



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115475247 B

(45) 授权公告日 2024.02.20

(21) 申请号 202110665803.9

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.16

C12N 15/113 (2010.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115475247 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2022.12.16

CN 101091795 A, 2007.12.26

CN 101678126 A, 2010.03.24

(73) 专利权人 厦门大学

CN 109738654 A, 2019.05.10

CN 112004945 A, 2020.11.27

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路422号

EP 1741781 A2, 2007.01.10

IN 2923CHENP2008 A, 2009.03.06

(72) 发明人 王鑫 高月 赵依妮 郑秋阳

WO 2017/127537 A1, 2017.07.27

郑爽 郎茂菊

Roberto Dominici 等. Comparison of  $\beta$  2-microglobulin serum level between Alzheimer's patients, cognitive healthy and mild cognitive impaired individuals. Biomarkers. 2018, 第23卷(第6期), 603-608.

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA. 2021, NCBI reference sequence: NM\_004048.4.

专利代理师 刘海罗

审查员 武文聪

(51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

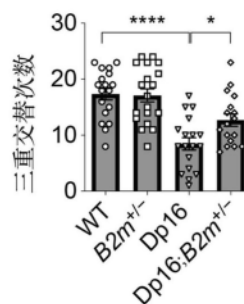
序列表5页 附图22页

(54) 发明名称

$\beta$  2-微球蛋白或其抑制剂的制药用途

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域, 涉及  $\beta$  2-微球蛋白或其抑制剂的制药用途。具体地, 本发明涉及  $\beta$  2-微球蛋白或其抑制剂在制备治疗和/或预防唐氏综合征或阿尔茨海默病的药物中的用途。 $\beta$  2-微球蛋白可作为防治唐氏综合征或阿尔茨海默病的有效药物靶点。



1. 抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的药物在制备治疗唐氏综合征或阿尔茨海默病的药物中的用途；

其中,所述抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的药物为反义寡核苷酸,并且所述反义寡核苷酸的序列如SEQ ID NO:6所示。

## β2-微球蛋白或其抑制剂的制药用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及β2-微球蛋白或其抑制剂的制药用途。

### 背景技术

[0002] 唐氏综合征(Down's Syndrome, DS), 又称21-三体综合征, 是先天性智力障碍的最常见原因, 患者表现出发育迟缓、学习障碍等, 每800个新生儿中约有一个罹患DS。唐氏综合征致病原因是由于唐氏患者的细胞中多了一条或者部分21号染色体, 从而干扰了细胞的正常生理功能。唐氏患者表现出多种疾病症状, 包括智力障碍、语言延迟、免疫和内分泌系统异常, 以及骨骼、心脏和消化系统的缺陷。21-三体导致的发育迟缓和智力障碍是影响唐氏患儿生活质量的一个重要原因, 随着年龄的增长, 学龄期唐氏患儿的认知问题会更加突出。此外, 所有唐氏患者在40岁后均会发展出类似阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的神经病理特征, 其中60%的患者在65岁会表现出明显的AD样痴呆症状。

[0003] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 是发生于老年人最常见的中枢神经系统退行性疾病之一, 临床上以进行性记忆丧失、认知障碍及行为异常为特征, 典型的病理学特征为由淀粉样蛋白(β-amyloid, Aβ)形成的淀粉样斑块(Amyloid plaque)和由高度磷酸化tau蛋白聚集形成的神经纤维缠结(Neurofibrillary tangle, NFT)。随着社会人口老龄化加剧, AD患病率呈逐渐上升趋势: 在年龄为65-74岁的人群中, AD的发病率约为5%, 而在85岁以上的人群中, AD的发病率约为50%。目前中国60岁以上人群的痴呆症总体患病率约为5.3%, 60岁以上痴呆症患者总数约为1000-1500万人, 其中60%为阿尔茨海默病, AD给患者本身和家庭带来了很大的痛苦和经济负担, 也给经济社会发展带来了巨大的挑战。

[0004] 常规应用于其它神经退行性疾病例如帕金森病等的药物对阿尔茨海默病和唐氏综合征无效。因此, 目前对于阿尔茨海默病和唐氏综合征非常缺乏具有治疗、预防或缓解作用的药物。

[0005] β2-微球蛋白(β2-microglobulin, B2M) 是主要组织相容性复合体I(Major histocompatibility complex I, MHC I)的组成亚基, 由人的15号染色体基因编码, 包含119个氨基酸。此外, B2M也可以游离形式而非MHC I复合体的形式存在, 随着MHC I在细胞膜表面不断的内吞循环, B2M可从细胞膜表面脱落进入血液系统。然而, 在一些病理因素作用下, B2M会发生聚集、沉积。B2M淀粉样沉积主要存在于骨关节区域, 并最终导致严重的关节炎、骨折及腕管综合征。另外, 在很多疾病状态下, 血清和血浆中B2M的含量均有增加, 并且越来越多的证据表明它是许多传染性、自身免疫性和肿瘤性中枢神经系统(Central nervous system, CNS)疾病中有用的炎症生物标志物。

[0006] 老年人和衰老小鼠血浆中B2M水平显著升高, 脑立体定位注射B2M会抑制神经元再生并损伤小鼠认知功能, 而B2m缺失可以促进神经元再生、逆转衰老相关的认知功能缺陷。此外, 唐氏患者血浆中B2M水平显著升高。然而, 外周血中升高的B2M是否参与调控唐氏的认知障碍则未见研究报道。

[0007] 因此, 尚需要开发新的防治唐氏综合征或阿尔茨海默病的技术手段。

## 发明内容

[0008] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,惊奇地发现,B2M在DS与AD发生发展过程中的作用,发现靶向B2M的药物(例如,反义寡核苷酸、抗体、RNAi等)具有作为防治AD或DS特别是AD或DS所致认知损伤的药物的潜力。由此提供了下述发明:

[0009] 本发明的一个方面涉及选自如下的(1) — (6)项中的任意一项在制备治疗和/或预防唐氏综合征或阿尔茨海默病特别是AD或DS所致认知损伤的药物中的用途:

[0010] (1)  $\beta$ 2-微球蛋白;

[0011] (2)  $\beta$ 2-微球蛋白基因的编码区或 $\beta$ 2-微球蛋白基因的非编码区;

[0012] (3) 核酸构建体,其含有用于完全敲除或者部分敲除 $\beta$ 2-微球蛋白基因的多核苷酸;优选地,所述多核苷酸为反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA、或者为用于CRISPR/Cas9系统的guide RNA;

[0013] (4) 宿主细胞,其中的编码 $\beta$ 2-微球蛋白的多核苷酸被完全敲除或部分敲除;优选地,其含有第(3)项所述的核酸构建体;

[0014] (5) 抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物;

[0015] (6) 抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的药物。

[0016] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物为抗 $\beta$ 2-微球蛋白的抗体(例如美国Abcam公司货号为ab214769或ab175031的抗体);优选地,所述抗体为单克隆抗体。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的药物选自反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA,以及用于CRISPR-Cas9系统的guide RNA;优选地,所述反义寡核苷酸的序列如SEQ ID NOs:6-14中的任一序列所示。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述 $\beta$ 2-微球蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0019] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述 $\beta$ 2-微球蛋白基因的编码区的序列如SEQ ID NO:4所示。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述 $\beta$ 2-微球蛋白基因的非编码区的序列如SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:5所示。

[0021] 本发明首次发现并阐明唐氏患者和唐氏小鼠模型Dp16脑组织和血浆中B2M表达显著升高,并且尾静脉注射B2M可以损伤野生型小鼠的认知和突触功能。此外,敲除B2m可以逆转唐氏小鼠模型Dp16的认知和突触功能缺陷。另外,本发明人发现阿尔茨海默病小鼠模型(5 $\times$ FAD)脑中B2M表达呈年龄依赖性增加,B2M结合并促进淀粉样蛋白A $\beta$ 寡聚化,过表达B2M可以增加5 $\times$ FAD小鼠脑内淀粉样斑沉积,而敲除B2m则可以显著减少5 $\times$ FAD小鼠脑内淀粉样斑沉积,逆转5 $\times$ FAD小鼠突触功能和认知功能缺陷。本发现为阿尔茨海默病和唐氏综合征的临床治疗提供了一个潜在的药物靶点。

[0022] 不拘于理论的限制,本发明人认为在正常生理状态下,身体内的B2M含量并不影响正常的认知功能。然而在某些因素刺激下,B2M的表达量异常增加,当超出身体清除能力和耐受水平时,B2M即会对认知功能造成不良影响。因此,在B2M异常增加时减少体内的B2M能够对认知起到一定的保护作用。

[0023] 不拘于理论的限制,本发明人发现,本发明对DS或AD的治疗机制并不通过影响神

神经元新生,而是通过影响谷氨酸受体从而增强突触功能。

[0024] 本发明的另一方面涉及选自如下的(1) — (6)项中的任意一项在制备筛选用于治疗 and/or 预防唐氏综合征或阿尔茨海默病特别是AD或DS所致认知损伤的药物的动物模型或者细胞模型中的用途:

[0025] (1)  $\beta$ 2-微球蛋白;

[0026] (2)  $\beta$ 2-微球蛋白基因的编码区或 $\beta$ 2-微球蛋白基因的非编码区;

[0027] (3) 核酸构建体,其含有用于完全敲除或者部分敲除 $\beta$ 2-微球蛋白基因的多核苷酸;优选地,所述多核苷酸为反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA、或者为用于CRISPR/Cas9系统的guide RNA;

[0028] (4) 宿主细胞,其中的编码 $\beta$ 2-微球蛋白的多核苷酸被完全敲除或部分敲除;优选地,其含有第(3)项所述的核酸构建体;

[0029] (5) 抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物;

[0030] (6) 抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白的基因表达水平的药物。

[0031] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物为抗 $\beta$ 2-微球蛋白的抗体(例如美国Abcam公司货号为ab214769或ab175031的抗体);优选地,所述抗体为单克隆抗体。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白的基因表达水平的药物选自反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA,以及用于CRISPR-Cas9系统的guide RNA;优选地,所述反义寡核苷酸的序列如SEQ ID NOs:6-14中的任一序列所示。

[0033] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述 $\beta$ 2-微球蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0034] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述 $\beta$ 2-微球蛋白基因的编码区的序列如SEQ ID NO:4所示。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述的用途,其中,所述 $\beta$ 2-微球蛋白基因的非编码区的序列如SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:5所示。

[0036] 本发明的再一方面涉及一种筛选用于治疗 and/or 预防唐氏综合征或阿尔茨海默病特别是AD或DS所致认知损伤的药物的方法,包括给予细胞或者动物以待测药物,以及检测 $\beta$ 2-微球蛋白活性或者检测 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的步骤;

[0037] 优选地,如果相对于给药之前或者不给药的对照, $\beta$ 2-微球蛋白活性降低或者 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平降低,初步判断待测药物为有效候选药物;

[0038] 优选地,所述细胞为唐氏综合征或阿尔茨海默病的模型细胞;

[0039] 优选地,所述动物为唐氏综合征或阿尔茨海默病的模型动物。

[0040] 如果该待测药物能够抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白的基因表达水平,或者抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性水平,则可以作为候选药物。例如:

[0041] 在本发明的一个实施方案中,将待测药物加入到分离的哺乳动物例如人或小鼠的细胞中,以不加待测药物的细胞作为对照。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,将待测药物施与哺乳动物例如人或小鼠,观察或者检测目标症状或者指标是否有改善。

[0043] 本发明的再一方面涉及一种治疗和/or 预防唐氏综合征或阿尔茨海默病特别是AD

或DS所致认知损伤的方法,包括给予有需求的受试者或者细胞以有效量的包选自如下的①—③项中的任一项的步骤:

[0044] ①抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白的基因表达的药物;

[0045] ②抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物;

[0046] ③对 $\beta$ 2-微球蛋白的基因进行完全敲除或者部分敲除的药物。

[0047] 在本发明的一些实施方案中,所述的方法,其中,所述抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物为抗 $\beta$ 2-微球蛋白的抗体;优选地,所述抗体为单克隆抗体。

[0048] 在本发明的一些实施方案中,所述的方法,其中,所述对 $\beta$ 2-微球蛋白的基因进行完全敲除或者部分敲除的药物用于完全敲除或者部分敲除 $\beta$ 2-微球蛋白的基因的多核苷酸;优选地,所述多核苷酸为反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA、或者为用于CRISPR/Cas9系统的guide RNA;优选地,所述反义寡核苷酸的序列如SEQ ID NOs:6-14中的任一序列所示。

[0049] 抑制受试者的 $\beta$ 2-微球蛋白活性的水平或者下调受试者的 $\beta$ 2-微球蛋白的基因表达的水平,取决于许多因素,例如所治疗病况的严重程度,患者或动物的性别、年龄、体重及个体反应,以及待治疗患者的病况和既往病史来选定。本领域通常的做法是,从低于为得到所需治疗效果和/或预防效果而要求的水平开始,逐渐增加剂量,直到得到所需的效果。

[0050] 本发明还涉及选自如下的(1) — (6)项中的任意一项,其用于治疗 and/或预防唐氏综合征或阿尔茨海默病特别是AD或DS所致认知损伤:

[0051] (1)  $\beta$ 2-微球蛋白;

[0052] (2)  $\beta$ 2-微球蛋白基因的编码区或 $\beta$ 2-微球蛋白基因的非编码区;

[0053] (3) 核酸构建体,其含有用于完全敲除或者部分敲除 $\beta$ 2-微球蛋白基因的多核苷酸;优选地,所述多核苷酸为反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA、或者为用于CRISPR/Cas9系统的guide RNA;

[0054] (4) 宿主细胞,其中的编码 $\beta$ 2-微球蛋白的多核苷酸被完全敲除或部分敲除;优选地,其含有第(3)项所述的核酸构建体;

[0055] (5) 抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物;

