

(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  
2024年4月18日 (18.04.2024)



(10) 国际公布号  
**WO 2024/078124 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C07K 14/475* (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01) *A61P 9/04* (2006.01)  
*C12N 15/864* (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)  
*A61K 38/18* (2006.01) *A61P 1/04* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)  
*A61P 39/06* (2006.01) *A61P 25/24* (2006.01)  
*A61P 27/12* (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/113288
- (22) 国际申请日: 2023年8月16日 (16.08.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202211252640.2 2022年10月13日 (13.10.2022) CN
- (71) 申请人: 呈诺再生医学科技(北京)有限公司(ALLIFE REGENERATIVE MEDICINE TECH. BEIJING CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市大兴区经济开发区科苑路18号3幢二层R2188室, Beijing 102600 (CN)。
- (72) 发明人: 蔡晓琛(CAI, Xiaochen); 中国北京市大兴区经济开发区科苑路18号3幢二层R2188室, Beijing 102600 (CN)。 顾雨春(GU, Yuchun); 中国北京市大兴区经济开发区科苑路18号3幢二层R2188室, Beijing 102600 (CN)。 谭帅帅(TAN, Shuashuai); 中国北京市大兴区经济开发区科苑路18号3幢二层R2188室, Beijing 102600 (CN)。 吴理

(54) Title: USE OF TDGF1 GENE IN PREPARATION OF DRUGS FOR TREATING AGING-RELATED DISEASES OR REVERSING CELL AGING

(54) 发明名称: TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用

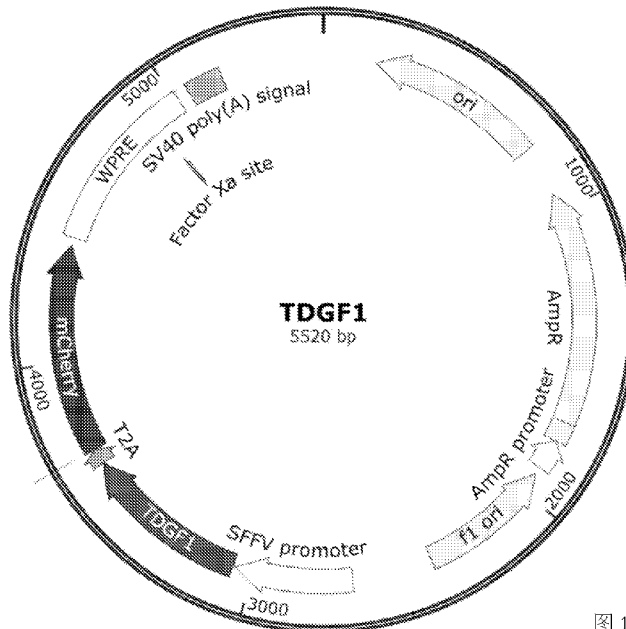


图 1

(57) Abstract: Provided in the present invention is the use of a TDGF1 gene in the preparation of a drug for treating aging-related diseases or reversing cell aging. Compared with the prior art, the present invention has the following advantages: the use of the TDGF1 gene provided in the present invention in the preparation of a drug for treating aging-related diseases or reversing cell aging finds for the first time that the overexpression of the TDGF1 gene can reverse cell aging and treat aging-related diseases. The expression vector overexpressing the TDGF1 gene can effectively reverse the aging of key cells in a body, so that effective treatment of various diseases



WO 2024/078124 A1

达(WU, Lida); 中国北京市大兴区经济开发区科苑路18号3幢二层R2188室, Beijing 102600 (CN)。

(74) 代理人: 北京智丞瀚方知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHI CHENG HAN FANG IP AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街1号院2号楼11C8-02, Beijing 100044 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

caused by aging of the body is achieved, and the effect is good. Cell experiments prove that the TDGF1 gene effectively increases the proportion of non-aged cells, and mouse experiments prove that the symptom of cataract caused by aging is effectively relieved by means of overexpression of the TDGF1 gene by AAV2.

(57) 摘要: 本发明提供了TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用。与现有技术相对比, 本发明具有以下优点: 本发明提供的TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用, 首次发现过表达TDGF1基因可逆转细胞衰老, 并治疗衰老相关疾病, 过表达TDGF1基因的表达载体能够有效逆转机体体内关键细胞的衰老, 从而实现了针对由于机体衰老所引起的多种疾病的有效治疗, 且效果良好, 细胞实验证明其有效提高了未衰老细胞的比例, 小鼠实验证明通过AAV2过表达TDGF1基因针对衰老引起的白内障的症状实现了有效缓解。

# 发明名称: TDGF1基因在制备治疗衰老 相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用

## 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域，具体涉及TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用。

## 技术背景

[0002] 随着现代社会人们寿命的延长，人们罹患与年龄相关疾病的风险也随之增加。事实上，数据显示，心脏病、癌症和神经退行性疾病的最大危险因素就是年龄，而阻止或逆转衰老的关键在于细胞重编程。“山中因子”(Yamanakafactors)，即Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc四种转录因子，通过病毒载体导入成熟体细胞后，可将体细胞转化为诱导多能干细胞。因其发现者为山中伸弥而得名，山中伸弥也因“发现四个转录因子具有细胞重编程能力”被授予2012年的诺贝尔生理学或医学奖。在2016年，首次报告称，可以使用山中因子逆转患有过早衰老疾病小鼠的衰老迹象，并改善心脏和大脑中的组织功能。此外，他们还发现，即使在年幼小鼠身上，山中因子也可以加速肌肉再生。然而，山中因子对生理衰老野生型小鼠的作用尚不清楚。除了山中因子，探索其他因子或者蛋白是否也能产生相似或者更强大的能够逆转衰老的效果，具有极大的社会与经济效应。

[0003] 大部分细胞在体外或体内复制的代数有限，在复制一定代数或受到环境氧化因子，促衰老因子等的作用下会出现细胞衰老现象，在体外影响细胞传代、代谢，在体内影响组织修复、更新，并随年龄增长表现为个体水平的衰老并出现诸多老龄疾病。延缓衰老的小分子药物包括二甲双胍、NMN、尿苷等，但作用机制不明。

[0004] 目前也有少数针对衰老相关因子通过驱动表观遗传重编程改变细胞状态的文献报道，例如，专利申请CN112154210A公开了一种用于逆转细胞老化的瞬时细胞重编程方法，包括用编码一种或多种细胞重编程因子的一种或多种

