



(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)

(56)对比文件

W0 2006022619 A2,2006.03.02,

CN 101631861 A,2010.01.20,

W0 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

(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。

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。

BPIFB4蛋白的变体

技术领域

[0001] 本发明涉及BPIFB4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BPIFB4(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BPIFB4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)、炎症疾病(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] NO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/NO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 (Shariff 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BPFIB4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NO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、炎症性疾病、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(acetylcholine)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,对应于较长的同工型)、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,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(Asparagin);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、炎症性疾病、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VTFTbBPIFB4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KCl (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HC1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KCl-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KCl-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sirtuin 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:GGTGAATCATATTGGAACATG)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

[0001]

```

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 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

```

[0002]

```

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 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

```

<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 aaagtgatgc tctccactcg gccctgagag aggtgccctt ggggtgttgg	60
gatattccct acaatgactt ccatgtccga ggaccccccc cagtatatata caacggcaaa	120
aaacttgatg gtattttacca gtatggtcac attgagacca acgacaacac tgctcagctg	180
gggggcaaat accgatatgg tgagatcctt gagtccgagg gaagcatcag ggacctccga	240
aacagtggct atcgcatgac cgagaatgca tatggaggcc acaggggcct cgggcgatac	300
agggcagcac ctgtgggcag gcttcaccgg cgagagctgc agcctggaga aatcccacct	360
ggagttgcc a ctggggcggt gggcccaggt ggtttgctgg gcaactggagg catgctggca	420
gctgatggca tctctgcagg ccaaggtggc ctgctcggcg gaggtgggtct ccttggtgat	480
ggaggacttc ttggaggagg ggggtgtcctg ggcgtgctcg gcgagggtgg catcctcagc	540
[0003] actgtgcaag gcatcacggg gctgcgtatc gtggagctga cctccctcg ggtgtccgtg	600
cggctcctgc ccggcgtggg tgtctacctg agcttgata cccgtgtggc catcaacggg	660
aagagtctta ttggcttcct ggacgtcgca gtagaagtga acatcacagc caaggtccgg	720
ctgaccatgg accgcacggg ttatcctcgg ctggtcattg agcgtatgta caccctccta	780
gggggcatca aagtcaagct gctgcgaggg cttctcccca atctcgtgga caatttagtg	840
acccgagtcc tggcgcagct cctccctgac ttgctctgac ccacgtgga tgtggtgctg	900
ggctctgtca atgaccagct gggcctcgtg gattctctga ttctctggg gatattggga	960
agtgtccagt acacettctc cagcctcccg cttgtgaccg gggaaattcct ggagctggac	1020
ctcaacacgc tggttgggga ggctggagga ggactcatcg actaccatt ggggtggcca	1080
gctgtgtctc ccaagccgat gccagagctg cctcccatgg gtgacaacac caagtccag	1140
ctggccatgt ctgccaaact cctgggctca gtgctgactc tactgcagaa gcagcatgct	1200
ctagacctgg atatcaccaa tggcatgttt gaagagcttc ctccacttac cacagccaca	1260
ctgggagccc tgatccccaa ggtgttccag cagtaccccg agtcctgccc acttatcatc	1320

```

aggatccagg tgctgaaccc accatctgtg atgctgcaga aggacaaagc gctggtgaag 1380
gtgttgGCCA ctgccgaggt catggtctcc cagcccaaag acctggagac taccatctgc 1440
ctcattgacg tggacacaga attcttgGCC tcattttcca cagaaggaga taagctcatg 1500
attgatGCCA agctggagaa gaccagcctc aacctcagaa cctcaaactg gggcaacttt 1560
gatattgGCC tcattggaggt gctggtggag aagatttttg acctggcatt catgcccGCA 1620
atgaacgctg tgctgggttc tggcgtccct cccccaaaa tcctcaacat cgactttagc 1680
aatgcagaca ttgacgtgtt ggaggacctt ttggtgctga gcgcatga 1728

```

<210> 3

<211> 575

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

[0004]

```

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 Gly Leu Leu Gly Asp
145       150       155       160
Gly Gly Leu Leu Gly 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 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	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	Gly	Leu	Leu	Gly	Asp
145					150					155				160	
Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	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	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	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			

[0006]

```

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

```

[0008]

```

Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly 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 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

<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 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 Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Gly 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 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

[0009]

[0010]

```

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 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
                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

```


[0011]

```

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 Gly Leu Leu Gly Asp
145         150         155         160
Gly Gly Leu Leu Gly 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 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

```

[0012]