[0056] (6) 抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的药物。

[0057] 本发明还涉及选自如下的(1) — (6)项中的任意一项,其用于筛选用于治疗 and/或预防唐氏综合征或阿尔茨海默病特别是AD或DS所致认知损伤的药物:

[0058] (1)  $\beta$ 2-微球蛋白;

[0059] (2)  $\beta$ 2-微球蛋白基因的编码区或 $\beta$ 2-微球蛋白基因的非编码区;

[0060] (3) 核酸构建体,其含有用于完全敲除或者部分敲除 $\beta$ 2-微球蛋白基因的多核苷酸;优选地,所述多核苷酸为反义寡核苷酸、siRNA例如shRNA、或者为用于CRISPR/Cas9系统的guide RNA;

[0061] (4) 宿主细胞,其中的编码 $\beta$ 2-微球蛋白的多核苷酸被完全敲除或部分敲除;优选地,其含有第(3)项所述的核酸构建体;

[0062] (5) 抑制或阻断 $\beta$ 2-微球蛋白活性的药物;

[0063] (6) 抑制或降低 $\beta$ 2-微球蛋白基因表达水平的药物。

[0064] 在本发明中,当提及 $\beta$ 2-微球蛋白(B2M)的氨基酸序列时,其包括 $\beta$ 2-微球蛋白的全长,还包括其融合蛋白。然而,本领域技术人员理解,在 $\beta$ 2-微球蛋白的氨基酸序列中,可天

然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。在本发明的一个实施方案中, $\beta$ 2-微球蛋白为人 $\beta$ 2-微球蛋白。在本发明的一个实施方案中, $\beta$ 2-微球蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0065] 人B2M蛋白的氨基酸序列(N端至C端)如下:

[0066] MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSPDIEVDLLKNGERIEK  
VEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:1)

[0067] 在本发明的一些实施方式中, $\beta$ 2-微球蛋白基因的序列如SEQ ID NO:2所示。

**1 attcctgaag ctgacagcat teggccgag atgtctcgct cctggcctt agctgtgctc**  
**61 gegtactct cttttctgg cctggagget atccagegta ctccaaagat tcaggtttac**  
**121 tcagtcate cagcagagaa tggaaagtea aatttctga attgctatgt gtctgggttt**  
**181 catccatccg acattgaagt tgacttactg aagaatggag agagaattga aaaagtgagg**  
**241 cattcagact tgttcttcag caaggactgg tctttctatc tcttgtaacta cactgaattc**  
**301 acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagecc**  
**361 aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca**  
**421 tttggattgg atgaattcca aattctgctt gcttctttt taatattgat atgcttatac**  
**481 acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt ataataatgt taacatggac atgatcttct**  
**541 ttataattct actttgagtg ctgtctccat gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca**  
**601 ggtagctcta ggagggtctgg caacttagag gtggggagca gagaattctc ttatccaaca**  
**661 tcaacatctt ggtagatatt gaactcttca atctcttgc ctaaaagctt gtttaagatag**  
**721 ttaagegtgc ataagttaac ttccaattta catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt**  
**781 tagaaatata attgacagga ttattggaaa tttgttataa tgaatgaaac atttgtcat**  
**841 ataagattca tatttacttc ttatacattt gataaagtaa ggcattggtt tggttaatct**  
**901 ggtttatttt tgttcacaa gttaaataaa tcataaaaact tga (SEQ ID NO: 2)**

[0068]

[0069] 其中,第1-30位核苷酸为5'非编码区序列(SEQ ID NO:3,对应于5'-UTR),第31-390位核苷酸为B2M编码区序列(SEQ ID NO:4下划线标出),第391-943位核苷酸为3'非编码区序列(SEQ ID NO:5,对应于3'-UTR)。

[0070] 术语“核酸构建体”,在文中定义为单链或双链核酸分子,优选是指人工构建的核酸分子。可选地,所述核酸构建体还包含有可操作地连接的1个或多个调控序列。

[0071] 在本发明中,术语“可操作地连接”是指两个或多个核苷酸区域或核酸序列的功能性的空间排列。所述“可操作地连接”可以通过基因重组的手段实现。

[0072] 在本发明中,术语“宿主细胞”指的是导入载体的细胞,包括如下许多细胞类型,如大肠杆菌或枯草菌等原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等昆虫细胞,或者如纤维原细胞、CHO细胞、COS细胞、NS0细胞、HeLa细胞、BHK细胞、HEK293细胞,或动物细胞例如人细胞。

[0073] 在本发明中,术语“载体”指的是,可将抑制某蛋白的多核苷酸插入其中的一种核

酸运载工具。举例来说,载体包括:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 $\lambda$ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可能含有多种控制表达的元件。

[0074] 本发明中,对于DNA或RNA的敲低包括但不限于,完全敲除和部分敲除。完全敲除是指将目标DNA或目标RNA的水平或其表达的蛋白的水平降低至几乎检测不到的水平(事实上,一般而言,很难将目标DNA或目标RNA 100%地敲除掉)。部分敲除是指敲除的程度大于零,小于完全敲除的情况。

[0075] 术语“有效量”,当对象为个体时,是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的剂量。当对象为细胞时,是指产生目标效果或者发挥目标作用的剂量,例如细胞中的加药量为 $1\mu\text{M}$ — $100\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ — $50\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ — $30\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ — $25\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ — $20\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ — $15\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ — $10\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ — $25\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ — $15\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $4\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $6\mu\text{M}$ 、 $7\mu\text{M}$ 、 $8\mu\text{M}$ 、 $9\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $11\mu\text{M}$ 、 $12\mu\text{M}$ 、 $13\mu\text{M}$ 、 $14\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 或 $100\mu\text{M}$ ,或者 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 等。

[0076] 术语“疾病和/或病症”是指所述受试者的一种身体状态,该身体状态与本发明所述疾病和/或病症有关。

[0077] 术语“受试者”可以指患者或者其它接受本发明药物组合物以治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,例如人、狗、猴、牛、马等。

[0078] 本发明中,如果没有特别说明,浓度单位 $\mu\text{M}$ 表示 $\mu\text{mol}/\text{L}$ , $\text{mM}$ 表示 $\text{mmol}/\text{L}$ , $\text{nM}$ 表示 $\text{nmol}/\text{L}$ 。

[0079] 本发明中,提到细胞中的加药量时,如果没有特别说明,一般是指加药后药物的终浓度。

[0080] 发明的有益效果

[0081] 本发明提供了新的预防、治疗或改善阿尔茨海默病和唐氏综合征,特别是预防、治疗或改善阿尔茨海默病或唐氏综合征导致的认知功能受损的药物靶点。抑制或阻断 $\beta 2$ -微球蛋白活性,或者抑制或降低 $\beta 2$ -微球蛋白基因表达水平能够有效地防治AD或DS特别是AD或DS认知损伤。

## 附图说明

[0082] 图1A-图1B:唐氏病人和唐氏小鼠脑组织和血浆中B2M表达升高的示意图。其中:

[0083] 图1A:免疫印迹检测唐氏综合征患者和正常人血浆中B2M的表达,N(Normal)代表正常对照,D(Down's Syndrome)代表唐氏患者,立春红染色蛋白条带作为内参。

[0084] 图1B:图1A的灰度分析结果,同一家族成员配对分析, $n(\text{Normal})=6$ , $n(\text{DS})=6$ ;数据代表平均值 $\pm$ 标准误;数据采用paired t test进行统计分析;\* $P<0.05$ \*\* $P<0.01$ 。

[0085] 图2A-图2D:唐氏小鼠脑组织和血浆中B2M表达升高的示意图。其中:

[0086] 图2A:免疫印迹检测Dp16小鼠海马组织中B2M和APP表达。

[0087] 图2B:图2A的灰度分析结果, $n=6$ 。数据采用unpaired t test进行统计分析。\* $P<0.05$ \*\* $P<0.01$ \*\*\* $P<0.001$ 。

[0088] 图2C:免疫印迹检测Ts65Dn小鼠血浆中B2M的表达,立春红染色蛋白条带作为内



参。

[0089] 图2D:图2C的灰度分析结果, $n=6$ 。数据代表平均值 $\pm$ 标准误。数据采用unpaired t test进行统计分析。 $*P<0.05$ ; $**P<0.01$ ; $***P<0.001$ 。

[0090] 图3A-图3H:过表达B2M损伤小鼠认知功能和突触可塑性的示意图。其中:图3D-图3F数据采用unpaired t test进行统计分析;图3G-图3H数据采用repeated measures ANOVA进行统计分析。 $*P<0.05$ ; $**P<0.01$ 。其中:

[0091] 图3A:C57BL/6J小鼠尾静脉注射B2M蛋白实验流程图,每次注射 $4\mu\text{g}$  B2M蛋白,连续注射三天,休息一天,总共注射6轮,共24天。注射后进行Morris水迷宫测试以及脑片长时程增强(Long-term potentiation,LTP)记录。

[0092] 图3B:Morris水迷宫训练期间小鼠到达平台的潜伏期。

[0093] 图3C:Morris水迷宫空间探索实验游泳轨迹图。图3C中的上图代表PBS组小鼠在平台测试时的游泳轨迹图,图3C中的下图代表B2M组小鼠在平台测试时的游泳轨迹图。

[0094] 图3D:Morris水迷宫平台测试时,小鼠第一次到达平台的潜伏期。

[0095] 图3E:Morris水迷宫平台测试时,小鼠在平台所在区域的穿梭次数。

[0096] 图3F:Morris水迷宫平台测试时,小鼠在平台所在区域的游泳时间。

[0097] 图3G:LTP记录结果。 $n(\text{PBS})=11$ , $n(\text{B2M})=10$ 。

[0098] 图3H:C57BL/6J小鼠分别脑立体定位单次注射ACSF和B2M蛋白( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,双侧注射, $1\mu\text{l}$ 每侧),注射5天后,进行LTP记录。 $n=10$ 。数据代表平均值 $\pm$ 标准误。

[0099] 图4A-图4F:敲除B2m改善Dp16小鼠认知功能的示意图。其中:

[0100] 图4A:旷场实验,WT、B2m<sup>+/-</sup>、Dp16、Dp16;B2m<sup>+/-</sup>在旷场中的运动总距离。

[0101] 图4B:T迷宫实验,小鼠在T迷宫三个臂的交替次数。

[0102] 图4C:Morris水迷宫训练期间,小鼠到达平台的潜伏期。

[0103] 图4D:Morris水迷宫平台测试期,小鼠第一次到达平台的潜伏期。

[0104] 图4E:Morris水迷宫平台测试期,小鼠在平台所在区域的游泳时间。

[0105] 图4F:Morris水迷宫测试过程中,小鼠游泳的平均速度。 $n(\text{WT})=19$ 、 $n(\text{B2m}^{+/-})=19$ 、 $n(\text{Dp16})=17$ 、 $n(\text{Dp16};\text{B2m}^{+/-})=19$ 。数据代表平均值 $\pm$ 标准误。数据采用one-way ANOVA进行统计分析。 $*P<0.05$ ; $**P<0.01$ ; $***P<0.001$ ; $****P<0.0001$ 。

[0106] 图5A-图5E:敲除B2m改善Dp16小鼠突触功能的示意图。其中:

[0107] 图5A:记录WT、B2m<sup>+/-</sup>、Dp16、Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠海马谢弗侧枝-CA1的LTP,图5A中上面的曲线代表LTP的基线和高频刺激后轨迹图。图5A中下面的曲线为LTP记录结果。

[0108] 图5B:统计LTP最后10分钟fEPSP slope。 $n(\text{WT})=10$ 、 $n(\text{B2m}^{+/-})=9$ 、 $n(\text{Dp16})=9$ 、 $n(\text{Dp16};\text{B2m}^{+/-})=8$ 。

[0109] 图5C:E/I比值。 $n(\text{WT})=26$ 、 $n(\text{Dp16})=32$ 、 $n(\text{Dp16};\text{B2m}^{+/-})=34$ 。

[0110] 图5D:高尔基染色:WT小鼠、B2m<sup>+/-</sup>小鼠、Dp16小鼠、Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠海马CA1区树突棘代表图。图中标尺为 $5\mu\text{m}$ 。

[0111] 图5E:图5D树突棘数量统计图:树突棘数量分别为 $n(\text{WT})=98$ 、 $n(\text{B2m}^{+/-})=125$ 、 $n(\text{Dp16})=95$ 、 $n(\text{Dp16};\text{B2m}^{+/-})=97$ 。数据代表平均值 $\pm$ 标准误。数据采用one-way ANOVA进行统计分析。 $*P<0.05$ ; $**P<0.01$ ; $****P<0.0001$ 。

[0112] 图6A-图6C:AD小鼠脑内B2M呈年龄依赖性增加并定位于A $\beta$ 淀粉样斑的示意图。其

中:

[0113] 图6A:3、6、9、12、15月龄WT和5×FAD小鼠大脑皮层组织中B2M表达免疫印迹分析结果。

[0114] 图6B:Image J分析图6A中B2M表达水平,每组n=5只小鼠。数据采用Mann-Whitney test进行统计分析.ns,无显著性差异, $P>0.05$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

[0115] 图6C:通过脑立体定位注射向2月龄5×FAD小鼠大脑海马内注射2 $\mu$ l过表达B2M-HA的腺相关病毒(AAV),单次注射4个月后用5%水合氯醛麻醉小鼠,使用磷酸盐缓冲液进行心脏灌注,取脑组织,于4%多聚甲醛固定过夜,经25%和30%蔗糖溶液脱水,使用OCT进行脑组织包埋,冰冻切片后,进行免疫荧光染色,染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)标记细胞核、抗体6E10标记A $\beta$ 以及小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞,通过激光共聚焦荧光显微镜采集图像。标尺,100 $\mu$ m。数据代表平均值 $\pm$ 标准误。