非整合型信使RNA来转染细胞不超过五个连续日，从而产生更生的细胞；其更生的细胞的转录组谱与年轻细胞的转录组谱更相似，包括选自RPL37、RHOA、SRSF3、EPHB4、ARHGAP18、RPL31、FKBP2、MAP1LC3B2、E1f1、Phf8、Pol2s2、Taf1和Sin3a的一种或多种基因的表达增加。

[0005] 畸胎瘤衍化生长因子(teratocarcinoma-derived growth factor1, TDGF1)是一种调控细胞存活、增殖、分化和迁移的小分子糖基磷脂酰肌醇(GPI)结合蛋白。TDGF1在正常组织中一般不表达或仅部分组织少量表达，在多种肿瘤细胞中表达极显著。以往有关TDGF1的报道多集中于肿瘤和早期胚胎发育，目前未发现有关TDGF1基因与衰老相关的文献报道。

[0006] 发明内容

[0007] 针对上述存在的技术局限性，本发明首次发现了TDGF1基因与细胞衰老相关，过表达该基因能够逆转细胞衰老，进而治疗衰老相关疾病，这是现有技术从未报道过的；基于此发现，本发明提出了TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用；其克服了背景技术中提到的不足和缺陷。

[0008] 为实现上述目的，本发明采用了以下技术方案：

[0009] 本发明的发明点是提供了TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病的药物中的应用。

[0010] 可选地，上述的应用，所述衰老相关疾病包括自然衰老、白内障、糖尿病视网膜病变、动脉粥样硬化、心血管疾病、老年骨质疏松症、高血压、神经退行性变性疾病、中风/脑卒中、萎缩性胃炎、躯干前驱症、慢性阻塞性肺疾病、冠状动脉疾病、多巴胺失调综合征、代谢综合征、心力衰竭、老年抑郁症、免疫衰老、心肌梗死、急性冠脉综合征、肌肉减少症、肌肉减少性肥胖；

[0011] 优选地，所述衰老相关疾病为白内障、自然衰老、糖尿病视网膜病变；

[0012] 更优选地，所述衰老相关疾病为白内障。

[0013] 本发明的第二个发明在于，提供了TDGF1基因在制备逆转细胞衰老的药物中的应用。

[0014] 可选地，上述的应用，所述TDGF1基因的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示，所述TDGF1基因编码蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0015] TDGF1基因的核苷酸序列SEQ ID No.1为:

```
ATGGA CTGCAGGAAGATGGCCCGCTTCTCTTACAGTGTGATTTGGA
TCATGGCCATTTCTAAAGTCTTTGAACTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGGCC
ATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTCAGAGATGACA
GCATTTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCCAGCGT
GTGCCGCCATGGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCT
GCCTGAATGGGGGAACCTGCATGCTGGGGTCCTTTTGTGCCTGCCCTCCC
TCCTTCTACGGACGGAACCTGTGAGCACGATGTGCGCAAAGAGA ACTGTG
GGTCTGTGCCCATGACACCTGGCTGCCCAAGAAGTGTTCCTGTGIAAA
TGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTTCCTCAGGCATTTCTACCCGGCTGT
GATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGA ACT
ACCACCGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGCATCTGCCTTCT
ATACAAAGCTACTAT。
```

[0016] TDGF1基因编码的蛋白质的氨基酸序列SEQ ID No.2为:

```
MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGLAFR
DDSIWPQEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSEKLNRTCCLNNGGTCMLGSFCACPPS
FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCD
GLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLVGLCLSIQSYY。
```

[0017] 可选地, 上述的应用, 所述细胞为人脐带静脉内皮细胞、人神经母细胞瘤细胞、成纤维细胞、诱导性多能干细胞和/或间充质干细胞及其衍生细胞, 优选为脐带静脉内皮细胞、成纤维细胞和间充质干细胞。

[0018] 可选地, 上述的应用, 所述应用是将TDGF1基因插入至骨架载体中构建过表达TDGF1基因的表达载体; 然后用腺相关病毒包装所述过表达TDGF1基因的表达载体, 获得过表达TDGF1基因的腺相关病毒; 最后将所述过表达TDGF1基因的腺相关病毒转染上述的细胞或直接注射于人或动物体内。

[0019] 可选地, 上述的应用, 所述骨架载体为pSFFV-T2A-mCherry质粒载体。

[0020] 可选地, 上述的应用, 所述过表达TDGF1基因的表达载体的构建方法为, 将TDGF1基因序列采用同源重组的方法插入至骨架载体pSFFV-T2A-mCherry质粒的pSFFV和T2A之间, 构建得到过表达载体pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry质粒。

[0021] 可选地, 上述的应用, 所述腺相关病毒为AAV2/2血清型AAV载体或AAV2/9血清型AAV载体。

- [0022] 具体方法为：将过表达载体(含过表达TDGF1重组基因)用腺相关病毒2(AAV2)包装，获得AAV2-pSFFV-TDGF1-mCherry；将所述AAV2-pSFFV-TDGF1-mCherry转染细胞或直接注射于人或动物体内；
- [0023] 腺相关病毒2包装的方式为：将pSFFV-T2A-mCherr质粒、AAV2基因与慢病毒包装细胞株进行共转染；慢病毒包装细胞株为293FT细胞。
- [0024] 可选地，上述的应用，所述逆转细胞衰老表现在降低细胞中 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的比例。
- [0025] 与现有技术相对比，本发明具有以下优点：
- [0026] 本发明提供的TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病或逆转细胞衰老的药物中的应用，首次发现过表达TDGF1基因可逆转细胞衰老，并治疗衰老相关疾病，过表达TDGF1基因的表达载体能够有效逆转机体体内关键细胞的衰老，从而实现了针对由于机体衰老所引起的多种疾病的有效治疗，且效果良好，细胞实验证明其有效提高了未衰老细胞的比例，小鼠实验证明其过表达质粒针对衰老引起的白内障的症状实现了有效缓解。

## 附图说明

- [0027] 图1为pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry质粒结构。
- [0028] 图2为转入TDGF1基因的HUVEC细胞和对照组细胞在光学显微镜下的形态，显示电转TDGF1能够有效逆转HUVEC细胞衰老。
- [0029] 图3为转入TDGF1基因的SH-SY5Y细胞的未衰老细胞比例统计结果，显示转入TDGF1基因的SH-SY5Y细胞中未衰老细胞的比例明显多于对照组SH-SY5Y细胞，也即说明了转入TDGF1基因能够延缓SH-SY5Y细胞的衰老。
- [0030] 图4为转入TDGF1基因的成纤维细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色结果，显示转入TDGF1基因的成纤维细胞中未衰老细胞的比例明显多于对照组成纤维细胞，也即说明了转入TDGF1基因能够延缓成纤维细胞的衰老。
- [0031] 图5为转入TDGF1基因的间充质干细胞的未衰老细胞比例统计结果，显示转入TDGF1基因的间充质干细胞中未衰老细胞的比例明显多于对照组间充质干细胞，也即说明了转入TDGF1基因能够延缓间充质干细胞的衰老。

