

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2016年11月3日 (03.11.2016)



(10) 国际公布号  
WO 2016/172955 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/078070
- (22) 国际申请日: 2015年4月30日 (30.04.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 江苏挪贝肽医药科技有限公司 (JIANGSU NUO-BETA PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省南通市如东高新技术产业开发区科创园, Jiangsu 226499 (CN)。
- (72) 发明人: 黄福德 (HUANG, Fude); 中国上海市浦东新区张江高科技园区海科路 99 号, Shanghai 201210 (CN)。 张潇 (ZHANG, Xiao); 中国上海市浦东新区张江高科技园区海科路 99 号, Shanghai 201210 (CN)。 王文安 (WANG, Wenan); 中国上海市杨浦区控江路 1665 号, Shanghai 200092 (CN)。 刘海燕 (LIU, Haiyan); 中国上海市浦东新区张江高科技园区海科路 99 号, Shanghai 201210 (CN)。
- (74) 代理人: 北京奉思知识产权代理有限公司 (F&S INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区知春路 6 号锦秋国际大厦 B 座 1402 室, Beijing 100191 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

### 本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR SCREENING DRUG AND THERAPEUTIC TARGET USED FOR TREATING ALZHEIMER'S DISEASE

(54) 发明名称: 一种筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物和治疗靶点的方法

(57) Abstract: Disclosed is the use of genetic means or a related inhibitor to inhibit and down-regulate the amount of PI4KIII $\alpha$  protein, RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B membrane proteins, TTC7 protein and membrane protein complexes formed by said proteins, or related enzyme activity to promote A $\beta$  secretion by neuronal cells, reduce A $\beta$  accumulation within neurons, and thereby reduce AD model fruit fly and mouse nerve dysfunction.

(57) 摘要: 本发明公开了利用遗传手段或相关抑制剂抑制下调 PI4KIII $\alpha$  蛋白、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 膜蛋白、TTC7 蛋白以及它们形成的膜蛋白复合体的数量或其相关的酶活性能够促进神经元细胞的 A $\beta$  分泌并减少神经元内的 A $\beta$  积累, 从而减轻 AD 模型果蝇和小鼠神经功能障碍。



WO 2016/172955 A1

# 说明书

一种筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物和治疗靶点的方法

## 5 关于资助研究的声明

本发明是在国家科技部 973 项目（2013CB530900）和国家自然科学基金委面上项目（81371400 和 81071026）资助下完成。

## 10 技术领域

本发明属于医药领域，涉及利用相关抑制剂来下调 PI4KIII $\alpha$  激酶及其与 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白和 TTC7 蛋白形成的膜蛋白复合体从而治疗阿尔茨海默病的方法；另一方面，本发明涉及根据是否促进细胞的 A $\beta$  分泌来筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物及治疗靶点的方法。

## 背景技术

20 阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）是老年人中最常见的神经退行性疾病，以进行性学习记忆能力丧失为特征。突触功能异常和丢失在 AD 早期发生，被广泛认为是 AD 学习记忆障碍的一种主要细胞机制，A $\beta$ （尤其是 A $\beta$ <sub>42</sub>）的积累在其中起着重要作用。然而，尽管对大量的旨在抑制 A $\beta$  产生和促进其清除的许多化合物或分子进行了临床试  
25 验，但还未发现一种化合物或分子可以改善学习记忆或阻止学习记忆障碍进一步恶化。一种可能的解释是这些药物或治疗方法没有改变导致 AD 学习记忆障碍的关键病理变化，对 A $\beta$  在 AD 中积累的各个方面的认识还待深入。

A $\beta$  不仅在细胞外，也在神经元内积累。大量的证据提示 A $\beta$  在神经元的多种细胞内器官中积累，且参与了突触障碍、淀粉样斑块形成、神经元死亡等 AD 病理变化。另外，被认为对突触和认知功能最具破坏力的寡聚状 A $\beta$  在细胞内形成并在 AD 病人和 APP 转基因小鼠的大脑神经元内积累或细胞膜中积累。这些膜偶联的 A $\beta$  可能扎住在神经元的细胞膜或胞内的细胞器膜上。导致神经元 A $\beta$  积累的途径可能有多种，比如胞外 A $\beta$  内吞、胞内产生的 A $\beta$  分泌减少而滞留、自噬泡产生并积累 A $\beta$ 、胞内 A $\beta$  清除下降。

尽管 A $\beta$  在细胞内外积累，但 AD 病人和处于 AD 早期的病人的脑脊液 A $\beta_{42}$  浓度是减低的，约为对照人群的一半。在 AD 模型小鼠中，脑脊液和脑组织液的 A $\beta_{42}$  浓度也呈月龄依赖性减低，脑组织液中也检测不到 A $\beta$  二聚体。人们推测脑脊液和脑组织液的 A $\beta_{42}$  浓度减低可能是由于胞外淀粉样斑块摄取、A $\beta_{42}$  分泌减少、A $\beta_{42}$  在神经元或大脑细胞膜中积累所致。

已有研究结果揭示，磷脂通过与 A $\beta$  相互作用或通过多种细胞和分子过程参与 AD 病理变化，包括：1) A $\beta_{42}$  能插入脂质膜与酸性磷脂相结合，结合的酸性磷脂则促使 A $\beta_{42}$  由无序向  $\beta$  折叠的构型转变，从而导致 A $\beta_{42}$  在脂质膜上或膜内聚合；2) 培养细胞的细胞膜上的 4,5 二磷酸磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol 4,5-phosphate, PIP2）水平与细胞分泌 A $\beta_{42}$  的量呈负相关；3) A $\beta_{42}$  表达引起的果蝇神经元功能障碍和学习记忆障碍可通过抑制 PI3K 而被修复。

在果蝇中 *rolling blackout (rbo)* 基因编码一个与二酯酰甘油裂解酶具有一定同源性的膜蛋白 RBO。RBO 蛋白在果蝇的磷脂代谢、视觉细胞的光传导、突触传递和散装的内吞（bulk endocytosis）中起作用。RBO 蛋白从酵母到人都保守。RBO 在酵母中的同源蛋白（EFR3）和小鼠的两个同源蛋白（EFR3A 和 EFR3B）在细胞膜上与 III $\alpha$  型磷脂酰肌醇 4 激酶（PI4KIII $\alpha$ ）和一个脚手架蛋白（在哺乳动物中称为

Tetratricopeptide repeat domain 7, TTC7, 参见 Baird D, Stefan C, et al., 2008, J Cell Biol; Nakatsu F, Baskin JF, et al., 2012, J Cell Biol) 形成复合体, 从而将 PI4KIII $\alpha$  锚泊在细胞膜上, 并进一步调控细胞膜上 4 磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol 4-phosphate, PI<sub>4</sub>P) 和 PIP<sub>2</sub> 的水平。

5

在果蝇中, 泛神经元表达与分泌信号肽融合的 A $\beta$ <sub>42</sub> 导致神经元内 A $\beta$ <sub>42</sub> 积累和神经退行性改变。之前, 发明人在成虫果蝇的一个简单神经通路, 即巨纤维通路 (giant fiber pathway, GF) 中表达含有分泌信号肽的 A $\beta$ <sub>42</sub>, 发现 A $\beta$ <sub>42</sub> 在神经元内积累, 并导致了日龄依赖 (age-dependent) 的突出传递失败和运动能力下降等障碍。这种表达 A $\beta$ <sub>42</sub> 的果蝇为研究一些可能与 AD 相关的基因在神经元内 A $\beta$ <sub>42</sub> 积累及其引起的突触障碍中的作用提供了很好的平台。有鉴于此, 发明人利用该模型检测了基因 *rbo*、PI4KIII $\alpha$  及 *ttc7* 的突变或过量表达, 以及常用的 PI4KIII $\alpha$  蛋白抑制剂对该模型中神经退行性病变的影响。发明人还在 APP / PS1 转基因小鼠中, 研究了敲减 *rbo* 基因的一个小鼠同源基因 *Efr3a* 对海马神经元萎缩, 以及利用常见的 PI4KIII $\alpha$  激酶的小分子抑制剂 PAO 灌胃对学习记忆、脑脊液中和大脑实质的细胞膜组分中 A $\beta$ <sub>42</sub> 浓度的影响, 以及下调 PI4KA 基因 (编码 PI4KIII $\alpha$  蛋白) 对学习记忆的影响, 以及 PI4KIII $\alpha$  的产物 PI<sub>4</sub>P 对 A $\beta$ <sub>42</sub> 在脂质体中形成聚合体的影响。

10

15

20

### 发明内容

本发明公开了利用遗传手段或相关抑制剂抑制下调 PI4KIII $\alpha$  蛋白、RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 膜蛋白、TTC7 蛋白、以及它们形成的膜蛋白复合体的数量或其相关的酶活性能够促进神经元细胞的 A $\beta$  (尤其是 A $\beta$ <sub>42</sub>) 分泌并相应减少了神经元内的 A $\beta$  积累, 从而可以减轻 AD 模型果蝇和小鼠的神经功能障碍。本发明因此揭示了神经元的 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌在 AD 治疗中的重要作用, 为治疗 AD 提供了全新的策略; 同时, 本发明也提供了治疗 AD 的新药物, 并为进一步筛选治疗 AD 的药物和治疗靶

25

30

点指明了新方向。

一方面，本发明提供了一种筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述方法包含筛选能提高细胞分泌  $A\beta$  水平的候选  
5 药物或治疗靶点。

根据本发明的一个具体实施例，所述筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，包括以下步骤：1) 将所述药物应用于过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系或果蝇组织或调节过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系或果蝇组织中的所述治疗靶点；  
10 以及 2) 利用免疫分析方法检测所述过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系或果蝇组织中细胞分泌  $A\beta$  的情况，其中，如果所述药物的应用或治疗靶点的调节能导致细胞分泌  $A\beta$  的量增加，则所述药物或治疗靶点可用于治疗阿尔茨海默病。优选地，所述的筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法中，所检测的  $A\beta$  为  $A\beta_{42}$ ；所述  
15 检测  $A\beta$  的分泌情况的免疫分析方法为酶联免疫吸附剂测定或电化学发光免疫分析方法；所述过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系为稳转人源 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的 HEK293T、N2a 或 SH-SY5Y 细胞系，或者所述过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的果蝇组织为  
20 果蝇三龄幼虫组织。

#### 附图说明

图 1 示出 *rbo* 基因突变缓解表达  $A\beta_{arc}$  的果蝇的神经功能损伤，减低 PI4KIII $\alpha$  蛋白的表达量或减弱了 PI4KIII $\alpha$  蛋白与 RBO 蛋白的相互作用。  
25 用。

图 2 示出下调 PI4KIII $\alpha$  蛋白表达量或药物抑制 PI4KIII $\alpha$  酶活性缓解表达  $A\beta_{arc}$  的果蝇的神经功能损伤。

图 3 示出下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  蛋白表达量或功能降低神经元内  $A\beta$  的积累。

30 图 4 示出下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  蛋白表达量或功能促进  $A\beta_{42}$  的分泌。

图 5 示出在 APP/PS1 和对照小鼠中敲减 *Efr3a* 基因对海马 CA3 和 DG 区神经元的树突的直径和树突棘密度的影响。

图 6 示出 PAO 处理对 APP/PS1 小鼠和对照小鼠的学习和记忆能力以及脑脊液和大脑细胞膜偶联的  $A\beta_{42}$  水平的影响。

5 图 7 示出 *rbo* 基因突变缓解表达  $A\beta_{42}$  的果蝇的神经功能损伤。

图 8 示出 *rbo* 基因和 *shibire* 基因突变分别对过表达  $A\beta_{arc}$  或果蝇 Tau 蛋白的果蝇的运动能力和寿命的影响。

图 9 示出 *rbo*<sup>S358A</sup> 基因和 *itpr*<sup>SV35</sup> 基因突变对表达  $A\beta_{arc}$  果蝇的影响。

10 图 10 示出敲减 *Efr3a* 基因对 N2a 细胞内吞细胞外  $A\beta_{42}$  的影响和 *rbo* 基因及 *PI4KA* 基因突变对  $A\beta_{arc}$  表达果蝇中  $A\beta_{arc}$  转录的影响。

图 11 示出在 HEK293 细胞或小鼠原代培养的海马神经元中敲减 *Efr3a* 基因或 *PI4KA* 基因的效率。

图 12 示在 APP/PS1 小鼠的一个拷贝 *PI4KA* 基因中插入转座子明显改善小鼠的学习和记忆能力。

15 图 13 示  $PI_4P$  促进  $A\beta_{42}$  在脂质体中形成寡聚体。

图 14 示 PAO 对 APP 表达量和  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  分泌酶活性的影响。

图 15 示 *ttc7* 基因突变和过量表达对  $A\beta_{arc}$  果蝇的神经功能损伤的影响。

## 20 具体实施方式

本发明中，包括说明书和权利要求书，除非特别说明，使用的下列术语具有如下的含义：

25 本发明所用的术语“*rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因”是指源自果蝇的 *rbo* 基因、源自酵母的 *Efr3*、或源自哺乳动物 *Efr3a* 基因以及 *Efr3b* 基因；本发明所用术语“RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白”是指源自果蝇的 *rbo* 基因、源自酵母的 *Efr3* 基因、或源自哺乳动物的 *Efr3a/Efr3b* 基因所编码的蛋白。

30

本发明所用的术语“*PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因”是指源自果蝇或哺乳动物的 *PI4KIII $\alpha$*  基因或 *PI4KA* 基因；本发明所用术语“*PI4KIII $\alpha$*  蛋白”是指果蝇或哺乳动物中由 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因所编码的蛋白。

5 本发明所用的术语“*ttc7* 基因”是指源自哺乳动物的 *ttc7* 基因；本发明所用术语“*TTC7* 蛋白”是指前述哺乳动物中由 *ttc7* 基因所编码的蛋白。

10 本发明所用的术语“抑制剂”是指能够起到降低、减少、或消除目标物的数量、特定功能、以及特定性质的物质。所述目标物可以为蛋白、多肽、核酸等，而所述抑制剂以所述目标物的数量、特定功能以及特定性质为直接或间接的作用对象，可以使得所述目标物的数量、特定功能以及特定性质产生相应的降低、减少或消除。所述抑制剂可以为蛋白、多肽、核酸、小分子化合物等。

15 例如，本发明所用的术语“*PI4KIII $\alpha$*  抑制剂”是指能够降低、减少、消除 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因的表达、转录、翻译，和/或其形成的 *PI4KIII $\alpha$*  蛋白的稳定性、与膜蛋白 *RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B* 以及 *TTC7* 蛋白的结合能力、以及具有的磷酸激酶活性等各方面的各类物质，包  
20 括但不限于对 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因特异的抑制性核苷酸、抗 *PI4KIII $\alpha$*  蛋白抗体、能够抑制 *PI4KIII $\alpha$*  激酶活性的小分子化合物，和/或能够抑制 *PI4KIII $\alpha$*  蛋白与其他膜蛋白相互作用的各种物质等。

25 类似地，本发明所用的术语“*RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B* 抑制剂”是指能够抑制、降低、消除 *rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因的表达、转录、翻译、和/或其形成的 *RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B* 蛋白的稳定性、其与 *PI4KIII $\alpha$*  蛋白的结合能力等各方面的各类物质，包括但不限于对 *rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因特异的抑制性核苷酸、抗 *RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B* 蛋白的抗体、以及能够抑制  
30 *RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B* 蛋白与 *PI4KIII $\alpha$*  蛋白形成复合体的各种物质。

5 本发明所用的术语“TTC7 抑制剂”是指能够降低、减少、消除 *ttc7* 基因的表达、转录、翻译、和/或其形成的 TTC7 蛋白的稳定性、与膜蛋白 RBO\EFR3\EFR3A\EFR3B 的结合能力等各方面的各类物质，包括但不限于对 *ttc7* 基因特异的抑制性核苷酸、抗 TTC7 蛋白抗体、和/或能够抑制 TTC7 蛋白与膜蛋白 RBO\EFR3\EFR3A\EFR3B 相互作用的各种物质等。

10 同样，本发明所用术语“PI<sub>4</sub>P 抑制剂”是指能够抑制、降低、消除细胞膜上 PI<sub>4</sub>P 数量水平的各类物质，包括但不限于抗 PI<sub>4</sub>P 抗体、以及能与 PI<sub>4</sub>P 特异结合的 OSH2-PH2X 融合蛋白或者 OSH2-2x-PH 融合蛋白等。

15 本发明所用的术语“抗体”，是指结合特定表位的任何免疫球蛋白或完整分子以及其片段。所述抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、以及完整抗体的片段和/或部分，只要这些片段或部分保留亲本抗体的抗原结合能力。例如，本发明中，“抗 PI4KIII $\alpha$  抗体”是指能特异性地结合 PI4KIII $\alpha$  蛋白，或其功能变体或功能片段的单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体和其具有免疫活性的片段或部分。本发明中，诸如“PI4KIII $\alpha$  抗体”、“抗 PI4KIII $\alpha$  抗体”以及“针对 PI4KIII $\alpha$  的抗体”这样的术语均可以互换使用。

25 本发明中，“功能变体”是指本发明的蛋白或多肽，其氨基酸序列上一个或多个氨基酸发生了改变。所述改变可以是“保守性”改变（其中取代的氨基酸具有相似结构或化学特性）也可以是“非保守性”变化；类似的变化还可包括氨基酸缺失或插入或两者均有。但这些氨基酸残基的改变或氨基酸的缺失或插入，均不应实质性地改变或破坏原氨基酸序列的生物学或免疫学活性和功能。类似地，本发明中，“功能片段”是指本发明的蛋白或多肽的任何部分，所述部分保留其作为

30

一部分的蛋白或多肽（即“亲本”蛋白或多肽）的基本相似或相同的生物学或免疫学活性和功能。

5 本发明所用的术语“抑制性核苷酸”是指能够结合并抑制特定基因表达的核苷酸化合物。典型的抑制性核苷酸包括但不限于反义寡核苷酸（antisense oligonucleotides）、三链螺旋 DNA（triple helix DNA）、RNA 适配体（aptamers）、核酶（ribozymes）、短抑制核糖核苷酸（siRNA）、短发夹 RNA（shRNA）和 microRNA。这些核苷酸化合物能以比对于其他核苷酸序列更大的亲和力与所述特定基因相结合，从而抑制特定  
10 基因的表达。

本发明所用术语“小分子化合物”是指一种分子量小于 3 千道尔顿的有机化合物，该有机化合物可以是天然的或者是化学合成的。本发明所用术语“衍生物”是指通过一种或多种化学对母体有机化合物进行修饰所产生的化合物，其与母体有机化合物具有相似的结构，  
15 在功能上具有相似的效果。本发明所用术语“类似物”则是指这样一类有机化合物，其并不一定是通过对母体有机化合物进行化学修饰而获得的，但其从结构上看与母体有机化合物相似，且在功能上也具有相似的效果。

20

本发明所用术语“阿尔茨海默病”（AD）是指一种以进行性学习记忆障碍为突出临床症状的老年性神经退行性疾病。大部分 AD 患者在中晚期有神经细胞外 beta 淀粉样斑块，细胞内有 Tau 蛋白组成的神经纤维缠结、或突触及神经细胞丢失。该疾病既可存在于人，也可存在于动物，比如狗。  
25

本发明所用术语“ $A\beta$ ”是指与由淀粉样前体蛋白（Amyloid Precursor Protein, APP）经分泌酶剪切而产生的一系列长度在 38-48 个氨基酸之间的多肽，主要是  $A\beta_{38}$ 、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{44}$  和  $A\beta_{45}$  等氨基酸序列相同的多肽。本发明中，利用特定的表达系统， $A\beta$  也可以通过利用转基因  
30

或病毒载体感染细胞等方法表达的 A $\beta$  融合蛋白经其它蛋白剪切酶剪切而来，比如 A $\beta$  的 N 端可以与来源于果蝇 necrotic 基因编码的蛋白的分泌信号肽（氨基酸序列：MASKVSILLLLTVHLLAAQTFAQDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA）（SEQ ID NO: 1）或来源于大鼠 Proenkephalin 前体（pre-proenkephalin）的分泌信号肽（氨基酸序列：MAQFLRLCIWLLALGSCLLATVQA（SEQ ID NO: 2））等组成的融合蛋白。

本发明所用术语“A $\beta$  分泌”是指 A $\beta$  在细胞内或细胞膜产生后经由细胞膜排出到胞外的过程，该过程可导致细胞内的 A $\beta$  积累减少。其中，“A $\beta_{42}$  分泌”是专门指 A $\beta_{42}$  在细胞内或细胞膜产生后经由细胞膜排出到胞外的过程，该过程可导致细胞内的 A $\beta_{42}$  积累减少。

本发明所用术语“治疗靶点”是指可用于治疗某种疾病的各种物质及其在动物体或人体的作用目标。所述物质作用于所述作用目标可以起到治疗该种疾病的效果。所述物质可以为蛋白、多肽、核酸、小分子化合物等各类物质，所述作用目标可以是某个基因（包括基因的特定位点）、某个蛋白（包括蛋白的某个特定位点）、某种蛋白复合体（包括其特定的结合部位）等这样的物质实体，也可以是前述基因和/或蛋白的某种特性、某种功能、某种与周边物质、环境的相互关系等，只要所述物质能够影响该基因、蛋白、蛋白复合体，或其特定的特性、功能、相互关系等，从而能够起到治疗该疾病的作用。