[0116] 图7A-图7E:过表达B2M增加AD小鼠脑内A $\beta$ 淀粉样斑沉积的示意图。其中,图7A-图7C为6月龄5×FAD小鼠脑立体定位注射AAV-B2M及对照病毒后的免疫荧光染色结果,染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)标记细胞核、抗体6E10标记A $\beta$ 以及小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞,通过激光共聚焦荧光显微镜采集图像。其中:

[0117] 图7A:5×FAD小鼠脑组织淀粉样斑免疫荧光染色结果。每组n=5-6只小鼠。

[0118] 图7B:图7A中海马DG区A $\beta$ 淀粉样斑数量(Number of A $\beta$ depositis)统计结果。数据采用Mann-Whitney test进行统计分析.ns,无显著性差异, $P>0.05$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

[0119] 图7C:图7A中海马DG区A $\beta$ 淀粉样斑面积(Total area)统计结果。数据采用Mann-Whitney test进行统计分析.ns,无显著性差异, $P>0.05$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

[0120] 图7D:5×FAD小鼠海马组织可溶性A $\beta$ (A $\beta_{1-42}$  in TBS)的ELISA分析结果。每组n=5-6只小鼠。数据采用Mann-Whitney test进行统计分析.ns,无显著性差异, $P>0.05$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

[0121] 图7E:5×FAD小鼠海马组织不溶性A $\beta$ (A $\beta_{1-42}$  in GDN-HCl)的ELISA分析结果。每组n=5-6只小鼠。数据代表平均值 $\pm$ 标准误。数据采用Mann-Whitney test进行统计分析.ns,无显著性差异, $P>0.05$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

[0122] 图8A-图8D:敲除B2m增强AD小鼠认知功能的示意图。其中,图8A-图8C是6-7月龄WT、B2m<sup>+/-</sup>、5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠Morris水迷宫(MWM)行为学结果。其中,图8B和图8C数据采用one-way ANOVA进行统计分析,图8D数据采用Mann-Whitney test进行统计分析.ns,无显著性差异, $P>0.05$ ; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; \*\*\*\* $P<0.0001$ 。其中:

[0123] 图8A:Morris水迷宫(MWM)训练期小鼠到达平台的潜伏期(Latency to target)。

[0124] 图8B:Morris水迷宫平台测试期小鼠第一次到达平台所在区域的潜伏时间(Time to quadrant)。每组n=19-22只小鼠。

[0125] 图8C:Morris水迷宫平台测试期小鼠在平台区穿梭次数分析结果(Quadrant cross number)。每组n=19-22只小鼠。

[0126] 图8D:条件惊恐(FC)场景相关记忆测试中小鼠僵直行为时间百分比分析结果

(Freezing%)。每组n=9-11只小鼠。数据代表平均值±标准误。

[0127] 图9A-图9D:敲除B2m逆转AD小鼠突触功能障碍的示意图。其中,图9A和图9B是6-7月龄WT、B2m<sup>+/-</sup>、5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑片CA1区LTP记录分析结果。其中,图9B和图9D数据采用one-way ANOVA进行统计分析。ns,无显著性差异,P>0.05;\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001;\*\*\*\*P<0.0001。其中:

[0128] 图9A:小鼠脑片CA1区LTP记录结果。每组n=4只小鼠,每组记录脑片数n=8。

[0129] 图9B:图9A中LTP记录结果最后10分钟fEPSP振幅统计分析结果。每组n=4只小鼠,每组记录脑片数n=8。

[0130] 图9C:6-7月龄小鼠海马组织高尔基染色代表图。

[0131] 图9D:图9C中神经元树突棘密度分析结果。标尺,10μm。每组n=4只小鼠,26-44根树突。数据代表平均值±标准误。

[0132] 图10A-图10G:敲除B2m减少AD小鼠脑内Aβ淀粉样斑沉积和斑块周围小胶质细胞数目的示意图。其中,图10B、图10C、图10D和图10F数据采用Mann-Whitney test进行统计分析。ns,无显著性差异,P>0.05;\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001。其中:

[0133] 图10A:6月龄5×FAD、5×FAD;B2m<sup>-/-</sup>小鼠脑内海马DG区沉积的Aβ淀粉样斑免疫荧光染色结果。染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)标记细胞核、抗体6E10标记Aβ以及小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞。标尺,10μm。每组n=5-6只小鼠。

[0134] 图10B:图10A中海马DG区Aβ淀粉样斑数量统计分析结果。

[0135] 图10C:图A中海马DG区Aβ淀粉样斑面积的统计分析结果。

[0136] 图10D:6月龄5×FAD、5×FAD;B2m<sup>-/-</sup>小鼠脑内海马组织不溶性Aβ(Aβ<sub>1-42</sub> in GDN-HCl)的ELISA分析结果。每组n=5-6只小鼠。

[0137] 图10E:6月龄5×FAD、5×FAD;B2m<sup>-/-</sup>小鼠海马DG区淀粉样斑周围小胶质细胞免疫荧光染色代表图,抗体6E10标记Aβ、小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞。标尺,100μm。每组n=5-6只小鼠。

[0138] 图10F:图10E中Aβ淀粉样斑周围小胶质细胞数目的统计分析结果。Aβ淀粉样斑直径介于3-8μm,n(5×FAD)=96,n(5×FAD;B2m<sup>-/-</sup>)=52。

[0139] 图10G:透射电子显微镜(TEM)分析B2M蛋白孵育对Aβ<sub>1-42</sub>寡聚化的影响。标尺,100μm。数据代表平均值±标准误。

[0140] 图11A-图11E:靶向人B2M反义寡核苷酸的敲低效率示意图。其中,图11C、图11E数据采用ANOVA进行统计分析。ns,无显著性差异,P>0.05;\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001;\*\*\*\*P<0.0001。其中:

[0141] 图11A:针对人B2M mRNA序列设计的ASO 1-9位点示意图,B2M mRNA全长943bp,每条ASO序列20-21bp。

[0142] 图11B:用合成的ASO 1-6和对照ASO-CON转染293T细胞,感染48小时后收细胞,通过免疫印迹检测B2M蛋白水平。每组n=3。

[0143] 图11C:Image J分析图11B中B2M表达水平。每组n=3。

[0144] 图11D:用合成的ASO 7-9和对照ASO-CON转染293T细胞,感染48小时后收细胞,通过免疫印迹检测B2M蛋白水平。每组n=3。

[0145] 图11E:Image J分析图11D中B2M表达水平。每组n=3。

### 具体实施方式

[0146] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0147] 实施例1: B2M在唐氏患者血浆中表达量增加

[0148] 将采集的6个家庭的唐氏儿童和其正常兄弟姐妹的血浆样品(具有知情同意书并且已经通过伦理审查),分别稀释20倍,取10 $\mu$ l样品进行免疫印迹检测B2M表达水平,立春红染色蛋白条带作为内参。如图1A和图1B所示,B2M蛋白在唐氏患者血浆样品中显著高于正常人。提示B2M在唐氏血浆中表达水平显著增加。

[0149] 综上,B2M蛋白在唐氏患者血浆中表达水平增加。

[0150] 实施例2: B2M在唐氏小鼠血浆和脑组织中表达量增加

[0151] 检测5-6月龄的野生型(Wild-type, WT)小鼠(C57BL6小鼠购自厦门大学实验动物中心)和5-6月龄的唐氏综合征模型小鼠Dp16(美国The Jackson Laboratory,货号013530)海马组织和血浆中B2M的表达水平。采用5%水合氯醛麻醉小鼠,心脏取血,然后使用磷酸盐缓冲液进行灌注,取脑组织。将分离的海马组织匀浆,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10分钟,取上清液,取30 $\mu$ g蛋白样品进行免疫印迹检测B2M表达水平,APP为阳性对照, $\beta$ -actin为内参基因。如图2A和图2B所示,Dp16小鼠海马组织中B2M水平显著高于WT小鼠。

[0152] 将收集到的血液样品,4 $^{\circ}$ C,1000g离心10分钟,取上清液即为血浆。将血浆样品分别稀释20倍,取10 $\mu$ l进行免疫印迹检测B2M表达水平,立春红染色蛋白条带作为内参。如图2C和图2D所示,Dp16小鼠血浆中B2M水平显著高于WT小鼠。

[0153] 综上,表明B2M蛋白在唐氏小鼠血浆和脑组织中表达水平增加。

[0154] 实施例3: 过表达B2M损伤小鼠的认知功能和突触可塑性

[0155] 如图3A所示,2月龄WT小鼠,尾静脉每次注射4 $\mu$ g B2M蛋白或对照200 $\mu$ l PBS,连续注射三天,休息一天,注射6轮,共24天。注射后进行Morris水迷宫测试以及脑片LTP记录。进行行为学测试开始前三天接触抚摸小鼠,每天一次,轻柔地抓住鼠尾拿起小鼠,让小鼠在手上停留30秒;实验当天,在实验前先将实验的小鼠转移到准备间,让小鼠适应30分钟。动物行为学实验于每天9:00a.m.-6:00p.m.之间进行,实验室内的光强度为650lux。采用Smart Video Tracking Software(Panlab,Harvard Apparatus)进行数据采集及分析处理。

[0156] Morris水迷宫测试(Morris water maze test)在一个圆形的水箱(直径120厘米)中进行,水箱中注水的高度以超过平台1厘米为宜,水箱内水的温度设定为22 $^{\circ}$ C。迷宫臂内四个方向分别贴有四个不同形状的图标作为空间定位参照物。在训练实验中,平台在水面下1厘米,然后将小鼠从迷宫的两个入水点放入,让小鼠搜索平台60秒,以小鼠停留在平台上10秒为实验停止的标准。如果小鼠在60秒内寻找不到平台,将其引导到平台所在位置,并让其在平台上面停留10秒。每只小鼠每天测试2次,分别随机选择两个不同的方位入水,每只小鼠两次实验的间隔时间至少要1小时。记录小鼠每次实验找到平台的潜伏时间(Latency to target)。连续进行4天的学习训练。第5天撤掉平台,进行平台测试,将小鼠从

平台对角线的位置鼠放入水中,让其在水迷宫中自由搜索60秒,记录小鼠第一次到达平台的时间(Latency to target)、在平台的穿梭次数(Target crossings)以及所在区域停留时间的百分比(%Time in zone)。

[0157] 如图3B所示,注射B2M与对照的两组小鼠(每组n=13只小鼠)未表现出明显差异。如图3C和图3D所示平台测试中,与对照组小鼠相比较,注射B2M组小鼠第一次到达平台的时间显著增加。如图3E所示,平台测试中,与对照组小鼠相比较,注射B2M组小鼠在平台的穿梭次数显著减少。如图3F所示,平台测试中,与对照组小鼠相比较,注射B2M组小鼠在平台停留时间显著减少。表明增加B2M会显著减弱小鼠的认知功能。

[0158] 注射B2M与对照的两组小鼠行为学实验结束后,进行脑片电生理记录。小鼠经麻醉后,快速取出脑组织置于冰冷且通氧的人工脑脊液(ACSF)中冷却,随后转至振荡切片机进行冠状切片,脑片厚度为400 $\mu$ m。将脑片置于32 $^{\circ}$ C氧饱和的ACSF中孵育1小时,之后转移至室温孵育1小时,将记录电极放置在Schaffer collateral-commissural通路的CA1区辐射层,刺激电极放置在CA3区。刺激强度为兴奋性突触后场电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)最大值的30%,fEPSP基线稳定记录20分钟后,高频刺激(High-frequency stimulation, HFS)诱导LTP(2串刺激,每串刺激包含100个刺激脉冲,每串刺激间隔30秒),持续记录60分钟。

[0159] 如图3G所示,相对于对照组小鼠,注射B2M小鼠海马CA3区至CA1区Schaffer collateral-commissural通路的LTP显著受损,由此表明,增加B2M显著损伤WT小鼠的突触功能。

[0160] B2M蛋白/生理盐水注射:2-3月龄小鼠称重后5%水合氯醛麻醉,WT小鼠8 $\mu$ l/g,麻醉消毒后剪开小鼠头皮,通过前囟和后囟定位双侧CA1(A/P:-2.3mm,M/L:-2mm,D/V:-1.8mm),注射B2M蛋白,浓度1 $\mu$ g/ $\mu$ l,双侧CA1脑区各注射1 $\mu$ l/次,注射速度为0.2 $\mu$ l/min,留针5分钟。注射后小鼠头部再次消毒,术后放置电热毯,待小鼠清醒后放回饲养笼。5天后进行脑片电生理记录。小鼠经麻醉后,快速取出脑组织置于冰冷且通氧的人工脑脊液(ACSF)中冷却,随后转至振荡切片机进行冠状切片,脑片厚度为400 $\mu$ m。将脑片置于32 $^{\circ}$ C氧饱和的ACSF中孵育1小时,之后转移至室温孵育1小时,将记录电极放置在Schaffer collateral-commissural通路的CA1区辐射层,刺激电极放置在CA3区。刺激强度为兴奋性突触后场电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)最大值的30%,fEPSP基线稳定记录20分钟后,高频刺激(HFS)诱导LTP(2串刺激,每串刺激包含100个刺激脉冲,每串刺激间隔30秒),持续记录60分钟。

[0161] 如图3H所示,相对于对照组小鼠,注射B2M小鼠海马CA3区至CA1区Schaffer collateral-commissural通路的LTP显著受损,显示增加B2M显著损伤WT小鼠的突触功能。

[0162] 综上,提示增加B2M损伤WT小鼠的认知功能和突触可塑性。

[0163] 实施例4:敲除B2m改善Dp16小鼠认知功能

[0164] B2m基因敲除小鼠B2m<sup>+/-</sup>(美国The Jackson Laboratory,货号002087)与唐氏综合征模型小鼠Dp16(美国The Jackson Laboratory,货号013530)交配得到Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠,然后将5至6月龄的WT、B2m<sup>+/-</sup>、Dp16以及Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠,进行学习记忆相关行为学测试,包括旷场、Y-迷宫和Morris水迷宫测试。在实验开始前三天接触抚摸小鼠,每天一次,轻柔地抓住鼠尾拿起小鼠,让小鼠在手上停留30秒;实验当天,在实验前先将实验的小鼠转移到准

