



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104507961 B

(45)授权公告日 2018.08.14

(21)申请号 201380036618.7

(22)申请日 2013.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104507961 A

(43)申请公布日 2015.04.08

(30)优先权数据

10-2012-0050529 2012.05.11 KR

10-2012-0050533 2012.05.11 KR

10-2012-0071989 2012.07.02 KR

10-2012-0104144 2012.09.19 KR

10-2012-0104207 2012.09.19 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/055327 2013.03.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/167298 EN 2013.11.14

(73)专利权人 珍白斯凯尔有限公司

地址 韩国大田广域市

专利权人 金商在

(72)发明人 金商在 金京姬 李圭庸 高成昊

朴贤喜 许成珍 李宇珍 金范竣

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 庞东成 武肅

(51)Int.Cl.

C07K 14/435(2006.01)

(56)对比文件

WO 2010003520 A3,2010.07.15,

WO 2011101173 A1,2011.08.25,

CN 1291231 A,2001.04.11,

US 2007190561 A1,2007.08.16,

SL Bernhardt et al..Telomerase

peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study.《British Journal of Cancer》.2006,第95卷(第11期),1474-1482.

审查员 李翠莹

权利要求书2页 说明书27页

序列表53页 附图82页

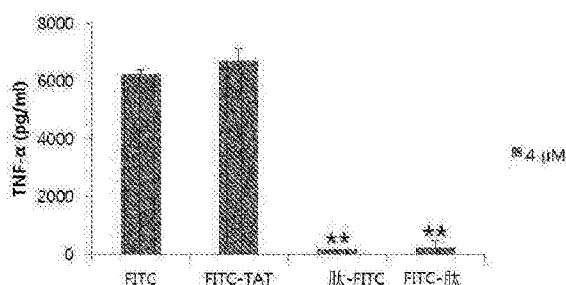
(54)发明名称

抗炎性肽及包含其的组合物

(57)摘要

本发明涉及具有抗炎活性的肽,其中,该肽包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列;该肽与上述序列具有超过80%的氨基酸序列同源性;或该肽为上述肽的片段。本发明还涉及包含上述肽的抗炎组合物。根据本发明,包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列的肽在抑制炎症及预防性手段方面皆具有优异的功效。因此,包含本发明的肽的组合物可用作抗炎药物组合物或用作化妆品组合物,从而治疗或防止多种不同类型的炎症性疾病。

TNF- α ELISA



1. 肽在制备抗炎组合物中的应用,其中,所述肽由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成;其中,所述肽由选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74,其中,所述炎是TNF- α 造成的炎,并且所述抗炎通过抑制TNF- α 来进行。

2. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物用于治疗或预防炎性疾病。

3. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物为用于改善或防止皮肤炎症的化妆品组合物。

4. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物为用于治疗或预防炎性疾病的药物组合物。

5. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物为用于治疗或预防炎症的食品组合物。

6. 肽在制备用于预防或治疗炎性疾病的试剂盒中的应用,所述试剂盒包含:肽或包含所述肽的组合物,所述肽由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,所述肽由选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74;以及包括所述肽或组合物的施用剂量、施用途径、施用频率和适应证中的至少一种的使用说明书;

其中,所述炎性疾病是TNF- α 造成的炎性疾病,并且所述预防或治疗通过抑制TNF- α 来进行。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的应用,其中,所述肽由选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。

8. 如权利要求1至6中任一项所述的应用,其中,所述肽由选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ

ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74。

9. 如权利要求1至6中任一项所述的应用,其中,所述肽源自人类端粒酶。

抗炎性肽及包含其的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及抗炎性肽及包含该抗炎性肽的组合物。

背景技术

[0002] 炎症是一种生物防御,作为保护身体不受到可能由外部物理刺激、化学刺激(例如暴露在多种过敏原下)或包括细菌、真菌及病毒在内的微生物的入侵造成的对生物组织的损伤的手段。

[0003] 产生前列腺素、血栓素等的环氧合酶(COX)途径或脂氧合酶(LOX)途径可用来进行炎症信号传递。一旦炎症信号被传递,身体所发生的诸多改变之一是血管扩张,以增加炎症周围的血液供给,从而集中炎症应答所需的血细胞,例如嗜中性粒细胞。然而,当异常的生物防御应答过多地发生时,可能导致炎症疾病。为了防止这种情况,目前正在开发通过抑制炎症信号传导途径中所用的酶(例如,COX-1、COX-2、5-LOX、12-LOX等)来抑制过度的炎症应答的药物。

