



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111132694 B

(45) 授权公告日 2024.12.03

(21) 申请号 201880045403.4

A61K 38/16 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.09

A61K 38/17 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 38/21 (2006.01)

申请公布号 CN 111132694 A

C07K 14/555 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.05.08

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

62/506,782 2017.05.16 US

WO 2015168800 A1,2015.11.12

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Wei-Lun Hsu.STAT1 Negatively

2020.01.07

Regulates Spatial Memory Formation and Mediates the Memory-Impairing Effect of Ab.《Neuropsychopharmacology》.2013,第39卷(第3期),摘要、介绍、结果、讨论部分和图2.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/031901 2018.05.09

Wei-Lun Hsu.STAT1 Negatively

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/213081 EN 2018.11.22

Regulates Spatial Memory Formation and Mediates the Memory-Impairing Effect of Ab.《Neuropsychopharmacology》.2013,第39卷(第3期),摘要、介绍、结果、讨论部分和图2.

(73) 专利权人 健艾仕生物医药有限公司

地址 上海市浦东新区张江蔡伦路781号706室

Richard Lathe.Atherosclerosis and Alzheimer - diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature.《BMC Geriatrics》.2014,第14卷(第36期),第17-18页.

(72) 发明人 傅新元

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 薛琦

审查员 姜紫耀

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

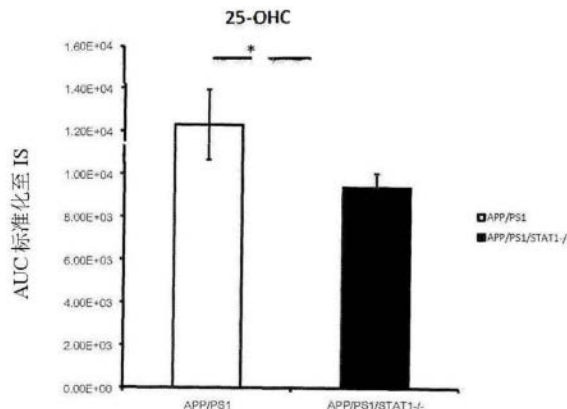
序列表1页 附图30页

(54) 发明名称

治疗阿尔茨海默病的组合物和方法

(57) 摘要

本发明公开了通过靶向AD发病机理中的STAT1-CH25H新通路来治疗或预防或延迟受试者阿尔茨海默病(AD)发作的方法,特别是通过向受试者施用药理学有效量的STAT1抑制剂、CH25H抑制剂或25-OHC抑制剂,例如3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,如辛伐他汀。



1. 一种包含药学有效量的CH25H抑制剂的组合物在制备治疗受试者阿尔茨海默病-药物中的应用,其中所述CH25H抑制剂为靶向CH25H的CRISPR-CAS9系统,其中,  
所述CRISPR-CAS9系统包含靶向CH25H的sgRNA,  
所述sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示。
2. 一种包含药学有效量的CH25H抑制剂的组合物在制备预防或延迟受试者阿尔茨海默病-发作的药物中的应用,其中所述CH25H抑制剂为靶向CH25H的CRISPR-CAS9系统,其中,  
所述CRISPR-CAS9系统包含靶向CH25H的sgRNA,  
所述sgRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2所示。

## 治疗阿尔茨海默病的组合物和方法

### 发明领域

[0001] 本发明总体上涉及药剂及其在疾病治疗中的用途领域,特别是靶向并抑制信号转导与转录激活因子1 (STAT1),如胆固醇25-羟化酶 (CH25H) 和25-羟基化胆固醇 (25-OHC) 的药剂;以及所述药剂在管理生理状况中的用途,尤其是通过减少淀粉样 $\beta$ 沉积物来治疗和/或预防各种疾病,包括中枢神经系统疾病、神经退行性疾病(例如阿尔茨海默病)和其他疾病。

### 背景技术

[0002] 随着人口寿命的增加,阿尔茨海默病 (AD) 成为全球范围内普遍存在的健康问题。AD患者的记忆力、方向感、判断力和推理能力都遭受了认知下降 (Tanzi和Bertram 2005)。通常,疾病发展到导致死亡的最后阶段大约需要10年。到目前为止,尚无治愈或预防性治疗方案。

[0003] 淀粉样前体蛋白(以下称为APP)的代谢产物 $A\beta$ 蛋白的沉积及其在脑中的毒性被认为是AD发展的主要诱因 (Selkoe 2001)。 $A\beta$ 是在AD患者的老年斑中鉴定出的蛋白质组分 (Ikeda,Wong等,1987;Cole,Masliah等,1991)。从生物学上讲, $A\beta$ 是通过连续切割淀粉样蛋白- $\beta$ 前体蛋白 (APP)产生的,这种切割形成了不同大小的片段。药物研究已经确定 $A\beta_{42}$ 是促成AD发展的最具致病性的形式 (Roher,Chaney等,1996;Morelli,Prat等,1999)。 $A\beta_{42}$ 的产生是APP的 $\beta$ -和随后的 $\gamma$ -切割的结果 (Citron 2010,De Strooper,Vassar等人2010)。该不溶性 $A\beta_{42}$ 片段在细胞外空间聚集形成斑块。几项证据表明, $A\beta_{42}$ 的可溶性低聚物毒性更大。 $A\beta_{42}$ 的存在对突触活性有影响。 $A\beta_{42}$ 的积累可潜在地引起异常的神经网络活动和突触抑制 (Palop和Mucke 2009)。

[0004] 转基因小鼠模型中的临床前研究表明,免疫疗法在预防AD和朊病毒疾病方面具有巨大的功效 (Wisniewski 2012)。在 $A\beta$ 是AD核心分子的基础上,已经开发了一些通过小分子或免疫疗法消除 $A\beta$ 的策略 (Tabira 2011,Huang和Mucke 2012,Ozudogru和Lippa 2012,Delrieu,Ousset等人2014)。尽管 $A\beta$ 定向免疫在AD的小鼠模型中展现了很好的结果,但是向人类的有效治疗的转化仍然具有挑战性。

[0005] 在主动疫苗接种试验中,已经接受主动免疫的个体相对于未免疫对照显示出斑块负荷显著降低以及 $A\beta$ 显著降低。无论结果如何令人鼓舞,治疗组在长期存活率、发展为严重痴呆的时间和认知功能方面均未见改善 (Holmes,Boche等人,2008年)。最近有两项针对 $A\beta$ 的被动免疫大型III期试验也没有获得临床益处的证据 (Doody,Thomas等,2014,Salloway,Sperling等,2014)。因此,业界期望找到全新的AD治疗或预防疗法。

### [0006] 发明简介

[0007] 一方面,本发明是通过向受试者施用药学有效量的STAT1抑制剂来治疗受试者的阿尔茨海默病 (AD) 的方法。在一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对IFN或IFN受体的抗体。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对IL-6或IL6受体的抗体。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是抑制JAK1和JAK3的制剂。在又一个实施方案中,所述STAT1抑制剂

是减少STAT1磷酸化的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是防止STAT1易位进入细胞核的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对STAT1的RNAi剂。

[0008] 另一方面,本发明是通过向受试者施用药学有效量的CH25H抑制剂来治疗受试者的阿尔茨海默病(AD)的方法。在一些实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂。在另一个实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,其是针对IFN或IFN受体的抗体。在另一个实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,其是针对IL-6或IL6受体的抗体。在另一个实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,其是抑制JAK1和JAK3的制剂。在另一个实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,其是减少STAT1磷酸化的制剂。在另一个实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,其是防止STAT1易位进入细胞核的制剂。在又一个实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,其是针对STAT1的RNAi剂。

[0009] 另一方面,本发明是通过向受试者施用药学有效量的25-OHC抑制剂来治疗受试者的阿尔茨海默病(AD)的方法。在一个实施方案中,所述25-OHC抑制剂是CH25H抑制剂或STAT1抑制剂。在另一个实施方案中,所述25-OHC抑制剂是25-OHC的类似物。在另一个实施方案中,所述25-OHC抑制剂是3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,例如辛伐他汀。

[0010] 在另一方面,本发明是通过向受试者施用药学有效量的STAT1抑制剂来预防或延迟受试者的阿尔茨海默病(AD)发作的方法。在一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对IFN或IFN受体的抗体。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对IL-6或IL-6受体的抗体。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是抑制JAK1和JAK3的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是减少STAT1磷酸化的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是防止STAT1易位进入细胞核的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对STAT1的RNAi剂。

[0011] 在另一方面,本发明是通过向受试者施用药学有效量的CH25H抑制剂来预防或延迟受试者中阿尔茨海默病(AD)的发作的方法。在一些实施方案中,所述CH25H抑制剂是STAT1抑制剂。在一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对IFN或IFN受体的抗体。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对IL-6或IL-6受体的抗体。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是抑制JAK1和JAK3的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是减少STAT1磷酸化的制剂。在另一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是防止STAT1易位进入细胞核的制剂。在又一个实施方案中,所述STAT1抑制剂是针对STAT1的RNAi剂。

[0012] 在另一方面,本发明是通过向受试者施用药学有效量的25-OHC抑制剂来预防或延迟受试者的阿尔茨海默病(AD)发作的方法。在一些实施方案中,所述25-OHC抑制剂是CH25H抑制剂或STAT1抑制剂。在其他实施方案中,所述25-OHC抑制剂是25-OHC的类似物。在其他实施方案中,所述25-OHC抑制剂是3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,例如辛伐他汀。

[0013] 在又一个实施方案中,本发明是一种通过提供基因组编辑工具;向神经细胞提供所述基因组编辑工具;并通过删除整个STAT1基因、STAT1基因的磷酸化位点、STAT1基因的启动子区域或STAT1基因的SH2结构域来编辑STAT1基因以治疗受试者的阿尔茨海默病(AD)的方法。在一些实施方案中,所述基因组编辑工具是CRISPR-CAS9系统。

[0014] 在另一方面,本发明是一种通过提供基因组编辑工具;向神经细胞提供所述基因

组编辑工具；然后通过删除整个CH25H基因、CH25H基因的组氨酸簇区域或CH25H基因的启动子区域来编辑CH25H基因以治疗受试者的阿尔茨海默病(AD)的方法。在一些实施方案中,所述基因组编辑工具是CRISPR-CAS9系统。

[0015] 在另一方面,本发明是一种通过提供基因组编辑工具；向神经细胞提供所述基因组编辑工具；然后通过删除整个STAT1基因、STAT1基因的磷酸化位点、STAT1基因的启动子区域或STAT1基因的SH2结构域来编辑STAT1基因以预防或延迟受试者的阿尔茨海默病(AD)发作的方法。在一些实施方案中,所述基因组编辑工具是CRISPR-CAS9系统。

[0016] 在另一方面,本发明是一种通过提供基因组编辑工具；向神经细胞提供所述基因组编辑工具；然后通过删除整个CH25H基因、CH25H基因的组氨酸簇区域或CH25H基因的启动子区域来编辑CH25H基因以预防或延迟受试者的阿尔茨海默病(AD)发作的方法。在一些实施方案中,所述基因组编辑工具是CRISPR-CAS9系统。

## 附图说明

[0017] 专利或申请文件包含至少一张彩色附图。专利局将根据要求提供必要的费用,并提供带有彩色附图的本专利或专利申请公开文本的副本。

[0018] 图1A和1B显示了在阿尔茨海默病患者中检测到磷酸化STAT1水平升高。图1A示出了四个图像,其显示了来自三个AD患者(病例-1,病例-2和病例-3)和一个健康人(对照)的脑组织中磷酸化STAT1(pSTAT1)的染色。图1B显示了放大的图像以说明pSTAT1染色的形态,该形态表明pSTAT1在细胞核内积累。见矩形框内的染色斑点。

[0019] 图2A-2E显示了STAT1基因缺陷减弱了脑内淀粉样 $\beta$ 沉积。图2A显示了在AD的小鼠模型(APP/PS 1小鼠)和具有STAT1缺陷的AD小鼠(APP/PS/STAT1 $^{-/-}$ )中淀粉样蛋白 $\beta$ (A $\beta$ )的染色图像。脑切片分别从3个月大的APP/PS1和APP/PS1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠获得。图像以更高的放大倍数显示了整个大脑切片以及海马区的A $\beta$ 染色。图2B显示了分别从3个月大的APP/PS1和APP/PS 1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠获得的5个连续切片中的A $\beta$ 斑块数。图2C显示了5个连续切片中的A $\beta$ 斑块面积,所述5个连续切片分别从3个月大的APP/PS 1和APP/PS1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠获得。图2D显示了分别从3个月大的野生型、APP/PS 1和APP/PS1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠获得的脑组织的TBS提取物中的A $\beta$ 42的Elisa测量值。图2E示出了分别从3个月大的野生型、APP/PS1和APP/PS 1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠获得的脑组织的甲酸提取物中的A $\beta$ 42的Elisa测量值。\*表示P值小于0.05。

[0020] 图3A和3B显示了将CH25H鉴定为STAT1下游靶标。具体地,图3A显示了热力图,其展示了倍数变化 $>1.5$ 且p值 $<0.05$ 的差异表达基因的基因本体分析,每种基因型使用两个生物学重复。图3B显示了一个饼图,展示了通过David功能注释聚集对差异表达基因进行的途径分析。

[0021] 图4A和4B分别显示了在STAT1缺陷型小鼠中CH25H减弱。具体地,图4A显示了APP/PS 1和APP/PS1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠的脑中CH25H mRNA水平的实时定量PCR结果。数据代表3个独立实验。图4B展示了3对APP/PS1和APP/PS 1/STAT1 $^{-/-}$ 小鼠脑匀浆中CH25H、STAT1和 $\alpha$ -微管蛋白的蛋白质印迹结果。

[0022] 图5A和5B显示了STAT1物理结合CH25H启动子。具体地,图5A显示了CH25H基因及其启动子的示意图。图5B显示了染色质组蛋白免疫沉淀(ChIP)实验结果,其中通过STAT1抗体

的沉降,包含CH25H启动子的DNA片段产生了富集。与野生型(WT)小鼠相比,这样的富集在STAT1 KO(STAT1-/-)小鼠的样品中减少了。

[0023] 图6A和6B显示了STAT1缺乏导致脑中25-OHC降低。具体地,图6A显示APP/PS 1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠中总的脑胆固醇水平的测量结果,其中每组n=3。图6B显示在用于图6A中的胆固醇测量的相同小鼠中测量25-OHC水平的结果。

[0024] 图7显示了全长APP蛋白在STAT1-/-小鼠的外泌体级分中减少。将来自APP/PS 1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠的脑组织匀浆,然后将核后级分进行5%-45%的蔗糖梯度离心。收集十个级分,并用Triton-100溶解。将这些级分用于蛋白质印迹,并用于APP和外来体标记物Flotillin1的印迹。

[0025] 图8A-8C显示了25-OHC的处理减少了外体APP同时增加了细胞内APP。APP过表达的SH-SY5Y细胞经不同剂量的25-OHC处理。图8A展示了用APP进行Western印迹的结果,APP来自通过收集纯化后的外泌体并将其裂解得到的样品。图8B展示了APP的Western印迹结果,APP来自通过收集细胞裂解液以评估细胞内APP水平而制备的样品。图8C显示了描述对照和25-OHC处理的细胞中表面APP的FACS分析结果。

[0026] 图9显示了用25-OHC处理后外泌体中A $\beta$ 42增加。用不同浓度的25-OHC处理的细胞培养基中收集的外泌体中A $\beta$ 42的ELISA测量。数据代表三次独立的实验。\*p<0.05。

[0027] 图10A-10C展示了用25-OHC处理后的细胞内APP滞留时间的增加。图10A显示了通过FITC-偶联抗体标记的表面APP追踪APP分子运输。将细胞在不同的时间点进行固定,以检查特定时间APP的分布。图10B所示的延时摄影视频的快照图像,该图像显示了对照细胞中APP的延时易位。图10C所示的延时摄影视频的快照图像,显示了在25-OHC处理的细胞中的APP易位。

[0028] 图11A、11B和11C展示在APP/PS1小鼠中注射25-OHC促进了A $\beta$ 沉积。图11A显示了针对淀粉样蛋白 $\beta$ 的脑组织切片。每隔一天给2个月大的小鼠注射25-OHC或作为对照的盐水,持续1个月。将这些小鼠的大脑切成薄片,并进行 $\beta$ 淀粉样蛋白染色。数据代表3对注射盐水或25-OHC的小鼠。图11B和11C分别为从盐水对照和25-OHC小鼠获得的全脑(图11B)和海马体(图11C)的5个连续部分中的A $\beta$ 斑块数。

[0029] 图12A至图12E显示了CH25H KO小鼠的世代的图表和图像。图12A是CH25H基因和两个靶向sgRNA的示意图。图12B显示了两个靶向sgRNA的DNA序列。图12C展示了测序结果,其显示了在CH25H敲除型小鼠中CH25H基因的缺失。图12D分别展示了WT(534bp)和KO(488bp)带的基因分型结果。图12E分别展示了在WT和CH25H KO小鼠中CH25H RNA水平的实时PCR结果。

[0030] 图13A和13B展示了在CH25H KO小鼠中A $\beta$ 斑块沉积减少。图13A显示了在AD的小鼠模型(APP/PS1小鼠)和CH25H缺乏的AD小鼠(APP/PS/CH25H-/-)中淀粉样蛋白 $\beta$ 染色。脑切片分别从3个月大的APP/PS1和APP/PS1/CH25H-/-小鼠获得。图像显示了在较高的放大倍数下的整个脑部以及海马区的淀粉样蛋白 $\beta$ 染色。图13B和13C显示了分别从3个月大的小鼠的APP/PS1和APP/PS 1/CH25H-/-获得的全脑(图13B)和海马体(图13C)的5个连续部分中的A $\beta$ 斑块数。

[0031] 图14显示了CH25H基因的缺陷改善了APP/PS1小鼠的学习和记忆。对APP/PS 1(n=11)小鼠和APP/PS/CH25H-/(n=8)小鼠进行水迷宫训练。在5天的训练期间记录其找到隐

藏平台的平均时间。x轴是天数,y轴是小鼠在水迷宫中寻找平台所花费的时间。

[0032] 图15显示了在用25-OHC以及不同剂量的泼尼松龙三甲基乙酸酯或辛伐他汀处理的细胞中APP的蛋白质印迹结果。辛伐他汀可作为有效的25-OHC抑制剂。SH-SY5Y细胞用25-OHC以及不同剂量的泼尼松龙三乙酸甲酯或辛伐他汀处理。24小时后将细胞溶解并对APP进行印迹。

[0033] 图16A、16B、16C和16D展示了A $\beta$ 沉积的差异不是由于APP表达水平或裂解APP的分泌酶的差异所致。图16A展示了APP/PS1和APP/PS 1/STAT1-/-小鼠的大脑中APP mRNA水平的实时PCR定量结果。图16B、16C和16D所示三幅图分别展示了Adam 10(图16B)、BACE1(图16C)和Nicastrin(图16D)即APP的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 分泌酶的实时PCR定量结果。数据代表3个独立实验。

[0034] 图17A和17B表明WT和STAT1缺陷型小鼠之间的小胶质细胞的吞噬能力是相似的。图17A显示了将来自WT或STAT1缺陷型小鼠的小胶质细胞与荧光微珠一起孵育。孵育5分钟后将细胞固定,并对内在的微珠成像。WT和KO培养基分别是来自WT或KO小胶质细胞的培养基。图17B显示了内化微珠的定量结果。图17C展示了WT和STAT1缺陷型小鼠中SV2A的实时PCR测量。图17D展示了WT和STAT1缺陷型小鼠中CCR2的实时PCR测量。

[0035] 图18A、18B、18C和18D所示四幅图展示在APP/PS1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠各自的脑组织中CH25H(图18A)和其他已知的胆固醇羟化酶Cyp46a1(图18B)、Cyp7b1(图18C)和Cyp7a1(图18D)的实时定量PCR结果。结果显示,其他胆固醇羟化酶Cyp46a1、Cyp7b1和Cyp7a1不受STAT1缺陷的影响。

[0036] 图19A-19F显示了STAT1的缺乏不影响一般脂质代谢。图19A为3个月大时APP/PS1和APP/PS 1/STAT1-/-小鼠的体重图,每组分别为n=5。图19B分别显示了APP/PS1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠肝脏切片的油红-O染色图像。图像代表3对小鼠。图19C、19D、19E和19F所示四幅图分别展示了APP/PS 1和APP/PS 1/STAT1-/-小鼠中LPL、ABCA1、APOE和HMGR的实时定量PCR结果。

[0037] 图20A、20B、20C、20D、20E、20F和20G展示了测量氯化钾处理后即刻早期基因的诱导,经50nM的KCl处理30min后,WT或STAT1 KO小鼠的原代神经元培养物中c-fos(图20A)、zif268(图20B)、BDNF-IV(图20C)、BDNF-IX(图20D)、Gadd45b(图20E)、Npas4(图20F)和CH25H(图20G)的实时定量PCR结果。结果表明,STAT1缺乏症没有改变基础神经活动。

[0038] 发明详述

[0039] 本公开内容部分基于STAT1调节的CH25H表达影响阿尔茨海默病(AD)发病机理的新的令人意外的发现。发明人发现CH25H是STAT1的下游靶标,并且STAT1及其靶标CH25H在AD发展过程中促进了A $\beta$ 沉积。在AD患者中检测到的较高量的磷酸化STAT1(pSTAT1)是AD发展的原因,因为STAT1的基因缺失延迟了脑中的A $\beta$ 沉积。CH25H是一种将胆固醇转换为25-OHC的酶。25-OHC的独特功能之一是它可以穿过血脑屏障(BBB),这对药物开发非常有益,因为目前正在临床试验中的许多药物都存在BBB渗透性问题。发明人证明了CH25H或25-OHC对AD发病机理的影响。CH25H敲除小鼠中有与STAT1敲除型小鼠相当的A $\beta$ 沉积降低。相反,施用25-OHC会促进脑内A $\beta$ 沉积。

[0040] 本文描述了用于治疗或预防至少部分与STAT1-CH25H轴相关的疾病或医学症状的方法和手段,其产生25-OHC作为调节A $\beta$ 沉积的效应子。在此类疾病或医学症状中,STAT1-

CH25H的活性增强,从而导致A $\beta$ 沉积增加。STAT1-CH25H活性的增强可能是由于但不限于:1) STAT1磷酸化增加;2) STAT1或CH25H的表达增加;3) 作为CH25H底物的胆固醇的量的增加。本文中用于治疗 and 预防的拮抗剂可以是化学品、小分子、药物、非编码RNA、反义核苷酸、肽、蛋白质或抗体或其部分。在特定的实施方案中,拮抗剂以治疗有效量施用。

[0041] 本发明提供了用于治疗与受试者脑细胞中的A $\beta$ 沉积有关的疾病或医学症状的方法。在一个实施方案中,疾病或医学症状归因于A $\beta$ 的异常产生、运输或清除。在另一个实施方案中,所述疾病或医学症状是由于以下因素引起的STAT1-CH25H通路的活性增加,所述因素例如但不限于:IFN $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6家族细胞因子,或急性或慢性症状。在进一步的实施方案中,所述疾病或医学症状是由于受试者中高胆固醇含量引起的25-OHC含量增加。