备间,让小鼠适应30分钟。动物行为学实验于每天9:00a.m.-6:00p.m.之间进行,实验室内  
的光强度为650lux。采用Smart Video Tracking Software(美国Harvard Apparatus公司)  
进行数据采集及分析处理。

[0165] 旷场实验用于研究小鼠的自主运动能力。旷场实验中,将小鼠放置于迷宫箱体  
(40cm(L) × 40cm(W) × 40cm(H))的中心位置,让小鼠在迷宫里自由探索10分钟,记录小鼠在  
旷场中总的运动距离(Total distance)。如图4A所示,WT、B2m<sup>+/-</sup>、Dp16、Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠在  
旷场中总运动距离没有明显差异,显示敲除B2m并不影响小鼠自发运动。

[0166] Y-迷宫测试(Y-maze test)用于评价小鼠的自发性空间交替行为和工作记忆。将  
小鼠放置于Y-迷宫(长30cm,宽6cm,高15cm)中央,然后让小鼠在迷宫中自由探索5分钟。以  
小鼠的四肢都进入迷宫臂作为其进入迷宫臂的标准,以小鼠三次连续进入不同迷宫臂为一  
次正确的自主交替穿梭(Alternation)。

[0167] 如图4B所示,与WT小鼠相比较,Dp16小鼠在Y-迷宫中的自主交替穿梭次数  
(Alternation)显著减少,而敲除B2m后,Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠的自主交替穿梭百分比显著增加,  
表明敲除B2m可以逆转Dp16小鼠的工作记忆。

[0168] Morris水迷宫测试(Morris water maze test)在一个圆形的水箱(直径120厘米)  
中进行,水箱中注水的高度以超过平台1厘米为宜,水箱内水的温度设定为22℃。迷宫臂内  
四个方向分别贴有四个不同形状的图标作为空间定位参照物。在训练实验中,平台在水面  
下1厘米,然后将小鼠从迷宫的两个入水点放入,让小鼠搜索平台60秒,以小鼠停留在平台  
上10秒为实验停止的标准。如果小鼠在60秒内寻找不到平台,将其引导到平台所在位置,并  
让其在平台上面停留10秒。每只小鼠每天测试2次,分别随机选择两个不同的方位入水,每  
只小鼠两次实验的间隔时间至少要1小时。记录小鼠每次实验找到平台的潜伏时间  
(Latency to target)。连续进行5天的学习训练。第6天撤掉平台,进行平台测试,将小鼠从  
平台对角线的位置鼠放入水中,让其在水迷宫中自由搜索60秒,记录小鼠第一次到达平台  
的时间(Latency to target)以及所在区域停留的时间(Time in zone)。

[0169] 如图4C所示,与WT、Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠相比较,Dp16小鼠在水迷宫的训练过程中表现  
出显著的学习能力缺陷。如图4D所示平台测试中,与WT小鼠相比较,Dp16小鼠第一次到达平  
台的时间较长,而敲除B2m后,显著缩短Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠第一次到达平台的时间。如图4E所  
示,平台测试中,与WT小鼠相比较,Dp16小鼠在平台所停留的时间较少,而敲除B2m后,显著  
增加Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠在平台的时间。相较于WT小鼠,B2m<sup>+/-</sup>小鼠的学习记忆能力无显著性差  
异。此外,如图4F所示,Dp16小鼠的平均游泳速度显著低于WT小鼠,相对于Dp16小鼠,Dp16;  
B2m<sup>+/-</sup>小鼠的平均游泳速度显著升高。

[0170] 综上提示敲除B2m显著改善Dp16小鼠的空间学习记忆能力。

[0171] 实施例5:敲除B2m改善Dp16小鼠突触功能

[0172] 对6-7月龄WT、B2m<sup>+/-</sup>、Dp16、Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠进行脑片电生理记录。小鼠经麻醉后,  
快速取出脑组织置于冰冷且通氧的人工脑脊液(ACSF)中冷却,随后转至振荡切片机进行冠  
状切片,脑片厚度为400μm。将脑片置于32℃氧饱和的ACSF中孵育1小时,之后转移至室温孵  
育1小时,将记录电极放置在Schaffer collateral-commissural通路的CA1区辐射层,刺激  
电极放置在CA3区。刺激强度为兴奋性突触后场电位(field excitatory postsynaptic  
potential, fEPSP)最大值的30%,fEPSP基线稳定记录20分钟后,高频刺激(HFS)诱导LTP(2

串刺激,每串刺激包含100个刺激脉冲,每串刺激间隔30秒),持续记录60分钟。

[0173] 如图5A和图5B所示,相对于WT小鼠,Dp16小鼠海马CA3区至CA1区Schaffer collateral-commissural通路的LTP显著受损,而敲除B2m后显著增强Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠的LTP,由此表明,敲除B2m可以逆转Dp16小鼠的突触功能障碍。

[0174] 如图5C所示,Dp16小鼠兴奋性/抑制性比值(Excitation-Inhibition ratio,E/I ratio)显著低于WT小鼠,相比于Dp16小鼠,Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠E/I ratio显著升高,提示敲除B2m可以改善唐氏小鼠兴奋性/抑制性平衡。

[0175] 通过高尔基染色分析神经元树突棘密度,如图5D和图5E所示,与WT小鼠相比较,Dp16小鼠脑中神经元树突棘密度显著减少,而敲除B2m显著增加Dp16;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑中神经元树突棘密度。

[0176] 综上,显示敲除B2m可以改善Dp16小鼠的突触功能。

[0177] 实施例6:AD小鼠脑内B2M蛋白呈年龄依赖性增加,且共定位于A $\beta$ 淀粉样斑

[0178] 分别取3、6、9、12、15月龄野生型(Wild-type,WT)和阿尔茨海默病模型小鼠5 $\times$ FAD(美国The Jackson Laboratory,货号34840-JAX)大脑皮层组织,经组织研磨、裂解后提取总蛋白、BCA测浓度制样,然后进行免疫印迹检测。

[0179] 如图6A-图6B所示,相对于同龄WT小鼠,5 $\times$ FAD小鼠大脑皮层中B2M蛋白显著升高,并且随年龄逐渐增加。

[0180] 通过脑立体定位注射向2月龄5 $\times$ FAD小鼠大脑双侧海马内注射2 $\mu$ l B2M-HA过表达腺相关病毒(Adeno-associated virus,AAV)(病毒包装由和元生物技术(上海)股份有限公司提供),单次注射4个月后用5%水合氯醛麻醉小鼠,使用磷酸盐缓冲液进行心脏灌注,取脑组织,于4%多聚甲醛固定过夜,经25%和30%蔗糖溶液脱水,使用OCT进行脑组织包埋,冰冻切片后,进行免疫荧光染色,染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)标记细胞核、抗体6E10(Biolegend公司,货号803016)标记A $\beta$ 、HA抗体(Sigma公司,货号6908)标记B2M-HA,通过激光共聚焦荧光显微镜采集图像。如图6C所示,AAV介导过表达的B2M-HA与A $\beta$ 淀粉样斑存在共定位。

[0181] 综上,表明AD小鼠脑内B2M蛋白水平升高,且呈年龄依赖性增加,脑内的B2M蛋白与A $\beta$ 淀粉样斑存在共定位。

[0182] 实施例7:过表达B2M增加AD小鼠脑内A $\beta$ 淀粉样斑沉积

[0183] 通过脑立体定位注射向2月龄5 $\times$ FAD小鼠大脑双侧海马内注射2 $\mu$ l B2M-HA过表达腺相关病毒(AAV-B2M)或对照病毒(AAV-CON)(病毒包装由和元生物技术(上海)股份有限公司提供),单次注射4个月后用5%水合氯醛麻醉小鼠,使用磷酸盐缓冲液进行心脏灌注,取脑组织,于4%多聚甲醛固定过夜,经25%和30%蔗糖溶液脱水,使用OCT进行脑组织包埋,冰冻切片后,进行免疫荧光染色,染料DAPI标记细胞核、抗体6E10标记A $\beta$ 以及小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞,通过激光共聚焦荧光显微镜采集图像。

[0184] 如图7A-图7C所示,相对于对照组AAV-CON,注射AAV-B2M病毒显著增加5 $\times$ FAD小鼠海马内A $\beta$ 淀粉样斑。

[0185] A $\beta$ -ELISA检测是另一种检测脑内A $\beta$ 的方法,该方法可以对单位重量脑组织内的A $\beta$ <sub>1-42</sub>进行定量检测。脑内的A $\beta$ 可以分为可溶性和不溶性两种,可溶性A $\beta$ 是指能够溶于TBS和TBST溶液中的A $\beta$ ;不溶性A $\beta$ 是指需要用更强去垢剂盐酸胍(GDN-HCl)处理才能溶解的A $\beta$ 。取

6月龄5×FAD小鼠脑组织,分离海马和皮层。由于AAV病毒是注射到海马组织且特异性的在海马组织内表达,因此针对海马组织进行蛋白提取。先用TBS和TBST溶液顺次裂解组织,经孵育、离心后取上清即为可溶性A $\beta$ 组份;再用GDN-HCl溶液裂解可溶性组分离心后的沉淀,经孵育、离心后取上清即为不溶性A $\beta$ 组份。BCA法测定总蛋白浓度,A $\beta_{1-42}$  ELISA试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,货号KHB3441)测定A $\beta_{1-42}$ 含量。

[0186] 如图7D-图7E所示,与注射了AAV-CON病毒的5×FAD小鼠相比,注射了AAV-B2M病毒的5×FAD小鼠海马内可溶性和不溶性A $\beta_{1-42}$ 的含量均显著增加。

[0187] 综上,过表达B2M蛋白显著增加5×FAD小鼠脑内A $\beta$ 含量以及淀粉样斑沉积。

[0188] 实施例8:敲除B2m增强AD小鼠认知功能

[0189] B2m基因敲除小鼠B2m<sup>+/-</sup>(美国The Jackson Laboratory,货号002087)与5×FAD小鼠(美国The Jackson Laboratory,货号34840-JAX)交配得到5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠,然后将6至7月龄WT、B2m<sup>+/-</sup>、5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠进行学习记忆相关行为学测试,包括Morris水迷宫测试和条件惊恐测试。在实验开始前三天接触抚摸小鼠,每天一次,轻柔地抓住鼠尾拿起小鼠,让小鼠在手上停留30秒;实验当天,在实验前先将实验的小鼠转移到准备间,让小鼠适应30分钟。动物行为学实验于每天9:00a.m.-6:00p.m.之间进行,实验室内的光强度为650lux。采用Noldus EthoVision XT(意大利Ugo Bsaile公司)进行数据采集及分析处理。

[0190] Morris水迷宫测试(Morris water maze test)在一个圆形的水箱(直径120厘米)中进行,水箱中注水的高度以超过平台1厘米为宜,水箱内水的温度设定为22℃。迷宫臂内四个方向分别贴有四个不同形状的图标作为空间定位参照物。在训练实验中,平台在水面下1厘米,然后将小鼠从迷宫的两个入水点放入,让小鼠搜索平台60秒,以小鼠停留在平台上10秒为实验停止的标准。如果小鼠在60秒内寻找不到平台,将其引导到平台所在位置,并让其在平台上面停留10秒。每只小鼠每天测试2次,分别随机选择两个不同的方位入水,每只小鼠两次实验的间隔时间至少要1小时。记录小鼠每次实验找到平台的潜伏时间(Latency to target)。连续进行6天的学习训练。第7天撤掉平台,进行平台测试,将小鼠从平台对角线的位置鼠放入水中,让其在水迷宫中自由搜索60秒,检测小鼠第一次到达平台区域的时间(Time to quadrant)和小鼠在平台区域穿梭次数(Quadrant cross number)。

[0191] 如图8A所示,与WT、B2m<sup>+/-</sup>、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠相比较,5×FAD小鼠在水迷宫的训练过程中表现出显著的学习能力缺陷。如图8B所示,平台测试中,与WT小鼠相比较,5×FAD小鼠第一次到达平台区域的潜伏时间显著增加,而敲除B2m后,显著缩短5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠第一次到达平台区域的潜伏时间。如图8C所示,平台测试中,与WT小鼠相比较,5×FAD小鼠在平台区域穿梭的次数显著减少,而敲除B2m后,5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠在平台区域穿梭的次数显著增加,综上提示敲除B2m显著改善AD小鼠的空间学习记忆能力。

[0192] 条件惊恐测试(Fear conditioning test),第一天训练过程中,小鼠被放置在试验箱内,适应环境2分钟,随后对小鼠发出60分贝的噪音刺激(条件刺激),持续30秒,并在噪音刺激的最后2秒给予小鼠0.05mA的电击刺激(非条件刺激)。重复三次,每次间隔60秒,在最后的电击刺激后,让小鼠在试验箱内停留90秒。训练后第1天上午,进行场景记忆测试(Contextual test)将小鼠放在同一个试验箱内5分钟,记录小鼠僵直时间的百分比(Freezing%),以测定场景记忆。



[0193] 如图8D所示,与WT小鼠相比较,5×FAD小鼠表现出严重的场景记忆缺陷,而敲除B2m后,显著逆转5×FAD小鼠的场景记忆缺陷。

[0194] 综上,表明敲除B2m可以逆转AD小鼠的认知功能缺陷。

[0195] 实施例9:敲除B2m逆转AD小鼠突触功能障碍

[0196] 对6-7月龄WT、B2m<sup>+/-</sup>、5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠进行脑片电生理记录。小鼠经麻醉后,快速取出脑组织置于冰冷且通氧的人工脑脊液(ACSF)中冷却,随后转至振荡切片机进行冠状切片,脑片厚度为400μm。将脑片置于32℃氧饱和的ACSF中孵育1小时,之后转移至室温孵育1小时,将记录电极放置在Schaffer collateral-commissural通路的CA1区辐射层,刺激电极放置在CA3区。刺激强度为兴奋性突触后场电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)最大值的30%,fEPSP基线稳定记录20分钟后,高频刺激(HFS)诱导LTP(2串刺激,每串刺激包含100个刺激脉冲,每串刺激间隔30秒),持续记录60分钟。如图9A-图9B所示,相对于WT小鼠,5×FAD小鼠海马CA3区至CA1区Schaffer collateral-commissural通路的LTP显著受损,而敲除B2m后显著增强5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠的LTP,由此表明,敲除B2m可以逆转AD小鼠的突触功能障碍。

