

Nueva proteína y su aplicación

ANTECEDENTES

La presente invención se refiere, en general, a una nueva proteína y a su aplicación, la proteína secretora puede utilizarse para preparar fármacos para la prevención y el tratamiento de enfermedades inducidas por una formación excesiva o acumulación excesiva de proteínas basura.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

En las actividades fisiológicas normales, el organismo genera una gran cantidad de proteínas basura, que incluyen proteínas de oxidación, proteínas glicosiladas y algunas proteínas (polipéptido) cortadas y empalmadas anormales. El organismo retiene múltiples mecanismos para eliminar proteínas basura para mantener la función fisiológica normal. Sin embargo, la vejez o enfermedades inducirán una formación excesiva de proteínas basura o degradarán la capacidad del organismo para eliminar las proteínas basura, de modo que se acumula una gran cantidad de proteínas basura. La acumulación anormal de proteínas basura en el interior o el exterior de células es el mecanismo clave que induce una serie de enfermedades. Las enfermedades típicas incluyen la enfermedad renal crónica, la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Huntington, complicaciones diabéticas, etcétera ^[1-5]. La acumulación de proteínas de oxidación, proteínas glucosiladas u otras proteínas basura en el sistema circulatorio es una de las causas claves para el envejecimiento del organismo ^[6-7]. Se demuestra mediante investigación que la proteína de oxidación avanzada (AOPP) en suero daña las células renales, y es la patogénesis principal de la enfermedad renal crónica. La AOPP en

suero puede inducir la apoptosis programada de células β de los islotes ^[3,8]. La hipótesis β -amiloide indica que la disfunción sináptica y la muerte de las neuronas que resulta de una acumulación progresiva de toxoproteína inducida por un desequilibrio de generación y separación de proteína $A\beta$ en tejidos, son las primeras causas de la AD ^[9]. La proteína amilina no solo realiza una agregación anormal en la parte anormal en los tejidos de los islotes, sino que también en las placas en el tejido del cerebro, y está estrechamente relacionada con el progreso de la diabetes y enfermedades neurodegenerativas ^[10,11]. Basándose en estos hallazgos, en algunos modelos de enfermedades, la agregación de $A\beta$ o la formación en el modelo animal de AD es bloqueada al utilizar anticuerpos ^[12], fármacos polipeptídicos ^[13] o fármaco micromolecular ^[14], se puede reducir la formación de placas en el tejido nervioso, y se aumenta el nivel cognitivo del animal. Estos resultados demuestran que, utilizando fármacos para inhibir la formación y agregación de estas proteínas patógenas o para fomentar la eliminación de proteínas patógenas, para reducir la acumulación de proteínas patógenas, es un método importante para prevenir o tratar estas enfermedades.

Una investigación previa demuestra que cuando se produce el estrés oxidativo en las células, la proteína DSS1 (mano dividida/pie dividido eliminado 1) como una pequeña proteína en eucariotas altamente conservativa, puede modificarse de forma covalente en proteína de oxidación bajo las condiciones de reacción enzimática y el consumo de ATP, de modo que una modificación de este tipo mediará la proteína de oxidación para degradarse en la célula ^[15]. La inactivación del gen DSS1 conduce a

la muerte de las células; las células con una elevada expresión de la proteína DSS1 manifiestan una resistencia significativa al estrés oxidativo o la apoptosis inducida por antineoplásicos ^[16]. Estos resultados demuestran la función vital de la proteína DSS1 en el transcurso de separar la proteína de oxidación de las células, y también es la clave de la existencia de células.

Las referencias anteriores se describen a continuación:

1. Dobson CM (1999) Protein misfolding, evolution and disease. Trends Biochem Sci 24:329-332.

2. Liang M, Wang J, Xie C, Yang Y, Tian JW, Xue YM, Hou FF (2014) Increased plasma advanced oxidation protein products is an early marker of endothelial dysfunction in type 2 diabetes without patients albuminuria 2. J Diabetes 6(5):417-26.

3. Cao W, Hou FF, Nie J (2014) AOPPs and the progression of kidney disease. Kidney Int Suppl (2011) 4(1):102-106.

4. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J (2015) Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. Med Princ Pract 24(1):1-10.

5. Choe YJ, Park SH, Hassemer T, Körner R, Vincenz-Donnelly L, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2016) Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. Nature 531(7593):191-5.

6. Ott C, Grune T (2014) Protein oxidation and proteolytic signaling in aging Curr Pharm Des 20(18):3040-51.

7. Simm A, Müller B, Nass N, Hoffmann B, Bushnaq H, Silber RE, Bartling B (2015) Protein glycation - Between tissue aging and protection. Exp Gerontol 68:71-5.

8. Liang M, Li A, Lou A, Zhang X, Chen Y, Yang L, Li Y, Yang S, Hou FF (2017) Advanced oxidation protein products promote NADPH

oxidase-dependent β -cell destruction and dysfunction through the Bcl-2/Bax apoptotic pathway. Lab Invest 24. [Epub antes de la impresión].

9. Zhao LN, Long H, Mu Y, Chew LY (2012) The toxicity of amyloid β oligomers. Int J Mol Sci 13(6):7303-27.

10. Fernández MS (2014) Human IAPP amyloidogenic properties and pancreatic β -cell death. Cell Calcium 56(5):416-27.

11. Lim YA, Rhein V, Baysang G, Meier F, Poljak A, Raftery MJ, Guilhaus M, Ittner LM, Eckert A, Götz J (2010) Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. Proteomics 10(8):1621-33.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. Rezano A, Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Kitabatake M, Moolthiya P, Phimsen S, Suda T, Tone S, Yamamoto Y, Iwase H, Sakaguchi N (2013) Breast cancers with high DSS1 expression that potentially maintains BRCA2 stability have poor prognosis in the relapse-free survival. BMC Cancer 13: 562.

SUMARIO DE LA SOLICITUD

En el último estudio, nosotros (los inventores) descubrimos un nuevo subtipo de proteína DSS1 en el genoma de primates superiores (subfamilia antropoide), designada proteína DSS1 secretora (sDSS1). La sDSS1 es el primer subtipo de proteína DSS1 descubierto, y su secuencia, propiedades y función son muy similares a DSS1. Sin embargo, puede ser secretada en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, sus propiedades son más activas y puede formar un polímero con la proteína de oxidación en suero o solución tampón sin una reacción enzimática consumidora de energía, o puede combinarse con proteína A β y suprimir la formación de oligómero A β . La proteína sDSS1 añadida al medio de cultivo puede bloquear la citotoxicidad inducida mediante la proteína de oxidación, oligómero A β , oligómero amilina y proteína glicosilada para proteger la viabilidad celular. Por lo tanto, los autores de la invención identifican este nuevo tipo de proteína sDSS1 como un fármaco prometedor para prevenir y tratar las enfermedades inducidas por proteína de oxidación, proteína glicosilada, A β , amilina y otras proteínas patogénicas con características similares.

La solución técnica específica se describe a continuación:

Se proporciona una nueva proteína sDSS1 que incluye la proteína natural sDSS1 presente en animales Anthroidea, incluyendo seres humanos, en donde una proteína sDSS1 humana tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, los animales Anthroidea pueden ser, además, chimpancé, bonobo, gorila, orangután, gibón de mejillas blancas, langur de nariz chata dorado, macaco rhesus, papión oliva, colobo angoleño, mangabey gris, drill y macaco cola de cerdo norteamericano; en donde una proteína sDSS1 de chimpancé tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 5, una proteína sDSS1 de bonobo tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 6, una proteína sDSS1 de gorila tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 7, una proteína sDSS1 de orangután tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 8, una proteína sDSS1 de gibón de mejillas blancas tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 9, una proteína sDSS1 de langur de nariz chata dorado tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 10, una proteína sDSS1 de macaco rhesus tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 11, una proteína sDSS1 de papión oliva tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 12, una proteína sDSS1 de colobo angoleño tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 13, una proteína sDSS1 de mangabey gris tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 14, una proteína sDSS1 de drill tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 15, una proteína sDSS1 de macaco cola de cerdo norteamericano tiene un aminoácido tal como se recoge en SEQ ID NO: 16.

