(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
2020 年 8 月 27 日 (27.08.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/168850 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 25/14* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C12Q 1/42* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/070997

(22) 国际申请日: 2020 年 1 月 8 日 (08.01.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910130210.5 2019年2月21日 (21.02.2019) CN

(71) 申请人: 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心 (CENTER FOR EXCELLENCE IN BRAIN SCIENCE AND INTELLIGENCE TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳路 320 号, Shanghai 200031 (CN)。

(72) 发明人: 熊志奇 (XIONG, Zhiqi); 中国上海市徐汇区岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 王杰 (WANG, Jie); 中国上海市徐汇区岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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:** USE OF UBE3A UBIQUITINATION PP2A ACTIVATING FACTOR PTPA IN TREATING ANGELMAN SYNDROME AND AUTISM

(54) 发明名称: Ube3a泛素化PP2A激活因子PTPA在治疗天使综合症和孤独症中的应用

(57) **Abstract:** Provided is a use of Ube3a ubiquitination PP2A activating factor PTPA in treating angelman syndrome and autism. A new pathogenesis of angelman syndrome and/or autism or diseases related thereto is disclosed, i.e., the activity of phosphotyrosine phosphatase activating factors for protein phosphatase 2A is abnormal due to the lack or overexpression of Ube3a. Therefore, said factors can be used as target spots to develop medicines alleviating or treating angelman syndrome and/or autism or diseases related thereto. Said factors further can be used as markers for diagnosing and assessing angelman syndrome and/or autism or diseases related thereto.

(57) 摘要: 提供Ube3a泛素化PP2A激活因子PTPA在治疗天使综合症和孤独症中的应用。揭示了天使综合症和/或孤独症或其相关疾病的发病新机制，即Ube3a的缺乏或过表达导致磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子对蛋白磷酸酶2A活性发生异常。因此，可以以这些因子作为靶点，开发缓解或治疗天使综合症和/或孤独症或其相关疾病的药物。这些因子还可作为诊断、评估天使综合症/或孤独症或其相关疾病的标志物。

WO 2020/168850 A1

Ube3a 泛素化 PP2A 激活因子 PTPA 在治疗天使综合症和孤独症中的应用

技术领域

本发明属于分子生物学及药物学领域，更具体地，本发明涉及 Ube3a 调节 PP2A 的活性以及其在治疗天使综合症和孤独症中的应用。

背景技术

UBE3A 基因位于人的 15 号染色体的 15q11-13 区域，其编码的产物 Ube3a 是第一个发现的 HECT(Homologous with E6-assiciated protein C-Terminus) 家族的 E3 泛素连接酶。由于其蛋白结构内存在一个 E6 相结合的结构域，因此又称 E6AP。目前为止，Ube3a 有两个功能：一是作为 E3 连接酶，介导了其识别的特定底物的泛素化修饰，进而调节蛋白的降解，运输，定位等；二是在细胞核中，Ube3a 可以与激素受体结合，共同作为激活因子，调节基因的转录。

在神经元中，Ube3a 特异性地表达母源的基因，而父源的基因由于其产生一个反向的 RNA，使得其不表达或表达很少。Ube3a 蛋白泛素连接酶功能的缺失是天使综合症(Angelman syndrome，AS)致病的最主要的因素。天使综合症是 1965 年首次由儿科医生 Harry Angelman 发现并报道的，其特征为发育迟缓，语言障碍，智力障碍，运动障碍等。目前为止，已经发现了四种基因组的异常突变：15 号母源染色体 15q11-q13 区段的缺失，15 号父源染色体双倍体，15 号母源染色体 15q11-q13 区段印记调控区的异常，以及位于 15 号母源染色体 15q11-q13 区段中 Ube3a 基因的突变。

孤独症谱系障碍（autism spectrum disorders, ASD），又称自闭症谱系障碍，是一类发病机制异质的神经发育性疾病。该病的主要特征为：社交障碍，交流障碍，行为重复刻板，兴趣范围狭窄，语言发育缓慢。孤独症儿童通常在 3 岁之前发病，男性患病率是女性患病率的四倍。尽管发病的机理目前还不是很清楚，但是 25%的患儿伴随有基因的新生突变或染色体的拷贝数异常。

基因拷贝数变异是孤独症发生的重要原因之一，其中 15q11-13 染色体拷贝数异常占全部孤独症患者的 1%-3%。带有母源 15q11-13 的染色体间质复制(二倍）的部分人群会表现出孤独症表型，而等臂双着丝粒染色体 15（三倍）的突变人群则全部表现出孤独症。该类型的染色体异常又被称为 15q11-13 复制综

合征。该区段中，*UBE3A* 是唯一一个只表达母源等位基因的基因。不仅如此，在小鼠模型中，三拷贝数的 *Ube3a* 小鼠表现出典型的孤独症特征。以上研究证明，*UBE3A* 是孤独症的易感基因。因此，Ube3a 的蛋白水平过多或过少均导致了神经系统的发育与功能的异常，研究 Ube3a 的致病机制对于治疗该 Ube3a 导致的神经发育类疾病具有重要的意义。

虽然 Ube3a 的一些底物已经被报道，但是这些底物都不能很好地解释 Ube3a 异常所导致的神经发育疾病的表型，进而也没有有效的药物治疗手段来干预 Ube3a 所在基因区段的异常所导致的疾病。

因此，本领域还需要找到 Ube3a 的直接底物来寻求更有效的干预手段治疗 Ube3a 所导致的神经发育疾病。

发明内容

本发明的目的在于提供 Ube3a 调节 PP2A 的活性以及其在治疗天使综合症中和/或孤独症相关疾病中的应用。

在本发明的第一方面，提供蛋白磷酸酶 2A(PP2A)或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子(PTPA)的抑制剂的用途，用于制备缓解或治疗天使综合症的药物组合物。

在另一优选例中，所述药物组合物还用于预防和/或治疗天使综合症。

在另一优选例中，所述药物组合物还用于纠正天使综合症的哺乳动物中 PP2A 活性的增加。

在另一优选例中，所述哺乳动物包括人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述哺乳动物包括啮齿动物（如小鼠、大鼠、兔）、灵长类动物（如猴）。

在一个优选例中，所述的抑制剂选自：特异性抑制蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的小分子化合物；特异性干扰蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的基因表达的干扰分子；特异性敲除蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的基因编辑试剂；或特异性与蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子结合的抗体或配体。

在另一优选例中，所述的抑制剂是特异性抑制蛋白磷酸酶 2A 活性的小

分子化合物，其选自：抑制剂 LB-100。

在另一优选例中，所述的抑制剂是特异性上调 Ube3a 蛋白(包括促进其表达或提高其活性)的试剂，其通过上调 Ube3a 蛋白而降解磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子、进而抑制蛋白磷酸酶 2A。

在另一优选例中，所述的特异性上调 Ube3a 蛋白的试剂为过表达 Ube3a 的表达构建物(表达质粒)。

在另一优选例中，所述抑制剂还包括 Ube3a 蛋白或表达 Ube3a 蛋白的载体。

在另一优选例中，所述表达 Ube3a 蛋白的载体包括病毒载体。

在另一优选例中，所述病毒载体选自下组：腺相关病毒载体、慢病毒载体、或其组合。

在另一优选例中，所述的蛋白包括全长蛋白或蛋白片段。

在另一优选例中，所述的 Ube3a 蛋白来源于哺乳动物，更佳地来源于啮齿动物(如小鼠、大鼠)、灵长动物和人。

在另一优选例中，所述 Ube3a 蛋白还包括 Ube3a 蛋白的衍生物。

在另一优选例中，所述 Ube3a 蛋白的衍生物包括经修饰的 Ube3a 蛋白、氨基酸序列与天然 Ube3a 蛋白同源且具有天然 Ube3a 蛋白活性的蛋白分子、Ube3a 蛋白的二聚体或多聚体、含有 Ube3a 蛋白氨基酸序列的融合蛋白。

在另一优选例中，所述经修饰的 Ube3a 蛋白是 PEG 化的 Ube3a 蛋白。

在另一优选例中，所述“氨基酸序列与天然 Ube3a 蛋白同源且具有天然 Ube3a 蛋白活性的蛋白分子”是指其氨基酸序列与 Ube3a 蛋白相比具有≥85%的同源性，较佳地≥90%的同源性，更佳地≥95%的同源性，最佳地≥98%同源性；并且具有天然 Ube3a 蛋白活性的蛋白分子。

在另一优选例中，所述 Ube3a 蛋白选自下组：

(A) 氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 18 所示的多肽；

(B) 将 SEQ ID NO.: 18 所示的氨基酸序列经过一个或几个(通常为 1-60 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的 ECM1 蛋白衍生物，或其活性片段；

(C) 序列与 SEQ ID NO.:18 所示的氨基酸序列相比，同源性≥90%，较佳地≥95%，更佳地≥98%，最佳地≥99%的 Ube3a 蛋白衍生物，或其活性片段。

在另一优选例中，所述的特异性干扰磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的基因

表达的干扰分子是 shRNA。

在另一优选例中，所述的 shRNA 靶向于：CAGTTCCAGATATGGGCAAATGGAA(SEQ ID NO: 1)、CCTGGTATGCC AAACTTGATCAGGA(SEQ ID NO: 2)或 TCAAGGTGTTTGATAGGTATCTT GA(SEQ ID NO: 3)；较佳地，所述的 shRNA 具有 SEQ ID NO: 4 的正义链和 SEQ ID NO: 5 的反义链，或具有 SEQ ID NO: 6 的正义链和 SEQ ID NO: 7 的反义链；或具有 SEQ ID NO: 8 的正义链和 SEQ ID NO: 9 的反义链。

在本发明的另一方面，提供蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子在细胞中的生理作用和机制，用于制备预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物组合物。

在本发明的第二方面，提供蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的用途，用于筛选缓解或治疗天使综合症的药物。

在本发明的第三方面，提供一种筛选缓解或治疗天使综合症的潜在物质的方法，所述方法包括：(1) 用候选物质处理表达蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的体系；和(2) 检测所述体系中蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性；其中，若所述候选物质可降低蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性，则表明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

在一个优选例中，步骤(1)包括：在测试组中，将候选物质加入到表达蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的体系中；步骤(2)包括：检测测试组的体系中蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性，并与对照组比较，其中所述的对照组是不添加所述候选物质的表达蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的体系；如果测试组中蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性在统计学上低于对照组，就表明该候选物是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

在另一优选例中，所述的统计学上低于优选显著低于，如低 20%以上，较佳的低 50%以上；更佳的低 80%以上。

在另一优选例中，所述的体系中还表达 Ube3a 蛋白，所述方法还包括：检测所述体系中 Ube3a 蛋白的表达；其中，若所述候选物质能够通过提高 Ube3a 的表达而抑制(优选显著抑制，如抑制 20%以上，较佳的抑制 50%以上；更佳的抑制 80%以上)蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子，则表

明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

在另一优选例中，所述的体系选自：细胞体系(如表达蛋白磷酸酶 2A、磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子和/或 Ube3a 的细胞或细胞培养物)、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

在另一优选例中，所述的候选物质包括(但不限于)：针对蛋白磷酸酶 2A 基因或蛋白设计的小分子化合物、干扰分子、核酸抑制物、结合分子(如抗体或配体)等；或针对蛋白磷酸酶 2A 基因或蛋白所参与的信号通路或其上游或下游蛋白(如 Ube3a，磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子)设计的调节分子。

在另一优选例中，所述的方法还包括：对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验，以从候选物质中进一步选择和确定对于缓解或治疗天使综合症有用的物质。

在本发明的第四方面，提供特异性识别蛋白磷酸酶 2A 基因或蛋白的试剂的用途，用于制备进行天使综合症诊断或预后评估的试剂或试剂盒。

在一个优选例中，所述的特异性识别蛋白磷酸酶 2A 基因或蛋白的试剂选自：特异性扩增蛋白磷酸酶 2A 基因的引物；特异性识别蛋白磷酸酶 2A 基因的探针；或特异性结合蛋白磷酸酶 2A 的抗体或配体。

在本发明的第五方面，提供特异性识别磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因或蛋白的试剂的用途，用于制备进行天使综合症诊断或预后评估的试剂或试剂盒。

在一个优选例中，所述的特异性识别磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因或蛋白的试剂选自：特异性扩增磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因的引物；特异性识别磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因的探针；或特异性结合磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的抗体或配体。

在本发明第六方面，提供了一种物质的用途，用于制备预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的组合物或制剂，其中，所述物质选自下组：(a) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂、(b) PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂、(c) PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂、或其组合。

在另一优选例中，所述物质还包括（d）PP2A 全酶的组装的促进剂。

在另一优选例中，所述 PP2A 蛋白还包括 PP2A 蛋白的活性片段。

在另一优选例中，所述孤独症或其相关疾病选自下组：孤独症、15q11-13 复制综合征、或其组合。

在另一优选例中，所述组合物或制剂还用于选自下组的一种或多种用途：

(i) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；

(ii) 降低 MAPK 信号通路的活性；

(iii) 提高 PP2A 全酶的含量。

在另一优选例中，所述 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂选自下组：抗体、小分子化合物、microRNA、siRNA、shRNA、或其组合。

在另一优选例中，所述 PP2A 促进剂或 PTPA 促进剂是指能够在体内或体外提高 *PP2A* 或 *PTPA* 基因或其蛋白的活性和/或含量的物质；所述物质可以为人工合成的或天然的化合物、蛋白、核苷酸等。

在另一优选例中，所述 PP2A 或 PTPA 促进剂包括促剂 PP2A 或 PTPA 表达的物质。

在另一优选例中，所述 PP2A 促进剂包括 PP2A 蛋白促进剂和/或 PP2A 基因促进剂。

在另一优选例中，所述 PTPA 促进剂包括 PTPA 蛋白促进剂和/或 PTPA 基因促进剂。

在另一优选例中，所述促进 PP2A 或 PTPA 表达或活性指将 PP2A 或 PTPA 基因或蛋白的表达或活性提高≥10%，较佳地，≥20%，更佳地，≥70%。

在另一优选例中，所述 PP2A 促进剂选自下组：小分子化合物、表达 PP2A 的载体、或其组合。

在另一优选例中，所述 PP2A 促进剂选自下组：FTY720、C2 ceramide、或其组合。

在另一优选例中，所述表达 PP2A 的载体包括病毒载体。

在另一优选例中，所述 PTPA 促进剂选自下组：小分子化合物、表达 PTPA 的载体、或其组合。

在另一优选例中，所述表达 PTPA 的载体包括病毒载体。

在另一优选例中，所述病毒载体选自下组：腺相关病毒载体、慢病毒载体、或其组合。

在另一优选例中，所述的蛋白包括全长蛋白或蛋白片段。

在另一优选例中，所述的 *PP2A* 基因、或其蛋白来源于哺乳动物，更佳地来源于啮齿动物(如小鼠、大鼠)、灵长动物和人。

在另一优选例中，所述的 *PTPA* 基因、或其蛋白来源于哺乳动物，更佳地来源于啮齿动物(如小鼠、大鼠)、灵长动物和人。

在另一优选例中，所述 PP2A 蛋白还包括 PP2A 蛋白的衍生物。

在另一优选例中，所述 PP2A 蛋白的衍生物包括经修饰的 PP2A 蛋白、氨基酸序列与天然 PP2A 蛋白同源且具有天然 PP2A 蛋白活性的蛋白分子、PP2A 蛋白的二聚体或多聚体、含有 PP2A 蛋白氨基酸序列的融合蛋白。

在另一优选例中，所述经修饰的 PP2A 蛋白是 PEG 化的 PP2A 蛋白。

在另一优选例中，所述“氨基酸序列与天然 PP2A 蛋白同源且具有天然 PP2A 蛋白活性的蛋白分子”是指其氨基酸序列与 PP2A 蛋白相比具有≥85%的同源性，较佳地≥90%的同源性，更佳地≥95%的同源性，最佳地≥98%同源性；并且具有天然 PP2A 蛋白活性的蛋白分子。

在另一优选例中，所述 PP2A 蛋白选自下组：

(A) 氨基酸序列如 SEQ ID NO.:19 所示的多肽；

(B) 将 SEQ ID NO.: 19 所示的氨基酸序列经过一个或几个(通常为 1-60 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的 PP2A 蛋白衍生物，或其活性片段；

(C) 序列与 SEQ ID NO.:19 所示的氨基酸序列相比，同源性≥90%，较佳地≥95%，更佳地≥98%，最佳地≥99%的 PP2A 蛋白衍生物，或其活性片段。

在另一优选例中，所述的 PP2A 基因编码 PP2A 蛋白。

在另一优选例中，所述的 PP2A 基因选自下组：

(a)编码如 SEQ ID NO.:19 所示多肽的多核苷酸；

(b)序列如 SEQ ID NO.:20 所示的多核苷酸；

(c)核苷酸序列与 SEQ ID NO.: 20 所示序列的同源性≥95%(较佳地≥98%)，且编码 SEQ ID NO.:19 所示多肽的多核苷酸；

(d)与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

在另一优选例中，所述 PTPA 蛋白还包括 PTPA 蛋白的衍生物。

在另一优选例中，所述 PTPA 蛋白的衍生物包括经修饰的 PTPA 蛋白、氨基酸序列与天然 PTPA 蛋白同源且具有天然 PTPA 蛋白活性的蛋白分子、PTPA 蛋白的二聚体或多聚体、含有 PTPA 蛋白氨基酸序列的融合蛋白。

在另一优选例中，所述经修饰的 PTPA 蛋白是 PEG 化的 PTPA 蛋白。

在另一优选例中，所述“氨基酸序列与天然 PTPA 蛋白同源且具有天然 PTPA

蛋白活性的蛋白分子”是指其氨基酸序列与PTPA蛋白相比具有≥85%的同源性，较佳地≥90%的同源性，更佳地≥95%的同源性，最佳地≥98%同源性；并且具有天然PTPA蛋白活性的蛋白分子。

在另一优选例中，所述PTPA蛋白选自下组：

(A) 氨基酸序列如SEQ ID NO.:21所示的多肽；

(B) 将SEQ ID NO.: 21所示的氨基酸序列经过一个或几个(通常为1-60个，较佳地1-30个，更佳地1-20个，最佳地1-10个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的PTPA蛋白衍生物，或其活性片段；

