

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019年7月11日 (11.07.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/134481 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/17 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/120172

(22) 国际申请日: 2018年12月11日 (11.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810002892.7 2018年1月2日 (02.01.2018) CN

(71) 申请人: 上海清流生物医药科技有限公司 (SHANGHAI E-BLOT PHOTOELECTRIC TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼420室, Shanghai 201321 (CN)。

(72) 发明人: 张英豪 (ZHANG, Yinghao); 中国上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼420室, Shanghai 201321 (CN)。 付晶鹏 (FU, Jingpeng);

中国上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼420室, Shanghai 201321 (CN)。

(74) 代理人: 北京联瑞联丰知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING UTC LIANFENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国广东省广州市黄埔区萝岗经济开发区科学大道231-233号A9-A10栋1-4楼黄冠华, Guangdong 510000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: USES OF PROTEIN IN PREPARING DRUG FOR PREVENTING AND TREATING ALZHEIMER'S DISEASE

(54) 发明名称: 一种蛋白在制备预防和治疗痴呆症的药物中的应用

| | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Aβ1-40 (μM) | - | - | - | - | 20 | 20 | 20 |
| Aβ1-42 (μM) | - | 20 | 20 | 20 | - | - | - |
| sDSS1 (μM) | 20 | - | 10 | 20 | - | 10 | 20 |

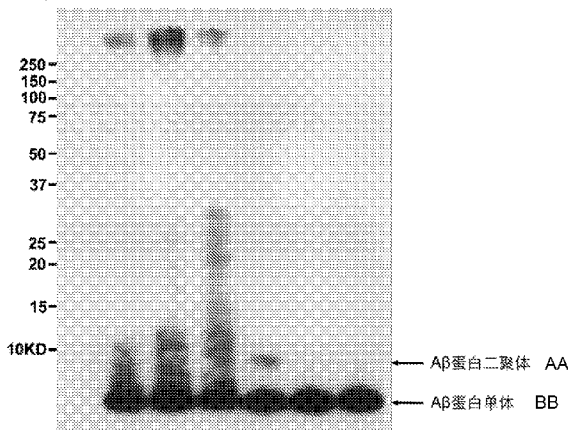


图 1A

AA Aβ dimer
BB Aβ monomer

(57) Abstract: Uses of a protein in preparing a drug for preventing and treating Alzheimer's disease, said protein being an sDSS1 protein used in preparing a drug for preventing neurodegenerative and vascular dementias, or a drug for treating said diseases in the prophase, early, middle and later stages. Said sDSS1 protein interacts with an amyloid β-protein (Aβ) to contribute to Aβ removal while protecting against Aβ toxicity. Moreover, the Aβ deposition is effectively reduced in animals, and the concentration of a soluble Aβ is reduced, leading to disease symptom relief.

(57) 摘要: 一种蛋白在制备预防和治疗痴呆症的药物中的应用, 其是sDSS1蛋白应用于制备退行性痴呆症和血管性痴呆症预防药物, 或这些疾病前期、早期、中期、晚期治疗药物。sDSS1蛋白与Aβ蛋白发生相互作用, 帮助Aβ蛋白清除, 屏蔽Aβ蛋白细胞毒性; 在动物体上有效降低Aβ沉积, 减少可溶性Aβ蛋白浓度并缓解疾病症状。

WO 2019/134481 A1

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

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

一种蛋白在制备预防和治疗痴呆症的药物中的应用

技术领域

本发明内容涉及 sDSS1 蛋白药物在制备预防和治疗痴呆症的药物中的应用,包括用于制备退行性痴呆症和血管性痴呆症的预防药物,或用于制备这些疾病前期、早期、中期或晚期的治疗药物。

背景技术

痴呆症 (Dementia) 是是脑部疾病的一类,此症导致患者思维能力和学习记忆力长期而逐渐地退化,最常见的痴呆症是阿尔兹海默病 (Alzheimer's Disease, AD),占痴呆症患者的 50-70%,其他还包括血管性痴呆症 (~25%)、路易氏体型痴呆症 (~15%) 等。国际阿尔茨海默症协会 (Alzheimer's Disease International) 2015 年公布的数据显示,全球痴呆症人数大约 4680 万人,2030 年全球患者预计将达到 7500 万[1]。AD 是一种典型的神经退行性疾病,临床表现为进行性学习记忆功能降低和神经系统损伤。AD 患者典型病理特征是神经组织中出现 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 斑块和 tau 蛋白沉积。 β 淀粉样蛋白假说认为神经组织中 $A\beta$ 蛋白产生和清除失衡导致的毒性蛋白进行性堆积及由此引起的突触功能紊乱、神经元死亡是导致疾病的关键机制[2][3]。基于 β 淀粉样蛋白假说,研究人员希望通过药物抑制 $A\beta$ 蛋白的生成和聚集,或者促进 $A\beta$ 清除,从而达到预防或治疗疾病的目的[4]。基于动物实验的 AD 研究结果表明,抗体[5][6]、多肽类药物[7]、小分子类药物[8]可以阻断 $A\beta$ 聚集或生成,减少斑块形成,减轻动物疾病指征。因此,药物抑制并清除 $A\beta$ 病理性沉积或可成为治疗 AD 的有效途径。

过去十几年来,包括礼来、阿斯利康、强生、辉瑞、罗氏在内的数十家医药企业投入数百亿美元研发 AD 治疗药物,然而进展并不顺

利，可见 AD 治疗药物开发的困难性与复杂性。礼来公司 (Lily) 以 A β 蛋白为靶点单抗药物 solanezumab，在 III 期临床实验中显示能够减缓 34% 中期 AD 患者的认知能力下降以及 18% 患者的行为能力下降，但是受广泛的副作用、综合效应评价不具有统计学差异等因素影响，该药物于 2016 年 12 月宣布失败。百健 (Biogen) 2018 年 7 月公布的 Ib 期临床实验研究表明，针对 A β 蛋白的实验性单抗药物 aducanumab 能够减少患者大脑中的 β 淀粉样蛋白，并且能够显著改善患者的认知水平。百健和卫材 (Eisai) 2018 年 11 月公布的针对 A β 蛋白的另一个单抗 BAN2401 的 II 期临床实验也取得显著的临床效果。此外，2017-2018 年，国际药业巨头，如罗氏、礼来、阿斯利康、默沙东各自宣布了针对 AD 疾病的新药开发计划，由此可见医药产业界对 AD 疾病的重点关注。

Shfm1 (split hand/split foot malformation type 1) 基因是人蟹爪病中的关键基因之一，进化上高度保守，其编码的蛋白 DSS1 参与到稳定基因组、同源基因重组、DNA 损伤修复和细胞增殖等过程 [9-12]。本专利发明人的研究结果显示 DSS1 蛋白作为标签可以通过耗能的酶促反应添加到氧化蛋白上，帮助细胞清除氧化蛋白 [13]。这些结果显示 DSS1 蛋白在生物活动中的重要作用。

以上内容的引文如下：

1. Alzheimer's Disease International (2016) World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia, an analysis of prevalence, incidence, cost and trends.
2. Gupta A, Iadecola C (2015) Impaired A β clearance: a potential link between atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7:115.
3. Bu XL, Xiang Y, Jin WS, Wang J, Shen LL, Huang ZL, Zhang K, Liu YH, Zeng F, Liu JH, Sun HL, Zhuang ZQ, Chen SH, Yao XQ,

Giunta B, Shan YC, Tan J, Chen XW, Dong ZF, Zhou HD, Zhou XF, Song W, Wang YJ (2017) Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies. *Mol Psychiatry*. [Epub ahead of print]

4. Citron M. (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 9(5):387-98.

5. Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, Maguire RP, Blennow K, Lundmark J, Staufenbiel M, Orgogozo JM, Graf A (2012) Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol* 11(7):597-604.

6. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M1, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537:50–56.

7. Chang L, Cui W, Yang Y, Xu S, Zhou W, Fu H, Hu S, Mak S, Hu J, Wang Q, Ma VP, Choi TC, Ma ED, Tao L, Pang Y, Rowan MJ, Anwyl R, Han Y, Wang Q (2015) Protection against β -amyloid-induced synaptic and memory impairments via altering β -amyloid assembly by bis(heptyl)-cognitin. *Sci Rep* 5:10256.

8. Kim HY, Kim HV, Jo S, Lee CJ, Choi SY, Kim DJ, Kim Y (2015) EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid- β oligomers and plaques. *Nat Commun* 6:8997.

9. Van Silfhout AT, van den Akker PC, Dijkhuizen T, Verheij JB, Olderode-Berends MJ, Kok K, Sikkema-Raddatz B, van Ravenswaaij-Arts CM (2009) Split hand/foot malformation due to chromosome 7q aberrations (SHFM1): additional support for functional haploinsufficiency as the causative mechanism. *Eur J Hum Genet* 17(11):1432-8.
10. Li J, Zou C, Bai Y, Wazer DE, Band V, Gao Q (2006) DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene* 25:1186–1194.
11. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer WD (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered singlestranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17:1260–1262.
12. Zhou Q, Kojic M, Cao Z, Lisby M, Mazloum NA, Holloman WK (2007) Dss1 interaction with Brh2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Mol Cell Biol* 27:2512–2526.
13. Zhang Y, Chang FM, Huang J, Junco JJ, Maffi SK, Pridgen HI, Catano G, Dang H, Ding X, Yang F, Kim DJ, Slaga TJ, He R, Wei SJ (2014) DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells. *Protein Cell* 5(2):124-40.

发明内容

A β 蛋白过度蓄积是 AD 发病的关键因素之一，通过药物清除 A β 或抑制 A β 聚集是治疗 AD 疾病的主要途径之一。本发明提供的 sDSS1 蛋白可以与 A β 蛋白结合从而加速 A β 蛋白清除，减少 A β 蛋白过度蓄积，改善疾病症状，具备用于制备临床上 AD 及其他痴呆症预防药物和治疗药物的潜力。

具体的技术方案如下：

一种蛋白在制备预防和治疗痴呆症的药物中的应用,所述的应用是把 sDSS1 蛋白用于制备痴呆症预防药物和治疗药物。

优选地,所述的痴呆症是指退行性痴呆症,包括早老性痴呆症、老年性痴呆症、路易氏体型痴呆症、额颞叶型痴呆症。

优选地,所述的痴呆症是血管性痴呆症。

优选地,所述的痴呆症是痴呆前期痴呆症、轻度痴呆期痴呆症、中度痴呆期痴呆症、重度痴呆期痴呆症。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白包括人、黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、白颊长臂猿、川金丝猴、恒河猴、滇金丝猴、东非狒狒、安哥拉疣猴、白顶白眉猴、鬼狒、豚尾猴中的任一 sDSS1 蛋白序列形成的基础蛋白,其中人 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1,黑猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2,倭黑猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3,大猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4,红毛猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5,白颊长臂猿 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6,川金丝猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7,恒河猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8,滇金丝猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9,东非狒狒 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10,安哥拉疣猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11,白顶白眉猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12,鬼狒 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13,豚尾猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是与所述的基础蛋白相似度达到 70% 以上的第一种蛋白。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是以所述的基础蛋白的氮端 58 个氨基酸为基础,在氮端或碳端融合其他多肽片段,用于融合的多肽片段的结构特征或氨基酸序列特征与所述的基础蛋白的碳端 31 个序列相同或相似的第二种蛋白。

优选地，所述的 sDSS1 蛋白是以所述的基础蛋白的氮端 58 个氨基酸为基础，在氮端或碳端融合其他氨基酸片段，融合后的蛋白能实现跨膜转运功能的第三种蛋白。

优选地，所述的 sDSS1 蛋白是利用所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白或第三种蛋白与该种蛋白自身、载体蛋白、抗体或其他任意长度氨基酸片段连接形成的融合蛋白。

优选地，所述的 sDSS1 蛋白是所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白进行的修饰产生的多肽/蛋白修饰物。

优选地，所述多肽/蛋白修饰物是针对氨基酸侧链上的氨基、氨基酸侧链上的羰基、氮末端氨基、碳末端羰基、半胱氨酸、酪氨酸、丝氨酸、色氨酸进行的特异性或非特异性的 1-20 个位点的化学修饰。

优选地，所述多肽/蛋白修饰物的修饰方法包括糖基化修饰、脂肪酸修饰、酰基化修饰、Fc 片段融合、白蛋白融合、聚乙二醇修饰、右旋糖苷修饰、肝素修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、聚氨基酸修饰、多聚唾液酸修饰、壳聚糖及其衍生物修饰、凝集素修饰、海藻酸钠修饰、卡波姆修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、羟丙基甲基纤维素修饰、羟丙基纤维素修饰、乙酰化修饰、甲酰化修饰、磷酸化修饰、甲基化修饰、磺酸化修饰以及其他医药上可用的多肽/蛋白药物修饰方法的一种或一种以上。

优选地，所述的 sDSS1 蛋白是利用所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的氨基酸序列为基础进行的 20 种基本氨基酸以外的氨基酸进行的 1-31 个任意氨基酸位点替换的非天然氨基酸替代蛋白。

优选地,所述的非天然氨基酸替代蛋白的氨基酸替换包括替换成羟脯氨酸、羟赖氨酸、硒代半胱氨酸、D-型氨基酸或者人工合成的非天然氨基酸及其衍生物。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是把所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或非天然氨基酸替代蛋白与医药上可应用的药物载体形成的部分或全部复合体。

优选地,所述复合体的药物载体包含肠溶衣制剂、胶囊、微球/囊、脂质体、微乳液、复乳液、纳米颗粒、磁颗粒、明胶和凝胶中的一种或一种以上。

优选地,所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或复合体发挥屏蔽毒性蛋白毒性的起始工作浓度为不小于 0.2 μ g/mL。

优选地,所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或复合体发挥屏蔽毒性蛋白毒性的摩尔浓度比率为不小于 0.010; 所述摩尔浓度比率是指反应体系中蛋白、多肽/蛋白修饰物或复合体的摩尔浓度与毒性蛋白摩尔浓度的比率。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是以个体自身 sDSS1 蛋白为靶点,通过外源药物影响个体自身 sDSS1 蛋白的水平。

优选地,所述的药物是以 sDSS1 蛋白、sDSS1 蛋白的基因、sDSS1 的基因的调控元件或 sDSS1 的基因的转录产物为药物作用靶点。

优选地,所述的药物是通过影响血液或脑脊液中蛋白酶/肽酶活性从而调节 sDSS1 蛋白在血液或脑脊液中的含量。

优选地,所述的药物是化学小分子药物、抗体、多肽/蛋白药物、核酸药物或纳米药物形成的第一种药物。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、复合体、第一种药物中的任一种成分的两种或多种的组合形成的第二种药物。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物中的任一种成分的一种、两种或多种与医药上可用的赋形剂的组合形成的第三种药物。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是通过表达体系把编码所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的核苷酸序列导入体内并表达获得的第四种蛋白。

优选地,所述的表达体系是真核表达质粒载体、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、杆状病毒、疱疹病毒、伪狂犬病毒、ZFN 基因编辑技术、TALEN 基因编辑技术、CRISPR/Cas 基因编辑技术或其他医疗上可用的基因编辑技术或病毒载体。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是通过移植细胞在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第五种蛋白。

优选地,所述的细胞是任意一种人的干细胞、前体细胞或成体细胞。

优选地,所述的干细胞是胚胎干细胞、诱导多能干细胞、转分化得到的细胞,或者来源于原代培养的干细胞、由母细胞分化得到的多能或单能干细胞。

优选地,所述的 sDSS1 蛋白是通过移植组织或器官在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第六种蛋白。

优选地，所述的组织是脑、肝、肾、脾、胰岛的完整器官或部分组织块，或血液、脂肪、肌肉、骨髓、皮肤。

优选地，所述的 sDSS1 蛋白是通过血清、脑脊液、组织间液输注引入个体体内的第七种蛋白。

优选地，所述的预防药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物、第二种药物、第三种药物、在表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

优选地，所述的治疗药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物、第二种药物、第三种药物、在表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

本发明的特点和/或有益效果有：

1. 本发明提供的 sDSS1 蛋白与 A β 蛋白结合，抑制 A β 蛋白聚集并降低 A β 蛋白与其受体蛋白的结合能力，有效缓解 A β 蛋白引起的细胞毒性。

