



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101466410 B

(45) 授权公告日 2013.03.06

(21) 申请号 200780022116.3

G01N 33/567(2006.01)

(22) 申请日 2007.06.13

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/813,170 2006.06.13 US

60/878,730 2007.01.05 US

Per Svenningsson et. al.. 《Alterations in 5-HT1B Receptor Function by p11 in Depression-Like States》. 《SCIENCE》. 2006, 第 311 卷第 77-80 页.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.12.12

审查员 豆波建

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/013948 2007.06.13

(87) PCT申请的公布数据

W02007/146372 EN 2007.12.21

(73) 专利权人 洛克菲勒大学

地址 美国纽约

(72) 发明人 P·斯韦宁松 P·格林加德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 陈润杰

(51) Int. Cl.

A61K 49/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 23 页

(54) 发明名称

新型治疗和诊断产品及方法

(57) 摘要

本发明涉及 p11 用作 p11/5-HT 受体相关病症的药物靶和用作诊断、治疗和研发 p11/5-HT 受体相关病症的工具的用途。本发明还涉及 p11 敲除动物和 p11 转基因动物以及它们作为用于开发新型精神病治疗药物的模型的用途,以及诊断、预防和治疗 p11/5-HT 受体相关病症的方法。

1. 用于确定 p11 水平的试剂在制备用于通过如下方法在受试者中诊断 p11/5-HT1B 受体相关病症的诊断产品中的用途,所述方法包括:确定来自所述受试者的生物样品中 p11 的水平,其中所述生物样品包括外周血单核细胞;和将所述 p11 水平与参照标准比较,其中,与参照标准相比,异常水平的 p11 构成 p11/5-HT1B 受体相关病症的阳性诊断,其中所述 p11/5-HT1B 受体相关病症为抑郁症,其中所述参照标准是不具有任何 p11/5-HT1B 受体相关病症、或不表现任何 p11/5-HT1B 受体相关病症的症状的对照群体中的 p11 水平。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断产品为试剂盒。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述抑郁症为 p11 相关抑郁。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述外周血单核细胞选自 NK 细胞和 CD-8+T 细胞。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述外周血单核细胞为 NK 细胞。

6. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述 p11/5-HT1B 受体相关病症是与异常低水平的 p11 相关的病症,其中所述 p11/5-HT1B 受体相关病症为抑郁症,其中与对照受试者相比,受试者中 p11 水平的减少构成此类病症的阳性诊断。

7. 前述权利要求 1 和 2 之任一项目的用途,其中通过在来自所述受试者的所述生物样品中测定单核细胞和 / 或淋巴细胞中的 p11 蛋白水平,确定所述 p11 水平。

8. 权利要求 2 的用途,其中使用特异于 p11 的单克隆抗体来确定 p11 的水平,并且其中所述试剂盒包含该单克隆抗体。

9. 权利要求 1 或 4 的用途,其中所述用于确定 p11 水平的试剂为特异于 p11 的单克隆抗体。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述单克隆抗体通过 ELISA 或 FACS 分析来检测。

11. 前述权利要求 1 和 2 之任一项目的用途,其中通过在来自所述受试者的生物样品中测定 p11mRNA 的水平,确定所述 p11 水平。

12. 权利要求 2 的用途,其中使用特异于 p11mRNA 的寡核苷酸探针来确定 p11 的水平,并且其中所述试剂盒包含该寡核苷酸探针。

13. 权利要求 1 的用途,其中所述用于确定 p11 水平的试剂为特异于 p11mRNA 的寡核苷酸探针。

## 新型治疗和诊断产品及方法

[0001] 本申请要求 2006 年 6 月 13 日提交的美国临时申请 60/813,170 和 2007 年 1 月 5 日提交的 60/878,730 的权利,所述临时申请的内容通过引用合并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及 p11 和 5-HT<sub>1B</sub> 及 5-HT<sub>4</sub> 受体之间的生物关联性,提供 p11 用作涉及这些受体的疾病的药物靶的用途以及作为诊断工具用于鉴定罹患 p11/5-HT 受体相关病症的患者的用途。

### 背景技术

[0003] 目前可获得的抗抑郁药和抗焦虑药靶向单胺类神经递质例如去甲肾上腺素、多巴胺和特别地 5-羟色胺 (5-羟基-色胺或 5-HT) 的生物合成、降解和工作途径 (operative pathway)。5-羟色胺,最早于 20 世纪 40 年代后期发现,在调节体内的许多功能,包括情绪、睡眠、食欲和性活动中起着关键作用。其既作为神经递质在中枢神经系统中起作用,也作为外周信号调节剂起作用。因此,5-羟色胺的可得性和活性的改变已与抑郁症、进食障碍 (例如贪食症)、强迫症 (OCD)、药物成瘾、注意力缺陷障碍 (ADD)、注意缺陷多动障碍 (ADHD)、经前综合征、焦虑症、攻击性 (aggression)、睡眠障碍、性功能障碍、胃肠道病症 (例如肠易激综合症)、躁狂症、偏头痛和双相性精神障碍联系起来。常规抗抑郁药通常通过 (1) 抑制单胺加氧酶以阻止 5-羟色胺降解或 (2) 抑制突触前神经元对 5-羟色胺的重摄取以增加 5-羟色胺的神经元转运来调节信号传递。尽管对 5-羟色胺途径进行了半个多世纪的深入研究,然而,对这些途径的理解还不完全,且尚未建立针对 5-羟色胺途径功能障碍的基于生物化学的诊断剂或生物标记。

[0004] 5-HT (5-羟色胺) 受体是异质性的且存在于许多种细胞的表面。5-HT<sub>1B</sub> 受体是 14 种 5-羟色胺受体亚型中的一种且大量见于整个中枢神经系统。5-HT<sub>1B</sub> 受体的结构、分布和表现功能在啮齿类动物和人中非常相似。该受体与许多生理功能和行为,包括情绪、认知、攻击性、成瘾、睡眠和进食相关。在包含 5-羟色胺和不包含 5-羟色胺的神经元上都发现 5-HT<sub>1B</sub> 受体。5-HT<sub>1B</sub> 受体主要发现于神经元的突触前部分,在此处它们作为末梢自身受体参与调控神经元的 5-羟色胺释放。当通过与 5-羟色胺的结合而被刺激时,它们抑制神经元释放额外的 5-羟色胺;当不受刺激时,5-羟色胺释放增强。因此对这些 5-HT<sub>1B</sub> 受体的阻断倾向于增强 5-羟色胺水平。存在一些证据表明 5-HT<sub>1B</sub> 受体是异质受体 (heteroreceptor),其参与控制其他神经递质例如乙酰胆碱、谷氨酸、多巴胺、去甲肾上腺素和  $\gamma$ -氨基丁酸以及 5-羟色胺的释放。也在神经突触后发现一些 5-HT<sub>1B</sub> 受体。5-HT<sub>4</sub> 受体存在于胃肠道系统 (在此其参与胃肠蠕动) 和中枢神经系统中。虽然 5-HT<sub>1B</sub> 通常与 cAMP 的减少相关,但 5-HT<sub>4</sub> 受体与增加的 cAMP 活性相关。大脑中的 5-HT<sub>4</sub> 受体调节神经递质 (乙酰胆碱、多巴胺、5-羟色胺和 GABA) 的释放并增强突触传递。它们还可通过促进非淀粉样蛋白生成性 (non-amyloidogenic) 可溶性淀粉样前体蛋白 (sAPP $\alpha$ ) 的释放而在记忆增强中起作用。由于普遍认为阿耳茨海默病是由  $\beta$ -淀粉样蛋白斑沉积的形成介导的,因而增强 5-HT<sub>4</sub> 受体

的功能,从而增加 sAPP $\alpha$  的释放是一种治疗或预防阿耳茨海默病的潜在方法。

[0005] 蛋白质 p11 是 S100 EF 手型蛋白家族的成员, p11 也称为膜联蛋白 II (annexin-II) 轻链、脂皮层蛋白 -II 轻链、依钙蛋白 I 轻链、42C 或 S-100 相关蛋白, 这些术语在本文中互换使用。R. Donate, *Biochim. Biophys. Acta*, 1450, 191 (1999)。其单独地或以异四聚体的形式存在于多种细胞中。该异四聚体由两个拷贝的 p36 (也称为膜联蛋白 -II 或依钙蛋白 -I 重链) 和两个拷贝的 p11 组成。在细胞中, 异四聚体在膜下细胞骨架中位于质膜的细胞质表面, 这暗示着该复合物可能在膜运输事件例如胞吐作用、内吞作用和细胞-细胞粘着中起作用, p11 已被声称在肿瘤细胞侵袭、肿瘤生长和转移中具有作用。US 2004/0142897A1。之前未确认 p11 与 5-HT 受体或精神病症相关。

[0006] 发明概述

[0007] 本申请人现已令人吃惊地发现, p11 蛋白特异性地与 5-HT<sub>1B</sub> 受体相互作用并且显示出可以帮助调控大脑化学信使 5-羟色胺 (许多精神治疗药物的关键性靶) 的信号转导。Svenningsson 等人, *Science* (2006) 331 :77-80 ;Svenningsson 等人, *Current Opinion in Pharmacology* (2006), 6 :1-6 (两者通过引用合并入本文), p11 显现出在将 5-HT<sub>1B</sub> 受体募集至神经元质膜 (在此处它们更具有功能性) 中起着关键作用。此外, 本申请人发现 p11 还与 5-HT<sub>4</sub> 受体相互作用。本申请人已证实 p11 的水平可直接参与抑郁症、焦虑症和据认为牵涉到缺陷性 5-羟色胺受体的相似精神病的发展。抑郁受试者 (抑郁的人和小鼠模型) 的大脑中的 p11 水平与非抑郁受试者 (非抑郁的人和对照小鼠) 的比较显示, 与非抑郁受试者相比, 抑郁受试者中的 p11 水平实质性地更低。此外, p11 的水平在使用各种类型抗抑郁药, 包括三环抗抑郁药、单胺氧化酶抑制剂 (MAOIs) 和电惊厥疗法 (electroconvulsivetherapy) 治疗的受试者中倾向更高。使用抗抑郁药治疗的动物中存在 p11 的超表达。例如, 我们已观察到接受选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂氟西汀 (nuoxetine) 的猴子在外周血单核细胞 (PBMC) 中展示出 p11 表达的显著 (超过 2 倍) 增加, 在接受氟西汀的小鼠的大脑中显示了相似的效应。类似地, 具有 p11 敲除基因的动物模型在神经元质膜上展示较少的 5-HT<sub>1B</sub> 受体, 具有减少的 5-羟色胺信号转导, 展示抑郁症样表型。有趣地, p11 的表达响应糖皮质激素 (通常响应压力而释放的) 的过量水平而减少, 根据本申请人的工作, 这为观察到的抑郁症和高压力事件之间的联系提供了可能的生物化学解释。基于本申请人的这些令人吃惊的发现, 证实 p11 对于之前与 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体或与 5-羟色胺功能 (或该功能的缺乏) 相关的病症而言是适宜的诊断靶和药物靶以及用于治疗开发的筛选工具。

[0008] 此处所使用的术语“p11/5-HT 受体相关病症”包括涉及由 p11 蛋白引起的 5-HT 受体 (例如 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体) 动员 (或缺乏动员)、与之相关、由之引起, 受之影响、由之触发的任何病症。p11/5-HT 受体相关疾病可包括但不限于精神病 (例如抑郁症、焦虑症、攻击性 (aggression)、燥狂症、双相性精神障碍、注意力缺陷障碍、注意缺陷多动症、药物成瘾和强迫症、及阿耳茨海默病)、睡眠障碍 (例如, 失眠症)、进食障碍 (例如贪食症)、性功能障碍、和胃肠道病症 (例如肠易激综合症); 特别是抑郁症。

[0009] 因此, 本发明提供, 例如, :

[0010] 1. 诊断 p11/5-HT 受体相关病症的方法;

[0011] 2. 鉴定可以用于治疗 p11/5-HT 受体相关病症的化合物的方法;

[0012] 3. 超表达 (over-express) 或欠表达 (under-express)p11 的转基因动物 ;和

[0013] 4. 治疗 p11/5-HT 受体相关病症的方法。

[0014] 发明详述

[0015] 在一个实施方案中,本发明涉及在受试者中诊断 p11/5-HT 受体相关病症的方法,该方法包括(1)测定所述受试者的生物样品例如血液或组织样品例如单核细胞和 / 或白细胞,例如,外周血单核细胞 (PBMC) 中的 p11 蛋白的水平,和(2)将所述 p11 水平与参照标准例如对照群体中的 p11 水平相比较,所述对照群体未患有或未疑似患有任何 p11/5-HT 受体相关病症,其中与参照标准相比,受试者中 p11 的异常水平构成 p11/5-HT 受体相关病症的阳性诊断(方法 1)。

[0016] 因此本发明包括方法 1 的下列实施方案:

[0017] 1.1. 方法 1 的方法,其中 p11/5-HT 受体相关病症是与 p11 的异常低水平相关的病症,其中与参照对照相比,受试者中减少的 p11 水平构成此类病症的阳性诊断。