(C) 序列与SEQ ID NO.:21所示的氨基酸序列相比，同源性≥90%，较佳地≥95%，更佳地≥98%，最佳地≥99%的PTPA蛋白衍生物，或其活性片段。

在另一优选例中，所述的PTPA基因编码PTPA蛋白。

在另一优选例中，所述的PTPA基因选自下组：

(a)编码如SEQ ID NO.:21所示多肽的多核苷酸；

(b)序列如SEQ ID NO.: 22所示的多核苷酸；

(c)核苷酸序列与SEQ ID NO.: 22所示序列的同源性≥95%(较佳地≥98%)，且编码SEQ ID NO.:21所示多肽的多核苷酸；

(d)与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

在另一优选例中，所述组合物包括药物组合物。

在另一优选例中，所述药物组合物含有 (i) Ube3a基因或其蛋白的抑制剂；PP2A基因、或其蛋白或其促进剂；PTPA基因、或其蛋白或其促进剂；或其组合；和(ii)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述药物组合物为液态、固体、或半固体。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型包括片剂、颗粒剂、胶囊、口服液、或注射剂。

在另一优选例中，所述的药物组合物中，所述组分(i)占所述药物组合物总重量的1-99wt%，较佳地10-90wt%，更佳地30-70wt%。

在另一优选例中，所述组合物还包括额外的预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的组分。

在另一优选例中，所述额外的预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的组分选自下组：拮抗吗啡药-钠屈酮(Nalterxone)、丙戊酸纳、卡马西平、碳酸锂,心得安、氯硝西泮、氯丙咪嗪、丙咪嗪、5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRS)、丁螺环酮、氯丙嗪、

舒必利，氟哌啶醇、利培酮(维思通)、氯氮平、奥氮平、哌甲酯(利他林)、匹莫林、或其组合。

在另一优选例中，所述 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRS)选自下组：氟西汀、色曲林、氟伏沙明(兰释)、或其组合。

在另一优选例中，所述组合物或制剂在预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的应用中，可单独使用，或联合使用。

在另一优选例中，所述的联合使用包括：与其他预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物联合使用。

在另一优选例中，所述其他预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物选自下组：拮抗吗啡药-钠屈酮(Nalterxone) 、丙戊酸纳、卡马西平、碳酸锂,心得安、氯硝西泮、氯丙咪嗪、丙咪嗪、5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRS)、丁螺环酮、氯丙嗪、舒必利，氟哌啶醇、利培酮(维思通)、氯氮平、奥氮平、哌甲酯(利他林)、匹莫林、或其组合。

在另一优选例中，所述 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRS)选自下组：氟西汀、色曲林、氟伏沙明(兰释)、或其组合。

在本发明第七方面，提供了一种药物组合物，包括：

(a1) 用于预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的第一活性成分，所述第一活性成分选自下组：(i) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂、(ii) PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂、(iii) PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂、或其组合；和

(b) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述药物组合物还包括(a2) 预防和/或治疗肝纤维化相关疾病的第二活性成分，所述第二活性成分包括：其他的用于预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物。

在另一优选例中，所述的药物组合物中，所述组分(a1)占所述药物组合物总重量的 1-99wt%，较佳地 10-90wt%，更佳地 30-70wt%。

在另一优选例中，所述的药物组合物中，所述组分(a2)占所述药物组合物总重量的 1-99wt%，较佳地 10-90wt%，更佳地 30-70wt%。

在另一优选例中，所述第一活性成分和第二活性成分的重量比为 1:100 至 100：1，较佳地为 1:10 至 10：1。

在另一优选例中，所述药物组合物还包括额外的抑制 ERK1/2 的磷酸化水平的组分。

在另一优选例中，所述额外的抑制 ERK1/2 的磷酸化水平的组分选自下组：MK-8353、U0126、SCG772984、或其组合。

在另一优选例中，所述药物组合物还包括额外的降低 MAPK 信号通路的活性的组分。

在另一优选例中，所述额外的降低 MAPK 信号通路的活性的组分选自下组：PD98059、Selumetinib、PD0325901、或其组合。

在另一优选例中，所述其他预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物选自下组：拮抗吗啡药-钠屈酮(Nalterxone) 、丙戊酸纳、卡马西平、碳酸锂、心得安、氯硝西泮、氯丙咪嗪、丙咪嗪、5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRS)、丁螺环酮、氯丙嗪、舒必利，氟哌啶醇、利培酮(维思通)、氯氮平、奥氮平、哌甲酯(利他林)、匹莫林、或其组合。

在另一优选例中，所述 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRS)选自下组：氟西汀、色曲林、氟伏沙明(兰释)、或其组合。

在另一优选例中，所述药物组合物中可以是单一化合物，也可以是多个化合物的混合物。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备治疗或预防孤独症或其相关疾病的药物或制剂。

在另一优选例中，所述的药物剂型为口服给药或非口服给药剂型。

在另一优选例中，所述的口服给药剂型是片剂、散剂、颗粒剂或胶囊剂，或乳剂或糖浆剂。

在另一优选例中，所述的非口服给药剂型是注射剂或针剂。

在另一优选例中，所述的活性成分(a1)和活性成分(a2)的总含量为组合物总重的 1～99wt%，更佳地为 5～90wt%。

在本发明第八方面，提供了一种药盒，包括：

(i) 第一容器，以及位于该第一容器中的活性成分(a1) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂；PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂；PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂；或其组合，或含有活性成分(a1)的药物。

在另一优选例中，所述药盒还包括：

(ii) 第二容器，以及位于该第二容器中的活性成分(a2) 其他的用于预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物,或含有活性成分(a2)的药物。

在另一优选例中，所述的第一容器和第二容器是相同或不同的容器。

在另一优选例中，所述的第一容器的药物是含活性成分(a1)的单方制剂。

在另一优选例中，所述的第二容器的药物是含活性成分(a2)的单方制剂。

在另一优选例中，所述药物的剂型为口服剂型或注射剂型。

在另一优选例中，所述试剂盒还含有说明书，所述说明书中记载了联合给予活性成分(a1)和活性成分(a2)从而(i) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(ii)抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或 (iii) 降低 MAPK 信号通路的活性。

在另一优选例中，所述含有活性成分(a1)的制剂或含有活性成分(a2)的制剂的剂型分别包括胶囊、片剂、栓剂、或静脉注射剂。

在另一优选例中，所述含有活性成分(a1)的制剂中，所述 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂的浓度为 0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在另一优选例中，所述含有活性成分(a1)的制剂中，所述 PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂的浓度为 0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在另一优选例中，所述含有活性成分(a1)的制剂中，所述 PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂的浓度为 0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在本发明第九方面，提供了一种(a)抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(b)降低 MAPK 信号通路的活性的方法，包括步骤：

在(a) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂、(b) PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂、(c) PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂、或其组合存在的条件下，培养脑组织细胞，从而(a)抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(b)降低 MAPK 信号通路的活性。

在另一优选例中，所述脑组织细胞来源于哺乳动物的皮层。

在另一优选例中，所述哺乳动物包括人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物包括啮齿动物、灵长目动物，较佳地，包括小鼠、大鼠、兔、猴。

在另一优选例中，所述脑组织细胞为体外培养的脑组织细胞（如神经元）。

在另一优选例中，所述方法为非诊断性和非治疗性的。

在另一优选例中，所述方法为治疗性的。

在另一优选例中，所述 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂的作用浓度为 0.00001

－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在另一优选例中，所述 PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂的作用浓度为 0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在另一优选例中，所述含有活性成分(a1)的制剂中，所述 PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂的作用浓度为 0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

本发明第十方面提供了一种筛选孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂的方法，包括：

(a) 在测试组中，在培养体系中，在测试化合物的存在下，培养表达 *Ube3a* 基因的细胞一段时间 T1，检测测试组所述培养体系中的 *Ube3a* 基因的表达量 E1；

并且在不存在所述测试化合物且其他条件相同的对照组中，检测对照组所述培养体系中 *Ube3a* 基因的表达量 E2；和

(b)对 E1 和 E2 进行比较，如果 E1 显著低于 E2，则表示所述测试化合物是孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂。

在另一优选例中，所述“显著低于”指 E1/E2≤1/2，较佳地，≤1/3，更佳地，≤1/4。

在另一优选例中，所述细胞包括脑组织细胞。

在另一优选例中，所述的方法是非诊断和非治疗性的。

在另一优选例中，所述的方法包括步骤(c)：将步骤(a)中所确定的潜在治疗剂施用于哺乳动物，从而测定其对哺乳动物的孤独症或其相关疾病的影响。

在另一优选例中，所述哺乳动物包括人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物包括啮齿动物、灵长目动物，较佳地，包括小鼠、大鼠、兔、猴。

本发明的第十一方面提供了一种筛选孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂的方法，包括：

(a) 在测试组中，在培养体系中，在测试化合物的存在下，培养表达 *PP2A*、和/或 *PTPA* 基因的细胞一段时间 T1，检测测试组所述培养体系中的 *PP2A*、和/或 *PTPA* 基因的表达量 E1；

并且在不存在所述测试化合物且其他条件相同的对照组中，检测对照组所述培养体系中 *PP2A*、和/或 *PTPA* 基因的表达量 E2；和

(b)对 E1 和 E2 进行比较，如果 E1 显著高于 E2，则表示所述测试化合物是孤

独症或其相关疾病的潜在治疗剂。

在另一优选例中，所述“显著低于”指E1/E2≥2，较佳地，≥3，更佳地，≥4。

在另一优选例中，所述细胞包括脑组织细胞。

在另一优选例中，所述细胞为体外培养的脑组织细胞。

在另一优选例中，所述的方法是非诊断和非治疗性的。

在另一优选例中，所述的方法包括步骤(c)：将步骤(a)中所确定的潜在治疗剂施用于哺乳动物，从而测定其对哺乳动物的孤独症或其相关疾病的影响。

在另一优选例中，所述哺乳动物包括人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物包括啮齿动物、灵长目动物，较佳地，包括小鼠、大鼠、兔、猴。

本发明第十二方面提供了一种预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的方法，包括步骤：

给需要的对象，施用(a) Ube3a基因或其蛋白的抑制剂、(b) PP2A基因、或其蛋白或其促进剂、(c) PTPA基因、或其蛋白或其促进剂、或其组合、本发明第七方面所述的药物组合物、或本发明第八方面所述的药盒。

在另一优选例中，所述的施用包括口服。

在另一优选例中，所述的对象包括人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物包括啮齿动物和灵长目动物，优选小鼠、大鼠、兔、猴。

在另一优选例中，所述 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂的施用剂量为0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在另一优选例中，所述 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂的施用频率为 15－60次/月，较佳地为 20－40 天/次。

在另一优选例中，所述 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂的施用时间为 10－100 天，较佳地为 20-80 天，最佳地为 30－50 天。

在另一优选例中，所述PP2A基因或其蛋白的促进剂的施用剂量为0.00001－10mg/kg 体重，较佳地 0.5－5mg/kg 体重，更佳地 0.5－2mg/kg 体重。

在另一优选例中，所述 PP2A 基因或其蛋白的促进剂的施用频率为 15－60次/月，较佳地为 20－40 天/次。

在另一优选例中，所述PP2A基因或其蛋白的促进剂的施用时间为 10－100天，较佳地为 20--80 天，最佳地为 30－50 天。

在另一优选例中，所述PTPA基因或其蛋白的促进剂的施用剂量为0.00001－10mg/kg体重，较佳地0.5－5mg/kg体重，更佳地0.5－2mg/kg体重。

在另一优选例中，所述PTPA基因或其蛋白的促进剂的施用时间为10－100天，较佳地为20--80天，最佳地为30－50天。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图1A、Western blot检测Ube3a缺失小鼠脑中，PTPA蛋白水平的变化的胶片扫描图。

图1B、PTPA蛋白水平在WT与AS小鼠脑中变化的统计柱形图。

图2A GST pull down和western blot检测UBE3A与PTPA相互作用

图2B Western blot 检测UBE3A体外泛素化PTPA.

图3、PP2A活性检测WT与AS小鼠脑中，PP2A活性的上升点状图。

图4、PP2A抑制剂LB-100可以纠正AS小鼠脑中PP2A活性异常的增加。

图5、PP2A抑制剂LB-100腹腔注射治疗AS小鼠的给药时间图。

图6A、PP2A抑制剂LB-100可以提高AS小鼠在细绳悬挂实验中的持续时间。

图6B、PP2A抑制剂LB-100可以提高AS小鼠在转棒实验中的运动学习能力。

图7A、高尔基染色法检测WT、AS、WT/LB-100以及AS/LB-100小鼠小脑蒲肯野细胞中的树突棘的形态图像。

图7B、形态分析法检测A中四种小鼠的细长树突棘比例的统计图。

图8A、高尔基染色法检测WT、AS、AS；*Ptpa*$^{+/-}$以及*Ptpa*$^{+/-}$小鼠小脑蒲肯野细胞中的树突棘的形态图像。

图8B、形态分析法检测A中四种小鼠的三种树突棘比例的统计图。

图9、Western Blot测定三个PTPA的shRNA下调PTPA的蛋白表达的效果。

图10、PTPA的干扰shRNA的病毒注射后，小鼠的运动行为结果。

图 11、侧脑室注射 PTPA 的干扰 shRNA 的病毒后的感染范围。

图 12A、Western Blot 检测转入 Ube3a 过表达载体引起 HEK293T 中的 Ube3a 蛋白水平上升的胶片扫描图。

图 12B、PP2A 活性检测 Ube3a 过表达后 HEK293T 细胞中的 PP2A 活性下将的柱状图。

图 13A、Western blot 检测 AS 小鼠中，ERK1/2 的磷酸化水平变化的胶片扫描图和统计柱形图。

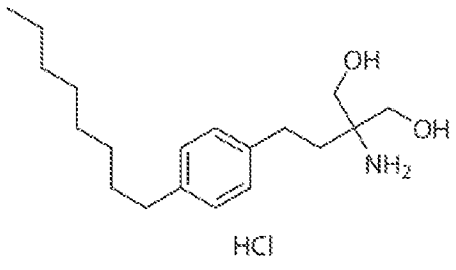
图 13B、Western Blot 检测转入 Ube3a 过表达载体引起 HEK293T 中的 ERK1/2 的磷酸化水平上升的胶片扫描图。

图 14、Western blot 检测 PP2A 抑制剂或激动剂对 ERK1/2 的磷酸化水平的影响。

具体实施方式

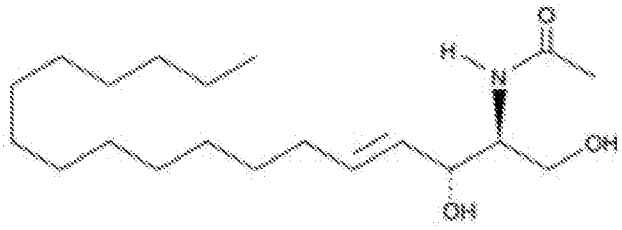
本发明人经过广泛而深入的研究，揭示了一种天使综合症发病的新机制，即 Ube3a 的缺乏导致磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子(PTPA)对蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A，PP2A)活性发生异常。因此，可以以 PTPA、PP2A 作为新靶点，开发缓解或治疗天使综合症的药物。PTPA、PP2A 还可作为天使综合症的诊断、预后评估标志物。

此外，本发明人还意外的发现，通过下调 Ube3a 的表达或活性、和/或上调 PP2A 的表达或活性、和/或上调 PTPA 的表达或活性，可预防和/或治疗孤独症相关疾病，此外，还可(i) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(ii) 降低 MAPK 信号通路的活性。在此基础上，本发明人完成了本发明。

如本文所用，术语“FTY720”的结构式为 

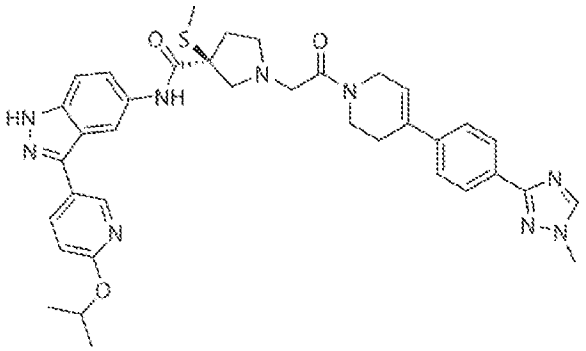
。

如本文所用，术语“C2 ceramide”的结构式为

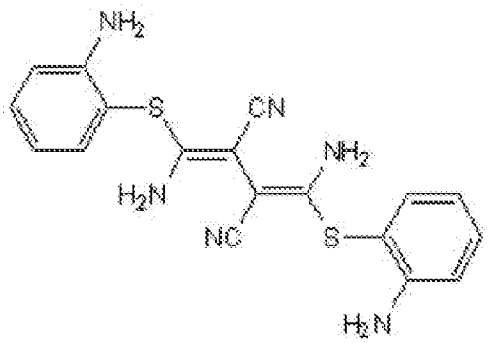


。

如本文所用，术语“MK-8353”的结构式为

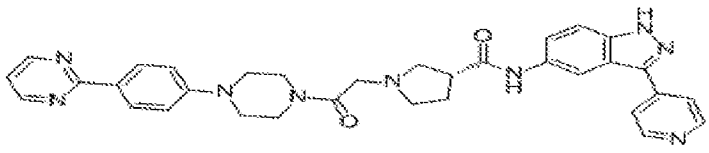


。



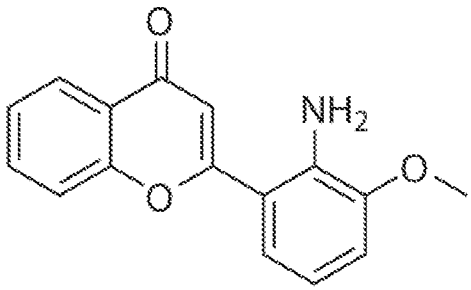
如本文所用，术语“U0126”的结构式为 。

如本文所用，术语“SCG772984”的结构式为



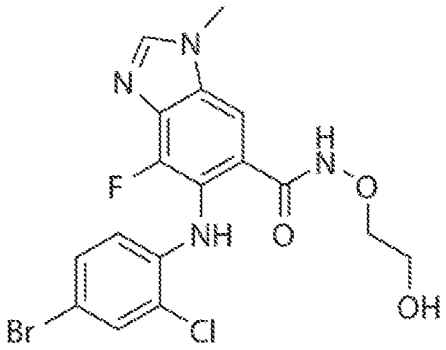
。

如本文所用，术语“PD98059”的结构式为



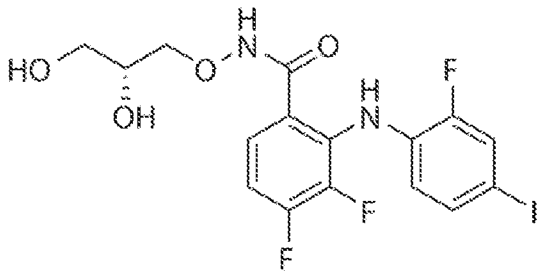
。

如本文所用，术语“Selumetinib”的结构式为



。

如本文所用，术语“PD0325901”的结构式为



。

Ube3a 蛋白及其编码核酸

UBE3A 基因位于人的 15 号染色体的 15q11-13 区域，其编码的产物 UBE3A 是第一个发现的 HECT(Homologous with E6-assiciated protein C-Terminus) 家族的 E3 泛素连接酶。由于其蛋白结构内存在一个 E6 相结合的结构域，因此又称 E6AP。在神经元中，*UBE3A* 是一个印记基因，其主要表达来源于母方染色体上的等位基因；而父源染色体上的等位基因因反向转录的非编码 RNA 的影响而不表达。人类的 15 号染色体的长臂端 11-13 区域与小鼠的 7 号染色体上的 7C 段序列同源。

