

载脂蛋白 E 的 C 端片段及其在抑制 γ 分泌酶活中的应用

5 相关申请的交叉引用

本专利申请要求于 2022 年 1 月 30 日提交的中国申请号 CN202210113320.2 的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

对电子序列表的引用

10 电子序列表（217334 1PCWO.xml；大小：92,558 字节；创建日期：2023 年 1 月 30 日）的内容通过引用整体并入本文。

技术领域

15 本发明涉及载脂蛋白 E（apolipoprotein E，ApoE）的 C 端片段及其抑制 γ 分泌酶活中的应用。

背景技术

γ 分泌酶是100多种I型跨膜蛋白的剪切酶，参与了多种生物学过程。T-细胞和B-细胞分化异常，出血性腹泻，皮肤和毛发缺陷，阿尔茨海默症（Alzheimer’s disease, AD）
20 等都与 γ 分泌酶的异常相关。 γ 分泌酶是四个蛋白组成的复合物：NCT、APH1、PEN2 和presenilin1（PS1）或者presenilin2（PS2）。 γ 分泌酶的酶切活性中心是PS1或者PS2。现在已经发现多种PS1和PS2的突变会导致AD，PS1和PS2都是AD的致病基因，因此 γ 分泌酶是非常重要的药物靶点，特别是针对AD的治疗。

AD是人类最常见的一种神经退行性疾病。AD患者主要表现为渐进性记忆障碍、
25 认知功能障碍、人格改变及语言障碍等症状，进一步发展为自理能力丧失，最终死亡。我国是世界上AD患者数量最多的国家。截至2019年，我国有1000多万AD患者，呈每年递增趋势。超过80岁的人群患AD的概率超过40%。并且AD的治疗费用也非常高昂，给家庭和社会造成极大负担。

在过去的几十年里，人们对AD致病机理的研究已经取得了很大的进展，提出了
30 A β 级联假说。该假说认为大脑中A β 的过度产生、异常聚集是一系列严重而缓慢病变的起始原因，引起大脑内一系列生物过程异常，导致神经元上突触退化和神经元死亡。

在大脑中，淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein, APP）主要由神经元表达，A β 是由经过 β 和 γ 分泌酶依次剪切APP产生的，生成的A β 被释放到细胞外，这一过程被称为APP的淀粉样代谢。在正常的生理状态下，大脑中生成的A β 多是可溶性的。但是发生病变后，大脑中的A β 大量异常聚集，形成沉积在神经元周边的淀粉样斑块，引发神经元的损伤，进一步引起脑组织的衰竭，最终导致AD。此外，淀粉样蛋白在大脑血管中异常聚集和沉淀会引发淀粉样脑血管病。APP除了被 β 和 γ 分泌酶剪切生成有毒性的A β 外，还可以被 α 和 γ 分泌酶依次酶切，是APP的非淀粉样代谢途径。由于 α 分泌酶的酶切位点位于A β 内部，所以 α 酶切产物不会生成A β ，剪切片段被称为 α -CTF，没有神经毒性，不会导致AD。 α 和 β 酶切相互竞争，增加 α 分泌酶的酶切，A β 的生成下降；同样地，减少 γ 分泌酶的酶切，也会减少A β 的生成，减缓淀粉样斑块的形成，最后减缓甚至预防AD和淀粉样脑血管病的发生。多种以 γ 分泌酶为靶点的药物已经做过临床试验。

ApoE是在人体中广泛分泌的蛋白，在脑中可以与APP共同表达在神经元中。人源ApoE有三种异构体ApoE2、ApoE3、ApoE4；它们在结构和功能上高度相似，大致分为三个功能域，分别是包含与受体结合位点的N端功能域，包含与脂质结合位点的C端功能域，以及连接两端功能域的中间柔性铰链区。ApoE2、ApoE3和ApoE4仅在N端功能域有两个氨基酸残基不同，在C端功能域上的氨基酸序列完全相同。其中ApoE2具有保护作用，可以降低AD的发病风险；ApoE4是AD的最主要的风险因子，不仅能够显著增加患AD的风险，还能够显著提前患AD的发病年龄，加重AD病情。目前为止，人们依然不清楚 ApoE2 和 ApoE4 如何改变 AD 的患病风险。

发明内容

在一个方面，本发明提供一种分离的ApoE构建物，其包含一个ApoE多肽，所述ApoE多肽：（1）包含来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个片段，该片段（或该ApoE多肽）N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第215-221位中的任意一个位置上的氨基酸残基，该片段（或该ApoE多肽）C端最后一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第274-299位（例如第279-299位）中的任意一个位置上的氨基酸残基；或（2）其氨基酸序列与（1）所述片段具有至少约70%（例如至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高）序列同一性，并保留至少约50%（例如至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5倍、2倍、5倍、10倍或更多）（1）所述片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含（或由其组成，或基本由其组成）如下任一序列：(i) SEQ ID NO:12第215-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(ii) SEQ ID NO:12第216-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(iii) SEQ ID NO:12第217-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(iv) SEQ ID NO:12第218-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(v) SEQ ID NO:12第219-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(vi) SEQ ID NO:12第220-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(vii) SEQ ID NO:12第221-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(viii) SEQ ID NO:12第216-294位氨基酸残基的氨基酸序列；(ix) SEQ ID NO:12第216-289位氨基酸残基的氨基酸序列；(x) SEQ ID NO:12第219-289位氨基酸残基的氨基酸序列；(xi) SEQ ID NO:12第219-288位氨基酸残基的氨基酸序列；(xii) SEQ ID NO:12第219-287位氨基酸残基的氨基酸序列；(xiii) SEQ ID NO:12第219-286位氨基酸残基的氨基酸序列；(xiv) SEQ ID NO:12第219-285位氨基酸残基的氨基酸序列；(xv) SEQ ID NO:12第219-284位氨基酸残基的氨基酸序列；(xvi) SEQ ID NO:12第219-279位氨基酸残基的氨基酸序列；(xvii) SEQ ID NO:12第219-274位氨基酸残基的氨基酸序列；(xviii) SEQ ID NO:12第220-274位氨基酸残基的氨基酸序列；(xix) SEQ ID NO:12第220-279位氨基酸残基的氨基酸序列；或 (xx) SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的氨基酸序列。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NOs:13、18-34、78和87中任一氨基酸序列。在一些实施方式中，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NOs:31-34、78和87中任一所示的氨基酸序列（例如SEQ ID NO:33）。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE多肽包含（或由其组成，或基本由其组成）与SEQ ID NOs:13、18-34、78和87中任一氨基酸序列具有至少约70%（例如至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高）序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中，所述ApoE多肽含有非人灵长类序列，例如与SEQ ID NOs:13、18-34、78和87中任一氨基酸序列高度同源和保守的序列。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE多肽包含相对于SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变（例如添加、缺

- 失或取代)：R226、D227、R228、L229、D230、Q235、E238、V239、R240、K242、E244、E245、Q246、A247、Q248、Q249、I250、R251、L252、Q253、A254、E255、Q275、V280、V287、T289、S290、A291、P293、V294、P295、S296、D297、N298、H299、R251+T289、R251+T289+A291、S290+P293+V294+P295+S296+D297+N298+H299、R226+D227+R228+L229+D230、E238+V239+R240+K242、E244+E245+Q246+A247+Q248+Q249+I250+R251+L252+Q253+A254。在一些实施方式中，所述ApoE多肽包含相对于SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变：R226A、D227A、R228A、L229A、D230A、Q235A、E238A、V239A、R240A、K242A、E244del、E245del、Q246del、A247del、Q248del、Q249del、I250del、R251S、L252del、Q253del、A254del、E255A、Q275A、V280A、V287A、T289A、S290A、A291T、P293A、V294A、P295A、S296A、D297A、N298A、H299A、R251A+T289A、R251S+T289A+A291T、S290A+P293A+V294A+P295A+S296A+D297A+N298A+H299A、R226A+D227A+R228A+L229A+D230A、E238A+V239A+R240A+K242A、或E244del+E245del+Q246del+A247del+Q248del+Q249del+I250del+R251del+L252del+Q253del+A254del。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE多肽包含（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NOs:46-52、57-59、62和76中任一氨基酸序列。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE构建物在ApoE多肽的N端还进一步包含SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸残基的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸至少有约70%（例如至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高）同一性的序列。在一些实施方式中，所述ApoE构建物包含（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NO:60或61所示的氨基酸序列。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE构建物在所述ApoE多肽的N端或C端还进一步包含一个穿膜肽。在一些实施方式中，所述穿膜肽包括（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NOs:35-45、63-65和84-86中任一氨基酸序列，例如包括（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NO:63或65所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，所述穿膜肽（例如C端）与所述ApoE多肽（例如N端）、

或所述包含SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸残基的氨基酸序列（例如N端）、或所述与SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸至少有约70%同一性的序列（例如N端）通过一个接头序列连接。

在根据以上任一所述分离的ApoE构建物的一些实施方式中，所述ApoE构建物在
5 所述ApoE多肽的N端还进一步包含一个信号肽。在一些实施方式中，所述信号肽包含（或由其组成，或基本由其组成）选自SEQ ID NOs:66-68中任一氨基酸序列。

在另一个方面，本发明提供一种分离的ApoE构建物，该分离的ApoE构建物包括
10 元件（1）：穿膜肽，和 元件（2）：ApoE2的全长序列（例如SEQ ID NO:12）或ApoE3的全长序列（例如SEQ ID NO:89）或至少包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的片段；其中，所述元件（1）和元件（2）之间通过肽键直接连接，或通过接头序列连接。在一些实施方式中，所述穿膜肽选自SEQ ID NOs:35-45、63-65和84-86中任一氨基酸序列，例如SEQ ID NO:63或65所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，元件（2）所述的至少包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的片段选自本发明所述的任一包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的ApoE多肽。在一些实施方案中，元
15 件（2）所述的至少包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的片段的氨基酸序列如SEQ ID NOs:13、18-34和78中任一所示。在一些实施方案中，元件（2）所述的至少包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的片段含有ApoE2的N端结构域（SEQ ID NO:12第1-167位氨基酸残基）和铰链区（SEQ ID NO:12第168-205位氨基酸残基）、以及C端至少包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的片段。在一些实施方式中，
20 所述元件（2）包含以下任一序列：SEQ ID NO:12第1-274位，第1-279位，第1-280位、第1-281位、第1-282位、第1-283位、第1-284位、第1-285位、第1-286位、第1-287位、第1-288位、第1-289位、第1-290位、第1-291位、第1-292位、第1-293位、第1-294位、第1-295位、第1-296位、第1-297位、第1-298位、或第1-299位氨基酸残基。

本发明还提供了编码以上任一所述分离的ApoE构建物的蛋白部分的分离的核酸
25 和载体（例如克隆载体或表达载体），以及表达以上任一所述分离的ApoE构建物的蛋白部分的宿主细胞，或包含该核酸或载体的宿主细胞。在一些实施方式中，所述载体在所述分离的核酸的5'端含有神经元特异性启动子。在一些实施方式中，所述神经元特异性启动子选自突触蛋白启动子、thy-1启动子和钙调素依赖型蛋白激酶II- α 启动子。在一些实施方式中，所述载体为是重组AAV或lentivirus表达载体。在一些实施方式中，
30 所述宿主细胞为神经元（例如人神经元、非人灵长类神经元、或啮齿类神经元）。在

一些实施方式中，所述ApoE构建物包含（或由其组成，或基本由其组成）ApoE2（例如SEQ ID NO:12）或ApoE3（例如SEQ ID NO:89）的全长氨基酸序列。

本发明还提供了一种药物组合物，其含有(i)本文任一实施方案所述的分离的ApoE构建物、分离的核酸、载体、或宿主细胞，和(ii)药学上可接受的载体。

- 5 本发明还提供了本文任一实施方案所述的分离的 ApoE 构建物、分离的核酸、载体、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗或预防一个个体（例如人）中与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病的药物中的应用。本发明还提供了一种治疗或预防一个个体（例如人）中与 γ 分泌酶的酶切活性相关疾病的方法，包括向所述个体施用有效剂量的本文任一实施方案所述的分离的 ApoE 构建物、分离的核酸、载体、宿主细胞或药物组合物。在一些实施方式中，所述药物或方法抑制 γ 分泌酶的酶切活性，从而治疗或预防所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病。在一个或多个实施方案中，所述疾病选自如下的组：神经系统退行性疾病，肿瘤或癌症，炎性疾病和肾脏疾病。在一个或多个实施方案中，所述疾病选自如下的组：阿尔茨海默病及其相关疾病、淀粉样脑血管病、唐氏综合症、与衰老相关的其他神经退行性疾病（比如额颞叶痴呆）、头颈癌（如头颈鳞细胞癌和口腔部鳞状细胞癌）、乳腺癌、肝癌、胰腺癌（包括转移性胰腺癌）、卵巢癌、肺癌（如非小细胞肺癌、肺腺癌和小细胞肺癌）、胶质瘤（如恶性神经胶质瘤）、纤维瘤、淋巴瘤（如 B 细胞淋巴瘤）、骨肉瘤、胃癌、膀胱癌、哮喘（如过敏性哮喘）、肺炎、气道炎症、急性肾损伤、透明细胞肾细胞癌、肾纤维化、和梗阻性肾病。

20

附图说明

- 图1：ApoE通过其C端片段（ApoE CT）减弱APP的淀粉样代谢，增加其非淀粉样代谢产物（ α -CTF）。面板A和B：在HEK 293T细胞中过表达的ApoE2和ApoE3可以显著增加共表达的APP经过非淀粉样代谢通路（ α 剪切）产生的 α -CTF，而ApoE4不可以。统计结果在面板B，N=8，paired或者one sample t-test。面板C：通过瞬时转染过表达的ApoE2减少了共表达的APP生成的总A β 40，N=8，paired或者one sample t-test。面板D和E：免疫印迹实验表明过表达的ApoE CT增加了共表达的APP生成的 α -CTF，而过表达ApoE2或ApoE4的N端片段（ApoE2 NT，ApoE4 NT）则不改变 α -CTF的产生，统计结果在面板E，N=8，paired或者one sample t-test。面板F和G：过表达ApoE CT降低了由APP生成的A β 40和A β 42，而过表达ApoE2 NT、ApoE3 NT或者ApoE4 NT均不改变A β ，N=5，one sample t-test。面板A-G：HEK 293T细胞。面板H：在小鼠的大脑皮

层和海马原代培养神经元中使用慢病毒表达系统（lentivirus）表达的ApoE CT可以降低神经元内源产生的A β 40。启动子是hSyn。N=7, one sample t-test。面板I：使用慢病毒在多能干细胞系诱导得到的人神经元中表达的ApoE CT同样可以减少神经元产生的内源性A β 40。启动子是hSyn，N=5, unpaired t-test。Western Blot检测蛋白APP， α -CTF和ApoE，A β 通过ELISA检测。

图2：培养液中的ApoE2和ApoE CT不能增加细胞中APP的非淀粉样代谢产物。面板A：免疫印迹实验检测培养液中含有的ApoE2和ApoE CT蛋白。面板B和C：与含有ApoE2或者ApoE CT蛋白的细胞培养液共孵育并不改变细胞中APP所生成的 α -CTF，统计结果在面板C，N=9, one sample t-test。面板D：免疫荧光实验显示，含有ApoE2或者ApoE CT蛋白的细胞培养液共孵育HEK 293T细胞之后在细胞内无法检测到ApoE2或者ApoE CT蛋白的大量存在，只有很少一部分附着于个别细胞表面。而利用脂质体在HEK 293T细胞中瞬转表达的ApoE CT则大量存在于细胞内。面板E：免疫荧光实验显示，与含有ApoE2或者ApoE CT蛋白的培养液共孵育后，小鼠原代培养神经元内无法检测到ApoE2或者ApoE CT蛋白的大量存在，ApoE只有很少一部分附着于个别神经元表面。而利用慢病毒表达的ApoE CT则大量存在于神经元内。MAP2标记神经元，DAPI标记细胞核。

图3：ApoE CT减少A β 的核心序列。面板A、B和C：在HEK 293T细胞中过表达不同的ApoE CT突变体对APP生成A β 的影响。面板A：CT NA1/2/3/4/5：在ApoE CT的N端添加ApoE原有的1、2、3、4或5个氨基酸残基。CT ND3/4：在ApoE CT的N端删除3或4个氨基酸残基。CT CD5/10：在ApoE CT的C端删除5或10个氨基酸残基。ELISA测量不同ApoE CT突变体对A β 40的影响。面板B：CT ND1/2/5：在ApoE CT的N端删除1、2或5个氨基酸残基。ELISA测量不同ApoE CT突变体对A β 40的影响。面板C：CT ND3CD10/11/12/13/14/15/20/25：在ApoE CT的N端删除3个氨基酸残基的同时，在C端删除10、11、12、13、14、15、20或25个氨基酸。ELISA测量不同ApoE CT突变体对A β 40的影响。N=5（面板A和B）或7（面板C），one sample t-test。

图4：ApoE CT并不改变APP分泌酶的表达量。面板A：ApoE CT不影响APP代谢酶mRNA的表达。面板B：ApoE CT不影响APP代谢酶的蛋白表达量。ADAM10：APP的 α 分泌酶；BACE1：APP的 β 分泌酶；PS1和PS2： γ 分泌酶的核心活性亚基蛋白。使用qRT-PCR和Western Blot分别检测mRNA和蛋白水平。表达GFP的细胞为负对照。N=9, one sample t-test。

图5: ApoE CT模拟了 γ 分泌酶抑制剂对APP剪切的影响, 抑制了 β -CTF的 γ 剪切。面板A和B: 过表达的 γ 分泌酶活性中心蛋白PS1可以降低 α -CTF的生成, 而表达的ApoE CT或者使用1 μ M PF03084014 (γ 分泌酶抑制剂) 处理均会增加 α -CTF的生成。统计结果在面板B, N=11, paired或者one sample t-test。面板C和D: 过表达的ApoE CT可以抑制由 β -CTF生成的A β 40 (N=4) 和A β 42 (N=6), one sample t-test。面板E: 过表达的ApoE CT不影响APP Δ AICD经过 β 酶切而生成的A β 40, N=4, one sample t-test。Western Blot检测蛋白, ELISA检测A β 。

图6: ApoE CT影响APP的剪切需要 γ 分泌酶的存在。面板A和D: γ 分泌酶活性中心蛋白PS1和PS2被敲除的HEK 293T细胞中 (PS1/2 dKO), α -CTF大量增加, 此时过表达的ApoE CT不再进一步增加 α -CTF, 统计结果在面板D (标注GFP1的两个柱子)。面板B、C和D: 在补充表达PS1或者PS2的PS1/2 dKO细胞中, 过表达的ApoE CT再次增加了 α -CTF, 统计结果在面板D, N=8, paired t-test。面板E: 在补充表达PS2的PS1/2 dKO细胞中, 过表达ApoE CT可以减少APP生成的A β 40, N=4, one sample t-test。Western Blot检测蛋白, ELISA检测A β 40。

图7: 体外纯化的ApoE2以浓度依赖性的方式直接抑制APP的 γ 酶切。面板A: 免疫印迹显示分离纯化的 β -CTF, ApoE2, ApoE2 NT, PS1, NCT, PEN2和GFP。面板B: 在纯化的系统中, γ 分泌酶剪切 β -CTF生成A β 40的反应可以被10 μ M PF03084014 (γ 分泌酶抑制剂) 抑制, N=3, paired t-tests。面板C: 纯化的ApoE2以剂量依赖性的方式抑制 γ 分泌酶对 β -CTF剪切, 减少A β 40的生成。ApoE2的半抑制浓度约为1.2 μ M, N=3。面板D: 纯化的ApoE2可以抑制 β -CTF经过 γ 酶切而生成的A β 40, 但是ApoE2 NT不能抑制 γ 分泌酶对 β -CTF剪切, N=3, paired t-tests。Western Blot检测蛋白, ELISA检测A β 40。

图8: ApoE CT不抑制APLP1的 γ 酶切。1 μ M PF03084014 (γ 分泌酶抑制剂) 抑制了HEK 293T细胞中外源表达的APLP1的 γ 剪切, 增多了APLP1经过 α 剪切生成的 α -like CTF; 但是ApoE CT并不会增多APLP1产生的 α -like CTF。

图9: 神经元中过表达的ApoE CT减少了5xFAD小鼠模型脑中的淀粉样斑块。面板A: 5xFAD小鼠模型 subiculum 区域淀粉样斑块 (THS 标记) 和ApoE CT或者GFP的共染色代表性图片。在5xFAD小鼠中使用腺相关病毒 (AAV) 表达系统在神经元中表达ApoE CT (一月龄注射, 七月龄分析), GFP作为对照, 启动子是hSyn (human synapsin)。编码多肽的核酸序列前面加有信号肽编码序列。统计结果在面板B、C、D和E。面板B: 表达ApoE CT的小鼠 subiculum 区域每个淀粉样斑块

(plaque) 的平均面积更小 (面板 B), 平均荧光强度更弱 (面板 C), 总面积中所占比例更小 (面板 D), 斑块的密度也更低 (面板 E)。THS 用来标记淀粉样斑块。N=33, unpaired t-test。

图 10: 神经元中表达的 ApoE2 可以抑制小鼠神经元内源产生的 A β 40。面板 A: 在小鼠的原代培养神经元中使用慢病毒表达系统 (lenti-virus) 表达的 ApoE2 可以降低小鼠神经元 (mouse neurons) 产生的内源性 A β 40, GFP 作为对照。N=7, paired t-test。面板 B: 在野生型小鼠 (WT mouse) 大脑中利用 AAV 表达的 ApoE2 降低了小鼠脑中的内源 A β 40, GFP 作为对照。N=5, unpaired t-test。使用 hsyn 启动子保证神经元特异性表达。ELISA 检测 A β 。

图 11: 在两端添加标签蛋白的 ApoE2 或 ApoE CT 依然具有调控 APP 剪切的活性。面板 A 和 B: 在 HEK 293T 细胞中过表达的含有标签蛋白 V5 的 ApoE2-V5 (C 端添加标签蛋白) 和 V5-ApoE2 (N 端添加标签蛋白) 都可以显著增加 APP 所产生的 α -CTF。统计结果在面板 B。N=6, one sample t-test。面板 C 和 D: 在 HEK 293T 细胞中过表达的在 ApoE CT 的 C 端或者 N 端添加标签蛋白 V5 的 ApoE CT-V5 和 V5-ApoE CT 都可以显著增加 APP 所产生的 α -CTF, 统计结果在面板 D。N=6, one sample t-test。Western Blot 检测 APP 及其剪切片段。

图 12: ApoE CT 的突变依然可以调控 APP 的剪切。面板 A 和 B: 在 HEK 293T 细胞中过表达的 ApoE CT, ApoE CT 的单个位点或者双位点突变, CT A20、CT A40、CT A60、CT A65、CT A72、CT A80 和 CT A36/74 都显著地增加了 α -CTF。统计结果在面板 B。N=6, one sample t-test。面板 C 和 D: 在 HEK 293T 细胞中过表达多位点突变的 CT R10、CT LF5 和 CT LM5 和 ApoE CT 同样能够显著增加 α -CTF; 但是 CT E5、CT E10、CT E20 和 CT F5 则失去了增加 α -CTF 的活性。统计结果在面板 D。N=4, one sample t-test。Western Blot 检测蛋白。

图 13: 在 ApoE2 的内部添加或者删除氨基酸序列, ApoE2 依然可以调控 APP 代谢。面板 A: 在 HEK 293T 细胞中与 APP 共表达的 ApoE2-M3F 增加了 α -CTF。面板 B: 在 HEK 293T 细胞中与 APP 共表达的 ApoE2 MD10 也增加了 α -CTF。

图 14: 非人源的 ApoE CT 同样调控 APP 的剪切。面板 A 和 B: 在 HEK 293T 细胞中过表达的与人源 ApoE CT 序列高度相似的非人灵长类来源的 ApoE CT 显著增加了 α -CTF, 并且其活性与人源 ApoE CT 的活性相同。统计结果在面板 B。N=6, one sample t-test。Western Blot 检测蛋白。人源与猴源 ApoE CT 序列比对在面板 C。

图15: 连有穿膜肽的ApoE依然具有调控APP剪切的活性。面板A和B: 在HEK 293T细胞中将APP与R9-ApoE2、FGF4-ApoE2或者RDP-ApoE2共表达, GFP作为阴性对照组。共表达的R9-ApoE2和RDP-ApoE2显著增加了 α -CTF。统计结果在面板B。N=5, one sample t-test。Western Blot检测蛋白。

5 图16: 在细胞中表达的ApoE CT需要连有信号肽才能具有调控APP剪切的活性。面板A和B: 在HEK 293T细胞中过表达的在N端连有载脂蛋白A1信号肽的ApoE CT突变体(ASP CT)和含有载脂蛋白J信号肽的ApoE CT突变体(JSP CT)依然可以显著增加 α -CTF。在细胞中表达没有连接信号肽的NSP CT则不能调控APP剪切而增加 α -CTF。统计结果在面板B。N=6, one sample t-test。Western Blot检测蛋白。

10 图17: ApoE2通过其C末端区域增加 α -CTF并减少A β 的产生。面板A: 人类(顶部)或猴子(底部)皮质中ApoE和NeuN(神经元标志物)的共免疫荧光染色的代表图像。箭头表示ApoE阳性神经元。面板B: 人脑皮层中ApoE和APP的共免疫荧光染色的代表性图像。面板C和D: 瞬时共表达APP和GFP、ApoE2、ApoE3或ApoE4的N2A细胞中的全长APP(FL-APP)、 α -CTF和ApoE信号的Western blot和相应的统计分析。N=8, one sample t-test。面板E: 瞬时共表达APP、BACE1和GFP、ApoE2、ApoE3或ApoE4的HEK 293T细胞中的A β 40的归一化统计分析。N=8, one sample t-test。面板F和G: 瞬时共表达APP和GFP、ApoE CT、ApoE2 NT或ApoE4 NT的N2A细胞中的全长APP(FL-APP)、 α -CTF和ApoE信号的Western blot和相应的统计分析。N=8, one sample t-test。面板H: 瞬时共表达APP、BACE1和GFP、ApoE CT的N2A细胞中的A β 40的归一化统计分析。N=4, one sample t-test。面板I和J: 瞬时共表达APP和GFP、ApoE2或ApoE CT的N2A细胞中的全长APP(FL-APP)、 α -CTF和ApoE信号的Western blot和相应的统计分析。N=6, one sample t-test。面板K: 利用慢病毒系统瞬时表达GFP或者ApoE CT的小鼠皮层(cortical neurons)或者(hippocampal neurons)神经元中的A β 40归一化统计分析。启动子是hSyn。N=7, one sample t-test。面板L: 利用慢病毒系统瞬时表达GFP或者ApoE CT的人源多能干细胞诱导的神经元(human neurons)中的A β 40归一化统计分析。启动子是hSyn。N=5, unpaired t-test。

25 图18: ApoE CT与APP和 γ 分泌酶相互作用。面板A: 瞬时共表达APP-FLAG和GFP、ApoE2或者ApoE CT的N2A细胞中ApoE和APP的免疫荧光染色的代表性图像。面板B: 瞬时表达GFP、ApoE2-V5或者ApoE CT-V5的原代培养神经元中ApoE和内源表达的APP的免疫荧光染色的代表性图像。面板C: 瞬时表达ApoE CT-V5的人源多能干细胞诱导的神经元中ApoE CT和内源表达的APP的免疫荧光染色的代表性图像。MAP2染

色表示神经元，DAPI染色表示细胞核。面板D：免疫印迹检测在HEK 293T细胞中共表达的APP-APEX2标记的ApoE2。面板E：免疫印迹检测在HEK 293T细胞中共表达的APP-APEX2标记的ApoE CT。面板F：免疫印迹检测在HEK 293T细胞中共表达的ApoE2-APEX2标记的APP。面板G：免疫印迹检测在小鼠神经元细胞中表达的ApoE-APEX2标记的神经元中内源表达的APP和阴性对照COX2。面板H：免疫印迹检测在HEK 293T细胞中与ADAM10、BACE1、PS1或者PS2分别瞬时共表达的ApoE2-APEX2标记的ADAM10、BACE1、PS1和PS2。面板I：免疫共沉淀检测在HEK 293T细胞中与ApoE2、ApoE2 NT或者ApoE CT分别瞬时共表达的 β -CTF-FLAG相互作用的ApoE。面板J：免疫共沉淀检测在HEK 293T细胞中与ApoE2、ApoE2 NT或者ApoE CT分别瞬时共表达的 γ 分泌酶（HA-APH，V5-NCT，FLAG-PEN2）相互作用的ApoE。面板K：免疫共沉淀检测人脑组织中内源性 γ 分泌酶（NCT、PS1、PS2 和 PEN2）和内源性ApoE的相互作用。

图19：ApoE CT通过抑制APP的 γ 酶切增加 α -CTF和减少A β 。面板A和B：免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞瞬时表达APP和GFP（条带1）；共表达APP和PS1时，1微摩尔 γ 分泌酶抑制剂PF03084014处理与否（条带2，条带3）；共表达APP、PS1和ApoE CT（条带4）；这几种表达或者药物处理条件下，APP产生 α -CTF的情况。N=11。面板C和D：免疫印迹检测和统计分析1微摩尔 γ 分泌酶抑制剂PF03084014处理时，在HEK 293T细胞中GFP或者ApoE CT对共表达APP生成 α -CTF的影响，对照组不用抑制剂处理。N=7。面板E：ELISA检测分别瞬时共表达 β -CTF和GFP或ApoE CT的HEK 293T细胞中生成的A β 40。N=4。面板F：ELISA检测分别瞬时共表达 β -CTF和GFP或ApoE CT的HEK 293T细胞中生成的A β 40。N=6。面板G和面板H：ELISA检测APP Δ AICD和GFP或者ApoE CT分别共表达的HEK 293T生成A β 40的结果。面板G，细胞培养基。面板H，细胞裂解液。面板B、D、E、F、G和H，one sample t-test。

图20： γ 分泌酶对于ApoE CT调节APP的代谢是必需的。面板A：免疫印迹检测野生型（WT）、PS1或者PS2单敲除（PS1 KO，PS2 KO）、PS1和PS2双敲除（PS1/2 dKO）HEK 293T细胞系中PS1和PS2的蛋白表达。面板B：APP表达在野生型HEK 293T细胞系中（条带1）；APP表达在PS1单敲除HEK 293T细胞系中（条带2）；APP表达在1微摩尔 γ 分泌酶抑制剂PF03084014处理的PS1单敲除HEK 293T细胞系中（条带3）；APP和PS1共表达在PS1单敲除HEK 293T细胞系中（条带4）。免疫印迹检测不同条件下，细胞中 α -CTF的含量。面板C和D：分别在野生型（WT）和PS1单敲除（PS1 KO）HEK 293T细胞系中免疫印迹检测和统计分析ApoE CT对共表达的APP经酶切产生的 α -CTF

的影响，GFP作为对照。N=9。面板E和F：分别在野生型和PS2单敲除（PS2 KO）HEK 293T细胞系中免疫印迹检测和统计分析ApoE CT对共表达的APP经酶切产生的 α -CTF的影响，GFP作为对照。N=9。面板G和J：分别在野生型（WT）和PS1和PS2双敲除（PS1/2 dKO）HEK 293T细胞系中免疫印迹检测和统计分析ApoE CT对共表达的APP产生 α -CTF的影响，GFP作为对照。N=8。面板H和J：免疫印迹检测和统计分析在PS1和PS2双敲除（PS1/2 dKO）HEK 293T细胞中分别共表达APP、PS1和GFP或者ApoE CT生成的 α -CTF。N=8。面板I和J：免疫印迹检测和统计分析在PS1和PS2双敲除（PS1/2 dKO）HEK 293T细胞中分别共表达APP、PS2和GFP或者ApoE CT生成的 α -CTF。N=8。面板K和L：免疫印迹检测和统计分析在PS1和PS2双敲除（PS1/2 dKO）HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP或者ApoE2生成的 α -CTF。N=9。面板M：ELISA检测在PS1和PS2双敲除（PS1/2 dKO）HEK 293T细胞中分别共表达 β -CTF、PS2和GFP或者ApoE CT生成的A β 40。N=4。面板D、F、J、L和M，one sample t-test。

图21：小鼠神经元中敲低内源性ApoE导致APP的代谢产物CTF_{14kD}含量降低和A β 升高。面板A：免疫印迹检测利用慢病毒表达系统瞬时表达shScramble（阴性对照）、shApoE_1（ApoE的shRNA_1）或 shApoE_2（ApoE的shRNA_2）的原代培养小鼠神经元中内源表达的ApoE。面板B：1微摩尔 γ 分泌酶的抑制剂PF03084014处理时，小鼠神经元中APP的代谢物CTF_{14kD}的相对含量。面板C和D：免疫印迹检测和统计分析利用慢病毒表达系统瞬时表达shScramble、shApoE_1或 shApoE_2的原代培养小鼠神经元中内源表达的APP的代谢物CTF_{14kD}的相对含量。N=5，one sample t-test。面板E：1微摩尔 γ 分泌酶的抑制剂PF03084014处理时，免疫印迹检测利用慢病毒表达系统瞬时表达shScramble、shApoE_1或 shApoE_2的原代培养小鼠神经元中内源表达的APP的代谢物CTF_{14kD}的相对含量。面板F：ELISA分析利用慢病毒表达系统瞬时表达shScramble、shApoE_1或 shApoE_2的原代培养小鼠神经元中内源表达的APP产生的A β 40。N=5，one sample t-test。

图22：ApoE2直接抑制APP的 γ 酶切。面板A：免疫印迹分析表达纯化的 β -CTF、ApoE2、ApoE2 NT、PS1、NCT、PEN2和GFP。面板B：ELISA检测和统计分析纯化的 β -CTF、纯化的 β -CTF和 γ 分泌酶共孵育、以及1微摩尔 γ 分泌酶的抑制剂PF03084014处理时纯化的 β -CTF和 γ 分泌酶共孵育，三种不同条件下生成的A β 水平。N=3，student's t test。面板C：ELISA检测和统计分析纯化的 β -CTF与一系列浓度梯度的ApoE2共孵育生成的A β 。IC₅₀大约是1.2 $\pm$ 0.48微摩尔。面板D：ELISA检测和统计分析纯化的 β -CTF

分别与2.5微摩尔纯化的GFP、ApoE2和ApoE2 NT共孵育生成的A β 。N=3, student's t test。

图23: 神经元表达的ApoE CT迁移至淀粉样斑块并减缓5 $\times$ FAD小鼠脑中淀粉样斑块的形成。面板A: 实验模式图。面板B: 在5 $\times$ FAD小鼠脑神经元中表达10周的腺相关病毒GFP或者ApoE CT和淀粉样斑块 (plaque) 在小鼠脑中的免疫荧光染色代表性图片。5
5 面板C: 统计分析淀粉样斑块的平均大小。面板D: 统计分析淀粉样斑块总面积在subiculum区域所占的比例。面板E: 统计分析淀粉样斑块的密度。N=21。