[0018] 1.2. 根据方法 1 或 1.1 的方法,其中所述病症与异常低水平的 p11 相关,并选自抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍以及注意缺陷多动症。

[0019] 1.3. 根据上述方法中的任一项的方法,其中所述病症与 p11 的异常低水平相关且为抑郁症。

[0020] 1.4. 根据方法 1 的方法,其中所述 p11/5-HT 受体相关病症是与 p11 的异常高水平相关的病症,其中与参照标准相比,受试者中提高的 p11 水平构成了此类病症的阳性诊断。

[0021] 1.5. 根据方法 1 或 1.4 中的任一项的方法,其中所述病症与 p11 的异常高水平相关,且选自躁狂症、双相性精神障碍、焦虑症、攻击性、睡眠障碍、性功能障碍和胃肠道病症。

[0022] 1.6. 根据上述方法中的任一项的方法,其中通过测定来自所述受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 中的 p11 蛋白水平来确定所述 p11 的水平。

[0023] 1.7. 根据 1.6 的方法,其中 PBMC 选自单核细胞、NK 细胞和 CD-8<sup>+</sup>T<sup>-</sup> 细胞。

[0024] 1.8. 根据上述方法中的任一项的方法,其中通过测定来自所述受试者的生物样品中的 p11 mRNA 的水平来确定所述 p11 水平。

[0025] 1.9. 根据上述方法中的任一项的方法,其中使用特异于 p11 的单克隆抗体来确定 p11 的水平。

[0026] 1.10. 根据上述方法中的任一项的方法,其中 p11/5-HT 受体相关病症是 p11/5-HT<sub>1B</sub> 受体相关病症。

[0027] 1.11. 根据上述方法中的任一项的方法,其中 p11/5-HT 受体相关病症是 p11/5-HT<sub>4</sub> 受体相关病症。

[0028] 1.12. 用于例如按照上述方法 1-1.11 中的任一项测量 p11 水平的试剂盒,其包括特异于 p11 mRNA 的寡核苷酸探针或特异于 p11 的单克隆抗体以及使用说明书。

[0029] 1.13. 特异于 p11 mRNA 的寡核苷酸探针或特异于 p11 的单克隆抗体在方法 1-1.11 中的任何一项中的用途。

[0030] 1.14. 特异于 p11 mRNA 的寡核苷酸探针或特异于 p11 的单克隆抗体在制造于根据权利要求 1-1.11 之任一项的方法或根据 1.12 的试剂盒中使用的试剂中的用途。

[0031] 在另一个实施方案中,本发明涉及鉴定可以用于治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的 p11 调节剂的方法,该方法包括测定候选调节剂调控(上调或下调)p11 表达或与

5-HT 受体相关的 p11 活性的能力 (方法 2)。

[0032] 因此,方法 2 包括

[0033] 2.1. 鉴定可以用于治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的 p11 调节剂的方法,该方法包括步骤:提供包含等量的 p11 基因产物(例如,蛋白质或 mRNA)的第一样品和第二样品,例如细胞培养物或细胞或组织样品;将第一样品与候选 p11 调节剂接触;和确定第一样品中 p11 基因产物的量是否已改变,其中增加的基因产物的量表明候选调节剂可用于治疗或改善与 p11 的异常低水平相关的病症,而减少的量表明候选调节剂可用于治疗或改善与 p11 的异常低水平相关的病症。

[0034] 2.2. 鉴定用于治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的 p11 调节剂的方法,包括步骤:提供在细胞表面包含等量的 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体的第一样品和第二样品;将第一样品与候选 p11 调节剂接触;和确定第一样品的细胞表面上的 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体的数量与第二样品相比是否已改变,其中细胞表面上 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体数量的增加表明候选调节剂可用于治疗或改善与 p11 的异常低水平相关的病症,而细胞表面上 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体数量的减少表明候选调节剂可用于治疗或改善与 p11 的异常低水平相关的病症。

[0035] 2.3. 鉴定 p11 调节剂的方法,包括将候选 p11 调节剂与包含与 p11 启动子有效连接的报告基因的细胞接触,和以报告基因的表达水平代表 p11 的表达。

[0036] 2.4. 鉴定用于治疗或改善与低水平 p11 相关的病症的 p11 调节剂的方法,该方法包括测定候选调节剂上调 p11 的表达或增加与 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 相关(从而在神经元质膜上募集 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体)的 p11 活性的能力。

[0037] 2.5. 根据方法 2-2.4 的任一项的方法,其中与 p11 的异常低水平相关的病症选自抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍或注意缺陷多动症和阿耳茨海默病。

[0038] 2.6. 根据上述方法 2-2.5 的任一项的方法,其中病症是抑郁症。

[0039] 2.7. 根据上述方法 2-2.6 的任一项的方法,其中 p11 调节剂用作阳性对照。

[0040] 2.8. 根据方法 2.6 的方法,其中 p11 调节剂选自三环抗抑郁药、选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂、曲坦类药物(triptan)和单胺氧化酶抑制剂。

[0041] 2.9. 根据方法 2.8 的方法,其中 p11 调节剂是选自阿米替林(商品名:Elavil)、去甲丙咪嗪(商品名:Norpramin)、丙咪嗪(商品名:Tofranil)和去甲替林(商品名:Aventyl, Pamelor)的三环抗抑郁药。

[0042] 2.10. 根据方法 2.8 的方法,其中 p11 调节剂是丙咪嗪。

[0043] 2.11. 根据方法 2.8 的方法,其中 p11 调节剂是单胺氧化酶抑制剂(MAOI),例如选自异卡波肼(商品名:Marplan)、苯乙肼(商品名:Nardil)和反苯环丙胺(商品名:Parnate)。

[0044] 2.12. 根据 2.11 的方法,其中 MAOI 是反苯环丙胺。

[0045] 2.13. 根据方法 2.8 的方法,其中 p11 调节剂是选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂,例如选自西酞普兰(商品名:Celexa)、依他普仑(escitalopram)(商品名:Lexapro)、氟西汀(商品名:Prozac)、氟苯哌苯醚(商品名:Paxil, Pexeva)、舍曲林(商品名:Zoloft)。

[0046] 2.14. 鉴定用于治疗或改善与 p11 的高水平相关的病症的 p11 调节剂的方法,其包括测定候选调节剂下调 p11 的表达或抑制或减少与 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 相关的 p11 活性

(从而减少或抑制 p11 将 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体募集至神经元质膜的能力) 的能力。

[0047] 2. 15. 根据 2. 14 的方法, 其中与高水平的 p11 相关的病症包括但不限于躁狂症、双相性精神障碍、焦虑症、攻击性、睡眠障碍、性功能障碍和胃肠道病症。

[0048] 2. 16. 根据 2. 15 的鉴定用于治疗或改善与高水平 p11 相关的病症的 p11 调节剂的方法, 其中所述调节剂选自 p11 的 siRNA、反义寡核苷酸和单克隆抗体。

[0049] 2. 17. 方法 2-2. 16 的任一项的方法, 其中选自 p11 的 siRNA、反义寡核苷酸和单克隆抗体的 p11 抑制剂化合物用作对照或比较物 (comparator)。

[0050] 2. 18. 鉴定用于治疗或改善与异常低水平的 p11 相关的病症的 p11 模拟物的方法, 例如根据方法 2-2. 17 之任一项的方法, 该方法包括测定候选 p11 模拟物与 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体结合或相互作用从而将 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体募集至神经元质膜的能力。

[0051] 2. 19. 根据方法 2. 18 的鉴定用于治疗或改善抑郁症的 p11 模拟物的方法, 该方法包括测定候选 p11 模拟物将 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体募集至神经元质膜的能力。

[0052] 2. 20. 根据上述方法的任一项的方法, 其中 p11/5-HT 受体相关病症是 p11/5-HT<sub>1B</sub> 受体相关病症。

[0053] 2. 21. 根据上述方法的任一项的方法, 其中 p11/5-HT 受体相关病症是 p11/5-HT<sub>4</sub> 受体相关病症。

[0054] 2. 22. 包含与 p11 启动子有效连接的报告基因的细胞。

[0055] 2. 23. 根据 2. 22 的细胞在根据方法 2-2. 21 的任一项的方法中的用途。

[0056] 在另一个实施方案中, 本发明涉及超表达或欠表达 p11 的转基因非人哺乳动物或其后代, 和它们在开发新药物的方法中的用途 (方法 3)。本发明因此包括:

[0057] 3. 1. p11 敲除的非人哺乳动物, 其中所述非人哺乳动物具有在 p11 基因中具有缺陷、突变或不足的 DNA 序列, 并因此与相同物种的野生型非人哺乳动物相比, 欠表达 p11 蛋白和 / 或在神经元质膜上具有较少的 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体, 从而展示抑郁症样表型。

[0058] 3. 2. p11 转基因非人哺乳动物, 其中所述非人哺乳动物, 与相同物种的野生型非人哺乳动物相比, 超表达 p11 蛋白和 / 或在神经元质膜上展现出提高的 5-HT<sub>1B</sub> 和 / 或 5-HT<sub>4</sub> 受体水平, 并因此展示出过兴奋表型。

[0059] 3. 3. 根据 3. 1 或 3. 2 的非人哺乳动物, 其是小鼠。

[0060] 3. 4. 例如根据 3. 2 或 3. 3 的非人哺乳动物, 其具有包含编码 p11 的编码区的转基因, 其中该转基因与可调型启动子例如多西环素可调型钙 / 钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CamKII) 启动子有效连接。

[0061] 3. 5. 研究 p11/5-HT 受体相关病症或开发用于治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的新型精神病治疗药物的方法, 该方法包括 (1) 向 (a) 根据 3. 1 或 3. 3 的 p11 敲除哺乳动物和 (b) 未患有或未疑似患有任何 p11/5-HT 受体相关病症的相同物种的对照哺乳动物施用所述药物; 和 (2) 评估和比较所述 (a) 基因敲除哺乳动物和 (b) 对照哺乳动物的行为和 / 或 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体的水平。

[0062] 3. 6. 例如根据 3. 4 的研究抑郁症的方法, 该方法包括向 (a) p11 敲除哺乳动物和 (b) 未患有或未疑似患有抑郁症的对照哺乳动物施用抗抑郁药; 和 (2) 评估和比较所述 (a) 基因敲除哺乳动物与 (b) 对照哺乳动物的行为和 / 或 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体水平。

[0063] 3. 7. 用于开发新型抗精神病药物的 p11 小鼠模型, 所述开发包括 (1) 向 (a) 超表

达 p11 的小鼠和 (b) 未患有或未疑似患有任何 p11/5-HT 受体相关病症的对照小鼠施用所述药物 ;和 (2) 评估和比较所述 (a) 转基因小鼠与 (b) 对照小鼠的 p11 水平。

[0064] 3. 8. 研究 p11/5-HT 受体相关病症或开发用于治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的新型精神病治疗药物的方法,该方法包括 (1) 向 (a) 根据 3. 2 或 3. 3 的哺乳动物和 (b) 未患有或未疑似患有任何 p11/5-HT 受体相关病症的相同物种的对照哺乳动物施用所述药物 ;和 (2) 评估和比较所述 (a) 根据 3. 2 或 3. 3 的哺乳动物与 (b) 对照哺乳动物的 p11 水平。

[0065] 3. 9. 用于开发新型抗精神病药物的 p11 小鼠模型,所述开发包括 (1) 向 (a) 超表达 p11 的小鼠,例如根据 3. 2 的小鼠和 (b) 未患有或未疑似患有任何 p11/5-HT 受体相关病症的对照小鼠施用所述药物 ;和 (2) 评估和比较所述 (a) 转基因小鼠与 (b) 对照小鼠的行为和 / 或 p11 或 5-HT 受体的水平。

[0066] 3. 10. 根据上述方法或模型之任一项的方法或模型,其中所测量的或超表达的或欠表达的 5-HT 受体是 5-HT<sub>1B</sub> 受体。

[0067] 3. 11. 根据上述方法或模型之任一项的方法或模型,其中所测量的或超表达的或欠表达的 5-HT 受体是 5-HT<sub>4</sub> 受体。

[0068] 本发明还涉及治疗罹患 p11/5-HT 受体相关病症的患者的方法,该方法包括施用治疗有效量的 p11 调节剂 (方法 4)。

[0069] 4. 1. 方法 4,其中首先按照方法 1-1. 11 的任一项鉴定患者。

[0070] 4. 2. 根据 4 或 4. 1 的方法,其中 p11/5-HT 受体相关病症是与异常低水平的 p11 相关的病症,例如选自抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍或注意缺陷多动症以及阿耳茨海默病。

[0071] 4. 3. 根据 4. 2 的方法,其中病症是抑郁症。

[0072] 4. 4. 根据上述方法 4-4. 3 中的任一项的方法,该方法包括施用按照方法 3,例如使用实施方案 3. 1-3. 11 之任一项鉴定的 p11 调节剂。

