



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113354724 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 202110467570.1

A61P 25/28 (2006.01)

(22) 申请日 2021.04.28

A23L 33/18 (2016.01)

(71) 申请人 蒋青

地址 210008 江苏省南京市鼓楼区中山路321号

(72) 发明人 蒋青 郭保生 石天舒

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 殷星

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

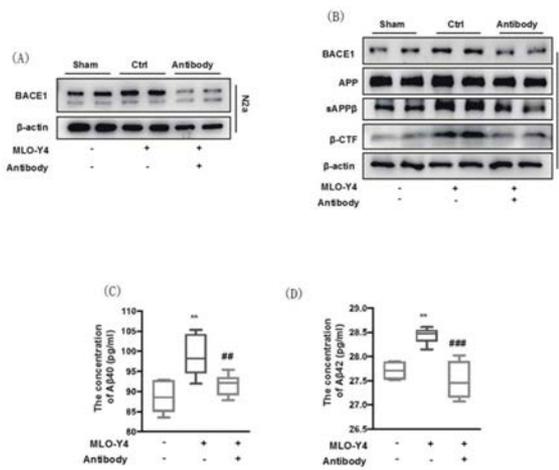
权利要求书1页 说明书9页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

骨硬化蛋白及其在制备治疗或预防阿尔兹海默症的相关产品上应用

(57) 摘要

本发明属于阿尔兹海默症的相关药物研究领域,具体公开了骨硬化蛋白及其在制备治疗或预防阿尔兹海默症的相关产品上应用。骨硬化蛋白作为一种骨细胞分泌的调控骨量的蛋白,其氨基酸序列如SEQ NO.1所示。通过合成骨硬化蛋白重蛋白以及相应的中和抗体,再通过细胞、动物学实验验证,sclerostin重组蛋白可以加速脑组织外Aβ蛋白的产生,加速认知功能衰退;在加入中和抗体之后,通过显著抑制BACE1蛋白表达,抑制Aβ蛋白的产生,具有缓解阿尔兹海默症的作用。本发明基于sclerostin制备的中和抗体具有治疗和/或预防的作用,可被用于制备治疗和/或阿尔兹海默症的药物或保健品,这为治疗和/或预防阿尔兹海默症提供了一种全新的选择和思路,拓宽了治疗阿尔兹海默症的选择领域。



1. 骨硬化蛋白,其特征在于,所述骨硬化蛋白的氨基酸序列如SEQ NO.1所示。
2. 根据权利要求1所述的骨硬化蛋白,其特征在于,编码所述骨硬化蛋白的核苷酸序列如SEQ NO.2示。
3. 一种重组质粒,其特征在于,含有编码权利要求1所述的骨硬化蛋白的核苷酸序列的质粒。
4. 一种重组菌株,其特征在于,表达权利要求3所述的重组质粒的菌株。
5. 基于权利要求1所述的骨硬化蛋白、权利要求3所述的重组质粒或权利要求4所述的重组菌株在制备治疗或预防阿尔兹海默症的中和抗体上应用。
6. 一种中和抗体,其特征在于,其有效成分为权利要求1所述的骨硬化蛋白、权利要求3所述的重组质粒或权利要求4所述的重组菌株。
7. 一种治疗或预防阿尔兹海默症的产品,其特征在于,包含权利要求1所述骨硬化蛋白、权利要求3所述的重组质粒、权利要求4所述的重组菌株或权利要求6所述的一种中和抗体作为活性成分;所述产品为药物组合物或保健品。
8. 根据权利要求7所述的治疗或预防阿尔兹海默症的产品,其特征在于,所述药物组合物的剂型为注射粉针、注射针剂或散剂粉末。

骨硬化蛋白及其在制备治疗或预防阿尔兹海默症的相关产品 上应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域的新用途,属于阿尔兹海默症的相关药物研究领域,具体涉及骨硬化蛋白(sclerostin)及其在制备治疗或预防阿尔兹海默症的相关产品上应用。

背景技术

[0002] 阿尔兹海默症(Alzheimer's Disease,AD)是一种逐渐加重的神经退行性疾病,广泛影响到患者的大脑皮质和海马区域,导致患者进行性记忆减退,严重影响正常老年人的认知功能,给患者带来严重的生活负担,也给社会带来沉重的经济压力。到2018年,全球大约有0.44亿人患有阿尔兹海默症,而这个数字将会在2050年达到1.5亿人,然而其中具体机制不是很清楚,并且尚无显著改善的药物治疗。

[0003] 目前对于阿尔兹海默症的致病原因可能与细胞外空间和血管壁上的斑块状不溶淀粉状蛋白 β (A β)的积累以及神经元中微管Tau蛋白聚集导致的神经缠结增加有关。A β 蛋白是由APP蛋白上裂解下来,并以可扩散的寡聚物(A β O)的方式释放到细胞外环境中。A β O可以通过APOE介导从大脑中清除,也可以通过低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)被星形胶质细胞摄取从而降低脑组织中A β O的浓度。此外,A β O还可以在细胞间隙中聚集形成原纤维结构,然后将其组装成斑块。A β 斑块可通过吞噬作用被巨噬细胞和小胶质细胞清除,也可以在星形胶质细胞的内切蛋白酶(IDE、NEP、MMPs)作用下降解。然而目前研究认为,在阿尔兹海默症临床前期,就可以出现脑脊液中A β O清除效率降低,增加脑脊液A β O浓度,这可能与这些降解蛋白酶功能失调有关。此外,并不是所有A β O都可以被清除,一些从A β 原纤维解离的低聚物可能未被清除,并且对相邻的突触有一定毒性,促使微管相关Tau蛋白的过度磷酸化和聚集,使其失去了与微管结合和稳定微管的作用,聚集形成成对螺旋丝,加重认知功能的退变。