图24: 在5 $\times$ FAD小鼠神经元中表达的ApoE通过CT在淀粉样斑块周边聚集。面板A: 在5 $\times$ FAD小鼠皮层神经元中表达三个月的慢病毒ApoE2-IRES-GFP、ApoE2 NT-IRES-GFP和ApoE CT-IRES-GFP与淀粉样斑块 (GFP) 的免疫荧光染色代表性图片。10
10 面板B: 在5 $\times$ FAD小鼠皮层神经元中表达一个月的慢病毒ApoE CT与人源APP (hAPP) 的免疫荧光染色代表性图片。面板C: 在野生型小鼠脑神经元中表达三个月的慢病毒ApoE CT与hAPP的免疫荧光染色代表性图片。Plaque, 淀粉样斑块。

图25: 人神经元中存在内源性ApoE, AD患者脑中淀粉样斑块与ApoE共定位。面板A: 非AD患者 (62岁, 顶部) 或者AD患者 (86岁, 底部) 皮质中ApoE和NeuN (神经元标志) 的免疫荧光共染色的代表图像。箭头表示ApoE阳性神经元。面板B: ApoE15
15 阳性神经元相对于人脑皮层总神经元的百分比。面板C: ApoE 阳性神经元相对于所有ApoE阳性细胞的百分比。年轻 (young): 16-23岁, n=3; 老年 (old): >60岁, n=3; AD: >60岁, n=6。面板D: 人脑皮层中ApoE和GFAP (星形胶质细胞标志) 的免疫荧光共染色的代表图像。20
20 面板E: 非AD患者 (62岁, 顶部) 或者AD患者 (86岁, 底部) 皮质中ApoE和淀粉样斑块 (6E10) 的免疫荧光共染色的代表性图像。

图26: 在HEK 293T细胞中, ApoE2通过ApoE CT增加 α -CTF和减少A β 。面板A: 免疫印迹检测在HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP或者ADAM10生成的 α -CTF。面板B: 免疫印迹检测1微摩尔ADAM10的抑制剂GI254023X处理的HEK 293T细胞生25
25 成的 α -CTF, 对照没有用GI254023X处理。面板C和D: 免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP、ApoE2、ApoE3或ApoE4生成的 α -CTF。N=12。面板E和F: 免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP、ApoE2 NT、ApoE3 NT或ApoE4 NT生成的 α -CTF。N=12。面板G和H: 免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP或ApoE CT生成的 α -CTF。N=18。面板I:30
30 ELISA检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP、BACE1和GFP、ApoE CT、ApoE2 NT、ApoE3 NT或ApoE4 NT产生的分泌到培养基中的A β 40。N=4。面板J: ELISA

检测在HEK 293T细胞中分别共表达APP、BACE1和GFP或ApoE CT产生的细胞裂解液中的A β 40。N=5。面板K：ELISA检测在HEK 293T细胞中分别共表达APP、BACE1和GFP或ApoE CT产生的A β 42和A β 42/A β 40。N=6。面板L和M：免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别将APP、BACE1分别与GFP或ApoE CT共表达生成的 β -CTF。N=13。面板N和O：免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP、ApoE2或ApoE CT生成的 α -CTF。N=6。面板P和Q：免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达mouse APP (mAPP)和GFP或者ApoE CT生成的 α -CTF。N=6。面板R和S：ELISA检测和统计在HEK 293T细胞中分别共表达APPSW和GFP或者ApoE CT生成的A β 40；面板R，培养基中的A β 40；面板S，细胞裂解液中的A β 40。N=6。面板T和U：免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP和GFP或ApoA1生成的 α -CTF。N=6。面板V：ELISA检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP、BACE1和GFP或ApoA1生成的A β 40。N=3。面板D、F、H、I、J、K、M、O、Q、R、S、U和V，one sample t-test。

图27：培养液中的ApoE2和ApoE CT不能改变APP的代谢。面板A：免疫印迹检测细胞培养液中的ApoE2和ApoE CT。面板B和C：免疫印迹检测和统计分析培养液中GFP、ApoE2或者ApoE CT对共表达在HEK 293T细胞中APP生成 α -CTF的影响。N=9。面板D：免疫印迹检测不同条件下培养液中的ApoE2。原始含有ApoE2的培养液（条带1），与未转染细胞孵育48小时后的含有ApoE2的培养液（条带2），在37°C培养箱中单独保存48小时的含有ApoE2的培养液（条带3）。面板E：免疫荧光检测HEK 293T细胞摄取的培养液中的ApoE2和ApoE CT，以及HEK 293T细胞表达的ApoE CT。DAPI，细胞核标志物。面板F：免疫荧光检测神经元摄取的培养基中的ApoE2和ApoE CT，以及神经元表达的ApoE CT。MAP2，成熟神经元的标志物；DAPI，细胞核标志物。面板G：免疫印迹分析纯化的ApoE2和来自细胞裂解物或细胞培养基的ApoE2。

图28：在APP的 γ 酶切位点附近的AD相关突变影响ApoE CT的活性。面板A和B：免疫印迹检测统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP不同的AD突变和GFP或者ApoE CT生成的 α -CTF。N=7，one sample and student's t-test。

图29：当 α 或 β 分泌酶被抑制时，ApoE CT仍然能够调节APP的代谢。面板A：免疫印迹检测和分析1微摩尔ADAM10抑制剂GI254023X处理时，在HEK 293T细胞中ApoE CT对共表达的APP生成 α -CTF的影响；对照组不用抑制剂处理。N=9。面板C和D：ELISA检测和统计分析免疫印迹检测1微摩尔ADAM10抑制剂GI254023X处理时，在HEK 293T细胞中ApoE CT对共表达的APP和BACE1生成A β 的影响；对照组不用抑

制剂处理。面板C, 细胞培养基中的A β 40; 面板D, 细胞裂解液中的A β 40。N=6。面板E和F: 免疫印迹检测和统计分析5微摩尔BACE1抑制剂AZD3839处理时, 在HEK 293T细胞中ApoE CT对共表达的APP生成 α -CTF的影响; 对照组不用抑制剂处理。N=10。面板G和H: 免疫印迹检测和统计分析在HEK 293T细胞中分别共表达APP_{M596V}和GFP或者ApoE CT生成的 α -CTF。N=7。面板I: qRT-PCR检测和统计分析表达的ApoE2或者ApoE CT对HEK 293T细胞内源性ADAM10、BACE1、PS1和PS2 mRNA表达量的影响。面板J: 免疫印迹检测ApoE2或者ApoE CT对HEK 293T细胞内源性ADAM10、BACE1、PS1和PS2蛋白表达量的影响。面板K: 免疫印迹检测ApoE CT对共表达在HEK 293T细胞中的APP在细胞表面表达的影响。表达GFP (-) 和ApoE CT (+) 的HEK 293T细胞的细胞表面蛋白用碘基-N-羟基琥珀酰亚胺-生物素标记, 并用链霉亲和素偶联的琼脂糖珠分离。

图30: ApoE CT无法抑制NOCTH和APLP1的 γ 酶切。面板A: 在HEK 293T细胞中, 只表达N100-V5 (条带1); 共表达的N100-V5和 γ 分泌酶 (条带2); 1微摩尔 γ 分泌酶的抑制剂PF03084014处理共表达的N100-V5和 γ 分泌酶 (条带3); 共表达N100-V5、 γ 分泌酶和ApoE CT (条带4)。免疫印迹检测以上条件表达时N100-V5的剪切。面板B: 免疫印迹检测在HEK 293T细胞中共表达APP、 γ 分泌酶和ApoE CT时 α -CTF的含量。面板C: 在HEK 293T细胞中, 只表达APLP-V5 (条带1); 1微摩尔 γ 分泌酶的抑制剂PF03084014处理表达的APLP-V5 (条带2); 共表达APLP1-V5和ApoE CT (条带3)。免疫印迹检测以上条件表达时APLP1-V5的代谢。

图31: 体外纯化的 β -CTF、ApoE2、ApoE2 NT和 γ 分泌酶。考马斯亮蓝染色显示纯化的 β -CTF-Myc-6 $\times$ His (面板A)、ApoE2-3 $\times$ FLAG (面板B)、ApoE2NT-3 $\times$ FLAG (面板C)、 γ 分泌酶 (面板D) (NCT-V5-6 $\times$ His; PLAG-PEN2; APH; 全长PS1, FL-PS1; PS1的N端片段, PS1 NTF; PS1的C端片段, PS1 CTF) 和3 $\times$ FLAG-GFP (面板E)。

图32: 本实例所用人脑信息表。

图33: 人ApoE蛋白结构。N端结构域 (残基1-167) 和C端结构域 (残基206-299) 由柔性铰链区 (残基168-205) 连接。三种亚型为ApoE2 (Cys112; Cys158), ApoE3 (Cys112; Arg158) 和ApoE4 (Arg112; Arg158)。

具体实施方式

应理解, 在本发明范围内, 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, 从而构成优选的技术方案。

人源载脂蛋白E (ApoE) 主要包括ApoE2、ApoE3和ApoE4三种亚型。ApoE包含三个区域：一个N端结构域(ApoE NT)、一个铰链区域和一个保守的C端结构域(ApoE CT)。三种ApoE亚型之间的唯一序列差异在于它们的N端结构域 (图33)。示例性的ApoE2 (人源ApoE2) 的氨基酸序列如下所示：

- 5 KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEE
LLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLG
ADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKC
LAVYQAGAR*EGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERL*
RARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS
10 WFE
EPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (SEQ ID NO:12, 全长 299
氨基酸残基；下划线序列为 216-299 位点 ApoE CT SEQ ID NO:33；方框为 1-167 位
点 N 端结构域；斜体为 168-205 位点铰链区；残基 206-299 为 C 端结构域)。

- KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
15 LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGA
DMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKCL
AVYQAGAR (SEQ ID NO:79; ApoE2 N端结构域)

- EGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQE (SEQ ID NO:80 ;
20 ApoE2或ApoE3铰链区)

- KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGA
DMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKCL
25 AVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQE (SEQ ID
NO:81; ApoE2 N端结构域+铰链区)

示例性的ApoE3 (人源ApoE3) 的氨基酸序列如下所示：

- KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEE
30 LLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLG
ADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKR

LAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERL
RARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWF
EPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (SEQ ID NO:89, 全长 299
 氨基酸残基; 下划线序列为 216-299 位点 ApoE CT SEQ ID NO:33; 方框为 1-167 位
 点 N 端结构域; 斜体为 168-205 位点铰链区; 残基 206-299 为 C 端结构域)。

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRVWQTLSEQVQEEL
 LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGA
 DMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKRL
 AVYQAGAR (SEQ ID NO:90; ApoE3 N 端结构域)

10

- 本发明提供了一种分离的 ApoE 构建物, 其包含一个 ApoE 多肽。该 ApoE 多肽
 包含 ApoE 蛋白 C 端结构域的一部分序列 (例如 SEQ ID NO:12 第 221-274 位氨基
 酸)、或基于该序列的改造序列。本发明是基于发明人对所述 ApoE 构建物 (例如本
 发明所述的 ApoE 多肽或 ApoE2) 的意料发现: (i) 其可以在神经元中 (体内或体外)
 以细胞自主性的方式调控前体淀粉蛋白蛋白质(amyloid precursor protein, APP)的剪切;
 (ii) 其可以抑制 (例如抑制至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、
 90%、95%、或 100%) γ -分泌酶的酶活, 例如抑制 γ -分泌酶介导的 APP γ -剪切, 与 γ -
 分泌酶抑制剂 (例如 PF03084014) 的 APP γ -剪切抑制效果相似; (iii) 其可以降低 (例
 如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%)
 APP 的淀粉样代谢, 例如减少 (例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、
 70%、80%、90%、95%、或 100%) 淀粉样蛋白- β ($A\beta$) (例如 $A\beta$ 40 和/或 $A\beta$ 42)
 的生成, 或降低 (例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、
 90%、95%、或 100%) 对 C 末端片段- β (β -CTF) 的 γ -剪切; (iv) 其可以提高 (例如
 提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、
 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) APP 的非淀粉样代谢, 例如增加 (例如增加至少约
 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、
 10 倍、20 倍或更高) C 末端片段- α (α -CTF) 的生成; (v) 其不影响 (或影响不超过
 约 30%、20%、10%、5%或更少) α -分泌酶、 β -分泌酶、和/或 γ -分泌酶 (或其亚基)
 (例如 ADAM10、BACE1、PS1 和/或 PS2) 的 mRNA 和/或蛋白质表达; (vi) 其不影
 响 (或影响不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) β -分泌酶介导的 APP β -剪切, 和
 /或 α -分泌酶介导的 APP α -剪切; (vii) 其不抑制 (或抑制不超过约 30%、20%、10%、

5%或更少)对非 APP 蛋白(例如 APLP1 (APP like protein 1) 或 Notch)或其片段的 γ -剪切, 不增加(或增加不超过约 30%、20%、10%、5%或更少)非 APP 蛋白 γ -剪切产生的 α -CTF, 说明所述 ApoE 构建物以底物特异性抑制 γ -剪切, 而 γ -分泌酶抑制剂则没有此底物特异性; (viii) 所述 ApoE 构建物可以减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) AD 模型小鼠脑中的淀粉样斑块, 例如减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 淀粉样斑块的平均斑块大小、总面积、和/或密度, 减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 神经元内 $A\beta$ (例如 $A\beta_{40}$ 和/或 $A\beta_{42}$) 生成, 降低(例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 小鼠的 AD 病理进程, 提高(例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) AD 小鼠存活率和/或寿命; (ix) 在所述 ApoE 构建物的 N 端和/或 C 端添加标签蛋白(例如纯化标签或检测标签), 和在某些所述 ApoE 构建物(例如 ApoE2 或 ApoE3)的内部添加或删除氨基酸残基(例如 ApoE2-M3F 或 ApoE2 MD10), 不会影响(或影响不超过约 30%、20%、10%、5%或更少)该 ApoE 构建物抑制 γ -分泌酶酶活, 例如抑制 γ -分泌酶介导的 APP γ -剪切; (x) 在所述 ApoE 构建物的 N 端或 C 端添加穿膜肽(cell-penetrating peptide, CPP) 可以提高(例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高)所述 ApoE 构建物的抑制 γ -分泌酶酶活的效果(如以上所述一个或多个效果); (xi) 在细胞内, 所述 ApoE 构建物的 N 端需要有信号肽才能调控 γ 分泌酶对 APP 的剪切, 但对信号肽的来源没有严格要求; (xii) 本发明所述的某些 ApoE 构建物(例如 ApoE CT (SEQ ID NO:33))甚至比 ApoE2 (例如 SEQ ID NO:12)和/或 ApoE3 (例如 SEQ ID NO:89) 全长蛋白有更高(例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高)的抑制 γ -分泌酶介导的 APP γ -剪切的活性; (xiii) 所述 ApoE 构建物对多种表达 APP 变体的细胞, 例如致病性瑞典 APP 突变体(APP_{sw})、保护性冰岛 APP 突变(A673T)、APP_{M596V}、或 APP 在 β -或 α -切割位点附近的突变(KM670/671NL、E693K、E693 Δ), 也有抑制 APP γ -剪切的效果, 例如减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) $A\beta$ 的生成; (xiv) 所述 ApoE 构建物可以与细胞内源 APP 呈现重叠的核周亚细胞分布模式, 与细胞内源的 APP、 α -分泌酶和 γ -分泌酶或其组分相互作用; (xv) 在 AD 模

型小鼠中，神经元局部表达（例如在皮质、齿状回(DG)和海马体 CA3 表达）的所述 ApoE 构建物可以从远处迁移到下托并积聚在淀粉样斑块周围，从而在这些淀粉样蛋白生成热点局部抑制 γ -分泌酶的酶活；和/或 (xvi) 与本发明所述 ApoE 构建物具有高度同源性(例如至少约 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的非人源 ApoE 构建物（例如猴 ApoE C 端序列）也具有类似的以上所述一个或多个特性。

本申请首次发现载脂蛋白E通过它的C端片段以细胞自主性的方式抑制 γ 分泌酶的酶切（即与 γ 分泌酶在同一细胞内发挥作用），抑制APP的淀粉样代谢，减少A β 生成；并且增加了APP的非淀粉样代谢产物， α -CTF；在AD模型小鼠脑中减缓淀粉样斑块的大小和密度。因此ApoE的C端片段可作为一个以 γ 分泌酶为靶点的药物，用于减缓（例如减慢至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或100%的AD发展进程）、治疗、或者预防AD和淀粉样脑血管病的发生和发展。此外，ApoE的C端片段作为一种 γ 分泌酶的抑制剂可能在多种生物过程发挥着作用，ApoE的C端片段的应用不限于神经退行性疾病领域，还可以用于癌症、炎症疾病、肾脏疾病等多种疾病，例如任何与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病（抑制 γ 分泌酶的酶切活性可以治疗或预防所述疾病）。常规 γ 分泌酶抑制剂在治疗中会引起严重的副作用，均与 Notch 信号缺陷相关，例如免疫抑制、胃肠道出血和腹泻以及癌性皮肤损伤。本发明提供的ApoE构建物不影响Notch的 γ -剪切，因此本发明提供的ApoE构建物和相关方法可能可以提供一种新型的高效且安全的治疗方案。

本申请进一步发现，载脂蛋白E的C端片段中SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸序列 (MGSRTDRLDEVKEQVAEVRKLEEQAAQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQ R; SEQ ID NO:78; “ApoE CT ND5CD25”)是该C端片段发挥生物功能（例如抑制 γ -分泌酶介导的APP γ -剪切）所必须含有的氨基酸序列。在一些实施方式中，载脂蛋白E的C端片段中起作用的最短片段是SEQ ID NO:12第220-274位氨基酸序列 (EMGSRTDRLDEVKEQVAEVRKLEEQAAQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQ R; SEQ ID NO:87)。在一些实施方式中，ApoE的C端片段中起作用的最短片段是SEQ ID NO:12第220-279位氨基酸残基：EMGSRTDRLDEVKEQVAEVRKLEEQAAQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQ RQWAGL (SEQ ID NO:34)。

1. 定义

除非另有特别指出,否则本发明的实施将采用在本领域技术内的化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学、细胞生物学、干细胞方案、细胞培养和转基因生物学的常规方法,其中许多在下文描述用于举例说明的目的。这样的技术已经在文献中充分说明。本文引用的所有公开文件、专利和专

5 利申请通过引入全文并入本文。

除非另有说明,本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属的技术领域的普通技术人员通常理解的含义。为了本发明的目的,定义以下术语,以同本技术领域通常理解的含义保持一致。

如本文所用,术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指延迟术语适用的疾

10 病或病患或此类疾病或病患的一种或多种症状的发作、延迟或逆转其进展、降低其严重程度或对其的缓解或预防。

术语“有效量”或“药学有效量”是指必需产生所需结果的一种或多种试剂的量和/或剂量和/或剂量方案,如,足以降低APP γ 剪切的量,或治疗神经退行性疾病(例如AD)相关的一种或多种症状的量,或足以减轻特征为哺乳动物脑中的淀粉样沉积

15 物的疾病的严重程度或延迟所述疾病进展的量(如,治疗有效量),足以降低特征为哺乳动物脑中的淀粉样沉积物的疾病的风险或延迟所述疾病的发作和/或降低最终的严重度的量(如,预防有效量)。

术语“减轻”是指减少或消除该病理或疾病的一种或多种症状,和/或减少该病理或疾病的一种或多种症状的速率或延迟该病理或疾病的一种或多种症状的发作或严重

20 程度和/或预防所述病理或疾病。在某些实施方案中,减少或消除病理或疾病的一种或多种症状包括但不限于减少或消除为病理或疾病特征的一个或多个标记(如,总-Tau(tTau)、磷酸化-Tau(pTau)、APPneo、可溶性A β 40、A β 42、pTau/A β 42比率和tTau/A β 42比率和/或CSF中一个或多个选自A β 42/A β 40比率、A β 42/A β 38比率、sAPP α 、sAPP α /sAPP β 比率、sAPP α /A β 40比率、sAPP α /A β 42比率等的组分的水平的增加),和

25 /或增加非淀粉样代谢产物如 α -CTF,和/或减少、稳定或逆转一个或多个诊断标准(如,临床痴呆评定(CDR))。

“个体”或“受试者”包括但不限于哺乳动物、鸟类、蛙类、鱼类、果蝇、线虫等。哺乳动物包括但不限于灵长类(例如人类,或非人类灵长类例如猴子),啮齿类(例如小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、松鼠、豚鼠和兔子),家畜(例如猪、牛、羊、马、

30 驴),宠物(例如猫、狗、兔和仓鼠)等。在一些实施方式中,所述个体是人类。

如本文所用的术语“制剂”或“药物制剂”或“剂型”或“药物制剂”是指含有至少一种用于递送至受试者的治疗剂或药物的组合物。

两条多肽或核酸序列之间的“序列同一性”表示所述序列之间相同的残基的数目占残基总数的百分比，且基于突变类型确定残基总数的计算。突变类型包括在序列任
5 一端或两端的插入(延伸)、在序列任一端或两端的缺失(截短)、一个或多个氨基酸/核苷酸的置换/替代、在序列内部的插入、在序列内部的缺失。举多肽为例(核苷酸同理)，如果突变类型为以下中的一种或多种：一个或多个氨基酸/核苷酸的置换/替代、在序列内部的插入和在序列内部的缺失，则残基总数以比较的分子中较大者来计算。如果
10 突变类型还包括在序列任一端或两端的插入(延伸)或在序列任一端或两端的缺失(截短)，则在任一端或两端插入或缺失的氨基酸的数量(例如，在两端插入或缺失的数量小于20个)并不计入残基总数中。在计算同一性百分数时，将正在比较的序列以产生序列之间最大匹配的方式比对，通过特定算法解决比对中的空位(如果存在的话)。

此处所用的术语“片段”指多肽并且被定义为给定多肽中特有的或特征性的任意分离部分。此处所用的该术语也指给定多肽中保留至少部分全长多肽活性的任意分离
15 部分。优选保留的活性部分至少为全长多肽活性的10%。更优选保留的活性部分至少为全长多肽活性的20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。更优选保留的活性部分至少为全长多肽活性的95%、96%、97%、98%或99%。最优选保留的活性部分为全长多肽活性的100%。此处所用的该术语也指包括全长多肽中至少一个确定序列元件的指定多肽的任意部分。优选该序列元件跨越全长多肽的至少4-5个，
20 更优选至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多氨基酸。

此处所用的术语“多肽”是指通过肽键相连的顺序氨基酸链。该术语用以指任意长度的氨基酸链，然而本领域普通技术人员知道该术语不仅指代长链，也可用于指含有通过肽键相连的2个氨基酸的最短链。

此处所用的术语“蛋白质”是指作用如离散单位的一个或多个多肽。如果单个多肽
25 即为离散的功能单位，且不需要与其他多肽的持久物理缔合以形成该独立的功能单位，则此处术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用。如果该离散功能单位由多于一个彼此物理缔合的多肽组成，则此处所用的术语“蛋白质”指物理偶联的并且共同作为离散单位起作用的多个多肽。

“重组表达多肽”、“重组多肽”和“经修饰的多肽”(或蛋白)是指从经遗传工程
30 修饰以表达该多肽的宿主细胞中表达的多肽。重组表达多肽可以与宿主细胞(如哺乳动物细胞)内正常表达的多肽相同或相似。重组表达多肽也可作为宿主细胞的外源物，

例如异源于哺乳动物宿主细胞正常表达的多肽。或者重组表达多肽为嵌合多肽，例如部分多肽含有与哺乳动物宿主细胞内正常表达的多肽相同或相似的氨基酸序列，而其他部分为宿主细胞外源物。

- 5 术语“氨基酸”意指二十种常见的天然存在的氨基酸。天然存在的氨基酸包括丙氨酸(Ala; A)、精氨酸(Arg; R)、天冬酰胺(Asn; N)、天冬氨酸(Asp; D)、半胱氨酸(Cys; C)、谷氨酸(Glu; E)、谷氨酰胺(Gln; Q)、甘氨酸(Gly; G)、组氨酸(His; H)、异亮氨酸(Ile; I)、亮氨酸(Leu; L)、赖氨酸(Lys; K)、蛋氨酸(Met; M)、苯丙氨酸(Phe; F)、脯氨酸(Pro; P)、丝氨酸(Ser; S)、苏氨酸(Thr; T)、色氨酸(Trp; W)、酪氨酸(Tyr; Y)和缬氨酸(Val; V)。
- 10 可以保守性置换非关键的氨基酸而不影响蛋白质的正常功能。保守性置换意指用化学或功能相似的氨基酸置换氨基酸。提供相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。举例来说，在一些实施方式中，以下提供的氨基酸组被认为是相互的保守性置换。

在某些实施方式中，被认为是相互保守性置换的氨基酸的所选组：

酸性残基	D和E
碱性残基	K、R和H
亲水性不带电荷的残基	S、T、N和Q
脂肪族不带电荷的残基	G、A、V、L和I
非极性不带电荷的残基	C、M和P
芳香族残基	F、Y和W

在某些实施方式中，被认为是相互的保守性置换的氨基酸的其他所选组：

组 1	A、S和T
组 2	D和E
组 3	N和Q
组 4	R和K
组 5	I、L和M
组 6	F、Y和W

- 15 在某些实施方式中，被认为是相互的保守性置换的氨基酸的其他所选组：

组 A	A和G
组 B	D和E
组 C	N和Q

组 D	R、K和H
组 E	I、L、M、V
组 F	F、Y和W
组 G	S和T
组 H	C和M

如本文使用的，术语”约”或”约 “是指与参考数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺度、大小、量、重量或长度相比较，改变多达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺度、大小、量、重量或长度。在一个实施方式中，术语 “约”或 “大约” 是指围绕参考数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺度、大小、量、重量或长度±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%的数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺度、大小、量、重量或长度范围。

如本文使用的，术语”基本上(substantially/essentially) “是指与程度、参考数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺度、大小、量、重量或长度相比较，是约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的程度、数量、水平、值、数量、频率、百分比、尺度、大小、量、重量或长度。

数值范围，包含该范围的端点值，以及范围的每个具体数值，例如 “16至100个氨基酸之间” 包括16和100，以及16至100之间的每一个具体数值。

在本说明书全文，除非上下文另有要求，否则术语"包含"， “包括”、 “含有” 和 “具有” 应理解为暗示包括所述步骤或要素或者步骤或要素组，但不排除任何其他步骤或要素或者步骤或要素组。在特定实施方式中，术语"术语"包含"， “包括”、 “含有” 和 “具有” 同义使用。

“由……组成”意指包括但不限于在短语”由……组成”后的任何。因此，短语”由……组成 “是指示所列出的要素是需要的或强制性的，并且没有其他要素是可以存在的。

"基本上由……组成"意指包括在短语"基本上由……组成"后列出的任何要素，并且限于不干扰或贡献于所列出的要素的公开内容中指定的活动或动作的其他要素。因此，短语"基本上由……组成” 是指示所列出的要素是需要的或强制性的，但没有其

他要素是任选的，并且取决于它们是否影响所列出的要素的活动或动作而可以存在或不存在。

冠词"一个/一种(a/an)"和"该/所述(the)"在本文中用于指一个/一种或超过一个/一种(即至少一个/一种)所述冠词的语法对象。例如，"要素"意指一个/一种要素或超过一个/一种要素。

替代(例如"或")的使用应理解为意指替代方案中任一、两者或其任何组合。

术语"和/或"应理解为意指替代方案中任一或两者。

在本说明书全文，提到"一个实施方式"、"实施方式"、"特定实施方式"、"相关实施方式"、"某个实施方式"、"另外的实施方式"或"进一步的实施方式"或其组合意指与
10 所述实施方式结合描述的特定特征、结构或特性被包括在本发明的至少一个实施方式中。因此，前述短语在本说明书全文的各个地方的出现不一定全部指相同实施方式。此外，特定特征、结构或特性可以以任何合适方式在一个或多个实施方式中组合。

2. ApoE构建物和ApoE多肽

15 在一个方面，本申请提供一种分离的ApoE构建物，其包含一个ApoE多肽，所述ApoE多肽：（1）包含来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个片段，该片段（或该ApoE多肽）N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第215-221位中的任意一个位置上的氨基酸残基，该片段（或该ApoE多肽）C端最后一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第274-299位（例如第279-299位）中的任意一个位置上的氨基酸残基；或（2）其氨基酸
20 序列与（1）所述片段具有至少约70%（例如至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高）序列同一性，并保留至少约50%（例如至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5倍、2倍、5倍、10倍或更多）（1）所述片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。应理解，本文所述的“片段”是指来自相应蛋白的连续的一段氨基酸序列。

25 在一些实施方式中，所述ApoE多肽包含来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个片段，该ApoE多肽N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第215-221位中的任意一个位置上的氨基酸残基，该ApoE多肽C端最后一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第274-299位（例如第279-299位）中的任意一个位置上的氨基酸残基。在一些实施方式中，所述ApoE构建物包含一个ApoE多肽，所述ApoE多肽由一个来自SEQ ID NO:12所示
30 氨基酸序列的片段组成，该ApoE多肽N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第215-

221位中的任意一个位置上的氨基酸残基，该ApoE多肽C端最后一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第274-299位（例如第279-299位）中的任意一个位置上的氨基酸残基。

5 在一些实施方式中，所述ApoE多肽与一个来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段具有至少约70%同一性，并保留至少约50%该片段对 γ 分泌酶切活性的抑制，其中该片段的N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第215-221位中的任意一个位置上的氨基酸残基，并且该片段C端最后一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第274-299位（例如第279-299位）中的任意一个位置上的氨基酸残基。

10 在一些实施方式中，所述分离的ApoE构建物由所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）组成或基本上由所述ApoE多肽组成。因此在一些实施方式中，本申请还提供一种ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）。

在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）由（1）所述来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个片段组成，或基本上由所述（1）来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个片段组成。

15 在一些实施方式中，所述ApoE构建物不是自然存在的。比如，在一些实施方式中，所述ApoE构建物或所述ApoE多肽不是ApoE2，不是ApoE3，和/或不是ApoE4全长蛋白。

在一些实施方式中，所述ApoE构建物或所述ApoE多肽是全长ApoE2或ApoE3蛋白（例如人全长ApoE2或ApoE3蛋白），比如在用作神经特性表达的ApoE构建物的时候。

20 在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段的氨基酸序列起点（或N端第一个氨基酸残基）为ApoE SEQ ID NO:12序列的第215-221位间（例如第215位、第216位、第217位、第218位、第219位、第220位或第221位）任意一个位点的氨基酸残基，例如第215位、第216位、第219位、第220位或第221位上任意一个氨基酸残基。在一些实施方式中，
25 所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段的氨基酸序列终点（或C端最后一个氨基酸残基）为ApoE SEQ ID NO:12序列第274至第299位间（例如第274位、第275位、第276位、第277位、第278位、第279位、第280位、第281位、第282位、第283位、第284位、第285位、第286位、第287位、第288位、第289位、第290位、第291位、第292位、第293位、第294位、第295位、第296位、第297位、第298
30 位或第299位）任意一个位点的氨基酸残基，例如第279-299位间（包括本数）的任一位置的氨基酸残基，例如第274位、第279位或第299位的任一氨基酸残基。

在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含（或由其组成，或基本由其组成）如下任一序列：SEQ ID NO:12所示序列的第215-299位、第216-299位、第217-299位、第218-299位、第219-299位、第220-299位、第221-299位、第215-274位、第216-274位、第217-274位、第218-274位、第219-274位、第220-274位、第221-274位、第215-279位、第216-279位、第217-279位、第218-279位、第219-279位、第220-279位、第221-279位、第215-294位、第216-294位、第217-294位、第218-294位、第219-294位、第220-294位、第221-294位、第215-289位、第216-289位、第217-289位、第218-289位、第219-289位、第220-289位、第221-289位、第215-288位、第216-288位、第217-288位、第218-288位、第219-288位、第220-288位、第221-288位、第215-287位、第216-287位、第217-287位、第218-287位、第219-287位、第220-287位、第221-287位、第215-286位、第216-286位、第217-286位、第218-286位、第219-286位、第220-286位、第221-286位、第215-285位、第216-285位、第217-285位、第218-285位、第219-285位、第220-285位、第221-285位、第215-284位、第216-284位、第217-284位、第218-284位、第219-284位、第220-284位、或第221-284位的氨基酸残基。

在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含（或由其组成，或基本由其组成）如下任一序列：(i) SEQ ID NO:12第215-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(ii) SEQ ID NO:12第216-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(iii) SEQ ID NO:12第217-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(iv) SEQ ID NO:12第218-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(v) SEQ ID NO:12第219-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(vi) SEQ ID NO:12第220-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(vii) SEQ ID NO:12第221-299位氨基酸残基的氨基酸序列；(viii) SEQ ID NO:12第216-294位氨基酸残基的氨基酸序列；(ix) SEQ ID NO:12第216-289位氨基酸残基的氨基酸序列；(x) SEQ ID NO:12第219-289位氨基酸残基的氨基酸序列；(xi) SEQ ID NO:12第219-288位氨基酸残基的氨基酸序列；(xii) SEQ ID NO:12第219-287位氨基酸残基的氨基酸序列；(xiii) SEQ ID NO:12第219-286位氨基酸残基的氨基酸序列；(xiv) SEQ ID NO:12第219-285位氨基酸残基的氨基酸序列；(xv) SEQ ID NO:12第219-284位氨基酸残基的氨基酸序列；(xvi) SEQ ID NO:12第219-279位氨基酸残基的氨基酸序列；(xvii) SEQ ID NO:12第219-274位氨基酸残基的氨基酸序列；(xviii) SEQ ID NO:12第220-274位氨基酸残基的氨基酸序列；(xix) SEQ ID NO:12第220-279位氨基酸残基的氨基酸序列；或 (xx) SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的氨基酸序列。

在一些实施方式中,所述ApoE构建物或ApoE多肽不包含SEQ ID NO:12第211-214位中一个或多个氨基酸序列。在一些实施方式中,所述ApoE构建物或ApoE多肽不包含以下一个或多个(或不包含任何一个)氨基酸片段: SEQ ID NO:12的第212-214位、第213-214位、第211-214位、第211-215位、第211-216位、第211-217位、第211-218位、
5 第211-219位、第211-220位、第211-221位、第211-222位、第212-214位、第212-215位、第212-216位、第212-217位、第212-218位、第212-219位、第212-220位、第212-221位、第212-222位、第213-214位、第213-215位、第213-216位、第213-217位、第213-218位、第213-219位、第213-220位、第213-221位、第213-222位、第214-215位、第214-216位、第214-217位、第214-218位、第214-219位、第214-220位、第214-221位、或第214-222
10 位。