[0073] 4. 5. 根据前述方法中的任一项的方法,其中 p11 调节剂选自三环抗抑郁药、选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂和单胺氧化酶抑制剂。

[0074] 4. 6. 根据方法 4. 4 中的方法,其中 p11 调节剂是选自阿米替林 (商品名 :Elavil)、去甲丙咪嗪 (商品名 :Norpramin)、丙咪嗪 (商品名 :Tofranil) 和去甲替林 (商品名 :Aventyl、Pamelor) 的三环抗抑郁药。

[0075] 4. 7. 根据方法 4. 5 的方法,其中 p11 调节剂是丙咪嗪。

[0076] 4. 8. 根据方法 4. 4 的方法,其中 p11 调节剂是选自异卡波肼 (商品名 :Marplan)、苯乙肼 (商品名 :Nardil) 和反苯环丙胺 (tranlcypromine) (商品名 :Parnate) 的单胺氧化酶抑制剂 (MAOI)。

[0077] 4. 9. 根据方法 4. 8 的方法,其中 MAOI 是反苯环丙胺。

[0078] 4. 10. 根据方法 4. 4 的方法,其中 p11 调节剂是选自西酞普兰 (商品名 :Celexa)、依他普仑 (商品名 :Lexapro)、氟西汀 (商品名 :Prozac)、氟苯哌苯醚 (商品名 :Paxil, Pexeva)、舍曲林 (商品名 :Zoloft) 的选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂。

[0079] 4. 11. 根据上述方法 4-4. 10 中的任一项的、治疗或改善罹患 p11/5-HT 受体相关病症的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的 p11 调节剂或模拟物以调节

(上调或下调)p11 的表达和 / 或神经元质膜上的 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体。

[0080] 4. 12. 根据 4. 11 的、治疗或改善罹患与异常低水平的 p11 相关的病症的受试者的方法, 该方法包括向所述受试者施用有效量的 p11 调节剂或模拟物以上调 p11 的表达或将 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体募集至神经元质膜。

[0081] 4. 13. 根据 4. 12 的方法, 其中病症选自抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍或注意缺陷多动症和阿耳茨海默症。

[0082] 4. 14. 根据上述方法中的任一项的方法, 其中 p11/5-HT 受体相关病症是 p11/5-HT<sub>1B</sub> 受体相关病症。

[0083] 4. 15. 根据上述方法中的任一项的方法, 其中 p11/5-HT 受体相关病症是 p11/5-HT<sub>4</sub> 受体相关病症。

[0084] 4. 16. p11 调节剂例如此处描述的调节剂在制造用于治疗 p11/5-HT 受体介导的病症 (例如在方法 4-4. 15 之任一项中) 的药物中的用途。

[0085] 4. 17. 包含 p11 调节剂、用于治疗 p11/5-HT 受体介导的病症, 例如用于方法 4-4. 15 之任一项中的药物组合物。

[0086] 在另一个实施方案中, 本发明涉及用于在罹患 p11/5-HT 受体相关病症的患者中增强 p11 的表达或上调 p11 的方法, 该方法包括在所述患者的脑中施用表达 p11 的核酸或诱导 p11 表达的核酸, 其中所述核酸在所述患者的脑中上调 p11 或增加 p11 的表达 (方法 5)。编码 p11 的核酸或诱导 p11 表达的核酸优选通过载体或通过包含该核酸的细胞递送至患者的脑中。此类载体可以是在适宜递送系统中的 DNA 或 RNA 形式 (例如脂质体包封的 DNA 构建体), 或是病毒载体的形式, 例如复制缺陷型腺病毒载体或腺伴随病毒载体。在一个优选实施方案中, 载体是提供期望转基因的瞬时表达而非将转基因整合至感染的细胞中的病毒载体, 例如来源于腺病毒的载体。载体可以例如包含编码 p11 的 DNA, 该 DNA 与启动子, 例如组成型启动子 (例如, CMV 启动子)、组织特异性启动子 (例如, 神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 启动子) 或诱导型启动子 (例如, 四环素或多西环素诱导型启动子) 有效连接, 所述启动子控制编码 p11 的 DNA 的表达以使 p11 能够在靶细胞中表达。例如, 病毒载体可以是重组修饰的、包含在组织特异性启动子控制下的 p11 DNA 构建体且缺乏复制所必需的一个或多个基因 (例如, E1 和 / 或 E3 基因) 的功能性拷贝的腺病毒, 这样该病毒只能够在辅助细胞系或提供复制所必需的基因 (一个或多个) 产物的其他环境中复制。病毒载体还可包括表面修饰, 从而减少免疫原性和 / 或将载体靶向期望的细胞。适合在 CNS 中用于基因治疗的病毒载体在本领域内是已知的, 例如, 包括靶向 CNS 细胞的载体和使用组织特异性或诱导型启动子以表达转基因的载体, 例如 Benitez, 等人, " Gene Therapy Targeting in Central Nervous System", Current Gene Therapy (2003) 3 :127-145 (通过引用合并入本文) 中描述的载体。非病毒核酸递送系统可包括与有助于核酸跨细胞膜进入细胞的试剂结合或复合的核酸。此类非病毒载体复合物的实例包括具有促进 DNA 浓缩的聚阳离子试剂的制剂、和基于脂质的递送系统, 例如基于脂质体的递送系统。在另一个实施方案中, 通过移植入患者脑中的细胞, 例如神经元干细胞, 递送所述表达 p11 或诱导 p11 表达的核酸, 其中所述细胞比患者的细胞表达更高水平的 p11。细胞的来源可以是患者或人供体。可通过就 p11 的表达进行筛选、和 / 或通过使用 (i) p11 构建体、(ii) 可以增强 p11 表达的位于天然 p11 序列上游的启动子、或 (iii) 编码增强 p11 表达的蛋白质的构建体进行转化, 例如

离体转化,在移植的细胞中实现 p11 的表达。优选,例如使用逆转录病毒或慢病毒载体稳定地转化细胞,以便构建体被整合入细胞的基因组中。细胞或病毒载体还可包含“安全基因”,例如使宿主细胞对丙氧鸟苷 (gancyclovir) 敏感的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (HSV-tk),这样如果细胞变成癌性的或病毒感染患者或存在对患者有害的其它风险时,可容易地破坏细胞或病毒。在一个优选实施方案中,将增强 p11 表达的核酸(例如包含表达 p11 的构建体的细胞或病毒载体)通过脑内施用方式导入靶细胞,例如导入海马区。可以以单次或多次治疗的形式施用核酸。

[0087] 因此,本发明还提供如下方法:

[0088] 5.1 方法 5,其中所述方法增加 p11 的表达。

[0089] 5.2 方法 5 或 5.1,其中核酸构建体能够在脑细胞中表达 p11。

[0090] 5.3 方法 5、5.1-5.2,其中 p11/5-HT 受体相关病症是与异常低水平的 p11 相关的病症,例如选自抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍或注意缺陷多动症和阿耳茨海默病。

[0091] 5.4 方法 5、5.1-5.2,其中 p11/5-HT 受体相关病症是焦虑症或抑郁症。

[0092] 5.5 方法 5、5.1-5.2,其中 p11/5-HT 受体相关病症是抑郁症。

[0093] 5.6 方法 5、5.1 或 5.5,其中通过包含编码 p11 的 DNA 的复制缺陷型腺病毒载体递送所述编码 p11 的核酸。

[0094] 5.7 方法 5.6,其中编码 p11 的 DNA 在组织特异性启动子,例如 NSE 启动子的控制之下。

[0095] 5.8 方法 5、5.1 或 5.5,其中通过转化了 p11 构建体的干细胞递送所述编码 p11 的核酸。

[0096] 5.9 方法 5 或 5.1-5.8 之任一项,其中通过脑内施用,导入所述 p11 的核酸。

[0097] 5.10 方法 5 或 5.1-5.8 之任一项,其中将所述 p11 的核酸导入海马。

[0098] 如此处和所附权利要求中所使用的,除非上下文清楚地另行指出,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数含义。因此,例如,提及“抗体”是指一个或多个抗体和本领域技术人员已知的其等同物,等等。对“一种”p11/5-HT<sub>1B</sub> 受体介导的病症的治疗可包括对多种此类病症的治疗。

[0099] 术语“p11”此处是指来自人或任何其他物种的 p11 多肽的任何形式和所有形式,包括但不限于,部分、同种型、前体形式、全长多肽、包含 p11 序列的融合蛋白或上述任一的片段。

[0100] 术语“p11/5-HT 受体相关病症”此处是指牵涉到 p11 蛋白及其对 5-HT 受体,特别是 5-HT<sub>1B</sub> 或 5-HT<sub>4</sub> 受体的动员、或由之介导、或与之相关、或由之引起、或受之影响、或由之触发的任何病症。p11/5-HT 受体相关病症可包括但不限于,精神病(例如抑郁症、焦虑症、攻击性、躁狂症、双相性精神障碍、注意力缺陷障碍、注意缺陷多动症、阿耳茨海默病、药物成瘾和强迫症)、睡眠障碍(例如,失眠症)、进食障碍(例如贪食症)、性功能障碍、和胃肠道病症(例如肠易激综合症)。“与异常低水平的 p11 相关的病症”此处是指病症例如抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍或注意缺陷多动症、或阿耳茨海默病,特别是抑郁症。同样,“与异常高水平的 p11 相关的病症”是指病症例如躁狂症、双相性精神障碍、焦虑症、攻击性、睡眠障碍、性功能障碍和胃肠道病症。

[0101] 短语“p11 调节剂”是指与相似细胞中的 p11 活性相比,能够改变(增加或减少)编码 p11 蛋白的基因的表达、p11 基因或 cDNA 向 mRNA 的转录、p11 mRNA 向蛋白质的翻译、p11 蛋白的翻译后修饰、p11 蛋白的细胞定位或细胞外定位、或位于细胞膜内或其上或细胞内的 p11 的量的任何物质或化合物(例如此处描述的小分子或多肽)或治疗方法(例如,电惊厥疗法)。术语“p11 调节剂”还指能够影响(正面或负面地)p11 蛋白将 5-HT<sub>1B</sub> 受体募集至神经元质膜的能力的任何物质。用于治疗与异常低水平的 p11 相关的病症例如抑郁症的 p11 调节剂的实例包括三环抗抑郁药(例如丙咪嗪(**Tofranil®**)、阿米替林(**ELAVIL®**、**ENDEP®**、**TRYPTANOL®**)、氯丙咪嗪(**ANAFRANIL®**)、去甲丙咪嗪(**NORPRAMIN®**、**PERTOFRANE®**)、氯苯咪嗪(**GAMANIL®**、**LOMONT®**)、去甲替林(**PAMELOR®**)、三甲丙咪嗪(**SURMONTIL®**))。用于治疗或改善与低水平 p11 相关的病症(例如抑郁症)的其他调节剂包括单胺氧化酶抑制剂(MAOI)(例如反苯环丙胺(Parnate)、异卡波肼(Marplan)、摩氯苯胺(Aurorix, Manerix, **MOCLODURA®**)或苯乙肼(Nardil))和选择性 5-羟色胺重摄取抑制剂(例如,西酞普兰(商品名:Celexa)、依他普仑(商品名:Lexapro)、氟西汀(商品名:Prozac)、氟苯哌苯醚(商品名:Paxil、Pexeva)、舍曲林(商品名:Zoloft))。

[0102] 常规筛选试验(体外和体内)可用于鉴定抑制或诱导 p11 活性和/或 p11 基因表达的调节剂。一个这样的试验是报告基因试验,其中使转染了在 p11 结合位点下游包含标记基因(例如,萤光素酶或绿色荧光蛋白(GFP))的报告基因构建体的细胞与候选调节剂化合物接触,测量标记蛋白的表达改变,将其与未和任何调节剂接触的转染细胞样品比较。将抑制或诱导标记蛋白表达的候选调节剂鉴定为可以用于治疗 p11/5-HT 受体相关病症的药物。抑制标记蛋白表达的候选调节剂是可以用于治疗与异常高水平的 p11 相关的病症的有用药物候选物,而诱导标记蛋白表达的候选调节剂是可以用于治疗与异常低水平的 p11 相关的病症的有用药物候选物。

[0103] P11 调节剂可包括例如游离或可药用盐形式的天然或非天然化学化合物、有义或反义 p11 寡核苷酸、p11 的抑制性抗体、p11-受体阻断肽、p11 拮抗剂、siRNA、三股螺旋 DNA、核酶、RNA 适体和/或双链 RNA。此处所使用的术语“反义”是指与特定的 DNA 或 RNA 序列互补的核苷酸序列。因此,“p11 反义多核苷酸”是指与 p11 DNA 或 RNA 序列互补的任何核苷酸序列。功能上,p11 反义多核苷酸能够减少细胞中 p11 蛋白的表达。术语“反义链”用于指与“有义”链互补的核酸链。可通过任何方法产生反义分子,所述方法包括通过以相反方向将目的基因与允许互补链合成的病毒启动子连接进行的合成。在导入细胞后,该转录的链与细胞产生的天然序列结合,以形成双链体。然后这些双链体阻断进一步的转录或翻译。标记“负”有时用于指反义链,而“正”有时用于指有义链。类似地,此处所使用的术语“有义”是指可被翻译以产生特定多肽或其片段的核苷酸序列。因此,“p11 有义多核苷酸”是指可被翻译以产生 p11 多肽或其片段的任何核苷酸序列。功能上,p11 有义多核苷酸能够增加细胞中 p11 蛋白的表达。