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
			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		

ttcgagctcgcccgacattgattattgactagttattaata
gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatgg
agttccgcgttacataaacttacgggtaaattggcccgccctggc
tgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgac
gtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgac
gtcaatgggtggagtatattacgggtaaactgcccacttggca
gtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattga
cgtcaatgacgggtaaattggcccgccctggcattatgcccggt
acatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctac
gtattagtcatecgtattaccatgggtgatgcgggttttggca
gtacatcaatgggcggtggatagcgggtttgactcacggggat
ttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttggtt
tggcaccaaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaac
ctccgccccattgacgcaaattgggcggtaggcgtgtacgggt
gggagggtctatataagcagagctcggtttagtgaaccgtcag
atcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccatag
aagacaccgggaccgatccagcctccgcggccgggaacgggt
gcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagt
accgcctatagagtctataggcccacccccttggcttcgtt
agaacgcgggtacaattaatacataaccttatgtatcatac
acatacgatttaggtgacactatagaataacatccactttg
cctttctctccacagggtgtccactcccagggtccaactgcac
ctcggttctaagcttgcattgcctgcagggtcgactctagagg
atccccgcccaccatgctgcagcaaagtgatgctctccactc
ggccctgagagaggtgcccttgggtggttgatattccct
acaatgacttccatgtccgaggaccccccccagtatatacc
aacggcaaaaaacttgatgggtatttaccagtatggtcacat
tgagaccaacgacaacactgctcagctggggggcaaatacc
gatatgggtgagatccttgagtccgagggaagcatcaggggac

图1

ctccgaaacagtggctatcgcagtgccgagaatgcatatgg
aggccacaggggcctcgggcgatacagggcagcacctgtgg
gcaggcttcaccggcgagagctgcagcctggagaaatccca
cctggagttgccactggggcggtgggcccagggtggtttgct
gggcaactggaggcatgctggcagctgatggcactcctcgcag
gccaagggtggcctgctcggcgagggtgggtctccttggtgat
ggaggacttcttggaggaggggggtgtcctgggcggtgctcgg
cgagggtggcatcctcagcactgtgcaaggcatcacggggc
tgcgtatcgtggagctgaccctccctcgggtgtccgtgcgg
ctcctgcccggcggtgggtgtctacctgagcttgtacacccg
tgtggccatcaacgggaagagtcttattggcttcctggaca**a**
/gtcgcagtagaagtgaacatcacagccaagggtccggctga
ccatggaccgcacgggttatcctcgggtgggtcattgagcga
tgtgacaccctcctaggggggcatcaaagtcaagctgctgcg
agggttctccccaatctcgtggacaatttagtgaa**a/c**ccg
agtcctggccgacgtcctccctgacttgctctgccccatcg
tggatgtgggtgctgggtcttgtcaatgaccagctgggcctc
gtggattctctgattcctctggggatattgggaagtgtcca
gtacaccttctccagcctcccgcttgtgaccgggggaattcc
tggagctggacctcaacacgctgggtggggaggctggagga
ggactcatcgactaccattgggggtggccagctgtgtctcc
caagccgatgccagagctgcctcccatgggtgacaacacca
agtcccagctggccatgtctgccaaacttcctggggtcagtg
ctgactctactgcagaagcagcatgctctagacctggatat
caccaatggcatgtttgaagagcttcctccacttaccacag
ccacactgggagccctgatccccaagggtgttccagcagtac
cccgagtcctgcccacttatcatcaggatccagggtgctgaa
cccaccatctgtgatgctgcagaaggacaaagcgctgggtga
agggtgttggccactgccgagggtcatgggtctcccagcccaaa

图1(续)

gacctggagactaccatctgcctcattgacgtggacacaga
attcttggcctcattttccacagaaggagataagctcatga
ttgatgccaaagctggagaagaccagcctcaacctcagaacc
tcaaacgtgggcaactttgatattggcctcatggaggtgct
ggtggagaagatttttgacctggcattcatgcccgcgaatga
acgctgtgctgggttctggcgtccctctccccaaaatcctc
aacatcgactttagcaatgcagacattgacgtggttgagga
ccttttggtgctgagcgcacgggtaccgggtcgccaccatgg
tgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtggtgcccatc
ctggtcgagctggacggcgacgtaaacgggccacaagttcag
cgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagc
tgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtg
ccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgca
gtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgact
tcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgc
accatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgc
cgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcg
agctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctg
gggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtcta
tatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaact
tcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctc
gccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccc
cgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcctg
ccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatgggtc
ctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcat
ggacgagctgtacaagtaaagcggccgcgactctagaattc
aatcgatggccgccatggcccaacttgttttattgcagctta
taatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttccaa
ataaagcatttttttctactgcattctagttgtggtttgtcc

图1(续)

aaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcgggaatta
attcggcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaagag
gaacttggttaggtaccttctgaggcggaaagaaccagctg
tggaatgtgtgtcagttaggggtgtggaaagtccccaggctc
cccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagt
cagcaaccagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggc
agaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccat
agtcccgcccctaactccgcccatacccgcccctaactccgc
ccagttccgcccattctccgcccatacccgcccctaactccgc
tttattttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagct
attccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaggct
tttgcaaaaagctgttaacagcttggcactggccgtcgttt
tacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccctaactt
aatcgccttgacgacatccccctttcgccagctggcgtaa
tagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgc
gcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctc
cttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaag
caaccatagtacgcgccttgtagcggcgcattaagcgcggc
gggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcca
gcgcccctagcgcggcctcctttcgcttttcttcccttccttt
ctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcg
ggggctcccttttaggggttccgatttagtgctttacggcacc
tcgacccccaaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagt
gggcatcgccctgatagacgggtttttcgccctttgacggtt
ggagtccacgttctttaatagtggactcttggttccaaactg
gaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgattta
taagggattttgccgatcttcggcctattgggttaaaaaatga
gctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatat
taacgttttacaatttttatgggtgcactctcagtacaatctgc