[0042] 发明人发现,STAT1信号转导的阻断、STAT1表达的废除或CH25H的消耗,减弱伴有A $\beta$ 斑块减少的AD的发病机理。25-OHC的化学类似物也可减少培养细胞中的APP。本文中的治疗方法包括施用调节STAT1或CH25H信号传导、表达或活性的制剂,例如阻断25-OHC活性或促使25-OHC降解的制剂。特别地,本发明提供了治疗阿尔茨海默病的方法和手段。

[0043] 因此,一方面,本发明涉及通过抑制STAT1、其下游靶标CH25H或25-羟基化胆固醇(25-OHC),在受试者的脑中治疗诸如AD之类的疾病的方法。

[0044] 因此,一方面,本发明涉及通过抑制STAT1、其下游靶标CH25H或25-羟基化胆固醇(25-OHC),来预防或延迟受试者脑中诸如AD的疾病的发作的方法。

[0045] 在另一方面,本发明涉及通过抑制STAT1、其下游靶标CH25H或25-羟基化胆固醇(25-OHC),来减少受试者脑中淀粉样 $\beta$ (A $\beta$ )沉积的方法。

[0046] 在另一方面,本发明涉及通过抑制STAT1、其下游靶标CH25H或25-羟基化胆固醇(25-OHC),来预防或延迟受试者的脑内淀粉样 $\beta$ (A $\beta$ )沉积的积累的方法。

[0047] 在一个实施方案中,在上述方法中对STAT1的抑制是通过向受试者施用药学有效量的STAT1抑制剂。

[0048] 如本文所用,术语“受试者”是指动物,优选哺乳动物,最优选人。在某些情况下,可以根据某些生物标志物的存在与否将受试者分为不同的亚组。在其他情况下,可以基于某些生物标志物的量低于还是高于阈值将受试者分为不同的亚组。在任一种情况下,亚组可以被包括在本发明中的治疗之内或排除在治疗之外。

[0049] 在一些实施方案中,STAT1抑制剂是包含药理学有效量的活性剂(例如化合物、肽、抗体或其片段或核酸)和药理学上可接受的赋形剂的组合物。

[0050] “赋形剂”、“载体”、“药理学上可接受的赋形剂”、“药理学上可接受的载体”或类似术语是指一种或多种在与本发明组合物或配方的其他成分相容的意义上可接受的成分或组分,并且对被施用STAT1抑制剂组合物或制剂的患者、动物、组织或细胞没有过度有害。

[0051] 关于STAT1抑制剂的术语“药理学有效量”、“有效剂量”等是指足以引起期望的应答,例如减少在其所施用的受试者(例如人类)中A $\beta$ 沉积;或对AD的分子或细胞参数或临床状况或症状进行可检测的调节或改善的STAT1抑制剂的量。有效量,例如用于人类的治疗用途,可以是一日内施用的单剂量或两个或多个亚剂量的STAT1抑制剂,也可以在一段时间内例如超过1、2、3、4或大约7天到一年内,以多次剂量的形式给药。

[0052] 根据本文提供的详细公开内容,治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。例如,治疗有效量或剂量可以首先从体外和细胞培养测定中估计。再例如,可以在

动物模型中配制有效剂量以达到所需的浓度或效价。此类信息可用于更准确地确定对人体的有效剂量。

[0053] 本文所述活性成分的毒性可通过体外、细胞培养或实验动物中的标准药理学方法来确定。从这些体外和细胞培养测定法以及动物研究中获得的数据可用于制定一系列用于人的剂量。所述剂量可以根据所采用的剂型和所采用的给药途径而变化。具体的制剂、给药途径和剂量可以由个别医师根据患者的状况来选择。

[0054] 剂量和间隔可以分别调节至足以诱导或抑制生物学作用的活性成分的血浆水平(最小有效浓度, MEC)。每种制剂的MEC会有所不同, 但可以根据体外数据进行估算。达到MEC所需的剂量将取决于个体特征和给药途径。检测测定可用于确定血浆给药浓度。给药的方式取决于要治疗的病症的严重性和反应性, 可以单次或多次给药, 治疗过程可以持续数天至数周或者直至治愈或减轻疾病状态为止。当然, 要给予的组合物的量将取决于例如所治疗的受试者、患病的严重程度、给药方式以及开药医师的判断。

[0055] 例如, 在一些实施方案中, STAT1抑制剂的药理学有效量在人中可以低至约0.02mg/kg/天至约0.03mg/kg/天, 并且高至约2mg/kg/天至约3mg/kg/天。甚至在一些实施方案中, 随着A $\beta$ 沉积变得更严重, 有效量可以高于3mg/kg/天。在其他实施方案中, 使用STAT1抑制剂治疗时的有效量可以比使用STAT1抑制剂预防或延迟A $\beta$ 沉积发作时的有效量更高。

[0056] 在一些实施方案中, 剂量和给药方案还可取决于待治疗的人类受试者的性别。在某些情况下, 某些女性患者可能更容易受到STAT1治疗的影响, 因此剂量可能比男性患者更小, 给药计划的频率可能更低。在其他情况下, 某些女性患者可能对STAT1治疗更敏感, 因此, 剂量可能较小, 并且给药安排的频率可能比男性患者低。

[0057] 在一些实施方案中, 施用可优选在可以检测到A $\beta$ 沉积之前很早开始。在其他实施方案中, 施用可以在检测到A $\beta$ 沉积之后、看到AD的任何临床症状之前开始。在其他实施方案中, 可以在可见AD的临床症状后开始给药。在某些情况下, 可以单剂量给药。施用可以是多次剂量, 例如在其他情况下为2、3、4、5或6次剂量。可以按照医生认为必要的次数连续进行多次给药。

[0058] 在其他实施方案中, 给药方案和剂量可以关联。例如, 可以在看到AD的临床症状之前很早开始的第一次给药期间, 每次给药的剂量可以小于可以看到AD的临床症状之后第一次给药的剂量。又例如, 当频繁给药时, 例如每12小时一次, 每次给药的剂量可以小于不那么频繁给药时的剂量, 如每24小时一次。

[0059] 在本文公开的治疗方法或其他方法中使用STAT1抑制剂时, 诸如“使用”、“治疗”、“治疗”、“处理”等之类的术语是指将STAT1抑制剂, 如本文所述或本文引用的参考文献所述施用于受施用者, 在体内或体外给药至受试者的组织或与组织、细胞或无细胞系统接触。通常, 这样的使用或治疗导致例如(1) 被治疗的病症或症状得到可检测的改善或缓解; (2) 相关生物分子、治疗性细胞群体或病理性细胞的活性、水平或数量得到可检测的调节; (3) 减缓疾病的进展或延迟其发作, 或减轻疾病症状的严重程度; 或(4) 本文所述的另一种可检测的反应。任何这样的改善可能是短暂的, 例如持续至少数一段时间, 例如约1至24小时, 或数天, 例如约1、2、3、4、5、6或7天; 或者改善可以延长例如, 持续约8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、24、26、28、35、42、49、56至60天或更长时间, 或永久性改善。治疗可减慢疾病或症状的进展或降低疾病或症状严重性, 例如, 至少某些受试者的疾病或症状的

发作与未接受足够量的STAT1抑制剂治疗的受试者相比,可延迟约1-24小时、约2-10天,为2-30天或大约1-5年。因此,与合适的对照相比,如未经处理的情形,使用STAT1抑制剂或进行治疗通常会导致相关免疫参数发生可检测的调节,例如靶效应子或抑制因子细胞群、白介素、细胞因子、趋化因子、免疫球蛋白的水平、活性或相对量的调节。STAT1抑制剂治疗还可引起相关转录因子或酶的水平或活性、细胞生物学活性或水平、疾病病原体活性的调节。STAT1抑制剂的治疗可用于延迟或预防疾病、症状或并发症的发作,或改善或减慢先前存在的疾病、病症、症状或并发症的进程,或有助于消除疾病、病症、症状或并发症,例如AD中A $\beta$ 的沉积。

[0060] “减轻”、“改进”、“改善”等是指在受试者或至少少数受试者中发生可检测的改善或与改善一致的可检测变化,例如至少约2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、100%或介于这些值中的任何两个之间。与未用STAT1抑制剂治疗的受试者相比,在治疗的受试者中可观察到这种改善或改变,其中未治疗的受试者患有或正在发展相同或相似的疾病、病症、症状等。疾病、病症、症状或测定参数的改善可以被主观或客观地确定,例如,受试者的自我评估、通过临床医生的评估或通过进行适当的测定或测量,包括例如生活质量评估、疾病或病症的发展放缓、疾病或病症的严重程度降低、生物分子或细胞的水平或活性的适当测定(一个或多个),或检测受试者内的细胞迁移。改善可以是短暂的、延长的或永久的,也可能是在STAT1抑制剂施用于受试者期间或其后的一段可变的相对时间内,或在本文所述或引用的参考文献中的测定或其他方法中或使用后,例如,在在受试者接受STAT1抑制剂后的1小时内,或其后约3、6、9个月或更长时间。

[0061] “调节”,例如在症状、分子的水平或生物学活性、细胞应答、细胞活性等中,是指细胞、水平或活性等可检测地增加或减少。与未用STAT1抑制剂治疗的受试者相比,在未治疗的受试者患有或正经历相同或相似的疾病、病症、症状等,在治疗的受试者中可以观察到这种增加或减少。这样的增加或减少可以是至少约2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%在这些值中的任何两个之间的任何范围内,约90%、95%、98%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、1000%或更大。调节可以主观或客观地确定,例如通过受试者的自我评估,通过临床医生的评估或通过进行适当的测定或测量,包括例如生活质量评估或针对分子、细胞或受试者体内的迁移的水平或活性的适当测定。调节可以是瞬时的、延长的或永久的,或者可以在将STAT1抑制剂施用于受试者期间或之后一段可变的相对时间内,或用于本文所述或引用的参考文献中所述的测定法或其他方法中,例如在施用的约1小时内,或者在受试者接受STAT1抑制剂后约3、6、9个月或更长时间给予或使用STAT1抑制剂。

[0062] 在本公开内容的各个位置,例如,在任何公开的实施例或权利要求中,涉及形容“包括”一个或多个特定组分、要素或步骤的化合物、组合物、制剂或方法。本发明的实施方案还具体包括那些化合物、组合物、制剂或方法,这些化合物、组合物、制剂或方法由那些规定的组分、要素或步骤组成或基本上由那些规定的组分、要素或步骤组成。根据美国专利法,术语“包括”、“由...组成”和“基本上由...组成”具有其通常接受的含义。例如,公开的“包含”组分或步骤的组合物或方法是开放的,并且它们包括或解读为的那些组合物或方法以及另外的一种或多种组分或步骤。类似地,“由组分或放步骤组成”的所公开的组合物或

方法是封闭的,它们将不包括或解读为具有可观量的附加组分或附加步骤的那些组合物或方法。

[0063] 在一些情况下,STAT1抑制剂可以是抗干扰素的抗体,因为干扰素是激活STAT1所必需的,而干扰素的抑制将阻止或减少STAT1的激活。干扰素抗体的一个例子是Fontolizumab(计划商业名称为HuZAF),这是一种针对干扰素 $\gamma$ 的人源化单克隆抗体。因为产生和测定抗体活性的方法是本领域公知的,所以本领域技术人员可以制备类似的抗干扰素抗体,并筛选其对干扰素的抑制作用。

[0064] 在一些情况下,STAT1抑制剂可以是针对干扰素受体的抗体,因为干扰素受体对于激活STAT1是必需的,并且干扰素受体的抑制将阻止或减少STAT1的激活。干扰素受体抗体的一个例子是Anifrolumab,一种靶向I型干扰素(IFN)受体的人单克隆抗体。由于制备和测定抗体活性是本领域众所周知的,所以本领域技术人员可以制备类似的针对干扰素受体的抗体,并筛选其对干扰素受体的抑制作用。

[0065] 在某些情况下,STAT1抑制剂可能是抗IL6的抗体,因为IL6是激活STAT1所必需的,而干扰素的抑制将阻止或减少STAT1的激活。IL-6抗体的一个例子是Siltuximab,它是一种针对IL-6的嵌合单克隆抗体(由人和小鼠蛋白质制成)。因为产生和测定抗体活性的方法是本领域公知的,所以本领域技术人员可以制备类似的针对IL-6的抗体,并筛选其对IL-6的抑制作用。

[0066] 在某些情况下,STAT1抑制剂可能是针对IL-6受体(IL-6R)的抗体,因为干扰素受体是激活STAT1所必需的,而IL-6受体的抑制将阻止或减少STAT1的激活。IL-6受体抗体的一个例子是Tocilizuma,一种针对白介素6受体的人源化单克隆抗体。因为产生和测定抗体活性的方法是本领域公知的,所以本领域技术人员可以制备类似的针对IL-6R的抗体,并筛选其对IL-6R的抑制作用。

[0067] 在其他情况下,STAT1抑制剂可以是抑制JAK1或JAK3的制剂,因为JAK1和JAK3是激活STAT信号传导众所周知的上游激酶。抑制JAK1和JAK3的制剂可以是小分子,例如,作为JAK1抑制剂的非尔替尼(Filgotinib),作为JAK3抑制剂的托法替尼。

[0068] 在其他情况下,STAT1抑制剂可以是减少STAT1磷酸化的制剂。此类降低STAT1磷酸化的制剂可以是据报道可抑制STAT磷酸化的FLLL32。

[0069] 在其他情况下,STAT1抑制剂可以是防止STAT1易位进入细胞核的制剂。防止STAT1易位进入细胞核中的此类制剂可能是Meales病毒蛋白P和V。

[0070] 在其他情况下,STAT1抑制剂是针对STAT1的RNAi剂。这种RNAi剂可以是靶向STAT1的任何siRNA,例如ThermoSisher Scientific的产品105153。靶向STAT1的其他siRNA剂可以由本领域技术人员制备,因为制备针对特定靶的siRNA的方法是本领域公知的。

[0071] 在其他情况下,作为治疗、预防或延迟AD发作的方法,可以使用基因组编辑工具删除整个STAT1基因、STAT1基因的磷酸化位点、STAT1基因的启动子区域或神经细胞中STAT1基因的SH2结构域。基因组编辑工具可以是任何基因组编辑工具,只要它可以用于靶向STAT1基因的特定区域并可以传递到目标细胞即可。这种基因组编辑工具的一个例子是Ran,F等人所描述的CRISPR-CAS9系统。使用葡萄球菌Cas9进行体内基因组编辑,《自然》(2015)。这种基因组编辑工具的另一个例子是CRISPR-Cpf1系统,如Zetsche等人所述,Cpf1是2类CRISPR-Cas系统的单RNA引导的核酸内切酶,《细胞》(2015)。

[0072] 在其他实施方案中,以上方法中对CH25H的抑制是通过向受试者施用药学有效量的CH25H抑制剂。在一些实施方案中,CH25H抑制剂是STAT1抑制剂,因为STAT1激活CH25H并且STAT1的抑制导致STAT1不能激活CH25H。STAT1抑制剂可以是本申请中公开的任何STAT1抑制剂。

[0073] 在其他实施方案中,作为用于治疗、预防或延迟AD发作的方法,基因组编辑工具可用于删除整个CH25H基因、CH25H基因的组氨酸簇区域或所述启动子区域或神经细胞中的CH25H基因。基因组编辑工具可以是任何基因组编辑工具,只要它可以用于靶向CH25H基因的特定区域并可以被传递到目标细胞即可。这种基因组编辑工具的一个例子是Ran,F等人所描述的CRISPR-CAS9系统,使用葡萄球菌Cas9进行体内基因组编辑,《自然》(2015)。这种基因组编辑工具的另一个例子是CRISPR-Cpf1系统,如Zetsche等人所述,Cpf1是2类CRISPR-Cas系统的单RNA引导的核酸内切酶,细胞(2015)。

[0074] 在其他实施方案中,上述方法中对25-OHC的抑制是通过向受试者施用药物有效量的25-OHC抑制剂。

[0075] 在某些情况下,25-OHC抑制剂可以是CH25H抑制剂或STAT1抑制剂,因为CH25H和STAT1在25-OHC的上游,并且CH25H或STAT1的抑制会导致CH25H无法产生25-OHC。在其他情况下,25-OHC抑制剂可以是25-OHC的类似物。在其他情况下,25-OHC抑制剂可以是3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂。HMG-CoA还原酶抑制剂的一个例子是辛伐他汀。

[0076] 在整个本申请中,本发明的各种实施例可以以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此,应该认为范围的描述已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,对范围从1到6的描述应视为已明确公开了从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等的子范围,以及该范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5和6。这与范围的幅度无关。

[0077] 应当理解,为清楚起见,在各个的实施例的文本中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施例中组合使用。相反,为简洁起见,在单个实施例的文本中描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合或在本发明的任何其他所述的实施例中合适地使用。在各种实施例的文本中描述的某些特征不应被认为是那些实施例的必要特征,除非缺乏那些要素时该实施方案无法操作。

[0078] 应该理解,本发明不限于本文描述的可以变化的特定方法、方案和试剂。本文所使用的术语仅出于描述特定实施例的目的,并且无意于限制本发明的范围。

[0079] 所公开主题的实施例在下面阐述。根据详述、附图、示例和权利要求,公开的主题的其他特征、目的和优点将是显而易见的。与本文描述的方法和材料基本相似或等效的方法和材料可用于实践或测试当前公开的主题。现在描述示例性的方法和材料如下。

[0080] 示例

[0081] 方法

[0082] 小鼠

[0083] APP/PS1 5XFAD小鼠购自Jackson实验室,而STAT1缺陷小鼠则由Daved Levy提供。通过crisper/cas9方法产生CH25H KO小鼠。先前(Zhou等,2014)已描述了用于表达Cas9蛋白的pST1374-Cas9-N-NLS-flag-linker质粒(Addgene ID44758)。Ch25h基因序列是从UCSC

Genome Browser网站 (<http://genome.ucsc.edu/>) 下载的。合成两个sgRNA寡核苷酸,并退火至pUC57-sgRNA结构。如先前(Zhou等,2014)所述进行体外转录。将Cas9 mRNA和sgRNA注射到C57BL6/J的背景中。APP/PS1小鼠与CH25H-/-小鼠交配并产生后代,后者携带APP/PS1基因和CH25H的WT或KO等位基因。将APP/PS1小鼠与STAT1-/-小鼠交配并产生后代,该后代携带APP/PS1基因以及STAT1的WT或KO等位基因。所有小鼠均具有C57BL/6遗传背景,并在新加坡国立大学饲养于无特定病原体的条件下。所有实验均在3-4个月大的小鼠上进行,并获得新加坡国立大学机构动物护理和使用委员会的批准(Institutional Animal Care and Use Committee of NUS)。

#### [0084] 组织裂解物的制备和蔗糖梯度

[0085] 对小鼠脑称重并在9倍体积的TBS中匀浆。将得到的匀浆在4°C下以1000g离心15分钟。将上清液作为核后级分。将核后级分小心地置于5%-45%的蔗糖梯度中,并在4°C以147,000g离心16小时。离心后,各级分从上到下各取1ml。将Triton添加到每个级分中以达到0.1%的最终浓度以溶解膜关联蛋白。所得样品用于蛋白质印迹分析。

#### [0086] 外泌体的制备

[0087] 将过表达人APP的SH-SY5Y细胞培养在含10%FBS的DMEM中。外泌体制备前一天,将培养基更换为空白DMEM,以避免污染血清外泌体。更换培养基后24小时,收集培养基,并以200g的转速离心5分钟以沉淀漂浮的细胞。将无细胞的培养基在4°C进一步以100,000g离心1h,并将含有外泌体的沉淀溶解在RIPA缓冲液中。

#### [0088] 微阵列分析

[0089] 使用由Molecular Genomics提供的affymetrix微阵列系统(Affymetrix)进行微阵列分析。用GeneSpring软件进行数据分析。使用中等分类严格性的默认设置,将差异表达的基因输入David Functional Annotation Clustering网站 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)。聚类结果重新绘制在饼图中。

#### [0090] 组织学分析

[0091] 将组织固定在4%多聚甲醛中、脱水、渗透并包埋石蜡。将切片(5 $\mu$ m)用苏木精和曙红(H&E)染色,以评估总体形态。为进行免疫荧光(IF)或免疫组织化学(IHC),将切片重新水化并用抗A $\beta$ 的一抗(Cell Signaling)染色,然后与荧光偶联的二抗(Invitrogen)孵育。对于油红O染色,将肝脏包埋在Tissue Tek(电子显微镜科学)中,并在-80°C下冷冻。切下10 $\mu$ m厚的切片,并用dH<sub>2</sub>O水化,然后在油红O工作溶液(0.3%油红O(Sigma)溶于60%异丙醇中)中孵育1h。之后,将载玻片在60%异丙醇中快速洗涤3次,直到从载玻片上滴下的异丙醇是清澈的为止。随后,将玻片用水洗涤并用苏木精复染。

#### [0092] 实时PCR

[0093] 根据制造商的说明书,用Trizol试剂(Invitrogen)从细胞中提取总RNA。用Superscript逆转录酶(Invitrogen)合成互补DNA(cDNA)。通过使用SYBR qPCR试剂盒(KAPA)的7500实时PCR系统(Applied Biosystems)测量基因表达。Actib、Gapdh或Rn18S用作内部对照。引物序列可应要求提供。

#### [0094] ELISA

[0095] 根据制造商的说明书,使用ELISA试剂盒(Millipore)对A $\beta$ 42进行定量。

#### [0096] 染色质免疫沉淀测定

[0097] 将来自APP/PS1或APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠的一半脑半球在9倍体积的TBS中匀浆以获得脑匀浆。添加终浓度为1%的甲醛,交联10分钟,然后用甘氨酸淬灭。用低渗缓冲液处理匀浆,然后用核裂解缓冲液处理以释放染色质。通过超声破碎染色质,并用Protein G微珠预先清除,然后在4°C下用抗STAT1抗体(Santa Cruz)或常规的兔IgG(Santa Cruz)沉淀过夜。洗涤和洗脱后,在65°C下孵育8小时来完成交联逆转。如前所述,对洗脱的DNA纯化,并用对CH25H启动子有特异性的引物进行RT-PCR分析。

#### [0098] 统计

[0099] 显著统计学差异是通过使用GraphPad Prism 6.01的Student's t检验确定的。p值<0.05被认为是显著的。临床的p值是通过单向方差多范围分析(ANOVA)进行多次比较确定的。除非另有说明,否则数据以平均值和平均值的标准误差(平均值±SEM)表示。

#### [0100] 实施例1:Stat1敲除小鼠具有降低的A $\beta$ 沉积

[0101] 我们证明了在AD病例中STAT1的表达高于老年匹配对照病例(图1A和1B)。在图1A中,对照细胞中未观察到磷酸化的STAT1(pSTAT1)的染色。相反,如同一图1A所示和图1B中病例-1的照片的放大快照,在这三种情况中的每一种中,pSTAT1的染色都多得多。