[0104] 特别地,在核酸水平上抑制 p11 表达的物质可以包括指向 p11 核酸中的合适核苷酸序列的核酶、反义寡核苷酸、三股螺旋 DNA、RNA 适体和/或双链 RNA。可由本领域技术人员使用常规技术而无需过度劳动或实验来产生这些抑制性分子。例如,可通过设计针对编码此处所讨论的多肽的基因的调控区,即启动子、增强子和内含子的反义分子、DNA 或 RNA

来获得基因表达的改变（例如，抑制）。例如，可使用来源于转录起始位点（例如，距起始位点 -10 位和 +10 位之间）的寡核苷酸。然而，基因的所有区域均可以用于设计反义分子，以产生对 mRNA 具有最强杂交的反义分子，并且可通过本领域技术人员熟知的标准试验方法制备和鉴定此类合适的反义寡核苷酸。

[0105] 类似地，可使用“三股螺旋”碱基配对方法获得对基因表达的表达抑制。Gee, J. E. 等人 (1994) In :Huber, B. E. 和 B. I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N. Y.)。还可以设计这些分子以使之通过阻止转录物与核糖体结合从而阻断 mRNA 的翻译。还可使用核酶，一种酶促 RNA 分子，通过催化 RNA 的特异切割来抑制基因的表达。核酶的作用机制包括核酶分子对互补的靶 RNA 的序列特异性杂交，以及之后的内切核酸水解断裂。可使用的实例包括基因工程“锤头”或“发夹”基元核酶分子，该核酶分子可以经设计特异性地和有效地催化基因序列例如 p11 基因的内切核酸水解断裂。可通过扫视靶分子寻找包含下列序列的核酶切割位点：GUA、GUU 和 GUC，初步地鉴定任何潜在的 RNA 靶内的特异核酶切割位点。在鉴定后，可以就可能造成寡核苷酸不能行使其功能的二级结构特征，评估相应于包含切割位点的靶基因区域的 15 至 20 个核苷酸的短 RNA 序列。Grassi 和 Marini, 1996, *Annals of Medicine* 28 :499-510 ;Gibson, 1996, *Cancer and Metastasis Reviews* 15 :287-299 ;Cotten 等人, 1989 *EMBO J.* 8 :3861-3866。还可将 RNA 适体导入细胞或在细胞中表达以改变 RNA 丰度或活性。RNA 适体是蛋白质的特异性 RNA 配体，例如针对 Tat 和 Rev 的 RNA (Good 等人, 1997, *Gene Therapy* 4 :45-54)，所述 RNA 可以特异性地抑制它们的翻译。还可使用常规双链 RNA 技术获得基因表达的基因特异性抑制。此类技术的描述可见于 W099/32619，特此将其全文并入作为参考。

[0106] 可通过本领域已知的用于核酸分子合成的任何方法制备本发明的反义分子、三股螺旋 DNA、RNA 适体和核酶。这些方法包括用于化学合成寡核苷酸的技术，例如固相亚磷酸酰胺化学合成。可选择地，可通过体外和体内转录编码此处描述的多肽的基因的 DNA 序列来产生 RNA 分子。可将此类 DNA 序列整合入多种具有合适的 RNA 聚合酶启动子例如 T7 或 SP6 的载体。可选择地，可将组成型或诱导型地合成反义 RNA 的 cDNA 构建体导入细胞系、细胞或组织。

[0107] 对于本发明的 siRNA 分子的制备，可以使两个互补的单链 RNA 分子退火在一起（其中一条单链与靶 mRNA 的一部分匹配）(Fire 等人, 美国专利号 6, 506, 559)，或可以使用能够自身回折以产生需要的双链部分的单个发夹 RNA 分子 (Yu 等人 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :6047-52)。可化学合成 (Elbashir 等人 (2001) *Nature* 411 :494-98) siRNA 分子，或可以通过使用单链 DNA 模板进行体外转录 (Yu 等人, 同上) 产生 siRNA 分子。可选择地，可通过生物方法，使用包含有义和反义 siRNA 序列的表达载体瞬时 (Yu 等人, 同上引文 ;Sui 等人 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :5515-20) 或稳定 (Paddison 等人 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :1443-48) 地产生 siRNA 分子。最近，使用表达发夹 RNA (其可进一步加工成 siRNA) 的腺病毒载体，证实可以在原代人细胞中以有效的和序列特异性的方式减少靶 mRNA 的水平 (Arts 等人 (2003) *Genome Res.* 13 :2325-32)。

[0108] 如此处所使用的，短语“p11 活性”是指 p11 的任何直接的生物化学活性或与 p11 相关以致影响（正面或负面地）p11 与 5-HT<sub>1B</sub> 受体的相互作用的任何间接活性。增加 p11 对 5-HT<sub>1B</sub> 受体的活性的调节剂可以是增加 p11 与 5-HT<sub>1B</sub> 受体的结合从而增加 p11 蛋白将

5-HT<sub>1B</sub> 受体募集至神经元质膜的能力的任何物质。相反地,抑制或减少 p11 对 5-HT<sub>1B</sub> 受体的活性的调节剂可以是阻止或减少 p11 和 5-HT<sub>1B</sub> 受体之间的相互作用从而降低 p11 蛋白将 5-HT<sub>1B</sub> 受体募集至神经元质膜的能力的任何物质。

[0109] 术语“p11 模拟物”是指在结构、功能、性质和 / 或活性上模拟 p11 蛋白从而调节、调控或增加神经元质膜上 5-HT<sub>1B</sub> 受体的可得性的天然或非天然物质或多肽或其任何片段。p11 模拟物可模拟完整的或部分的 p11。

[0110] 术语“受试者”是指任何人或非人生物。

[0111] “对照受试者”是指未患有和 / 或未疑似患有 p11/5-HT 受体相关病症的病症、症状、疾病、病状和 / 或症候的任何人或非人生物。

[0112] 术语“生物样品”可包括包含生物材料的任何样品,所述生物材料获自例如生物、体液、废物、细胞或其细胞的部分、细胞系、生物活检组织、组织培养物或包含 p11 蛋白、多肽、寡核苷酸、mRNA 或多核苷酸或上述之任一的任何片段的其他来源。

[0113] p11/5-HT 受体相关病症的“阳性诊断”是指接受检查的受试者,与未患有和 / 或未疑似患有 p11/5-HT 受体相关病症的对照受试者相比,展现出异常水平的 p11。异常水平是指高于或低于对照受试者中的水平的水平。例如抑郁症的阳性诊断受试者,与未患有和 / 或未疑似患有抑郁症和 / 或其症状的对照受试者相比,展示减少的 p11 水平。在另一个方面,焦虑症的阳性诊断受试者,与未患有和 / 或未疑似患有焦虑症和 / 或其症状的对照受试者相比,展示提高的 p11 表达。

[0114] 可通过测定获自受试者的表达 p11 的组织或细胞类型的样品中的 p11 蛋白来确定 p11 的水平。例如,可使用单核细胞和 / 或淋巴细胞。类似地,还可通过测定样品中 p11 mRNA 的水平来确定 p11 的水平,可使用本领域技术人员熟悉的方法来确定 p11 基因的表达(例如,mRNA 水平),所述方法包括例如常规 Northern 分析或可商购获得的微阵列。此外,可使用基于抗体的 ELISA 测定法或荧光标记反应试验,检测受试化合物对 p11 和 / 或相关调节蛋白的水平的抑制。与参照例如对照受试者或对照群体(或基于之前在对照群体中的测量结果的参照标准)相比,受试者中 p11 蛋白或 mRNA 的异常水平构成对 p11/5-HT 受体相关病症的阳性诊断。因此,与参照相比,受试者中提高的 p11 水平构成对与高水平 p11 相关的病症,例如躁狂症、双相性精神障碍、焦虑症、攻击性、睡眠障碍、性功能障碍和胃肠道病症(例如 IBD)的阳性诊断。另一方面,与对照受试者中的 p11 水平相比,受试者中降低的或减少的 p11 水平构成对与低水平 p11 相关的病症,例如抑郁症、强迫症、药物成瘾、进食障碍、注意力缺陷障碍或注意缺陷多动症的阳性诊断。在一个优选实施方案中,本发明包括诊断患有抑郁症的受试者的方法,该方法包括测定所述受试者的 p11 水平,然后将该水平与对照受试者中的 p11 水平比较,其中与对照受试者中的 p11 水平相比,所述受试者中的 p11 水平的降低构成抑郁症的阳性诊断。

[0115] 如此处所使用的,术语“抗体”是指能够结合表位决定簇的完整分子和其片段,例如 Fa、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv。可使用完整多肽或包含目的小肽的片段作为免疫性抗原,制备结合 p11 多肽的抗体。用于免疫动物的多肽或肽可从 RNA 的翻译产生或化学合成,如果想要,可将其缀合至载体蛋白。与肽化学偶联的常用载体包括牛血清白蛋白和甲状腺球蛋白。然后将偶联的肽用于免疫动物(例如,小鼠、大鼠或兔)。

[0116] 对于优化患者疗法所要考虑的因素包括接受治疗的特定状况、接受治疗的特定哺

乳动物、患者个体的临床状况、活性化合物的递送位置、活性化合物的具体类型、施用方法、施用方案和医生已知的其他因素。这些考虑因素将决定待施用的活性化合物的治疗有效量,所述治疗有效量是治疗 p11 介导的病症,优选抑郁症,所必需的最小量。

[0117] 可从商业来源获得或按照常规方法生产抗 p11 或相关调控蛋白的合适抗体。例如,此处描述了用于产生能够特异性识别一个或多个差异表达的基因表位的抗体的方法。此类抗体可包括但不限于,多克隆抗体、单克隆抗体 (mAb)、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、通过 Fab 表达文库产生的片段、抗独特型 (抗 -Id) 抗体和上述任何抗体的表位结合片段。

[0118] 对于此处描述的 p11 多肽的抗体的产生,可通过注射该多肽或其部分来免疫各种宿主动物。此类宿主可包括但不限于兔、小鼠和大鼠。取决于宿主的物种,可使用不同的佐剂增强免疫反应,所述佐剂包括但不限于弗氏 (完全和不完全) 佐剂、矿物凝胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、多聚醇 (pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔?? 血蓝蛋白、二硝基苯酚和潜在有用的人佐剂例如 BCG (结核菌苗) 和短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。

[0119] 多克隆抗体是从用抗原例如靶基因产物或其抗原性功能衍生物免疫的动物的血清获得的异质抗体分子群。为了产生多克隆抗体,可通过注射补充有上述佐剂的多肽或其部分来免疫宿主动物例如上述动物。

[0120] 可通过任何能够由培养连续细胞系产生抗体分子的技术,获得针对特定抗原的均质抗体群,即,单克隆抗体,此类技术在本领域内是熟知的。此类抗体可以是任何免疫球蛋白类型,包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 和其任何亚型,优选 IgG。可体外或体内培养产生本发明 mAb 的杂交瘤或转化细胞。可选择地,可以适应性修改描述用于产生单链抗体的技术,以便用于产生差异表达的基因 - 单链抗体。单链抗体通过氨基酸桥将 Fv 区的重链片段与轻链片段连接在一起导致单链多肽来形成。

[0121] 可使用标准的 ELISA、FACS 分析和用于体外或体内的标准成像技术,检测此处描述的抗体。可通过将抗体偶联 (即,物理连接) 至可检测的物质上来帮助检测。可检测的物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、3- 半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素 (dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白,合适的放射性材料的实例包括 <sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S 或 <sup>3</sup>H。

[0122] 例如,在典型的正向测定试验中,将未标记的抗体固定在固相基质上,使待检测的样品与结合的分子接触。在合适的温育期 (足以允许抗体 - 抗原二元复合物形成的时间段) 后,加入用能够诱导可检测信号的报告分子标记的二抗,然后温育,允许时间长到足以形成抗体 - 抗原 - 标记的抗体的三元复合物。然后洗去未反应的材料,抗原的存在通过观察信号来确定,或可通过与包含已知量的抗原的对照样品比较来定量。该正向测定试验的变型包括同时测定试验——其中向已结合的抗体中同时加入样品和抗体,或反向测定试验——其中首先将标记的抗体和待检测的样品混合、然后温育和加入未标记的表面结合的抗体。这

些技术对于本领域技术人员来说是熟知的,小变化的可能性是极明显的。如此处所使用的,“夹心试验”意欲包括在基础的两点技术上的所有变型。关于本发明的免疫测定试验,唯一的限制因素是标记的抗体是对于 p11 多肽或相关调控蛋白具特异性的抗体、或其片段。