在一些实施方式中,所述ApoE构建物或ApoE多肽包含SEQ ID NO:12第211-214位的氨基酸序列,但是该SEQ ID NO:12第211-214位的氨基酸序列的C端不与所述ApoE多肽的N端直接连接,比如之间至少插入一个非ApoE来源的序列(例如FLAG序列)。在一些实施方式中,所述SEQ ID NO:12第211-214位的氨基酸序列的C端与所述
15 ApoE多肽的N端之间插入SEQ ID NO:77所示的3XFLAG序列。

在一些实施方式中,所述ApoE构建物或所述ApoE多肽可以在所述(1)中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段的N端和/或C端额外包含一个或多个非ApoE来源的氨基酸残基。在一些实施方式中,所述ApoE构建物或所述ApoE多肽可以在所述
(1)中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段的N端和/或C端额外包含一个或多个
20 氨基酸残基,并且该氨基酸残基在添加到所述(1)片段N端或C端时与SEQ ID NO:12对应位点的氨基酸残基不一样。比如,所述(1)中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段的N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12的第215位氨基酸残基,所述ApoE构建物或所述ApoE多肽可以在SEQ ID NO:12第215位氨基酸残基的N端额外包含一个或多个氨基酸残基,但这一个或多个氨基酸残基与SEQ ID NO:12第214、213、212、
25 211等位点的氨基酸残基不同。

在一些实施方式中,所述ApoE构建物可以在所述ApoE多肽(例如(1)中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段,或ApoE突变体)的N端和/或C端额外包含一个或多个非ApoE来源的氨基酸残基。在一些实施方式中,所述ApoE构建物可以在所述ApoE多肽的N端和/或C端额外包含一个或多个氨基酸残基,并且该氨基酸残基在添加到所
30 述ApoE多肽的N端或C端时与SEQ ID NO:12对应位点的氨基酸残基不一样。比如,所述ApoE多肽的N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12的第215位氨基酸残基,所述

ApoE构建物可以在SEQ ID NO:12第215位氨基酸残基的N端额外包含一个或多个氨基酸残基，但这一个或多个氨基酸残基与SEQ ID NO:12第214、213、212、211等位点的氨基酸残基不同。

5 在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段至少包括SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸序列（SEQ ID NO: 78）。例如，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段在SEQ ID NO:78所示氨基酸序列的N端可以额外包含1、2、3、4、5、或6个氨基酸残基，和/或在C端可以额外包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。在一些
10 实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列组成，或基本由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列组成。在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段至少包括SEQ ID NO:12第220-279位氨基酸序列（SEQ ID NO:34）。例如，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ
15 ID NO:12所示氨基酸序列的片段在SEQ ID NO:34所示氨基酸序列的N端可以额外包含1、2、3、4、或5个氨基酸残基，和/或在C端可以额外包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基。在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段由SEQ ID NO:34所示氨基酸序列组成，或基本由SEQ ID NO:34所
20 示氨基酸序列组成。在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段至少包括SEQ ID NO:12第219-274位氨基酸序列（SEQ ID NO:32）。例如，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段在SEQ ID NO:32所示氨基酸序列的N端可以额外包含1、2、3或4个氨基酸残基，和/或在C端可以额外包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、
25 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸残基。在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段由SEQ ID NO:32所示氨基酸序列组成，或基本由SEQ ID NO:32所示氨基酸序列组成。在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段至少包括SEQ ID NO:12
30 第219-279位氨基酸序列（SEQ ID NO:31）。例如，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段在SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的N端可以额

外包含1、2、3或4个氨基酸残基，和/或在C端可以额外包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基。在一些实施方式中，所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段由SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成，或基本由SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成。

5 在一些实施方式中，所述ApoE构建物（例如分离的ApoE构建物）、所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）、或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含SEQ ID NOs:13、18-34、78和87（例如SEQ ID NOs:31-34、78和87，或SEQ ID NO:33或78）中任一氨基酸序列。在一些实施方式中，所述ApoE构建物（例如分离的ApoE构建物）、所述ApoE多肽（例如分离的ApoE多肽）、或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段由SEQ ID NOs:13、18-34、78和87（例如SEQ ID NOs:31-34、78和87，或SEQ ID NO:33或78）中任一氨基酸序列组成，或基本由SEQ ID NOs:13、18-34、78和87（例如SEQ ID NOs:31-34、78和87，或SEQ ID NO:33或78）中任一氨基酸序列组成。

15 本申请所述 ApoE 构建物和所述 ApoE 多肽也包括其突变体（在本文中也称“ApoE 突变体”）。例如，与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列）相比，该突变体具有一个或多个氨基酸突变（例如添加、缺失或取代），包括但不限于“抑制酶活保守修饰”。再例如，该突变体与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列）具有至少约 70%（例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高）序列同一性。在一些实施方式中，所述突变体保留至少约 50%（例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多）所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列）对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。在一些实施方式中，所述突变体保留至少约 50%（例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多）ApoE2（SEQ ID NO:12）或 ApoE3（SEQ ID NO:89）或 SEQ ID NO:33 所示 ApoE 片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。

本文中“抑制酶活保守修饰”指不显著影响（例如降低不多于约 50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%或更少）或改变该蛋白构建物或多肽抑制 γ 分泌酶的酶切（例如对 APP 的 γ -酶切）的氨基酸修饰。此类抑制酶活保守修饰包括氨基酸替换、添加和/

或缺失。可通过本领域已知的标准技术，如定点诱变或 PCR 介导的诱变来向本发明的蛋白构建物或多肽中引入修饰。在一些实施方案中，与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列）相比，所述 ApoE 突变体具有 1 个或多个（如 40 个以内、30 个以内、20 个以内、10 个以内、8 个以内、5 个以内、3 个以内、2 个或 1 个）氨基酸插入、取代和/或缺失（包括在 N 端和/或 C 端进行插入和/或删除），同时仍保留至少约 50%（例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多）所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段抑制 γ 分泌酶的酶切（例如对 APP 的 γ -酶切）的生物学活性。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽（例如分离的 ApoE 多肽）保留至少约 50%（例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多）ApoE2（SEQ ID NO:12）或 ApoE3（SEQ ID NO:89）或 SEQ ID NO:33 所示 ApoE 片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽（例如分离的 ApoE 多肽）与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列，比如 SEQ ID NO:33）相比，具有更高的（例如至少约 1.2 倍、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多）抑制 γ 分泌酶的酶切（例如对 APP 的 γ -酶切）的生物学活性。

在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含实施例 1 中任何 ApoE 多肽或 ApoE 构建物中的一个或多个氨基酸位点的突变（例如添加、缺失或取代）。本发明提供实施例 1 中和实施例 2 中任何 ApoE 多肽或 ApoE 构建物（例如分离的）。

在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含相对于 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变（例如添加、缺失或取代）：R226、D227、R228、L229、D230、Q235、E238、V239、R240、K242、E244、E245、Q246、A247、Q248、Q249、I250、R251、L252、Q253、A254、E255、Q275、V280、V287、T289、S290、A291、P293、V294、P295、S296、D297、N298、H299、R251+T289、R251+T289+A291、S290+P293+V294+P295+S296+D297+N298+H299、R226+D227+R228+L229+D230、E238+V239+R240+K242、或 E244+E245+Q246+A247+Q248+Q249+I250+R251+L252+Q253+A254。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含相对于 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变：Q235、E255、Q275、V280、V287、P295、R251+T289、S290+P293+V294+P295+S296+D297+N298+H299、R226+D227+R228+L229+D230、

E238+V239+R240+K242
 E244+E245+Q246+A247+Q248+Q249+I250+R251+L252+Q253+A254
 R251+T289+A291。在一些实施方式中，所述突变包括在所述一个或多个位点取代为 A、S 或 T，例如取代为 A。在一些实施方式中，所述突变包括删除所述一个或多个位点的氨基酸残基。

5 在一些实施方式中，所述抑制酶活保守修饰是保守取代。保守取代指氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的替换。已经在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括带有以下侧链的氨基酸：碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、β-分支侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。

15 在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含相对于 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变：R226A、D227A、R228A、L229A、D230A、Q235A、E238A、V239A、R240A、K242A、E244del、E245del、Q246del、A247del、Q248del、Q249del、I250del、R251S、L252del、Q253del、A254del、E255A、Q275A、V280A、V287A、T289A、S290A、A291T、P293A、V294A、P295A、S296A、D297A、N298A、H299A
 20 S290A+P293A+V294A+P295A+S296A+D297A+N298A+H299A
 R226A+D227A+R228A+L229A+D230A、E238A+V239A+R240A+K242A、或 E244del+E245del+Q246del+A247del+Q248del+Q249del+I250del+R251del+L252del+Q253del+A254del。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含相对于 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变：Q235A、E255A、Q275A、V280A、V287A、
 25 P295A
 S290A+P293A+V294A+P295A+S296A+D297A+N298A+H299A
 R226A+D227A+R228A+L229A+D230A、E238A+V239A+R240A+K242A、E244del+E245del+Q246del+A247del+Q248del+Q249del+I250del+R251del+L252del+Q253del+A254del、或 R251S+T289A+A291T。

30 在一些实施方案中，所述 ApoE 多肽或所述 ApoE 突变体与所述 (1) 中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序

列，比如 SEQ ID NO:33）具有至少约 70% 的序列同一性，例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高（但不是 100%）的同一性。在一些实施方式中，所述 ApoE 突变体与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列，比如 SEQ ID NO:33）
5 相比同样能抑制 γ 分泌酶的酶切，或保留至少约 50%（例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多）所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。在一些实施方式中，所述 ApoE 突变体与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段同样来源于人。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含或源自非人
10 源序列。可采用本领域周知的方法测定突变体与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段之间的序列同一性，例如，可采用 BLASTP 测定。

在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含或源自非人源序列，并且其氨基酸序列与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列，比如 SEQ ID NO:33）具有至少约 70% 序列同一性，并保留至少约 50% 所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含或源自以下任一物种的 ApoE
15 序列：哺乳动物、鸟类、蛙类、鱼类、果蝇、线虫等。在一些实施方式中，哺乳动物包括但不限于灵长类（例如人类，或非人类灵长类例如猴子），啮齿类（例如小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、松鼠、豚鼠和兔子），家畜（例如猪、牛、羊、马、驴），宠物
20 （例如猫、狗、兔和仓鼠）等。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含非天然存在的修饰，例如在猴 ApoE 序列上进一步包括氨基酸修饰。

在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽或所述 ApoE 突变体含有非人灵长类序列，例如与所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列，比如 SEQ ID NO:33）高度同源和保守的序列。在一些
25 实施方式中，所述 ApoE 多肽包含 SEQ ID NO:62 所示猴源 ApoE C 端氨基酸序列。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽由 SEQ ID NO:62 所示氨基酸序列组成，或基本由 SEQ ID NO:62 所示氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含基于 SEQ ID NO:33 所示氨基酸序列的一个或多个突变（例如添加、缺失或取代），例如在上述任何一个或多个位点的突变，
30 或与 SEQ ID NO:33 所示氨基酸序列具有至少约 70%（例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高）的序列同一性。在一些实施方式中，所

述 ApoE 多肽包含基于 SEQ ID NO:33 所示氨基酸序列的一个或多个突变(例如添加、缺失或取代), 例如在上述任何一个或多个位点的突变, 或与 SEQ ID NO:33 所示氨基酸序列具有至少约 70% (例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 的序列同一性, 且保留至少约 50% (例如至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多) SEQ ID NO:33 所示氨基酸序列对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物或所述 ApoE 多肽包含 SEQ ID NOs:46-52、57-59、62 和 76 中任一氨基酸序列。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物或所述 ApoE 多肽由 SEQ ID NOs:46-52、57-59、62 和 76 中任一氨基酸序列组成, 或基本由 SEQ ID NOs:46-52、57-59、62 和 76 中任一氨基酸序列组成。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物(例如分离的 ApoE 构建物)、所述 ApoE 多肽(例如分离的 ApoE 多肽, 或 ApoE 突变体)、或所述(1)中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列)对于 γ 分泌酶介导的酶切(例如对 APP 的 γ -酶切)的抑制作用包括下面一个或多个特性: (i) 抑制(例如抑制至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) γ -分泌酶介导的 APP γ -剪切; (ii) 降低(例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) APP 的淀粉样代谢; (iii) 减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) A β (例如 A β 40 和/或 A β 42) 的生成; (iv) 降低(例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 对 β -CTF 的 γ -剪切; (v) 提高(例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) APP 的非淀粉样代谢; (vi) 增加(例如增加至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) α -CTF 的生成; (vii) 不抑制(或抑制不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) 对非 APP 蛋白(例如 APLP1 或 Notch)或其片段的 γ -剪切; (viii) 不增加(或增加不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) 非 APP 蛋白(例如 APLP1、Notch、ErbB4、E-cadherin、N-cadherin、ephrin-B2 或 CD44) γ -剪切产生的 α -CTF; (ix) 减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 患 AD 个体脑中的淀粉样斑块, 例如减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 淀粉样斑块的平均斑块大小、总面积、和/或密度; (x) 减少(例如减少至少约 10%、20%、

30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 患 AD 个体神经元内 A β (例如 A β 40 和/或 A β 42) 生成; (xi) 降低 (例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 患 AD 个体病理进程; (xii) 提高 (例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、
5 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) 患 AD 个体存活率和/或寿命; 和/或(xiii) 不影响 (或影响不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) α -分泌酶、 β -分泌酶、和/或 γ -分泌酶 (或其亚基) (例如 ADAM10、BACE1、PS1 和/或 PS2) 的 mRNA 和/或蛋白质表达。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物 (例如分离的 ApoE 构建物)、所述 ApoE
10 多肽 (例如分离的 ApoE 多肽, 或 ApoE 突变体)、或所述 (1) 中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对 γ -分泌酶酶切 (例如对 APP 的 γ -酶切) 的抑制能力高于 (例如高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更多) SEQ ID NO:12 或 33 或 89 所示蛋白对 γ -分泌酶酶切的抑制能力。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物、所述 ApoE 多肽 (例如分离的
15 的 ApoE 多肽, 或 ApoE 突变体)、或所述 (1) 中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对 γ -分泌酶酶切 (例如对 APP 的 γ -酶切) 的抑制能力与 SEQ ID NO:12 或 33 或 89 所示蛋白对 γ -分泌酶酶切的抑制能力相同或相似 (例如差别在约 10%以内)。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物、所述 ApoE 多肽 (例如分离的 ApoE 多肽, 或 ApoE 突变体)、或所述 (1) 中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对 γ -分泌酶酶切 (例如对 APP 的 γ -酶切) 的抑制能力比 SEQ ID NO:12 或 33 或 89 所示蛋白对 γ -分泌酶酶切的抑制能力低最多约 50% (例如低 40%、30%、20%、10%、5%、1% 或更少)。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物 (例如分离的 ApoE 构建物)、所述 ApoE
25 多肽 (例如分离的 ApoE 多肽, 或 ApoE 突变体)、或所述 (1) 中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列) 对于 γ 分泌酶介导的酶切 (例如对 APP 的 γ -酶切) 的抑制活性与 γ -分泌酶抑制剂 (例如 PF03084014) 相同或相似 (例如差别在约 10%、5%或 1%之内)。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物 (例如分离的 ApoE 构建物)、所述 ApoE 多肽 (例如分离的 ApoE 多肽, 或 ApoE 突变体)、或所述 (1) 中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段
30 对于 γ 分泌酶介导的酶切 (例如对 APP 的 γ -酶切) 的抑制活性高于 (例如高至少约 10%、20%、50%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍或更高) γ -分泌酶抑制剂 (例如 PF03084014)。

5 在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物（例如分离的 ApoE 构建物）、所述 ApoE 多肽（例如分离的 ApoE 多肽，或 ApoE 突变体）、或所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对于 γ 分泌酶介导的酶切（例如对 APP 的 γ -酶切）的抑制活性低于（例如低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多） γ -分泌酶抑制剂（例如 PF03084014）。

10 在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物（例如分离的 ApoE 构建物）、所述 ApoE 多肽（例如分离的 ApoE 多肽，或 ApoE 突变体）、或所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、78 和 87 中任一序列）对 APP 的 γ -酶切的抑制高于（例如高至少约 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更多）对非 APP 蛋白（例如 APLP1、Notch）的 γ -酶切的抑制。在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物（例如分离的 ApoE 构建物）、所述 ApoE 多肽（例如分离的 ApoE 多肽，或 ApoE 突变体）、或所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段只对 APP 的 γ -酶切抑制，而对非 APP 蛋白（例如 APLP1、Notch）的 γ -酶切没有或几乎没有抑制。

15 在一些实施方式中， α -淀粉酶抑制剂（例如 GI254023X）和/或 β -淀粉酶抑制剂（例如 AZD3839）不会影响，或影响不超过约 50%（例如不超过约 40%、30%、20%、10%、5%、1%或更少）所述 ApoE 构建物（例如分离的 ApoE 构建物）、所述 ApoE 多肽（例如分离的 ApoE 多肽，或 ApoE 突变体）、或所述（1）中来自 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的片段对 γ 分泌酶酶切（例如对 APP 的 γ -酶切）活性的抑制。比如，20 在 α -淀粉酶抑制剂或 β -淀粉酶抑制剂存在下，所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽依然可以提高由 APP 产生的 α -CTF 水平并减少 A β 的产生。

25 对 γ 分泌酶酶切（例如对 APP 的 γ -酶切）活性的影响可以用任何本领域内适合的方式进行研究，比如研究 γ 分泌酶的酶活本身，或研究 γ 分泌酶酶切产物（例如 A β ，如 A β 40 或 A β 42）特性或数量，或研究 γ 分泌酶底物（例如 APP、 α -CTF、 β -CTF、APLP1、Notch、ErbB4、E-cadherin、N-cadherin、ephrin-B2 或者 CD44）特性或数量（例如是否因被 γ 酶切而减少）。这些研究方法包括但不限于 qRT-PCR、BCA、流式细胞分选、蛋白质组学、代谢组学、ELISA、Western blot、免疫共沉淀、蛋白荧光标记、免疫染色等，可以是体内方法，也可以是体外方法（细胞或非细胞实验）。任何 γ 分泌酶活性检测试剂盒也可在此使用，例如 MyBioSource 的#MBS704513 30 试剂盒、或 R&D Systems 的#FP003 试剂盒。另参见实施例 1 和 2 中所述研究方式。

在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物在任一所述 ApoE 多肽（例如 SEQ ID

NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列)的 N 端还进一步包含 ApoE2 蛋白的 N 端结构域序列或部分序列(例如 SEQ ID NO:12 第 1-167 位氨基酸序列或部分序列; SEQ ID NO:79), 和/或铰链区序列或部分序列(例如 SEQ ID NO:12 第 168-205 位氨基酸序列或部分序列; SEQ ID NO:80), 或与 ApoE2 蛋白的 N 端结构域序列(或部分序列)和/或铰链区序列(或部分序列)至少有约 70%(例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)同一性的序列(例如来自非人灵长类(比如猴)的 ApoE 同源序列)。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物在任一所述 ApoE 多肽(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列)的 N 端还进一步包含 ApoE3 蛋白的 N 端结构域序列或部分序列(例如第 1-167 位氨基酸序列或部分序列; SEQ ID NO:90), 和/或铰链区序列或部分序列(例如第 168-205 位氨基酸序列或部分序列; SEQ ID NO:80), 或与 ApoE3 蛋白的 N 端结构域序列(或部分序列)和/或铰链区序列(或部分序列)至少有约 70%(例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)同一性的序列(例如来自非人灵长类(比如猴)的 ApoE 同源序列)。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物在所述 ApoE 多肽的 N 端还进一步包含来自 ApoE C 端结构域(SEQ ID NO:12 第 206-299 位)的一部分序列(例如其 N 端部分序列), 例如 SEQ ID NO:12 第 206-214 位氨基酸的序列或部分序列, 或与 ApoE C 端结构域的该一部分序列至少有约 70%(例如至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)同一性的序列。在一些实施方式中, 所述 ApoE2 或 ApoE3 蛋白(或非人同源蛋白) N 端结构域序列或部分序列的 C 端, 或(N 端结构域+铰链区)序列或部分序列的 C 端, 或(N 端结构域+铰链区+C 端结构域的部分 N 端序列)序列的 C 端, 与所述 ApoE 多肽的 N 端通过肽键或接头序列(例如蛋白接头序列)连接。在一些实施方式中, 与人 ApoE2 或 ApoE3 蛋白的 N 端结构域(或部分序列)和/或铰链区(或部分序列)和/或 C 端结构域(或其 N 端部分序列)同源的 ApoE 蛋白序列源自以下任一物种的序列: 哺乳动物(例如非人类灵长类比如猴子、啮齿类、家畜、宠物)、鸟类、蛙类、鱼类、果蝇、线虫等。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物在任一所述 ApoE 多肽(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列)的 N 端还进一步包含 SEQ ID NO:12 第 1-167 位(SEQ ID NO:79)或第 1-205 位(SEQ ID NO:81)或第 1-214 位氨基酸残基的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO:12 第 1-167 位或第 1-205 位或第 1-214 位氨基酸至少有约 70%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中, 所述 ApoE

构建物包含 SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物由 SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列组成，或基本由 SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列组成。

5 在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物在任一所述 ApoE 多肽（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列）的 N 端还进一步包含 ApoE3 (SEQ ID NO:89) 第 1-167 位 (SEQ ID NO:90) 或第 1-205 位或第 1-214 位氨基酸残基的氨基酸序列，或与 ApoE3 第 1-167 位或第 1-205 位或第 1-214 位氨基酸至少有约 70% 同一性的氨基酸序列。

10 在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物包含（或由其组成、或基本由其组成）ApoE2（例如人 ApoE2，SEQ ID NO:12）的全长序列。在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物包含（或由其组成、或基本由其组成）ApoE3（例如人 ApoE3，SEQ ID NO:89）的全长序列。

15 在一些实施方式中，所述 ApoE 构建物在任一所述 ApoE 多肽（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列，或 ApoE2 或 ApoE3 全长序列）的 N 端或 C 端还进一步包含一个穿膜肽。在一些实施方式中，所述穿膜肽包含（或由其组成、或基本由其组成）SEQ ID NOs:35-45、63-65 和 84-86 中任一氨基酸序列，例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，所述穿膜肽（例如 C 端）与所述 ApoE 多肽（例如 N 端）、或所述包含 SEQ ID NO:12 或 89 第 1-167 位（或其片段）或第 1-205 位（或其片段）或第 1-214 位（或其片段）氨基酸残基的氨基酸序列（例如 N 端）、或所述与 SEQ ID NO:12 或 89 第 1-167 位（或其片段）或第 1-205 位（或其片段）或第 1-214 位（或其片段）氨基酸至少有约 70% 同一性的序列（例如 N 端）通过肽键或接头序列（例如蛋白接头序列）连接。在一些实施方式中，所述穿膜肽的 N 端进一步和一个信号肽的 C 端通过肽键或接头序列连接。在一些实施方式中，所述穿膜肽位于所述 ApoE 构建物的最 N 端。在一些实施方式中，所述穿膜肽位于所述 ApoE 构建物的最 C 端。

20 25 30 在一些实施方案中，本发明提供一种 ApoE 构建物（或融合蛋白），该融合蛋白包括以下元件（1）和元件（2）：（1）穿膜肽，和（2）ApoE2 的全长序列（例如 SEQ ID NO:12）或 ApoE3 的全长序列（例如 SEQ ID NO:89）或 ApoE2 的至少包括 SEQ ID NO:12 第 221-274 位氨基酸残基的片段。所述元件（1）和元件（2）之间可通过肽键直接连接，也可通过接头序列连接。

穿膜肽或细胞穿膜肽指一类能携带大分子物质进入细胞的短肽。可采用本领域周知的穿膜肽来构建本发明的融合蛋白。示例性的穿膜肽可参见Siegmond Reissmann, Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides, J. Pept. Sci. 2014; 20: 760–784。本文将其全部内容以引用的方式纳入本文。适用于本

5 发明的穿膜肽包括但不限于 RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:35); YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:36); KQAIPVAK (SEQ ID NO:37); RRRRNTRRRNRVR (SEQ ID NO:38); 寡精氨酸(即长9-12个精氨酸残基的片段; R₉ (SEQ ID NO:63), R₁₀ (SEQ ID NO:84), R₁₁ (SEQ ID NO:85), R₁₂ (SEQ ID NO:86)); KLTRAQRRAAARKNKRNTRGC (SEQ ID NO:39); ALWKTLLKKVLKAPKKKRVK

10 (SEQ ID NO:40); RKKRRQRRR (SEQ ID NO:41); DAATATGRSAASRPTERPRAPARSASRRPVE (SEQ ID NO:42); GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:43); AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:44); YTAIAWVKAFIRKLRLK (SEQ ID NO:45); 和KSVRTWNEIIPSKGCLRVGGRCHPHVNGGRRRRRRRRR (SEQ ID

15 NO:65)。

在一些实施方案中,融合蛋白中元件(2)所述的 ApoE2 的至少包括 SEQ ID NO:12 第 221-274 位氨基酸残基的片段,可以是本文任一实施方案所述的分离的 ApoE 多肽,以及含有 ApoE2 或 ApoE3 的 N 端和铰链区(或其片段)以及 C 端至少第 221-274 位氨基酸残基的片段。在一些实施方式中,所述的 ApoE2 多肽可以包含如下任一序列:

20 SEQ ID NO:12 第 1-274 位,第 1-279 位,以及第 1-280 位、第 1-281 位、第 1-282 位、第 1-283 位、第 1-284 位、第 1-285 位、第 1-286 位、第 1-287 位、第 1-288 位、第 1-289 位、第 1-290 位、第 1-291 位、第 1-292 位、第 1-293 位、第 1-294 位、第 1-295 位、第 1-296 位、第 1-297 位、第 1-298 位或第 1-299 位氨基酸残基。

在一些实施方案中,所述融合蛋白中的元件(2)选自:SEQ ID NOs:12、13、18-25 34、60、78、87 和 89 中任一氨基酸序列。

在一些实施方式中,所述接头是非蛋白接头。在一些实施方式中,所述接头是蛋白接头。在一些实施方式中,所述接头是包含 3~25 个残基的肽,例如包含 3~15、5~15、10~20、20-25、或 3-10 个残基的肽。肽接头的适合的实例是本领域中公知的。通常,接头含有一个或多个前后重复的基序,该基序通常含有 Gly 和/或 Ser。例

30 如,该基序可以是 SGGs (SEQ ID NO:69)、GSSGs (SEQ ID NO:70)、GGGs (SEQ ID NO:71)、GGGGs (SEQ ID NO:72)、SSSSG (SEQ ID NO:73)、GSGSA (SEQ

ID NO:74) GGSGG (SEQ ID NO:75) 或 GGGSGGGS (SEQ ID NO:88)。在一些实施方式中, 以上序在接头序列中是相邻的, 在重复之间没有插入氨基酸残基。接头序列可以包含 1、2、3、4 或 5 个重复基序组成。在某些实施方案中, 接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制, 通常为 2~20 个, 例如 2~15、
5 2~10、2~8 个。除甘氨酸和丝氨酸外, 接头中还可含有其它已知的氨基酸残基, 例如丙氨酸、亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、谷氨酰胺等。在一些实施方式中, 所述接头序列如 SEQ ID NO:88 所示。

本发明的 ApoE 构建物或融合蛋白中还可能包括因基因克隆操作、和/或为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于
10 重组蛋白的检测和/或纯化等而在融合蛋白中引入的氨基酸残基或序列。在一些实施方式中, 本发明的 ApoE 构建物或融合蛋白中还包括信号肽、前导肽、末端延伸、标签蛋白等。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物在所述 ApoE 多肽的 N 端还进一步包含一个信号肽, 特别是需要在细胞中表达时。在一些实施方式中, 所述信号肽的 C 端与所
15 述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列, 或 ApoE2 或 ApoE3 全长序列) 的 N 端、或所述包含 SEQ ID NO:12 或 89 第 1-167 位 (或其片段) 或第 1-205 位 (或其片段) 或第 1-214 位 (或其片段) 氨基酸残基的氨基酸序列的 N 端、或所述与 SEQ ID NO:12 或 89 第 1-167 位 (或其片段) 或第 1-205 位 (或其片段) 或第 1-214 位 (或其片段) 氨基酸至少有约 70% 同一性的序
20 列的 N 端、或穿膜肽的 N 端通过肽键或接头序列 (例如蛋白接头序列) 连接。在一些实施方式中, 所述信号肽位于所述 ApoE 构建物的最 N 端。在一些实施方式中, 所述信号肽进一步添加于 SEQ ID NO:60 或 61 所示氨基酸序列的 N 端。在一些实施方式中, 所述信号肽进一步添加于 ApoE2 (例如 SEQ ID NO:12) 或 ApoE3 (例如 SEQ ID NO:89) 全长序列的 N 端。在一些实施方式中, 所述信号肽的 C 端进一步与一个
25 穿膜肽的 N 端通过肽键或接头序列 (例如蛋白接头序列) 连接。任何周知的信号肽均可在此使用。在一些实施方式中, 所述信号肽与所述 ApoE 构建物或所述 ApoE 多肽同源, 例如是来自 ApoE2 (SEQ ID NO:12) 或 ApoE3 (SEQ ID NO:89) 蛋白本身的信号肽。在一些实施方式中, 所述信号肽与所述 ApoE 构建物或所述 ApoE 多肽异源, 例如是来自 ApoA1 或 ApoJ 的信号肽。在一些实施方式中, 所述信号肽包含 (或由其组
30 成, 或基本由其组成) 选自 SEQ ID NOs:66-68 中任一氨基酸序列。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物包含 (或由其组成、或基本由其组成) 如

下从 N 端到 C 端的序列:

信号肽 – 可选的接头 1 – 穿膜肽(例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列)–
可选的接头 2 – ApoE2 蛋白 (例如 SEQ ID NO:12) 或 ApoE3 蛋白 (例如 SEQ ID
NO:89) ;

- 5 信号肽 – 可选的接头 – ApoE2 蛋白 (例如 SEQ ID NO:12) 或 ApoE3 蛋白 (例
如 SEQ ID NO:89) ;

ApoE2 蛋白 (例如 SEQ ID NO:12) 或 ApoE3 蛋白 (例如 SEQ ID NO:89) ;

穿膜肽(例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列) – 可选的接头 – ApoE2 蛋
白 (例如 SEQ ID NO:12) 或 ApoE3 蛋白 (例如 SEQ ID NO:89) ;

- 10 信号肽 – 可选的接头 1 – 穿膜肽(例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列)
– 可选的接头 2 – 任一所述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、
62、76、78 和 87 中任一序列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

- 穿膜肽(例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列) – 可选的接头 – 任一所述
ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序
15 列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

信号肽 – 可选的接头 – 任一所述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-
52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

任一所述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78
和 87 中任一序列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

- 20 信号肽 – 可选的接头 1 – 穿膜肽 (例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列)
– 可选的接头 2 – ApoE2 或 ApoE3 N 端结构域和/或铰链区和/或(C 端结构域的 N 端)
序列或片段(例如 SEQ ID NOs:79-81 和 90 中任一所示氨基酸序列或其片段)– 可选的
接头 3 – 任一所述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、
78 和 87 中任一序列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

- 25 穿膜肽 (例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列) – 可选的接头 1 – ApoE2
或 ApoE3 N 端结构域和/或铰链区和/或(C 端结构域的 N 端)序列或片段(例如 SEQ ID
NOs:79-81 和 90 中任一所示氨基酸序列或其片段) – 可选的接头 2 – 任一所述 ApoE
多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列,
比如 SEQ ID NO:33) ;

- 30 信号肽 – 可选的接头 1 – ApoE2 或 ApoE3 N 端结构域和/或铰链区和/或(C 端结
构域的 N 端)序列或片段(例如 SEQ ID NOs:79-81 和 90 中任一所示氨基酸序列或其片

段) – 可选的接头 2 – 任一所述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

ApoE2 或 ApoE3 N 端结构域和/或铰链区和/或(C 端结构域的 N 端)序列或片段 (例如 SEQ ID NOs:79-81 和 90 中任一所示氨基酸序列或其片段) – 可选的接头 – 任一所述 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一序列, 比如 SEQ ID NO:33) ;

信号肽 – 可选的接头 1 – 穿膜肽(例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列) – 可选的接头 2 – (SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列);

穿膜肽(例如 SEQ ID NO:63 或 65 所示的氨基酸序列) – 可选的接头 – (SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列);

SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列; 或

信号肽 – 可选的接头 – (SEQ ID NO:60 或 61 所示的氨基酸序列)。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物在所述 ApoE 多肽的 N 端和/或 C 端还进一步包含一个标签蛋白。在一些实施方式中, 所述标签蛋白位于所述 ApoE 构建物的最 N 端。在一些实施方式中, 所述标签蛋白位于所述 ApoE 构建物的最 C 端。在一些实施方式中, 所述标签蛋白(例如 SEQ ID NO:77 所示的 3XFLAG 序列)位于所述 ApoE 构建物的内部但是位于所述 ApoE 多肽的 N 端, 例如与所述 ApoE 多肽的 N 端直接相连。所述标签蛋白可以是表达纯化标签 (例如 His-tag, FLAG-tag、GST-tag、c-Myc-tag、V5-tag、HA-tag), 或检测标签 (例如 GFP、RFP、V5、HA)。在一些实施方式中, 纯化标签也可用于检测, 例如免疫印迹或抗体检测。在一些实施方式中, 所述标签蛋白位于所述 ApoE 构建物 (例如 ApoE2 或 ApoE3, 或包含 SEQ ID NO:33 序列的 ApoE 多肽) 的最 N 端。在一些实施方式中, 所述标签蛋白位于所述 ApoE 构建物的最 C 端。在一些实施方式中, 所述标签蛋白是 V5 标签 GKIPNPLLGLDST (SEQ ID NO:82) 或 IPNPLLGLD (SEQ ID NO:83)。在一些实施方式中, 所述标签蛋白是 FLAG 标签 (例如 SEQ ID NO:77)。

淀粉样蛋白前体蛋白 (Amyloid-beta precursor protein, APP) 和水解

APP 是细胞膜内嵌蛋白, 主要集中于神经元突触。其含有 α 、 β 、 γ 分泌酶的酶切位点。APP 表达于很多不同物种且高度同源。本文所述 APP 可以来自任何物种, 例如哺乳动物、鸟类、蛙类、鱼类、果蝇、线虫等。哺乳动物包括但不限于灵长类 (例如人类, 或非人类灵长类例如猴子), 啮齿类 (例如小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、松鼠、