图1(续)

tctgatgccgcatagttaagccagccccgacaccccgccaac
acccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcat
ccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatg
tgtcagagggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacg
aaagggcctcgtgatacgcctatTTTTtataggTTaatgtca
tgataataatggTTTTcttagacgtcaggTggcactTTTTcgg
ggaaatgtgcgcggaacccctatTTtgTTTTatTTTTtctaaat
acattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgat
aaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtatt
caacatttccgtgtcgcccttattccctTTTTtgcggcatt
ttgccttcctgTTTTtgctcaccagaaacgctggTgaaag
taaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttac
atcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttt
tcgccccgaagaacgTTTTccaatgatgagcactTTTtaaag
ttctgctatgtggcgcggtattatcccgTattgacgcggg
caagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatga
cttgggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgg
atggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacc
atgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgat
cggaggaccgaaggagctaaccgctTTTTtgacaacatgg
gggatcatgtaactcgccttgatcgTTgggaaccggagctg
aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcc
tgtagcaatggcaacaacgTTgcgcaaactattaactggcg
aactacttactctagcttcccggaacaattaatagactgg
atggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggc
ccttccggctggctggTTTTattgctgataaatctggagccg
gtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcca
gatggtaagccctcccgTatcgtagttatctacacgacggg
gagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctg

图1(续)

agataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagac
caagtttactcatatatacttttagattgattttaaacttca
tttttaattttaaaaggatctaggtgaagatccttttttgata
atctcatgaccaaataccttaacgtgagttttcgttccac
tgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttg
agatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaaca
aaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaa
gagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcag
agcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatac
ctcgtctctgctaatacctgttaccagtggctgctgccagtgg
cgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgatagt
taccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcg
tgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaact
gagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttc
ccgaaggggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagg
gtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaa
cgcctgggtatctttatagtcctgtcgggttttcgccacctct
gacttgagcgtcgattttttgtgatgctcgtcagggggggcgg
agcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttttacgggtt
cctggcctttttgctggcctttttgctcacatgttctttcctg
cgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttt
gagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcg
cagcgagtcagtgagcgaggaagcgggaagagcgcccaatac
gcaaaccgcctctccccgcgcggttggccgattcattaatgc
agctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggacgtga
gcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcac
cccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgt
ggaattgtgagcgggataacaatttcacacaggaaacagcta
tgacatgattacgaattaa

图1(续)