[0032] 图6为具有白内障表型的C57BL/6J老龄鼠晶状体注射过表达TDGF1的质粒后症状变化，其中图4A为注射前明显浑浊的小鼠晶状体，图4B为注射AAV2 TDGF1质粒8天后，晶状体浑浊已经消失。

## 具体实施方式

[0033] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了，下面对本发明进行进一步详细说明。但是应该理解，此处所描述仅仅用以解释本发明，并不用于限制本发明的范围。

[0034] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术术语和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同，本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在限制本发明。本文中所使用的试剂和仪器均商购可得，所涉及的表征手段均可参阅现有技术中的相关描述，本文中不再赘述。

[0035] 为了进一步了解本发明，下面结合最佳实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0036] 实施例1

[0037] TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病的药物中的应用。

[0038] 衰老相关疾病包括自然衰老、白内障、糖尿病视网膜病变、动脉粥样硬化、心血管疾病、老年骨质疏松症、高血压、神经退行性变性疾病、中风/脑卒中、萎缩性胃炎、躯干前驱症、慢性阻塞性肺疾病、冠状动脉疾病、多巴胺失调综合征、代谢综合征、心力衰竭、老年抑郁症、免疫衰老、心肌梗死、急性冠脉综合征、肌肉减少症、肌肉减少性肥胖；

[0039] 优选地，衰老相关疾病为白内障、自然衰老、糖尿病视网膜病变；

[0040] 更优选地，衰老相关疾病为白内障。

[0041] 还提供了TDGF1基因在制备逆转细胞衰老的药物中的应用。

[0042] TDGF1基因的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示，TDGF1基因编码蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0043] TDGF1基因的核苷酸序列SEQ ID No.1为：

ATGGACTGCAGGAAGATGGCCCGCTTCTCTTACAGTGTGATTTGGA

TCATGGCCATTTCTAAAGTCTTTGAACTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGGCC  
 ATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTCAGAGATGACA  
 GCATTTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCCAGCGT  
 GTGCCGCCCATGGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCT  
 GCCTGAATGGGGGAACCTGCATGCTGGGGTCTTTTTGTGCCTGCCCTCCC  
 TCCTTCTACGGACGGAACCTGTGAGCACGATGTGCGCAAAGAGAACTGTG  
 GGTCTGTGCCCCATGACACCTGGCTGCCCAAGAAGTGTTCCCTGTGTA  
 TGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTTCCTCAGGCATTTCTACCCGGCTGT  
 GATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGA  
 ACTACCACCGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGCATCTGCCTTCT  
 ATACAAAGCTACTAT。

[0044] TDGF1基因编码的蛋白质的氨基酸序列SEQ ID No.2为:

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGLAFR

DDSIWPQEPAIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNNGGTCMLGSFCACPPS  
 FYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGD  
 GLVMDEHLVASRTPPELPPSARTTTFMLVGLCLSIQSY。

[0045] 细胞可选择为人脐带静脉内皮细胞、人神经母细胞瘤细胞、成纤维细胞、诱导性多能干细胞和/或间充质干细胞及其衍生细胞，优选为脐带静脉内皮细胞、成纤维细胞和间充质干细胞。

[0046] 应用是将TDGF1基因插入至骨架载体中构建过表达TDGF1基因的表达载体；然后用腺相关病毒包装过表达TDGF1基因的表达载体，获得过表达TDGF1基因的腺相关病毒；最后将过表达TDGF1基因的腺相关病毒转染上述的细胞或直接注射于人或动物体内。

[0047] 骨架载体为pSFFV-T2A-mCherry质粒载体。

[0048] 可过表达TDGF1基因的表达载体的构建方法为，将TDGF1基因序列采用同源重组的方法插入至骨架载体pSFFV-T2A-mCherry质粒的pSFFV和T2A之间，构建得到过表达载体pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry质粒。

[0049] 腺相关病毒为AAV2/2血清型AAV载体或AAV2/9血清型AAV载体。

[0050] 具体方法为：将过表达载体(含过表达TDGF1重组基因)用腺相关病毒2(AAV2)包装，获得AAV2-pSFFV-TDGF1-mCherry；将AAV2-pSFFV-TDGF1-mCherry转染细胞或直接注射于人或动物体内；

[0051] 腺相关病毒2包装的方式为：将pSFFV-T2A-mCherr质粒、AAV2基因与慢病毒包装细胞株进行共转染；慢病毒包装细胞株为293FT细胞。

[0052] 逆转细胞衰老表现在降低细胞中β-半乳糖苷酶染色阳性的比例。

[0053] 实施例2

[0054] 载体构建：

[0055] 1、以pSFFV-OSK-T2A-mCherry质粒为基因表达的骨架载体；

[0056] 2、基因合成基因序列，将TDGF1等基因序列用同源重组的方法插入pSFFV-T2A-mCherry质粒的pSFFV和T2A之间，载体命名为pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry。

[0057] pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry的质粒载体结构如图1所示。

[0058] 实施例3

[0059] 一、腺相关病毒包装：

[0060] 1、细胞接种：

[0061] T175Flasks接种 $2 \times 10^7$ 个293FT细胞。加30ml含10%FBS的DMEM培养基，37°C，5%CO<sub>2</sub>培养箱过夜培养，16-24h后转染。

[0062] 2、细胞转染：

[0063] 细胞生长的交汇度达到80-90%，准备转染。转染体系如下表1所示。

[0064] 表1

A 液		B 液	
pSFFV- TDGF1-T2A-mCherry 质粒	10.5μg	PEI	150μl
AAV2/9	10.5μg	opti-MEM (Gibco)	3ml
Helpr	30μg		
opti-MEM (Gibco)	3ml		

[0065] A液和B液分别混合后，室温静置5min。接着B液逐滴加入A液中，边加边摇匀，室温22-26°C静置20min。逐滴加到培养皿中，轻轻摇匀，5%CO<sub>2</sub>，37°C过夜培养。

[0066] 3、转染换液：

[0067] 16-18h后, 去掉含转染试剂的培养基, 加入30ml含10%FBS的DMEM, 5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下继续培养。

[0068] 4、病毒第一次收获(获得AAV2-pSFFV-TDGF1-mCherry):

[0069] 从转染开始算48h后, 收获细胞上清, 转移到50ml离心管中, 上清用0.45 μ m滤膜过滤, 4°C保存。细胞加入30ml含10%FBS的DMEM, 5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下继续培养。

