

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480044652.X

[43] 公开日 2007 年 12 月 5 日

[11] 公开号 CN 101084309A

[22] 申请日 2004.10.22

[21] 申请号 200480044652.X

[86] 国际申请 PCT/GB2004/004504 2004.10.22

[87] 国际公布 WO2006/043014 英 2006.4.27

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.19

[71] 申请人 诺伊热尼有限公司

地址 英国伯明翰

[72] 发明人 祖贝尔·艾哈迈德 马丁·贝里
安·洛根

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

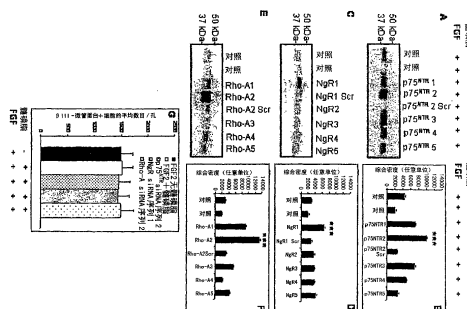
权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 6 页

[54] 发明名称

神经元再生

[57] 摘要

本发明提供一种基因沉默分子，其适于下调编码参与 Rho - A 抑制途径的肽的基因的表达。所述基因沉默分子用于促进中枢神经系统 (CNS) 中神经元存活和轴突再生。本发明还提供组合物以及应用所述组合物提高神经存活和促进轴突生长的方法。



1. 一种基因沉默分子, 其适于下调编码参与 Rho-A 抑制途径的肽的基因的表达。

2. 按照权利要求 1 的基因沉默分子, 其中所述基因沉默分子是反义分子、核酶分子或短干扰核酸(siNA)。

3. 按照权利要求 2 的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括 siRNA 分子。

4. 按照权利要求 2 或权利要求 3 的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括大约 5bp-50bp。

5. 按照权利要求 2-4 中任一项的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括小于 50% 的 GC 含量。

6. 按照权利要求 2-5 中任一项的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括适于下调编码 p75^{NTR} 受体的基因的表达的序列。

7. 按照权利要求 6 的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括: -

5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3' (SEQ ID No.1);

5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3' (SEQ ID No.2);

5'-AAGAGACCAGGAGCATTGTAC-3' (SEQ ID No.3);

5'-AAGAACCAGAGCCATGCACTC-3' (SEQ ID No.4); 或

5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3 (SEQ ID No.5)。

8. 按照权利要求 2-5 中任一项的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括适于下调编码 NgR 的基因的表达的序列。

9. 按照权利要求 8 的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括: -

5'-AATCTCACCATCCTGTGGCTG-3' (SEQ ID No.6);

5'-AACCTCACGCATCTCTTTCTG-3' (SEQ ID No.7);

5'-AATCAGCTCACTGATGAGGAG-3' (SEQ ID No.8);

5'-AAATGCACTCAAGGGACGTGT-3' (SEQ ID No.9); 或

5'-AATGACTCTCCATTTGGGACT-3' (SEQ ID No.10)。

10. 按照权利要求 2-5 中任一项的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子

包括适于下调编码 Rho-A 分子的基因的表达的序列。

11. 按照权利要求 10 的基因沉默分子, 其中所述 siNA 分子包括: -

5'-AAGATTATGACCGTCTGAGGC-3' (SEQ ID No.11);

5'-AAGGATCTTCGGAATGATGAG-3' (SEQ ID No.12);

5'-AAGGCGGGAGTTAGCCAAAAT-3' (SEQ ID No.13);

5'-AATGAAGCAGGAGCCGGTAAA-3' (SEQ ID No.14); 或

5'-AAAGACCAAAGACGGAGTGAG-3' (SEQ ID No.15).

12. 按照任一前述权利要求的基因沉默分子, 其中所述基因沉默分子包括 SEQ ID No.2, SEQ ID No.6 或 SEQ ID No.12 确定的序列。

13. 按照任一前述权利要求的基因沉默分子, 其中所述基因沉默分子与刺激神经突生长的分子组合应用。

14. 按照权利要求 13 的基因沉默分子, 其中所述刺激神经突生长的分子包括神经营养因子(NTF)。

15. 按照权利要求 14 的基因沉默分子, 其中所述 NTF 独立地选自由下列各项组成的组: CNTF, FGF2, NGF, NT-3, NT-4, BDNF, GDNF, FGF-1, FGF-5, CT-1, CDF, 胰岛素, IGF-1, IGF-2, IL-6, LIF, NPF, PDGF, PN-1, S-100, TGF- β , 以及 VIP 等。

16. 按照权利要求 15 的基因沉默分子, 其中所述 NTF 是睫状神经营养因子(CNTF)或成纤维生长因子 2 (FGF2)。

17. 按照权利要求 1-16 中任一项的基因沉默分子, 其用作药物。

18. 按照权利要求 1-16 中任一项的基因沉默分子用于制备促进神经元存活和轴突生长的药物中的应用。

19. 按照权利要求 1-16 中任一项的基因沉默分子用于制备抑制细胞程序性细胞死亡的药物中的应用。

20. 按照权利要求 1-16 中任一项的基因沉默分子, 其特征在于所述分子适于在存在神经突生长抑制剂分子时比不存在所述抑制剂分子时诱导更多的神经元存活和轴突生长。

21. 一种组合物, 其包括治疗有效量的按照权利要求 1-16 中任一项的基因沉默分子, 和药用赋形剂。

22. 用于促进神经元存活和轴突生长的组合物, 所述组合物包括按照

权利要求 1-16 中任一项的基因沉默分子，和神经营养生长因子。

23. 按照权利要求 22 的组合物，其中所述 NTF 独立地选自由下列各项组成的组：CNTF，FGF2，NGF，NT-3，NT-4，BDNF，GDNF，FGF-1，FGF-5，CT-1，CDF，胰岛素，IGF-1，IGF-2，IL-6，LIF，NPF，PDGF，PN-1，S-100，TGF- β ，和 VIP 等。

24. 促进受试者中神经元存活和轴突生长的方法，所述方法包括给需要这样的治疗的受试者施用按照权利要求 21-23 中任一项的组合物。

神经元再生

本发明涉及神经元存活和轴突再生，并且具体地涉及中枢神经系统（CNS）中神经生长的调控。本发明还提供组合物和使用所述组合物来提高神经存活和促进轴突生长的方法。

在所有动物物种的 CNS 和外周神经系统（PNS）的发育过程中，轴突和树突充分地延长。然而，在成年人中，CNS 中轴突和树突再生随着进化发展而日益丧失。在 PNS 中，在施加损伤后，所有脊椎动物物种的轴突都能够再生，至少在某种程度上再生。然而，在哺乳动物的 CNS 中，损伤后的轴突再生限于轴突萌发。然而，神经过程的再生在更低等脊椎动物物种中是可能的。

神经胶质是控制轴突再生的决定性决定因素。在发育过程的 CNS 中和在成人 PNS 中，哺乳动物的神经胶质允许轴突生长。因此，当施加损伤时，成年哺乳动物 PNS 的神经胶质可以重新表达它们的早期轴突生长-促进潜力，并且促进再生。某些低等脊椎动物的 CNS 神经胶质在成年时期保持允许轴突的再生。相反，成年哺乳动物的 CNS 神经胶质在损伤后不重新表达它们的发育生长特性。

神经营养因子（NTF）存在于神经系统的正常发育过程中。在这样的发育中，神经靶点结构产生有限量的特异性 NTFs，NTFs 是投射到靶点结构中的神经元存活、分化和生长所必需的。NTFs 促进成熟神经元的存活和/或维持，并且是 CNS 损伤后神经再生的主要决定因素。此外，外周神经胶质（神经膜细胞）产生神经营养因子（NTF），推测所述神经营养因子负责成人 PNS 损伤后的轴突再生。然而，长期的实验证明移植到 CNS 中的外周神经移植物在超过损伤后 30 天（dpl）不再维持 CNS 轴突再生，并且到 100 dpl，大部分轴突降解了，大概是由于外周神经移植物中的神经膜细胞在移植后大约 20 天停止产生 NTFs，这可能是由于缺少轴突接触。

CNS 髓磷脂是轴突生长抑制剂的丰富来源, 包括髓磷脂相关的糖蛋白 (MAG)、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白 (OMgp)、Nogo 和硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPG), 其通过结合 Nogo 受体(NgR)而阻滞轴突生长。Nogo 受体与 LINGO-1 (含有 LRR 和 Ig 结构域的 Nogo 受体相互作用蛋白)和 p75 神经营养蛋白受体 (p75^{NTR}) 相关, 其中 p75 神经营养蛋白受体 (p75^{NTR}) 是肿瘤坏死因子受体家族的一员。后者通过激活下游 Rho-A 而传导抑制信号, 这导致顺序的 ROCK/LIM 激酶/肌动蛋白丝切蛋白肌动蛋白丝解聚以及生长锥瓦解。因此, NgR、p75^{NTR} 和 RhoA 抑制分子一起形成轴突生长抑制途径的主要因素。应该理解, 许多其它分子, 诸如 ROCK/LIM、肌动蛋白丝切蛋白和 LINGO-1 也参与所述途径。

尽管许多年来进行了无数的尝试, 但是, 从来没有实现治疗性的 CNS 中的神经再生。例如, Logan 等 (Eur. J. Neurosci. 1994 16(3) 355-63)研究了损伤 CNS 中转化生长因子 β_1 (TGF β_1) 调控水平的作用, 以观察是否可以诱导神经元再生。在一些环境中, TGF β_1 是一种神经营养因子, 并且还是有用的纤维发生因子, 刺激包括 CSPG (一种轴突生长抑制性配体)的基质分子的产生, 由此潜在地调控所述轴突生长抑制途径。他们证明 TGF β_1 参与瘢痕形成, 其又限制瘢痕区域周围损伤的 CNS 中轴突投射的生长, 这可能是通过如本文所含的 CSPG 的抑制性配体对活性轴突生长的抑制。他们表明, 阻滞 TGF β_1 活性不抑制瘢痕, 但是存在很少或没有相关的轴突生长, 这表明阻滞瘢痕形成和某些种类抑制分子的产生没有引起增强的轴突再生。

因此, 对于提供可以在 CNS 中促进神经生长的再生性治疗存在显而易见的需求。这样的治疗可以用来使得损伤或患病的神经能够在损伤之后存活、再生并且重新起作用。因此, 本发明人决定将他们的研究集中在神经元抑制途径上, 以观察这一途径的调控是否能够增强-NTF 刺激的神经元存活和轴突生长。

按照本发明的第一方面, 提供一种适合下调编码参与 Rho-A 抑制途径的肽的基因的表达的基因沉默分子。

按照本发明的第二方面, 提供一种用作药物的适合下调编码参与 Rho-A 抑制途径的肽的基因的表达的基因沉默分子。

按照本发明的第三方面，提供适合下调编码参与 Rho-A 抑制途径的蛋白的基因的表达的基因沉默分子用于制备促进神经元存活和轴突生长的药物中的应用。

本发明人研究了许多生物化学途径，以评估它们是否可以被调控以影响神经元生长。他们的研究确定 Rho-A 抑制途径是一个令人惊讶的良好的调控靶点。通过表达“Rho-A 抑制途径”，我们意指轴突生长抑制途径，其中其包括 NgR、p75^{NTR} 和 RhoA 抑制分子。

他们开始检测 Rho-A 途径的各种调控子，以观察是否可以促进轴突生长，尽管没有成功（例如，参见上文）。然而，令人惊讶地，按照本发明第一方面的基因沉默分子（例如 siNA）的应用证明是有效的，并且的确刺激神经生长。此外，令人惊讶地，本发明人已经确定，按照本发明的基因沉默分子还有用于促进神经元存活（即，它们减少程序性细胞死亡对神经元的清除）。因此，第一方面的分子具有按照第二方面的医学应用，并且更具体地，已经表现出刺激按照第三方面的神经元存活和轴突生长。

