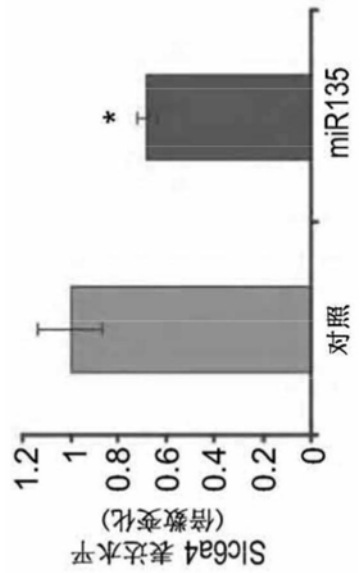


图33B

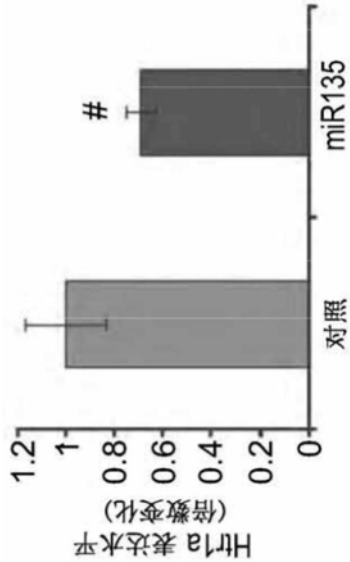


图33C

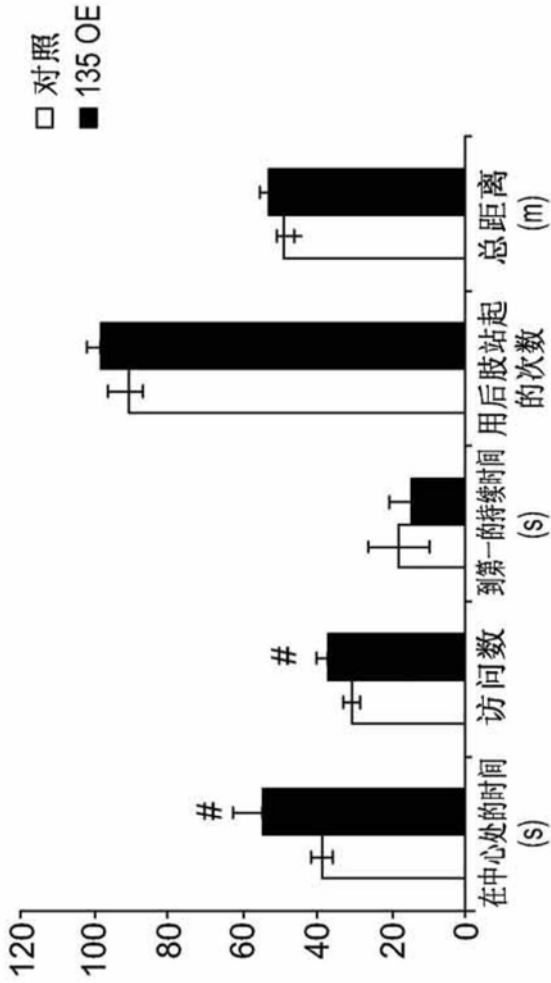


图34A

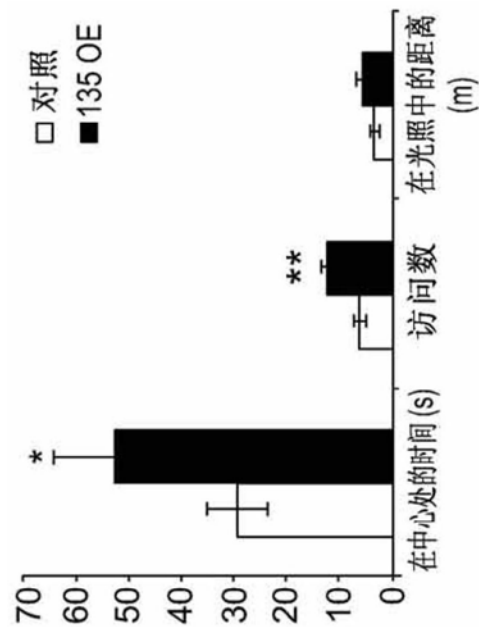