[0004] 骨硬化蛋白(sclerostin)是由sost基因编码表达翻译的糖蛋白,在成年以前,发现骨细胞、肝脏细胞、心脏、血管内皮细胞都可以分泌,在成年以后,sost基因主要由骨细胞、软骨细胞表达,分泌于血液中调控外周骨量。之前的研究发现,sclerostin是Wnt信号的特异性抑制因子,可以与细胞表面LRP5/6结合,激活了下游的GSK-3 β 活性,从而增加 β -catenin的磷酸化水平,促进其蛋白降解,从而起到抑制Wnt信号作用。同时Wnt信号通路在成人脑中调控神经元突触可塑性和记忆功能中也起到重要作用,之前的研究发现在家族性PS1突变的家族性AD患者中, β -catenin蛋白表达显著下降,且在前脑神经元细胞中特异性敲除LRP6受体,可以显著损伤突触可塑性,增加A β 蛋白的表达,这可能与Wnt信号受到抑制时,激活BACE1蛋白的表达,促进A β 蛋白剪切体的形成。因此,提示sclerostin可能在阿尔兹海默症发病过程中以及A β 蛋白产生过程中起到重要作用。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供了骨硬化蛋白(sclerostin)及其在制备治疗或

预防阿尔兹海默症的相关产品上应用,该骨硬化蛋白的氨基酸序列如SEQ NO.1所示,将其应用到制备治疗和/或预防阿尔兹海默症的中和抗体的药物中,表现出较好的减少神经元细胞BACE1表达,以及抑制A β 蛋白产生的作用,为治疗和/或预防阿尔兹海默症提供了一种全新的选择和思路,拓宽了治疗阿尔兹海默症的选择领域。

[0006] 为解决现有技术问题,本发明采取的技术方案为:

[0007] 骨硬化蛋白(sclerostin),所述的骨硬化蛋白的氨基酸序列如SEQ NO.1所示。

[0008] 作为改进的是,编码上述骨硬化蛋白的核苷酸序列如SEQ NO.2示。

[0009] 一种重组质粒,含有上述的骨硬化蛋白的核苷酸序列的质粒。

[0010] 一种重组菌株,其特征在于,表达上述的重组质粒的菌株。

[0011] 上述骨硬化蛋白、重组质粒或重组菌株在制备治疗或预防阿尔兹海默症的中和抗体上应用。

[0012] 一种中和抗体,其特征在于,其有效成分为上述的骨硬化蛋白、重组质粒或重组菌株。

[0013] 一种治疗或预防阿尔兹海默症的产品,包含上述骨硬化蛋白、重组质粒、重组菌株或中和抗体作为活性成分;所述产品为药物组合物或保健品。

[0014] 作为改进的是,所述药物组合物的剂型为注射粉针、注射针剂或散剂粉末。

[0015] 有益效果:

[0016] 与现有技术相比,本发明骨硬化蛋白(sclerostin)及其在制备治疗或预防阿尔兹海默症的相关产品上应用,骨硬化(sclerostin)作为一种骨细胞分泌的调控骨量的蛋白,发明人通过复制骨硬化蛋白的核苷酸序列合成重组蛋白,再通过细胞、动物学实验验证,发现sclerostin蛋白可以加速脑组织外A β 蛋白的产生,加速认知功能衰退,同时,在加入合成的中和抗体之后,通过显著抑制BACE1蛋白表达,从而抑制A β 蛋白的产生,具有缓解阿尔兹海默症的作用。可见,基于sclerostin制备的中和抗体具有治疗和/或预防的作用,可被用于制备治疗和/或阿尔兹海默症的药物或保健品,这为治疗和/或预防阿尔兹海默症提供了一种全新的选择和思路,拓宽了治疗阿尔兹海默症的选择领域。

附图说明

[0017] 图1为增加骨源性sclerostin蛋白显著增加淀粉样蛋白沉积,加速阿尔兹海默症小鼠认知功能衰退,(A)在打入骨靶向过表达sost病毒后,小鼠血清中sclerostin蛋白水平显著增加;(B-C)在阿尔兹海默症小鼠模型APP/PS1小鼠中,增加血清中sclerostin蛋白浓度,显著增加淀粉样蛋白沉积模式图(B)以及统计图(C);(D-G)在阿尔兹海默症小鼠模型APP/PS1小鼠中,增加血清中sclerostin蛋白浓度,显著增加大脑皮质和海马区A β 1-40、1-42蛋白产生;(H)水迷宫检测发现,在阿尔兹海默症小鼠模型APP/PS1小鼠中,增加血清中sclerostin蛋白浓度,显著破坏阿尔兹海默症小鼠空间记忆能力;(I)新事物认知检测发现,在阿尔兹海默症小鼠模型APP/PS1小鼠中,增加血清中sclerostin蛋白浓度,显著破坏阿尔兹海默症小鼠对新事物探索的能力;