优选地，所述药物用于促进 CNS 中神经元存活和轴突再生。CNS 损伤可以由手术、外伤、加压、挫伤、横切、神经毒性或其它物理损伤引起，由脉管系统药理性或其它损伤包括出血或局部缺血损伤引起，或者由神经退化或其它神经疾病引起。特征在于消弱的或失败的轴突生长的疾病，其可以用所述药物进行治疗，优选地特征在于神经损伤的疾病。例如，所述疾病可以是慢性的或急性的脑外伤、脊髓损伤、神经毒性、中风、青光眼、视神经损伤、CNS 出血、面神经损伤，其由非急需施行的手术(elective surgery)、神经加压、震荡、局部缺血 (ischaemia)、烧伤等引起。

本发明人更吃惊的是确定按照本发明的分子可以用于治疗特征在于增加的细胞死亡的病症。因此，他们已经确定所述药物还可以用来治疗神经元存活是显著问题的病况。例如，所述药物可以用于治疗神经退化疾病，诸如痴呆、帕金森病、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默病、运动神经元疾病、CJD 等。

按照本发明的第四方面，提供适合下调编码参与 Rho-A 抑制途径的蛋白的基因的表达的基因沉默分子用于制备抑制细胞程序性细胞死亡的药物中的应用。

术语“基因沉默分子”，我们意指干扰讨论基因表达的任何分子。这样的分子可以是反义分子（反义 DNA 或反义 RNA）或核酶分子。核酶和反义分子可以用于抑制编码参与 Rho-A 抑制途径的肽的基因的转录，或者抑制所述基因的 mRNA 的翻译。反义分子是以序列特异性方式与核酸如 DNA 或 RNA 结合的寡核苷酸。当与具有互补序列的 mRNA 结合时，反义 RNA 防止所述 mRNA 的翻译。三联体分子是指结合双联体 DNA 的单反义 DNA 链形成线性对应的三联体分子，因而防止转录。特别有用的反义核苷酸和三联体分子是与编码参与 Rho-A 抑制途径的肽的 DNA 有义链（或 mRNA）互补或结合的那些分子。

能够催化 RNA 底物的特异性裂解的酶促 RNA 分子的核酶的表达，还可以用于阻滞蛋白翻译。核酶作用机制包括核酶分子与互补的靶点 RNA 的序列特异性杂交，然后是核酸内切性裂解，例如锤头状基序核酶。

优选地，所述基因沉默分子是短干扰核酸（siNA）。

优选地，按照本发明的分子沉默 NgR、p75^{NTR} 和/或 RhoA 抑制性分子的基因。

当所述分子是 siNA 分子时，它可以是双链的，并且因此包括有义和反义链。siNA 分子可以包括 siDNA 分子或 siRNA 分子。然而，优选所述 siNA 分子包括 siRNA 分子。因此，按照本发明的 siNA 分子优选地通过 RNA 干扰(RNAi)而下调基因表达。

RNAi 是动物和植物中序列特异性的转录后基因沉默作用。它使用小干扰 RNA 分子(siRNA)，所述 siRNA 是双链的，并且在序列上与沉默的（靶点）基因同源。因此，siRNA 分子与由靶点基因转录产生的 mRNAs 的序列特异性结合允许非常特异性的基因表达的靶点‘击倒’。

作为一种实验方法，本发明人设计并且生产了许多 siRNA 分子，目的是检测它们在调控 Rho-A 抑制途径中的效果。令人惊讶地，本发明人发现，使用许多表现出针对参与 Rho-A 抑制途径的各种蛋白的序列特异性的 siRNA 分子的确导致对所述途径的抑制解除，并且导致提高的轴突生长以及提高的神经元存活。这使得他们相信按照本发明的分子的应用可能是一种用于增强轴突长出（outgrowth）的抑制解除的内源机制以及提高的神经元存活的有用技术。

编码参与 Rho-A 抑制途径的肽的基因可以被视作靶点基因。优选地, siNA 分子基本上与靶点基因的编码序列的至少一个区域相同, 以能够下调所述靶点基因。优选地, siNA 分子序列和靶点基因区域之间的同一性程度是至少 60% 的序列同一性, 优选地, 至少 75% 的序列同一性, 优选地至少 85% 的同一性; 至少 90% 的同一性; 至少 95% 的同一性; 至少 97% 的同一性; 和最优选地, 至少 99% 的同一性。

不同氨基酸/多肽/核酸序列之间相似性百分数的计算可以进行如下。首先通过 ClustalX 程序(成对参数: 缺口开口 10.0, 缺口延伸 0.1, 蛋白基质 Gonnet 250, DNA 基质 TUB; 多重参数: 缺口开口 10.0, 缺口延伸 0.2, 延迟分歧序列 30%, DNA 转变重量 0.5, 阴性基质 off, 蛋白基质 gonnet 系列, DNA 重量 TUB; 蛋白缺口参数, 残基特异性罚分 on, 亲水性罚分 on. 亲水残基 OPSNDQERR, 缺口分离距离 4, 末端缺口分离 off)产生多重比对。然后从所述多重比对计算同一性百分数为 $(N/T) \times 100$, 其中 N 是两种序列分享相同残基的位置的数目, 和 T 是进行比较的位置总数。备选地, 同一性百分数可以作为 $(N/S) \times 100$ 计算, 其中 S 是进行比较的较短的序列的长度。氨基酸/多肽/核酸序列可以从头合成, 或者可以是天然氨基酸/多肽/核酸序列, 或其衍生物。

一种基本上相似的核苷酸序列应该由在严紧条件下与本文提及的任何核酸序列或它们的补体杂交的序列所编码。对于严紧条件, 我们意指核苷酸在 45°C 左右在 $6 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与过滤结合的 DNA 或 RNA 杂交, 然后在 5-65°C 左右在 $0.2 \times$ SSC/0.1% SDS 中洗涤至少 1 次。备选地, 基本上相似的多肽可以在至少 1 个, 但是少于 5, 10, 20, 50 或 100 个氨基酸不同于按照本发明的肽序列。

由于遗传密码的简并性, 清楚地, 任何核酸序列可以是不同的或改变的, 而基本上不影响其所编码的蛋白序列, 以提供其功能变体。适宜的核苷酸变体是具有通过在所述序列内编码相同氨基酸的不同密码子的取代(因此产生沉默改变)而改变的序列的那些核苷酸。其它适宜的变体是那些具有同源核苷酸序列但是包括通过取代编码具有同它所取代的氨基酸相似的生物物理特性的侧链的氨基酸(以产生保守改变)而改变的序列的全部或部分的核苷酸。例如, 小的非极性、疏水氨基酸包括甘氨酸、丙氨

酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸；大的非极性、疏水氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸；中性极性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺；正电荷（碱性）氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸；以及负电荷（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

精确的蛋白或 DNA 序列比对是一种复杂的过程，其已经由许多研究者详细地研究过。特别重要的是序列的最佳匹配和为得到这样的匹配引入缺口之间的平衡（trade-off）。在蛋白的情形中，匹配计分的方法也是重要的。尽管其它同等实用的矩阵是本领域的技术人员已知的，但是 PAM 矩阵（例如，Dayhoff, M.等, 1978, Atlas of protein sequence and structure, Natl. Biomed. Res. Found.）和 BLOSUM 矩阵家族量化保守取代的性质和可能性，并且用于多重比对运算法则中。常用的多重比对程序 ClustalW，以及其 windows 版本 ClustalX (Thompson 等., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson 等, 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) 是产生蛋白和 DNA 多重比对的有效方法。

通常，自动产生的比对需要人工比对，应用专门训练的使用者关于要研究的蛋白家族的知识，例如，主要保守位点的生物知识。尽管其它的程序，诸如 JalView 或 Cinema 也是适用的，但是，一种这样的比对编辑程序是 Align (<http://www.gwdg.de/~dhepper/download/>; Hepperle, D., 2001: Multicolor Sequence Alignment Editor. Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 16775 Steehlm, Germany)。

蛋白之间同一性百分数的计算发生在通过 Clustal 产生多重比对的过程中。然而，如果所述比对是人工改良的，或者为了两种序列的谨慎比较，这些值需要重新计算。在比对中计算关于成对蛋白序列的这一值的程序包括 PHYLIP 系统发展包装中的 PROTDIST (Felsenstein; <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>)，其使用“相似性表格”选项作为氨基酸取代(P)的模型。对于 DNA/RNA，在 PHYLIP 的 DNADIST 程序内存在相同的选项。

在一个优选的实施方案中，所述分子是 siNA 分子，并且包括大约 5bp-50bp，更优选地 10bp-35bp，甚至更优选地，15bp-30bp，并且还更优选，18bp-25bp。优选地，所述 siNA 分子为 20bp-23bp，并且更优选地，

所述 siNA 分子包括 21bp 或 22bp。最优选地，所述 siNA 分子包括少于 22bp。

适宜的 siNA 分子的设计是一种复杂的过程，并且包括非常认真地分析靶点 mRNA 分子的序列。然后，使用相当多的创造性努力，本发明人必须选择具有确定的核苷酸碱基组成的确定的 siNA 序列，其将具有引起 RNA 干扰所需要的亲和性以及稳定性。

因此，为了可以确定适宜的 siNA 序列，靶点基因的编码序列首先由本发明人仔细审阅，以定位其靶点区域，所述靶点区域编码靶点 mRNA。优选地，所述靶点序列的靶点区域包括二腺嘌呤起始序列，和最大 60% 的 GC 含量。优选地，所述分子包括低于 50% 的 GC 含量。使用在 5' 末端选择的靶点基因的 mRNA 序列的 DNA 副本，设计 siNA 分子的反义链。

siNA 分子可以从头合成，或者通过微生物产生。例如，siNA 分子可以由细菌如大肠杆菌 (*E.coli*) 产生，在这种情形中，优选所述 siNA 分子的有义和反义链的 3' 末端可以包括一种 8 核苷酸序列 5'-CCTGTCTC-3'。这与 siNA 分子有效转录所需要的 T7 启动子引物的互补序列相对应。优选地，这一 8 核苷酸序列在使用 siNA 分子之前被去除，以下调靶点基因。

适于下调编码 p75^{NTR} 受体的基因表达的特别优选的 siNA 分子序列包括下列序列：

p75^{NTR} 序列：

序列 1, 5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3' (SEQ ID No.1);

序列2, 5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3' (SEQ ID No.2);

序列3, 5'-AAGAGACCAGGAGCATTGTAC-3' (SEQ ID No.3);

序列4, 5'-AAGAACCAGAGCCATGCACTC-3' (SEQ ID No.4); 和

序列5, 5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3' (SEQ ID No.5)。

应该理解，这样的 siNAs 可以包括尿嘧啶 (siRNA) 或胸腺嘧啶 (siDNA)。

本发明人通过在实施例 1 和实施例 2 中所述的方法检测这 5 种 siNA 分子的每一种。

本发明的一个重要特征是按照本发明的基因沉默分子可以与刺激神经突生长的分子组合应用，以对轴突生长和神经元存活具有令人惊讶的协同作用。单独使用，这些试剂具有中等或最小的作用，而组合应用，这些

试剂可以显著地提高神经再生。适当的生长刺激剂的实例可以包括任何NTF (TRK依赖型或TRK不依赖型), 例如, 睫状神经营养因子(CNTF)或成纤维生长因子2 (FGF2)。应该理解, CNTF是视网膜神经节细胞(RGC)中神经突的有效生长刺激剂, 和FGF2是背根神经节神经突(DRGN)中神经突的有效生长刺激剂。可以与所述分子组合应用的其它NTFs包括NGF, NT-3, NT-4, BDNF, GDNF, FGF-1, FGF-5, CT-1, CDF, 胰岛素, IGF-1, IGF-2, IL-6, LIF, NPF, PDGF, PN-1, S-100, TGF- β , 和VIP (Oppenheim. 1996, Neuron 17:195-197)。