在小鼠中，特异缺失 Ube3a 可以很好地模拟人的天使综合症表型。在该 AS 模型小鼠中，研究已经发现了一些蛋白的磷酸化有所变化，如 Ca/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II （CaMKII ）和 ERK1/2。

本发明涉及一种 Ube3a 蛋白及其变体，在本发明的一个优选例中，所述 Ube3a 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:18 所示。本发明的 Ube3a 蛋白或其促进剂可作为 PP2A 和/或 PTPA 的抑制剂，用于预防、缓解和/或治疗天使综合症；此外，本发明的 Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂还可用于(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；(c) 降低 MAPK 信号通路的活性。

本发明还包括与本发明的 SEQ ID NO.:18 所示序列具有 50%或以上(优选 60%以上，70%以上，80%以上，更优选 90%以上，更优选 95%以上，最优选 98%以上，如 99%)同源性的具有相同或相似功能的多肽或蛋白。

其中，SEQ ID NO.:18 为鼠源 Ube3a 蛋白（与人源 Ube3a 蛋白的同源度为 95%）；SEQ ID NO.:23 为人源 Ube3a 蛋白。

所述“相同或相似功能”主要是指：预防、缓解和/或治疗天使综合症。

本发明的蛋白可以是重组蛋白、天然蛋白、合成蛋白。本发明的蛋白可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的蛋白可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的蛋白还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括具有 Ube3a 蛋白活性的 Ube3a 蛋白片段和类似物。如本文所用，术语“片段”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然 Ube3a 蛋白相同的生物学功能或活性的蛋白。

本发明的突变蛋白片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的突变蛋白，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的突变蛋白，或(iii)成熟突变蛋白与另一个化合物(比如延长突变蛋白半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的突变蛋白，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此突变蛋白序列而形成的突变蛋白(如前导序列或分泌序列或用来纯化此突变蛋白的序列或蛋白原序列，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领

域熟练技术人员公知的范围。本发明中，保守性替换的氨基酸最好根据表 I 进行氨基酸替换而产生。

表 I

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明还包括与本发明的天然 Ube3a 蛋白具有 50%或以上(优选 60%以上，70%以上，80%以上，更优选 90%以上，更优选 95%以上，最优选 98%以上，如 99%)同源性的具有相同或相似功能的多肽或蛋白。在蛋白质变体可以经过若干个(通常为 1-60 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)取代、缺失或添加至少一个氨基酸所得的衍生序列，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内)氨基

酸。例如，在所述蛋白中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能，在C末端和/或\末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。本发明包括天然Ube3a蛋白类似物与天然Ube3a蛋白的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些蛋白的类似物包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分了生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如β、γ-氨基酸)的类似物。应理解，本发明的蛋白并不限于上述例举的代表性蛋白。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外蛋白的化学衍生形式如乙酸化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在蛋白质合成和加工中进行糖基化修饰。这种修饰可以通过将蛋白暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。此外，还可以对本发明突变蛋白进行修饰。修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的突变蛋白的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在突变蛋白的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的突变蛋白。这种修饰可以通过将突变蛋白暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的突变蛋白。

本发明还提供了编码Ube3a蛋白的多核苷酸序列。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括：DNA、基因组DNA或人工合成的DNA，DNA可以是单链的或是双链的。编码成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的

取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

根据本文所述的核苷酸序列，本技术领域人员可方便地用各种已知方法制得本发明的编码核酸。这些方法例如但不限于：PCR，DNA 人工合成等，具体的方法可参见 J. 萨姆布鲁克，《分子克隆实验指南》。作为本发明的一种实施方式，可通过分段合成核苷酸序列再进行重叠延伸 PCR 的方法来构建本发明的编码核酸序列。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件(或严紧条件)下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC，0.1%SDS，60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll，42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上，更好是 95%以上时才发生杂交。

本发明的蛋白和多核苷酸优选以分离的形式提供，更佳地，被纯化至均质。

本发明多核苷酸全长序列通常可以通过 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法被优选用于获得本发明的多核苷酸。特别是很难从文库中得到全长的 cDNA 时，可优选使用 RACE 法(RACE-cDNA 末端快速扩增法)，用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

PP2A 蛋白或其编码基因

PP2A 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶，占细胞总蛋白含量的近 1%。PP2A 是一个异源三聚体。其中 35 kD 的催化亚基 C（PP2Ac）和 65 kD 的结构亚基 A (PR65) 构成了 PP2A 的核心二聚体，核心二聚体通过 A 亚基结合一个调节亚基 B，共同组成了 PP2A 全酶复合物。

本发明涉及一种 PP2A 的催化亚基 PP2Ac 蛋白及其变体，在本发明的一个优选例中，所述 PP2A 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:19 所示。本发明的 PP2A 蛋白或其促进剂可用于 (a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；(c) 降低 MAPK 信号通路的活性。

本发明还包括与本发明的 SEQ ID NO.:19 所示序列具有 50%或以上(优选 60%以上，70%以上，80%以上，更优选 90%以上，更优选 95%以上，最优选 98%以上，如 99%)同源性的具有相同或相似功能的多肽或蛋白。

其中，SEQ ID NO.:19 为鼠源 PP2A 蛋白（与人源 PP2A 蛋白的同源度为 99%）；SEQ ID NO.:24 为人源 PP2A 蛋白。

所述“相同或相似功能”主要是指：(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；(c) 降低 MAPK 信号通路的活性。

PTPA 蛋白或其编码基因

PTPA，由 *PPP2R4* 基因编码，是一个 ATP/Mg^{2+}依赖的肽脯酰胺反式/顺式异构酶，其普通存在于哺乳动物组织和细胞中。PTPA 通过改变 PP2Ac 亚基的脯氨酸 190 位的构象，增加 Leu309 位点甲基化水平来增强 PP2A 磷酸酯酶的活性。

本发明涉及一种 PTPA 蛋白及其变体，在本发明的一个优选例中，所述 PTPA 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:21 所示。本发明的 PTPA 蛋白或其促进剂可用于 (a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；(c) 降低 MAPK 信号通路的活性。

本发明还包括与本发明的 SEQ ID NO.:21 所示序列具有 50%或以上(优选 60%以上，70%以上，80%以上，更优选 90%以上，更优选 95%以上，最优选 98%以上，如 99%)同源性的具有相同或相似功能的多肽或蛋白。

其中，SEQ ID NO.:21 为鼠源 PTPA 蛋白（与人源 PTPA 蛋白的同源度为 87%）；SEQ ID NO.:25 为人源 PTPA 蛋白。

所述“相同或相似功能”主要是指：(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾

病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；(c) 降低 MAPK 信号通路的活性。

促进剂

在本发明中，促进剂包括能够在体内或体外提高 *PP2A* 或 *PTPA* 基因或其蛋白的活性和/或含量的物质。

其中，可通过下述方法增加 PP2A 或 PTPA 的表达量：组织自身分泌大量 PP2A 或 PTPA 蛋白或人工过表达 PP2A 或 PTPA 蛋白、或者人工输送 PP2A 或 PTPA 蛋白（比如，用病毒载体，如腺相关病毒载体）或者 PP2A 或 PTPA 促进剂。

在本发明中，所述 PP2A 或 PTPA 促进剂没有特别限制，只要能够促进 PP2A 或 PTPA 的表达或者增强 PP2A 或 PTPA 蛋白活性都在本发明的保护范围内。

在一优选实施方式中，所述 PP2A 或 PTPA 促进剂包括小分子化合物。

天使综合症

1965 年，一位英国的儿科医生 Harry Angelman 首次报道了三个患有天使综合征的儿童，他称他们为“木偶儿童”。天使综合征（Angelman syndrome, AS）发病率为 1:12,000，临床主要表现为发育迟缓，智力低下，失语症，运动协调性差，经常发笑，伴有癫痫发作。 经过 30 多年的研究发现，母源染色体 15q11-13 区段中的 *UBE3A* 是天使综合征的致病基因。导致天使综合征发生的四种遗传突变形式分别为： 15q11-13 区段母方来源染色体的缺失（75%）；15 号父方来源染色体双倍体（2%）；15 号染色体印记中心的缺失（imprinting defect，ID）（2%）；*UBE3A* 基因的突变（20%）。这些染色体的异常导致 UBE3A 蛋白水平下降或活性缺失，进而造成天使综合征的发生。

孤独症或其相关疾病

在本发明中，孤独症或其相关疾病包括并不限于：孤独症、15q11-13 复制综合征。

孤独症谱系障碍（autism spectrum disorders, ASD），是一类发病机制异质的神经发育性疾病。该病的主要特征为：社交障碍，交流障碍，行为重复刻板，兴趣范围狭窄，语言发育缓慢。孤独症儿童通常在 3 岁之前发病，男性患病率是女性患病率的四倍。尽管发病的机理目前还不是很清楚，但是 25%的患儿伴随有基因的新生突变或染色体的拷贝数异常。

基因拷贝数变异是孤独症发生的重要原因之一，其中 15q11-13 染色体拷贝数异常占全部孤独症患者的1%-3%。带有母源15q11-13的染色体间质复制(二倍）的部分人群会表现出孤独症表型，而等臂双着丝粒染色体15（三倍）的突变人群则全部表现出孤独症。该类型的染色体异常又被称为 15q11-13 复制综合征。该区段中，*UBE3A* 是唯一一个只表达母源等位基因的基因。不仅如此，在小鼠模型中，三拷贝数的 *Ube3a* 小鼠表现出典型的孤独症特征。在全基因组的研究中，研究人员发现在一个UBE3A点突变的病人中，其表现出了孤独症的表型，而该点突变导致了UBE3A活性的增加。以上研究证明，*UBE3A* 是孤独症的易感基因。

UBE3A的缺失会导致天使综合症，而UBE3A的异常增多会导致孤独症。因此，UBE3A的或多或少菌导致了神经发育性疾病的发生。

调节剂

基于本发明人的上述新发现，本发明提供了一种PP2A或PTPA的抑制剂的用途，用于制备预防、缓解和/或治疗天使综合症的药物组合物。

如本文所用，所述的PP2A或PTPA的抑制剂包括了下调剂、拮抗剂、阻滞剂、阻断剂、降解剂等。

所述的PP2A或PTPA基因或蛋白的抑制剂是指任何可降低PP2A或PTPA蛋白的活性、降低PP2A或PTPA基因或蛋白的稳定性、下调PP2A或PTPA蛋白的表达、减少PP2A或PTPA蛋白有效作用时间、或抑制PP2A或PTPA基因的转录和翻译的物质，这些物质均可用于本发明，作为对于下调PP2A或PTPA有用的物质，从而可用于缓解或治疗天使综合症。例如，所述的抑制剂是：特异性干扰PP2A或PTPA基因表达的干扰RNA分子或反义核苷酸；或是特异性与PP2A或PTPA基因编码的蛋白结合的抗体或配体，等等。

在一优选实施方式中，本发明的抑制剂还可同时抑制PP2A和PTPA基因或其蛋白的表达或其活性。

作为本发明的一种优选方式，所述的抑制剂是针对PP2A或PTPA的小分子化合物。在本领域技术人员可以采用本领域的常规筛选方法，来进行这类小分子化合物的筛选。例如，所述的小分子化合物为PP2A抑制剂LB-100。

作为一种选择方式，所述的抑制剂可以PP2A或PTPA特异性的干扰RNA分子(shRNA)。采用干扰RNA分子，可显著地下调PP2A或PTPA，发挥对于疾

病的缓解或治疗作用。本发明对干扰 RNA 分子的制备方法没有特别的限制，包括但不限于：化学合成法，体外转录法等。所述的干扰 RNA 可通过采用适当的转染试剂被输送到细胞内，或还可采用本领域已知的多种技术被输送到细胞内。

作为另一种选择，可采用 CRISPR/Cas9 系统进行靶向的基因编辑，从而在特定地敲除 PP2A 或 PTPA 基因。常见的敲除 PP2A 或 PTPA 基因的方法包括：将 sgRNA 或能形成所述 sgRNA 的核酸、Cas9 mRNA 或能形成所述 Cas9 mRNA 的核酸共转到靶向区域或靶向细胞中。在确定了靶位点之后，可以采用已知的方法来使得 sgRNA 及 Cas9 被引入到细胞内。所述的能形成所述 sgRNA 的核酸为核酸构建体或表达载体，或所述的能形成所述 Cas9 mRNA 的核酸为核酸构建体或表达载体，将这些表达载体导入到细胞内，从而在细胞内形成有活性的 sgRNA 及 Cas9 mRNA。

基于本发明人的新发现，所述的抑制剂是特异性上调 Ube3a 蛋白(包括促进其表达或提高其活性)的试剂，其通过上调 Ube3a 蛋白而降解 PTPA、进而抑制 PP2A 的活性。

Ube3a 的上调剂是指任何可提高 Ube3a 的活性、提高 Ube3a 的稳定性、上调 Ube3a 的表达、增加 Ube3a 有效作用时间的物质，这些物质均可用于本发明，作为对于上调 Ube3a 有用的物质，从而可用于抑制(包括降解)PTPA、进而抑制 PP2A。它们可以是化合物、化学小分子、生物分子。所述的生物分子可以是核酸水平(包括 DNA、RNA)的，也可以是蛋白水平的。

作为本发明的优选选择方式，所述的 Ube3a 上调剂是表达 Ube3a 的表达系统或表达构建物。所述的表达系统或表达构建物没有特别的限制，任何可表达出具有 Ube3a 或其类似物、模拟物相似活性的表达系统均可应用于本发明中。例如，所述的表达系统或表达构建物包括但不限于：表达载体、含有表达载体的宿主细胞或病毒；所述的病毒包括腺病毒、腺相关病毒、慢病毒等。本领域技术人员了解如何表达出甘油激酶或其类似物、模拟物，并且已经有一些商业化的表达系统，均可应用于本发明中。

药物筛选

在得知了提高 Ube3a 表达或抑制 PP2A 或 PTPA 的表达可缓解或治疗天使

综合症后，可以基于该特征来筛选提高 Ube3a 表达或抑制 PP2A 或 PTPA 的表达或活性的物质。可从所述的物质中找到对于缓解或治疗天使综合症真正有用的药物。

因此，本发明提供一种筛选缓解或治疗天使综合症的潜在物质的方法，所述的方法包括：用候选物质处理表达 PP2A 的体系；和检测所述体系中 PP2A 的表达或活性；若所述候选物质可抑制 PP2A 的表达或活性，则表明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。所述的表达 PP2A 的体系较佳的是细胞（或细胞培养物）体系，所述的细胞可以是内源性表达 PP2A 的细胞；或可以是重组表达 PP2A 的细胞。

在本发明的优选方式中，所述的体系中还表达 Ube3a 蛋白，所述方法还包括：检测所述体系中 Ube3a 蛋白的表达；其中，若所述候选物质能够通过提高 Ube3a 的表达而抑制蛋白磷酸酶 2A，则表明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

在本发明的优选方式中，所述的体系中还表达 PTPA，所述方法还包括：检测所述体系中 PTPA 的表达；其中，若所述候选物质能够通过抑制 PTPA 的表达而抑制 PP2A，则表明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

在本发明的优选方式中，在进行筛选时，为了更易于观察到 Ube3a、PP2A 或 PTPA 的表达或活性的改变，还可设置对照组，所述的对照组可以是不添加所述候选物质的表达 Ube3a、PP2A 或 PTPA 的体系。

作为本发明的优选方式，所述的方法还包括：对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验，以进一步选择和确定对于缓解或治疗天使综合症真正有用的物质。

另一方面，本发明还提供了采用所述筛选方法获得的潜在物质。这些初步筛选出的物质可构成一个筛选库，以便于人们最终可以从中筛选出能够对于抑制 PP2A 或 PTPA 的表达和活性，进而缓解或治疗天使综合症有用的物质。

药物组合物

本发明还提供了一种用于缓解或治疗天使综合症的药物组合物，它含有有效量（如 0.000001-50wt%；较佳的 0.00001-20wt%；更佳的，0.0001-10wt%）的所述的 PP2A 或 PTPA 基因或蛋白的抑制剂，以及药学上可接受的载体。任何前述的 PP2A 或 PTPA 基因或蛋白的抑制剂均可用于组合物的制备。

作为本发明的一种优选方式，提供了一种用于缓解或治疗天使综合症的组合物，所述的组合物含有有效量的本发明所述的抑制剂 LB-100，以及药学上可接受的载体。

如本文所用，所述“有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。所述“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体，包括各种赋形剂和稀释剂。该术语指这样一些药剂载体：它们本身并不是必要的活性成分，且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体，如水、盐水、缓冲液。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如填充剂、润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。所述的载体中还可以含有细胞转染试剂。