[0102] 为了解STAT1途径的激活是AD发病的原因,还是AD晚期的神经炎症的结果,我们将STAT1<sup>-/-</sup>小鼠与APP/PS1小鼠杂交以产生具有STAT1<sup>-/-</sup>背景的AD小鼠。将APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠及其APP/PS1基因型同窝对照饲养3-4个月,并处死以进行A $\beta$ 沉积的组织学检查。出乎意料的是,我们发现Stat1<sup>-/-</sup>小鼠的A $\beta$ 数量以及A $\beta$ 占据的面积持续减少(图2A和2B)。当我们在TBS或甲酸提取物中测量A $\beta$ 42时,观察到相似的结果(图2C和2D)。此外,A $\beta$ 的降低不是由于APP表达水平的改变或分泌酶切割APP引起的(图16A和16B)。

#### [0103] 实施例2:Stat1-KO小鼠中因下游靶标CH25H的减少带来的A $\beta$ 沉积的减少

[0104] 我们的微阵列数据鉴定出在AD病症中,CH25H是STAT1调节的基因(图3A和3B)。此外,我们通过实时PCR、蛋白质印迹和ChIP分析证实了STAT1对CH25H的调节作用(图4A、4B、5A和5B)。如图4A(展示实时PCR结果)所示,在STAT1缺陷小鼠中CH25H mRNA表达显著降低。如图4B所示的蛋白质印迹结果,表明在STAT1缺陷型小鼠中CH25H蛋白水平也显著降低。图5A和5B中ChIP分析的结果还表明,在STAT1缺陷型小鼠中,更少的STAT1与CH25H基因启动子序列结合。STAT1缺陷小鼠中25-OHC水平的降低,进一步支持了STAT1-CH25H轴控制大脑25-OHC水平的观点(图6A-6B)。

#### [0105] 实施例3 STAT1-CH25H调节的25-OHC影响外泌体中APP的分泌

[0106] 通过蔗糖梯度分级分离小鼠脑匀浆以检查APP蛋白的细胞定位。简而言之,在5XFAD和5XFAD/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之间,APP的分布模式相似,除了具有最高密度的外泌体、Flotillin1丰富的级分。STAT1<sup>-/-</sup>小鼠在此级分中的APP含量明显较高(图7)。

[0107] 我们使用APP过表达的SH-SY5Y细胞系来进一步检查外泌体APP的差异是否归因于25-OHC。用不同剂量的25-OHC处理细胞,并从培养基中收集细胞裂解物和外泌体。25-OHC表现出剂量依赖性地增加细胞APP,同时减少外泌体APP(图8A和8B)。如图8A所示,随着25-OHC剂量的增加,在外泌体级分中发现更少的APP。相反,随着25-OHC剂量的增加,在细胞裂解液级分中发现更多的APP。

[0108] 表面APP的FACS分析还显示25-OHC增加了细胞表面上APP的量(图8C)。25-OHC处理后,在过表达APP细胞的表面检测到更多的APP。

[0109] 此外,我们发现用25-OHC处理后,外泌体中的A $\beta$ 42增加。收集不同浓度的25-OHC处理的细胞培养基,并通过ELISA测定从该培养基中收集的外泌体中的A $\beta$ 42。如图9所示,在用更高浓度25-OHC处理后的细胞培养基中检测到A $\beta$ 42的增加。数据代表三次独立的实验。

[0110] 实施例4 25-OHC增加了APP在细胞中的保留时间

[0111] 在25-OHC处理后,多种机制可能有助于增加细胞APP。但是,我们的小鼠数据表明APP的合成和降解均正常:APP的表达情况也相似,并且裂解APP的酶也处于相当水平(图16A和16B)。如图16A所示,无论STAT1是否缺乏,APP的表达水平均相似。如图16B所示,无论STAT1是否缺乏,Adam10、BACE1和Nicastrin的表达水平,即APP的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 分泌酶也分别相似。

[0112] 我们继续检查APP蛋白的运输。用抗体标记表面APP,将细胞放回培养箱中,并在不同的时间点固定进行染色。在未经处理的细胞中,APP迅速进入细胞的特定区室,并且在6小时内信号消失,而在经过25-OHC处理的细胞中,APP的运输速度较慢(图10A)。延时摄影视频清楚地显示,在未处理的细胞中,APP聚集在特定的区室中,而在25-OHC处理的细胞中,APP在监测时间内仍均匀分布(图10B)。

[0113] 实施例5 CH25H KO重新获得STAT1 KO表型以延迟AD的发病机理

[0114] 我们研究了CH25H KO在AD发病机理中的作用。设计靶向CH25H的SgRNA,其中sgRNA1为SEQ ID NO:1,而sgRNA2为SEQ ID NO:2。参见图12A和12B。利用两个sgRNA,通过crisher/cas9方法敲除CH25H基因,从而在CH25H基因的外显子中删除46个碱基对(bp)(见图12C),以产生CH25H敲除型(KO)小鼠。

[0115] 在CH25H KO小鼠中,检测到CH25H基因的46bp片段缺失,其中488bp的条带是缺失的CH25H基因,而534bp是野生型基因。CH25H KO小鼠中CH25H mRNA的表达显著降低(图12E)。

[0116] 一旦与5XFAD小鼠杂交,CH25H KO表现出与STAT1 KO相似的表型。在免疫染色和ELISA定量中,A $\beta$ 均大大降低(分别为图13A、13B和13C)。相反,注射25-OHC的小鼠具有显著高含量的A $\beta$ (图11A、11B和11C)。

[0117] 为了测试A $\beta$ 降低对认知能力的影响,通过水迷宫检查小鼠。XFAD小鼠逐渐学会了将平台定位在水下,而CH25H KO小鼠发现平台所需的时间显著减少( $p < 0.05$ ),表明它们在学习和记忆任务方面表现更好(图14)。

[0118] 实施例6:辛伐他汀抑制25-OHC诱导的APP积累

[0119] 我们筛选了许多潜在的小分子25-OHC抑制剂,发现辛伐他汀阻断了25-OHC诱导的细胞APP的增加。在辛伐他汀低至10nM的情况下就可以看到这种作用,这远低于可能引起细胞毒性作用的剂量。

[0120] 如图15所示,25-OHC处理导致APP水平升高。但是,辛伐他汀治疗可以降低25-OHC治疗引起的APP水平升高。相反,泼尼松龙三乙酸甲酯的处理对25-OHC诱导的APP水平升高没有影响。因此,辛伐他汀是25-OHC的有效抑制剂。

[0121] 实施例7 WT和STAT1缺陷型小胶质细胞之间的相似吞噬作用

[0122] 将WT或STAT1 $^{-/-}$ 小胶质细胞与荧光微珠一起温育以测试其吞噬能力。为了检查分泌因子在培养基中的作用,将两种细胞均保留在WT细胞的培养基中或STAT1 $^{-/-}$ 细胞的培养基中。成像和定量显示在所有测试条件下吞噬作用均相似(图17A和17B)。我们还测量了参

与吞噬过程的关键基因SV2a和CCR2的mRNA。它们的表达水平在APP/PS1和APP/PS1/STAT1-/-之间相似(图17C和图17D)。

[0123] 实施例8 CH25H是STAT1依赖性胆固醇羟化酶

[0124] 我们测试了几种已知的胆固醇羟化酶,包括CH25H、Cyp46a1、Cyp7b1和Cyp7a1,它们在不同位置向胆固醇添加了羟基。在我们测试的酶中,只有CH25H显示出STAT1依赖性表达模式,因为只有CH25H的表达显著降低(图18A、18B、18C和18D)。

[0125] 实施例9 STAT1缺乏症并未引起一般的代谢缺陷

[0126] 最初已知CH25H调节胆固醇代谢。但是,当我们比较体重、肝脏中的脂质沉积和参与脂质代谢的关键酶时,WT和STAT1-/-小鼠之间没有显著变化(图19A-19F)。如图19A所示,APP/PS1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠之间的体重没有显著差异。如图19B所示,在APP/PS1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠之间,肝细胞中的脂质沉积没有显著差异。此外,如图19C-19F所示,APP/PS1和APP/PS1/STAT1-/-小鼠之间的关键酶,包括LPL、ABCA1、APOE和HMGCR的表达没有显著差异。

[0127] 实施例10 STAT1缺乏并未改变通过诱导即刻早期基因而测量的神经元活性。

[0128] 培养来自WT或STAT1-/-小鼠的原代海马神经元,然后用50mM KCl处理。通过RT-PCR测量了一些即刻早期基因(包括cfos、Zif268、BDNF-IV、BDNF-IX、Gadd45b、Npas4和Ch25h),作为神经元活性的标记。如图20A-20G所示,WT和STAT1-/-神经元都能够以相似的程度诱导这些基因。

[0129] 参考文献:

[0130] Bonni, A., Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos and M. E. Greenberg (1997). "Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway." Science 278(5337): 477-483.

[0131] Chen, Y. C., W. L. Hsu, Y. L. Ma, D. J. Tai and E. H. Lee (2014). "CREB SUMOylation by the E3 ligase PIAS1 enhances spatial memory." J Neurosci 34(29):9574-9589.

[0132] Citron, M. (2010). "Alzheimer's disease: strategies for disease modification." Nat Rev Drug Discov 9(5):387-398.

[0133] De Strooper, B., R. Vassar and T. Golde (2010). "The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease." Nat Rev Neurol 6(2):99-107.

[0134] Delrieu, J., P. J. Ousset, T. Voisin and B. Vellas (2014). "Amyloid beta peptide immunotherapy in Alzheimer disease." Rev Neurol (Paris) 170(12):739-748.

[0135] Do, D. V., J. Ueda, D. M. Messerschmidt, C. Lorthongpanich, Y. Zhou, B. Feng, G. Guo, P. J. Lin, M. Z. Hossain, W. Zhang, A. Moh, Q. Wu, P. Robson, H. H. Ng, L. Poellinger, B. B. Knowles, D. Solter and X. Y. Fu (2013). "A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo." Genes Dev 27(12):1378-1390.

[0136] Doody, R. S., R. G. Thomas, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, R. Raman, X. Sun, P. S. Aisen, E. Siemers, H. Liu-Seifert, R. Mohs, C. Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering and G. Solanezumab Study

(2014). "Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease." N Engl J Med 370(4):311-321.

[0137] Engelhart, M.J., M.I. Geerlings, J. Meijer, A. Kiliaan, A. Ruitenberg, J.C. van Swieten, T. Stijnen, A. Hofman, J.C. Witteman and M.M. Breteler (2004). "Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study." Arch Neurol 61(5):668-672.

[0138] Etminan, M., S. Gill and A. Samii (2003). "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies." BMJ 327(7407):128.

[0139] Gao, Q., M.J. Wolfgang, S. Neschen, K. Morino, T.L. Horvath, G.I. Shulman and X.Y. Fu (2004). "Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation." Proc Natl Acad Sci U S A 101(13):4661-4666.

[0140] Green, R.C., L.S. Schneider, D.A. Amato, A.P. Beelen, G. Wilcock, E.A. Swabb, K.H. Zavitz and G. Tarenflurbil Phase 3 Study (2009). "Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." JAMA 302(23):2557-2564.

[0141] Heneka, M.T., M.P. Kummer, A. Stutz, A. Delekate, S. Schwartz, A. Vieira-Saecker, A. Griep, D. Axt, A. Remus, T.C. Tzeng, E. Gelpi, A. Halle, M. Korte, E. Latz and D.T. Golenbock (2013). "NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice." Nature 493(7434):674-678.

[0142] Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R.W. Jones, R. Bullock, S. Love, J.W. Neal, E. Zotova and J.A. Nicoll (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet 372(9634):216-223.

[0143] Huang, Y. and L. Mucke (2012). "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies." Cell 148(6):1204-1222.

[0144] Ikeda, S., C.W. Wong, D. Allsop, M. Landon, M. Kidd and G.G. Glenner (1987). "Immunogold labeling of cerebrovascular and neuritic plaque amyloid fibrils in Alzheimer's disease with an anti-beta protein monoclonal antibody." Lab Invest 57(4):446-449.

[0145] Jiang, W., Y. Zhang, F. Meng, B. Lian, X. Chen, X. Yu, E. Dai, S. Wang, X. Liu, X. Li, L. Wang and X. Li (2013). "Identification of active transcription factor and miRNA regulatory pathways in Alzheimer's disease." Bioinformatics 29(20):2596-2602.

[0146] Kitamura, Y., S. Shimohama, T. Ota, Y. Matsuoka, Y. Nomura and T. Taniguchi (1997). "Alteration of transcription factors NF-kappaB and STAT1 in Alzheimer's disease brains." Neurosci Lett 237(1):17-20.

[0147] Morelli, L., M.I. Prat and E.M. Castano (1999). "Differential accumulation

of soluble amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 in human monocytic and neuroblastoma cell lines. Implications for cerebral amyloidogenesis." Cell Tissue Res 298(2):225-232.

[0148] Ozudogru, S.N. and C.F. Lippa (2012). "Disease modifying drugs targeting beta-amyloid." Am J Alzheimers Dis Other Demen 27(5):296-300.

[0149] Palop, J.J. and L. Mucke (2009). "Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease." Arch Neurol 66(4):435-440.

[0150] Roher, A.E., M.O. Chaney, Y.M. Kuo, S.D. Webster, W.B. Stine, L.J. Haverkamp, A.S. Woods, R.J. Cotter, J.M. Tuohy, G.A. Krafft, B.S. Bonnell and M.R. Emmerling (1996). "Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease." J Biol Chem 271(34):20631-20635.

[0151] Salloway, S., R. Sperling, N.C. Fox, K. Blennow, W. Klunk, M. Raskind, M. Sabbagh, L.S. Honig, A.P. Porsteinsson, S. Ferris, M. Reichert, N. Ketter, B. Nejadnik, V. Guenzler, M. Miloslavsky, D. Wang, Y. Lu, J. Lull, I.C. Tudor, E. Liu, M. Grundman, E. Yuen, R. Black, H.R. Brashear, Bapineuzumab and I. Clinical Trial (2014). "Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease." N Engl J Med 370(4):322-333.

[0152] Schmidt, R., H. Schmidt, J.D. Curb, K. Masaki, L.R. White and L.J. Launer (2002). "Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study." Ann Neurol 52(2):168-174.

[0153] Selkoe, D.J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev 81(2):741-766.

[0154] Tabira, T. (2011). "[Immunotherapy targeting on Abeta for Alzheimer disease]." Nihon Rinsho 69 Suppl 10(Pt 2):77-82.

[0155] Tai, D.J., W.L. Hsu, Y.C. Liu, Y.L. Ma and E.H. Lee (2011). "Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning." EMBO J 30(1):205-220.

[0156] Tanzi, R.E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell 120(4):545-555.

[0157] Weggen, S., J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde and E.H. Koo (2001). "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity." Nature 414(6860):212-216.

[0158] Wisniewski, T. (2012). "Active immunotherapy for Alzheimer's disease." Lancet Neurol 11(7):571-572.

[0159] Wolfe, M.S., J. De Los Angeles, D.D. Miller, W. Xia and D.J. Selkoe (1999). "Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease." Biochemistry 38(35):11223-11230.

- [0001] SEQUENCE LISTING  
[0002] <110> 健艾仕生物医药有限公司  
[0003] 傅新元  
[0004] <120> 治疗阿尔茨海默氏病的组合物和方法  
[0005] <130> P19114389WP  
[0006] <160> 2  
[0007] <170> PatentIn version 3.5  
[0008] <210> 1  
[0009] <211> 20  
[0010] <212> DNA  
[0011] <213> Artificial Sequence  
[0012] <220>  
[0013] <223> 合成序列1  
[0014] <400> 1  
[0015] ggcagaagct gctttacgga 20  
[0016] <210> 2  
[0017] <211> 20  
[0018] <212> DNA  
[0019] <213> Artificial Sequence  
[0020] <220>  
[0021] <223> 合成序列2  
[0022] <400> 2  
[0023] gctgacactc taccagcacc 20