本发明所用的术语“治疗”是指逆转、减轻或抑制该术语所应用的疾病的进展，或疾病的一种或多种症状。如本文所使用的，根据患者的状况，该术语也包括预防疾病，包括预防疾病或与其相关的任何症状的发作，以及减轻病症或其在发作前的任何病状的严重性。

本发明所用术语“抑制”、“削弱”、“下调”、“消除”等均是指数量或程度上的减少或减轻。这种减少或减轻并不限于任何幅度，

只要表现出这种趋势即可。例如，该种减少或减轻相对于原来的数量或程度可以是 100%，也可以是 50%，也可以是 1%甚至更少。

5 本发明揭示了下调 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白、TTC7 蛋白或 PI4KIII $\alpha$  蛋白的表达、削弱 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白、TTC7 蛋白、与 PI4KIII $\alpha$  蛋白之间的相互作用、以及抑制 PI4KIII $\alpha$  的酶活性等一系列行为均可改善表达 A $\beta$ <sub>42</sub> 的神经细胞随着年龄的增长而出现的突触功能减退和丢失等缺陷，并且公开了这些作用是通过促进神经细胞的 A $\beta$ （尤其是 A $\beta$ <sub>42</sub>）分泌，减少神经细胞膜或神经细胞内的 A $\beta$ （尤其是 A $\beta$ <sub>42</sub>）累积所致。

10 例如，本发明中，发明人发现敲减 *Efr3a* 基因可以减少 APP/PS1 双转基因小鼠的海马神经元树突和棘的萎缩，而用一种常用的 PI4KIII $\alpha$  蛋白抑制剂一氧化苯砷（Phenylarsine Oxide, PAO）进行灌胃则可以明显改善 APP/PS1 小鼠的学习和记忆能力，减少了脑组织细胞膜偶联的 A $\beta$ <sub>42</sub> 尤其是聚合状 A $\beta$ <sub>42</sub> 的含量，尽管该过程同时伴随有脑脊液中 A $\beta$ <sub>42</sub> 含量增加。这些结果揭示，APP/PS1 小鼠的痴呆症状可以通过促进神经元的 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌，减少神经元内或神经元细胞膜上 A $\beta$ <sub>42</sub>（特别是聚合状 A $\beta$ <sub>42</sub>）的累积而得到改善。

20 发明人发现，通过遗传方法适度下调细胞或神经元内 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白、TTC7 蛋白、以及 PI4KIII $\alpha$  蛋白的表达，或阻止它们形成蛋白复合物以减少 PI4KIII $\alpha$  蛋白的膜上分布，或抑制 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶活性，均能起到促进细胞或神经元的 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌，减少神经元内 A $\beta$ <sub>42</sub> 积累，缓解 AD 相关的神经退行性改变以及功能障碍的作用，但同时，无论是 A $\beta$ <sub>42</sub> 或 APP 的表达量，还是剪切 APP 的  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶的活性，均未受到明显影响。发明人另外还发现，PI4KIII $\alpha$  蛋白的产物 PI<sub>4</sub>P 在脂质体中促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 单体聚合形成多聚体，且该促进作用比 PI<sub>4</sub>P 的前体（PI）和其衍生物 PI<sub>4,5</sub>P 的促进作用要强很多。

25

30

发明人认为， $A\beta$ （包括  $A\beta_{42}$ ）产自于细胞质膜上或细胞内器官，而产生的  $A\beta$  可能通过被动释放、胞吐、溶酶体介导的释放、或其它还未被发现的途径被分泌出细胞。但是，不管  $A\beta$  产自于哪儿，如何被分泌，细胞质膜应是  $A\beta$  离开细胞必须经过的最后通路。由于  $A\beta$  的疏水性，在细胞质膜上， $A\beta$  一方面插入疏水的脂肪酸链区，另一方面又与磷脂酰肌醇（尤其是磷酸化磷脂酰肌醇中的  $PI_4P$ ）和其他酸性磷脂相互作用，这种作用促使  $A\beta$  从无序构型向  $\beta$  折叠构型转变，进而聚集形成  $A\beta$  聚合体沉积于膜上或随后被内吞而在细胞内积累。此外，研究表明，可溶  $A\beta$ （包括  $A\beta_{42}$ ）聚合体与细胞膜或脂质体膜的亲和力要比  $A\beta$  单体强许多。因此，形成聚合体的  $A\beta$  将更容易累积在细胞膜上。

$PI_4P$  是细胞膜上磷酸化磷脂酰肌醇的主要组成成分之一，其对  $A\beta$  聚合体形成的促进作用比  $PI$  和  $PI_{4,5}P$  的作用要强。本发明中，发明人发现， $PI_4P$  对处于脂质中的  $A\beta_{42}$  形成聚合体的促进作用呈现明显的剂量依赖性。下调  $RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B$  蛋白、 $TTC7$  蛋白或  $PI4KIII\alpha$  蛋白的表达，抑制它们之间形成复合物，或者抑制  $PI4KIII\alpha$  蛋白的激酶功能，均将减少细胞膜上  $PI_4P$  的生成量。因此，下调  $RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B$  蛋白、 $TTC7$  蛋白和/或  $PI4KIII\alpha$  蛋白的表达，或阻止  $RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B$  蛋白、 $TTC7$  蛋白和  $PI4KIII\alpha$  蛋白形成附着在膜上的蛋白复合体，或抑制  $PI4KIII\alpha$  蛋白相应的磷酸激酶功能，均将实质性地降低细胞质膜上磷酸化磷脂酰肌醇（尤其是  $PI_4P$ ）的含量，从而削弱细胞质膜上  $A\beta$ （包括  $A\beta_{42}$ ）与磷酸化磷脂酰肌醇的相互作用，从而导致细胞质膜上的  $A\beta$  更多地以无序的  $A\beta$  单体形式存在。如前所述，这种无序形式的  $A\beta$  单体和膜的亲和力低，很容易被从膜上释放出来而分泌到细胞外。因此，上述调节行为能在  $APP$  表达量和  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶活性无明显变化的情况下，有效地减低胞内  $A\beta$  的积累，并导致胞外  $A\beta$  水平明显增多。

已有研究报导发现，果蝇细胞内  $A\beta_{42}$  的累积可激活  $PI3K$  和与之相

5 关的 PI3K/Akt 信号通路，从而诱发 AD 相关的突触功能损害和长期记忆缺失；相应地，相关研究认为抑制 PI3K 的活性也可以作为治疗 AD 的手段。但本发明中，发明人认为细胞中 A $\beta$ <sub>42</sub> 的累积并不是因磷脂酰肌醇激酶(包括 PI3K)激活其所相关联的 PI3K/Akt 信号通路所造成的，而更直接地是因细胞质膜上磷脂酰肌醇激酶被激活后磷酸化膜上的磷脂酰肌醇所导致的结果；此外，本发明所涉及的磷脂酰肌醇激酶主要为 PI4K，而并非涉及 PI3K/Akt 信号通路的 PI3K。例如，发明人发现，采用针对 PI4K 具有较高特异性但对 PI3K 不敏感的磷脂酰肌醇激酶抑制剂，例如 PAO，在较低浓度下即可以有效地促进细胞的 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌。

10

因此，本发明揭示，为了实现治疗 AD 的目的，可以采用促进 A $\beta$  分泌，尤其是促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌的方式，以减少 A $\beta$ （包括 A $\beta$ <sub>42</sub>）在神经细胞内或细胞膜上的累积。但是，增加的 A $\beta$  分泌，不能是可归因于上调了 APP 的表达量，或是改变了  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶的活性而导致的 A $\beta$  的产生量增多。

15

本领域普通技术人员了解，促进神经细胞的 A $\beta$  分泌可以采用很多种形式，包括削弱 A $\beta$  与细胞膜上糖、脂和蛋白的结合或相互作用等。本发明中，优选为如前所述通过减少 A $\beta$ （尤其是 A $\beta$ <sub>42</sub>）在细胞膜上形成聚合体的方法来促进细胞的 A $\beta$  分泌。

20

此外，本发明还揭示，由于调节 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白、TTC7 蛋白与 PI4KIII $\alpha$  蛋白的数量和它们形成复合物的能力，以及调节 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶活性，均可减少 A $\beta$  在细胞膜上形成的聚合体，从而促进细胞的 A $\beta$ （尤其是 A $\beta$ <sub>42</sub>）分泌，因此这些蛋白以及这些蛋白的相互关系均能构成对 AD 治疗的潜在治疗靶点。

25

据此，本领域普通技术人员可以了解，能够抑制、降低、减弱、或者消除 *rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因的表达、转录或翻译以及降低其编码的 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白的稳定性的抑制剂和方法，以及能

30

5 够阻止它和磷酸肌醇激酶 PI4KIII $\alpha$  蛋白以及 TTC7 蛋白形成蛋白复合物的抑制剂和方法, 均可用于治疗 AD。所述 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 抑制剂包括但不限于 *rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因的抑制性核苷酸 (包括反义 RNA、siRNA 或 miRNA 等), 以及抗 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白的抗体等。

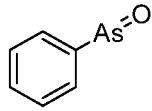
10 本领域技术人员了解, *rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因的抑制性核苷酸及其制备方法已经公开 (例如, 可参见 [www.genecards.org](http://www.genecards.org), 以及已有的产品: ORIGENE, Cat. # SR308056 和 Cat. # TR303768)。类似地, 抗 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 抗体的制备方法也已经公开 (例如, 可参考 [www.genecards.org](http://www.genecards.org), 以及已有的产品: Novus, Cat. # NBP1-81539; Thermo Fisher Scientific Cat. # PA5-24904)。

15 此外, 如前所述, 调节 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因在细胞上的表达、转录、翻译, 调节 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因编码的 PI4KIII $\alpha$  蛋白的稳定性, 调节该蛋白和膜蛋白 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 以及 TTC7 蛋白形成蛋白复合体的能力, 以及调节该磷酸激酶的酶活性, 也均可作为 AD 治疗的手段。本领域普通技术人员因此应该知道, 能够抑制、降低、减弱、消除 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因的表达、转录、翻译, 或其编码的 PI4KIII $\alpha$  蛋白的  
20 稳定性和其生物活性的抑制剂和方法, 包括但不限于对 *PI4KIII $\alpha$ /PI4KA* 基因特异的抑制性核苷酸, 抗 PI4KIII $\alpha$  蛋白的抗体能够抑制 PI4KIII $\alpha$  蛋白与膜蛋白形成膜蛋白复合体, 以及能够抑制激酶活性的小分子化合物抑制剂等, 均可用于治疗 AD。优选地, 该抑制剂为小分子化合物, 例如, PAO (氧化苯砷或 Phenylarsine Oxide), PAO 的衍生物, A1,  
25 G1, 或 A1 以及 G1 的类似物。更优选地, 该抑制剂可以为 PAO 或其衍生物。

本领域技术人员了解, PAO 是一种以氧化砷基与苯环为基本结构

的小分子化合物，其对 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶活性具有很强的抑制作用。PAO 的化学式结构为：

5



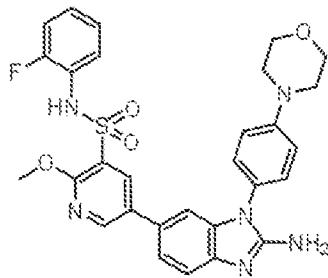
苯基氧化砷（氧化苯砷）（oxo(phenyl)arsane）

10

PAO 的制备方法为本领域技术人员所熟知。根据本发明，可以用于治疗 AD 的还包括 PAO 的各种衍生物，只要这些衍生物具有抑制 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶活性的作用。本领域技术人员了解，该类衍生物的制备方法均已公开。

15

同样，本领域技术人员了解，A1 和 G1 均为 PI4KIII $\alpha$  蛋白的小分子化合物抑制剂，具有较类似的结构。其中，A1 的化合结构式为：

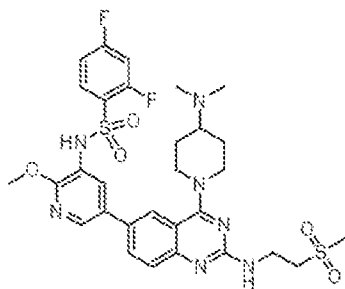


A1

5-(2-氨基-1-(4-(4-吗啉基)苯基)-1H-苯并咪唑-6-基)-N-(2-氟代苯基)-2-甲氧基-3-吡啶磺酰胺

20

G1 的化学结构式为：



G1

(aS)-5-(2-氨基-4-氧代-3-(2-(三氟甲基)苯基)-3,4-二氢喹啉-6-基)-N-(2,4-二氟代苯基)-2-甲氧基吡啶-3-磺酰胺

5 A1 和 G1 的制备方法均已公开（例如，可参见 Bojjireddy, N., et al. (2014), JBC 289:6120-6132 和 Leivers, A.L., et al. (2014), JMC 57:2091-2106)。根据本发明，A1 和 G1 的结构类似物，只要它们具备抑制 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶活性的功能，也同样可以用于治疗 AD。本领域技术人员了解，该类结构类似物的制备方法也均已公开。

10 此外，PI4KIII $\alpha$  蛋白与 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白结合形成膜蛋白复合体需要相应的脚手架蛋白 TTC7 的协助。因此，根据本发明，本领域普通技术人员可以了解，能够抑制、降低、减弱、或者消除 *ttc7* 基因的表达、转录或翻译以及降低其编码的 TTC7 蛋白的稳定性的抑制剂和方法，以及能够阻止它和 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白以及  
15 PI4KIII $\alpha$  蛋白形成蛋白复合物的抑制剂和方法，均可用于治疗 AD。所述 TTC7 抑制剂包括但不限于 *ttc7* 基因的抑制性核苷酸（包括反义 RNA、siRNA 或 miRNA 等），以及抗 TTC7 蛋白的抗体等。

再者，根据本发明，下调 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白和 PI4KIII $\alpha$  蛋白的表达，或阻止它们形成复合物以减少 PI4KIII $\alpha$  蛋白的膜上分布，  
20 或抑制 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶活性，实质上均导致的是细胞膜上 PI<sub>4</sub>P 减少，进而促进细胞的 A $\beta$  分泌。因此，本领域普通技术人员了解，任何时候能减少细胞膜上 PI<sub>4</sub>P 数量水平的抑制剂或方法，进而可以减少 A $\beta$  在细胞膜上形成多聚体，也均能起到前述治疗 AD 的作用。

25 本领域技术人员了解，前述 PI<sub>4</sub>P 抑制剂可以是能与 PI<sub>4</sub>P 特异结合的抗体或其它分子。目前抗 PI<sub>4</sub>P 抗体的制备方法已经公开（参见 Brown BK and Karasavass N, et al., 2007, J virol; Wassef NM and Roerdink F, et al. 1984, Mol Immunol）。例如，可以是人源的广谱中和抗体 4E10 和其它抗  
30 PI<sub>4</sub>P 抗体。目前与 PI<sub>4</sub>P 特异结合的分子的制备方法也已经公开（Balla A

and Kim YJ, et al., 2008, Mol Biol Cell; Zubenko GS and Stiffler et al., 1999, Biol Psychiatry)。例如，可以是OSH2-PH2X融合蛋白或者 OSH2-2x-PH融合蛋白。

5            本发明所提供的上述各种可以用于治疗 AD 或具有治疗 AD 的潜力物质（笼统称为“本发明物质”），包括但不限于抗 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 抗体、抗 PI4KIII $\alpha$  抗体、抗 TTC7 抗体，抗 PI<sub>4</sub>P 抗体、对 *rbo/Efr3/Efr3a/Efr3b* 基因特异的抑制性核苷酸、对 PI4KIII $\alpha$ /PI4KA 基因特异的抑制性核苷酸、以及对 PI4KIII $\alpha$  蛋白的磷酸激酶作用有抑制作用的小分子化合物等，均可以是分离的、纯化的、  
10            合成的、和/或重组的。

            此外，本发明物质还可以配制成组合物，诸如药物组合物。在这一点上，本发明提供包括前面所述任意抗体、抑制性核苷酸、或/和小分子化合物等抑制剂，以及相应的药用载体的药物组合物。  
15

            包含任意本发明物质的药物组合物可以包括多于一种本发明物质，例如：抗体和小分子化合物、抑制性核苷酸和抗体，或两种或更多不同的抗体或者小分子化合物等。备选地，所述药物组合物还可以包括  
20            与另一种或多种具有药物活性的试剂或药物的组合。例如，可以包括抗 A $\beta$  的抗体药物，如 Bapineuzumab，或者是可以与大脑内神经细胞外的 A $\beta$  或  $\beta$  淀粉样斑块结合，阻滞 A $\beta$  聚合或促进聚合状的 A $\beta$  解聚的化合物，比如海洋硫酸寡糖类 HSH971 及其类似物、阿坎酸（tramiprosate）及其类似物、依达拉奉（Edaravone）及其类似物等。  
25            这样，该药物组合物一方面促进 A $\beta$  从神经元内分泌出来，一方面促进神经元外的 A $\beta$  清除，从而可达到更好的治疗 AD 的效果。

            另一方面，本发明同时还揭示了一种新的用于筛选治疗 AD 的药物或治疗靶点的方法。该方法的设计基于前述本发明的新发现，也即采用促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌的方式可以减少胞内的 A $\beta$ <sub>42</sub> 的累积，从而可以减缓和  
30

防止 AD 相关的神经退化和功能障碍。因此，筛选候选药物或治疗靶点的标准是应用该药物或调节该治疗靶点后能够达到促进细胞的  $A\beta$  分泌的效果，尤其是  $A\beta_{42}$  的分泌，且增加的  $A\beta$  分泌不能归因于是因为上调了 APP 的表达量，或者改变了  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$  分泌酶的活性而导致的  $A\beta$  的产生增多。

根据本发明，所述治疗靶点的调节是指利用相关物质对该治疗靶点进行直接或间接的作用，从而导致该治疗靶点的功能、性质或与周围环境的相关关系发生改变，因而能够产生或引发产生相应的促进细胞的  $A\beta$  分泌的效果，尤其是  $A\beta_{42}$  的分泌。

普通技术人员可以了解，为了选出有效的治疗阿尔茨海默病的药物，可以用于筛选试验的细胞系可为哺乳动物、昆虫等的真核细胞系，比如：HEK293、COS7、N2a、SH-SY5Y、S2 和 sf9 等。所述方法包括检测候选药物是否能减少细胞膜或细胞内的  $A\beta$  积累，尤其是  $A\beta_{42}$  的积累，从而选出有效的治疗阿尔兹海茨海默病的药物。优选地，所述  $A\beta_{42}$  分泌是否增加的检测实验可利用过量表达 APP 的细胞系（如稳转人源 APP 的 HEK293、COS7、N2a、SH-SY5Y 细胞系）来进行，或者利用果蝇模型进行，优选是果蝇三龄幼虫组织。所述  $A\beta_{42}$  分泌是否增加可以采用免疫分析方法来检测，包括酶联免疫吸附剂测定方法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）或电化学发光免疫分析（Electrochemiluminescence, ECLIA）方法。

优选地，所述用于筛选治疗 AD 的药物或调节靶点的方法可以包括首先观察候选药物或调节靶点的应用对 PI4KIII $\alpha$  酶活性的影响，若候选药物或调节靶点的应用能够使检测系统中 PI4KIII $\alpha$  激酶的作用效果发生负向改变，即表征 PI4KIII $\alpha$  酶活性减弱或细胞膜上 PI4P 水平下降，则表明该候选药物、试剂或靶点是治疗 AD 的潜在药物或调节靶点。通过这样的筛选，再检测其是否对细胞内  $A\beta$ （尤其是  $A\beta_{42}$ ）积累造成减少，是否促进  $A\beta$  向胞外的分泌。采用这样的方法，可以大大提高候

选对象的筛选效率。

5 根据本发明的一个具体实施例，所述筛选用于治疗 AD 的药物或治疗靶点的方法可以通过直接检测候选药物的应用或治疗靶点的调节是否能使原来定位在细胞膜的 PI4KIII $\alpha$  蛋白向胞浆分布，从而减少 PI4KIII $\alpha$  蛋白在细胞膜上的量，导致减少细胞膜上的 A $\beta$  单体向聚合体的转变并增加向胞外的分泌来判断。优选地，可以选择观察细胞膜上利用荧光标记的 PI4KIII $\alpha$ ，比如荧光蛋白标记的 PI4KIII $\alpha$  (GFP-PI4KIII $\alpha$ )，观察该荧光标记的 PI4KIII $\alpha$  是否从细胞膜上向胞浆转移。

10

根据本发明的一个具体实施例，所述筛选用于治疗 AD 的药物或治疗靶点的方法还可以利用包括免疫共沉淀等检测蛋白与蛋白相互作用的方法来进行。如候选药物的应用或者治疗靶点的调节能够使 RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B 蛋白与 TTC7 蛋白以及 PI4KIII $\alpha$  蛋白相互作用减弱，即表征该药物或靶点能够削弱 PI4KIII $\alpha$  蛋白形成膜蛋白复合体的能力，从而减少细胞膜上的 A $\beta$  单体向聚合体转变，增加向胞外的分泌。