[0018] 图2(A)为在神经元细胞系N2a中,加入sclerostin重组蛋白,在24小时和48小时后,细胞内BACE1 mRNA水平改变情况;

[0019] 图2(B)为在N2a细胞中,加入200ng/ml的重组sclerostin后,神经元细胞N2a中的

BACE1蛋白表达情况；

[0020] 图2(C)为在N2a细胞中,加入200ng/ml的重组sclerostin可以显著促进BACE1的luciferase活性变化情况；

[0021] 图2(D)为在阿尔兹海默症神经元细胞系N2a-APP细胞中,加入200ng/ml的sclerostin重组蛋白,显著促进了A β 蛋白产生过程中的蛋白片段sAPP β 和 β -CTF蛋白水平；

[0022] 图2(E)为在阿尔兹海默症神经元细胞系N2a-APP细胞中,加入200ng/ml的sclerostin重组蛋白,A β 1-40蛋白的产生情况；

[0023] 图2(F)为在阿尔兹海默症神经元细胞系N2a-APP细胞中,加入200ng/ml的sclerostin重组蛋白,A β 1-42蛋白产生情况；

[0024] 图3(A)为在神经元细胞系N2a细胞和骨细胞ML0-Y4共培养中,加入sclerostin中和抗体,神经元细胞N2a中的BACE1蛋白产生情况；

[0025] 图3(B)为在阿尔兹海默症细胞模型的神经元细胞系N2a-APP细胞和骨细胞ML0-Y4共培养中,加入sclerostin中和抗体,N2a-APP细胞中A β 蛋白产生过程中的蛋白片段sAPP β 和 β -CTF蛋白水平；

[0026] 图3(C)为在阿尔兹海默症细胞模型的神经元细胞系N2a-APP细胞和骨细胞ML0-Y4共培养中,加入sclerostin中和抗体,培养基中A β 1-40蛋白水平的变化；

[0027] 图3(D)为在阿尔兹海默症细胞模型的神经元细胞系N2a-APP细胞和骨细胞ML0-Y4共培养中,加入sclerostin中和抗体,培养基中A β 1-42蛋白水平的含量变化。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步描述。

[0029] 实施例1Sclerostin准备

[0030] 化学合成纯度大于98%的小鼠骨硬化蛋白(sclerostin)的氨基酸序列如SEQ NO.1所示：

[0031] MQPSLAPCLICLLVHAAFCAVEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPPENNQTMNRAENGGRPPHPYD
AKDVSEYSCRELHYTRFLTGDGPCRSAPVTELVCSGQCQGPARRLLPNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLC
PGGAAPRSRKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPETARPQKGRKPRPGARGAKANQAELENAY

[0032] 将合成的骨硬化蛋白(sclerostin)粉末溶于双蒸水中,配制浓度为1 μ g/ μ l溶液,分装后-80 $^{\circ}$ C的低温保存备用。使用时用双蒸水稀释成相应浓度保存备用,本实施例中稀释成200ng/ml。

[0033] 实施例2基于sclerostin重组蛋白构建sclerostin中和抗体

[0034] 根据小鼠骨硬化蛋白(sclerostin)氨基酸序列,构建可以打入小鼠体内的中和抗体,具体构建方法如下：

[0035] 材料准备阶段:免疫原验证

[0036] 免疫原制备:根据实施例1构建的小鼠骨硬化蛋白作为免疫原,采用SDS-PAGE方法检验蛋白质抗原。负责将其偶联Immunoplas作为免疫原,用于打破小鼠的免疫耐受。

[0037] 质量控制(QC):采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法,纯度>75%。

[0038] 第一阶段:动物免疫SC2033-PF

[0039] 选用常规免疫方案,采用靶蛋白-Immunoplas免疫3只BALB/C小鼠+3只C57小鼠；

[0040] 常规方案免疫计划表具体下表所示。

步骤	时间表	剂量
免疫前采血	第- 4 天	
第一次免疫	第 0 天	50 µg/只
第二次免疫	第 14 天	25 µg/只
[0041] 采血检测 1	第 21 天	
第三次免疫	第 28 天	25 µg/只
采血检测 2	第 35 天	
终免	第 50±7 天	25 µg/只
[0042] 细胞融合	终免 4 天后	

[0043] 采血检测:每次免疫7天后,用间接ELISA方法检测免疫动物血清,以此确定免疫应答的水平。

[0044] 饲养:小鼠饲养

[0045] 常规免疫第一阶段结束后,如果免疫动物能够达到针对免疫原的免疫应答水平(OD值>1.0,效价达到1:8,000),则进入第二阶段。

[0046] 第二阶段:细胞融合和筛选

[0047] 细胞融合和铺板:采用电融合方法进行2轮细胞融合。平均融合效率是用大约2500个脾细胞就能融合产生1个杂交瘤细胞,因此预计杂交瘤细胞数目可以达到约 2×10^4 个。每轮融合的所有细胞都将被铺到96孔板中,至多铺15块96孔板。

[0048] 初筛:用间接ELISA方法筛选融合细胞的上清液,挑选出针对靶蛋白呈阳性的上清。

[0049] 具体筛选方案如下:

检测原	间接 ELISA
靶蛋白	阳性
[0050] 检测原	阻断 ELISA
受体	阻断效价较佳

[0051] 确认筛选:对初筛阶段得到的所有阳性克隆,采用间接ELISA方法筛选所有的阳性母克隆细胞上清,针对阻断物受体有较好的阻断效果。

[0052] 克隆扩大培养和冻存:

[0053] 将阳性母克隆细胞转到24孔板扩大培养,最多10株。每个扩大培养的克隆收集2ml上清,用于间接ELISA检测。冻存所有特异性阳性克隆细胞,以避免克隆丢失。

[0054] 第三阶段:亚克隆,扩大培养和低温保存

[0055] 亚克隆:采用有限稀释法对阳性母克隆进行亚克隆(最多选取5株),以确保这些阳性母克隆分别来自于单个母克隆细胞。最多进行3轮亚克隆。一般亚克隆的成功率在80%。亚克隆阶段可能出现阳性丢失。(如果得到的阳性母克隆不能够满足特异性要求,将额外选择其它母克隆重新进行亚克隆)。

[0056] 亚克隆筛选:用间接ELISA和阻断ELISA方法进行亚克隆筛选。

[0057] 单克隆细胞低温保存:每个母克隆选择2个稳定的子克隆进行扩增和低温保存。低温冻存前每个子克隆收集5ml上清。每个子克隆提供2管细胞。

[0058] 第四阶段:小规模抗体生产

[0059] 抗体生产:采用定株细胞进行小规模抗体生产,体外培养。

[0060] 抗体纯化:采用Protein A/G亲和层析方法纯化抗体,用透析方法将纯化抗体保存在磷酸盐缓冲液(PBS)中。

[0061] 质量控制(QC):用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),间接ELISA和阻断ELISA进行QC检测,在NanoDrop2000测定抗体浓度。

[0062] 实施例3

[0063] 根据骨硬化蛋白(sclerostin)的氨基酸序列,构建sost过表达质粒,并与目前较为成熟的骨靶向病毒AAV9-DSS-N1ter结合(标准参考:Yang,Y.S.,et al.(2019).“Bone-targeting AAV-mediated silencing of Schnurri-3 prevents bone loss in osteoporosis.”Nat Commun 10(1):2958.),构建称为骨靶向过表达sost病毒,用于打入小鼠体内进行相关实验验证。

[0064] 通过PCR或者酶切获得目的基因,通过连接或者同源重组/组装构建入目的载体,转化E.coli DH5 α 感受态细胞。用菌落PCR对转化子进行筛选,阳性克隆送测序。经验证无误的克隆进行质粒抽提。本实施例中采用PCR的方式进行构建。

[0065] 从GenBank中查询目的基因以及上、下游的序列,用VectorNTI软件进行引物设计,引物的序列如下所示:

[0066] 正向引物如SEQ NO.2所示:CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG;

[0067] 反向引物如SEQ NO.3所示:CATAGCGTAAAAGGAGCAACA;

[0068] 使用高保真的PrimeSTAR酶扩增目的基因,反应体系和条件如下。

[0069] ①.按照下列组分配置PCR反应液:

	5xPrimeSTAR Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μ l
	dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μ l
[0070]	Primer 1 (10 μ M)	1 μ l
	Primer 2 (10 μ M)	1 μ l
	模版 DNA	< 200ng
	PrimerSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	0.5 μ l
	灭菌蒸馏水	Up to 50 μ l
[0071]	②. PCR 反应条件设置如下:	
	98 $^{\circ}$ C	10 sec
	55 $^{\circ}$ C	5 sec
	72 $^{\circ}$ C	1 min/kb
		30 Cycles

[0072] PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果,并把目的基因条带从琼脂糖凝胶电泳后的胶中割下来,用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.3.0做胶回收,所得sost过表达质粒序列如SEQ NO.4所示所示:

[0073] ATGCAGCCCTACTAGCCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCACGCTGCCTTCTGTGCTGTGGAGGGC
CAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGA
GAACAACCAGACCATGAACCGGGCGGAGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAAGATGTGTCCG
AGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCCTGACAGACGGCCATGCCGACGCCAAGCCGGTCACCGAG
TTGGTGTGCTCCGGCCAGTGC GGCCCCGCGGGCTGCTGCCAACGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAA
CGGACCGGATTTCCGCTGCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGCGGGCGC
CGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTC
AAGGACTTCGGGCCGAGACCGCGCGGCCGAGAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGGGCGCCCGGGGAGCCAAAGCCAA
CCAGGCGGAGCTGGAGAACGCCTAC

[0074] ③、使用无缝组装试剂盒(多个目的基因插入片段适用),将目的基因构建入线性化表达载体中,即将目的基因片段和线性化载体以摩尔比1:1加到离心管中进行重组反应:

	ddH ₂ O	Up to 20 μ l
	5x 反应 Buffer	4 μ l
[0075]	插入片段	x μ l
	线性化载体	y μ l
	无缝组装酶	2 μ l