[0070] 5、病毒第二次收获:

[0071] 收获细胞上清, 转移到50ml离心管中, 上清用0.45 μ m滤膜过滤, 4°C保存。细胞用10%消毒液(84消毒液)处理后丢弃。

[0072] 6、病毒浓缩:

[0073] 将收集到的腺相关病毒组分用0.45 μ m滤器过滤去除细菌污染, 将过滤后组分与PEG8000按照体积比3: 1混合, 轻轻颠倒混匀。

[0074] 7、4°C孵育30min或过夜。

[0075] 8、4°C, 1500g离心45min, 离心后在管底出现白色沉淀。

[0076] 9、吸去上清液, 不能破坏白色沉淀。

[0077] 10、用适当体积腺相关病毒保存液重悬沉淀, 对病毒进行qPCR检测测定病毒滴度并将所获取的腺相关病毒分别分装、保存于-80°C。

[0078] 二、病毒滴度测定:

[0079] 对腺相关病毒进行qPCR检测测定病毒滴度:

[0080] 1.将待测定病毒的标准质粒10倍梯度稀释, 选10<sup>11</sup> ~ 10<sup>7</sup>copies/ μ L作为实验标准曲线建立的标准品。

[0081] 2、按照TransStart® Top Green qPCR SuperMix说明书及荧光定量PCR仪反应体系要求配置qPCR反应的试剂, 反应体系如下表2所示。

[0082] 表2

成分	体积
----	----

正向引物(10 $\mu$ m)	1 $\mu$ L
反向引物(10 $\mu$ m)	1 $\mu$ L
2 $\times$ TransStar Top/Tip Green qPCR SuperMix	10 $\mu$ L
无核酸酶水	7 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ L
总体积	20 $\mu$ L

[0083] 正向引物序列为GGAGTTGTGGCCCGTTGT;

[0084] 反向引物序列为GAGCCCCTGTCCAGCAGC。

[0085] 3、将反应混合液取19  $\mu$  L/孔(20  $\mu$  L体系)分装至8联管中，依次在孔中加入1  $\mu$  L/孔反应标准品及待检样品。

[0086] 4、将加入反应液的8联管瞬离，轻微震荡混匀，瞬离后放入LightCycler®96System仪中，设定反应程序，运行。反应程序如表3所示。

[0087] 表3

温度	时间	
94°C	30s	
94°C	5s	30 个循环
55°C	15s	
72°C	10s	

[0088] 5、反应程序结束后，取出检测8联管丢弃，拷出数据进行保存分析。

[0089] 三、实验结果：

[0090] 将TDGF1转入腺相关病毒后，AAV2/2-TDGF1病毒滴度为 $5.97 \times 10^{11}$ 。

[0091] 实施例4

[0092] HUVEC细胞培养及电转化：

[0093] 1、实验材料：

[0094] 具体如表4所示。

[0095] 表4

名称	公司	货号
内皮细胞培养基	ScienCell	BNCC342473
人脐带静脉内皮细胞 HUVEC	ScienCell	#8000
Neon™ 转染系统起始套装	Thermo Fisher	MPK5000S
DPBS (无钙镁)	Gibco	2380005
0.25%胰酶	Cytiva	J210027
细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒	碧云天	C0602

[0096] 2、实验方法：

[0097] (1)HUVEC细胞复苏：

[0098] 1)从液氮罐中取出1支冻存管，立即在37℃水中不断摇晃，使冻结的细胞悬液彻底融化。

[0099] 2)冻存管中的细胞一旦彻底融化(液态)，立即将其从热水桶中取出，75%的酒精彻底消毒冻存管表面，放入超净工作台内。冻存管即将融化时，将含有已预热至37℃内皮培养基的离心管经酒精消毒后，放置于超净工作台内。

[0100] 3)严格无菌操作条件下将冻存管中的细胞悬液取出，加入预热E8培养基15ml离心管内，轻轻吹打2-3次，1300rpm，5min离心，离心结束后弃上清。

[0101] 4)加入内皮培养基，轻轻吹打2-3次，将细胞转移至细胞培养瓶中，加入培养液。将培养瓶放置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

[0102] (2)HUVEC消化传代：

[0103] 1)从培养箱取出待传代的孔板/培养瓶，吸弃上清，DPBS洗一次。

[0104] 2)加胰蛋白酶，铺满瓶底后，吸弃胰蛋白酶，置于培养箱孵育4-5min，期间可镜下观察，细胞收缩变圆且分散开即可。

[0105] 3)轻轻拍打培养瓶/板，使细胞脱壁，然后用枪头轻轻吹打几次，最后加入内皮培养基终止消化，将细胞吹打脱落后转移至新培养瓶，加入内皮培养基，置于37℃，5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。

[0106] 4)每三天均进行换液操作，待细胞汇合度约70%-80%时，进行传代。

- [0107] (3)HUVEC细胞电转化：
- [0108] 使用第6代HUVEC细胞，20万细胞1 μg质粒。
- [0109] 电转条件：电压：1350v，脉冲时间：30ms，脉冲数：1；
- [0110] 电转后3天一换液，9天后进行衰老细胞统计。
- [0111] (4)衰老细胞染色：
- [0112] 使用β-半乳糖苷酶染色试剂盒对HUVEC细胞进行染色。
- [0113] a、对于24孔板中培养的细胞，吸除细胞培养液，用DPBS洗涤1次，加入0.5毫升β-半乳糖苷酶染色固定液，室温固定15分钟。对于其它类型的培养板，固定液及后续溶液的用量参照此比例进行操作。
- [0114] b、吸除细胞固定液，用DPBS洗涤细胞3次，每次3分钟。
- [0115] c、吸除PBS或HBSS，每孔加入1毫升染色工作液。染色工作液的配制方法如表5所示。
- [0116] 表5

染色工作液组分	用量体积
β-半乳糖苷酶染色液 A	10 μl
β-半乳糖苷酶染色液 B	10 μl
β-半乳糖苷酶染色液 C	930 μl
β-半乳糖苷酶显色底物 X-Gal 溶液	50 μl
总计	1000 μl (1ml)

- [0117] d、37℃孵育过夜，可以用parafilm或保鲜膜封住6孔板防止蒸发。37℃孵育不能在二氧化碳培养箱中进行。
- [0118] e、普通光学显微镜下观察。
- [0119] 3、实验结果：
- [0120] β-半乳糖苷酶染色结果如图2所示，衰老细胞呈现蓝色，转入TDGF1基因的HUVEC细胞中衰老细胞比例明显少于对照组HUVEC细胞。说明转入TDGF1基因能够延缓HUVEC细胞的衰老。
- [0121] 实施例5
- [0122] SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞)衰老细胞活体标记及流式分析：