15

20 根据本发明的一个具体实施例，所述筛选用于治疗 AD 的药物或治疗靶点的方法还可以通过直接检测候选药物的应用或者治疗靶点的调节是否能够使细胞膜的 PI<sub>4</sub>P 水平下降来实现。优选地，可以利用荧光显微镜、共聚焦或双光子显微镜观察细胞膜上荧光标记的特异结合 PI<sub>4</sub>P 的分子，比如荧光蛋白标记的 OSH2-PH2X 或者 OSH2-2x-PH 融蛋白，在细胞膜上的量是否减少，或是否从细胞膜上向胞浆转移来判断。

25

下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

30 以下数据主要是通过动物和细胞培养实验获得的，选择 SPSS 软件

分析。如其他地方未特别标明，数据采用 mean±sem 表示。P<0.05 为差异有统计学意义。这里和以下显示的所有数据均以 mean±sem 表示，“\*”，“\*\*”和“\*\*\*”分别表示 p<0.05，0.01 和 0.001。

## 5 实施例 1：果蝇品系与遗传学方法

标准培养基，在 12 小时光照 12 小时黑暗交替循环，恒温 25℃ 条件下培养。

10 本发明采用了下列转基因果蝇品系：*rbo*<sup>S358A</sup>、[UAS]*Aβ*<sub>arc</sub>、[UAS]*Aβ*<sub>42</sub>、[UAS]*dtau*、[UAS]*mCD8-gfp*（由 Dr. Z. Wang 提供）、[UAS]*shibire*<sup>ts1</sup>（由 Dr. A Guo 提供）、[Gal4]A307（由 Dr. O’Kane 提供）。其中，*rbo*<sup>S358A</sup> 基因是用含有 *rbo* 基因的野生型基因组 DNA 经定点突变后构建的转基因，其表达由 *rbo* 基因本身的前驱动子驱动。

15 [Gal4]A307 表达转录因子 Gal4，用于驱动 [UAS]*Aβ*<sub>arc</sub>、[UAS]*Aβ*<sub>42</sub>、[UAS]*dtau*、[UAS]*mCD8-gfp*、[UAS]*shibire*<sup>ts1</sup> 转基因在果蝇的巨纤维通路 (Giant Fiber system) 神经元和少量其它神经元表达 *Aβ*<sub>arc</sub>、*Aβ*<sub>42</sub>、dTau、mCD8-GFP 或温度敏感型突变的 Dynamin。采用的果蝇突变体有：*rbo*<sup>ts1</sup>（温度敏感的错义突变）、*rbo*<sup>2</sup>（敲除突变）、*itpr*<sup>sv35</sup>（无义突变，

20 Bloomington Stock # 30740）、*PI4KIIIα*<sup>def</sup>（缺失了 *PI4KIIIα* 基因及其附近 DNA 的突变，Bloomington Stock # 9518）、*PI4KIIIα*<sup>GS27</sup> 和 *PI4KIIIα*<sup>GJ86</sup>（均为无义突变）。P{lacW}1(2)k14710k<sup>15603</sup> 转座子插在 *l(2) k14710* 基因的第二个外显子中，阻止 *l(2) k14710* 基因的转录，Bloomington Stock # 11134）；P{EPgy2}bin3<sup>EY09582</sup>（Bloomington Stock # 20043）。为了纯化基因背景，所有的转基因和突变体果蝇在使用前均分别与一个野生的等基因品系（isogenic *w*<sup>1118</sup>，Bloomington stock #5 905）回交 5 代以上。

25

发明人之前的研究发现在 GF 通路中表达野生型或北极突变型（arctic mutant）*Aβ*<sub>42</sub> 的果蝇（*Aβ*<sub>42</sub> 或 *Aβ*<sub>arc</sub> 果蝇）呈现神经元内 *Aβ*<sub>42</sub> 30 积累、日龄依赖性突触传递失败、寿命缩短。这些果蝇还表现出日龄

依赖的爬行能力下降。为了研究 *rbo* 基因在神经元内  $A\beta_{42}$  积累引起的神经障碍中的作用，将 *rbo* 基因的两个突变—错义突变 (*rbo<sup>ts1</sup>*) 和敲除突变 (*rbo<sup>2</sup>*)—分别引入了  $A\beta_{arc}$  果蝇中，并分别检测了它们对突触传递、爬行能力、寿命的影响。为了这些测试，共构建了 4 组果蝇，它们分别是对照果蝇 (control)、*rbo<sup>ts1/+</sup>* 或 *rbo<sup>2/+</sup>* 杂合体果蝇 (*rbo*)、 $A\beta_{arc}$  果蝇和含有 *rbo<sup>ts1/+</sup>* 或 *rbo<sup>2/+</sup>* 杂合突变的  $A\beta_{arc}$  果蝇 ( $A\beta_{arc}$ -*rbo*)。每组果蝇含有 1-2 个品系，其中，“ctrl”是指带有 [*Gal4*]*A307* 转基因的野生型对照组果蝇；“*rbo<sup>ts1/+</sup>*” and “*rbo<sup>2/+</sup>*”是指带有一个拷贝 [*Gal4*]*A307* 转基因的 *rbo<sup>ts1/+</sup>* 和 *rbo<sup>2/+</sup>* 杂合子果蝇；“ $A\beta_{arc}$ ”是指带有 ([*Gal4*]*A307*/[*UAS*] $A\beta_{arc}$  双转基因的果蝇；“ $A\beta_{arc}$ -*rbo<sup>ts1/+</sup>*”和“ $A\beta_{arc}$ -*rbo<sup>2/+</sup>*”是分别指 [*Gal4*]*A307*-*rbo<sup>ts1</sup>*/[*UAS*] $A\beta_{arc}$  和 [*Gal4*]*A307*-*rbo<sup>2</sup>*/[*UAS*] $A\beta_{arc}$ 。前两组果蝇不表达  $A\beta_{arc}$ ，被归类为“non- $A\beta$  flies”，而后两组果蝇是表达  $A\beta_{arc}$  的，被归类为“ $A\beta$  flies”。

实施例 2：通过突触传递检测 *rbo* 基因突变特异性地抑制  $A\beta_{42}$  表达果蝇的神经障碍

突触传递的检测方法：

逃跑通路中记录细胞内的兴奋性突触后电位 (excitatory junction potential, EJP) 方法。利用低熔点蜡 tackiwax (Boeckel Scientific) 将特定日龄的成年雌果蝇在解剖镜下固定在载玻片上，腹部向下。记录系统包括腹部一根参考电极，插入眼中的两根刺激电极和插入背部纵向肌肉细胞内的一根记录电极。双眼给予电刺激 (100Hz, 50pulses)。刺激强度 5-20Volts，持续时间 0.2ms，约为阈值刺激强度的 150%。电信号通过 Axonal clamp 900A (Molecular Devices) 记录并放大，在频率 10 kHz 下通过 Digidata 1440A (Molecular Devices) 数字化。数据经由 pClamp 软件 (version 10.0; Molecular Devices) 记录并分析。电极均为玻璃电极，其中灌注 3.0 摩尔浓度的氯化钾溶液。记录的环境温度为 25°C。

在图 1 中，4 组果蝇在不同日龄阶段的脑刺激诱发的 EJP 的代表性

记录(参见图 1(a)),以及诱导 EJPs 的成功率的定量分析(参见图 1(b))。特别值得注意的是, *rbo* 突变明显抑制了由  $A\beta_{arc}$  引起的日龄依赖的神经突触传递失败。对于第 3-7、15-17 和 25-27 天的数据,  $n=6\sim 12$ , 对于 31-35 天的数据,  $n=10-23$ , 统计学检验使用的是单因素方差(one-way ANOVA)分析。

根据上述突触传递的检测方法,在果蝇大脑给予高频电刺激(100Hz, 50 个脉冲),在背部纵向肌纤维细胞内记录兴奋性神经肌肉接头的终板电位(EJP)。当果蝇处于羽化后 3-7<sup>th</sup>、15-17<sup>th</sup>、25-27<sup>th</sup> 和 31-35<sup>th</sup> 日龄时我们进行了 EJP 记录。于 3-7<sup>th</sup> 和 15-17<sup>th</sup> 日龄时,高频电刺激在  $A\beta_{arc}$ -*rbo* 果蝇中的 EJP 诱发成功率与在其它三组果蝇中的无显著差异(图 1a 和 b)。于 25-27<sup>th</sup> 和 31-35<sup>th</sup> 日龄时,  $A\beta_{arc}$ -*rbo* 果蝇中的 EJP 诱发成功率比对照果蝇和 *rbo* 果蝇的要低,但比  $A\beta_{arc}$  果蝇中的显著增高(图 1a 和 b)。

这些结果显示 *rbo* 基因突变缓解了神经元内  $A\beta_{arc}$  积累引起的日龄依赖性突触传递失败。这种缓解作用不可能是基因背景差异所致,因为通过与一个野生的等基因系(isogenic  $w^{1118}$ )回交 5 代以上,用于建立上述 4 组果蝇的转基因果蝇和 *rbo* 突变体果蝇的基因背景早已基本被纯化。由于完全敲除 *rbo* 基因导致胚胎致死,所以无法研究完全敲除 *rbo* 基因对  $A\beta_{arc}$  引起突触传递障碍的影响。

实施例 3: 通过爬管试验检测 *rbo* 基因突变特异性地抑制  $A\beta_{42}$  表达果蝇的神经障碍

爬管试验:

爬管能力的研究是通过测量 10 只果蝇从直立的透明塑料管底部向上爬行 7 秒后的高度的平均值。为此,开发了一套重复性高的果蝇爬管能力测试装置。该装置包括: 1) 一个长方形的金属框架(宽 32cm,

高 21cm), 框架中垂直固定 10 根透明塑料管(内径 2.1cm, 高 19.0cm);  
2) 一台电动马达, 用来驱动金属框架在垂直方向上移动; 3) 一台步  
进驱动器, 用来把电动马达的工作节奏控制在每隔 1 分钟使金属框架  
连续快速上下移动各 4 次, 每次上下移动预定的高度; 4) 一台录像机,  
5 用来记录爬管过程; 5) 一套分析软件, 用来分析录像中特定时刻果蝇  
的爬管位置。实验时, 每根透明塑料管中放置 10 只特定基因型的果蝇,  
塑料管均匀分布并固定于金属盒中。金属盒可以沿着垂直固定在基座  
上的两根金属杆上下滑动。在爬管实验中, 步进驱动器控制电机运转,  
电机将金属盒提升 5.8cm 然后释放, 金属盒依重力下落到原位置。当  
10 金属盒停止运动时, 果蝇由于惯性掉落到管底部。在金属盒 3 秒内被  
抬升下落 4 次后, 所有果蝇都位于管底部。随后, 果蝇沿管壁向上爬  
行。整个过程被录像以进行后续分析。发明人编写了一个电脑程序,  
用于测量每只果蝇在开始爬管后任何时间点的所在高度。

15 在图 1(c)中, *rbo* 基因突变改善了日龄依赖的表达  $A\beta_{arc}$  的果蝇的  
爬管能力,  $n=3$ (3 组果蝇, 每组 10 只), 单因素方差(one-way ANOVA)  
分析。

20 在果蝇羽化后第 3 天、第 16 天、第 26 天和第 31 天测试果蝇的爬  
管能力。在第 3 天和第 16 天, 四组果蝇的爬管能力在都相似(图 1c)。  
在第 26 天和 31 天,  $A\beta_{arc-rbo}$  果蝇比  $A\beta_{arc}$  果蝇明显爬得快, 但是并不  
像对照组和 *rbo* 果蝇那么快(图 1c)。

25 实施例 4: 通过寿命分析 *rbo* 基因突变特异性地抑制  $A\beta_{42}$  表达果蝇的  
神经障碍

寿命分析:

30 每种基因型 100 或 200 只果蝇, 平均分配到 5 或 10 个含标准果蝇  
食物和干酵母的管中, 在 25°C 下培养。每 3 天将果蝇换到含新食物和  
干酵母的管中, 并记录死亡果蝇数目。最终用 SPSS 11 Kaplan-Meier

软件统计存活率。

在图 1(d)中, *rbo* 基因突变延长了表达  $A\beta_{arc}$  的果蝇的寿命。每组果蝇均是  $n=200$ ,  $P<0.001$ , 采用 Log Rank 检验。

5

在图 7 中, 3 组果蝇在不同日龄阶段的脑刺激诱发的 EJP 的代表性记录(参见图 7(a)), 以及诱导 EJP 成功率的定量分析(参见图 7(b)), “ctrl”是指带有  $[Gal4]A307$  转基因的野生型对照组果蝇; “ $A\beta_{42}$ ”是指带有  $([Gal4]A307$  和  $[UAS]A\beta_{42}$  双转基因的果蝇; “ $A\beta_{42}-rbo^{ts1/+}$ ”和  
10 “ $A\beta_{42}-rbo^{2/+}$ ” 是指  $[Gal4]A307-rbo^{ts1}/[UAS]A\beta_{42}$  和  $[Gal4]A307-rbo^2/[UAS]A\beta_{42}$ 。值得注意的是, *rbo* 突变明显抑制了由  $A\beta_{42}$  引起的日龄依赖的神经突触传递失败。对于第 3-5 天的数据,  $n=6\sim 12$ , 对于 37-39 天的数据,  $n=10-12$ , 单因素方差(one-way ANOVA)分析。

15

在图 7(c)中, *rbo* 基因突变改善了表达  $A\beta_{42}$  的果蝇的日龄依赖的爬管能力,  $n=3$ , 单因素方差(one-way ANOVA)分析。

在图 7(d)中, *rbo* 基因突变延长了表达  $A\beta_{42}$  的果蝇的寿命。每组果蝇均是  $n=200$ ,  $P<0.001$ , 采用 Log Rank 检验。

20

寿命研究显示  $A\beta_{arc}-rbo$  果蝇的寿命也比  $A\beta_{arc}$  果蝇的长, 虽然比对照组和 *rbo* 果蝇的短(图 1d); 在比较四组果蝇的寿命平均值时也可以得出相同的结论(表 1)。这些结果与上述研究突触传递时的发现一致。对 *rbo* 基因突变对表达野生型  $A\beta_{42}$  的果蝇的突触传递、爬管能力和寿命长度的影响做出进一步的研究, 发现了更好的改善(图 7a-d)。  
25

30

表 1. 果蝇寿命均值及其比较

果蝇	寿命均值 (天)	p 值 (与对照 组相比)	p 值 (与 A $\beta_{arc}$ 组 相比)
ctrl	47.5	n.a.	<0.001
<i>rbo</i> <sup>ts1/+</sup>	46.2	0.201	<0.001
<i>rbo</i> <sup>2/+</sup>	54.3	<0.001	<0.001
A $\beta_{arc}$	27.0	<0.001	n.a.
A $\beta_{arc}$ - <i>rbo</i> <sup>ts1/+</sup>	39.9	<0.001	<0.001
A $\beta_{arc}$ - <i>rbo</i> <sup>2/+</sup>	36.8	<0.001	<0.001

在图 8 (a) 中, *rbo* 基因突变对在果蝇巨纤维通路过表达果蝇 Tau 蛋白引起的运动障碍 (左侧) 和过早死亡的影响。在图 8 (b) 中, *shibire* 基因突变对在果蝇巨纤维通路过表达 A $\beta_{arc}$  引起的运动障碍 (左侧) 和过早死亡的影响。寿命分析实验中, 每组果蝇均是 n=100, 采用 Log Rank 检验。

*rbo* 基因突变对抗 A $\beta_{42}$  的毒性作用不能归因于一种对神经元内毒性蛋白积累的普遍效应, 因为 *rbo* 基因突变不能改善过表达 Tau 蛋白的果蝇的寿命缩短 (图 8a)。 *rbo* 基因突变对抗 A $\beta_{42}$  的毒性作用也不能归因于一种可能基于突触功能或者细胞内吞功能下调的普遍效应, 因为向 A $\beta_{arc}$  果蝇中导入 *shibire* 基因突变 (*shibire*<sup>ts1</sup>) 不能缓解 A $\beta_{arc}$  果蝇过早死亡的现象 (图 8b)。与 *rbo*<sup>ts1</sup> 基因突变相同, *shibire*<sup>ts1</sup> 基因突变也引起温度依赖的突触传递、散装的胞吞作用以及运动功能改变。

通过实施例 1-4, 结果显示 *rbo* 基因突变或不足可以特异性地改善表达野生型和突变体 A $\beta_{42}$  果蝇的神经退行性病变。

实施例 5: 通过免疫共沉淀检测缺乏或抑制与 RBO 蛋白相互作用的 PI4KIII $\alpha$  酶减轻 A $\beta_{arc}$  果蝇的神经损伤

免疫共沉淀和免疫印迹:

收集 300 个果蝇头，在预冷的 500 $\mu$ l Tris 缓冲液中碾磨均匀。Tris 缓冲液配方如下：50mM Tris, 50mM KCl, 1mM EDTA, 1% cocktail protease inhibitor(Calbiochem), 调 PH 至 7.4。将组织匀浆 10000g 离心 10 分钟，取上清，使用约 1 $\mu$ g 的小鼠源抗果蝇 RBO 单克隆抗体或者兔源抗果蝇 PI4KIII $\alpha$  的多克隆抗体进行免疫共沉淀和免疫印迹实验。上述两种抗体分别与上海 Abmart 和中国 Abgent 合作构建。构建 RBO 抗体采用的多肽是果蝇 C 亚型 RBO 蛋白的 251<sup>th</sup>-500<sup>th</sup> 氨基酸，构建抗果蝇 PI4KIII $\alpha$  的多肽是 NH<sub>2</sub>-KRSNRSKRLQYQKDSYC-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3)。免疫印迹实验时，抗果蝇 RBO 和 PI4KIII $\alpha$  抗体的稀释比例都是 1:2000。利用野生型和相应的纯合突变体的头部组织匀浆分别验证了抗果蝇 RBO 和 PI4KIII $\alpha$  抗体。

在图 9(a)中, *rbo*<sup>S358A</sup> 基因不改善表达 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇的寿命(P=0.07)。

尽管 RBO 是一种推定 (putative) 的二酯酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 裂解酶, 并且有报道说 DAG 裂解酶活性在 AD 病人和动物模型中的海马区有上调。但是, RBO 蛋白不太可能以 DAG 裂解酶的作用方式调节 A $\beta$ <sub>arc</sub> 的毒性, 因为在 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇中导入 *rbo*<sup>S358A</sup> 转基因不能缓解 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇过早死亡的现象 (图 9a)。在 *rbo*<sup>S358A</sup> 基因编码的 RBO 蛋白中, 一个推定的酶活性中心被突变了。

在图 1(e)中, 显示 RBO 蛋白与 PI4KIII $\alpha$  蛋白相互共免疫沉淀的代表性免疫印迹图, n>3。

在图 1(f)中, 代表性免疫印迹图 (左侧) 和半定量分析 (右侧) 显示 RBO 蛋白与 PI4KIII $\alpha$  蛋白在野生型对照果蝇和 *rbo* 基因突变的杂合子果蝇中的表达量, n=7, 单因素方差分析。

在图 1(g)中, 代表性免疫印迹图 (左侧) 和半定量分析 (右侧) 显示 PI4KIII $\alpha$  分别与野生型 (wtRBO) 和突变型 (mRBO) RBO 蛋白的

免疫共沉淀, n=4, T 检验。

在图 1(h)中, RT-PCR 定量分析 PI4KIII $\alpha$  信使 RNA 在 A $\beta_{arc}$ 、A $\beta_{arc}$ -*rbo*<sup>ts1/+</sup>、A $\beta_{arc}$ -*rbo*<sup>2/+</sup>果蝇中的表达水平, n=5-6, 单因素方差分析。

5

RBO 蛋白在酵母细胞和小鼠中的同源蛋白与 PI4KIII $\alpha$  蛋白结合, 并且在细胞膜上形成一种复合体。与此一致的是, RBO 蛋白会特异性地和果蝇 PI4KIII $\alpha$  蛋白发生免疫共沉淀 (图 1e)。此外, 在 A $\beta_{arc}$ -*rbo* 果蝇中除去一个拷贝的 *rbo* 基因 (*rbo*<sup>2/+</sup>), 可以显著地降低 RBO 蛋白和 PI4KIII $\alpha$  蛋白的表达水平 (图 1f), 而 *rbo*<sup>ts1/+</sup> 基因突变并没有减少 RBO 蛋白和 PI4KIII $\alpha$  蛋白的表达量, 但是显著地削弱了 RBO 蛋白与 PI4KIII $\alpha$  蛋白之间的相互作用 (图 1g)。值得注意的是, 两种 *rbo* 基因突变并没有改变 PI4KIII $\alpha$  基因的转录 (图 1h)。

15 为了测试 PI4KIII $\alpha$  酶在 A $\beta_{arc}$  果蝇的神经损伤中是否起着与 RBO 蛋白相同的作用, 向表达 A $\beta_{arc}$  的果蝇中分别引入一种染色体缺失 (一条染色体上缺失了包含 PI4KIII $\alpha$  基因的 DNA 片段, *pi4k*<sup>def/+</sup>) 和一种 PI4KIII $\alpha$  的无意义突变 (*PI4KIII $\alpha$* <sup>GS27/+</sup>)。