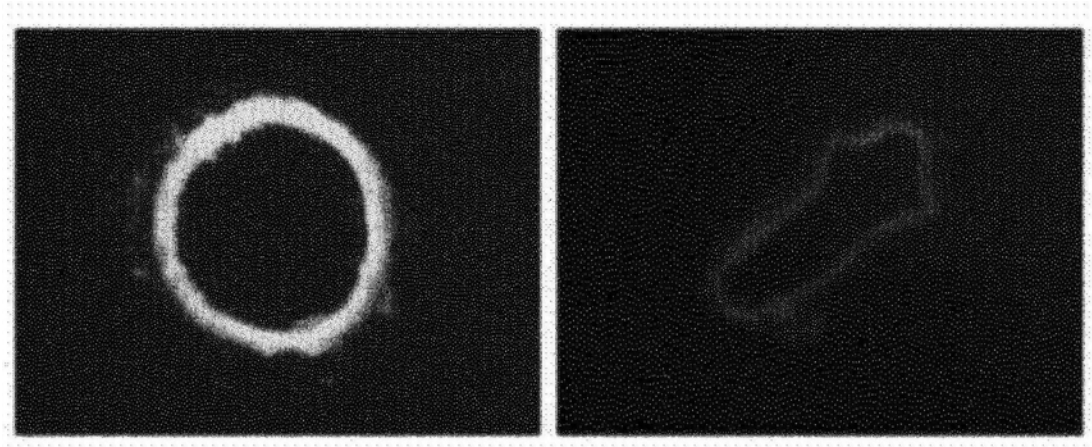


图2

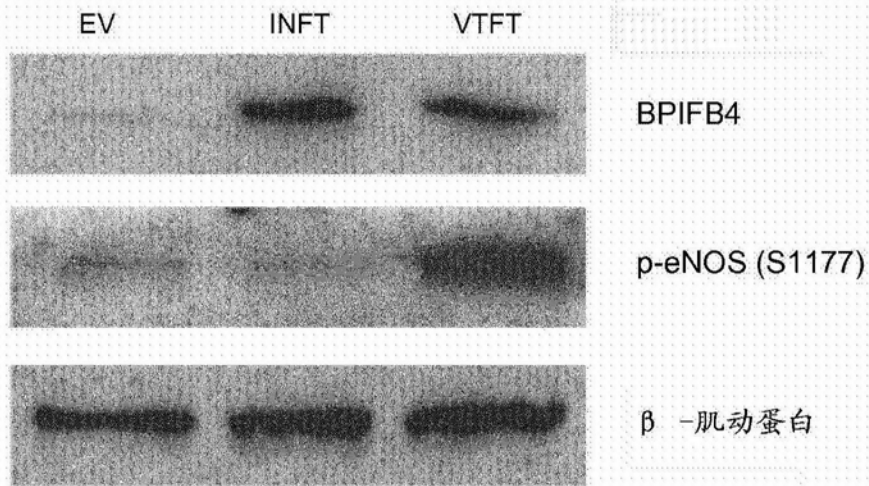


图 3a

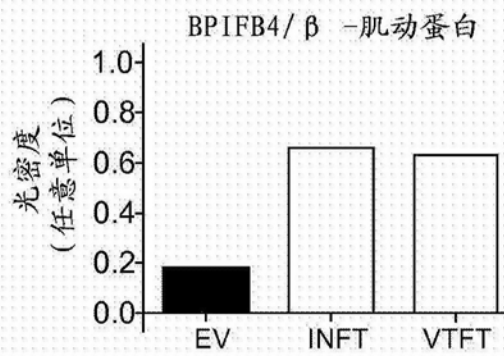


图 3b

