



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104955836 B

(45)授权公告日 2019.03.08

(21)申请号 201380068475.8

(22)申请日 2013.12.27

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104955836 A

(43)申请公布日 2015.09.30

(30)优先权数据

12425208.1 2012.12.28 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.06.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/078076 2013.12.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/102343 EN 2014.07.03

(73)专利权人 LGV1有限公司

地址 意大利那不勒斯

(72)发明人 安尼巴莱·亚历山德罗·普卡

察尔米内·韦基奥内

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

(54)发明名称

BPIFB4蛋白的变体

(57)摘要

本发明涉及BPIFB4(杀菌/渗透性增加蛋白家族B,成员4)蛋白的变体及其用于治疗涉及一氧化氮信号传导受损的病状的用途。

(56)对比文件

WO 2006022619 A2,2006.03.02,
CN 101631861 A,2010.01.20,
WO 0179269 A2,2001.10.25,
Bingle CD等.Systematic nomenclature
for the PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins as
a subfamily of the BPI fold-containing
superfamily.《Biochem Soc Trans》.2011,第39
卷(第4期),第977-983页.

Puca AA等.Endothelial nitric oxide
synthase, vascular integrity and human
exceptional longevity.《IMMUNITY and
AGEING》.2012,第9卷(第26期),1724-4933-9-
26.

Kinane DF等.Human variability in
innate immunity.《Periodontology 2000》
.2007,第45卷第14-34页.

Paget DS等.Infectibility of
endovascular stents following antibiotic
prophylaxis or after arterial wall
incorporation.《Am J Surg》.1999,第178卷(第
3期),第219-224页.

审查员 郝攀

权利要求书2页 说明书11页

序列表12页 附图14页

1. BPIFB4蛋白变体在制备用于以下的药物中的用途：(i) 预防、改善、治疗选自以下的病状或降低其风险：动脉高血压、糖尿病、血脂异常、肾衰竭、代谢综合征、卒中、心肌梗死、勃起功能障碍、神经变性疾病、多发性硬化、认知障碍、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎、血管性视网膜病、青光眼、冠状痉挛性心绞痛、血栓形成、肺动脉高压、先兆子痫、血管炎、炎性疾病、静脉功能不全以及eNOS活性和由eNOS产生的NO降低的遗传疾病；或者(ii)改善肌营养不良的运动后疲劳或用作用于血管阻塞的一种或更多种支架的植入中的共辅助剂，其中所述BPIFB4蛋白变体具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有至少95%同源性的氨基酸序列并且所述变体的序列包含在对应于SEQ ID NO:1的229位的位置处的缬氨酸、在对应于SEQ ID NO:1的281位的位置处的苏氨酸、在对应于SEQ ID NO:1的488位的位置处的苯丙氨酸以及在对应于SEQ ID NO:1的494位的位置处的苏氨酸，并且所述变体具有提高eNOS活性和/或由eNOS产生NO的活性。

2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述BPIFB4蛋白变体具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述BPIFB4蛋白变体与使所述BPIFB4蛋白变体靶向至特定器官或组织的序列连接。

4. 多核苷酸在制备用于以下的药物中的用途：(i) 预防、改善、治疗选自以下的病状或降低其风险：动脉高血压、糖尿病、血脂异常、肾衰竭、代谢综合征、卒中、心肌梗死、勃起功能障碍、神经变性疾病、多发性硬化、认知障碍、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎、血管性视网膜病、青光眼、冠状痉挛性心绞痛、血栓形成、肺动脉高压、先兆子痫、血管炎、炎性疾病、静脉功能不全以及eNOS活性和由eNOS产生的NO降低的遗传疾病；或者(ii)改善肌营养不良的运动后疲劳或用作用于血管阻塞的一种或更多种支架的植入中的共辅助剂，其中所述多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有至少95%同源性之氨基酸序列的BPIFB4蛋白变体的氨基酸序列，并且所述变体的序列包含在对应于SEQ ID NO:1的229位的位置处的缬氨酸、在对应于SEQ ID NO:1的281位的位置处的苏氨酸、在对应于SEQ ID NO:1的488位的位置处的苯丙氨酸以及在对应于SEQ ID NO:1的494位的位置处的苏氨酸，并且所述变体具有提高eNOS活性和/或由eNOS产生NO的活性。

5. 根据权利要求4所述的用途，其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列，所述核苷酸序列包含编码SEQ ID NO:1之缬氨酸229、苏氨酸281、苯丙氨酸488和苏氨酸494的核苷酸。

6. 根据权利要求4所述的用途，其中所述BPIFB4蛋白变体具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

7. 根据权利要求4所述的用途，其中所述BPIFB4蛋白变体与使所述BPIFB4蛋白变体靶向至特定器官或组织的序列连接。

8. 载体在制备用于以下的药物中的用途：(i) 预防、改善、治疗选自以下的病状或降低其风险：动脉高血压、糖尿病、血脂异常、肾衰竭、代谢综合征、卒中、心肌梗死、勃起功能障碍、神经变性疾病、多发性硬化、认知障碍、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎、血管性视网膜病、青光眼、冠状痉挛性心绞痛、血栓形成、肺动脉高压、先兆子痫、血管炎、炎性疾病、静脉功能不全以及eNOS活性和由eNOS产生的NO降低的遗传疾病；或者(ii)改善肌营养不良的运动后疲劳或用作用于血管阻塞的一种或更多种支架的植入中的共辅助剂，其中所述载体包含与

表达控制序列有效连接的多核苷酸：所述多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:1均氨基酸序列有至少95%同源性之氨基酸序列的BPIFB4蛋白变体的氨基酸序列，并且所述变体的序列包含在对应于SEQ ID NO:1的229位的位置处的缬氨酸、在对应于SEQ ID NO:1的281位的位置处的苏氨酸、在对应于SEQ ID NO:1的488位的位置处的苯丙氨酸以及在对应于SEQ ID NO:1的494位的位置处的苏氨酸，并且所述变体具有提高eNOS活性和/或由eNOS产生NO的活性。

9. 根据权利要求8所述的用途，其中所述BPIFB4蛋白变体具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

10. 根据权利要求8所述的用途，其中所述BPIFB4蛋白变体与可用于使所述BPIFB4蛋白变体靶向至特定器官或组织的序列连接。

11. 根据权利要求8所述的用途，其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列，所述核苷酸序列包含编码SEQ ID NO:1之缬氨酸229、苏氨酸281、苯丙氨酸488和苏氨酸494的核苷酸。

12. 根据权利要求8至11中任一项所述的用途，其中所述载体为病毒载体。

13. 根据权利要求12所述的用途，其中所述病毒载体为腺病毒载体。

14. 根据权利要求12所述的用途，其中所述病毒载体选自AAV血清型1-9。

BP1FB4蛋白的变体

技术领域

[0001] 本发明涉及BP1FB4蛋白(杀菌/渗透性增加蛋白家族B,成员4)的变体及其用于治疗与受损的eNOS和NO介导的血管扩张所引起的内皮功能紊乱相关的病状(pathology)的用途。

背景技术

[0002] 人BP1FB4(也称为C20orf186;RY2G5;LPLUNC4)是BPI/LBP/PLUNC样家族的分泌蛋白成员,其已经涉及对抗细菌的宿主防御过程。这种蛋白质存在氨基酸序列为575(Acc.P-59827-2)和613(Acc.EAW76337.1)个氨基酸的不同长度的两种不同同种型(Bingle CD等,Biochem Soc Trans.(2011)39(4):977-83;Andrault J.-B等,Genomics(2003)82:172-184;Bingle C.D等,Hum.Mol.Genet.(2002)11:937-943;Bingle C.D等,Protein Sci.(2004)13:422-430)。

[0003] 对于这种蛋白质,已经在参考575氨基酸序列指出的以下位点描述了若干单核苷酸多态性:rs2070325-Ile229Val、rs 571391-Asn281Thr、rs7583529Phe488Leu和rs285097-Thr494Ile,其可导致产生若干不同的蛋白质变体。本发明人已经鉴定和表征了BP1FB4的若干变体。在仔细分析了上述4种多态性的单元型(haplotype)阶段(即,等位基因的组合)后,本发明人发现,最常见的单元型(65%分析的染色体)是编码氨基酸Ile229/Asn281/Leu488/Ile494(INLI)的组合AACT;第二最频繁单元型是编码氨基酸Val229/Thr281/Phe488/Thr494(VTFT)的组合GCTC(30%染色体包含这种单倍型),最后仅在2%人白种人染色体中存在编码Ile229/Asn281/Phe488/Thr494(INFT)的AATC组合。

[0004] 血管内皮由位于血管内腔和血管平滑肌细胞之间的细胞层形成。这些细胞持续产生一氧化氮(NO),一种由酶内皮一氧化氮合酶(eNOS)合成的可溶性气体。该物质在调节血管稳态和内皮功能(包括调节血管紧张度、调节局部细胞生长和保护血管免受血液中循环的血小板和细胞的有害结果)中具有重要作用。

[0005] 越来越多的病症列表已经与由eNOS合成受损或过量氧化降解造成的动脉壁的一氧化氮释放降低相关联(American Journal of Physiology,Endocrinology and metabolism 2012Mar 1;302(5)和Current Vascular Pharmacology 2012Jan;10(1):第4-18页)。这些病理学状况大部分与衰老相关。例如,已经在以下疾病中报道了一氧化氮信号传导受损:冠状痉挛性心绞痛(coronary spastic angina)(Miyamoto Y等.Hum Mol Genet.2000Nov 1;9(18):第2629-37页)、血栓形成(Loscalzo J,Circulation Research.2001;88,第756-762页)、肺动脉高压(D'Uscio LD.,Cardiovasc Res 2011,92(3),第359-360页)、先兆子痫(The Lancet,第361卷,9368,第1511-1517页)、血管炎(vasculites)(Kanwar JR等,Curr Med Chem.2009;16(19):2373-2394)、癌症(Kanwar JR等.Curr Med Chem.2009;16(19):第2373-2394页)、炎性疾病(Kanwar JR等.,Curr Med Chem.2009;16(19):第2373-2394页)、静脉功能不全(**Förstermann** U等.Circulation.2006;113:第1708-1714页),具有降低的eNOS活性和NO产生的遗传疾病,例

如MTHFR基因变异(Lemarie CA等.,Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011,第300卷:H745-53)、动脉高血压(Sparacino-Watkins CE等,Circulation.,2012;第125卷(23),第2824-6页; **Böger** RH等,Circulation.2009,第119卷(12),第1592-600页)、动脉粥样硬化、糖尿病、血脂异常、肾衰竭(Jiang B等,Hum Gene Ther.2012;23(11),第1166-75页; Ponnuswamy Pet等.PLoS One.2012;7(1):e30193;Vita JA.等,Circulation.2011,第124卷(25),第906-12页;Li ZL等.,PLoS One.2012,第7卷(6):e38787)、代谢综合征(Quyyumi AA等.,Circulation.1995,第92卷:第320-326页)、卒中(Madden JA.,Neurology.2012年9月25日;79(13Suppl 1):S58-62)、心肌梗死(Nakata S等,Circulation.2008年4月29日;第117卷(17):第2211-23页)、勃起功能障碍(Bianca Rd等,PLoS One.2012,第7卷(2):e31019)、神经变性疾病和多发性硬化(Faraci FM.,Circulation Research.2006,第99卷,第1029-1030页;Wu M,等,Glia.2009,第57卷(11),第1204-15页)、认知障碍(Rayatnia等,Eur J Pharmacol.2011,第666卷(1-3),第122-30页;Paydar等,Brain Res.2011;第1386卷,第89-99页)、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎(uveoretinitis)、血管性视网膜病(vascular retinopathy)、白内障和青光眼(Chiou g等.Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.2001年4月,17(2):第189-198页;Li Q等,Invest Ophthalmol Vis Sci.2010年10月,51(10):第5240-6页;Kwak HJ等,Mol Cells.2001年10月31日;12(2):第178-84页)。

[0006] N0产生的降低和随之内皮功能的失调已经被认定是导致上述病理状态的关键因素之一。因此,本领域中已经努力鉴定通过增强内皮的一氧化氮释放来逆转内皮功能障碍的潜在候选治疗。