2. 本发明提供的 sDSS1 蛋白可以加速小胶质细胞清除 A β 蛋白，并且屏蔽 A β 寡聚物毒性，减少 A β 寡聚物引起的小胶质细胞激活。

3. 本发明提供的 sDSS1 蛋白在 CL4176 线虫上显著改善 AD 模型线虫的疾病症状，降低线虫组织中 A β 蛋白的蓄积。

4. 本发明提供的 sDSS1 蛋白帮助小鼠清除 A β ，减少血液中 A β 水平。给 AD 模型 APP/PS1 小鼠长时间注射 sDSS1 蛋白可以有效减少脑组织中 A β 斑块沉积。

5. 本发明提供的 sDSS1 蛋白是人和其他灵长类动物所具有的

蛋白，分子量相对较小，免疫原性低，并且体内存在天然的蛋白降解机制，因此，临床应用不会引起明显的免疫反应或其他的毒副效应，安全可靠。

综上，本发明提供了一种用于痴呆症治疗的 sDSS1 蛋白药物，通过分子水平、细胞水平和动物水平的实验验证，sDSS1 蛋白可以与 A β 蛋白结合，抑制 A β 聚集，降低 A β 蛋白与受体的结合效率，促进小胶质细胞清除 A β 并减少小胶质细胞激活。在动物实验中，sDSS1 蛋白促进血液中 A β 清除，减少组织中 A β 蛋白的过渡蓄积，缓解疾病症状。sDSS1 蛋白免疫原性较低，药效显著，具备用于临床上制备痴呆症预防药物，或者用于制备治疗前期、早期、中期、晚期痴呆症药物的潜力。

附图说明

下面结合附图，对本发明做进一步详细的阐述，以使本发明能够清楚、完整，但不是为了限制本发明的保护范围。

图 1A-图 1B. 分子实验显示 A β 蛋白与 sDSS1 蛋白结合。

图 1A，分别把 A β 1-42 蛋白和 A β 1-40 蛋白与 sDSS1 蛋白进行孵育，用 A β 蛋白抗体可以检测到 A β 1-42 蛋白与 sDSS1 蛋白形成的复合物（分子量 10KD-37KD 之间，第 3 泳道和第 4 泳道）。A β 1-40 蛋白单独孵育形成部分二聚体，与 sDSS1 蛋白孵育可以减少二聚体形成。

图 1B，用 sDSS1 蛋白抗体同样可以检测到 sDSS1 蛋白与 A β 1-42 蛋白（第 3 泳道和第 4 泳道）或 sDSS1 蛋白与 A β 1-40 蛋白（第 6 泳道和第 7 泳道）形成复合物（分子量 37-150KD 之间），并且复合物形成随着反应体系中 sDSS1 蛋白浓度增加而增加。

图 1C. ThT 实验检测 A β 1-42 蛋白聚集。A β 1-42 蛋白在 12 小时就发生聚集，显示出上升曲线。按照分子量比率加入 5%或 10%

sDSS1 蛋白后，能抑制上升曲线，延长检测时间也没有观察到上升曲线，提示没有 A β 1-42 蛋白聚集发生。

图 1D. ThT 实验检测 A β 1-40 蛋白聚集。A β 1-40 蛋白在 24 小时开始出现上升曲线，显示聚集体形成。按照分子量比率加入 5%或 10% sDSS1 蛋白能抑制上升曲线，延长检测时间也没有观察到上升曲线，提示没有 A β 1-40 蛋白聚集发生。

图 1E. ThT 实验检测 sDSS1 蛋白突变体 4 抑制 A β 1-40 蛋白聚集。A β 1-40 蛋白在 20-24 小时发生聚集，显示出上升曲线。按照分子量比率加入 0.667%、0、3.33%或 16.67% sDSS1(M4)蛋白后，能抑制上升曲线，延长检测时间也没有观察到上升曲线,提示没有 A β 1-40 蛋白聚集发生。

图 1F. ThT 实验检测 sDSS1 蛋白突变体 11 抑制 A β 1-40 蛋白聚集。A β 1-40 蛋白在 20-24 小时发生聚集，显示出上升曲线。按照分子量比率加入 0.667%、0、3.33%或 16.67% sDSS1(M11)蛋白后，能抑制上升曲线，延长检测时间也没有观察到上升曲线,提示没有 A β 1-40 蛋白聚集发生。

图 2A-图 2B. 分子实验显示 A β 蛋白寡聚物与 sDSS1 蛋白结合。

图 2A, 分别把 A β 1-42 蛋白寡聚物和 A β 1-40 蛋白寡聚物与 sDSS1 蛋白进行孵育，用 A β 蛋白抗体可以检测到 A β 1-42 蛋白与 sDSS1 蛋白形成的复合物（分子量 10KD-37KD 之间，第 3 泳道和第 4 泳道）。A β 1-42 蛋白与 sDSS1 蛋白的反应没有检测到明显的差异。

图 2B, 利用 sDSS1 蛋白抗体可以检测到 sDSS1 蛋白与 A β 1-42 寡聚物（第 3 泳道）或 sDSS1 蛋白与 A β 1-40 寡聚物（第 5 泳道）形成的复合物（分子量 37-150KD 之间）。

图 2C. ThT 实验检测 sDSS1 蛋白与 A β 1-40 寡聚物反应。在 30 μ M A β 1-40 寡聚物中按照分子量比率加入 50%和 100% sDSS1 蛋白，可以见到 A β 1-40 寡聚物荧光值提高，在 12 小时检测时间内荧

光值基本保持不变。

图 2D. ThT 实验检测 sDSS1 蛋白与 A β 1-42 寡聚物反应。在 30 μ M A β 1-42 寡聚物中按照分子量比率加入 50%和 100% sDSS1 蛋白，可以见到 A β 1-42 寡聚物荧光值提高。在 12 小时检测限内，A β 1-42 寡聚物的荧光值还有上升，加入 sDSS1 蛋白后，荧光值上升减慢。

图 3A. sDSS1 蛋白不能与 RAGE 受体蛋白相互作用。分子互作仪检测结果显示，在结合曲线上，可以看到 sDSS1 蛋白进样后，看不到明显的上升结合曲线，也看不到明显的解离曲线。

图 3B. sDSS1 蛋白抑制 A β 蛋白与 RAGE 受体蛋白的相互作用。A β 1-42 蛋白可以结合到 RAGE 受体蛋白上，加入 sDSS1 蛋白后可以抑制 A β 蛋白与 RAGE 结合效率，A β 蛋白结合量下降，并且该效应呈现典型的剂量依赖效应。sDSS1 蛋白浓度越大，A β 蛋白结合效率越低。

图 4A-图 4C. 细胞实验验证 sDSS1 蛋白屏蔽 A β 1-42 寡聚物毒性并保护 N2a 细胞活力。

图 1A, A β 1-42 寡聚物引起 N2a 细胞毒性，加入 A β 1-42 寡聚物引起细胞异常聚集和变圆，sDSS1 蛋白可以缓解这些现象。

图 2B, 检测细胞活力发现 sDSS1 蛋白可以减少细胞活力受 A β 1-42 寡聚物影响，等量的 sDSS1 蛋白加入后，细胞活力几乎不受 A β 1-42 寡聚物毒性的影响。

图 2C, A β 1-42 引起细胞毒性，显示为溶液 LDH 含量上升，加入 sDSS1 蛋白后，溶液 LDH 含量显著降低，显示细胞毒性水平下降。每组 N=5。数据经 ANOVA 分析，*，p-value < 0.05；**，p-value < 0.01。

图 5A-图 5B. 细胞实验验证 sDSS1 蛋白屏蔽 A β 1-42 寡聚物毒性并保护原代神经元细胞活力。

图 5A, 10 μ M A β 1-42 寡聚物可以引起神经元细胞活力下降，加入 5 μ M 和 10 μ M sDSS1 蛋白后，细胞活力可以被挽回。

图 5B, sDSS1 蛋白能减少 A β 1-42 蛋白引起的细胞毒性水平上升, 10 μ M sDSS1 蛋白可以保护细胞几乎不受 A β 1-42 寡聚物毒性的影响。每组 N=10。数据经 ANOVA 分析, *, p-value < 0.05; **, p-value < 0.01。

图 6A-图 6B. sDSS1 蛋白促进小胶质细胞清除 A β 蛋白。

图 6A, 培养基中同时添加 A β 1-42 蛋白和 sDSS1 蛋白, 24 小时后检测到小胶质细胞胞浆 A β 蛋白的浓度显著高于只添加 A β 蛋白的对照, 随着添加的 sDSS1 蛋白浓度增加, 胞浆 A β 蛋白浓度增加。

图 6B, 相应的, 在添加 sDSS1 蛋白的培养液中的 A β 1-42 蛋白的含量显著低于只添加 A β 的对照样品, 且呈现剂量依赖效应。每组 N=3。数据经 ANOVA 分析, *, p-value < 0.05; **, p-value < 0.01。

图 6C-图 6D. sDSS1 蛋白降低 A β 1-42 蛋白寡聚物引起的小胶质细胞激活。

图 6C, A β 1-42 蛋白寡聚物引起小胶质细胞的激活, 表现为 BV2 细胞 ROS 水平提高, 添加不同浓度的 sDSS1 蛋白后, BV2 细胞 ROS 水平逐渐下降, 接近对照组细胞水平。

图 6D, A β 1-42 蛋白寡聚物刺激小胶质细胞释放炎症因子 TNF- α , sDSS1 蛋白添加后减少 TNF- α 释放。每组 N=3。数据经 ANOVA 分析, *, p-value < 0.05; **, p-value < 0.01。

图 7A. sDSS1 蛋白缓解 CL4176 线虫的疾病症状。随着培养时间延长, AD 模型 CL4176 线虫的瘫痪率逐渐上升, 在培养液中加入 sDSS1 蛋白可以显著减慢瘫痪率上升。且缓解效率呈现药物剂量依赖性, 随着 sDSS1 蛋白浓度增加, 缓解效应增强。在 26 小时, 对照组未瘫痪线虫的比率仅仅为 15.09%, 500 μ g/mL sDSS1 蛋白给药组为 39.47%, 1000 μ g/mL sDSS1 蛋白给药组为 65.71%。到了 43 小时, 对照组线虫几乎全部瘫痪 (未瘫痪线虫比率小于 1%), 而 500 μ g/mL sDSS1 蛋白给药组中, 未瘫痪的线虫比例为 18.42%, 1000 μ g/mL sDSS1 蛋白给药组为 48.57%。每组线虫数量为 90 条。

该实验重复 3 次，数据经 Log-rank (Mantel-Cox) test 分析，***，p-value < 0.001。

图 7B. 免疫组织荧光染色检测 C14176 线虫组织 A β 1-42 沉积。AD 模型 4176 线虫组织经过固定和免疫荧光染色，A β 1-42 特异性抗体用于显示 A β 蛋白（绿色荧光），Hoechst 染料用于染色细胞核（蓝色荧光），白色箭头指示 A β 斑块沉积。在对照组线虫组织中可见典型的 A β 1-42 斑块和弥散的 A β 沉淀。经过 500 μ g/mL sDSS1 蛋白处理，A β 斑块和弥散性沉积显著减少。1000 μ g/mL sDSS1 蛋白给药组几乎看不到斑块，弥散性沉积较少。

图 7C-图 7D. 4176 线虫组织研磨液中 A β 1-42 聚集体和总 A β 蛋白含量减少。

图 7C, 用 Western blotting 方法检测线虫组织研磨液中 A β 1-42 聚集体，可见经过 sDSS1 蛋白处理后，多数 A β 聚集体条带减少或完全消失（黑色箭头指示位置）。

图 7D, 经过 ELISA 检测组织研磨液中总 A β 蛋白量，发现 sDSS1 蛋白给药组线虫组织总 A β 蛋白显著降低，1000 μ g/mL sDSS1 蛋白给药组含量仅仅是对照组的 59.07%。实验中每组用的线虫数量为 400 条。

图 8A-图 8B. sDSS1 蛋白促进小鼠血液中 A β 蛋白清除。

图 8A, 给小鼠静脉注射 A β 蛋白制造急性 A β 上升模型，结果显示 sDSS1 蛋白给药能加速 A β 蛋白清除。随着 sDSS1 蛋白给药量增加，A β 含量明显下降。

图 8B, 给 AD 模型 APP/PS1 小鼠注射 sDSS1 蛋白，在血液中也检测到 A β 水平显著降低。急性模型每组 5 只小鼠，APP/PS1 小鼠每组 3 只。数据经 ANOVA 分析，**，p-value < 0.01；***，p-value < 0.001。

图 9A-图 9C. sDSS1 蛋白降低 APP/PS1 小鼠脑组织 A β 斑块沉积。

图 9A, 经 FSB 染料染色后, 在 11 月龄 APP/PS1 小鼠脑组织中可以看到大量 A β 斑块沉淀 (蓝色荧光), sDSS1 蛋白给药后, 脑组织海马区斑块沉积下降, 显示斑块数量减少, 亮度降低。

图 9B, 图片用 Phototshop CS 软件处理后, 统计斑块面积, 结果显示 sDSS1 蛋白给药后脑组织斑块面积显著低于对照组。

图 9C, 按照斑块大小统计小型斑块 (图 9A 中标记为 1)、中型斑块 (图 9A 中标记为 2)、大型斑块 (图 9A 中标记为 3) 数量, 数据显示与对照组相比, sDSS1 蛋白给药后组织中中型斑块以及大型斑块数量显著下降, 小型斑块没有显著差异。APP/PS1 小鼠每组 3 只。数据经 ANOVE 分析, n.s., p-value > 0.5 ;**, p-value < 0.01。

具体实施方式

以下内容将结合实例对本发明中的优选方案进行说明和验证, 不是对本发明的范围进行限定。本发明的所有范围限定以权利要求书中的限定为准。

下述实施案例中所用的实验方法如无特殊说明, 均为常规实验方法。

下述实施案例中所用的 sDSS1 蛋白为本公司自行生产的人源 sDSS1 蛋白, 蛋白序列见 SEQ ID NO: 1。本公司对蛋白品质进行质量控制, 经检测蛋白纯度大于 95%, 内毒素 (小于 3EU/mg 蛋白) 和其他杂质残留符合标准, 可用于动物实验而不引起明显的动物毒性反应。

下述实施案例中材料和试剂, 除了 sDSS1 蛋白其他均可以通过商业途径获取。

实施例 1、sDSS1 蛋白抑制 A β 蛋白聚集。

实验方法

1. ThT 实验 A β 1-42 和 A β 1-40 蛋白委托苏州强耀生物科技有

限公司合成并制成冻干粉，蛋白纯度经检测大于 95%。硫代黄素 T 染料 (ThT, Sigam-Aldrich, T3516) 首先用甲醇溶解为 1mg/mL (3.1mM)，继续用 PBS 稀释为 1mM。A β 蛋白用 20mM NaOH 溶解为 2mg/mL 并用 PBS 稀释为 100 μ M。sDSS1 蛋白、sDSS1 蛋白突变体 4 (sDSS1(M4)) (氨基酸序列见 SEQ ID 15)、sDSS1 蛋白突变体 11 (sDSS1(M11)) (氨基酸序列见 SEQ ID 16) 分别用 PBS 稀释为 1mg/mL (100 μ M)。实验在 PBS 环境中进行，首先在 1.5mL 离心管中补充需要添加 PBS，然后依次加入 sDSS1 蛋白或突变体蛋白、A β 蛋白和 ThT 染料，sDSS1 蛋白摩尔浓度根据预设的浓度梯度添加。对于 A β 1-42 蛋白，A β 蛋白和 ThT 染料的摩尔浓度分别为 30 μ M 和 5 μ M；对于 A β 1-40 蛋白，A β 蛋白和 ThT 染料的摩尔浓度分别为 30 μ M 和 10 μ M。完成后，溶液在混悬仪上震荡混匀，然后取 200 μ L 加入到黑色荧光检测板 (Costar, 3792) 中，每组两个复孔。黑色荧光检测板放入多功能酶标仪 (Molecular Devices, SpectraMax i3x) 上检测荧光值，设置激发光 450nm，发射光 485nm，检测间隔 30 分钟，连续检测 48 个小时。

2. 蛋白质相互作用 A β 1-42 和 A β 1-40 蛋白单体用 PBS 稀释到 20 μ M 并与 10 μ M 或 20 μ M sDSS1 蛋白混合，20 μ M A β 蛋白作为阳性对照。蛋白液混匀后放在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育的蛋白液中加入 5 \times 上样缓冲液，混匀并在 100 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟，制备的样品用于 Western Blotting 分析。