[0123] 最常使用的报告分子是酶、包含荧光基团或放射性核素的分子。在酶免疫测定试验的情况下,通常通过戊二醛或高碘酸将酶偶联至第二抗体。然而,如很容易认识到的,存在许多种本领域技术人员熟知的不同连接技术。常用的酶包括,例如,辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。与特定的酶一起使用的底物通常基于在相应的酶水解后能产生可检测的颜色变化而选择。例如对-硝基苯基磷酸适合与碱性磷酸酶缀合物一起使用;对于过氧化物酶缀合物,通常使用 1,2-苯二胺或甲苯胺。还可以使用产生荧光产物的发荧光的底物而非上面提及的显色底物。然后向三级复合物中加入包含该合适的底物的溶液。底物与连接至第二抗体的酶反应,产生定性视觉信号,该信号通常可进一步通过分光光度计测量来定量,以给出存在于血清样品中的目的多肽或多肽片段的估计量。

[0124] 可选择地,可将荧光化合物例如荧光素和罗丹明化学偶联至抗体而不改变它们的结合能力。当通过使用特定波长的光进行光照激活时,荧光色素标记的抗体吸收光能,在分子中诱导激发状态,然后以更长的特征性波长发射光。发射表现为可使用光学显微镜目视检测的特征性颜色。免疫荧光和 EIA 技术在本领域中是良好建立的技术,特别优选用于本发明的方法。然而,也可使用其他报告分子,例如放射性同位素、化学发光或生物发光分子。如何改变该操作程序以适应于所需要的用途对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0125] 当抗体意欲用于治疗用途时,优选它们具有人恒定区,以使它们的免疫原性最小化。可以通过将编码来自具有合适抗原特异性的供体抗体分子的可变区的 DNA 与编码人抗体分子的恒定区的 DNA 拼接在一起,产生嵌合抗体。可进一步修饰该抗体以提供经进一步修饰以除去非人残基的人源化抗体。就大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体蛋白),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有想要的特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠或兔子)的 CDR 的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基被相应的非人残基替代。人源化抗体可包含在受体抗体和引入的 CDR 或构架序列中都不存在的残基。产生这些修饰可以进一步精细化和优化抗体的性能。通常,人源化抗体包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的 CDR 区都相应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,且所有或基本上所有的 FR 区都是具有人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。最佳地,人源化抗体还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)——通常是人免疫球蛋白的恒定区或结构域——的至少一部分。可选择地,可以例如使用噬菌体展示技术或转基因动物,例如具有人 IgV 和 IgC 基因的转基因小鼠,从非人来源但使用完全的人免疫球蛋白基因生产抗体,此类抗体应展示出最小的免疫原性。

[0126] 此处所使用的“治疗有效量”是指足以治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的病理效应的药物量。例如足以治疗或改善 p11/5-HT 受体相关病症的病理效应的 p11 调节剂的治疗有效量是足以诱导或抑制 p11 表达或调节(上调或下调)神经元质膜上的 5-HT<sub>1B</sub> 受体水平的量。因此,足以治疗或改善抑郁症的病理效应的 p11 调节剂的治疗有效量是足以诱导 p11 表达或增加 p11 将 5-HT<sub>1B</sub> 受体募集至神经元质膜的能力的量。相反地,足以治疗或改善焦虑症的病理效应的 p11 调节剂的治疗有效量是足以抑制 p11 表达或下调神经元质膜上的 5-HT<sub>1B</sub> 受体的量,可通过本领域内已知的方法,包括静脉内、皮下、肌内、经皮肤或脑内

施用,给予 p11 调节剂。施用可以是快速的(如通过注射)或持续一段时间(如通过缓慢输注或施用缓释制剂)。

[0127] 术语“p11 敲除”是指在 p11 基因中具有完全的或部分的缺陷、改变或突变的 DNA 序列、或无 p11 基因或具有 p11 基因缺陷的 DNA 序列。因此“p11 敲除小鼠”或“p11 敲除转基因小鼠”是指导入所述小鼠的 DNA 在表达 p11 蛋白的基因中包含缺陷、不足、突变或改变。作为 p11 基因缺陷或不足的结果, p11 敲除小鼠与野生型小鼠相比在神经元质膜上具有较少的 5-HT<sub>1B</sub> 受体和 / 或在神经元质膜上展示减少的或无 5-HT<sub>1B</sub> 受体,从而展示抑郁症样表型。术语“基因敲除”可以指与原始基因相比,在任何地方相差 1 个核苷酸至缺失整个基因。可通过使用本领域内已知的技术例如靶向同源重组,产生基因敲除小鼠。

[0128] 术语“重组”是指 DNA 已从天然或内在来源分离并通过化学或酶学方式修饰以缺失掉天然侧翼核苷酸或具有非天然侧翼核苷酸。侧翼核苷酸是在所述核苷酸序列或子序列上游或下游的那些核苷酸。

[0129] 如此处所使用的,“载体”是将重组核酸递送至想要的细胞或组织中的物质,例如可感染、转染或瞬时地或永久地转导细胞的病毒。应认识到,载体可以是裸露的核酸或与蛋白质或脂质复合的核酸。载体任选地包含病毒或细菌核酸和 / 或蛋白质和 / 或膜(例如,细胞膜、病毒脂质包膜等)。为了该应用的目的,载体还可以是包含重组核酸的细胞。应认识到,载体通常包括将目的核酸置于启动子的控制下的表达盒,或可简单地包含侧翼连接靶向性序列的启动子,其中通过所述靶向性序列可以实现在基因(所述基因的表达是想要的)上游的插入。载体包括,但不限于可以与 DNA 片段连接并造成其复制的复制子(例如,质粒、噬菌体)。因此载体包括但不限于 RNA、自主复制的环状 DNA(质粒),包括表达和非表达质粒。当重组微生物或细胞培养物被描述为“表达载体”的宿主时,这包括染色体外环状 DNA 和已整合入宿主染色体的 DNA。当通过宿主细胞维持载体时,载体可以作为自主结构在有丝分裂过程中通过细胞稳定地复制,或可整合入宿主基因组中。

[0130] 短语“核酸序列编码”是指核酸包含当转录和 / 或翻译时可以表达特定蛋白质或肽的密码子。该核酸序列可以额外地包含侧翼序列、内含子和 / 或编码可以随后在翻译后切割的肽的序列。该核酸序列既包括可以转录成 RNA 的 DNA 链序列也包括可以翻译成蛋白质的 RNA 序列。该核酸序列包括全长核酸序列和源于全长序列的非全长序列。还应理解,该序列包括天然序列和使用简并密码子例如以使序列适应于特定宿主细胞中的密码子偏好性的序列。

[0131] 如此处所使用的“核酸”可以是 DNA 或 RNA。核酸还可以包括允许聚合酶正确连续且不改变由该核酸编码的多肽的表达的经修饰核苷酸。

[0132] 实施例

[0133] 实施例 1- 酵母双杂交筛选

[0134] 为了更好地理解 5-HT<sub>1B</sub> 受体的功能,将该受体的第三细胞内环用作酵母双杂交筛选中的诱饵。从全长 cDNA 大鼠脑文库中 PCR 扩增大鼠 5-HT<sub>1B</sub> 受体的第三细胞内环(氨基酸 226-311),然后将其亚克隆入 pAS2- 衍生的诱饵载体的 Nco I/Sal I 位点,以表达为 GAL4 DNA- 结合结构域融合蛋白。通过使用醋酸锂方法将 5-HT<sub>1B</sub> 受体- 诱饵质粒转化入酵母株系 CG1945。使用抗 GAL4 DNA 结合结构域抗体,通过免疫印迹检查融合蛋白的大小和表达水平。将 pACT2 大鼠脑 cDNA 文库转化入酵母株系 Y187。使诱饵和猎物转化体在 YPD 培养基上接

合 (mate), 并铺在对组氨酸报告基因表达具有选择性的培养基 (-LWH) 上。筛选  $244 \times 10^6$  个来自 pACT2 大鼠脑 cDNA 文库的二倍体克隆。在该培养基上培养后, 进行 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基 -D- 半乳糖苷覆层试验。300 多个克隆生长在在选择培养基上且对于  $\beta$ - 半乳糖苷酶报告基因是阳性的。从双阳性克隆制备酵母提取物。通过 PCR (5' -CGCGTTTGAATCACTACAGGG ATG-3' 和 5' -GAAATTGAGATGGTGCACGATGCAC-3' ) 扩增猎物插入物, 使用猎物载体寡核苷酸 (5' -GGCTTACCC ATACGATGTTTC-3' ) 进行测序。通过 BLAST 搜索, p11 被鉴定为主要猎物, 从酵母选择性拯救 p11 猎物质粒克隆, 将其转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 以进行 DNA 扩增, 然后与 (i) 原始 5-HT<sub>1B</sub> 受体 - 诱饵载体、(ii) 诱饵对照载体 (以检测反式激活)、(iii) 两种其他无关的诱饵构建体 pRP21 和 CA115 或 (iv) 相应于 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>5A</sub>、5-HT<sub>6</sub>、D1 或 D2 受体的第三细胞内环的诱饵构建体一起, 再转化入酵母株系 Y187 中, 以检测相互作用的特异性。通过从大鼠脑 cDNA 文库进行 PCR 扩增, 分别制备相应于 5-HT<sub>1A</sub> (氨基酸 218-345)、5-HT<sub>2A</sub> (氨基酸 236-302)、5-HT<sub>5A</sub> (氨基酸 233-295)、5-HT<sub>6</sub> (氨基酸 209-265)、D1 (氨基酸 256-312) 和 D2 (氨基酸 211-343) 受体的诱饵, 然后亚克隆入 pAS2 衍生的载体中。将这些诱饵各与 p11 猎物构建体共转化入酵母, 通过使用 -LW 或 -LWH 培养基和 X-gal 覆层试验分析相互作用。所有共转化体在非选择培养基 (-LW) 对照板上生长。在选择培养基 (-LWH) 上, 可以检测到 p11 与 5-HT<sub>1B</sub> 受体但不与任何其他诱饵有阳性相互作用。

[0135] 29 个双阳性猎物克隆中有 26 个编码 p11 的基因。p11 在该试验中与 5-HT<sub>1B</sub> 受体相互作用但不与 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>5A</sub>、5-HT<sub>6</sub>、多巴胺 D<sub>1</sub> 或多巴胺 D<sub>2</sub> 受体、两个无关诱饵 (CA115 和 pRP21) 或空质粒相互作用, 从而显示 p11 与 5-HT<sub>1B</sub> 受体结合的特异性。

[0136] 实施例 2- 共免疫沉淀

[0137] 将包含内源 p11 (S1) 的 HeLa 细胞培养在 DMEM 培养基中至 60% 汇合, 然后按照厂商的方案用 pcDNA3.1-5-HT<sub>1BR</sub>-V5 或空质粒构建体、利用 Lipofectamine 实施转染。转染后, 在 4°C 溶解 (在 50mM Tris, pH7.4/150mM NaCl/2mM EDTA/2mM EGTA/0.1% Triton 和蛋白酶抑制剂) 细胞提取物。使用抗 V5 单克隆抗体免疫沉淀细胞提取物, 将其与 G 蛋白一起温育, 然后充分清洗。在其他实验中, 在 4°C 将来自野生型和 p11KO 小鼠的大脑皮层的脑组织在溶解缓冲液中匀浆。使用多克隆 5-HT<sub>1B</sub> 受体抗体免疫沉淀大脑提取物, 将其与 A 蛋白一起温育, 然后充分清洗。将来自细胞和大脑组织的免疫沉淀在 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳, 然后转移至 PVDF 膜。使用小鼠抗 p11 单克隆抗体 (1/100) 进行免疫印迹。通过与针对小鼠 IgG 的 HRP 连接的第二抗体一起温育和增强的化学发光来检测抗体结合。

[0138] p11 与 HeLa 细胞和脑组织中的 5-HT<sub>1B</sub> 受体免疫共沉淀。

[0139] 实施例 3- 免疫荧光

[0140] 用 pcDNA3.1-5-HT<sub>1BR</sub> 或 pcDNA3.1-V5 构建体转染 HeLa 细胞。转染后 36 小时, 用 4% 多聚甲醛 /0.01M PBS 固定细胞 10 分钟。通过与 PBS 中的 10% BSA 一起温育来封闭非特异性染色。通过与抗 V5-FITC 抗体 (1/500) 和抗小鼠 p11 抗体 (1/1000) 一起温育, 然后与 Alexa Fluor 568- 标记的山羊抗小鼠第二抗体 (1/500) 一起温育来显现 5-HT<sub>1B</sub> 受体和 p11。在 PBS 中清洗后, 通过使用 Gel/Mount 将盖玻片封于载玻片上。使用激光扫描显微镜获取荧光蛋白的图象。