在得知了所述 PP2A 或 PTPA 基因或蛋白的抑制剂的用途后，可以采用本领域熟知的多种方法来将所述的抑制剂或其编码基因、或其药物组合物给药于哺乳动物。包括但不限于：皮下注射、肌肉注射、经皮给予、局部给予、植入、缓释给予等；优选的，所述给药方式是非肠道给予的。

可采用基因治疗的手段进行给予。比如，可直接将 PP2A 或 PTPA 的抑制剂通过诸如注射等方法给药于受试者；或者，可通过一定的途径将携带 PP2A 或 PTPA 的抑制剂的表达单位(比如表达载体或病毒等，或 siRNA)递送到靶点上，并使之表达活性的 PP2A 或 PTPA 抑制剂，具体情况需视所述的抑制剂的类型而定，这些均是本领域技术人员所熟知的。

本发明所述的 PP2A 或 PTPA 基因或蛋白的抑制剂的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于：所述的 PP2A 或 PTPA 基因或蛋白的抑制剂的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。

诊断用途

基于本发明人的上述新发现，可以将 PP2A 或 PTPA 作为天使综合症诊断或预后评估的标志物：(i) 进行天使综合症的分型和/或鉴别诊断；(ii) 评估相关人群的患病风险、药物疗效、预后，以及选择合适的治疗方法。比如，

可分离出由 PP2A 或 PTPA 基因表达异常的人群，从而可进行更有针对性地治疗。

根据本发明人的新发现，可以通过判断待评估样本中 PP2A 或 PTPA 的表达情况或活性情况，来预测提供该待评估样本的受试者的天使综合症预后情况，选择合适的药物实施治疗。通常，可以规定一个 PP2A 或 PTPA 的阈值，当 PP2A 或 PTPA 的表达情况高于所规定的阈值时，考虑采用抑制 PP2A 或 PTPA 的方案进行治疗。所述的阈值对于本领域技术人员而言是易于确定的，例如可以通过将正常人组织微环境中的 PP2A 或 PTPA 的表达情况与患者微环境中的 PP2A 或 PTPA 的表达情况进行比较后，获得 PP2A 或 PTPA 表达异常的阈值。

可采用各种本领域已知的技术来检测 PP2A 或 PTPA 基因的存在与否以及表达情况，这些技术均包含在本发明中。例如可用已有的技术如 Southern 印迹法、Western 印迹法、DNA 序列分析、PCR 等，这些方法可结合使用。

本发明还提供了用于在分析物中检测 PP2A 或 PTPA 基因的存在与否以及表达情况的试剂。优选的，当进行基因水平的检测时，可以采用特异性扩增 PP2A 或 PTPA 的引物；或特异性识别 PP2A 或 PTPA 的探针来确定 PP2A 或 PTPA 基因的存在与否；当进行蛋白水平的检测时，可以采用特异性结合 PP2A 或 PTPA 编码的蛋白的抗体或配体来确定 PP2A 或 PTPA 蛋白的表达情况。

针对 PP2A 或 PTPA 基因的特异性探针的设计是本领域人员熟知的技术，例如，制备一种探针，其可与 PP2A 或 PTPA 基因上特定位点发生特异性结合，而不与 PP2A 或 PTPA 基因以外的其它基因特异性结合，且所述探针带有可检测信号。

利用特异性结合 PP2A 或 PTPA 蛋白的抗体来检测分析物中 PP2A 或 PTPA 蛋白表达情况的方法也是本领域人员熟知的技术。

本发明还提供了用于在分析物中检测 PP2A 或 PTPA 基因的存在与否以及表达情况的试剂盒，该试剂盒包括：特异性扩增 PP2A 或 PTPA 基因的引物；特异性识别 PP2A 或 PTPA 基因的探针；或特异性结合 PP2A 或 PTPA 基因编码的蛋白的抗体或配体。

此外，所述的试剂盒中还可包括用于提取 DNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂，包括但不限于：抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液等。

此外，所述的试剂盒中还可包括使用说明书和/或核酸序列分析软件等。

复方药物组合物和药盒

本发明提供了含有活性成分(a) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂；PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂；PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂；或其组合；以及(b)药学上可接受的载体的复方药物组合物。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、粉剂、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。本发明的药物组合也可以被制成粉剂用于雾化吸入。本发明的药物组合物的剂型为注射剂、口服制剂(片剂、胶囊、口服液)、透皮剂、缓释剂。活性成分的给药量是治疗有效量。本发明的药物制剂还可制成缓释制剂。本发明的药物组合物优选为注射制剂。此外，本发明药物组合物还可与其他治疗剂一起使用。并且，本发明的药物组合物还可以包括额外的组分，所述额外的组分选自下组：其他(a)预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b)抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(c)降低 MAPK 信号通路的活性的物质，如 MK-8353, U0126 和 SCG772984，PD98059, Selumetinib 和 PD0325901 等。

本发明所述的活性成分的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于：所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。通常，当本发明的活性成分每天以约 0.00001mg-10mg/kg 动物体重(较佳地，0.5mg-5mg/kg 动物体重)的剂量给予，能得到令人满意的效果。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或将剂量按比例地减少。

本发明所述的药学上可接受的载体包括(但不限于)：水、盐水、脂质体、脂质、蛋白、蛋白-抗体缀合物、肽类物质、纤维素、纳米凝胶、或其组合。载体的选择应与给药方式相匹配，这些都是本领域的普通技术人员所熟知的。

本发明还提供了一种可用于(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(c) 降低 MAPK 信号通路的活性的药盒，该药盒含有：

(i) 第一容器，以及位于该第一容器中的活性成分(a1) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂；PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂；PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂；或其组合，或含有活性成分(a1)的药物；和

(ii) 说明书，所述说明书中记载了给予活性成分(a1)从而(i) 预防和/或治疗肝纤维化相关疾病；和/或(ii) 维持肝脏稳态的说明。

本发明的药物组合物和药盒适用于(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(c) 降低 MAPK 信号通路的活性。

本发明制剂可以每一天服用三次到每十天服用一次，或者以缓释方式每十天服用一次。优选的方式是每天服用一次，因为这样便于病人坚持，从而显著提高病人服药的顺应性。

服用时，极大多数病例一般每天应用的总剂量应低于(或少数病例等于或略大于)各个单药的每天常用剂量，当然，所用的活性成分的有效剂量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而有所变化。

治疗方法

本发明还提供了用本发明的活性成分或相应的药物来(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(c) 降低 MAPK 信号通路的活性的方法，它包括给哺乳动物施用有效量的活性成分(a1) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂；PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂；PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂；或其组合，或者施用含有所述活性成分(a1)的药物组合物。

当本发明的活性成分被用于上述用途时，可与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合，如溶剂、稀释剂等，而且可以用如下形式口服给药：片剂、丸剂、胶囊、可分散的粉末、颗粒或悬浮液(含有如约 0.05-5%悬浮剂)、糖浆(含有如约 10-50%糖)、和酏剂(含有约 20-50%乙醇)，或者以无菌可注射溶液或悬浮液形式(在等渗介质中含有约 0.05-5%悬浮剂)进行非肠胃给药。例如，这些药物制剂可含有与载体混合的约 0.01-99%，更佳地约为 0.1%-90%(重量)的活性成分。

本发明的两种活性成分或药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、口服、瘤内或局部给药。优选的给药途径包括口服给药、肌内给药或静脉内给药。

从易于给药的立场看，优选的药物组合物是液态组合物，尤其是注射剂。

此外，本发明的活性成分或药物还可与其他(a) 预防和/或治疗孤独症或其相关疾病；和/或(b) 抑制 ERK1/2 的磷酸化水平；和/或(c) 降低 MAPK 信号通路的活性的组分或药物(如 MK-8353、U0126、SCG772984、PD98059、Selumetinib 和 PD0325901 等)联合使用。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，科学出版社，2002(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

实施例中所用的材料和试剂，如无特别说明，均为市售产品。

实施例 1、*Ube3a* 缺失小鼠中 PTPA 蛋白水平的检测

首先，分别取出生后 30 天(P30)的小鼠：野生型(WT)与同窝的 Ube3a 母源缺失的 AS 小鼠(获自杜克大学，在 Ube3a 的二号外显子下引入一个终止密码子，导致了 Ube3a 的不表达)，进行麻醉，按照 70mg/kg 的标准腹腔注射 0.7%的戊巴比妥钠；待其麻醉后，快速用剪刀将其头颅打开取出其整个大脑，快速放入预冷的 0.9%的生理盐水中，经生理盐水洗去血液后，放在无菌的滤纸上，用镊子与海马勺解剖脑组织，将一半小脑组织放入 2ml 的 Axygen 离心管中，然后放入 400ul 的加入 1mM PMSF 的 RIPA 裂解液，放入一个 3mm 直径的磁珠后放入组织匀浆器中，60Hz，破碎 30s 后，取出，放入冰上裂解 30min。之后，在冷冻离心机中，4° C，14000g 离心 20min 后取上清到一个新的 1.5ml 的离心管中，然后置于冰上。

利用天根 BCA 蛋白定量试剂盒测定组织中的蛋白浓度。先将蛋白的裂解液取出 5ul 进行 10 倍稀释后，按照说明书上的方法，将试剂盒中的 A 和 B 液按 1:50 混合后，制备 BSA 蛋白标准品各 50ul，将样品与标准品各 25ul 与 200ul 的 AB 混合液混合放入到 96 孔盘(美国 Corning 公司生产)中，37° 反应 30min 后，取出放入到酶标仪中测定 562nm 下的吸光值。计算出标准曲线后，将样品的所得吸光值带入公式，算出其对应的浓度，然后再扩大 10 倍后

即是所测样品的浓度。测定后，将样品统一调节到2ug/ul的浓度，把蛋白样品和等体积的 2×蛋白上样缓冲液(二硫苏糖醇(DTT)：0.1572 g 溴酚蓝；0.01 g Tris-HCl(1 M pH 6.8)：0.5 ml 10% SDS：2 ml 甘油：1 ml H_2O：定容至10 ml)混合后，80° C煮7min。

Tris (1 M pH 6.8) 缓冲液的配制方法：称取 Tris Base 24.228 g 溶于约 160 ml 超纯水，充分搅拌溶解，用盐酸调节 pH 至 6.8，同时用超纯水定容至 200 ml。

Western Blot方法检测蛋白表达：

准备好配制凝胶需要的试剂如下：30% acrylamide mix购于Generay公司；

Tris (1.5 M pH 8.8)配制方法：称取Tris Base 36.342 g溶于约160 ml超纯水，充分搅拌溶解，用盐酸调节pH至8.8，同时用超纯水定容至200 ml；

Tris (0.5 M pH 6.8)缓冲液的配制方法：称取Tris Base 12.114 g溶于约160 ml超纯水，充分搅拌溶解，用盐酸调节pH至6.8，同时用超纯水定容至200 ml；

10% SDS的配制方法:称取5 g十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate，SDS)，溶于超纯水至50 ml；

10%APS的配制方法：称取1 g 过硫酸铵(Ammonium persulfate，APS)，溶于超纯水至10 ml；

TEMED 是指 N,N,N’,N’-Tetramethylethylenediamine，中文名N,N,N’,N’-四甲基二乙胺。

准备好电泳装置和配制1.5 mm厚凝胶的玻璃板。把玻璃板洗涤干净，再用去离子水冲洗一遍，放入电热鼓风干燥箱中烘干。待玻璃板全干后组装好配胶装置，配制10%分离胶(ddH_2O：4.0 ml 30% acrylamide mix：3.3 ml Tris (PH 8.8 1.5 M)：2.5 ml 10% SDS：100 μl 10% APS：100 μl TEMED：4 μl)，将其注入至玻璃板，加入后用500μl无水乙醇封住上表面。

室温放置30min以上，待乙醇和凝固的分离胶两相界面变清晰，准备好5%浓缩胶(ddH_2O：2.7 ml 30% acrylamide mix：0.67 ml Tris (PH 6.8 0.5 M)：0.5 ml 10% SDS：40 μl 10% APS：40 μl TEMED：4 μl)，倒掉玻璃板中的酒精，注入浓缩胶，插上梳子，室温放置20min待其凝固后即可使用。

电泳：配制10×电泳液(Tris：30.3 g，甘氨酸：144.0 g，SDS：10.0 g

去离子水，定容至 1000 ml)，将 100 ml 10×电泳液与 900 ml H_2O_2混合即得到 1000 ml 1×电泳液。

安装好电泳装置并用清水冲洗干净，拔掉梳子。倒上 1000 ml 电泳液，保持电泳槽内槽充满电泳液，样品在 6000 转/分条件下离心 1 s 收集后加入泳道，邻近样品放的其中一个空白孔加入预染 marker(加拿大 Fermentas 公司生产，货号 SM0671)。电泳时电源限定条件：80V 40min，然后 110V 90min。待指示剂显示样品接近凝胶下边界时停止电泳。

转膜：配制 10×转膜液(Tris： 30.3 g 甘氨酸： 144.0 g H_2O： 定容至：1000 ml)。接下来配制好 1×转膜液(10×转膜液：80ml 甲醇：160ml H_2O：定容至 800 ml)。准备好转膜装置，两组 8.5×8 cm 规格滤纸，每组二张。把 PVDF 膜先浸泡在甲醇中约 1min 待其浸透无白点，再放入转膜液中平衡后，转移至装有转膜液的小盒中备用。然后用塑料片轻轻切去浓缩胶，再切割分离胶两端和与玻璃接触的面。用塑料片蘸少许转膜液，塞入分离胶下使其松动，然后将其倒扣至装有转膜液的塑料盆中轻轻摇晃，分离胶即从玻璃上脱离到转膜液中。打开转膜用的塑料板，浸没到转膜液中，在转膜液中按如下顺序组装：负极板(黑)放上海绵→一组滤纸(三张)→分离胶→PVDF 膜→一组滤纸(三张)→海绵→正极板。然后夹持好装置，倒上转膜液，确保转膜的三明治样结构完全浸没在转膜液中，盖上带有电源线的盖子，整个电泳装置置于塑料盆中，电泳盒外围加上冰水混合物即可开始转膜。转膜时电源限定条件：I=350 mA; t=120min。

封闭：配制好 10×TBS 缓冲液(1L 含 Tris 24.23 g、NaCl 80.06 g，HCl 调 pH 至 7.4)，然后用去离子水稀释 10 倍得到 1×TBS，再加入 0.5%(v/v)的吐温-20 配制成 TBST。准备好 5%脱脂奶，将 5 g 脱脂牛奶(中国内蒙古伊利实业集团股份有限公司)溶于 100 ml TBST 溶液中，即为封闭液。转膜完毕后，取出 PVDF 膜装入塑料盒中，倒入 30 ml 的 5%脱脂牛奶，置于脱色摇床上摇一个小时。

一抗孵育：从摇床取下 PVDF 膜后，按 1:2000 稀释率取用 PTPA 抗体(Cell signaling 公司，3330)，1：5000 稀释率取用 Ube3a 抗体(Sigma 公司，E8655)以及抗体 HRP 偶联的 Actin(Santa cruz 公司，sc-1615 HRP)，加入到 3 ml 封闭液中，摇匀即得到抗体工作液。把膜装入自封袋，倒入配好的抗体工作液，中速运转的脱色摇床上 4° C 孵育过夜。一抗孵育完后，若一抗上已经有辣根

过氧化物酶标记(如内参蛋白 GAPDH 的抗体)，则直接跳至显影步骤，若没有，则需要二抗孵育。

二抗孵育：先用 1×TBST 洗涤 3 次，每次 10 分钟。吸取辣根过氧化物酶标记的兔免疫球蛋白抗体(Santa Cruz 公司生产，稀释率为 1:3000)或鼠免疫球蛋白抗体(Santa cruz 公司生产，稀释率为 1:3000)，加入到 3 ml 封闭液中摇匀。把洗涤后的膜装入自封袋，倒入配好的二抗工作液，封口，摇床上摇 120min。

显影：二抗孵育结束后，用 1×TBST 洗涤 3 次，每次 10 分钟。以下操作在显影暗室中红光灯辅助下完成。分别吸取 800 μl 显影底物 A 和 B(中国天根生化科技有限公司生产)混匀，平衡至室温。把 PVDF 膜放在洁净的剪开的自封袋内表面上。迅速加上显影底物，孵育 1min，若肉眼可见明显条带，则终止孵育。弃掉显影底物液体，把膜转移至三面剪开的自封袋中，合上自封袋，用卫生纸小心吸掉多余的液体，放入显影暗匣，用绝缘胶带固定。放上胶片，胶片曝光一定时间(5～30 秒)后，依次放入显影液、定影液各 20s，然后把胶片放在清水中。最后在自来水下洗净胶片，晾干，扫描至计算机，得到检测结果。

Western Blot 的结果如图 1（A，B）所示，表明 UBE3A 调节 PTPA 的蛋白表达，并呈现负相关性。

实施例 2、UBE3A 泛素化 PTPA

1）GST pull-down

GST 标签蛋白的纯化：将构建好的原核表达的质粒（PGEX-4T-1 或者 Pgex-4T-1-UBE3A）转入感受态 Rosetta 表达菌种中，并涂于带氨苄抗性的平板上。待其长出菌落后，挑取菌落于 5 mL 的含有抗生素的 LB 细菌培养基中，37 摄氏度，250 转每分钟，过夜培养。将过夜培养的细菌按照 1:100 接入已经加入抗生素的 LB 细菌培养基中，37 摄氏度培养至 OD600=0.6-0.8 (约 2.5 小时)。然后加入 IPTG (0.168 mM)，27 摄氏度诱导 5 个小时。将诱导后的菌液，12000 rpm，离心 2 分钟，收集到 15 mL 的离心管中。加入 5 mLGST 裂解缓冲液 (PBS+1%TritonX-100，1 mM PMSF）重悬菌体。80-100 W 下超声 5 秒，间歇 15 秒直到菌液变澄清。超声结束后，12000 g，4 摄氏度离心 20 分钟，取上清液到一个新的离心管中。将上清液加入装有适量的谷胱甘肽结合的珠