图34B

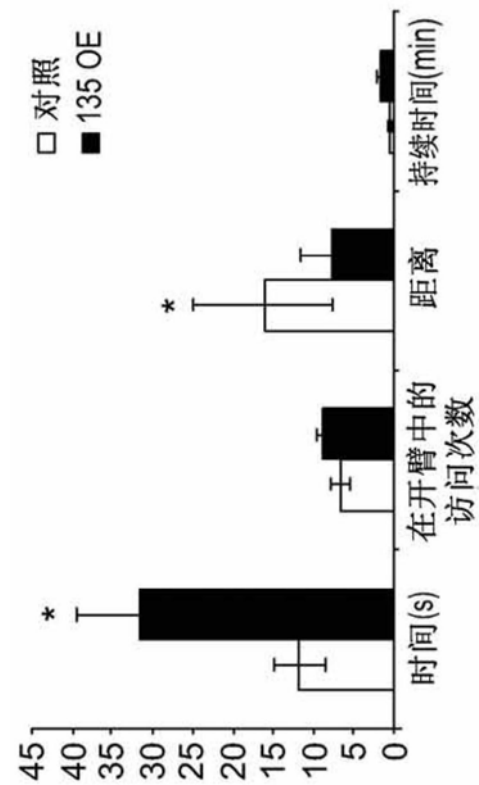


图34C



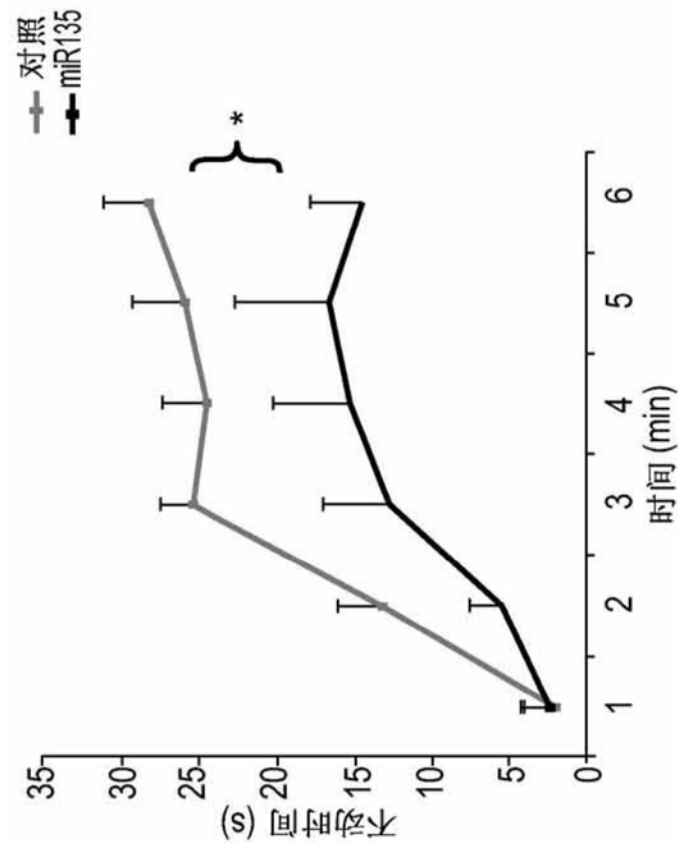


图34E

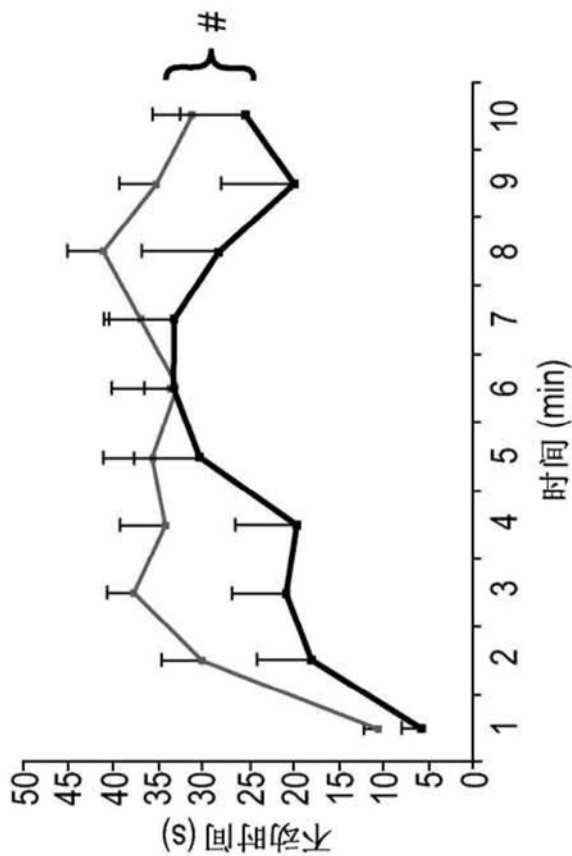


图34D