- | | | |
|--------|-----|------------|
| [0076] | 总体积 | 20 μ l |
|--------|-----|------------|
- [0077] 最适插入片段使用量 = $[0.02 \times \text{插入片段碱基数}] \text{ng}$ (0.03pmol) ,
- [0078] 最适线性化载体使用量 = $[0.02 \times \text{线性化载体碱基数}] \text{ng}$ (0.03pmol) ,
- [0079] 混匀后在37℃孵育30分钟,然后转移到冰上放置5分钟。直接转化或者置于-20℃保存等需要转化时解冻转化。
- [0080] 实施例4
- [0081] 为了验证sclerostin是否参与阿尔兹海默症发病过程,我们将构建骨靶向过表达sost质粒病毒通过尾静脉以 4×10^{11} 浓度打入5月龄APP/PS1小鼠体内,将APP/PS1小鼠以单笼饲养3个月,进行相关实验分析。主要包括血清中sclerostin浓度,小鼠脑组织A β 蛋白浓度,小鼠行为学检测(包括水迷宫、新事物认知)、突触可塑性和完整性检测等,以明确增加血清中sclerostin之后,是否可以影响A β 蛋白产生改变小鼠认知功能。
- [0082] 我们对通过尾静脉注射骨靶向sost过表达病毒的APP/PS1阿尔兹海默症小鼠血清检测发现,打入sost过表达病毒后,小鼠血清中骨硬化蛋白(sclerostin浓度)显著增加(如图1(A))。之后检测小鼠皮质、海马区中A β 蛋白沉积进行检测,发现在APP/PS1小鼠中,增加血清中sclerostin蛋白浓度可以显著增加皮质和海马区淀粉样蛋白沉积现象(图1(B-G))。我们对不同组小鼠进行行为学检测发现(检测方法和标准参照Vorhees, C.V. and M.T.Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." Nat Protoc 1(2):848-858. Leger, M., et al. (2013). "Object recognition test in mice." Nat Protoc 8(12):2531-2537.) ,增加血清中sclerostin可以显著破坏小鼠的空间记忆(图1(H))、新事物认知(图1(I))。这表明增加血清中的sclerostin蛋白通过促进淀粉样蛋白形成和沉积,进而加速阿尔兹海默症小鼠认知功能衰退。
- [0083] 实施例5
- [0084] 将200ng/ml sclerostin重组蛋白加入神经元细胞系N2a细胞培养基中,检测(检测方法参照Liu, C.C., et al. (2014). "Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease." Neuron 84(1):63-77. Parr, C., et al. (2015). "Activation of the Wnt/beta-catenin pathway represses the transcription of the beta-amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter." FASEB J 29(2):623-635.) β -catenin蛋白、BACE1蛋白的细胞内含量。之后通过对N2a细胞内转入 β -catenin过表达质粒和BACE1 promoter质粒,进行在sclerostin加入后的Luciferase活性检测,明确sclerostin对BACE1 mRNA转录情况。
- [0085] 我们采用神经元细胞系N2a细胞进行细胞检测,在细胞中加入重组的骨硬化蛋白(sclerostin),分别在24小时、48小时后检测细胞内BACE1 mRNA水平改变情况,发现加入不同浓度sclerostin蛋白可以显著增加BACE1 mRNA转录水平如图2(A)所示,从图中可以看出,发现加入100ng/ml和200ng/ml的sclerostin重组蛋白可以显著促进BACE1 mRNA水平 Sclerostin重组蛋白可以显著促进BACE1蛋白表达,促进A β 蛋白产生。之后对N2a细胞内蛋白进行检测,进一步明确sclerostin可以显著降低细胞内 β -catenin蛋白水平,增加BACE1

蛋白表达(图2(B))。之后我们通过Luciferase明确sclerostin增加BACE1转录水平(图2(C))。之后我们构建阿尔兹海默症细胞系N2a-APP细胞,发现加入sclerostin重组蛋白后,可以显著促进A β 蛋白产生过程中的蛋白片段sAPP β 和 β -CTF蛋白水平(图2(D))。对培养基进行检测发现,加入sclerostin重组蛋白后,培养基中A β 1-40、A β 1-42蛋白浓度显著增加。

[0086] 上述使用所用N2a-APP细胞系的构建方法如下:

[0087] 一、实验材料:

[0088] 1. 细胞株和慢病毒:

[0089] 病毒(pRLenti-CMV-MCS-3FLAG-PGK-Puro,和元构建:GL102);

[0090] 病毒(pRLenti-CMV-APP695swe(K595N/M596L)-3FLAG-PGK-Puro,和元构建:H13319);Neuro-2a细胞来源于库存,

[0091] 培养基:MEM+10%FBS,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养。

[0092] 2. 主要试剂耗材:

[0093] MEM(Hyclone,SH30023.01B);胎牛血清(Gibco:10099-141);Polybrene(Sigma:H9268);Puromycin(Sigma:P8833);24孔板(Corning:3524);6孔板(Corning:3516);60mm dish(Corning:430166);100mm dish(Corning:430167)

[0094] 3. 主要仪器设备:

[0095] 荧光显微镜(DMI8,LEICA);CO₂培养箱(311,Thermo);生物安全柜(BSC-II-A2,上海净化)。

[0096] 二、实验步骤:

[0097] 1、细胞铺板:

[0098] 将Neuro-2a细胞按30%汇合度接种到6cm培养皿。

[0099] 1) Neuro-2a细胞配成 0.33×10^5 cells/ml细胞悬液,待铺板。

[0100] 2) 每皿铺3ml,即 1×10^6 cells/well,铺6个6cm培养皿。

[0101] 2、感染慢病毒:

[0102] 12~20小时后感染病毒

[0103] 加病毒量计算方法:(细胞数 \times MOI值/病毒原液滴度) $\times 10^3$ =病毒加药量(μ l)