子（GE Healthcare）的层析柱，再用一定体积的 GST 裂解缓冲液洗五次，最后用适量的洗脱缓冲液将蛋白洗脱下来，保存在-80 摄氏度下。上述所用缓冲液均需要提前加入蛋白酶体抑制剂。

IPTG（异丙基硫代-β-D-半乳糖苷）的配制： 2 g IPTG 溶解入 10 mL 水，过滤除菌，分装，-20 度保存。

PBS 的配制： KH2PO4 0.24 g，Na2HPO4 1.44 g，NaCl 8.0 g， KCl 0.2 g，加水至 1000 mL。

洗脱缓冲液的配制：0.615 g 谷胱甘肽，10 mL Tris-HCl（1M，pH 8.0），90 mL 双蒸水。

His 标签蛋白的纯化步骤与 GST 蛋白的纯化步骤相似，该纯化所用的为 Ni-NTA 珠子（Qiagen），纯化步骤按照说明书操作。

将纯化的 GST 融合蛋白与 His 融合蛋白置于 pull-down 缓冲液中（50 mM Tris-Cl，（pH 8.0），200 mM NaCl，1 mM EDTA，1% NP-40，1 mM DTT，10 mM MgCl2）中，4 摄氏度孵育 2 个小时。然后，用 pull-down 缓冲液洗珠子四次后，加入 2X 蛋白上样缓冲液，进行免疫印迹实验。

2）体外泛素化反应

体外泛素化反应按照 E6AP（UBE3A）泛素连接试剂盒（Boston Biochem，K-240）中提供的说明书进行实验。具体反应如下：将 3 μL 10X E1，3 μL 10X E2，3 μL 10X His6-UBE3A，3 μL 10X Mg2+-ATP，3 μL 10X His6-PTPA enzyme（2 μg），3 μL10X 反应缓冲液和 6 μL 水混合。阴性对照组中，将水代替 Mg2+-ATP。当加入 3 μL 10X 的泛素溶液时，反应开始。反应在 37 摄氏度下进行。1.5 小时后，加入上样缓冲液终止反应，并用免疫印迹检测 PTPA 的泛素化水平。

UBE3A 泛素化 PTPA 的结果如图 2（A、B）所示，表明 UBE3A 与 PTPA 直接相互作用，并且使得 PTPA 泛素化。

实施例 3、*Ube3a* 缺失小鼠中 PP2A 活性的检测

按照实施例 1 中的方法取出小鼠的整个大脑，将其放入预冷的玻璃匀浆器中，加入 1ml 咪唑裂解液(20mM 咪唑盐酸(PH7.0)，2mM EDTA，2mM EGTA，1mM PMSF，5ul Protease Inhibitor Cocktail(P8430))，均匀匀浆约 20 次，将裂解液用移液器移到 1.5ml 的离心管中，并插入冰盒中。将该离心管放入

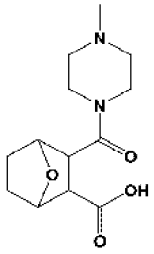
冷冻离心机中，4℃，3000g，离心 5min。取出上清到新的离心管中，按照实施例 1 中的方法测定蛋白的浓度。

取 500ug 蛋白到一个新的 1.5ml 离心管中，将其体积用咪唑裂解液补到 500ul 后，按照 PP2A 活性检测试剂盒(墨客密理博，#17-313)提供的步骤完成 PP2A 活性的检测。具体是在 500ug 的蛋白裂解液中加入 4ug 的 Anti-PP2A，C (#05-421)抗体以及 40ul 的试剂盒中提供的 Protein A 琼脂糖珠子，放在 4℃的冷库中的混合器(H30 混合器)上，转动 2 小时。将离心管取下，3000g，4℃离心 3min，去除上清，留下琼脂糖珠子。加入 700ul 的 1×TBS 后混匀，再次 3000g，4℃离心 3min。重复三次。最后再用试剂盒提供的 500ul 的 Ser/Thr 反应缓冲液洗一次，最后将琼脂糖珠子留下。加入 60ul 的磷酸化的多肽(750uM)以及 20ul Ser/Thr 反应缓冲液，混匀。在 30℃的水浴锅中孵育 10min，期间不断取出混匀后再放入。待反应完后，10000g 离心 30s 后，取 25ul 放入到试剂盒提供的 96 孔板中，再加入 100ul 的孔雀绿磷酸检测溶液中，室温反应 15min 后，在酶标仪中测定 650nm 下的荧光值。得出相对的组织中的磷酸酶活性。

磷酸酶活性的结果如图 3 所示，表明 *Ube3a* 缺失的 AS 小鼠模型中，PP2A 活性显著地升高。

实施例 4、PP2A 抑制剂纠正了天使综合症小鼠脑中 PP2A 活性的增加

LB-100 是一种水溶性的 PP2A 抑制剂，水的溶解度为 53mg/mL 其分子式为 $C_{13}H_{20}N_2O_4$，分子结构如下：



本实施例中，所用 LB-100 购买自 Selleck 公司，纯度为 95%。将药物溶解在生理盐水中，配制母液浓度为 10mg/ml，20ul 分装后，放入-20℃冰箱保存。

AS 模型小鼠来自杜克大学，在 Ube3a 的二号外显子下引入一个终止密码子，导致了 Ube3a 的不表达。这种 Ube3a 不表达的小鼠为天使综合征的模型小鼠。

取野生型(WT)小鼠和 AS 小鼠，分成 4 组，每组 4-6 只，按照实施例 1 中的方法取出小鼠的整个大脑，放入到组织液 1 中，将小脑取出后，放入到含有氧气的人工脑脊液中。其中，WT 组分为对照组和 LB-100 给药组：在人工脑脊液中分别加入生理盐水组或者最终浓度为 300nM 的 LB-100 给药组。同样，AS 小鼠分为对照组和 LB-100 给药组。当药物处理 2 个小时后，取出组织，按照实施例 3 的方法，分别测定 PP2A 的活性。

组织液 1：N-Methyl-D-glucamine (NMDG), 93 mM; KCl, 2.5 mM; NaH2PO4, 1.2 mM; NaHCO3, 30 mM; HEPES, 20 mM; Glucose, 25 mM, Sodium pyruvate, 3 mM; MgSO4, 10 mM; CaCl2, 0.5 mM, 调节 pH7.3-7.4。

人工脑脊液：NaCl, 125 mM; KCl, 2.5 mM; CaCl2, 2 mM; MgCl2,1.3 mM; NaH2PO4, 1.3 mM; NaHCO3, 26 mM; Glucose, 10 mM。

磷酸酶活性的结果如图 4 所示，结果表明，PP2A 抑制剂，比如 LB-100 可以明显恢复 *Ube3a* 缺失的 AS 小鼠模型中 PP2A 活性的升高。

实施例 5、PP2A 抑制剂治疗天使综合症小鼠运动障碍的效果

按照实施例 4 中的方法配置 PP2A 抑制剂 LB-100。将药物溶解在生理盐水中，配制母液浓度为 10mg/ml，20ul 分装后，放入-20℃冰箱保存。

AS 模型小鼠来自杜克大学，在 Ube3a 的二号外显子下引入一个终止密码子，导致了 Ube3a 的不表达。这种 Ube3a 不表达的小鼠为天使综合征的模型小鼠。

取野生型(WT)小鼠和 AS 小鼠各 8 只，分成 4 组：WT 给生理盐水组(WT)，AS 给生理盐水组(AS)，WT 给 LB-100 药物组(WT/LB-100)，AS 给 LB-100 药物组(AS/LB-100)。在出生后 14 天，开始进行药物注射，按照小鼠体重，每千克体重注射 1mg 的 LB-100 的浓度进行给药。现将配制好的 LB-100 母液从冰箱拿出，解冻后，将其稀释到 50ug/ml 的工作浓度，称量小鼠体重后，进行腹腔注射。每两天注射一次，注射到出生后 30 天，开始进行行为检测。

给药步骤如图 5 所示，从出生后 14 天(P14)给药，每隔两天给一次药，直到出生后 30 天(P30)后，进行行为检测。

细绳悬挂实验：该实验主要是探测小鼠的肌肉力量和运动的协调性。取一个直径为 0.2cm，长度为 54.4cm 的细绳，将其固定在两端的支架上，将其高度调整到离地面 50cm 处，在其下面垫上一个泡沫的垫子，防止小鼠掉落摔

伤。先小鼠放到房间适应环境 30min 后开始实验。实验时，将小鼠提起后，将前肢挂在细绳上后松开手，记录小鼠在电线上不掉落的时间，最大时间记录到 120s。每只老鼠重复三次，每次时间间隔 15min。

转棒实验：该实验主要是检测小鼠的运动协调与学习能力。实验需要进行六天：第一天将小鼠放在转棒仪上，4 转每分钟，运动 2min 后，取出放入笼子中；第二天开始正式实验：转棒仪设置调节到逐渐加速程序，从 5 转每分钟到 30 转每分钟，加速时间为 5min。该实验记录其在转棒仪上运动的时间，如果小鼠掉落或者抱着柱子转动两圈，记为失败，记下此时的时间就是小鼠在转棒仪上驻足的时间。连续此步骤五天。将每个小鼠的五天的成绩做成曲线，比较小鼠的运动能力。

给药后四组小鼠的运动行为结果如图 6，A～B 所示，表明本发明中 PP2A 抑制剂可以改善天使综合症小鼠的肌肉力量以及运动协调性。

实施例 6、PP2A 抑制剂治疗天使综合症小鼠树突棘异常的效果

实施例 5 中的小鼠完成行为实验后，进行高尔基银染，观察小鼠小脑中的浦肯野细胞的树突棘。本实验利用染色试剂盒是 FD Golgi stain kit (Consulting & Services 公司，PK401)。首先，将试剂盒中的 A 液与 B 液 1:1 提前一天混合，并室温避光保存。第二天，将小鼠进行麻醉，方法如实施例 1，将小鼠的脑组织放入 ddH_2O 中，简单漂洗，去除表面的血液和杂物。将小鼠脑组织放入含有 5mlAB 混合液的 15ml 离心管(Corning 公司生产)中，浸泡脑组织。避光保存 24 小时后，重新置换 5ml 的 AB 混合液，继续避光室温保存 14 天。14 天后，将其中的 AB 混合液换成试剂盒中的 C 液，并 4℃避光保存，24 小时后置换 C 液，继续在 4℃保存 3 天。3 天后，将脑组织中的小脑切下后，矢状放入到 24 孔盘中，倒入预先溶解的 3%的琼脂中，并放入冰箱中，待其凝固。

3%的琼脂溶液制备：称取 3g 的琼脂粉放入玻璃的三角瓶中，加入 110ml 的水，放入微波炉中加热，待其沸腾一次后，拿出摇动几下，再次放入微波炉中，待其再次沸腾。最后溶液呈现均匀的状态后，快速倒入 50ml 的离心管(Cornin 公司购买)中，放入到 60℃的水浴锅中，使其保持溶解的状态。

将包埋的脑组织取出，将其放入到振动切片机(Leica)上进行切片。具体来说，将脑组织取出后，进行修剪后，用强力胶将其固定到切片机的底座

上，迅速倒入 C 液，调整切片机的切片厚度为 150um，将切下的脑片，直接贴在明胶包被的玻片上，每个小脑准备一个玻片。完成后，放在暗盒里，待其干燥。约 2 天后，进行高尔基染色。用超纯水洗脑片 2 次，每次 4min，然后将脑片放在 D+E+水(50ml：50ml:100ml)的混合液中 10min 进行染色，然后用超纯水洗脑片 4 次，每次 4min。然后用 50%，75%，95%逐级脱水，每次脑片放置 4min。最后用无水乙醇进行四次的脱水，每次 4min。最后用二甲苯进行脱脂 3 次，每次 4min。最后每个玻片滴加 200ul 树脂后，盖上盖玻片，进行封片。封片后的片子室温避光保存待拍摄。

将待拍摄的片子用 Nikon A1 倒置共聚焦显微镜的明场下，用 60x 物镜进行拍摄，将光源调节到最佳水平后，选取蒲肯野细胞的远离胞体的树突进行拍摄。最后将所得的图片中的树突棘根据形态分为三类：蘑菇状(mushroom)，粗短状(stubby)，细长型(thin)，计算每个树突干中的三种树突棘的数量，最后算出每个类别的比例。

给药后，四组小鼠小脑的蒲肯野细胞的树突棘的类别分析如图 7，A～B 所示，表明 PP2A 抑制剂可以明显改善天使综合症小鼠中的蒲肯野细胞树突棘的异常成熟。

实施例 7、敲减 PTPA 基因的表达可以改善天使综合症小鼠中的神经元的形态异常

根据前述研究结果，本发明人将雌性的父源 *Ube3a* 缺失的杂合子小鼠(*Ube3a*$^{m+/p-}$)(获自杜克大学)与雄性的 *Ptpa* 缺失的杂合子小鼠(*Ptpa*$^{+/-}$)(中科院上海生科院神经科学研究所，以 CRISPR/Cas9 技术改造 *Ptpa* 获得)交配，其产生四种后代：野生型(WT)，母源 *Ube3a* 缺失的 AS 小鼠，*Ptpa* 缺失的杂合子小鼠(*Ptpa*$^{+/-}$)，以及 *Ube3a* 与 *Ptpa* 双敲除的小鼠(AS；*Ptpa*$^{+/-}$)。在出生后 30 天后，按照实施例 5 中的方法，将四种基因的老鼠分别进行高尔基染色，观察小鼠小脑中的浦肯野细胞的树突棘。将树突棘根据形态分为三类：蘑菇型(mushroom)、短粗型(stubby)和细长型(thin)。统计三种树突棘在不同老鼠中的比例。

四组小鼠小脑的蒲肯野细胞的树突棘的类别分析如图 8 所示，表明本发明中降低 PTPA 的蛋白水平可以明显改善天使综合症小鼠中的蒲肯野细胞树突棘的异常成熟。

实施例 8、靶向 PTPA 基因并特异性抑制 PTPA 基因表达的 shRNA 可以缓解天使综合症模型小鼠的运动异常

1、特异性抑制 PTPA 基因表达的 shRNA 载体的构建以及序列的筛选

从 NCBI 网站 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 下载小鼠 PTPA 的 mRNA(Genebank Accession：NM_138748.5) 的互补 DNA (Complementary DNA，cDNA) 序列信息，在 Invitrogen 网站 (https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/) 设计针对 PTPA 的 shRNA，前期选择 3 条靶点序列。入靶点序列进行比对分析，要求靶点序列和人的其它 mRNA 基因没有高度同源性，可作特异性干扰 PTPA 的干扰靶点。再根据这些序列按 sense-loop-antisense 的顺序人工设计 shRNA，sense 是指靶点序列的正义链，antisense 是指靶点序列的反义链，loop 是指形成环的序列，这里使用 TTCAAGAGA。再在两端加上限制性内切酶 BglII 和 HindIII 识别的序列，得到如下所示针对一个靶点的两条 shRNA 序列：正义链：5’-GATCCCC-sense-TTCAAGAGA-antisense-TTTTTA-3’；反义链：5’-AGCTTAAAAA-sense-TCTCTTGAA-antisense-GGG-3’。

三个 shRNA 的序列如下：

sh1# 的正义链 (sh1#-F)：5’-GATCCCCCAGTTCCAGATATGGGCAAATGGAATTCAAGAGAttccatttgcccatatctggaactgTTTTTA-3’ (SEQ ID NO: 4)；

sh1# 的反义链 (sh1#-R)：5’-AGCTTAAAAACAGTTCCAGATATGGGCAAATGGAATCTCTTGAAttccatttgcccatatctggaactgGGG-3’ (SEQ ID NO: 5)；

sh3# 的正义链 (sh1#-F)：5’-GATCCCCCCTGGTATGCCAAACTTGATCAGGATTCAAGAGAtcctgatcaagtttggcataccaggTTTTTA-3’ (SEQ ID NO: 6)；

sh3# 的反义链 (sh1#-R)：5’-AGCTTAAAAACCTGGTATGCCAAACTTGATCAGGATCTCTTGAAtcctgatcaagtttggcataccaggGGG-3’ (SEQ ID NO: 7)；

sh4# 的正义链 (sh1#-F)：5’-GATCCCCTCAAGGTGTTTGATAGGTATCTTGATTCAAGAGAtcaagatacctatcaaacaccttgaTTTTTA-3’ (SEQ ID NO: 8)；

sh4# 的反义链 (sh1#-R)：5’-AGCTTAAAAATCAAGGTGTTTGATAGGTATCTTGATCTCTTGAAtcaagatacctatcaaacaccttgaGGG-3’ (SEQ ID NO: 9)；

把引物信息交 invitrogen 公司合成。DNA Oligo 加入 ddH_2O 溶解，浓度 3 mg/ml。分别取 shRNA 的正义链和反义链 2 ul 的 DNA oligo 与 5 ul 的

10×退火缓冲液(成分为 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)，10 mM EDTA，1mM NaCl)混合，95℃水浴 12 min 后拿出，在室温下冷却至室温。25℃下，用 T4 连接酶(美国 NEB 公司生产)将互补双链与 BglII、HindIII 酶切的 pSuper basic 载体 16℃连接过夜，体系按说明书配制(DNA 4μl，载体 2μl，10× T4 buffer 2μl，T4 连接酶 2μl，ddH_2O 10 μl)。

取连接产物加入装有大肠杆菌 DH5α 感受态细胞的 1.5 ml 规格离心管使

其混合，置于冰上 30 分钟，然后放入 42℃水浴 90 秒，再放回冰上 2 分钟后

加入 800μl 不含抗生素的培养基，置 37℃细菌培养箱中摇 1 小时。4500 转/

分离心收集得到的细菌后涂固体 LB 培养基平板，37℃细菌培养箱过夜培养

至长出菌落。挑取单克隆置 1.5 ml 规格离心管进行培养，用 PCR 方法鉴定是否转化成功，鉴定所用的引物为：

T7 primer：5’-AATACGACTCACTATAG-3’ (SEQ ID NO: 16)；

T3 primer：5’-TTAACCCTCACTAAAGG-3’ (SEQ ID NO: 17)。

转化成功的取样送测序(华大基因有限公司提供测序服务)，测序使用的引物是：T7 primer：5’-AATACGACTCACTATAG-3’ （SEQ ID NO.:16）。取测序正确的细菌和 5 ml 添加抗生素的培养基加入 50 ml 规格离心管培养 8 小时，然后与 400 ml 添加了抗生素的培养基一起倒入 1000ml 规格的培养瓶中扩大培养，使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 大抽试剂盒(德国凯杰生物技术有限公司生产)抽提出质粒，质粒抽提按 Plasmid Maxi Kit 说明书进行操作。