Preferiblemente, la proteína sDSS1 incluye una secuencia de aminoácidos N-terminal de 58 aminoácidos y una secuencia de aminoácidos C-terminal de 31 aminoácidos, en donde la proteína sDSS1 humana tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal de 58 aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 3, la proteína sDSS1 humana tiene una secuencia de aminoácidos C-terminal de 31 aminoácidos tal como se recoge en SEQ ID NO: 2; en donde la secuencia de aminoácidos N-terminal de los 58 aminoácidos incluye 3 o más secuencias de aminoácidos con aminoácidos de carácter ácido consecutivos, cada una de las secuencias de aminoácidos con aminoácidos de carácter ácido consecutivos incluye no más de 10 aminoácidos de carácter ácido, cualquiera de dos secuencias de aminoácidos adyacentes de las secuencias de aminoácidos con aminoácidos de carácter ácido consecutivos tiene una separación de no más de 4 aminoácidos, y la separación incluye al menos un aminoácido hidrofóbico, un valor del pH no es mayor que 4.5, la secuencia de aminoácidos N-terminal de los 58 aminoácidos incluye no menos de 10 aminoácidos de carácter ácido; la secuencia de aminoácidos C-terminal que sigue a la posición 58 de la secuencia de aminoácidos N-terminal de los 58 aminoácidos es relativamente hidrofóbica en su conjunto, la secuencia de aminoácidos C-terminal de los 31 aminoácidos incluye no menos de 10 aminoácidos hidrofóbicos;

en donde el aminoácido hidrofóbico se selecciona del grupo que consiste en alanina, isoleucina, leucina, valina, cisteína, fenilalanina, metionina, triptófano y tirosina;

el aminoácido neutro se selecciona del grupo que consiste en treonina, glicina, serina, histidina y glutamina;

el aminoácido de carácter ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, aspartato, prolina y asparaginato; y

los aminoácidos de carácter básico se seleccionan del grupo que consiste en arginina y lisina.

Preferiblemente, la proteína sDSS1 en los animales Anthrooidea incluyen una secuencia de aminoácidos C-terminal de:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅

X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁;

X₁ es un aminoácido neutro; X₂ es un aminoácido hidrofóbico; X₃ y X₄ son aminoácidos hidrofóbicos, X₅ es un aminoácido hidrofóbico, X₆ es un aminoácido hidrofóbico; X₇ es un aminoácido hidrofóbico; X₈ es un aminoácido hidrofóbico; X₉ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₀ es un aminoácido de carácter ácido; X₁₁ es un aminoácido neutro; X₁₂ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₃ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₄ es un aminoácido neutro; X₁₅ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₆ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₇ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₈ es un aminoácido hidrofóbico; X₁₉ es un aminoácido de carácter básico; X₂₀ es un aminoácido de carácter ácido; X₂₁ es un aminoácido de carácter básico; X₂₂ es un aminoácido neutro; X₂₃ es un aminoácido de carácter básico; X₂₄ es un aminoácido hidrofóbico; X₂₅ es un aminoácido hidrofóbico; X₂₆ es un aminoácido neutro; X₂₇ es un aminoácido hidrofóbico; X₂₈ es un aminoácido hidrofóbico; X₂₉ es un aminoácido hidrofóbico; X₃₀ es un aminoácido hidrofóbico; y X₃₁ es un aminoácido hidrofóbico;

una secuencia de aminoácidos que tiene 40% o más de homología con la secuencia de aminoácidos C-terminal de los 31 aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una propiedad y función

igual o similar a la secuencia de aminoácidos C-terminal de una proteína sDSS1 humana.

Un polipéptido codificado por una secuencia polipeptídica, en donde la secuencia polipeptídica se construye en base a la secuencia de aminoácidos N-terminal de los 58 aminoácidos y la secuencia de aminoácidos C-terminal de los 31 aminoácidos de la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, en donde

1) la secuencia polipeptídica tiene un extremo N que tiene 40% o más de similitud con la secuencia de aminoácidos N-terminal de los 58 aminoácidos, y la secuencia polipeptídica tiene un extremo C que tiene 40% o más de similitud con la secuencia de aminoácidos C-terminal de los 31 aminoácidos, una proteína codificada por la secuencia polipeptídica tiene una propiedad y función igual o similar a una proteína sDSS1 humana; o

2) un extremo N de la secuencia polipeptídica se basa en una secuencia de aminoácidos N-terminal de 58 aminoácidos de una proteína sDSS1 humana, o es una secuencia que tiene 40% o más de similitud con la secuencia de aminoácidos N-terminal de los 58 aminoácidos de la proteína sDSS1 humana, en donde un extremo C o el extremo N del polipéptido está fusionado con otra secuencia de aminoácidos, la otra secuencia de aminoácidos para la fusión tiene una propiedad idéntica o similar a una secuencia de aminoácidos C-terminal de 31 aminoácidos de la proteína sDSS1 humana y realiza las mismas o similares funciones, una proteína modificada codificada por la secuencia polipeptídica realiza una función idéntica o similar a la proteína sDSS1 humana; o

3) la secuencia peptídica se construye fusionando la secuencia de aminoácidos C-terminal de los 31 aminoácidos en la

proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior con otra secuencia polipeptídica.

La proteína de fusión incluye una secuencia completa o una secuencia parcial de la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, y la secuencia polipeptídica de acuerdo con la solución anterior.

Preferiblemente, la proteína de fusión es un complejo de proteínas formado al enlazar la proteína sDSS1, una proteína de soporte, un anticuerpo u otra secuencia de aminoácidos arbitraria.

Un complejo incluye una secuencia completa o una secuencia parcial de la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, la secuencia polipeptídica de la solución anterior o una secuencia completa o una secuencia parcial de la proteína de fusión de acuerdo con la solución anterior.

Preferiblemente, el complejo es un complejo formado al enlazar la proteína sDSS1 a un soporte de fármaco farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, el soporte de fármaco farmacéuticamente aceptable incluye una o más de microesfera/cápsula, liposoma, micro-emulsión, nanopartícula, partícula magnética y gel.

Un nucleótido codifica la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior.

Preferiblemente, el nucleótido incluye ADN y ARN.

Una célula expresa la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior.

Preferiblemente, la célula es una célula madre, una célula precursora o una célula adulta de un mamífero.

Preferiblemente, el mamífero es un ser humano, un orangután, un mono, un caballo, una res, una oveja, un cerdo, un burro, un perro, un conejo, un gato, una rata o un ratón.

Preferiblemente, la célula incluye una célula madre embrionaria, una célula madre multipotencial inducida o una célula madre derivada de un cultivo primario, una célula madre multipotencial o monopotencial derivada de la diferenciación de una célula madre.

Un sistema de expresión, en donde una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior se introduce en un organismo, y la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior se expresa en el organismo.

Preferiblemente, el sistema de expresión se selecciona del grupo que consiste en vector de plásmido de expresión eucariótico, adenovirus, virus lento, retrovirus, técnica CRISPR/Cas y otras técnicas de edición de genes factibles.

Preferiblemente, el organismo es un ser humano, un orangután, un mono, un caballo, una res, una oveja, un cerdo, un burro, un perro, un conejo, un gato, una rata, un ratón, un pollo, un pato o un ganso.

Un fármaco fija como objetivo de manera primaria la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior, en donde el fármaco puede afectar a un nivel de expresión de la proteína sDSS1 de acuerdo

con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior en el organismo tras la administración.

Preferiblemente, el fármaco es un fármaco micromolecular químico, un fármaco de proteína/polipéptido, un fármaco de ácido nucleico o un nanofármaco.

Preferiblemente, el fármaco de ácido nucleico incluye uno o más de un ARNsi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, un ADN de triple cadena y una ribozima.

Un método de producir una proteína incluye las siguientes etapas:

S1. Construcción de un vector de expresión: insertar una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior en un plásmido e introducir el plásmido en bacterias o células de levadura, o insertar la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior en el genoma de una célula de insecto o una célula de mamífero;

S2. Expresión de la proteína sDSS1: expandir un cultivo de la bacteria, célula de levadura, célula de insecto o célula de mamífero según se modifica en S1, y recoger un medio de cultivo o un lisado celular que contiene la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior;

S3. Purificación de la proteína sDSS1: filtrar de manera tosca y purificar el medio de cultivo o el lisado celular obtenido en S2 para obtener la proteína sDSS1.

Un método de producir una proteína incluye utilizar una técnica de síntesis química para producir la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior, o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior.

Un método de producir una proteína incluye utilizar un sistema de expresión de ribosomas *in vitro* para producir la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior o el polipéptido de acuerdo con la solución anterior.

Una aplicación de la proteína sDSS1, polipéptido, proteína de fusión, complejo, secuencia de nucleótidos, célula, sistema de expresión o fármaco de acuerdo con la solución anterior en el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad.

Preferiblemente, la enfermedad es una enfermedad, inducida por una formación o acumulación excesiva de proteína/polipéptido patogénico.

Preferiblemente, la proteína/el polipéptido patogénico es un producto de proteína de oxidación, producto de proteína de glicosilación, una proteína de precursor amiloide y un espliceosoma del mismo, un polipéptido amiloide de los islotes y un espliceosoma de la misma, u otras proteínas/polipéptidos patogénicos que tienen características similares a una proteína de oxidación, una proteína de glicosilación, una proteína amiloide o un polipéptido amiloide de los islotes.

Preferiblemente, el diagnóstico de la enfermedad incluye detectar uno o más de un nivel de expresión de una secuencia completa o parcial de la secuencia de aminoácidos, el nivel de ARNm y el número de copias de genes de la proteína sDSS1 de acuerdo con la solución anterior.

Preferiblemente, la prevención incluye uno o más de modificación genética, introducción de ácidos nucleicos, inyección/administración de fármacos, trasplante celular y trasplante de tejidos.