实施例1描述将针对p75^{NTR} mRNA的siNA分子递送到在抑制性CNS髓磷脂的存在下用CNTF处理的培养的视网膜神经节细胞(RGC)中的检测范例。如在图1中所示, 本发明人惊讶地发现, 在抑制性CNS髓磷脂的存在下, SEQ ID No.1-5确定的上述siNA分子中的每一种与CNTF组合, 在RGCs中诱导神经元存活和神经突发生。由5种siNA分子中的4种(除SEQ ID No.2外的全部)引起的神经突发生程度与在不存在髓磷脂和存在CNTF时诱导的程度相当。每种序列表现出神经长出途径的抑制解除作用(即, 抵消抑制性髓磷脂的作用), 通过下调编码p75^{NTR}的基因的表达并且因而下调其下游信号成分而进行。

甚至更令人惊讶的是下调p75^{NTR}的具有SEQ ID No.2的siNA分子在下列各项中引起显著的增加: (a) 具有神经突的RGCs的数目, 和(b) 平均神经突长度, 并且显著地促进(c) RGC存活。因此, 不但SEQ ID No.2如同其它4种siNA's一样引起该途径的抑制解除作用, 它还能够诱导比不存在髓磷脂时刺激的更多的神经生长。这是特别令人惊讶地, 由于某种未知的机制, SEQ ID No.2能够刺激超过在不存在髓磷脂时观察到的生长的生长。这可能是由于所述分子是不同于髓磷脂的解除抑制的抑制剂。

因此, 特别优选siNA分子包括SEQ ID No.2, 并且特别优选这一分子与NTF组合用于临床应用。

应该理解, SEQ ID No.2包括4个连续的胸腺嘧啶碱基。本发明人最初认为这在RNAi方案中可能是有问题的。这是由于他们认为siNA分子中4个连续的胸腺嘧啶碱基可能模拟转录终止序列, 因而引起RNA聚合酶从所述siNA模板上解离, 而终止siNA的转录。幸运地, 这不是这种情形, 并

且优选的siNA不但可以有效地在细菌中合成，而且十分有效地下调p75^{NTR}。

因此，本发明人表明，siRNA-介导的p75^{NTR}的击倒在RGCs中导致CNTF-刺激的神经突长出的抑制解除作用。

本发明人对同样的5种siNA分子进行进一步的检测。实施例2描述将同样的5种针对p75^{NTR} mRNA的siNA分子递送到在抑制性CNS髓磷脂的存在下用FGF2处理的培养的背根神经节神经元(DRGN)中。应该理解，FGF2促进DRGNs中的神经突发生，并且因此在DRGNs中作用为神经突的阳性生长刺激剂。如上所述，CNS髓磷脂作用抑制神经突发生。本发明人吃惊地发现，每种siNA分子还在DRGNs中增加细胞的存活和促进轴突生长，最有效的是具有SEQ ID No.2的siNA分子。然而，SEQ ID No.2不但如其它4种siNAs一样引起所述途径的抑制解除作用，它还能够诱导比在不存在髓磷脂时刺激的更多的神经生长。这是特别令人惊讶的，由于某种未知的机制，SEQ ID No.2能够刺激超过在不存在髓磷脂时观察到的生长的生长。这可能是由于所述分子是不同于髓磷脂-相关分子的解除抑制的抑制剂。

因此，本发明人还证明siRNA-介导的p75^{NTR}的击倒在DRGN中导致FGF2-刺激的神经突长出的解除抑制作用。

适于下调编码NgR的基因的表达的特别优选的siNA分子序列包括下列序列：-

NgR序列：-

序列1, 5'-AATCTCACCATCCTGTGGCTG-3' (SEQ ID No.6);

序列2, 5'-AACCTCACGCATCTCTTTCTG-3' (SEQ ID No.7);

序列3, 5'-AATCAGCTCACTGATGAGGAG-3' (SEQ ID No.8);

序列4, 5'-AAATGCACTCAAGGGACGTGT-3' (SEQ ID No.9); 和

序列5, 5'-AATGACTCTCCATTTGGGACT-3' (SEQ ID No.10)。

本发明人通过实施例2中所述的方法检测了上述siNA分子的每一种。实施例2描述将上述5种针对NgR mRNA的siNA分子递送到在抑制性CNS髓磷脂（生长抑制剂）的存在下用叫作成纤维生长因子2（FGF2）的NGF处理的培养的DRGNs中。本发明人发现，每种siNA分子在DRGNs中增加神经突发生，最有效的是具有SEQ ID No.6的siNA分子。令人惊讶地，SEQ

ID No.6在存在抑制性髓磷脂时比在不存在髓磷脂刺激更多的轴突生长。

因此，特别优选siNA分子包括SEQ ID No.6。

因此，本发明人还证明siRNA-介导的NgR击倒在DRGN中导致FGF2-刺激的神经突长出的抑制解除作用。

适于下调编码Rho-A分子的基因的表达的特别优选的siNA分子序列包括下列序列： -

Rho-A序列： -

序列1, 5'-AAGATTATGACCGTCTGAGGC-3' (SEQ ID No.11);

序列2, 5'-AAGGATCTTCGGAATGATGAG-3' (SEQ ID No.12);

序列3, 5'-AAGGCGGGAGTTAGCCAAAAT-3' (SEQ ID No.13);

序列4, 5'-AATGAAGCAGGAGCCGGTAAA-3' (SEQ ID No.14); 和

序列5, 5'-AAAGACCAAAGACGGAGTGAG-S' (SEQ ID No.15)。

本发明人通过实施例2所述的方法检测了上述siNA分子的每一种。如上文，本发明人发现，每种siNA分子在DRGNs增加神经突发生，最有效的是具有SEQ ID No.12的siNA分子。本发明人吃惊地发现，每种siNA分子在DRGNs中增加细胞的存活和促进轴突生长，最有效的是具有SEQ ID No.2的siNA分子。然而，SEQ ID No.12不但引起所述途径的抑制解除作用（如其它siNAs一样），它还能够诱导比在不存在髓磷脂时刺激的更多的神经生长。这是特别令人惊讶的，由于某种未知的机制，SEQ ID No.12还似乎能够刺激超过在不存在髓磷脂时观察到的生长的生长。这可能是由于所述分子是不同于髓磷脂-相关分子的解除抑制的抑制剂。

因此，特别优选所述siNA分子包括SEQ ID No.12。

因此，本发明人表明，使用按照本发明的分子的基因沉默可以用来提高神经元存活和轴突生长。优选地，所述分子是调控NgR、p75^{NTR}和/或Rho-A的击倒的siRNA分子。最优选地，按照本发明的分子与NTF（例如，FGF2）联合应用。当是这种情形时，按照本发明的分子对于解除抑制NTF刺激的轴突生长，以及令人惊讶的神经元存活非常有效。本发明人发现，在CNS髓磷脂的存在下，FGF2-刺激的DRGN中p75^{NTR}、NgR和Rho-A的击倒分别促进5倍、3.5倍和6.5倍增加的神经突长出。在siNA-介导的Rho-A击倒后，神经突比p75^{NTR}和NgR击倒后长得更长。这表明Rho-A沉默可能

是在体内促进CNS轴突再生的特别有效的解除抑制的策略。因此，特别优选按照本发明的siNA分子是SEQ ID No.12。不被任何假说束缚，本发明人相信RhoA沉默导致信号传导途径上游成分的令人吃惊的沉默——可能通过目前定义为反馈环的作用。

按照本发明的第五方面，提供适于下调编码参与RhoA抑制途径的肽的基因表达的基因沉默分子，其特征在于所述分子在存在神经突生长抑制剂分子时比在不存在所述抑制剂分子时适于诱导更多的神经元存活和轴突生长。

表达“更多的神经元存活和轴突生长”，我们意指，与不存在相同的神经突抑制剂分子相比，当存在神经突生长抑制剂分子时，获得更高的诱导水平。

优选地，按照本发明第五方面的分子可以与NTF（例如FGF2或CNTF）组合应用，在神经突生长抑制剂分子诸如先前命名为髓磷脂-相关的分子的存在下，所述NTF的活性受到抑制。按照本发明第五方面的分子，不但颠倒由神经突生长抑制剂分子诸如指出的髓磷脂-相关分子所引起的NTF-刺激的轴突生长的抑制，而且还令人吃惊地，刺激比在不存在抑制剂分子时观察到的更大程度的神经元存活和轴突生长。例如，所述作用大于在对照实验中发现的作用，在对照实验中，在不存在神经突生长抑制剂分子（例如，除去髓磷脂的CNS神经元）时用NTF刺激神经突。

优选地，按照第五方面的分子包括siNA分子，并且可以选自具有SEQ ID No. 2，SEQ ID No. 6或SEQ ID No.12确定的序列的siRNA分子的组。

按照本发明任一方面应用的基因沉默分子优选为核酸（例如，siRNA或反义或核酶）。这样的分子可以（但不必要）是这样的，即，其结合在要治疗的受试者的细胞的DNA中。未分化的细胞可以稳定转化所述基因沉默分子，导致产生遗传修饰的子细胞（在这种情形中，在受试者中可能需要表达调控，例如，使用特异的转录因子或基因活化剂）。

基因沉默分子可以是从头合成的，并且以足够的量引入以在靶点细胞中诱导基因沉默（例如，通过RNA干扰）。备选地，所述分子可以通过微生物如大肠杆菌产生，然后以足够的量引入以在靶点细胞中诱导基因沉默。

所述分子可以通过携带编码基因沉默序列的核酸的载体而产生。所述载体可以包括能够控制和/或增强核酸表达的元件。载体可以是重组载体。例如，所述载体可以包括质粒、黏端质粒、噬菌体或病毒DNA。除了使用或代替使用所述载体合成所述基因沉默分子，所述载体可以用作用所述基因沉默序列转化靶点细胞的递送系统。

重组载体还可以包括其它功能元件。例如，重组载体可以设计成所述载体在靶点细胞中自动复制。在这一情形中，在重组载体中可能需要诱导核酸复制的元件。备选地，所述重组载体可以设计成所述载体和重组核酸分子整合到靶点细胞的基因组中。在这一情形中，有利于靶点结合（例如，通过同源重组）的核酸序列是理想的。重组载体还可以具有编码可以在克隆过程中用作选择标记的基因的DNA。

当需要时，所述重组载体还可以包括控制核酸表达的启动子或调控子或增强子。组织特异性启动子/增强子元件可以用来调控核酸在特异的细胞类型如CNS神经元中的表达。启动子可以是组成型的或诱导型的。

备选地，所述基因沉默分子可以以结合在载体中或者不结合在载体中而施用给靶点细胞或受试者。例如，所述分子可以结合在脂质体或病毒颗粒（例如，反转录病毒、疱疹病毒、痘病毒、痘苗病毒、腺病毒、慢病毒（lentovirus）等）内。备选地，可以通过适当的方法例如直接的胞吞吸收而将“裸” siNA或反义分子插入到受试者细胞中。

可以通过转染、感染、显微注射、细胞融合、原生质体融合或弹果轰击(ballistic bombardment)而将所述基因沉默分子转移到要治疗的受试者的细胞中。例如，转移可以通过：使用包被的金颗粒的弹果转染；含有siNA分子的脂质体；包括基因沉默序列的病毒载体（例如，包括SEQ ID No.2, 6或12的腺病毒）；或者通过直接应用所述基因沉默分子而提供直接的核酸吸收（例如，内吞）的方式进行。

在本发明的一个优选实施方案中，siNA分子可以递送到靶点细胞（不管是在载体中还是“裸露的”），并且然后可以依赖于宿主细胞进行复制，并且因此达到治疗有效的水平。当是这种情形时，所述siNA优选地结合在能够使得siNA（例如，SEQ ID No.2, 6或12）在细胞中转录的表达盒中，然后干扰编码参与Rho-A途径的蛋白的内源mRNA的翻译。