3. 蛋白免疫印迹实验 (Western Blotting) 15 μ L 制备的上样样品加入上样孔，10% 预制胶 (Life technology 公司 C#NP0321BOX) 分离蛋白后转移到 PVDF 膜上。膜依次经过 5% 脱脂牛奶封闭 1 小时，第一级抗体 Rabbit-anti-A β (Cell Signaling Technology 公司, #8243) 或 Rabbit-anti-sDSS1 (发明人委托上海睿智化学研究有限公司制备) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，TBST 溶液清洗三遍；第二级抗体 (Goat-anti-rabbit HRP 抗体) 室温孵育 2 小时。用 TBST 清洗三遍，完成后用发光液

显影并用 X 光片显示条带。

实验结果

在缓冲液中，把 A β 1-42 或 A β 1-40 蛋白与 sDSS1 蛋白进行共孵育，检测孵育后的混合物，可以看到 A β 1-42 蛋白与 sDSS1 蛋白形成复合物（分子量 10KD-37KD）。A β 1-40 蛋白与 sDSS1 蛋白共孵育可以显著减少二聚体的形成（图 1A）。用 sDSS1 蛋白抗体同样检测检测到 A β 蛋白与 sDSS1 蛋白复合物信号，并且随着 sDSS1 蛋白浓度增加，复合物信号增强（图 1B）。A β 1-42 或 A β 1-40 单体蛋白发生聚集，形成淀粉样沉淀，与 ThT 染料结合后荧光强度增强。在对照组，可以看到随着孵育时间延长，荧光亮度逐渐增强，显示 A β 1-40 和 A β 1-42 蛋白发生聚集。但是，在反应体系中加入不同浓度的 sDSS1 蛋白或 sDSS1 突变体蛋白后，荧光亮度不增加并持续保持在初始值附近，说明 sDSS1 蛋白显著抑制了 A β 蛋白聚集。而且，最低仅需要在反应体系中添加 5% 的 sDSS1 蛋白即可抑制 A β 蛋白聚集反应（图 1C，图 1D）；在反应体系中添加 0.667% 或 3.33% 的 sDSS1(M4) 蛋白或 sDSS1(M11) 蛋白即可抑制 A β 蛋白聚集反应（图 1E，图 1F）。这些结果说明，sDSS1 蛋白可以与 A β 蛋白发生相互作用形成复合物，并抑制 A β 蛋白聚集体形成过程。

实施例 2、sDSS1 蛋白与 A β 蛋白寡聚物结合。

实验方法

1. A β 1-42 蛋白溶解及寡聚物制作 1mg A β 1-42 或 A β 1-40 蛋白加入 500 μ L 20mM NaOH 溶液，震荡混匀 10 分钟后，超声 10 分钟帮助蛋白溶解。用 PBS 溶液稀释到 100 μ M，稀释液放在 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时，12000g 离心 10 分钟除去可能的沉淀，获得 A β 1-42 或 A β 1-40 寡聚物。A β 寡聚物按照孵育前 A β 单体蛋白浓度来标注。

2. ThT 实验 sDSS1 蛋白用 PBS 稀释为 1mg/mL (100 μ M)。

实验在 PBS 条件下进行,首先在 1.5mL 离心管中补充需要添加 PBS,然后依次加入 sDSS1 蛋白、A β 蛋白寡聚物和 ThT 染料, sDSS1 蛋白摩尔浓度根据预设的浓度梯度添加。对于 A β 1-42 蛋白, A β 蛋白和 ThT 染料的摩尔浓度分别为 30 μ M 和 5 mM;对于 A β 1-40 蛋白, A β 蛋白和 ThT 染料的摩尔浓度分别为 30 μ M 和 10mM。完成后,溶液在混悬仪上震荡混匀,然后取 200 μ L 加入到黑色荧光检测板 (Costar, 3792) 中,每组两个复孔。黑色荧光检测板放入多功能酶标仪上检测荧光值,设置激发光 450nm,发射光 485nm,检测间隔 30 分钟,连续检测 12 个小时。

3. 蛋白质相互作用 A β 1-42 或 A β 1-40 蛋白寡聚物用 PBS 稀释到 20 μ M 并与 10 μ M 或 20 μ M sDSS1 蛋白混合, 20 μ M A β 寡聚物作为阳性对照。蛋白液混匀后放在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育的蛋白液中加入 5 \times 上样缓冲液,混匀并在 100 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟,制备的样品用于 Western Blotting 分析。

4. 蛋白免疫印迹实验 (Western Blotting) 15 μ L 制备的上样样品加入上样孔, 4-12% 预制胶 (Life technology 公司 C#NP0321BOX) 分离蛋白后转移到 PVDF 膜上。膜依次经过 5% 脱脂牛奶封闭 1 小时, 第一级抗体 Rabbit-anti-A β (Cell Signaling Technology 公司, #8243) 或 Rabbit-anti-sDSS1 (发明人委托上海睿智化学研究有限公司制备) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液清洗三遍; 第二级抗体 (Goat-anti-rabbit HRP 抗体) 室温孵育 2 小时。用 TBST 清洗三遍, 完成后用发光液显影并用 X 光片显示条带。

实验结果

A β 1-40 或 A β 1-42 的寡聚物是 A β 蛋白产生细胞毒性的主要形式。为了检测 sDSS1 蛋白与 A β 蛋白寡聚物的反应, 首先孵育 A β 蛋白形成寡聚物形式, 然后与 sDSS1 蛋白进行共同孵育并进行 western blotting 和 ThT 检测。结果显示, 用 A β 蛋白抗体可以检测到 sDSS1 蛋白与 A β 1-42 寡聚物形式的反应, 复合物含量随着反应

体系中 sDSS1 蛋白浓度增加而增加(图 2A)。用 sDSS1 蛋白抗体同样可以检测 sDSS1 蛋白与 A β 蛋白形成的复合物(图 2B)。在 ThT 荧光实验中,可以看到 sDSS1 蛋白可以与 A β 1-40 或 A β 1-42 的淀粉样沉淀发生反应, sDSS1 蛋白与 A β 1-40 淀粉样沉淀反应后, 荧光强度增加(图 2C); sDSS1 蛋白与 A β 1-42 淀粉样沉淀反应后, 荧光强度显著降低(图 2D)。以上结果说明, sDSS1 蛋白也能与 A β 蛋白寡聚物形式发生结合形成复合物, 这些相互作用可能抑制 A β 蛋白的细胞毒性。

实施例 3、sDSS1 蛋白降低 A β 蛋白与受体蛋白的结合效率。

实验方法

1. 分子互作实验 利用生物大分子相互作用仪(GE, Biacore 3000)检测 RAGE 蛋白与 sDSS1 蛋白的结合效率。首先用 PBS 冲洗芯片 20 分钟直到基线稳定, 继续用 1 μ g/mL RAGE 蛋白上的 His 标签把蛋白耦联到传感片 NTA 芯片(GE), 耦联量大约 50RU。把 sDSS1 蛋白稀释到 10 μ g/mL, 上样量 20 μ L, 上样时间 200 秒。完成后, 用 PBS 溶液冲洗, 检测洗脱曲线。

2. 配体受体结合实验 本实验采用 ELISA 方法检测 A β 蛋白单体与糖基化蛋白受体(receptor of advanced glycation end product, RAGE)结合效率的变化。RAGE 蛋白购自北京义翘神州科技有限公司(11629-H02H)。空白酶标板用 PBS 清洗一遍, 每孔加入 100 μ L 用 PBS 稀释的 0.5 μ g/mL RAGE 蛋白 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 完成后用 PBS 清洗一遍。加入 PBS 稀释的 2% BSA in PBST (0.05% Tween 20)在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 个小时, 完成后用 PBS 清洗一遍。加入 100 μ L A β 1-42 蛋白或 A β 1-42 蛋白与 sDSS1 蛋白混合物, 设置 A β 1-42 蛋白浓度分别为 0.625 μ g/mL 和 0.3125 μ g/mL 以及 sDSS1 蛋白浓度分别为 0.2 μ g/mL 和 1 μ g/mL, 室温孵育 2 小时。用 PBST (0.05% Tween 20)清洗一遍, 加入 100 μ L Rabbit-anti-A β (1: 10000 稀释在 PBST 溶液, 包

含 0.5%BSA), 室温孵育 1 小时, 完成后用 PBST 清洗三遍。继续加入 100 μ L 辣根过氧化物酶 (HRP) 耦联的山羊来源抗兔抗体 (1:10000 稀释在 PBST 溶液, 包含 0.5%BSA), 室温孵育 1 小时, 完成后用 PBST 清洗 6 遍。加入 200 μ L TMB 显色液, 室温孵育 30 分钟, 完成后加入 50 μ L 终止液。96 孔板在酶标仪上读取 450nm 吸光度值, 反映配基配体结合量。

实验结果

利用 BIAcore 设备, 检测发现 sDSS1 蛋白与 RAGE 蛋白不能发生结合, 在 BIAcore 上显示没有明显的结合峰 (图 3A)。ELISA 实验显示, A β 1-42 蛋白作为配体可以与 RAGE 蛋白结合, 显示较高的结合量。加入 0.2 μ g/mL 和 1 μ g/mL sDSS1 蛋白可以降低 A β 1-42 与 RAGE 的结合量, 并且该效应呈现明显的浓度依赖效应 (图 3B)。这些结果说明, sDSS1 蛋白与 A β 1-42 蛋白反应后可以降低 A β 蛋白结合与受体的结合效率。

实施例 4、sDSS1 蛋白屏蔽 A β 寡聚物引起的细胞毒性。

实验方法

1. 细胞培养 小鼠来源神经瘤母细胞 (N2a) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 (细胞目录号: TCM29)。N2a 细胞培养在含 10%胎牛血清 (FBS, Gibco, 10091148) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ThermoFisher Scientific, 11995065) 完全培养液中, 每两天传代一次。

2. 原代神经元培养 怀孕 16 天的小鼠用乙醚深度麻醉后颈椎脱臼处死, 解剖出 E16 期胎鼠。胎鼠用冰冷冻麻醉后, 压迫颈椎处死, 解剖出鼠脑, 浸泡在预冷的 DMEM 溶液 (含 2%双抗) 中, 用眼科镊除去软脑膜并反复清洗去除血迹。解剖额叶皮层并用眼科剪剪碎组织, 所有组织收集到离心管中, 加入 5mL 0.05%胰酶消化液在室温下消化 15 分钟。完成后, 加入等体积 DMEM 完全培养基终止

消化，反复吹打组织并用 40 μ m 细胞滤器过滤，获得细胞悬液。细胞计数后按照 3.0×10^4 细胞每孔加入 96 孔板中，200 μ L DMEM 完全培养基，培养板放在 37 $^{\circ}$ C 培养。24 小时后，换成 200 μ L 神经元培养基，包含 98% Neurobasal (Gibco, 21103049)，2% B27 supplement (Gibco, 17504044)，1% GlutaMAX-1 supplement (Gibco, 35050061)。以后每两天换一次新鲜神经元培养基。培养的神经元 8 天之后成熟可以用于后续实验。

2. A β 1-42 蛋白溶解及寡聚物制作 1mg A β 1-42 用无血清的 DMEM/-培养基稀释到 100 μ M，稀释液放在 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时，获得 A β 1-42 寡聚物蛋白。A β 寡聚物蛋白按照孵育前 A β 单体蛋白浓度来标注。

3. 细胞毒性实验 N2a 细胞按照 2×10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中。细胞贴壁 12 小时后，换成无血清 DMEM 培养基，细胞饥饿处理 24 小时。A β 1-42 寡聚物用无血清 DMEM 稀释成 20 μ M 溶液。阴性对照组用无血清 DMEM，阳性对照组加入 20 μ M A β 蛋白溶液，实验组除了 20 μ M A β 蛋白，分别包含 10 μ M、20 μ M sDSS1 蛋白。对于神经元细胞，细胞成熟后，用无血清 DMEM 按照 N2a 细胞实验过程稀释 A β 并设置相同的 sDSS1 蛋白梯度。神经元处理 48 小时。收集 96 孔板中的细胞的上清液，100g 离心 10 分钟取上清液用于细胞毒性水平检测；细胞用于细胞活力检测。

4. 细胞毒性水平检测 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司 (C0016)。检测酶活性时，首先根据试剂盒说明书配置好足量检测工作液。在 96 孔板中每孔加入 120 μ L 细胞毒性实验中收集的上清液，然后加入 60 μ L 检测工作液，稍混匀，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。在酶标仪上检测 490nm 吸光度值，吸光度高低与细胞毒性水平成正比。

5. 细胞活力检测 细胞增殖 / 细胞毒性检测试剂盒 (CCK-8) 购自东仁化学科技(上海)有限公司 (CK04)。用无血清 DMEM 按照

1: 20 (体积比, v/v) 稀释 CCK-8 溶液制成工作液。96 孔中的细胞处理完成后, 弃去旧培养基, 每孔加入 100 μ l CCK-8 工作液。培养板放在培养箱中孵育 1-2 小时, 然后在多功能酶标仪上检测 450nm 吸光度值, 反映细胞活力。

实验结果

为了检测 sDSS1 蛋白对 A β 1-42 蛋白寡聚物细胞毒性的屏蔽作用, 分别检测 sDSS1 蛋白对小鼠神经瘤母细胞和原代培养小鼠神经元的保护效应。实验结果显示, A β 1-42 寡聚物蛋白能引起 N2a 细胞明显的细胞毒性, 寡聚物处理 48 小时导致细胞变圆及异常聚集, 加入 sDSS1 蛋白可以减少细胞毒性反应 (图 4A)。用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力发现, sDSS1 蛋白可以显著屏蔽 A β 1-42 寡聚物引起的细胞活力下降, 20 μ M sDSS1 蛋白可以保护细胞几乎不受 A β 1-42 寡聚物的影响 (图 4B)。LDH 试剂盒检测细胞毒性反应水平, 结果显示 sDSS1 蛋白组的细胞毒性反应水平明显下降 (图 4C)。在小鼠原代神经元细胞上, sDSS1 蛋白同样显示对 A β 寡聚物毒性的屏蔽效应, 神经元的细胞活力受到 sDSS1 蛋白保护 (图 5A), 细胞毒性反应水平下降 (图 5B)。这些结果显示, sDSS1 蛋白可以显著屏蔽 A β 寡聚物蛋白引起的细胞毒性。

实施例 5、sDSS1 蛋白促进小胶质细胞清除 A β 蛋白并减少小胶质细胞激活。

实验方法

1. 细胞培养 小鼠小胶质细胞 (BV2) 购自国家实验细胞资源共享平台 (3111C0001CCC000063)。BV2 细胞培养在含 10%FBS 的 DMEM 培养液中, 每两天传代一次。

2. A β 清除实验 BV2 细胞按照 3×10^5 每孔接种到 6 孔板中, 细胞贴壁 12 小时。A β 蛋白预先用 DMEM 完全培养液稀释成 1 μ M 溶液。阴性对照组不加蛋白, 阳性对照组加入 1 μ M A β 蛋白溶液, 实验

组除了 $1\mu\text{M}$ $\text{A}\beta$ 蛋白，分别包含 $0.5\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ sDSS1 蛋白。处理 24 小时后，收集上清液 $500\mu\text{L}$ ， 100g 离心 10 分钟，取上清液用于 ELISA 实验检测 $\text{A}\beta_{1-42}$ 水平。离心收集所有细胞，裂解液后 12000g 离心收取裂解上清液用于 ELISA 检测 $\text{A}\beta_{1-42}$ 水平。细胞裂解液用 BCA 蛋白定量试剂盒 (ThermoFisher, 23252) 进行蛋白浓度定量。

3. BV2 细胞激活实验 BV2 细胞按照 1.5×10^5 每孔接种到 6 孔板中，12 小时后换成无血清的 DMEM 培养基，细胞饥饿处理 24 小时。 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚物用无血清 DMEM 稀释成 $20\mu\text{M}$ 溶液。阴性对照组不加蛋白，阳性对照组加入 $20\mu\text{M}$ $\text{A}\beta$ 蛋白溶液，实验组除了 $20\mu\text{M}$ $\text{A}\beta$ 蛋白，分别包含 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ sDSS1 蛋白。细胞处理 24 小时后，收集上清液， 100g 离心 10 分钟取上清液用于 ELISA 实验检测溶液 $\text{TNF}\alpha$ 水平。收集所有细胞用于 ROS 水平检测。