Preferiblemente, el tratamiento incluye uno o más de modificación genética, introducción de ácidos nucleicos, inyección/administración de fármacos, trasplante celular y trasplante de tejidos.

Las características y/o los efectos beneficiosos de la presente solicitud son:

1. La secuencia polipeptídica de la proteína sDSS1 y la proteína sDSS1 humana típica proporcionada por la presente solicitud es
MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDDDNVEDDFSNQLRATVLLMILV
CETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC (véase SEQ ID NO: 1). De acuerdo con un análisis bioinformático, la proteína es una proteína de animales de la subfamilia antropoide.

2. De acuerdo con un análisis bioinformático y el experimento celular, la secuencia carbono terminal de 31 aminoácidos de la proteína sDSS1 es un péptido señal y tiene un efecto crítico sobre las propiedades y la propiedad de secreción de la proteína. La secuencia C-terminal de los 31 aminoácidos es T
TVLLMILVCETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC (véase SEQ ID NO: 2).

3. La proteína sDSS1 definida en la presente solicitud se puede combinar con proteína de oxidación, proteína glicosilada, proteína A β y proteína amilina y puede blindar la citotoxicidad inducida por la agregación de estas toxoproteínas, de modo que tiene un importante potencial en el tratamiento de enfermedades

inducidas por una formación excesiva o una acumulación excesiva de estas toxoproteínas y otras proteínas patógenas con características similares.

4. La proteína sDSS1 de la presente solicitud se produce por fermentación de *Escherichia coli*. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína sDSS1 se inserta en el plásmido pET151D durante la expresión de sDSS1, el nitrógeno terminal se fusiona con una etiqueta 6-his y una etiqueta V5 para la purificación y la detección por inmunotransferencia. La expresión de la proteína en *Escherichia coli* se purifica preliminarmente utilizando una columna de gel Ni-NTA, y luego la SDS-PAGE se utiliza para la purificación del gel. La tira de corte que contiene la proteína His-V5-sDSS1 se coloca en una bolsa de diálisis que contiene tampón de transferencia, la proteína se extrae del gel bajo la impulsión del campo eléctrico y se recoge en la bolsa de diálisis. La proteína purificada mediante análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida puede alcanzar el nivel para el bioexperimento.

5. De acuerdo con el experimento molecular, la proteína sDSS1 de la presente solicitud se puede combinar con la proteína de oxidación en suero y la proteína de oxidación en solución tampón para formar polímeros, o se puede combinar con proteína A β para reducir la formación de oligómero A β .

6. El experimento celular demuestra que la proteína sDSS1 de la presente solicitud puede blindar de manera eficaz la citotoxicidad inducida por la proteína de oxidación, la proteína glicosilada, el oligómero A β y el oligómero amilina en el medio de cultivo, con el fin de mantener la viabilidad celular.

Resumiendo, la presente solicitud proporciona una proteína sDSS1, la propiedad y actividad biológicas de la proteína sDSS1 se demuestran mediante la investigación en bioinformática, biología molecular y niveles de citobiología. La proteína sDSS1 puede reducir de manera eficaz la citotoxicidad inducida por la proteína de oxidación, proteína glicosilada, oligómero A β y oligómero amilina en medio de cultivo para mantener la viabilidad celular. Dado que la proteína sDSS1 es una proteína congénita de un primate superior, está exenta de inmunorreacción en la aplicación clínica. Por lo tanto, la presente solicitud proporciona un fármaco candidato para prevenir y tratar las enfermedades inducidas por una formación excesiva o una acumulación excesiva de proteína de oxidación, proteína glicosilada, proteína A β , polipéptido amilina y otras proteínas patógenas con características similares, y tiene importantes perspectivas de aplicación en biomedicina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente solicitud se explica adicionalmente mediante las siguientes figuras adjuntas, con el fin de hacer a la presente solicitud más clara y completa, pero no para limitar el alcance de protección de la presente solicitud.

Fig. 1A. El gen sDSS1 es un nuevo subtipo de gen DSS1, la comparación entre el ADNc del gen DSS1 humano (NM_006304.1, 509 pb) y ADNc del gen sDSS1 humano (AK309241.1, 1195 pb) muestra una zona de solapamiento, la secuencia de ácidos nucleicos de la zona de solapamiento puede codificar secuencias de 58 aminoácidos N-terminales de acuerdo con el análisis.

Fig. 1B. Las secuencias de aminoácidos de la proteína sDSS1 de 13 especies de primates se compararon utilizando el software

Clustal X2.1, los resultados demuestran que la secuencia de aminoácidos de la proteína sDSS1 es altamente conservativa, las secuencias de 58 aminoácidos N-terminales son idénticas y las secuencias de 31 aminoácidos C-terminales tienen una mutación puntual solamente en unos pocos sitios.

Fig. 2A. En células 293T transfectadas con plásmidos, la distribución de la proteína GFP se observó 24 h más tarde. La fluorescencia verde en la célula control (GFP) era clara y brillante, y el fondo en solución era tenue. Se observó una señal de fluorescencia verde obvia en la solución de cultivo de proteína sDSS1 y GFP quelada (sDSS1-GFP) o secuencias de 31 aminoácidos C-terminales de la proteína sDSS1 y la proteína GFP quelada (sDSS1-c-GFP), y la fluorescencia intracelular se dispersa y la intensidad disminuye, lo que significa que la proteína GFP se recogió de la célula con la proteína sDSS1 o la secreción de la secuencia C-terminal de la proteína sDSS1.

Fig. 2B. Ensayos de inmunotransferencia en membrana puntual para detectar el medio de cultivo de células transfectadas, los resultados demuestran que la señal GFP se detectó en medios de cultivo sDSS1-GFP y sDSS1-c-GFP, y no existía señal obvia detectada en el grupo control en blanco y el grupo control de GFP, demostrando que la proteína sDSS1 es una proteína secretora y las secuencias de 31 aminoácidos C-terminales son péptidos señal.

Fig. 3A. La señal sDSS1 se puede detectar en la muestra de suero humano o de fluido cefalorraquídeo (CSF) humano utilizando un anticuerpo específico de una secuencia polipeptídica C-terminal de la proteína sDSS1 (secuencia de antígeno: secuencias de 31 aminoácidos C-terminales de la proteína sDSS1). La muestra de CSF

humano procedía de ciudadanos de edad, la muestra de suero *a* procedía de la sangre de un joven después de ejercicio extenuante, las muestras de suero *b*, *c* y *d* procedían de la sangre de jóvenes en estado de reposo.

Fig. 3B. La secuencia de ARNm específica del gen *sDSS1* (el producto amplificado es de 293 pb) se puede detectar en glioblastoma de astrocitomas humano (U-87 MG) utilizando la PCR, el gen *sDSS1* se utiliza como control (el producto amplificado es de 238 pb).

Fig. 4A-Fig.4B. Ilustran que la tinción con azul brillante coomassie muestra el contenido de proteína objetivo en los procesos de producción y purificación de proteína *sDSS1*.

Fig. 4A. Se seleccionó la cepa de clonación de *Escherichia coli* positiva para expandir el cultivo, la adición de IPTG puede inducir la expresión de proteína *sDSS1*, el nivel de expresión de la proteína objetivo en la célula sin inducción era muy bajo.

Fig. 4B. Se sometieron a ensayo el lisado concentrado después de purificación preliminar de columna en gel de Ni-NTA y el contenido de proteína objetivo después de la purificación, el canal *a* muestra la proteína *sDSS1* purificada, el canal *b* muestra la solución de lisis celular preliminarmente purificada.

Figs. 5A-5D. Ilustran que el experimento bioquímico y el experimento celular demuestran que la proteína *sDSS1* pueden combinarse con proteína de oxidación y blindar la toxicidad de la proteína de oxidación.

Fig. 5A. Los 0.72 µg de proteína *sDSS1* purificada se mezclaron con diferentes proporciones de proteína sérica para la incubación, la proteína *sDSS1* se sometió a ensayo mediante la

proteína conjugada con V5 (V5-HRP), el resultado demuestra que la proteína sDSS1 y la proteína de oxidación del suero formaron el complejo proteico macromolecular. **Fig. 5B.** La AOPP (200 µg/mL) y las proteínas sDSS1 purificadas a diferentes concentraciones se incubaron a 4°C durante la noche, el producto se separó mediante SDS-PAGE y la tinción con azul brillante Coomassie demuestra que la proteína sDSS1 y AOPP pueden formar un complejo macromolecular, el contenido del complejo aumenta con la concentración de proteína sDSS1. **Fig. 5C.** El medio de cultivo se mezcla con suero oxidado al 10%, la proliferación celular se redujo significativamente, la proteína sDSS1 en medio de cultivo puede blindar la citotoxicidad derivada del suero oxidado. **Fig. 5D.** El medio de cultivo sin suero se mezcló con 100 µg/mL de proteína AOPP para reducir la viabilidad de las células, la adición de proteína sDSS1 a la isoconcentración puede recuperar la viabilidad celular, los 100 µg/mL de BSA se utilizaron para el grupo control. Los datos se analizaron mediante el ensayo t de dos colas y la viabilidad mediante ANOVE. **, valor $p < 0.01$.