[0141] 免疫荧光显示细胞表面上 p11 和 5-HT<sub>1B</sub> 受体的显著共定位。

[0142] 实施例 4- 原位杂交实验

[0143] 按照 Rockefeller University、the Karolinska Institute 和美国国立卫生研究院的实验动物管理委员会 (institutional animal care committees) 的指导方针进行所有动物实验。使用来自成年雄性 Sprague Dawley 大鼠的脑, 确定 p11 基因表达的区域分布和其与 5-HT<sub>1B</sub> 受体基因表达的共分布。对于一些实验, 使用来自 p11 KO 小鼠和它们的野生型对应物的脑。为了研究精神药物治疗对 p11 mRNA 表达的影响, 通过赋形剂 (vehicle)、丙咪嗪 (10mg/kg, i. p.)、氟派啶醇 (1mg/kg, i. p.)、地西洋 (5mg/kg, i. p.)、反苯环丙胺 (10mg/kg, i. p.) 或利哌利酮 (1mg/kg, i. p.) 的单次注射或重复注射 (每天一次, 进行 14 天) 处理野生型成年雄性 C57B16 小鼠。在最后的注射后 1 小时处死动物。为了研究电惊厥疗法 (ECT) 对 p11 表达的影响, 通过耳夹电极 (45mA ;0.3 秒) 将雄性 Sprague Dawley 大鼠 (200 克) 每天暴露于 ECT, 共 10 天, 在最后的刺激后 18 小时处死大鼠。对照动物接受假处理, 其中将电极夹在大鼠耳上但不加电流。

[0144] 在丙咪嗪和反苯环丙胺进行 14 天处理后、以及在重复的电惊厥治疗后, 在前脑中存在 p11 mRNA 的上调, 但用氟派啶醇、利哌利酮或地西洋处理未有此上调。

[0145] 实施例 5- 小鼠抑郁症模型以及正常和抑郁症人中的 p11 蛋白水平。

[0146] 用赋形剂或丙咪嗪 (10mg/kg, i. p.) 每天处理野生型成年雄性 C57B16 小鼠一次, 进行 14 天, 在最后的注射后 1 小时处死小鼠。通过耳夹电极 (45mA ;0.3 秒) 将雄性 Sprague Dawley 大鼠每日暴露于 ECT, 进行 10 天, 在最后的刺激后 18 小时处死大鼠。处死成年雌性无助 H/Rouen 小鼠和非无助 NH/Rouen 小鼠。自这 3 个不同的处理组和它们相应的对照, 解剖额叶皮质 (frontal cortice), 然后冷冻。

[0147] 从 Stanley 基金神经病理协会 (Stanley Foundation Neuropathology Consortium) 获得正常对照和重度抑郁症患者的人扣带回皮层的新鲜冷冻组织。在 1% SDS 中对冷冻皮层进行超声, 然后煮沸 10 分钟。保留少量的匀浆物等分试样以用于通过二辛可宁酸蛋白测定法进行的蛋白质测定。

[0148] 通过使用 10-20% 梯度丙烯酰胺凝胶电泳等量的蛋白质。使用抗 p11 的多克隆或单克隆抗体 (对于人样品, 1/1000 ; 和对于啮齿类动物样品, 1/200) 和抗肌动蛋白的多克隆抗血清 (1/1000) 进行免疫印迹。通过增强的化学发光检测抗体结合, 并通过光密度分析法, 使用美国国立卫生研究院 IMAGE1.63 软件定量抗体结合。将 p11 的水平对肌动蛋白的水平进行标准化。所有数据表示为标准化后的水平。

[0149] 为了研究抑郁症的遗传小鼠模型中 p11 mRNA 的调节, 比较来自成年雌性和雄性无助 H/Rouen 小鼠和来自非无助 NH/Rouen 小鼠的前脑组织, p11 mRNA 和蛋白质在 H/Rouen 小鼠中显著更低。对于两种性别, 发现相似的结果。

[0150] 从 Stanley 基金神经病理学协会获得正常对照和重度抑郁症患者的人扣带回皮层的 40  $\mu$ m 厚冷冻切片。所分析的样品来自两种性别 (在正常组和抑郁症组中都是 6 名女性和 9 名男性), 年龄 29-68 岁 (正常) 和 30-65 岁 (抑郁症)。抑郁症患者中疾病的持续时间从 1 年至 42 年不等。抑郁个体中有 7 名死于自杀。从死亡至脑组织被冷冻前的间隔时间是 8-42 小时 (正常) 和 7-47 小时 (抑郁症), 并且组织的 pH 是 5.8-6.6 (正常) 和 5.9-6.5 (抑郁症)。通过 PCR 分别扩增大鼠 5-HT<sub>1B</sub> 受体基因的编码序列的核苷酸

1159-1420、小鼠或人 p11 基因的编码序列的核苷酸 1-293 和大鼠 p11 基因的编码序列的核苷酸 1-287, 以制备原位杂交探针。将不同的 PCR 片段亚克隆入 pCRII-TOPO 载体。除了关于人组织的研究外, 对于所有其它研究制备 12- $\mu$ m 厚的冷冻切片。将切片与 [ $^{35}$ S] UTP 标记的核糖核酸探针杂交, 其中通过从相应于之前描述的大鼠 5-HT<sub>1B</sub> 受体基因或小鼠、大鼠或人 p11 基因 (S5) 的 cDNA 体外转录, 制备所述核糖核酸探针。在杂交后, 以切片曝光 Biomax MR 胶片 7 至 24 天, 使用 NIH Image 1.63 软件进行分析。除非另有指出, 否则在边缘前皮层/前扣带回皮层中进行分析。将一些切片浸入 Ilford K5 乳剂中以进行细胞分析。在 8 周后, 对切片进行显影、尼氏染色和封片。

[0151] 与 H/Rouen 小鼠相似, 在罹患单相重度抑郁症的患者的前扣带回皮层中 p11 mRNA 和蛋白质下调。

[0152] 实施例 6-p11/5-HT<sub>1B</sub> 受体共转染实验。

[0153] 用 p11 (pcDNA3.1-p11)、用 5-HT<sub>1B</sub> (pcDNA3.1-5-HT<sub>1B</sub>R-V5)、用多巴胺 D<sub>1</sub> 受体 (pcDNA3.1-D<sub>1</sub>R-VS) 或空质粒转染包含低水平 (如果有的话) 天然 p11 的 COS 7 细胞。在冰上将包含 1mg/ml 磺基-NHS-LC-生物素的培养基与涂板的 COS 7 细胞一起温育 30 分钟。在 TBS 中漂洗细胞以淬灭生物素反应。在 300  $\mu$ l 改进的 RIPA 缓冲液 (1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸, 50mM NaPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM NaF, 10mM 焦磷酸钠, 1mM 原钒酸钠, 1mM PMSF 和 1mg/ml 亮抑酶肽) 中裂解细胞。在 4°C 以 14,000g 离心匀浆物 15 分钟。取出 15  $\mu$ l 的上清液以测量 5-HT<sub>1B</sub> 受体的总水平。将剩余上清液与 100  $\mu$ l 50% Neutravidin 琼脂糖一起在 4°C 温育 3 小时, 短暂离心。收集包含胞质 5-HT<sub>1B</sub> 受体的上清液。此后, 用 RIPA 缓冲液清洗琼脂糖珠 3 次, 在最终的短暂离心后, 将结合的蛋白重悬浮于 40  $\mu$ l 的 SDS 样品缓冲液中并且煮沸。使用抗 V5 (以检测 5-HT<sub>1B</sub> 受体; 1:1000) 和抗 p11 (1:1000) 抗体对总的胞质的和生物素化的 (表面) 蛋白进行定量 western 印迹。通过增强的化学发光, 然后通过放射自显影, 检测免疫反应条带。使用 NIH Image 1.63 软件定量条带的强度。对每一个孔计算表面/总体比率。对照实验证实细胞内蛋白质肌动蛋白在该试验中不被生物素化。

[0154] 用 5-HT<sub>1B</sub> 受体和 p11 共转染的细胞比单独用 5-HT<sub>1B</sub> 受体转染的细胞在细胞表面展示更多的 5-HT<sub>1B</sub>。相反地, 在 p11 存在或不存在的条件下, 表面对总体多巴胺 D<sub>1</sub> 受体的比率相似。

[0155] 实施例 7- 测量 COS 7 细胞中的 cAMP

[0156] 用 5-HT<sub>1B</sub> 受体和 / 或 p11 转染培养在 DMEM 培养基上的 COS7 细胞。36 个小时后, 用茶碱 (5mM) 和帕吉林 (10  $\mu$ M) 预处理细胞 15 分钟。然后加入包含或不包含 5-羟色胺 (10  $\mu$ M) 的赋形剂或福斯高林 (10  $\mu$ M), 再处理另外 15 分钟。在处理结束时, 除去包含药物的培养基, 在 PBS 中洗涤孔, 收获细胞。按照厂商说明书使用直接的 cAMP 酶免疫测定试剂盒定量 cAMP 的形成。对照实验显示 5-羟色胺在未转染的 COS 7 细胞中不改变 cAMP 的形成。

[0157] 5-羟色胺 (10mM) 在用 5-HT<sub>1B</sub> 受体转染的 COS-7 细胞中抵消福斯高林诱导的 cAMP 形成的能力在存在共转染的 p11 的情况下得到增加。在有或无 p11 的情况下, cAMP 对福斯高林的反应无显著的差异。将数据相对于福斯高林刺激的条件 (有或无 p11 的情况) 进行标准化, 数据表示为平均 TSEM。

[0158] 实施例 8- 超表达 p11 的转基因小鼠的产生和分析。

[0159] 产生转基因小鼠, 所述转基因小鼠具有在钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CamKII) 启动子控制下的多西环素调控性 p11 超表达。使用 PCR 将小鼠 p11 与 Myc 表位标签融合, 然后亚克隆入 pTet-splice(S6) 的 Sal I/HindIII 位点。将该质粒 (pTetOp-p11-Myc) 转染入表达 tTA 的 CHO 细胞 (由 DrPatrick Allen 惠赠)。使用抗 Myc (1:1000) 抗体, 通过免疫印迹在这些细胞的提取物中确认 Myc 的表达。在确认 p11-Myc 表达后, 线性化 DNA 片段 (包含 pTetOp-p11-Myc、SV40 内含子和 poly(A)+ 信号), 通过电洗脱进行纯化 \ 和将其显微注射入来自 C57BL6 小鼠的卵母细胞的原核, 然后植入假孕的 C57BL6/CBA 小鼠 (Rockefeller University Transgenic Facility)。通过 PCR (5' -TATAGTCGACATGATGCCATCCCAAATGG-3' 和 5' -TATAAAGCTTCTACAAATCTTCTTCAGAAATCAATTTTGTTCAGATTTCTTCCCCTTCTG-3' ) 分析尾 DNA 中的转基因。将对于 pTetOp-p11-Myc 构建体是阳性的建立者小鼠与 C57BL6 小鼠杂交, 从而产生 F1 小鼠。通过使 F1 同胞杂交获得 F2 纯合 pTetOp-p11-Myc 转基因小鼠。(通过将它们与野生型小鼠杂交来确认纯合基因型)。将这些小鼠与在 CamKII 启动子 (S7) 下表达 tTA 的 C57BL6 小鼠杂交。使用上述引物 (以检测 p11-Myc) 以及 5' -GAGCTGCTT AATGAGGTCG GAATC-3' 和 5' -TCTAAAGGGCAAAGTGAGTATGG-3' (以检测 tTA), 通过 PCR 对小鼠进行基因分型。通过使用抗 Myc 抗体进行免疫印迹和通过针对小鼠 p11 基因的原位杂交来确认 p11-Myc 在双重转基因小鼠中的超表达 (图 S2)。使用原位杂交, 用针对 tTA 的编码区的核糖核酸探针 (由 Dr Alexei Morozov, Columbia University 惠赠), 检测 CamKII 驱动的 tTA 的表达 (图 S2)。在行为实验中, 将双重转基因小鼠与不表达或表达一个转基因以用作对照小鼠的同窝出生仔畜比较。在实验前, 一些双重转基因小鼠从它们的饮用水中接受多西环素 50mg/l, 18 天。

[0160] 在多西环素不存在的情况下, 转基因小鼠在前脑中不包含 5-羟色胺的神经元中具有提高的 p11, 但在缝核中的 5-羟色胺神经元中不具有提高的 p11。这些小鼠在黑质中具有增加的功能性 5-HT<sub>1B</sub> 受体, 在开放场试验中展示减少的趋触性 (焦虑相关痛苦的指标) 和增加的水平活动。它们还在尾悬挂试验中显示减少的不动性 (抑郁症样状态的指标)。因此, 超表达 p11 的小鼠的行动就好像用抗抑郁药对它们进行过治疗一样, 尽管一个令人困惑的因素是它们显得通常过度活跃。用多西环素处理的转基因小鼠具有标准化的 p11 表达 (图 S4), 不具有趋触性、不动性或水平活动的显著改变。