[0123] 1、实验材料：

[0124] 具体如表6所示。

[0125] 表6

名称	公司	货号
MEM	Invitrogen	11090081
F12	Invitrogen	11765054
FBS	Gibco	—
Gluta-max	Invitrogen	35050061
Sodium pyruvate	Invitrogen	11360070
NEAA	Invitrogen	11140050
SH-SY5Y	中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库	SCSP-5014
C12FDG 活性染料	Abcam	138777-25-0
DMSO	Sigma	D2650
Bafilomycin A1	Abcam	88899-55-2
DPBS(无钙镁)	Gibco	2380005

[0126] 2、实验方法：

[0127] SH-SY5Y培养基配方(100ml)：MEM 43.5ml，F12 43.5ml，FBS 10ml，Gluta-max 1ml，Sodium pyruvate 1ml，NEAA 1ml。

[0128] (1)诱导SH-SY5Y衰老：用150  $\mu$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理SH-SY5Y 2h后更换正常培养基培养24h；

[0129] (2)用100  $\mu$  M Bafilomycin处理细胞1h，抑制溶酶体中 $\beta$ -半乳糖苷酶活性，再加 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性荧光底物染料于SH-SY5Y培养基中，37度培养2h，用DPBS洗两遍，用胰酶消化收集细胞，进行流式细胞分析。从平均荧光强度及染色降低细胞比例比较过表达基因对逆转衰老效果。

[0130] 3、实验结果：

[0131] 如图3所示，将TDGF1转入SH-SY5Y后，未衰老细胞比例为15.23%，明显高于对照组的5.99%，表明至少在SH-SY5Y上，TDGF1基因的过表达可以延缓细胞衰老，维持年轻状态。

[0132] 实施例6

[0133] 成纤维细胞培养及电转化：

[0134] 1、实验材料：

[0135] 具体如表7所示。

[0136] 表7

名称	公司	货号
DMEM 高糖培养基	Gibco	12100-046
fetal bovine serum	Cellma	SA211.02
Neon™ 转染系统起始套装	Thermo Fisher	MPK5000S
DPBS (无钙镁)	Gibco	2380005
0.25%胰酶	Cytiva	J210027
细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒	碧云天	C0602

[0137] 2、实验方法：

[0138] (1)成纤维细胞复苏：

[0139] 1)从液氮罐中取出1支冻存管，立即在37℃水中不断摇晃，使冻结的细胞悬液彻底融化。

[0140] 2)冻存管中的细胞一旦彻底融化(液态)，立即将其从热水桶中取出，75%的酒精彻底消毒冻存管表面，放入超净工作台内。冻存管即将融化时，将含有已预热至37℃内皮培养基的离心管经酒精消毒后，放置于超净工作台内。

[0141] 3)严格无菌操作条件下将冻存管中的细胞悬液取出，加入预热E8培养基15ml离心管内，轻轻吹打2~3次，1300rpm，5min离心，离心结束后弃上清。

[0142] 4)加入内皮培养基，轻轻吹打2~3次，将细胞转移至细胞培养瓶中，加入培养液。将培养瓶放置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

[0143] (2)成纤维细胞消化传代：

[0144] 1)从培养箱取出待传代的孔板/培养瓶，吸弃上清，DPBS洗一次。

[0145] 2)加胰蛋白酶，铺满瓶底后，吸弃胰蛋白酶，置于培养箱孵育4-5min，期间可镜下观察，细胞收缩变圆且分散开即可。

- [0146] 3)轻轻拍打培养瓶/板,使细胞脱壁,然后用枪头轻轻吹打几次,最后加入内皮培养基终止消化,将细胞吹打脱落后转移至新培养瓶,加入内皮培养基,置于37°C,5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。
- [0147] 4)每三天均进行换液操作,待细胞汇合度约70%~80%时,进行传代。
- [0148] (3)成纤维细胞电转化:
- [0149] 使用第24代细胞,20万细胞1 $\mu$ g质粒。
- [0150] 电转条件:电压:1350v,脉冲时间:30ms,脉冲数:1,电转后3天一换液,9天后进行衰老细胞统计。
- [0151] (4)衰老细胞染色:
- [0152] 使用 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒对成纤维细胞进行染色。
- [0153] a、对于24孔板中培养的细胞,吸除细胞培养液,用DPBS洗涤1次,加入0.5毫升 $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15分钟。对于其它类型的培养板,固定液及后续溶液的用量参照此比例进行操作。
- [0154] b、吸除细胞固定液,用DPBS洗涤细胞3次,每次3分钟。
- [0155] c、吸除PBS或HBSS,每孔加入1毫升染色工作液。染色工作液的配制方法如实施例4表5所示。
- [0156] d、37°C孵育过夜,可以用parafilm或保鲜膜封住6孔板防止蒸发。37°C孵育不能在二氧化碳培养箱中进行。
- [0157] e、普通光学显微镜下观察。
- [0158] 3、实验结果:
- [0159]  $\beta$ -半乳糖苷酶染色结果如图3所示,衰老细胞呈现蓝色,转入TDGF1基因的成纤维细胞中未衰老细胞的比例明显多于对照组成纤维细胞。说明转入TDGF1基因能够延缓成纤维细胞的衰老。
- [0160] 实施例7
- [0161] 间充质干细胞衰老细胞活体标记及流式分析:
- [0162] 1、实验材料:
- [0163] 具体如表8所示。
- [0164] 表8

名称	公司	货号
$\alpha$ -MEM 培养基	Hyclone	SH30265.01

Z41	HPCPLCRL05	F5427
C12FDG 活性染料	Abcam	138777-25-0
DMSO	Sigma	D2650
Bafilomycin A1	Abcam	88899-55-2
DPBS(无钙镁)	Gibco	2380005

[0165] 2、实验方法：

[0166] 用100  $\mu$  M Bafilomycin处理细胞1h，抑制溶酶体中 $\beta$ -半乳糖苷酶活性，再加 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性荧光底物染料于 $\alpha$ -MEM培养基中，37 $^{\circ}$ C培养2h，用DPBS洗两遍，用胰酶消化收集细胞，进行流式细胞分析。从平均荧光强度及染色降低细胞比例比较过表达基因对逆转衰老效果。

[0167] 3、实验结果：

[0168] 如图5所示，将TDGF1转入间充质干细胞后，未衰老细胞比例为22.5%，明显高于对照组的12.4%。说明转入TDGF1基因能够延缓间充质干细胞的衰老。