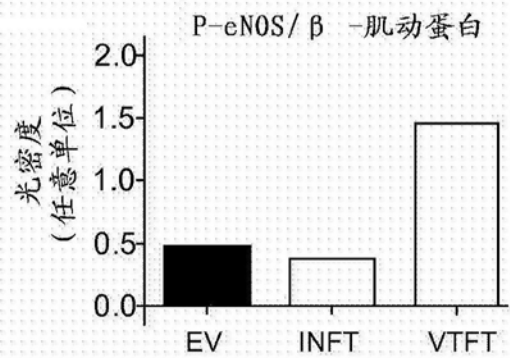


图 3c

图3

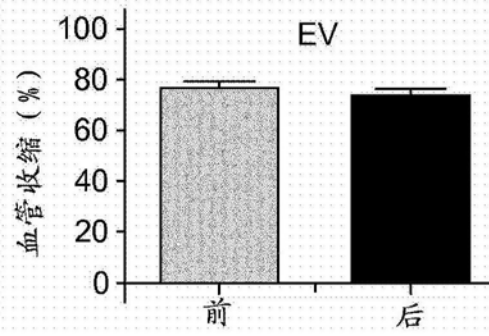


图4a

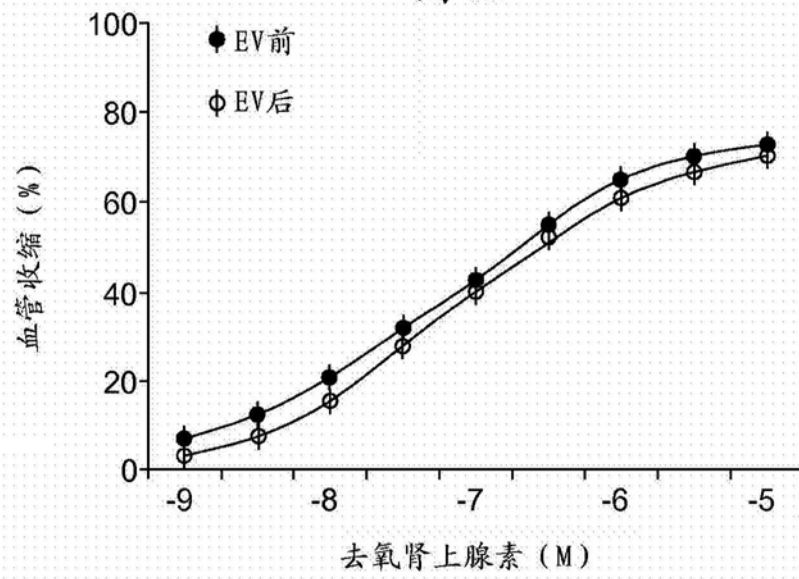


图4b

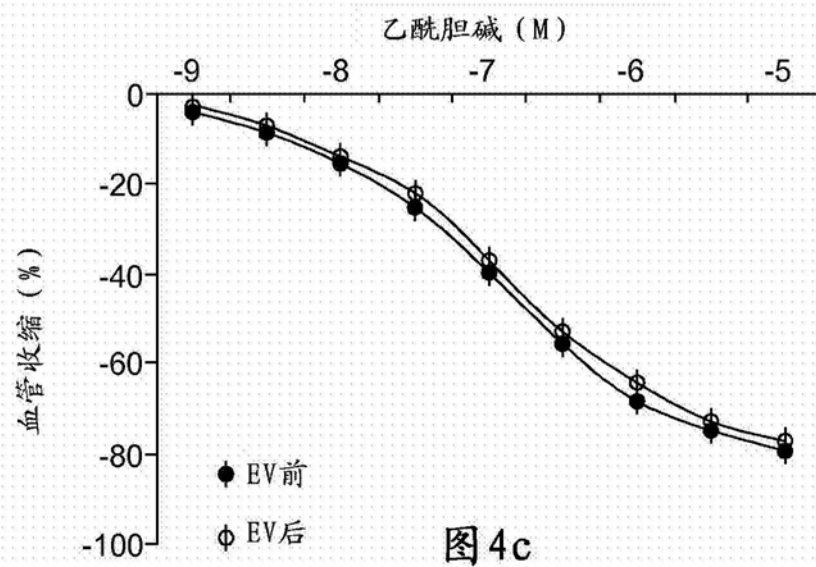