[0161] 实施例 9 : p11 敲除小鼠的产生和分析

[0162] p11 KO 小鼠的产生和分析。使用来自大鼠 p11 的编码序列的探针, 通过 BAC 文库筛选分离出 6 个基因组克隆。从 BAC 克隆亚克隆 13.7-kb Bam HI 片段, 通过限制性内切酶分析对该片段作图。小鼠 p11 基因包含一个含有 ATG 的外显子、一个 3.5-kb 内含子, 之后是另一个外显子和终止密码子。在 pBSK(-) 中产生跨 p11 基因的该包含 ATG 的外显子的 11.3 kb 打靶载体 (5' Hinc II-Bgl II+[Bam HI-loxPNeoloxP-Kpn I]+Apa I\* -EcoRV 3' ) (图 S5)。通过电穿孔将该打靶载体导入 129SvEv ES 细胞, 然后通过 G418 筛选重组克隆。在对分别用 Spe I 和 Bam HI/Sal I 消化的 ES 细胞的 DNA 的分析中, 使用 5' 和 3' 外部探针 (分别地, 300-bp BamHI/Bsp M1 片段和 285-bp Bam HI/Scal I 片段) 通过 southern 印迹将 ES 克隆鉴定为同源重组阳性。将阳性克隆注射入 C57BL/6 胚胎, 将嵌合雄性与 C57BL/6 雌性小鼠交配, 以获得种系的传递。使杂合后代交配从而产生基因敲除小鼠和野生型小鼠。

来自尾部 DNA 的 Southern 印迹确认两个等位基因在 p11KO 小鼠中都发生突变 (图 S5)。使用抗小鼠 p11 基因的探针,通过原位杂交进一步确认了在 p11 敲除小鼠中不存在 p11 基因 (图 S5)。开发使用下列寡核苷酸: 5' -CATTAGAGGTGAACCCTGCTGAGGG-3'、5' -CCTGTCA GCCACTCTATATGCTCCTAATC-3' 和 5' -GGCCAGCTCATTCCTCCC ACTCATG-3' 的 PCR 方法,以区分野生型、杂合子和基因敲除小鼠 (图 S5)。该基于 PCR 的方法用于常规的基因分型。除了使用原代皮层培养物的研究外,在从杂合子育种产生的 p11 KO 和野生型同窝出生仔上进行所有其它实验。杂合子 x 杂合子育种产生了 29% 的野生型、53% 的 p11 杂合子和 18% 的 p11 KO 小鼠。还不清楚为什么存在较少的 KO 小鼠,但已发现 p11 参与早期胚胎植入 (S8)。将杂合 p11 小鼠与 C57B16 小鼠回交两代。使用 104 个特异性 C57B16 标记 (Rockefeller University Genomics ResourceCenter) 进行微卫星基因分型,显示用于实验动物育种的杂合 p11 小鼠具有  $74 \pm 2.8\%$  的 C57B16 背景。

[0163] 定量受体放射自显影。从 p11 KO 和野生型小鼠制备冷冻切片 ( $12 \mu\text{m}$  厚)。通过在包含拮抗剂 [ $^{125}\text{I}$ ] 氰基咪唑洛尔 (cyanopindolol) (0.3、1、3、10、30、100 pM; 2200 Ci/mmol)、100nM 8-OH-DPAT (作为 5-HT<sub>1A</sub> 阻断剂) 和 30  $\mu\text{M}$  异丙基肾上腺素 (作为  $\beta$ -肾上腺素能受体阻断剂) 的 170mM Tris/150mM NaCl pH 7.4 (25°C) 中温育切片两小时来检测 5-HT<sub>1B</sub> 受体 (S9)。通过在 100  $\mu\text{M}$  5-羟色胺存在的情况下的测量,确定非特异性结合。在置换实验中,将浓度不断增加的 5-羟色胺 (0、0.3、1、3、10、30、100、300、1000、10000nM) 与 10pM [ $^{125}\text{I}$ ] 氰基咪唑洛尔如上述一起温育。还通过将切片在具有拮抗剂 [ $^3\text{H}$ ]GR125743 (0.3、1、3、10、30nM; 80Ci/mmol; GE Healthcare) 的 170mM Tris/4mM CaCl<sub>2</sub>/0.1% 抗坏血酸 pH7.4 (25°C) 中温育 2 小时,检测 5-HT<sub>1B</sub> 受体。通过在 100  $\mu\text{M}$  5-羟色胺存在的情况下的测量,确定非特异性结合。通过在 50mM Tris pH7.4, 4mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> 和 0.1% 牛血清白蛋白 (包含拮抗剂 [ $^3\text{H}$ ]8-羟基-(二-正丙基氨基)-四氢萘 ([ $^3\text{H}$ ]8-OH-DPAT; 10nM; 125Ci/mmol; GE Healthcare)、300 nM SB-269970 (作为 5-HT<sub>7</sub> 受体阻断剂)) (25°C) 中温育切片 1 小时,检测 5-HT<sub>1A</sub> 受体。通过在 100  $\mu\text{M}$  5-羟色胺存在的情况下的测量,确定非特异性结合。通过在 25mM Tris/100mM NaCl/1mM MgCl<sub>2</sub>/1  $\mu\text{M}$  帕吉林/20nM 米安舍林/0.001% 抗坏血酸 (包含拮抗剂 [ $^3\text{H}$ ]7-氯-2,3,4,5-四氢-3-甲基-5-苯基-1H-3-苯并氮杂卓-7-醇 ([ $^3\text{H}$ ]SCH 23390; 2nM; 87.0 Ci/mmol)) 中温育切片 2 小时,检测 D1 样受体。通过在 100  $\mu\text{M}$  SKF82958 存在的情况下的测量,确定非特异性结合。通过用 170mM Tris/120mM NaCl/5mM KCl/2mM CaCl<sub>2</sub>/1mM MgCl<sub>2</sub>/10  $\mu\text{M}$  GTP/0.001% 抗坏血酸 (包含拮抗剂 [ $^3\text{H}$ ]雷氯必利 (raclopride) (5nM; 72Ci/mmol)) 温育切片 1 小时,检测 D2 样受体。通过在 100  $\mu\text{M}$  喹吡罗 (quinpirole) 存在的情况下的测量,确定非特异性结合。在所有放射自显影实验结束时,在相应的冷的结合缓冲剂中漂洗切片 2 次,每次 5 分钟,在 4°C 将切片浸入蒸馏水中,然后在冷空气中干燥。将切片和 [ $^{125}\text{I}$ ] 或 [ $^3\text{H}$ ] 微量标准 (microscale) 置于 Biomax MR 胶片上 3-5 天 ([ $^{125}\text{I}$ ] 氰基咪唑洛尔) 或 4-10 周 ([ $^3\text{H}$ ]GR125743、[ $^3\text{H}$ ]8-OHDPAT、[ $^3\text{H}$ ]SCH23390、[ $^3\text{H}$ ]雷氯必利)。使用 NIH Image 1.63 成像分析系统,在几个脑区域获得光密度测量。通过从总的结合中数字扣除非特异性结合,以计算特异性结合。使用从 [ $^3\text{H}$ ] 或 [ $^{125}\text{I}$ ] 微量标准产生的标准曲线将光密度转化成飞摩尔/毫克蛋白质。使用非线性回归方程分析从饱和及置换实验中获得的数据。

[0164] 放射自显影配体结合实验显示在 p11 KO 的苍白球中存在比野生型小鼠少的

5-HT<sub>1B</sub> 受体拮抗剂放射性配体 [<sup>125</sup>I] 碘氰咪唑洛尔 (iodocyanopindolol) 和 [<sup>3</sup>H]GR125743 的结合位点。类似地, [<sup>125</sup>I] 碘氰咪唑洛尔的结合在 p11 KO 的黑质网状部中比在野生型小鼠中低 (77.3±5.8 对 98.8±6.2 fmol/mg 蛋白质; P < 0.05, Student t 检验)。在野生型和 p11 KO 小鼠之间, 5-羟色胺置换结合的 [<sup>125</sup>I] 碘氰咪唑洛尔的亲和力没有差异 [中值有效浓度 (EC<sub>50</sub>) 值: 57 对 52nM]。在野生型和 p11 KO 小鼠之间在 5-HT<sub>1A</sub>、D1 或 D2 受体的量上没有检测到差异。相对 NH/Rouen 小鼠, [<sup>125</sup>I] 碘氰咪唑洛尔结合在 H/Rouen 小鼠中也减少。

[0165] 响应 5-HT<sub>1A</sub> 或 5-HT<sub>1B</sub> 受体刺激的 [<sup>35</sup>S]GTP γ S 结合。在 Tris-HCl 50mM (pH 7.4) (补充有 100mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EGTA, 2mM GDP 和 1U/ml 腺苷脱氨酶) 中预孵育来自野生型、p11 KO 和 p11 转基因小鼠的新鲜冷冻切片 (12 μm) 30 分钟, 以除去内源腺苷。此后在 25°C 在包含 40pM [<sup>35</sup>S]GTP S 的相同溶液 (具有 (刺激条件) 或不具有 (基础条件) 50 μM 的 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂, 即, 8-OH-DPAT 或 5-HT<sub>1B</sub> 受体激动剂, 即, 安吡托林 (anpirtoline)) 中温育切片 2 小时。在来自与 10 μM 未标记的 GTP S 温育的相邻切片的放射自显影照片上确定非特异性标记 (背景)。在 50mM Tris-HCl 缓冲液中漂洗切片 2 次 (每次 3 分钟), 在蒸馏水中漂洗 1 次 (30 秒), 以除去缓冲液盐, 然后空气干燥。通过在 Biomax MR 胶片上曝光 2-4 天, 获得放射自显影照片。使用 NIH Image 1.63 成像分析系统在几个脑区域获得光密度测量。

[0166] p11 KO 小鼠中细胞膜上 5-HT<sub>1B</sub> 受体受体数目的减少反映在 5-HT<sub>1B</sub> 受体激动剂安吡托林在这些小鼠的苍白球中增加 [<sup>35</sup>S] 鸟苷 5' -O-(3' -硫代三磷酸 (GTP-S) 结合的能力减小。相反地, 通过 8-OH-DPAT [(+/-)-8-羟基-2-(二-正丙基氨基) 四氢萘] (5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂) 引起的 [<sup>35</sup>S]GTP-S 结合在野生型和 p11 KO 小鼠中没有差异 (6.0±2.1 对 5.0±2.0 光密度单位)。p11KO 小鼠的细胞表面上功能性 5-HT<sub>1B</sub> 受体数目的减少反映在 5-羟色胺和安吡托林在来自 p11 KO 小鼠的原代皮层培养物中下调磷酸 -Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-ERK1/2 (细胞外信号调控的激酶) 水平的能力的丢失、或安吡托林在来自 p11 KO 小鼠的纹状体切片中减少磷酸 -Ser<sup>9</sup>- 突触蛋白 I (被 cAMP 依赖性蛋白激酶磷酸化的位点) 的能力的丢失。

[0167] 检测原代皮层培养物中磷酸化 ERK1/2 的 Western 印迹。从产生自 WT x WT 或 p11 KO x p11 KO 育种的 E18 小鼠取出皮层, 使其接受胰蛋白酶作用 (0.25%), 通过研磨将其分散, 然后铺在包被有多聚 L 赖氨酸 (1mg/ml) 的 6 孔板上。将培养物 (500,000 个细胞/ml) 培养在包含 DMEM 和 5% 胎牛血清、4mM L-谷氨酰胺、B-27 营养增补剂、青霉素 (5U/ml) 和链霉素 (5 μg/ml) 的培养基中。两周后, 用赋形剂、5-羟色胺 (10 μM) 或安吡托林 (10 μM) 处理培养物 15 分钟。在处理结束时, 除去包含药物的培养基, 在冰冷的 PBS 中漂洗孔, 通过细胞刮棒取下神经元, 将其在液氮中冷冻。将冷冻的细胞样品在 1% SDS 中进行超声, 煮沸 10 分钟。保留小量匀浆物等分试样, 以用于通过二辛可宁酸蛋白质测定法进行蛋白质测定。如所描述的 (S10), 使用 10% 丙烯酰胺凝胶电泳等量的蛋白质。使用磷酸化状态特异性的抗磷酸 -Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>-ERK1/2 抗体或对磷酸化状态不具有特异性的抗总 ERK1/2 抗体进行免疫印迹。通过增强的化学发光检测抗体结合, 并使用美国国立卫生研究院 IMAGE 1.63 软件通过光密度分析法定量。将 ERK1/2 的磷酸化形式的水平相对于其总水平进行标准化。所有数据表示为标准化后的水平。