[0004] 根据应答时间,炎症可分为急性炎症(即时应答,非特异性应答,数天至数周)、慢性炎症(延迟的应答,特异性应答,数周或更久)、亚急性炎症(急性炎症与慢性炎症之间的中间阶段,特征在于单核及多形核的混合产物)。

[0005] 并且,除了肽因子之外,诸如前列腺素、白三烯、脂质因子(包括血小板活化因子(PAF))、炎症因子的合成酶、自由基(例如NO(一氧化氮))、多种细胞粘着分子、免疫系统及凝血因子等因子皆可引起炎症。

[0006] 一旦细胞因已知的致炎症物质(例如外部生物因子(微生物、病毒、寄生虫)、物理因子(机械刺激、热、辐射、电)及化学因子)而受损时,会释放出组胺及激肽。释出的组胺及激肽将造成血管扩张、毛细血管通透性增加及炎症处的巨噬细胞集中,并引起血液流速增加、水肿、免疫细胞及抗体的迁移、疼痛以及发热。

[0007] 目前使用的炎症治疗物为合成药物(例如布洛芬)、抗组胺剂、类固醇、可的松、免疫抑制剂和免疫激动剂;但这些药物仅暂时性地缓解炎症。这些药物无法从根本上治疗炎症,且具有诸如超敏反应和免疫系统退化等副作用。

[0008] 因此,为了有效缓解炎症,已进行了开发抑制上述炎症蛋白的表达的物质的研究。然而,先前开发的抗炎物质具有若干问题。已开发出了包括非类固醇类抗炎药物(NSAID)及类固醇类抗炎药物(SAID)在内的多种类型的抗炎药物;但这些药物不但时常在服用时产生副作用,而且它们无法从根本上治愈炎症。因此,目前需要在物质上及经济上皆可行的抗炎药物。就急性或慢性炎症(例如慢性类风湿性关节炎)方面的一个例子而言,非类固醇类抗炎药物不仅会抑制COX-2酶的活性,已知它们还会抑制COX-1的活性,从而引起例如胃肠道失调等副作用。

[0009] 本发明人发现,源自端粒酶的肽可具有抗炎性质,由此完成了本发明。

[0010] 因此,本发明的目的在于提供一种新颖的肽。

[0011] 本发明的另一个目的在于提供编码该新颖的肽的多核苷酸。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供一种具有抗炎活性的肽。

- [0013] 本发明的另一个目的在于提供使用此肽作为活性成分的抗炎组合物。
- [0014] 本发明的另一个目的在于提供使用此肽作为活性成分的化妆品组合物。
- [0015] 本发明的另一个目的在于提供使用此肽作为活性成分的药物组合物。

发明内容

[0016] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种具有抗炎活性的肽,其中该肽包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列,或其中该肽与上述序列具有至少80%的序列同一性,或者该肽为上述肽的片段。

[0017] 在另一个实施方式中,上述片段由3个或更多个氨基酸组成。举例而言,所述片段可由4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个氨基酸残基组成。

[0018] 在另一个实施方式中,上述肽由30个或更少个氨基酸组成。

[0019] 举例而言,所述肽可由29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9或8个氨基酸残基组成。

[0020] 在另一个实施方式中,上述肽由SEQ ID NO:2~179中的任一个氨基酸序列组成。

[0021] 在另一个实施方式中,上述肽包含选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:174、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:177和SEQ ID NO:178。

[0022] 在另一个实施方式中,上述肽包含选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ

ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173和SEQ ID NO:174。

[0023] 在另一个实施方式中,上述肽包含选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列:SEQ ID NO:2~SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7~SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38~SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78~SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:109~SEQ ID NO:179。

[0024] 在另一个实施方式中,上述肽包含选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:112和SEQ ID NO:113。

[0025] 在另一个实施方式中,上述肽包含选自由以下序列组成的组的任一个氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:170、SEQ ID NO:171、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:178和SEQ ID NO:179。

[0026] 在另一个实施方式中,上述肽源自人类端粒酶。

[0027] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种编码具有抗炎活性的肽的多核苷酸,其中该肽包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列,或该肽与上述序列具有至少80%的序列同一性,或该肽为上述肽的片段。