4. ELISA 检测 将上述 $\text{A}\beta$ 清除实验中获得培养液用于 ELISA 实验中，培养液样品用试剂盒提供的标准品蛋白稀释液 (Standard diluent buffer) 稀释 50 倍用于后续检测。按 ELISA 试剂盒 (Invitrogen, Human $\text{A}\beta_{42}$ ELISA kit, KHB3441) 说明书要求，依次完成标准品蛋白和待测线虫蛋白孵育和清洗，加入显色底物孵育 20 分钟，加入终止液，在酶标仪上检测 450nm 吸光度值。根据标准曲线计算出蛋白样品中的 $\text{A}\beta$ 蛋白浓度。

5. ROS 水平检测 活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司 (S0033)。阳性对照细胞预先在 37°C 用 $1\mu\text{M}$ Rosup 处理 20 分钟。取 $300\mu\text{L}$ 细胞悬液， 100g 离心 5 分钟，加 PBS 清洗细胞两次。加入 $300\mu\text{L}$ 无血清 DMEM 稀释的荧光探针 (DCFDA) (1:1000)， 37°C 孵育 20 分钟。 100g 离心 5 分钟，用 PBS 清洗细胞三次，用流式细胞仪 (Millipore, guava Easyocyte) 检测。绿色荧光 (488nm) 强度反映了细胞 ROS 水平。

6. $\text{TNF}\alpha$ 水平检测 BV2 细胞激活实验中收集的上清液用试剂盒提供的 Standard Dilute buffer 稀释 10 倍用于 ELISA 检测。按

ELISA 试剂盒 (Invitrogen, TNF alpha Mouse ELISA Kit, KMC3011C) 说明书要求, 依次完成标准品蛋白和待测线虫蛋白孵育和清洗, 加入显色底物孵育 20 分钟, 加入终止液, 在酶标仪上检测 450nm 吸光度值。根据标准曲线计算出上清液中的 TNF α 浓度。

实验结果

小胶质细胞是神经组织中清除 A β 蛋白等毒性蛋白的主要细胞。为了在检测 sDSS1 蛋白能否帮助小胶质细胞清除 A β 蛋白, 在培养的小鼠小胶质细胞中加入 1 μ M A β 1-42 蛋白和不同浓度的 sDSS1 蛋白。结果显示, 小胶质细胞胞浆中检测到 A β 蛋白, 随着 sDSS1 蛋白加入, 细胞胞浆 A β 蛋白浓度显著提高 (图 6A)。相应的, 培养液中 A β 蛋白残留减少, 随着溶液中 sDSS1 蛋白浓度增加, A β 蛋白浓度越来越低 (图 6B)。这些结果说明 sDSS1 蛋白帮助小胶质细胞清除 A β 蛋白。在培养液中加入高浓度 A β 蛋白寡聚物并加入不同浓度的 sDSS1 蛋白, 可以看到培养液中的 sDSS1 蛋白能显著降低激活的小胶质细胞数量, 细胞 ROS 水平显著降低 (图 6C), 炎症因子 TNF- α 释放随着 sDSS1 蛋白浓度增加逐渐降低 (图 6D)。这些结果说明, sDSS1 蛋白能刺激小胶质细胞清除 A β 蛋白并屏蔽 A β 寡聚物对小胶质细胞的影响。

实施例 6、sDSS1 蛋白降低 AD 模型线虫的疾病症状。

实验方法

1. AD 模型线虫瘫痪检测 线虫实验平台由上海南方模式生物科技股份有限公司提供, AD 线虫模型由线虫实验平台提供。首先将成年 CL4176 线虫挑入固体培养基中, 放入 16 $^{\circ}$ C 培养箱, 培养 2 小时后, 挑出全部成虫, 将虫卵放入 16 $^{\circ}$ C 培养箱。48 小时后, 培养皿转入 25 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养并分别加入不同浓度的 sDSS1 蛋白药物处理, 对照组 0 μ g/ml, 低剂量组 500 μ g/ml, 高剂量组 1000 μ g/ml。药物连续处理 18 小时后, 开始统计 CL4167 线虫瘫痪个数, 每 2

小时统计一次，统计完毕后作图分析。线虫瘫痪标准是金属丝轻触线虫时，线虫身体僵直不能活动。

2. 线虫蛋白样品收集 CL4176 线虫在不同浓度药物中处理 20 小时，完成后收集线虫，每组 400 条线虫。线虫用 PBS 清洗三遍并盛装在 1.5mL 离心管中，每管加入 150 μ L 线虫裂解液（线虫裂解液含 62mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% 甘油, 4% β -巯基乙醇, cocktail 蛋白酶抑制剂），液氮冻融 2 次, 60Hz 超声 5 分钟, 12000rpm 离心 10 分钟，取上清液即为线虫总蛋白。线虫蛋白加入上样缓冲液（Loading buffer）并在 100 $^{\circ}$ C 加热处理 10 分钟，制成可用于 Western blotting 分析的蛋白样品。

3. Western Blotting 线虫蛋白样品用 SDS-PAGE 电泳进行分离，电泳条件为：10% 变性预制胶（C#NP0321BOX，购自 Life technology 公司），MES 电泳液，200V，30 分钟。电泳完毕后，进行转膜，转膜条件为：100V 恒压湿转 60 分钟，PVDF 膜。完成的膜首先用 5% 脱脂奶粉（溶解在 PBST 中）室温封闭 1 小时，然后依次用兔来源 A β 抗体稀释液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜（1:3000 稀释在封闭液中），PBST 清洗三次，HRP 耦联驴来源抗兔抗体稀释液室温孵育 1 小时（1: 5000 稀释到 PBST 中）。ECL 显色后压片并拍照保存。内参采用 tubulin 蛋白（抗体购自碧云天生物技术有限公司，AF0001）。

4. ELISA 检测 将上述 Western blotting 实验中提取的线虫总蛋白用于 ELISA 实验中，蛋白样品用试剂盒提供的标准品蛋白稀释液（Standard diluent buffer）稀释三倍用于后续检测，蛋白稀释液加入体积根据 Western blotting 实验中内参的数据进行调整，保证加入的总蛋白量一致。按 ELISA 试剂盒说明书要求，依次完成标准品蛋白和待测线虫蛋白孵育和清洗，加入显色底物孵育 20 分钟，加入终止液，在酶标仪上检测 450nm 吸光度值。根据标准曲线计算出蛋白样品中的 A β 蛋白浓度。

5. 线虫免疫组织化学染色 CL4176 线虫在不同浓度药物中处理 20 小时，完成后收集线虫，每组 50-100 条线虫。线虫用 PBS 清洗一遍并盛装在 1.5mL 离心管中，弃去上清后加入 4%多聚甲醛（溶解在 PBS 中，pH7.2）4°C条件下固定过夜。固定好的线虫首先用清洗缓冲液（包含 10mm Tris/HCl, 1%Triton-X100, 1mM EDTA, pH7.4）冲洗一遍。线虫依次用继续用含 1%β 巯基乙醇的清洗液室温孵育 1 小时，硼酸缓冲液（包含 25mM H₃BO₃, 12.5mM NaOH, 10mM DTT, pH9.2）室温孵育 1 慢慢 5 分钟，含 1%H₂O₂的清洗缓冲液室温孵育 15 分钟。完成后，线虫用清洗缓冲液清洗一遍，加入封闭液（包含 1%BSA、0.5%Triton-X100, 1mM EDTA, PBS）室温封闭两个小时。处理好的线虫依次经过一抗稀释液（Aβ 抗体，1: 100 稀释到封闭液中）4°C孵育过夜，二抗稀释液（按照 1: 1000 比例添加 Hoechst）（Donkey-anti-Rabbit-Alex Fluor 488（购自 Life Technology 公司，A-11008）按照 1: 5000 稀释在 PBST 中）室温孵育 1 小时。PBST 清洗三遍，完成后封片并用 Confocol 激光共聚焦显微镜（Nikon, Nikon C1Plus）观察，拍照分析。

实验结果

CL4176 线虫作为 AD 动物模型用于检测急性 Aβ 1-42 蛋白蓄积引起的毒性，被用于药物评价。在线虫瘫痪实验中，加入不同浓度的 sDSS1 蛋白可以显著降低线虫瘫痪水平，且效应呈现出显著的浓度依赖（图 7A）。在 43 小时后检测，对照组未瘫痪线虫的比例低于 1%，而给药组仍旧有 18.42%（500μg/mL sDSS1 蛋白）和 48.57%（1000μg/mL sDSS1 蛋白）的线虫表现正常。总体分析，半数线虫发生瘫痪的中位时间分别是对照组 22 小时、低浓度给药组 24 小时、高浓度给药组 42 小时。这些结果说明，sDSS1 蛋白能有效降低 AD 模型线虫的疾病症状。利用免疫组织化学检测线虫体内 Aβ 沉积，可以在对照线虫体内看到明显的颗粒状聚集体，而 sDSS1 蛋白给药组没有检测到聚集体或者检测到很少的颗粒，说明 sDSS1 蛋白减少

了 A β 聚集体形成 (图 7B)。利用 Western blotting 实验检测线虫研磨液中 A β 蛋白含量, 结果同样表明, sDSS1 蛋白减少了 A β 蛋白多聚体的含量 (图 7C)。用 ELISA 实验检测组织裂解液中 A β 1-42 蛋白含量, 可以看到 sDSS1 蛋白处理的线虫中 A β 蛋白显降低, 1000 μ g/mL sDSS1 蛋白处理组 A β 蛋白量仅是对照组的 59.09% (图 7D)。通过以上实验, 我们在 AD 线虫模型上验证 sDSS1 蛋白可以降低 A β 1-42 聚集体形成, 减少组织 A β 蓄积, 缓解 AD 模型线虫的疾病症状。

实施例 7、sDSS1 蛋白加速小鼠体内 A β 蛋白的清除。

实验方法

1. APP/PS1 小鼠血液 A β 清除实验 APP/PS1 小鼠 (2 月龄, 雄性) 购自南京大学模式动物中心。APP/PS1 小鼠从 8 月龄开始, 按照 25mg/kg 体重连续尾静脉注射 sDSS1 蛋白 8 周, 完成后处死小鼠, 取血并离心取血浆用于 ELISA 检测血液中 A β 1-42 水平。

2. A β 蛋白急性清除实验 ICR 小鼠 (6-8 周龄, 雄性) 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠根据体重分成四组, 包括阴性对照组 (注射生理盐水)、阳性对照组 (A β 蛋白单独给药)、低剂量给药组 (A β 给药和 5mg/kg 体重注射 sDSS1 蛋白)、高剂量给药组 (A β 给药和 30mg/kg 体重注射 sDSS1 蛋白)。实验开始时, 小鼠首先根据分组尾静脉注射 sDSS1 蛋白, 阴性对照组和阳性对照组注射等量 PBS, 1 小时后, 阳性对照组和给药组按照 10mg/kg 体重尾静脉注射 A β 蛋白, 阴性对照组注射等量生理盐水。注射完成后, 小鼠正常饲养, 2 小时后处死小鼠, 心脏取血, 3500g 离心 20 分钟取血浆用于 ELISA 检测 A β 1-42 水平。

3. ELISA 检测 将上述实验中获得的血浆样品 (必要时稀释 1-3 倍) 用于 ELISA 实验。按 ELISA 试剂盒说明书要求, 依次完成标准品蛋白和待测血浆样品的孵育和清洗, 加入显色底物孵育 20 分钟,

加入终止液，在酶标仪上检测 450nm 吸光度值。根据标准曲线计算出血浆中的 A β 蛋白浓度。

实验结果

为了检测 sDSS1 蛋白能否帮助清除 A β 蛋白，我们分别采用急性 A β 水平增加模型和慢性 A β 水平增加模型。在急性模型中，通过尾静脉注射高浓度 A β 1-42 蛋白，同时注射 sDSS1 蛋白。实验结果显示，不同浓度的 sDSS1 蛋白给药都能显著降低血液 A β 蛋白水平，并且该效应呈现出一定的剂量依赖性（图 8A）。在慢性模型中，给 AD 模型 APP/PS1 小鼠长时间尾静脉注射 sDSS1 蛋白，结果发现 sDSS1 蛋白同样能减少血液 A β 蛋白的水平（图 8B）。这两个结果说明 sDSS1 蛋白能帮助清除小鼠血液中 A β 蛋白。

实施例 8、sDSS1 蛋白降低 AD 模型小鼠脑组织斑块沉积。

实验方法

1. AD 模型小鼠给药 APP/PS1 小鼠（2 月龄，雄性）购自南京大学模式动物中心。APP/PS1 小鼠从 9 月龄开始，按照 50mg/kg 体重连续尾静脉注射 sDSS1 蛋白 8 周，完成后小鼠用于行为学实验检测。行为学实验完成后，小鼠处死，取血浆用于血液指标检测，取脑组织并在 4%多聚甲醛固定用于免疫组织化学染色分析斑块沉积水平。

2. 免疫组织化学实验 处理完成的小鼠依次用 50m 生理盐水和 50m 预冷的 4%多聚甲醛溶液进行心脏灌注，完成后取脑组织浸泡在 4%多聚甲醛中固定 2 天，完成后用 30%蔗糖溶液脱水并用包埋剂包埋制成组织块。脑组织用冰冻切片机切成 10um 厚的脑片用于后续免疫组织化学分析。脑片首先用 PBS 清洗一遍除去包埋剂，然后用 FSB 工作液 (Dojindo, F308) (用 50%乙醇溶液稀释成 0.05%工作液) 孵育 30 分钟，完成后切片浸泡到饱和碳酸锂溶液中，最后用 50%乙醇溶液清洗一遍。切片用封片剂封片并用荧光显微镜观察，拍照分析淀粉样沉淀斑块数量和大小。

实验结果

AD 模型小鼠给药 8 周后，脑片经染色观察组织中 A β 斑块沉积水平。结果显示，在对照组 11 月龄 APP/PS1sDSS1 小鼠的脑组织中检测到大小不一的斑块，但是 sDSS1 蛋白给药 8 周之后，组织中斑块沉积显著降低(图 9A)。利用 photoshop CS 软件统计斑块面积，结果给药组斑块面积仅是对照组三分之一(图 9B)。根据斑块大小统计斑块数量，结果看到给药组小鼠脑组织中型斑块数量显著降低，几乎找不到大型斑块沉积(图 9C)。这些结果说明，sDSS1 蛋白给药能显著降低 AD 模型小鼠脑组织 A β 蛋白沉积。

权利要求书

1、一种蛋白在制备预防和治疗痴呆症的药物中的应用，其特征在于，所述的应用是把 sDSS1 蛋白用于制备痴呆症预防药物和治疗药物。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的痴呆症是指退行性痴呆症，包括早老性痴呆症、老年性痴呆症、路易氏体型痴呆症、额颞叶型痴呆症。

3、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的痴呆症是血管性痴呆症。

4、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的痴呆症是痴呆前期痴呆症、轻度痴呆期痴呆症、中度痴呆期痴呆症、重度痴呆期痴呆症。

5、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白包括人、黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、白颊长臂猿、川金丝猴、恒河猴、滇金丝猴、东非狒狒、安哥拉疣猴、白顶白眉猴、鬼狒、豚尾猴中的任一 sDSS1 蛋白序列形成的基础蛋白，其中人 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1，黑猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2，倭黑猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3，大猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4，红毛猩猩 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5，白颊长臂猿 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6，川金丝猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7，恒河猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8，滇金丝猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9，东非狒狒 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10，安哥拉疣猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11，白顶白眉猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12，鬼狒 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13，豚尾猴 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14。

6、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是与所述的基础蛋白相似度达到 70% 以上的第一种蛋白。

7、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是以所述的基础蛋白的氮端 58 个氨基酸为基础，在氮端或碳端融合其他多肽片段，用于融合的多肽片段的结构特征或氨基酸序列特征与所述的基础蛋白的碳端 31 个序列相同或相似的第二种蛋白。

8、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是以所述的基础蛋白的氮端 58 个氨基酸为基础，在氮端或碳端融合其他氨基酸片段，融合后的蛋白能够实现跨膜转运功能的第三种蛋白。