应该理解，按照本发明的基因沉默分子可以用于单一治疗（例如，使用按照本发明的siNA's刺激神经元存活和轴突生长）。然而，优选地，按照本发明的分子可以用作添加剂，或者与用于刺激轴突生长的已知治疗组合应用。特别优选地，所述组合治疗包括基因沉默分子和NTF（例如，FGF2或CNGF）。

按照本发明的基因沉默分子可以与具有许多不同形式的组合物组合，特别取决于所述组合物使用的方式。因此，例如，所述组合物可以以胶囊、液体、软膏剂、膏剂、凝胶、水凝胶、气雾剂、喷雾剂、微胶粒、透皮贴片、脂质体的形式，或可以施用给患有以消弱的轴突生长为特征的疾病状态的人或动物的任何其它适当形式。应该理解，本发明的组合物的赋形剂应该是对于它所给予的受试者良好耐受的赋形剂，并且优选地能够使得所述分子递送到需要轴突生长和/或提高神经元存活的靶点位点。

包括按照本发明的siNA's的组合物可以以许多方法应用。例如，可以需要全身使用，在这种情形中，化合物可以包含在例如可以通过注射到血流而施用的组合物中。注射可以是静脉内（大丸剂或灌注）、皮下（大丸剂或灌注）、心室内或蛛网膜下的。

所述化合物可以通过吸入（例如，鼻内地）而施用。

基因沉默分子还可以结合在缓慢的或延缓释放的装置中。例如，这样的装置可以插入到CNS损伤的位点，并且所述分子可以几周或几个月的释放。当需要使用按照本发明的基因沉默分子进行长期治疗时，以及通常需要频繁的施用（例如，至少每日注射）的治疗中，这样的装置可能是特别有利的。

应该理解，需要的基因沉默分子的量由它的生物活性和生物利用度决定，并且其又依赖于施用的模式、应用的分子的物理化学特性、以及它是用作单一治疗还是与NTF组合治疗。施用的频率还将受到上文提及的因素以及特别是在治疗的受试者内分子半衰期的影响。

施用的最佳剂量可以由本领域的技术人员确定，并且将随着下列各项而不同：使用的具体的基因沉默分子、制剂的强度、施用的模式、以及疾病病症的晚期或严重性、和轴突生长需要的紧急性。取决于要治疗的具体受试者的其它因素将导致需要调整的剂量，所述因素包括受试者年龄、体

重、性别、日常饮食和施用时间。

已知的方法，诸如药物工业常规所用的那些方法（例如，体内实验、临床试验等），可以用于建立按照本发明应用的具体的制剂和精确的治疗方案（诸如基因沉默分子的日常剂量和施用频率）。

一般地，取决于所用的具体基因沉默分子，0.01 $\mu\text{g/kg}$ 体重和0.5 g/kg体重之间的按照本发明的基因沉默分子的日常剂量可以用于刺激轴突生长（并且促进神经元存活）。更优选地，日常剂量在0.01 mg/kg体重和200 mg/kg体重之间，并且更优选地，在大约0.1mg/kg和100 mg/kg之间，并且甚至更优选地在大约1 mg/kg和10 mg/kg之间。

当将所述分子（例如，siNA或反义的）递送到细胞（并且在靶点细胞中不需要从头合成）时，日常剂量可以作为单一施用（例如，单一的每日注射）而给出。典型地，治疗有效剂量应该每单一剂量提供约1 ng-100 $\mu\text{g/kg}$ 的基因沉默分子，并且优选地每剂量2 ng-50 ng。

备选地，所述分子可以需要一天内施用两次或更多次。作为实例，按照本发明的siNA's可以作为两剂（或多剂，取决于病症的严重性）0.1 mg/kg和10 mg/kg之间（即，假定体重70 kg）的每日剂量进行施用。接受治疗的患者可以在醒来时服用第一剂，然后在傍晚服用第二剂（如果是两剂方案），或者在其后以3或4小时的时间间隔服用。备选地，可以应用缓慢释放的装置为患者提供最佳剂量，而无需施用重复的剂量。

按照第六方面，提供包括治疗有效量的按照本发明第一方面的基因沉默分子和药用赋形剂的组合物。

在一个实施方案中，按照本发明第六方面的组合物可以包括大约0.01 μg 和0.5 g的基因沉默分子。更优选地，组合物的量是在0.01 mg和200 mg之间，并且更优选地，在大约0.1 mg和100 mg之间，并且甚至更优选地在大约1 mg和10 mg之间的基因沉默分子。最优选地，所述组合物包括大约2 mg和5 mg之间的基因沉默分子。

优选地，所述组合物包括大约0.1% (w/w)-90% (w/w)的基因沉默分子，并且更优选地，1% (w/w)-10% (w/w)的基因沉默分子。其余的组合物可以包括赋形剂。

本发明提供制备药物组合物的方法，所述方法包括将治疗有效量按照

本发明的基因沉默分子与药用赋形剂组合在一起。

“治疗有效量”是当施用给受试者时，促进轴突生长和神经元存活的按照本发明第一或第四方面的分子的任何量。

“受试者”可以是脊椎动物、哺乳动物、家畜或人。

当用于本文时，“药用赋形剂”是本领域普通技术人员已知的用于配制药物组合物的任何生理学赋形剂。

在一个优选的实施方案中，所述药物赋形剂是液体，并且所述药物组合物是溶液的形式。在另一个实施方案中，所述药物赋形剂是凝胶，并且所述组合物是膏剂等的形式。

是无菌溶液或混悬液的液体药物组合物可以通过，例如，肌内、鞘内、硬膜外、腹膜内、静脉内以及特别是皮下、大脑内或大脑室内的注射。SiNA分子可以制备成无菌固体组合物，其可以在施用时使用无菌水、盐水或其它适当的无菌注射介质而溶解或混悬。赋形剂意欲包括必要的和惰性的粘合剂、混悬剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、防腐剂、染料以及包衣材料。

基因沉默分子和NTF的组合代表了本发明的重要特征。因此，本发明人发现，这两种活性成分的组合对于在受伤组织中诱导神经元生长和促进细胞存活特别有利。

因此，按照本发明的第七方面，提供用于促进神经元存活和轴突生长的组合物，所述组合物包括适于下调基因的表达的基因沉默分子，以及神经营养生长因子，所述基因编码参与Rho-A抑制途径的肽。

按照第七方面的组合物可以用来治疗患有CNS损伤的个体。

按照第八方面，提供在受试者中促进神经元存活和轴突生长的方法，所述方法包括给需要这样的治疗的受试者施用一种组合物，所述组合物包括适于下调基因的表达的基因沉默分子，以及NTF，所述基因编码参与Rho-A抑制途径的肽。

适当的神经营养生长因子的实例可以包括CNTF, FGF2, NGF, NT-3, NT-4, BDNF, GDNF, FGF-1, FGF-5, CT-1, CDF, 胰岛素, IGF-1, IGF-2, IL-6, LIF, NPF, PDGF, PN-1, S-100, TGF- β , 以及VIP等(Oppenheim, 1996, Neuron 17:195-197)。

NTF的量可以在大约0.01 $\mu\text{g/kg}$ 体重和0.5 g/kg体重之间，更优选地，

大约0.1 mg/kg和10 mg/kg之间。

所述基因沉默分子可以包括反义分子或短干扰核酸(siNA)。

本文所述的所有特征（包括任何附属的权利要求、摘要和附图），和/或所公开的任何方法或过程的所有步骤可以以除其中至少某些这样的特征和/或步骤是互斥的组合外的任何组合与上述方面组合。

为了更好地理解本发明，并且表现其实施方案可以怎样实施，现在通过实例的方式参考附属的简图，其中：

图1显示siRNA处理后，在解离的视网膜培养物中p75^{NTR}和Rho-A的击倒；

图2显示FGF2在DRGN培养物中促进神经突长出；

图3显示CNS髓磷脂阻滞FGF2-促进的DRGN神经突长出；

图4显示在CNS髓磷脂的存在下，FGF2-刺激的DRGN的siRNA-介导的p75^{NTR}的击倒；

图5显示在髓磷脂的存在下，在FGF2-刺激的DRGN中siRNA-介导的NgR的击倒；

图6显示在髓磷脂的存在下，在FGF2-刺激的DRGN中siRNA-介导的Rho-A的击倒；

图7显示在siRNA-介导的p75^{NTR}、NgR和Rho-A击倒后，在CNS髓磷脂的存在下，在DRG培养物中作为与FGF2-刺激的DRGN神经突生长相关的βIII-微管蛋白的蛋白质印迹和密度定量。

实施例1

材料和方法

成年视网膜培养物

将成年大鼠（6-8周龄）通过断颈法处死，并且通过解剖移出视网膜，并且按照制造者的流程(Worthington Biochem, New Jersey, USA)使用木瓜蛋白酶系统解离。在37 °C在5 %湿润的CO₂氛围下，在补充了Neurobasal-A (Invitrogen)的培养基中，将含有RGC的2×10⁶个解离的视网膜细胞在4孔培养板(Nunc, UK)中用100 μg/ml聚-D-赖氨酸(Sigma, Dorset, UK)和20 μg/ml分区蛋白(Chemicon, Harrow, UK)预先包被的玻璃盖玻片

上培养4 d。

siRNA制备和转染

为了设计靶点-特异的siRNA双联体, 我们应用Elbashir和合作者提出的标准(Nature 411: 494-498)从大鼠p75^{NTR} mRNA的开放阅读框(NCBI登记号NM012610)中选择针对p75^{NTR}的5种siRNA序列。化学合成寡核苷酸模板和控制-合成(control-scrambled)的序列(Alta Biosciences, University of Birmingham, UK), 并且使用Silencer siRNA构建试剂盒(Ambion. Texas, USA)构建siRNA序列。

所用的siRNA序列为: -

p75^{NTR}序列: -

序列1. 5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3';

序列2, 5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3';

序列3, 5'-AAGAGACCAGGAGCATTGTAC-3';

序列4, 5'-AAGAACCAGAGCCATGCACTC-3'; 和

序列5, 5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3'。

合成的序列为: -

反义 5'-AATCGCATGCGTTCCATTTTCGCCTGTCTC-3';

有义 5'-AACGAAATGGAACGCATGCGACCTGTCTC-3'。

按照制造者的指导(Invitrogen), 使用Oligofectamine试剂(Invitrogen), 在4孔培养板(Nunc)中, 用siRNA转染RGC。转染5 h后, 加入补充的Neurobasal-A, 并且在细胞裂解和免疫组化之前, 在存在/不存在CNS髓磷脂(来自N. Gregson的馈赠, Kings College London, UK)下再培养72 h。

抗体

单克隆 β -III微管蛋白(1:100)和多克隆抗-p75^{NTR} (1:500)都来自Sigma, Poole, UK。单克隆192-Ig (1:100用于免疫组化, 和1:500用于蛋白质印迹)购自Oncogene Research Products, San Diego, USA。山羊抗人NgR (1:100用于蛋白质印迹)和单克隆抗人Rho-A (26C4)用于通过免疫组化(1:200)和蛋白质印迹(1:200) (Santa Cruz, C.A., USA)而定位Rho-A。

组织制备和免疫组化

将至少3只大鼠的组通过麻醉过量而处死，并且切离它们的视网膜和视神经(ON)，包埋在OCT (Miles mc, CA, USA)中，并且在液氮中冷冻。在-20℃从ON和视网膜(Bright Instrument Co. Ltd., Cambridgeshire, UK)上切下10 μm厚的纵向低温切片，收集到Vectabond包被的载玻片(Vector Laboratories, Cambridgeshire, UK)上，空气干燥，并且按先前所述(Mol Cell Neurosci 21: 301-311)处理进行免疫组化。将培养的视网膜细胞固定在4%低聚甲醛中，并且也按先前所述(Lorber等., 2002, Mol Cell Neurosci 21:301-311)进行处理。

神经突长出检测

通过使用Axiovision软件(Zeiss, Hertfordshire, UK)追踪每一神经突，从捕获的βIII-微管蛋白免疫染色的RGC图片检测神经突长出，并且在每一盖玻片上检测50 RGC的最长的神经突(n=3, 3次独立实验)。然后计算平均神经突长度。