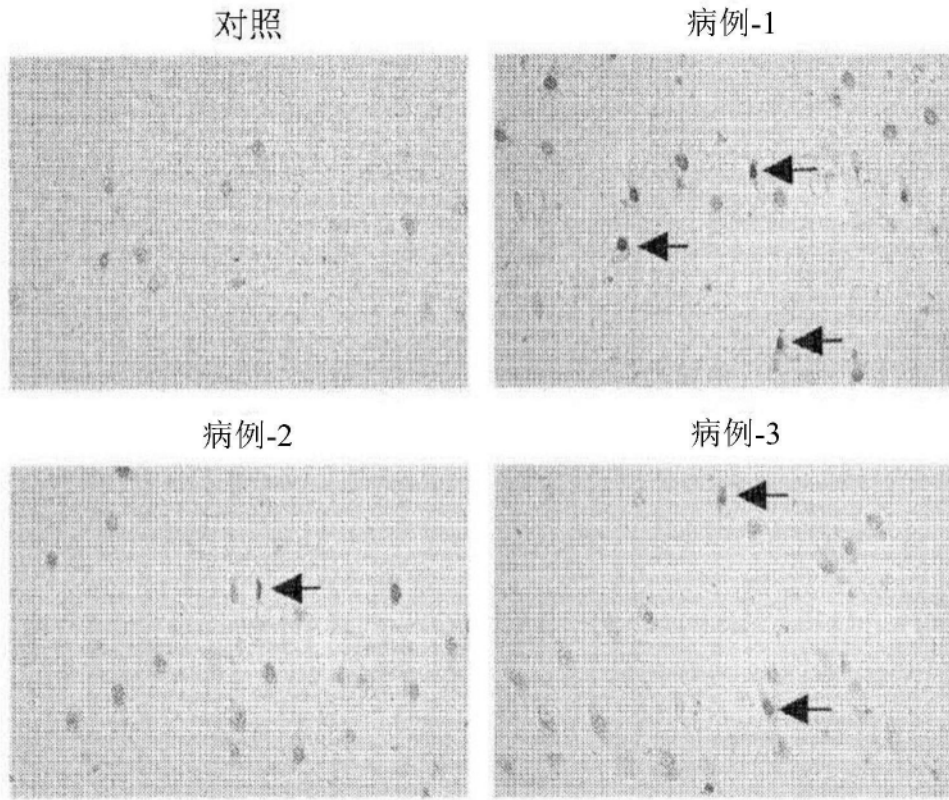


图1A

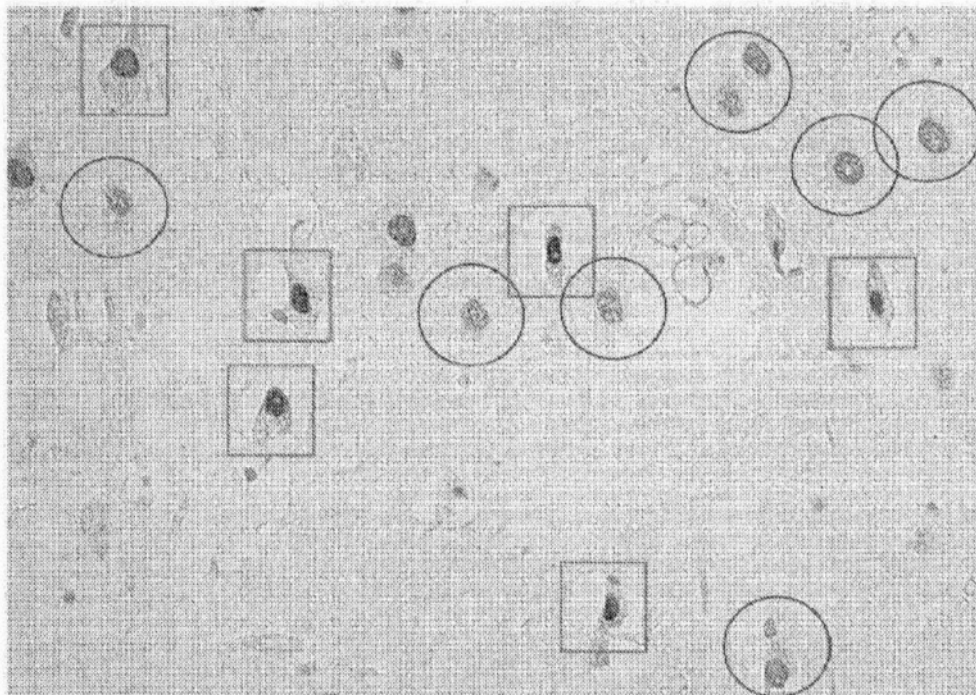


图1B

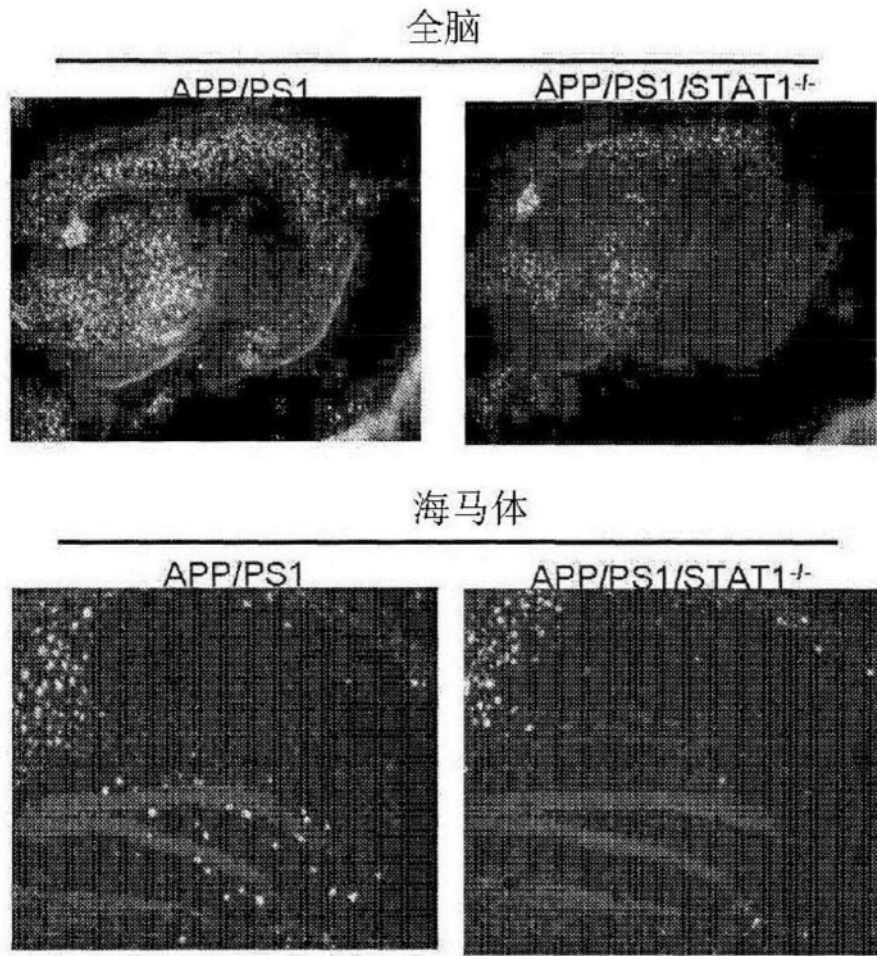


图2A

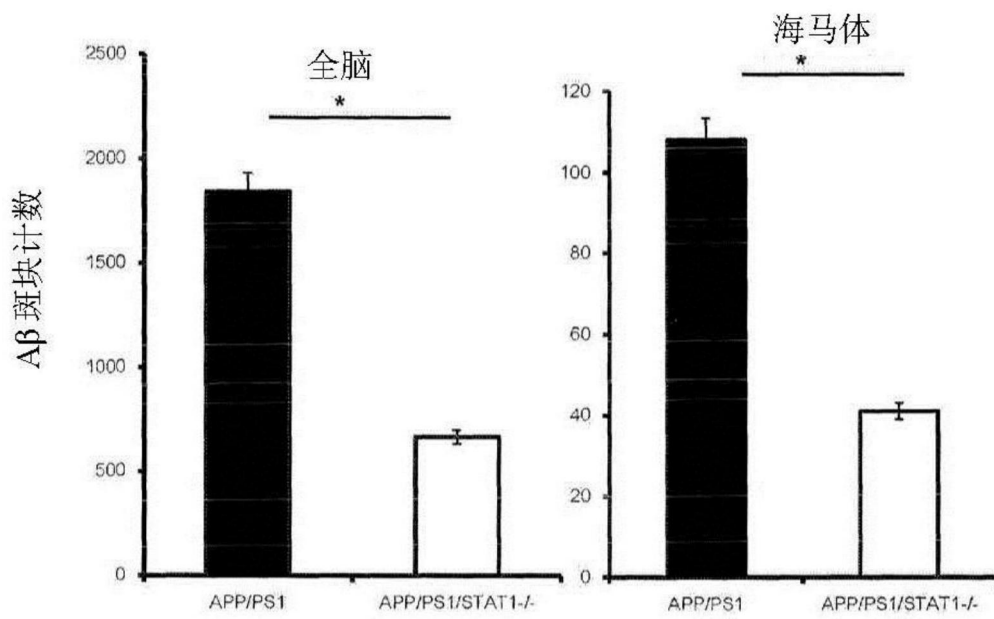


图2B

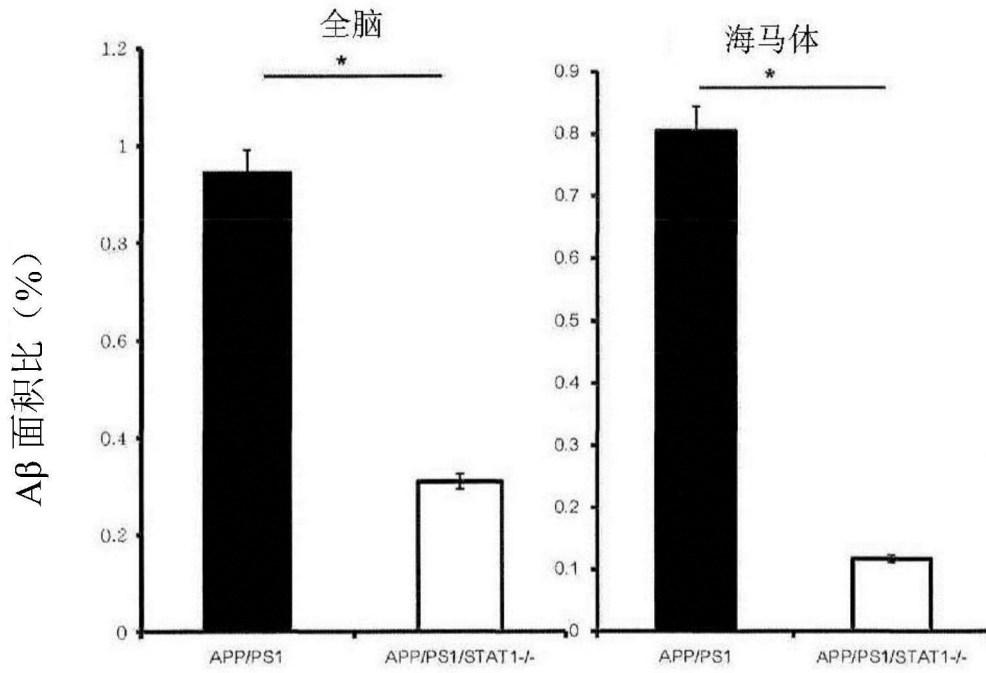


图2C

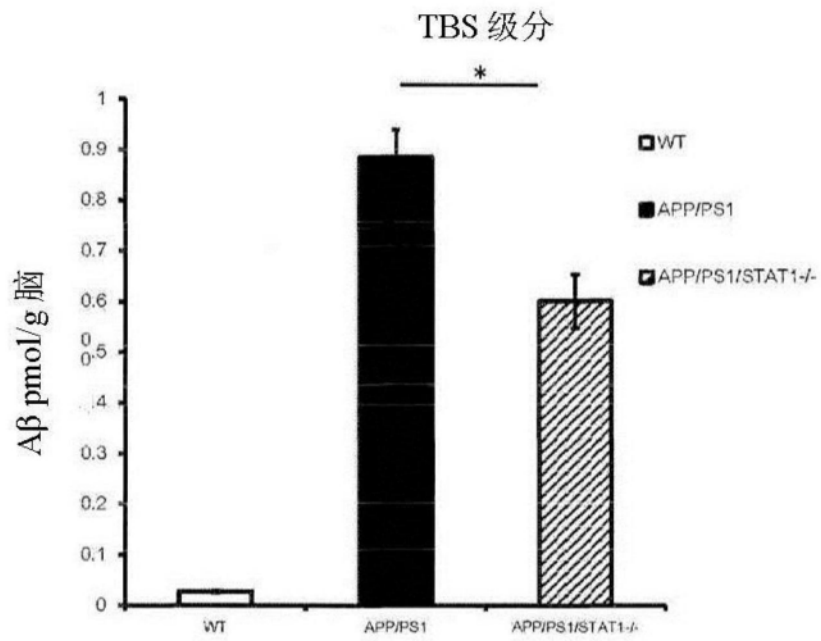


图2D

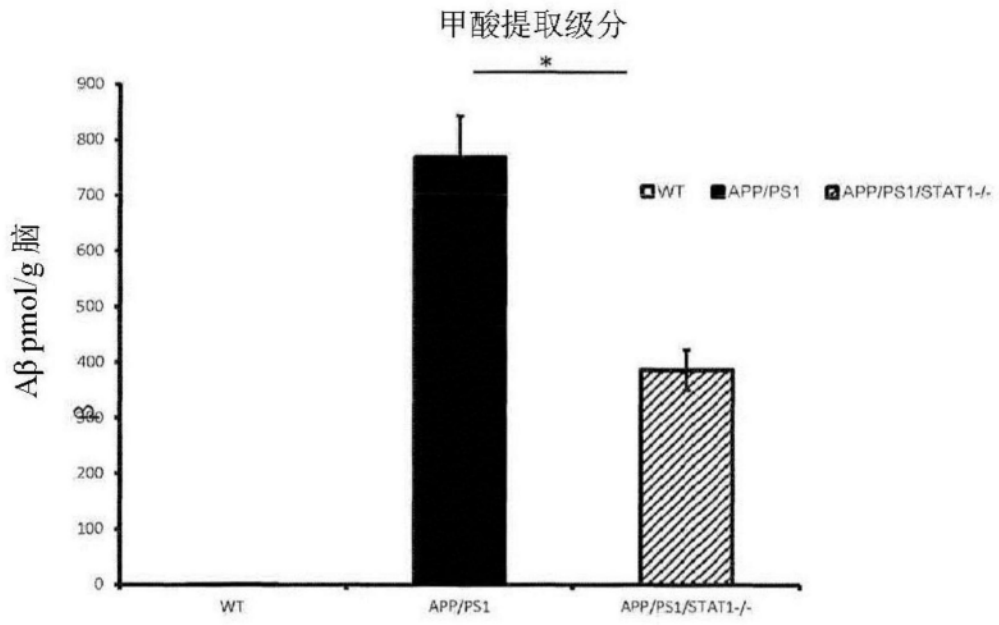


图2E

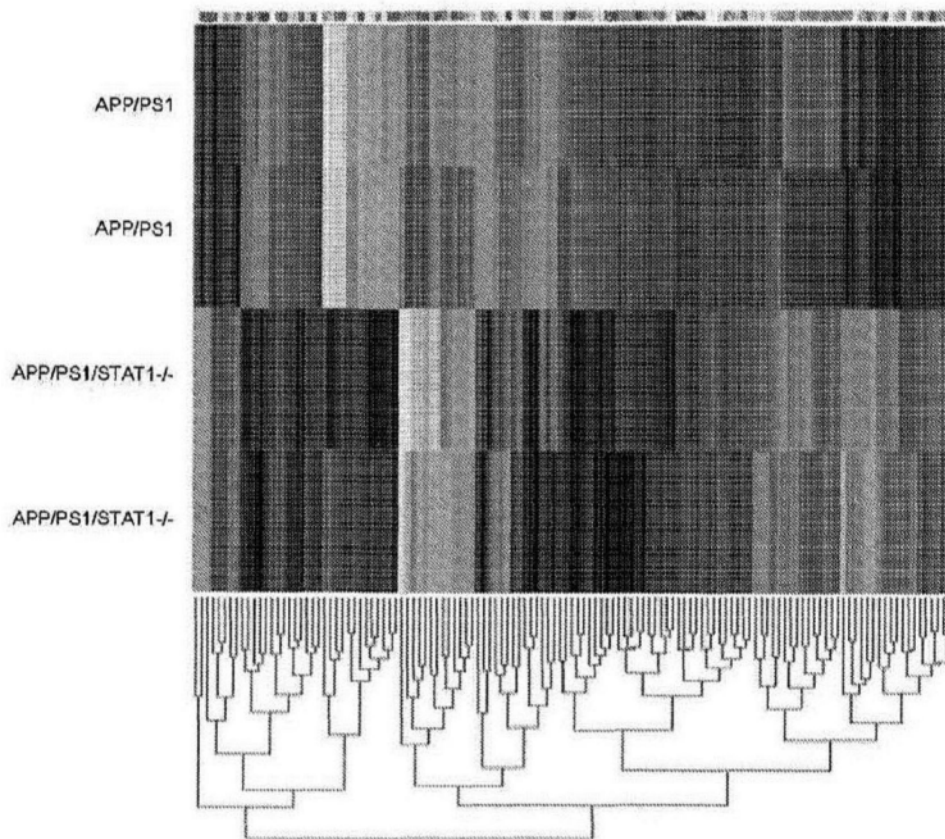


图3A

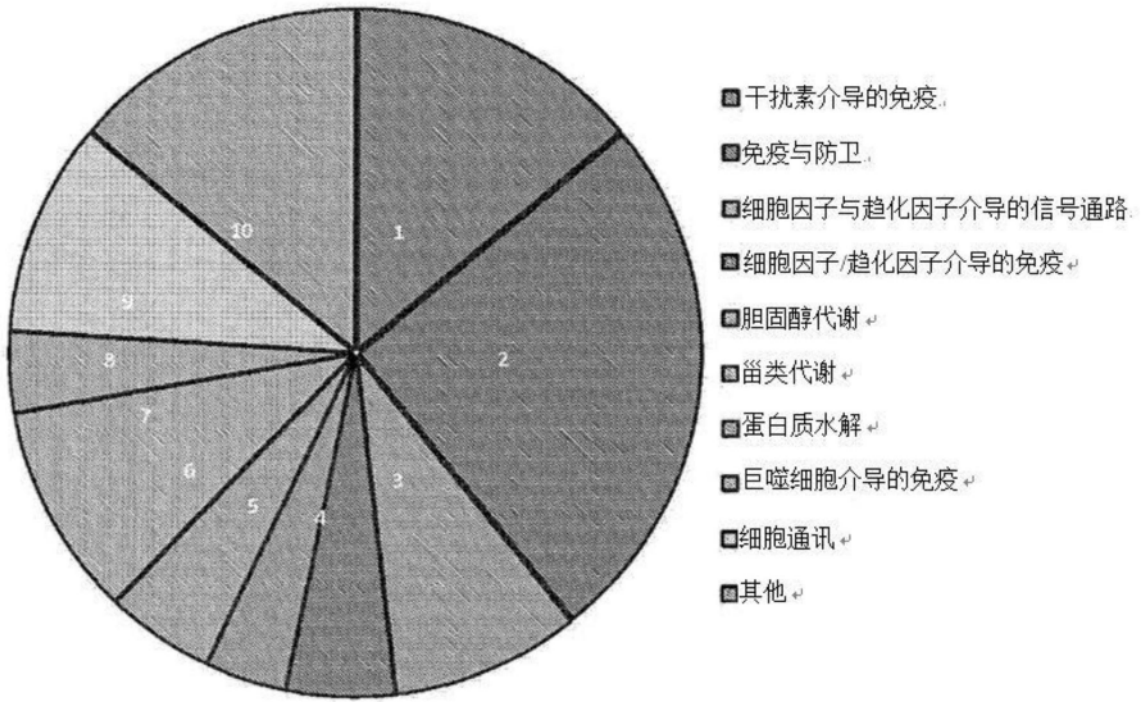


图3B

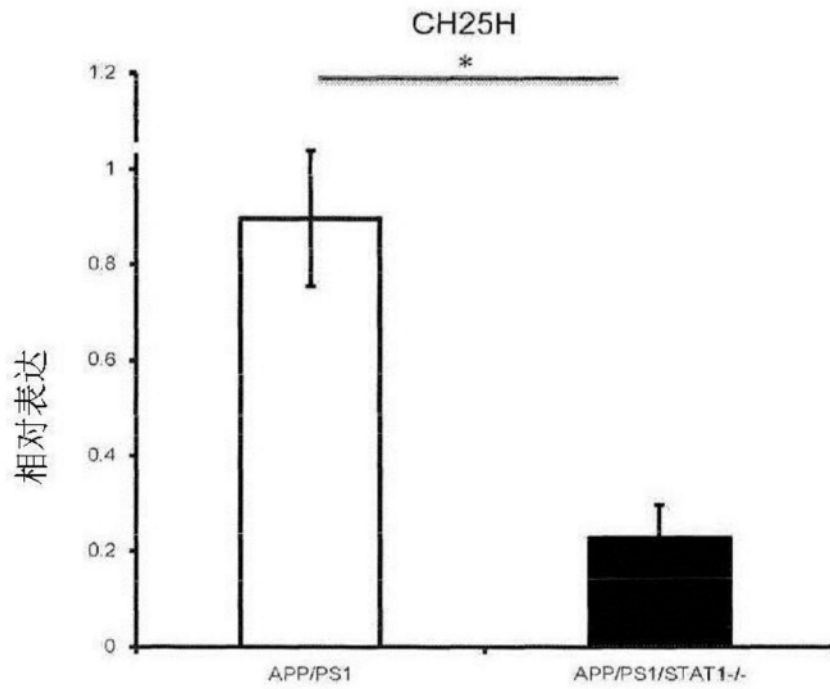


图4A

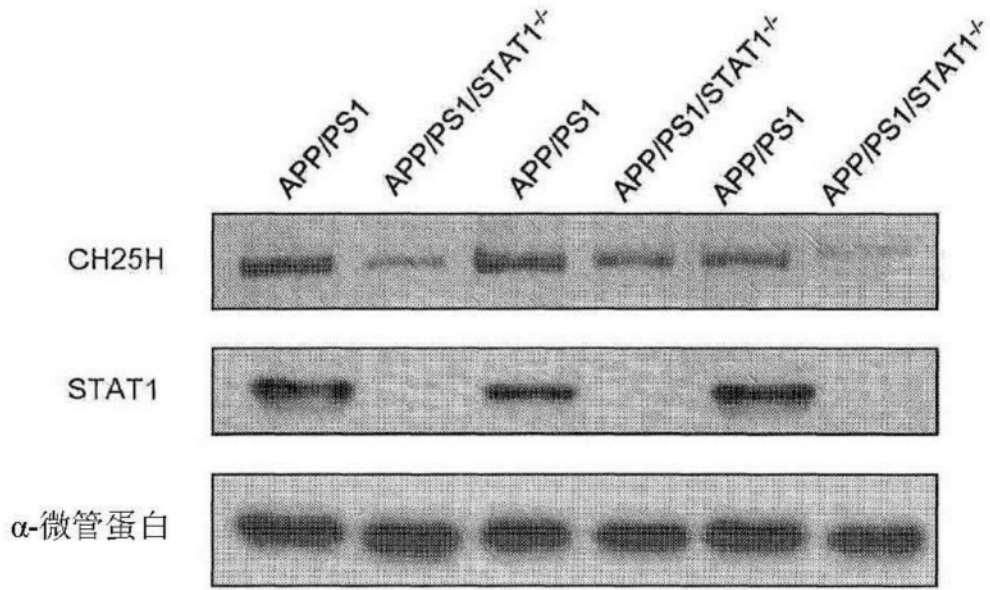


图4B

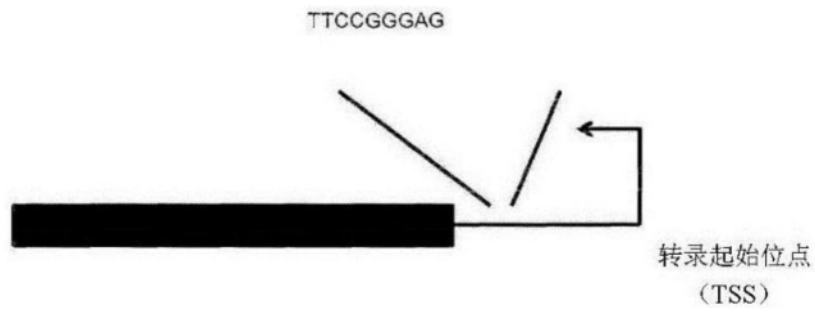


图5A

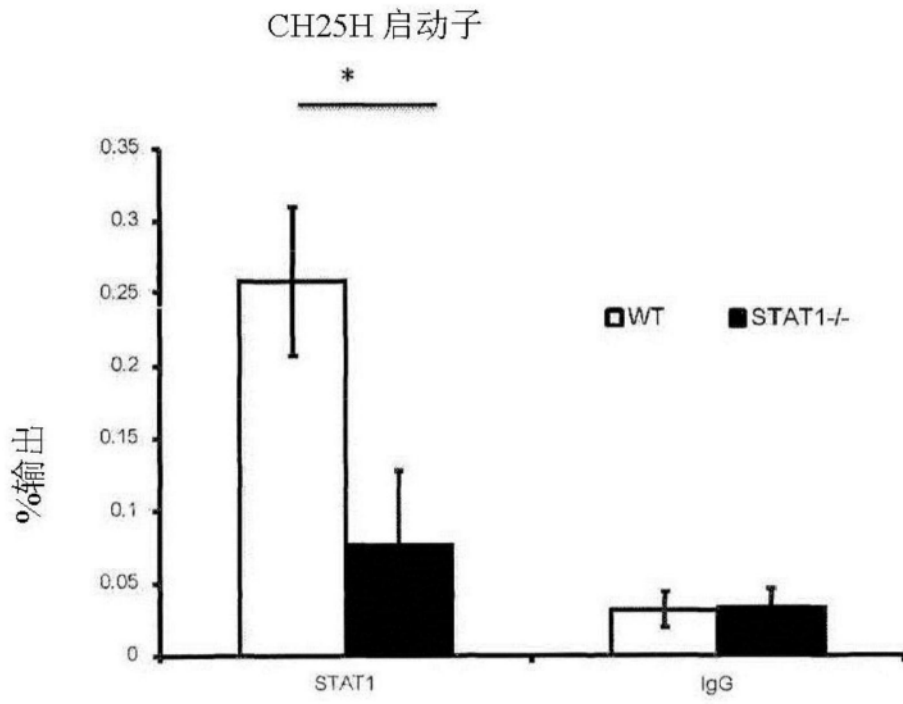


图5B

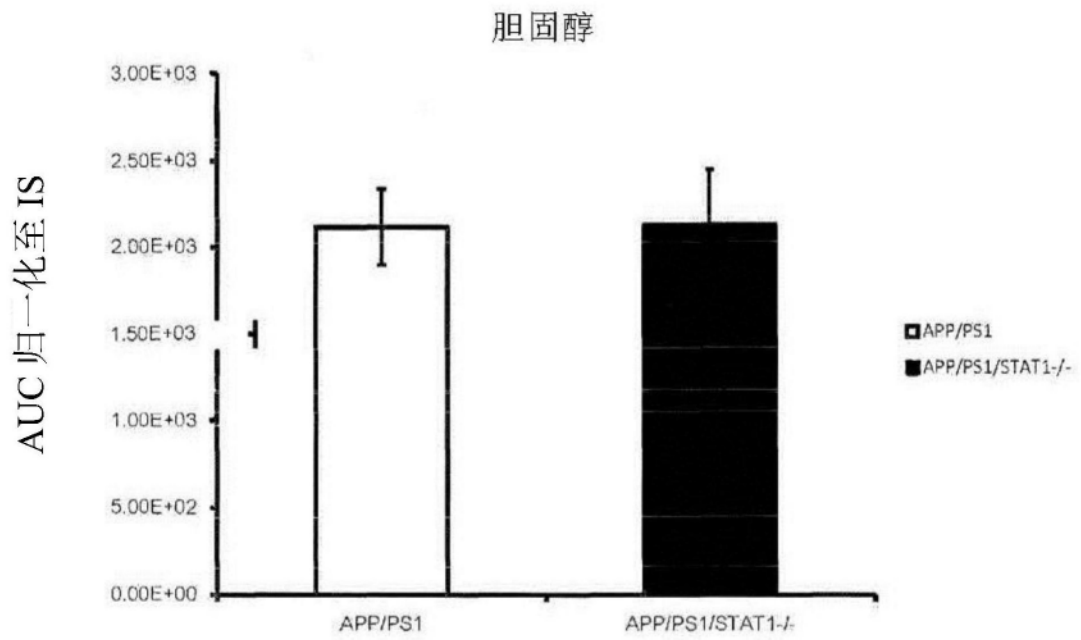


图6A

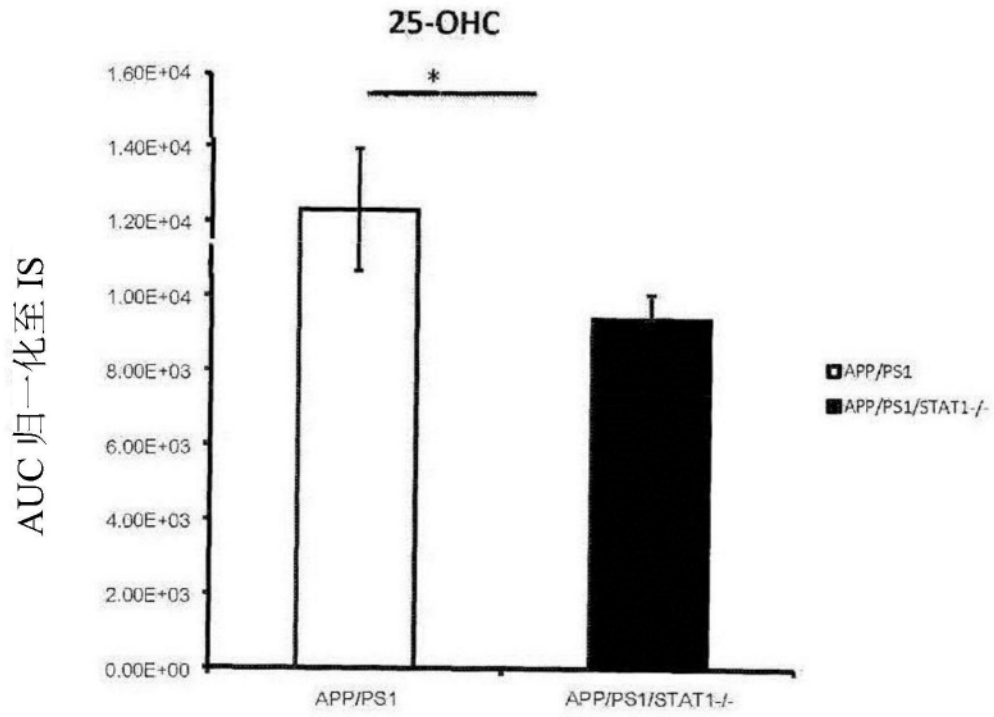


图6B

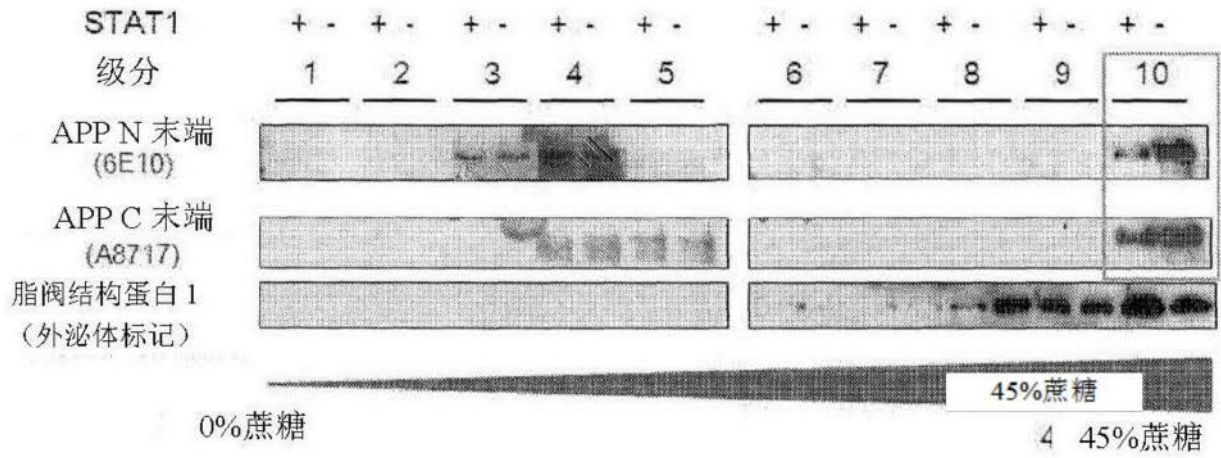


图7

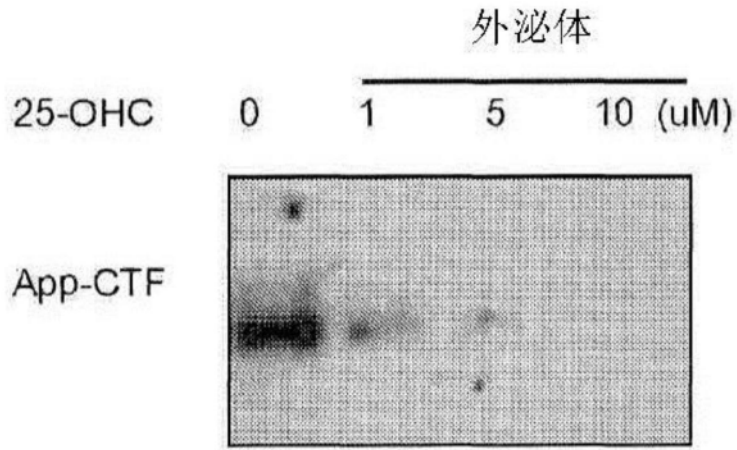


图8A

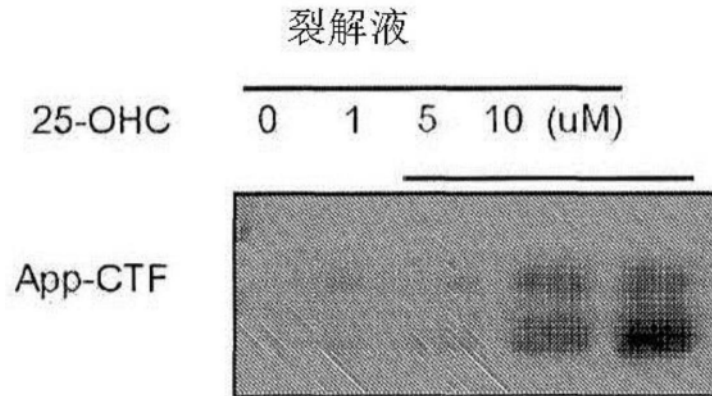
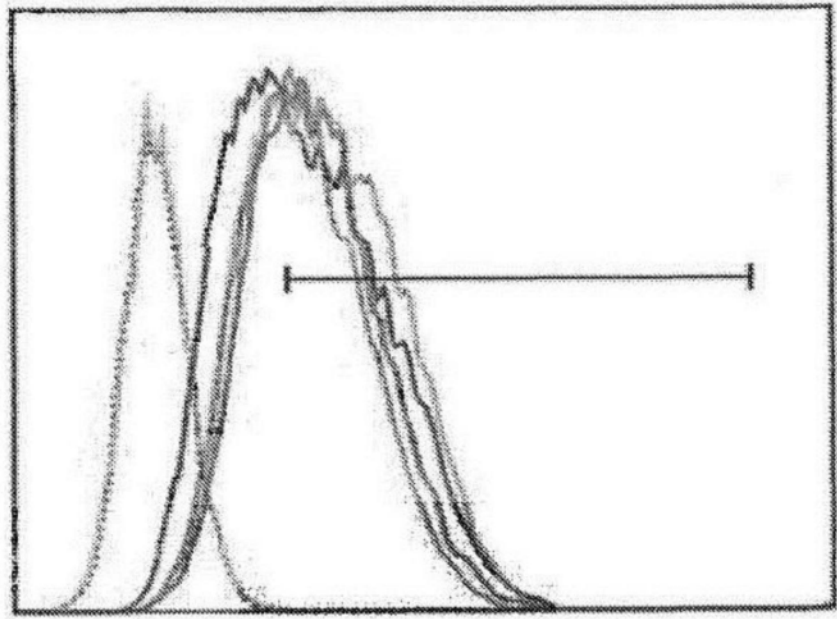


图8B

归一化至模式



APP AF488

- 同位素对照
- ▨ 无 APP 过表达的野生型细胞
- ▩ APP 过表达细胞
- ▧ APP 过表达细胞, +25-CHC 2h
- ▦ APP 过表达细胞, +25-CHC 6h
- ▤ APP 过表达细胞, +25-CHC 12h