9、根据权利要求 5-8 任一所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是利用所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白或第三种蛋白与该种蛋白自身、载体蛋白、抗体或其他任意长度氨基酸片段连接形成的融合蛋白。

10、根据权利要求 5-9 任一所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白进行的修饰产生的多肽/蛋白修饰物。

11、根据权利要求 10 所述的应用，其特征在于，所述多肽/蛋白修饰物是针对氨基酸侧链上的氨基、氨基酸侧链上的羰基、氮末端氨基、碳末端羰基、半胱氨酸、酪氨酸、丝氨酸、色氨酸进行的特异性或非特异性的 1-20 个位点的化学修饰。

12、根据权利要求 10 所述的应用，其特征在于，所述多肽/蛋白修饰物的修饰方法包括糖基化修饰、脂肪酸修饰、酰基化修饰、Fc 片段融合、白蛋白融合、聚乙二醇修饰、右旋糖苷修饰、肝素修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、聚氨基酸修饰、多聚唾液酸修饰、壳聚糖及其衍生物修饰、凝集素修饰、海藻酸钠修饰、卡波姆修饰、聚乙烯吡咯烷酮修饰、羟丙基甲基纤维素修饰、羟丙基纤维素修饰、乙酰化修饰、

甲酰化修饰、磷酸化修饰、甲基化修饰、磺酸化修饰以及其他医药上可用的多肽/蛋白药物修饰方法的一种或一种以上。

13、根据权利要求 5-9 所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是利用所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的氨基酸序列为基础进行的 20 种基本氨基酸以外的氨基酸进行的 1-31 个任意氨基酸位点替换的非天然氨基酸替代蛋白。

14、根据权利要求 13 所述的应用，其特征在于，所述的非天然氨基酸替代蛋白的氨基酸替换包括替换成羟脯氨酸、羟赖氨酸、硒代半胱氨酸、D-型氨基酸或者人工合成的非天然氨基酸及其衍生物。

15、根据权利要求 5-14 任一所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是把所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或非天然氨基酸替代蛋白与医药上可应用的药物载体形成的部分或全部复合体。

16、根据权利要求 15 所述的应用，其特征在于，所述复合体的药物载体包含肠溶衣制剂、胶囊、微球/囊、脂质体、微乳液、复乳液、纳米颗粒、磁颗粒、明胶和凝胶中的一种或一种以上。

17、根据权利要求 5-16 任一所述的应用，其特征在于，所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或复合体发挥屏蔽毒性蛋白毒性的起始工作浓度为不小于 0.2 μ g/mL。

18、根据权利要求 5-16 任一所述的应用，其特征在于，所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物或复合体发挥屏蔽毒性蛋白毒性的摩尔浓度比率为不小于 0.010；所述摩尔浓度比率是指反应体系中蛋白、多肽/蛋白修饰物或复合体的摩尔浓度与毒性蛋白摩尔浓度的比率。

19、根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述的sDSS1蛋白是以个体自身sDSS1蛋白为靶点，通过外源药物影响个体自身sDSS1蛋白的水平。

20、根据权利要求19所述的应用，其特征在于，所述的药物是以sDSS1蛋白、sDSS1蛋白的基因、sDSS1的基因的调控元件或sDSS1的基因的转录产物为药物作用靶点。

21、根据权利要求19所述的应用，其特征在于，所述的药物是通过影响血液或脑脊液中蛋白酶/肽酶活性从而调节sDSS1蛋白在血液或脑脊液中的含量。

22、根据权利要求19-21任一所述的应用，其特征在于，所述的药物是化学小分子药物、抗体、多肽/蛋白药物、核酸药物或纳米药物形成的第一种药物。

23、根据权利要求5-22任一所述的应用，其特征在于，所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、复合体、第一种药物中的任一种成分的两种或多种的组合形成的第二种药物。

24、根据权利要求5-22任一所述的应用，其特征在于，所述的sDSS1蛋白是以所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物中的任一种成分的一种、两种或多种与医药上可用的赋形剂的组合形成的第三种药物。

25、根据权利要求5-9任一所述的应用，其特征在于，所述的sDSS1蛋白是通过表达体系把编码所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白的核苷酸序列导入体内并表达获得的第四种蛋白。

26、根据权利要求25所述的应用，其特征在于，所述的表达体系是真核表达质粒载体、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、

杆状病毒、疱疹病毒、伪狂犬病毒、ZFN 基因编辑技术、TALEN 基因编辑技术、CRISPR/Cas 基因编辑技术或其他医疗上可用的基因编辑技术或病毒载体。

27、根据权利要求 5-9 任一所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是通过移植细胞在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第五种蛋白。

28、根据权利要求 27 所述的应用，其特征在于，所述的细胞是任意一种人的干细胞、前体细胞或成体细胞。

29、根据权利要求 28 所述的应用，其特征在于，所述的干细胞是胚胎干细胞、诱导多能干细胞、转分化得到的细胞，或者来源于原代培养的干细胞、由母细胞分化得到的多能或单能干细胞。

30、根据权利要求 5-9 任一所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是通过移植组织或器官在个体体内获得的所述的基础蛋白、第一种蛋白、第二种蛋白、第三种蛋白或融合蛋白形成的第六种蛋白。

31、根据权利要求 30 所述的应用，其特征在于，所述的组织是脑、肝、肾、脾、胰岛的完整器官或部分组织块，或血液、脂肪、肌肉、骨髓、皮肤。

32、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述的 sDSS1 蛋白是通过血清、脑脊液、组织间液输注引入个体体内的第七种蛋白。

33、根据权利要求 1-32 任一所述的应用，其特征在于，所述的预防药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物、第二种药物、第三种药物、在表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

34、根据权利要求 1-32 任一所述的应用，其特征在于，所述的治疗药物是包含基础蛋白、第一种至第七种任一蛋白、融合蛋白、多肽/蛋白修饰物、非天然氨基酸替代蛋白、复合体、第一种药物、第二种药物、第三种药物、在表达体系、细胞、组织、器官、体液、组织液的蛋白药物、多肽药物、核酸药物、化学小分子药物、细胞产品、商业化移植组织、注射液、冻干粉、保健品、食品添加剂中的一种或多种。

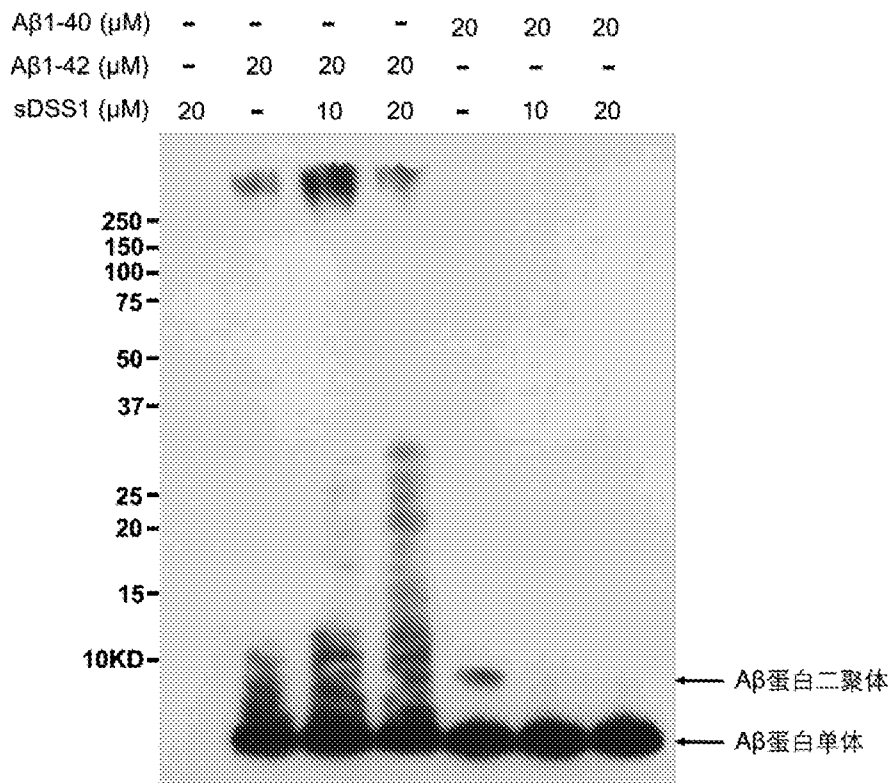


图 1A

| | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Aβ1-40 (μM) | - | - | - | - | 20 | 20 | 20 |
| Aβ1-42 (μM) | - | 20 | 20 | 20 | - | - | - |
| sDSS1 (μM) | 20 | - | 10 | 20 | - | 10 | 20 |