[0169] 实施例8

[0170] 过表达TDGF1治疗自然衰老导致的白内障：

[0171] 1、实验材料：

[0172] 具体如表9所示。

名称	公司	货号
C57BL/6J 老龄白内障鼠	江苏悟空生物科技有限公司	11001A
DPBS(无钙镁)	ScienCell	#8000
一次性使用无菌胰岛素注射器	洁瑞	

[0173] 2、实验方法：

[0174] 对具有白内障表型的C57BL/6J老龄鼠晶状体注射3  $\mu$  l总量为 $10^8$ 的AAV2-pSFFV-TDGF1-mCherry，一周后观察白内障变化。

[0175] 质粒：pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry；

[0176] 细胞系：HUVEC人脐血内皮细胞，人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y。

[0177] 3、实验结果：

[0178] 如图4所示，图4A显示在注射前，滴加散瞳药后，晶状体在解剖镜下明显浑浊；图4B显示在玻璃体注射AAV2 TDGF1 8天后，晶状体浑浊消失，持续观察一周，白内障未复发。

[0179] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换或改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

## 权利要求书

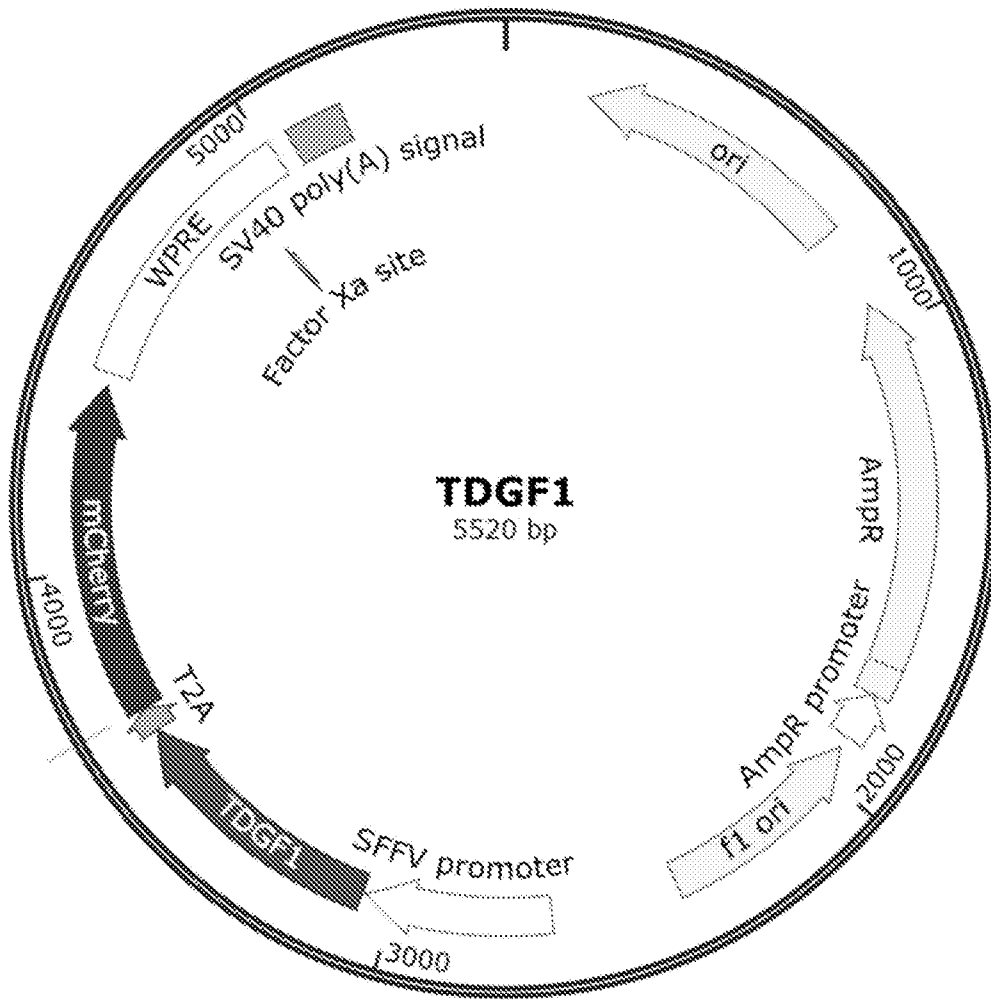
- [权利要求 1] TDGF1基因在制备治疗衰老相关疾病的药物中的应用。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，所述衰老相关疾病包括自然衰老、白内障、糖尿病视网膜病变、动脉粥样硬化、心血管疾病、老年骨质疏松症、高血压、神经退行性变性疾病、中风/脑卒中、萎缩性胃炎、躯干前驱症、慢性阻塞性肺疾病、冠状动脉疾病、多巴胺失调综合征、代谢综合征、心力衰竭、老年抑郁症、免疫衰老、心肌梗死、急性冠脉综合征、肌肉减少症、肌肉减少性肥胖；  
优选地，所述衰老相关疾病为白内障、自然衰老、糖尿病视网膜病变；  
更优选地，所述衰老相关疾病为白内障。
- [权利要求 3] TDGF1基因在制备逆转细胞衰老的药物中的应用。
- [权利要求 4] 根据权利要求1-3任一项所述的应用，其特征在于，所述TDGF1基因的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示，所述TDGF1基因编码蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。
- [权利要求 5] 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，所述细胞包括人脐带静脉内皮细胞、人神经母细胞瘤细胞、成纤维细胞、间充质干细胞。
- [权利要求 6] 根据权利要求1-3任一项所述的应用，其特征在于，所述应用是将TDGF1基因插入至骨架载体中构建过表达TDGF1基因的表达载体；然后用腺相关病毒包装所述过表达TDGF1基因的表达载体，获得过表达TDGF1基因的腺相关病毒；最后将所述过表达TDGF1基因的腺相关病毒转染权利要求3所述的细胞或直接注射于人或动物体内。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的应用，其特征在于，所述骨架载体为pSFFV-T2A-mCherry质粒载体。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的应用，其特征在于，所述过表达TDGF1基因的表达载体的构建方法为，将TDGF1基因序列采用同源重组的