图8C

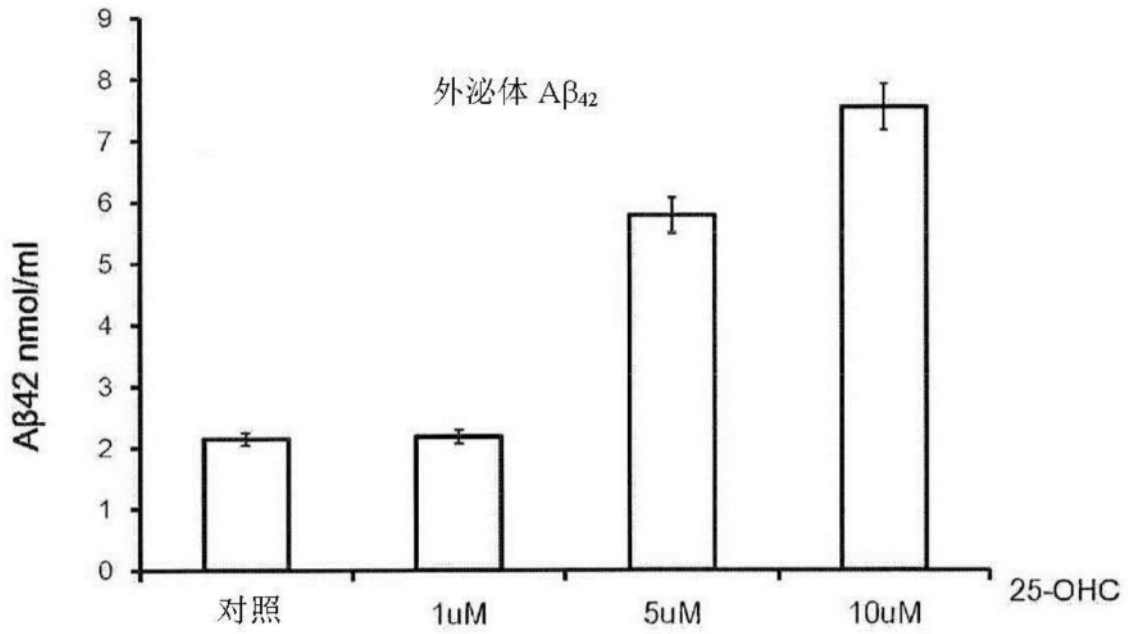


图9

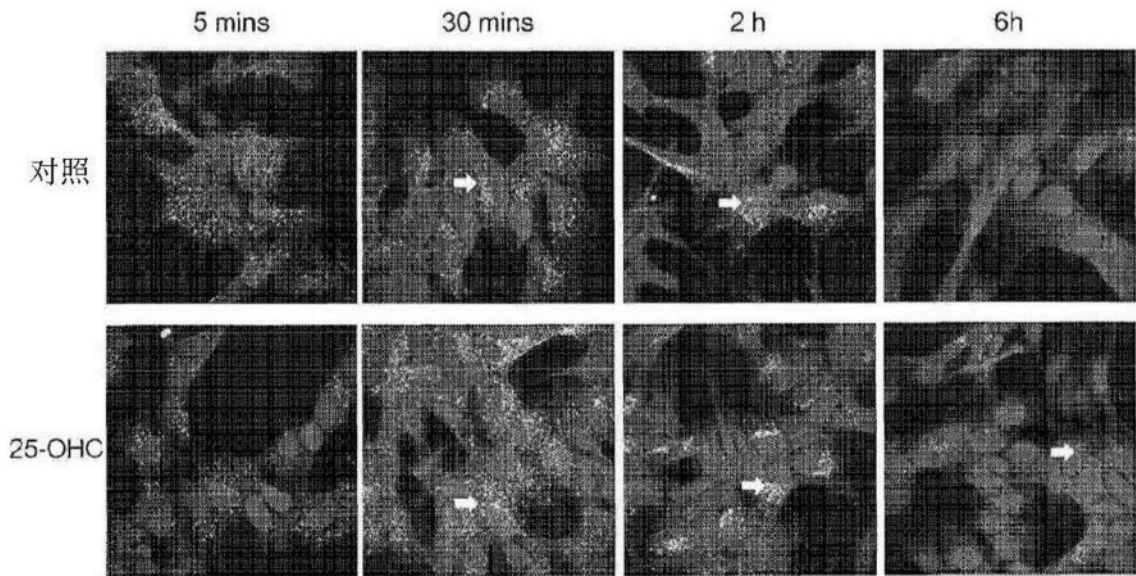


图10A

对照

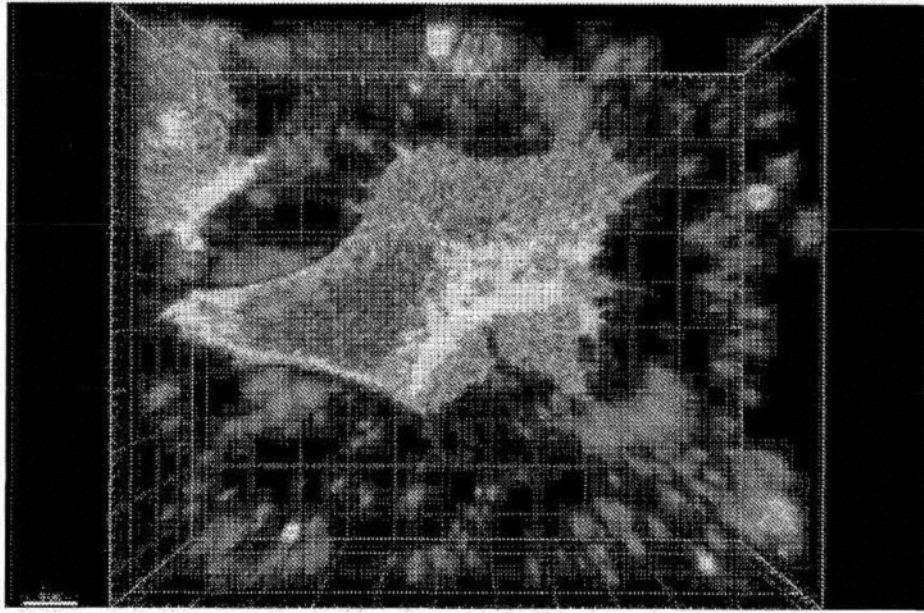


图10B

25-OHC

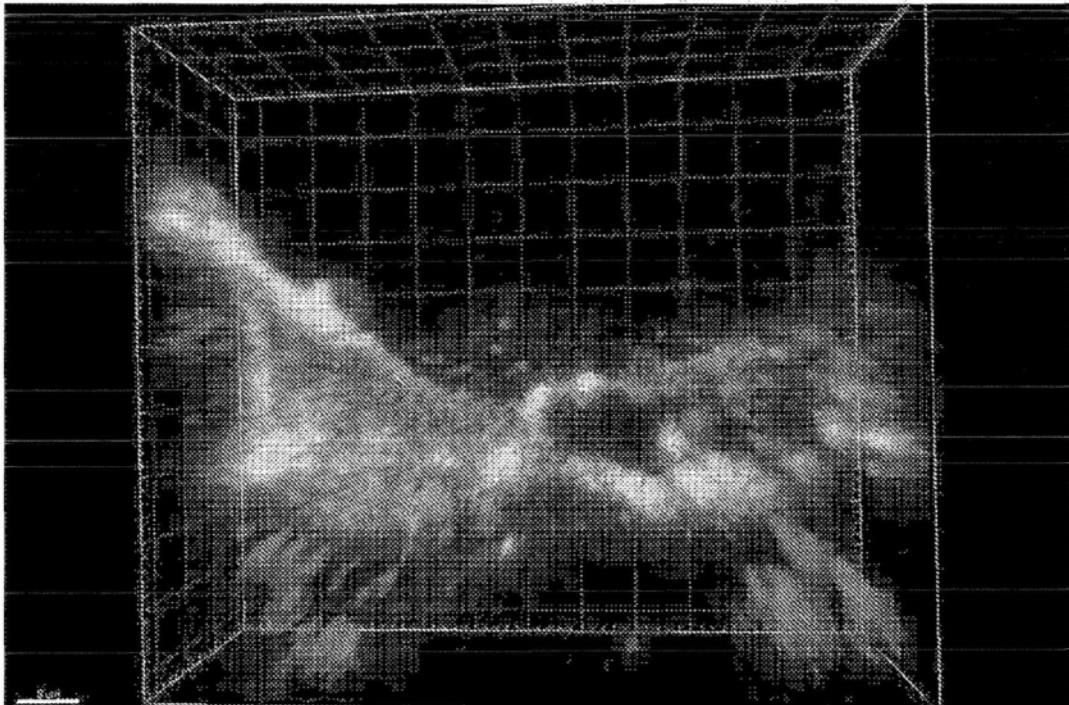


图10C

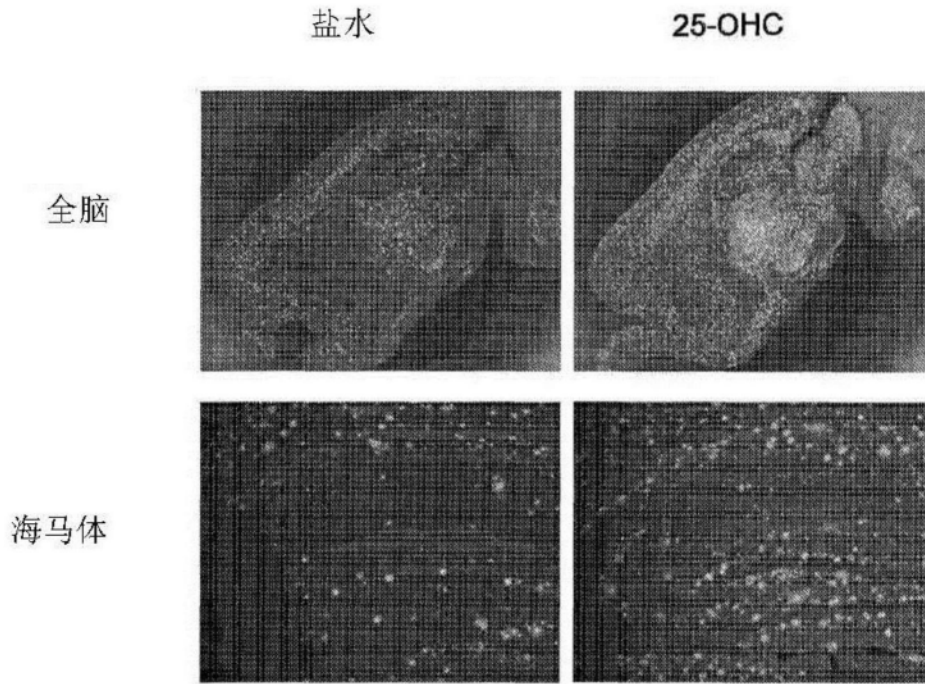


图11A

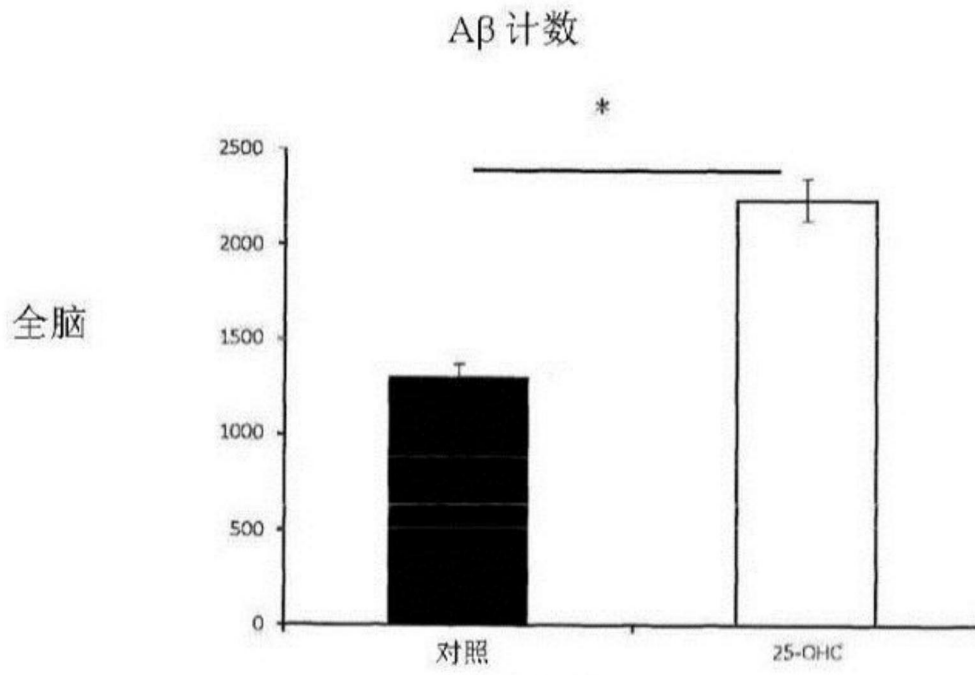


图11B



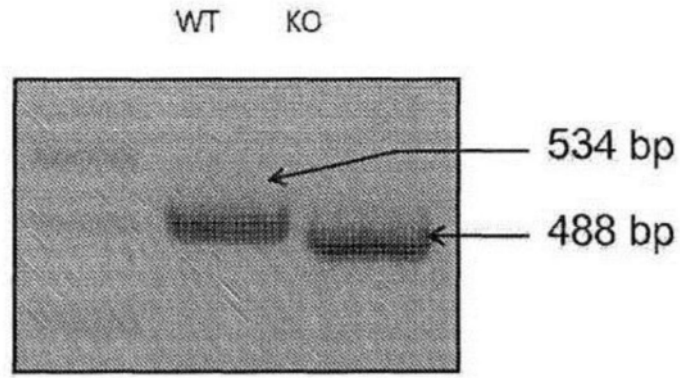


图12D

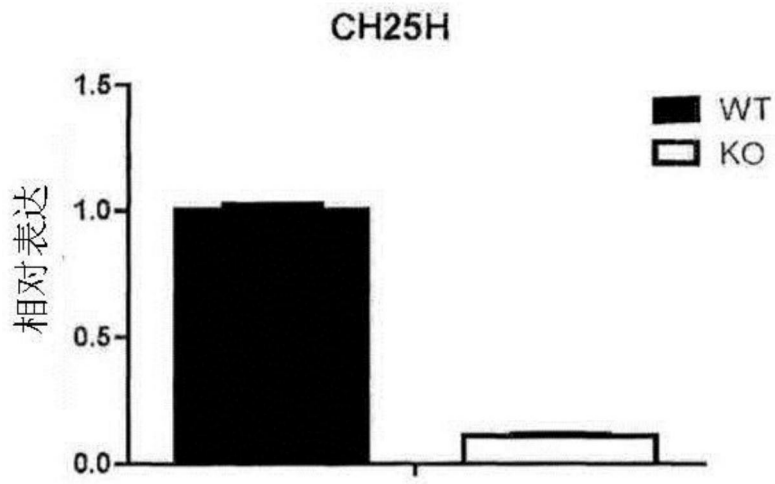


图12E

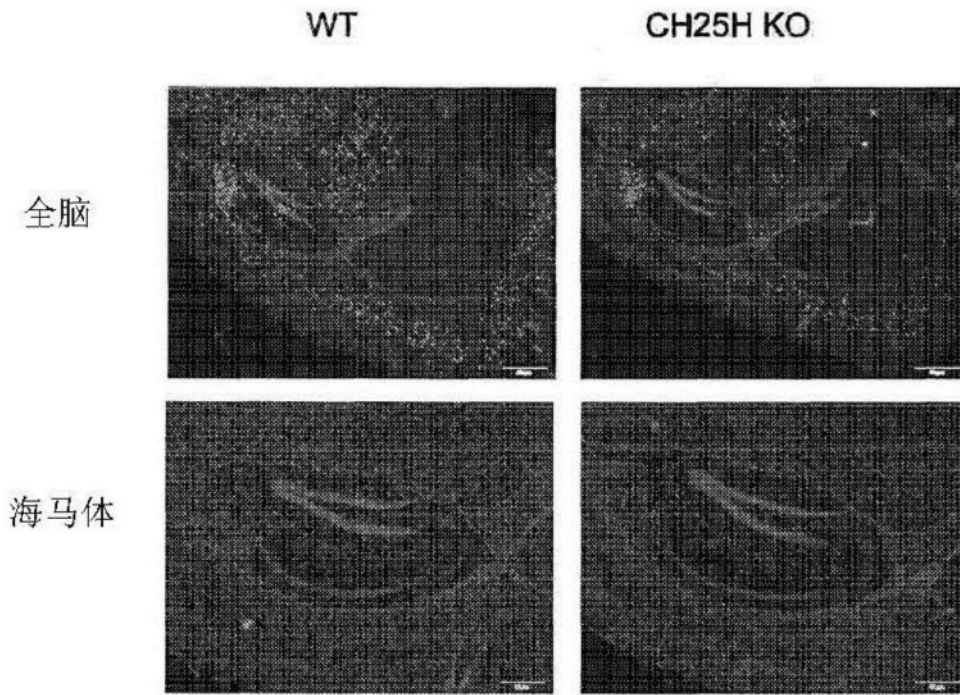


图13A