按照动物操作规程取出 E18 或 P0 SD 大鼠的脑组织，转移至装有解剖液(Hank’s buffer；$NaHCO_3$ 0.35g/L；HEPES 10 mM，pH 7.3；Glucose 33.3 mM)的 10 cm 培养皿中，剥除脑膜，分离出大脑皮层。将皮层转移至装有解剖液的 35mm 培养皿，用剪刀剪碎，随后用 Trypsin(0.14%)在 37℃消化 15 分钟。加入用 plating medium(95% MEM，Invitrogen，美国；5% FBS(v/v)，Invitrogen，美国；0.4% Glucose (w/v)，Sigma，美国)终止 Trypsin 的消化。用巴斯德吸管或者 1 ml 移液器枪头小心将消化后的组织吹散成单细胞悬液。在离心机中以 500g 的速度离心 5 分钟，细胞碎片悬于上清，细胞沉

于底部。弃上清，将沉淀的细胞用 plating medium 清洗一次，500g、5 分钟离心沉淀细胞。再次用 plating medium 重悬细胞。将细胞悬液稀释 10 倍后用血球计数器计数。所有培养皿和玻片在使用前均用多聚赖氨酸(PDL)进行包被(玻片 0.1mg/ml，培养皿 0.01 mg/ml)。将细胞放入 5% CO_2，37℃的细胞培养箱中培养。当细胞贴壁后(约 1-2 小时)用 Neruobasal 细胞培养液(97% Neurobasal medium (v/v)，Invitrogen，美国；2% B-27 supplement (v/v)，Invitrogen，美国；1% GlutaMAX (v/v)，Invitrogen，美国)换液。

使用 lonza 公司的核转染系统对铺盘前的神经元进行电转：将 200μl 电转液与 15μg 构建好的 PTPA shRNA 三个质粒与对照质粒分别和 1×10^7 细胞混合后，加入电转杯，使用电转仪(Lonza)选择 O-03 的程序进行电击，然后迅速加入 1mL 培养基重悬细胞，按合适密度铺入培养板。2 小时后更换不含血清的 N27 培养基(500ml Neural basal+10ml B27+500μl Glutamax+10μl gentamicin)。细胞置于 5%CO_2，37℃的培养箱中进行培养。

三天后，加入 RIPA 裂解液(碧云天公司购买)冰上裂解 30min 之后，在冷冻离心机(Eppendorf 公司供应)中，4° C，14000g 离心 20min 后取上清到一个新的 1.5ml 的离心管中，然后按照实施例 1 中的方法进行蛋白浓度测定与 Western blot 检测 PTPA 的蛋白水平。

电转液有 A 液与 B 液组成，使用前将两者按照 1:50 的比例混匀后使用。

电转 A 液：2 g ATP-disodium salt，sigma A2383；1.2 g $MgCl_2\cdot6H_2O$，sigma M2393；用双蒸水定容到 10 ml 后，0.22 微米的过滤器过滤分装，-20℃保存。

电转 B 液：6g KH_2PO_4，sigma P5655；0.6 g $NaHCO_3$，sigma S5761；0.2 g Glucose，sigma G6152，溶解后调节 pH7.4 后，定容到 500 ml，0.22 微米的过滤器过滤分装，-20℃保存。

Western Blot 的结果如图 9 所示，表明上述三个 PTPA 的 shRNA 能下调 PTPA 的蛋白表达水平。

2、PTPA 干扰 shRNA 缓解天使综合症的运动表型

将 PTPA 的 sh4#序列与送于上海泰儿图生物科技有限公司构建 AAV 病毒，将序列插入到 p-CMV-bGlobin-Egfp-H1(上海泰儿图生物科技有限公司)载体中，获得血清型为 AAV9 型的空载体对照病毒与干扰 PTPA 的 shRNA 的病毒颗

粒。将构建好的两种病毒在出生第一天时利用 10 ul 微量进样器(上海高鸽)分别取 1 ul(1×10^{12}VG/ml)注射 WT 与 AS 小鼠的侧脑室。在四周后检测小鼠的转棒行为。该行为的操作步骤见实施例 6。

病毒注射后，小鼠的运动行为结果如图 10 所示，表明本发明中 PTPA 的干扰 shRNA 的病毒可以改善天使综合症小鼠的运动协调与学习能力。

行为实验结束后，按照 70mg/kg 的标准腹腔注射 0.7%的戊巴比妥钠；待其麻醉后，将小鼠四肢用注射器的针头固定在泡沫平板上，用手术剪刀打开小鼠的胸部，剪开左右肋弓后掀起，可以看到心脏。用剪刀剪开右心耳，可以看到血液流出，快速的将 20 ml 的生理盐水注射经左心室利用体液循环将血液冲出，此时可以看到肝脏变白。再用 20ml 的 4% 多聚甲醛(PFA)(4g 多聚甲醛，8g NaCl，0.2g KCl，3.58g $Na_2HPO_4\cdot12H_2O$，0.24g KH_2PO_4，双蒸水定容到 1000 ml)固定小鼠。固定后，取出小鼠的脑组织，放在 5ml 的 4%的 PFA 溶液中，放在 4℃过夜，进行后固定。第 2 天换成 15%蔗糖溶液(15g 蔗糖配制在 1×PBS 溶液中)重新放入 4℃进行脱水)，第 3 天换成 30%蔗糖溶液(30g 蔗糖配制在 1×PBS 溶液中，4℃过夜脱水。

将脱水完全的小鼠脑取出，于滤纸上吸干外周液体后，将小鼠脑沿中缝切开，将切开的切面作为底面，放在切片机自带的底座上，用 OCT 包埋，置于冰冻切片机箱中冷冻约 30 分钟。将冷冻好的脑连同底座，放置在冰冻切片机上(CM1950，Leica)，调节切片的厚度按钮，切出 30 微米的矢状脑片。将脑片收集在装有 PBS 的 12 孔盘中。

待全部脑片切完后，挑出 4 张脑片，本发明人将选出的脑片放在含有细胞核抗体 Hoechst(碧云天)的 PBS 中 15 分钟，进行染色。最后用 PBS 漂洗 2 次后，贴片，用 90%的甘油(90 ml 甘油，10 ml PBS)封片。然后，进行观察病毒感染的范围。由于所使用的病毒载体中带有 GFP 基因。因此，本发明人利用 GFP 的位置信息代表病毒的感染范围。同利用 Olympus VS120 高通量荧光成像显微镜，用 20×物镜进行拍摄。

侧脑室注射病毒后，其感染范围如图 11 所示，表明本发明中病毒的感染很广泛。

实施例 9、筛选方法

1、PP2A 为筛选靶点

设置：

测试组：HEK 293T 细胞(其中表达 PP2A)，并给予候选物质；

对照组：HEK 293T 细胞(其中表达 PP2A)，不给予候选物质。

分别检测测试组和对照组中 PP2A 的表达情况，并进行比较。如果测试组中 PP2A 的表达在统计学上低于（如低 30%或更低）对照组，就表明该候选物是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

2、PTPA 为筛选靶点

设置：

测试组：HEK 293T 细胞(其中表达 PTPA)，并给予候选物质；

对照组：HEK 293T 细胞(其中表达 PTPA)，不给予候选物质。

分别检测测试组和对照组中 PTPA 的表达情况，并进行比较。如果测试组中 PTPA 的表达在统计学上低于（如低 30%或更低）对照组，就表明该候选物是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

3、PP2A 为筛选靶点、PTPA、Ube3a 参与

设置：

测试组：HEK 293T 细胞(其中同时表达 Ube3a、PTPA、PP2A)，并给予候选物质；

对照组：HEK 293T 细胞(其中同时表达 Ube3a、PTPA、PP2A)，不给予候选物质。

分别检测测试组和对照组中 Ube3a、PP2A 的表达情况，并进行比较。如果测试组中 Ube3a 的表达在统计学上高于（如高 30%或更高）对照组，并伴随 PTPA 的降解以及 PP2A 的显著降低(如降低 30%或更低)，就表明该候选物是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

实施例 10、UBE3A 过表达后 PP2A 活性的检测

1、Ube3a 过表达载体的构建

Ube3a 片段的扩增：小鼠的 Ube3a 序列(NM_011668)，从 NCBI 上获取其编码序列，设计 PCR 引物，将其扩增，引物序列如下：

Ube3a-F：5’-atgaagcgagcagctgcaaagc-3’ (SEQ ID NO: 10)；

Ube3a-R：5’-ttacagcatgccaaatcctttggc-3’ (SEQ ID NO: 11)；

把引物信息交 Invitrogen 公司合成。将得到的引物加入 ddH_2O 溶解，浓度 10 uM。用 PCR 方法，利用小鼠的 cDNA 文库为模板，特异将 Ube3a 的 CDS 扩增，具体反应体系为：(1ul Ube3a-F，1ul Ube3a-R，10ul dNTP，1ul KOD，25ul 反应缓冲液，2ul cDNA 文库，最后用 ddH_2O 补齐到 50ul)，按照 KOD 酶(KFX-101)的反应特异与说明书扩增长度 2613bp 的片段。将得到的片段，再次用新的引物扩增，将其两端加入所连接载体的两端的序列，用于下面的重组连接。引物序列如下：

Ube3a-F-infusion：

5’-GAGCCCGGGCGGATCCatggccacagcttgtaaaagatc-3’ (SEQ ID NO: 12)；

Ube3a-R-infusion：

5’- GGTATCGATAAGCTTttacagcatgccaaatcctttggc-3’ (SEQ ID NO: 13)；

将第一次得到的 PCR 片段为模板，再次 PCR，之后与 BamHI 与 HindIII 酶切后的载体 pCAG-tag2B 空载体(购自 Stratagene 公司)，用重组酶(ClonExpress II One Step Cloning Kit，vazyme)在 37℃条件下重组 30min 后，将连接产物加入装有大肠杆菌 DH5α 感受态细胞的 1.5 ml 规格离心管使其混合，置于冰上 30min，然后放入 42℃水浴 90s，再放回冰上，-2 分钟后加入 800 μl 不含抗生素的培养基，置 37℃细菌培养箱中摇 1 小时。4500 转/分离心收集得到的细菌后涂固体 LB 培养基平板，37℃细菌培养箱过夜培养至长出菌落。

挑取单克隆置 1.5 ml 规格离心管进行培养，用 PCR 方法鉴定是否转化成功，鉴定所用的引物为：

pCAG-tag2B-F：5’-ggcaaagaagctagcg-3’ (SEQ ID NO: 14)；

pCAG-tag2B-R：5’-gggcgatcgagtgaattgtaatac-3’ (SEQ ID NO: 15)；

转化成功的取样送测序(华大基因有限公司提供测序服务)，测序使用的引物是：pCAG-tag2B-F：ggcaaagaagctagcg。取测序正确的细菌和 5 ml 添加抗生素的培养基加入 50 ml 规格离心管培养 8 小时，然后与 400 ml 添加了抗生素的培养基一起倒入 1000ml 规格的培养瓶中扩大培养，使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 大抽试剂盒(德国凯杰生物技术有限公司生产)抽提出质

粒，质粒抽提按 Plasmid Maxi Kit 说明书进行操作。

在 37℃ 5% CO_2的细胞培养箱中培养 HEK 293T 细胞(下简称 293T，购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)，培养基使用添加了 10%胎牛血清的 DMEM(美国纽约 Gibco 公司生产)培养基。传代培养 293T 细胞于直径为 6 cm 的培养皿中，当细胞长到汇合度为 70%左右，按 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen公司生产)说明书操作，准备好 6ug 上面得到的 pCAG-tag2B-Ube3a 质粒(或不含 Ube3a 的空载体质粒)的转染混合物。把混合物添加到细胞中进行转染，在培养 24 小时后收集，收集细胞，按照实施例 3 中的方法测定 PP2A 活性。

磷酸酶活性的结果如图 12，A-B 所示，表明 UBE3A 过表达的 HEK293T 细胞中，PP2A 活性发生显著性降低。

实施例 11、UBE3A 调节 MAPK 信号通路的活性

取出生后 30 天的小鼠，野生型（WT）和同窝的 AS 小鼠将其进行麻醉后，取脑组织进行 western blot 检测，具体方法同实施例 1。

而在 UBE3A 过表达的 HEK293T 中，ERK1/2 的磷酸化水平上调。

Western blot 的结果如图 13（A、B）所示，表明 UBE3A 缺失的 AS 小鼠中，ERK1/2 的磷酸化水平下降；UBE3A 过表达后,ERK1/2 的磷酸水平上升。两者呈现正相关。

实施例 12、PP2A 作为筛选靶点，ERK1/2 作为筛选的一个指标

利用免疫印迹的方法（前面已经详细介绍），在体外培养 10 天的神经元中，加入 PP2A 的抑制剂 Okadaic acid (OA, Cell signaling, #5934) (10nM, 2 个小时)或 CalyculinA（CYA）(Sigma, C5552) (10nM, 2 个小时)后，ERK1/2 的磷酸化增加，在加入 PP2A 的激动剂 FTY720(Sigma, SML0700)（10uM，8 小时）时，ERK1/2 的磷酸化下降。表明，可以通过 PP2A 的激动剂来改善 UBE3A 过表达而导致的孤独症。同时，FTY720 也可能成为治疗孤独症的一个潜在的药物。

具体的实验方法和步骤如下：

原代培养的大鼠皮层和海马神经元是取材自出生 24 小时以内的 Sprague-Dawley（SD）大鼠。具体步骤大致如下：提前将解剖器械浸泡在 75%

的酒精中，并在无菌操作台中紫外照射 30 分钟。将大鼠用 75%消毒酒精喷洒消毒，用剪刀和镊子将头皮和头盖骨小心撕开，剥离大脑后置于解剖液（Hank’s buffer; $NaHCO_3$ 0.35 g/L; HEPES 10 mM, pH 7.3; Glucose 33.3 mM）中。在解剖液中用剪刀和镊子将皮层与脑干、丘脑等其他结构的联系切断，在体视显微镜下将大脑半球的脑膜小心剥离。以眼科剪获取海马组织。分别将去除脑膜的皮层组织和海马组织剪碎，并以新鲜配置的木瓜蛋白酶在 37 摄氏度培养箱中消化 7 分钟，中途轻轻吹打一次，再次消化 7 分钟。消化结束后加入等体积的铺盘培养基（450 mL MEM，50 mL FBS，0.4% Glucose）终止消化，并用移液枪轻轻吹散组织块。将全部的溶液于 70 μm 孔径的滤网中过滤，以除去未被消化的组织块。过滤产物以 500 g 离心 5 分钟获取细胞，去除上清液。用培养基再次将细胞重悬，离心，去除上清液。将所得细胞用培养基重悬，以血球计数板计数并按照需求的密度铺于细胞的孔盘中。所有培养皿和玻片在使用前均用多聚赖氨酸（PDL）进行包被（玻片 0.1 mg/mL，培养皿 0.01 mg/mL）。将细胞放入 5% CO2，37 摄氏度的细胞培养箱中培养。2-4 小时后，将培养基换为 Nuerobasal 培养基培养。

解剖液：Hank’s buffer; $NaHCO_3$ 0.35 g/L; HEPES 10 mM, pH 7.3; Glucose 33.3 mM。

铺盘培养基：450 mL MEM，50 mL HBS，2 g Glucose。

Nuerobasal 培养基培养：500 mL Neurobasal A medium，5 mL B-27 supplement，5 mL GlutaMAX。

Okadaic acid 和 Calyculin A 溶解在 DMSO 中， FTY720 溶解在水中。

Western Blot 的结果如图 14 所示，表明 PP2A 的抑制剂可以增加 ERK1/2 的磷酸化水平，激活 MAPK 途径；PP2A 的激动剂 FTY720 可以抑制 ERK1/2 的磷酸化水平，抑制 MAPK 途径。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的抑制剂的用途，用于制备缓解或治疗天使综合症的药物组合物。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的抑制剂选自：

特异性抑制蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的小分子化合物；

特异性干扰蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的基因表达的干扰分子；

特异性敲除蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的基因编辑试剂；或

特异性与蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子结合的抗体或配体。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的抑制剂是特异性抑制蛋白磷酸酶 2A 活性的小分子化合物，其选自：抑制剂 LB-100。

4. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的抑制剂是特异性上调 Ube3a 蛋白的试剂，其通过上调 Ube3a 蛋白而降解磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子、进而抑制蛋白磷酸酶 2A。

5. 如权利要求 4 所述的用途，其特征在于，所述的特异性上调 Ube3a 蛋白的试剂为过表达 Ube3a 的表达构建物。

6. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的特异性干扰磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的基因表达的干扰分子是 shRNA。

7. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的 shRNA 靶向于： SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3；较佳地，所述的 shRNA 具有 SEQ ID NO: 4 的正义链和 SEQ ID NO: 5 的反义链，或具有 SEQ ID NO: 6 的正义链和 SEQ ID NO: 7 的反义链；或具有 SEQ ID NO: 8 的正义链和 SEQ ID NO: 9 的反义链。

8. 蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的用途，用于制备预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的药物组合物。

9. 蛋白磷酸酶 2A 或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的用途，用于筛选缓解或治疗天使综合症的药物。

10. 一种筛选缓解或治疗天使综合症的潜在物质的方法，所述方法包括：

(1) 用候选物质处理表达蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的体系；和

(2) 检测所述体系中蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性；

其中，若所述候选物质可降低蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性，则表明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，步骤(1)包括：在测试组中，将候选物质加入到表达蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的体系中；

步骤(2)包括：检测测试组的体系中蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性，并与对照组比较，其中所述的对照组是不添加所述候选物质的表达蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的体系；

如果测试组中蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的表达或活性在统计学上低于对照组，就表明该候选物是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述的体系中还表达 Ube3a 蛋白，所述方法还包括：检测所述体系中 Ube3a 蛋白的表达；