Figs. 6A-6E. Ilustran que la proteína sDSS1 reduce la formación de oligómero A β y reduce la citotoxicidad y la apoptosis de las células inducida por el oligómero A β .

Fig. 6A. Diferentes proporciones de proteína sDSS1 se mezclaron con 10 µg de proteína A β antes de la incubación, de acuerdo con el ensayo de anticuerpos A β , la proteína sDSS1 y A β formaron un complejo proteico conjugado de forma covalente y de elevado peso molecular, una conjugación de este tipo puede reducir la formación de oligómero A β con citotoxicidad. **Fig. 6B.** La proteína V5 de sDSS1 se sometió a ensayo mediante proteína

conjugada (V5-HRP), el resultado demuestra que la proteína sDSS1 y A β formaron un complejo proteico. **Fig. 6C.** La adición de oligómero A β al medio de cultivo indujo citotoxicidad, la viabilidad celular se degradó, la proteína sDSS1 puede blindar por completo la citotoxicidad inducida por el oligómero A β . **Fig. 6D.** El experimento de la apoptosis celular demuestra que la proteína sDSS1 añadida al medio de cultivo redujo de manera significativa la apoptosis temprana y la apoptosis tardía de células SH-SY5Y inducidas por parte del oligómero A β , con el fin de reducir el efecto de la toxoproteína sobre las células. **Fig. 6E.** La proteína sDSS1 puede blindar la toxicidad del oligómero A β para células madre nerviosas (NSCs) de ratón. Los datos se analizaron mediante el ensayo t de dos colas y se validaron mediante ANOVE. **, valor $p < 0.01$.

Fig. 7. El oligómero de amilina añadido al medio de cultivo induce citotoxicidad y reduce la viabilidad celular, la adición de proteína sDSS1 puede recuperar la viabilidad celular, fomentando la supervivencia de las células. Los datos se analizaron mediante ensayo t de dos colas y se validaron mediante ANOVE. **, valor $p < 0.01$.

Fig. 8. La disminución de la viabilidad celular inducida por 400 $\mu\text{g/mL}$ de proteína glicosilada se puede recuperar mediante proteína sDSS1, el efecto de recuperación aumentó con la concentración de proteínas sDSS1 (100 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$). Los 400 $\mu\text{g/mL}$ de proteína BSA se utilizaron para el grupo control. Los datos se analizaron mediante el ensayo t de dos colas y se validaron mediante ANOVE. **, valor $p < 0.01$.

Fig. 9A. Ilustra el método operativo de inyectar virus en el ventrículo lateral de ratones SAMP8 y el sitio de inyección del virus.

Fig. 9B. El adenovirus se inyectó en el ventrículo lateral de un ratón SAMP8 acelerado en senescencia de 5 meses de edad (1 μ L de virus en el cerebro de la derecha e izquierda, respectivamente), la supervivencia del animal se observó de forma continua. El resultado demuestra que la tasa de supervivencia después de la operación del ratón al que se le inyectó proteína sDSS1 que expresa adenovirus era aparentemente más elevada que la del ratón control (que expresa proteína GFP). Los datos se analizaron mediante ANOVE. **, valor $p < 0.01$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

Las soluciones preferidas de la presente solicitud se describen y validan con ejemplos en el siguiente texto, no para limitar el alcance de la presente solicitud. Todo el alcance de la presente solicitud es objeto del alcance de las reivindicaciones.

Los métodos experimentales para los siguientes casos son métodos experimentales convencionales, a menos que se especifique de otro modo.

En las siguientes realizaciones, la proteína sDSS1 era de producción propia y su pureza alcanzó el nivel para el bioexperimento, los otros materiales y reactivos estaban disponibles en el comercio.

Ejemplo 1, la proteína sDSS1 es una proteína secretora de primates

Herramienta de análisis bioinformático:

Base de datos del genoma de National Center of Biotechnology Information (NCBI); herramienta blast de nucleótidos (NCBI); herramienta blast de nucleótidos de alineación de secuencias (NCBI), herramienta de traducción (SIB Bioinformatics Resource Portal); Clustal X2.1: Alineación Múltiple de Secuencias (EMBL-EBI); SecretomeP 2.0 (servicio de predicción de CBS); WoLF PSORT II.

Método bioexperimental:

1. Cultivo celular, células 293T se adquirieron de la American type culture collection (ATCC), las células se cultivaron en el medio de cultivo celular que contenía 90% de medio basal (medio de eagle modificado por Dulbecco, DMEM) (Life technology C#12500062) y 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco C#10100-147) se cultivaron en una incubadora de células (temperatura 37°C, humedad 95%, concentración de CO₂ 5%) y se subcultivaron una vez cada dos días.

2. Transfección celular, las células 293T se inocularon en una placa de 6 pocillos a razón de 3×10^5 por pocillo, se mezclaron con 1.5 mL de medio de cultivo celular, el plásmido se transfectó cuando las células se habían adherido a la pared durante 12 horas. Se utilizó el plásmido de expresión eucariótico pCMV-C-Flag, la secuencia de ácidos nucleicos insertada que expresa proteína sDSS1 se expresó como SEQ ID NO: 17. 2500 ng del plásmido se diluyeron y mezclaron con 750 µL de medio Opti-MEM® (Life technology C#31985062) uniformemente, 10 µL de reactivo de transfección Lip2000 (Invitrogen C#12566014) se diluyeron y mezclaron uniformemente con 750 µL de medio Opti-MEM®, la solución de plásmido diluida se instiló gota a gota en el reactivo de

transfección diluido, se mezcló uniformemente y se incubó a temperatura normal durante 5 minutos. El medio de cultivo celular se transfirió de la placa de 6 pocillos, las células se limpiaron con PBS y luego se aplicó el fluido de trabajo de transfección incubado. Las células se cultivaron de forma continua en la incubadora y la expresión de la proteína fluorescente de las células 2 se observó durante 24 a 48 horas.

3. Transferencia Western, la membrana de PVDF se activó mediante metanol y se secó, el medio de cultivo de control y diferente medio de cultivo de células de transfección se goteó sobre la membrana. Cuando la membrana se secó, la membrana de PVDF completó el sellado de BSA al 1%, la incubación de anticuerpo primario (anti-GFP de conejo) (Cell signal technology C#2956), la incubación de anticuerpo secundario (anticuerpo HRP anti-conejo de cabra) (Zsbio, ZDR-5403), sucesivamente. La membrana se limpió con PBST tres veces, se desarrolló mediante líquido luminiscente (Zsbio, ZLI-9017) y las bandas se expusieron a una película de rayos X.

Análisis de los resultados:

En el análisis bioinformático del gen shfm1 en genoma humano, se encontró que el gen tiene múltiples transcripciones (véase la información del gen shfm1 en la base de datos de NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7979>). Aparte de una secuencia de ARNm de la secuencia de proteína DSS1 codificada conjuntamente (NM_006304.1, 509 pb), existe una secuencia de ARNm más larga (AK309241.1, 1195 pb). La secuencia de ARNm corta y la secuencia de ARNm larga tienen solo una secuencia de repetición de 256 pb (Fig. 1A). De acuerdo con el análisis de la secuencia de ácidos

nucleicos, se puede observar a partir de la herramienta de traducción que la secuencia de repetición puede codificar las secuencias de 58 aminoácidos N-terminales de la proteína DSS1. La secuencia de ARNm larga codifica 89 aminoácidos. De acuerdo con la alineación de las secuencias de polipéptidos, la secuencia de polipéptido codificada por ARNm largo y la secuencia polipeptídica DSS1 tienen la zona de solapamiento de 58 aminoácidos N-terminales, y la zona de variación de 31 aminoácidos. Este nuevo polipéptido se denominó proteína DSS1 secretora (sDSS1), las secuencias polipeptídicas se expresan como sigue:

DSS1 (Homo sapiens):

MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDDDNVEDDFSNQLRAELEKH
GYKMETS (véase SEQ ID NO: 4)

s-DSS1 (Homo sapiens):

MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDDDNVEDDFSNQLRATVLLM
ILVCETPYGCYVLHQGRMCSAFLCC (véase SEQ ID NO: 1)

De acuerdo con el rastreo del genoma de primates secuenciado y otros genomas de patrón animal, en la base de datos NCBI solamente el genoma de animales Anthroidea tiene una secuencia de ARNm largo similar y una secuencia polipeptídica similar a la proteína sDSS1 humana, tal como se muestra en la Tabla 1. Los resultados de la alineación de secuencias polipeptídicas demuestran que la secuencia de la proteína sDSS1 es altamente conservativa, las secuencias de 59 aminoácidos N-terminales son idénticas, las otras secuencias de aminoácidos C-terminales tienen una pequeña mutación puntual (Fig. 1B).