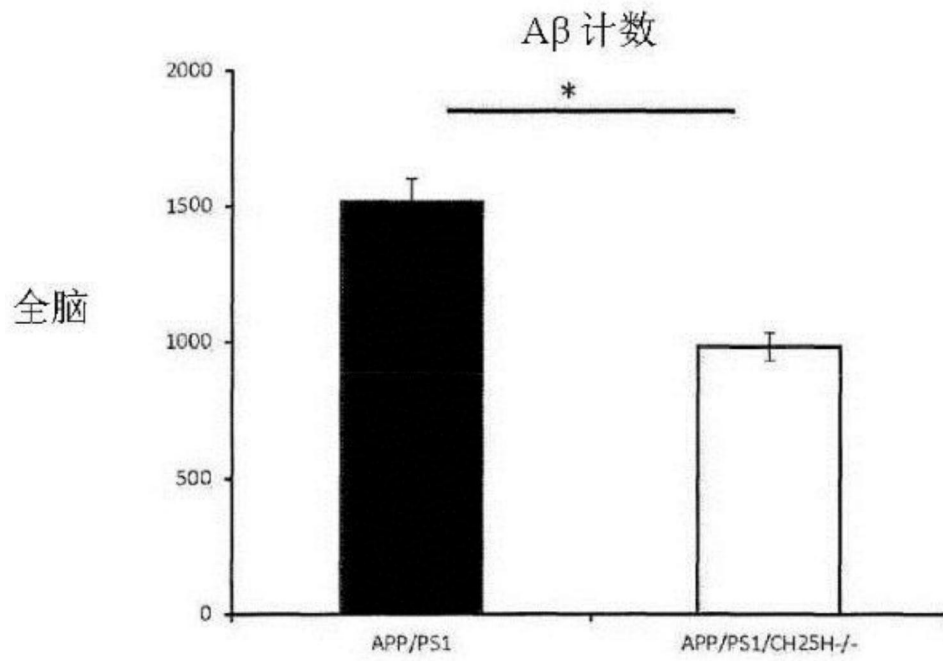


图13B

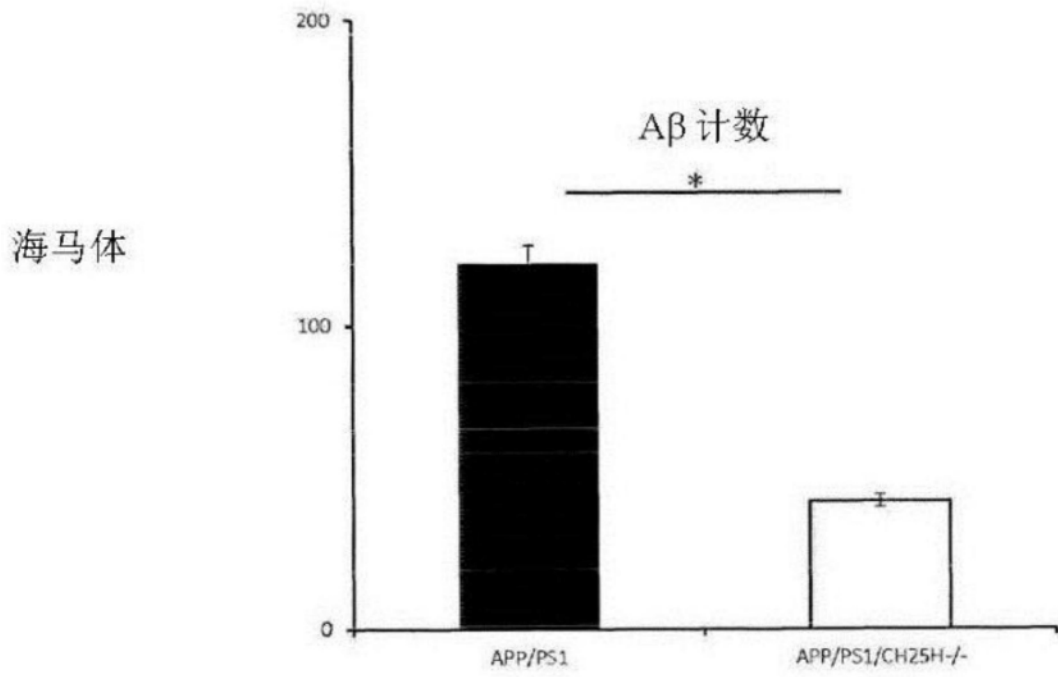


图13C

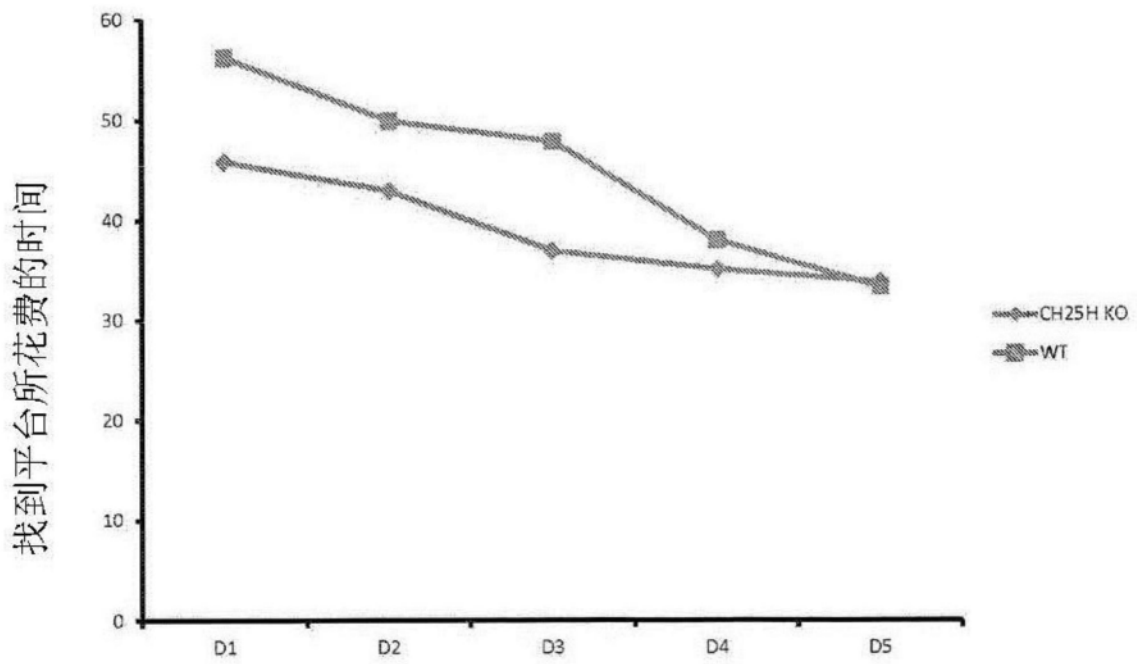


图14

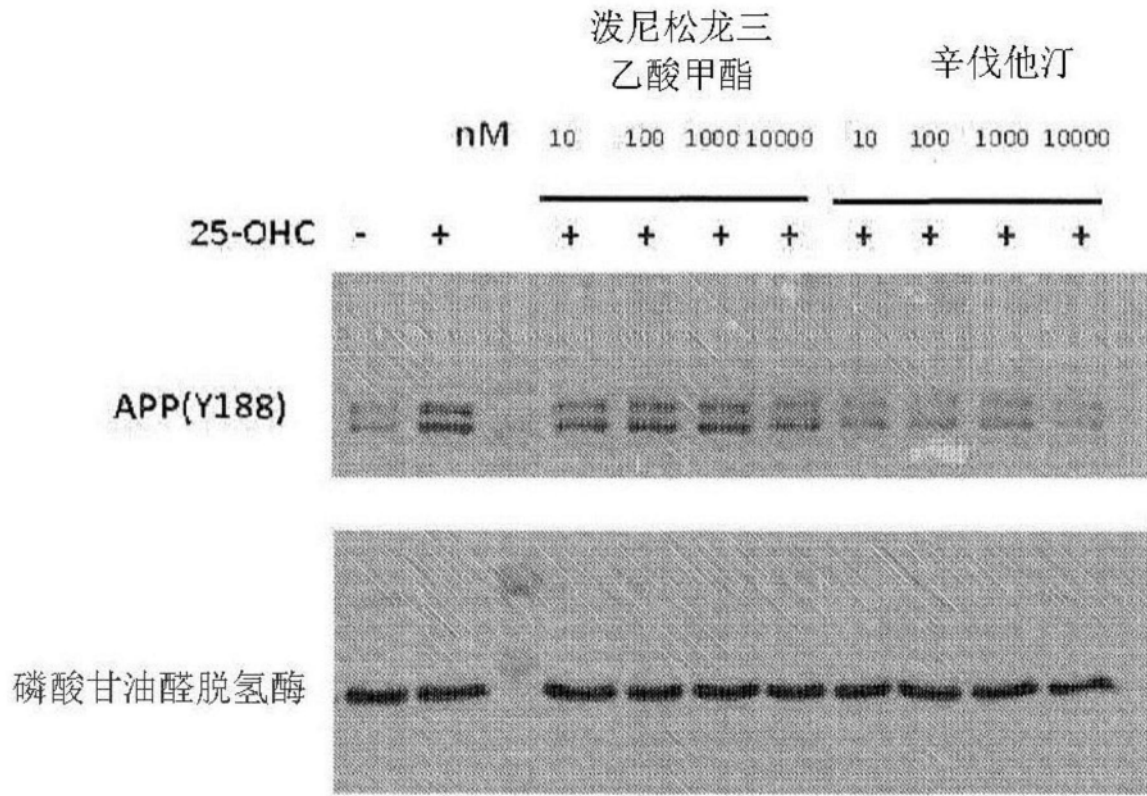


图15

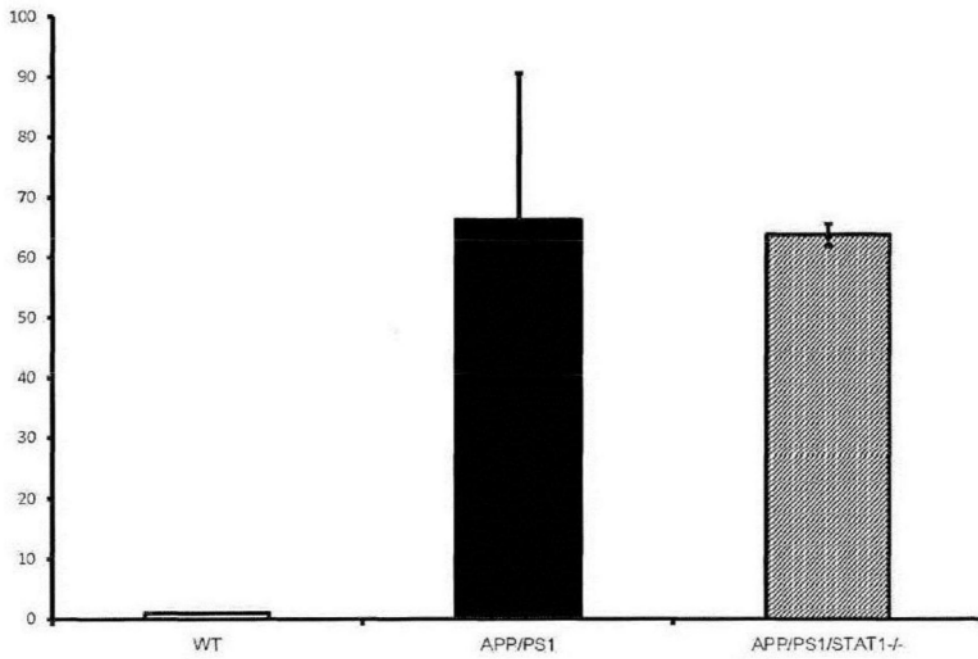


图16A

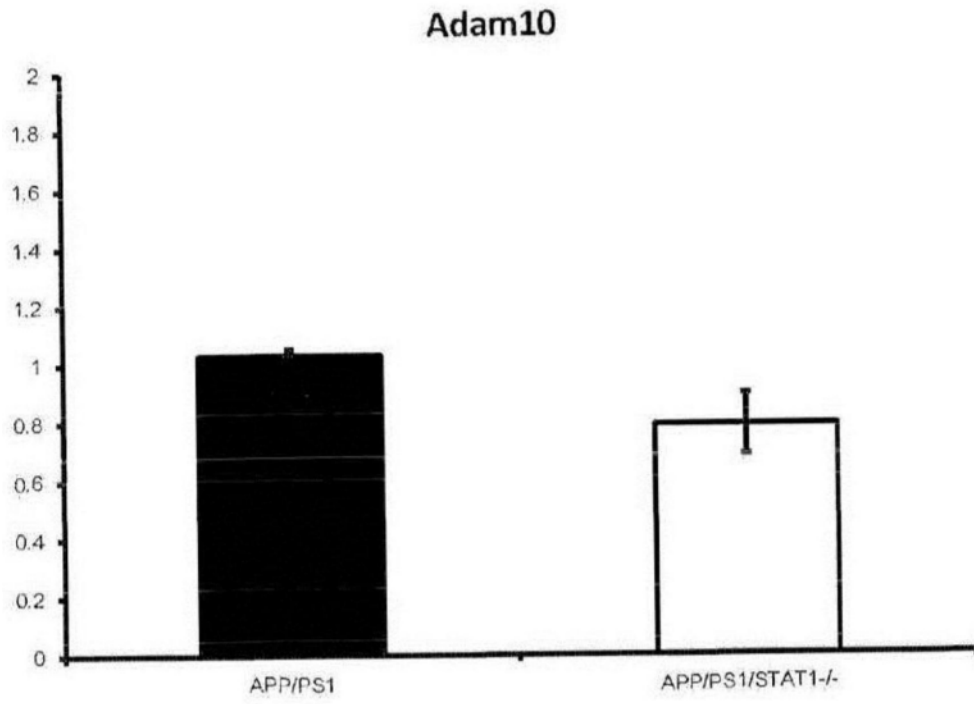


图16B

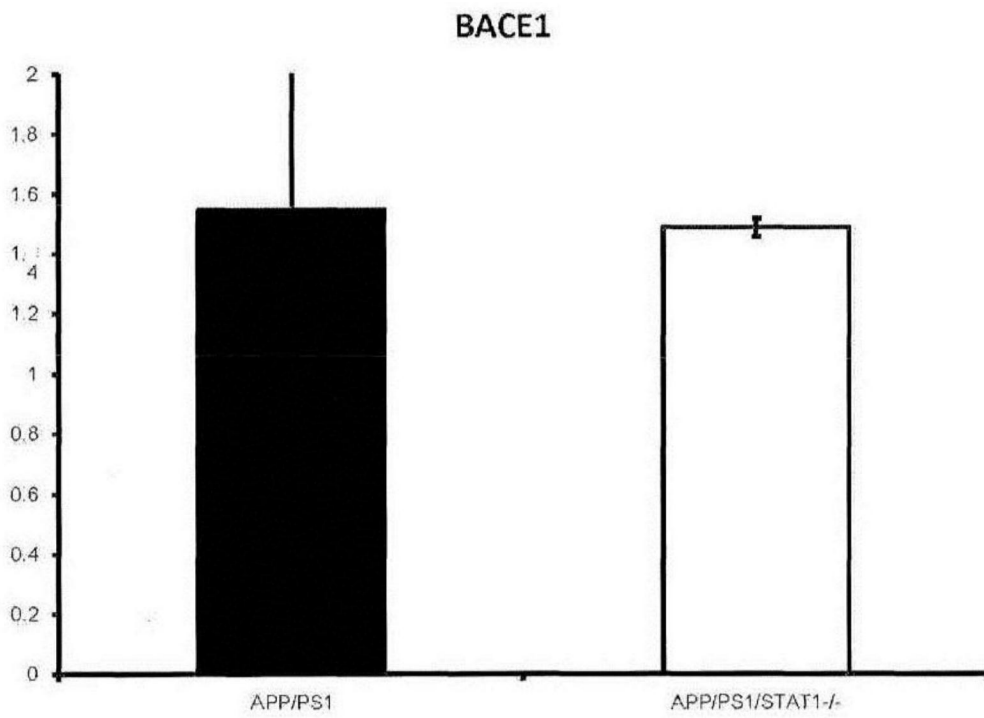


图16C

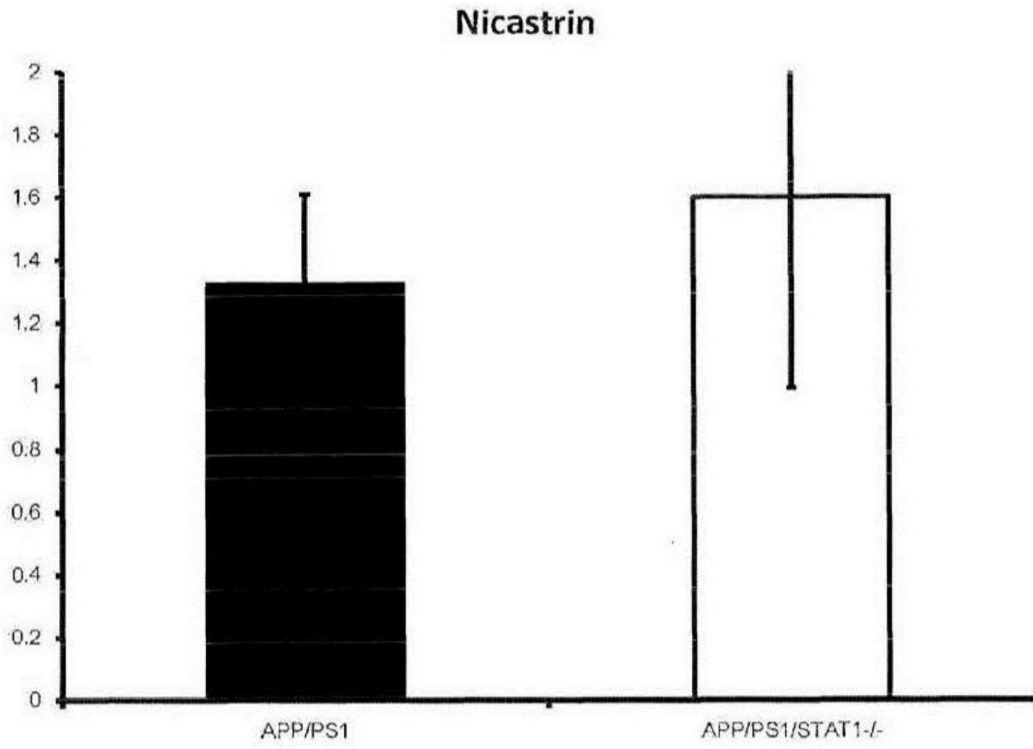


图16D

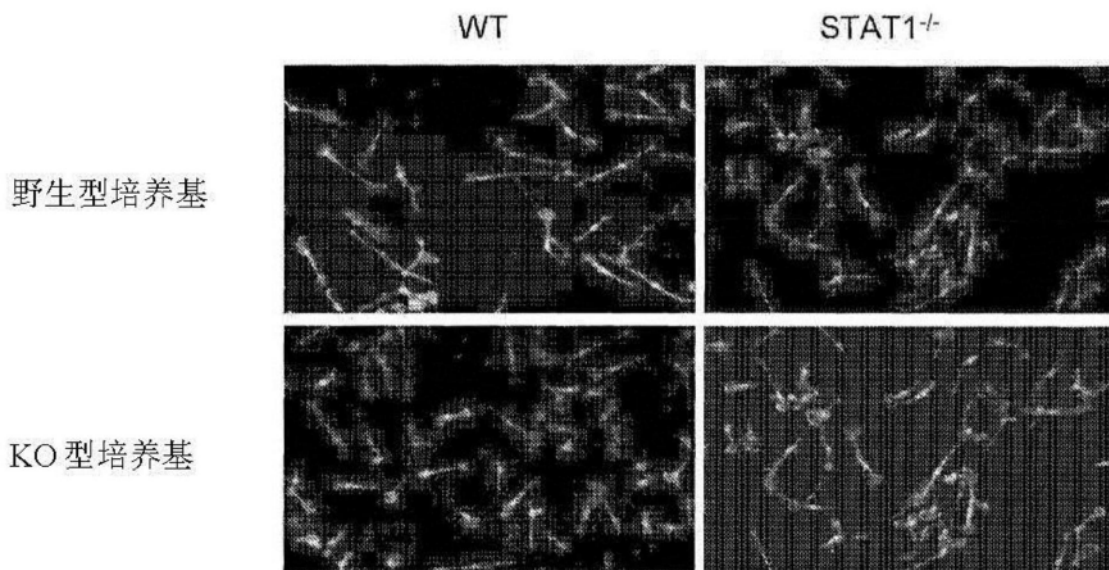


图17A

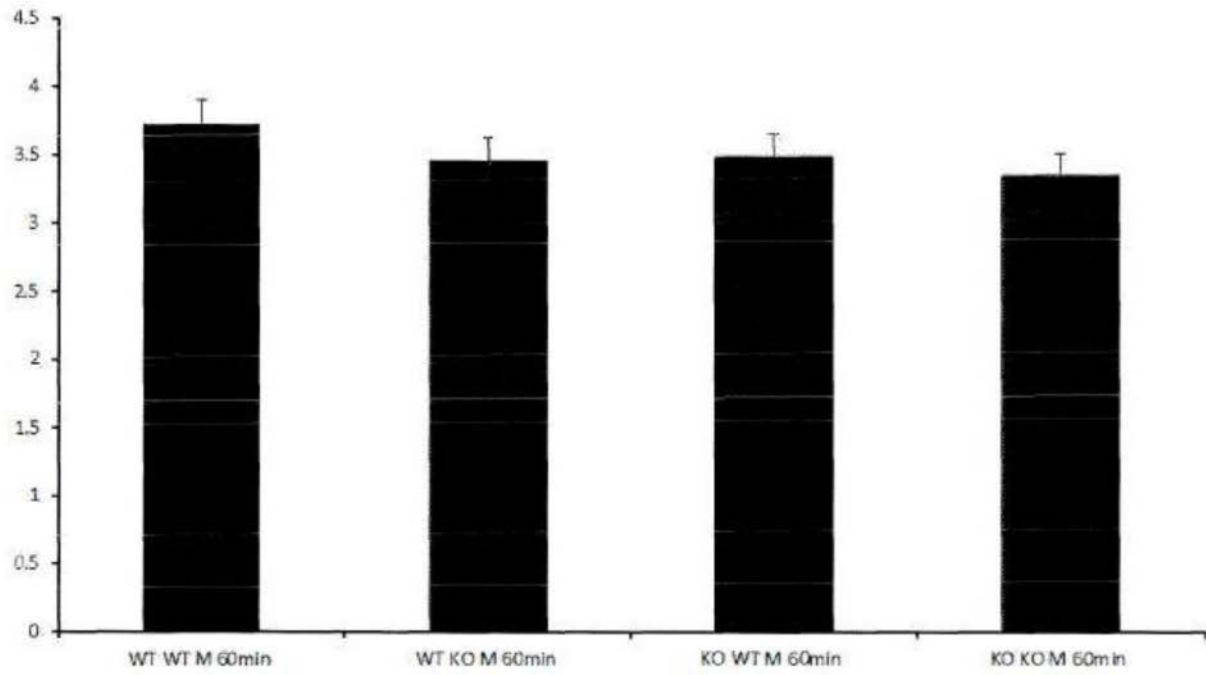