其中，若所述候选物质能够通过提高 Ube3a 的表达而抑制蛋白磷酸酶 2A 和/或磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子，则表明该候选物质是缓解或治疗天使综合症的潜在物质。

13. 特异性识别蛋白磷酸酶 2A 基因或蛋白的试剂的用途，用于制备进行天使综合症诊断或预后评估的试剂或试剂盒。

14. 如权利要求 13 所述的用途，其特征在于，所述的特异性识别蛋白磷酸酶 2A 基因或蛋白的试剂选自：

特异性扩增蛋白磷酸酶 2A 基因的引物；

特异性识别蛋白磷酸酶 2A 基因的探针；或

特异性结合蛋白磷酸酶 2A 的抗体或配体。

15. 特异性识别磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因或蛋白的试剂的用途，用于制备进行天使综合症诊断或预后评估的试剂或试剂盒。

16. 如权利要求 15 所述的用途，其特征在于，所述的特异性识别磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因或蛋白的试剂选自：

特异性扩增磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因的引物；

特异性识别磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子基因的探针；或

特异性结合磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子的抗体或配体。

17. 一种物质的用途，其特征在于，用于制备预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的组合物或制剂，其中，所述物质选自下组：(a) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂、(b) PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂、(c) PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂、或其组合。

18. 一种药物组合物，其特征在于，包括：

(a1) 用于预防和/或治疗孤独症或其相关疾病的第一活性成分，所述第一活性成分选自下组：(i) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂、(ii) PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂、(iii) PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂、或其组合；和

(b) 药学上可接受的载体。

19. 一种药盒，其特征在于，包括：

(i) 第一容器，以及位于该第一容器中的活性成分(a1) Ube3a 基因或其蛋白的抑制剂；PP2A 基因、或其蛋白或其促进剂；PTPA 基因、或其蛋白或其促进剂；或其组合，或含有活性成分(a1)的药物。

20. 一种筛选孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂的方法，其特征在于，包括：

(a) 在测试组中，在培养体系中，在测试化合物的存在下，培养表达 *Ube3a* 基因的细胞一段时间 T1，检测测试组所述培养体系中的 *Ube3a* 基因的表达量 E1；

并且在不存在所述测试化合物且其他条件相同的对照组中，检测对照组所述培养体系中 *Ube3a* 基因的表达量 E2；和

(b)对 E1 和 E2 进行比较，如果 E1 显著低于 E2，则表示所述测试化合物是孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂。

21. 一种筛选孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂的方法，其特征在于，包括：

(a) 在测试组中，在培养体系中，在测试化合物的存在下，培养表达 *PP2A*、和/或 *PTPA* 基因的细胞一段时间 T1，检测测试组所述培养体系中的 *PP2A*、和/或 *PTPA* 基因的表达量 E1；

并且在不存在所述测试化合物且其他条件相同的对照组中，检测对照组所述培养体系中 *PP2A*、和/或 *PTPA* 基因的表达量 E2；和

(b)对 E1 和 E2 进行比较，如果 E1 显著高于 E2，则表示所述测试化合物是孤独症或其相关疾病的潜在治疗剂。

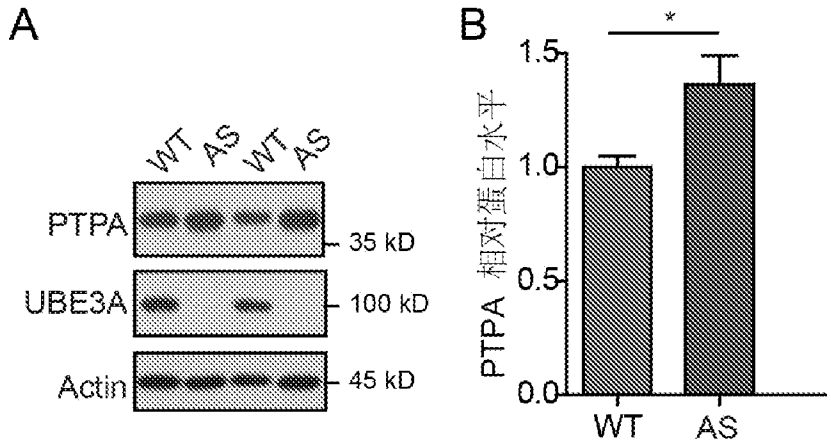

A
WT
AS
WT
AS
PTPA
35 kD
UBE3A
100 kD
Actin
45 kD
B
*
1.5
1.0
0.5
0.0
PTPA 相对蛋白水平
WT
AS

图 1

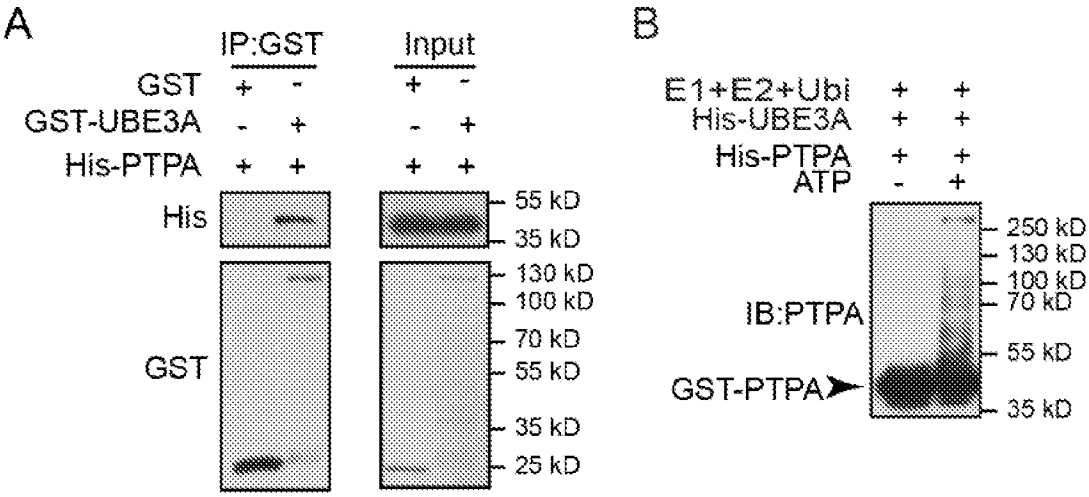

A
IP:GST
Input
GST + - + -
GST-UBE3A - + - +
His-PTPA + + + +
His
GST
55 kD
35 kD
130 kD
100 kD
70 kD
55 kD
35 kD
25 kD
B
E1+E2+Ubi + +
His-UBE3A + +
His-PTPA + +
ATP - +
IB:PTPA
GST-PTPA
250 kD
130 kD
100 kD
70 kD
55 kD
35 kD

图 2

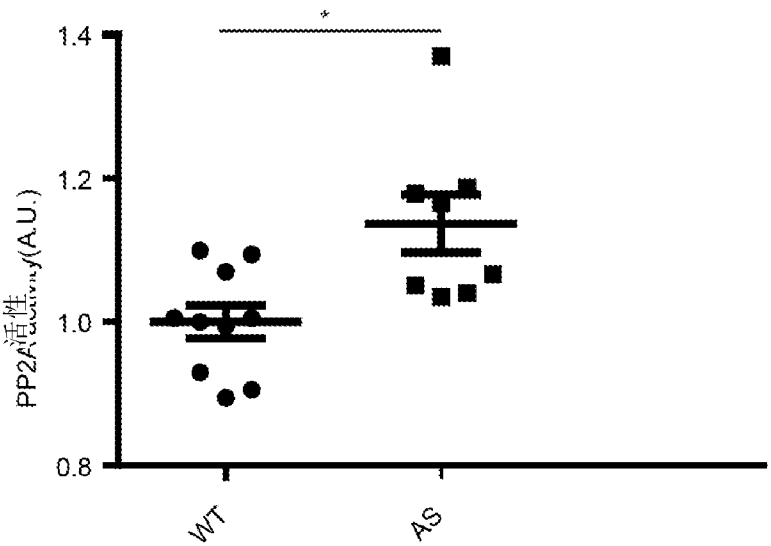

*
1.4
1.2
1.0
0.8
PP2A活性(A.U.)
WT
AS

图 3

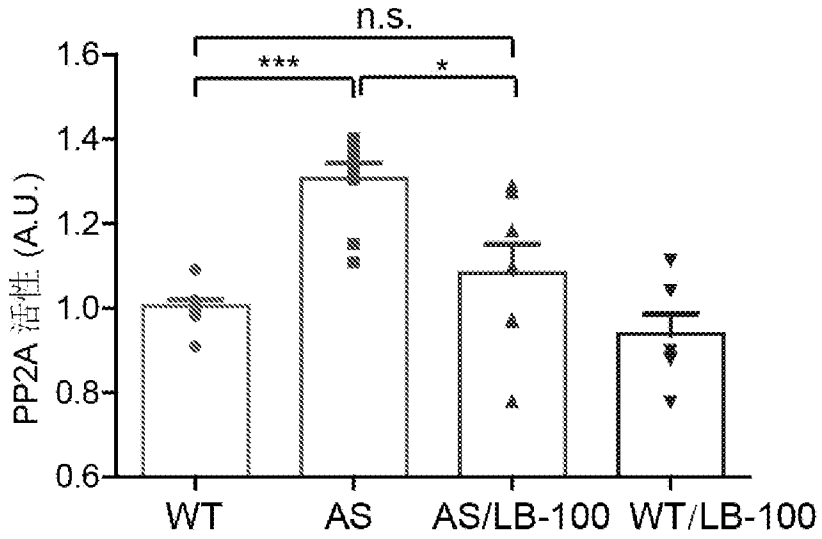

n.s.
***
*
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
PP2A 活性 (A.U.)
WT
AS
AS/LB-100
WT/LB-100

图 4

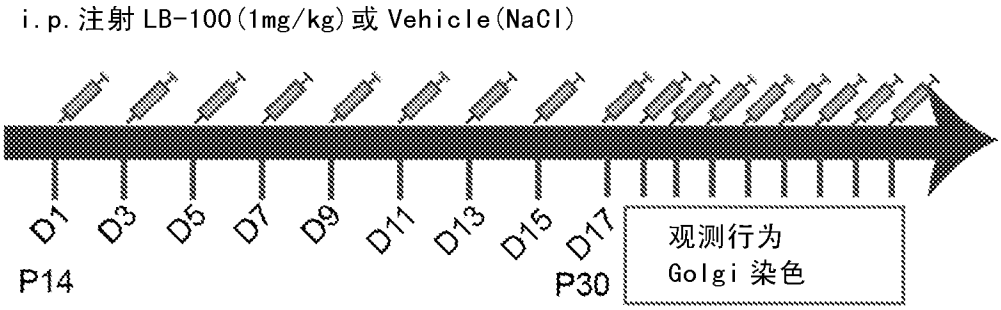

i.p.注射 LB-100(1mg/kg)或 Vehicle(NaCl)
D1
D3
D5
D7
D9
D11
D13
D15
D17
P14
P30
观测行为
Golgi 染色

图 5

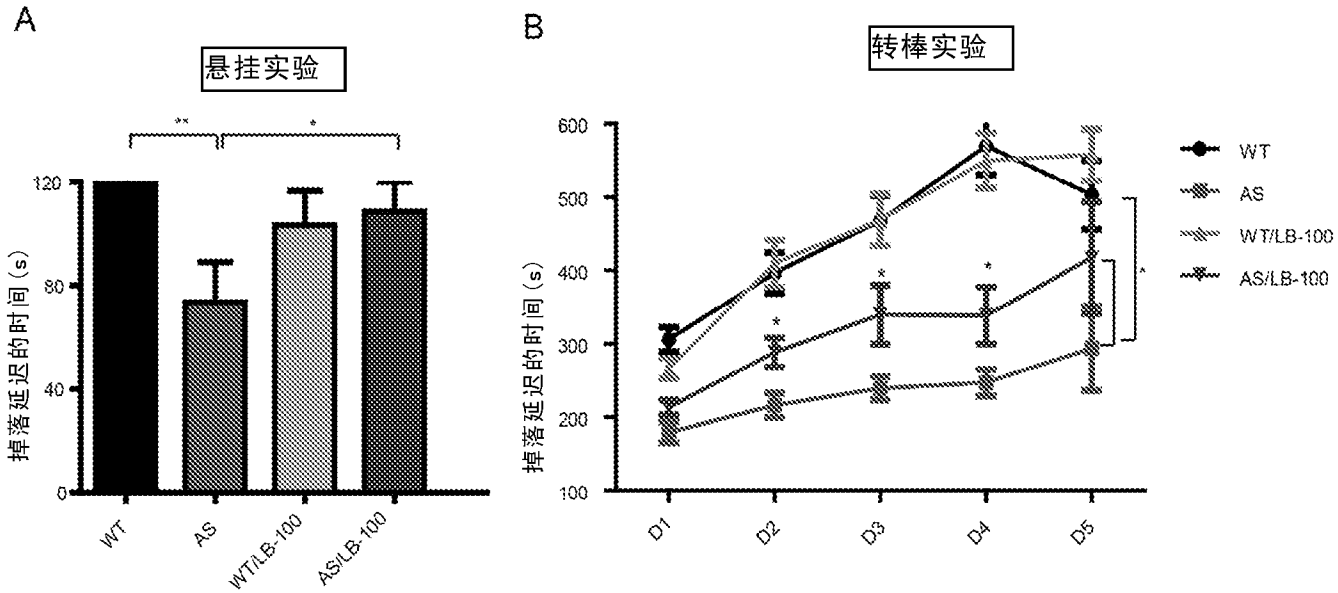

A
悬挂实验
**
*
120
80
40
0
掉落延迟的时间(s)
WT
AS
WT/LB-100
AS/LB-100
B
转棒实验
600
500
400
300
200
100
掉落延迟的时间(s)
D1
D2
D3
D4
D5
WT
AS
WT/LB-100
AS/LB-100

图 6

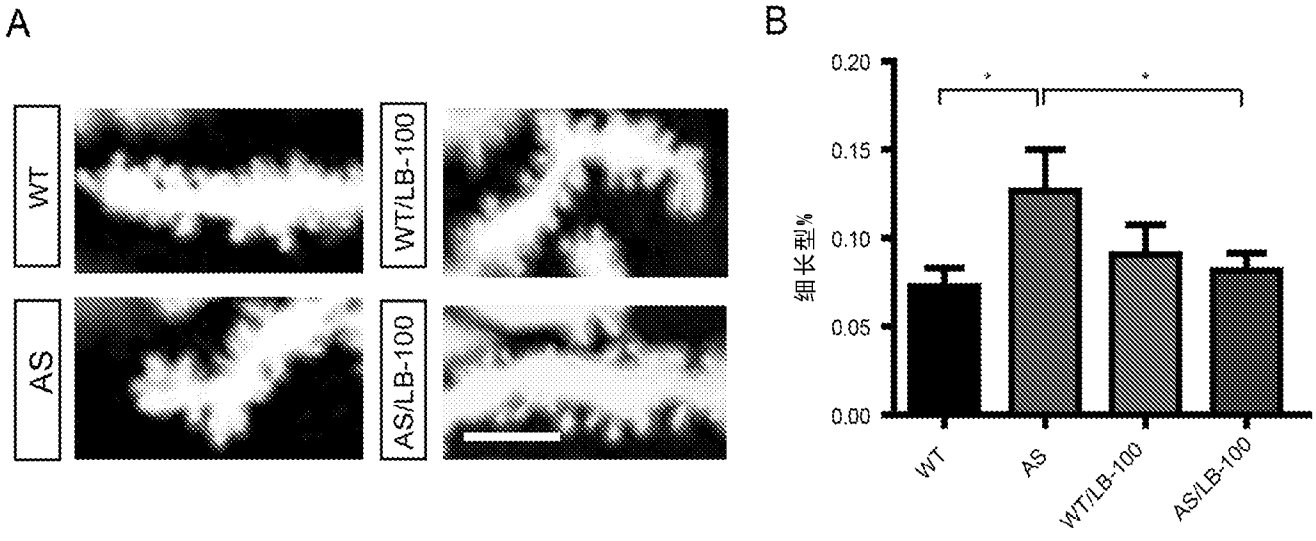

A
WT
WT/LB-100
AS
AS/LB-100
B
细长型%
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
WT
AS
WT/LB-100
AS/LB-100

图 7

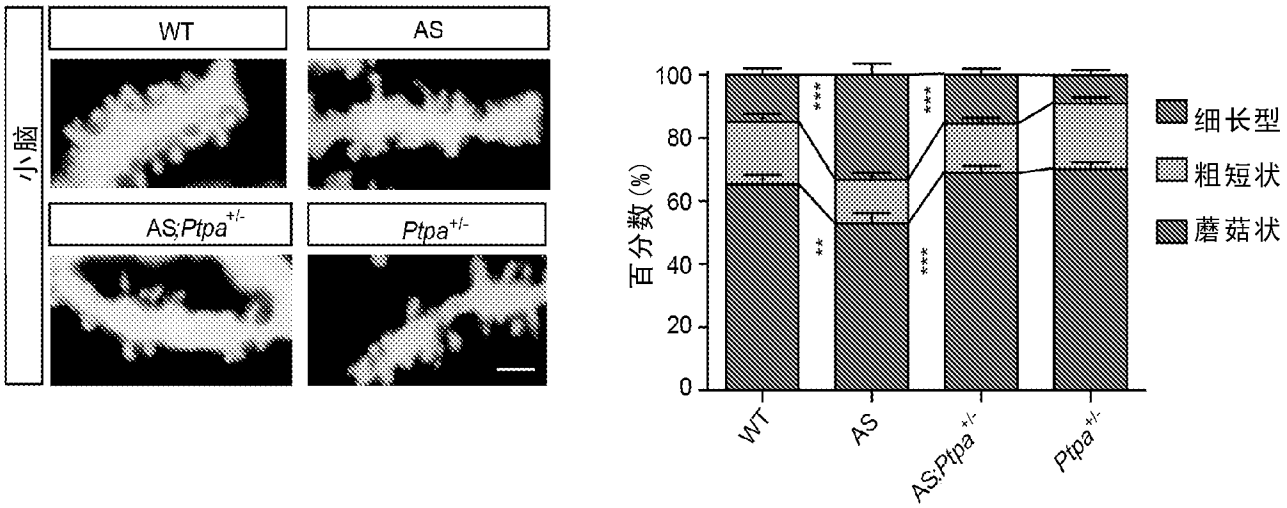

小脑
WT
AS
AS;Ptpa+/-
Ptpa+/-
百分数(%)
100
80
60
40
20
0
细长型
粗短状
蘑菇状
WT
AS
AS;Ptpa+/-
Ptpa+/-