[0007] 此外,已经证明eNOS活性/N0产生的提高对于肌营养不良患者中的运动后疲劳(Nature.2008第27卷;456,第511-515页)和用于血管阻塞的支架植入(Sharif F,等.Mol Ther.2008年10月;16(10):第1674-80页)有益。

[0008] 现在,本发明人惊奇地发现BPIFB4蛋白的特定变体与异常长寿相关。本发明人进一步发现,鉴定的变体出人意料地能够提高内皮细胞中eNOS的活化和N0的产生。这些生物学特性依赖于蛋白质中229位、281位、488位、494位的四个特定氨基酸的存在,因为用不同氨基酸在任意这些位置进行替换都导致蛋白质活性的丧失。

发明内容

[0009] 因此,本发明提供了一种BPIFB4蛋白的变体蛋白,其具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有至少85%同源性的氨基酸序列,其中所述序列包含在对应于SEQ ID NO:1的229位的位置处的缬氨酸,在对应于SEQ ID NO:1的281位的位置处的苏氨酸,在对应于SEQ ID NO:1的488位的位置处的苯丙氨酸,以及在对应于SEQ ID NO:1的494位的位置处的苏氨酸。

[0010] 氨基酸序列中的所述同源性优选是至少90%,更优选至少95%,甚至更优选至少99%。

[0011] 根据一个特别优选的实施方案,本发明的蛋白质具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0012] 根据一个可替代的优选实施方案,本发明的蛋白质具有对应于SEQ ID NO 1之序列的氨基酸序列,其中在不同于SEQ ID NO 1之229位、281位、488位和494位的位置处的一个或更多个氨基酸被保守氨基酸替换。“保守氨基酸”意指其物理化学性质在功能上等同于

原始氨基酸的氨基酸。

[0013] 本发明还提供了具有编码上述蛋白质之核苷酸序列的多核苷酸,以及包含与表达控制序列有效连接的所述多核苷酸的载体。根据一个优选实施方案,所述多核苷酸具有SEQ ID NO:2的序列。

[0014] 还提供了转染有上述载体并且能够表达本发明蛋白质的宿主细胞。

[0015] 本发明还提供了上述蛋白质、多核苷酸或载体用于治疗。

[0016] 特别地,本发明的目的是上述蛋白质、多核苷酸或载体用于预防、改善、治疗由eNOS活性和/或NO产生的降低造成的内皮功能障碍或者受益于提高eNOS活性和/或NO产生的病状或病症,和/或降低其风险。根据一个优选实施方案,上述蛋白质、多核苷酸或载体用于预防、改善或治疗选自以下的病状或病症或降低其风险:动脉高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、血脂异常、肾衰竭、代谢综合征、卒中、心肌梗死、勃起功能障碍、神经变性疾病、多发性硬化和认知障碍、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎、血管性视网膜病、白内障和青光眼、冠状痉挛性心绞痛、血栓形成、肺动脉高压、先兆子痫、血管炎、癌症、炎性疾病、静脉功能不全、eNOS活性和NO产生降低的遗传疾病如MTHFR基因变异、肌营养不良患者中的运动后疲劳。根据另一个优选实施方案,上述蛋白质、多核苷酸或载体用作用于血管阻塞的一种或更多种支架(优选含药支架)的植入中的共辅助剂(co-adjuvant)。

[0017] 最后,本发明提供了一种药物组合物,其包含与可药用载剂和赋形剂组合的本发明的蛋白质或多核苷酸。

[0018] 通过以下详细描述和权利要求,本发明的其他特征和优点将变得明显。

附图说明

[0019] 图1示出了实施例3中使用的编码INFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:3) 或VTFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:1) 之pRK5载体的序列,其中BPIFB4蛋白的序列以下划线表示,而EGFP的序列以斜体表示。

[0020] 图2示出了对实施例3中用编码INFT BPIFB4之质粒(左图)或对照空pRK5质粒(右图)离体灌注的肠系膜血管中的绿色荧光蛋白的检测。

[0021] 图3表示用空载体(EV)、编码INFT hBPIFB4或VTFT hBPIFB4之质粒灌注的肠系膜血管中的BPIFB4蛋白表达和eNOS活化。图a示出了7个合并实验的Western印迹以及对BPIFB4(顶部)和P-eNOS S1177(中间)的检测。图b示出了对BPIFB4表达的量化并且图c示出了对eNOS之1177位丝氨酸上的磷酸化的量化。

[0022] 图4、5和6:图4a、5a和6a表示在实施例3中在用空质粒pRK5质粒(EV/图4a)、编码INFT hBPIFB4之pRK5质粒(INFT/图5a)或编码VTFT hBPIFB4之pRK5质粒(VTFT/图6a)离体灌注的肠系膜血管中观察到的KC1诱导的血管收缩。图4b、5b和6b表示在实施例3中在用空质粒pRK5质粒(EV/图4b)、编码INFT hBPIFB4之pRK5质粒(INFT/图5b)或编码VTFT hBPIFB4之pRK5质粒(VTFT/图6b)离体灌注的肠系膜血管中观察到的去氧肾上腺素诱导的血管扩张。图4c、5c和6c表示在实施例3中在用空质粒pRK5质粒(EV/图4c)、编码INFT hBPIFB4之pRK5质粒(INFT/图5c)或编码VTFT hBPIFB4之pRK5质粒(VTFT/图6c)离体灌注的肠系膜血管中观察到的乙酰胆碱(acetylcoline)诱导的血管收缩。用编码VNFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:4)、ITFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:5)、VTLI hBPIFB4 (SEQ ID NO:6) 和INLI hBPIFB4 (SEQ

ID NO:7)之质粒在灌注的肠系膜血管中对以下进行观察所观察到的结果与用空载体获得的结果叠加(数据未示出):KCl诱导的血管收缩、去氧肾上腺素诱导的血管收缩或乙酰胆碱诱导的血管扩张。

[0023] 图7和8:图7a和8a表示eNOS抑制剂L-NAME对用空pRK5质粒(EV/图7a)或编码突变VTFT hBPIFB4之pRK5质粒(VTFT/图8a)离体灌注的血管中乙酰胆碱诱导的舒张的影响。图8b表示亚甲基四氢叶酸还原酶敲除小鼠(Mthfr^{+/−})、对照(Mthfr^{+/+})和用空pRK5质粒(Mthfr^{+/−}-EV)(图7b)或编码VTFT hBPIFB4之pRK5质粒(Mthfr^{+/−}-M)(图8b)处理的敲除小鼠之血管中的血管舒张的恢复。

[0024] 图9:图a)示出了证明在HEK293T细胞中H₂O₂诱导BPIFB4表达的RT-PCR。图b)示出了对表达VTFT hBPIFB4(VTFT)之HEK293T细胞和过量表达INFT hBPIFB4(INFT)之细胞或暴露于空载体(EV)之细胞中eNOS之1177位丝氨酸上的磷酸化的Western印迹。图c)顶部示出了β-肌动蛋白标准化的OD。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明的第一个目的是BPIFB4蛋白变体,其具有与SEQ ID NO:1的氨基酸序列有至少85%同源性的氨基酸序列并且特征在于所述序列包含在对应于SEQ ID NO:1的229位的位置处的缬氨酸(以下称为缬氨酸229),在对应于SEQ ID NO:1的281位的位置处的苏氨酸(以下称为苏氨酸281),在对应于SEQ ID NO:1的488位的位置处的苯丙氨酸(以下称为苯丙氨酸488),以及在对应于SEQ ID NO:1的494位的位置处的苏氨酸(以下称为苏氨酸494)。

[0027] 所述同源性优选是至少90%,更优选至少95%,甚至更优选至少99%。

[0028] 本发明之BPIFB4蛋白变体的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的不同之处可在于存在氨基酸的添加、缺失或另外的替换。

[0029] 然而,本发明变体的一个基本特征是其包含上文所述的4个氨基酸。在因氨基酸缺失或添加而不同于SEQ ID NO:1的同源物的情况下,上述4个氨基酸存在于对应于其在SEQ ID NO:1中的原始位置的位置。在因氨基酸替换而不同于SEQ ID NO:1的同源物的情况下,上述4个氨基酸存在于与SEQ ID NO:1中相同的位置。根据一个优选的实施方案,本发明的蛋白质具有对应于SEQ ID NO:1的氨基酸序列,其中在不同于SEQ ID NO:1之229位、281位、488位和494位的位置处的一个或更多个氨基酸已被保守氨基酸替换。“保守氨基酸”指其物理化学性质在功能上等同于原始氨基酸的氨基酸。

[0030] 根据本发明,特别优选的蛋白质具有已知在以下中鉴定的BPIFB4蛋白的氨基酸序列:智人(Homo Sapiens)(Acc.N.NP-59827.2;SEQ ID NO:1或Acc.N.NP-872325.2,对于较长的同工型)、猫(Felis Catus)(Acc N.XP003983665.1);黑猩猩(Pan Troglodytes)(Acc N XP525303);亚马逊松鼠猴(Samiri boliviensis boliviensis)(Acc N XP-003932113.1);猕猴(Macaca Mulatta)(Acc N NP-001230192.1);倭黑猩猩(Pan paniscus)(Acc N.XP-003814776.1);小耳大婴猴(Otolemur garnettii)(Acc N.XP_003788148.1);苏门答腊猩猩(Pongo abelii)(Acc N XP-003780649.1.);袋獾(Sarcophilus harrisii)(Acc N.XP-003758987.1);褐家鼠(Rattus norvegicus)(Acc N.NP-001102679.2);普通狨(Callithrix jacchus)(Acc N.XP-003732841.1);小鼠(Mus musculus)(Acc N.NP-001030047.2);牛(Bos taurus)(Acc N XP-003586861.1);家犬(Canis lupus familiaris)(Acc N.XP-534383.3);野猪(Sus scrofa)(Acc N.XP-

003134448.3)；原鸡 (*Gallus gallus*) (Acc No XP-425718)；北美负鼠 (*Didelphis virginiana*) (LOC100032880) 或 非洲爪蟾 (*Xenopus*) (LOC100485776)，已对其进行修饰使得其包含在对应于SEQ ID NO:1的229位的位置处的缬氨酸，在对应于SEQ ID NO:1的281位的位置处的苏氨酸，在对应于SEQ ID NO:1的488位的位置处的苯丙氨酸，以及在对应于SEQ ID NO:1的494位的位置处的苏氨酸。

[0031] 根据一个特别优选的实施方案，本发明的BPIFB4蛋白变体具有SEQ ID NO:1的序列。在下文中将具有这样的序列的蛋白质称为VTFT hBPIFB4。

[0032] 本发明的第二个目的是一种蛋白质，其具有由与能够赋予该蛋白质特别有利特性的另外的氨基酸序列连接的根据本发明之BPIFB4蛋白变体的氨基酸序列组成的序列。优选地，所述另外的氨基酸序列用于识别根据本发明的BPIFB4蛋白变体或者用于将本发明的BPIFB4蛋白变体靶向至特定的器官或组织。优选地，所述蛋白质是嵌合蛋白。

[0033] 如实验部分中将详细描述的，本发明人意外地发现上述VTFT hBPIFB4与3个独立群体中的异常长寿有关。本发明人还证明突变蛋白质对预期寿命的有益作用是其能够调节与衰老相关的血管功能障碍的结果。如实验部分中所证明的，这种调节依赖于本发明VTFT hBPIFB4中对应于SEQ ID NO:1之229位、281位、488位和494位的位置处的特定4个氨基酸的存在。