图17B

SV2a

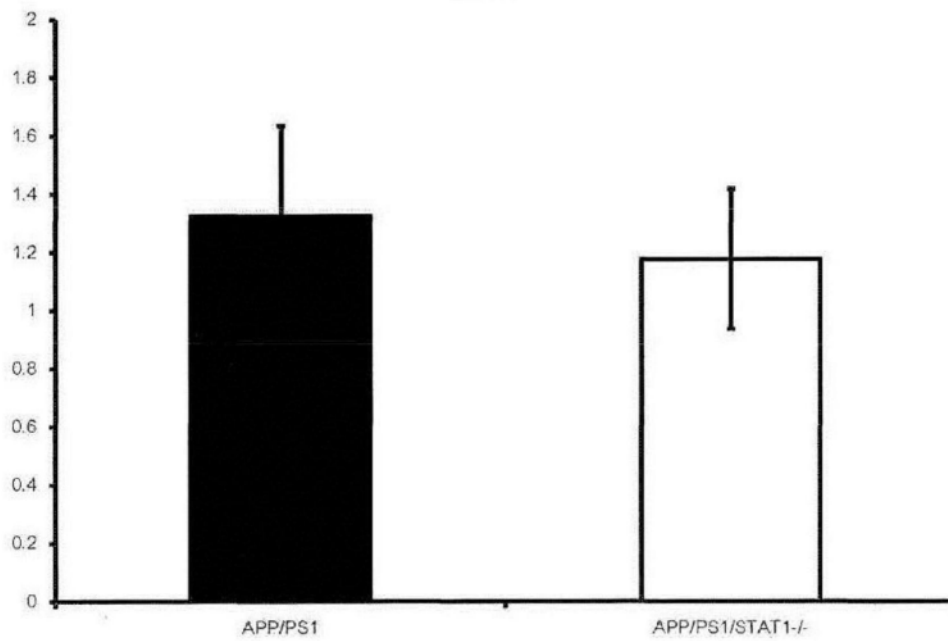


图17C

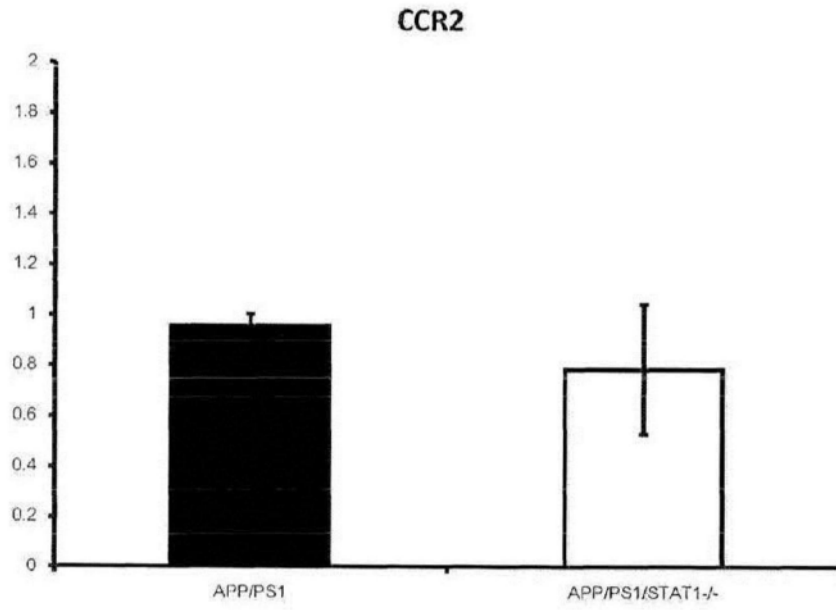


图17D

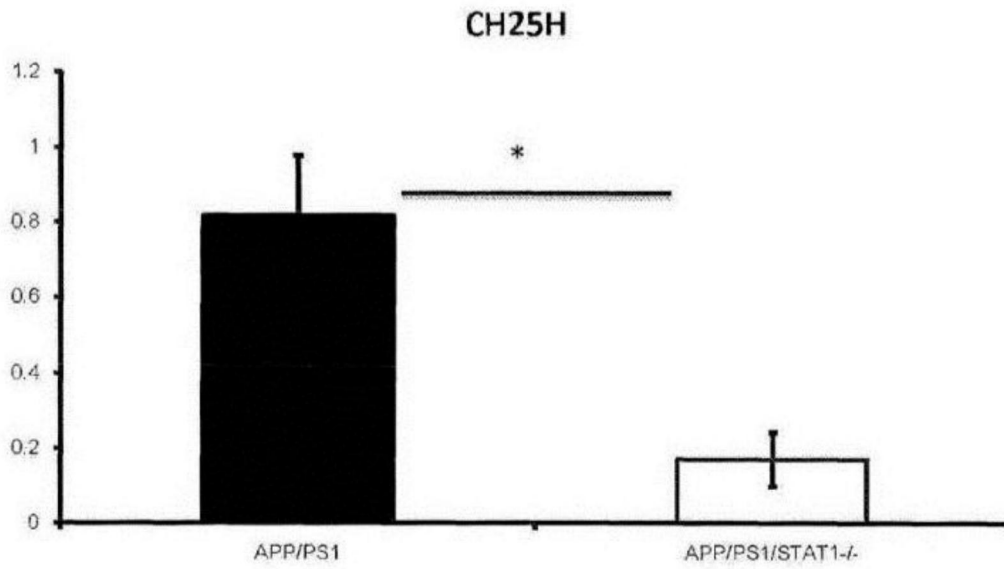


图18A

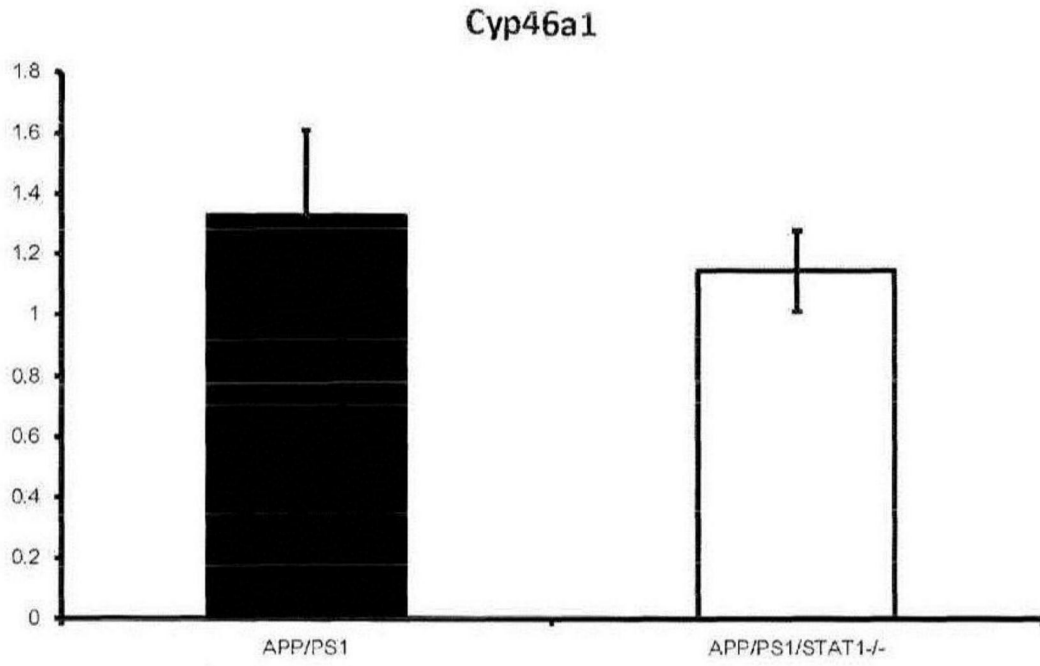


图18B

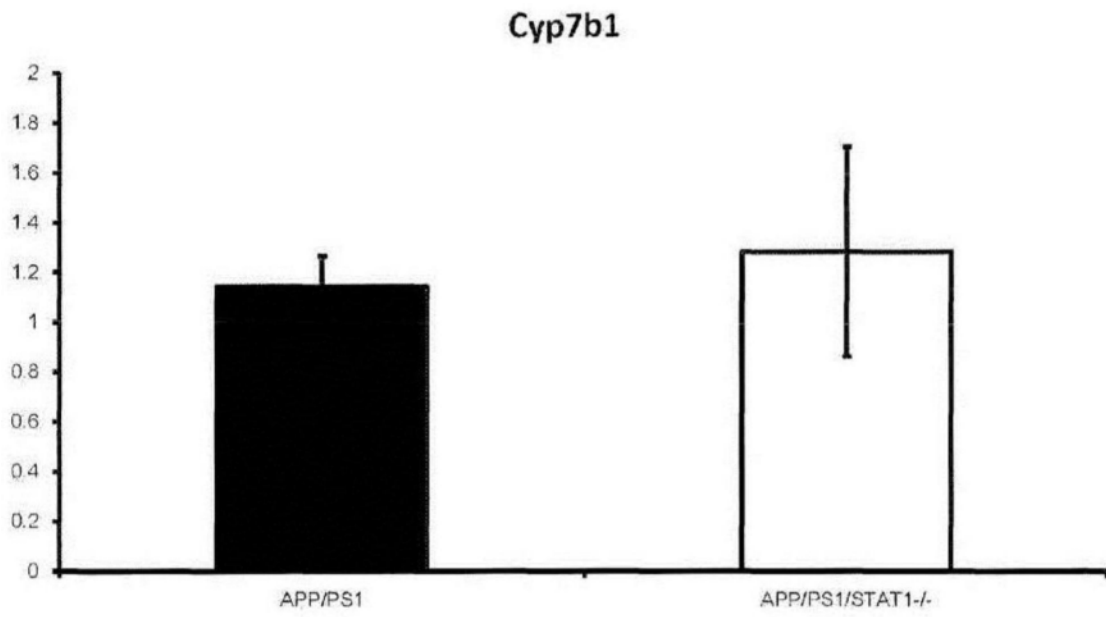


图18C

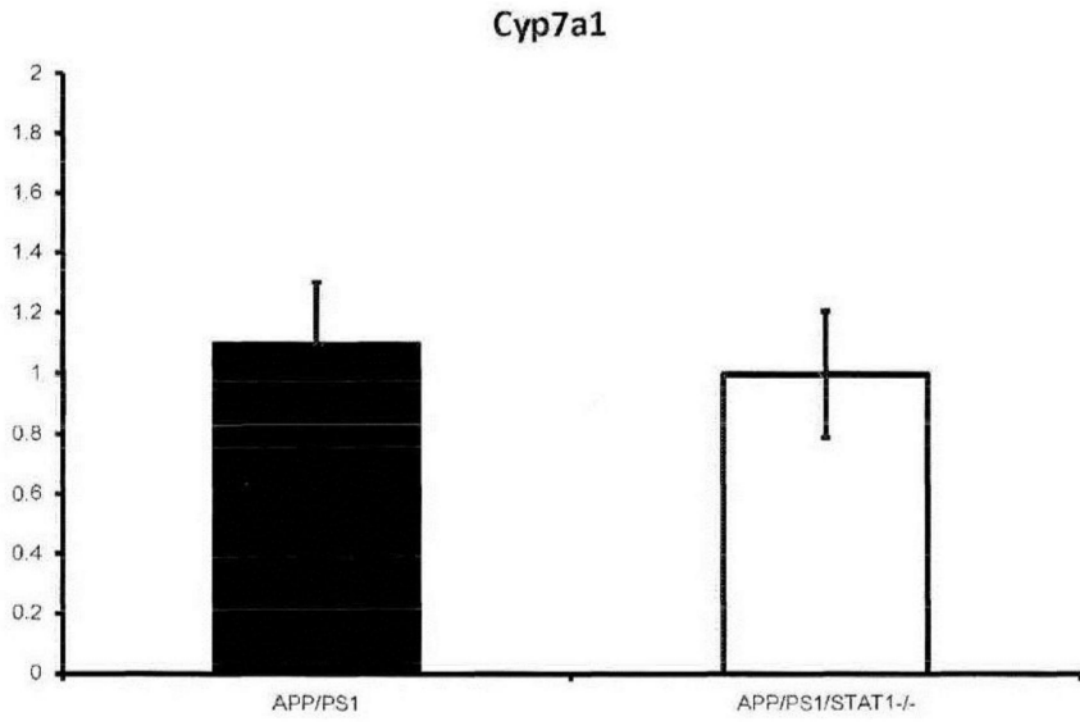


图18D

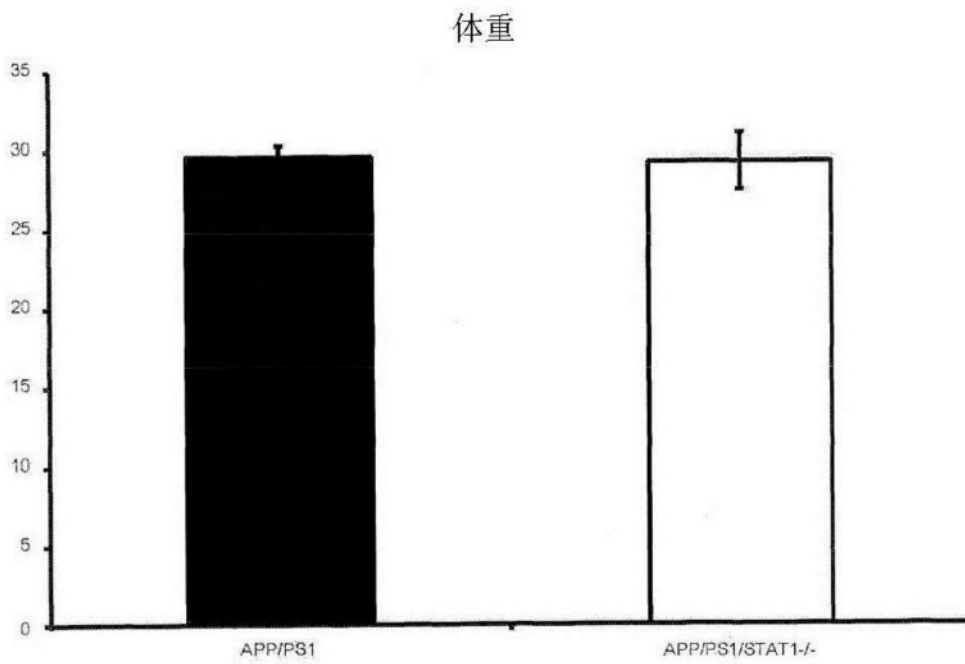


图19A

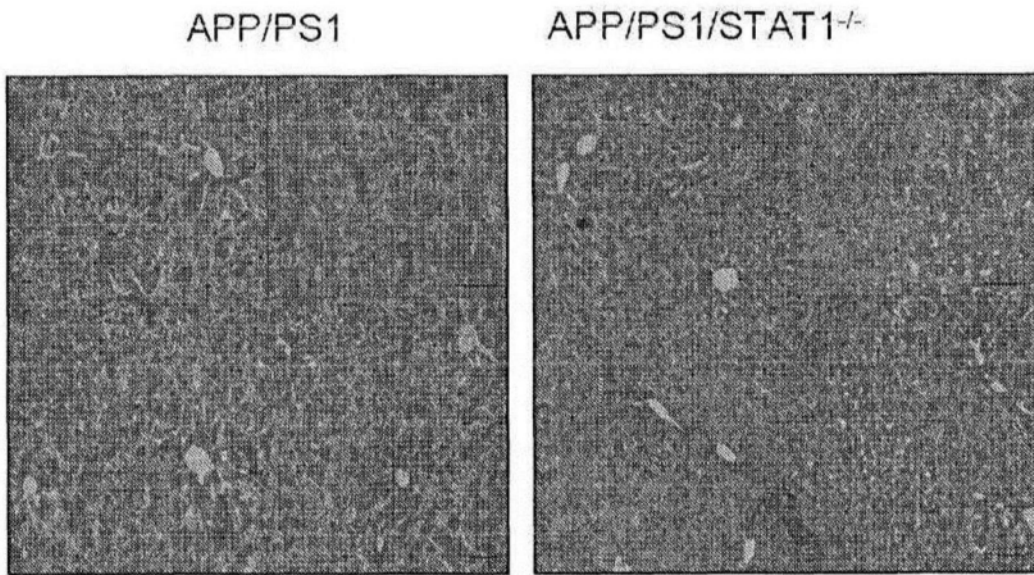


图19B

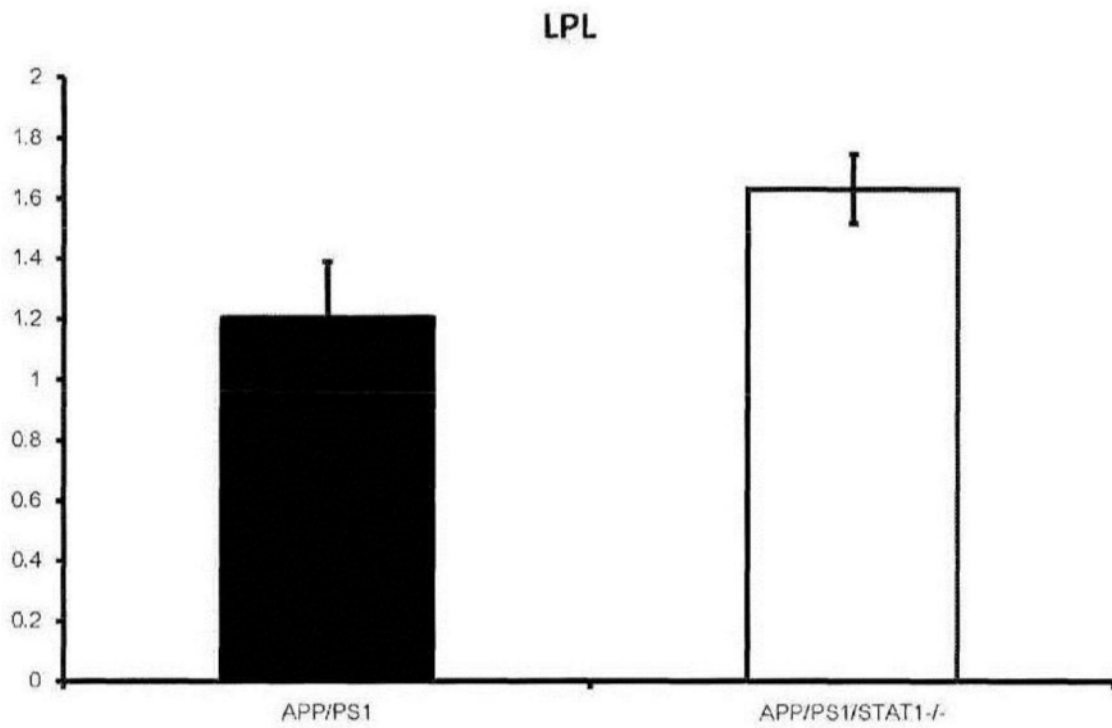


图19C