豚鼠和兔子)，家畜（例如猪、牛、羊、马、驴），宠物（例如猫、狗、兔和仓鼠）等。在一些实施方式中，所述 APP 是人 APP。

APP 的淀粉样代谢可以产生短的 β 淀粉样多肽(A β)。A β 多肽由在接近 A β 的 N-末端位置处通过 β -分泌酶活性和在接近 A β 的 C-末端位置处通过 γ 分泌酶活性的 APP 切割制备。APP 也由 α -分泌酶活性切割，产生可溶性 APP α 的分泌的、非淀粉样片段。 β 位点 APP 切割酶("BACE-1")被认为是负责通过 β -分泌酶活性产生 A β 的主要的天冬氨酰蛋白酶。BACE-1 抑制可以抑制 A β 的产生。BACE1 为具有切割 APP 以将胞外域(sAPP β)释放至细胞外间隙的腔活性位点的 I 型跨膜蛋白。剩余的 C-末端片段(CTF)通过 γ -分泌酶经历进一步切割，导致 A β 和 APP 细胞内 C-末端结构域(AICD)的释放。早老蛋白为 γ -分泌酶的主要酶组分， γ -分泌酶的 APP 的不精确切割在 C-末端处产生长度变化若干氨基酸的连续的 A β 多肽。大部分 A β 通常在氨基酸 40(A β 40)处结束，但是已示出 42-氨基酸变体(A β 42)更易受聚合的影响，并且已假设成核老年斑形成。 γ -分泌酶的调节也可导致 38-氨基酸变体(A β 38)的增加。竞争 α -分泌酶途径为 α -分泌酶和 γ -分泌酶相继切割的结果。ADAM-10 为用于 APP 切割的 α -分泌酶，该切割释放胞外域(sAPP α)，所述胞外域显示神经保护功能(Lammich 等，(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96:3922-3927)。83-氨基酸 CTF(C83)的随后切割释放 p3(其为非淀粉样的)和 AICD(Furukawa 等，(1996)J.Neurochem., 67:1882-1896)。

A β 为 β 淀粉样纤维和斑块的主要组分，所述 β 淀粉样纤维和斑块被认为在越来越多的病理学中发挥作用。此类病理学的实例包括但不限于阿尔茨海默氏病、唐氏综合征、帕金森病、记忆丧失(包括与阿尔茨海默氏病和帕金森病相关的记忆丧失)、注意力缺陷症(包括与阿尔茨海默氏病、帕金森病和唐氏综合征相关的注意力缺陷症)、痴呆(包括老年前期痴呆，老年性痴呆，与阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森病和唐氏综合征相关的痴呆)、进行性核上麻痹、皮质基底变性、神经变性、嗅觉障碍(包括与阿尔茨海默氏病、帕金森病和唐氏综合征相关的嗅觉障碍)、 β -淀粉样脑血管病(包括大脑淀粉样脑血管病)、遗传性脑出血、轻度认知障碍("MCI")、青光眼、淀粉样变性、II 型糖尿病、血液透析(β 2 微球蛋白和由其产生的并发症)、神经变性疾病诸如痒病、牛海绵状脑炎、克雅氏病(Creutzfeldt Jakob disease)、外伤性脑损伤等。

在一些实施方式中，所述 APP 是野生型 APP。在一些实施方式中，所述 APP 是自然存在的 APP 亚型。在一些实施方式中，所述 APP 是突变体，包括但不限于任何已知或未知 APP 突变。已在 121 个家族中识别出 APP 突变。最常见的错义突变利用 Ile(伦敦突变)、Phe 或 Gly 残基替换 Val⁷¹⁷ 残基，利用 Gln 残基(荷兰突变)或 Gly 残基

(北极突变)替换 Glu⁶⁹³, 或利用 Asn 和 Leu 残基替换 Lys⁶⁷⁰ 和 Met⁶⁷¹(双重突变称为瑞典突变 APP_{SW}, 在 APP₇₇₀ 异构体中编号)。在一些实施方式中, 所述 APP 是人 APP, 其包含下述一个或多个突变: K670N、M671L、瑞典(K670N+M671L)、佛罗里达(I716V)、伦敦(V717I)、APP_{M596V}(不能进行 β 切割)、 γ 切割位点附近的 fAD 突变(例如 T714I、
5 V717F、L723P)、 β -或 α -切割位点附近的 fAD 突变(例如 KM670/671NL、E693K、E693 Δ)、或保护性冰岛突变(A673T)。在一些实施方式中, 所述 APP 不包含影响 γ -剪切的突变, 例如 γ 位点附件的突变。

在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽可以对任一 APP 的 γ -切割进行抑制(例如抑制至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、
10 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽对任一所述 APP 突变体的 γ -切割抑制能力为其对野生型 APP γ -切割的抑制能力的至少约 30%(例如至少约 40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多)。在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽对包含影响 γ -剪切的突变的 APP(例如
15 T714I、V717F、L723P)的 γ -切割抑制能力低于(例如低至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%或 100%)其对野生型 APP γ -切割的抑制能力。

γ 分泌酶

20 γ 分泌酶复合物由四种单独的蛋白质组成: PSEN1(早老素 1, presenilin-1, PS1)、nicastrin、APH-1(前咽缺陷 1, anterior pharynx-defective 1)和 PEN-2(早老素增强子 2, presenilin enhancer 2)。最近的证据表明, CD147 是复合物的第五种蛋白, 是非必需调节剂, 其缺失会增加 γ 分泌酶活性。

本文所述 γ 分泌酶可以来自任何物种, 例如哺乳动物、鸟类、蛙类、鱼类、果蝇、
25 线虫等。在一些实施方式中, 所述 γ 分泌酶来自人类, 或非人类灵长类例如猴子。

在一些实施方式中, 本文所述 γ 分泌酶是野生型 γ 分泌酶, 或自然存在的亚型。在一些实施方式中, 所述 γ 分泌酶包含一个或多个突变, 例如增强或降低其酶切活性的突变。在一些实施方式中, 所述 γ 分泌酶在 PS1 上有一个或两个突变: M146L, L286V。在一些实施方式中, 所述 γ 分泌酶的 PS1 和/或 PS2 活性降低或缺失。

30 在一些实施方式中, 所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽可以对任一 γ 分泌酶的酶活进行抑制(例如抑制至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)。在一些实施方式中,所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽对任一所述 γ 分泌酶突变体酶活的抑制能力为其对野生型 γ 分泌酶酶活的抑制能力的至少约 30% (例如至少约 40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍或更多)。

5

3. ApoE构建物的制造方法

本发明还提供了编码以上任一所述分离的 ApoE 构建物 (例如 SEQ ID NOs:12、60、61 和 89 任一氨基酸序列)、融合蛋白、或 ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列,比如 SEQ ID NO:33) 的蛋白部分的分离的核酸和载体 (例如克隆载体或表达载体),以及表达以上任一所述分离的 ApoE 构建物的宿主细胞,或包含该核酸或载体的宿主细胞。在一些实施方式中,所述载体为是重组 AAV 或 lentivirus 表达载体。在一些实施方式中,所述载体在所述分离的核酸的 5'端含有神经元特异性启动子。在一些实施方式中,所述神经元特异性启动子选自突触蛋白启动子(例如 hSYN)、thy-1 启动子和钙调素依赖型蛋白激酶 II- α 启动子。在一些实施方式中,所述宿主细胞为神经细胞,例如神经元 (比如人神经元、非人灵长类神经元、或啮齿类神经元)。可参见实施例 1 和 2 的载体、细胞和制造方法。

在一些实施方式中,本发明提供一种可以介导神经细胞特异性表达任一所述 ApoE 构建物、融合蛋白、或 ApoE 多肽的核酸或载体。在一些实施方式中,本发明提供一种载体或分离的核酸,其包含如下 5'至 3'序列:神经元特异性启动子 (例如 hSYN) - 编码信号肽的核苷酸序列 - 编码穿膜肽 (例如 SEQ ID NO:63 或 65) 的核苷酸序列 - 编码任一所述 ApoE 构建物 (例如 SEQ ID NO:12 或 89) /融合蛋白/ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NO:33) 的核苷酸序列。在一些实施方式中,本发明提供一种载体或分离的核酸,其包含如下 5'至 3'序列:神经元特异性启动子 (例如 hSYN) - 编码穿膜肽 (例如 SEQ ID NO:63 或 65) 的核苷酸序列 - 编码任一所述 ApoE 构建物 (例如 SEQ ID NO:12 或 89) /融合蛋白/ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NO:33) 的核苷酸序列。在一些实施方式中,本发明提供一种载体或分离的核酸,其包含如下 5'至 3'序列:神经元特异性启动子 (例如 hSYN) - 编码信号肽的核苷酸序列 - 编码任一所述 ApoE 构建物 (例如 SEQ ID NO:12 或 89) /融合蛋白/ApoE 多肽 (例如 SEQ ID NO:33) 的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述 ApoE 构建物包含 (或由其组成,或基本由其组成) ApoE2 或 ApoE3 全长序列。在一些实施方式中,所述 ApoE 构建物包含 (或

由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NOs: 60 或 61 的氨基酸序列。在一些实施方式中，所述 ApoE 多肽包含（或由其组成，或基本由其组成）SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列，比如 SEQ ID NO:33。

本申请也包括编码以上任一所述分离的 ApoE 构建物、融合蛋白、或 ApoE 多肽的核酸分子及其互补序列。本发明包括本发明核酸分子的所有形式，包括 RNA 和 DNA。应理解，本文所述的互补序列指长度与该核酸分子基本一致（例如长度至少为约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同）的互补序列，例如至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%互补。

含有所述核酸分子或其互补序列的核酸构建物也包括在本发明的范围内。核酸构建物可以是一表达盒，其含有启动子、所述核酸分子以及转录终止序列。根据表达所需，表达盒中还可任选地含有增强子。启动子、增强子、转录终止序列、可选择标记和信号序列为本领域所周知，并可由本领域技术人员根据所选择的用于表达所述多肽的宿主细胞而做出适当的选择。表达盒中的这些元件相互之间可操作连接，以使它们发挥它们预期的功能。例如，可操作连接启动子序列至感兴趣的核苷酸序列是指连接启动子序列和感兴趣的核苷酸序列，以使启动子序列能够指导感兴趣的核苷酸序列在目标细胞中进行转录和/或感兴趣的核苷酸序列编码的多肽的合成。可选择标记可以帮助从未插入载体的那些宿主细胞中选择出插入有载体的宿主细胞，举例来说，可选择标记可为赋予抗生素抗性的基因。可选择信号序列以允许所表达多肽运输至宿主细胞的外部。

遗传控制元件可用于调控多肽或蛋白质的基因表达。选择此类遗传控制元件使其在相关宿主细胞中具有活性。控制元件可具有组成型活性或为指定条件下可诱导。可诱导型控制元件在表达蛋白质具毒性或对细胞生长和/或存活力具其他不良影响时特别有用。在这种情况下，通过可诱导型控制元件调控多肽或蛋白质的表达，可以改善细胞存活力、细胞密度和/或表达多肽或蛋白质的总产率。可用于实施本发明的大量控制元件为本领域公知且可获取。

可用于本发明的代表性组成型哺乳动物启动子包括但不限于，次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（HPT）启动子、腺苷脱氨酶启动子、丙酮酸激酶启动子、 β 肌动蛋白启动子以及其他本领域普通技术人员已知的组成型启动子。此外，能驱动真核细胞中编码序列的组成型表达的病毒启动子包括，如猿猴病毒启动子、单纯疱疹病毒启动子、乳头瘤病毒启动子、腺病毒启动子、人免疫缺陷病毒（HIV）启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、巨细胞病毒（CMV）启动子、莫洛尼鼠白血病病毒及其他逆转录病毒的长末端

重复序列 (LTR)、单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子, 以及其他本领域普通技术人员已知的病毒启动子。

诱导型启动子可在存在诱导剂时驱动有效连接的编码序列的表达, 也可根据本发明使用。例如在哺乳动物细胞内, 金属硫蛋白启动子在某些金属离子存在时能诱导下游编码序列的转录。其他诱导型启动子为本领域普通技术人员所识别和/或公知。

在一些实施方式中, 适用于本发明的基因表达控制元件为神经元特异性控制元件, 包括启动子和增强子。本文中, 术语“神经元特异性”的控制元件指用于在神经元中特异性表达感兴趣的核酸分子的控制元件, 如启动子和增强子。在一些实施方案中, 神经元特异性启动子是用于在某个亚型的神经元 (例如多巴胺能神经元、兴奋性神经元、侧前额叶皮质神经元等) 中表达转基因的启动子。

本领域已知神经元特异性启动子和其它控制元件 (如增强子)。适合的神经元特异性启动子包括但不限于神经元特异性烯醇酶(NSE)启动子、芳香族氨基酸脱羧酶启动子、神经丝启动子、突触蛋白启动子、thy-1 启动子、血清素受体启动子、酪氨酸羟化酶启动子、GnRH 启动子、L7 启动子、DNMT 启动子、脑啡肽启动子、髓鞘碱性蛋白启动子、钙调素依赖型蛋白激酶 II- α 启动子、和 CMV 增强子/血小板源生长因子- β 启动子。在一些实施方式中, 所述神经元特异性启动子选自突触蛋白启动子 (例如 hSYN)、thy-1 启动子和钙调素依赖型蛋白激酶 II- α 启动子。

一般而言, 基因表达序列也包括分别涉及转录和翻译起始的 5'非转录和 5'非翻译序列, 如 TATA 盒、帽子序列、CAAT 序列等。增强子元件可任选用于增强欲表达多肽或蛋白质的表达水平。可在哺乳动物细胞中作用的增强子元件的实例包括 SV40 早期基因增强子 (如 Dijkema 等人, EMB0J.(1985)4:761 所述)、以及来自劳斯肉瘤病毒 (RSV)(如 Gorman 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79 :6777 所述)和人巨细胞病毒 (如 Boshart 等人, Cell(1985)41 :521 所述)长末端重复序列的增强子/启动子。

将控制元件连接到编码序列的系统为本领域公知 (普通分子生物学和重组 DNA 技术, 如 Sambrook,Fritsch 和 Maniatis,Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, NY, 1989, 此处引用作为参考)。适用于插入优选编码序列以在多种生长和诱导条件下的多种哺乳动物细胞中表达的商业载体也为本领域所公知。

在一些实施方案中, 核酸构建物为载体, 包括表达载体和克隆载体。表达载体是适合在宿主细胞中表达外源基因如编码本发明所述多肽 (如 ApoE2 或 ApoE3 全长序

列或任一本文所述的 ApoE 构建物、ApoE 多肽或融合蛋白)的核酸分子的载体,包括原核表达载体和真核表达载体。真核表达系统有酵母表达系统,哺乳细胞表达系统和昆虫细胞表达系统等。克隆载体用于在宿主细胞中进行目的基因(如编码本发明所述多肽的核酸分子)的扩增。克隆载体包括质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、以及

5 由它们互相组合或者与其他基因组 DNA 组合而成的载体。分子克隆中最常用的宿主细胞是大肠杆菌。

在一些实施方案中,载体为病毒载体,包括但不限于慢病毒载体、单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体。可使用本领域的标准方法制备此类载体。在一些实施方式中,所述载体为 lentivirus 或 lentiviral 载体。

10 在一些实施方案中,所述载体为重组 AAV 载体。可使用本领域的标准方法制备 AAV 载体。可使用任何血清型的腺相关病毒载体,包括但不限于 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15 和 AAV16。

在一些实施方案中,本发明提供一种载体(例如 AAV 或慢病毒载体),其含有

15 一表达盒,该表达盒含有与感兴趣的核酸分子可操作性连接的神经元特异性启动子(例如 hSyn),该感兴趣的核酸分子选自:编码本发明任一所述 ApoE C 端片段的核酸分子、编码 ApoE2 或 ApoE3 全长蛋白的核酸分子、编码本发明任一所述 ApoE2 构建物或融合蛋白的核酸分子、或编码本发明任一所述 ApoE2 多肽的核酸分子。优选地,该载体是重组 AAV 载体。优选地,适用于本文的神经元特异性启动子包括突触

20 蛋白启动子、thy-1 启动子和钙调素依赖型蛋白激酶 II- α 启动子。在一些实施方案中,所述感兴趣的核酸分子编码 SEQ ID NOs: 12、13、18-34、46-52、57-59、60-62、76、78、87 和 89 中任一所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述感兴趣的核酸分子还编码一个 N 端的信号肽(例如 SEQ ID NOs:66-68 中任一氨基酸序列)。在一些实施方案中,所述感兴趣的核酸分子还编码一个 N 端和/或 C 端穿膜肽(例如 SEQ ID

25 NOs:35-45、63-65 和 84-86 中任一氨基酸序列)。在一些实施方案中,所述感兴趣的核酸分子还编码一个 N 端和/或 C 端的标签蛋白(例如 V5、EGFP)。

本发明还提供一种表达系统,其包含本文公开的核酸分子、核酸构建物或载体。表达系统可为例如革兰氏阳性或革兰氏阴性原核宿主细胞系统,例如经修饰以表达本发明多肽的大肠杆菌。在一些实施方案中,表达系统是真核宿主细胞系统,例如酵母,

30 例如巴斯德毕赤酵母或酿酒酵母。在一些实施方案中,所述宿主细胞为哺乳动物宿主细胞,例如 HEK 293T、N2A、CHO 细胞等。在一些实施方案中,所述宿主细胞为神

经细胞，包括但不限于胶质细胞和神经元。高等真核细胞，特别是源于多细胞生物体的那些，可用于糖基化多肽的表达。适合高等真核细胞包括但不限于无脊椎动物细胞和昆虫细胞、以及脊椎动物细胞。

适于将表达目的多肽或蛋白质所需的足量核酸引入宿主细胞（例如哺乳动物宿主细胞）内的方法为本领域所公知。见如 Gething 等人, *Nature*, 293 :620-625 (1981) ; Mantei 等人, *Nature*, 281 :40-46(1979) ;Levinson 等人; EP 117,060;以及 EP 117, 058, 均在此处引用作为参考。可使用本领域中已知的任何适合方法将载体引入至宿主细胞中，所述方法包括但不限于 DEAE-右旋糖酐介导的递送、磷酸钙沉淀方法、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、电穿孔、微粒轰击、受体介导的基因递送、由聚赖氨酸、组蛋白、壳聚糖和肽介导的递送。对于哺乳动物细胞而言,优选转化方法包括, Graham 和 van der Erb, *Virology*, 52 :456-457(1978)的磷酸钙沉淀法, 或 Hawley-Nelson, *Focus* 15 :73 (1193)的 lipofectamine™. (Gibco BRL)法。哺乳动物细胞宿主系统转化的一般方面已由 Axel 述于 1983 年 8 月 16 日递交的美国专利号 4, 399, 216。转化哺乳动物细胞的多种技术可见 Keown 等人, *Methods in Enzymology* (1989)、

15 Keown 等人, *Methods in Enzymology*, 185 : 527-537 (1990), 以及 Mansour 等人, *Nature*, 336 :348-352 (1988)。在哺乳动物细胞中表达多肽或蛋白质的合适载体的非限制性代表实例包括 P(3)NA1 ;p(3), 见 Okayama 等人. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5 :1136-1142 ;pMCIneoPoly-A, 见 Thomas 等人. (1987)*Cell* 51:503-512; 以及杆状病毒载体如 PAC373 或 pAC610。

20 在一些实施方式中,本发明所述多肽或蛋白质稳定转染入宿主细胞中。然而,本领域普通技术人员应当认识到,本发明可用于瞬时或稳定转染宿主细胞。

有多种方式可以实现让目标蛋白或多肽进入目标细胞,例如使用脂质体传递编码目标蛋白的 DNA（例如质粒）或者 RNA, 或使用编码目标蛋白的慢病毒或和腺相关病毒感染细胞。

25 本发明中可应用任何易于细胞培养及表达多肽的哺乳动物细胞或细胞类型。可用于本发明的哺乳动物细胞的非限制性实例,包括 BALB/c 小鼠骨髓瘤细胞系(NSO/1, ECACC No :85110503); 人成视网膜细胞 (PER. C6 (CruCell , Leiden, The Netherlands));SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651);人胎肾细胞系 (亚克隆的 293 或 293 细胞用于在悬浮培养基中生长, Graham 等人, *J. Gen Virol.* ,36 :59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞 +/- DHFR(CH0, Urlaub 和 Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 :42 16(1980));小鼠支持

30

细胞(TM4, Mather, Biol. R 印 rod., 23 :243-251 (1980));猴肾细胞(CVI ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞 (VER0-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HeLa, ATCC CCL 2);狗肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(WI38,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 5 060562, ATCC CCL51);TRI 细胞(Mather 等人, Annals N. Y. Acad. Sci., 383 :44-68 (1982)) ; MRC 5 细胞; FS4 细胞和人肝癌细胞系 (Hep G2); 小鼠神经元细胞 N2A。

在允许插入载体中的经分离核酸的表达的条件下培养经分离宿主细胞。适于多核苷酸的表达的条件可包括但不限于适合培养基、宿主细胞在培养基中的适合密度、存在必要营养物、存在补充性因子、适合温度和湿度、以及不存在微生物污染物。本领域普通技术人员可出于表达的目的酌情选择适合条件,适当修饰本发明的步骤和组合 10 物,从而优化细胞生长和/或任意给定表达的多肽或蛋白质的产生。

制备宿主细胞(例如哺乳动物细胞)的多种方法为本领域公知。例如,可通过任意数目的公知技术将足以进行表达的核酸(一般为含有编码目的多肽或蛋白质基因及任何有效连接的遗传控制元件的载体)引入宿主细胞系内。一般而言,筛查细胞以确定 15 哪些宿主细胞实际获得了载体并表达目的多肽或蛋白质。检测宿主细胞表达的某一特定目的多肽或蛋白质的常规方法,包括但不限于免疫组化、免疫沉淀、流式细胞术、免疫荧光显微术、SDS-PAGE, Western 印迹、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、高效液相色谱 (HPLC)技术、生物活性测定和亲和层析。本领域普通技术人员将会知道检测表达多肽或蛋白质的其他合适技术。如果多个宿主细胞表达目的多肽或蛋白质,可以使用某些或所有上述技术确定哪些细胞表达多肽或蛋白质的水平最高。 20

一种或多种所表达多肽和/或多肽复合物可使用任何适合方法加以收集。一种或多种多肽和/或多肽复合物可在细胞内,在周质间隙中表达,或被分泌至细胞的外部而进入培养基中。如果多肽和/或多肽复合物在细胞内表达,那么可使含有多肽和/或多肽复合物的宿主细胞溶解,并且可通过离心或超滤移除非所要碎片来从溶解产物分离多肽和/或多肽复合物。如果多肽和/或多肽复合物被分泌至大肠杆菌的周质间隙中, 25 那么可在诸如乙酸钠(pH 3.5)、EDTA 和苯基甲基磺酰氟(PMSF)的剂存在下使细胞糊状物解冻约 30 分钟,并且可通过离心移除细胞碎片(Carter 等人, BioTechnology 10: 163-167(1992))。如果多肽和/或多肽复合物被分泌至培养基中,那么可收集细胞培养物的上清液,并且使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器例如 Amincon 或 Millipore 30 Pellicon 超滤装置加以浓缩。可在收集和浓缩步骤中包括蛋白酶抑制剂和/或抗生素以抑制蛋白质降解和/或污染微生物的生长。

可以通过标准方法分离和纯化多肽或蛋白质，包括但不限于色谱法（例如离子交换、亲和力、尺寸排阻和羟基磷灰石层析）、凝胶过滤、离心或差异溶解度、乙醇沉淀或任何其他可用的纯化蛋白质技术（见如 Scopes, Protein Purification Principles and Practice 第二版, Springer-Verlag, New York, 1987 ; Higgins, S. J. 和 Hames' B.D.(编辑), Protein Expression : A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999 ;以及 Deutscher, M. P. , Simon, M.I. , Abelson, J. N.(编辑) , Guide to Protein Purification : Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997,均在此处引用作为参考)。具体对于免疫亲和层析而言，通过将蛋白质结合于含有抗体的亲和柱可以分离蛋白质，所述抗体为针对该蛋白质所产生并固定于固态支持物上。或者可
10 利用标准重组技术将亲和标记如流感外壳序列、多聚组氨酸、谷胱甘肽-S-转移酶连接于蛋白质，以使得可通过合适的亲和柱进行简单纯化。可在任意或所有阶段加入蛋白酶抑制剂如苯甲基磺酰氟（PMSF）、亮抑蛋白酶肽、胃蛋白酶抑制剂或抑酶肽，以减少或消除纯化过程中多肽或蛋白质的降解。当必须裂解细胞以分离和纯化表达多肽或蛋白质时，尤其需要蛋白酶抑制剂。本领域普通技术人员应当认识到根据待纯化多
15 肽或蛋白质的特性、表达多肽或蛋白质的细胞特性，以及细胞生长的培养基组成，具体纯化技术有所不同。

4. 药物组合物和试剂盒

本发明还提供了一种药物组合物，其含有(i)本文任一所述的分离的 ApoE 构建物
20 （例如 SEQ ID NOs:12、60、61 和 89 中任一氨基酸序列）、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列，比如 SEQ ID NO:33）、分离的核酸、载体（例如神经特异性表达 ApoE 构建物（例如全长 ApoE2 或 ApoE3）或 ApoE 多肽的载体）、或宿主细胞，和(ii)药学上可接受的载体。

25 药物组合物中活性成分（即本发明的 ApoE 构建物、ApoE 多肽（如 ApoE C 端多肽）、融合蛋白或表达载体）的实际剂量水平可以改变，以获得有效达到下述效果的活性成分的量：达到对具体患者、组合物和施用模式的所需治疗反应，且对患者无毒性。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素，包括本发明所用的多肽或者表达载体的活性、施用途径、施用时间、治疗持续时间、用于与所用特定组合物组合的
30 其它药物、化合物和/或物质、所治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康以及先前医疗史，以及医学领域内熟知的类似因素。

本文中，可药用载体包括稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒，包括但不限于水、动物油、植物油、淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、丙二醇、水、乙醇等。如果需要，该组合物还可以包含少量的湿润剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。通常，生理上可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者暴露于其的细胞无毒，并且包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵；氯化六甲双铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；以及间甲酚)；低分子量(小于约 10 个残基)多肽；蛋白质，诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖以及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖，诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐反离子，诸如钠；金属络合物(例如 Zn-蛋白质络合物)；和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)。

在一些实施方案中，药物组合物被配制以具有在约 4.5 至约 9.0 的范围内的 pH，包括例如约 5.0 至约 8.0、约 6.5 至约 7.5、或约 6.5 至约 7.0 中的任一者的 pH 范围。在一些实施方案中，还可通过添加适合张力调节剂诸如甘油来使药物组合物与血液等张。

待用于体内施用的药物组合物通常被配制成无菌的大致上等张药物组合物，并且完全符合美国食品与药物管理局的所有良好制造规范(GMP)规定。通过经无菌过滤膜过滤，易于实现无菌性。在一些实施方案中，组合物不含病原体。对于注射，药物组合物可呈液体溶液的形式，例如处于生理上可相容的缓冲液诸如汉克斯溶液(Hank's solution)或林格氏溶液(Ringer's solution)中。此外，药物组合物可呈固体形式，并且在使用之前即刻加以再溶解或混悬。还包括冻干组合物。

本文中，药物组合物可以为溶液、混悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。可根据具体的给药方式和给药途径将本发明的多肽制备成合适的剂型。

药物组合物可适于本文所述的多种施用模式，包括例如全身性或局部化施用。在一些实施方案中，药物组合物被配制用于静脉内施用或皮下注射。在一些实施方案中，药物组合物被配制用于局部施用，例如局部施用至肿瘤部位(例如肿瘤内注射)、或局部施用(如注射)到大脑(例如皮层或海马体)。

在一些实施方案中，药物组合物根据常规程序被配制成适合于静脉内、腹膜内或脑内注射的药物组合物。通常，注射用组合物是处于无菌等张水性缓冲液中的溶液。必要时，组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂(诸如利多卡因(lignocaine))以减轻注射部位处的疼痛。通常，成分以分开方式或以一起混合成单位剂型的方式加以供给，例如作为干燥冻干粉末或无水浓缩物处于指示活性剂的数量的气密容器诸如安瓿或药囊中。当组合物待通过输注施用，它可用含有无菌药品级水或盐水的输注瓶加以分配。当组合物通过注射施用，可提供含无菌注射用水或盐水的安瓿以使成分可在施用之前加以混合。

在一些实施方案中，所述药物组合物适于施用至人。在一些实施方案中，所述药物组合物适于施用至啮齿动物(例如小鼠、大鼠、兔)或非人灵长类动物(例如猴)。在一些实施方案中，所述药物组合物含于单次使用小瓶诸如单次使用密封小瓶中。在一些实施方案中，所述药物组合物含于多次使用小瓶中。在一些实施方案中，所述药物组合物散装含于容器中。在一些实施方案中，所述药物组合物是经低温保存的。

本发明还提供了包含本文任一所述的分离的 ApoE 构建物、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽、分离的核酸、载体、宿主细胞、或其组合物(诸如药物组合物)的单位剂型。术语“单位剂型”是指适合作为单位剂量用于个体的物理离散单元，每个单元含有被计算以产生所需治疗作用的预定量的活性物质，以及适合药物载体、稀释剂或赋形剂。这些单位剂型可以单一或多个单位剂量储存在适合包装中，并且还可加以进一步灭菌和密封。

本申请还提供了在适合包装中包含本文所述的组合物(诸如药物组合物)的制品。适于本文所述的组合物(诸如药物组合物)的包装在本领域中是已知的，并且包括例如小瓶(诸如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、柔性包装(例如密封迈拉(Mylar)或塑料袋)等。这些制品可进一步加以灭菌和/或密封。

本发明还提供了包含本文任一所述的分离的 ApoE 构建物、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽、分离的核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物的试剂盒。在一些实施方式中，所述试剂盒还包括关于使用所述蛋白、表达载体、或组合物的方法诸如本文所述的用途的一个或多个说明。本文所述的药盒可还包括从商业和使用者观点来看可合乎需要的其他材料，包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器、以及具有关于进行本文所述的任何方法的说明的包装插页。

5. 疾病治疗方法

本发明还提供了任一实施方案所述的分离的 ApoE 构建物(例如 SEQ ID NOs:12、60、61 和 89 中任一氨基酸序列)、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列, 比如 SEQ ID NO:33)、分离的核酸、载体(例如神经特异性表达 ApoE 构建物(例如全长 ApoE2 或 ApoE3)或 ApoE 多肽的载体)、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗或预防一个个体(例如人)中与 γ 分泌酶的酶切活性(例如对 APP 的 γ 酶切活性)相关的疾病的药物中的应用。在一些实施方式中, 所述药物抑制 γ 分泌酶的酶切活性(例如对 APP 的 γ 酶切活性), 从而治疗或预防所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病。在一些实施方式中, 本发明提供了一种治疗或预防一个个体(例如人)中与 γ 分泌酶的酶切活性(例如对 APP 的 γ 酶切活性)相关疾病的方法, 包括向所述个体施用有效剂量的本发明所述任一分离的 ApoE 构建物(例如 SEQ ID NOs:12、60、61 和 89 中任一氨基酸序列)、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列, 比如 SEQ ID NO:33)、分离的核酸、载体(例如神经特异性表达 ApoE 构建物(例如全长 ApoE2 或 ApoE3)或 ApoE 多肽的载体)、宿主细胞或药物组合物。在一些实施方式中, 所述方法抑制 γ 分泌酶的酶切活性(例如对 APP 的 γ 酶切活性), 从而治疗或预防所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病。在一些实施方式中, 所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病选自如下的组: 神经系统退行性疾病, 肿瘤或癌症, 炎症疾病和肾脏疾病。在一些实施方式中, 所述疾病选自如下的组: 阿尔茨海默病及其相关疾病、淀粉样脑血管病、唐氏综合症、与衰老相关的其他神经退行性疾病(比如额颞叶痴呆)、头颈癌(如头颈鳞细胞癌和口腔部鳞状细胞癌)、乳腺癌、肝癌、胰腺癌(包括转移性胰腺癌)、卵巢癌、肺癌(如非小细胞肺癌、肺腺癌和小细胞肺癌)、胶质瘤(如恶性神经胶质瘤)、纤维瘤、淋巴瘤(如 B 细胞淋巴瘤)、骨肉瘤、胃癌、膀胱癌、哮喘(如过敏性哮喘)、肺炎、气道炎症、急性肾损伤、透明细胞肾细胞癌、肾纤维化、和梗阻性肾病。在一些实施方式中, 所述疾病为 AD 及其相关疾病, 例如散发性阿尔茨海默病(sporadic Alzheimer's disease, sAD)。

本发明提供的所述药物、治疗或预防方法适用于任何个体, 包括但不限于哺乳动物、鸟类、蛙类、鱼类、果蝇、线虫等。哺乳动物包括但不限于灵长类(例如人类, 或非人类灵长类例如猴子)、啮齿类(例如小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、松鼠、豚鼠和兔子)、家畜(例如猪、牛、羊、马、驴)、宠物(例如猫、狗、兔和仓鼠)等。在一些实施方式中, 所述个体是小鼠或猴。在一些实施方式中, 所述个体是人类。

本文中，合适的给药方式和给药途径为本领域所周知，合适的施用途径包括静脉内、肌内、真皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其它胃肠外施用途径，例如经注射或灌注。“胃肠外给药”是除了肠内和局部施用以外的施用模式，通常经注射，并包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、鼻腔、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和灌注。术语“全身施用(systemic administration)”和“全身施用(systemically administered)”是指将本文描述的试剂或组合物施用于个体(如哺乳动物)使得所述试剂或组合物经由循环系统被递送至体内位点(包括药物作用的靶向位点)的方法。全身施用包括但不限于口服、鼻内、直肠和胃肠外(如，除了通过消化道之外，诸如肌内、静脉内、动脉内、透皮和皮下)施用。

在一些实施方案中，将本发明任一所述分离的 ApoE 构建物(例如 SEQ ID NOs:12、60、61 和 89 中任一氨基酸序列)、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列，比如 SEQ ID NO:33)、分离的核酸、载体、或药物组合物经任何适合的途径引入中枢神经系统，包括脑室内和鞘内注射。脑室内注射可经例如与贮库(例如 Ommaya 贮库)连接的脑内室导管辅助。

在一些实施方案中，可采用本领域周知的技术递送编码本发明多肽的核酸分子，如本发明多肽的编码序列，包括 RNA 和 DNA 序列。在一些实施方案中，以表达载体(如利用病毒载体，例如 AAV 或慢病毒载体)的方式向需要的对象(例如人)递送本发明多肽的编码序列。在一些实施方案中，采用脂质体递送本文所述的可以编码本发明多肽的 DNA 或者 RNA 分子。因此，在这些实施方案中，本发明的药物组合物含有脂质体以及本文所述的编码本发明多肽的 DNA 或者 RNA 分子及其表达载体。适用于本发明的脂质体可以是本领域周知的适合于人体给药的脂质体。