[0168] 在脑切片中检测磷酸化突触蛋白 I 的 Western 印迹。如所描述的 (S10), 从野生型

和 p11 KO 小鼠制备纹状体切片 (300  $\mu$  m)。在恒定的充氧状态 (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) 下, 在 30°C 在 Krebs 缓冲液 (118mM NaCl/4.7mM KCl/1.5mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/25mM NaHCO<sub>3</sub>/11.7mM 葡萄糖/1.3mM CaCl<sub>2</sub>) 中预孵育切片 60 分钟, 其中在 30 分钟后更换缓冲液。用赋形剂或安吡托林 (50  $\mu$  M) 处理切片 2 分钟。在药物处理后, 除去缓冲液, 在干冰上快速冷冻切片, 在 1% SDS 中进行超声, 然后煮沸 10 分钟。保留小的匀浆等分试样以用于通过二辛可宁酸蛋白质测定法进行蛋白质的测定。用 10% 丙烯酰胺凝胶电泳等量的蛋白质。使用对磷酸化状态具有特异性的抗磷酸-Ser<sup>9</sup>-突触蛋白 I (被 PKA 和 CamKII 磷酸化的位点) 的兔多克隆抗体或对磷酸化状态不具有特异性的兔多克隆突触蛋白 I 抗体进行免疫印迹。通过增强的化学发光检测抗体结合, 并使用美国国立卫生研究院 IMAGE 1.63 软件通过光密度分析法定量。将突触蛋白的磷酸化形式的水平相对于其总水平进行标准化。所有数据表示为标准化后的水平。

[0169] 电生理学。在 fluorothane 麻醉下将雄性 p11 KO 和野生型小鼠 (4-7 周龄) 去头。快速取出它们的脑, 使用微型切片机制备包含伏核的冠状脑切片 (400  $\mu$  m 厚)。在 32°C 在充氧 (95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>) 的人工脑脊液 (aCSF) (包含 (以 mM 表示): 126 NaCl、2.5 KCl、1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.3 MgCl<sub>2</sub>、2.4 CaCl<sub>2</sub>、10 葡萄糖和 26 NaHCO<sub>3</sub>、pH7.4) 中温育切片至少 1 小时。将切片转移至安装在直立式显微镜上的记录室, 在 28°C 用充氧的 aCSF 持续灌注。使用置于切片表面上装有 aCSF 的玻璃微量吸液器记录伏核中细胞外场电位。信号通过 Axopatch 200B 放大器放大 500 倍、以 10kHz 采集, 以 2kHz 过滤, 并使用采集和 pClamp9 数据分析软件记录在计算机上。在切片表面上使用置于记录电极附近的同心双极刺激电极, 诱发突触反应。施予切片的刺激的强度与 fEPSP 幅度的相关性在 WT 和 p11 KO 小鼠中是相似的, 从而证明谷氨酸能 12 突触传递在 WT 和 p11 KO 小鼠之间无差异。通过测量由递增刺激强度诱发的场电位波幅, 针对每个切片建立刺激/反应曲线, 通过该曲线估计可以产生 50% -70% 最大反应的强度, 以此强度每 15 秒施加单个刺激 (0.1ms 持续时间) 一次。为了评估 5-羟色胺受体激活对谷氨酸能突触传递的影响, 在灌流液中施加 5-羟色胺, 同时测量 fEPSP/PS 幅度。

[0170] 在来自 WT 小鼠的切片中 5-羟色胺 (50  $\mu$  M; 在 10  $\mu$  M 氟西汀存在的情况下) 抑制 fEPSP/PS 的幅度 (72 $\pm$ 2.7% 的基线值), 而在来自 p11 KO 小鼠的切片中该效应被消除 (98 $\pm$ 3.6% 的基线值)。数值表示为平均值  $\pm$  SEM。通过转换三通阀在灌流液中施加药物。

[0171] 5-羟色胺通过 5-HT<sub>1B</sub> 受体在源于大脑皮层的神经元的末梢减少谷氨酸的释放并在皮质纹状体突触处抑制突触传递。监测通过短暂电刺激谷氨酸能神经纤维诱发的、并在伏核中于细胞外记录到的、场兴奋性突触后电位 (f EPSPs) 的幅度。

[0172] 在野生型和 p11 KO 小鼠中, f EPSPs 由被内源谷氨酸 (通过对切片的电刺激而释放) 激活的 AMPA 受体介导 [在施用 AMPA 受体拮抗剂 6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮 (CNQX) 后 15 分钟, 与基线相比, fEPSP/群峰电位 (PS) 分别减少 77 和 81%]。当 5-羟色胺施加于灌流液中时, 其在来自野生型小鼠的切片中但不在来自 p11 KO 小鼠的切片中使 f EPSP/PS 幅度降低。

[0173] 单胺化合物和代谢物的组织含量。通过聚焦微波辐射处死雄性 p11KO、p11 杂合子和野生型小鼠 (n = 8/ 基因型), 解剖纹状体、皮层和海马, 在干冰上冷冻。然后在 10 倍体积的 0.1N TCA 中对组织样品进行超声, 涡旋, 然后以 12,000g 离心 2 分钟。收集上清液, 使

用偶联电化学检测器的HPLC(HPLC-EC)分析上清液中的5-羟色胺和5-羟色胺代谢物5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)。使用碱灭活二氧化硅-Hypersil 5  $\mu$ m C18分析柱(4.6x150mm),以1.2ml/分钟的流速,用由75mM磷酸二氢钠、350mg/L 1-辛基磺酸钠盐、0.5mM EDTA、0.8%四氢呋喃(HPLC级,无抑制剂)和8%乙腈、pH3(用磷酸调节的)组成的流动相,分离5-羟色胺和5-HIAA。使用具有双玻璃碳电极的电化学检测器(电极1 = 680mV,范围,0.5nA;电极2 = -100mV,范围,0.2nA)。使用计算峰高和样品浓度的EZChrom软件收集数据。对于5-羟色胺和5-HIAA的灵敏性是0.1pmol/ml。

[0174] 5-HT<sub>1B</sub>受体作为自身受体起作用并抑制5-羟色胺释放。因为p11在缝核中表达,因此在野生型和p11 KO小鼠中测量投射区,即,皮层、纹状体和海马中的5-羟色胺和其代谢物5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)的量。与5-HT<sub>1B</sub>受体对5-HT更新和/或代谢的负调控作用以及p11对5-HT<sub>1B</sub>受体功能的加强作用相符,p11 KO小鼠具有增加的5-羟色胺更新和/或代谢水平。

[0175] 行为分析-开放场分析。在白天在完全计算机化的、多笼(multicage)、红光和红外光敏感性运动检测系统中测量水平活动30分钟(每隔5分钟分析结果)。以周围活动值(peripheral activity value)除(13)总的水平活动值以确定趋触性。在使用安吡托林(5mg/kg, i. p.)的实验中,在注射后15分钟检测动物。一些安吡托林处理的小鼠已接受每天丙咪嗪(10mg/kg, i. p.)注射,持续4周直至实验前一天。

[0176] 行为分析-尾悬挂试验。如所描述的(S11),进行尾悬挂试验(抗抑郁药样活性的模型),所述尾悬挂试验是针对C57B16(S12)和NMRI小鼠(S13)经验证的改进形式。使用胶带(距尾尖的距离为2cm)通过尾巴将小鼠单个悬挂至水平杆(距地面35cm)。典型地,小鼠表现出几种以逃生为导向的行为,其间交替有时间递增的静止回合。对6分钟的试验期进行录像,由不知道基因型的观察者评分。记录的参数是静止所持续的秒数。在使用安吡托林(5mg/kg)和丙咪嗪(10mg/kg)的实验中,注射后15分钟检测动物。

[0177] 行为分析-蔗糖消耗试验。在单个笼养的p11 KO小鼠和野生型小鼠中使用单瓶法(single bottle procedure)检测蔗糖消耗。在96小时的时期中测量2%的蔗糖水溶液的消耗。在随后的实施中,测量水的摄取,进行同样长的时间。

[0178] 为了评估p11缺失的行为影响,在未接触过药物的小鼠中以及在已长期接受丙咪嗪处理的小鼠中,在基础条件下以及在响应安吡托林的情况下,比较野生型和p11 KO小鼠的趋触性。在用丙咪嗪处理的动物中,安吡托林在野生型小鼠中但不在p11 KO小鼠中引起趋触性的显著减少(图4G)。此外,在注射盐水的野生型中也存在比p11 KO小鼠少的趋触性(图4G)。未接触过药物的野生型小鼠和p11 KO小鼠在安吡托林不存在或存在的情况下均展示出相似的趋触性。在尾悬挂试验中,在基线条件下和在使用安吡托林或丙咪嗪急性处理后,p11 KO小鼠与野生型小鼠相比都存在增加的不动性(图4H)。这些行为结果表明p11 KO小鼠展示抑郁症样表型以及p11通过5-HT<sub>1B</sub>受体介导对丙咪嗪的行为响应。进一步支持p11 KO小鼠的抑郁症样表型的是,p11 KO小鼠比它们的野生型同窝出生仔消耗更少的可口的2%蔗糖溶液(1.74 $\pm$ 0.07对2.17 $\pm$ 0.11 ml/g体重/天;P < 0.05 Student t检验),这表明减少的对甜奖赏的反应性。在p11 KO小鼠和它们的野生型同窝出生仔中水摄取相似(1.51 $\pm$ 0.05对1.42 $\pm$ 0.05ml/g体重/天),这排除了改变的体液平衡在该行为中的作用。

[0179] 实施例 10 :在人外周血单核细胞 (PBMC) 中检测 p11

[0180] 在肝素化试管中收集全血 (10-15ml)。1ml 血将产生大约 1milj 单核细胞,但个体之间此数目存在相当大的变化。在基于磷酸盐的盐水 (PBS) 中 1:1 稀释血液。向 15ml 试管中加入 2.5ml lymphoprep (Medinor cat nr1114547), 将 10ml 稀释的血液小心地铺在顶上。在室温以 1800rpm 离心试管 20 分钟。通过使用巴斯德吸管,从两个试管收集 PBMC,放入一个干净的 15ml 试管。在该试管中加入 PBS,以 1500rpm 离心 10 分钟。然后在 PBS 中清洗细胞两次 (除去血小板和 lymphoprep)。为了计数,每初始的 10ml 全血体积,在 1ml 介质 (90% 胎牛血清 /10% DMSO) 中稀释 PBMC。(以 1:10 在台盼蓝中计数稀释)。在 -80°C (干冰) 或冷却器中冷冻 PBMC,然后贮存,并在 -80°C 运送。向 96 孔板中加入每孔 0.5milj PBMC。对板离心,弃去上清液。在 BD 固定缓冲液 (BD Biosciences, 来自试剂盒产品编号 554715) 中固定细胞。加入来自相同试剂盒的透化缓冲液,清洗细胞。细胞现已准备好用于细胞内染色。将 p11 抗体 (BD Biosciences ;2.5ug/ml) 在透化缓冲液中进行稀释,然后加入孔中。一个孔用于 IgG1 对照。通过抽吸使细胞悬浮。温育细胞 30 分钟,然后在透化缓冲液中进行清洗。在透化缓冲液中稀释第二抗体 (过量 (ex) 山羊抗小鼠 PE 缀合的),然后将其加入至各孔。悬浮细胞,温育 30 分钟。用透化缓冲液清洗两次,用 PBS-1% FCS 清洗一次。对于双重染色,通过用 100ul PBS-1% FCS-1% NMS (正常小鼠血清) 清洗一次来封闭第二抗体。封闭步骤对于避免随后的抗体与任何剩余的第二抗体结合是必需的。为了对表面标记染色,向各个孔中加入包含 CD14-PerCP (以区分单核细胞) 或 CD3-PerCP 和 CD56-PE (以区分 T 细胞和 NK 细胞) 或 CD19-FITC (以区分 B 细胞) 的 PBS。通过抽吸悬浮细胞,然后在冰箱中温育 10 分钟。然后用 200ul PBS-1% FCS 清洗它们一次。使用标准的 FACS 方法确定不同类型的单核细胞中 p11 的染色,p11 在一些白细胞、单核细胞、NK 杀伤细胞和 CD8+T 细胞中高度表达。

专利名称(译)	新型治疗和诊断产品及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101466410B</a>	公开(公告)日	2013-03-06
申请号	CN200780022116.3	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
当前申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
[标]发明人	P斯韦宁松 P格林加德		
发明人	P·斯韦宁松 P·格林加德		
IPC分类号	A61K49/00 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	A01K2227/105 A01K2217/052 G01N2800/30 C12Q2600/158 A01K2217/075 C12Q1/6883 C12N15/8509 A01K2267/0356 G01N2500/04 C07K14/4721 G01N33/942 G01N33/6896 A01K2217/20 A01K67/0276 G01N2500/00 C07K2319/41 A01K67/0275 G01N2800/304 C12N2830/003 C12Q2600/136 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P15/00 A61P15/10 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 Y10T436/143333 C12N15/09 C12Q1/6886 G01N33/53 A61K49/0008 C12Q1/6876 C12Q2600/106 C12Q2600/178 G01N33/68 G01N2333/46 G01N2500/10		
代理人(译)	陈润杰		
优先权	60/813170 2006-06-13 US 60/878730 2007-01-05 US		
其他公开文献	CN101466410A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及p11用作p11/5-HT受体相关病症的药物标靶和用作诊断、治疗和研发p11/5-HT受体相关病症的工具的用途。本发明还涉及p11敲除动物和p11转基因动物以及它们作为用于开发新型精神病治疗药物的模型的用途，以及诊断、预防和治疗p11/5-HT受体相关病症的方法。