[0034] 如实施例3中所示，小鼠肠系膜血管被离体灌注空质粒或者编码VTFT hBPIFB4或与VTFT hBPIFB4的不同之处在于对4个相关氨基酸之多种替换的蛋白质的质粒，所述蛋白质为：具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的INFT hBPIFB4，其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含分别在229位和281位的异亮氨酸和天冬酰胺 (Asparagine)；具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VNFT hBPIFB4，其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含281位的天冬酰胺；具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的ITFT hBPIFB4，其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含229位的异亮氨酸；具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VTLI hBPIFB4，其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含448位的亮氨酸和494位的异亮氨酸；具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的INLI hBPIFB4，其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含229位的异亮氨酸、281位的天冬酰胺、488位的亮氨酸和494位的异亮氨酸。尽管VNFT hBPIFB4、ITFT hBPIFB4、VTLI hBPIFB4和INLI hBPIFB4对血管功能没有表现出任何作用并且INFT hBPIFB4强烈抑制任何血管功能，从而阻断血管收缩和血管扩张两者，VTFT BPIFB4蛋白表现出弱的血管收缩抑制作用但显著增强血管扩张。已证明，这种作用是通过经由1177位丝氨酸上的磷酸化活化eNOS来介导的，因而其与内皮细胞的NO释放增加有关。VTFT hBPIFB4诱导eNOS活化的能力已在细胞系HEK293T中得到证实(实施例5)。

[0035] 上述数据在与NO产生受损有关的血管疾病动物模型(杂合Mthfr敲除小鼠)中也得到了证实，其中已显示VTFT hBPIFB4蛋白的转染恢复NO释放和内皮依赖性血管扩张反应(实施例4)。

[0036] 本发明的第三个目的是本发明的BPIFB4蛋白变体的片段，其具有包含上文所述的缬氨酸229、苏氨酸281、苯丙氨酸488和苏氨酸494的序列。

[0037] 本文明的上述BPIFB4蛋白变体或片段由于其生物活性而可有利地用于预防、改善、治疗由NO产生或eNOS活性降低引起的内皮性病理病症或受益于提高eNOS活性或NO产生的病状或病症，和/或降低其风险。

[0038] 由此,本发明的第四个目的是上述BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段,其用于治疗。优选地,本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段用于预防、改善、治疗由于内皮细胞的NO释放低于生理水平或eNOS的活性降低而引起的功能障碍和/或降低其风险,或者用于其中受益于提高eNOS的活化和/或NO的产生的临床情况。根据本发明的一个优选实施方案,本发明的所述BPIFB4蛋白变体、所述蛋白质或所述片段用于预防、改善、治疗选自以下的病状或降低其风险:动脉高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、血脂异常、肾衰竭、代谢综合征、卒中、心肌梗死、勃起功能障碍、神经变性疾病、多发性硬化、认知障碍、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎、血管性视网膜病、白内障、青光眼、冠状痉挛性心绞痛、血栓形成、肺动脉高压、先兆子痫、血管炎、癌症、炎性疾病、静脉功能不全、eNOS活性和NO产生降低的遗传疾病,例如MTHFR基因变异。

[0039] 根据本发明的一个替代优选实施方案,所述BPIFB4蛋白变体用于改善肌营养不良患者中的运动后疲劳以及作为用于血管阻塞的一种或更多种支架(优选含药物的)的植入中的共辅助剂。

[0040] 可将根据本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段通过经口、经鼻、静脉内、局部、眼内或眼后施用施用于有此需要、受上述任一种病状侵袭或处于上述临床状态的患者。

[0041] 因此,本发明的第五个目的是优选适用于经口、经鼻、静脉内、局部、眼内或眼后施用的药物组合物,其包含与可药用载剂和/或赋形剂混合的本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段。适用于本发明的药物组合物的配制在本领域中是公知的,并且在例如最新的“Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook”, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania或Babizhayev MA. Drug Testing and Analysis, 第4卷,第6期,第468-485页,2012年6月)中进行了描述。

[0042] 特别适用于施用根据本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段的药物制剂基于使用聚氨基酸和多糖结构的合成共聚物,其能够与BPIFB4蛋白变体、蛋白质或其片段通过静电、疏水或其他物理相互作用形成可逆的物理复合物,并产生在施用后从其释放完整形式之蛋白质或片段的纳米聚集体(Diaz-Fernandez YA等,Biosens Bioelectron. 2010年9月15日;26 (1):29-35)。

[0043] 本发明的第六个目的是多核苷酸,优选DNA多核苷酸,其编码根据本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或多肽的氨基酸序列。根据一个优选的实施方案,所述多核苷酸的序列包含SEQ ID NO:2或其片段的序列,或者由SEQ ID NO:2或其片段的序列组成,所述片段含有编码上述缬氨酸229、苏氨酸281、苯丙氨酸488和苏氨酸494的核苷酸。

[0044] 可使用上述多核苷酸借助于包含它的合适表达载体体外、离体或体内获得突变蛋白质或多肽在宿主细胞中的表达。

[0045] 因此,本发明的第七个目的是包含与表达控制序列有效连接本发明的上述多核苷酸的载体。

[0046] 根据一个优选的实施方案,本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段是在经上述载体转染的宿主细胞中重组产生的。根据该实施方案,本发明的载体优选是适合以高产量产生蛋白质或多肽的载体。例如,可使用pcDNATM3.3-**TOPO®**载体来获得本发明的蛋白质在瞬时转染后在贴壁哺乳动物组织培养细胞中的高水平表达,或者使用FreeStyleTM MAX CHO和FreeStyleTM MAX 293系统(Invitrogen INC.)来获得分泌性蛋白质的高水平表达。

[0047] 因此,本发明的第八个目的是经本发明的上述载体转染的宿主细胞。

[0048] 本发明的第九个目的是重组产生根据本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段的方法,其包括在允许所述BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段表达的条件下培养上述宿主细胞并回收所述BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段。

[0049] 作为原样直接施用的替代选择,本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段可在向有此需要的患者施用根据本发明的载体之后在靶组织中表达,所述施用优选通过静脉内(endovenous)、皮下、眼内、眼后途径,所述载体适合诱导所述突变蛋白质或多肽在所述靶组织中表达。所述靶组织可根据待治疗的病状而不同并且可以是例如内皮组织、肝组织、心脏组织、肾组织、眼组织或肌肉组织。

[0050] 根据该实施方案,本发明的载体是优选适合在静脉内施用后转染目的靶组织之细胞的载体。

[0051] 根据一个特别优选的实施方案,所述载体是病毒载体,基于对目的靶组织的特异性,优选腺病毒载体,更优选选自AAV血清型1-9载体的载体,(Varadi K,等, Gene Ther. (2012);19 (8):800-9;Zincarelli C等,Mol Ther. (2008),16 (6):1073-80;Diaz-Fernandez YA等,Oligonucleotides. 2010;20 (4):191-8.)。

[0052] 因此,本发明的第十个目的是本发明之上述用于治疗的所述多核苷酸或载体。优选地,所述多核苷酸或载体用于预防、改善、治疗由于内皮细胞的NO释放低于生理水平或eNOS的活性降低而引起的内皮功能障碍和/或降低其风险,或者用于受益于提高eNOS的活化和/或NO的产生的情况中。根据本发明的一个优选实施方案,所述多核苷酸或载体用于预防、改善、治疗选自以下的病状或病症或者降低其风险:动脉高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、血脂异常、肾衰竭、代谢综合征、卒中、心肌梗死、勃起功能障碍、神经变性疾病、多发性硬化、认知障碍、视网膜变性、葡萄膜视网膜炎、血管性视网膜病、白内障、青光眼、冠状痉挛性心绞痛、血栓形成、肺动脉高压、先兆子痫、血管炎、癌症、炎性疾病、静脉功能不全、eNOS活性和NO产生降低的遗传疾病,例如MTHFR基因变异。

[0053] 根据本发明的一个替代优选实施方案,所述多核苷酸或载体用于改善肌营养不良患者中的运动后疲劳以及作为用于血管阻塞的一种或更多种支架(优选含药的)的植入中的共辅助剂。

[0054] 本发明的第十一个目的是优选适用于静脉内、皮下、眼内或眼后施用的药物组合物,其包含根据本发明的载体与可药用载剂和/或赋形剂的混合物。适用于本发明的药物组合物的配制在本领域中是公知的。作为一个实例,可使用基于聚合物的纳米系统或配位聚剂纳米系统(polycomplex nanosystem)来递送本发明的载体(Murano E等,Nat Prod Commun. (2011),6 (4):555-72;Moustafine RI等,Int J Pharm. 2012年10月3日)。

[0055] 本发明的BPIFB4蛋白变体、蛋白质或片段或载体的平均日剂量将取决于多种因素,例如患者的疾病严重程度和情况(年龄、性别和体重)。技术人员可使用本领域中公知的技术手段来发现正确的剂量和方案从而确保在每种特定病状情况下的最佳治疗。

[0056] 将通过下文的实施例对本发明进行更好的说明,但不应将其解释为是对本发明的限制。

实施例

[0057] 实施例1: 鉴定三个独立群体中的VTFThBPIFB4蛋白

[0058] 最近发表之对南部意大利百岁老人 (Southern Italian Centenarian, SIC) 进行的全基因组关联研究 (Genome Wide Association Study, GWAS) 已鉴定出若干与长寿个体有关的遗传变体 (Malovini等, Rejuvenation Research 2011; 第14(3)卷, 第283-291页)。

[0059] 为了证实该研究中所报道的前4种改变 ($p < 1 \times 10^{-4}$) , 在招募来进行德国人百岁研究 (German Centenary Study) (Keidorp等; Aging Cell 2011; 第10卷, 第622-8页) 的第一重复同龄组 (replication cohort) 中进行了重复尝试, 所述第一重复同龄组包含1447个长寿个体 (LLI) (年龄范围为95岁至110岁, 平均年龄98.8岁) 和1029个较年轻的对照 (年龄范围为60岁至75岁, 并且平均年龄为66.8岁)。结果, 通过Taqman分析已测试到两个非同义的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) rs2070325和rs571391以及两个内含子标记rs7583529和rs285097, 所述两个内含子标记是功能变体rs7917和rs1695501的标签。

[0060] 详细地, 从所述个体的外周血提取DNA (QIAamp DNA血液抽提试剂盒, Qiagen) 并在 ABI 7900HT 实时PCR (Applied Biosystems) 上用探针进行基因型分析。对于筛选, 使用以下探针:

[0061] 针对rs2070325的hCV25757827;

[0062] 针对rs571391的hCV958887;

[0063] 针对rs7583529的hCV28993331; 和

[0064] 针对rs285097的hCV3073023。

[0065] 用序列检测系统 (Sequence Detection Systems) (Applied Biosystems) 来进行数据分析。

[0066] 用于对由全基因组扫描获得的数据进行分析的统计方法和运算在Malovini A等, Rejuvenation Res 2011, 第14卷, 第283-91页中进行了描述。

[0067] 在所测试的4个变体中, 在该组的LLI ($OR = 1.42, 95\% CI = 1.12 - 1.80, p = 5.3 \times 10^{-3}$, Bonferroni校准的 $p = 0.021$) 中, 仅产生BPIFB4中Ile229Val氨基酸改变的rs2070325重复在隐性遗传模型下与SIC群中所观察到的关联 ($OR = 2.42, 95\% CI = 1.56 - 3.77, p = 5.98 \times 10^{-5}$)。

[0068] 然后, 如上文所述, 通过Taqman分析测试第二组中该变体的关联, 所述第二组代表由基于美国收集的1461个LLI (年龄范围为91岁至119岁, 平均年龄100.8岁) 和526个对照 (年龄范围为0岁至35岁, 平均年龄28.2岁)。逻辑回归在该第二重复组中也证实了上述SNP的关联 ($OR: 1.62, 95\% CI = 1.15 - 2.27, p = 3.7 \times 10^{-3}$)。

[0069] 通过在R中执行的“元”程序包对关联结果进行元分析 (<http://cran.r-project.org/web/packages/meta/index.html>)。通过SNPNexus在线资源对鉴定的SNP进行位置和功能注释()。

[0070] 来自元分析的结果将由在德国人和美国人重复组中对该标记进行评价获得的关联统计数据合并, 其揭示在这两个群体中估计的OR之间不存在统计学上显著的异质性 (Q-统计量, $p > 0.05$; 异质性指数, $I^2 = 0\%$)。根据这些观察结果, 将关联统计数据合并, 呈现固定的效应模型 ($OR = 1.49, 95\% CI = 1.22 - 1.81, p < 1 \times 10^{-4}$)。

[0071] 实施例2:对BPIFB4基因座进行单元型分析

[0072] 单元型分析揭示BPIFB4基因组位点中存在强连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)模式,其限定高度富含非同义SNP的区域(补充附录中的图S1)。BPIFB4的rs2070325变异(Ile229Val)加标签于rs2889732(Asn288Thr)、rs11699009(Leu488Phe)和rs11696307(Ile494Thr)。