[0028] 在所述多核苷酸的另一个实施方式中,上述肽由30个或更少个氨基酸组成。举例而言,上述肽可由29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9或8个氨基酸残基组成。在所述多核苷酸的另一个实施方式中,上述肽由SEQ ID NO:2~179中的任一个氨基酸序列组成。

[0029] 在所述多核苷酸的另一个实施方式中,上述肽源自人类端粒酶。

[0030] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种包含肽作为活性成分的抗炎组合物,其

中,该肽包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列,该肽的氨基酸序列与上述序列的同源性超过80%,或该肽为上述肽的片段。

[0031] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述肽由30个或更少个氨基酸组成,参照上文。

[0032] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述肽由SEQ ID NO:2~179中的任一个氨基酸序列组成。

[0033] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述肽源自人类端粒酶。

[0034] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述组合物用于治疗或预防炎性疾病。

[0035] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述组合物为用于改善或防止皮肤炎症的化妆品组合物。

[0036] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述组合物为用于治疗或预防炎性疾病的药物组合物。

[0037] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述组合物为用于治疗或预防炎症的食品组合物。

[0038] 在所述组合物的另一个实施方式中,上述炎性疾病的特征在于其选自由下列疾病组成的组:(1) 普遍的或局部的炎性疾病(例如,过敏症;免疫复合物病;枯草热;超敏性休克;内毒素性休克;恶病质,过热;肉芽肿病;或结节病);(2) 胃肠相关疾病(例如,阑尾炎;胃溃疡;十二指肠溃疡;腹膜炎;胰腺炎;溃疡性结肠炎、急性结肠炎或缺血性结肠炎;胆管炎;胆囊炎、脂肪泻、肝炎、克罗恩氏病(Crone's disease);或惠普尔氏病(Whipple's Disease));(3) 皮肤相关疾病(例如,牛皮癣;烧伤;晒伤;皮炎;荨麻疹性疣或风团);(4) 血管相关疾病(例如,脉管炎(angitis);血管炎(vasculitis);心内膜炎;动脉炎;动脉硬化;血栓性静脉炎;心包炎;充血性心力衰竭;心肌炎;心肌缺血;结节性动脉周围炎;周期性狭窄(recurrent stenosis);柏格氏病(Buerger's disease);或风湿热);(5) 呼吸道疾病(例如,哮喘;会厌炎;支气管炎;肺气肿;鼻炎;囊性纤维化;间质性肺炎;COPD(慢性阻塞性肺病);成人呼吸窘迫综合征;粉尘病;肺泡炎;细支气管炎;咽炎;肋膜炎;或鼻窦炎);(6) 骨骼、关节、肌肉及结缔组织相关疾病(例如,嗜伊红性肉芽肿;关节炎;关节痛;骨髓炎;皮炎;筋膜炎;佩吉特氏病(Paget's disease);痛风;牙周病;类风湿性关节炎;重症肌无力;强直性脊柱炎;或滑膜炎);(7) 泌尿生殖系统失调(例如,附睾炎;阴道炎;前列腺炎;或尿道炎);(8) 中枢或周围神经系统相关疾病(例如,阿尔茨海默氏病;脑膜炎;脑炎;多发性硬化症;脑梗死;脑栓塞;格-巴二氏综合征(Guillain-Barre syndrome);神经炎;神经痛;脊柱损伤;麻痹;或葡萄膜炎);(9) 病毒(例如,流行性感;呼吸道合胞病毒;HIV;乙型肝炎;丙型肝炎;或疱疹病毒)、感染性疾病(例如,登革热;或败血症)、真菌感染(例如,念珠菌病);或细菌、寄生虫及类似微生物感染(例如,弥散性菌血症;疟疾;盘尾丝虫病;或阿米巴病);(10) 自身免疫病(例如,甲状腺炎;红斑狼疮;古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome);同种异体移植排斥;移植物抗宿主病;或糖尿病);及(11) 癌症或肿瘤疾病(例如,霍奇金病)。

[0039] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种通过施用所述抗炎组合物来治疗或防止炎性疾病的方法。

[0040] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种用于预防或治疗炎性疾病的试剂盒,其包含:具有抗炎活性的肽或包含所述肽的组合物,其中,该肽包含SEQ ID NO:2~179中的至