20 在图 2 中, 表达 A $\beta_{arc}$  的果蝇的突触传递和运动障碍及过早死亡均被杂合的 *PI4KIII $\alpha$*  基因缺失 (*PI4KIII $\alpha$* <sup>def/+</sup>) (参见图 2(a)) 和无义 (*PI4KIII $\alpha$* <sup>GS27/+</sup>) (参见图 2(b)) 突变缓解, 也被 PAO 缓解 (图 2(c)-(e))。 “ctrl”是指带有 [*Gal4*]*A307* 转基因的野生型对照组果蝇; “*PI4KIII $\alpha$* <sup>def/+</sup>” 和 “*PI4KIII $\alpha$* <sup>GS27/+</sup>”是指带有一个拷贝 [*Gal4*]*A307* 转基因的 *PI4KIII $\alpha$* <sup>def/+</sup> 和 *PI4KIII $\alpha$* <sup>GS27/+</sup> 杂合子果蝇; “A $\beta_{arc}$ ”是指带有 ([*Gal4*]*A307*/[*UAS*]*A $\beta_{arc}$*  双转基因的果蝇; “A $\beta_{arc}$ -*PI4KIII $\alpha$* <sup>def/+</sup>” 和 “A $\beta_{arc}$ -*PI4KIII $\alpha$* <sup>GS27/+</sup>”是指 *PI4KIII $\alpha$* <sup>def/+</sup>; [*Gal4*]*A307*/[*UAS*]*A $\beta_{arc}$*  和 *PI4KIII $\alpha$* <sup>GS27/+</sup>; [*Gal4*]*A307*-*rbo*<sup>2</sup>/[*UAS*]*A $\beta_{arc}$* 。对于每组 EJP 记录数据, n=6~10; 每个爬管实验数据, n=3~5; 每个果蝇品系的寿命数据, n=100~200, P 值均小于 0.001。统计数检验方法如上所述。

30

事实上，实验结果表明这些 PI4KIII $\alpha$  的基因突变均抑制了 A $\beta_{arc}$  在突触传递、运动功能以及寿命上的引起的改变（图 2(a)-(b)）。与此结果一致的是，喂给 A $\beta_{arc}$  果蝇一种 PI4KIII $\alpha$  的抑制剂 PAO，同样显著地减轻了这些改变，并呈现一种与药剂量相关的效应（图 2(c)-(e)）。

5

在图 9(b)中，*itpr*<sup>SI35</sup> 基因突变不改善表达 A $\beta_{arc}$  果蝇的突触传递和寿命 (P=0.13)。寿命分析实验中，每组果蝇均是 n=100，采用 Log Rank 检验；EJP 诱发成功率实验中，n=5。

10

然而，下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  所带来的抑制 A $\beta_{arc}$  果蝇中的神经损伤不能够归结于减轻了磷脂酶 C，PI<sub>4,5</sub>P 和肌醇三磷酸受体(IP<sub>3</sub>R)所介导的钙释放所可能引起的毒性作用，因为向表达 A $\beta_{arc}$  的果蝇中引入编码肌醇三磷酸受体的基因的无意义突变即不能减轻突触障碍，也不能延长寿命（图 9(b)-(c)）。

15

实施例 6：通过染色和成像检测下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  减少了 A $\beta_{42}$  的细胞内沉积

20 染色和成像：

果蝇中枢系统中的 A $\beta$  染色方法如下。在预冷的 PBS 中解剖出果蝇中枢神经系统(CNS)整体，包括脑和腹神经节，于 PBS 配置的 4% PFA 中固定约 45 分钟。以 PBS 洗 30 分钟，随后以甲酸(70%的水溶液)处理 45 分钟，使抗原决定簇暴露，然后用 PBS-0.25%Triton-5%BSA 重复冲洗。一抗(6E10, 1:100 稀释)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 10-12 小时。以 PBS 洗，其后

25 在室温下，以 cy3-偶联的二抗(Jackson ImmunoResearch, 1:200 稀释)孵育 2 小时。使用 Nikon A1R-A1 共聚焦显微镜采集图像，果蝇中枢神经系统的基因型对于采集图像的人员来说是未知的。

30 在图 3(a)中，日龄为 21-25 天的表达 mCD8-GFP 的对照果蝇（上

排)和  $A\beta_{arc}$  表达果蝇(中排)的腹侧神经节的全标本包埋  $A\beta$  染色的共聚焦成像;  $mCD8-GFP$  和  $A\beta_{arc}$  的表达均为  $[Gal4]A307$  驱动。每组染色重复两次;下排是中排图中被正方形框定区域的放大。日龄为 21-25 天的  $A\beta_{arc}$ 、 $A\beta_{arc-rbo}^{ts1/+}$ 、 $A\beta_{arc-rbo}^{2/+}$ 、 $A\beta_{arc-PI4KIII\alpha}^{def/+}$  和  $A\beta_{arc-PI4KIII\alpha}^{GS27/+}$  果蝇的代表性腹侧神经节的全标本包埋  $A\beta$  染色的共聚焦成像,每组染色重复两次(参见 3(b)),以及 ELISA 方法定量头部的  $A\beta$  水平(图 3(c),上图)。图 3(c)的下图是 ELISA 方法定量不同浓度 PAO 处理后的  $A\beta_{arc}$  表达果蝇头部的  $A\beta$  水平。ELISA 方法定量的每组数据,  $n=3\sim 5$ , 单因素方差(one-way ANOVA)分析。在图 3(a)和(b)中,比例尺是 50 微米。

先前,由于表达  $A\beta_{arc}$  在 GF 通路里所引发的神经损伤被归结于细胞内  $A\beta$  淀粉样蛋白的积累。这里,通过向  $A\beta_{arc}$  果蝇中导入  $uas-mCD8-gfp$  转基因,以便进一步证实  $A\beta$  淀粉样蛋白在神经元内积累。 $uas-mCD8-gfp$  转基因表达的是定位到细胞膜的  $mCD8-GFP$  荧光蛋白,它是由与  $A\beta_{arc}$  相同的驱动子驱动的,所以表达  $A\beta_{arc}$  的神经元会被 GFP 标记,共聚焦显微成像揭示绝大部分  $A\beta$  免疫染色信号与 GFP 信号共定位(图 3(a)),从而确证了这一果蝇模型中神经元内  $A\beta$  积累的现象。

为了研究 RBO/PI4KIII $\alpha$  的不足是否会影响细胞内  $A\beta$  积累,在  $A\beta_{arc}$ 、 $A\beta_{arc-rbo}$  和  $A\beta_{arc-PI4KIII\alpha}$  果蝇中进行  $A\beta$  免疫染色。发现  $A\beta_{arc-rbo}$  和  $A\beta_{arc-PI4KIII\alpha}$  果蝇的  $A\beta$  免疫反应信号比  $A\beta_{arc}$  果蝇的明显减弱(图 3(b))。

实施例 7: 通过 ELISA 定量测试检测下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  减少了  $A\beta_{42}$  的细胞内沉积

ELISA 方法检测:

ELISA 使用的是  $A\beta_{42}$  Human ELISA Kit (invitrogen), 并按照使用说明进行实验。为分析中枢系统中  $A\beta_{42}$  的水平,将每个品系中 25 个

果蝇的大脑在预冷过的 PBS 中解剖出来，并迅速置于冷的添加了蛋白酶抑制剂混合物（Calbiochem）的 ELISA 样品稀释液中，果蝇脑被充分的捣碎，室温摇动孵育 4 小时， $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

5            与实施例 6 相一致的是，ELISA 定量测试显示在  $\text{A}\beta_{\text{arc}}\text{-}rbo$ 、 $\text{A}\beta_{\text{arc}}\text{-}PI4KIII\alpha$  和用药物 PAO 治疗的  $\text{A}\beta_{\text{arc}}$  果蝇中， $\text{A}\beta_{42}$  的量显著地降低（图 3(c&d)）。

10           在图 10(a)中，RT-PCR 方法检测 N2 细胞中敲减 *EFR3a* 基因效率的代表图（左侧）和归一化法定量分析（中间），右侧显示敲减 *EFR3a* 基因不影响 N2a 细胞内吞细胞外  $\text{A}\beta_{42}$ 。用于构建敲减 *Efra* RNAi 的序列是：5'-AGGTATCATTCAGGTTCTGTT-3'（SEQ ID NO: 4）。图 10(b)中，RT-PCR 方法检测显示 *rbo* 基因及 *PI4KIIIa* 基因突变没有减低  $\text{A}\beta_{\text{arc}}$  表达果蝇中  $\text{A}\beta_{\text{arc}}$  转录水平。

15           通过实施例 6 和 7，*RBO/PI4KIII $\alpha$*  下调所导致的神经元内  $\text{A}\beta$  积累减少并不像是因为细胞外  $\text{A}\beta_{42}$  的摄取的降低所导致，也不像是  $\text{A}\beta_{\text{arc}}$  转录的减少所造成，因为：1) 敲减了 *rbo* 同源基因的 N2a 细胞摄取细胞外的  $\text{A}\beta_{42}$  没有明显减少（图 10(a)）；2) 在不同日龄的  $\text{A}\beta_{\text{arc}}\text{-}rbo$  以及  $\text{A}\beta_{\text{arc}}\text{-}PI4KIII\alpha$  果蝇中  $\text{A}\beta_{\text{arc}}$  的 mRNA 表达水平与实验组  $\text{A}\beta_{\text{arc}}$  果蝇比较并没有减少（图 10(b)）。

实施例 8：PI4KIII $\alpha$  抑制剂 PAO、A1 和 G1 溶液制备及其毒性测试

25           利用 PAO 或 A1 处理 HEK293 细胞、果蝇幼虫和成虫时，首先把 PAO 粉末（Sigma-Aldrich, CAS NO. 637-03-6）和 A1 粉末（分别溶于 DMSO，制成 10 和 0.9 mM 的母液。然后用蒸馏水梯度稀释到所要的浓度，并调整 DMSO 的最终浓度以避免 DMSO 浓度差异影响实验结果。

30           测试 PAO 对活体果蝇的毒性时，我们用含有 50、100、200、300、

400 和 600 $\mu$ M PAO 的食物培养野生型果蝇,从胚胎期开始。发现 200 $\mu$ M 及以下 PAO 对羽化率和羽化后的爬行能无明显影响。从而选取 25、50、100 和 150 $\mu$ M PAO 浓度培养  $A\beta$ arc 果蝇及对照果蝇。

5           测试 PAO 对解剖的果蝇三龄幼虫的毒性时,我们用含有 50、100、150、200、300、400 和 500nM PAO 的施耐德培养基在 25 $^{\circ}$ C 下过夜培养解剖的野生型果蝇三龄幼虫。发现 300nM 和以上浓度的 PAO 会使果蝇幼虫的唾液腺和中枢神经系统的颜色变为灰白,提示损伤。而 150nM 和以下浓度的 PAO 则不会。因此,选取 50、100 和 150nM PAO 浓度  
10 进行培养。

          测试 PAO 和 A1 对 HEK239 细胞的毒性时,用含有 50、100、150、200、250、300、400 和 600nM PAO 或 A1 的 DMEM 培养基培养 HEK239 细胞 12 小时后,用 MTT 法分析发现 250nM 和以上浓度的 PAO 和 A1  
15 均会杀死大部分细胞,150nM 和以下浓度则不会。因此,选取 25、50、100 和 150nM PAO 和 A1 浓度进行培养。

          测试 PAO 灌胃对小鼠的毒性时,把 PAO 粉末溶于 DMSO,制成 30mg/ml 的母液。然后用蒸馏水梯度稀释到所要的浓度,并调整 DMSO  
20 的最终浓度以避免 DMSO 浓度差异影响实验结果。首先按 18、10 和 6mg/kg 体重的剂量给 3 月龄的 C57BL/6 小鼠灌胃,每个剂量灌胃 2 只小鼠。第 2 天发现所有小鼠均死亡。然后按 4.5 和 2.0mg/kg 体重的剂量灌胃,每个剂量灌胃 5 只小鼠。对于 4.5mg/kg 体重剂量,每天灌胃 1 次,连续 5 天后,5 只小鼠中有 4 只存活。对于 2.0mg/kg 体重剂量,  
25 按周 1 至周 5 每天灌胃 1 次,周末停药。连续 2 周后,发现 5 只小鼠均存活。因此,对于 C57/B6 小鼠,PAO 灌胃的半数致死量在 2-6mg/kg 体重,约为 4mg/kg 体重。所以,我们选取 0.1、0.3 和 1.0 mg/kg 体重剂量给 APP/PS1 和对照小鼠灌胃,按周 1 至周 5 每天灌胃 1 次,周末停药,连续 6 周。

30

实施例 9: 通过表达 A $\beta$  的幼虫组织培养检测下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌

表达 A $\beta$  的幼虫组织培养:

5 将果蝇三龄幼虫用水清洗和 70%酒精消毒 2 分钟, 在施耐德 (Schneider's) (Sigma) 培养基中沿着幼虫的背中线剪开, 小心清除幼虫的气管, 内脏和脂肪组织。在施耐德培养基中清洗解剖过的幼虫, 并转入 2ml 的离心管中, 该离心管中有 150ul 的施耐德培养基和庆大霉素(20 毫克/毫升)。每管中有 5 个解剖后的幼虫, 将离心管置于潮湿, 10 黑暗, 恒温 25°C 的环境中 8 小时。然后从每管中提取 100ul 用 ELISA 定量测试 A $\beta$ <sub>42</sub>。ELISA 使用的是 A $\beta$ <sub>42</sub> Human ELISA Kit (invitrogen)。

在图 4 中, 图 4(a)-(c)显示归一化法定量分析不同 PAO 浓度处理、*rbo* 基因和 *PI4KIII $\alpha$*  基因突变对培养解剖了的表达 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇三龄幼虫 15 的培养基中 A $\beta$ <sub>42</sub> 的水平的影响。

为了探究 PAO 药物治疗和 RBO/PI4KIII $\alpha$  不足减少神经元内 A $\beta$  积累的机理, 检测了表达 A $\beta$ <sub>arc</sub> 的三龄幼虫解剖样本在 Schneider 培养基培养的过程中分泌 A $\beta$ <sub>42</sub> 的情况。ELISA 测试表明, PAO 处理会促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 20 分泌, 且呈现一种与药物剂量关联的趋势(图 4(a)), 表明抑制 PI4KIII $\alpha$  酶活性促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌。与此一致的是, 较之 A $\beta$ <sub>arc</sub> 幼虫的培养基, A $\beta$ <sub>arc</sub>-*rbo* 品系和 A $\beta$ <sub>arc</sub>-*PI4KIII $\alpha$*  品系的幼虫培养基中有显著升高的 A $\beta$ <sub>42</sub> 浓度(图 4(b)-(c))。

25 实施例 10: 通过表达人源 APP 的 HEK293T 细胞培养检测下调 RBO/PI4KIII $\alpha$  促进 A $\beta$ <sub>42</sub> 分泌

表达人源 APP 的 HEK293T 细胞培养:

30 稳转了人源 APP 的 HEK293T 细胞使用 DMEM 培养基(Hyclone)培养, 加入 10%FBS (Gibco), 青霉素和链霉素, 和 G418(100 微克/毫升)。

表达目的基因 shRNA 的 pSUPER.basic 重组质粒通过 Lipofectamine™ 2000 (invitrogen)瞬时转染到 HEK293T 细胞中。转染后培养细胞两天,再用于后续试验。用 ELISA 检测培养液中 A $\beta$ <sub>42</sub> 浓度时,收集新换的且培养了细胞 12 小时的培养液。

5

APP 的  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  分泌酶的活性和稳转人源 APP 的 HEK293T 细胞中 APP 表达量检测:

利用 12 孔板培养稳转 APP 的 HEK293T 细胞,培养液中含有 PAO 的浓度为 0、25、50、100 或 150nM,培养 6-8 小时后,分别收集等量的细胞。检测分泌酶活性时,用 500 微升 TBS 缓冲液分别裂解细胞,低温离心 (13000g) 15 分钟,保留上清,沉淀则用 500 微升 TBS 缓冲液重悬浮。检测  $\alpha$  和  $\beta$  分泌酶的活性时,取 100 微升的上清与含有 10  $\mu$ M 的  $\alpha$  或  $\beta$  分泌酶特异性荧光底物 (specific fluorogenic substrates Calbiochem, Cat. No. 565767/565758) 的 2 倍反应液 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4 mM EDTA, 0.5% CHAPSO (w/v)) 混合;检测  $\gamma$  分泌酶的活性时,取 100 微升的重悬浮液与含有 10  $\mu$ M 的  $\gamma$  分泌酶特异性荧光底物 (specific fluorogenic substrates Calbiochem, Cat. No. 565764) 的 2 倍反应液 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4 mM EDTA, 0.5% CHAPSO (w/v)) 混合。在 37°C 反应 30 分钟后,用酶标仪 (excitation/emission : 365/490 nm for  $\alpha/\beta$  酶活性, 365/440 for  $\gamma$  酶活性) 检测。

检测 APP 表达量时,将收集的细胞用含有蛋白酶抑制剂 (1% cocktail, invitrogen) TBS 缓冲液裂解后进行后利用抗 APP/A $\beta$  抗体 (6E10) 进行免疫印迹。

10

15

20

25

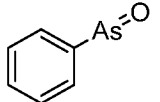
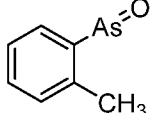
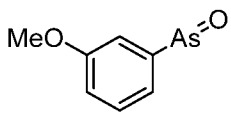
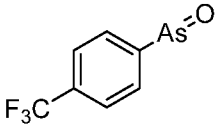
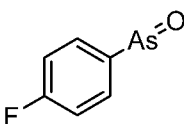
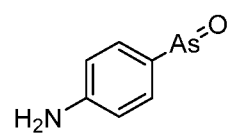
30

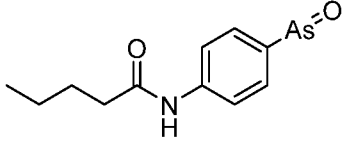
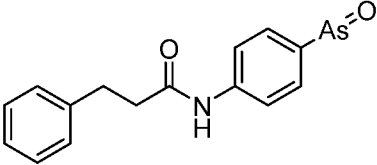
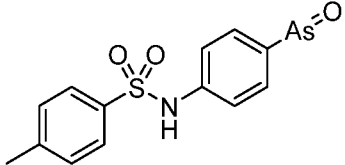
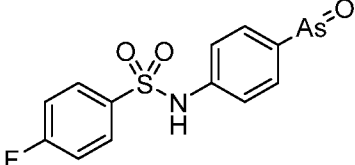
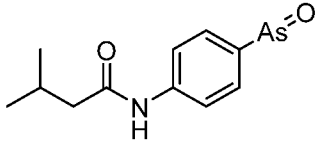
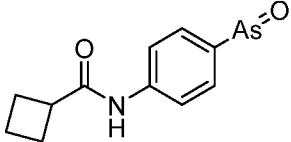
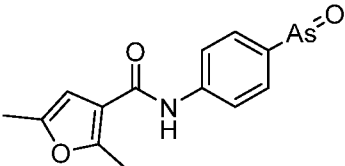
图 14 (a) 示归一化法定量分析 PAO 对 HEK293T 细胞的  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  分泌酶活性的影响,每个数据点, n=5, 单因素方差检验;图 14 (b) 示免疫印迹显示经不同 PAO 浓度处理后 HEK293T 细胞的 APP 表达量的代表图,该实验重复了 3 以上。

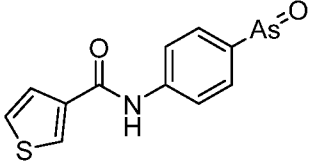
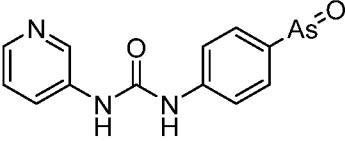
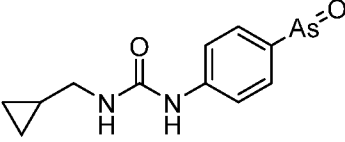
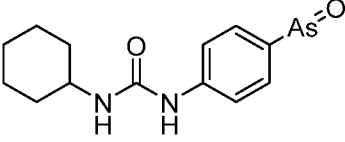
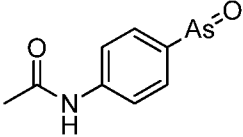
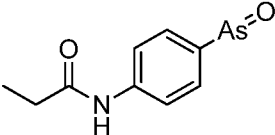
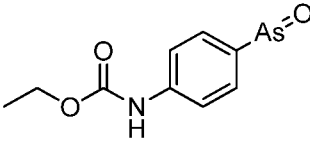
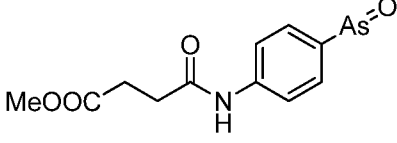
为了测试这种易化作用是否作用于从  $\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 剪切而来的 A $\beta$ <sub>42</sub> 的分泌,检测了一种稳定过量表达人源 APP 的