[0073] 通过同源建模用I-TASSER程序(REF:Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang. I-TASSER:a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 第5卷, 725–738 (2010).)并使用来自PDB的蛋白质BPI(代码1EWF)作为模板来预测人BPIFB4的三维结构。在视觉结构分析中考虑所有的模型,所述视觉结构分析用程序PyMOL版本1.2r3pre, **Schrödinger**, LLC (Molecular Graphics System)来进行。上述分析揭示Ile268Val和Asn320Thr两者均位于推定的蛋白质-蛋白质相互作用位点。为了评价这些变异的作用,我们通过同源建模对野生型(WT)和突变(Ile229Val、Asn281Thr、Leu488Phe、Ile494Thr)BPIFB4蛋白的结构进行了预测。BPIFB4在结构上与BPI和CETP非常类似,它们的实验结构是可获得的并且由于它们的结构相似性,我们认为预期以下是合理的:BPIFB4在与另外两种蛋白质类似的区域中结合脂多糖。我们的结构分析揭示Leu488Phe位于脂质结合袋中,预测其尺寸是因为突变而减小。Ile494Thr突变位于第二脂质结合袋中,其中替换降低了其疏水性。在两种情况下,突变可导致结合脂质的能力下降。

[0074] 相比之下,Ile229Val和Asn281Thr位于远离结构同源蛋白的脂质结合位点的位置,因为他们可能影响诸如与其他蛋白质的相互作用的功能,而非脂质结合。

[0075] 实施例3:离体血管对INFT hBPIFB4和VTFT hBPIFB4的反应性

[0076] 为了确定所鉴定的特定BPIFB4变体对血管功能的作用,我们研究了用编码VTFT hBPIFB4或与VTFT hBPIFB4的不同之处在于他们对4个相关氨基酸表现出多种替换之蛋白质的pRK5载体离体转染小鼠肠系膜血管的影响,所述蛋白质为:具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的INFT hBPIFB4,其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含分别在229位和281位的异亮氨酸和天冬酰胺;具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VNFT hBPIFB4,其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含281位的天冬酰胺;具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的ITFT hBPIFB4,其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含229位的异亮氨酸;具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VTLI hBPIFB4,其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含448位的亮氨酸和494位的异亮氨酸;以及具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VTLI hBPIFB4,其与VTFT hBPIFB4的不同之处在于其包含229位的异亮氨酸、281位的天冬酰胺、488位的亮氨酸和494位的异亮氨酸。所使用的pRK5载体的序列报道于图1中(a, 编码wtBPIFB4和GFP之载体的序列;以及b, 编码VTFT hBPIFB4和GFP之载体的序列)。

[0077] 如先前所述对C57BL6小鼠之肠系膜动脉树的二级分支进行转染(Vecchione C等, *J Exp Med* 2005; 第201卷, 第1217–28页)。

[0078] 简言之,将血管(n=7)放置于填充有Krebs溶液的Mulvany压力系统中,所述溶液添加有20μg编码INFT或VTFT hBPIFB4的pRK5载体。使用空质粒作为阴性对照。将血管在100mmHg下灌注1小时,随后在60mmHg下灌注5小时。

[0079] 通过绿色荧光蛋白(GFP)之共表达的存在(图2)和Western印迹来评价转染效率。

[0080] 详细地,对来自经转染之灌注血管的蛋白质提取物进行Western印迹分析(每种载体,n=7)。将蛋白质提取物在10%SDS-PAGE上在100V下分离1小时或者在4%至12%SDS-PAGE上在100V下分离2小时,并随后转移至硝化纤维膜或PVDF膜。将所述膜与以下的一抗一起孵育过夜:抗-磷酸化-Ser1177eNOS(Cell Signaling,兔mAb,1:1000)、抗-BPIFB4(Abcam,兔多克隆Ab,1:200)和抗-β-肌动蛋白(Cell Signaling,小鼠mAb,1:3000)。将所述膜洗涤三次,并随后与以1:3000稀释的二抗(辣根过氧化物酶抗-兔IgG或抗-小鼠IgG,Amersham Life Science)孵育1或2小时。然后,将所述膜洗涤4次并用ECL Prime化学发光剂(Amersham Life Science)检测特定的蛋白质条带。将Western印迹数据用ImageJ软件(由Wayne Rasband,National Institutes of Health,USA开发)进行分析以确定这些条带的光密度(optical density,OD)。考虑到上样中的变化,将OD读数相对于β-肌动蛋白进行标准化。

[0081] 如图3中所示,在经编码INFT hBPIFB4或VTFT hBPIFB4的质粒灌注后在血管中检测到丰富的BPIFB4蛋白,其中野生型和VTFT hBPIFB4两者以相当的量表达。相比之下,暴露于空质粒的血管表达低水平的天然BPIFB4蛋白。

[0082] 另外,表达VTFT hBPIFB4而非INFT hBPIFB4的血管表现出对eNOS之1177位丝氨酸(酶的活化位点)上的磷酸化的一连串诱导。

[0083] 用KC1(80mM)和递增剂量的去氧肾上腺素(10^{-9} M至 10^{-6} M)来评估血管收缩,按照在施用药物后腔直径的百分数改变。在转染前后测试血管响应。如下评估内皮依赖性舒张和内皮独立性舒张:测量在经以一定剂量之去氧肾上腺素预收缩的血管中肠系膜动脉分别对累积浓度的乙酰胆碱(10^{-9} M至 10^{-5} M)和硝酸甘油(10^{-9} M至 10^{-5} M)的扩张响应,所述剂量是在每一环中获得类似的预收缩水平所必需的(初始KC1诱导之收缩的80%)。将由去氧肾上腺素引起的最大收缩视为用于后续引起的血管舒张的基线。注意避免内皮损伤:功能的整体性通过对乙酰胆碱(10^{-6} M)的响应反映。

[0084] 过量表达INFT hBPIFB4几乎消除在暴露于质粒之前引起的KC1-和去氧肾上腺素-诱导的血管收缩(图5a)。显著血管收缩的缺乏阻碍对血管舒张进行后续评价。相比之下,VTFT hBPIFB4的表达部分补救了由INFT hBPIFB4施加的对KC1-和去氧肾上腺素-诱导之血管收缩的抑制作用:事实上,当与在灌注之前所观察的那些相比时,由激动剂引起的血管响应有所下降,但并未消除(图6a至6b)。另外,当VTFT hBPIFB4表达时,与在转染之前所观察到的相比,乙酰胆碱诱导的血管扩张显著增强(图6c),但硝酸甘油引起的平滑肌舒张却未变化(数据未示出),这表明这种作用是由内皮功能增强引起的。用VNFT hBPIFB4、ITFT hBPIFB4、VTLI hBPIFB4和INLI hBPIFB4没有观察到对血管功能的影响。

[0085] 我们检测了eNOS抑制剂L-NAME对经空载体(图7,图a, EV)或VTFT hBPIFB4编码质粒(图8,图a, VTFT)转染之血管的影响。如所预期的,在经空质粒灌注的血管中,L-NAME钝化乙酰胆碱的血管扩张作用,并且这种作用在表达VTFT hBPIFB4的血管中更明显,这表明在后一种情况下存在更多的NO。

[0086] 实施例4:VTFT hBPIFB4对血管疾病之体内模型的影响归因于NO释放受损

[0087] 还在来自杂合mthfr小鼠的肠系膜血管及其对照上进行上述实验,如Lemarie CA等,Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;第300卷:H745-53中所述。Mthfr+/-小鼠表现出eNOS的功能障碍,其与长寿因子surtuin 1的下调有关。因此,我们探索了VTFT

hBPIFB4对这些小鼠的肠系膜血管的影响。如所预期的，在暴露于EV之后，与Mthfr^{+/+}同窝出生小鼠相比，在Mthfr⁺⁻小鼠中乙酰胆碱诱导的血管舒张显著降低(图7,图b)，但在硝酸甘油引起的血管响应中未观察到变化(数据未示出)。在暴露于编码的VTFT hBPIFB4质粒Mthfr⁺⁻-VTFT之后，Mthfr⁺⁻血管的内皮舒张得到显著改善，变得与在Mthfr^{+/+}血管中所观察到的相当(图8b)。这表明VTFT hBPIFB4在抵抗血管功能障碍方面具有强治疗作用(图8,图b)。

[0088] 实施例5:评价Hek293T细胞中通过BPIFB4的eNOS调节

[0089] 将人胚肾细胞(HEK293T)在37℃下在5%CO₂气氛中维持在补充有10%(v/v)胎牛血清和1%非必需氨基酸的Dulbecco改良的Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)中。将细胞以 0.25×10^6 /孔接种到6孔板中，并在接种后24小时用10μl Lipofectamine2000(LifeTechnologie)和4μg质粒转染。24小时后，将细胞血清饥饿24小时。在血清饥饿期间，将经转染的细胞用400μM H₂O₂处理24小时。通过用TRIzol(Ambion)从细胞中提取总RNA来检测BPIFB4的转录、逆转录(iScript BioRad)。用针对BPIFB4(正向：CTCTCCCCAAAATCCTCAACA, 反向：AGCCTCTCTGGGACTGGTTC)和GAPDH(正向：GTGAAGGTCGGAGTCAACG, 反向：GGTGGAAATCATATTGGAACATG)的特异性引物来扩增cDNA。

[0090] 当暴露于H₂O₂时，HEK293T细胞中可诱导BPIFB4转录；这证明BPIFB4在胁迫响应中的作用(图9,图a)。因此，我们探索了BPIFB4如何影响eNOS之1177位丝氨酸上的胁迫介导的磷酸化。

[0091] 将人胚肾细胞(HEK293T)在37℃下在5%CO₂气氛中维持在补充有10%(v/v)胎牛血清和1%非必需氨基酸的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中。将细胞以 0.25×10^6 /孔接种到6孔板中，并在接种后24小时用10μl Lipofectamine 2000(LifeTechnologie)和4μg质粒转染。24小时后，将细胞血清饥饿24小时。在血清饥饿期间，将经转染的细胞用400μM H₂O₂处理24小时。将蛋白质提取物在10%SDS-PAGE上在100V下分离1小时或者在4%至12% SDS-PAGE上在100V下分离2小时，并随后转移至硝化纤维膜或PVDF膜。将所述膜与以下一抗一起孵育过夜：抗-磷酸化-eNOS Ser1177(细胞信号传导，兔mAb,1:1000)和抗-β-肌动蛋白(Cell Signaling, 小鼠mAb,1:3000)。将所述膜洗涤三次，并随后与二抗(Amersham Life Science辣根过氧化物酶连接的抗-兔IgG或抗-小鼠IgG,1:3000)一起孵育1小时或2小时。然后，将所述膜洗涤4次并用ECL Prime化学发光剂(Amersham Life Science)检测特定的蛋白质条带。将Western印迹数据用ImageJ软件(由Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA开发)进行分析以确定这些条带的光密度(OD)。考虑到上样中的变化，将OD读数相对于β-肌动蛋白进行归一化。

[0092] 如图9的图b和c中所示，当暴露于H₂O₂时，与过量表达INFT hBPIFB4的细胞相比，在表达VTFT hBPIFB4的HEK293T细胞中eNOS变得更加活化。该结果证实离体灌注血管所得到eNOS活化。

序列表

<110> Vecchione, Carmine
Puca, Annibale Alessandro

<120> BPIFB4蛋白的变体

<130> PucaEP1EP

<160> 7

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 575

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
1 5 10 15

Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
20 25 30

[0001] Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
35 40 45

Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
65 70 75 80

Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly
85 90 95

Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu
100 105 110

Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
115 120 125

Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile
130 135 140

Leu Ala Gly Gln Gly Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly Asp
145 150 155 160