图4c

图4

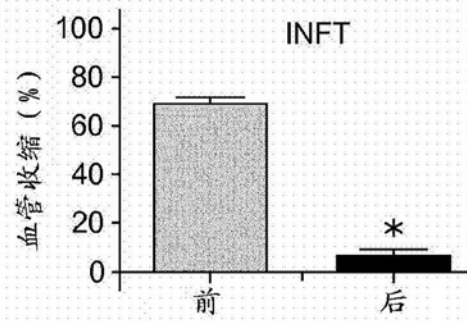


图 5a

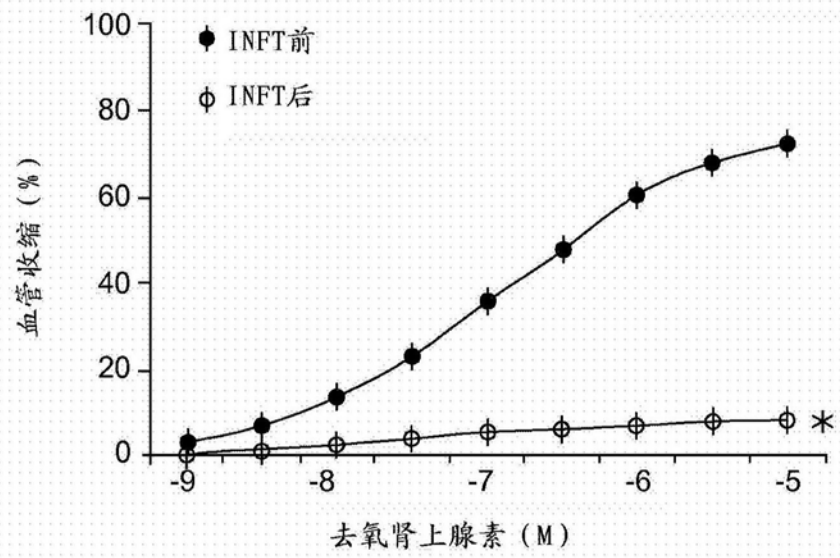


图 5b

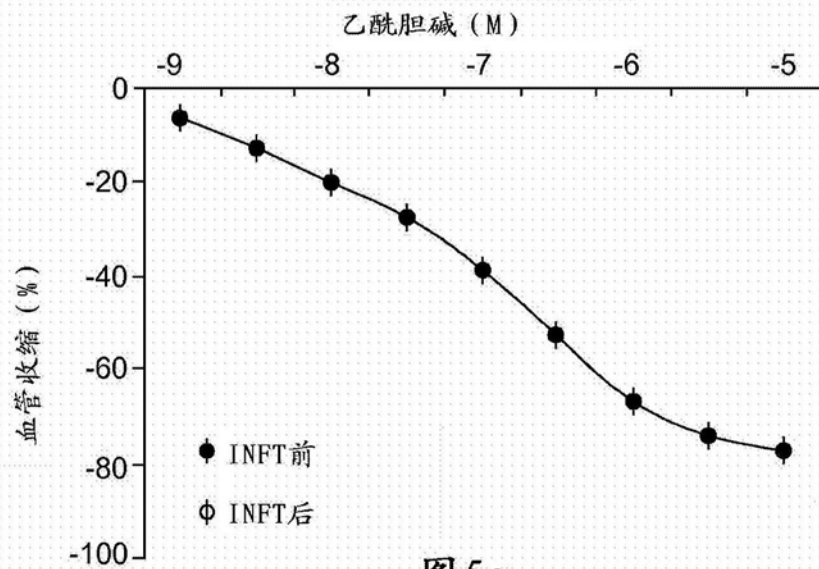