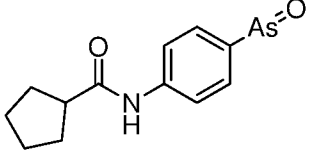
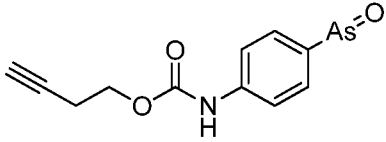
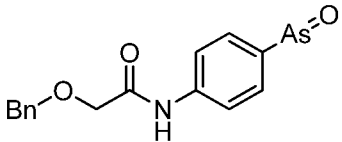
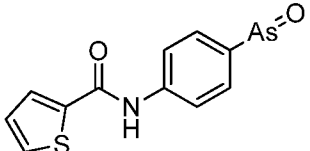
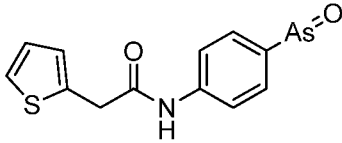
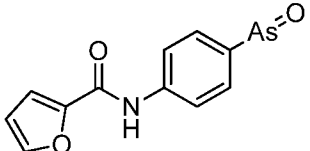
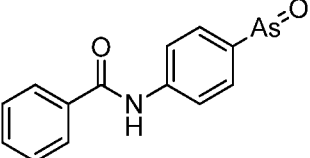
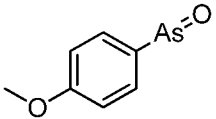
HEK293T 细胞的  $A\beta_{42}$  分泌情况。在图 4(d)-(g)中, 归一化法定量分析不同 PAO 和 A1 浓度处理、*EFR3a* 和 *PI4KA* 基因敲减对培养稳转人源 APP 的 HEK293 细胞的培养基中  $A\beta_{42}$  的水平的影响。事实上, PAO 处理在培养基中产生类似的提高  $A\beta_{42}$  浓度的效果 (图 4(d)), 且 PAO 即使在  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 DAPT (1 $\mu$ M)存在的情况之下, 依然提升了培养基中的  $A\beta_{42}$  浓度 (图 4(e))。值得注意的是, PAO 的浓度甚至在相当低 (甚至可以低到 1.0nM) 的情况下, 仍然存在稳定的效果 (图 4(i))。再者, 在稳定过量表达人源 APP 的 HEK293T 细胞中敲减 *EFR3a* 或 *PI4KA* 基因或应用 A1 处理均可以显著的提升培养基内的  $A\beta_{42}$  浓度 (图 4(f-g))。每组数据,  $n=4\sim 15$ , 单因素方差检验。

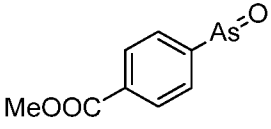
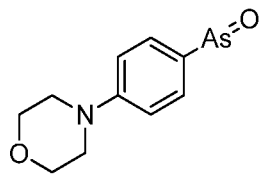
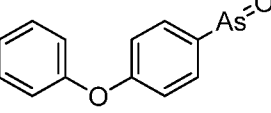
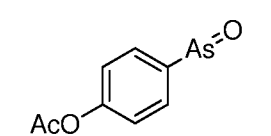
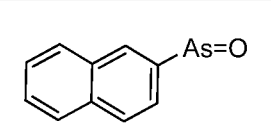
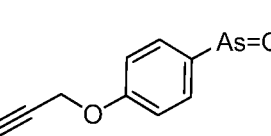
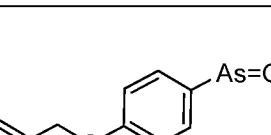
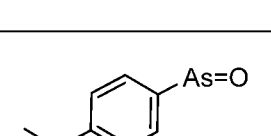
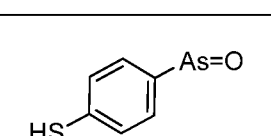
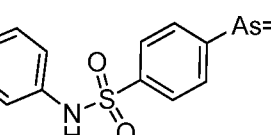
根据检测在稳定过量表达人源 APP 的 HEK293T 细胞的  $A\beta_{42}$  分泌情况, 对以下化合物进行检测并获得如下结果:

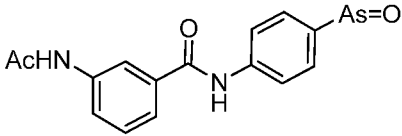
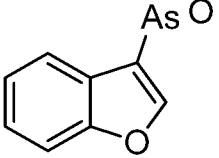
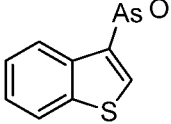
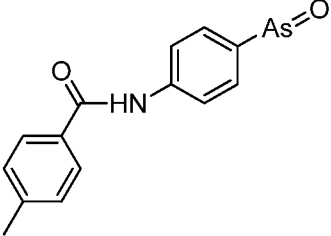
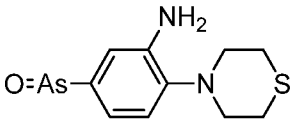
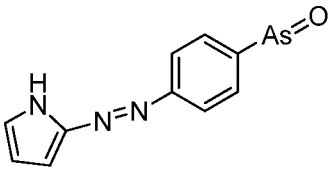
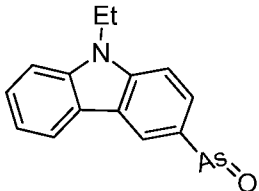
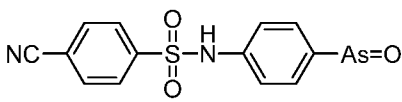
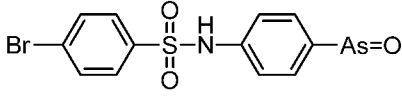
No.	化学式结构	名称	分子量	活性
1		苯基氧化砷 (oxo(phenyl)arsane)	168.0	+++
2		邻甲苯基氧化砷 (oxo(o-tolyl)arsane)	182.1	+
3		3-甲氧基苯基氧化砷 (3-methoxyphenyl)(oxo)arsane)	198.15	+
4		4-三氟甲基苯基氧化砷 (oxo(4-(trifluoromethyl)phenyl)arsane)	236.0	++
5		4-氟苯基氧化砷 (4-fluorophenyl)(oxo)arsane)	186.0	++
6		4-氧化砷基苯胺 (4-(oxoarsanyl)aniline (PAPAO))	183.0	++

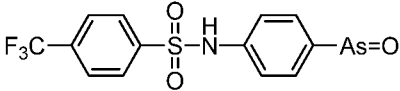
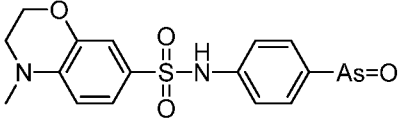
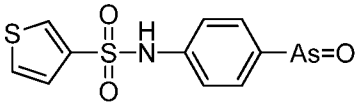
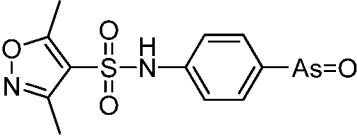
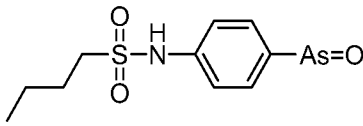
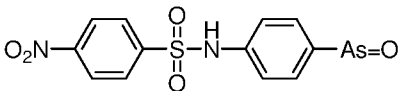
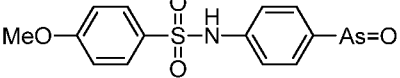
7		N-(4-氧化砷基苯基)戊酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)pentanamide)	267.2	+
8		N-(4-氧化砷基苯基)-3-苯基丁酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)-3-phenylpropanamide)	315.2	+
9		4-甲基-N-(4-氧化砷基苯基)苯磺酰胺 (4-methyl-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)benzenesulfonamide)	337.2	+
10		4-氟-N-(4-氧化砷基苯基)苯磺酰胺 (4-fluoro-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)benzenesulfonamide)	341.2	+
11		3-甲基-N-(4-氧化砷基苯基)丁酰胺 (3-methyl-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)butanamide)	267.2	+
12		N-(4-氧化砷基苯基)环丁基甲酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)cyclobutanecarboxamide)	265.1	+
13		2,5-二甲基-N-(4-氧化砷基苯基)呋喃-3-甲酰胺 (2,5-dimethyl-N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)furan-3-carboxamide)	305.2	+

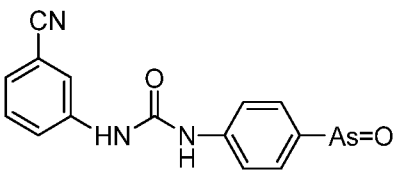
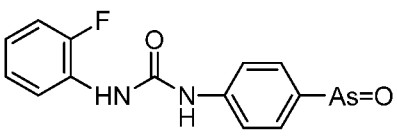
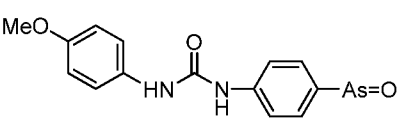
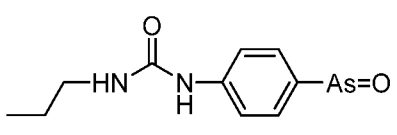
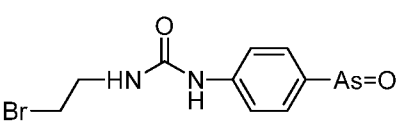
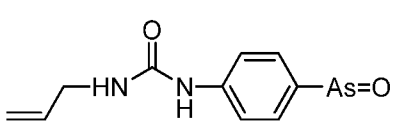
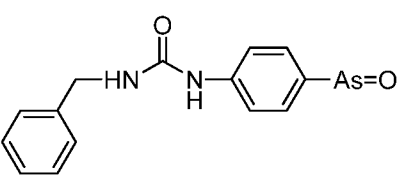
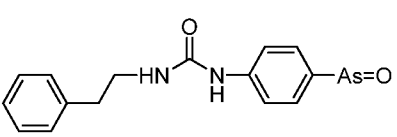
14		N-(4-氧化砷基苯基)噻吩-3-甲酰胺 (N-(4-(oxoarsanyl)phenyl)thiophene-3-carboxamide)	293.2	+
15		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(3-吡啶基)脲 (1-(4-(oxoarsanyl)phenyl)-3-(pyridin-3-yl)urea)	303.2	+
16		1-(环丙基甲基)-3-(4-氧化砷基苯基)脲 (1-(cyclopropylmethyl)-3-(4-(oxoarsanyl)phenyl)urea)	280.2	+
17		1-环己基-3-(4-氧化砷基苯基)脲 (1-cyclohexyl-3-(4-(oxoarsanyl)phenyl)urea)	308.2	+
18		N-(4-氧化砷基苯基)乙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)acetamide)	225.0	+
19		N-(4-氧化砷基苯基)丙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)propionamide)	239.0	+
20		(4-氧化砷基苯基)氨基甲酸乙酯 (ethyl(4-arsorylphenyl)carbamate)	255.0	+
21		4-((4-氧化砷基苯基)氨基)-4-氧化丁酸甲酯 (methyl 4-((4-arsorylphenyl)amino)-4-oxobutanoate)	297.0	+

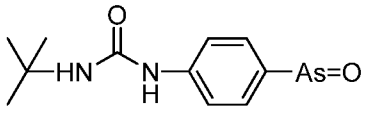
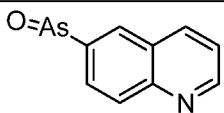
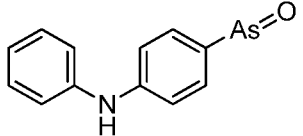
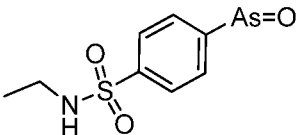
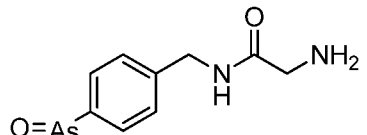
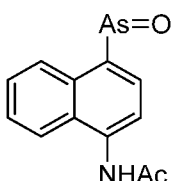
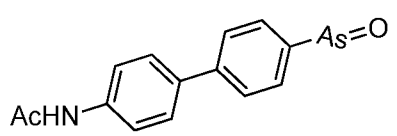
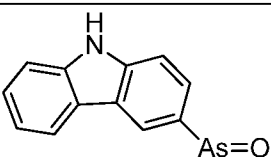
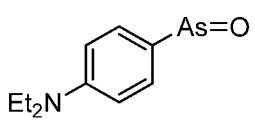
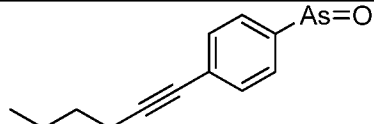
22		N- (4-氧化砷基苯基) 环戊酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)cyclopentanecarboxamide)	279.0	+
23		(4-氧化砷基苯基)氨基甲酸-3-丁炔-1-酯 (but-3-yn-1-yl (4-arsorylphenyl)carbamate)	279.0	+
24		N- (4-氧化砷基苯基) -2-苄氧基乙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-2-(benzyloxy)acetamide)	331.0	+
25		N- (4-氧化砷基苯基) 噻吩-2-甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)thiophene-2-carboxamide)	292.9	+
26		N- (4-氧化砷基苯基) -2- (噻吩-2-基) 乙酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-2-(thiophen-2-yl)acetamide)	307.0	+
27		N- (4-氧化砷基苯基) 呋喃-2-甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)furan-2-carboxamide)	277.0	+
28		N- (4-氧化砷基苯基) 苯甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)benzamide)	287.0	++
29		4-甲氧基苯基氧化砷 ( (4-methoxyphenyl)(oxo)arsine )	198.0	++

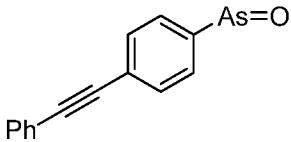
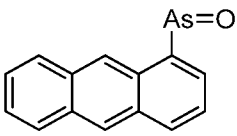
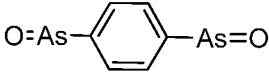
30		4-氧化砷基苯甲酸甲酯 (methyl 4-arsorylbenzoate)	226.0	+
31		4-(4-氧化砷基苯基)吗啉 (4-(4-arsorylphenyl)morpholine)	253.0	+
32		4-苯氧基苯基氧化砷 (oxo(4-phenoxyphenyl)arsine)	260.0	+
33		4-氧化砷基苯基乙酸酯 (4-arsorylphenyl acetate)	226.0	++
34		萘-2-基氧化砷 (naphthalen-2-yl(oxo)arsine)	218.0	++
35		4-(2-丙炔-1-氧基)苯基氧化砷 (oxo(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)arsine)	222.0	+
36		4-(2-丙烷-1-氧基)苯基氧化砷 (oxo(4-(prop-2-en-1-yloxy)phenyl)arsine)	224.0	+
37		4-甲硫基苯基氧化砷 (4-(methylthio)phenyl)(oxo)arsine)	213.9	+
38		4-氧化砷基苯硫酚 (4-arsorylbenzenethiol)	199.9	+
39		4-氧化砷基-N-苯基苯磺酰胺 (4-arsoryl-N-phenylbenzenesulfonamide)	323.0	+

40		3-乙酰胺基-N-(4-氧化砷基苯基) 苯甲酰胺 (3-acetamido-N-(4-arsorylphenyl)benzamide)	344.0	+
41		苯并呋喃-3-基氧化砷 (benzofuran-3-yl(oxo)arsine)	208.0	+
42		苯并[b]噻吩-3-基氧化砷 (benzo[b]thiophen-3-yl(oxo)arsine)	224.0	+
43		N-(4-氧化砷基苯基)-4-甲基苯甲酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-methylbenzamide)	301.0	+
44		5-氧化砷基-2-硫代吗啉基苯胺 (5-arsoryl-2-thiomorpholinoaniline)	284.0	+
45		2-(4-氧化砷基苯基偶氮基)-1H-吡咯 (2-((4-arsorylphenyl)diazenyl)-1H-pyrrole)	261.0	+
46		3-氧化砷基-9-乙基-9H-咔唑 (3-arsoryl-9-ethyl-9H-carbazole)	285.0	+
47		N-(4-氧化砷基苯基)-4-腈基苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-cyanobenzenesulfonamide)	335.9	+
48		N-(4-氧化砷基苯基)-4-溴代苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-bromobenzenesulfonamide)	400.9	+

		4-bromobenzenesulfonamide)		
49		N-(4-氧化砷基苯基)-4-(三氟代甲基)苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide)	300.9	+
50		N-(4-氧化砷基苯基)-4-甲基-3,4-二氢化苯并[b]-2H-1,4-恶嗪-7-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine-7-sulfonamide)	394	+
51		N-(4-氧化砷基苯基)噻吩-3-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)thiophene-3-sulfonamide)	328.9	+
52		N-(4-氧化砷基苯基)-3,5-二甲基异恶唑-4-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-3,5-dimethylisoxazole-4-sulfonamide)	342.0	+
53		N-(4-氧化砷基苯基)-正丁基-1-磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)butane-1-sulfonamide)	303.0	+
54		N-(4-氧化砷基苯基)-4-硝基苯磺酰胺 (N-(4-arsorylphenyl)-4-nitrobenzenesulfonamide)	367.9	+
55		N-(4-氧化砷基苯基)-4-甲氧基苯磺酰胺	353.0	+

		(N-(4-arsorylphenyl)-4-methoxybenzenesulfonamide)		
56		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(3-腈基苯基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(3-cyanophenyl)urea)	327.0	+
57		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(2-氟代苯基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(2-fluorophenyl)urea)	320.0	+
58		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(4-甲氧基苯基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)urea)	332.0	+
59		1-(4-氧化砷基苯基)-3-丙基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-propylurea)	368.0	+
60		1-(4-氧化砷基苯基)-3-(2-溴代乙基)脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(2-bromoethyl)urea)	331.9	+
61		1-烯丙基-3-(4-氧化砷基苯基)脲 (1-allyl-3-(4-arsorylphenyl)urea)	266.0	+
62		1-(4-氧化砷基苯基)-3-苯基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-benzylurea)	316.0	+
63		1-(4-氧化砷基苯基)-3-苯乙基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-phenethylurea)	330.0	+

64		1-(4-氧化砷基苯基)-3-叔丁基脲 (1-(4-arsorylphenyl)-3-(tert-butyl)urea)	282.0	+
65		6-氧化砷基喹啉 (6-arsorylquinoline)	219.0	+
66		4-氧化砷基二苯胺 (4-arsoryl-N-phenylaniline)	259.0	+
67		4-氧化砷基-N-乙基苯磺酰胺 (4-arsoryl-N-ethylbenzenesulfonamide)	275.0	+
68		2-氨基-N-(4-氧化砷基苄基)乙酰胺 (2-amino-N-(4-arsorylbenzyl)acetamide)	254.0	+
69		N-(4-氧化砷基萘-1-基)乙酰胺 (N-(4-arsorylnaphthalen-1-yl)acetamide)	275.0	+
70		N-(4'-氧化砷基-[1,1']联二苯-4-基)乙酰胺 (N-(4'-arsoryl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetamide)	301.0	+
71		3-氧化砷基-9H-咔唑 (3-arsoryl-9H-carbazole)	257.0	+
72		4-氧化砷基-N,N-二乙基苯胺 (4-arsoryl-N,N-diethylaniline)	239.0	+
73		(4-(1-己炔-1-基)苯基)氧化砷 (4-(hex-1-yn-1-yl)ph)	248.0	+

		enyl)(oxo)arsine)		
74		(4-苯乙炔基苯基)氧化砷 (oxo(4-(phenylethynyl)phenyl)arsine)	268.0	+
75		蒽-1-基氧化砷 (anthracen-1-yl(oxo)arsine)	268.0	++
76		1,4-二(氧化砷基)苯 (1,4-diarsorylbenzene)	257.9	++

此外, PAO 促进稳转 APP 的 HEK293 细胞分泌  $A\beta_{42}$ , 但不改变剪切 APP 的  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  分泌酶的活性图 14 (a)、也不引起 APP 水平升高图 4 (b)。

5

实施例 11: 病毒构建包装及其在小鼠中的显微注射

慢病毒由 invitrogen 公司(上海)使用 BLOCK-iT™ HiPerform™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP 这一表达系统制造。四个针对 *EFR3a* 基因的 miRNAs 寡聚片段被合成并插入 pcDNA™6.2-GW/EmGFPmi 载体。用 RT-PCR 或 Western Blot 的方法检测敲除效率。检测结果显示, 其中一个载体在过表达 *EFR3a* 基因的 HEK293T 细胞中, 对沉默 *EFR3a* 基因表达最有效。敲除效率最高的载体目的序列为 AGGTATCATTCAGGTTCTGTT。这一最有效的 miRNA 载体与 pDONRTM221 及 pLenti6/V5 DEST 重组, 通过 Gateway®重组反应得到 pLENT6/V5-GW/±EmGFP-miRNA 载体。慢病毒通过共转染 pLENT6/V5-GW/±EmGFP -miRNA vector 和 Packaging Mix 得到。病毒浓度经由在 HEK293T 细胞中连续稀释得到。随后每三天统计一次 EGFP 阳性的细胞。沉默效率进一步通过慢病毒转染原代培养的海马神经元得到。