Gly Gly Leu Leu Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
165 170 175

Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
180 185 190

Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
210 215 220

Gly Phe Leu Asp Val Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg

225	230	235	240
Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys			
245	250	255	
Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu			
260	265	270	
Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Thr Arg Val Leu Ala Asp Val Leu			
275	280	285	
Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn			
290	295	300	
Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly			
305	310	315	320
Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe			
325	330	335	
Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Leu			
340	345	350	
Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro			
355	360	365	
Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser			
370	375	380	
Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala			
385	390	395	400
Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu			
405	410	415	
Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr			
420	425	430	
[0002] Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro			
435	440	445	
Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr			
450	455	460	
Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys			
465	470	475	480
Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly			
485	490	495	
Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu			
500	505	510	
Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu			
515	520	525	
Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val			
530	535	540	
Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser			
545	550	555	560
Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala			
565	570	575	

<210> 2
<211> 1728
<212> DNA
<213> 智人

<220>

<221> 来源
<222> 1..1728
<223> /生物=“智人”
/mol-类型=“未指定DNA”

<400> 2	
atgctgcagc aaagtatgc tctccactcg gccctgagag aggtgccctt ggggttttgtt	60
gatattccct acaatgactt ccatgtccga ggacccccc cagtatatac caacggcaaa	120
aaacttgatg gtatttacca gtatggtcac attgagacca acgacaacac tgctcagctg	180
gggggcaaat accgatatgg tgagatcctt gagtccgagg gaagcatcag ggacctccga	240
aacagtggct atcgcagtgc cgagaatgca tatggaggcc acaggggcct cgggcgatac	300
agggcagcac ctgtggcag gcttcaccgg cgagagctgc agcctggaga aatcccacct	360
ggagttgcca ctggggcggt gggcccaggt ggttgctgg gcactggagg catgctggca	420
gtgtatggca tcttcgcagg ccaaggtggc ctgctcggcg gaggtggctt cttgggtat	480
ggaggacttc ttggaggagg ggggttcctg ggcgtgctcg gcgagggtgg catcctcagc	540
[0003] actgtgcaag gcatcacggg gctgcgtatc gtggagctga ccctccctcg ggtgtccgtg	600
cggctctgc ccggcgtggg tgtctacctg agcttgtaca cccgtgtggc catcaacggg	660
aagagtctta ttggcttcct ggacgtcgca gtagaagtga acatcacagc caagggtccgg	720
ctgaccatgg accgcacggg ttatcctcgg ctggcatttgc agcgatgtga caccctccta	780
gggggcatca aagtcaagct gctgcgaggg cttctccca atctcgtgga caatttagtg	840
acccgagtcc tggccgacgt cctccctgac ttgctctgcc ccattcgtgga tgtggtgctg	900
ggtcttgcata atgaccagct gggcctcggtt gattctctga ttccctctgg gatattggaa	960
agtgtccagt acaccccttc cagccctcccg cttgtgaccg gggaaattcct ggagctggac	1020
ctcaacacgc tgggtgggaa ggctggagga ggactcatcg actaccatt ggggtggcca	1080
gctgtgtctc ccaagccgat gccagagctg cctcccatgg gtgacaacac caagtccca	1140
ctggccatgt ctgccaactt cctggcgtca gtgctgactc tactgcagaa gcagcatgct	1200
ctagacctgg atatcaccaa tggcatgttt gaagagcttc ctccacttac cacagccaca	1260
ctggggagccc tggatccccaa ggtgttccag cagtaccccg agtccctgccc acttatcatc	1320

aggatccagg tgctgaaccc accatctgtg atgctgcaga aggacaaagc gctggtaag	1380
gtgttggcca ctgccgaggt catggctcc cagccaaag acctggagac taccatctgc	1440
ctcattgacg tggacacaga attttggcc tcatttcca cagaaggaga taagctcatg	1500
attgatgccca agctggagaa gaccagcctc aacctcagaa cctcaaacgt gggcaacttt	1560
gatattggcc tcatggaggt gctggtag aagatttttgc acctggcatt catgccccca	1620
atgaacgctg tgctgggccc tggcgccct ctccccaaa tcctcaacat cgacttttagc	1680
aatgcagaca ttgacgtgtt ggaggacatt ttggtgctga gcgcatga	1728
<210> 3	
<211> 575	
<212> PRT	
<213> 智人	

[0004]

<400> 3	
Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro	
1 5 10 15	
Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro	
20 25 30	
Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr	
35 40 45	
Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr	
50 55 60	
Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg	
65 70 75 80	
Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly	
85 90 95	
Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu	
100 105 110	
Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly	
115 120 125	
Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile	
130 135 140	
Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp	
145 150 155 160	
Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly	
165 170 175	
Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu	
180 185 190	
Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val	
195 200 205	
Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile	
210 215 220	

Gly Phe Leu Asp Ile Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 260 265 270
 Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Asn Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285
 Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300
 Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335
 Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Leu
 340 345 350
 Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365
 Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser
 370 375 380
 Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu
 405 410 415
[0005] Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr
 420 425 430
 Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 435 440 445
 Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr
 450 455 460
 Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys
 465 470 475 480
 Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly
 485 490 495
 Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu
 500 505 510
 Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
 530 535 540
 Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
 545 550 555 560
 Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
 565 570 575

<210> 4

<211> 575

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
 1 5 10 15

Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
 20 25 30

Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
 35 40 45

Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr
 50 55 60

Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80

Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly
 85 90 95

Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu
 100 105 110

Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
 115 120 125

Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 130 135 140

Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
 165 170 175

Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
 [0006] 180 185 190

Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
 195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
 210 215 220

Gly Phe Leu Asp Val Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240

Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255

Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 260 265 270

Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Asn Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285

Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300

Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320

Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335

Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Leu
 340 345 350

Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365

Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser
 370 375 380

Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu
 405 410 415
 Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr
 420 425 430
 Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 435 440 445
 Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr
 450 455 460
 Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys
 465 470 475 480
 Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly
 485 490 495
 Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu
 500 505 510
 Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
 530 535 540
 Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
 545 550 555 560
 Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
 565 570 575

[0007]

<210> 5
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
 35 40 45
 Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr
 50 55 60
 Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly
 85 90 95
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu
 100 105 110
 Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
 115 120 125
 Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 130 135 140

Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
 165 170 175
 Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
 180 185 190
 Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
 210 215 220
 Gly Phe Leu Asp Ile Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 260 265 270
 Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Thr Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285
 Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300
 Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335
 Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Leu
 [0008] 340 345 350
 Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365
 Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser
 370 375 380
 Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu
 405 410 415
 Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr
 420 425 430
 Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 435 440 445
 Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr
 450 455 460
 Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys
 465 470 475 480
 Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly
 485 490 495
 Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu
 500 505 510
 Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
 530 535 540

Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
 545 550 555 560
 Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
 565 570 575

 <210> 6
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 6
 Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
 35 40 45
 Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Lys Tyr
 50 55 60
 Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly His Arg Gly
 85 90 95
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu
 [0009] 100 105 110
 Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
 115 120 125
 Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 130 135 140
 Leu Ala Gly Gln Gly Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
 165 170 175
 Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
 180 185 190
 Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
 210 215 220
 Gly Phe Leu Asp Val Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 260 265 270
 Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Thr Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285
 Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300

Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335
 Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Leu
 340 345 350
 Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365
 Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser
 370 375 380
 Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu
 405 410 415
 Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr
 420 425 430
 Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 435 440 445
 Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr
 450 455 460
 Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys
 465 470 475 480
 Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Leu Leu Ala Ser Phe Ser Ile Glu Gly
 485 490 495
 Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu
 [0010] 500 505 510
 Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
 530 535 540
 Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
 545 550 555 560
 Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
 565 570 575

 <210> 7
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 7
 Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
 35 40 45
 Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr
 50 55 60

Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly
 85 90 95
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu
 100 105 110
 Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
 115 120 125
 Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 130 135 140
 Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
 165 170 175
 Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
 180 185 190
 Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
 210 215 220
 Gly Phe Leu Asp Ile Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 [0011] 260 265 270
 Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Asn Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285
 Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300
 Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335
 Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Leu
 340 345 350
 Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365
 Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser
 370 375 380
 Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Gln Lys Gln His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu
 405 410 415
 Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Pro Lys Val Phe Gln Gln Tyr
 420 425 430
 Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 435 440 445
 Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr
 450 455 460

Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys
465 470 475 480
Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Leu Leu Ala Ser Phe Ser Ile Glu Gly
485 490 495
Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu
500 505 510
Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
[0012] 515 520 525
Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
530 535 540
Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
545 550 555 560
Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
565 570 575

ttcgagctgccccacattgattattgactagtattata
gtaatcaattacggggcattagttcatagcccatatatgg
agttccgcgttacataactacggtaatggccgcctggc
tgaccgcccacgaccggccattgacgtcaataatgac
gtatgttcccatagtaacgccaataggactttccattgac
gtcaatgggtggagttacggtaactgcccactggca
gtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattga
cgtcaatgacggtaatggccgcctggcattatgcccagt
acatgacccattatggactttcctacttggcagtacatctac
gtattagtcatcgctattaccatggatgcgggtttggca
gtacatcaatggcgtggatagcggtttgactcacggggat
ttccaagtctccacccattgacgtcaatggagttgtt
tggcacaaaaatcaacggactttccaaaatgtcgtaacaa
ctccgccccattgacgcaaattggcggtaggcgtgtacgg
gggaggtctatataagcagagctcggttagtgaaccgtcag
atcgccctggagacgccatccacgctgtttgacccatag
aagacaccgggaccgatccagcctccgcggccggAACGGT
gcatttggAACGCGGATTCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGT
ACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCGTT
AGAACGCGGCTACAATTACATAACCTTATGTATCATAAC
ACATACGATTAGGTGACACTATAGAATAACATCCACTTTG
CCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAC TGCA
CTCGGTTCTAAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACTCTAGAGG
ATCCCCGCCACCATGCTGCAGCAAAGTGATGCTCTCCACTC
GGCCCTGAGAGAGGTGCCCTGGTGTGGTGAATTCCCT
ACAATGACTTCCATGTCCGAGGACCCCCCCCAGTATAACC
AACGGCAAAAAACTTGATGGTATTACCAAGTATGGTCACAT
TGAGACCAACGACAACACTGCTCAGCTGGGGGCAAATACC
GATATGGTGAAGATCCTTGAGTCCGAGGGAAGCATCAGGGAC

图1

ctccgaaacagtggatatcgcagtgccgagaatgcataatgg
aggcacagggcctcgccgatacaggcagcacctgtgg
gcaggcttcaccggcgagagctgcagcctggagaaatccca
cctggagttgccactggggcggtggccaggtgggttgct
ggcactggaggcatgctggcagctgatggcatcctcgcag
gccaagggtggcctgctcggcggaggtggtctcctgggtgat
ggaggacttcttgaggagggggtgtcctggcgtgctcgg
cgagggtggcatcctcagcactgtgcaaggcatcacggggc
tgcgtatcgtggagctgaccctccctcgggtgtccgtgcgg
ctcctgcccggcgtgggtgtctacctgagcttgtacacccg
tgtggccatcaacgggaagagtcttattggcttcctggaca**a**
/gtcgcagttagaagtgaacatcacagccaagggtccggctga
ccatggaccgcacgggttatcctcggtggcattgagcga
tgtgacaccctccatggggcatcaaagtcaagctgctgcg
aggcttctcccaatctcggtggacaatttagtga**a/c**ccg
agtccctggccgacgtccctccctgacttgctctgccccatcg
tggatgtgggtgtgggtttgtcaatgaccagctggcctc
gtggattctctgattcctctgggatattggaaagtgtcca
gtacacccctccagcctcccgcttgcgtgaccggggattcc
tggagctggacctaacaacgcgtgggtggggaggctggagga
ggactcatcgactaccattgggtggccagctgtgtctcc
caagccgatgccagagctgcctccatgggtgacaacacca
agtcccagctggccatgtctgccaacttcctggctcagtg
ctgactctactgcagaagcagcatgctctagacacctggat
caccaatggcatgtttgaagagcttcctccacttaccacag
ccacactggagccctgatccccaaagggtttccagcagta
cccgagtcctgcccacttatcatcaggatccaggtgctgaa
cccaccatctgtgatgctgcagaaggacaaggcgctggta
aggtgttggccactgccgaggtcatggctccagccaaa