Tabla 1

Primate	Especie	Secuencia de aminoácidos
Haplorrhini	Homo sapiens	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRATVLLMILVCETPYGCYVLHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 1)
	Pan troglodytes	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRATVLLMILVCETPYGCYVLHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 5)
	Pan paniscus)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRATVLLMILVCETPYGCYVLHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 6)
	Gorilla gorilla)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRVTVLLMILVCETLYGCYVLHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 7)
	Pongo abelii	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRATILLMILVCETPYGCYVLHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 8)
	Nomascus leucogenys	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRATVLLMVLVCETPYGCYVLHQKERM

	CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 9)
Rhinopithecus roxellana	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDFSQQLRATVLLMIKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 10)
Macaca mulatta	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDFSQQLRATVLLMIKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 11)
Papio anubis	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDFSQQLRATVLLMIKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 12)
Angola colobus	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDFSQQLRATVLLMKKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 13)
mangabey gris	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFAEDWAGLDEDEDAAHVWED NWDDDNVEDDFSQQLRATVLLMIKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 14)
Mandrillus	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFAEDWAGLDEDEDAAHVWED

	leucophaeus	NWDDDNVEDDDFSNQLRATVLLMIKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 15)
	Macaca nemestrina	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFFPAEDWAGLDEDEDAHVWED NWDDDNVEDDDFSNQLRATVLLMIKVYETPYGCYILHQKGRM CSAFLCC (véase SEQ ID NO: 16)

La secuencia de aminoácidos de la proteína sDSS1 se analizó utilizando dos tipos de software de análisis de proteínas secretoras y de predicción que son Wolf PSORT y SecretomeP 2.0. Los resultados de la predicción demuestran que la proteína sDSS1 está situada fuera de las células, de manera similar a múltiples proteínas secretoras identificadas, se estima como una proteína secretora (Tabla 2). De acuerdo con el resultado del análisis del software Wolf PSORT, el sitio de escisión del péptido señal de la proteína sDSS1, está situado entre las posiciones de aminoácidos 58-59.

Tabla 2

Nombre de la especie	SecretomeP 2.0 (Umbral recomendado para la proteína secretada: 0.6)	WOLF PSORT (Número de proteínas secretadas similares)	Localización de proteínas predicha
Homo sapiens	0.85	28	Extracelular

Pan troglodytes	0.85	28	Extracelular
Pan paniscus	0.85	28	Extracelular
Nomascus leucogenys	0.85	27	Extracelular
Gorilla gorilla	0.752	23	Extracelular
Pongo abelii	0.86	27	Extracelular
Rhinopithecus roxellana	0.836	29	Extracelular
Macaca mulatta	0.836	29	Extracelular
Angola colobus	0.823	28	Extracelular
Mangabey gris	0.836	29	Extracelular
M. leucophaeus	0.836	29	Extracelular
Macaca nemestrina	0.836	29	Extracelular
Papio anubis	0.836	29	Extracelular

De acuerdo con los resultados del análisis bioinformático, la secuencia completa o las secuencias de 31 aminoácidos C-terminales (secuencias de 31 aminoácidos después de la posición de aminoácido 58) de la proteína están conectadas a la proteína fluorescente verde (GFP) y son expresadas en células 293T (sDSS1-GFP, sDSS1-c-GFP). Los resultados demuestran que la solución tenía fluorescencia verde, el fondo emitía luz y la fluorescencia en las células era tenue. No existía fluorescencia en la solución del

grupo control (GFP), el fondo era muy oscuro, la fluorescencia en las células era clara y brillante (Fig. 2A). El medio de cultivo celular se sometió a ensayo mediante inmunotransferencia de membrana puntual, la señal GFP se detectó en el medio de cultivo celular de grupos sDSS1-GFP y sDSS1-c-GFP, pero la señal no se detectó en el grupo control (GFP) (Fig. 2B). Para resumir estos resultados, la proteína sDSS1 es un tipo de proteína secretora, se puede sintetizar en las células y secretar de las células, las secuencias de 31 aminoácidos C-terminales de la proteína sDSS1 realizan la función del péptido señal.

Ejemplo 2, la proteína sDSS1 es un tipo de proteína

1. Tratamiento de suero humano y muestra de CSF. Se recogió sangre entera humana reciente, se mantuvo a temperatura ambiente durante 10-20 minutos, se centrifugó a 3500 g durante 30 minutos, el sobrenadante era suero humano. El suero se mezcló uniformemente con β -mercaptoetanol 100 mM y se trató mediante un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se centrifugó a alta velocidad a 12000 g durante 10 minutos después del enfriamiento y se mezclaron el sobrenadante y 1/5 de la solución de tampón de carga 5x en volumen. El CSF reciente se obtuvo del hospital y se colocó en una caja con hielo para el transporte, y se trató en el día. El CSF reciente se mezcló con tampón de carga 5x directamente y se incluyó en muestras directamente para la carga.

2. Transferencia Western, 15 μ L de muestra de carga preparada se colocaron en el pocillo de carga, la proteína se separó con gel prefabricado al 4-12% (Life technology C#NP0321BOX) y se movió a una membrana de PVDF. La membrana se sometió a incubación de anticuerpo primario (anti-sDSS1 de conejo) (secuencia del antígeno:

secuencias de 31 aminoácidos C-terminales de la proteína sDSS1), limpiando tres veces la solución de PBST; e incubación del anticuerpo secundario (anticuerpo HRP anti-conejo de cabra). Éste se limpió con PBST tres veces, se reveló mediante líquido luminiscente y las bandas se exhibieron en una película de rayos X.

3. Cultivo celular, las células de glioma humano (células U87-MG) se adquirieron de ATCC, las células se cultivaron en medio de cultivo celular completo que contenía 90% de medio DMEM basal y 10% de FBS, se cultivaron en una incubadora de células (temperatura 37°C, humedad 95%, concentración de CO₂ 5%), se subcultivaron una vez cada dos días.

4. Experimento de la PCR, las células U87-MG se recogieron y se lisaron rápidamente, el ARN total se extrajo de la solución de lisis celular utilizando un kit de extracción de ARN total (QIAGEN, 51304), la muestra de ARN se trató con 1 U/ μ L de DNasa I a temperatura ambiente durante 15 minutos para separar ADN del genoma residual. La muestra de ARN obtenida se convirtió por completo y se sintetizó en ADNc utilizando un kit de síntesis de ADNc (TransGen Biotech, AT301) y se utilizó como una muestra de molde para el subsiguiente experimento de PCR. 20 μ L del sistema de reacción se utilizaron en la reacción PCR, incluyendo 10 μ L de reactivo premezclado en PCR (Mezcla PCRTaq) (Omega bio-tek, TQ2200), 0.5 μ L de molde de ADNc (3.5 μ g/mL), 0.5 μ L de cebador, 9 μ L de agua ultrapura, se mezclaron uniformemente antes de la reacción PCR. Cebadores de ADNc de DSS1: cebador directo: GCAGACAGTCGAGATGTCAGAG, cebador inverso: TTCTTCTGGATGCTATGAAGTCTCC; cebadores de ADNc de sDSS1: cebador directo: GCAGACAGTCGAGATGTCAGAG, cebador inverso: TGATGATCTGTTAACAGCAGAGG.

Procedimiento de reacción PCR: 94°C, 10 minutos, reacción cíclica 40 veces: incluyendo 94°C 10 s, 62°C 20 s, 72°C 20 s, 72°C 10 minutos después de finalizar la circulación, se almacenaron a 4°C y el contenido en ADN en el producto de PCR se sometió a ensayo mediante electroforesis en sefarosa al 3% [SYBR Green Stain al 0.05% (ThermoFisher, 4472903)].

Análisis de los resultados:

La señal de la proteína sDSS1 se puede detectar en CSF o suero utilizando el anticuerpo específico de sDSS1. Las muestras de suero procedentes de diferentes individuos manifiestan diferentes modos de señal, la señal sDSS1 en el suero del individuo después del ejercicio era aparentemente más intensa que la del individuo en estado de reposo (Fig. 3A). La señal ARNm del gen sDSS1 se puede detectar en células U87-MG, el resultado de la secuenciación del gen del producto amplificado por PCR era idéntica a la secuencia de la base de datos (Fig. 3B). Estos resultados demuestran que la proteína sDSS1 es un tipo de proteína que existe en CSF y el suero.

Ejemplo 3, preparación de una pequeña cantidad de proteína sDSS1

Método experimental

1. Preparación de la proteína sDSS1: el segmento de nucleótidos de la proteína sDSS1 humana codificada por síntesis del gen total (véase SEQ ID NO: 17) se insertó en la parte trasera de la etiqueta Hisx6-V5 en pET151D. El plásmido se transfirió a la cepa de expresión BL21 (DE3). La *Escherichia coli* se fusionó con la proteína Hisx6-V5-sDSS1 de expresión, la columna en gel de Ni-NTA se utilizó para la purificación preliminar y luego se utilizó

SDS-PAGE para la purificación del gel. La tira cortada que contenía la proteína His-V5-sDSS1 se colocó en el filtro de bolsa con tampón de transferencia. La proteína se retiró del gel bajo la impulsión del campo eléctrico y se recogió en el filtro de bolsa. La proteína se concentró a aproximadamente 500 μ L, se dializó en solución PBS a 4°C cuatro veces, 200 ml cada vez.

2. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, la proteína sDSS1 purificada o la proteína de solución de lisis bacteriana se mezcló con solución tampón de carga 5x, se trató mediante un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se centrifugó a 12000 g de alta velocidad durante 10 minutos y el sobrenadante se extrajo para el análisis. La proteína se separó mediante gel prefabricado al 4-12%, el gel se tiñó durante 1 hora utilizando solución de tinción azul brillante Coomassie y se decoloró mediante un eliminador de manchas a temperatura ambiente durante la noche. Cuando se completó la decolorización, se observaron y fotografiaron las bandas en el gel.

Análisis de los resultados:

Se seleccionó la cepa de *Escherichia coli* clonada positiva, el cultivo se expandió, las células bacterianas se estimularon mediante IPTG para expresar la proteína objetivo al comienzo de la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. Las bacterias se lisaron y se sometió a ensayo el nivel de expresión de la proteína objetivo. El resultado demuestra, después de la estimulación con IPTG, que el nivel de expresión de la proteína sDSS1 de células bacterianas había aumentado significativamente. Las bandas de proteínas eran obvias en la imagen del gel (Fig. 4A). Después de purificar de manera preliminar la solución de lisis bacteriana

mediante columna en gel de Ni-NTA, la proteína objetivo en el concentrado se concentró grandemente (canal b), el contenido en proteína impura disminuyó, se podía obtener una proteína sDSS1 muy pura mediante purificación adicional (canal a) (Fig. 4B), aplicable al posterior bioexperimento. La proteína sDSS1 se cuantificó mediante proteína BCA, la concentración final era 0.72 mg/ml, almacenada a 4°C para el uso futuro.

Ejemplo 4, la proteína sDSS1 reacciona con proteína de oxidación y blinda la citotoxicidad de la proteína de oxidación

Método experimental

1. Reacción entre suero oxidado y proteína sDSS1, 3500 g de sangre reciente se centrifugaron durante 30 minutos, el suero superior se extrajo para el experimento posterior. Los 10 µL de solución de proteína sDSS1 (0.72 mg/mL) se mezclaron con 10, 20, 50 y 100 µL de sueros oxidados, respectivamente, las relaciones en masa de sDSS1 a proteína sérica eran de aproximadamente 1:100, 1:200, 1:500 y 1:1000, mezclados con 20 µM de reactivo Fenton (FeSO_4 y H_2O_2 se mezclaron en la relación en masa de 1:1) y se incubaron en una placa oscura a 4°C durante la noche. Al día siguiente, la His-V5-sDSS1 reaccionante se separó utilizando 10 µL de perlas de Ni-NTA. El líquido reaccionante se mezcló con las perlas a 4°C durante 2 horas, el dispositivo de separación magnética adsorbió las perlas en la pared del tubo, el líquido se separó, se aplicó 1 ml de PBST, el tubo se retiró del dispositivo de separación magnética, después de limpieza por oscilación repetida, el dispositivo de separación magnética adsorbió las perlas, el PBST se eliminó por succión y las etapas anteriores se repitieron cuatro veces. Finalmente, la proteína se eluyó con 50

μ L de TBS que contenía EDTA 50 mM, el eluyente se mezcló con solución 2x SDS isométrica, se trató a 100°C durante 10 minutos, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se extrajo para el ensayo. El sobrenadante se mezcló con solución de tampón de carga 5x, se calentó a 100°C durante 10 minutos y la muestra preparada se utilizó para la transferencia Western.

2. Preparación de FBS oxidado y AOPP, 10 mL de FBS se mezclaron con NaClO 10 mM y se trataron durante 1 hora, el suero oxidado se dializó continuamente en solución de PBS utilizando un filtro de bolsa de 3000 Da durante 24 horas, la solución se cambió a intervalos de 8 horas durante la diálisis y la solución de suero tratada se mezcló con vitamina C (Vc) 1 mM para separar por completo el oxidante participante. La concentración de proteínas se testó mediante cuantificación de proteínas BCA. El contenido de la proteína de oxidación se testó utilizando dos métodos, el valor de ditirosina en el suero oxidado medido mediante cloramina-T era 75.31 μ M/mg de proteína (el suero no tratado era 15.05 μ mol/mg de proteína), el contenido en carbonilo detectado por dinitrofenilhidrazina era 16.33 nmol/mg de proteína (el suero no tratado era 13.68 nmol/mg de proteína).

Los 10 mg de albúmina del suero se trataron con NaClO 160 mM durante 1 hora, la proteína de oxidación se dializó continuamente en solución de PBS utilizando un filtro de bolsa de 3000 Da durante 24 horas, la solución se cambió a intervalos de 8 horas durante la diálisis. La concentración de proteínas de la AOPP tratada se determinó mediante cuantificación de proteínas BCA. El valor de ditirosina de la muestra de AOPP medida mediante cloramina-T era 54.21 μ mol/mg de proteína (BSA no tratado era

14.55 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína), el contenido en carbonilo medido mediante dinitrofenilhidrazina era 1042.57 nmol/mg de proteína (BSA no tratado era 10.26 nmol/mg de proteína).

3. Reacción entre proteína AOPP y sDSS1, los 150 μL del sistema de reacción se mezclaron con 30 μg de proteína AOPP (200 $\mu\text{g/mL}$) y se mezclaron con 15 μg (100 $\mu\text{g/mL}$), 30 μg (200 $\mu\text{g/mL}$) y 60 μg (400 $\mu\text{g/mL}$) de proteína sDSS1, respectivamente, el volumen en exceso se complementó mediante solución en PBS aséptica. La solución se agitó uniformemente y se hizo reaccionar a 4°C durante la noche. La muestra después de la reacción se mezcló con solución de tampón de carga 5x, se calentó a 100°C durante 10 minutos, la muestra tratada se separó mediante SDS-PAGE y las bandas se exhibieron mediante tinción con azul brillante Coomassie.

4. Transferencia Western, la mezcla de proteínas después de la reacción se mezcló con tampón de carga 5x y se trató mediante un baño de agua hirviendo durante 10 minutos para el análisis de la transferencia Western. El método específico era el mismo que el arriba descrito. El anticuerpo era anticuerpo V5-HRP (diluido 1:5000).

5. Cultivo de la línea celular, células de neuroblastoma humanas (SH-SY5Y) se hicieron crecer en el medio basal DMEM con FBS al 10%; las células se subcultivaron una vez cada dos días.

6. Ensayo de viabilidad celular, con el fin de testar el efecto de la proteína sDSS1 sobre la citotoxicidad de suero oxidado, las células SH-SY5Y se inocularon a una placa de 96 pocillos a razón de 10^4 células por pocillo, 200 μL de medio completo. 12 horas más tarde, el medio completo se cambió a DMEM sin suero que contenía BSA al 0.5%, 200 μL por pocillo. Después de

24 horas de tratamiento, la solución de DMEM se cambió a suero oxidado al 10% y suero oxidado al 10% que contenía 20 µg/mL de proteína sDSS1 como medio de cultivo, 200 µL por pocillo. Después de 48 horas de tratamiento, el medio de cultivo viejo se retiró de la placa de 96 pocillos, 100 µL de fluido de trabajo CCK-8 diluido (diluido 1:20) (DOJINDO, CK04) se colocaron en cada uno de los pocillos para testar los cambios en la viabilidad celular. El grupo con BSA a isoconcentración era el grupo control.

Con el fin de testar el efecto protector de proteína sDSS1 sobre la citotoxicidad inducida por AOPP, las células SH-SY5Y se inocularon en la placa de 96 pocillos a razón de 2×10^4 células por pocillo, después de 12 horas de adhesión el medio de cultivo se cambió a medio de cultivo sin suero que contenía BSA al 0.5%. Después de 24 horas de tratamiento, se cambió el medio de cultivo sin suero que contenía 100 µg/mL de proteína AOPP, y al grupo de tratamiento se proporcionaron 100 µg/mL de proteína sDSS1, 200 µL por pocillo. Después de 48 horas de tratamiento de la placa de 96 pocillos, los cambios en la viabilidad celular se testaron utilizando el kit CCK-8.