20

APP/PS1 转基因雄鼠 (B6.Cg-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/Mmjax (MMRRC ID 034832-JAX) 通过与 (C57BL/6 和 C3H 交配的 F1 带) 小鼠杂交保种。在 6 月龄时, 使用 100mg/kg Ketamine 加 20mg/kg Xylazine 麻醉小鼠, 固定于立体定位仪, 腹部向下置于电热毯上。清除头部毛发, 切开皮肤, 穿透颅骨打一小洞。使用注射泵 (Harvard Apparatus) 通过套管系统 (external diameter, 0.29mm, internal diameter, 0.1mm, RWD Life Science Co., Ltd), 在 20 分钟内注射 2  $\mu$ l 慢病毒溶液 (病毒浓度:  $6 \times 10^{-7}$ ) 至 2.1mm posterior to bregma, 2.3mm lateral and 1.9mm ventral。注射后 5 分钟, 移除针头, 缝合皮肤, 小鼠移至 25 $^{\circ}$ C 含充足食物和水的环境中培养。至 12 月龄时, 再次麻醉小鼠, 使用 PBS 配制的 4%多聚甲醛 (para-formaldehyde, 简称 PFA) 灌注。实验遵照美国神经科学协会对动物使用的政策在小鼠上进行实验。

15 实施例 12: 通过小鼠脑片 GFP 染色检测敲减 *EFR3a* 基因可修复 APP/PS1 鼠神经元树突的萎缩

小鼠脑片 GFP 染色:

20 脑片 (厚 60 $\mu$ m) 使用 PBS-0.3%triton-5%BSA 封闭 1 小时, 使用兔源 anti-GFP 抗体 (A11122, invitrogen, 1:100 稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。随后以 PBS 洗, 并用生物素化羊源抗兔 IgG 抗体 (H+L) (AbboMax, Inc, 1:100 稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再次以 PBS 洗, 使用 Cy3-Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 1:1000 稀释) 于室温下孵育 2 小时。使用 Zeiss LSM 511 共聚焦显微镜采集图像, 通过 AutoQuant X2 反卷积, 再用 NeuronStudio 软件进行数据分析。脑片与采集到的树突图像所属基因型对于采集图像的人员和进行数据分析的人来说都分别是未知的。

30 在图 11 中, RT-PCR 方法检测在 HEK293 细胞中敲减内在 *EFR3a* 基因 (a) 和 *PI4KA* 基因 (b), 在 HEK293 细胞中敲减过表达的小鼠

*EFR3a-gfp* 重组基因 (c), 以及在小鼠原代培养的海马神经元中敲减小鼠内在 *EFR3a* 基因 (d) 的效率。代表图在上, 归一化法定量分析在下。用于构建敲减人源 *Efr3a* 和 *PI4KA* 基因的 RNAi 的序列分别是:  
5 5'-GGTTATTGAAATTCGAACT-3' (SEQ ID NO:5) 和 5'-TGCTCATT  
AGCAGTAAAGA-3' (SEQ ID NO:6)。对于每个数据, n=3-5, T 检验获得 P 值。

在图 5(a)中, 共聚焦成像显示抗 GFP 免疫染色的海马切片全图(上部)与慢病毒转染的 CA3 区锥体细胞(下部)。选取长度约 30 $\mu$ m 的树突片段(两箭头之间)片段量化树突的直径和树突棘的密度。比例尺是 500 微米(上部)和 50 微米(下部)。在 APP/PS1 和同窝对照小鼠的 CA3 区锥体神经元(参见图 5(b))和 DG 区颗粒神经元(参见图 5(c))中敲减 *EFR3a* 基因对树突直径和树突棘密度的影响。CA3 和 DG 区树突的代表图位于顶部, 树突直径和树突棘密度的定量分析位于底部。每个数据点取自 3~4 只动物的 n $\geq$ 25 张切片, P 值通过单因素方差分析得到。比例尺在图 5(b)和(c)中是 1.0 微米。  
10  
15

小鼠和人类有 *EFR3a* 基因和 *EFR3b* 基因两个 *rbo* 的同源基因, 这两个基因在海马等 AD 易感区富集(Allen brain atlas)。通过在 APP/PS1 小鼠中运用 EGFP 标记的 RNAi 技术, 研究下调 *EFR3a* 基因后能否保护海马神经细胞。RNAi 的敲减效率(见图 11(a)&(b))。激光共聚焦成像显示海马 CA3 和 DG 区的小部分神经细胞被表达 EGFP 的慢病毒感染(图 5(a)上)。我们通过随机选取细胞近端部分(约 30 $\mu$ m 长)的次级顶树突, 测量其树突直径及树突棘密度。在野生型对照组小鼠与 APP/PS1 小鼠之间比较, 以上两个参数的值在受对照慢病毒感染的 APP/PS1 小鼠的 CA3 和 DG 区神经细胞中显著降低(图 5(b)&(c)), 表明 APP/PS1 小鼠的海马神经元树突及树突棘有萎缩。在 APP/PS1 小鼠之间比较, 以上两个参数的值在受 RNAi 慢病毒感染的神经细胞中显著增高, 几乎与这两个参数在野生型小鼠中的值无差异(图 5(b)&(c))。  
20  
25

因此，下调 APP/PS1 小鼠海马的神经元的 *rbo* 同源基因 *EFR3a* 也可保护神经细胞。

5 实施例 13：通过对脑脊液和分离小鼠大脑细胞膜组分的分析检测 PAO 改善 APP/PS1 小鼠的记忆和学习能力，增加脑脊液内  $A\beta_{42}$ ，但减少大脑细胞膜中的  $A\beta_{42}$

脑脊液的采集：

10 用氯胺酮和甲苯噻嗪将小鼠麻醉，注意用适配器保护小鼠的头部。将小鼠颈部的毛剃掉并切开皮肤，用钳子把下面的皮下组织和肌肉向两侧分开，以暴露覆盖在小脑延髓池的那部分硬脑膜。准备一只一端很锐利但另一端较钝的玻璃毛细管，钝的一端连接显微注射器，然后用锐利的一端刺入硬脑膜。当感觉到明显的突破感时，说明毛细管成功进入小脑延髓池，脑脊液就会被吸入毛细管，大约收集 10—20 微升。  
15 将收集的脑脊液转移到微量离心管， $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

分离小鼠大脑细胞膜组分：

20 通过一系列的抽提得到可溶于去垢剂的  $A\beta_{42}$ ，加入相当于小鼠大脑半球的 5 倍体积的用缓血酸胺缓冲液(TBS)进行研磨，研磨成匀浆后放入离心机，在  $4^{\circ}\text{C}$  以 100,000g 离心 60 min，则上层清液是 TBS 提取物。收集下面的沉淀，加入 5 倍体积的含有 1%聚乙二醇辛基苯基醚的 TBS 缓冲液，再次研磨并离心，则上层为 TBS-Triton 提取物。再收集下层沉淀，加入 5 倍体积的包含 1% SDS 的 TBS 缓冲液，进行第三次研磨并离心，则上层清液为 TBS-SDS 提取物。分别收集这三次的上次  
25 清液，分装好后，放入 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存，为做 ELISA 检测备用。

30 以上在培养细胞和果蝇中的实验结果显示 PAO 可以促进  $A\beta_{42}$  分泌，减少神经元内  $A\beta_{42}$  积累并改善突触等功能，说明通过促进  $A\beta_{42}$  分泌，PAO 可作为治疗 AD 的一个潜在药物。为此，对灌胃服用了不同 PAO 剂量的 APP/PS1 小鼠进行了行为和生化实验。

在图 6(a)中, 不同浓度 PAO 处理的 APP/PS1 小鼠 (左侧图) 和同窝出生的野生型小鼠 (右侧图) 的水迷宫实验训练曲线。为了方便对比, PAO 灌胃浓度为 0 的 APP/PS1 小鼠的学习曲线在左右两图中均有显示。在图 6(b)中, 训练后对照和 APP/PS1 小鼠在目标象限中的搜寻时间占总的搜寻时间的百分比。ELISA 方法定量分析不同浓度处理的 APP/PS1 小鼠脑脊液中 (参见图(c)), 和 1% Triton 及 1%SDS 的 TBS 缓冲液提取的大脑细胞膜组分中 (参见图 6(d)) 的  $A\beta_{42}$  水平。在图 6(e) 中, 100°C 处理不同时间对 ELISA 方法定量分析 APP/PS1 小鼠脑脊液中 (左图) 和 1%SDS 的 TBS 缓冲液提取的大脑细胞膜组分中的  $A\beta_{42}$  测定值的影响。在图 6(f)中, ELISA 方法定量分析 100°C 处理 60 分钟后 1% Triton 及 1%SDS 的 TBS 缓冲液提取的大脑细胞膜组分中的  $A\beta_{42}$  水平。在图 6(f)中, 100°C 处理 60 分钟后从 1% Triton 及 1%SDS 的 TBS 缓冲液提取的各大脑细胞膜组分中所释放出的  $A\beta_{42}$  量占各自总量的百分比。在图 6(a)和(b)中, 各野生型对照组  $n=6\sim 8$ , 各 APP/PS1 组  $n=7\sim 8$ ; 在图 6(e), 左侧,  $n=3$ , 图 e, 右侧,  $n=23$ ; 在图 6(c,d 和 f)中,  $n=5\sim 6$ 。P 值均通过单因素方差 (one-way ANOVA) 分析得到。

通过在实施例 8 中描述的对野生型小鼠灌胃测试 PAO 的毒性后, 以 0、0.1、0.3 和 1.0mg/kg 为浓度梯度进行以下实验。对 4 月龄大的 APP/PS1 小鼠和野生型小鼠进行 PAO 灌胃, 周一至周五每天一次, 连续 6 周。之后停药一周, 通过按照 Vorhees and Williams 描述的方法进行的水迷宫实验测试小鼠的学习和记忆能力。与野生型对照组相比, 没有进行 PAO 灌胃的 APP/PS1 小鼠的空间记忆和学习能力明显受损 (图 6(a)&(b))。这种损害在有 PAO 灌胃的 APP/PS1 小鼠中显著降低, 尤其当剂量为 0.3mg/kg 时最明显 (图 6(a)&(b))。这一结果表明 PAO 能治疗 APP/PS1 小鼠的学习记忆障碍。行为测试后, 对每只 APP/PS1 小鼠进行收集脑脊液和提取脑组织的细胞膜组分。利用含有 1%Triton X-100 和 1% SDS 的两种 TBS 缓冲液对脑组织进行分级分馏操作, 提取细胞膜偶联的  $A\beta_{42}$ , 然后采用 ELISA 定量法检测。发现 PAO 增加了

脑脊液中  $A\beta_{42}$  的含量（图 6(c)），并出乎意料地增加了大脑细胞膜中  $A\beta_{42}$  的水平，尤其当剂量在 0.3mg/kg 时（图 6(d)）。但是，图 6(f) 显示 PAO 处理显著减少了大脑细胞膜中聚合状  $A\beta_{42}$  的水平，尤其当剂量在 0.3mg/kg 时。

5

实施例 14: 通过水迷宫实验检测突变小鼠 PI4KIII $\alpha$  改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力

在  $A\beta_{42}$  表达果蝇中遗传方法下调 PI4KIII $\alpha$  的表达量或 PAO 抑制其酶活性都减轻了神经功能异常，在 APP/PS1 小鼠中 PAO 抑制 PI4KIII $\alpha$  的酶活性也改善了学习记忆功能。为了进一步明确 PI4KIII $\alpha$  在 APP/PS1 小鼠神经退行性改变中的功能，我们检测了 PI4KIII $\alpha$  杂合突变 (Pi4ka<sup>Gt(RRO073)Byg/+</sup>: 转座子 pGT2Lxf 插入在一个拷贝的 PI4KA 基因中会导致该拷贝基因在转录时出现障碍，产生的 mRNA 仅能翻译 PI4KIII $\alpha$  氨基端的前~265 个氨基酸与报告基因编码的蛋白所组成的融合蛋白) 对 APP/PS1 小鼠在水迷宫实验中影响。把 Pi4ka<sup>Gt(RRO073)Byg/+</sup> 突变杂合子 (MMRRC, Cat. #016351-UCD) 与 APP/PS1 小鼠交配，获得四组基因型小鼠: 野生型 (WT)、PI4KIII $\alpha$  突变杂合子 (PI4K\*/+), APP/PS1 (TG) 和含有 PI4KIII $\alpha$  杂合突变的 APP/PS1 (TG;PI4K\*/+)。当这四组小鼠达到 5 月龄时按照 Vorhees and Williams 描述的方法进行水迷宫实验。如图 12 所示，结果显示 PI4KIII $\alpha$  杂合突变能显著改善 5 月龄 APP/PS1 小鼠的空间学习和记忆能力。图 12 左侧显示的是四组基因型小鼠在训练日的上台时间，右侧显示的是在训练结束日后第 1 天的测试中四组基因型小鼠在目标象限中游动时间所占的百分比。

25

实施例 15: 通过脂质体实验检测 PI、PI<sub>4</sub>P、PI<sub>4,5</sub>P 在脂质体中对  $A\beta_{42}$  聚合的影响

脂质体实验:

30

1) 用六氟异 (2) 丙醇 (hexafluoro-2-propranol, HFIP) 溶解合成

的 A $\beta$ <sub>42</sub>，溶解比率是 1:1 (mg:ml)，然后是在室温下用 50Hz 的超声波混匀 15 分钟。超声波产生器是 KUDOS ultrasonic instrument (Model SK250HP)。

5 2) 用氯仿 (chloroform) 分别溶解用于制备脂质体的各种脂类 (见表 1) 溶解比率也是 1:1 (mg:ml)，在室温下用 50Hz 的超声波混匀 15 分钟。

3) 按表 1 的比率把 A $\beta$ <sub>42</sub> 和各种脂类混合在一起，随后用冷冻干燥器抽干混合液中的有机溶剂。

10 4) 用 1.0ml 的 Tris 缓冲液(50mM Tris, 120mM NaCl, pH7.0)重悬浮冷冻干燥处理后所得的沉淀，在冰水中超声波混匀 30 分钟。然后在 4°C 下静置 48 小时后进行免疫印迹检测 (一抗是抗人源 A $\beta$  的单克隆抗体 6E10, 1:1000)。免疫印迹检测前需在冰水中超声波混匀 15 分钟。

表 1. 制备脂质体的各种脂类配比

	CAS #	分子量	%摩尔	加入体积
磷脂酰丝氨酸(PS)	145849-32-7	757.95	8.9	68 $\mu$ l
磷脂酰胆碱(PC)	63-89-8	734.04	15.4	121 $\mu$ l
磷脂酰乙醇胺(PE)	1069-79-0	748.07	26.5	196 $\mu$ l
胆固醇(CH)	57-88-5	386.65	14.8	57 $\mu$ l
鞘磷脂(SM1)	85187-10-6	973.55	8.9	86 $\mu$ l
			终浓度	
A $\beta$ <sub>42</sub>		4514.04	1.0 $\mu$ M	4.5 $\mu$ l
PI (diC16)	119943-95-2	833.01	20 $\mu$ M	17 $\mu$ l
PI <sub>4</sub> P (diC16)	214332-61-3	956.96	20 $\mu$ M	19 $\mu$ l
PI <sub>4,5</sub> P (diC16)	120595-88-2	1080.9	20 $\mu$ M	22 $\mu$ l

15

对 PI、PI<sub>4</sub>P、PI<sub>4,5</sub>P 在脂质体中对 A $\beta$ <sub>42</sub> 寡聚体形成的影响和比较进行分析，图 13 的左列显示的是 PI<sub>4</sub>P 对脂质体中 A $\beta$ <sub>42</sub> 寡聚体形成的促进作用呈浓度依赖性，上下部是同一免疫印记膜的相对短和长时间的曝光后显影的结果；请注意 PI<sub>4</sub>P 浓度为 80 $\mu$ M 时，对 A $\beta$ <sub>42</sub> 寡聚体形成

的促进作用反而比 40 $\mu$ M 时有所减弱。图 13 的右列显示的是 PI、PI<sub>4</sub>P 和 PI<sub>4,5</sub>P 对脂质体中 A $\beta$ <sub>42</sub> 聚合的促进作用，上下部是同一免疫印记膜的相对短和长时间的曝光后显影的结果；请注意 PI<sub>4</sub>P 的作用明显比 PI 和 PI<sub>4,5</sub>P，且 PI 和 PI<sub>4</sub>P 对 A $\beta$ <sub>42</sub> 三聚体和以上的寡聚体形成的促进作用又比 PI<sub>4,5</sub>P 强。

实施例 16: RBO/EFR3/EFR3A/EFR3B、PI4KIIIa 和 TTC7 在细胞膜上形成复合体

报道显示，酵母的 EFR3 蛋白与 PI4KIIIa 和一个脚手架蛋白 YPP1（在哺乳动物中叫 TTC7，包括 TTC7A 和 TTC7B 两个同源蛋白）在细胞膜上形成复合体，且以斑片状聚集（PIK patches），一起控制膜的 PI<sub>4</sub>P 水平、甚至 PI<sub>4,5</sub>P 水平。YPP1 与酵母 PI4KIIIa 蛋白的 N 端和中间区域均有直接相互作用，对 PIK patches 的组建和稳定起着关键作用（Baird D, Stefan C, et al., 2008, J Cell Biol）。PIK patches 的构成和功能在哺乳动物细胞中也保守（Nakatsu F, Baskin JF, et al., 2012, J Cell Biol）。果蝇中的 TTC7 的果蝇同源蛋白是由 lethal (2) k14710[ *l(2) k14710* ] 基因编码。

为了检测 TTC7 蛋白在神经元内 A $\beta$  积累引起的神经退行性改变中的作用，在 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇中分别引入两个转座子（transpon）介导的转基因，一个是 P{lacW}l(2) k14710k<sup>15603</sup>，（Bloomington Cat. #11134）该转座子插在 *l(2) k14710* 基因的第一个外显子中，阻止 *l(2) k14710* 基因的转录；另一个是 P{EPgy2}bin3<sup>EY09582</sup>，（Bloomington Cat. #20043）。该实验共构建了 4 组果蝇：对照果蝇（ctrl）、A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇、含有一个拷贝的 P{lacW}l(2) k14710k<sup>15603</sup> 的 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇（A $\beta$ <sub>arc</sub>-*dttc7*<sup>+/-</sup>，TTC7 下调）和含有一个拷贝 P{EPgy2}bin3<sup>EY09582</sup> 的 A $\beta$ <sub>arc</sub> 果蝇（A $\beta$ <sub>arc</sub>-*dttc7*-OE，TTC7 过表达）。当 4 组果蝇的成虫达到 5-10、30-35 天两个日龄段后，进行 100 赫兹脑刺激诱发的逃跑通路的兴奋性突触后电位记录。

图 15 示定量分析分别下调和过量表达 TTC7 对 A $\beta$ arc 果蝇中神经传递的影响。在日龄为 5-10 天时，4 组果蝇的 100 赫兹脑刺激诱发的神经传递成功率无明显差异，但在日龄为 30-35 天时，A $\beta$ arc 果蝇的神经传递的成功率明显比对照果蝇（ctrl）要低，过量表达 TTC7（A $\beta$ arc-dttc7-OE）使成功率进一步降低，但下调 TTC7 表达（A $\beta$ arc-dttc7+/-）则提高神经传递的成功率。

上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

15

20

25

# 权 利 要 求 书

1. 一种筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述方法包含筛选能提高细胞分泌  $A\beta$  水平的候选药物或治疗靶点。

5

2. 如权利要求 1 所述的筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 将所述药物应用于过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系或果蝇组织或调节过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系或果蝇组织中的所述治疗靶点；以及

10

(2) 利用免疫分析方法检测所述过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系或果蝇组织中细胞分泌  $A\beta$  的情况，其中，如果所述药物的应用或治疗靶点的调节能导致细胞分泌  $A\beta$  的量增加，则所述药物或治疗靶点可用于治疗阿尔茨海默病。

15

3. 如权利要求 1 或 2 中任一所述的筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述  $A\beta$  为  $A\beta_{42}$ 。

4. 如权利要求 2 中所述的筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述检测  $A\beta$  的分泌情况的免疫分析方法为酶联免疫吸附剂测定或电化学发光免疫分析方法。

20

5. 如权利要求 2 中所述的筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的细胞系为稳转人源 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的 HEK293T、N2a 或 SH-SY5Y 细胞系。