图1(续)

gacctggagactaccatctgcctcattgacgtggacacaga
attcttggcctcatttccacagaaggagataagctcatga
ttgatgccaagctggagaagaccgcctcaacctcagaacc
tcaaacgtggcaactttgatattggcctcatggaggtgct
ggtggagaagattttgaccttgcattcatgcccgaatga
acgctgtgcttggttcttggcgtccctctccccaatctc
aacatcgactttgtagcaatgcagacattgacgtgttggggg
ccttttggtgctgaggcgcacggtgaccgatgcccaccgatg
tggcaggggcggagggactgttcaccgggggtggtgcccatc
ctggtgcagctgggacggcgacgtaaacgggccacagttcag
cgtgtccgggcggagggcggatgcccacctgggcaagc
tggaccctgtagttcatgtcgacccaccgggcagctgcccgtg
cccttggccacccctgtggacccacccctgaccctgacggggtgca
gtgcttcaggccgctacccccggaccacatgaagcgacgacgact
tcttcaagtccgccatgcccagggctacgtccagggaggcgc
accatcttttcaagggacgacgggcaactacaagaccccgcg
cggagggtaagttcgagggcggacaccctggtgaaccggcatcg
agctgaaggggcatcgacttcaaggagggacggcaacatcctg
gggcacaagctgggattcaaactacaacagccacaacgtctta
tatcatggccgacaagcagaaacggcatcaagggtgaact
tcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcggtgcagctc
gccgaccactaccagcagaacacccccatcggcacggcc
cgtgctgctgccgacaaccactaccctgaggacccaggtccg
cccctgagcaagaccccaacgagaagcgcggatcacaatggttc
ctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcacttccggcat
ggaccgagctgttacaagtaagcgggccgcgacttctagaattc
aaatcgatggccgccatggcccaactttgttttattgcagctta
taatggtttacaaaataaagcaatgcatcacaaaatttcacaaa
ataaagcatttttcactgcatttcatgtgtggttgtcc

图1(续)

aaactcatcaatgttatcttatcatgtctggatcggaattt
attcggcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaagag
gaacttggttaggtaccttctgaggcgaaagaaccagctg
tggaatgtgttcagttagggtgtggaaagtccccaggctc
cccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattcaattagt
cagcaaccagggtgtggaaagtccccaggctccccaggc
agaagtatgcaaagcatgcattcaattagtcaaccat
agtccccccctaactccgcattccgccttaactccgc
ccagttccgcattctccgcattggctgactaatttt
tttatttatgcagaggccgaggccctcgcccttgagct
attccagaagttagtgaggaggcttttgaggcctaggct
tttgcaaaaagctgttaacagcttggcactggccgtcg
tacaacgtcgtgactggaaaaaccctggcgtaacc
aatcgccttgcagcacatcccccttcgcagctggcgta
tagcgaagaggcccgcaccgatgcgcctccaa
cagttgcgtgatggcgaatggcgcctgatgcgg
cttacgcattgtgcgttacaccgcata
caagctcaaag
caaccatagtagcgcgcctgttagcggcgcatta
gggtgtggtggttacgcgcagcgtgacc
gctacacttgcca
gcgccttagcgcgcgccttcgcatttt
ctcgccacgttgcgcgcatttccgtca
gggctccctttagggtccgatttagtgc
tcgacccaaaaacttgattgggtgatgg
ttcacgttagt
ggccatcgccctgatagacgg
tttcgcgcatttgc
ggagtccacgttcttaat
gaacaacactcaacc
tatctcg
ggctatttgc
gatttgc
gatgg
ttcaactg
gctgattt
taacgtt
acaattt
tatgg
tgcact
ctc
agtc
act
tgc

图1(续)

tctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaac
acccgctgacgcgcctgacgggcttgcgtctgctccggcat
ccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatt
tgtcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacg
aaaggcctcgatgcctattttataggttaatgtcat
tgataataatggttcttagacgtcaggtggactttcgg
ggaaatgtgcgcgaaacccctattgtttatttctaaat
acattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctgat
aatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatgatgagatt
caacattccgtgtcgcccttattcccttttgcggcatt
ttgccttcctgtttgctcacccagaaacgctggtaag
taaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggtac
atcgaactggatctcaacagcgtaagatcctgagagatt
tcgccccgaagaacgtttccaatgatgagactttaaag
ttctgctatgtggcgccgtattatccgtattgacgcgg
caagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatga
cttgggtgagtaactcaccagtcacagaaaagcatcttacgg
atggcatgacagtaagagaattatgcagtgcgtgccataacc
atgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgat
cgaggaccgaaggagctaaccgcttttgcacaacatgg
gggatcatgtaactcgccctgatcggtggaaaccggagctg
aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcc
tgttagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcg
aactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactgg
atggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcggc
ccttccggctggctggttattgctgataatctggagccg
gtgagcgtgggtctcgccgtatcattgcagcactggggcca
gatggtaagccctcccgatcgtagttatctacacgacggg
gagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctg

图1(续)

agataggtgcctcactgattaaggcattggtaactgtcagac
caagtttactcatataacttagattgattaaaacttca
ttttaattaaaaggatcttaggtgaagatccttttgata
atctcatgacccaaatccctaactgtgagtttcgttccac
tgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctg
agatccttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaa
aaaaaccaccgctaccagcggtggttgttgcggatcaa
gagctaccaactcttccgaaggtaactggcttcagcag
agcgcagataccaaatactgttcttagtgttagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgttagcaccgcctacatac
ctcgctctgctaattcctgttaccagtggctgtgccagtg
cgataagtctgtcttaccgggttggactcaagacgatagt
taccggataaggcgcagcggtcggctgaacgggggttcg
tgcacacagcccagcttggagcgaacgacacctacaccgaact
gagataacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttc
ccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagg
gtcggAACAGGGAGGAGCAGCGACGAGGGAGCTCCAGGGGAAA
cgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctct
gacttgagcgtcgattttgtatgctcgtcagggggcgg
agcctatggaaaaacgccagcaacgcggcttttacggtt
cctggcctttgctggcctttgctcacatgttcttcctg
cgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctt
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcg
cagcgagtcaagtgagcggagaaagcggaaagagcggccaaatac
gcaaaccgcctctcccgccgttggccgattattaatgc
agctggcacgacaggtttcccgactggaaagcggcagtg
gcgcaacgcaattaatgtgagtttagctcactcattaggcac
cccaggcttacacttatgcttccggctcgtatgttgt
ggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagcta
tgacatgattacgaat

图1(续)