本发明提供的 ApoE 构建物(例如全长 ApoE2 或 ApoE3)、融合蛋白、或 ApoE 多肽是 γ 分泌酶的抑制剂(例如对 APP 的 γ 酶切特异性抑制)，因此本发明的多肽或其药物组合物可用于治疗或预防受益于 γ 分泌酶被抑制的疾病，以抑制 γ 分泌酶为靶标而获得治疗或预防益处的疾病(本文也称为 γ 分泌酶介导的疾病或与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病)。已知有多种疾病由 γ 分泌酶介导，包括但不限于：神经系统退行性疾病，如阿尔茨海默病及相关疾病和淀粉样脑血管病(Erik D. Roberson 和 Lennart Mucke, 100 years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease, 314: 781-784 (2006); Bart De Strooper 等, Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and

- Role in Alzheimer's Disease, 2:a006304 (2012); Weiming Xia, γ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond, Neuroscience Letters 701: 162–169 (2019)) ; 肿瘤或癌症, 包括头颈癌如头颈鳞细胞癌和口腔部鳞状细胞癌(Liang Mao 等, γ -Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma, Int. J. Cancer: 142, 999–1009 (2018)) , 乳腺癌和肝细胞癌 (Hui Jia 等, γ -Secretase inhibitors for breast cancer and hepatocellular carcinoma: From mechanism to treatment, Life Sciences 268 (2021) 119007) , 胰腺癌 (包括转移性胰腺癌) (Ana De Jesus-Acosta 等, A Phase II Study of the Gamma Secretase Inhibitor RO4929097 in Patients with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma, Invest New Drugs. 2014 August; 32(4): 739–745) , 卵巢癌 (Zhaoyi Feng, Inhibition of gamma-secretase in Notch1 signaling pathway as a novel treatment for ovarian cancer, Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 5), pp: 8215-8225) , 肺癌 (如非小细胞肺癌或肺腺癌和小细胞肺癌) (Antonio Maraver, Therapeutic effect of γ -secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma through derepression of DUSP1 phosphatase and inhibition of ERK, Cancer Cell. 2012 August 14; 22(2); Katherine M. Morgan 等, Gamma secretase inhibition by BMS-906024 enhances efficacy of paclitaxel in lung adenocarcinoma, Mol Cancer Ther. 2017 December; 16(12): 2759–2769) , 胶质瘤如恶性神经胶质瘤 (Edward Pan 等, Phase I Study of RO4929097 with Bevacizumab in Patients with Recurrent Malignant Glioma, Neurooncol. 2016 December ; 130(3): 571–579) , 纤维瘤 (Shivaani Kummar 等, Clinical Activity of the γ -Secretase Inhibitor PF-03084014 in Adults With Desmoid Tumors (Aggressive Fibromatosis), JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, VOLUME 35, NUMBER 14, MAY 10, 2017) , 淋巴瘤如 B 细胞淋巴瘤 (Shuji Tohda, Establishment of a novel B-cell lymphoma cell line with suppressed growth by gamma-secretase inhibitors, Leukemia Research 30 (2006) 1385–1390) , 胃癌 (Hyun-Woo Lee 等, Targeting Notch signaling by γ -secretase inhibitor I enhances the cytotoxic effect of 5-FU in gastric cancer, Clin Exp Metastasis (2015) 32:593–603) , 膀胱癌 (YIBING WANG 等, γ -secretase inhibitor inhibits bladder cancer cell drug resistance and invasion by reducing epithelial-mesenchymal transition, MOLECULAR MEDICINE REPORTS 12: 2821-2827, 2015) , 骨肉瘤 (M Tanaka 等, Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation, British Journal of Cancer (2009) 100, 1957–1965) ; 炎症疾病, 包括哮喘, 如过敏性哮喘 (Weixi Zhang 等, γ -Secretase Inhibitor

Alleviates Acute Airway Inflammation of Allergic Asthma in Mice by Downregulating Th17 Cell Differentiation, Mediators of Inflammation, Volume 2015, Article ID 258168, 7 pages), 气道炎症如过敏性气道炎症 (Weixi Zhang 等, γ -Secretase Inhibitor Alleviates Acute Airway Inflammation of Allergic Asthma in Mice by Downregulating Th17 Cell Differentiation, Mediators of Inflammation, Volume 2015, Article ID 258168), 肺炎 (Jin Hyun Kang 等, γ -Secretase Inhibitor Reduces Allergic Pulmonary Inflammation by Modulating Th1 and Th2 Responses, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE VOL 179, 2009) 等; 肾脏疾病, 如急性肾损伤 (Jean-Christophe Wyss 等, Targeted γ -secretase inhibition of Notch signaling activation in acute renal injury, Am J Physiol Renal Physiol 314: F736–F746, 2018)。

在一些实施方式中, 所述与 γ 分泌酶的酶切活性 (例如对 APP 的 γ 酶切活性) 相关的疾病是神经退行性疾病, 例如阿尔茨海默氏病(AD)、路易体痴呆(DLB)、轻度认知障碍(MCI)、额颞叶痴呆(FTD)、脑淀粉样血管病(CAA)、CAA-相关脑出血、血管性认知障碍、帕金森病(PD)、多发性硬化症(MS)、创伤性脑损伤(TBI)或脆性 X(Fragile X syndrome)相关性震颤/共济失调综合征。CAA 是一种以蛋白质 (主要是淀粉样蛋白 β) 沉积在脑血管壁为特征的病症。CAA 在 AD 患者中很常见, 但在没有 AD 证据的情况下也会发生。

在一些实施方案中, 所述与 γ 分泌酶的酶切活性 (例如对 APP 的 γ 酶切活性) 相关的疾病是“淀粉样蛋白 β 相关疾病”, 该术语是指以异常高水平的淀粉样蛋白 β 肽的产生、积累和/或聚集为特征的任何病症, 例如, 在淀粉样斑块的形式, 特别是在大脑中。淀粉样蛋白 β 相关疾病包括 AD、唐氏综合征、脆性 X 综合征(Fragile X syndrome)、CAA、CAA 相关脑出血和散发性包涵体肌炎。

AD 是在发达国家中最常见的神经退化性疾病。在组织病理学上, AD 的特征在于包含 A β 肽的淀粉样蛋白斑的积聚和由 tau 蛋白制成的 NFT。在临床上, AD 与特征在于记忆、功能、语言能力、判断、以及执行功能的损失的进行性认知障碍相关联。AD 经常在其后期阶段导致严重的行为症状。

大致一半的早发型阿尔茨海默氏病例(即, 在 65 岁之前诊断)为家族性阿尔茨海默氏病(FAD), 并且以常染色体显性方式遗传。FAD 由至少 3 个基因中的一者的突变造成: APP 突变、PSEN1 突变和 PSEN2 突变。已在 121 个家族中识别出淀粉样蛋白前体蛋白质(APP)突变。最常见的错义突变利用 Ile(伦敦突变)、Phe 或 Gly 残基替换 Val⁷¹⁷ 残基, 利用 Gln 残基(荷兰突变)或 Gly 残基(北极突变)替换 Glu⁶⁹³, 或利用 Asn

和 Leu 残基替换 Lys⁶⁷⁰ 和 Met⁶⁷¹(双重突变称为瑞典突变, 在 APP₇₇₀ 异构体中编号)。已在 480 个家族中识别出 219 个早老素 1(PSEN1), 其中 γ 分泌酶裂解减弱、一些突变的氧化应力增加且对 DNA 损伤诱发的死亡的神经元敏感性增加。已在 34 个家族中识别出 13 个早老素 2(PSEN2), 其中 γ 分泌酶裂解减弱且一些突变的氧化应力增加。

5 在一些实施方式中, 本发明提供的任一分离的 ApoE 构建物(例如 SEQ ID NOs:12、60、61 和 89 任一氨基酸序列)、融合蛋白、分离的 ApoE 多肽(例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列, 比如 SEQ ID NO:33)、分离的核酸、载体(例如神经特异性表达 ApoE 构建物(例如全长 ApoE2 或 ApoE3)
10 或 ApoE 多肽的载体)、宿主细胞或药物组合物可以通过抑制 γ 分泌酶酶活而用于治疗任何与 APP γ -酶切相关的疾病(如 AD), 例如带有任何 APP 突变的疾病(如 AD)。在一些实施方式中, 所述 APP 是人 APP, 其包含下述一个或多个突变: K670N、M671L、瑞典(K670N+M671L)、佛罗里达(I716V)、伦敦(V717I)、APP_{M596V}(不能进行 β 切割)、 γ 切割位点附近的 fAD 突变(例如 T714I、V717F、L723P)、 β -或 α -切割位点附近的
15 fAD 突变(例如 KM670/671NL、E693K、E693 Δ)、或保护性冰岛突变(A673T)。

用于评估阿尔茨海默病表型、用于表征治疗剂和评价治疗的一些行为和组织病理学测试是本领域已知的。组织学分析通常在死后进行。可使用硫磺素-S 进行 A β 水平的组织学分析。刚果红, 或抗-A β 染色(例如, 4G8、10D5 或 6E10 抗体)将切片的脑组织上的 A β 沉积可视化(参见, 例如, Holcomb 等人, 1998, Nat. Med. 4:97-100; Borchelt
20 等人, 1997, Neuron 19:939-945; Dickson 等人, 1988, Am. J. Path. 132:86-101)。将转基因小鼠中的 A β 沉积物可视化的体内方法也已得到描述。BSB((反式, 反式)-1-溴-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯)和 PET 示踪物 ¹¹C-标记的 Pittsburgh 化合物-B(PIB)与 A β 斑块结合(参见, 例如, Skovronsky 等人, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:7609-7614; Klunk 等人, 2004, Ann. Neurol. 55:306-319)。含 ¹⁹F 的亲淀粉样蛋白刚果红型化合物
25 FSB((E,E)-1-氟-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯)允许通过 MRI 将 A β 斑块可视化(参见, 例如, Higuchi 等人, 2005, Nature Neurosci. 8:527-533)。放射性标记的、腐胺修饰的淀粉样蛋白- β 肽体内标记阿尔茨海默病的小鼠模型中的淀粉样沉积物(参见, 例如, Wengenack 等人, 2000, Nat. Biotechnol. 18:868-872)。

可使用针对阿尔茨海默病的本领域已知的标准诊断方法来鉴别罹患阿尔茨海默
30 病的受试者。通常, 阿尔茨海默病的诊断是基于患者的症状(例如, 记忆功能进行性下降、正常活动的逐步放弃和受挫、冷漠、躁动或易怒、攻击性、焦虑、睡眠障碍、心

烦、异常运动行为、去抑制、社交退缩、食欲下降、幻觉、痴呆)、病史、神经心理学测试、神经和/或身体检查。还可以测试脑脊髓液中与阿耳茨海默病理学有关的多种蛋白质,包括 tau、淀粉样 β 肽和 AD7C-NTP。基因测试也可用于早发性家族性阿尔茨海默病(eFAD)、常染色体显性遗传性疾病。临床基因测试可用于具有 AD 症状的个体或具有早发型疾病患者的风险家族成员。在美国,可根据临床实验室改进修正案,在临床或联邦政府批准的临床实验室中测试 PS2 的突变和 APP。PS1 突变的商业测试也是可用的(Elan Pharmaceuticals)。

可以通过上述任何所述方法或指标来评估本发明的治疗效果。在一些实施方式中,本发明的 ApoE 构建物、ApoE 多肽、载体、组合物、或治疗/预防方法可以达到以下一个或多个效果: (i) 在神经元中(体内或体外)以细胞自主性的方式调控 APP 的剪切; (ii) 抑制(例如抑制至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) γ -分泌酶的酶活,例如抑制 γ -分泌酶介导的 APP γ -剪切,与 γ -分泌酶抑制剂(例如 PF03084014)的 APP γ -剪切抑制效果相似; (iii) 降低(例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) APP 的淀粉样代谢,例如减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 淀粉样蛋白- β ($A\beta$) (例如 $A\beta_{40}$ 和/或 $A\beta_{42}$) 的生成,或降低(例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 对 C 末端片段- β (β -CTF) 的 γ -剪切; (iv) 提高(例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) APP 的非淀粉样代谢,例如增加(例如增加至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高) C 末端片段- α (α -CTF) 的生成; (v) 不影响(或影响不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) α -分泌酶、 β -分泌酶、和/或 γ -分泌酶(或其亚基)(例如 ADAM10、BACE1、PS1 和/或 PS2)的 mRNA 和/或蛋白质表达; (vi) 不影响(或影响不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) β -分泌酶介导的 APP β -剪切,和/或 α -分泌酶介导的 APP α -剪切; (vii) 不抑制(或抑制不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) 对非 APP 蛋白(例如 APLP1 (APP like protein 1) 或 Notch)或其片段的 γ -剪切,不增加(或增加不超过约 30%、20%、10%、5%或更少) 非 APP 蛋白 γ -剪切产生的 α -CTF; (viii) 减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 或预防脑中淀粉样斑块,例如减少(例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%) 淀粉样斑块的平

均斑块大小、总面积、和/或密度，减少（例如减少至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%）或预防神经元内 A β （例如 A β 40 和/或 A β 42）生成，减缓（例如减缓至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍或更多）AD 病理进程，提高（例如提高至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍或更高）个体存活率和/或寿命；(ix) 神经元局部表达（例如在皮质、齿状回(DG)和海马体 CA3 表达）的本发明所述 ApoE 构建物可以从远处迁移到下托并积聚在淀粉样斑块周围，从而在这些淀粉样蛋白生成热点局部抑制 γ -分泌酶的酶活；或(x)减轻（例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%）、消除、或预防（包括减缓发生时间）一个或多个 AD 症状(例如，记忆功能进行性下降、正常活动的逐步放弃和受挫、冷漠、躁动或易怒、攻击性、焦虑、睡眠障碍、心烦、异常运动行为、去抑制、社交退缩、食欲下降、幻觉、痴呆)。

在一些实施方案中，所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的癌症包括如下一个或多个：头颈癌（如头颈鳞细胞癌和口腔部鳞状细胞癌）、乳腺癌、肝癌、胰腺癌（包括转移性胰腺癌）、卵巢癌、肺癌（如非小细胞肺癌、肺腺癌和小细胞肺癌）、胶质瘤（如恶性神经胶质瘤）、纤维瘤、淋巴瘤（如 B 细胞淋巴瘤）、骨肉瘤、胃癌、膀胱癌。

在一些实施方案中，本文所述的治疗与 γ 分泌酶的酶切活性相关癌症的药物或方法具有以下生物活性中的一者或多者：(1)杀灭癌细胞，例如至少约 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高中的任一者的肿瘤细胞死亡率；(2)抑制癌细胞的增殖，例如抑制至少约 10%(包括例如至少约 20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一者) 增殖；(3)降低肿瘤尺寸，例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%肿瘤尺寸；(4)缓和患有癌症的个体中的一种或多种症状；(5)抑制肿瘤转移(例如向淋巴结的转移)，例如抑制至少约 10%(包括例如至少约 20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一者)的肿瘤转移；(6)延长存活期，例如延长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18 或 24 个月或更长时间中的任一者；(7)预防癌症或延长达到癌症进展的时间，例如使达到癌症进展的时间延长至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月或更长时间中的任一者；以及(8)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。

在一些实施方案中，所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病是炎性疾病，包括但不限于哮喘（如过敏性哮喘）、肺炎、气道炎症。在一些实施方案中，本文所述的药

物或治疗/预防方法可以降低（例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一者）炎症引发细胞因子的分泌和/或活性，和/或减轻（例如减轻至少约 10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一者）、消除或预防（包括减缓发生时间）一种或多种疾病症状。

- 5 在一些实施方案中，所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病是肾脏疾病，指影响肾脏或肾脏系统的任意疾病、病症或病况。肾脏相关疾病或病况的实例包括，但不限于，急性肾脏疾病（或衰竭）、透明细胞肾细胞癌、肾纤维化、或梗阻性肾病。评估和诊断肾脏疾病的常规标记物包括 GFR、肌酸酐和白蛋白，可以使用任一种标记物或相关方法评估本发明治疗效果。在一些实施方案中，本文所述的药物或治疗/预防方法
- 10 可以(i)降低（例如降低至少约 10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一者）、消除或预防（包括减缓发生时间）一个或多个肾脏疾病指标；和/或 (ii)保护或改善肾功能。

- 本发明提供一种治疗或预防对象（例如人） γ 分泌酶介导的疾病的方法，该方法包括给予该对象治疗有效量或预防有效量的本发明任一所述 ApoE 构建物、融合蛋白、
- 15 ApoE 多肽、核酸分子、载体或其药物组合物。有效量可根据对象年龄、性别、体重、病症、一般健康以及先前医疗史等因素由本领域技术人员确定。所述疾病优选包括前文所述的神经系统退行性疾病、肿瘤或癌症、炎性疾病以及肾脏疾病等。

- 本发明的一些实施方案提供一种抑制 γ 分泌酶的酶切，从而抑制 APP 的淀粉样代谢，减少 A β 生成的方法，该方法包括在表达 γ 分泌酶的细胞内（例如神经元）产生 ApoE2（例如 N 端带有穿膜肽的 ApoE2）或本文任一实施方案所述的 ApoE 构建物（例如 ApoE2 的 C 端片段，或全长 ApoE2 或 ApoE3）、融合蛋白或 ApoE 多肽（例如 SEQ ID NOs:13、18-34、46-52、57-59、62、76、78 和 87 中任一氨基酸序列，比如 SEQ ID NO:33）。在一些实施方案中，所述细胞为神经元。在一些实施方案中，
- 20 所述方法用于减缓（例如减缓至少约 10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一者）、预防或治疗 AD 和淀粉样脑血管病的发生和发展。本文所述的产生包括表达产生多肽和从细胞外部将多肽递送进入细胞内。在一些实施方案中，采用脂质体将编码所述 ApoE 构建物（例如 ApoE2 和/或 ApoE3 和/或其 C 端片段）或 ApoE 多肽的 DNA 或者 RNA 递送到所述细胞内，使其在细胞内表达产生所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽；或者采用慢病毒和腺相关病毒侵染细胞的方式在所述细胞内产生
- 30 所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽；或采用细胞穿膜肽或细胞胞吞增强的方式使所述 ApoE 构建物或 ApoE 多肽进入所述细胞内。

在一些实施方案中，本文任一所述实施方案所述的 ApoE 构建物或融合蛋白、用途和方法中提到的多肽特别包括 SEQ ID NOs: 12、13、18-33 和 89 中任一所示的多肽。

5 实施例

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并不用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，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。

- 10 实施例中，数据使用GraphPad Prism软件分析，所有的数据都展示为mean ± SEM。下述数据分析使用了unpaired, paired或者one sample t-test。显著性差异由星号(*)展示，一个星号(*)代表P值小于0.05；两个星号(**)代表P值小于0.01；三个星号(***)代表P值小于0.001；四个星号(****)代表P值小于0.0001。

15 实施例1

1. 主要试剂与材料

HEK 293T细胞系培养在含有10%胎牛血清(FBS)(Life公司)和1%青霉素/链霉素的DMEM培养液(HyClone公司)中，并培养在含有5%CO₂的37℃无菌细胞培养箱(ThermoFisher公司)中。

- 20 原代培养的神经元来自于16天胚胎小鼠的皮层或者海马。小鼠皮层或海马在体视镜下取得；20U/ml木瓜蛋白酶(Worthington公司)在37℃消化10分钟；消化后以单细胞形式存在的神经元以每孔(24孔板)100000个神经元种板；在含有2% B27(ThermoFisher公司)和1%青霉素/链霉素的神经元培养液中(Neurobasal medium; ThermoFisher公司)培养该神经元；每周换一次新鲜培养液。

- 25 0-7月龄C57野生型小鼠和AD模型小鼠(5×FAD小鼠[Tg6799]，表达含有致病性突变的APP和PS1的小鼠。所表达的APP上包含有三个突变：K670N/M671L、I716V、V717I；而PS1则包含有两个突变：M146L, L286V)。给予小鼠充足的食物和水，并在室温下以12h/12h的明暗周期饲养，饲养环境达到SPF(Specific Pathogen Free)级标准。

- 30 酶联免疫吸附剂测定盒(ELISA)购自Invitrogen公司，人源Aβ40(KHB3481)，人源Aβ42(KHB3441)，小鼠源Aβ40(KMB3481)。

转染试剂是购自ThermoFisher公司的lipofectamine2000和SignaGen公司的Polyjet。

用于qRT-PCR的Quantitect SYBR-Green qRT-PCR试剂盒购自Qiagen公司。

表1： 抗体信息

试剂	来源	目录号
Rabbit anti- APP [Y188] (monoclonal)	Abcam	ab32136
Rabbit anti-ApoE [EP1374Y] (monoclonal)	Abcam	ab52607
Rabbit anti-ApoE [EP1373Y] (monoclonal)	Abcam	ab51015
Rabbit anti-PS1 [EP2000Y] (monoclonal)	Abcam	ab76083
Rabbit anti-PS2 [EP1515Y] (monoclonal)	Abcam	ab51249
Mouse anti-GAPDH (monoclonal)	Proteintech	60004-1-Ig
Rabbit anti-alpha/beta-Tubulin (polyclonal)	Cell Signaling Technology	2148
Chicken anti-MAP2 (polyclonal)	Synaptic Systems	188006

2. 实验方法

- 52.1 蛋白样品制备及免疫印迹（Western Blot）
- 5a) 构建在哺乳动物细胞中表达目的蛋白的质粒，蛋白表达启动子是CAG。
- 5b) 在HEK 293T细胞系中表达目的蛋白。在转染前一天进行细胞传代，当细胞的贴壁程度达到70%-80%时进行转染。转染试剂是lipofectamine2000（ThermoFisher公司）。
- 10c) 转染4-6小时后，更换为新鲜的细胞培养液。
- 10d) 转染36-48小时后，裂解细胞（10% 1M tris-HCl (pH=6.8)，4% SDS，20% 甘油，0.01 %溴酚蓝），收集蛋白样品，之后进入免疫印迹实验或者冻存在-80℃冰箱中。
- 10e) 聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白上样之前，98℃煮沸10min，然后12000 rpm离心10min。电泳：上层浓缩胶80 V；下层分离胶120 V。
- 15f) 转膜。滤纸使用前在电转液中浸湿，PVDF膜放在甲醇中10s激活，从电泳槽中取出电泳结束的胶，按滤纸-PVD膜-胶-滤纸从下到上的顺序放好，放入转膜仪，恒流转膜，0.1A，70min。
- 15g) 封闭和孵育抗体：将转好的PVDF膜放在5% BSA/TBST封闭液中，于摇床上室温封闭1 h。孵育一抗，4℃，摇床过夜（12-16 h）；1×TBST，洗三遍，每10分钟清洗一次；孵育二抗，室温摇床1-2 h；1×TBST，洗三遍，每10分钟清洗一次。
- 20h) 显影成像：ECL化学发光超敏显色试剂显影。

2.2 脑片制备和免疫组化

- a) 灌流取脑。从心脏处对小鼠灌流，先用20ml PBS冲洗掉血液，之后用20ml 4% PFA进行灌流。
- 5 b) 固定和脱水。先用4%PFA 在4℃固定24小时，再用30%蔗糖在4℃脱水。
- c) 鼠脑切片。脱水24小时后，将小鼠脑子切成厚度为40μm的脑片，放在冰冻缓存液中储存或进入后续免疫组化。
- d) THS染色。ddH₂O，洗三遍，每次5分钟；1%的THS水溶液，浸泡10分钟；80%乙醇，洗两遍，每次3分钟；95%乙醇，洗一遍，3分钟。进行后续免疫组化。如果不
- 10 进行THS染色，则直接进行下面的免疫组化。
- e) 免疫组化。1×PBS，洗三遍，每次10分钟；使用0.1%的Triton-X100进行细胞破膜；使用5%的驴或者山羊血清进行封闭；之后孵育一抗，4℃，摇床过夜（12-16 h）；1×PBS，洗三遍，每次10分钟；孵育二抗，室温摇床1-2 h；1×PBS，洗三遍，每次10分钟。
- 15 f) 贴片及封片。
- g) 呈像，在封片24小时后。
- h) 使用Image J处理图像及分析信号密度。

2.3 酶联免疫吸附剂测定（ELISA）

- 20 按照 Invitrogen 公司的 ELISA 分析试剂盒中的标准流程进行实验。
- a) 在HEK 293T细胞系中表达目的蛋白。在转染前一天进行细胞传代，当细胞的贴壁程度达到70%-80%时进行转染。转染试剂是lipofectamine2000（ThermoFisher公司）。
- b) 转染4-6小时后，更换新鲜的培养液；
- 25 c) 转染36-48小时后，收集细胞培养液，之后进入ELISA流程或者冻存在-80℃冰箱中。
- d) 50 μl标准样品和实验样品分别添加到96孔板每孔中。
- e) 50 μl人源Aβ40或Aβ42或小鼠源Aβ40检测抗体添加到96孔板每孔中。
- f) 轻轻摇晃，室温放置3小时。
- 30 g) 去除孔中液体，1×wash缓冲液清洗4次。
- h) 添加100 μl的含有1×anti-Rabbit IgG HRP的缓冲液。

- i) 轻轻摇晃，室温放置30分钟。
- j) 去除孔中液体，1×wash缓冲液清洗4次。
- k) 每孔中添加100 μl的Stabilized Chromogen，避光室温放置30分钟。
- l) 每孔中添加100 μl的Stop Solution。
- 5 m) 酶标仪测量450 nm吸光度。

2.4 qRT-PCR

按照TRIzol™ Reagent（ThermoFisher公司）的操作手册提取处理的细胞的RNA。

- a) 在 HEK 293T 细胞系中表达目的蛋白。在转染前一天进行细胞传代，当细胞
- 10 的贴壁程度达到 70%-80%时进行转染。转染试剂是 lipofectamine2000（ThermoFisher 公司）。
- b) 转染 6 小时后，更换新鲜的培养液。
- c) 转染 48 小时后，提取 RNA。
- d) 24 孔板的每孔加入 500 μl Trizol（ThermoFisher 公司），摇晃，室温 20 分钟。
- 15 e) 收集细胞悬液至离心管中。
- f) 加入 250 μl 氯仿，彻底颠倒混匀，室温静置 3 分钟。
- g) 12000g，4℃离心 15 分钟。离心后，溶液出现明显分层，底部为氯仿含苯酚（粉色），中间为 DNA 和蛋白质，最上层为含有 RNA 的水相（透明澄清），转移上清至新的离心管。
- 20 h) 加入等体积（上清）的异丙醇，颠倒混匀，室温放置 20 分钟。
- i) 12000g，4℃离心 15 分钟。除去上清，底部可见少量白色沉淀（RNA）。
- j) 加入 400 μl 75%的乙醇。12000g，4℃离心 5 分钟。
- k) 尽量除去乙醇，通风厨内彻底干燥，但避免过干燥。加入适量 DEPC 水。
- l) 去除 DNA 后，-80℃保存用于后续实验。

- 25 使用Qiagen公司的Quantitect SYBR-Green qRT-PCR试剂盒定量分析mRNA的相对含量。qRT-PCR引物如表2。

表2：用于qRT-PCR的引物

ADAM10	F	5'-AGAGCAACATCTGGGGACAAA-3'（SEQ ID NO:1）
	R	5'-TCCACAAATAGGTTGGCCAGAT-3'（SEQ ID NO:2）
	R	5'-GCTCTGGGAGAGCCAACATA-3'（SEQ ID NO:3）
BACE1	F	5'-AACGAATTGGCTTTGCTGTCA-3'（SEQ ID NO:4）

	R	5'-AGGCTATGGTCATGAGGGTTG-3' (SEQ ID NO:5)
PS1	F	5'-TGACTCTCTGCATGGTGGTG-3' (SEQ ID NO:6)
	R	5'-TCAGAATTGAGTGCAGGGCT-3' (SEQ ID NO:7)
PS2	F	5'-TTTGAGCCTCCCCTTGACTGG-3' (SEQ ID NO:8)
	R	5'-GGTATTCCAGTCCCCGCTG-3' (SEQ ID NO:9)

2.5 PS1 KO、PS2 KO和PS1/2 dKO细胞系的构建

本发明选用HEK 293T细胞，按照2013年张锋等发表的标准程序(Ran等人., 2013)使用 CRISPR/CAS9 技术 构建 PS1 KO、PS2 KO 和 PS1/2 dKO 细胞系。使用
5 https://zlab.bio/guide-design-resources网站设计了特异性敲除PS1和PS2的sgRNA，如表3。

- a) 在 HEK 293T 细胞中表达 PS2 sgRNA 和对照空质粒。在转染前一天进行细胞传代，当细胞的贴壁程度达到 70%-80%时进行转染。转染试剂是 lipofectamine2000 (ThermoFisher 公司)。
- 10 b) 转染 6 小时后，更换新鲜的培养液。
- c) 转染 18 小时后，更换为含有 3 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素 (Selleck 公司) 的新鲜培养液。
- d) 当转染空质粒的 HEK 293T 细胞系，在 3 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的作用下全部死亡后，收集转染了 PS2 sgRNA 的 HEK 293T 细胞。
- e) 以 1: 400 的比例将转染了 PS2 sgRNA 的 HEK 293T 细胞传代到 10 cm 细胞
15 培养皿中，保证细胞以单克隆的形式繁殖。
- f) 当单克隆繁殖的细胞生长到细胞团后，收集单个细胞团，并将单个细胞团传代到 12 孔板中。
- g) 等细胞团生长铺满整个 12 孔板，收集该细胞。一半细胞用于提取 DNA 和蛋白质，检测 PS2 的 DNA 序列和蛋白质表达量。另一部分细胞用于传代。
- 20 h) PS2 的 DNA 序列已经被编辑和不再表达 PS2 蛋白质的细胞即是 PS2 敲除细胞系—PS2 KO 细胞系。
- i) 本发明在PS2 KO细胞系基础上构建了PS1/PS2 dKO细胞系。在PS2 KO细胞系中进一步表达PS1 sgRNA或对照空质粒；并进行a-g步骤，进行PS1的DNA序列检测和蛋白质表达。
- 25 j) PS1的DNA序列已经被编辑和不再表达PS1蛋白质的PS2 KO细胞系即是PS1和PS2双敲除细胞系—PS1/2 KO细胞系。

表3: sgRNA

PS1 sgRNA	5'-GATTATCTAATGGACGACCCC-3' (SEQ ID NO:10)
PS2 sgRNA	5'-GCGTGCTTCGCTCCGTATTG-3' (SEQ ID NO:11)

2.6 病毒制备及注射。

2.6.1 慢病毒制备

- 5
- a) 构建可以特异性在神经元中表达的慢病毒表达质粒，lentivirus-GFP和lentivirus-ApoE CT。
- b) 将慢病毒表达载体与外壳蛋白载体（PSPAX2和PMD2G）共转染在HEK 293T细胞系中。在转染前一天进行细胞传代，当细胞的贴壁程度达到70%-80%时进行转染。转染试剂是Polyjet（SignaGen公司）。
- 10
- c) 转染36-48小时后，收集细胞培养液，0.22 μm的滤膜过滤。
- d) 过滤后的细胞培养液超速离心。20000 rpm，4℃离心2小时5分钟。
- e) 离心后，去除上清，每3个10厘米细胞培养液的沉淀用50μl的PBS重悬。
- f) 重悬的病毒分装，保存到-80℃冰箱中用于后续实验。

2.6.2 腺相关病毒制备

- 15
- 表达在神经元中的腺相关病毒AAV-CT（AAV2/9-hSyn-ApoE CT）和AAV-GFP（AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA），购自泰尔图生物科技公司。

2.6.3 病毒注射

- 20
- 利用立体定位注射仪将上述1μl制备的腺相关病毒注射到1月龄的小鼠的大脑皮层（x, y, z, +/-1.6, 0, -1）和海马体（x, y, z, +/-1.5, -2, -1.5）中。

2.7 蛋白纯化

2.7.1 γ分泌酶的纯化

- 25
- 人源γ分泌酶的表达载体参见Lu等人，2014。
- a) 在HEK 293T细胞系中表达人源γ分泌酶（同一个表达质粒同时表达人源γ分泌酶四个蛋白，NCT，PS1，PLAG-PEN2，APH）。在转染前一天进行细胞传代，当细胞的贴壁程度达到70%-80%时进行转染。转染试剂是lipofectamine2000（ThermoFisher公司）。

- b) 转染4-6小时后, 更换为新鲜的细胞培养液。
- c) 转染48小时后, 冰1×PBS清洗一次, 用细胞刮刀将细胞刮下来, 离心收集细胞, 800g, 5min。
- d) 用裂解液[25mM HEPES, pH 7.4; 150mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM 二硫苏糖醇, 0.05% (v/v) Tween-20, 1×cocktail]裂解重悬细胞。
- 5 e) 超声处理裂解的细胞, 20个循环(3秒开, 3秒关), 45% power output。
- f) 3000g, 4°C离心10分钟, 收集上清至新的离心管。
- g) 15000g, 4°C离心1小时, 弃上清。
- h) 用1 ml裂解液重悬沉淀, 重悬后向其中加入1% CHAPSO, 在四度孵育2小时。
- 10 15000g, 离心30分钟, 收集上清至新的离心管。
- i) 上清中加入100 µl FLAG珠子(SIGMA公司), 在4°C孵育2小时。
- j) 用下述缓冲液清洗三次。25mM HEPES, pH 7.4; 150mM NaCl, 0.1% digitonin。
- k) 用下述缓冲液洗脱下人源γ分泌酶。25mM HEPES, pH 7.4; 150mM NaCl, 0.1% digitonin和500 µg/ml 3xFLAG peptide(SIGMA公司)。
- 15 l) 免疫印迹检测纯化得到的人源γ分泌酶; -80°C保存。