方法插入至骨架载体pSFFV-T2A-mCherry质粒的pSFFV和T2A之间，构建得到过表达载体pSFFV-TDGF1-T2A-mCherry质粒。

[权利要求 9] 根据权利要求6所述的应用，其特征在于，所述腺相关病毒为AAV2/2血清型AAV载体或AAV2/9血清型AAV载体。

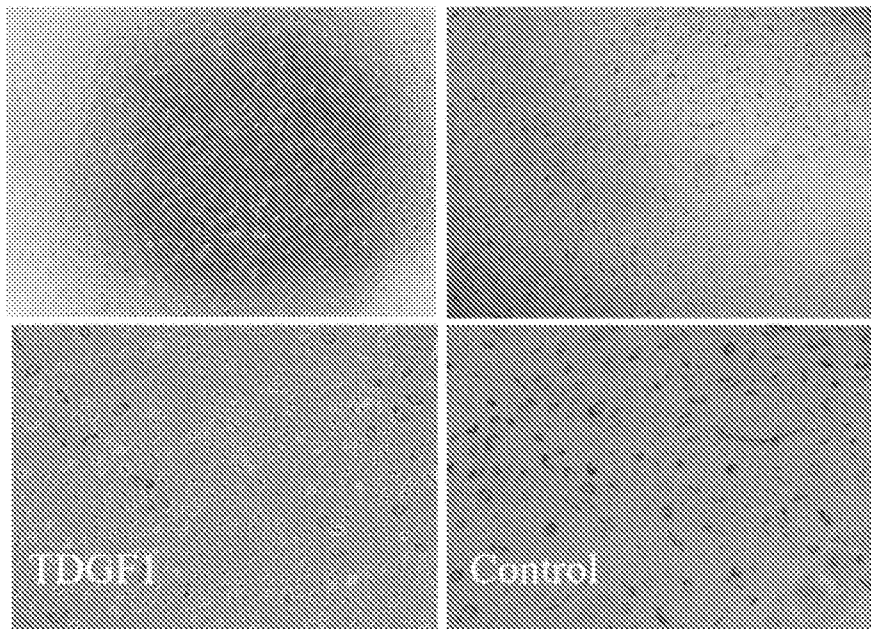
[权利要求 10] 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，所述逆转细胞衰老表现在降低细胞中 $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的比例。

[图 1]



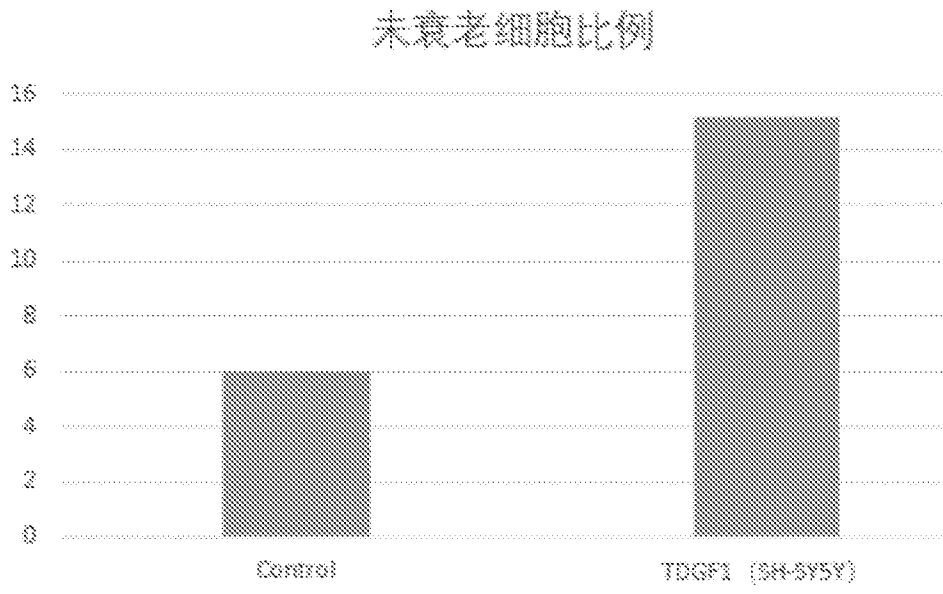
细则 26,  
01.11.2023

[图 2]



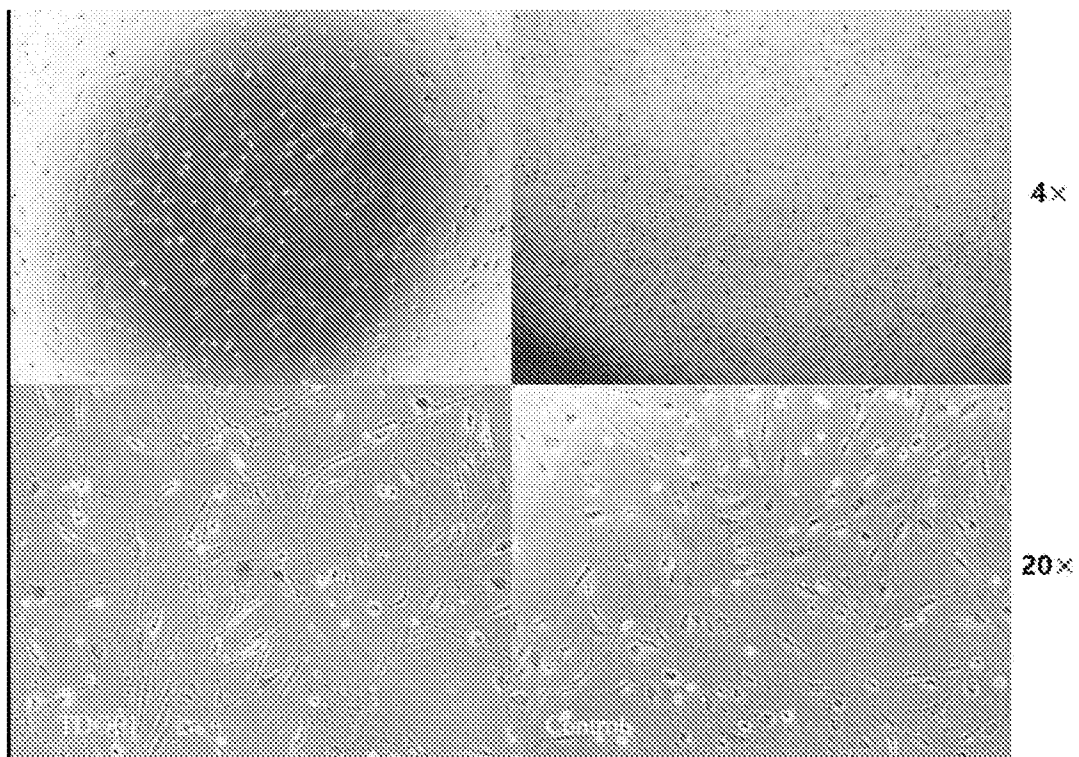
细则 26,  
01.11.2023

[图 3]