25

6. 如权利要求 2 中所述的筛选用于治疗阿尔茨海默病的药物以及治疗靶点的方法，所述过量表达 APP 或含分泌信号肽的  $A\beta$  的果蝇组

织为果蝇三龄幼虫组织。

5

10

15

20

25

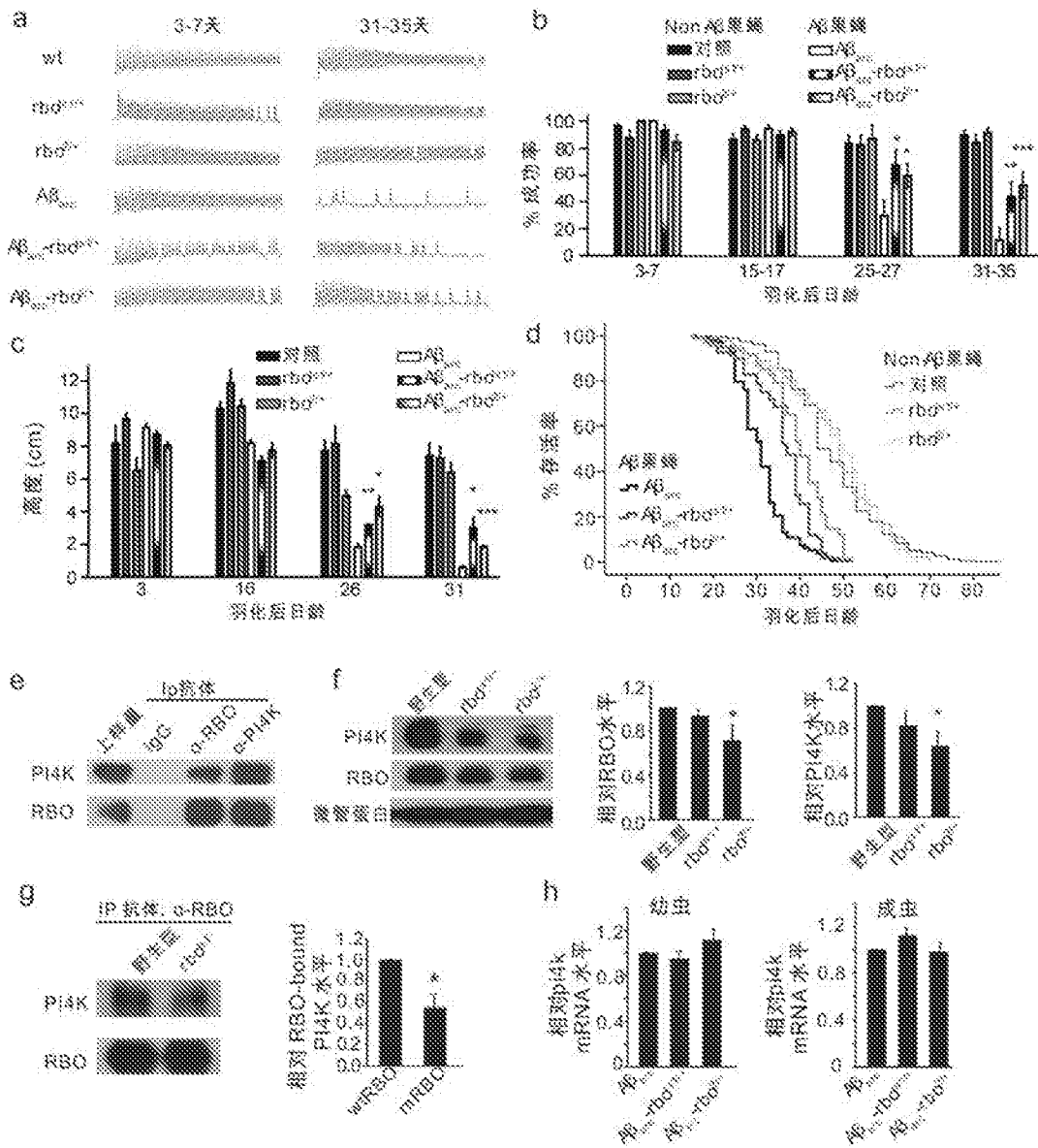


图 1

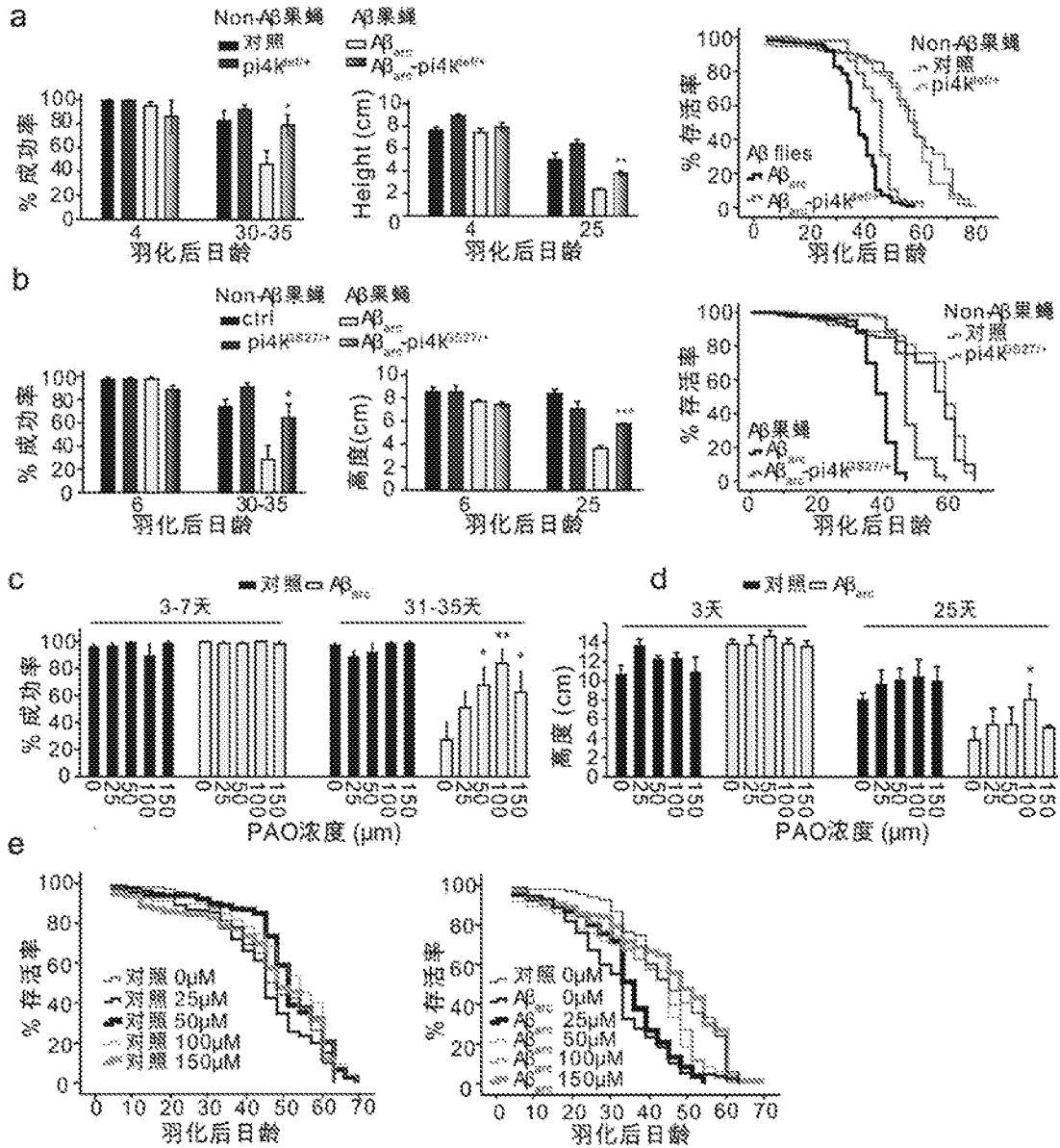


图 2

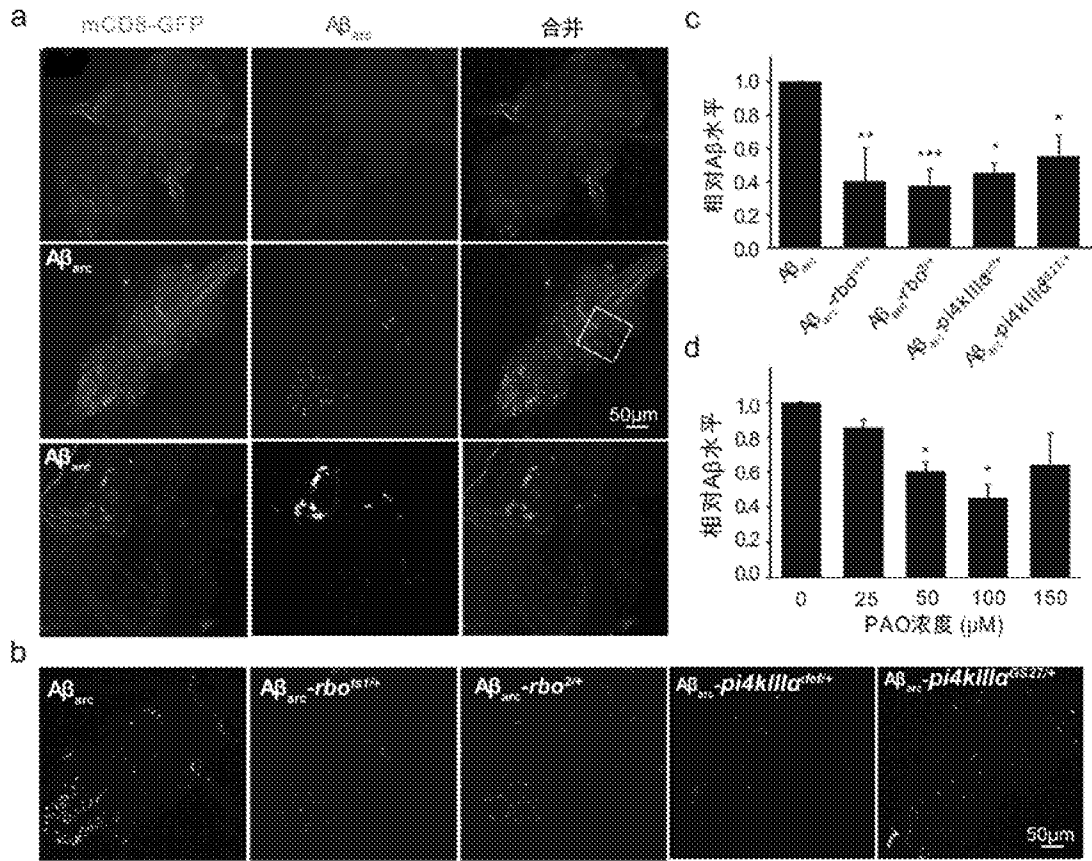


图 3

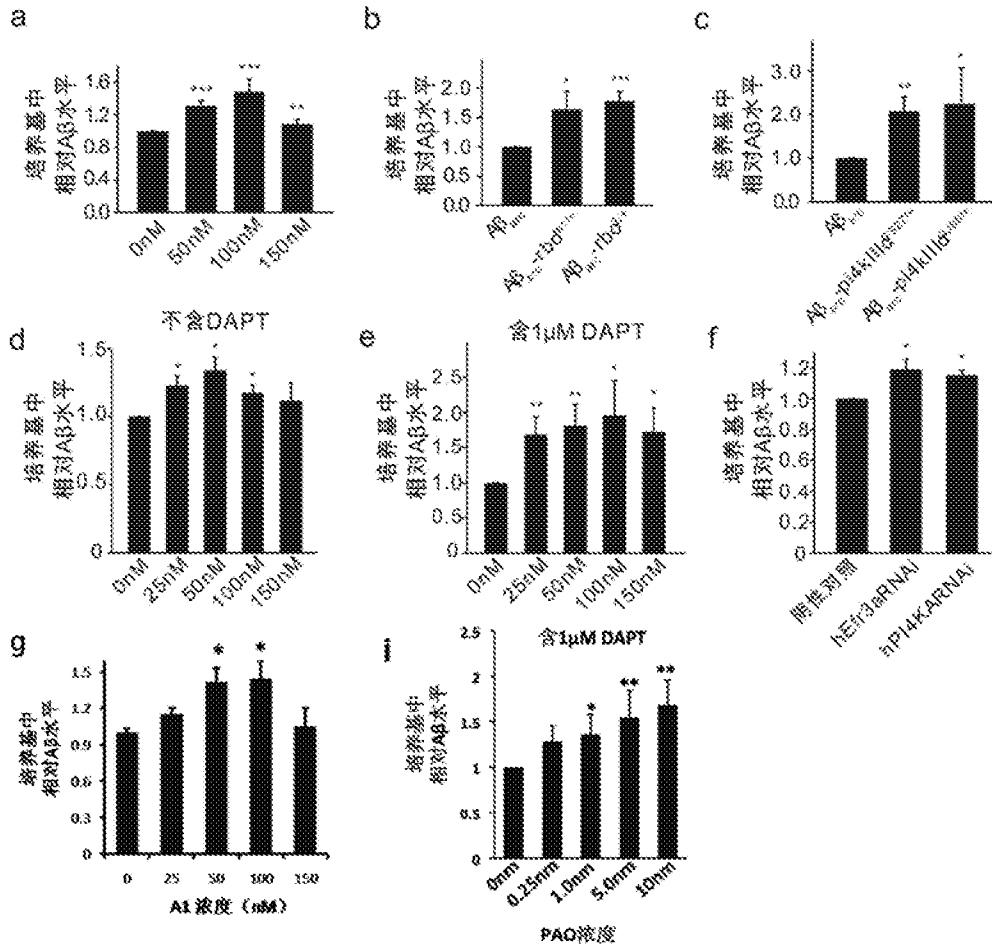


图 4

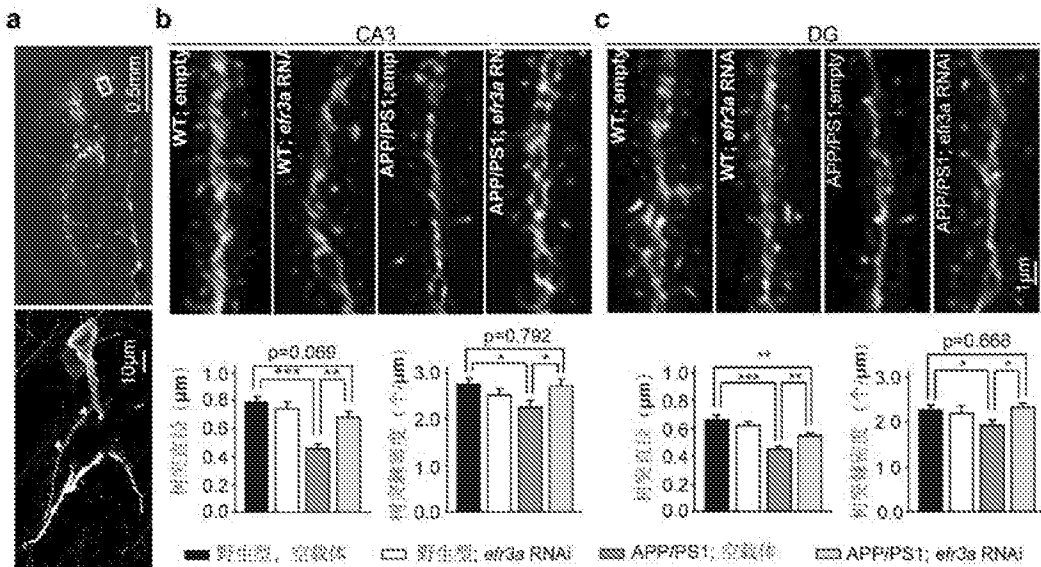


图 5

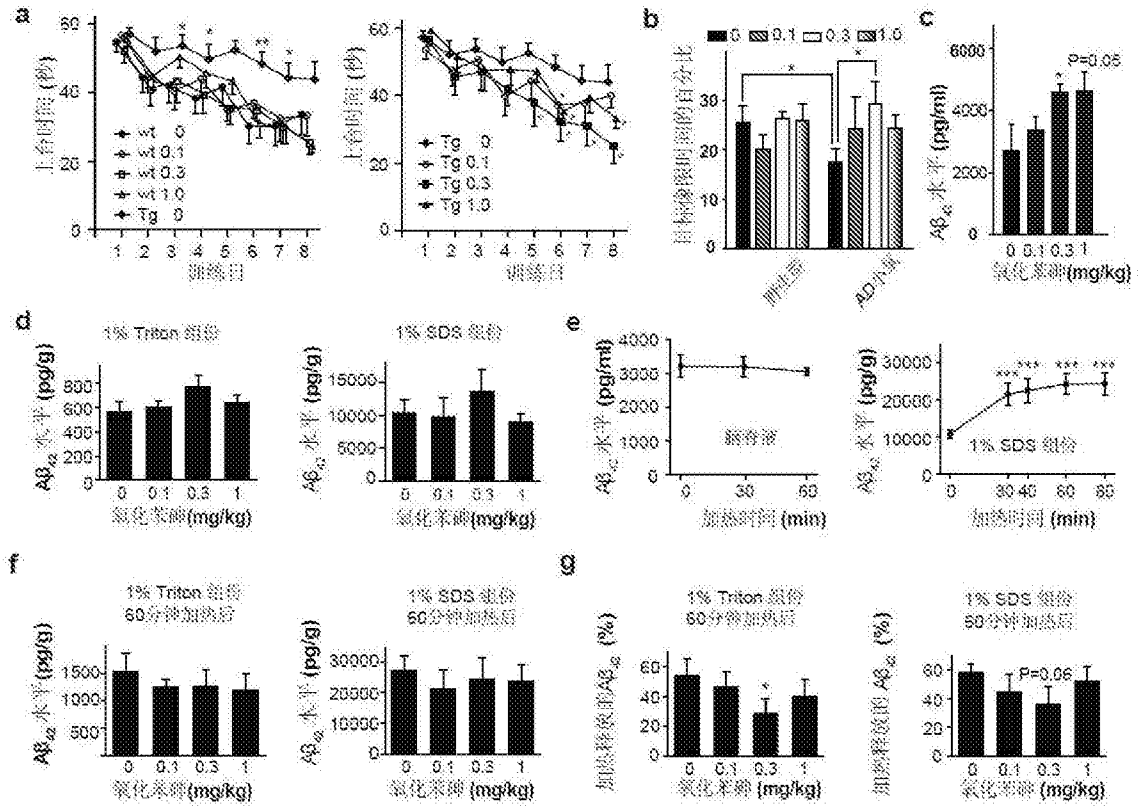


图 6

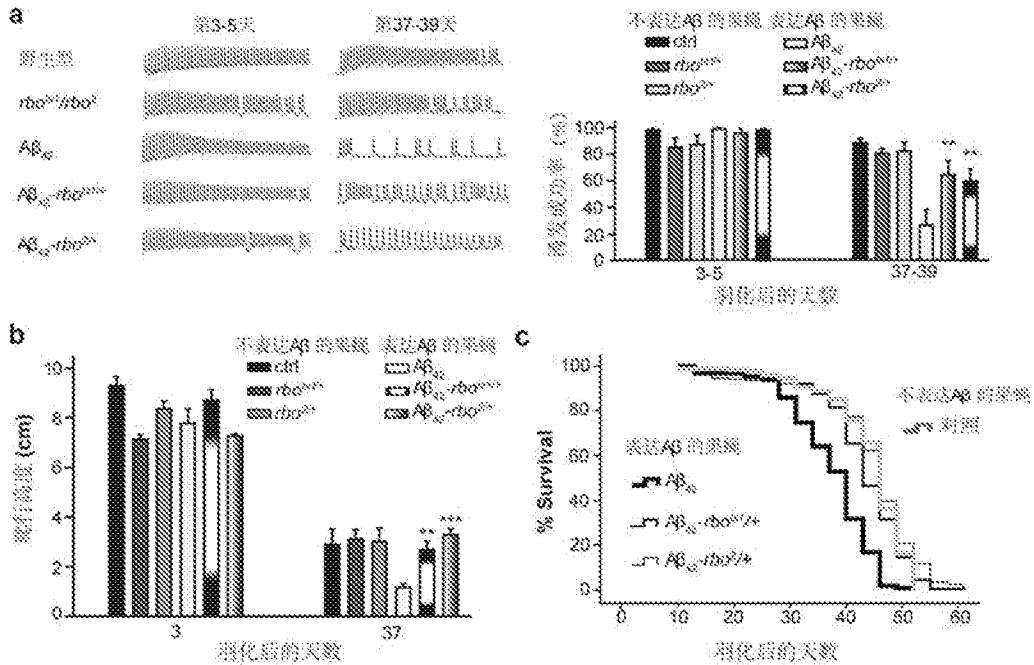


图 7

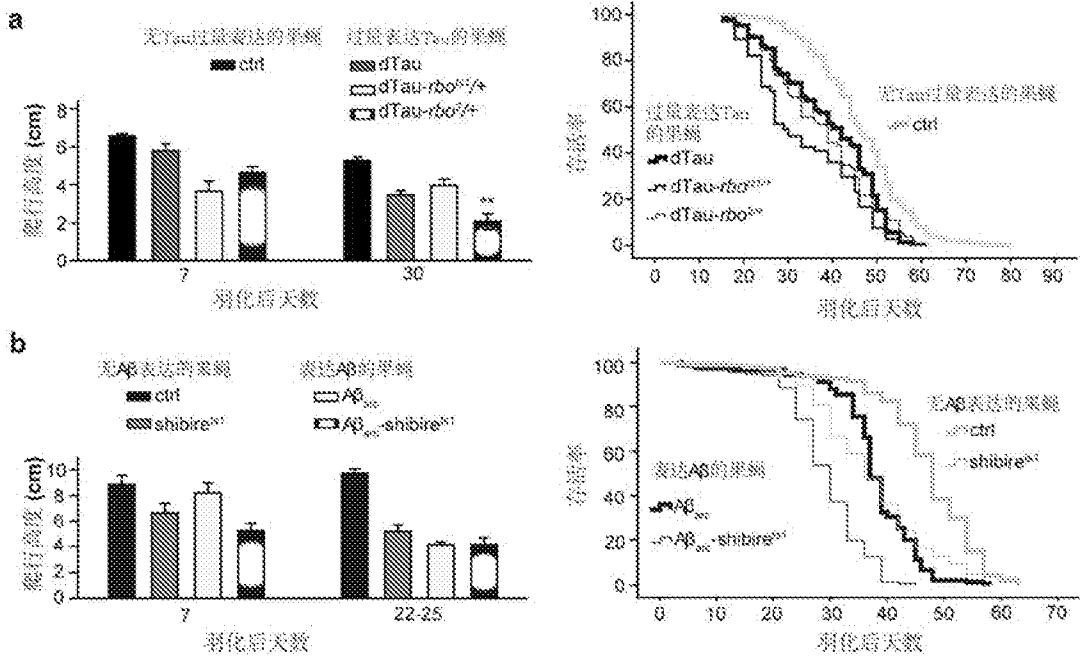


图 8

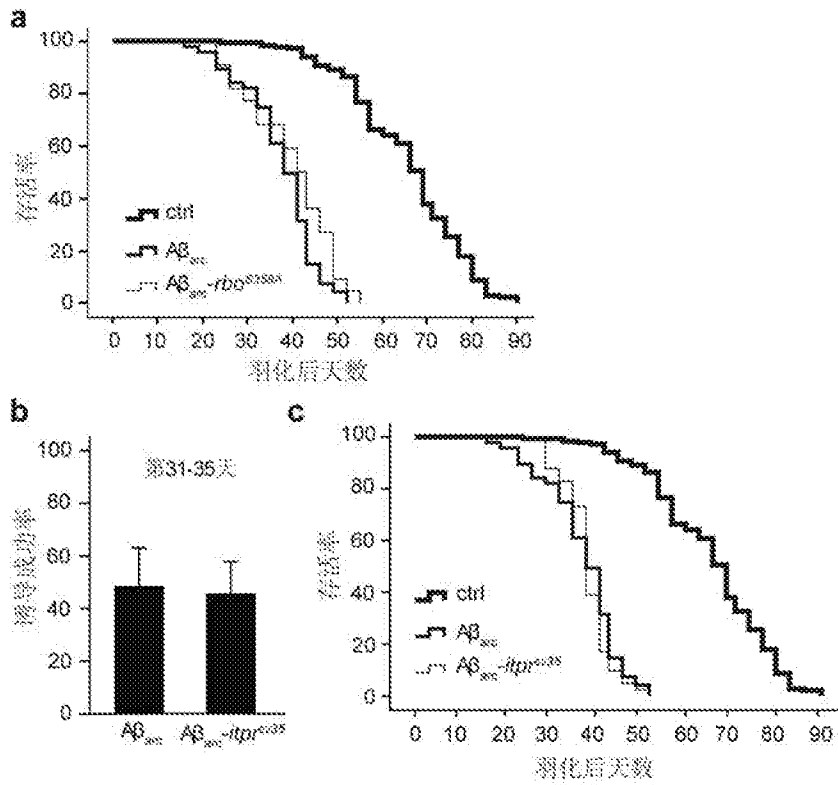


图 9

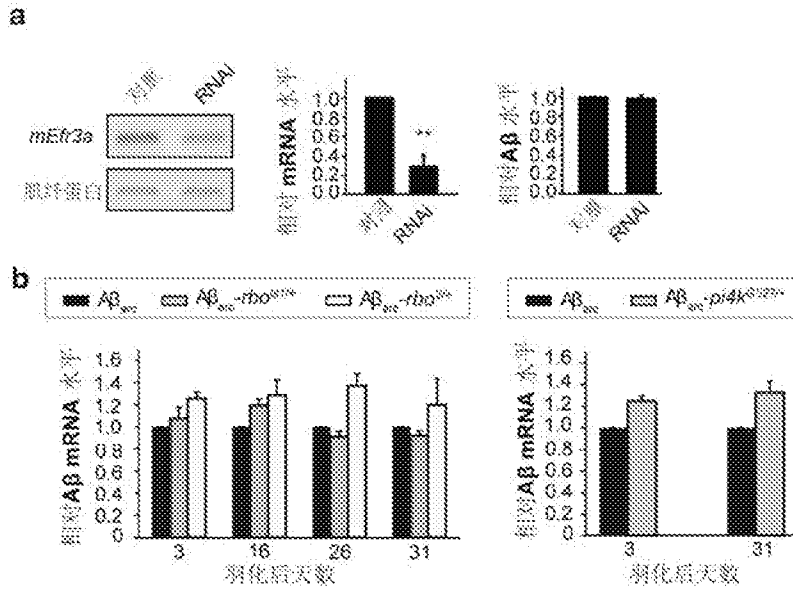


图 10

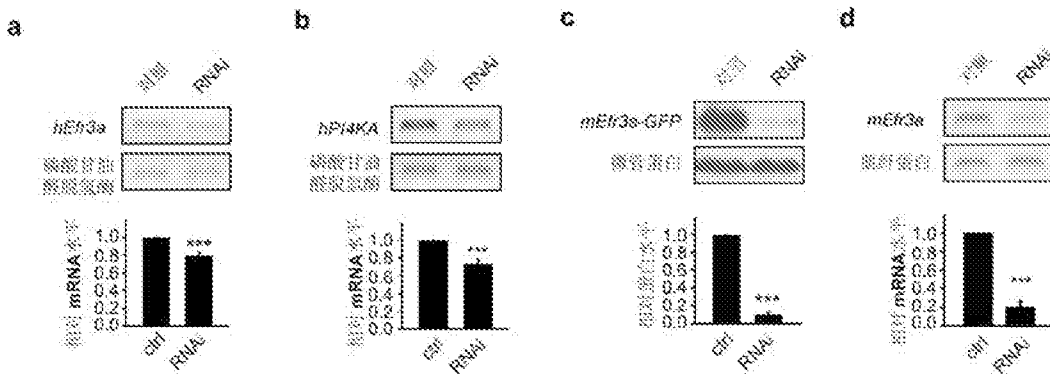


图 11

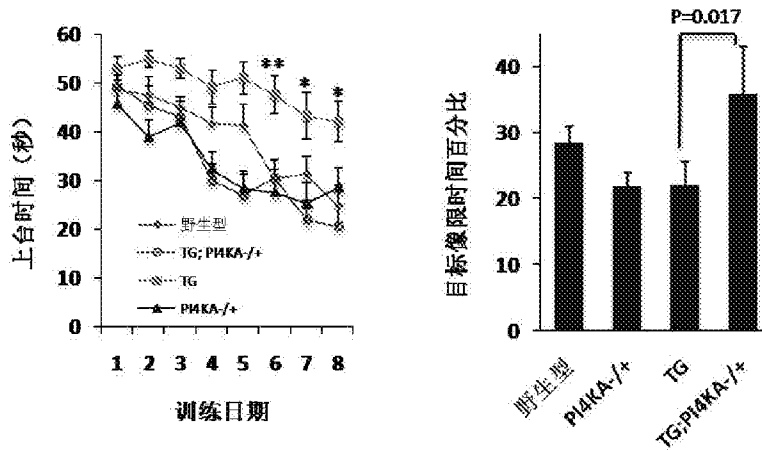


图 12

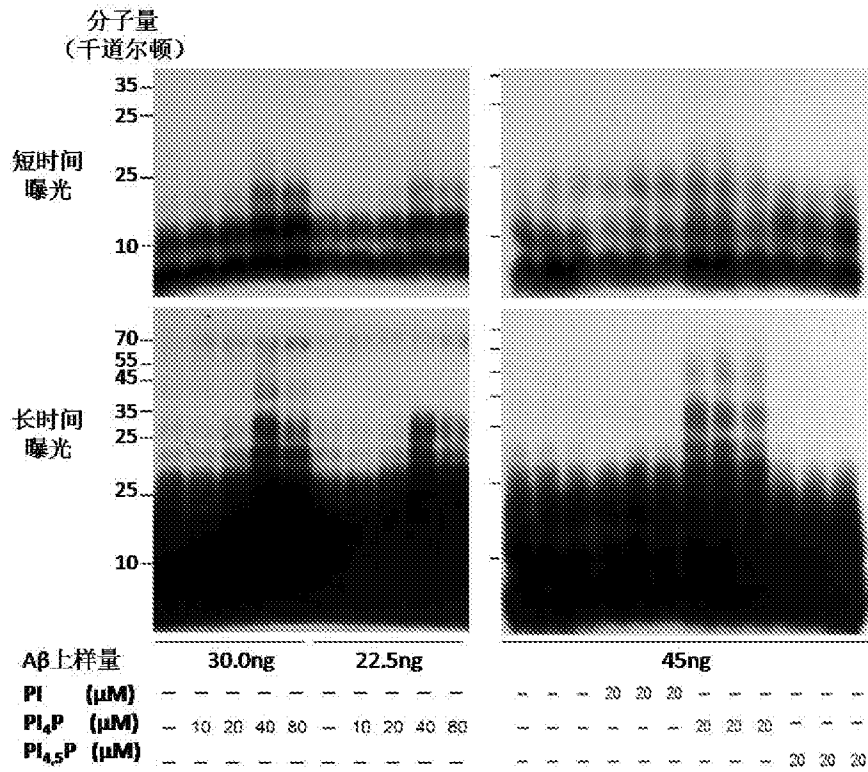


图 13

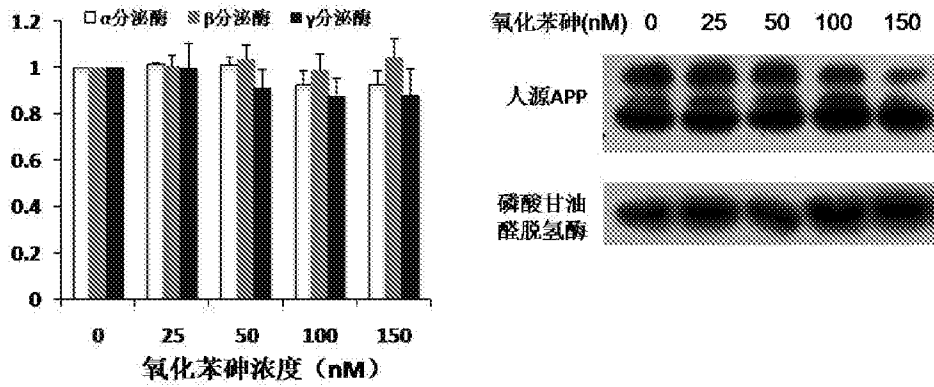


图 14

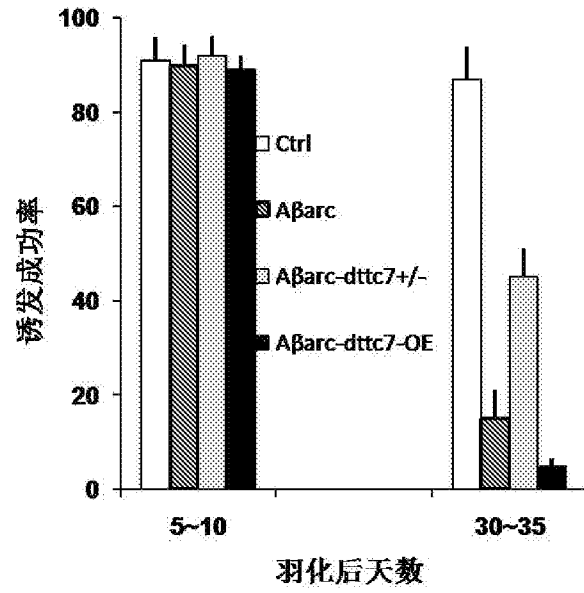


图 15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2015/078070**

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - on paper
    - in electronic form
  - b. (time)
    - in the international application as filed
    - together with the international application in electronic form
    - subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2015/078070**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, embase, ISI web of Knowledge: cell membrane, screen, secretion, neuron, AD, alzheimer, membrane, drosophila, APP, A $\beta$ , TTC7, RBO

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103529182 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 22 January 2014 (22.01.2014), abstract, claims 1-11, and description, paragraphs 0002-0007, 0089 and 0093	1-6
A	CN 104046676 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 17 September 2014 (17.09.2014), the whole document	1-6
A	CN 102265806 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 07 December 2011 (07.12.2011), the whole document	1-6
A	CN 1329674 A (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH), 02 January 2002 (02.01.2002), the whole document	1-6
A	CN 1339066 A (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY), 06 March 2002 (06.03.2002), the whole document	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
21 January 2016 (21.01.2016)

Date of mailing of the international search report  
**04 February 2016 (04.02.2016)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**WU, Li**  
Telephone No.: (86-10) **62411046**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2015/078070**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103529182 A	22 January 2014	None	
CN 104046676 A	17 September 2014	None	
CN 102265806 A	07 December 2011	WO 2011140997 A1	17 November 2011
		CN 102265806 B	25 December 2013
CN 1329674 A	02 January 2002	CN 1261589 C	28 June 2006
		US 7109027 B2	19 September 2006
		DE 19856261 C1	30 March 2000
		WO 0034511 A2	15 June 2000
		DE 59914752 D1	19 June 2008
		JP 4594529 B2	08 December 2010
		CA 2354154 A1	15 June 2000
		WO 0034511 A3	16 November 2000
		EP 1137810 A2	04 October 2001
		JP 2002531141 A	24 September 2002
		AT 394505 T	15 May 2008
		AU 766751 B2	23 October 2003
		ZA 200104490 A	04 June 2002
		US 2001034884 A1	25 October 2001
		EP 1137810 B1	07 May 2008
		BR 9915982 A	11 September 2001
		AU 1968000 A	26 June 2000
		HK 1041714 A1	17 November 2006
CN 1339066 A	06 March 2002	CA 2354154 C	04 January 2011
		ES 2318902 T3	01 May 2009
		KR 100768381 B1	18 October 2007
		IL 182070 D0	24 July 2007
		SK 3902001 A3	03 December 2001
		EP 1115874 B1	07 January 2009
		PL 348629 A1	03 June 2002
		KR 100691601 B1	09 March 2007
		CN 1502697 A	09 June 2004
		AU 2004203588 A1	02 September 2004
		PL 205294 B1	31 March 2010
		CN 1502692 A	09 June 2004
		DE 69940265 D1	26 February 2009
		NZ 527053 A	29 April 2005
		AU 772812 B2	06 May 2004
		AU 6141899 A	10 April 2000
		CY 1111006 T1	11 June 2015
		CZ 20010966 A3	17 October 2001
		HK 1042730 A1	18 November 2005
		IL 142207 A	30 November 2010
		NO 20011505 A	23 May 2001
		JP 2009201517 A	10 September 2009
		SG 113454 A1	29 August 2005
		KR 20070013361 A	30 January 2007
		WO 0017369 B1	28 December 2000
		ZA 200102387 A	23 September 2002
		EA 009216 B1	28 December 2007
		CN 1300320 C	14 February 2007

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2015/078070**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		KR 20060111905 A	30 October 2006
		KR 20060126626 A	07 December 2006
		CN 1502696 A	09 June 2004
		EP 1115874 A2	18 July 2001
		NO 20011505 D0	23 March 2001
		AT 420185 T	15 January 2009
		KR 20040097216 A	17 November 2004
		KR 20040093193 A	04 November 2004
		CN 1198936 C	27 April 2005
		BR 9913920 A	06 November 2001
		TR 200101484 T2	21 June 2002
		PT 1115874 E	09 April 2009
		AU 772812 C	09 December 2004
		KR 20070004143 A	05 January 2007
		TR 200601231 T2	21 September 2006
		JP 2002526081 A	20 August 2002
		KR 20040099362 A	26 November 2004
		HU 0103838 A3	29 May 2006
		HK 1062187 A1	22 June 2007
		CA 2343004 A1	30 March 2000
		TR 200200662 T2	21 June 2002
		IS 5905 A	22 March 2001

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/078070