蛋白提取和蛋白质印迹

在ON粉碎后第0, 6, 8和20d，将在每一处理组中的大鼠杀死，并且提取来自6个汇集的ON的蛋白，按先前所述(J Biol Chem 277: 32820-32829)进行处理用于蛋白质印迹分析。为了通过蛋白质印迹确定siRNA处理的RGC培养物中p75^{NTR}的水平，按先前所述(Winton等, 2002, J Biol Chem. 157:565-570)，将6×10⁶个细胞/siRNA裂解并点样。

统计学分析

计算样品平均数，并且使用GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Version 4.0, San Diego, USA)，通过单向变量分析(ANOVA)，然后用Dunnett's方法进行post-hoc检测，而分析显著性。

结果

在抑制性CNS髓磷脂的存在下， siRNA-介导的p75^{NTR}击倒下调Rho-A，并且增强CNTF-刺激的神经突长出

本发明人使用解离的RGC的原代培养物建立CNS损伤的体外模型，并且发现100 ng/ml的非Trk-依赖型神经营养蛋白CNTF促进最理想的RGC神经突长出，并且这种CNTF-介导的长出受到10 μ g/ml大鼠CNS髓磷脂的抑制（未显示）。在存在髓磷脂而生长的CNTF-刺激的RGC中，使用siRNA p75^{NTR}而获得p75^{NTR}击倒，并且结果在图1中显示，其中： -

(a) 显示使用SEQ ID No. 2确定的p75^{NTR} siRNA的完全击倒，和使用p75^{NTR}的其它siRNA序列的‘部分’击倒，以及当在存在髓磷脂用CNTF刺激RGC时对Rho-A活化的同时抑制。因此，所有的siRNA序列都表现出功效。(b) 来自视网膜细胞培养物的第二蛋白质印迹表明合成的序列对p75^{NTR}和Rho-A没有作用，这证明SEQ ID No. 2作用的特异性。(c) 体外击倒，特别是用SEQ ID No. 2，将神经突长出水平恢复到不存在髓磷脂时观察到的水平，并且SEQ ID No. 2显著地刺激神经突长出，高于不存在髓磷脂时观察到的水平。SEQ ID No. 2还显著地促进RGC存活（*** $P < 0.0001$ ，在存在髓磷脂时，序列2相对于CNTF，ANOVA）。注意SEQ ID No. 1-5都阻滞髓磷脂的抑制作用。(d) 使用双免疫组化，在存在CNTF下生长的 β III-微管蛋白⁺ RGC表现在somata和神经突中的p75^{NTR}免疫染色。然而，在SEQ ID No. 2.-介导的p75^{NTR} siRNA实验中， β III微管蛋白⁺ RGC表现出完全的（somata和神经突）或部分的（只有神经突）p75^{NTR}击倒。刻度条，50 μ m。

在所有的对照培养物（未处理的RGC，用CNTF处理的RGC，以及用CNTF和CNS髓磷脂处理的RGC）中，检测到p75^{NTR}和Rho-A的显著水平（图1a）。在递送5种p75^{NTR} siRNA (SEQ ID Nos 1-5)后，SEQ ID Nos 1和3诱导显著的p75^{NTR}击倒（70-80%，通过蛋白质印迹密度计量学而定量（未显示）），而SEQ ID No. 2引起100%的p75^{NTR}击倒和其处理形式（胞外结构域(ECD): p55和胞内结构域(ICD): p25片段）（图1a）。所有5种检测的p75^{NTR} siRNA序列还显著地抑制Rho-A-GTP的水平，并且使用序列1-3完全阻滞了活化（图1a）。SEQ ID No. 2的对照合成序列没有在p75^{NTR}水平或在Rho-A活化中引起变化，如在单独的蛋白质印迹中所示（图1b）。

与存在髓磷脂时只用CNTF观察到的数目相比,在用SEQ ID No. 2在培养的RGC中击倒p75^{NTR}/p55/p25以及因而抑制Rho-A活化后,在存在髓磷脂时用CNTF刺激生长神经突的RGC的数目发生5倍的增加(图1c),伴随RGC神经突长度的5倍的延长(图1c)。此外,在培养4天后,下调p75^{NTR}/p55/p25和抑制Rho-A活化与显著增加的RGC存活相关(图1c)。有趣地,在抑制性CNS髓磷脂的存在下,所有5种siRNA序列将CNTF-刺激的RGC神经突长出恢复到不存在髓磷脂时用CNTF观察到的水平(图1c)。然而,SEQ ID No. 2令人惊讶地增强RGC神经突的长出,高出当没有CNS髓磷脂用CNTF刺激时观察到的水平。与单独的CNTF对照相比,存在CNTF和合成序列2而生长的RGC在神经突长出中没有表现出差异(图1d)。

尽管本发明人不希望受到任何假说的束缚,但是他们相信这些结果表明,通过siRNA-介导的p75^{NTR} mRNA翻译沉默而击倒p75^{NTR}阻滞Rho-A GDP向Rho-A GTP转化,因而通过保持生长锥完整性在抑制性环境中增强CNTF-诱导的RGC神经突长出,并且可能通过增强的肌动蛋白多聚化作用而提高。

讨论

检测的5种siRNA分子的每一种表现出对RhoA抑制途径的抑制解除作用。特别地,在存在抑制性髓磷脂时,比不存在所述抑制剂时,SEQ ID No. 2令人惊讶地有效地刺激更多的生长。在体外,siRNA-介导的p75^{NTR}的击倒导致完全阻滞下游抑制性信号传导分子Rho-A的活化,并且在CNS髓磷脂存在下,CNTF-刺激RGC存活和神经突长出显著地增强。同时,部分消除p75^{NTR},除了SEQ ID No. 2之外的p75^{NTR} siRNA序列还导致对Rho-A活化的显著抑制,并且在存在CNS髓磷脂时,通过CNTF恢复RGC神经突长出。在存在CNS髓磷脂时,SEQ ID No. 2引起所有p75^{NTR}形式和Rho-A的完全击倒,同时增强比不存在髓磷脂时观察到的生长高2倍的神经突长出。这表明,即使不存在髓磷脂,CNTF的神经营养功效受到抑制性分子的控制。尽管我们不希望受到任何假说的束缚,本发明人相信这些可能包括CSPG、肝配蛋白、脑信号蛋白等。

总之,本发明人结果表明,在NTF-刺激的再生RGC中,存在一种下

调p75^{NTR}介导的生长锥(cone)衰弱(collapse)的内源机制, 包括对下游Rho-A-介导的抑制信号传导的抑制。这种p75^{NTR}的内源下调作用可以通过应用p75^{NTR}-靶向的siRNA而有效地增加。因此, siRNA技术提供一种其它的治疗策略, 以帮助再生的轴突克服CNS的抑制环境。对于成功的CNS修复, 神经元死亡可能是比最初的想法更大的障碍, 并且使用适当的NTFs和按照本发明的分子增强神经元存活以及轴突再生的组合治疗策略, 是在损伤后促进CNS轴突再生、细胞存活和恢复功能的优选的方法。

实施例2

材料和方法

成年DRGN培养物

将L4-L7 DRG对从成年大鼠(6-8周龄)解剖下来, 并且在37°C含有5%CO₂的湿润氛围中, 使用含有0.1% 胶原酶 (Sigma, Poole, England)和200 U/ml DnaseI (Worthington Biochem, New Jersey, USA)的Neurobasal-A (Invitrogen, Paisley, UK)溶液处理2 hr, 将其解离成单细胞, 捣几次, 并且通过15%牛血清白蛋白梯度离心以去除碎片。将解离的细胞沉淀下来, 然后重悬在含有B27补充物、L-谷氨酰胺和Gentimicin的Neurobasal-A (补充的Neurobasal-A, 所有的都来自Invitrogen)中。在37°C含有5%CO₂的湿润氛围中, 在存在和不存在大鼠CNS髓磷脂(来自Dr. Norman Gregson, King's College London, UK)下, 将1,500 DRGN/孔在4孔组织培养板(Nunc. UK)中用100 µg/ml聚-D-赖氨酸然后用20 µg/ml层粘连蛋白-I (Sigma, Dorset, UK)预先包被的无菌玻璃盖玻片上培养72 hr。

siRNA制备和转染

同实施例1, 使用Elbashir和合作者提出的标准 (Elbashir等., 2001, 同前所述), 设计针对p75^{NTR}、NgR和Rho-A的siRNA。仔细审看大鼠p75^{NTR}、NgR和Rho-A的编码序列, 以确定具有二腺嘌呤起始序列并且包括低于50%GC含量的可能的区域。所用的siRNA序列为: -

p75^{NTR}序列: -

SEQ ID No. 1, 5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3';
SEQ ID No.2, 5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3';
SEQ ID No. 3, 5'-AAGAGACCAGGAGCATTGTAC-3';
SEQ ID No. 4, 5'-AAGAACCAGAGCCATGCACTC-3'; 和
SEQ ID No. 5, 5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3'。

NgR序列: -

SEQ ID No.6, 5'-AATCTCACCATCCTGTGGCTG-3';
SEQ ID No. 7, 5'-AACCTCACGCATCTCTTTCTG-3';
SEQ ID No. 8, 5'-AATCAGCTCACTGATGAGGAG-3';
SEQ ID No. 9, 5'-AAATGCACTCAAGGGACGTGT-3'; 和
SEQ ID No. 10, 5'-AATGACTCTCCATTTGGGACT-3'。

Rho-A序列: -

SEQ ID No. 11, 5'-AAGATTATGACCGTCTGAGGC-3';
SEQ ID No. 12, 5'-AAGGATCTTCGGAATGATGAG-3';
SEQ ID No. 13, 5'-AAGGCGGGAGTTAGCCAAAAT-3';
SEQ ID No. 14, 5'-AATGAAGCAGGAGCCGGTAAA-3'; 和
SEQ ID No. 15, 5'-AAAGACCAAAGACGGAGTGAG-3'。

将所选的序列进行BLAST搜索(www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed), 以确保与其它基因没有显著的同源性。有义siRNA模板在5'端以AA二聚体起始, 然后接着19个与靶点序列互补的核苷酸。有义和反义模板的3'端都包括8个核苷酸的序列5'-CCTGTCTC-3', 其与所述siRNA有效转录所需要的T7启动子引物的互补序列相对应。去保护的和脱盐的寡核苷酸模板和对照-合成的序列是化学合成的(Alta Biosciences, University of Birmingham, UK)。

SEQ ID No. 16: 合成的p75NTR Seq 2: 5'-AATCGCATGCGTTCCATTTCG-3';

SEQ ID No. 17: 合成的NgR1: 5'-AACTTCCACCATTGCGGTC-3';

SEQ ID No. 18: 合成的Rho-A Seq 2: 5'-AAGAGTTCATCTGAGTAGGAG-3'。

将 Oligofectamine 试剂 (Invitrogen) 用于 4 孔组织培养板 (Nunc) 进行

siRNA转染。在一个管中，将0.84 μg siRNA/孔混合在50 μl Opti-MEM (Invitrogen)中，同时第二个管含有3 μl Oligofectamine (Invitrogen)和12 μl Opti-MEM (Invitrogen)。将这些管在室温下温育5 min，然后将这两种溶液合并，并且允许在室温下再温育25 min，以便形成复合物。然后，将整个混合物补充Opti-MEM (Invitrogen)达到需要的用量，以允许每孔DRGN加入150 μl 转染培养基。在转染5 hr后，向转染培养基中加入补充的Neurobasal-A，使得终浓度为500 μl /孔，并且在进行细胞裂解（用于蛋白质印迹分析）或免疫组化之前，将DRGN再培养48 hr。