少一个氨基酸序列,该肽与上述序列具有超过80%的同源性,或该肽为上述肽的片段;以及包括该肽或组合物的施用剂量、施用途径、施用频率及适应证中的至少一种的使用说明书。

[0041] 产业实用性

[0042] 根据本发明,序列为SEQ ID NO:2~179的肽在抑制炎症及预防性手段方面皆具有优异的功效。因此,包含本发明的肽的组合物可用作抗炎药物组合物或用作化妆品组合物,进而可治疗或防止多种不同类型的炎性疾病。

[0043] 参考文献

[0044] KR2012-0130996A

[0045] KR2012-0133661A

[0046] KR2011-0060940A

[0047] US2011-0150873A1

[0048] Bonaldi T等,EMBO J, (22) 5551-60, 2003

[0049] Yankner BA等,Science (New York,N.Y.) [1990, 250 (4978) :279-282]

[0050] Dahlgren KN等,J.Biol.Chem.277:32046-32053, 2002.

附图说明

[0051] 图1为显示出用源自PBMC的单核细胞的培养物进行TNF- α ELISA的结果的图。以LPS (10ng/ml) 刺激单核细胞2小时,接着分别与肽FITC、FITC-TAT、PEP 1-FITC及FITC-肽反应2小时 (**P<0.01,相较于阴性对照组 (FITC及FITC-TAT))。

[0052] 图2为显示出以NF- κ B萤光素酶转染HEK293/空白及HEK293/TLR2细胞系、接着与脂蛋白 (10ng/ml) 和FITC及FITC-PEP 1 (4 μ M) 反应、并温育18小时后进行萤光素酶分析的结果的图。萤光素酶的结果使用海肾萤光素酶校正而获得 (**P<0.01,相较于阴性对照组 (未处理) 且将较于脂蛋白处理样品)。

[0053] 图3~图23是对单核细胞的TNF- α 抑制效果的筛选结果。

[0054] 图24~图46是对细胞系THP-1的TNF- α 抑制效果的筛选结果。

[0055] 图47呈现了经0、2.5、5.0、10、20及40 μ M的淀粉样 β 蛋白处理的神经干细胞的存活力。

[0056] 图48呈现了经0、2.5、5.0、10、20及40 μ M的淀粉样 β 蛋白处理的神经干细胞的增殖。

[0057] 图49呈现了经0、1、10、50、100及200 μ M的PEP 1处理的神经干细胞的存活力。

[0058] 图50呈现了经0、1、10、50、100及200 μ M的PEP 1处理的神经干细胞的增殖。

[0059] 图51呈现了经1、10、50及100 μ M的PEP 1处理的神经干细胞的存活力;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1处理后测量细胞的存活力 (对照组未用淀粉样 β 蛋白及端粒酶系肽处理)。

[0060] 图52呈现了经1、10、50及100 μ M的PEP 1处理的神经干细胞的毒性;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1处理后测量细胞毒性 (对照组未用淀粉样 β 蛋白及端粒酶系肽处理)。

[0061] 图53呈现了经1、10、50及100 μ M的PEP 1处理的神经干细胞的增殖;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1处理后测量细胞增殖 (对照组未用淀粉样 β 蛋白及端粒酶系肽处理)。

[0062] 图54呈现了经1、10、50及100 μ M的PEP 1处理的神经干细胞的迁移;使神经干细胞

受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1处理后测量细胞迁移(对照组未用淀粉样 β 蛋白及PEP-1处理)。

[0063] 图55呈现了经1、10、50及100 μ M的PEP-1处理的神经干细胞的凋亡;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1处理后测量细胞凋亡(对照组未用淀粉样 β 蛋白及端粒酶系肽处理)。

[0064] 图56呈现了PEP-1在受到淀粉样 β 蛋白损伤的神经干细胞中的ROS(活性氧)抑制效果;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1(1、10、50及100 μ M)处理后测量对ROS的抑制(对照组未用淀粉样 β 蛋白及PEP-1处理)。

[0065] 图57呈现了利用(A) 2D电泳及(B) 抗体阵列所分析的蛋白表达水平的结果;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,在用不同浓度的PEP-1(1、10及50 μ M)处理后测量蛋白表达水平(对照组未用淀粉样 β 蛋白及PEP-1处理)。