[0197] 此外,通过高尔基染色分析神经元树突棘密度,如图9C-图9D所示,与WT小鼠相比较,5×FAD小鼠脑中神经元树突棘密度显著减少,而敲除B2m显著增加5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑中神经元树突棘密度。

[0198] 综上,表明敲除B2m可以逆转AD小鼠的突触功能障碍。

[0199] 实施例10:敲除B2m减少AD小鼠脑内淀粉样斑沉积和斑块周围小胶质细胞

[0200] 取6-7月龄5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑组织,用5%水合氯醛麻醉小鼠,使用磷酸盐缓冲液进行心脏灌注,取脑组织,于4%多聚甲醛固定过夜,经25%和30%蔗糖溶液脱水,使用OCT进行脑组织包埋,冰冻切片后,进行免疫荧光染色,染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)标记细胞核、抗体6E10标记Aβ以及小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞,通过激光共聚焦荧光显微镜采集图像。如图10A至图10C所示,相较于5×FAD小鼠,敲除B2m<sup>+/-</sup>显著减少5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑内海马DG区Aβ淀粉样斑数量和斑块面积。

[0201] 通过ELISA检测6-7月龄5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠海马组织Aβ<sub>1-42</sub>。如图10D所示,相较于5×FAD小鼠,敲除B2m<sup>+/-</sup>显著减少5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠海马组织GDN-HC可溶的Aβ<sub>1-42</sub>。

[0202] 6-7月龄5×FAD、5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑组织做免疫荧光染色,染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)标记细胞核、抗体6E10标记Aβ以及小胶质细胞标记蛋白Iba1抗体标记小胶质细胞,通过激光共聚焦荧光显微镜采集图像。选取海马DG区直径在3-8μm范围内的Aβ斑块,统计斑块周围的小胶质细胞数目。如图10E至图10F所示,相较于5×FAD小鼠,敲除B2m<sup>+/-</sup>显著减少5×FAD;B2m<sup>+/-</sup>小鼠脑内Aβ淀粉样斑周围的小胶质细胞数目。

[0203] Aβ<sub>1-42</sub>通过寡聚化形成纤维状的寡聚物,继而沉积形成淀粉样斑。将纯化的B2M蛋白与Aβ<sub>1-42</sub>多肽在37℃条件下共孵育72小时,然后将样品点在碳涂层网格上,再用1%醋酸铀酰对样品进行染色,通过Hitachi HT-7800透射电镜(日立高新技术,日本)采集图像。如图10G所示,与对照组相比较,B2M蛋白孵育Aβ<sub>1-42</sub>后形成的纤维状寡聚物染色着色更深,即寡聚物更加致密。

[0204] 综上,敲除B2m可以减少AD小鼠脑内A $\beta$ 淀粉样斑沉积以及斑块周围小胶质细胞数目。

[0205] 实施例11:靶向B2M的反义寡核苷酸

[0206] 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide,ASO)是指与特定靶RNA序列互补的15-25bp短核酸序列。ASO序列进入细胞后,通过碱基互补配对原则与靶RNA结合,通过多种不同的机制增加或者减少靶基因的表达。

[0207] 如图11A所示,本研究针对人B2M蛋白的mRNA序列设计9条特异性的ASO序列,详细序列见下表。

SEQ ID NO:	命名	序列
6	ASO-1	CACAGGTAGCTCTAGGAGGG
7	ASO-2	CACGTCATCCAGCAGAGAAT
8	ASO-3	CATCCATCCGACATTGAAGT
9	ASO-4	TTGTCACAGCCCAAGATAGT
[0208] 10	ASO-5	TCTCTTGCACTCAAAGCTTG
11	ASO-6	TACTCTGCTTAGAATTTGGG
12	ASO-7	GGATAAGAGAATTCTCTGCTC
13	ASO-8	TGACTTTCCATTCTCTGCTGG
14	ASO-9	GCTTACATGTCTCGATCCCAC
15	ASO-CON (阴性对照序列)	CCTTCCCTGAAGGTTCCCTCC

[0209] 通过Lipofectamine 2000转染试剂(Thermo Fisher Scientific公司,货号11668019)将合成的B2M ASO序列(终浓度为50nM)转染到人胚肾细胞HEK293T(美国ATCC公司,货号CRL-3216)中,作用48小时后收细胞提蛋白,BCA测浓度,制样做WB检测。如图11B至图11E所示,靶向B2M的ASO 1-9均可显著地减少HEK293T细胞内B2M蛋白的表达。

[0210] 综上,靶向人B2M的ASO可有效减少HEK293T细胞中B2M表达。

[0211] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001] SEQUENCE LISTING  
 [0002] <110> 厦门大学  
 [0003] <120>  $\beta$ 2-微球蛋白或其抑制剂的制药用途  
 [0004] <130> IDC210148  
 [0005] <160> 15  
 [0006] <170> PatentIn version 3.5  
 [0007] <210> 1  
 [0008] <211> 119  
 [0009] <212> PRT  
 [0010] <213> Homo sapiens  
 [0011] <400> 1  
 [0012] Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser  
 [0013] 1 5 10 15  
 [0014] Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg  
 [0015] 20 25 30  
 [0016] His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser  
 [0017] 35 40 45  
 [0018] Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu  
 [0019] 50 55 60  
 [0020] Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp  
 [0021] 65 70 75 80  
 [0022] Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp  
 [0023] 85 90 95  
 [0024] Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile  
 [0025] 100 105 110  
 [0026] Val Lys Trp Asp Arg Asp Met  
 [0027] 115  
 [0028] <210> 2  
 [0029] <211> 943  
 [0030] <212> DNA  
 [0031] <213> Homo sapiens  
 [0032] <400> 2  
 [0033] attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc 60  
 [0034] gcgctactct ctctttctgg cctggaggct atccagcgta ctccaagat tcaggtttac 120  
 [0035] tcacgtcacc cagcagagaa tggaaagtca aatttctga attgctatgt gtctgggttt 180  
 [0036] catccatccg acattgaagt tgacttactg aagaatggag agagaattga aaaagtggag 240  
 [0037] cattcagact tgtctttcag caaggactgg tctttctatc tcttgtacta cactgaattc 300  
 [0038] acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc 360

[0039] aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca 420  
 [0040] tttggattgg atgaattcca aattctgctt gcttgctttt taatattgat atgcttatac 480  
 [0041] acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt ataataatgt taacatggac atgatcttct 540  
 [0042] ttataattct actttgagtg ctgtctccat gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca 600  
 [0043] ggtagctcta ggagggtg caacttagag gtggggagca gagaattctc ttatccaaca 660  
 [0044] tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag 720  
 [0045] ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt 780  
 [0046] tagaaatata attgacagga ttattggaaa tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat 840  
 [0047] ataagattca tatttacttc ttatacattt gataaagtaa ggcattggtg tggttaatct 900  
 [0048] ggtttatfff tgttccacaa gttaaataaa tcataaaact tga 943  
 [0049] <210> 3  
 [0050] <211> 30  
 [0051] <212> DNA  
 [0052] <213> Homo sapiens  
 [0053] <400> 3  
 [0054] attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag 30  
 [0055] <210> 4  
 [0056] <211> 360  
 [0057] <212> DNA  
 [0058] <213> Homo sapiens  
 [0059] <400> 4  
 [0060] atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 60  
 [0061] atccagcgta ctcaaagat tcaggtttac tcacgtcacc cagcagagaa tggaaagtca 120  
 [0062] aatttcttga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg 180  
 [0063] aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg 240  
 [0064] tctttctatc tcttgtacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc 300  
 [0065] cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa 360  
 [0066] <210> 5  
 [0067] <211> 553  
 [0068] <212> DNA  
 [0069] <213> Homo sapiens  
 [0070] <400> 5  
 [0071] gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca tttggattgg atgaattcca aattctgctt 60  
 [0072] gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt 120  
 [0073] ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat 180  
 [0074] gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagctcta ggagggtg caacttagag 240  
 [0075] gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca 300  
 [0076] atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta 360  
 [0077] catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa 420

[0078] tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt 480  
[0079] gataaagtaa ggcattggttg tggtaaatct ggtttatttt tgttccacaa gttaaataaa 540  
[0080] tcataaaaact tga 553  
[0081] <210> 6  
[0082] <211> 20  
[0083] <212> DNA  
[0084] <213> Artificial Sequence  
[0085] <220>  
[0086] <223> ASO-1  
[0087] <400> 6  
[0088] cacaggtagc tctaggaggg 20  
[0089] <210> 7  
[0090] <211> 20  
[0091] <212> DNA  
[0092] <213> Artificial Sequence  
[0093] <220>  
[0094] <223> ASO-2  
[0095] <400> 7  
[0096] cacgtcatcc agcagagaat 20  
[0097] <210> 8  
[0098] <211> 20  
[0099] <212> DNA  
[0100] <213> Artificial Sequence  
[0101] <220>  
[0102] <223> ASO-3  
[0103] <400> 8  
[0104] catccatccg acattgaagt 20  
[0105] <210> 9  
[0106] <211> 20  
[0107] <212> DNA  
[0108] <213> Artificial Sequence  
[0109] <220>  
[0110] <223> ASO-4  
[0111] <400> 9  
[0112] ttgtcacagc ccaagatagt 20  
[0113] <210> 10  
[0114] <211> 20  
[0115] <212> DNA  
[0116] <213> Artificial Sequence

- [0117] <220>  
[0118] <223> AS0-5  
[0119] <400> 10  
[0120] tctcttgac tcaaagcttg 20  
[0121] <210> 11  
[0122] <211> 20  
[0123] <212> DNA  
[0124] <213> Artificial Sequence  
[0125] <220>  
[0126] <223> AS0-6  
[0127] <400> 11  
[0128] tactctgctt agaatttggg 20  
[0129] <210> 12  
[0130] <211> 21  
[0131] <212> DNA  
[0132] <213> Artificial Sequence  
[0133] <220>  
[0134] <223> AS0-7  
[0135] <400> 12  
[0136] ggataagaga attctctgct c 21  
[0137] <210> 13  
[0138] <211> 21  
[0139] <212> DNA  
[0140] <213> Artificial Sequence  
[0141] <220>  
[0142] <223> AS0-8  
[0143] <400> 13  
[0144] tgactttcca ttctctgctg g 21  
[0145] <210> 14  
[0146] <211> 21  
[0147] <212> DNA  
[0148] <213> Artificial Sequence  
[0149] <220>  
[0150] <223> AS0-9  
[0151] <400> 14  
[0152] gcttacatgt ctcgatecca c 21  
[0153] <210> 15  
[0154] <211> 20  
[0155] <212> DNA

- 
- [0156] <213> Artificial Sequence  
[0157] <220>  
[0158] <223> ASO-CON  
[0159] <400> 15  
[0160] ccttcctga aggttcctcc 20