图 5c

图5

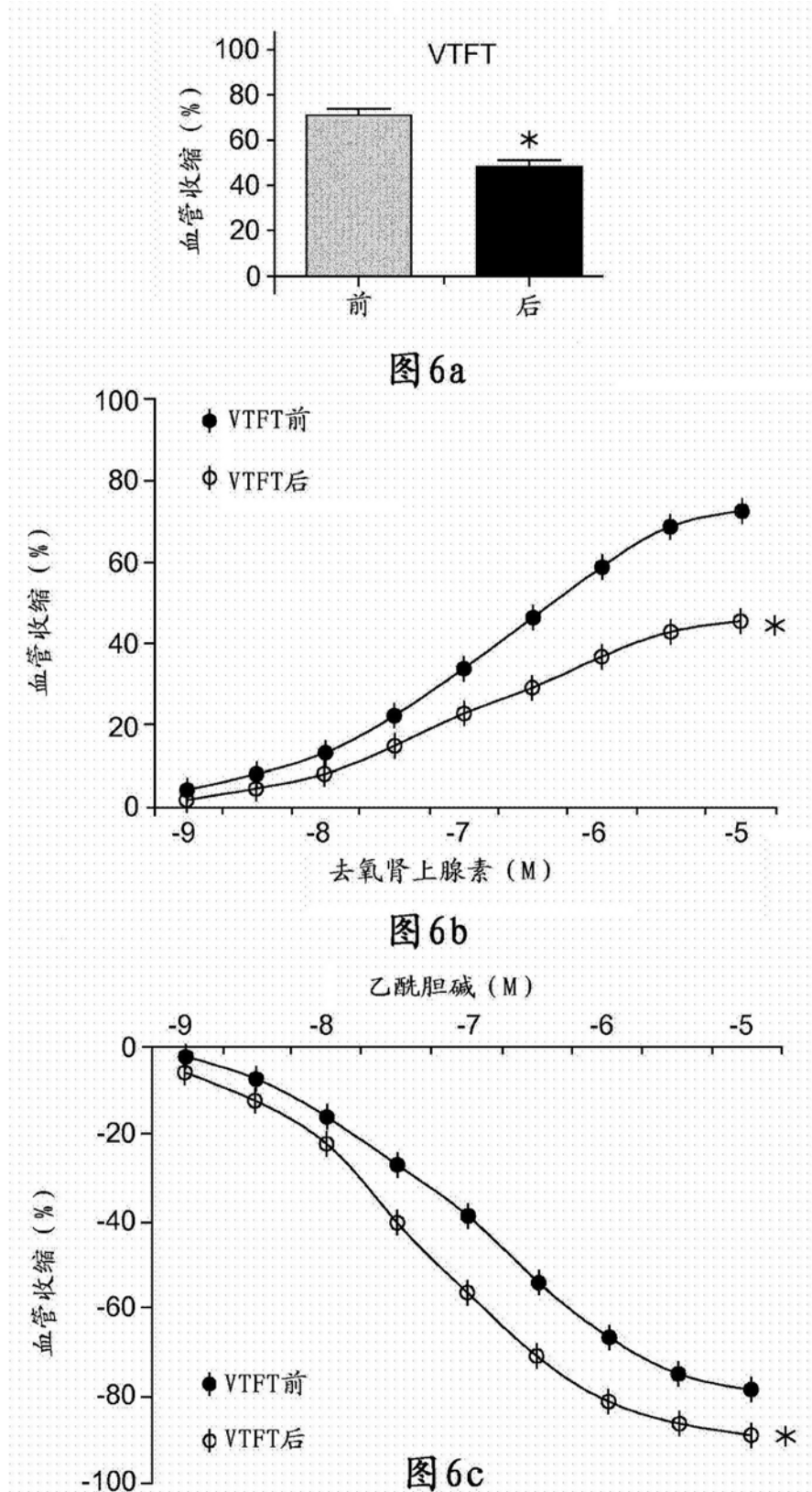


图6

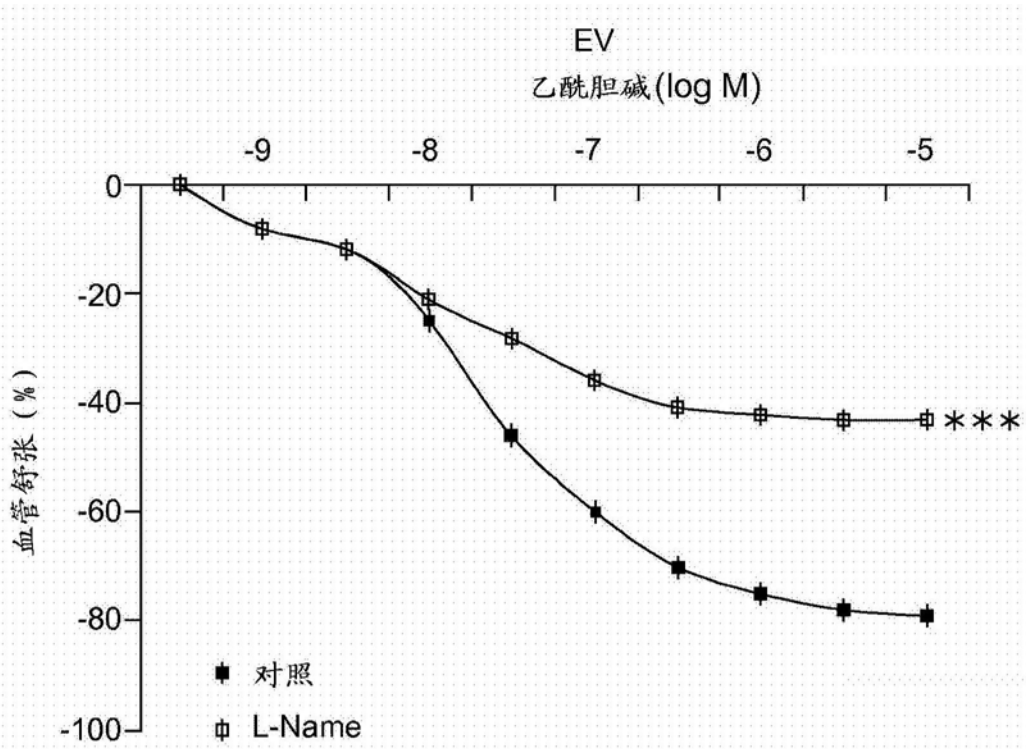


图 7a

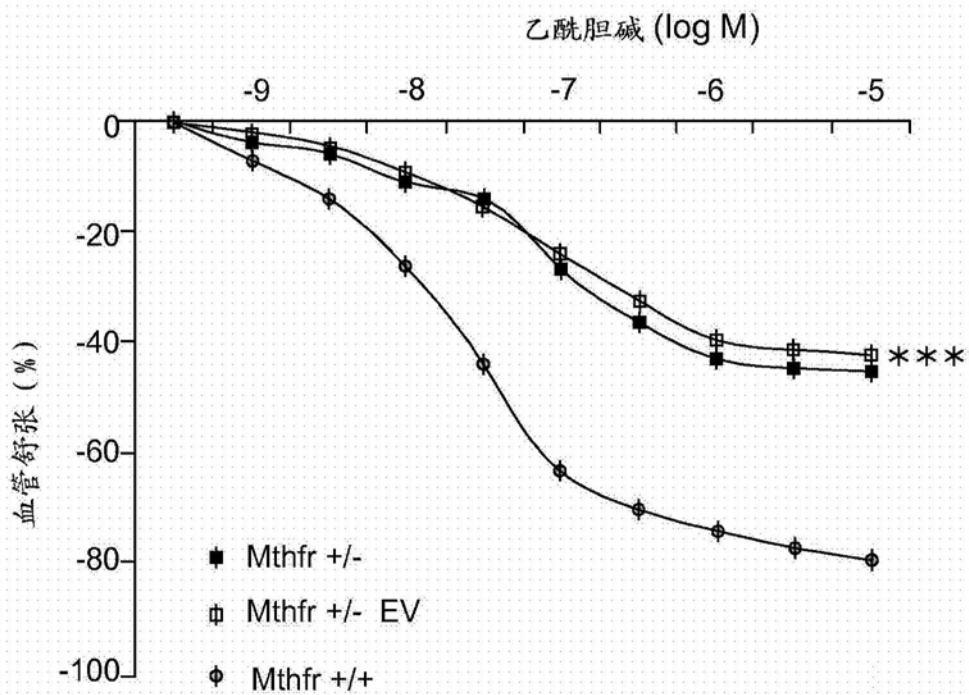