[0066] 图58呈现了蛋白质印迹的结果,其显示了炎症相关蛋白的表达水平;使神经干细胞受到20 μ M的淀粉样 β 蛋白的损伤,随后,用不同浓度的PEP-1(1、10及50 μ M)处理细胞。

[0067] 图59呈现了PEP-1对淀粉样 β 蛋白聚集的抑制效果;(A) 显示出当用1 μ M的淀粉样 β 蛋白和PEP-1(0.1、1及10 μ M)共同处理时淀粉样 β 蛋白的寡聚化减少;(B) 显示了用PEP-1处理已被诱导聚集的淀粉样 β 蛋白的情况。

[0068] 图60呈现了PI3K抑制剂LY294002对经PEP-1处理的细胞的存活力的影响。用PEP-1处理后所增加的细胞存活力在用LY294002处理后减少。

[0069] 图61~图159是对所选择的肽的蛋白质印迹分析结果,其显示出了HMGB1在细胞中的积累。

具体实施方式

[0070] 由于本发明可适应各种转化形式及实际应用实例,以下是对本发明的更详细描述。然而,这不意味着对实际应用形式的限制;应理解的是,本发明的意图在于包括所有转化形式、等价形式及替代形式中的技术概念及外延。在描述本发明时,若有关现有技术的任何详细描述被认为会破坏本发明的基本原理,则将略去该描述。

[0071] 已知端粒为染色体末端的遗传物质重复序列,其防止染色体受损或与其它染色体融合。端粒的长度会在每次细胞分裂时缩短,在细胞分裂一定次数后,端粒的长度会缩得非常短以使细胞停止分裂并死亡。另一方面,已知端粒的延长可延长细胞的寿命。举例而言,癌细胞分泌一种称为端粒酶的酶,其防止端粒缩短,因而导致癌细胞的增殖。本发明是基于发现具有抗炎效果的源自端粒酶的肽而完成的。

[0072] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种具有抗炎活性的肽。所述肽包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列,所述肽与上述序列具有超过80%的同源性,或所述肽为上述肽的片段。

[0073] SEQ ID NO:2~179中描述的肽如下表1所示。SEQ ID NO:180列出了人类端粒酶蛋白的全长序列。SEQ ID NO:1列出了由16个氨基酸的序列构成的源自端粒酶的肽。SEQ ID NO:2~179中提及的肽如下表1所示。SEQ ID NO:180列出了人类端粒酶蛋白的全长序列。SEQ ID NO:1列出了由16个氨基酸的序列构成的源自端粒酶的肽。SEQ ID NO:2~77中的肽是包含SEQ ID NO:1的肽。SEQ ID NO:78~179中的肽是SEQ ID NO:1肽的片段。

[0074] 下表1中的“名称”用于区分这些肽。在本发明的另一个具体实施方式中,SEQ ID NO:2~179中所述的肽中有多于一种肽包括“合成肽”,即端粒酶的选定区域的合成肽。在本说明书中,术语“pep”是指:具有SEQ ID NO:2~179中任一个的肽、或包含与上述序列的同源性超过80%的氨基酸序列的肽、或上述肽的肽片段。

[0075] 表1

[0076]