2.7.2 ApoE的纯化

- a) 在HEK 293T细胞系中表达ApoE2和ApoE2 NT。ApoE2和ApoE2NT蛋白上含有融合表达的FLAG。在转染前一天进行细胞传代, 当细胞的贴壁程度达到70%-80%时进行转染。转染试剂是lipofectamine2000(ThermoFisher公司)。
- 20 b) 转染4-6小时后, 更换为新鲜的细胞培养液。
- c) 转染48小时后, 冰1×PBS清洗一次, 用细胞刮刀将细胞刮下来, 离心收集细胞, 800g, 5min。
- d) 用裂解液[25mM HEPES, pH 7.4; 150mM NaCl, 1×cocktail]裂解重悬细胞。
- 25 e) 超声处理裂解的细胞, 20个循环(3秒开, 3秒关), 45% power output。
- f) 离心得到含有蛋白的上清, 12000g, 15分钟, 4°C, 收上清至新的离心管。
- g) 含有蛋白的上清孵育anti-FLAG M2亲和树脂(SIGMA公司)90分钟, 4°C。孵育后ApoE2和ApoE2 NT转移到anti-FLAG M2亲和树脂上。
- h) 含有ApoE2和ApoE2 NT的anti-FLAG M2亲和树脂用下述缓冲液清洗三次。
- 30 25mM HEPES, pH 7.4; 150mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% (v/v) Tween-20。

i) ApoE2和ApoE2 NT用下述缓冲液洗脱下来。25 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl和500 µg/ml 3xFLAG peptide (SIGMA公司)。

j) 免疫印迹检测纯化得到的ApoE2和ApoE2 NT; -80°C保存。

5 2.7.3 β-CTF的纯化

a) 在E.coli大肠杆菌中表达β-CTF, 表达质粒为pET22 β-CTF-Myc-6xHis

b) 0.5mM IPTG诱导, 37°C表达4小时后, *E. coli*大肠杆菌用下述裂解液裂解。30 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA。

c) 25000g, 室温离心10分钟。去除上清。

10 d) 用下述缓冲液重悬沉淀, 在室温缓慢混匀。30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 M urea, 1% TritonX-100, 1 mM CaCl₂, 1×cocktail。

e) 40000g, 离心30分钟, 弃掉沉淀, 0.45 mM滤膜过滤上清。

f) 过滤后的上清, 与Ni-NTA-珠 室温孵育2h, 而后将孵育好的Ni-NTA-珠与上清液同时装载空的层析柱, 使其在重力的作用下流出。收集流穿液体再使其与珠结合
15 一次。

g) 以下述10倍Ni-NTA-珠柱体积清洗Ni-NTA-珠: 30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 M urea, 1% TritonX-100, 1 mM CaCl₂, 1× cocktail。

h) 以下述20倍Ni-NTA-珠柱体积清洗Ni-NTA-珠: 30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl, 0.1% Trion X-100。

20 i) 以下述20倍Ni-NTA-珠柱体积清洗Ni-NTA-珠: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl, 0.1% CHAPSO。

j) 以下述缓冲液洗脱β-CTF: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl, 0.1% CHAPSO, 300 mM 咪唑。

k) 免疫印迹检测纯化得到的β-CTF; -80°C保存。

25

2.7.4 GFP的纯化

GFP的纯化方式同2.7.2 ApoE的纯化方式。

3. 实验结果

30 3.1 三种ApoE异构体和ApoE不同蛋白片段对APP代谢的影响

本发明在HEK 293T细胞中将人源的APP分别与ApoE2、ApoE3和ApoE4共表达，GFP作为对照组，使用Western Blot测定 α -CTF的生成量。免疫印迹实验结果（图1，面板A-B）显示与APP共表达的ApoE2和ApoE3可以显著增加APP的非淀粉样代谢产物 α -CTF；而与APP共表达的ApoE4则不能显著改变 α -CTF（对比GFP对照组的 α -CTF）。

- 5 本发明进一步探究了ApoE对APP淀粉样代谢通路的影响。A β 是淀粉样代谢的产物，A β 的生成量越少，APP的淀粉样代谢越弱。本发明将人源的野生型APP和 β 分泌酶分别与ApoE2、ApoE3或者ApoE4在HEK 293T细胞中共表达，GFP作为对照组，检测ApoE对A β 生成的影响。ELISA结果（图1，面板C）显示ApoE2的表达显著减少了A β 40的生成，但是ApoE3和ApoE4则没有此效果。相比于ApoE4，ApoE2的表达也显著减少了A β 40。这些结果表明与APP在同一种细胞中表达的ApoE2可以减弱APP的淀粉样代谢，减少A β 40；增加APP的非淀粉样代谢产物 α -CTF。而ApoE4并不具备这一能力。

- 本发明进一步研究ApoE的哪些片段发挥了减弱APP淀粉样代谢的功能。ApoE2、ApoE3和ApoE4仅在N端功能域有两个氨基酸残基不同，在C端功能域的氨基酸残基序列完全相同。因此，本发明构建了人源ApoE的N端片段和C端片段的表达质粒，并分别命名为ApoE2 NT、ApoE3 NT、ApoE4 NT或者ApoE CT蛋白的质粒用于后续实验。在细胞中表达时，所有构建蛋白的N端都进一步连接了人源ApoE本身的信号肽（SEQ ID NO:66）。在HEK 293T细胞中将APP分别与ApoE2 NT、ApoE4 NT和ApoE CT共表达，GFP作为对照组。免疫印迹实验结果（图1，面板D-E）显示只有共表达ApoE CT显著地增加了 α -CTF到原有水平的5倍以上。共表达ApoE2 NT或ApoE4 NT都没有改变 α -CTF。同时，ELISA实验结果显示ApoE CT显著地降低A β 40到GFP对照的~25%，三种ApoE NT都没有减少A β 40（图1，面板F）；同样地，ApoE CT显著地降低A β 42到GFP对照的~26%（图1，面板G）。

- AD是一种神经系统疾病，在脑中A β 主要由神经元中表达的APP剪切产生。本发明构建了在神经元中表达ApoE CT的慢病毒。ELISA结果（图1，面板H）表明在神经元中过表达ApoE CT可以使原代培养的小鼠海马或者皮层神经元中内源生成的A β 40分别降低到对照组的~71%和~73%。同样（图1，面板I），在人源多能干细胞诱导的神经元中过表达的ApoE CT也使人神经元内源生成的A β 40降低到对照组的~54%。

这些结果说明，在多种细胞中，ApoE2均能以细胞自主式的方式通过它的C端片段增加APP的非淀粉样代谢产物 α -CTF；同时减弱淀粉样代谢通路，减少A β 。

- 30 本发明各实验所使用的ApoE CT氨基酸序列如下：

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (SEQ ID NO:33)。

3.2 分泌在培养液中的ApoE2和ApoE CT不影响APP的剪切

5 培养表达ApoE2或者ApoE CT的HEK 293T细胞，获得培养液，结果显示培养液中含有分泌出来的ApoE2或者ApoE CT (图2，面板A)。将表达APP的HEK 293T细胞与这种含有ApoE2或ApoE CT的培养液共孵育。表达APP的HEK 293T细胞与含有GFP的培养液共孵育作为阴性对照。结果显示，与GFP对照相比，共孵育的培养液中的ApoE2和ApoE CT并未显著改变 α -CTF水平 (图2，面板B-C)。免疫荧光结果 (图2，面板D-10 E) 显示，即使经过长时间的共孵育，培养液中的ApoE2和ApoE CT也主要粘附在细胞表面，几乎不进入细胞内。而在HEK 293T细胞 (图2，面板D) 或小鼠原代培养神经元 (图2，面板E) 中表达的ApoE2和ApoE CT则可以在细胞内大量存在。

这一结果说明，细胞培养液中的ApoE2和ApoE CT并不能改变 α -CTF和A β 的生成。ApoE2和ApoE CT必须要以细胞自主性的方式，即必须与APP处于同一细胞中，才能15 调控APP的剪切，从而达到增加 α -CTF并且降低A β 的生成的效果。其中，有多种方式可以实现让ApoE2和ApoE CT进入目标细胞，具体包括：脂质体传递编码此类蛋白的DNA或者RNA，如果不加特殊说明，本发明采用脂质体将编码相应蛋白的质粒转染到细胞中表达ApoE和ApoE CT；慢病毒和腺相关病毒侵染细胞等方式都可以使ApoE2和ApoE CT在表达APP的细胞中表达，本发明在神经元中表达的ApoE2或者ApoE CT20 采用了慢病毒或者腺相关病毒表达系统；细胞穿膜肽，细胞胞吞增强等方式都可以使ApoE2和ApoE CT蛋白进入表达APP的目标细胞内等，本发明在后文详细探讨了细胞穿膜肽的作用。

3.3 ApoE CT减弱APP淀粉样代谢的核心序列

25 为探究ApoE CT上的哪些氨基酸是改变APP代谢的核心序列，本发明在ApoE CT的N端添加ApoE原有的1、2、3、4或5个氨基酸残基，构建表达CT NA1、CT NA2、CT NA3、CT NA4、CT NA5的质粒；在ApoE CT的N端删除1、2、3、4或5个氨基酸，构建表达CT ND1、CT ND2、CT ND3、CT ND4、CT ND5的质粒；在ApoE CT的C端删除ApoE原有的5、10个氨基酸，构建表达CT CD5和CT CD10的质粒。上述CT NA1、30 CT NA2、CT NA3、CT NA4、CT NA5、CT ND1、CT ND2、CT ND3、CT ND4、CT

ND5、CT CD5和CT CD10的氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:13-24所示。在细胞中表达时，所有构建蛋白的N端都进一步连接了ApoE本身的信号肽（SEQ ID NO:66）。

SEQ ID NO:13（CT NA1）：

RARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWF

5 EPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:14（CT NA2）：

LRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS

WFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:15（CT NA3）：

10 **RL**RARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKS

WFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:16（CT NA4）：

ERLRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLK

SWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

15 SEQ ID NO:17（CT NA5）：

GERLRARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARL

KSWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:18（CT ND1）：

RMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEP

20 LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:19（CT ND2）：

MEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPL

VEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:20（CT ND3）：

25 EEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE

DMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

SEQ ID NO:21（CT ND4）：

EMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE

DMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH；

30 SEQ ID NO:22（CT ND5）：

MGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVED
MQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH;

SEQ ID NO:23 (CT CD5) :

ARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
5 PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPV;

SEQ ID NO:24 (CT CD10) :

ARMEEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGT.

在HEK 293T细胞中将人源的APP和 β 分泌酶与上述每个质粒分别共表达, GFP作
10 为对照组, 使用ELISA测定上述蛋白对A β 40生成的影响。ELISA结果(图3, 面板A-
B)表明在ApoE CT的N端添加1个其本身原有的氨基酸残基后, CT NA1依然减少A β 40
生成; 但是添加两个或者以上的氨基酸残基, CT NA2、CT NA3、CT NA4和CT NA5
就完全丧失了减少A β 的能力。在ApoE CT的N端删除1-5个氨基酸残基后, ApoE ND1,
ApoE ND2, ApoE ND3, ApoE ND4和ApoE ND5依然可以减少A β 40。在ApoE CT的C
15 端即使删除5或10个氨基酸残基, CT CD5、CT CD10依然减少A β 的生成。这些结果说
明, ApoE CT的N端非常重要, 即使只有1或者2个氨基酸的改变都有可能影响ApoE CT
抑制A β 40生成的活性。但是其C端残基对活性的影响则相对较弱。

根据以上结果, 本发明在ApoE CT的N端删除3个氨基酸残基(CT ND3)的基础
上, 在ApoE CT的C端分别删除10、11、12、13、14、15、20或25个氨基酸残基, 构
20 建了表达CT ND3CD10、CT ND3CD11、CT ND3CD12、CT ND3CD13、CT ND3CD14、
CT ND3CD15、CT ND3CD20和CT ND3CD25的质粒, 其氨基酸序列如SEQ ID NOs:25-
32所示。在细胞中表达时, 所有构建蛋白的N端都进一步连接了ApoE本身的信号肽
(SEQ ID NO:66)。

SEQ ID NO:25 (CT ND3CD10) :

25 EEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQRQWAGLVEKVQAAVGT;

SEQ ID NO:26 (CT ND3CD11) :

EEMGSRTDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQRQWAGLVEKVQAAVG;

30 SEQ ID NO:27 (CT ND3CD12) :

EEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQRQWAGLVEKVQAAV;

SEQ ID NO:28 (CT ND3CD13) :

EEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
5 DMQRQWAGLVEKVQAA;

SEQ ID NO:29 (CT ND3CD14) :

EEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQRQWAGLVEKVQA;

SEQ ID NO:30 (CT ND3CD15) :

10 EEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQRQWAGLVEKVQ;

SEQ ID NO:31 (CT ND3CD20) :

EEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQRQWAGL;

15 SEQ ID NO:32 (CT ND3CD25) :

EEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVE
DMQR。

在HEK 293T细胞中将人源的APP、 β 分泌酶与上述每个质粒分别共表达，GFP作为对照组，使用ELISA测定上述蛋白对细胞中A β 生成的影响。ELISA结果（图3，面板
20 C）表明ApoE CT的N端删除3个氨基酸残基并且C端删除10、11、12、13、14、15、20
或25个氨基酸后，CT ND3CD10、CT ND3CD11、CT ND3CD12、CT ND3CD13、CT
ND3CD14、CT ND3CD15、CT ND3CD20或者CT ND3CD25依然可以显著减少A β 40。
这些结果表明ApoE CT抑制A β 生成的核心序列结束位置在ApoE蛋白第274位残基到
最末尾氨基酸残基。

25

3.4 ApoE CT通过 γ 剪切影响APP的剪切

为了研究ApoE CT影响APP剪切的机制，本发明检测了ApoE CT是否会改变APP
关键分泌酶的表达水平。本发明利用qRT-PCR和Western Blot技术分别检测了
ADAM10（主要的 α 分泌酶）、BACE1（ β 分泌酶）、PS1和PS2（ γ 分泌酶活性亚基）
30 的mRNA和蛋白表达量。qRT-PCR（图4，面板A）和Western Blot（图4，面板B）结
果显示，与GFP对照相比，在细胞中过表达ApoE CT并不会改变ADAM10、BACE1、

PS1和PS2的mRNA和蛋白表达量,说明ApoE CT不是通过改变APP代谢酶的表达量来影响APP剪切。

α -CTF是 γ 分泌酶的一个底物,而A β 则是 γ 分泌酶的剪切产物。所以 γ 分泌酶活性发生变化时, α -CTF和A β 的生成量会显著变化,而ApoE CT正是改变了 α -CTF和A β 的生成量。因此ApoE CT有可能改变了 γ 分泌酶的活性。为验证这一猜想,本发明在HEK 293T细胞中共表达APP和 γ 分泌酶的活性中心PS1。免疫印迹实验结果(图5,面板A-B)显示,过表达PS1(可以增强 γ 分泌酶活性)降低了 α -CTF。而表达ApoE CT或者用1 μ M γ 分泌酶抑制剂PF03084014处理都使 α -CTF显著增多(图5,面板A-B)。这一结果提示,在细胞中表达的ApoE CT对APP剪切的影响与抑制 γ 分泌酶的效果相似。 β -CTF是APP经过 β 分泌酶切的产物,也是 γ 分泌酶的底物,只需经过一步 γ 酶切就可以生成A β 。ELISA结果(图5,面板C-D)显示表达ApoE CT不仅使 β -CTF生成的A β 40下降到原有水平的~80%,也使A β 42下降到原有水平的~8%;说明ApoE CT降低A β 的能力可能是通过调节 γ 酶切来实现的。本发明又进一步将去掉APP胞内域(APP intracellular C-terminal domain)的APP(APP Δ AlCD)与BACE1(β 分泌酶)、ApoE CT在HEK 293T细胞中共表达。APP Δ AlCD不需要经过 γ 酶切,只要经过一步 β 酶切就可以产生A β 。ELISA结果(图5,面板E)显示,表达ApoE CT不再降低由APP Δ AlCD所生成的A β ,说明ApoE CT并不影响 β 酶切。

这些结果说明在细胞中表达的ApoE CT降低A β 需要 γ 酶切,过表达的ApoE CT模拟了 γ 分泌酶抑制剂的效果;ApoE CT可能是通过抑制APP的 γ 酶切,从而增加 α -CTF,减少A β 。

3.5 ApoE CT调控APP的剪切需要 γ 分泌酶参与

γ 分泌酶的活性中心是PS1或者PS2,在敲除PS1和PS2后(PS1/2 dKO), α -CTF无法通过 γ 分泌酶酶切进行代谢,因此大量聚集。免疫印迹结果(图6,面板A和D)显示,在野生型HEK 293T细胞系中,表达的ApoE CT显著地增加了 α -CTF;在表达GFP的PS1/2 dKO细胞中,相比于野生型HEK 293T细胞系, α -CTF含量显著增加。在PS1/2 dKO细胞中表达ApoE CT并不进一步增加 α -CTF,说明在没有 γ 分泌酶时,ApoE CT不再能够增加 α -CTF。在补充表达PS1或者PS2的PS1/2 dKO细胞中表达的ApoE CT则可以显著增加了 α -CTF(图6,面板B-D),说明ApoE CT增加 α -CTF依赖于PS1或者PS2。同样地,在补充表达PS2的PS1/2 dKO细胞系中,过表达ApoE CT可以减少A β 40(图6,面板E)。这些结果说明ApoE CT只有在 γ 分泌酶存在的情况下才能调控APP的代谢。

3.6 ApoE在纯化体系中直接抑制 γ 分泌酶对 β -CTF的剪切

为了进一步验证ApoE是否直接抑制 γ 分泌酶，本发明纯化了 β -CTF，ApoE2，ApoE2 NT和 γ 分泌酶，免疫印迹验证了这些纯化的蛋白（图7，面板A）。其中PS1、NCT和PEN2是 γ 分泌酶的组成蛋白。ELISA结果（图7，面板B）显示， γ 分泌酶与 β -CTF共孵育可产生A β ，此时加入的10 μ M γ 分泌酶抑制剂（PF03084014）可以抑制A β 的生成。在此反应体系中加入纯化的ApoE2以浓度依赖性的方式抑制了A β 40的产生，其半抑制浓度（IC50）为~1.2 μ M（图7，面板C）。另外，在同等浓度条件下（2.5 μ M），ApoE2可以显著抑制A β 产生，但是ApoE2 NT无法抑制A β 40的产生（图7，面板D）。这些结果表明，ApoE2可以直接抑制 γ 分泌酶对 β -CTF剪切，而ApoE CT对ApoE的该活性是必须的，提示ApoE CT是ApoE2抑制 γ 分泌酶剪切APP的关键片段。

3.7 ApoE CT不抑制APLP1的 γ 酶切

APLP1（APP like protein 1）是一种和APP结构相似的蛋白，同样也是 α 和 γ 分泌酶的底物之一。免疫印迹结果（图8）显示 γ 分泌酶的抑制剂PF03084014可以抑制HEK293T细胞中APLP1的 γ 剪切，使 α -like CTF显著增多；但是共表达的ApoE CT并不会增加APLP1的 α -like CTF，说明ApoE CT并不抑制APLP1的 γ 酶切。这一结果表明ApoE CT抑制 γ 分泌酶的酶切活性具有一定的底物选择性。

3.8 在神经元中表达的ApoE CT减少了AD模型小鼠脑内的淀粉样斑块

在4周龄的AD模型小鼠（5 $\times$ FAD）皮层和海马体中注射能够在神经元中表达ApoE CT的腺相关病毒。在神经元中表达ApoE CT（或GFP作为阴性对照）六个月后，检测其对淀粉样斑块的影响，对ApoE CT、GFP和淀粉样斑块进行染色。结果显示，在神经元中表达ApoE CT（N端连接了人源ApoE本身的信号肽（SEQ ID NO:66））的5 $\times$ FAD小鼠脑中淀粉样斑块的面积更小、荧光强度更弱、淀粉样斑块的总面积在大脑中所占比例更小、淀粉样斑块的密度也减小（图9，面板A-E）。这些结果表明表达在神经元中的ApoE CT抑制了5 $\times$ FAD小鼠脑中淀粉样斑块的沉积，减弱了小鼠的AD病理进程。

3.9 在神经元中表达的ApoE2可以抑制小鼠内源A β 40的产生

上述实验已经表述了ApoE CT是ApoE2抑制 γ 分泌酶活性的关键功能域，并且ApoE CT可以抑制小鼠神经元产生A β 40。接下来探究了ApoE2是否同样抑制神经元中

内源A β 40的产生(图10)。在小鼠的原代培养神经元中分别使用慢病毒表达系统(lentivirus)和神经元特异性启动子表达GFP或者ApoE2。ApoE2的N端进一步连接了人源ApoE本身的信号肽(SEQ ID NO:66)。ELISA结果(图10, 面板A)展示, 与GFP对照相比, 在神经元中过表达的ApoE2可以降低内源生成的A β 40。进一步, 利用AAV表达系统将ApoE2表达在野生型小鼠(WT mouse)大脑中的神经元中。ELISA结果(图10, 面板B)显示, 与GFP对照相比, 在小鼠大脑神经元内表达的ApoE2同样降低了内源A β 40的生成。这些结果说明ApoE2与ApoE CT一样可以抑制神经元中内源A β 40的产生。

10 3.10 在两端添加标签蛋白的 ApoE 依然拥有调控 APP 剪切的活性

为探究在 ApoE 上添加的标签蛋白是否会破坏 ApoE 的活性, 本发明分别在 ApoE2 和 ApoE CT 的 C 端和 N 端分别添加标签蛋白 V5 (SEQ ID NO:82), 分别命名为 ApoE2-V5 (V5 在 C 端)、V5-ApoE2 (V5 在 N 端)、ApoE CT-V5 和 V5-ApoE CT。所有构建蛋白的 N 端都进一步连接了人源 ApoE 本身的信号肽(SEQ ID NO:66)。并将这些表达质粒与 APP 在 HEK 293T 细胞中共表达。免疫印迹结果显示(图 11), 不论是 ApoE2-V5 和 V5-ApoE2 (图 11, 面板 A-B), 还是 ApoE CT-V5 和 V5-ApoE CT (图 11, 面板 C-D) 都显著地增加 α -CTF, 且活性与 ApoE2 或 ApoE CT 相近。这说明在两端添加标签蛋白的 ApoE2 和 ApoE CT 依然具有调控 APP 剪切的活性。

20 3.11 ApoE CT 的突变体依然可以调控 APP 的剪切

为探究 ApoE CT 的突变是否会改变 ApoE CT 调控 APP 剪切的活性, 本发明构建并分析了一系列的 ApoE CT 的突变体。包括单个位点突变: CT A20, CT A40, CT A60, CT A65, CT A72, CT A80; 双位点突变: CT A36/74; 多位点突变: CT E5, CT E10, CT E20, CT F5, CT R10, CT LF5, CT LM5。所述突变位点位置是相对于 ApoE CT (SEQ ID NO:33) 的位置。其氨基酸序列如 SEQ ID NOs:46-59 所示。所有构建蛋白的 N 端都进一步连接了人源 ApoE 本身的信号肽 (SEQ ID NO:66)。

SEQ ID NO:46 (CT A20; 相对于 SEQ ID NO:33 Q20A; 相对于 SEQ ID NO:12 Q235A):

ARMEEMGSRTRDRLDEVKEAVA EVRAKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
30 PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

SEQ ID NO:47 (CT A40; 相对于 SEQ ID NO:33 E40A; 相对于 SEQ ID NO:12

E255A) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAAAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

5 SEQ ID NO:48 (CT A60; 相对于 SEQ ID NO:33 Q60A; 相对于 SEQ ID NO:12
Q275A) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

SEQ ID NO:49 (CT A65; 相对于 SEQ ID NO:33 V65A; 相对于 SEQ ID NO:12
V280A) :

10 ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLAEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

SEQ ID NO:50 (CT A72; 相对于 SEQ ID NO:33 V72A; 相对于 SEQ ID NO:12
V287A) :

15 ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAAAGTSAAPVPSDNH

SEQ ID NO:51 (CT A80; 相对于 SEQ ID NO:33 P80A; 相对于 SEQ ID NO:12
P295A) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVASDNH

20 SEQ ID NO:52 (CT A36/74; 相对于 SEQ ID NO:33 R36A+T74A; 相对于 SEQ ID
NO:12 R251A+T289A) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIALQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGASAAPVPSDNH

SEQ ID NO:53 (CT E5) :

25 ARMEEMGSRTDRDLAEVKEAFAEVAALKEAQAQQARLQAAAFQAALKSW
AEPLVADMQRQWAGLAEKVQAAVGTAAAPVASDNH

SEQ ID NO:54 (CT E10) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEAFAEVRAKLEAQAQQIRLQAAAFQARLKSWA
EPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVASDNH

30 SEQ ID NO:55 (CT E20) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEAFAEVRAKLEEQAQQIRLQAAAFQARLKSWFE

PLVEDMQRRAWAGLVEKVQAAVGTSAAPVASDNH

SEQ ID NO:56 (CT F5) :

AAAAAMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFE

PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

- 5 SEQ ID NO:57 (CT R10 ; 相对于 SEQ ID NO:33 S75A+P78A+V79A+P80A+S81A+D82A+N83A+H84A ; 相对于 SEQ ID NO:12 S290A+P293A+V294A+P295A+S296A+D297A+N298A+H299A) :

ARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFE

PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTAAAAA

- 10 SEQ ID NO:58 (CT LF5; 相对于 SEQ ID NO:33 R11A+D12A+R13A+L14A+D15A; 相对于 SEQ ID NO:12 R226A+D227A+R228A+L229A+D230A) :

ARMEEMGSRTAAAAEVKEQVAEVRAKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFE

PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

- 15 SEQ ID NO:59 (CT LM5; 相对于 SEQ ID NO:33 E23A+V24A+R25A+K27A; 相对于 SEQ ID NO:12 E238A+V239A+R240A+K242A) :

ARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAAAAALEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFE

PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

- 在 HEK 293T 细胞中将人源的 APP 与上述每个质粒分别共表达, GFP 作为阴性对照组, ApoE CT 作为阳性对照。免疫印迹结果显示, 构建的 ApoE CT 的单位点突变和双位点突变 (图 12, 面板 A-B), CT A20、CT A40、CT A60、CT A65、CT A72、CT A80 和 CT A36/74 都显著地增加了 α -CTF; 并且相比于 ApoE CT, 这些突变增加 α -CTF 的程度没有降低 (CT A72、CT A80 和 CT A36/74 增加 α -CTF 的程度甚至更高)。多位点突变 CTE5、CTE10、CTE20 和 CTF5 则不再能增加 α -CTF; 但是 CT R10、CT LF5 和 CT LM5 依然显著地增加了 α -CTF, 并且这些突变和 ApoE CT 增加了相似水平的 α -CTF (图 12, 面板 C-D)。这些数据表明 ApoE CT 的突变体 (如 CT A20、CT A40、CT A60、CT A65、CT A72、CT A80、CT A36/74、CT R10、CT LF5 和 CT LM5) 同样具备与原始 ApoE CT 类似的、调节 APP 剪切的活性。

3.12 在 ApoE2 内部添加或删除氨基酸残基依然能够调控 APP 代谢

- 30 本实验探究在 ApoE2 的内部添加或者删除氨基酸残基是否会影响 ApoE 的活性。本发明首先在 ApoE2 (SEQ ID NO:12) 第 215 位和第 216 位氨基酸残基之间添加了

标签蛋白，3XFLAG，并命名为 ApoE2-M3F（SEQ ID NO:60；3XFLAG 序列加粗；下划线指示 SEQ ID NO:33 序列），该修饰不影响 ApoE CT 序列（SEQ ID NO:33）。本发明还构建了 ApoE2 MD10（SEQ ID NO:61），ApoE2 MD10 是删除 ApoE2 的第 244 至 254 位氨基酸残基得到的，并且删除的这些氨基酸位于 ApoE2 发挥调控 APP 代谢的 C 端区域，即位于 SEQ ID NO:33 序列中。在细胞中表达时，所有构建蛋白的 N 端都进一步连接了人源 ApoE 本身的信号肽（SEQ ID NO:66）。

SEQ ID NO:60（ApoE2-M3F）

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGA
10 DMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLRLDADDLQKCL
AVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGER
LRGSGGSDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKSGSGSARMEEMGSRTRDRLDEVK
EQVAEVRAKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAA
VGTSAAPVPSDNH（SEQ ID NO: 12；下划线指示 SEQ ID NO:33 序列；加粗指示
15 3XFLAG 序列，SEQ ID NO:77）

SEQ ID NO:61（ApoE2 MD10）

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGA
DMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLRLDADDLQKCL
20 AVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGER
LRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQWA
GLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

KVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
25 LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQAAQARLGA
DMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLRLDADDLQKCL
AVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGER
LRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAAQQIRLQAEAFQARLKSWFEP
LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH（SEQ ID NO: 12；下划线指示
30 SEQ ID NO:33 序列；方框指示 ApoE2 MD10 中删除的序列）

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQW
AGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (SEQ ID NO:76; 删除 ApoE2 的第 244 至 254
位氨基酸残基的 ApoE CT)

- 5 GSGGSDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKSGSGS (SEQ ID NO:77; 3XFLAG)
在 HEK 293T 细胞中将人源的 APP 分别与 ApoE2-M3F、ApoE2 MD10 共表达，
GFP 作为阴性对照组。免疫印迹结果显示 (图 13)，不论是在 ApoE2 中间位置添加
氨基酸残基的 ApoE2-M3F (不影响 ApoE CT 序列)，还是删除 C 端功能区域中部氨
基酸残基的 ApoE2 MD10 都依然显著地增加了 α -CTF。这一结果表明在 ApoE2 内部
10 添加或者删除某些氨基酸序列，ApoE2 依然可以调控 APP 代谢。

3.13 非人源的 ApoE CT 也可以调控 APP 的剪切

- 为进一步探究非人源的 ApoE 是否也具有同样的活性，本实验分析了非人灵长类
来源的 ApoE CT (monkey CT)。该序列与人源的 ApoE CT 在氨基酸序列上高度相
15 似，仅有三个氨基酸取代 R36S+T74A+A76T (图 14，面板 C)。猴 ApoE CT 氨基酸
序列如下所示。

SEQ ID NO:62 (monkey CT) :

ARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRAKLEEQAAQISLQAEAFQARLKSWFE
PLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGASTAPVPSDNH

- 20 在 HEK 293T 细胞中将人源的 APP 与非人灵长类 ApoE CT (在细胞中表达时，
N 端都进一步连接了人源 ApoE 本身的信号肽 (SEQ ID NO:66)) 共表达，GFP 作为
阴性对照组，人源 ApoE CT (N 端都进一步连接了人源 ApoE 本身的信号肽 (SEQ ID
NO:66)) 作为阳性对照。免疫印迹结果 (图 14，面板 A 和 B) 显示非人灵长类 ApoE
CT (monkey CT) 和人源的 ApoE CT 同样增多了 α -CTF。这一结果表明非人灵长类
25 的 ApoE CT 同样具有调控 APP 剪切的活性。

3.14 添加穿膜肽的 ApoE 具有调控 APP 剪切的活性

为探究穿膜肽是否改变 ApoE 的活性，本发明在 ApoE 上添加穿膜肽。所选用的穿
膜肽序列如下：

- 30 SEQ ID NO:63 (R₉) : RRRRRRRRRR
SEQ ID NO:64 (FGF4) : AAVLLPVLLAAP

SEQ ID NO:65 (RDP) :
KSVRTWNEIIPSKGCLR VGGRCHPHVNGGRRRRRRRRR

在人源ApoE2的N端添加R9、FGF4、RDP构建的ApoE2的突变体分别被命名为R9-ApoE2、FGF4-ApoE2、RDP-ApoE2。所有蛋白构建体N端都进一步连接了人源ApoE本身的信号肽（SEQ ID NO:66）。将R9-ApoE2、FGF4-ApoE2、RDP-ApoE2分别与人源的APP在HEK 293T细胞中共表达，GFP作为阴性对照组。免疫印迹结果（图15）显示虽然FGF4-ApoE2没有增加 α -CTF，但是R9-ApoE2和RDP-ApoE2都显著地增加了 α -CTF。这一结果说明连有穿膜肽的ApoE2依然可以调控APP的剪切。

3.15 信号肽对于ApoE CT调控APP剪切的活性是必须的。

上述实验用来探究细胞中表达的ApoE功能的所有表达相应多肽的氨基酸序列前段包含有人源ApoE本身的信号肽（ApoE SP；SEQ ID NO:66），信号肽位于ApoE或ApoE CT和前文所述ApoE或ApoE CT各突变体的N端。为探究信号肽是否会影响ApoE CT的活性，本发明更换了ApoE CT的信号肽，分别更换为载脂蛋白A1和载脂蛋白J的信号肽（ApoA1 SP和ApoJ SP；SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68）。同时还分析了不连接信号肽的ApoE CT活性。

SEQ ID NO:66（ApoE SP）：MKVLWAALLVTFLAGCQA
SEQ ID NO:67（ApoA1 SP）：MKA AVLTLAVLFLTGSQA
SEQ ID NO:68（ApoJ SP）：MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG

更换为载脂蛋白A1信号肽的ApoE CT突变体，命名为ASP CT；更换为载脂蛋白J信号肽的ApoE CT突变体，命名为JSP CT；不含有信号肽的ApoE CT突变体，命名为NSP CT。在HEK 293T细胞中将人源的APP与上述每个ApoE CT的突变体分别共表达，GFP作为阴性对照组，ApoE CT作为阳性对照。免疫印迹结果（图16）显示ASP CT和JSP CT依然可以增加 α -CTF，但增加 α -CTF的程度不如带有ApoE本身信号肽的ApoE CT；删除信号肽后，NSP CT不再增加 α -CTF。这一结果表明在细胞中表达的ApoE CT需要连有信号肽才能调控 γ 分泌酶对APP的剪切，但是这个信号肽可以是不同的信号肽，并不局限于ApoE原有的信号肽。

4. 实验结论

本发明首次发现ApoE2可以在神经元中以细胞自主性的方式调控APP的剪切，这一过程依赖于ApoE2的C端片段。ApoE的C端片段不仅增加APP的非淀粉样代谢产物

α -CTF；而且减弱APP的淀粉样代谢，减少A β 。还发现ApoE2及其C端片段调控APP代谢，并不是通过分泌出来的ApoE蛋白在细胞外间接影响细胞中APP的剪切；而是通过与APP共存于同一细胞中的ApoE2或其C端片段直接抑制APP的 γ 酶切来实现的，这是一种细胞自主性作用方式。在使用纯化蛋白完成的实验中也发现ApoE2可以直接抑制 γ 分泌酶对 β -CTF的酶切，而缺失C端的ApoE NT则不能抑制 γ 分泌酶对 β -CTF的酶切。此外，ApoE的C端片段不可以抑制APLP1的 γ 酶切，说明ApoE的C端片段对 γ 酶切的抑制作用是有一定的底物选择性的。本发明还发现，神经元中特异性表达的ApoE的C端片段显著降低AD模型小鼠脑中淀粉样斑块的大小和密度。小鼠神经元细胞中特异性表达的ApoE可以抑制内源A β 40的产生。此外，在N或C端添加标签蛋白不会影响ApoE2和ApoE C端片段抑制APP γ 酶切的活性。本发明还构建了一系列ApoE C端片段和ApoE2内部序列的突变体，具备与原始ApoE CT或ApoE2相似的抑制APP γ 酶切的活性。本发明还发现ApoE的N端添加某些穿膜肽不会影响其抑制APP γ 酶切的活性，但是如果N端缺乏信号肽会导致ApoE抑制APP γ 酶切活性的缺失。本发明的发现不局限于人源ApoE C端片段，非人灵长类的ApoE C端片段也有相似的抑制APP γ 酶切的活性。