图 7b

图7

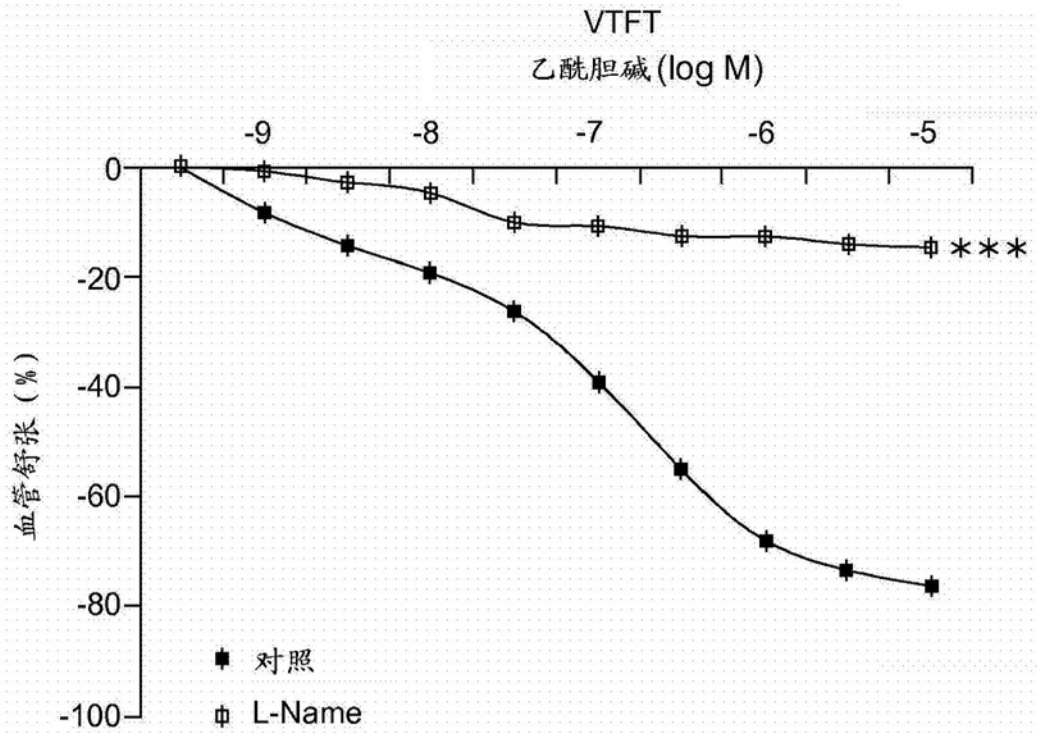


图 8a

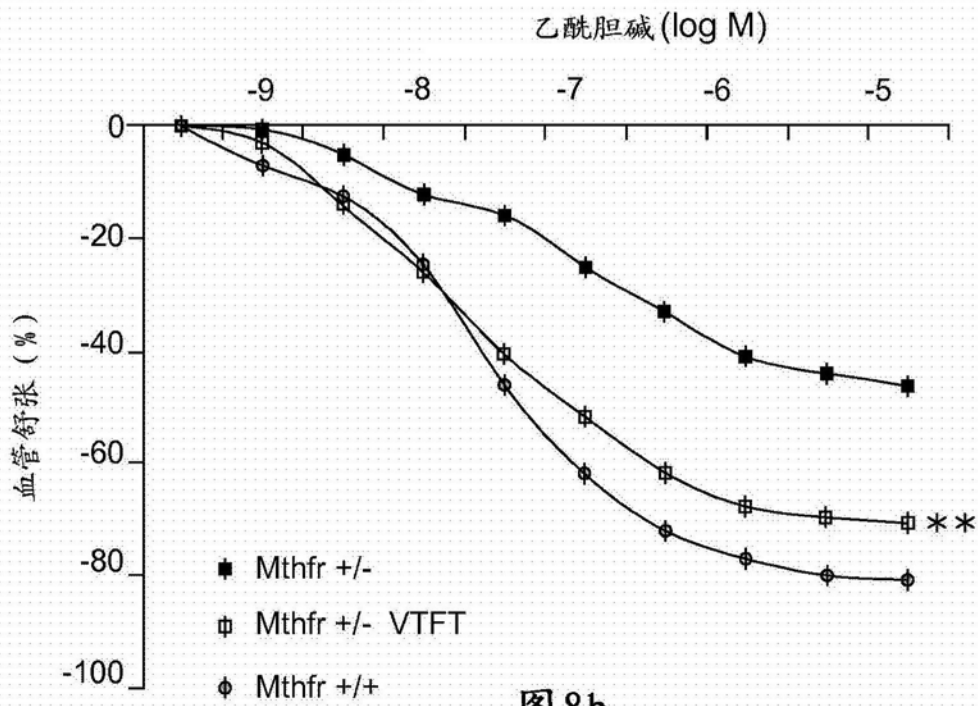


图 8b

图8

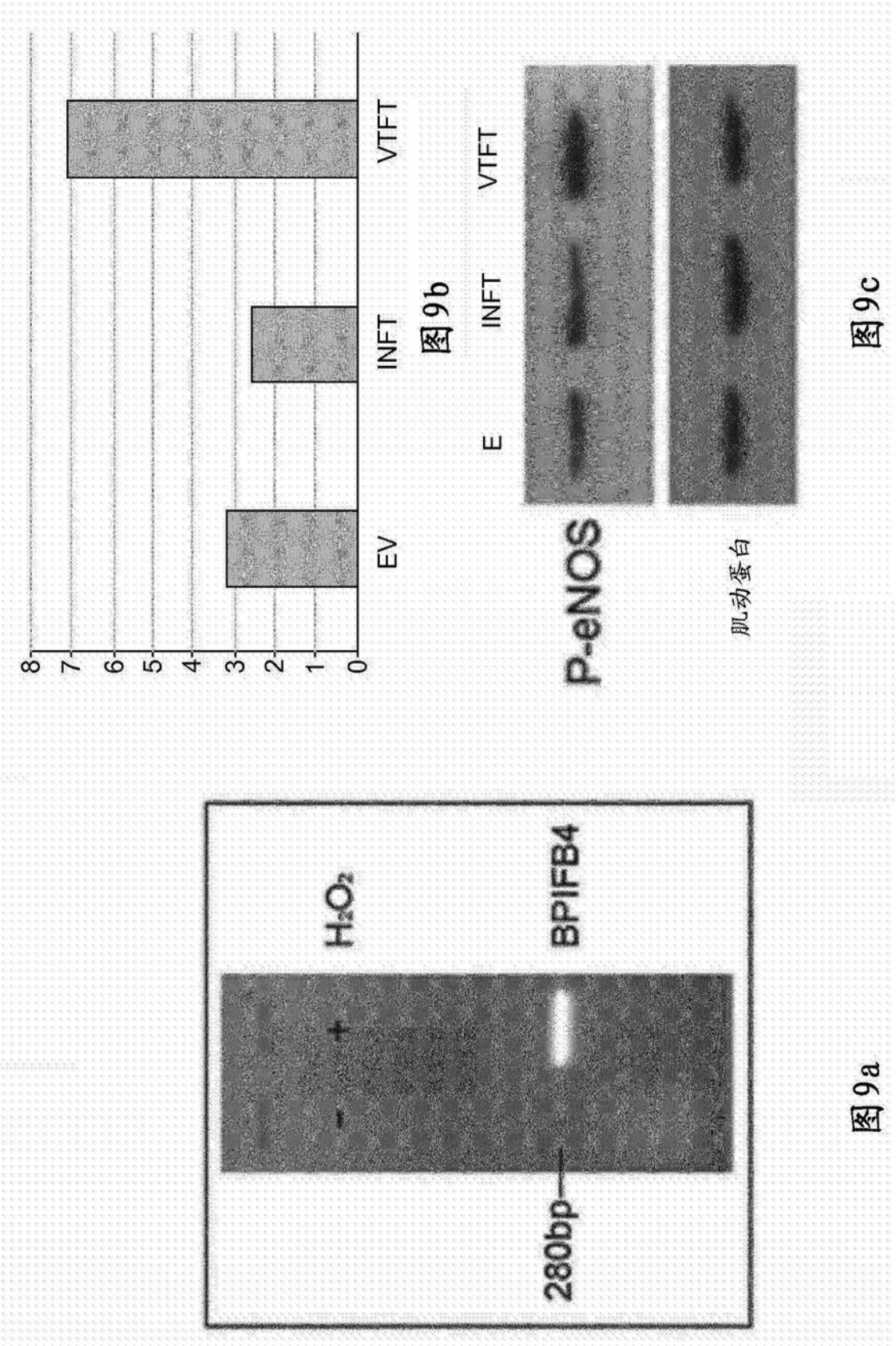


图9