SEQ ID NO	名称	在端粒酶中的位置	序列	长度
1	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2	pep-RIA-1	[610-626]	REARPALLTSRLRFIPK	17 aa
3	pep-RIA-2	[609-626]	HREARPALLTSRLRFIPK	18 aa
4	pep-RIA-3	[608-626]	QHREARPALLTSRLRFIPK	19 aa
5	pep-RIA-4	[607-626]	RQHREARPALLTSRLRFIPK	20 aa
6	pep-RIA-5	[606-626]	VRQHREARPALLTSRLRFIPK	21 aa
7	pep-RIA-6	[605-626]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPK	22 aa
8	pep-RIA-7	[604-626]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	23 aa
9	pep-RIA-8	[603-626]	EAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	24 aa
10	pep-RIA-9	[602-626]	SEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	25 aa
11	pep-RIA-10	[601-626]	LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	26 aa
12	pep-RIA-11	[600-626]	ELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	27 aa
13	pep-RIA-12	[599-626]	RELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	28 aa
14	pep-RIA-13	[598-626]	LRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	29 aa
15	pep-RIA-14	[597-626]	QLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	30 aa
16	pep-RIA-15	[610-627]	REARPALLTSRLRFIPKP	18 aa
17	pep-RIA-16	[609-627]	HREARPALLTSRLRFIPKP	19 aa
18	pep-RIA-17	[609-628]	HREARPALLTSRLRFIPKPD	20 aa
19	pep-RIA-18	[610-628]	REARPALLTSRLRFIPKPD	19 aa
20	pep-RIA-19	[608-627]	QHREARPALLTSRLRFIPKP	20 aa
21	pep-RIA-20	[608-628]	QHREARPALLTSRLRFIPKPD	21 aa
22	pep-RIA-21	[608-629]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDG	22 aa
23	pep-RIA-22	[609-629]	HREARPALLTSRLRFIPKPDG	21 aa
24	pep-RIA-23	[610-629]	REARPALLTSRLRFIPKPDG	20 aa
25	pep-RIA-24	[607-627]	RQHREARPALLTSRLRFIPKP	21 aa
26	pep-RIA-25	[607-628]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPD	22 aa
27	pep-RIA-26	[607-629]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	23 aa
28	pep-RIA-27	[607-630]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	24 aa
29	pep-RIA-28	[608-630]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	23 aa
30	pep-RIA-29	[609-630]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGL	22 aa
31	pep-RIA-30	[610-630]	REARPALLTSRLRFIPKPDGL	21 aa
32	pep-RIA-31	[606-627]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKP	22 aa
33	pep-RIA-32	[606-628]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPD	23 aa
34	pep-RIA-33	[606-629]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	24 aa
35	pep-RIA-34	[606-630]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	25 aa
36	pep-RIA-35	[606-631]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	26 aa
37	pep-RIA-36	[607-631]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	25 aa
38	pep-RIA-37	[608-631]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	24 aa
39	pep-RIA-38	[609-631]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	23 aa
40	pep-RIA-39	[610-631]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLR	22 aa
41	pep-RIA-40	[605-627]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKP	23 aa
42	pep-RIA-41	[605-628]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPD	24 aa
43	pep-RIA-42	[605-629]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	25 aa
44	pep-RIA-43	[605-630]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	26 aa
45	pep-RIA-44	[605-631]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	27 aa
46	pep-RIA-45	[605-632]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	28 aa
47	pep-RIA-46	[606-632]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	27 aa
48	pep-RIA-47	[607-632]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	26 aa
49	pep-RIA-48	[608-632]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	25 aa

[0077]