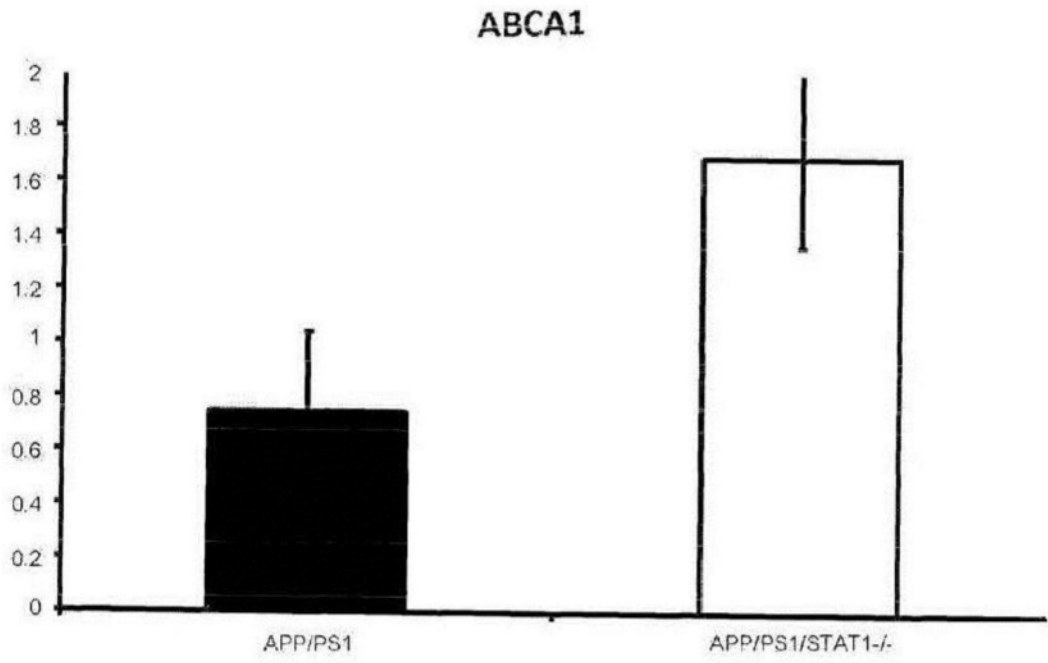


图19D

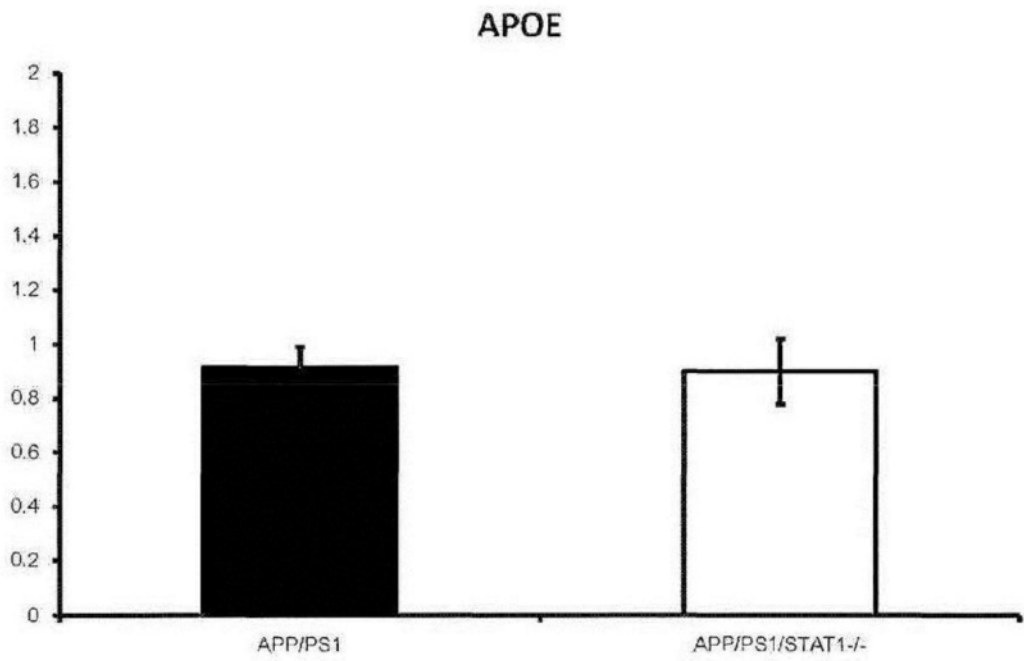


图19E

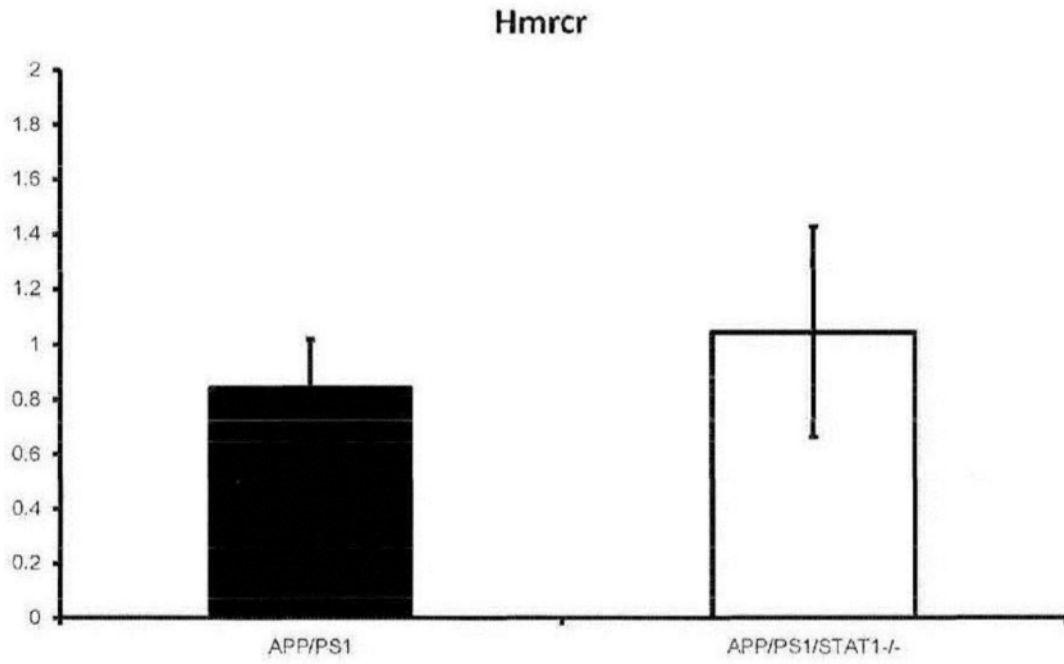


图19F

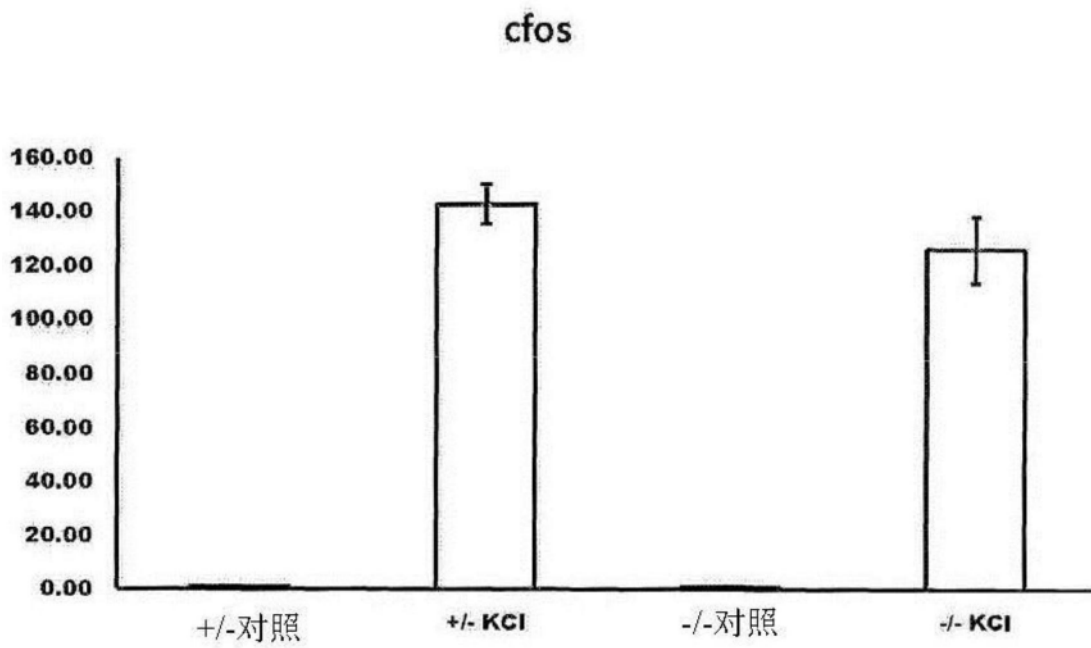


图20A

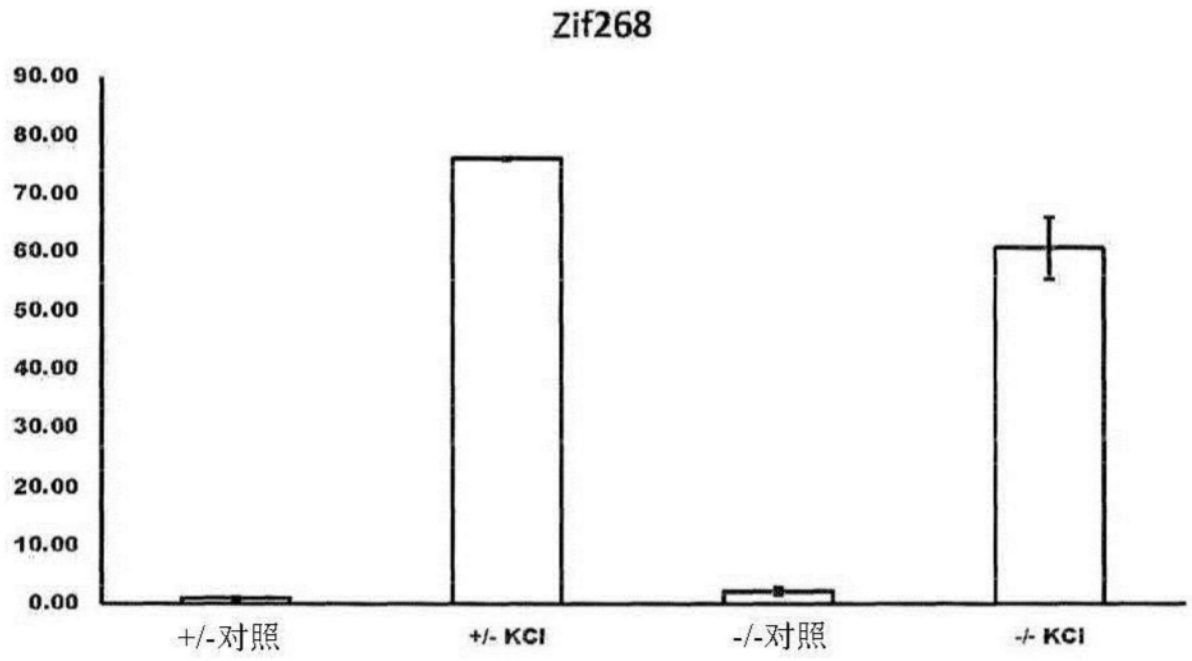


图20B

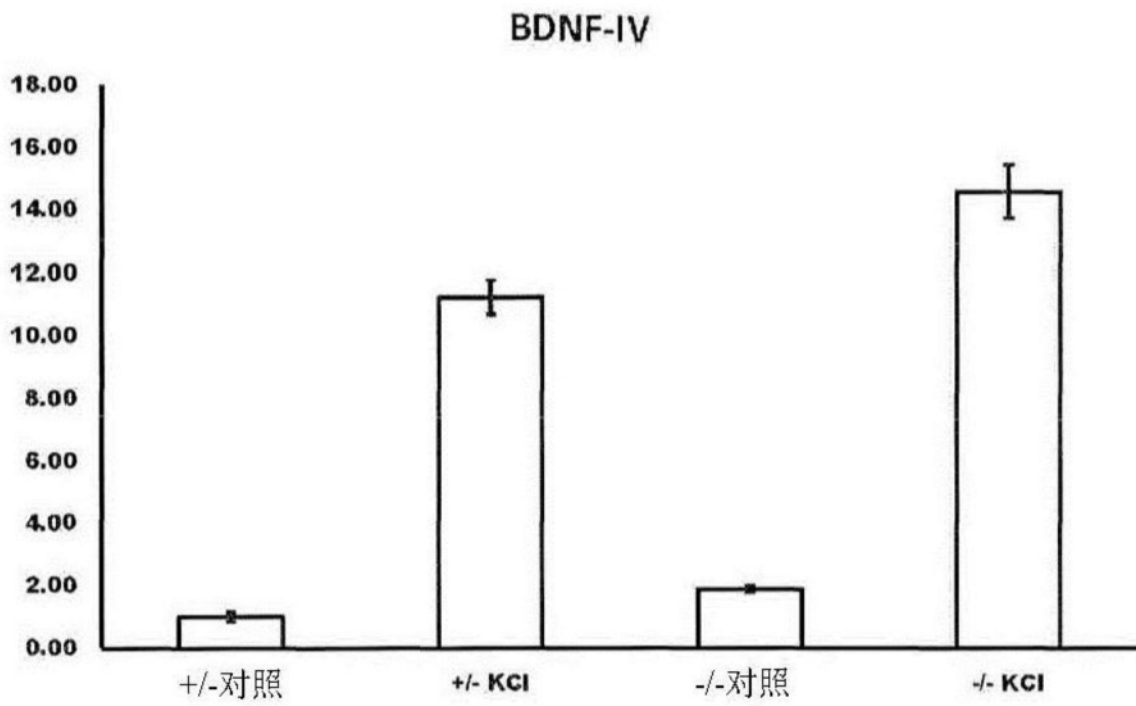


图20C

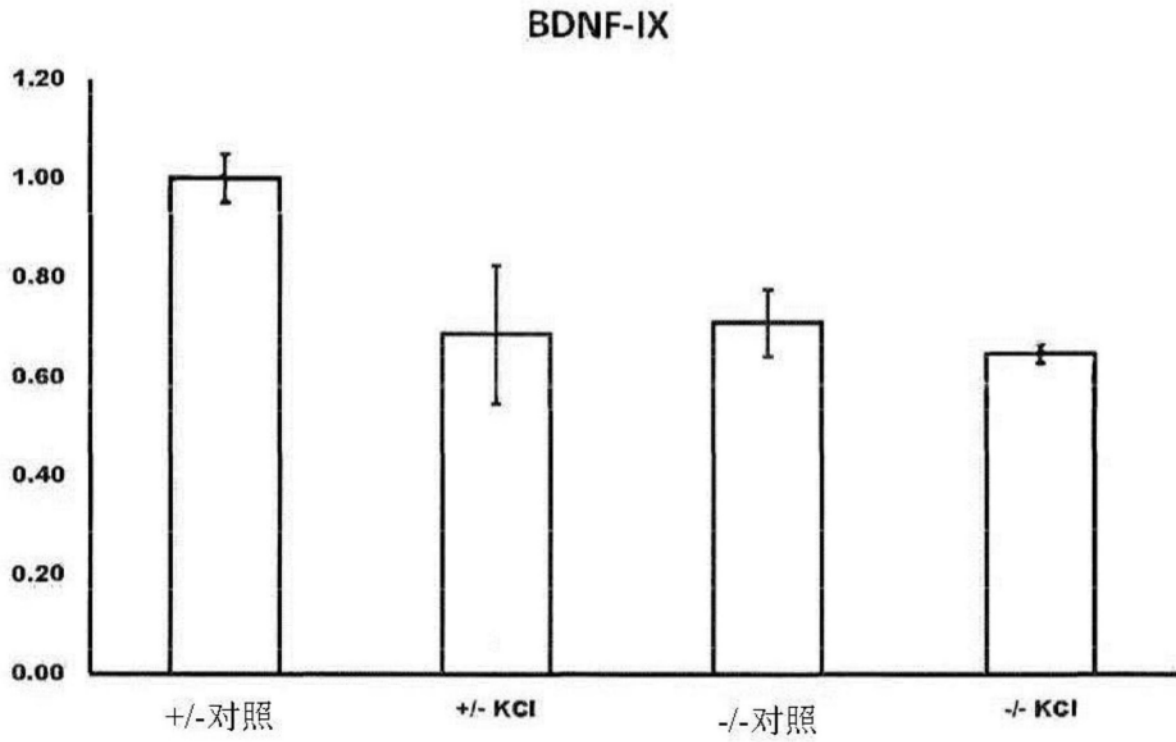


图20D

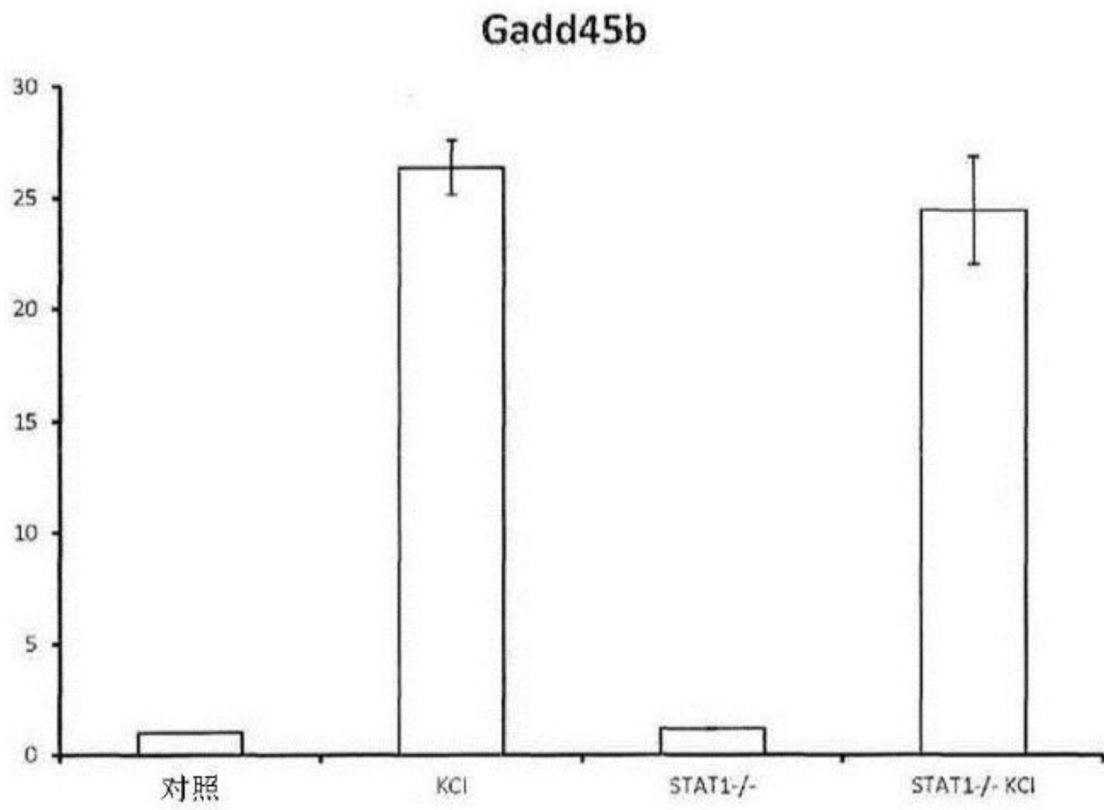


图20E

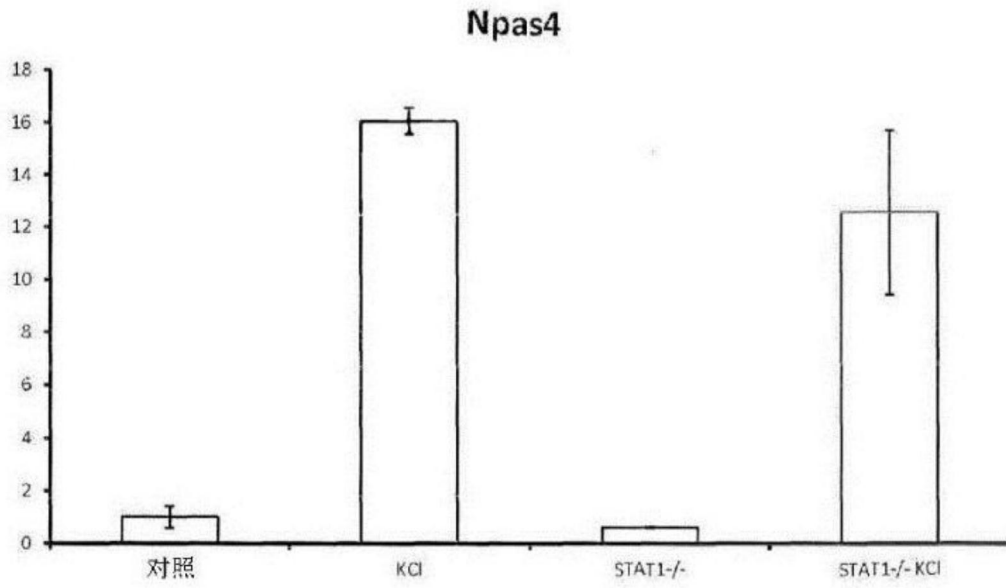


图20F

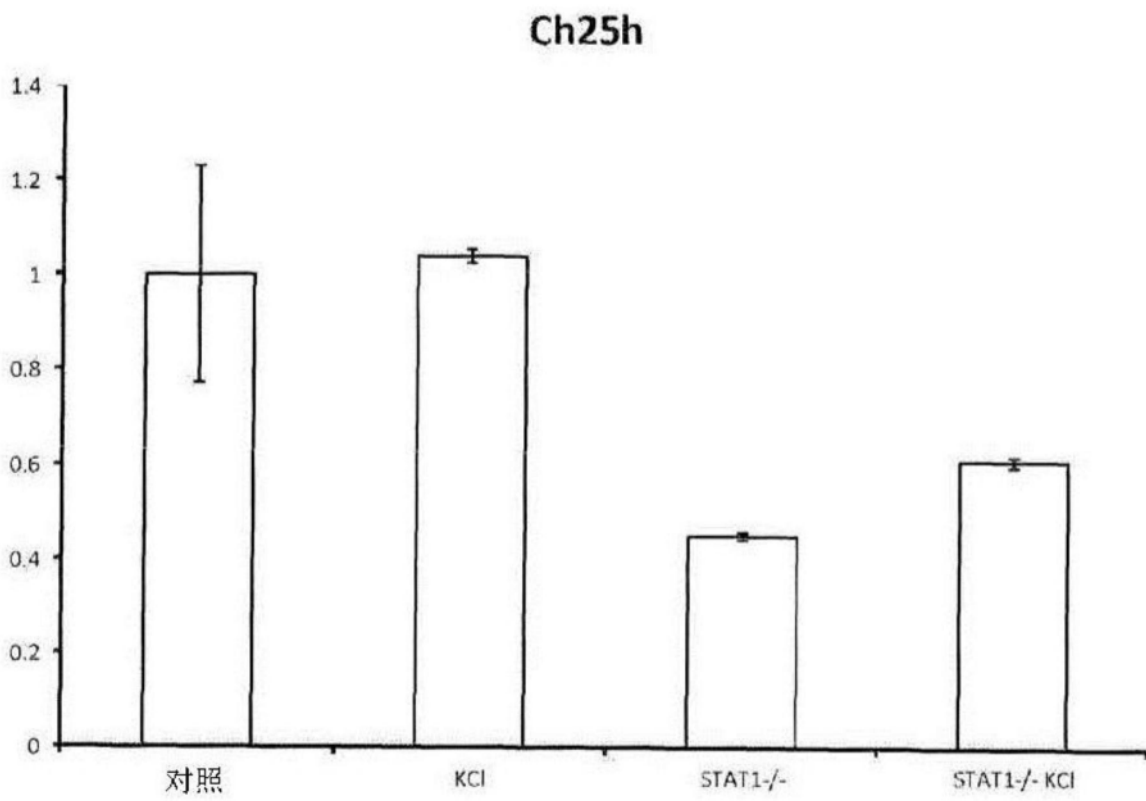


图20G