图 8

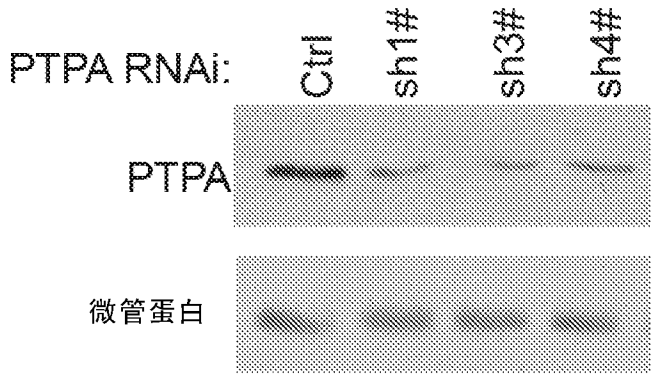

PTPA RNAi:
Ctrl
sh1#
sh3#
sh4#
PTPA
微管蛋白

图 9

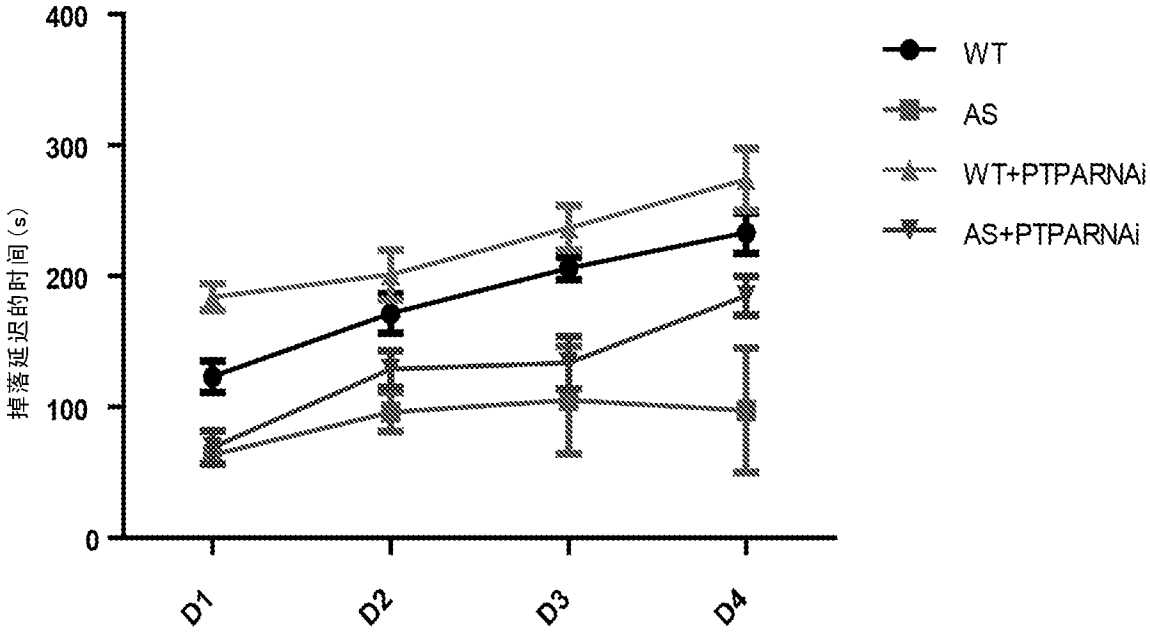

400
300
200
100
0
掉落延迟的时间（s）
D1
D2
D3
D4
WT
AS
WT+PTPARNAi
AS+PTPARNAi

图 10

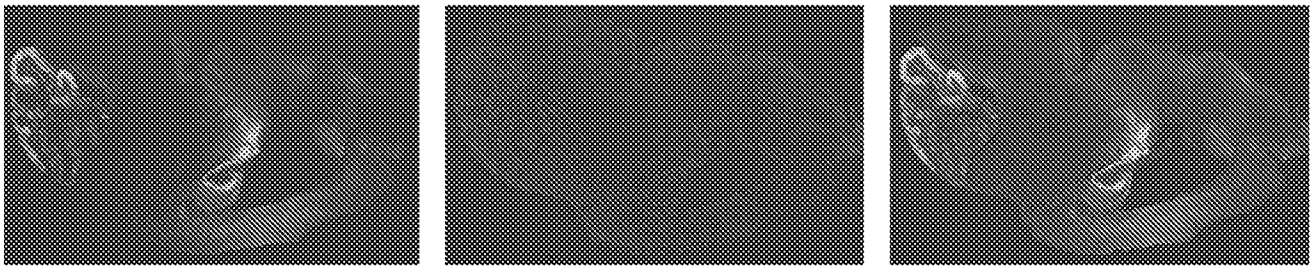


图 11

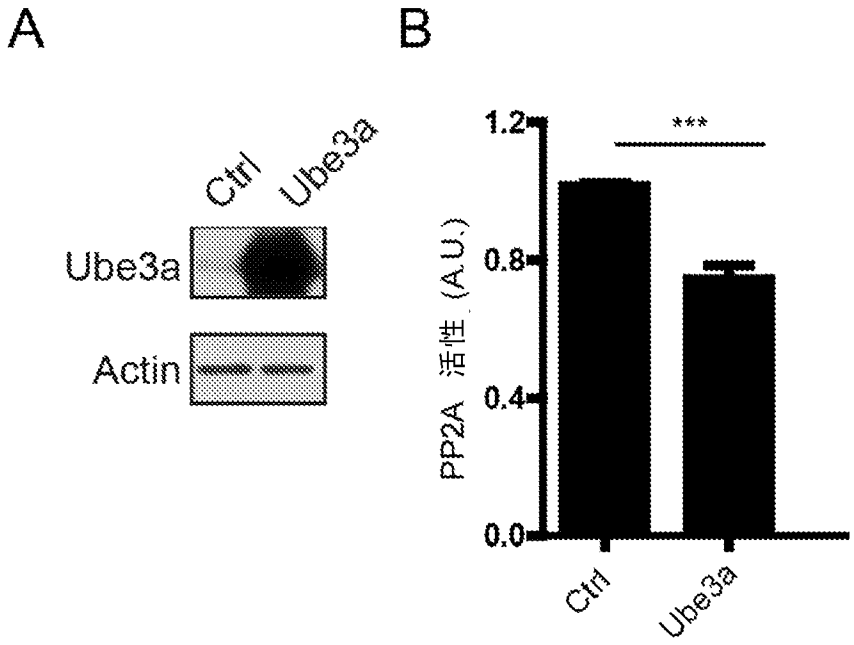

A
B
Ctrl
Ube3a
Ube3a
Actin
PP2A 活性（A.U.）
1.2
0.8
0.4
0.0
***
Ctrl
Ube3a

图 12

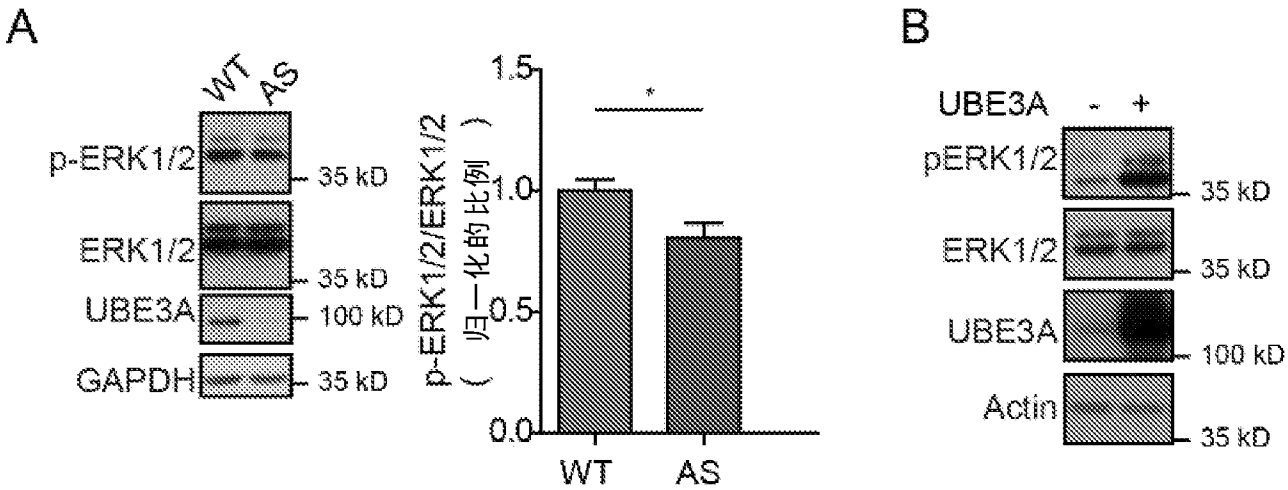

A
WT
AS
p-ERK1/2
35 kD
ERK1/2
35 kD
UBE3A
100 kD
GAPDH
35 kD
p-ERK1/2/ERK1/2（归一化的比例）
1.5
1.0
0.5
0.0
*
WT
AS
B
UBE3A - +
pERK1/2
35 kD
ERK1/2
35 kD
UBE3A
100 kD
Actin
35 kD

图 13

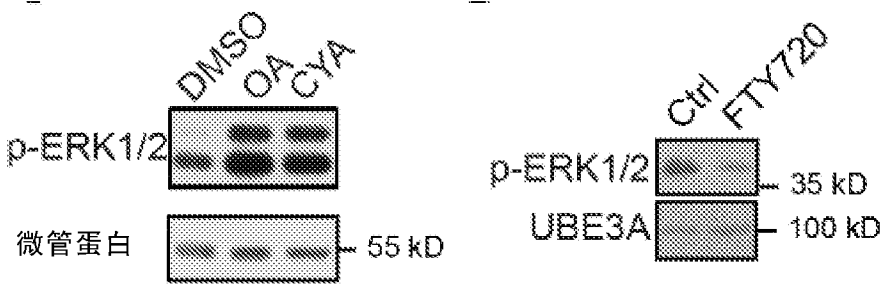

DMSO
OA
CYA
p-ERK1/2
微管蛋白
55 kD
Ctrl
FTY720
p-ERK1/2
35 kD
UBE3A
100 kD

图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/070997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; C12Q 1/42(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)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)

A61K,A61P,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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, NCBI, EMBL, STN: Ube3a, ubiquitin-protein ligase E3A, E6AP, PP2A, 蛋白磷酸酶2A, protein phosphatase 2A, LB-100, PTPA, 磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子, phosphotyrosine phosphatase activating factor, FTY720, fingolimod, 芬戈莫德, C2 ceramide, 天使综合症, 愉快木偶综合征, 天使综合征, 安吉尔曼综合征, Angelman syndrome, Angelman综合症, Angelman综合征, 孤独症, 自闭症, 孤独性障碍, autism, autism spectrum disorders, ASD, 自闭症谱系障碍, 序列1-9

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014066082 A1 (HAAS, A. L. et al.) 01 May 2014 (2014-05-01) page 3, paragraph 2, and page 12, paragraphs 2 and 3	17-20
Y	WO 2014066082 A1 (HAAS, A. L. et al.) 01 May 2014 (2014-05-01) page 3, paragraph 2, and page 12, paragraphs 2 and 3	17-19
X	WU, H. W. et al. "Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism" *Life Sciences*, Vol. 173, 01 February 2017 (2017-02-01), pages 43-54	17-19
Y	WU, H. W. et al. "Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism" *Life Sciences*, Vol. 173, 01 February 2017 (2017-02-01), pages 43-54	17-19

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 March 2020	**09 April 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/070997

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEEBER, E. J. et al. "Derangements of Hippocampal Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in a Mouse Model for Angelman Mental Retardation Syndrome" *The Journal of Neuroscience,* Vol. 23, No. 7, 01 April 2003 (2003-04-01), pages 2634-2644	1-5, 9-14
Y	WEEBER, E. J. et al. "Derangements of Hippocampal Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in a Mouse Model for Angelman Mental Retardation Syndrome" *The Journal of Neuroscience,* Vol. 23, No. 7, 01 April 2003 (2003-04-01), pages 2634-2644	1, 2, 6, 7, 9-12, 15, 16
X	REYNHOUT, S. et al. "De Novo Mutations Affecting the Catalytic Cα Subunit of PP2A, PPP2CA, Cause Syndromic Intellectual Disability Resembling Other PP2A-Related Neurodevelopmental Disorders" *The American Journal of Human Genetics,* Vol. 104, 03 January 2019 (2019-01-03), pages 139-156	8, 17-19, 21
Y	REYNHOUT, S. et al. "De Novo Mutations Affecting the Catalytic Cα Subunit of PP2A, PPP2CA, Cause Syndromic Intellectual Disability Resembling Other PP2A-Related Neurodevelopmental Disorders" *The American Journal of Human Genetics,* Vol. no. 104, 03 January 2019 (2019-01-03), pages 139-156	1, 2, 6, 7, 9-12, 15-19
X	EP 2724721 A1 (KONSTANTIN, M.) 30 April 2014 (2014-04-30) Claims 1-6	17-20
X	徐祥清等 (XU, Xiangqing et al.). "孤独症谱系障碍的药物治疗研究进展 (Non-official translation: Research Progress in Medicinal Treatment of Autism Spectrum Disorders)" *药学学报 (Acta Pharmaceutica Sinica),* Vol. 53, No. 3, 31 December 2018 (2018-12-31), pages 321-327	17-19
PX	CN 110237257 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 September 2019 (2019-09-17) claims 1-21	1-21
A	WO 2014172490 A1 (TUFTS UNIVERSITY et al.) 23 October 2014 (2014-10-23) entire document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/070997

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2014066082	A1	01 May 2014	US	9328341	B2	03 May 2016
				US	2016201049	A1	14 July 2016
				US	9725708	B2	08 August 2017
				US	2015210998	A1	30 July 2015
EP	2724721	A1	30 April 2014		None		
CN	110237257	A	17 September 2019		None		
WO	2014172490	A1	23 October 2014		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/070997

A. 主题的分类

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; C12Q 1/42(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K,A61P,C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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）)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: Ube3a, ubiquitin-protein ligase E3A, E6AP, PP2A, 蛋白磷酸酶2A, protein phosphatase 2A, LB-100, PTPA, 磷酸酪氨酸磷酸酶活化因子, phosphotyrosine phosphatase activating factor, FTY720, fingolimod, 芬戈莫德, C2 ceramide, 天使综合症, 愉快木偶综合征, 天使综合征, 安吉尔曼综合征, Angelman syndrome, Angelman综合症, Angelman综合征, 孤独症, 自闭症, 孤独性障碍, autism, autism spectrum disorders, ASD, 自闭症谱系障碍, 序列1-9

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2014066082 A1 (HAAS, A.L.等) 2014年 5月 1日 (2014-05-01) 第3页第2段，第12页第2-3段	17-20
Y	WO 2014066082 A1 (HAAS, A.L.等) 2014年 5月 1日 (2014-05-01) 第3页第2段，第12页第2-3段	17-19
X	Wu, H.M.等. "Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism" Life Sciences, 第173卷, 2017年 2月 1日 (2017-02-01), 第43-54页	17-19
Y	Wu, H.M.等. "Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism" Life Sciences, 第173卷, 2017年 2月 1日 (2017-02-01), 第43-54页	17-19

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"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）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"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
"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
"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
"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
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 3月 18日	2020年 4月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 张蕾 电话号码 86-(10)-53962037

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/070997

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Weeber, E.J.等. "Derangements of Hippocampal Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in a Mouse Model for Angelman Mental Retardation Syndrome" The Journal of Neuroscience, 第23卷, 第7期, 2003年 4月 1日 (2003-04-01), 第2634-2644页	1-5, 9-14
Y	Weeber, E.J.等. "Derangements of Hippocampal Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in a Mouse Model for Angelman Mental Retardation Syndrome" The Journal of Neuroscience, 第23卷, 第7期, 2003年 4月 1日 (2003-04-01), 第2634-2644页	1-2, 6-7, 9-12, 15-16
X	REYNHOUT, S.等. "De Novo Mutations Affecting the Catalytic Cα Subunit of PP2A, PPP2CA, Cause Syndromic Intellectual Disability Resembling Other PP2A-Related Neurodevelopmental Disorders" The American Journal of Human Genetics, 第104卷, 2019年 1月 3日 (2019-01-03), 第139-156页	8, 17-19, 21
Y	REYNHOUT, S.等. "De Novo Mutations Affecting the Catalytic Cα Subunit of PP2A, PPP2CA, Cause Syndromic Intellectual Disability Resembling Other PP2A-Related Neurodevelopmental Disorders" The American Journal of Human Genetics, 第104卷, 2019年 1月 3日 (2019-01-03), 第139-156页	1-2, 6-7, 9-12, 15-19
X	EP 2724721 A1 (KONSTANTIN, M.) 2014年 4月 30日 (2014-04-30) 权利要求1-6	17-20
X	徐祥清等. "孤独症谱系障碍的药物治疗研究进展" 药学学报, 第53卷, 第3期, 2018年 12月 31日 (2018-12-31), 第321-327页	17-19
PX	CN 110237257 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2019年 9月 17日 (2019-09-17) 权利要求1-21	1-21
A	WO 2014172490 A1 (TUFTS UNIVERSITY等) 2014年 10月 23日 (2014-10-23) 全文	1-21

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/070997

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)
WO	2014066082	A1	2014年 5月 1日	US	9328341	B2	2016年 5月 3日
				US	2016201049	A1	2016年 7月 14日
				US	9725708	B2	2017年 8月 8日
				US	2015210998	A1	2015年 7月 30日
EP	2724721	A1	2014年 4月 30日		无		
CN	110237257	A	2019年 9月 17日		无		
WO	2014172490	A1	2014年 10月 23日		无		