[0104] 病毒量,见下表所示。

	病毒液滴度 (TU/ml)	MOI 10 (μ l)
Neuro-2a 细胞		
GL102	4.84×10^8	21
H13319	1.36×10^9	7.4

[0106] 1) 加polybrene:每皿加15 μ l 1mg/ml polybrene,最终在细胞样品中polybrene终浓度为5 μ g/ml;

[0107] 2) 感染12-20小时后换培养基:弃去培养基,每皿加入3ml新鲜的培养基。

[0108] 3、稳定株筛选

[0109] 1) 72h以后,加入终浓度1 μ g/ml puromycin;每隔2-3天换一次终浓度1 μ g/ml

puromycin新鲜培养基;

[0110] 2) 药物筛选约两周后,拍荧光照片;

[0111] 3) 稳定细胞株冻存。

[0112] 实施例6

[0113] 构建阿尔兹海默症细胞模型及N2a-APP细胞系,将200ng/ml sclerostin重组蛋白加入神经元细胞系N2a细胞培养基中培养,提取N2a-APP细胞蛋白,检测A β 蛋白产生过程中的蛋白片段如 β -CTF,sAPP β 蛋白,以及培养基中A β 1-40和A β 1-42蛋白浓度(测定采用R&D公司的ELISA,货号:DAB142,DAB140B)。

[0114] 实施例7

[0115] 将骨细胞系MLO-Y4与神经元细胞系N2a细胞共培养,在培养基(培养基具体为: α MEM培养基+10%胎牛血清+2%青霉素+链霉素)中加入200ng/ml的sclerostin中和抗体,放入培养箱中孵育24小时后,提取N2a细胞蛋白,利用Western Blot技术检测BACE1蛋白表达情况,结果如图3(A)所示,从图中可以看出,sclerostin中和抗体的加入,显著降低N2a细胞内BACE1蛋白表达。

[0116] 之后再将骨细胞系MLO-Y4与构建的阿尔兹海默症细胞模型及N2a-APP细胞系共培养,在培养基(培养基具体为: α MEM培养基+10%胎牛血清+2%青霉素+链霉素)中加入200ng/ml的sclerostin中和抗体,孵育24小时后,提取N2a-APP细胞蛋白检测BACE1蛋白表达情况以及A β 蛋白产生过程中的蛋白片段如 β -CTF,sAPP β 蛋白(检测使用Western Blot技术),以及培养基中A β 1-40和A β 1-42蛋白浓度(检测采用Elisa技术,产品公司R&D),从而明确sclerostin中和抗体对A β 蛋白产生过程的影响。加入sclerostin中和抗体之后可以显著抑制A β 蛋白产生过程中的蛋白片段sAPP β 和 β -CTF蛋白水平,结果如图3(B)所示,同时对培养基进行检测发现,加入sclerostin中和抗体后,培养基中A β 1-40(图3(C))、A β 1-42(图3D)蛋白的浓度显著降低。

[0117] 综上所述,骨硬化蛋白(Sclerostin)在动物和细胞水平中都可以显著促进A β 蛋白的产生,加速认知功能的衰退。同时根据sclerostin重组蛋白构建的中和抗体,可以在细胞层面中减少神经元细胞内BACE1蛋白水平,进而抑制A β 蛋白的产生,具有缓解和/或治疗阿尔兹海默症的作用。

[0118] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

序列表

<110> 蒋青

<120> 骨硬化蛋白及其在制备治疗或预防阿尔兹海默症的相关产品上应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

cgcaaatggg cggtaggcgt g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

catagcgtaa aaggagcaac a 21

<210> 3

<211> 633

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatt tgctacttg tgcacgctgc cttctgtgct 60
 gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgatgcca cagaggtcat cccagggtt 120
 ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga 180
 ggcagacctc cccaccatcc ctatgacgcc aaagatgtgt ccgagtacag ctgccgcgag 240
 ctgcactaca cccgcttctt gacagacggc ccatgccgca gcgccaagcc ggtcaccgag 300
 ttggtgtgct ccggccagtg cggccccgcg cggtctgtgc ccaacgcat cgggcgctg 360
 aagtgggtggc gcccgaacgg accggatttc cgtgcatcc cggatcgcta ccgcgcgag 420
 cgggtgcagc tgctgtgccc cgggggcgcg gcgccgct cgcgcaaggt gcgtctggtg 480
 gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgc ttccacaacc agtcggagct caaggacttc 540
 gggccggaga ccgcgcggcc gcagaagggt cgcaagccgc ggcccggcgc ccggggagcc 600
 aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tac 633

<210> 5

<211> 211

<212> PRT

<213> 氨基酸序列 (Amino acid sequence)

<400> 5

Met Gln Pro Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ile Cys Leu Leu Val His Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Cys Ala Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Arg Asn Asp
 20 25 30
 Ala Thr Glu Val Ile Pro Gly Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro
 50 55 60
 His His Pro Tyr Asp Ala Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu
 65 70 75 80
 Leu His Tyr Thr Arg Phe Leu Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys
 85 90 95
 Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu
 100 105 110
 Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro
 115 120 125
 Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val
 145 150 155 160
 Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu
 165 170 175
 Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys
 180 185 190
 Pro Arg Pro Gly Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu
 195 200 205
 Asn Ala Tyr
 210