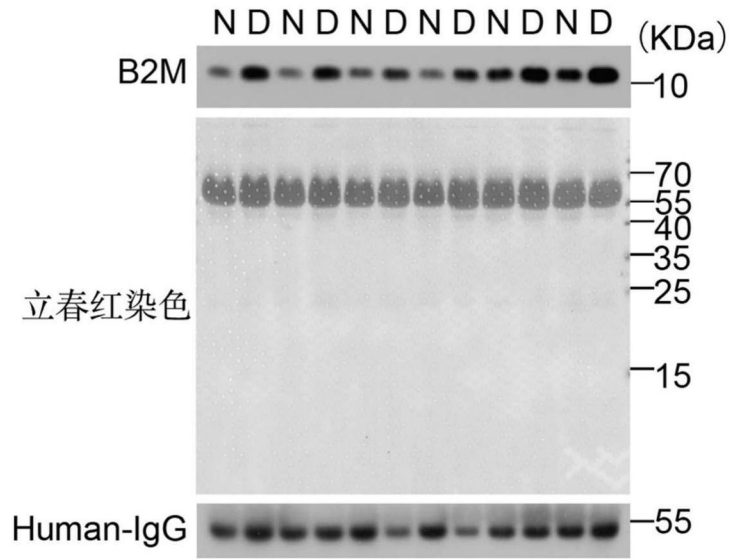


图1A

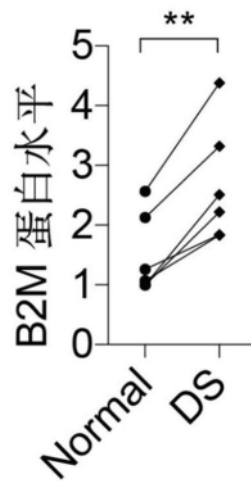


图1B

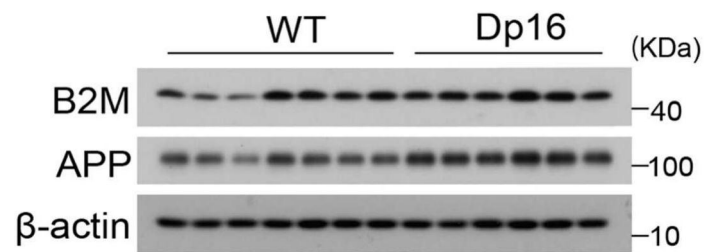


图2A



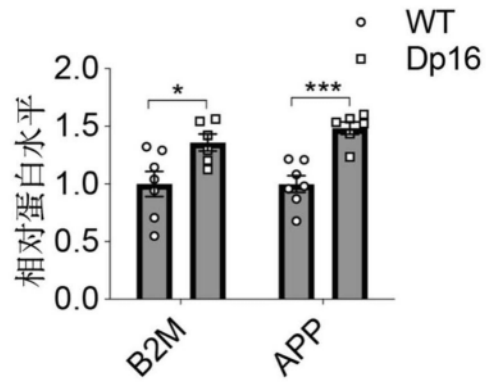


图2B

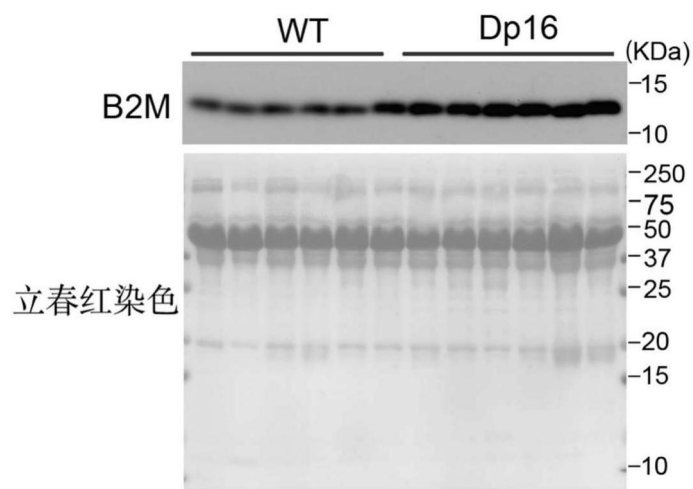


图2C

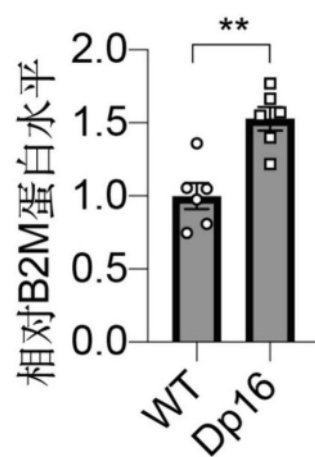


图2D

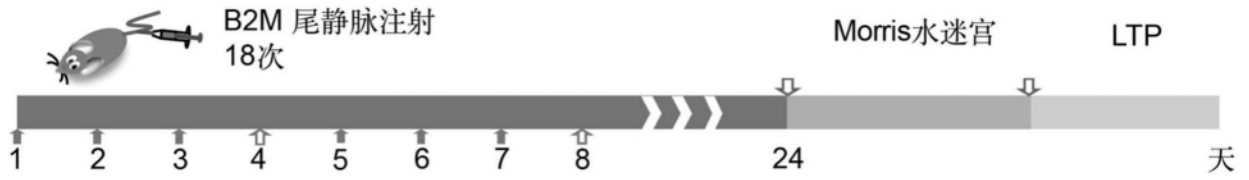


图3A

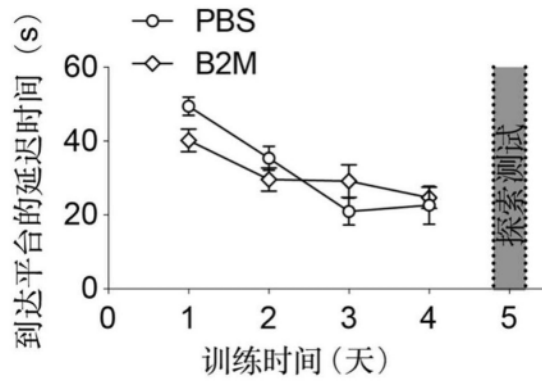


图3B

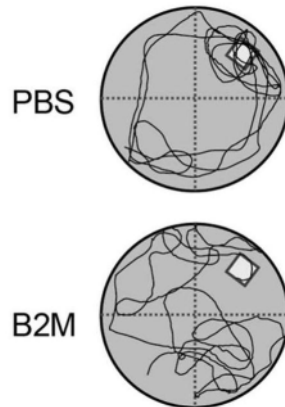


图3C

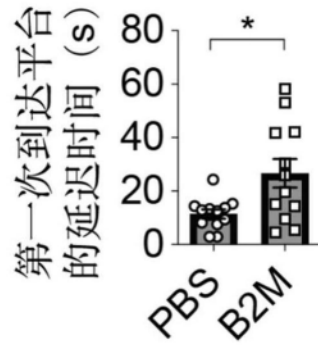


图3D

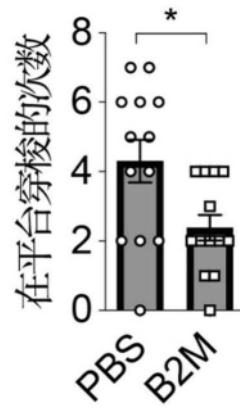


图3E

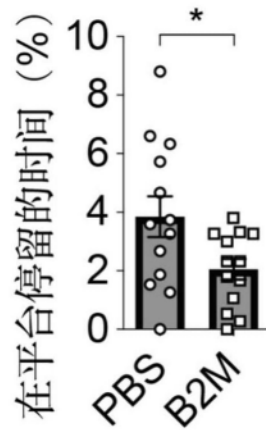


图3F

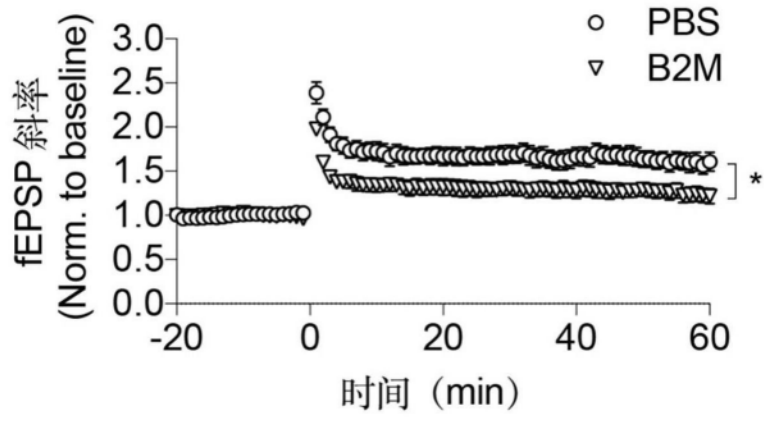


图3G

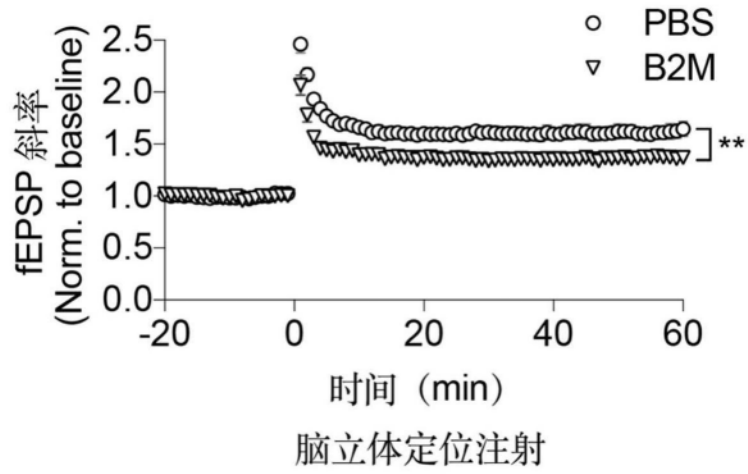


图3H

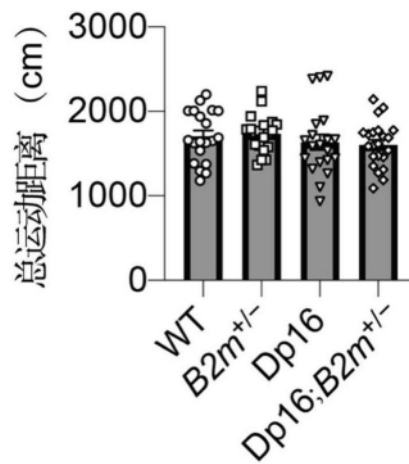


图4A

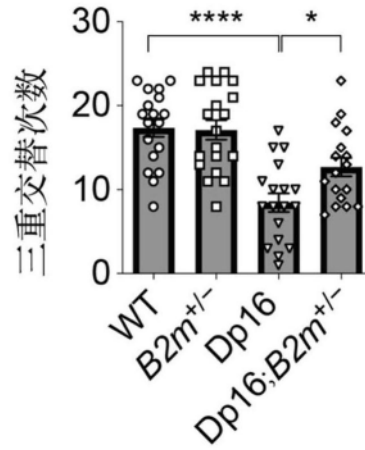


图4B

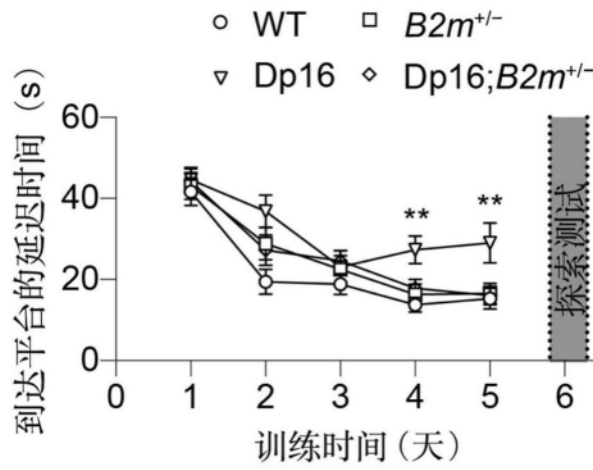


图4C

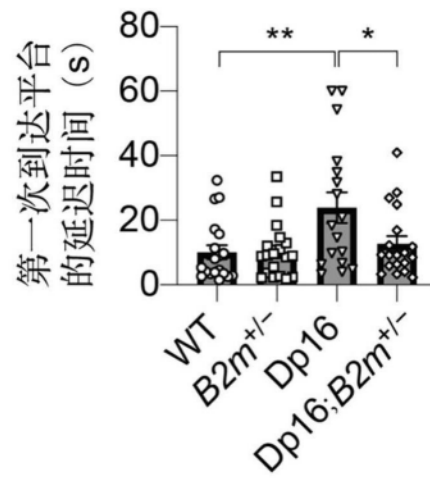