抗体

单克隆 β -III微管蛋白抗体(Sigma)以1:100应用以通过免疫细胞化学(ICC)标记DRGN神经突，并且在蛋白质印迹中以1:500应用。多克隆抗-p75^{NTR} Ab用于鉴定和定位p75^{NTR} (Sigma, 1:500稀释用于蛋白质印迹和ICC)。单克隆192-Ig用于鉴定和定位25 kDa加工的p75^{NTR}细胞质片段(Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA, 1:200稀释用于蛋白质印迹)。Rho-A(单克隆和多克隆Abs, 都以1:200稀释用于蛋白质印迹和ICC)和多克隆抗-NgR Ab (1:100稀释用于蛋白质印迹和ICC)购自Santa Cruz Biotechnology, CA, USA。

免疫细胞化学

在用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤3次之前，将DRG培养物在4%低聚甲醛上固定10 min (TAAB Laboratories, Berkshire, UK)，在含有0.5%牛血清白蛋白 (BSA, Sigma)和1% Triton X-100 (Sigma)的PBS中封闭，并且用1:100稀释在含有0.5% BSA和0.5%吐温-20 (Sigma)的PBS中的相应的一级抗体在湿润的房间里在室温下温育1 hr。然后将细胞在PBS中洗涤3次，并且用1:100稀释在PBS-T-BSA中的Alexa Fluor 488 (绿色)或Texas Red (红色) (二者都来自Molecular Probes)在室温下温育1 hr。在PBS中进一步洗涤后，将盖玻片包埋在FluorSave (Calbiochem, San Diego, USA)中，并且在荧光显微镜(Carl Zeiss, Welwyn-Garden City, UK)下观察。

神经突长出的检测

使用Axiovision软件(Carl Zeiss)从用Axiovision检测工具随机选择的30个DRGN/盖玻片捕获 β III-微管蛋白⁺免疫染色的DRGN神经突的显微照片。神经突长度表示为平均值 $\pm$ SD。由于神经突长出是广泛的,所以所述软件不能用于检测siRNA击倒实验的神经突。在这样的情形中,将DRGN细胞裂解物用于 β III-微管蛋白的蛋白质印迹,作为神经突长出的检测。

蛋白提取和蛋白质印迹

为了确定siRNA处理的DRG培养物中的p75^{NTR}、NgR和Rho-A的水平,将细胞用PBS洗涤2次,并且用0.25%胰蛋白酶/EDTA (Invitrogen)在37℃温育15 min,然后捣碎,并且在1300 rpm离心5 min。将DRG细胞沉淀重悬在冰冷的含有20mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1%NP-40 (Sigma)和蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma)的裂解缓冲液中,并且在冰上温育30 min。在4℃ 13,000 rpm离心30 min后,使用比色DC蛋白检测(Bio-Rad, Hercules, CA, USA),将裂解物的蛋白浓度标准化。在用于蛋白质印迹分析之前将匀浆物和细胞裂解物保存在-70℃。

将每种样品(40 μ g总蛋白)在90℃用2 $\times$ Laemmli上样缓冲液温育4 min,并且在12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen)上分离。将蛋白转移到PVDF膜 (Millipore UK, Gloucestershire, UK)上,在室温下在含有0.1%吐温20和5%脱脂牛奶的Tris-缓冲盐水中封闭1 hr。将膜用相应的抗体印迹过夜。对于检测,使用增强的化学发光(ECL)系统(Amersham, Buckinghamshire, UK)和HRP-缀合的二级抗体(1:1,000, Amersham)。将每一印迹去除,并且然后用相关的抗体重新探测。

DRGN存活

siRNA-介导的击倒后,在荧光显微镜下通过仔细审查每种siRNA 9个盖玻片的全区域而计数 β III-微管蛋白⁺ DRGN数目。按下文所述,计算DRGN/盖玻片的平均数,并且进行统计学分析。

密度计量

在3次独立的实验中，对于每种siRNA的蛋白质印迹和抗体评估进行3次，并且在相关情形中，使用ScionImage软件(Scion Corporation/NIH Image, USA)通过密度计量学而定量印迹。

统计学分析

计算样品的平均值，并且使用GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Version 4.0, San Diego, USA)通过单向变量分析(ANOVA)，分析显著性，然后通过Dunnett's方法进行post-hoc检测以确定统计学显著的组。

结果

FGF2促进DRGN神经突长出

为了检测所选的siRNA序列的功效，本发明人首先建立体外模型，其中将非Trk-依赖型神经营养因子FGF2用于刺激DRGN中神经突的长出，并且结果在图2中显示，其中：-

A, 无FGF2; B, 1 ng/ml FGF2; C, 10 ng/ml FGF2; D, 100 ng/ml FGF2; E, 200 ng/ml FGF2在DRGN神经突长度中引起剂量-依赖型增加；和F，通过图像分析而定量 β III-微管蛋白⁺平均值 $\pm$ SD神经突长度，表明用10 ng/ml FGF2获得最理想的神经突长出，此后平均神经突长出下降。

(*** $P < 0.0001$, 10 ng/ml FGF2相对于0 ng/ml)。

所述结果表明 β III-微管蛋白阳性DRGN神经突在单独的Neurobasal-A上生长，达到 $350 \pm 35 \mu\text{m}$ 的平均长度（如在图2A和F中所示）。然而，增加FGF2的浓度，达到10 ng/ml，增加神经突长出（图2B, C和F）。超过这一最佳浓度，DRGN神经突长出下降（图2D-F）。这些结果证明FGF2可以以浓度-依赖型方式有效地促进DRGN中神经突的长出。

在CNS髓磷脂中抑制FGF2-刺激的DRGN神经突长出

通过在存在一定范围的CNS髓磷脂浓度下培养DRGN，而确定CNS髓磷脂对FGF2-刺激的DRGN神经突长出的抑制作用，并且结果显示在图3中，其中：-

A, 无CNS髓磷脂; B, 100 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷脂; C, 10 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷

脂; D, 100 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷脂; E, 200 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷脂在DRGN神经突长度上引起剂量-依赖型减少; 和F, 通过图像分析定量平均值 $\pm$ SD神经突长度, 表明抑制DRGN神经突长出的最理想浓度是200 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷脂, 更高浓度的CNS髓磷脂 (500 $\mu\text{g/ml}$) 对于DRGN是有毒的。*** $P<0.0001$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 相对于0 $\mu\text{g/ml}$ 髓磷脂。

通过在存在100 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷脂下生长DRGN (图3B), 显著地减少了由10 ng/ml FGF2刺激的DRGN神经突长出 (如图3A所示), 而200 $\mu\text{g/ml}$ CNS髓磷脂几乎完全抑制了FGF2-介导的DRGN神经突长出 (图3C)。将CNS髓磷脂的浓度增加到250 $\mu\text{g/ml}$ (图3D) 和500 $\mu\text{g/ml}$ (图3E) 完全抑制了神经突长出。然而, 由于所用的最高CNS髓磷脂浓度导致增加的细胞死亡和改变的DRGN形态, 我们选择200 $\mu\text{g/ml}$ 髓磷脂为我们后续的siRNA实验提供最佳抑制。通过检测神经突长度量化神经突长出而证实这些观察 (图3F), 并且证明FGF2-刺激的神经突长出被CNS髓磷脂有效地阻滞。

p75^{NTR} siRNA击倒p75^{NTR}及其片段, 并且还在DRGN中下调Rho-A

本发明人已经在实施例1中证明, 在5种所选的针对p75^{NTR} mRNA的siRNA序列中, SEQ ID No. 2在RGC中完全击倒p75^{NTR}及其处理的片段, 以及下游Rho-A (参见实施例1)。来自只在FGF2存在下生长的DRG培养物细胞裂解物的蛋白质印迹分析没有表现出p75^{NTR}和Rho-A蛋白水平的任何变化。然而, p75^{NTR}蛋白水平在存在FGF2和CNS髓磷脂时生长的细胞裂解物中保持不受影响, 而Rho-A水平增强, 这表明对抑制途径的诱导 (如图4A所示)。

图4中: A, 在siRNA-介导的基因沉默作用后细胞裂解物的蛋白质印迹表现出p75^{NTR}蛋白的70%的击倒, 下调所有p75^{NTR}片段, 并且随后抑制Rho-A活化; B, 使用 β III-微管蛋白和p75^{NTR}抗体的双免疫细胞化学表明在不存在CNS髓磷脂时使用FGF2的神经突长出, 而p75^{NTR}免疫染色定位在DRGN somata和它们的神经突; C, 尽管CNS髓磷脂抑制神经突长出, 但是它对p75^{NTR}免疫反应性没有影响; D, 用p75^{NTR}序列2转染DRGN引起与显著的($P<0.0001$, 相对于p75^{NTR}合成的序列2)神经突长出相关的对p75^{NTR}

免疫反应性的显著减少；E，在存在针对p75^{NTR}序列2的合成序列时，p75^{NTR}的免疫反应性保持，而没有任何明显的神经突长出。

如同用于RGC那样（参见实施例1），当将DRGN用相同的5种针对p75^{NTR} mRNA的siRNA序列转染时，序列2又引起最大的p75^{NTR}及其处理片段p55和p25的击倒，具有70%的效率（ $P < 0.0001$ 相对合成的2）（图4A）。由于序列2的合成译本对于p75^{NTR}击倒没有作用，所以使用SEQ ID No. 2观察到的击倒是特异的。当将印迹去除，并且用Rho-A重新探测时，使用p75^{NTR} siRNA SEQ ID No.2还获得几乎完全的Rho-A击倒。在存在FGF2而没有CNS髓磷脂时，在βIII-微管蛋白⁺ DRGN中存在p75^{NTR}免疫反应性以及中等神经突长出（图4B）。DRGN somata和神经突的p75^{NTR}免疫反应性不受CNS髓磷脂和FGF2组合存在的影响，但是神经突长出显著减小（图4C）。

然而，在存在p75^{NTR} siRNA SEQ ID No.2与CNS髓磷脂和FGF2时生长的DRGN中，存在p75^{NTR}免疫反应性的显著减少，并且神经突长出增强（图4D）。在存在FGF2和CN髓磷脂时，合成的对照序列2在p75^{NTR}免疫反应性中没有表现出变化，并且没有神经突长出（图4E），这证实p75^{NTR} siRNA SEQ ID No.2-介导的击倒生物反应是特异的siRNA反应，其还引起下游抑制信号传导分子Rho-A的有效击倒。

NgR siRNA显著击倒DRGN中的NgR

本发明人检测了5种针对NgR mRNA的siRNA序列（SEQ ID No. 6-10）用于击倒DRGN中的NgR，并且结果显示在图5中，其中：-

A，使用siRNA SEQ ID No. 6, 7和10，在siRNA-介导的基因沉默作用后细胞裂解物的蛋白质印迹分别表现出100%，55%和18%的NgR蛋白击倒；B，用NgR siRNA SEQ ID No. 6转染DRGN引起免疫反应性的显著减少，同时促进显著的神经突长出；和C，然而，在用合成序列1转染的DRGN中，使用βIII-微管蛋白和NgR抗体的双免疫细胞化学没有揭示神经突长出，并且在NgR免疫反应性中没有变化。

本发明人表明，在存在FGF2和CNS髓磷脂时，SEQ ID No. 6完全击倒NgR（100%击倒， $P < 0.0001$ 相对于合成的1），如图5A所示。siRNA NgR SEQ ID No.6的合成译本对于NgR水平没有影响，这证明SEQ ID No.6

siRNA的特异性。在NgR击倒后，在p75^{NTR}及其片段中没有调控，然而，在获得显著的击倒的样品中，活性Rho-A水平减小（图5A）。在用NgR siRNA SEQ ID No. 6转染的DRGN中，NgR免疫反应性显著减小，而在存在CNS髓磷脂时，用FGF2刺激后， β III-微管蛋白⁺神经突的生长增强（图5B）。在存在FGF2和CNS髓磷脂时，合成的NgR SEQ ID No. 6对NgR免疫反应性和DRGN的神经突长出没有作用（图5C）。