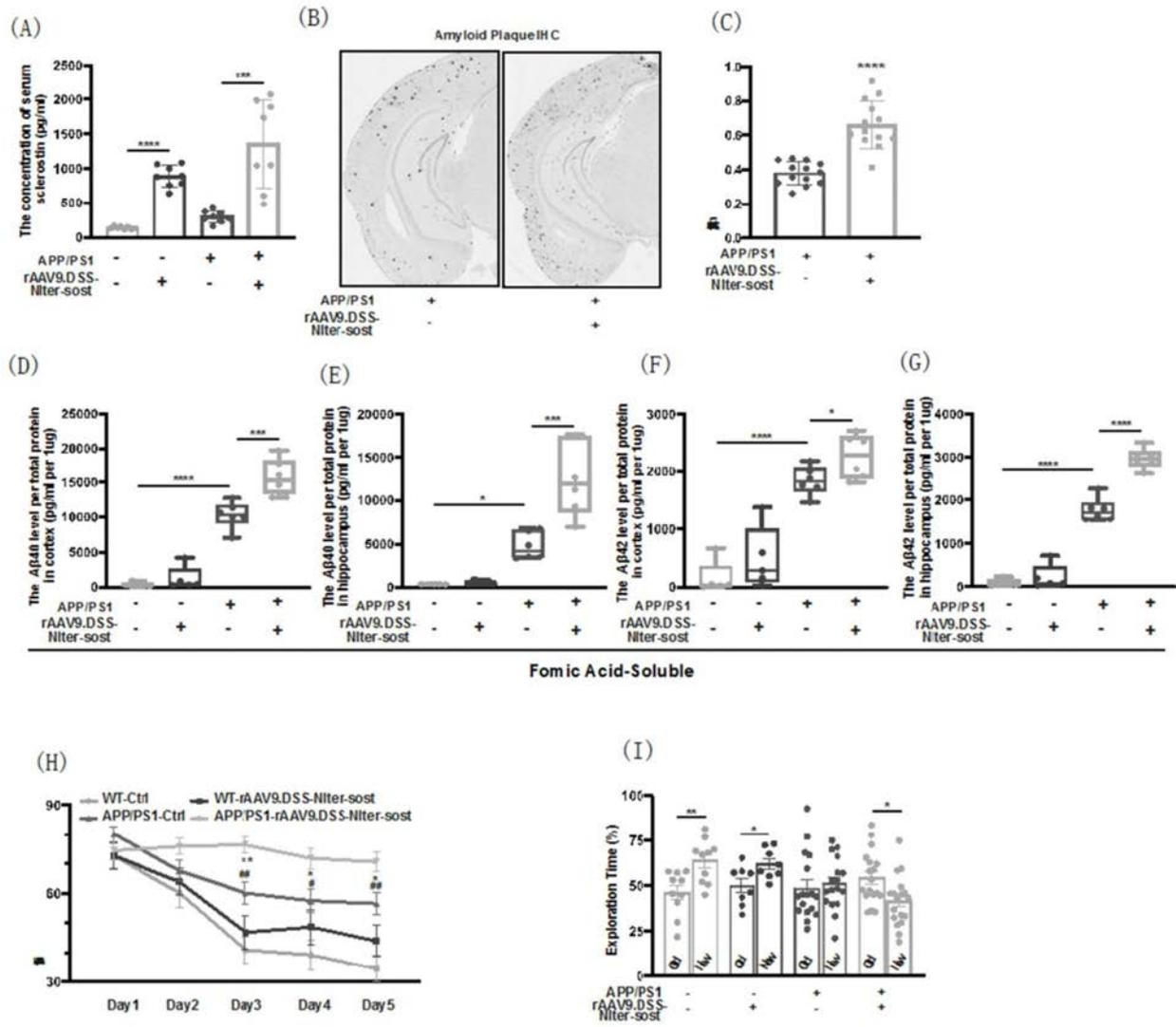


图1

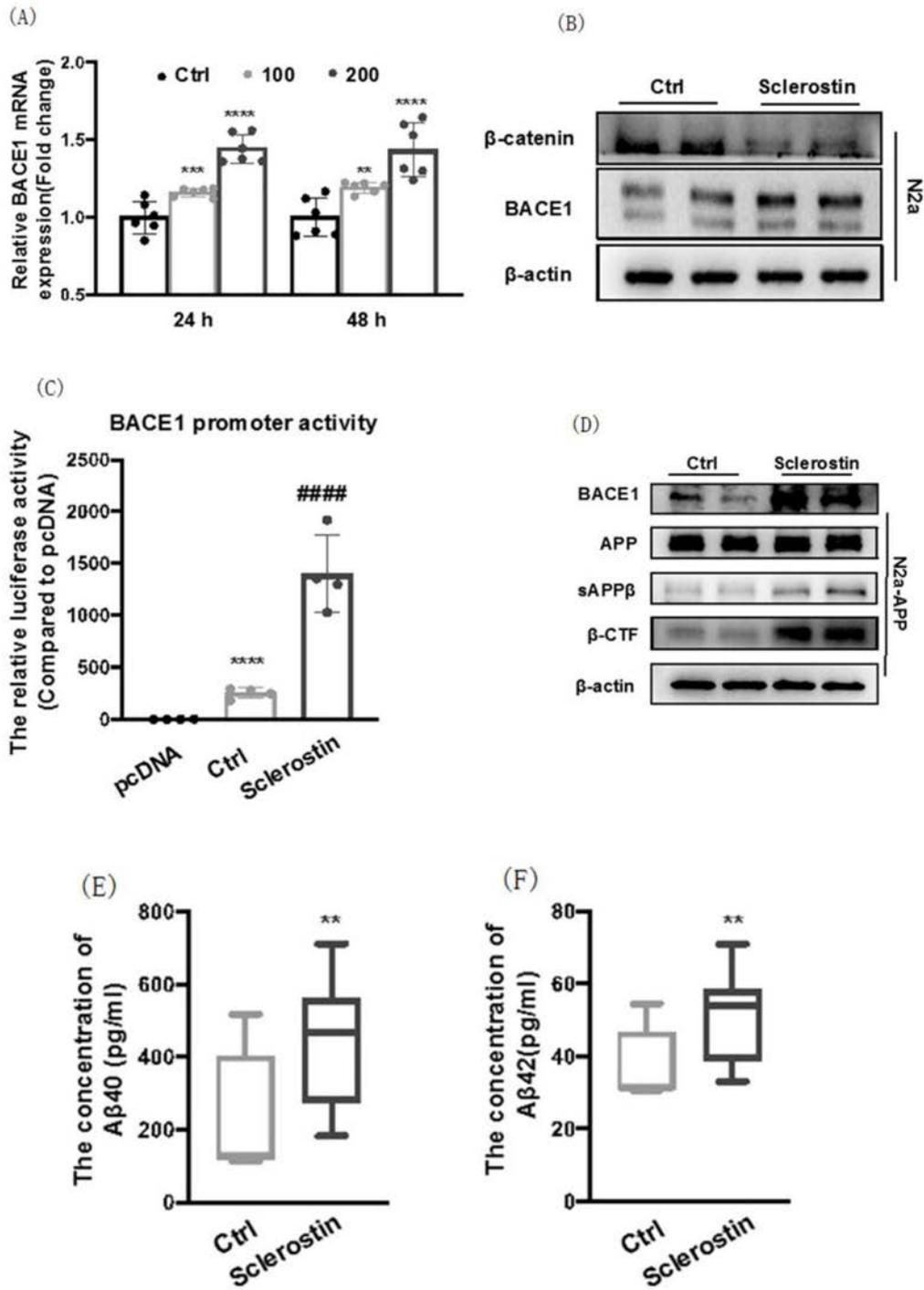