图4D

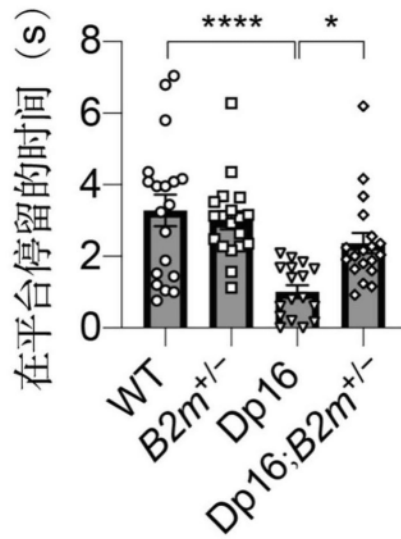


图4E

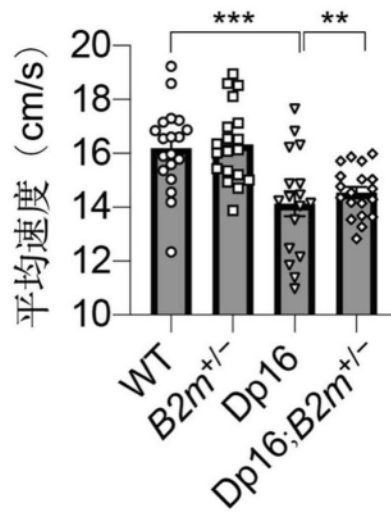


图4F

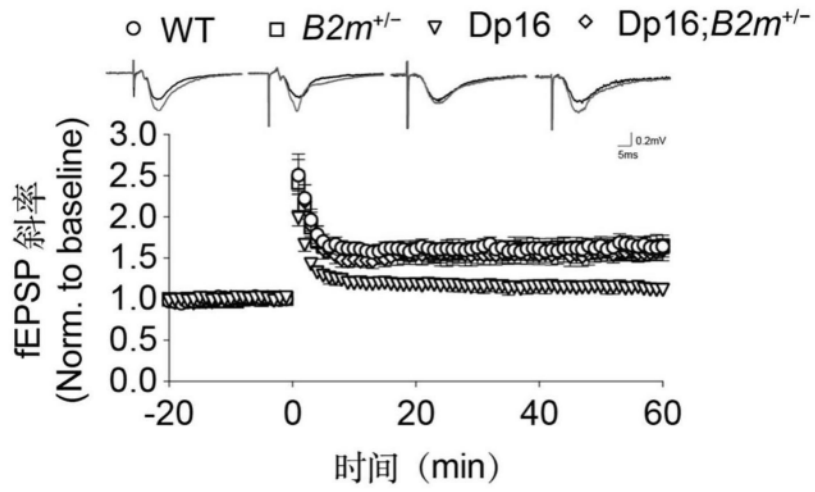


图5A

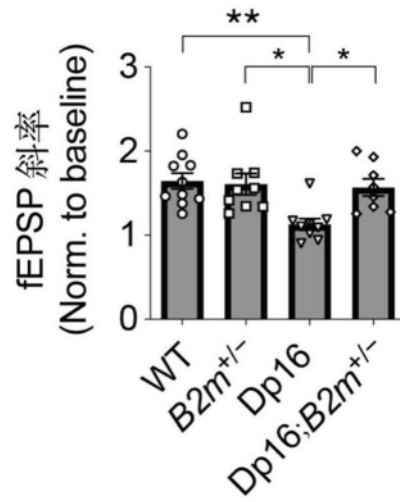


图5B

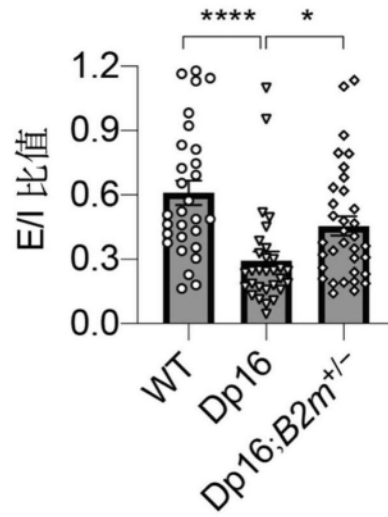


图5C

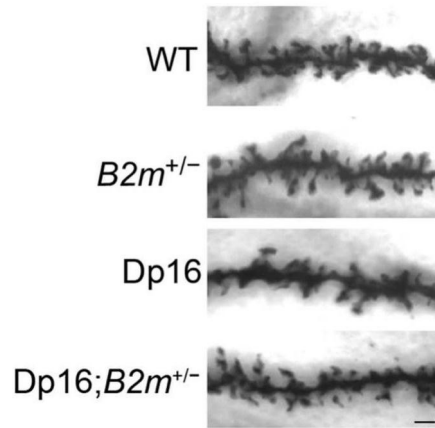


图5D



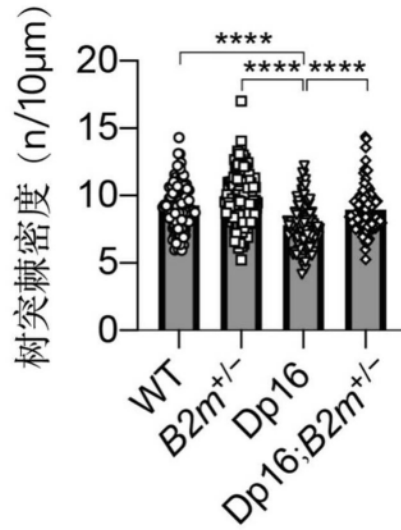


图5E

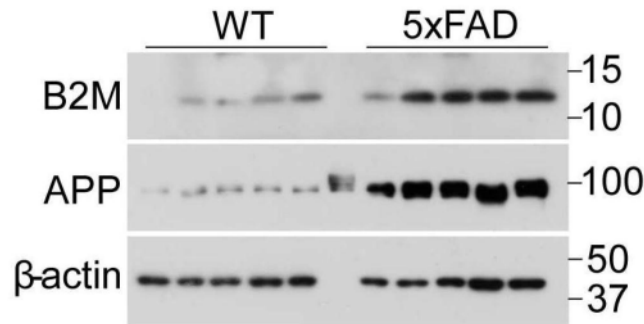


图6A

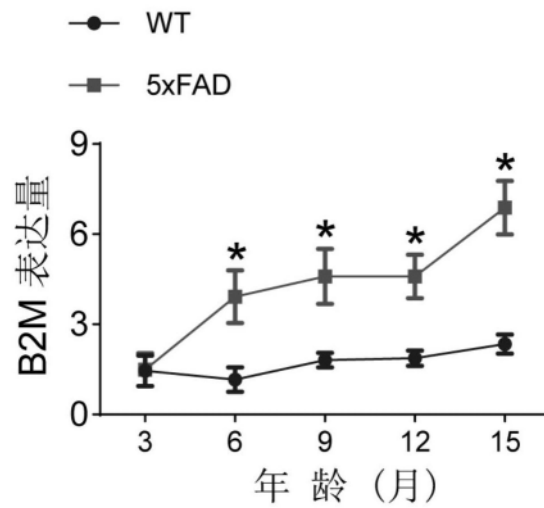


图6B

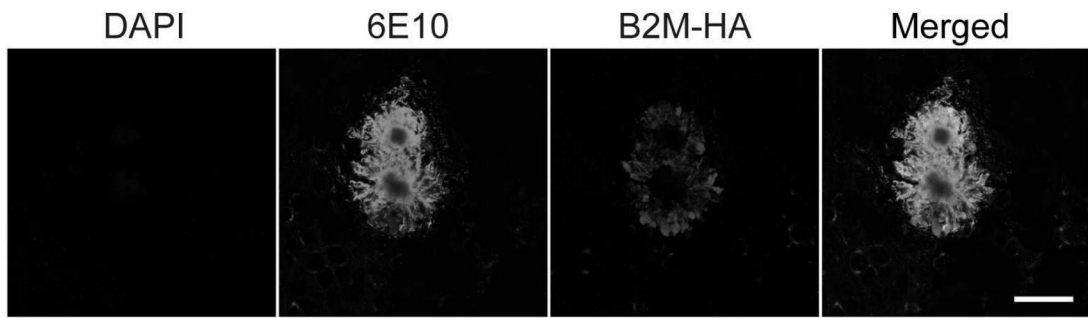


图6C

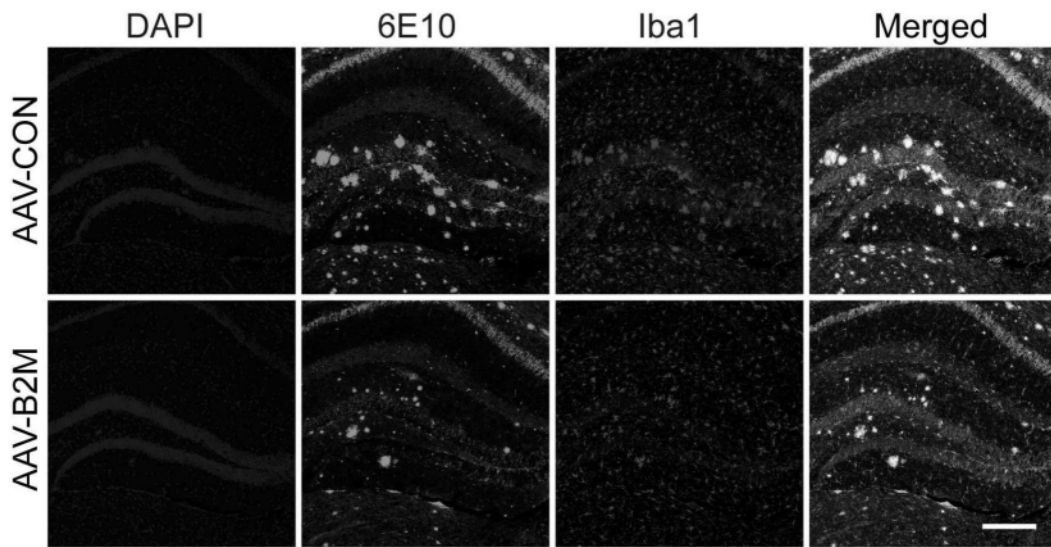


图7A

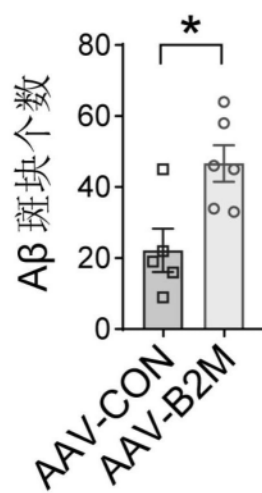


图7B

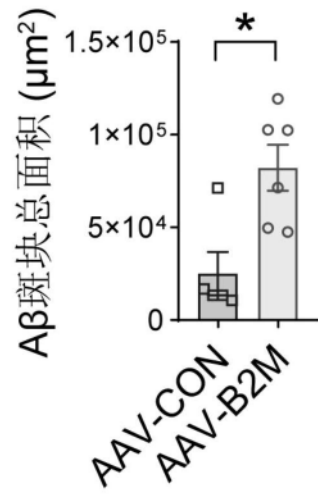


图7C

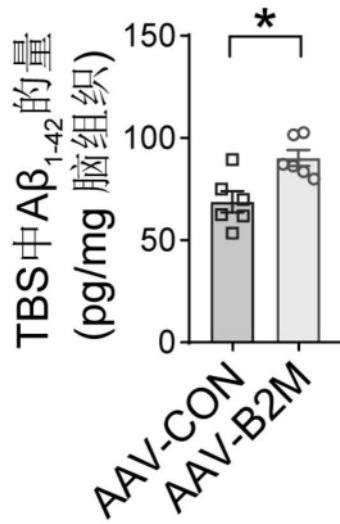


图7D

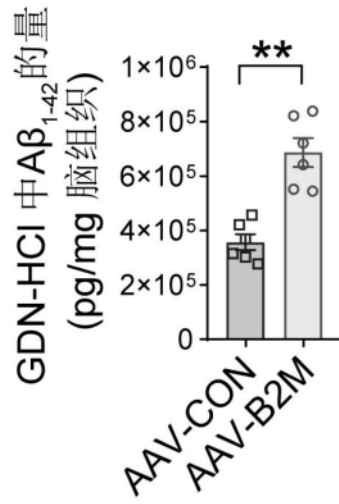


图7E

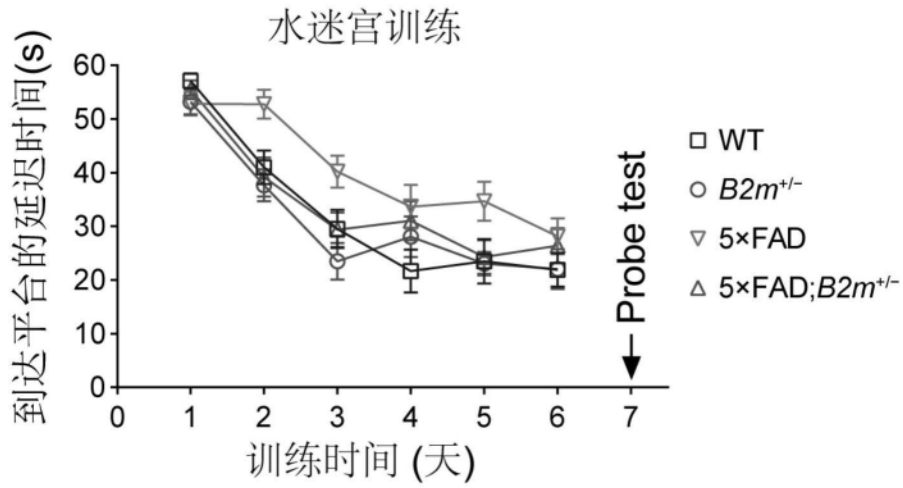


图8A

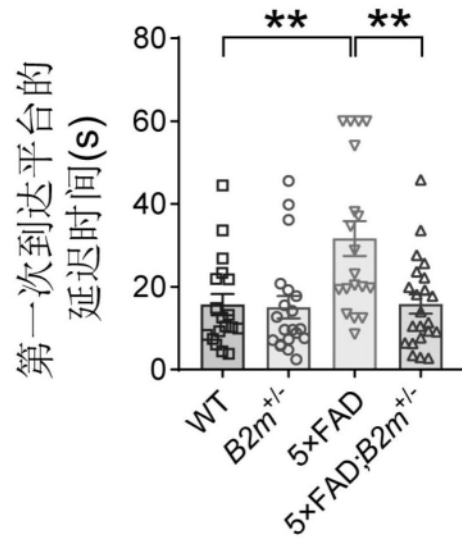


图8B

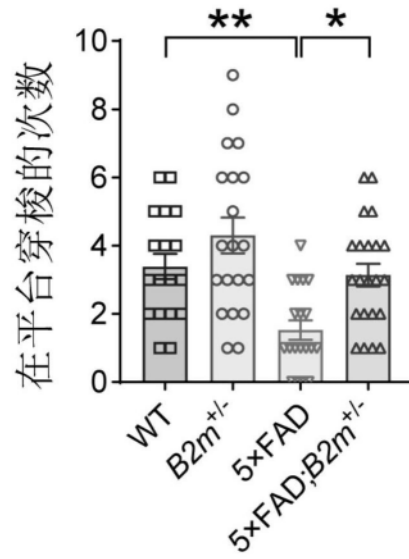