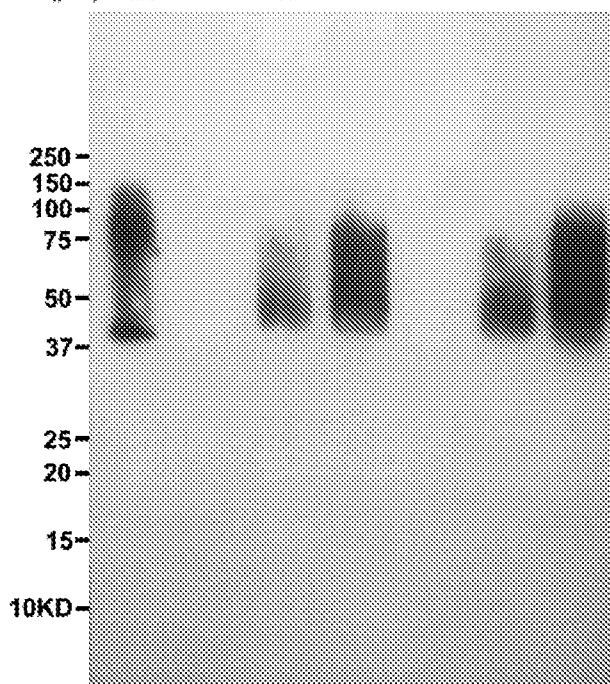


图 1B

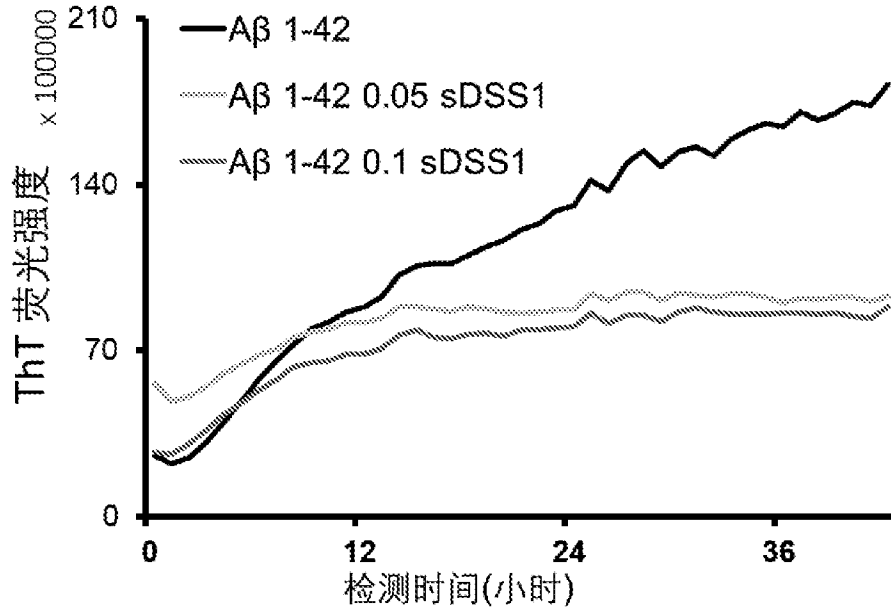


图 1C

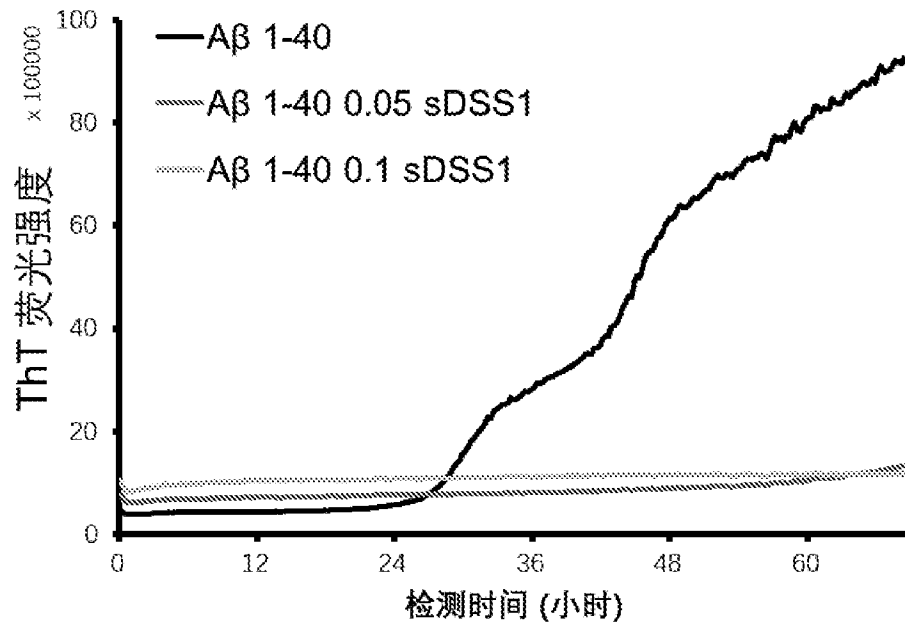


图 1D

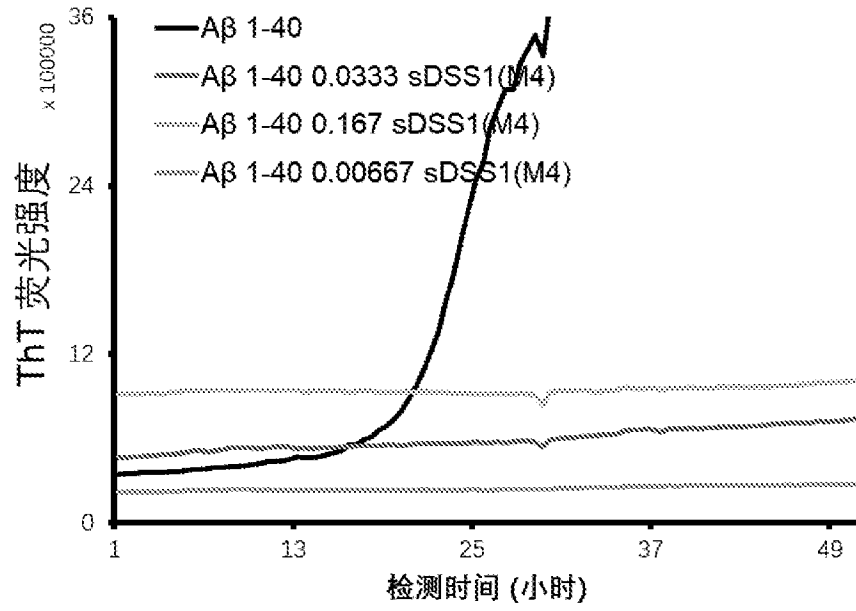


图 1E

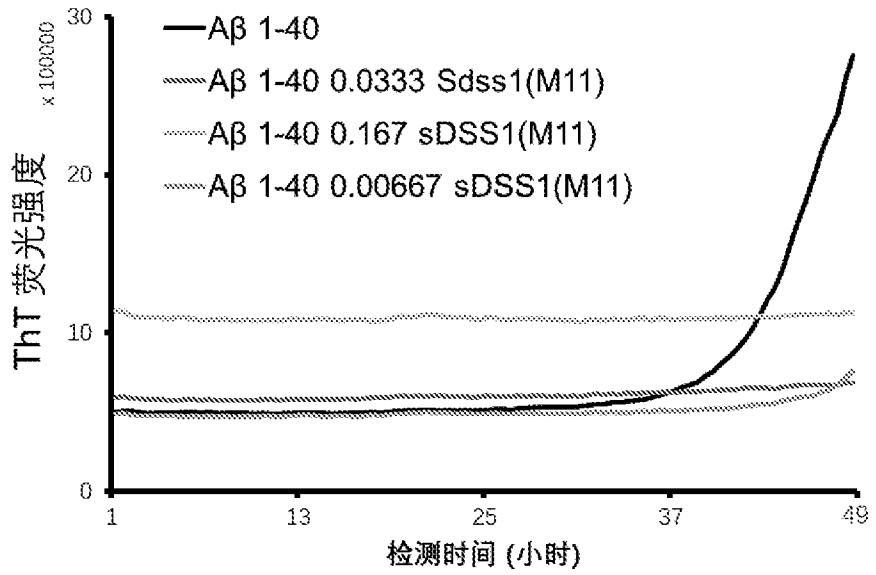


图 1F

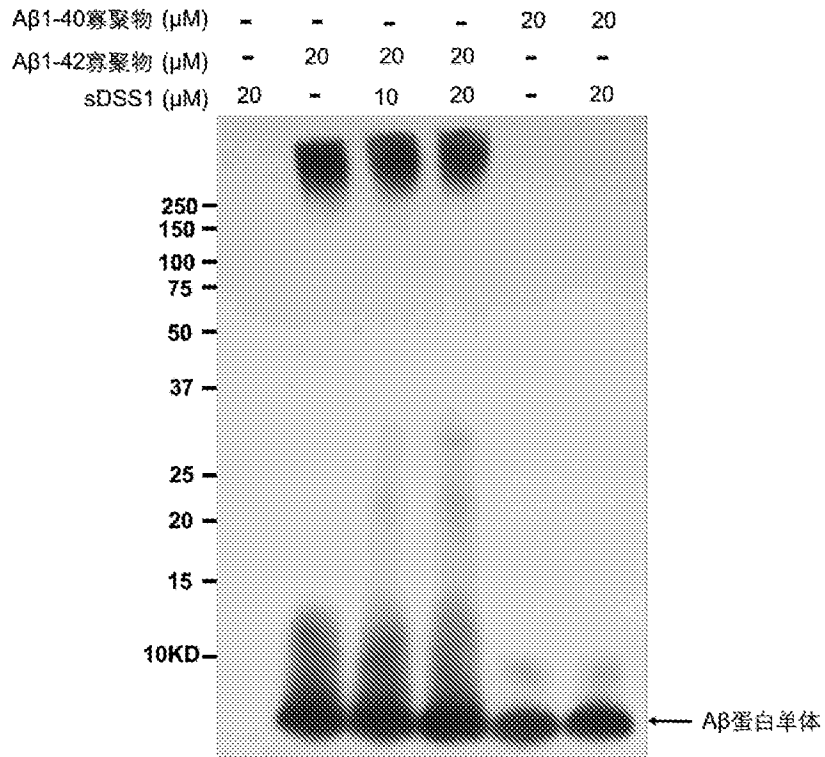


图 2A

| | | | | | |
|------------------------------|----|----|----|----|----|
| A β 1-40寡聚物 (μ M) | - | - | - | 20 | 20 |
| A β 1-42寡聚物 (μ M) | - | 20 | 20 | - | - |
| sDSS1 (μ M) | 20 | - | 20 | - | 20 |