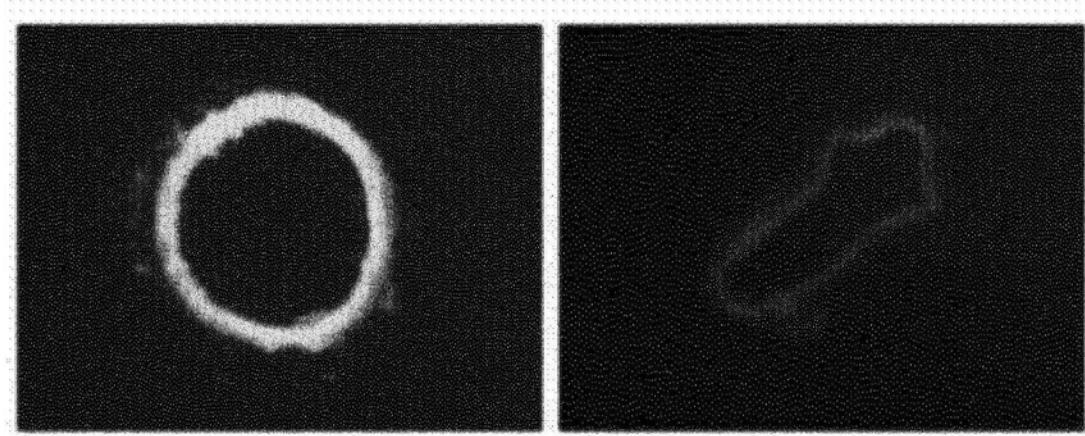


图2

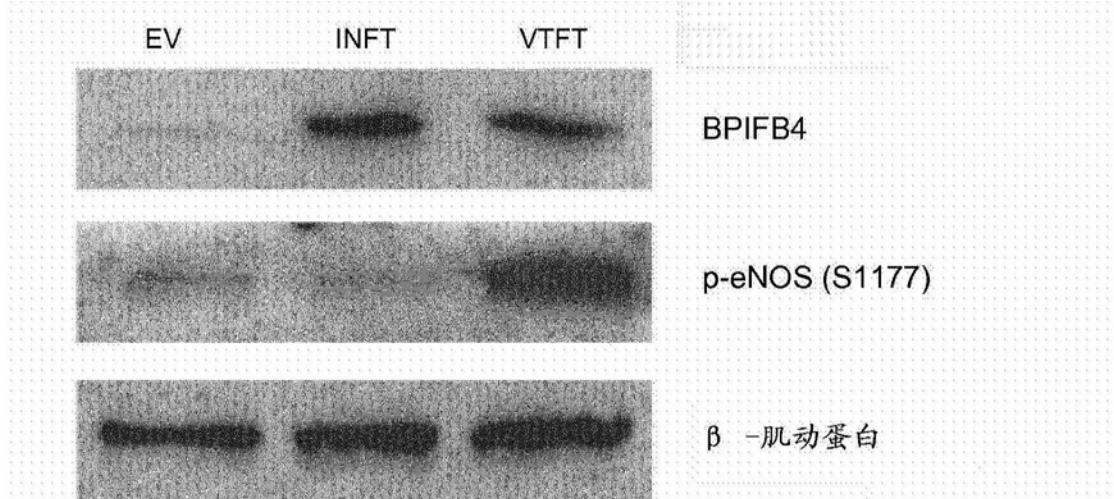


图 3a

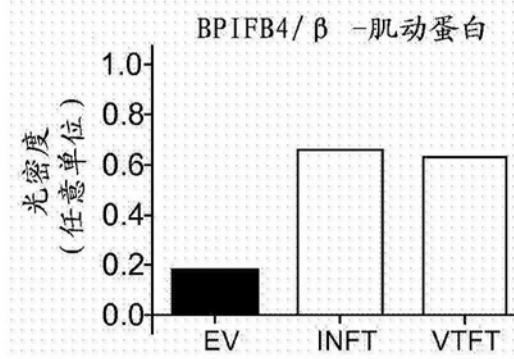


图 3b

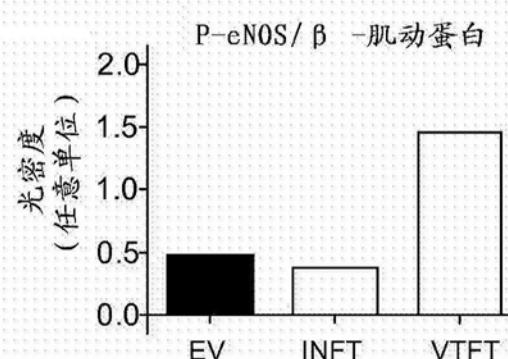


图 3c

图3

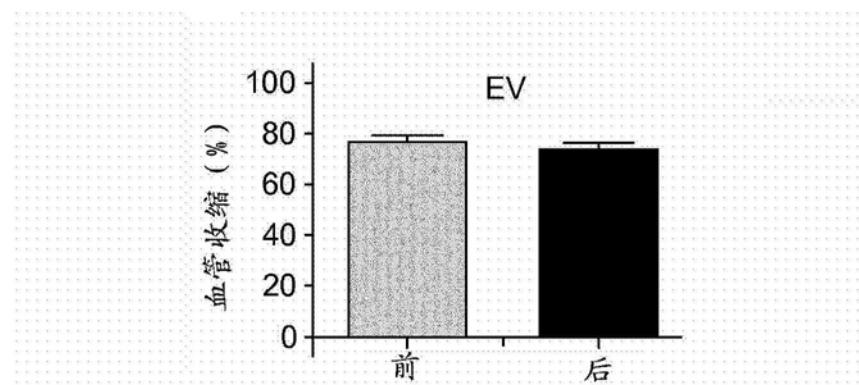


图 4a

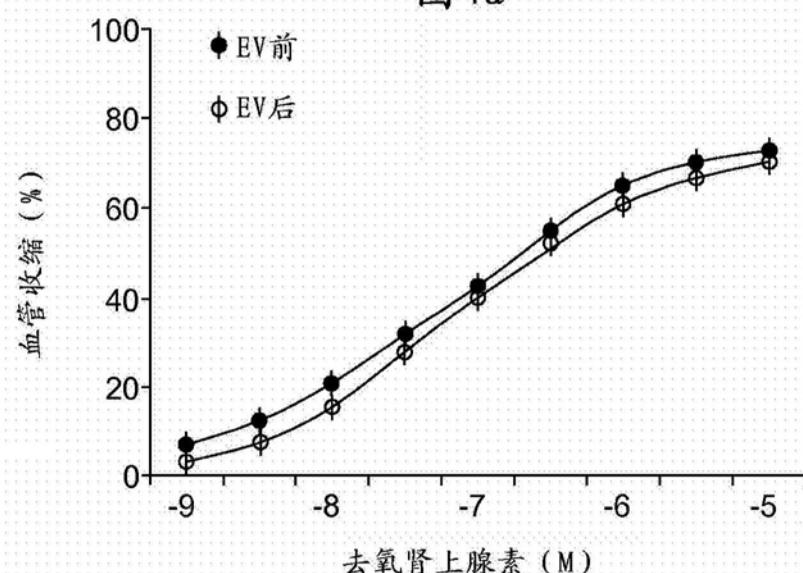


图 4b

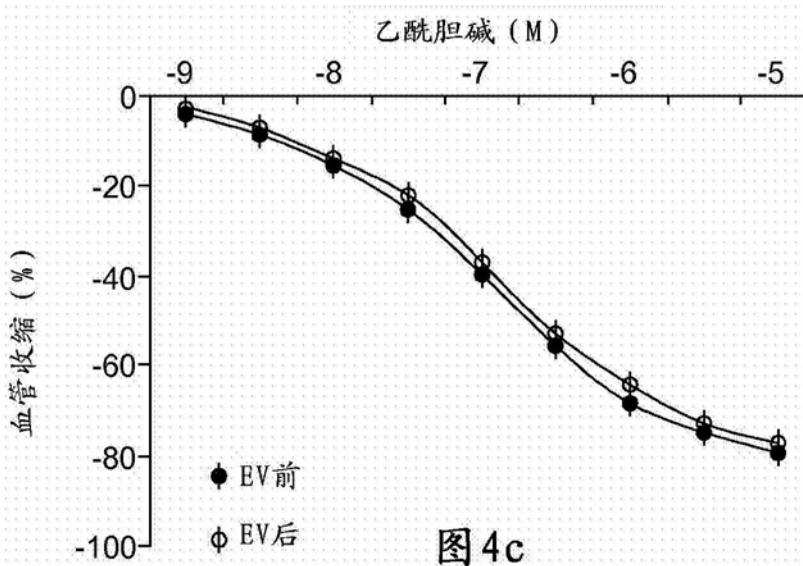


图 4c

图4

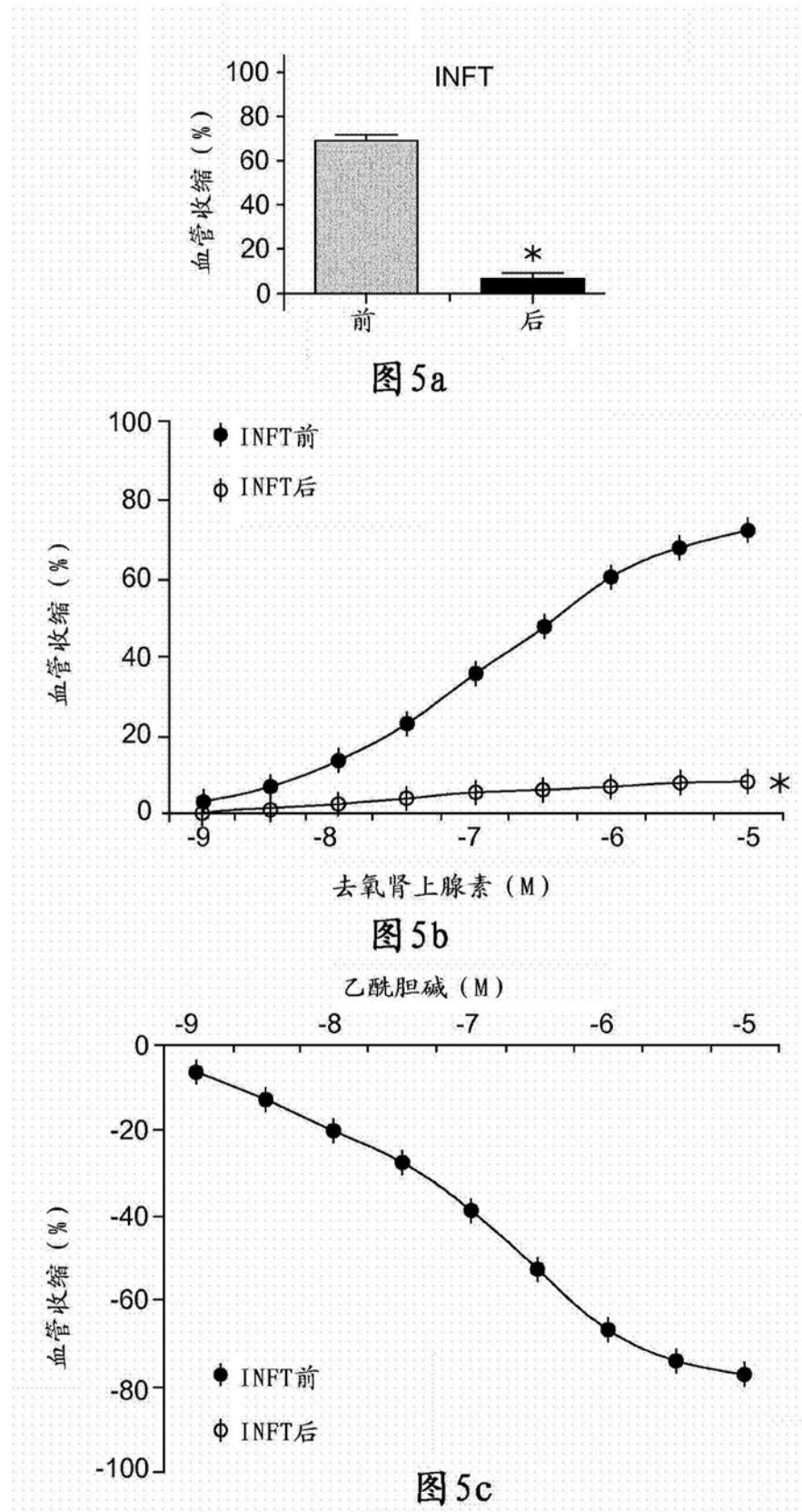


图5