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CPRABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, embase, ISI web of Knowledge: 细胞膜, 筛选, 果蝇, 阿尔茨海默, 分泌, 神经元, AD, alzheimer, membrane, drosophila, APP, Aβ, TTC7, RBO</p>																														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 103529182 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 1月 22日 (2014 - 01 - 22) 说明书摘要, 权利要求1-11, 说明书第0002-0007, 0089, 0093段</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104046676 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102265806 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2011年 12月 7日 (2011 - 12 - 07) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1329674 A (阿文蒂斯药物德国有限公司) 2002年 1月 2日 (2002 - 01 - 02) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1339066 A (法玛西雅厄普约翰美国公司) 2002年 3月 6日 (2002 - 03 - 06) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&amp;” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 103529182 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 1月 22日 (2014 - 01 - 22) 说明书摘要, 权利要求1-11, 说明书第0002-0007, 0089, 0093段	1-6	A	CN 104046676 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-6	A	CN 102265806 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2011年 12月 7日 (2011 - 12 - 07) 全文	1-6	A	CN 1329674 A (阿文蒂斯药物德国有限公司) 2002年 1月 2日 (2002 - 01 - 02) 全文	1-6	A	CN 1339066 A (法玛西雅厄普约翰美国公司) 2002年 3月 6日 (2002 - 03 - 06) 全文	1-6	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																												
X	CN 103529182 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 1月 22日 (2014 - 01 - 22) 说明书摘要, 权利要求1-11, 说明书第0002-0007, 0089, 0093段	1-6																												
A	CN 104046676 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-6																												
A	CN 102265806 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2011年 12月 7日 (2011 - 12 - 07) 全文	1-6																												
A	CN 1329674 A (阿文蒂斯药物德国有限公司) 2002年 1月 2日 (2002 - 01 - 02) 全文	1-6																												
A	CN 1339066 A (法玛西雅厄普约翰美国公司) 2002年 3月 6日 (2002 - 03 - 06) 全文	1-6																												
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																													
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																													
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																													
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件																													
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 1月 21日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 2月 4日</p>																													
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>吴立</p> <p>电话号码 (86-10)62411046</p>																													

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/078070

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103529182	A	2014年 1月 22日	无			
CN	104046676	A	2014年 9月 17日	无			
CN	102265806	A	2011年 12月 7日	WO	2011140997	A1	2011年 11月 17日
				CN	102265806	B	2013年 12月 25日
CN	1329674	A	2002年 1月 2日	CN	1261589	C	2006年 6月 28日
				US	7109027	B2	2006年 9月 19日
				DE	19856261	C1	2000年 3月 30日
				WO	0034511	A2	2000年 6月 15日
				DE	59914752	D1	2008年 6月 19日
				JP	4594529	B2	2010年 12月 8日
				CA	2354154	A1	2000年 6月 15日
				WO	0034511	A3	2000年 11月 16日
				EP	1137810	A2	2001年 10月 4日
				JP	2002531141	A	2002年 9月 24日
				AT	394505	T	2008年 5月 15日
				AU	766751	B2	2003年 10月 23日
				ZA	200104490	A	2002年 6月 4日
				US	2001034884	A1	2001年 10月 25日
				EP	1137810	B1	2008年 5月 7日
				BR	9915982	A	2001年 9月 11日
				AU	1968000	A	2000年 6月 26日
				HK	1041714	A1	2006年 11月 17日
				CA	2354154	C	2011年 1月 4日
CN	1339066	A	2002年 3月 6日	ES	2318902	T3	2009年 5月 1日
				KR	100768381	B1	2007年 10月 18日
				IL	182070	D0	2007年 7月 24日
				SK	3902001	A3	2001年 12月 3日
				EP	1115874	B1	2009年 1月 7日
				PL	348629	A1	2002年 6月 3日
				KR	100691601	B1	2007年 3月 9日
				CN	1502697	A	2004年 6月 9日
				AU	2004203588	A1	2004年 9月 2日
				PL	205294	B1	2010年 3月 31日
				CN	1502692	A	2004年 6月 9日
				DE	69940265	D1	2009年 2月 26日
				NZ	527053	A	2005年 4月 29日
				AU	772812	B2	2004年 5月 6日
				AU	6141899	A	2000年 4月 10日
				CY	1111006	T1	2015年 6月 11日
				CZ	20010966	A3	2001年 10月 17日
				HK	1042730	A1	2005年 11月 18日
				IL	142207	A	2010年 11月 30日
				NO	20011505	A	2001年 5月 23日
				JP	2009201517	A	2009年 9月 10日
				SG	113454	A1	2005年 8月 29日
				KR	20070013361	A	2007年 1月 30日
				WO	0017369	B1	2000年 12月 28日
				ZA	200102387	A	2002年 9月 23日
				EA	009216	B1	2007年 12月 28日
				CN	1300320	C	2007年 2月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/078070

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		KR	20060111905	A	2006年 10月 30日
		KR	20060126626	A	2006年 12月 7日
		CN	1502696	A	2004年 6月 9日
		EP	1115874	A2	2001年 7月 18日
		NO	20011505	D0	2001年 3月 23日
		AT	420185	T	2009年 1月 15日
		KR	20040097216	A	2004年 11月 17日
		KR	20040093193	A	2004年 11月 4日
		CN	1198936	C	2005年 4月 27日
		BR	9913920	A	2001年 11月 6日
		TR	200101484	T2	2002年 6月 21日
		PT	1115874	E	2009年 4月 9日
		AU	772812	C	2004年 12月 9日
		KR	20070004143	A	2007年 1月 5日
		TR	200601231	T2	2006年 9月 21日
		JP	2002526081	A	2002年 8月 20日
		KR	20040099362	A	2004年 11月 26日
		HU	0103838	A3	2006年 5月 29日
		HK	1062187	A1	2007年 6月 22日
		CA	2343004	A1	2000年 3月 30日
		TR	200200662	T2	2002年 6月 21日
		IS	5905	A	2001年 3月 22日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)