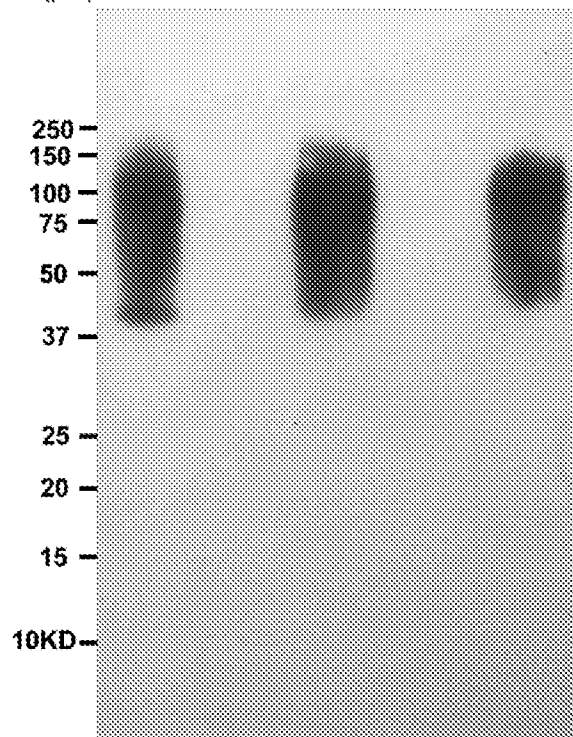


图 2B

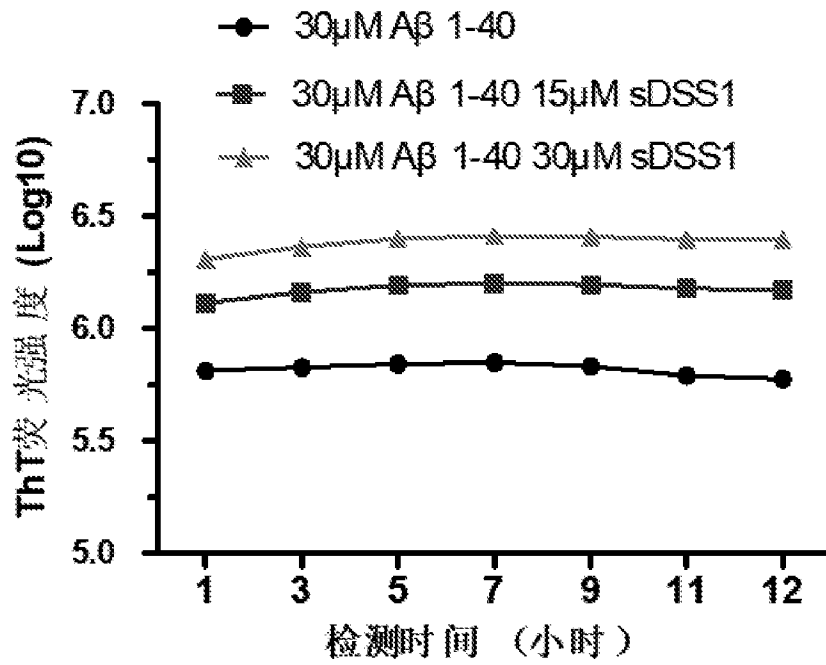


图 2C

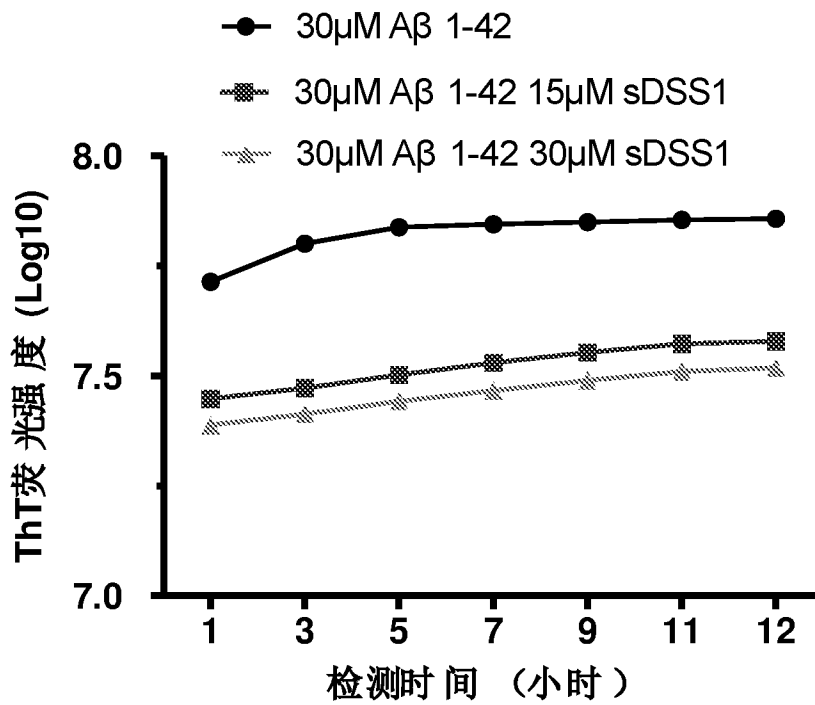


图 2D

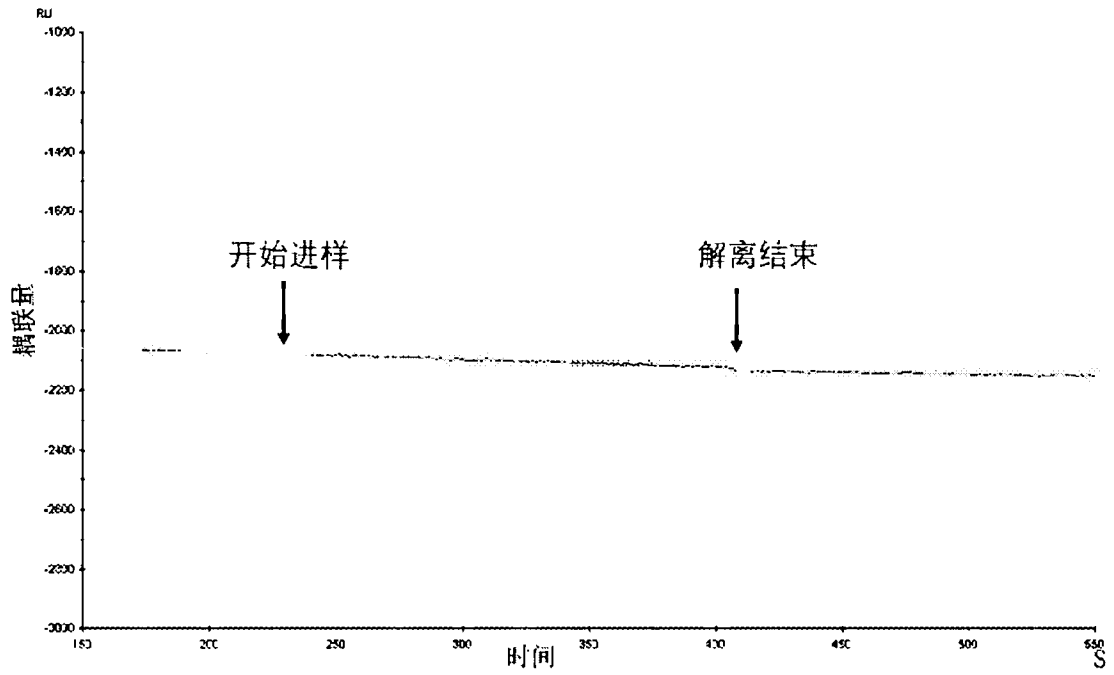


图 3A

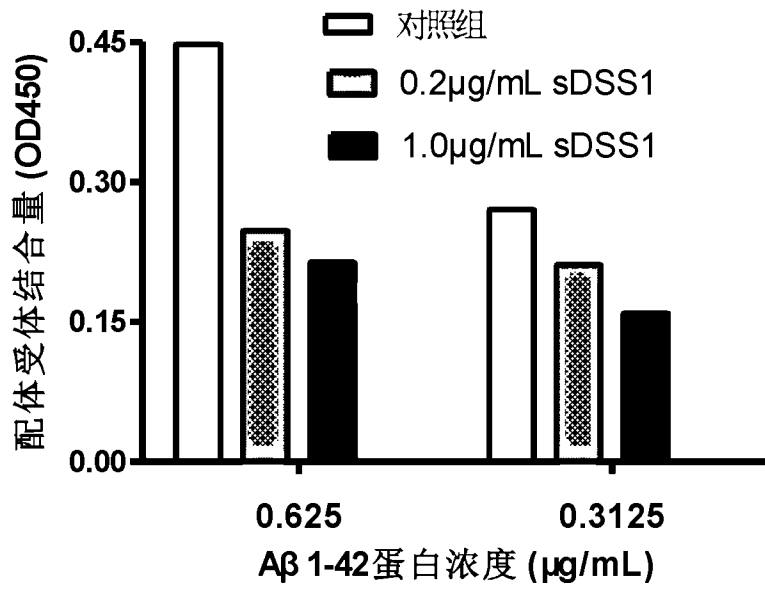


图 3B

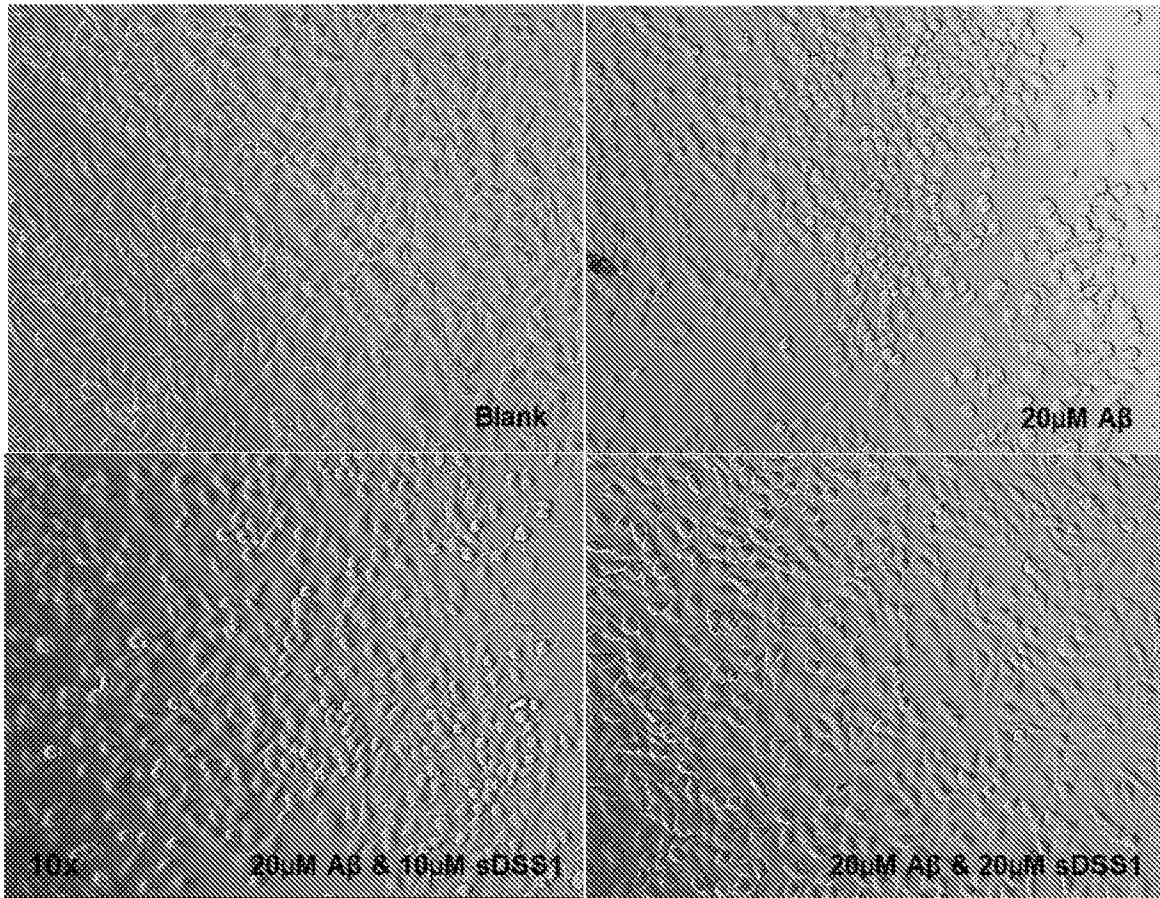


图 4A

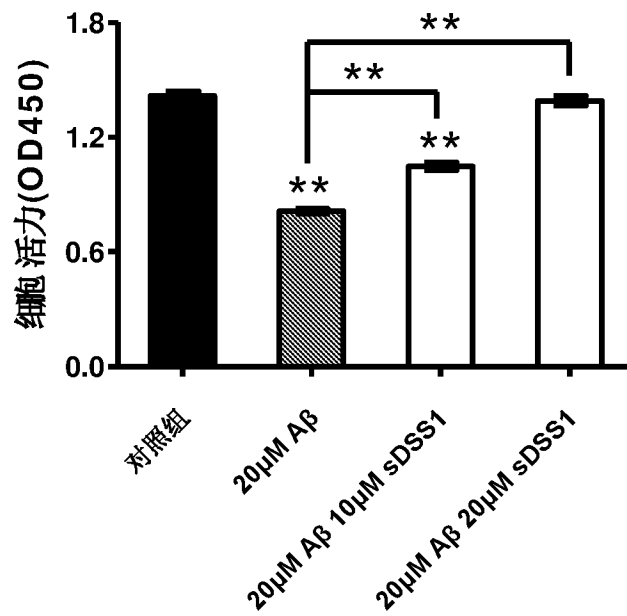


图 4B

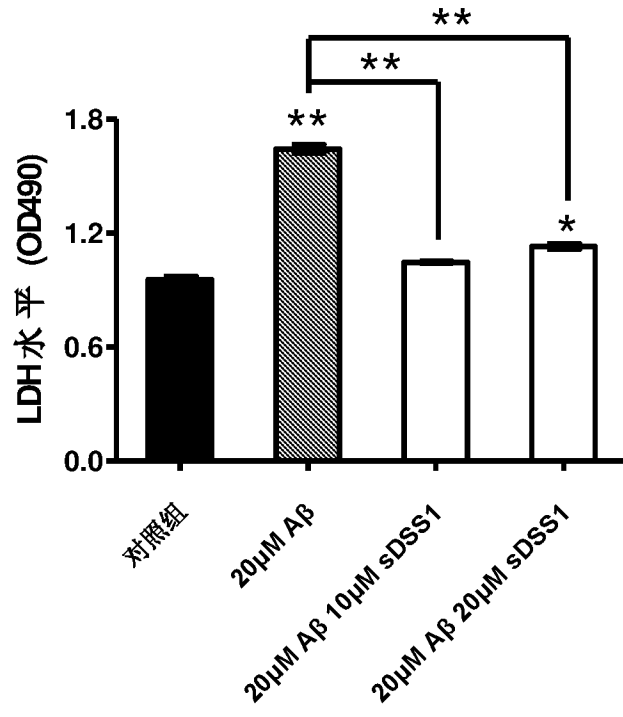


图 4C

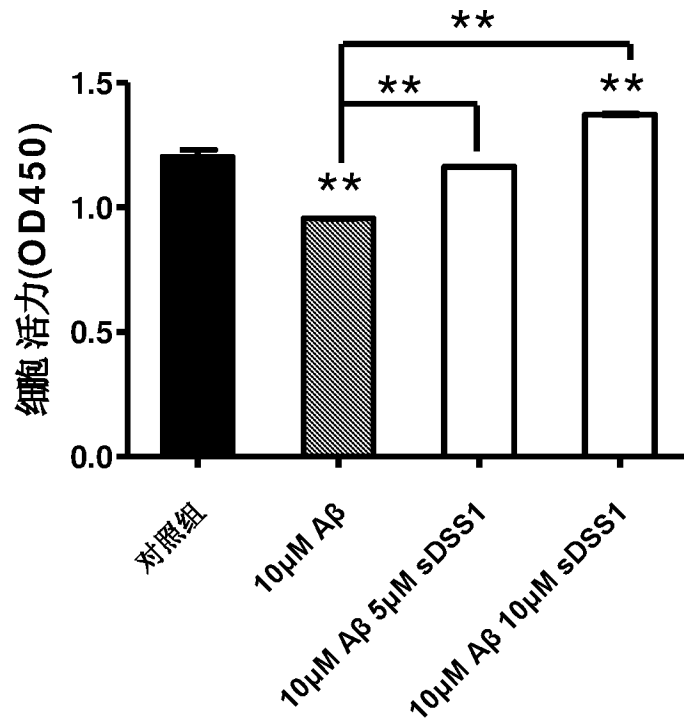


图 5A

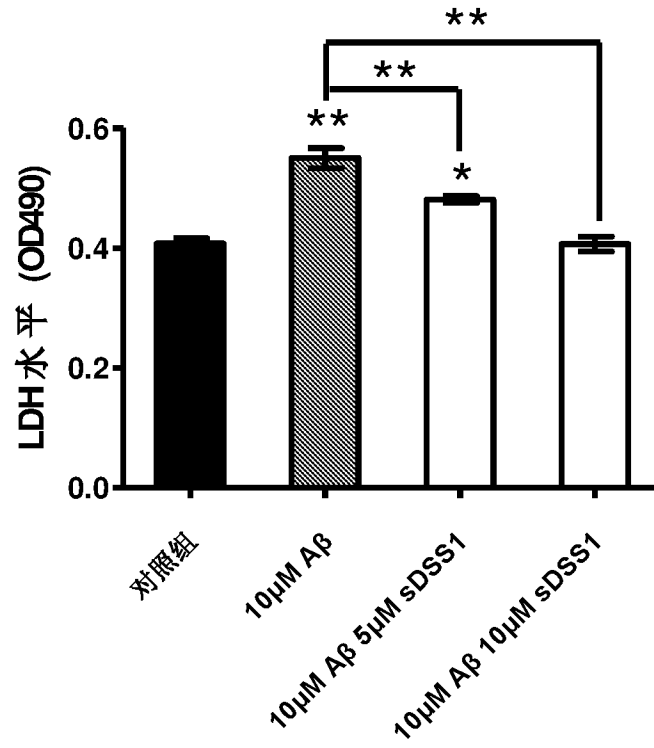


图 5B

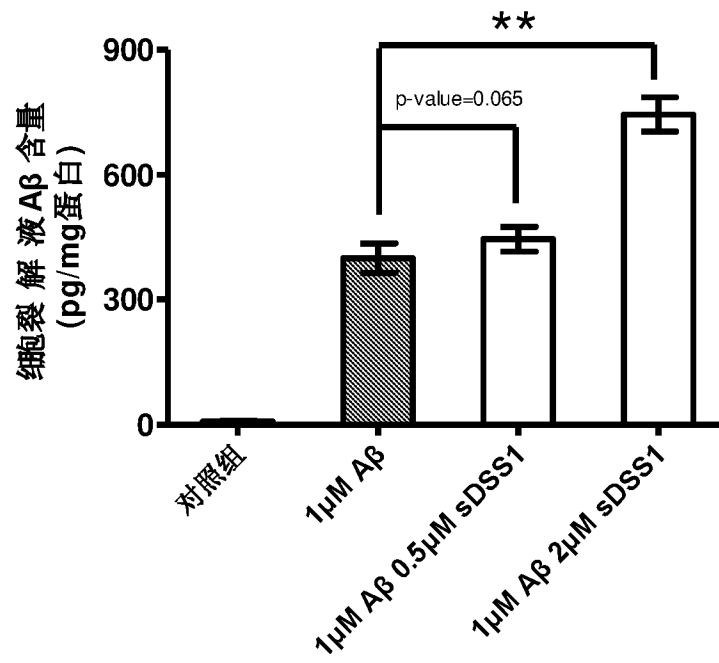


图 6A

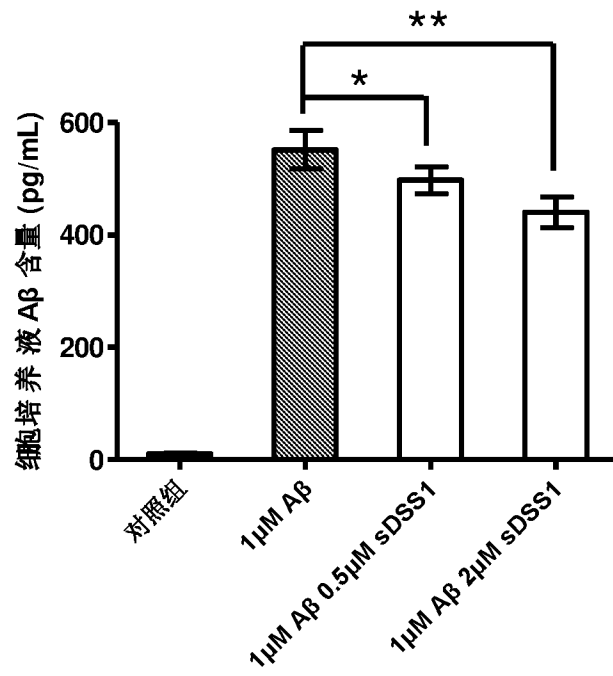


图 6B

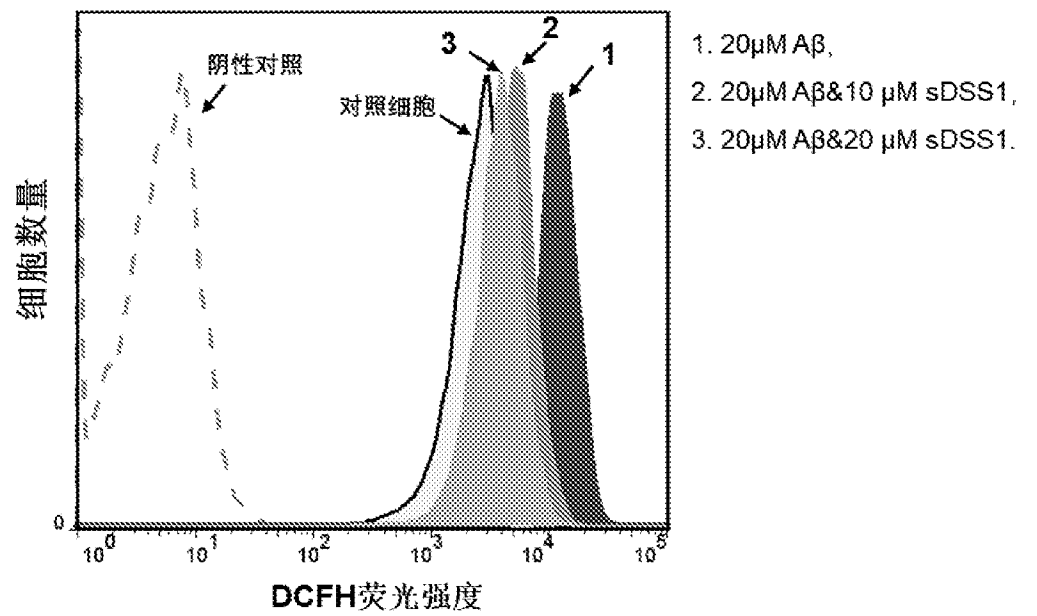


图 6C

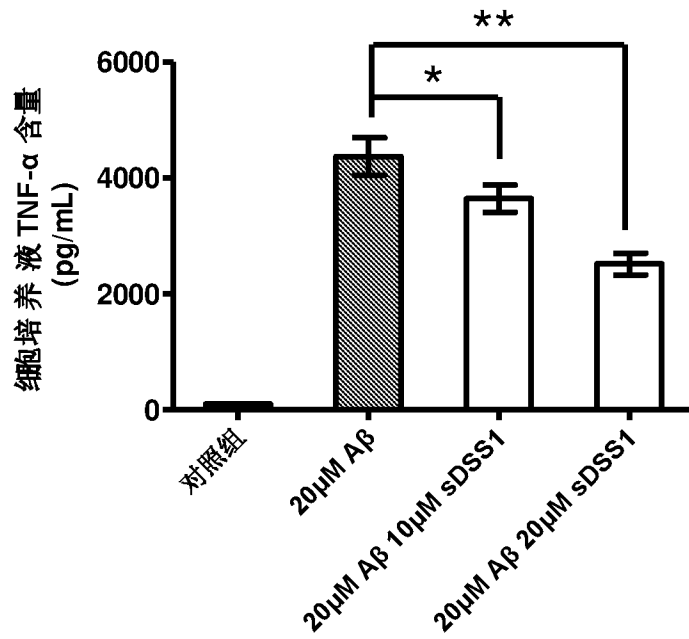


图 6D

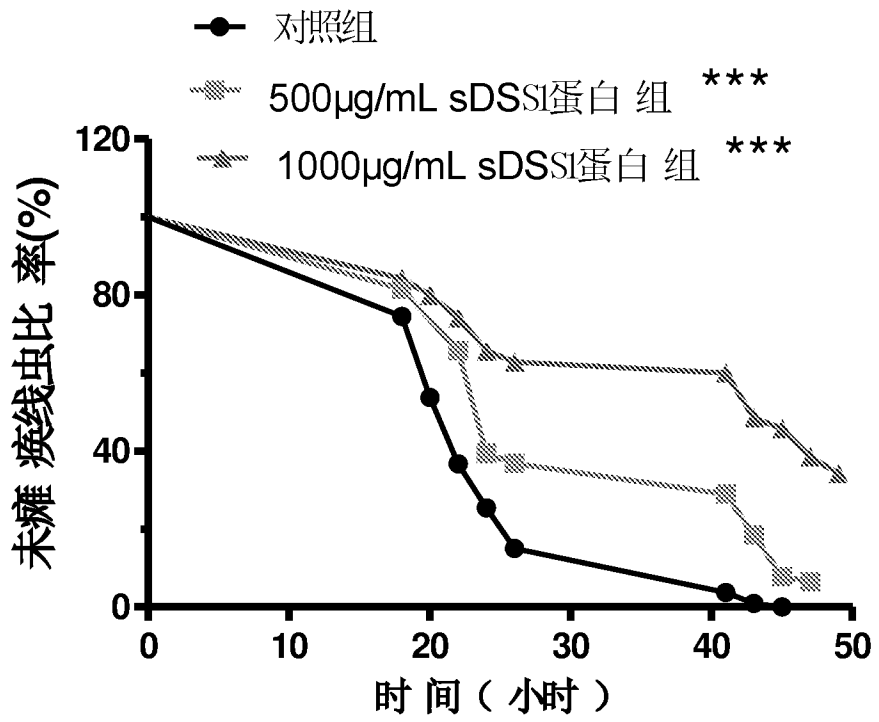


图 7A

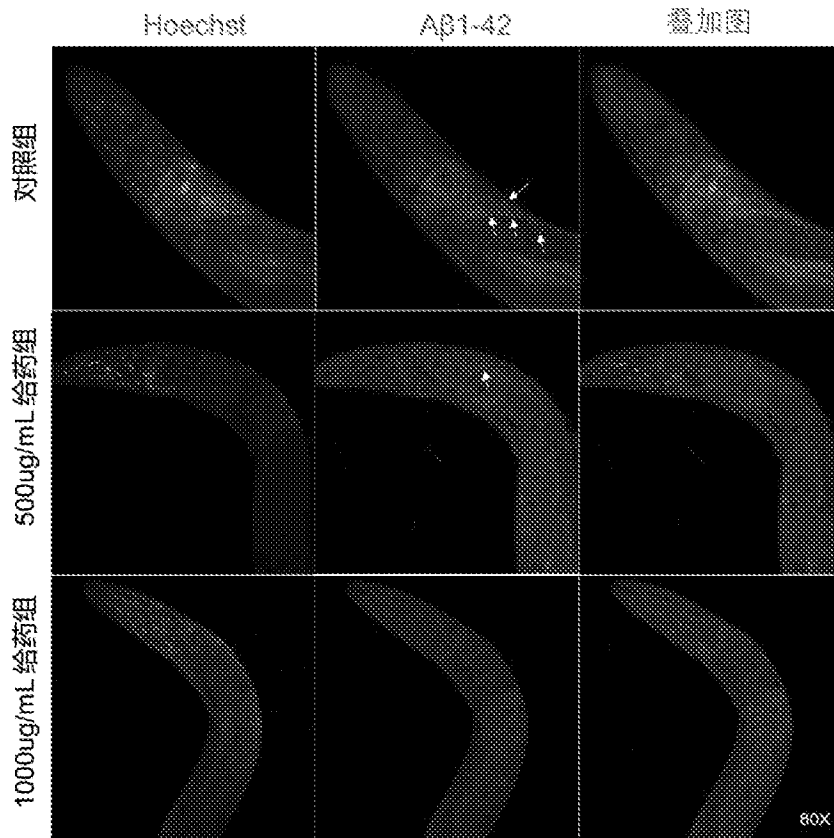


图 7B

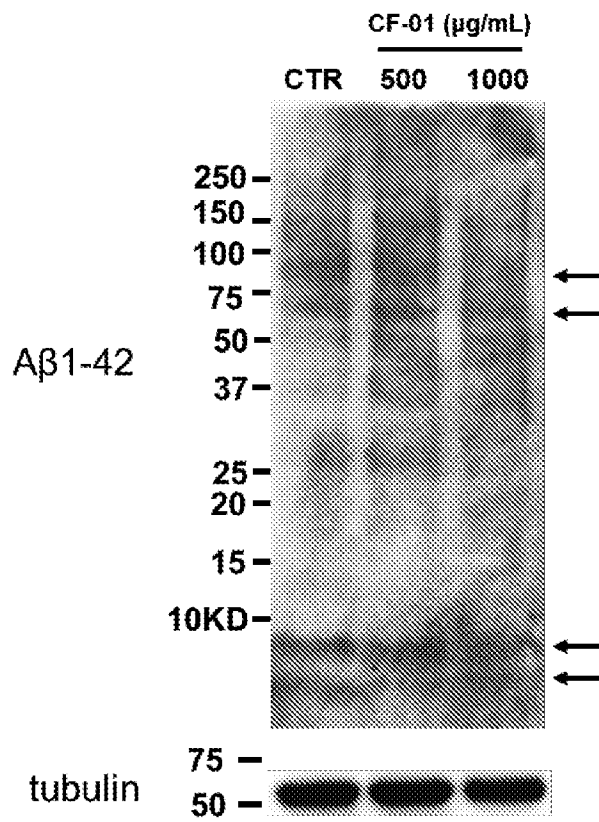


图 7C

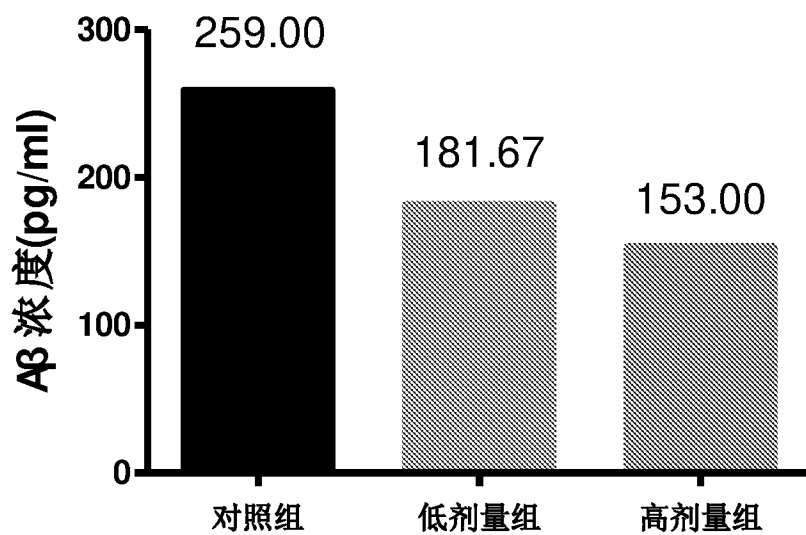


图 7D

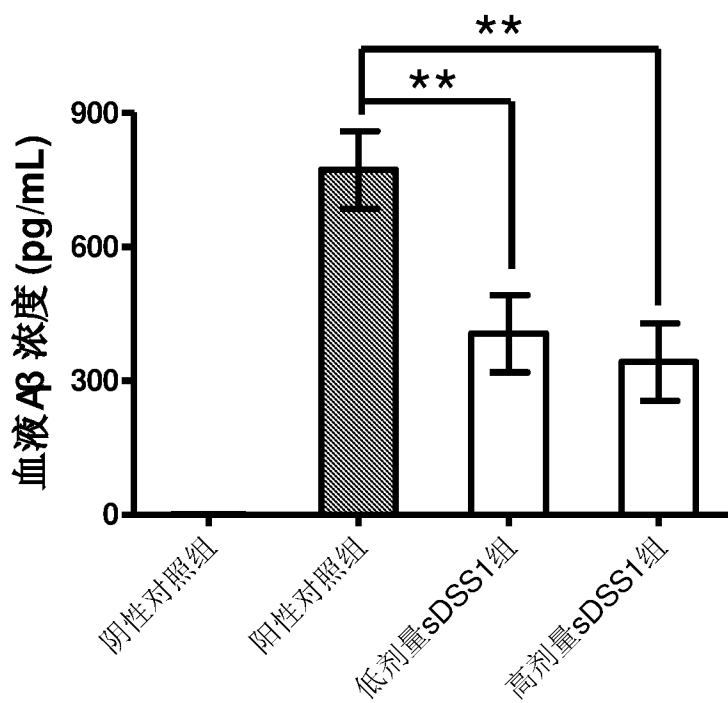


图 8A

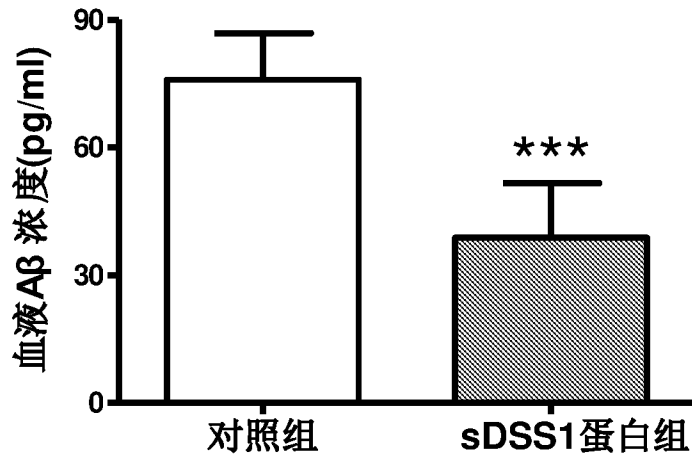


图 8B

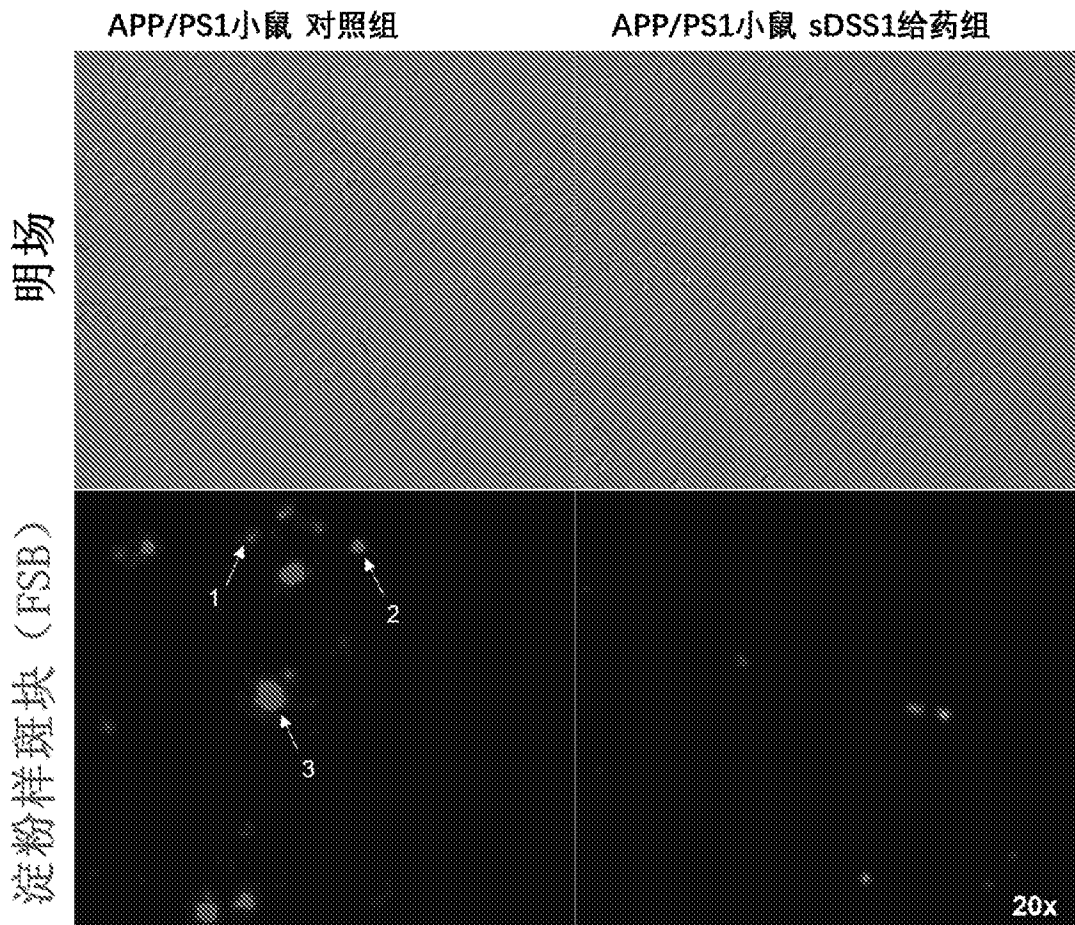


图 9A

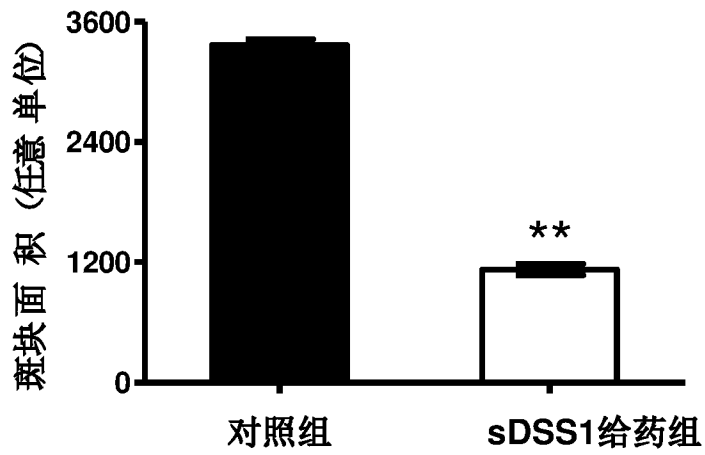


图 9B

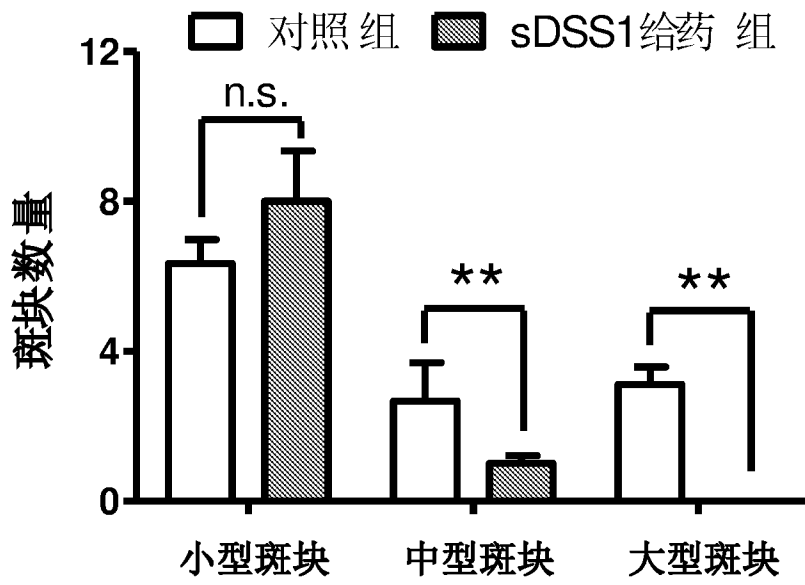


图 9C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/120172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K A61P

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

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

CNABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; WEB OF KNOWLEDGE; CNKI; NCBI GENBANK; 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; DDBJ; UNIPROT: 张英豪, 付晶鹏, 胡楠, 上海清流生物医药科技有限公司, sDSS1蛋白, 痴呆, 阿尔兹海默, 阿尔茨海默, search based on SEQ ID: 1-14, AD, Dementia, Alzheimer Disease, Shfm1, DSS1, A β **C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| PX | CN 107573412 A (SHANGHAI CLEAR FLUID BIOMEDICAL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 12 January 2018 (2018-01-12) description, paragraphs 18-131, sequence table, and figures 1-6C | 1-34 |
| X | GONG, Chengxin. "DSSylation, a Novel Guide for Protein Degradation" <i>Protein & Cell</i> , Vol. 5, No. (2), 31 December 2014 (2014-12-31), pp. 91-93 | 1-34 |
| A | ZHANG, Yinghao et al. "DSSylation, a Novel Protein Modification Targets Proteins Induced by Oxidative Stress, and Facilitates Their Degradation in Cells" <i>Protein & Cell</i> , Vol. 5, No. (2), 31 December 2014 (2014-12-31), pp. 124-140 | 1-34 |

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 February 2019

Date of mailing of the international search report

06 March 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/120172

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| CN 107573412 A | 12 January 2018 | WO 2018006750 A1 | 11 January 2018 |
| | | WO 2018006750 A8 | 08 February 2018 |
| | | KR 20180127382 A | 28 November 2018 |
| | | CA 3029458 A1 | 11 January 2018 |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/120172

| <p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 38/17(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p> | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---------|-----|-------------------|---------|----|--|------|---|--|------|---|--|------|