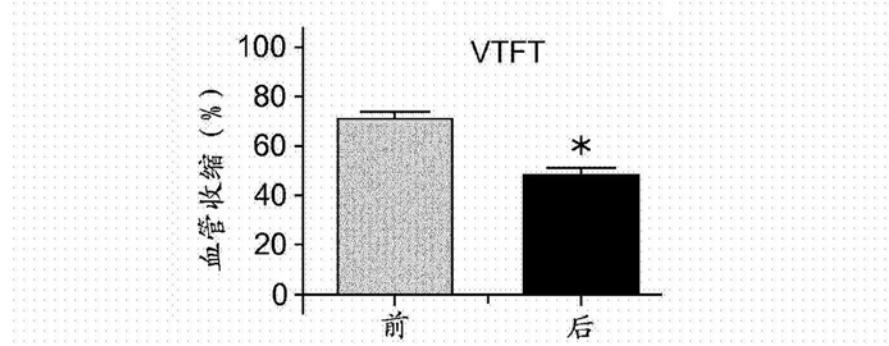


图 6a

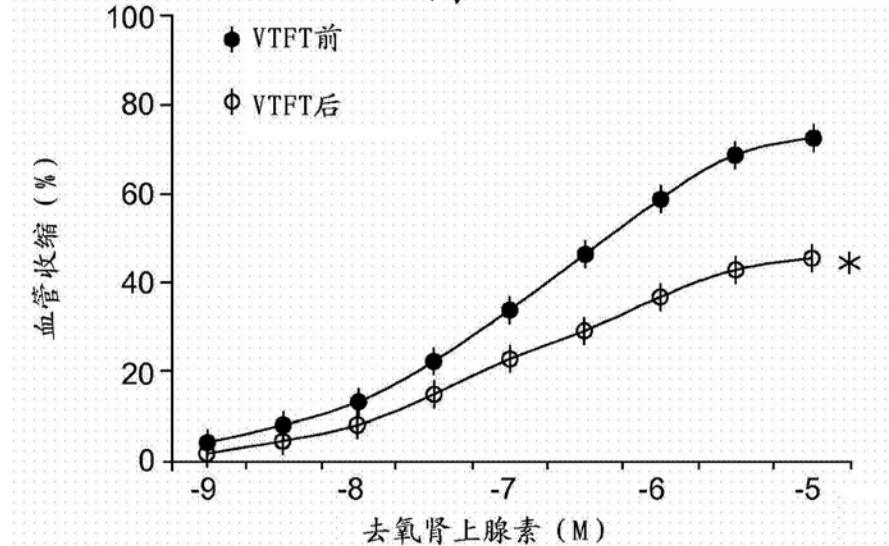


图 6b

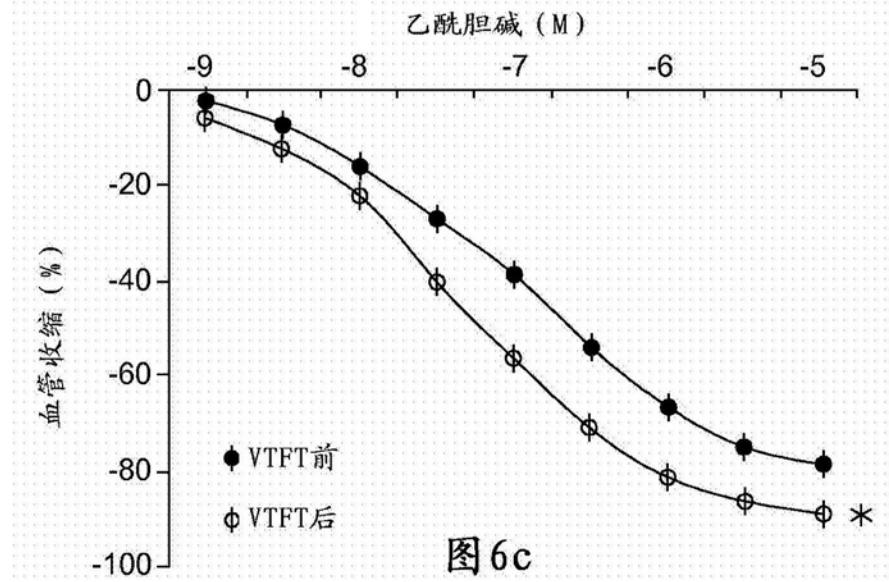


图 6c

图 6

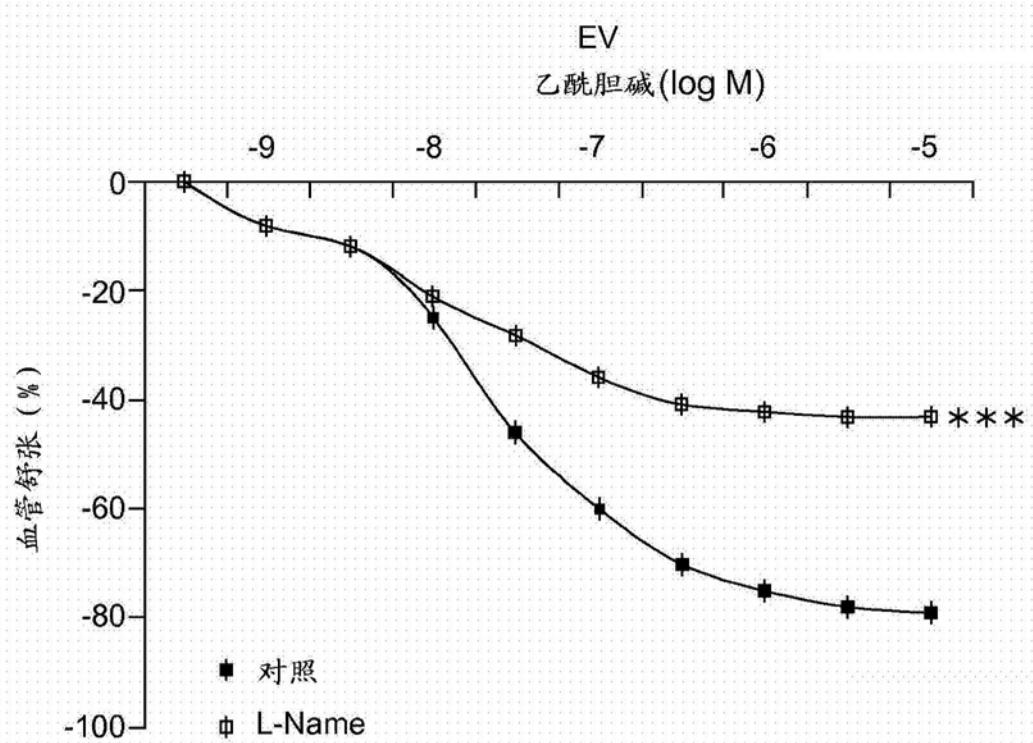


图 7a

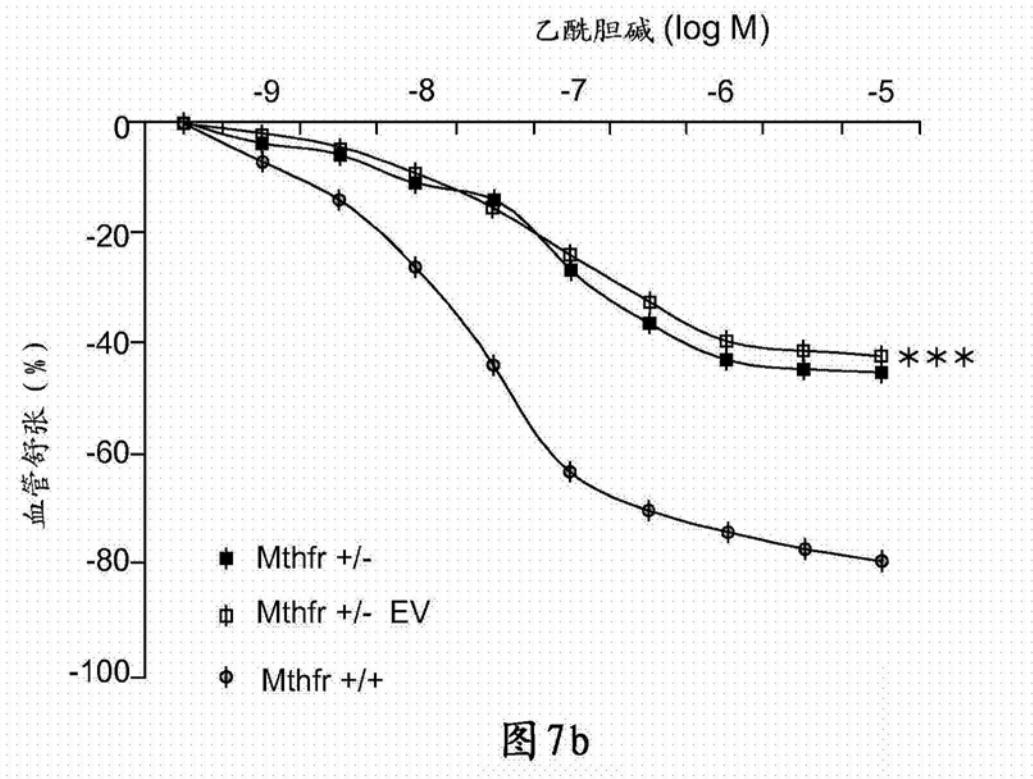


图 7b

图 7

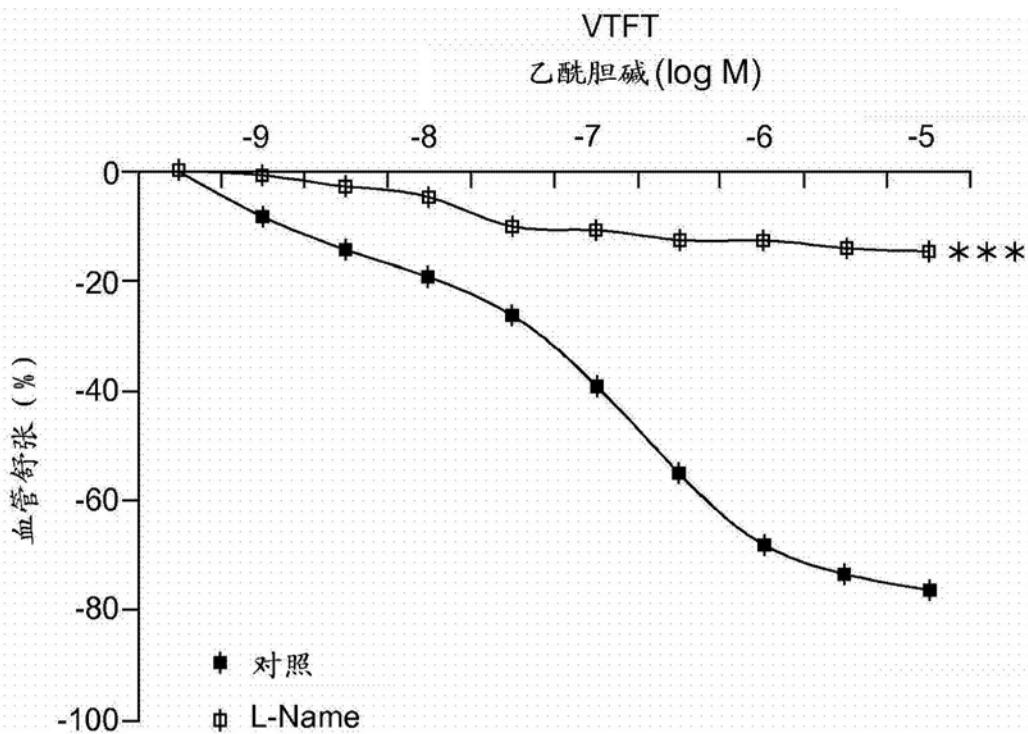


图 8a

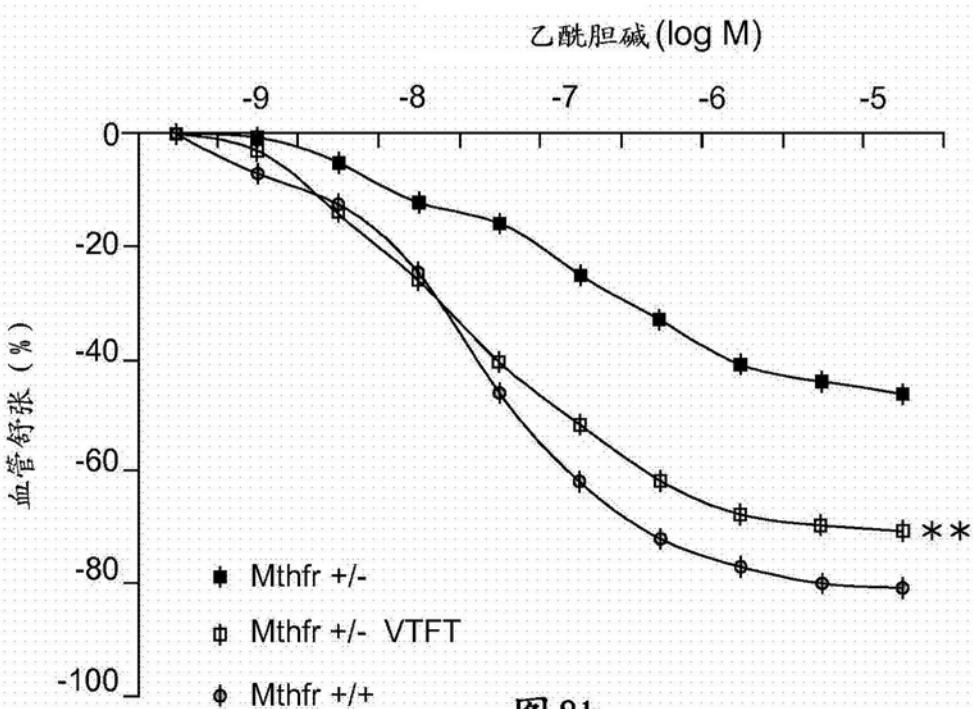


图 8b

图 8

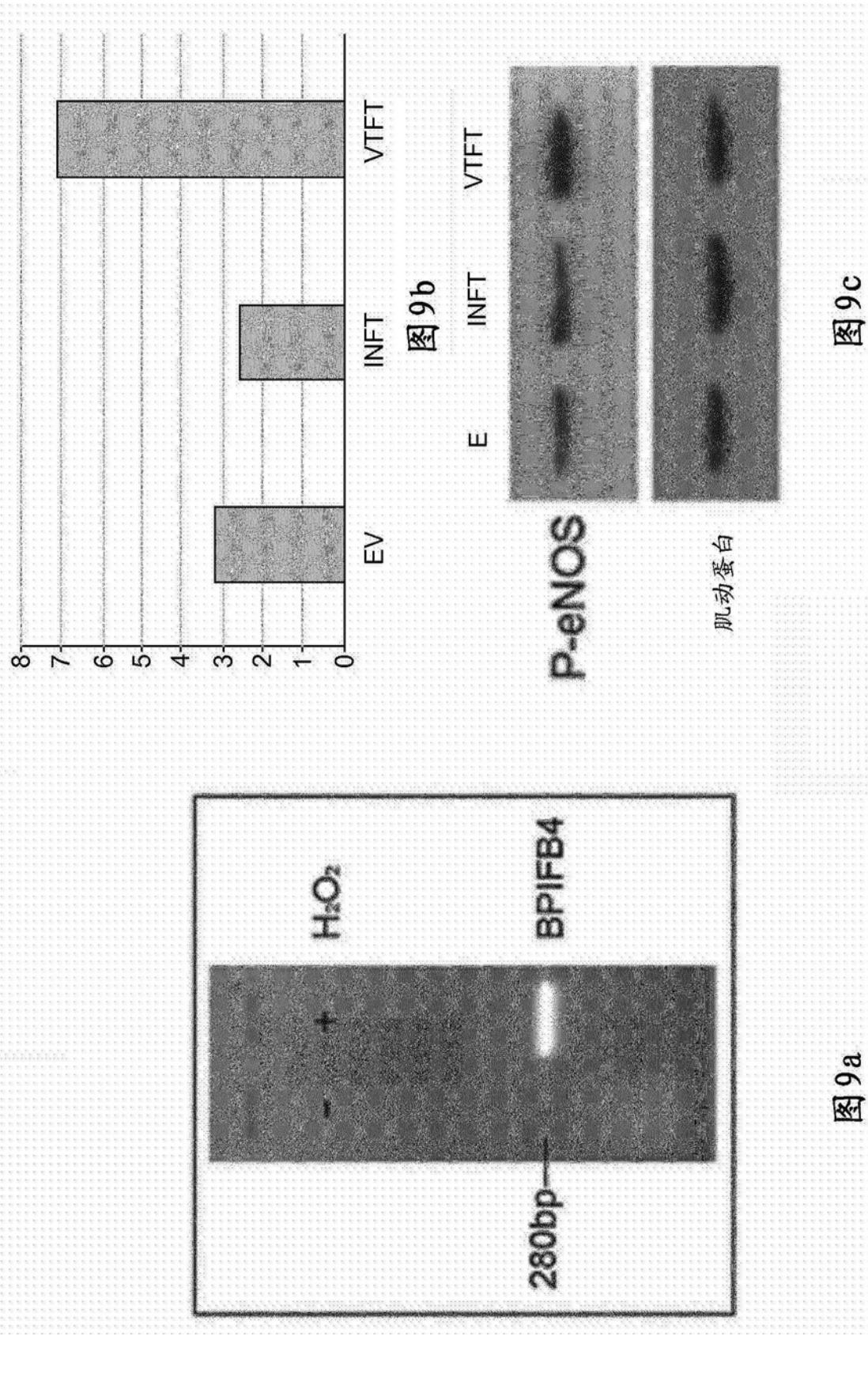


图9