这些结果说明 ApoE2 及其 C 端片段（或基于 ApoE2 或 C 端片段的突变体）可以作为一种潜在药物用于 AD 的预防或者治疗。而此类潜在药物需要在神经元中以细胞自主性的方式起作用。脂质体传递 DNA 或者 RNA，慢病毒和腺相关病毒感染细胞等方式都可以使 ApoE2 和/或其 C 端片段在目标细胞中表达；细胞穿膜肽，细胞胞吞增强等方式也可以使 ApoE2 和/或其 C 端片段的蛋白在目标细胞内大量存在；进而 ApoE2 和/或其 C 端片段以细胞自主性的方式抑制 γ 分泌酶的酶切活性，减少 A β ，减弱 APP 的淀粉样代谢。

上述实验仅是以 AD 疾病为例说明 ApoE2 和/或其 C 端片段以细胞自主性的方式抑制 γ 分泌酶的酶切活性。此外，诸如淀粉样脑血管病也与 γ 分泌酶功能的异常相关。而唐氏综合症也容易发展成 AD。因此，ApoE2 和/或其 C 端片段在这些 APP 或 γ 分泌酶相关疾病的治疗和预防中也有应用潜力。

实施例2. ApoE对 γ 分泌酶的精确抑制是其预防阿尔茨海默病的基础

1. 概要

异常低的 γ 分泌酶活性与大多数早老素突变有关，而这些突变会导致家族性阿尔茨海默病（familial AD, fAD）。然而， γ 分泌酶在更普遍的散发性 AD（sporadic AD，

sAD) 中的作用仍未得到解决。人类载脂蛋白 E (ApoE) 是 sAD 最重要的遗传风险因素, 本发明报告了 ApoE 与 γ 分泌酶相互作用, 并通过其保守的 C 末端区域 (CT) 以细胞自主方式以底物特异性抑制 γ 分泌酶的活性。这种 ApoE CT 介导的抑制活性在不同的 ApoE 亚型中受到不同程度的损害, 导致 ApoE2 > ApoE3 > ApoE4 效力等级顺序与其相关的 AD 风险成反比。有趣的是, 在 AD 小鼠模型中, 神经元中表达的 ApoE CT 可以从其他区域迁移至淀粉样斑块, 并减缓淀粉样斑块的形成。总之, 本实验的数据揭示了 ApoE 具有底物特异性的 γ 分泌酶抑制剂的活性, 并强烈表明 ApoE 的这种对 γ 分泌酶的精确抑制可以防止 sAD 的风险。

2. 介绍

阿尔茨海默病(AD)是最常见的神经退行性疾病, 影响全球近 5000 万人(Prince, 2015 年)。 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 假说将 AD 归因于 $A\beta$ 的过度聚集, $A\beta$ 是一种由 β 分泌酶和 γ 分泌酶连续切割淀粉样前体蛋白(APP)产生的多肽(De Strooper 和 Karran, 2016 年; De Strooper 等人, 1998 年; Haass 和 Selkoe, 1993 年; Hardy 和 Selkoe, 2002 年; Wolfe 等人, 1999 年)。 γ 分泌酶的酶活催化中心——早老素 1 (presenilin 1, PS1) 和早老素 2 (PS2) ——的突变会导致罕见的家族性 AD (fAD)。基于这些证据, γ 分泌酶被认为是 AD 的药物靶标。不幸的是, 使用常规 γ 分泌酶抑制剂治疗会引起严重的副作用 (Panza 等人, 2019 年; Xia, 2019 年)。最近的研究发现, 与 fAD 相关的早老素突变通常与 γ 分泌酶的整体活性降低有关 (Shen 和 Kelleher, 2007 年; Sun 等人, 2017 年; Walker 等人, 2005 年; Xia 等人, 2015 年), 这与基于 $A\beta$ 假设的 γ 分泌酶的预测作用相悖。鉴于基于 $A\beta$ 的药物研发工作的结果不尽如人意 (Karran 和 De Strooper, 2016 年), 迫切需要揭示 γ 分泌酶在更为普遍的散发性 AD (sAD) 中发挥的作用。

sAD 没有致病基因, 但其患病风险受多种遗传因素影响。其中, 载脂蛋白 E4 (ApoE4) 是最具影响力的一种 (Corder 等人, 1993; Rhinn 等人, 2013)。ApoE 基因编码三种亚型, 仅在其 N 末端区域 (NT) 具有单个氨基酸差异: ApoE2、3 和 4 (Kanekiyo 等人, 2014 年)。ApoE4 不仅会增加 AD 的风险, 还会导致发病年龄提前, 加重 AD 的严重程度 (Belloy 等人, 2019; Li 等人, 2020)。相反, ApoE2 降低了 AD 风险。在啮齿动物的大脑中, 在正常生理条件下, ApoE 通常仅在胶质细胞中检测到 (Kanekiyo 等人, 2014), 而 $A\beta$ 则由神经元产生。然而, ApoE 也在人类神经元 (Aoki 等人, 2003 年; Han 等人, 1994 年; Metzger 等人, 1996 年; Strittmatter 等人, 1993 年;

Xu 等人, 1999 年) 和受伤的啮齿动物神经元中表达 (Xu 等人, 2006 年)。人脑中 ApoE 的代谢更类似于神经元中表达的 ApoE 而不是胶质细胞中表达的 ApoE 的代谢 (Brecht et al., 2004)。最近一项使用携带不同 ApoE 亚型的人诱导多能干细胞(hiPSC)产生的神经元的研究表明, ApoE4 阳性神经元中 A β 的产生增加, 表明神经元中的 ApoE 会以细胞自主性的方式调节 APP 的代谢 (Wang 等人, 2018 年)。这些证据表明神经元中的 ApoE 有着非常关键的生理作用, 但是这一点从未被充分研究过。

本实验报告了 ApoE 直接与 γ 分泌酶相互作用, 并通过其 C 末端区域特异性抑制 APP 的 γ 酶切。值得兴奋的是, 这种抑制活性在不同的 ApoE 亚型中受到不同的损害, 与 ApoE 亚型所对应的 AD 风险呈现负相关性。此外, 神经元中表达的 ApoE CT 在淀粉样斑块周围积聚, 具有在该淀粉样蛋白生成热点区域内实现局部 γ 抑制的潜在可能性 (Jordà-Siquier 等人, 2022 年)。总之, 本实验的数据表明 ApoE 对 γ 分泌酶的精确抑制可防止 sAD 的风险, 并将 ApoE CT 鉴定为具有前所未有特异性的新型 γ 分泌酶抑制剂。

3. 实验结果

3.1. 内源性 ApoE 和 APP 在人类皮层神经元中共表达, 具有重叠的亚细胞分布模式

ApoE 在啮齿动物大脑中主要由胶质细胞表达, A β 则由神经元中表达的 APP 代谢产生。因此, 大多数研究都集中在胶质细胞分泌的 ApoE 如何影响胞外的淀粉样斑块形成 (Huang 等人, 2017 年; Huynh 等人, 2017 年; Liu 等人, 2017 年)。然而, 最近的一项研究表明 ApoE 能够以细胞自主方式调节 A β 的产生 (Wang 等人, 2018 年)。本研究在探寻此潜在机制之前, 首先使用免疫荧光对人脑样本进行染色, 以期验证 ApoE 确实在神经元中表达。实验结果与之前报道的人脑数据一致 (Aoki et al., 2003; Belonwu et al., 2022; Han et al., 1994; Zalocusky et al., 2021), 在人脑神经元和胶质细胞中均检测到 ApoE。具体而言, 年轻对照组 (年轻, 16-23 岁; 图 17, 面板 A; 图 25, 面板 B; 以及图 32 人脑供体的信息)、非 AD 患者的年龄匹配对照组 (老年, >60 岁) 和 AD 患者 (AD, >60 岁; 图 25, 面板 A 和 B) 的大脑样本中 30-50% 的皮层神经元呈 ApoE 阳性; 同时, 40-62% 的 ApoE 阳性细胞是人类皮层样本中的神经元 (图 17, 面板 A; 图 25, 面板 A 和 C)。此外, 人脑皮层星形胶质细胞也表达 ApoE (图 25, 面板 D)。在猴脑皮层中, 大多数可检测到的 ApoE 信号均位于神经元中 (图 17, 面板 A)。在人类 AD 患者大脑的淀粉样蛋白斑块中可检测到很强的 ApoE 染色信号, 但在没有罹患 AD 的对照大脑样本的相同区域则无法检测到 ApoE 信号

(图 25, 面板 E)。重要的是, 免疫染色显示内源性 ApoE 和 APP 在人类皮层神经中共存, 并且具有重叠的亚细胞信号模式(图 17, 面板 B)。

3.2. ApoE2 以细胞自主方式增加 α -CTF 和减少 $A\beta$

5 为了研究 ApoE 是否能以细胞自主方式来调控 APP 的代谢, 本实验将 APP 与 ApoE 在小鼠神经元细胞系(N2A; 图 17, 面板 C)和 HEK 293T 细胞(图 26, 面板 C)中共表达。 α -CTF 是 APP 的非淀粉样代谢途径的酶切产物, 已知其产生主要取决于 ADAM10(图 26, 面板 A 和 B), 一种 α -分泌酶(Esch 等人, 1990 年; Haass 等人, 1992 年; Mucke 和 Selkoe, 2012 年)。在 N2A 和 HEK 293T 细胞中, ApoE2 或
10 ApoE3 显著增加了共表达 APP 产生的 α -CTF 水平(图 17, 面板 C 和 D, N2A 细胞; 图 26, 面板 C 和 D, HEK 293T 细胞)。此外, ApoE2 也显著降低了共表达 APP 产生的 $A\beta_{40}$ 水平(图 17, 面板 E)。有趣的是, ApoE4 和 APP 的共表达未能改变 α -CTF(图 17, 面板 C 和 D)和 $A\beta_{40}$ 水平(图 17, 面板 E)。这些结果表明 ApoE2 以细胞自主方式增加 α -CTF。

15

3.3. ApoE2 的 C 端区域比全长 ApoE2 在提高 α -CTF 水平方面活性更强

ApoE 包含三个区域: 一个 N 末端区域(ApoE NT)、一个铰链区域和一个保守的 C 末端区域(ApoE CT)(图 33)(Chen et al., 2011)。三种 ApoE 亚型之间的唯一序列差异位于它们的 NT 之内。使用具有 ApoE 亚型截短突变体的 HEK 293T 细胞进行的实验表明, 来自 ApoE2、3 或 4 的 NT 并未显著改变共表达 APP 所产生的 α -CTF(图
20 26, 面板 E 和 F)。相反, 共表达保守的 ApoE CT 却导致 α -CTF 水平升高了 6 倍以上(图 26, 面板 G 和 H)。

引人注目的是, 实验显示与 APP 一起共表达 ApoE CT 使得分泌到细胞培养基中的 $A\beta_{40}$ 减少了约 75%(图 26, 面板 I), 细胞裂解物中的 $A\beta_{40}$ 减少了约 42%(图 26,
25 面板 J), 并且还显著减少了约 74%的 $A\beta_{42}$ (图 26, 面板 K), 但是 $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 的比率保持不变(图 26, 面板 K)。但与 APP 和 BACE1 共表达的 ApoE CT 并未改变 β -CTF 水平(图 26, 面板 L 和 M)。所有 ApoE NT 均未能显著降低 $A\beta_{40}$ (图 26, 面板 I)。类似地, 使用 N2A 细胞进行的实验显示, 只有与 APP 共表达 ApoE CT 才能显著增加 α -CTF, 而共表达 ApoE NT 则不可以(图 17, 面板 F 和 G); 此外, ApoE
30 CT 也显著减少了总 $A\beta_{40}$ (图 17, 面板 H)。

实验发现与 ApoE2 做对比, ApoE CT 同样显著增加了 α -CTF 水平(图 17, 面板

I 和 J, N2A 细胞; 图 26, 面板 N 和 O, HEK 293T 细胞), 这表明 ApoE CT 调节 APP 代谢的活性显然比全长 ApoE2 更高。这些结果表明 ApoE CT 这一 ApoE 的保守区域可以提高 α -CTF 水平, 并表明 ApoE 的 NT 可能以某种方式阻碍 ApoE CT 的这一活性。

- 5 为了研究分泌的 ApoE 是否也会影响 APP 的酶切, 本研究用含有分泌的 ApoE 或 ApoE CT 的培养液培养仅表达 APP 的 HEK 293T 细胞 (图 27)。实验表明培养液中游离的 ApoE2 或 ApoE CT 不会改变细胞中 APP 生成的 α -CTF (图 27, 面板 A、B 和 C)。值得注意的是, ApoE2 在 37°C 的条件培养基中能够稳定存在 48 小时 (图 27, 面板 D), 这可排除由 ApoE 降解带来的可能干扰因素。对于用条件培养基处理的
- 10 HEK 293T 细胞和原代培养的大鼠神经元, ApoE2 或 ApoE CT 主要在细胞膜外检测到 (图 27, 面板 E 和 F)。相比之下, 细胞或神经元表达的 ApoE CT 要分布在细胞或神经元内 (图 27, 面板 E 和 F)。比较细胞裂解液中的 ApoE2 与分泌在培养基中 ApoE2 的相对量, 发现两者含有相近的 ApoE2 (图 27, 面板 G)。此外, 来自条件培养基的少量 ApoE 在共孵育后可被细胞或神经元内吞 (图 27, 面板 E 和 F)。因
- 15 此, ApoE 调节 APP 代谢更可能是由细胞内 ApoE 以细胞自主的方式所介导的, 而不是由分泌的 ApoE 介导的。

3.4. 神经元中表达的 ApoE CT 减少了内源性 A β 。

- 除了人类 APP, ApoE CT 还提高了瞬时表达小鼠 APP(mAPP) 的 HEK 293T 细胞
- 20 中的 α -CTF 水平 (图 26, 面板 P 和 Q)。原代培养神经元的实验结果表明, 与 GFP 对照相比, 在小鼠皮质和海马神经元中过表达 ApoE CT (慢病毒感染) 后, 内源性 A β_{40} 减少了 30% (图 17, 面板 K)。在 hiPSC 诱导的神经元中, ApoE CT (慢病毒感染) 导致人神经元产生的 A β_{40} 约减少了 46% (图 17, 面板 L)。总的来说, 这些结果表明 ApoE CT 可以减缓啮齿动物和人类神经元中的内源性 A β 。此外, ApoE CT
- 25 的表达还减缓了表达致病性瑞典 APP 突变体 (APP^{Sw}) (Citron 等人, 1992) 的 HEK 293T 细胞中 A β_{40} 的产生: 培养基中的 A β_{40} 约减少了 76% (图 26, 面板 R), 在细胞裂解物中的 A β_{40} 约减少了 43% (图 26, 面板 S), 表明 ApoE CT 可减少 APP^{Sw} 产生的 A β 。

- 与 APP 共表达的另一载脂蛋白, 载脂蛋白 A1 (ApoA1), 未能改变 α -CTF 和 A β
- 30 的水平 (图 26, 面板 T、U 和 V), 表明 ApoE 调节 APP 剪切的活性不是任意载脂蛋白的非特异性活性。

3.5. ApoE2通过CT与APP和 γ 分泌酶相互作用。

在 N2A 细胞中, ApoE2 或者 ApoE CT 与共表达的 APP-FLAG 有着非常相似的核周亚细胞分布模式(图 18, 面板 A)。在培养的大鼠海马神经元(图 18, 面板 B)和 hiPSC 衍生神经元(图 18, 面板 C)中, 表达的 ApoE2-V5 或者 ApoE CT-V5 与神经元内源表达的 APP 有类似亚细胞分布模式(V5 为标签蛋白)。这些结果表明 ApoE 和 ApoE CT 与 APP 具有相似的亚细胞分布模式。

为了检测 ApoE 和 APP 或 APP 分泌酶之间的潜在相互作用, 本实验使用了蛋白质临近标记技术(Hung 等人, 2016 年)。当在 HEK 293T 细胞中共表达时, ApoE2 和 ApoE CT 被 APP-APEX2(抗坏血酸过氧化物酶 2, 连接到 APP 的 C 末端; 图 18, 面板 D 和 E)生物素化。同时, FL-APP(全长 APP)和 α -CTF 也可以在同一系统中被 ApoE2-APEX2 生物素化(图 18, 面板 F)。在原代培养的大鼠神经元中, ApoE2-APEX2 生物素化内源表达的 APP(图 18, 面板 G)。此外, ApoE2-APEX2 生物素化共表达的 ADAM10(α -分泌酶)、PS1 和 PS2(γ 分泌酶的酶切催化活性), 但不生物素化 β -分泌酶 BACE1(图 18, 面板 H)。此外, 当在 HEK 293T 细胞中共表达时, ApoE2 和 ApoE CT, 而不是 ApoE2 NT, 能够与 β -CTF-FLAG 免疫共沉淀(图 18, 面板 I)。类似地, 当在 HEK 293T 细胞中共表达时, ApoE2 和 ApoE CT(但不是 ApoE2 NT)与 γ 分泌酶的成分(APH、NCT 和 PEN2)发生免疫共沉淀(图 18, 面板 J; 使用抗 FLAG-PEN2 进行免疫沉淀)。有趣的是, 在人脑样本中, 内源性 γ 分泌酶(NCT、PS1、PS2 和 PEN2)与内源性 ApoE 发生免疫共沉淀(图 18, 面板 K)。上述结果表明只有 ApoE2 和 ApoE CT(不是 ApoE NT)能够与 APP、 γ 分泌酶和 α -分泌酶相互作用, 但它们不与 BACE1 相互作用, 并且人脑中存在 ApoE 与 γ 分泌酶的内源性相互作用。

3.6. ApoE CT减少了APP的 γ 剪切。

为了进一步研究潜在机制, 本研究进一步探索了与 AD 相关的 APP 突变体与 ApoE CT 的互作情况。ApoE CT 增加了所有测试的 APP 突变体产生的 α -CTF(图 28)。有趣的是, 与野生型 APP(WT APP)相比, 在表达 γ 切割位点附近发生 fAD 突变的 APP 变体的细胞中(T714I、V717F 和 L723P)(Kumar-Singh 等人, 2000 年; Kwok 等人, 2000 年; Murrell 等人, 1991 年), ApoE CT 提高 α -CTF 水平的能力显著降低(图 28)。在检查 WT APP 和在 β -或 α -切割位点附近产生 fAD 突变的 APP 亚

型 (KM670/671NL、E693K、E693Δ) (Bugiani 等人, 2010 年; Citron 等人, 1992 年; Tomiyama 等人, 2008 年; Xia 等人, 2021 年) 时, 则没有检测到 ApoE CT 对 α -CTF 水平产生具有统计学差异的影响 (图 28); 共表达具有减少 AD 发病几率、保护性的冰岛突变 (A673T) (Xia 等人, 2021 年) 的 APP 变体, 也没有检测到 ApoE CT 对 α -CTF 水平的差异性影响 (图 28)。综合来看, APP 的 γ 位点附近发生突变时, ApoE CT 活性遭到破坏, 这一现象提示 γ 剪切与 ApoE CT 调节 APP 代谢的活性有关。由于 α -CTF 被 γ 剪切而降解 (De Strooper 等人, 2012 年; De Strooper 等人, 1998 年; Haass 等人, 1992 年), 这些结果提示 ApoE CT 可能会影响 α -CTF 降解。

接下来, 本研究根据 γ 分泌酶在 APP 代谢过程中的作用进行深入探究。与之前 α -CTF 通过 γ 酶切的报道一致 (De Strooper 等人, 2012 年; De Strooper 等人, 1998 年; Haass 等人, 1992 年), 过表达的 PS1 显著将 α -CTF 的水平降低至 50% (图 19, 面板 A 和 B); 使用 γ 分泌酶抑制剂 PF03084014 (1 μ M) 处理时, 过表达的 PS1 不再降低 α -CTF, PF03084014 也增加了 α -CTF; γ 分泌酶抑制剂处理时, α -CTF 的水平与共表达 ApoE CT 的 HEK 293T 细胞中的 α -CTF 水平相似 (图 19, 面板 A、B、C 和 D)。有趣的是, 在 PF03084014 存在的情况下, ApoE CT 未能进一步增加 α -CTF (图 19, 面板 C 和 D), 表明通过抑制 γ 分泌酶可以阻断 ApoE CT 活性。此外, 使用 ADAM10 抑制剂 GI254023X (1 μ M) 可以将 α -CTF 减少至约 45% (图 29, 面板 A 和 B)。在 GI254023X 存在的情况下, ApoE CT 仍然可以增加 α -CTF (约 4 倍; 图 29, 面板 A 和 B) 和减少 A β ₄₀ (图 29, 面板 C 和 D)。此外, 当 β -分泌酶被其抑制剂 AZD3839 (5 μ M) 抑制时, ApoE CT 仍会增加 α -CTF (图 29, 面板 E 和 F)。ApoE CT 还能够提高 APP_{M596V} 所产生的 α -CTF (图 29, 面板 G 和 H), APP_{M596V} 是一个不能进行 β 酶切的 APP 突变 (Citron 等人, 1995 年)。此外, ApoE CT 也显著降低了 β -CTF 产生的 A β ₄₀ (图 19, 面板 E) 和 A β ₄₂ (图 19, 面板 F), 表明 ApoE CT 通过抑制 γ 酶切减少了 A β 的产生。APP 的 γ 剪切产物 APP Δ AICD 只需要经过 β 酶切就可以生成 A β ₄₀。有趣的是, ApoE CT 未能减 APP Δ AICD 产生的 A β ₄₀ (图 19, 面板 G 和 H)。这些结果共同支持了 ApoE CT 抑制了 APP 的 γ 酶切, 但不直接调节 α 或 β 酶切的假设。

此外, ApoE2 和 ApoE CT 均未改变 ADAM10、BACE1、PS1 或 PS2 的 mRNA 或蛋白质表达水平 (图 29, 面板 I 和 J), 表明 APP 分泌酶的表达水平没有改变。此外, ApoE CT 也没有改变 APP 在细胞表面的表达 (图 29, 面板 K)。

3.7. ApoE CT调节APP的代谢需要 γ 分泌酶参与。

为了确定 ApoE CT 调节 APP 的代谢是否需要 γ 分泌酶, 本研究构建了 PS1 和/或 PS2 敲除(KO) HEK 293T 细胞系 (Lu 等人, 2014 年) (图 20, 面板 A)。PS1 KO 细胞中的 α -CTF 水平升高, 这可以通过 PS1 的代偿性表达来逆转 (图 20, 面板 B)。

- 5 PF03084014 处理进一步增加了 PS1 KO 细胞中的 α -CTF 水平 (图 20, 面板 B)。共表达的 ApoE CT 仍然能够增加 PS1 KO 细胞 (图 20, 面板 C 和 D) 和 PS2 KO 细胞 (图 20, 面板 E 和 F) 中的 α -CTF。因此, 单独敲除 PS1 或 PS2 不足以完全消除 ApoE CT 的活性。

- 在 PS1/2 双敲除细胞 (PS1/2 dKO) 中, 与 WT 细胞相比, α -CTF 水平也显著升高 (图 20, 面板 G); 在 PS1/2 dKO 细胞中共表达的 ApoE CT (图 20, 面板 G 和 J) 或 ApoE2 (图 20, 面板 K 和 L) 没有进一步提高 α -CTF 水平。PS1 或 PS2 的补充表达挽救了 ApoE CT 的活性, ApoE CT 再次显著增加了 α -CTF (图 20, 面板 H、I 和 J)。同时, 在补充表达 PS2 的 PS1/2 dKO 细胞中, ApoE CT 也显著减少了 β -CTF 产生的 $A\beta_{40}$ (图 20, 面板 M)。这些结果共同表明, ApoE CT 或 ApoE2 需要 γ 分泌酶来增加 α -CTF。

3.8. 小鼠神经元内源表达的ApoE调节内源APP的 γ 酶切。

- 为了探索神经元中内源性 ApoE 的生理活性, 构建了小鼠 ApoE 的 shRNA (shApoE_1、shApoE_2、shScramble 作为对照)。在小鼠神经元中利用慢病毒系统表达的 shApoE_1 和 shApoE_2 成功降低了原代培养的小鼠神经元中内源性 ApoE 的蛋白表达量 (图 21, 面板 A)。用 γ 分泌酶抑制剂 PF03084014 处理后, 神经元中 APP 代谢产生的~14kD CTF (C 端片段, CTF_{14kD}) 水平显著增加, 表明该 CTF_{14kD} 也可以被 γ 分泌酶剪切 (图 21, 面板 B)。shApoE_1 或 shApoE_2 显著降低了小鼠神经元中 CTF_{14kD} 条带的基础水平 (图 21, 面板 C 和 D), 表明内源性 ApoE 增加了 CTF_{14kD}。
- 25 当存在 γ 分泌酶抑制剂 PF03084014 时, ApoE 的这两个 shRNA 不能再降低 CTF_{14kD} (图 21, 面板 E), 表明 ApoE 的这种活性需要有活性的 γ 分泌酶的存在。此外, ApoE 的敲低还导致神经元产生的 $A\beta$ 水平上升 (图 21, 面板 F)。这些结果共同表明, 神经元中内源性的 ApoE 调控了内源 APP 的 γ 酶切。

- 30 3.9. ApoE CT以底物特异性的方式抑制 γ 酶切。

本发明继续检测 ApoE CT 是否也抑制 NOTCH 的 γ 酶切。NOTCH 是 γ 分泌酶的

底物 (Xia, 2019 年; Yang 等人, 2019 年)。在 HEK 293T 细胞中, 共表达的 γ 分泌酶减少 N100 (NOTCH 片段), 并且 PF03084014 的处理逆转了这种降低 (图 30, 面板 A)。有趣的是, 共表达的 ApoE CT 未能抑制 N100 的这种 γ 分泌酶依赖性减少 (图 30, 面板 A)。然而, 当与 γ 分泌酶共表达时, ApoE CT 仍然抑制 γ 分泌酶对 APP 的 γ 剪切 (图 30, 面板 B)。APP 样蛋白 1 (APP-like protein 1, APLP1) 是 α 和 γ 分泌酶的另一个底物 (Eggert 等人, 2004 年)。用 PF03084014 处理降低了 APLP1 的水平, 同时增强了它的切割产物 (α -like CTF); 但是 α -like CTF 不会因 ApoE CT 与 APLP1 的共表达而改变 (图 30, 面板 C)。这些结果证 ApoE CT 不抑制 NOTCH 和 APLP1 的 γ 酶切。

10

3.10. ApoE2 直接抑制 APP 的 γ 酶切。

为了确定 ApoE 是否直接抑制 β -CTF 的 γ 剪切, 本发明纯化了 β -CTF、ApoE2、ApoE2 NT 和 γ 分泌酶 (Lu et al., 2014) (图 22, 面板 A; 图 31) 以供进一步测试。纯化的 γ 分泌酶与 β -CTF 一起孵育导致 $A\beta_{40}$ 的产生; 在没有 γ 分泌酶存在的条件下, β -CTF 不产生 $A\beta_{40}$; 并且 γ 分泌酶与 β -CTF 一起孵育生成的 $A\beta_{40}$ 可以被 PF03084014 完全阻断 (图 22, 面板 B)。纯化的 ApoE2 以剂量依赖性方式抑制 $A\beta_{40}$ 的产生, IC50 为 1.2 μ M (图 22, 面板 C)。相反, ApoE2 NT 未能抑制 $A\beta_{40}$ 的产生 (图 22, 面板 D)。这些结果表明 ApoE2 通过其 CT 直接抑制 β -CTF 的 γ 酶切。

3.11. 神经元表达的 ApoE CT 迁移至淀粉样斑块并减轻 5xFAD 小鼠的斑块负担。

为了研究 ApoE CT 是否可以延迟 AD 小鼠模型中的淀粉样斑块的生成, 本实验将 ApoE CT 通过 AAV 载体在 4 周龄 5xFAD 小鼠的皮质和海马中的神经元中表达 (图 23, 面板 A)。10 周后, 与 GFP 对照相比, 表达 ApoE CT 的 5xFAD 小鼠下托 (subiculum) 脑区内的平均斑块大小、总淀粉样斑块面积百分比和斑块密度均显著降低 (图 23, 面板 B、C、D 和 E)。

有趣的是, 在这些 5xFAD 小鼠中, 虽然 ApoE CT 表达局限于皮质、海马体的齿状回 (DG) 和 CA3 区域的神经元中, 但它迁移到了 subiculum 并积聚在淀粉样斑块周围 (图 23, 面板 B); 而神经元表达的 GFP 未能做到这一点。正如本发明 (图 25, 面板 E) 和其他人报道的数据所示 (Metzger 等人, 1996 年), 神经元中表达的 ApoE CT 可以迁移到淀粉样蛋白斑块以实现在这些淀粉样蛋白生成热点 (Jordà-Siquier 等人, 2022 年) 中对 γ 分泌酶的局部调节。在用慢病毒载体 (lentiviral vectors) 在 5xFAD

小鼠中表达 ApoE2 和 ApoE CT 时,淀粉样斑块周围也检测到类似的分布模式(图 24, 面板 A, 箭头, 淀粉样斑块中的 ApoE; 无柄箭头, 神经元中的 ApoE); 而 GFP 和 ApoE2 NT 未能在斑块周围积聚(图 24, 面板 A)。在未产生淀粉样斑块的 1 个月大 5×FAD 小鼠(图 24, 面板 B)和 WT 小鼠(图 24, 面板 C)中, ApoE CT 仅存在于 5 神经元胞体中, 并与表达的人源 APP (hAPP) 亚细胞分布部分共定位。这些结果表明 ApoE 积累在淀粉样斑块周围需要 CT。

4. 讨论

以A β 为靶点治疗AD的努力持续失败,使得A β 在AD中的作用受到质疑(Liu等人, 10 2019年; Panza等人, 2019年; Roberson和Mucke, 2006年)。不可避免地,这种失败也挑战了对AD本身的许多基本理解。例如,尽管 γ 分泌酶的功能障碍导致fAD仍然是毫无疑问的,这将A β 失调与fAD联系起来,并具有强大的人类遗传证据(Selkoe, 2001)。然而,支持A β 在sAD中作用的证据要弱得多。不能完全排除sAD是一种恰好与fAD具有相同病理特征的不同疾病的可能性(Armstrong, 2013; De Strooper和Karran, 2016 15 年)。事实上, fAD和sAD除了潜在的遗传因素外,在其他方面也存在差异,包括发病年龄、详细的病理异常和症状等(Dorszewska等人, 2016年; Roher等人, 2016年)。

ApoE是sAD最重要的遗传因子,本实验的数据首次显示, ApoE似乎通过选择性抑制APP的 γ 剪切(淀粉样蛋白生成的关键步骤)来降低sAD的风险。本发明的这些结果解释了为什么与ApoE2携带者相比, ApoE4携带者会产生更高的淀粉样蛋白负荷并且具有更少的来自非淀粉样蛋白生成途径的代谢产物(Corder等人, 1993年; 20 Hashimoto等人, 2012年; Olsson等人, 2003年; Schmechel等人, 1993年)。总之, 本实验的数据支持精确抑制 γ 分泌酶可以预防sAD的风险,因此通过抑制 γ 分泌酶来治疗sAD是合理的。值得注意的是,最近的研究发现,大多数fAD的早老素突变会导致 γ 分泌酶活性降低(Sun等人, 2017年; Xia等人, 2015年)。这表明尽管 γ 分泌酶的功能障碍在sAD和fAD的发病机制中起着核心作用,但在这两种不同形式的AD中, γ 分泌酶活性的变化却是相反的。从这个角度来看, γ 分泌酶抑制可能不适用于具有早老素功能丧失突变的fAD。它提出了有趣的问题,即为什么较高和较低的 γ 分泌酶活性都会导致AD, 以及是否应根据早老素突变如何影响 γ 分泌酶活性将fAD分为不同的组。 25

同时,考虑到尚未测试的广谱 γ 底物(Güner和Lichtenthaler, 2020年), APP可能 30 不是唯一一种其切割被ApoE抑制的底物,因此ApoE对APP的 γ 酶切的影响可能不是导致sAD风险的唯一原因,但仍然是合理的。因此,对 γ 分泌酶的抑制可能不会导致与A β

清除相同的效果。这是一个特别值得关注的问题，因为它可能有助于解释为什么单独使用A β 清除策略无法得到令人满意的临床效果。通过分析哪些 γ 分泌酶的底物受ApoE影响，本发明的研究将提供一个难得的机会来探讨除A β 外其他 γ 分泌酶的底物在AD病因学中的作用。

- 5 在小鼠模型中，ApoE主要在神经胶质细胞中表达(Xu et al., 2006)。由于A β 是在神经元中产生的，因此大多数研究都集中在神经胶质细胞分泌的ApoE如何影响胞外淀粉样进程(Holtzman等人，1999年；Huang等人，2017年；Huynh等人，2017年；Liu等人，2017年；Yu等人，2014年)。实际上，来自不同实验室的许多论文独立地表明，ApoE的mRNA和蛋白质都在人类神经元中检测到(Aoki等人，2003年；Han等人，1994
- 10 年；Metzger等人，1996年；Strittmatter等人，1993；Xu等人，1999)。最近的单核RNA-seq数据也表明，可以在神经元中检测到ApoE，高达28%的AD患者神经元高水平表达ApoE(Belonwu等人，2022年；Zalocusky等人，2021年)，这与我们观察到的一致，即大约30-40%的神经元在人类皮层中表达ApoE。此外，ApoE在人脑中的代谢更类似于神经元中表达的ApoE，而不是胶质细胞中表达的ApoE的代谢(Brecht et al., 2004)。
- 15 还有报道称，携带ApoE4亚型的人类神经元产生的A β 多于拥有其他ApoE亚型的人类神经元(Wang等人，2018年)，这强烈支持人类神经元中内源表达的ApoE可以调节内源APP的代谢。然而，ApoE在神经元中的作用在很大程度上仍未得到充分理解。本发明发现保护性亚型ApoE2通过其CT以细胞自主方式直接抑制APP的 γ 酶切，而ApoE4没有此活性。重要的是，本发明还发现小鼠神经元中内源性的ApoE显著抑制内
- 20 源表达的APP的 γ 酶切；并且人大脑中，内源的ApoE和内源表达的 γ 分泌酶存在相互作用。此外，AD小鼠模型概括了AD的许多关键病理特征，但没有概括ApoE的淀粉样蛋白沉积(Oakley等人，2006年)。令人惊讶的是，本发明发现在5 $\times$ FAD小鼠的神经元中表达的ApoE迁移并聚集在淀粉样蛋白斑块周围，这与先前报道的ApoE存在于AD患者大脑的淀粉样蛋白斑块中一致(Han et al., 1994；Strittmatter et al, 1993)，表明斑块
- 25 中的ApoE具有神经元起源。这些发现强调了神经元中的ApoE在AD中发挥着非常关键的作用，并为ApoE2和ApoE4对AD发病机制的不同贡献提供了新的机制解释。