| <p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K C07K A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;DWPI;SIPOABS;EPTXT;USTXT;WOTXT;WEB of KNOWLEDGE;CNKI;NCBI GenBank;中国专利生物序列检索系统; DDBJ;UNIPROT;张英豪, 付晶鹏, 胡楠, 上海清流生物医药科技有限公司, sDSS1蛋白, 痴呆, 阿尔兹海默, 阿尔茨海默, 根据SEQ ID: 1-14中的序列进行了检索, AD, Dementia, Alzheimer Disease, Shfm1, DSS1, Aβ</p> | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107573412 A (上海清流生物医药科技有限公司) 2018年 1月 12日 (2018 - 01 - 12) 说明书第18-131段, 序列表, 附图图1-图6C</td> <td>1-34</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>GONG, Cheng Xin. "DSSylation, a Novel Guide for Protein Degradation" PROTEIN & CELL, 第5卷, 第2期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第91-93页</td> <td>1-34</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZHANG, Ying Hao 等. "DSSylation, a Novel Protein Modification Targets Proteins Induced by Oxidative Stress, and Facilitates Their Degradation in Cells" PROTEIN & CELL, 第5卷, 第2期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第124-140页</td> <td>1-34</td> </tr> </tbody> </table> | | | 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | PX | CN 107573412 A (上海清流生物医药科技有限公司) 2018年 1月 12日 (2018 - 01 - 12) 说明书第18-131段, 序列表, 附图图1-图6C | 1-34 | X | GONG, Cheng Xin. "DSSylation, a Novel Guide for Protein Degradation" PROTEIN & CELL, 第5卷, 第2期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第91-93页 | 1-34 | A | ZHANG, Ying Hao 等. "DSSylation, a Novel Protein Modification Targets Proteins Induced by Oxidative Stress, and Facilitates Their Degradation in Cells" PROTEIN & CELL, 第5卷, 第2期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第124-140页 | 1-34 |
| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | | | | | | | | | | | | |
| PX | CN 107573412 A (上海清流生物医药科技有限公司) 2018年 1月 12日 (2018 - 01 - 12) 说明书第18-131段, 序列表, 附图图1-图6C | 1-34 | | | | | | | | | | | | |
| X | GONG, Cheng Xin. "DSSylation, a Novel Guide for Protein Degradation" PROTEIN & CELL, 第5卷, 第2期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第91-93页 | 1-34 | | | | | | | | | | | | |
| A | ZHANG, Ying Hao 等. "DSSylation, a Novel Protein Modification Targets Proteins Induced by Oxidative Stress, and Facilitates Their Degradation in Cells" PROTEIN & CELL, 第5卷, 第2期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第124-140页 | 1-34 | | | | | | | | | | | | |
| <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p> | | | | | | | | | | | | | | |
| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 | | | | | | | | | | | | | |
| 2019年 2月 13日 | 2019年 3月 6日 | | | | | | | | | | | | | |
| ISA/CN的名称和邮寄地址 | 受权官员 | | | | | | | | | | | | | |
| 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 | 何华山 | | | | | | | | | | | | | |
| 传真号 (86-10)62019451 | 电话号码 (86-512)88996498 | | | | | | | | | | | | | |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/120172

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日 (年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日 (年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|------|-------------|----|----------------|
| CN | 107573412 | A | 2018年 1月 12日 | WO | 2018006750 | A1 | 2018年 1月 11日 |
| | | | | WO | 2018006750 | A8 | 2018年 2月 8日 |
| | | | | KR | 20180127382 | A | 2018年 11月 28日 |
| | | | | CA | 3029458 | A1 | 2018年 1月 11日 |