Rho-A siRNA显著地击倒DRGN中的Rho-A

其次，本发明人构建了5种针对下游抑制性信号传导分子Rho-A的siRNA (SEQ ID No. 11-15)，并且检测它们击倒DRGN中Rho-A的能力，并且结果在图6中显示，其中：-

A，使用Rho-A siRNA SEQ ID No.s 11, 12, 13和15，在siRNA-介导的基因沉默作用后细胞裂解物的蛋白质印迹分别表现出80%，100%，10%和70%的Rho-A蛋白击倒。全长和p75^{NTR}处理形式的同时减少也是显而易见的；B，用SEQ ID No. 12转染的DRGN具有减少的Rho-A免疫反应性，和旺盛的神经突长出；和C，然而，在用合成SEQ ID No. 12转染的DRGN中，使用 β III-微管蛋白和NgR抗体的双免疫细胞化学没有表现出神经突长出，并且在Rho-A免疫反应性中没有变化。

在存在CNS髓磷脂时，在用FGF2刺激的DRGN中，SEQ ID No. 12完全击倒Rho-A (100%击倒, $P < 0.0001$ 相对于合成的序列12)蛋白，而合成的译本没有影响（图6A）。siRNA-介导的Rho-A击倒与p75^{NTR}及其片段p55和p25的显著击倒相关（图6A）。在 β III-微管蛋白⁺ DRGN中，Rho-A siRNA SEQ ID No. 12几乎完全消除了Rho-A的免疫反应性，并且在存在CNS髓磷脂时，比检测的任何其它的siRNA序列导致更多的FGF2-刺激的神经突长出（图6B）。合成的Rho-A SEQ ID No. 2对Rho-A免疫反应性和DRGN的神经突长出没有影响（图6C）。

从 β III-微管蛋白的蛋白质印迹量化DRGN神经突长出

由于许多DRGN生长多于一个神经突，并且这些由来自相邻DRGN的神经突点缀，所以，很难使用Axiovision软件检测用siRNA-介导的p75^{NTR}、

NgR和Rho-A击倒观察到的神经突长度。因此， β III-微管蛋白的蛋白质印迹的密度计量学分析用来估计神经突长出，并且结果显示在图7中，其中：

A和B，与用合成的或任何其它的siRNA序列转染的DRGN相比，在用p75^{NTR} siRNA SEQ ID No.2转染的DRGN中，检测到显著更高的 β III-微管蛋白量($P<0.0001$, ANOVA),与只存在FGF2和CNS髓磷脂时生长的DRGN相比，这表现出5倍的增加；C和D，使用针对NgR的siRNA，与用合成的或任何其它的siRNA序列转染的DRGN相比，在用SEQ ID No.6转染的DRGN中，检测到显著更高的 β III-微管蛋白量($P<0.0001$, ANOVA)，与只存在FGF2和髓磷脂时生长的DRGN相比，这表现出3倍的增加；E和F，使用针对Rho-A的siRNA，与用合成的或任何其它的siRNA序列转染的DRGN相比，在用Rho-A SEQ ID No.12转染的DRGN中，检测到显著更高的 β III-微管蛋白量($P<0.0001$, ANOVA)，与只存在FGF2和髓磷脂时生长的DRGN相比，这表现出6.5倍的增加。最大的 β III-微管蛋白量（反映最旺盛的神经突长出）在用Rho-A SEQ ID No.12转染的DRGN中检测到；和G，在siRNA-介导的p75^{NTR}、NgR或Rho-A击倒后，计数 β III-微管蛋白⁺ DRGN的数目，作为细胞存活的检测，没有揭示出任何显著变化。*** $P<0.0001$ 相对于使用FGF2和髓磷脂的对照DRGN。

当使用siRNA SEQ ID No. 2击倒p75^{NTR}时，存在CNS髓磷脂时，FGF2-介导的神经突长出增强5倍（图7A和B），当使用siRNA SEQ ID No. 6击倒NgR时增强3.5倍（图7C和D），以及当使用siRNA SEQ ID No.12击倒Rho-A时增强6.5倍（图6E和F）。在Rho-A击倒后，FGF2-刺激的 β III-微管蛋白水平比在p75^{NTR}击倒后观察到的水平进一步增加。这些结果表明，阻滞Rho-A最理想地解除CNS髓磷脂存在时对FGF2-刺激的DRGN神经突长出的抑制。

p75^{NTR}、NgR和Rho-A击倒后的DRGN存活

在p75^{NTR}、NgR和Rho-A击倒后，培养物中存在的在髓磷脂存在时用FGF2刺激的 β III-微管蛋白⁺ DRGN的数目保持不受影响（图7G）。这表明，存在CNS髓磷脂时，p75^{NTR}、NgR或Rho-A的击倒对于FGF2-刺激的DRGN

神经突长出没有不利影响。

讨论

本发明人的轴突生长解除抑制策略使用siRNA靶向抑制性信号传导级联，而不是抑制性配体。在FGF2-刺激的DRGN中p75^{NTR}、NgR和Rho-A的击倒都导致解除CNS抑制性髓磷脂存在时对神经突长出抑制，Rho-A的击倒引起最明显的作用。最有效的siRNA, Rho-A SEQ ID No. 12, 促进比存在CNS髓磷脂时用FGF2观察到的高6.5倍的FGF2-刺激的神经突长出，和比用siRNA p75^{NTR} SEQ ID No. 2观察到的高1.5倍的FGF2-刺激的神经突长出。有趣地，siRNA-介导的p75^{NTR}的击倒还引起Rho-A的完全击倒，而siRNA-介导的全部Rho-A的击倒相反在DRGN中引起中等的但是显著的p75^{NTR}的击倒。NgR的击倒增强神经突长出最小，当与存在CNS髓磷脂时生长的DRGN相比较时，其使FGF2-刺激的神经突长出增加3.5倍。

siRNA-介导的p75^{NTR}的击倒

本发明人已经证明siRNA-介导的p75^{NTR}的基因沉默作用解除了CNS髓磷脂存在对RGC神经突长出的抑制(实施例1)。本发明人还表明，p75^{NTR}的击倒导致对Rho-A活化的抑制，由此表明对抑制性信号传导的抑制(实施例2)。这里，本发明人使用相同的siRNA序列来在体外DRGN中研究p75^{NTR}基因沉默的作用。存在髓磷脂时，p75^{NTR}及其片段的击倒以及随后抑制Rho-A活化增强了FGF2-刺激的DRGN神经突长出，这一观察支持下述假说：抑制性配体结合分子NgR需要p75^{NTR}以在多种神经元细胞类型中转导其信号。

总之，结果证明p75^{NTR}的击倒在存在推定的抑制性环境（髓磷脂）时对于神经营养蛋白-刺激的(CNTF)RGC神经突长出具有显著有利的影响。此外，NgR、p75^{NTR}和Rho-A的击倒在存在推定的抑制性环境时对于神经营养蛋白-刺激的(FGF2) DRGN神经突长出具有显著有利的影响。这暗示神经营养蛋白-刺激的机制对神经突长出抑制的解除作用可能是一种普遍现象，并且siRNA可以增强这一作用。结果对于抑制解除策略是有希望的，并且表明针对下游信号传导分子的RNAi在促进最理想的CNS轴突再生中是最有利的。