Análisis de los resultados:

El suero contenía una gran cantidad de proteínas, principalmente albúmina sérica. Bajo el efecto del reactivo Fenton, las proteínas en suero se oxidaron, los productos de oxidación se hicieron reaccionar con sDSS1 para formar complejos. En el grupo control, el monómero de proteína sDSS1 no tenía una agregación obvia de proteínas. En el grupo experimental, la co-incubación con suero condujo a la formación de grandes cantidades de complejos de proteínas de alto peso molecular, estos complejos no se pueden

separar mediante SDS-PAGE (Fig. 5A). El resultado demuestra que la proteína sDSS1 puede combinarse con la proteína de oxidación en suero. En el experimento de citotoxicidad, comparado con el suero control, la adición de proteína de oxidación al 10% podría reducir la proliferación celular y la viabilidad celular obviamente, y 20 µg/mL de proteína sDSS1 en el medio de cultivo podrían recuperar la citotoxicidad de la proteína de oxidación (Fig. 5B).

La sDSS1 se mezcló con AOPP, la sDSS1 y AOPP se combinaron para formar complejos, estos complejos no se pueden separar mediante SDS-PAGE. El número de complejos aumentó aparentemente con la concentración de proteína sDSS1 en el sistema de reacción (Fig. 5C). En el experimento con células, la AOPP tenía una citotoxicidad significativa para células, reduciendo la viabilidad celular y la sDSS1 a isoconcentración podría blindar por completo la citotoxicidad de AOPP (Fig. 5D). Para resumir los resultados, la sDSS1 puede proteger a las células de la citotoxicidad de suero oxidado o AOPP.

Además, para resumir la reacción entre la proteína sDSS1 y la proteína de oxidación, dos proteínas pueden combinarse estrechamente con la proteína de oxidación, esta fuerza de unión puede resistir la elevada concentración de SDS que parece ser una interacción covalente. La diferencia es que el proceso de combinación de DSS1 y la proteína de oxidación necesita la asistencia de una enzima ATP [Zhang et al., 2014]. La evidencia demuestra que el acoplamiento estrecho de sDSS1 y proteína de oxidación está exento de ATP, no se requiere la enzima ATP. De acuerdo con las secuencias de aminoácidos de DSS1 y sDSS1, las secuencias de las posiciones de aminoácidos 1 a 58 de las dos

proteínas son idénticas, y la secuencia de las posiciones de aminoácidos 59 a 70 de DSS1 son completamente diferentes de la secuencia de las posiciones de aminoácidos 59 a 89 de sDSS1. El acoplamiento estrecho de DSS1 y sDSS1 con la proteína de oxidación se supone que se deriva de las secuencias de aminoácidos compartidas, es decir, la secuencia de los primeros 58 aminoácidos. La diferencia en la característica entre sDSS1 y DSS1, que es la característica que el acoplamiento estrecho con la proteína de oxidación está exento de la mediación de la enzima ATP, podría derivarse de la secuencia de aminoácidos única de sDSS1, es decir, la secuencia de aminoácidos C-terminal de las posiciones 59 a 89. En conjunto, el acoplamiento estrecho con la proteína de oxidación sin la mediación de enzima ATP de sDSS1 se deriva de la combinación orgánica de las secuencias de los primeros 58 aminoácidos y los últimos 31 aminoácidos.

Ejemplo 5, la proteína sDSS1 reduce la formación de oligómero A β y reduce la citotoxicidad de oligómero A β

Método experimental

1. Cultivo de la línea celular, las células de neuroblastoma humanas (SH-SY5Y) se hicieron crecer en el medio basal de DMEM con FBS al 10%; las células se subcultivaron una vez cada dos días.

2. Cultivo de células madre neurales, células madre neurales (NSCs) eran de tejido de cerebro de ratón P2, las NSCs de cultivo de suspensión primario se utilizaron para el ensayo de toxicidad después de dos subcultivos, las NSCs se cultivaron en el medio de cultivo de las células madre, que incluía 88% de medio basal DMEM/F12 (Gibco, C#12500-062), 10% de aditivo complementario de proliferación (Stem cell technology, C#05701), 2% de BSA (Sigma,

C#V900933), 10 ng/mL de heparina (Sigma, C#H3149), 10 ng/mL de bFGF (Roche, C#11104616001), 20 ng/mL de EGF (BD Bioscience, C#354010).

3. Reacción entre proteínas A β y sDSS1, polvo liofilizado de proteína A β (humana, 1-42) se suministró de Suzhou Qiangyao Biotechnology Co., Ltd. 2 mg de polvo liofilizado de A β se disolvieron mediante 20 μ L de DMSO, se diluyeron con PBS a 2 mg/mL y se almacenaron a -20°C. Al sistema de reacción se proporcionaron 300 μ L de solución de PBS, los 10 μ g de proteínas A β y sDSS1 se mezclaron en las relaciones molares en masa 1:1, 1:5 y 1:10 y luego se incubaron a 4°C durante la noche. El reaccionante incubado se mezcló con solución de tampón de carga 5x y se trató a 100°C durante 10 minutos para el análisis de transferencia Western.

4. Pretratamiento de la proteína A β , la solución de partida A β se diluyó con medio basal (pH 7.2) a 1000 μ g/mL, el diluyente de A β se incubó a 4°C durante 24 horas para formar oligómero para el experimento celular. La concentración de A β en el posterior experimento se marcó siempre de acuerdo con la concentración de proteínas antes de la incubación.

5. Transferencia Western, el reaccionante tratado se separó mediante SDS-PAGE para el análisis de transferencia Western, el método específico era el mismo que el descrito arriba. Los anticuerpos utilizados eran anticuerpo V5-HRP (diluido 1:5000), anticuerpo A β (Cell signal technology, 9888), anticuerpo secundario (anticuerpo HRP anti-conejo de cabra)

6. Ensayo de viabilidad celular, las células SH-SY5Y se inocularon en la placa de 96 pocillos a razón de 2×10^4 células por pocillo, después de 12 horas de adhesión el medio de cultivo

viejo se cambió por medio de cultivo sin suero que contenía BSA al 0.5%, después de 24 horas de tratamiento el medio de cultivo viejo se cambió a solución de DMEM que contenía proteínas A β o A β y sDSS1. Después de 48 horas de tratamiento de las células, el nivel de viabilidad celular se testó mediante el kit CCK-8.

7. Ensayo de apoptosis celular, el kit de ensayo de la apoptosis celular se adquirió de DOJINDO chemical technology (Shanghai) corp. (AD10). Las células SH-SY5Y se inocularon en la placa de 6 pocillos a razón de 3×10^5 células por pocillo después de 12 horas de adhesión, el medio de cultivo viejo se cambió por solución de DMEM sin suero que contenía BSA al 0.5%. Después de 24 horas de tratamiento, se cambió a solución que contenía proteínas A β o A β y sDSS1. Después de 48 horas de tratamiento, el nivel de la apoptosis celular se testó mediante el kit de apoptosis. Toda la solución y las células se recogieron, el sobrenadante se retiró mediante centrifugación. Las células se resuspendieron en los 400 μ L de solución de tampón de tinción proporcionada por el kit de apoptosis, 185 μ L de la suspensión celular se extrajeron para el test posterior. La suspensión celular se mezcló uniformemente con 5 μ L de solución de tinción de anexina V y las células se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se mezcló uniformemente con 10 μ L de solución de tinción PI, el nivel de la apoptosis celular se testó mediante citometría de flujo.

Las NSCs se adhirieron primeramente y se cultivaron en la placa de 6 pocillos, la placa se trató con laminina al 0.025% durante al menos dos horas y se limpiaron con PBS aséptica 6 veces para el uso futuro. Las NSCs se convirtieron en unicélulas y se inocularon en la placa de 6 pocillos a razón de 3×10^5 por pocillo,

las células se adhirieron durante 24 h para el experimento posterior.

Análisis de los resultados:

La proteína A β tenía una agregación obvia, después de la incubación existían agregados de proteínas de diferentes tamaños formados dentro de 10-20 KD. De acuerdo con informes previos, estos oligómeros A β eran la fuente principal de la citotoxicidad inducida por A β . Después de la co-incubación de proteína sDSS1 y A β , la proteína sDSS1 y la proteína A β se agregaron para formar un complejo de elevado peso molecular (peso molecular mayor que 20 KD), los oligómeros formados dentro de 10-20 KD se redujeron obviamente (Fig. 6A). A medida que aumentaba la concentración de la proteína sDSS1, la formación de oligómero A β se redujo aparentemente. De acuerdo con la detección de la señal de la proteína sDSS1, el complejo se formó mediante la reacción entre proteína sDSS1 y A β (Fig. 6B) y no se podía separar mediante SDS-PAGE.

Se testó el efecto de blindaje de la proteína sDSS1 sobre la citotoxicidad inducida por A β . En el ensayo de viabilidad celular, la viabilidad celular disminuyó significativamente después de aplicar el oligómero A β pre-tratado. Cuando el medio de cultivo se mezcló con proteína sDSS1, la viabilidad de células SH-SY5Y se recuperó significativamente, y la viabilidad celular era mayor que el grupo control (Fig. 6C). En el ensayo de apoptosis celular, la adición de oligómero A β al medio de cultivo indujo la apoptosis de células SH-SY5Y o NSCs. La adición de proteína sDSS1 al medio de cultivo puede reducir significativamente los niveles de apoptosis temprana y apoptosis tardía de células (Fig. 6D, Fig. 6E). De

acuerdo con los resultados, la proteína sDSS1 puede combinarse con proteína A β para reducir la formación de oligómeros A β , con el fin de mitigar la citotoxicidad inducida por la proteína A β .