图2

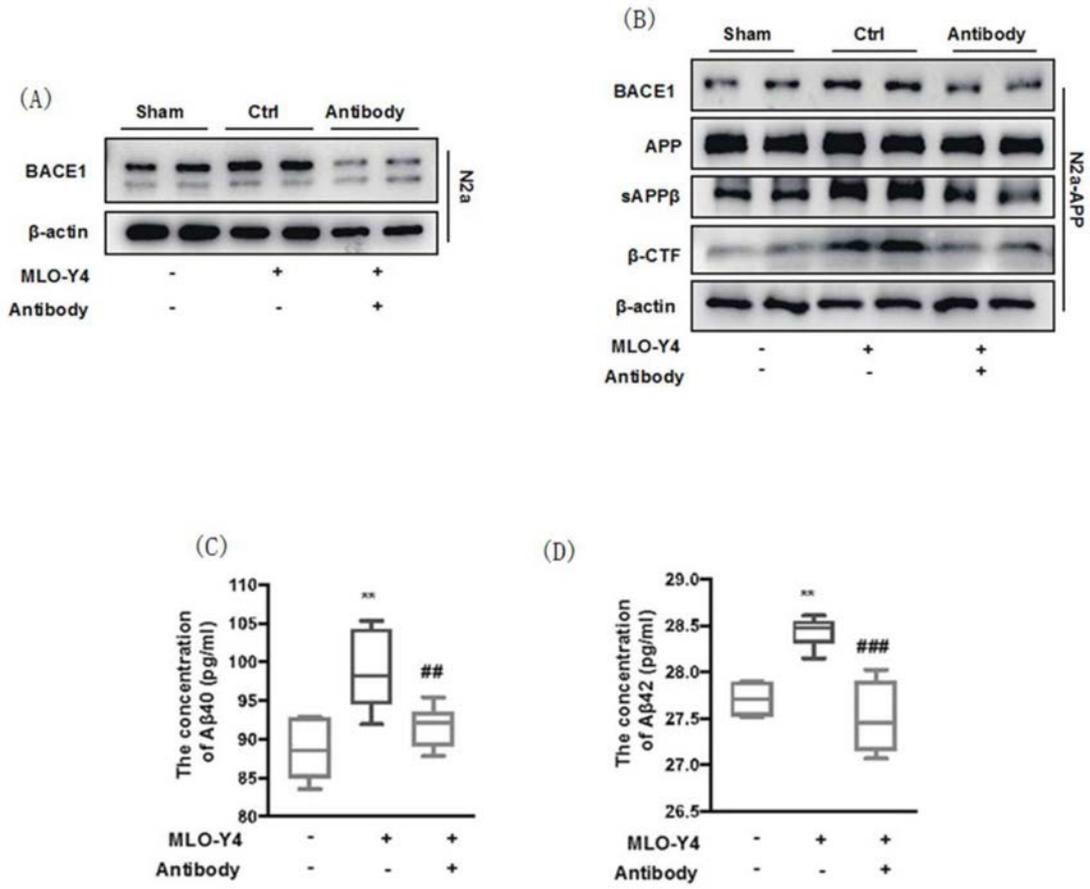


图3