图8C

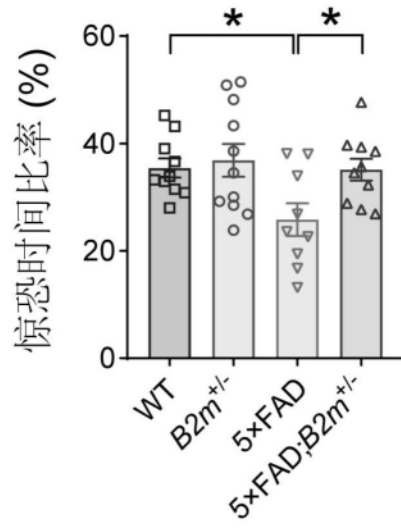


图8D

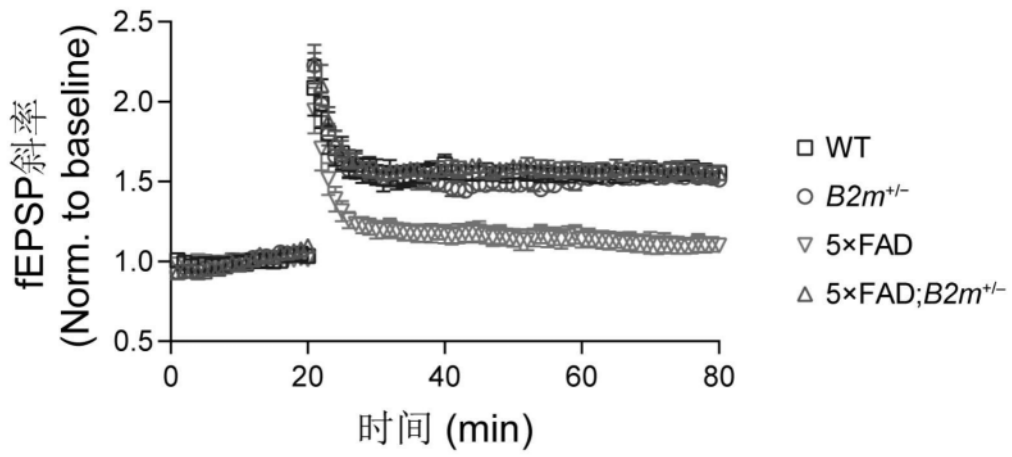


图9A

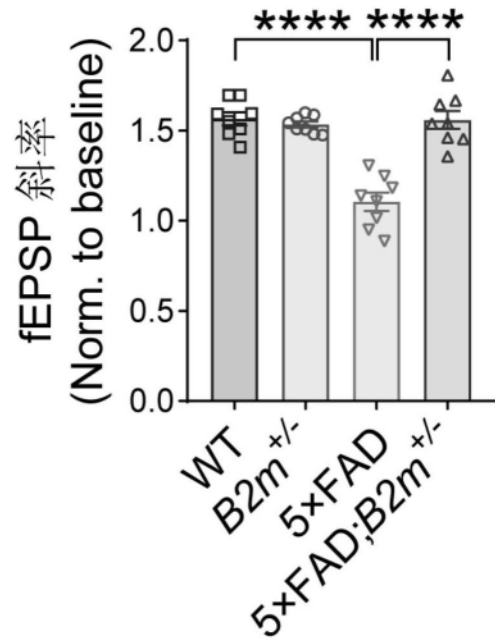


图9B

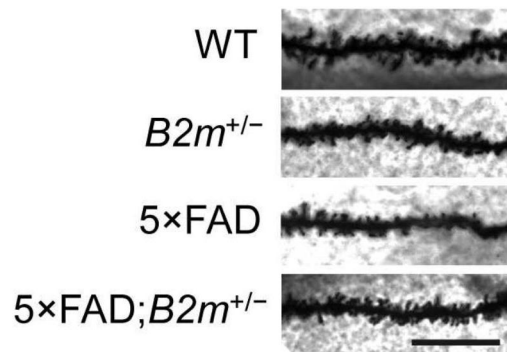


图9C

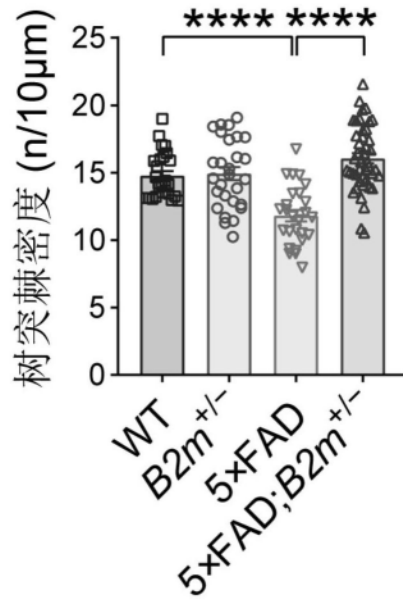


图9D

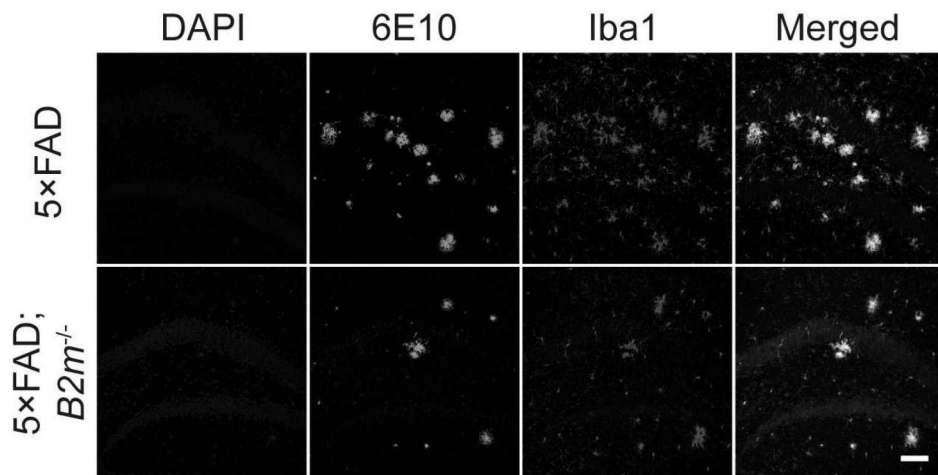


图10A



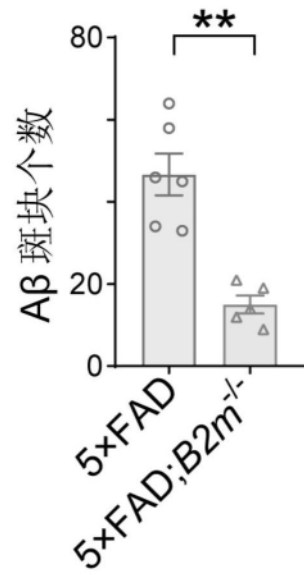


图10B

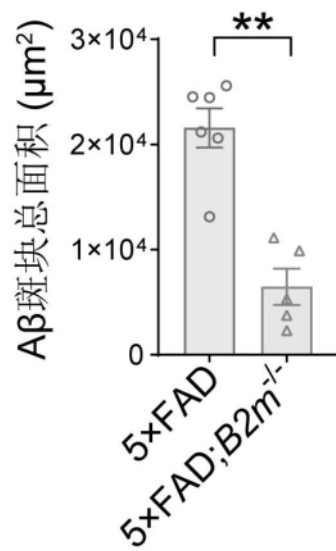


图10C

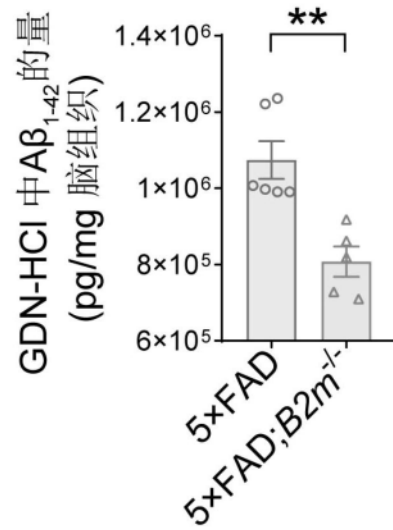


图10D

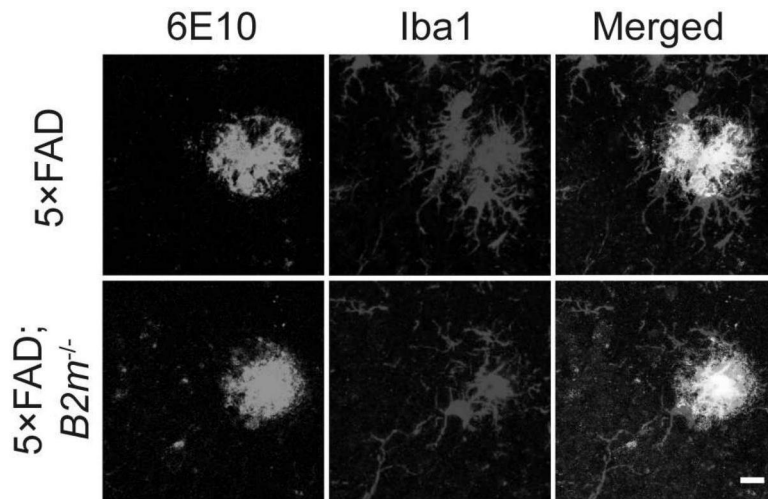


图10E

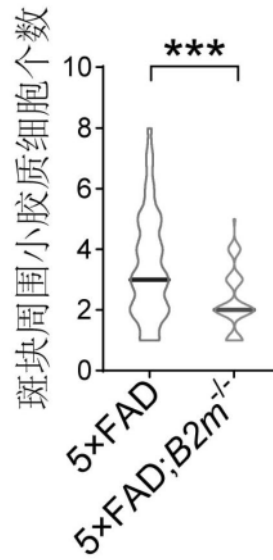


图10F

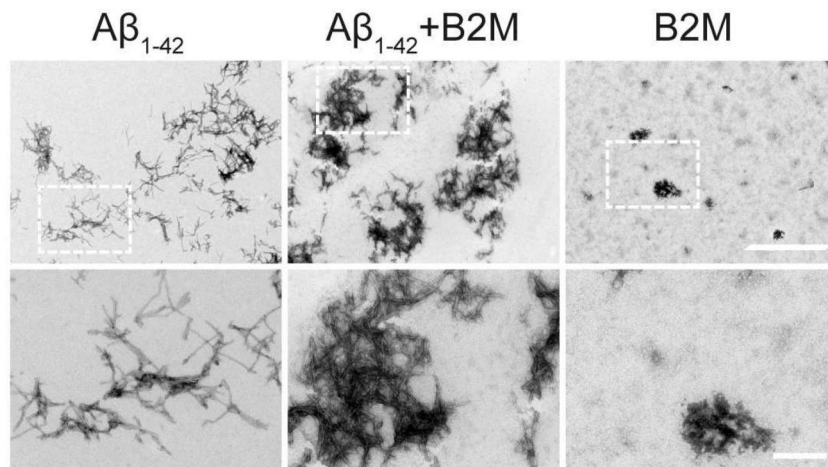


图10G

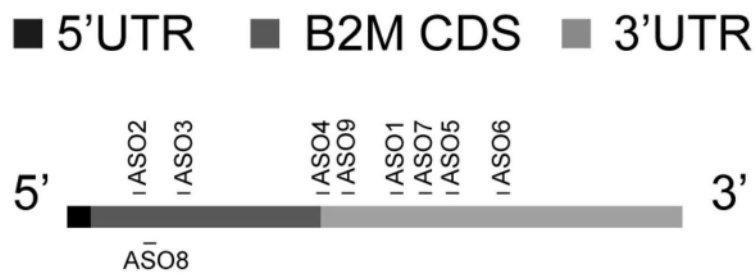


图11A

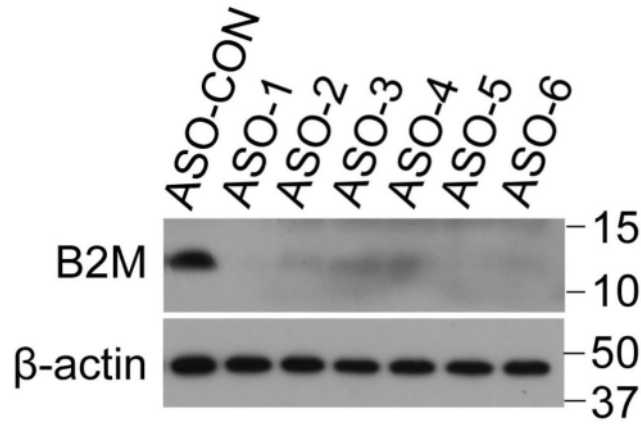


图11B

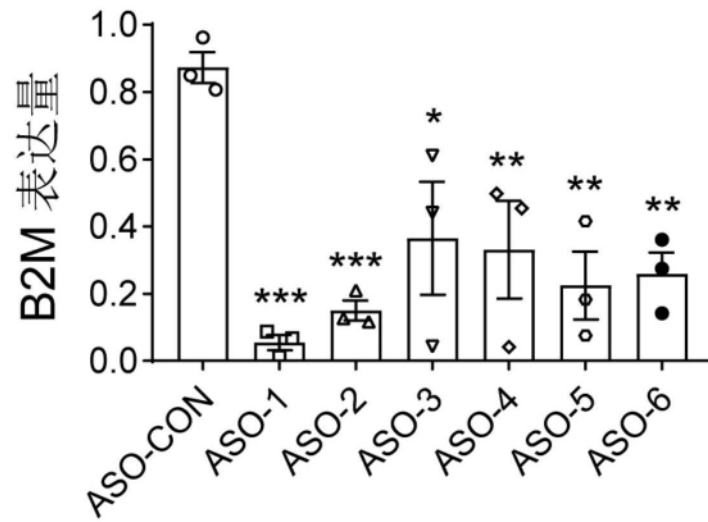


图11C

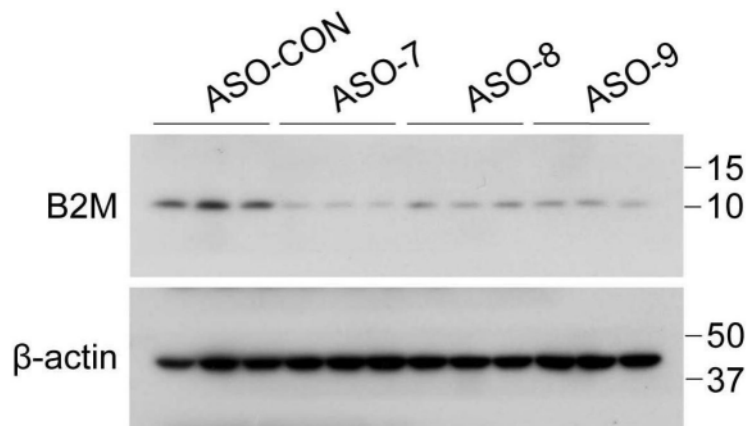


图11D

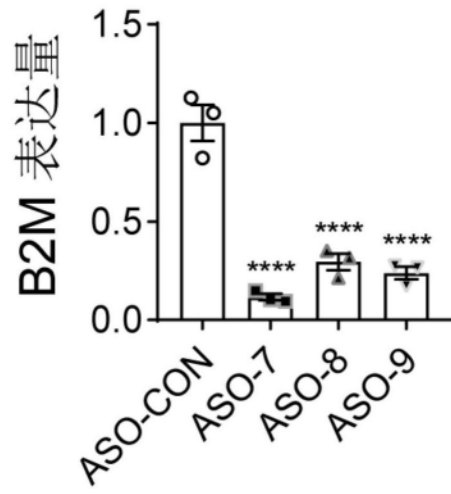


图11E