- γ 分泌酶是AD的潜在药物靶点。然而，在过往的药物研发中发现抑制 γ 分泌酶的活性会导致严重的副作用，这可能是由于 γ 分泌酶抑制剂在不同底物中的选择性较差的缘故(Panza等人，2019年；Roberson和Mucke，2006年；Xia，2019年)。广泛的、
- 30 非特异的抑制剂在抑制 γ 分泌酶阻断A β 生成的同时，也会阻止 γ 分泌酶其他底物的正常加工(Panza等人，2019年；Xia，2019年)，从而导致副作用。开发 γ 分泌酶修饰剂

来选择性抑制APP的 γ 剪切是一种很有前途的新策略(Xia, 2019)。本发明发现ApoE CT抑制APP的 γ 酶切, 但不影响NOTCH和APLP1的 γ 酶切, 表明ApoE CT对 γ 剪切的抑制作用具有底物特异性。正如之前报道的那样, 小分子药物通过占据PS1上与其底物(例如APP或Notch (Yang等人, 2021))相互作用的 β 链的相同位置来抑制 γ 分泌酶的活性。ApoE CT作为一种结构上与传统小分子抑制剂截然不同的分子, 可能作用于一些变构位点, 仅影响某些底物与 γ 分泌酶的结合, 而不影响其他底物的结合, 从而实现底物选择性。然而, 确切的机制仍有待解决。尽管如此, 与传统的 γ 分泌酶抑制剂相比, ApoE CT可能作为一种新的战略性治疗方法, 副作用可能更小。综上所述, 本发明不仅提供了潜在的机制理解神经元ApoE亚型在sAD发病机制中的作用; 而且还通过选择性抑制AD相关的 γ 分泌酶底物的 γ 剪切, 确定了ApoE CT作为AD的潜在治疗方法。

这些结果支持 γ 分泌酶的精确抑制可防止sAD的风险, 这与通常与 γ 分泌酶活性降低相关的fAD相反。本发明还将ApoE CT鉴定为一种有效的 γ 分泌酶抑制剂, ApoE CT具有罕见的底物特异性, 可以从远处迁移到斑块周围的淀粉样蛋白生成热点中局部起作用。

5. 实验材料和方法

动物

5xFAD小鼠的神经元中表达有五个fAD突变的人源APP和PS1: APP中的K670N/M671L+I716V+V717I突变和PS1中的M146L+L286V突变(Oakley等人, 2006)。所有小鼠都被安置在12小时的光暗循环(从早上8点到晚上8点光照)下, 随意获取食物和水。所有小鼠程序均按照中国科学院和美国国立卫生研究院的实验动物护理和使用指南进行。

人和猴脑组织

所有人类脑组织均来自中国湖北中国脑库(CBBC)和浙江大学医学院以及中国浙江国家健康与疾病人类脑库。图32总结了捐赠者的信息。人脑组织实验前-80°C保存, 4%PFA固定过夜, 切片前30%蔗糖冷冻过夜。以下步骤与在小鼠脑切片上执行的IHC相同。

成年恒河猴固定脑片来自中国科学院神经科学研究所, 中国上海(Wu等人, 2021)。

原代神经元的培养

如前人所述制备原代分离的神经元培养物（Chen等人，2014年）。从第16天野生型胚胎中取出整个海马体或皮质小鼠（C57BL/6）或大鼠（SD），并在37°C下用木瓜蛋白酶（Worthington）处理10分钟，并解离。将分离的细胞以150,000个细胞/孔（24孔板）接种在B27神经元生长培养基。神经元在37°C和5% CO₂培养箱中培养，并且每周添加一次新鲜培养基。

PS1KO、PS2KO和PS1/2dKO细胞系的构建

HEK 293T细胞在补充有10%牛血清白蛋白（Life Technology）和1%青霉素/链霉素（Life Technology）的DMEM培养基（Gibco）中培养。为了制备PS1、PS2单敲除或PS1/2双敲除HEK 293T细胞系，采用了CRISPR/Cas9基因组编辑方法（Ran等人，2013）。靶向PS1外显子4的向导RNA（gRNA）5'-ATTATCTAATGGACGACCCC-3'（SEQ ID NO: 91）和靶向PS2外显子4的gRNA 5'-CAAATACGGAGCGAAGCACG-3'（SEQ ID NO: 92）分别亚克隆到pSpCas9（BB）-2A-puro骨架（PS1gRNA、PS2gRNA）中。使用Lipofectamine2000（Invitrogen Technology）将含有gRNA的质粒转染到HEK 293T细胞中。转染PS1 gRNA或PS2 gRNA 18小时后，HEK 293T细胞用3μg/ml嘌呤霉素（Selleck）处理。当转染空白质粒的HEK 293T细胞完全死亡后，将转染PS1 gRNA或PS2 gRNA的HEK 293T细胞按1:400稀释度在10cm培养皿中培养，保证每个细胞均为单克隆。在单个细胞长成细胞团后，选择基因组编辑的细胞团并通过DNA测序和Western blot验证。用于构建PS1/2dKO细胞系用PS1 gRNA转染PS2已经敲除细胞并进行第二轮选择。

蛋白质印迹（WB）

在HEK 293T或N2A细胞中转染质粒36-48小时，然后在细胞裂解缓冲液[10%1Mtris-HCl（pH=6.8），4%SDS,20%甘油,0.01%溴酚蓝]中裂解。裂解物在室温下摇动10分钟，然后煮沸10分钟，并以12,000×g离心10分钟。蛋白质在8%或12%Tris-甘氨酸SDS-PAGE上运行并转移到PVDF膜（Life Technologies）。将样品在5%BSA缓冲液（在1×TBST中）稀释的一抗在4°C孵育过夜。用1×TBST洗涤3次后，将它们与稀释在5%BSA缓冲液（在1×TBST中）的二抗在室温下孵育2小时。最后用1×TBST洗涤3次后，通过ECL蛋白质印迹底物（Solarbio，PE0010）检测信号。

脑组织样本用TissueLyserII (QIAGEN,85300)并在RIPA缓冲液 (Solarbio,R0010)中裂解。裂解物煮沸10分钟,然后以12,000×g离心10分钟。Western blot的操作步骤同细胞样本。

5 用于蛋白质印迹的APEX标记蛋白的制备

如前人所述,应用了一种通过APEX2靶向检测活细胞中蛋白质相互作用的方法 (Hung 等人, 2016年)。转染后约30小时和APEX2质粒通过Lipofectamine2000 (Invitrogen Technology),将HEK 293T细胞在含有或不含250uM生物素苯酚 (BP)的1ml完全培养基中于37°C孵育30分钟。细胞用1mM H₂O₂处理1分钟,细胞在猝灭剂溶液 (10mM抗坏血酸钠、5mM Trolox和10mM叠氮化钠溶液的1×DPBS溶液)中洗涤3次。细胞在RIPA裂解缓冲液 (1×蛋白抑制剂混合物、1mM PMSF和10mM抗坏血酸钠、5mM Trolox和10mM叠氮化钠)中裂解。裂解物在冰上超声并离心 (12,000×g, 4°C, 10分钟),上清液与链霉亲和素磁珠在4°C孵育过夜。使用磁性架收集珠子并用一系列缓冲液洗涤 (两次使用RIPA缓冲液,一次使用1M KCl,一次使用0.1M Na₂CO₃,两次使用2M尿素的10mM Tris-HCl, pH8.0,并使用RIPA裂解缓冲液两次)。通过在含有2mM生物素和20mM DTT的加载缓冲液中煮沸每个样品10分钟,从珠子上洗脱生物素化的蛋白质,收集洗脱液。样本继续进行蛋白质印迹。

免疫共沉淀 (co-IP)

HEK 293T细胞转染的和质粒通过Lipofectamine2000 (Invitrogen Technology)处理48小时,HEK 293T细胞在1% CHAPSO (SIGMA)、25mM HEPES (pH7.4) (Gibco)、150mM NaCl (含1×蛋白酶抑制剂混合物)中裂解,并以14,000×g离心20min,收集上清液。将上清液与抗FLAG (SIGMA)或抗IgG (Santacruz)抗体在4°C下孵育3小时,并使用ProteinG Sepharose beads (Gen Script) pulldown,然后在0.1%洋地黄皂苷-HEPES缓冲液中洗涤3次,每次15分钟,并收集在细胞裂解缓冲液 [10%1M Tris-HCl (pH=6.8),4%SDS,20%甘油,0.01%溴酚蓝]。样本继续进行蛋白质印迹。

免疫荧光染色和免疫组织化学 (IHC)

在24孔板的盖玻片上培养的神经元和HEK 293T细胞用1×PBS (2.5mM MgCl₂和0.5mM CaCl₂)洗涤,并在室温下用4% PFA+4%蔗糖在1×PBS中固定10分钟。接下来,用0.15% Triton-X在1×PBS中打孔15分钟,并在室温下用5% BSA在1×PBS中封闭30分

钟，将样品与稀释在5% BSA（在1×PBS中）缓冲液中的一抗一起孵育4℃过夜。然后用1×PBS中的0.5M NaCl洗涤样品一次，并用1×PBS洗涤三次。然后将样品与稀释在5% BSA（在1×PBS中）缓冲液中的二抗一起孵育室温静置1h。在用1×PBS进行三次最终洗涤步骤后，用Prolong Gold Antifade Mountant（Life Technology）封固样品。所有
5 图像均以盲法拍摄和分析。

小鼠用异氟醚麻醉并灌注4% PFA。解剖的小鼠大脑在4% PFA中固定过夜，并在30%蔗糖中冷冻保护过夜。低温切片机（LeicaCM3050S）用于从固定和冷冻保护的小鼠大脑中获取冷冻脑切片（40μM）。漂浮切片用1×PBS洗涤3次，然后用0.5% Triton-X的1×PBS透化30分钟。1×PBS中的5% BSA室温封闭1h后，切片在含有一抗的5% BSA
10 （1×PBS中）缓冲液中4℃孵育过夜。切片用1×PBS洗涤3次，并与稀释在5% BSA（1×PBS）缓冲液中的二抗在室温下孵育1小时。然后用1×PBS洗涤样品3次并用Prolong Gold Antifade Mountant（LifeTechnology）封片。

THS染色

15 小鼠用异氟醚麻醉并灌注4% PFA。解剖的小鼠大脑在4% PFA中固定过夜，并在30%蔗糖中冷冻保护过夜。低温切片机（Leica, CM3050S）用于从固定和冷冻保护的小鼠大脑中获取冷冻脑切片（40μM）。漂浮切片用ddH₂O洗涤3次，然后在室温下用1%THS（SIGMA）的水溶液孵育5分钟。接下来，切片用80%乙醇洗涤两次，一次用95%乙醇，每次3分钟。样品经ddH₂O洗涤，1×PBS洗涤3次后，即可进行IHC。

20

定量实时PCR（qRT-PCR）

使用TRIzol试剂（Invitrogen）从HEK 293T细胞中提取总RNA。使用QuantiTect SYBR-Green RT-PCR（逆转录-PCR）试剂盒（Qiagen）进行逆转录。GAPDH用作内部对照。ADAM10 mRNA的正向引物5'-AGAGCAACATCTGGGGACAAA-3'（SEQ ID
25 NO: 93）和反向引物5'-TCCACAAATAGGTTGGCCAGAT-3'（SEQ ID NO: 94），BACE1 mRNA的正向引物5'-AACGAATTGGCTTTGCTGTC（SEQ ID NO: 95）和反向引物5'-AGGCTATGGTCATGAGGGTTG-3'（SEQ ID NO: 96），正向引物5'-TGACTCTCTGCATGGTGTTG-3'（SEQ ID NO: 97）和用于PS1 mRNA的反向引物5'-TCAGAATTGAGTGCAGGGCT-3'（SEQ ID NO: 98），用于PS2 mRNA的正向引物5'-
30 TTTGAGCCTCCCTTGACTGG-3'（SEQ ID NO: 99）和反向引物5'-

GGTATTCCAGTCCCCGCTG-3' (SEQ ID NO: 100) 用于qRT-PCR。使用SYBR绿色荧光信号 (Thermo Fisher Scientific的应用生物系统) 的比较阈值循环测量来测试量化。

酶联免疫吸附试验 (ELISA)

- 5 HEK 293T细胞和N2A细胞转染48小时, 或慢病毒感染神经元4.5天后, 收集培养基和裂解物。按照方案的指示, 通过A β 酶联免疫吸附测定试剂盒检测培养基和细胞裂解物中的A β 40和A β 42。(Invitrogen Technology; KHB3481用于人A β 40, KHB3441用于人A β 42和KMB3481用于小鼠A β 40)。

10 蛋白纯化

人的 γ -分泌酶复合物如前所述纯化 (Lu等人, 2014), 编码人 γ -分泌酶复合物的cDNA连同表达载体参见Lu等人, 2014。

- 人ApoE蛋白的纯化。用人ApoE质粒 (ApoE2-3 $\times$ FLAG或ApoE2NT-3 $\times$ FLAG) 转染细胞48小时后, 将转染的细胞在冷的1 $\times$ PBS中洗涤一次, 收获并以800g离心。然后
- 15 将细胞沉淀重悬于含有25mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM二硫苏糖醇 (DTT)、0.05% (v/v) Tween-20和1 $\times$ 蛋白酶抑制剂混合物的5ml裂解缓冲液中。细胞裂解通过超声处理实现, 细胞碎片通过离心分离 (12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 15分钟)。将上清液与抗FLAGM2亲和凝胶 (SIGMA) 在4 $^{\circ}$ C下孵育90分钟。然后用含有25mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT和0.05% (v/v) Tween-20的缓冲液洗涤树脂3次。ApoE蛋白用含有25mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl和500 μ g/ml 3 $\times$ FLAG肽 (SIGMA) 的缓冲液洗脱。SDS-PAGE和蛋白质印迹用于显示纯化的蛋白质。
- 20

- β -CTF的纯化。用人 β -CTF-Myc-6 $\times$ His质粒转化大肠杆菌细胞, 当OD₂₆₀达到0.6-0.8时, 用0.5 μ M IPTG (Solarbio) 在37 $^{\circ}$ C下诱导大肠杆菌细胞4小时。大肠杆菌细胞在
- 25 该缓冲液 (30mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA) 中裂解, 并在冰上超声处理。将裂解物以25,000 $\times$ g离心10分钟, 将裂解物溶解在尿素缓冲液 (30mM Tris-HCl, pH8.0, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 6M尿素, 1% TritonX-100和1mM CaCl₂, 1 $\times$ 蛋白酶抑制剂混合物) 并缓慢旋转3小时。将重悬的裂解物以40,000 $\times$ g、30分钟离心两次, 并将上清液与Ni-NTA珠 (GEhealthcare) 在室温下孵育2小时。用10柱体积 (CV) 的尿素缓冲液1 (30mM Tris-HCl, pH8.0; 300mM NaCl, 1mM EDTA, 6M尿素, 1% TritonX-100, 1mM CaCl₂, 1 $\times$ cocktail)、20CV洗涤缓冲液2 (30mM Tris-HCl、pH8.0、
- 30

300mM NaCl、0.1% TrionX-100)和20CV洗涤缓冲液3(50 mMTris-HCl、pH8.0、300mM NaCl、0.1%夏普索)。结合的材料用洗涤缓冲液(50mM Tris-HCl, pH8.0, 300mM NaCl, 0.1% CHAPSO)洗脱,咪唑梯度为0-300mM。SDS-PAGE和蛋白质印迹用于可视化纯化的蛋白质

5

病毒立体定位注射

在用异氟醚深度麻醉后,将小鼠(5周大)置于立体定向装置(RWD Instruments)中。零点(x,y,z,0,0,0)是Bregma。慢病毒(lentivirus-GFP、lentivirus-ApoE和lentivirus-ApoE-IRES-GFP)和AAV(AAV2/9-hSyn-EGFP-WPRE-pA和AAV2/9-hSyn-ApoECT;
10 购自上海泰图生物科技有限公司)被注射到皮层(x,y,z,+/-1.6,0,-1)或海马体(x,y,z,+/-1.5,-2,-1.5),每个注射位点注射1ul。然后在手术后将小鼠放回笼子中进行康复。

量化和统计分析

GraphPadPrism软件(v6)使用未配对、配对或一个样本t检验分析数据。A β 40和
15 A β 42水平针对相应的GFP对照进行标准化。将 α -CTF水平标准化为FL-APP和相应的GFP对照。所有数据均以平均值 $\pm$ SEM表示。统计显著性定义为p<0.05。图表中的一颗、二颗、三颗和四颗星(*)分别表示p值<0.05、<0.01、<0.001和<0.0001。

6. 参考文献

- 20 Aoki, K., Uchihara, T., Nakamura, A., Komori, T., Arai, N., and Mizutani, T. (2003). Expression of apolipoprotein E in ballooned neurons-comparative immunohistochemical study on neurodegenerative disorders and infarction. *Acta Neuropathol* 106, 436-440.
- Armstrong, R.A. (2013). What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathol* 51, 169-188.
- 25 Belloy, M.E., Napolioni, V., and Greicius, M.D. (2019). A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron* 101, 820-838.
- Belonwu, S.A., Li, Y., Bunis, D., Rao, A.A., Solsberg, C.W., Tang, A., Fragiadakis, G.K., Dubal, D.B., Oskotsky, T., and Sirota, M. (2022). Sex-Stratified Single-Cell RNA-Seq Analysis Identifies Sex-Specific and Cell Type-Specific Transcriptional Responses in
30 Alzheimer's Disease Across Two Brain Regions. *Molecular neurobiology* 59, 276-293T.
- Brecht, W.J., Harris, F.M., Chang, S., Tesseur, I., Yu, G.Q., Xu, Q., Dee Fish, J., Wyss-

- Coray, T., Buttini, M., Mucke, L., *et al.* (2004). Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 2527-2534.
- 5 Bugiani, O., Giaccone, G., Rossi, G., Mangieri, M., Capobianco, R., Morbin, M., Mazzoleni, G., Cupidi, C., Marcon, G., Giovagnoli, A., *et al.* (2010). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Archives of neurology* 67, 987-995.
- Chen, J., Li, Q., and Wang, J. (2011). Topology of human apolipoprotein E3 uniquely
10 regulates its diverse biological functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14813-14818.
- Chen, Y., Wang, Y., Modrusan, Z., Sheng, M., and Kaminker, J.S. (2014). Regulation of neuronal gene expression and survival by basal NMDA receptor activity: a role for histone deacetylase 4. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for*
15 *Neuroscience* 34, 15327-15339.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- 20 Citron, M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-670.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.
25 *Science* 261, 921-923.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., and Wolfe, M.S. (2012). Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006304.
- De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*
30 *164*, 603-615.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W.,

Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.

Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., and Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research* 13, 952-963.

Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C.L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279, 18146-18156.

Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.

Güner, G., and Lichtenthaler, S.F. (2020). The substrate repertoire of γ -secretase/presenilin. *Seminars in cell & developmental biology* 105, 27-42.

Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., *et al.* (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.

Haass, C., and Selkoe, D.J. (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039-1042.

Han, S.H., Hulette, C., Saunders, A.M., Einstein, G., Pericak-Vance, M., Strittmatter, W.J., Roses, A.D., and Schmechel, D.E. (1994). Apolipoprotein E is present in hippocampal neurons without neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and in age-matched controls. *Experimental neurology* 128, 13-26.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

Hashimoto, T., Serrano-Pozo, A., Hori, Y., Adams, K.W., Takeda, S., Banerji, A.O., Mitani, A., Joyner, D., Thyssen, D.H., Bacskai, B.J., *et al.* (2012). Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid beta peptide. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 15181-15192.

Holtzman, D.M., Bales, K.R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A.M., Chang,

- L.K., Sun, Y., and Paul, S.M. (1999). Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of clinical investigation* 103, R15-r21.
- Huang, Y.A., Zhou, B., Wernig, M., and Sudhof, T.C. (2017). ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and Abeta Secretion. *Cell* 168, 427-441 e421.
- Hung, V., Udeshi, N.D., Lam, S.S., Loh, K.H., Cox, K.J., Pedram, K., Carr, S.A., and Ting, A.Y. (2016). Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature protocols* 11, 456-475.
- Huynh, T.V., Liao, F., Francis, C.M., Robinson, G.O., Serrano, J.R., Jiang, H., Roh, J., Finn, M.B., Sullivan, P.M., Esparza, T.J., *et al.* (2017). Age-Dependent Effects of apoE Reduction Using Antisense Oligonucleotides in a Model of beta-amyloidosis. *Neuron* 96, 1013-1023 e1014.
- Jordà-Siquier, T., Petrel, M., Kouskoff, V., Smailovic, U., Cordelières, F., Frykman, S., Müller, U., Mülle, C., and Barthet, G. (2022). APP accumulates with presynaptic proteins around amyloid plaques: A role for presynaptic mechanisms in Alzheimer's disease? *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*.
- Kanekiyo, T., Xu, H., and Bu, G. (2014). ApoE and Abeta in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron* 81, 740-754.
- Karran, E., and De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of neurochemistry* 139 Suppl 2, 237-252.
- Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Löfgren, A., Vanderhoeven, I., *et al.* (2000). Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma (42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics* 9, 2589-2598.
- Kwok, J.B., Li, Q.X., Hallupp, M., Whyte, S., Ames, D., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Schofield, P.R. (2000). Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42(43) peptide levels and induces apoptosis. *Ann Neurol* 47, 249-253.
- Li, Z., Shue, F., Zhao, N., Shinohara, M., and Bu, G. (2020). APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Molecular*

neurodegeneration 15, 63.

Liu, C.C., Zhao, N., Fu, Y., Wang, N., Linares, C., Tsai, C.W., and Bu, G. (2017). ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron* 96, 1024-1032 e1023.

Liu, P.P., Xie, Y., Meng, X.Y., and Kang, J.S. (2019). History and progress of
5 hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal transduction and targeted therapy* 4, 29.

Lu, P., Bai, X.C., Ma, D., Xie, T., Yan, C., Sun, L., Yang, G., Zhao, Y., Zhou, R., Scheres, S.H.W., *et al.* (2014). Three-dimensional structure of human γ -secretase. *Nature* 512, 166-170.

10 Metzger, R.E., LaDu, M.J., Pan, J.B., Getz, G.S., Frail, D.E., and Falduto, M.T. (1996). Neurons of the human frontal cortex display apolipoprotein E immunoreactivity: implications for Alzheimer's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55, 372-380.

Mucke, L., and Selkoe, D.J. (2012). Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic
15 and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006338.

Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M.D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254, 97-99.

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., *et al.* (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates,
20 neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 10129-10140.

Olsson, A., Höglund, K., Sjögren, M., Andreasen, N., Minthon, L., Lannfelt, L., Buerger, K., Möller, H.-J., Hampel, H., Davidsson, P., *et al.* (2003). Measurement of α - and β -
25 secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Experimental Neurology* 183, 74-80.

Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., and Imbimbo, B.P. (2019). A critical appraisal of amyloid-beta-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology* 15, 73-88.

30 Prince, M. (2015). World Alzheimer report 2015: the global impact of dementia.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013).

Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8, 2281-2308.

Rhinn, H., Fujita, R., Qiang, L., Cheng, R., Lee, J.H., and Abeliovich, A. (2013). Integrative genomics identifies APOE epsilon4 effectors in Alzheimer's disease. *Nature* 500, 45-50.

- 5 Roberson, E.D., and Mucke, L. (2006). 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 314, 781-784.

Roher, A.E., Maarouf, C.L., and Kokjohn, T.A. (2016). Familial Presenilin Mutations and Sporadic Alzheimer's Disease Pathology: Is the Assumption of Biochemical Equivalence Justified? *J Alzheimers Dis* 50, 645-658.

- 10 Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9649-9653.

- 15 Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* 81, 741-766.

Shen, J., and Kelleher, R.J., 3rd (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 403-409.

- 20 Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1977-1981.

- 25 Sun, L., Zhou, R., Yang, G., and Shi, Y. (2017). Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E476-e485.

Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Ataka, S., *et al.* (2008). A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63, 377-387.

- 30 Walker, E.S., Martinez, M., Brunkan, A.L., and Goate, A. (2005). Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in

Abeta 42/40 ratios. *Journal of neurochemistry* 92, 294-301.

Wang, C., Najm, R., Xu, Q., Jeong, D.E., Walker, D., Balestra, M.E., Yoon, S.Y., Yuan, H., Li, G., Miller, Z.A., *et al.* (2018). Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nat Med* 24, 647-657.

Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.

Wu, S.-H., Li, X., Qin, D.-D., Zhang, L.-H., Cheng, T.-L., Chen, Z.-F., Nie, B.-B., Ren, X.-F., Wu, J., Wang, W.-C., *et al.* (2021). Induction of core symptoms of autism spectrum disorder by in vivo CRISPR/Cas9-based gene editing in the brain of adolescent rhesus monkeys. *Science Bulletin* 66, 937-946.

Xia, D., Watanabe, H., Wu, B., Lee, S.H., Li, Y., Tsvetkov, E., Bolshakov, V.Y., Shen, J., and Kelleher, R.J., 3rd (2015). Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron* 85, 967-981.

Xia, Q., Yang, X., Shi, J., Liu, Z., Peng, Y., Wang, W., Li, B., Zhao, Y., Xiao, J., Huang, L., *et al.* (2021). The Protective A673T Mutation of Amyloid Precursor Protein (APP) in Alzheimer's Disease. 58, 4038-4050.

Xia, W. (2019). gamma-Secretase and its modulators: Twenty years and beyond. *Neuroscience letters* 701, 162-169.

Xu, P.-T., Gilbert, J.R., Qiu, H.-L., Ervin, J., Rothrock-Christian, T.R., Hulette, C., and Schmechel, D.E. (1999). Specific Regional Transcription of Apolipoprotein E in Human Brain Neurons. *The American Journal of Pathology* 154, 601-611.

Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 4985-4994.

Yang, G., Zhou, R., Guo, X., Yan, C., Lei, J., and Shi, Y. (2021). Structural basis of γ -secretase inhibition and modulation by small molecule drugs. *Cell* 184, 521-533.e514.

Yang, G., Zhou, R., Zhou, Q., Guo, X., Yan, C., Ke, M., Lei, J., and Shi, Y. (2019). Structural basis of Notch recognition by human γ -secretase. *Nature* 565, 192-197.

Yu, J.T., Tan, L., and Hardy, J. (2014). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci* 37, 79-100.

- Zalocusky, K.A., Najm, R., Taubes, A.L., Hao, Y., Yoon, S.Y., Koutsodendris, N., Nelson, M.R., Rao, A., Bennett, D.A., Bant, J., *et al.* (2021). Neuronal ApoE upregulates MHC-I expression to drive selective neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 24, 786-798.
- 5

权 利 要 求 书

1. 一种分离的ApoE构建物，其包含一个ApoE多肽，所述ApoE多肽：
 - (1) 包含来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个片段，该片段N端第一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第215-221位中的任意一个位置上的氨基酸残基，该片段C端最后一个氨基酸残基为SEQ ID NO:12第274-299位（优选第279-299位）中的任意一个位置上的氨基酸残基；或
 - (2) 其氨基酸序列与（1）所述片段具有至少约70%序列同一性，并保留至少约50%（1）所述片段对 γ 分泌酶酶切活性的抑制。
2. 如权利要求1所述的分离的ApoE构建物，所述ApoE多肽或所述（1）中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含如下任一序列：
 - (i) SEQ ID NO:12第215-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (ii) SEQ ID NO:12第216-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (iii) SEQ ID NO:12第217-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (iv) SEQ ID NO:12第218-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (v) SEQ ID NO:12第219-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (vi) SEQ ID NO:12第220-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (vii) SEQ ID NO:12第221-299位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (viii) SEQ ID NO:12第216-294位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (ix) SEQ ID NO:12第216-289位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (x) SEQ ID NO:12第219-289位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xi) SEQ ID NO:12第219-288位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xii) SEQ ID NO:12第219-287位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xiii) SEQ ID NO:12第219-286位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xiv) SEQ ID NO:12第219-285位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xv) SEQ ID NO:12第219-284位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xvi) SEQ ID NO:12第219-279位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xvii) SEQ ID NO:12第219-274位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xviii) SEQ ID NO:12第220-274位氨基酸残基的氨基酸序列；
 - (xix) SEQ ID NO:12第220-279位氨基酸残基的氨基酸序列；或
 - (xx) SEQ ID NO:12第221-274位氨基酸残基的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE多肽或所述(1)中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含SEQ ID NOs:13、18-34、78和87中任一氨基酸序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE多肽或所述(1)中来自SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的片段包含SEQ ID NOs:31-34、78和87中任一所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE多肽包含相对于SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变: R226、D227、R228、L229、D230、Q235、E238、V239、R240、K242、E244、E245、Q246、A247、Q248、Q249、I250、R251、L252、Q253、A254、E255、Q275、V280、V287、T289、S290、A291、P293、V294、P295、S296、D297、N298、H299、R251+T289、R251+T289+A291、S290+P293+V294+P295+S296+D297+N298+H299、R226+D227+R228+L229+D230、E238+V239+R240+K242、或E244+E245+Q246+A247+Q248+Q249+I250+R251+L252+Q253+A254。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE多肽包含相对于SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的一个或多个氨基酸位点的突变: R226A、D227A、R228A、L229A、D230A、Q235A、E238A、V239A、R240A、K242A、E244del、E245del、Q246del、A247del、Q248del、Q249del、I250del、R251S、L252del、Q253del、A254del、E255A、Q275A、V280A、V287A、T289A、S290A、A291T、P293A、V294A、P295A、S296A、D297A、N298A、H299A、R251A+T289A、R251S+T289A+A291T、S290A+P293A+V294A+P295A+S296A+D297A+N298A+H299A、R226A+D227A+R228A+L229A+D230A、E238A+V239A+R240A+K242A、或E244del+E245del+Q246del+A247del+Q248del+Q249del+I250del+R251del+L252del+Q253del+A254del。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE多肽包含SEQ ID NOs:46-52、57-59、62和76中任一氨基酸序列。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE构建物在ApoE多肽的N端还进一步包含SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸残基的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸至少有约70%同一性的序列。

9. 如权利要求8所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE构建物包含SEQ ID NO:60或61所示的氨基酸序列。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE构建物在所述ApoE多肽的N端或C端还进一步包含一个穿膜肽。
- 5 11. 如权利要求10所述的分离的ApoE构建物, 所述穿膜肽包括SEQ ID NOs:35-45、63-65和84-86中任一氨基酸序列。
12. 如权利要求10或11所述的分离的ApoE构建物, 所述穿膜肽包括SEQ ID NO:63或65所示的氨基酸序列。
13. 如权利要求10-12中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述穿膜肽与所述ApoE多肽、或所述包含SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸残基的氨基酸序列、或所述与SEQ ID NO:12第1-167位或第1-205位或第1-214位氨基酸至少有约70%同一性的序列通过一个接头序列连接。
- 10 14. 如权利要求1-13中任一项所述的分离的ApoE构建物, 所述ApoE构建物在所述ApoE多肽的N端还进一步包含一个信号肽。
- 15 15. 如权利要求14所述的分离的ApoE构建物, 所述信号肽包含选自SEQ ID NOs:66-68中任一氨基酸序列。
16. 一种分离的核酸, 其编码如权利要求1-15中任一项所述的分离的ApoE构建物的蛋白部分。
17. 一种载体, 其包含权利要求16所述的分离的核酸。
- 20 18. 如权利要求17所述的载体, 所述载体在所述分离的核酸的5'端含有神经元特异性启动子。
19. 如权利要求18所述的载体, 所述神经元特异性启动子选自突触蛋白启动子、thy-1启动子和钙调素依赖型蛋白激酶II- α 启动子。
20. 如权利要求17-19中任一项所述的载体, 所述载体为是重组AAV或lentivirus表达载体。
- 25 21. 一种宿主细胞, 其表达权利要求1-15中任一项所述的分离的ApoE构建物、含有权利要求16所述的分离的核酸、或含有权利要求17-20中任一项所述的载体。
22. 如权利要求21所述的宿主细胞, 所述宿主细胞为神经元。
23. 一种药物组合物, 其含有(i) 权利要求1-15中任一项所述的分离的ApoE构建物、含有权利要求16所述的分离的核酸、含有权利要求17-20中任一项所述的载体、或含有权利要求21或22所述的宿主细胞, 和(ii)药学上可接受的载体。
- 30

24. 权利要求1-15中任一项所述的分离的ApoE构建物、权利要求16所述的分离的核酸、权利要求17-20中任一项所述的载体、权利要求21或22所述的宿主细胞、或权利要求23所述的药物组合物在制备用于治疗或预防一个个体中与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病的药物中的应用。

- 5 25. 一种治疗或预防一个个体中与 γ 分泌酶的酶切活性相关疾病的方法，包括向所述个体施用有效剂量的权利要求1-15中任一项所述的分离的ApoE构建物、权利要求16所述的分离的核酸、权利要求17-20中任一项所述的载体、权利要求21或22所述的宿主细胞、或权利要求23所述的药物组合物。

26. 如权利要求24所述的应用或25所述的方法，所述药物或方法抑制 γ 分泌酶的酶切活性，从而治疗或预防所述与 γ 分泌酶的酶切活性相关的疾病。
- 10

27. 如权利要求24-26中任一项所述的应用或方法，所述疾病选自如下的组：神经系统退行性疾病，癌症，炎性疾病和肾脏疾病。

28. 如权利要求24-27中任一项所述的应用或方法，

- (i) 所述神经系统退行性疾病选自如下的组：阿尔茨海默病及其相关疾病、淀粉样脑血管病、唐氏综合症、和与衰老相关的其他神经退行性疾病（如额颞叶痴呆）；
- 15

(ii) 所述癌症选自如下的组：头颈癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、胶质瘤、纤维瘤、淋巴瘤、骨肉瘤、胃癌、和膀胱癌；

(iii) 所述炎性疾病选自如下的组：哮喘、肺炎、和气道炎症；和/或

- (iv) 所述肾脏疾病选自如下的组：急性肾损伤、透明细胞肾细胞癌、肾纤维化、和梗阻性肾病。
- 20

29. 如权利要求24-28中任一项所述的应用或方法，所述个体是人。