Ejemplo 6, la proteína sDSS1 reduce la citotoxicidad del oligómero de amilina

Método experimental

1. Cultivo de la línea celular, las células de neuroblastoma humanas (SH-SY5Y) se hicieron crecer en el medio basal de DMEM con FBS al 10%; las células se subcultivaron una vez cada dos días.

2. Pre-tratamiento con la proteína amilina, el polvo liofilizado de la proteína amilina (humana) se suministró de Suzhou Qiangyao Biotechnology Corp. Los 2 mg de polvo liofilizado de amilina se disolvieron a razón de 2 mg/mL en solución de acetato de sodio 10 mM (pH 5.5), almacenado a -20°C. La solución de partida de amilina se diluyó a 1 mg/mL con medio basal (pH 7.2). El diluyente de amilina se incubó a 4°C durante 48 horas para formar oligómero para el experimento celular. La concentración de amilina en el posterior experimento se marcó siempre de acuerdo con la concentración de proteínas antes de la incubación.

3. Ensayo de viabilidad celular, las células SH-SY5Y se inocularon en la placa de 96 pocillos a razón de 2×10^4 células por pocillo, después de 12 horas de adhesión, el medio de cultivo viejo se cambió por medio de cultivo sin suero que contenía BSA al 0.5%. Después de 24 horas de tratamiento, el medio de cultivo viejo se separó y se aplicó la solución de DMEM que contenía proteínas amilina o amilina y sDSS1. Después de 48 horas de tratamiento de las células, el nivel de viabilidad celular se testó mediante el kit CCK-8.

4. Análisis de los resultados

La adición de 10 μ M de proteína amilina incubada al medio de cultivo celular puede inducir una citotoxicidad significativa, y la adición de proteína sDSS1 puede blindar la citotoxicidad inducida por el oligómero amilina, la viabilidad celular era incluso más alta que el grupo control (Fig. 7), lo que significa que la proteína sDSS1 puede blindar de manera efectiva la citotoxicidad de la proteína amilina.

Ejemplo 7, la proteína sDSS1 reduce la citotoxicidad de proteína glicosilada

Método experimental

1. Cultivo de la línea celular, las células de neuroblastoma humanas (SH-SY5Y) se hicieron crecer en el medio basal de DMEM con FBS al 10%; las células se subcultivaron una vez cada dos días.

2. Preparación de la proteína glicosilada, 10 mg/mL de albúmina del suero y ribosa 2.5 M se mezclaron e incubaron a 37°C durante 7 días y luego se dializaron en PBS utilizando un filtro de bolsa de 3000 Da durante 24 horas, la solución se cambió a intervalos de 8 horas. La proteína glicosilada completada se cuantificó mediante BCA, la muestra se almacenó a -80°C para el uso futuro.

3. Ensayo de viabilidad celular, las células SH-SY5Y se inocularon en la placa de 96 pocillos a razón de 2×10^4 células por pocillo, después de 12 horas de adhesión, el medio de cultivo viejo se cambió por medio de cultivo sin suero que contenía BSA al 0.5%. Después de 24 horas de tratamiento, el medio de cultivo viejo se separó y se aplicó la solución de DMEM que contenía proteína glicosilada y proteínas sDSS1 a diferentes

concentraciones, el grupo con BSA a isoconcentración se utilizó para el control. Después de 48 horas de tratamiento de las células, el nivel de viabilidad celular se testó mediante el kit CCK-8.

Análisis de los resultados

La adición de 400 µg/mL de proteína glicosilada al medio de cultivo celular puede inducir una citotoxicidad significativa, y la adicción de proteína sDSS1 puede reducir la citotoxicidad inducida por la proteína glicosilada. A medida que aumentaba la concentración de proteína sDSS1, la viabilidad celular era incluso más alta que el grupo control (Fig. 8), lo que significa que la proteína sDSS1 puede blindar de manera eficaz la citotoxicidad de proteína glicosilada.

Ejemplo 8, la proteína sDSS1 prolonga el tiempo de supervivencia post-operativo de ratón SAMP acelerado en la senescencia

Método experimental.

1. Alimentación de los animales, los ratones SAMP8 acelerados en senescencia (5 meses de edad, machos), se adquirieron de Beijing Vital River Laboratory Animal Technologice Co., Ltd., los animales fueron alimentados en el centro de cría de animales de laboratorio limpio de Southerm Model Organism Center. A los animales se les proporcionó agua aséptica suficiente y alimentación de cría de ratones estándar, 12 h/12 h de oscuridad-e-iluminación alterna brillante, el lecho y la jaula fueron cambiados mensualmente y diariamente se observó la supervivencia de los animales.

2. Síntesis de adenovirus, la secuencia de ácidos nucleicos (véase la SEQ ID NO: 17) de adenovirus que expresan la proteína

sDSS1 fue proporcionada por nosotros (autores de la invención), la construcción de adenovirus y la síntesis se completaron por parte de Cyagen (Guangzhou) Biotechnology Co., Ltd. La composición de la secuencia del promotor de adenovirus y de la región de transcripción: pAV[Exp]-UBC>EGFP:T2A:ORF_363bp, que incluye la secuencia del promotor de la proteína ubiquitina. De acuerdo con la determinación, el título del virus era mayor que 10^{10} PFU/mL. De acuerdo con la validación, infectando células U87-MG y células de neuroblastoma de ratón (N2a), el adenovirus puede infectar células y expresar de manera eficaz la proteína sDSS1. La proteína GFP que expresa adenovirus (pAV[Exp]-UBC>EGFP) se utilizó como control.

3. Inyección estereotáctica, los ratones SAMP8 acelerados en senescencia (6 meses de edad, machos), fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con uretano al 20% (disuelto en solución salina normal, impurezas y bacterias separadas mediante un filtro de 0.22 μ m) a razón de 800 mg/kg de peso corporal. Cuando el ratón fue anestesiado, se fijó al aparato estereotáxico del ratón (Stoelting, 51500), el hueso craneal se mantuvo horizontal. Se practicó una incisión en la piel de la cabeza para exponer el hueso craneal, el bregma se tomó como la coordenada de partida para localizar la región del ventrículo lateral (0.58 mm, 1.25 mm, 1.75 mm). El punto de marcación se perforó mediante un taladro dental. 2 μ L de líquido de virus se aspiraron por parte del microinyector (Hamilton 600-2.5 μ L, diámetro de la aguja de la jeringa 0.2 mm), la región del ventrículo lateral se relocalizó de acuerdo con los mismos valores de coordenadas. La aguja se insertó en la región del ventrículo lateral rápidamente de acuerdo con los valores de coordenadas especificados, el líquido del virus se

inyectó lentamente a razón de 200 nL/min de media, para una cantidad total de 1000 nL. Después de realizar la inyección, cada vez que se elevó la aguja 0.25 mm, se esperó durante 3 minutos hasta que la aguja se extrajera por completo del tejido del cerebro. La región del ventrículo lateral en la cara opuesta se relocalizó, se completaron la inserción de la aguja, inyección y elevación de la aguja, y se inyectó 1 μ L de líquido del virus. Para el ratón después de la inyección, el hueso craneal y los tejidos periféricos se limpiaron con 100 U/mL de ampicilina/estreptomicina, y la piel se suturó. En la cavidad abdominal del ratón se inyectaron 150 μ L de antibiótico, y el ratón se colocó en la jaula con el abdomen hacia arriba hasta que se despertó el ratón.

Análisis de los resultados

El diagrama esquemático indica la operación básica de inyectar virus en el ventrículo lateral del ratón y el sitio de inyección del adenovirus (Fig. 9A). En donde había dos tandas de ratones a los que se inyectó adenovirus que expresa sDSS1, 10 ratones en total; había dos tandas de ratones a los que se inyectaron GFP que expresa adenovirus, 14 ratones en total. En el espacio de 1 mes después de la inyección de adenovirus, tres ratones del grupo control murieron y murió un ratón del grupo experimental. En el espacio de 8 meses, los ratones del grupo control murieron sucesivamente, mientras que solo murió un ratón del grupo experimental (Fig. 9B). Para resumir los resultados, el tiempo de supervivencia post-operativo de los ratones SAMP8 a los que se inyectó adenovirus que expresa proteína sDSS1 era significativamente más largo que el de los ratones a los que solo

se inyectó virus control. La diferencia significativa se analizó mediante ANOVA (valor $P < 0.01$).

La descripción detallada anterior especifica únicamente las realizaciones factibles de la presente solicitud, y no pretende limitar el alcance de protección de la presente solicitud. Cualesquiera realizaciones o alternativas alteraciones equivalentes que no se desvíen de la esencia de la presente solicitud deben estar cubiertas por el alcance de protección de la presente solicitud.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.