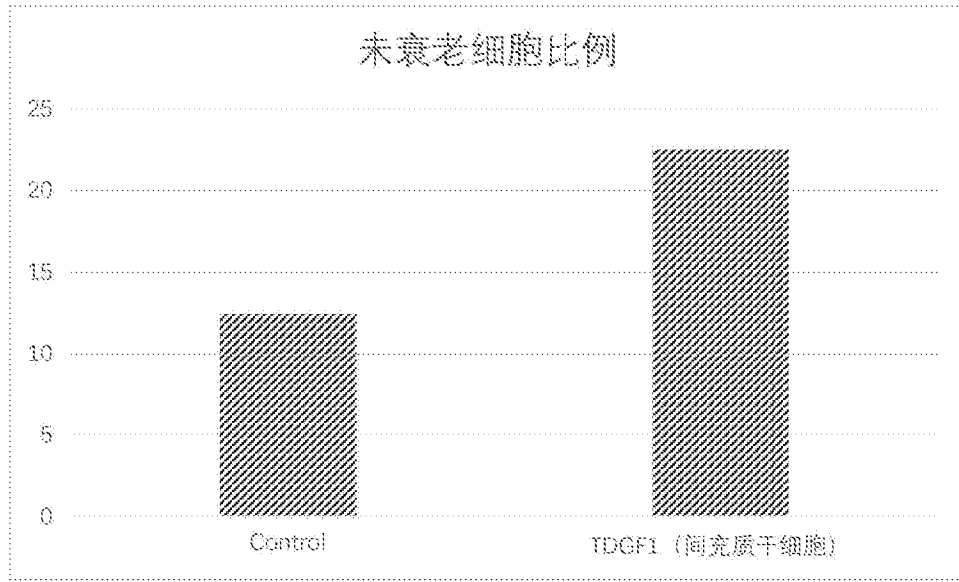
细则 26,  
01.11.2023

[图 4]



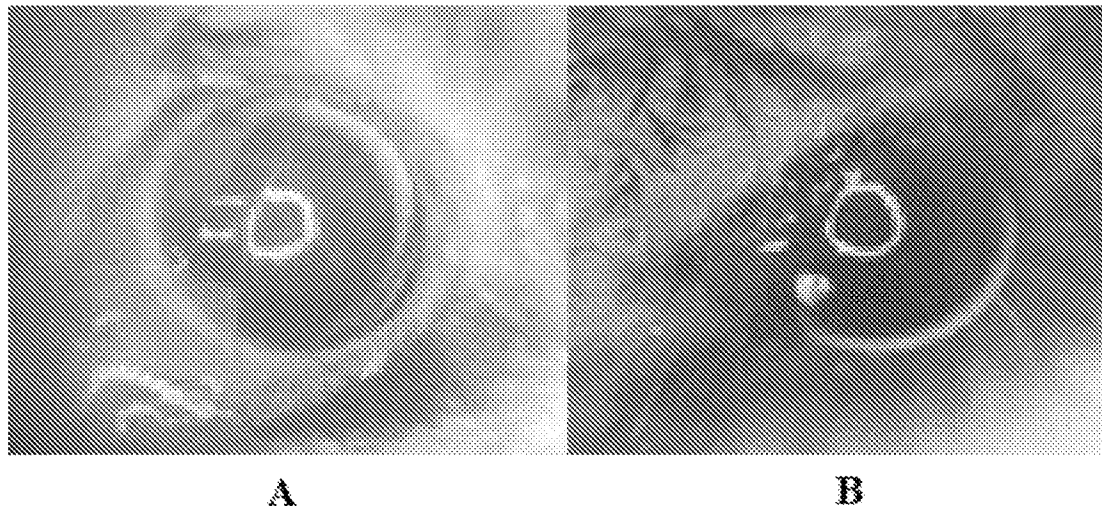
细则 26,  
01.11.2023

[图 5]



细则 26,  
01.11.2023

[图 6]



细则 26,  
01.11.2023

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/113288

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K14/475(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N15/864(2006.01)i; A61K38/18(2006.01)i; A61K48/00(2006.01)i; A61P39/06(2006.01)i; A61P27/12(2006.01)i; A61P27/02(2006.01)i; A61P9/10(2006.01)i; A61P3/10(2006.01)i; A61P9/00(2006.01)i; A61P9/12(2006.01)i; A61P9/04(2006.01)i; A61P19/10(2006.01)i; A61P1/04(2006.01)i; A61P25/00(2006.01)i; A61P25/24(2006.01)i; A61P11/00(2006.01)i; A61P3/00(2006.01)i; A61P37/00(2006.01)i; A61P21/00(2006.01)i; A61P3/04(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K C12N A61K 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) CNTXT; ENTXTC; VCN; CJFD; DWPI; CNKI; WFNPL; NPTXT; NPABS; Web of Science; STNext; NCBI; EMBL; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; 读秀, DUXIU; 衰老, 肌肉萎缩, 白内障, 畸胎癌衍化生长因子, TDGF1, CRGF, CRIPTO, teratocarcinoma, Aging, Muscle Atrophy, Cataract, 序列SEQ ID NO.1-2的检索, search for SEQ ID NOs: 1-2		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116041477 A (ALLIFE REGENERATIVE MEDICINE TECHNOLOGY (BEIJING) CO., LTD.) 02 May 2023 (2023-05-02) claims 1-10	1-10
X	WO 2008028888 A2 (VIB VZW et al.) 13 March 2008 (2008-03-13) description, page 3, last paragraph, page 4, paragraph 2, page 13, last paragraph, page 14, paragraph 1, page 10, the second-to-last paragraph, and page 11, paragraph 1	1-10
A	WO 2022164854 A2 (IMMUNIS, INC.) 04 August 2022 (2022-08-04) claims 1-19	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>22 November 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>24 November 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer  Telephone No.

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
    - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/CN2023/113288</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	116041477	A	02 May 2023	None	
WO	2008028888	A2	13 March 2008	WO	2008028888 A3 02 May 2008
WO	2022164854	A2	04 August 2022	IL	304719 A 01 September 2023
				CA	3209584 A1 04 August 2022
				WO	2022164854 A3 15 September 2022
				AU	2022212832 A1 07 September 2023

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a.  作为国际申请的一部分提交的;
- b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:



国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/113288

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	116041477	A	2023年5月2日	无	
WO	2008028888	A2	2008年3月13日	WO	2008028888 A3 2008年5月2日
WO	2022164854	A2	2022年8月4日	IL	304719 A 2023年9月1日
				CA	3209584 A1 2022年8月4日
				WO	2022164854 A3 2022年9月15日
				AU	2022212832 A1 2023年9月7日