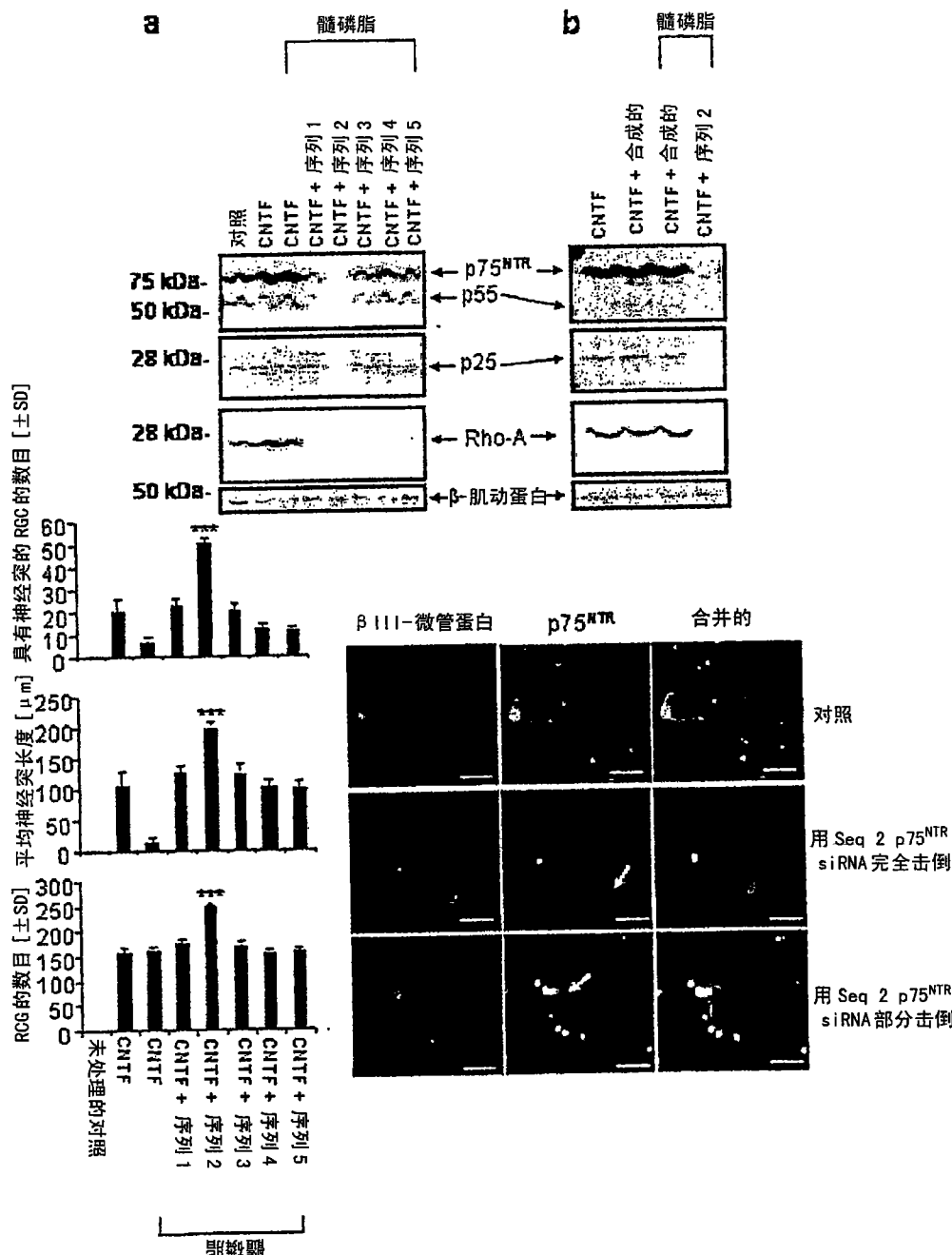


图 1

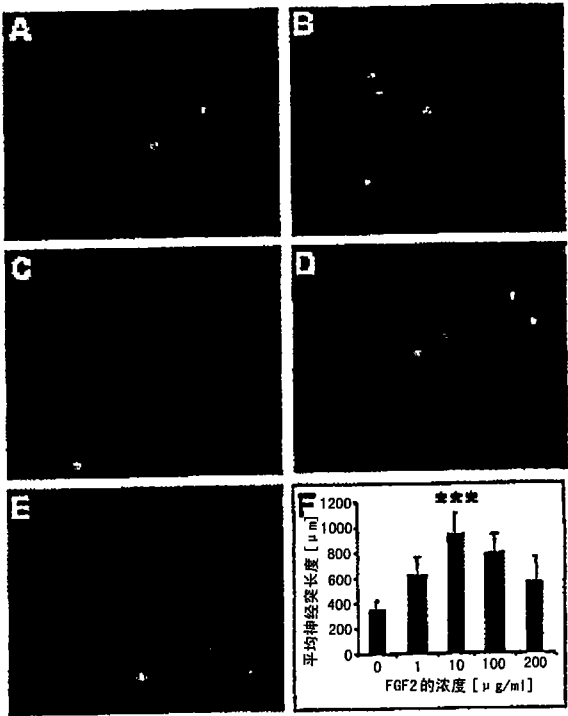


图 2

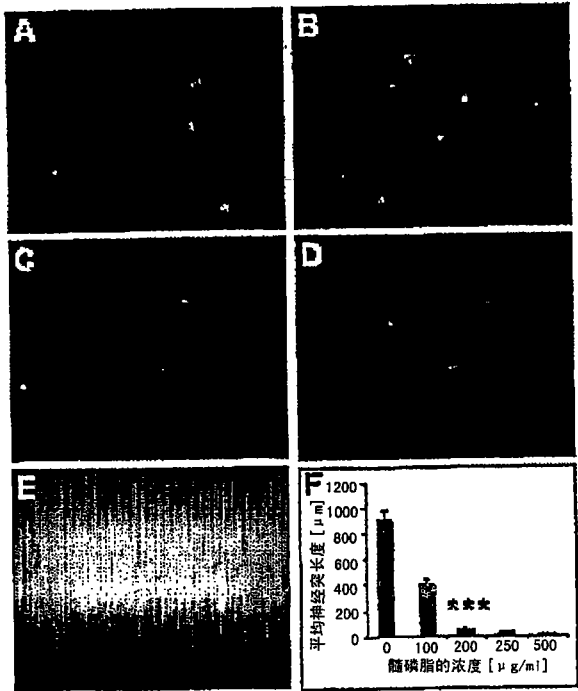


图 3

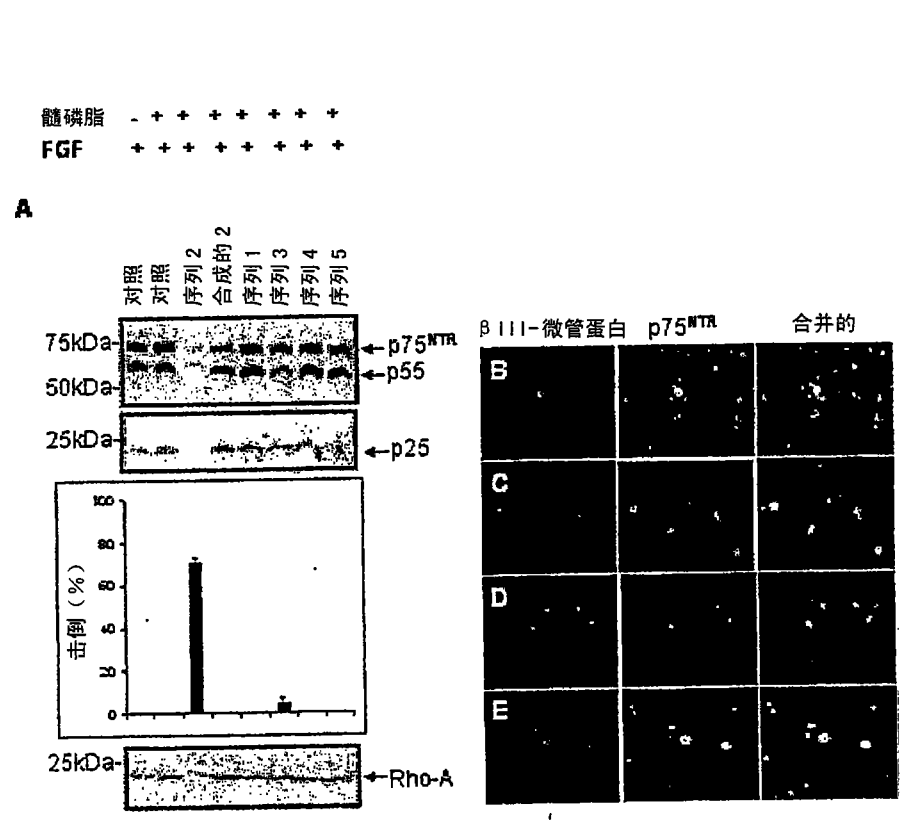


图 4

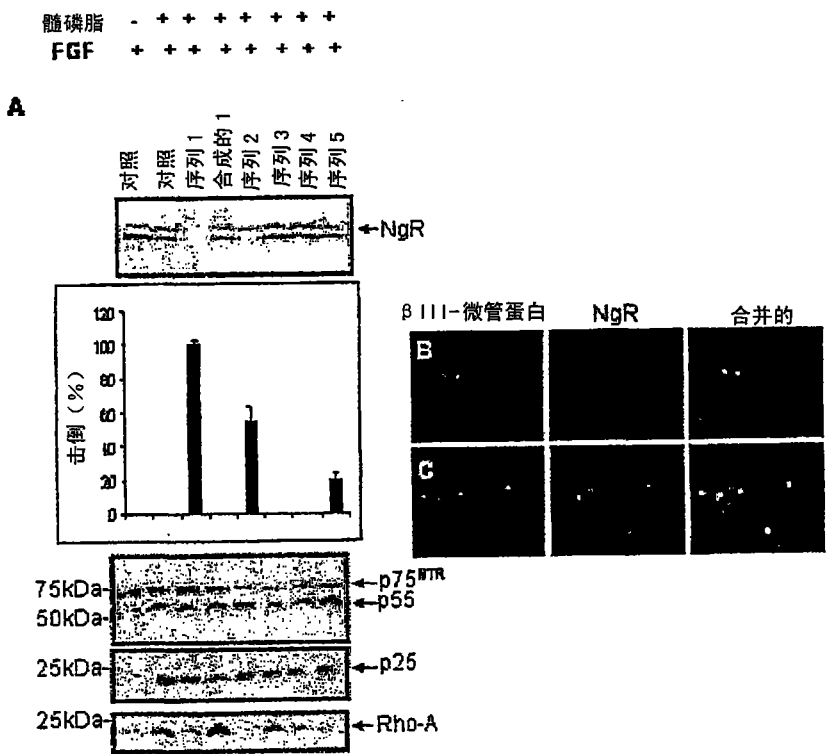


图 5

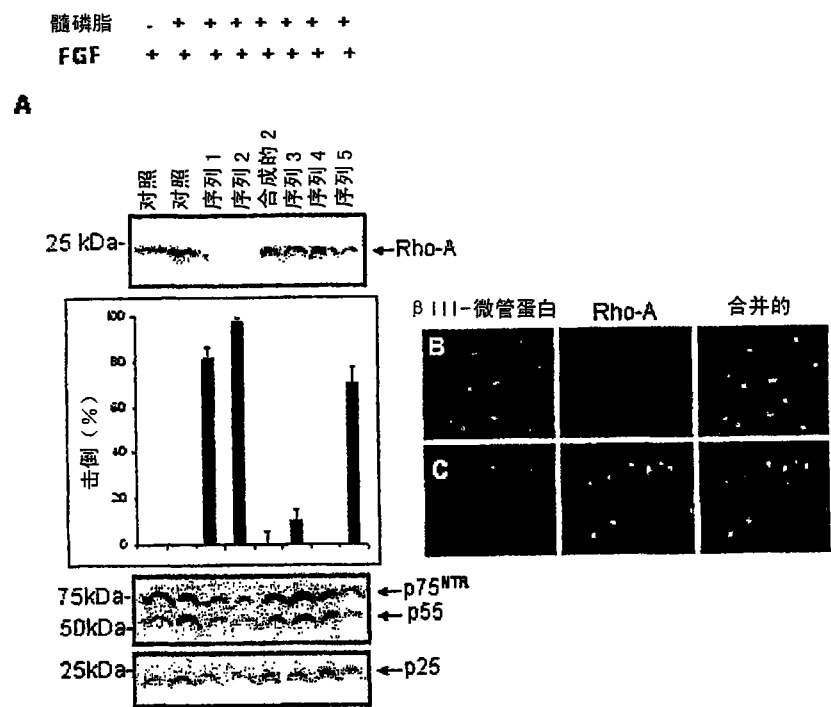


图 6

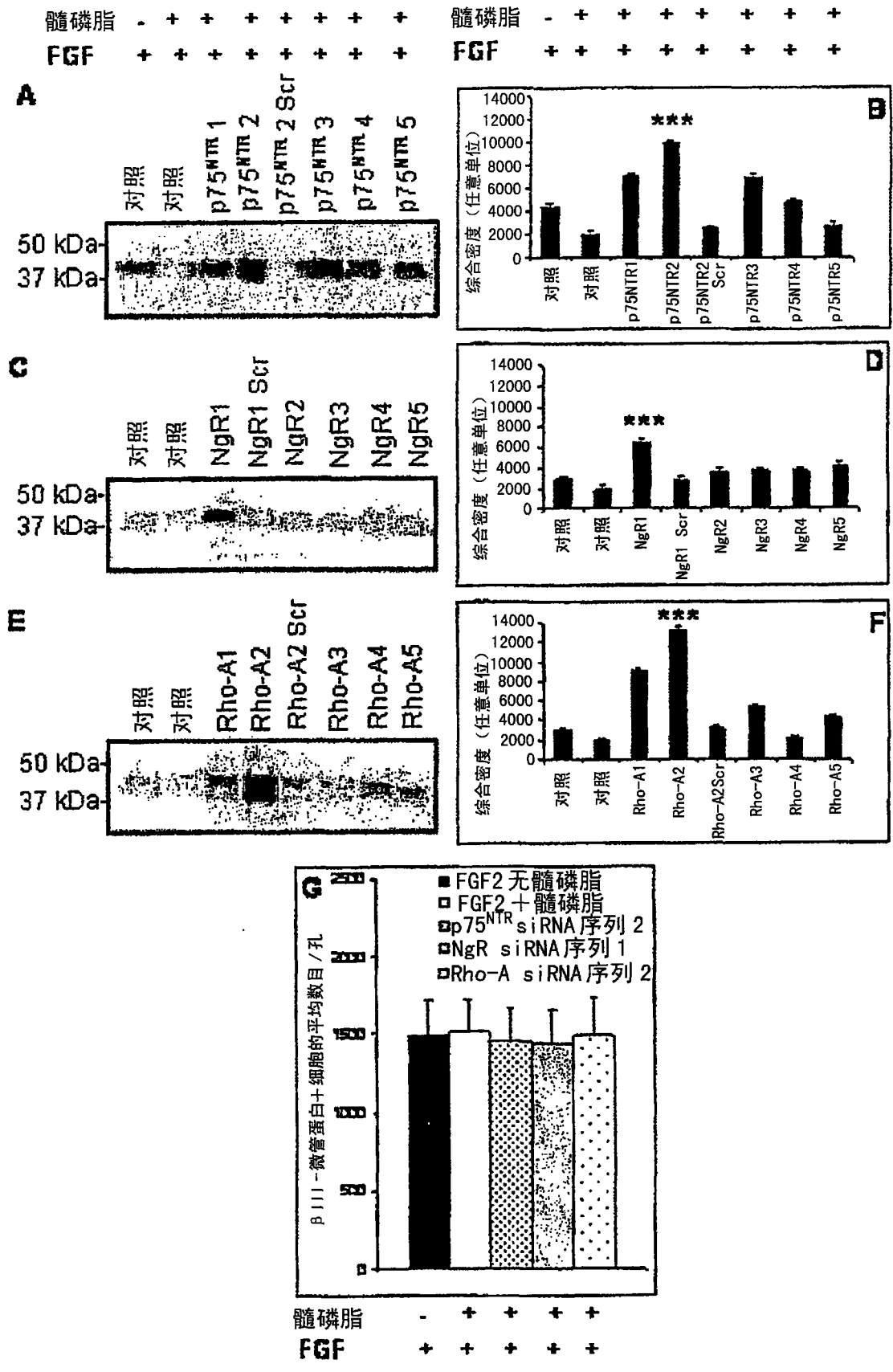


图 7