SEQ ID NO	名称	在端粒酶中的位置序列	长度
50	pep-RIA-49	[609-632] HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	24 aa
51	pep-RIA-50	[610-632] REARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	23 aa
52	pep-RIA-51	[604-627] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPD	24 aa
53	pep-RIA-52	[604-628] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPD	25 aa
54	pep-RIA-53	[604-629] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	26 aa
55	pep-RIA-54	[604-630] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	27 aa
56	pep-RIA-55	[604-631] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	28 aa
57	pep-RIA-56	[604-632] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	29 aa
58	pep-RIA-57	[604-633] AEVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	30 aa
59	pep-RIA-58	[605-633] EVRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	29 aa
60	pep-RIA-59	[606-633] VRQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	28 aa
61	pep-RIA-60	[607-633] RQHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	27 aa
62	pep-RIA-61	[608-633] QHQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	26 aa
63	pep-RIA-62	[609-633] HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	25 aa
64	pep-RIA-63	[610-633] REARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	24 aa
65	pep-RIA-64	[611-627] EARPALLTSRLRFIPKPD	17 aa
66	pep-RIA-65	[611-628] EARPALLTSRLRFIPKPD	18 aa
67	pep-RIA-66	[611-629] EARPALLTSRLRFIPKPDG	19 aa
68	pep-RIA-68	[611-631] EARPALLTSRLRFIPKPDGLR	21 aa
69	pep-RIA-69	[611-632] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	22 aa
70	pep-RIA-70	[611-633] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	23 aa
71	pep-RIA-71	[611-634] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPV	24 aa
72	pep-RIA-72	[611-635] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM	25 aa
73	pep-RIA-73	[611-636] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM	26 aa
74	pep-RIA-74	[611-637] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNMMD	27 aa
75	pep-RIA-75	[611-638] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNMMDY	28 aa
76	pep-RIA-76	[611-639] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNMMDYV	29 aa
77	pep-RIA-77	[611-640] EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNMMDYVV	30 aa
78	pep-RIA-78	[611-625] EARPALLTSRLRFIP	15 aa
79	pep-RIA-79	[611-624] EARPALLTSRLRFI	14 aa
80	pep-RIA-80	[611-623] EARPALLTSRLRF	13 aa
81	pep-RIA-81	[611-622] EARPALLTSRLR	12 aa
82	pep-RIA-82	[611-621] EARPALLTSRL	11 aa
83	pep-RIA-83	[611-620] EARPALLTSR	10 aa
84	pep-RIA-84	[611-619] EARPALLTS	9 aa
85	pep-RIA-85	[611-618] EARPALLT	8 aa
86	pep-RIA-86	[611-617] EARPALL	7 aa
87	pep-RIA-87	[611-616] EARPAL	6 aa
88	pep-RIA-88	[611-615] EARPA	5 aa
89	pep-RIA-89	[611-614] EARP	4 aa
90	pep-RIA-90	[611-613] EAR	3 aa
91	pep-RIA-91	[612-626] ARPALLTSRLRFIPK	15 aa
92	pep-RIA-92	[613-626] RPALLTSRLRFIPK	14 aa
93	pep-RIA-93	[614-626] PALLTSRLRFIPK	13 aa
94	pep-RIA-94	[615-626] ALLTSRLRFIPK	12 aa
95	pep-RIA-95	[616-626] LLTSRLRFIPK	11 aa
96	pep-RIA-96	[617-626] LTSRLRFIPK	10 aa
97	pep-RIA-97	[618-626] TSRLRFIPK	9 aa
98	pep-RIA-98	[619-626] SRLRFIPK	8 aa
99	pep-RIA-99	[620-626] RLRFIPK	7 aa
100	pep-RIA-100	[621-626] LRFIPK	6 aa
101	pep-RIA-101	[622-626] RFIPK	5 aa
102	pep-RIA-102	[623-626] FIPK	4 aa

[0078]

SEQ ID NO	名称	在端粒酶中的位置序列	长度
103	pep-RIA-103	[624-626] IPK	3 aa
104	pep-RIA-104	[612-625] ARPALLTSRLRFIP	14 aa
105	pep-RIA-105	[613-624] RPALLTSRLRFI	12 aa
106	pep-RIA-106	[614-623] PALLTSRLRF	10 aa
107	pep-RIA-107	[615-622] ALLTSRLR	8 aa
108	pep-RIA-108	[616-621] LLTSRL	6 aa
109	pep-RIA-109	[617-620] LTSR	4 aa
110	pep-RIA-110	[612-624] ARPALLTSRLRFI	13 aa
111	pep-RIA-111	[612-623] ARPALLTSRLRF	12 aa
112	pep-RIA-112	[612-622] ARPALLTSRLR	11 aa
113	pep-RIA-113	[612-621] ARPALLTSRL	10 aa
114	pep-RIA-114	[612-620] ARPALLTSR	9 aa
115	pep-RIA-115	[612-619] ARPALLTS	8 aa
116	pep-RIA-116	[612-618] ARPALLT	7 aa
117	pep-RIA-117	[612-617] ARPALL	6 aa
118	pep-RIA-118	[612-616] ARPAL	5 aa
119	pep-RIA-119	[612-615] ARPA	4 aa
120	pep-RIA-120	[612-614] ARP	3 aa
121	pep-RIA-121	[613-625] RPALLTSRLRFIP	13 aa
122	pep-RIA-122	[613-623] RPALLTSRLRF	11 aa
123	pep-RIA-123	[613-622] RPALLTSRLR	10 aa
124	pep-RIA-124	[613-620] RPALLTSR	8 aa
125	pep-RIA-125	[613-619] RPALLTS	7 aa
126	pep-RIA-126	[613-618] RPALLT	6 aa
127	pep-RIA-127	[613-617] RPALL	5 aa
128	pep-RIA-128	[613-616] RPAL	4 aa
129	pep-RIA-129	[613-615] RPA	3 aa
130	pep-RIA-130	[614-625] PALLTSRLRFIP	12 aa
131	pep-RIA-131	[614-624] PALLTSRLRFI	11 aa
132	pep-RIA-132	[614-622] PALLTSRLR	9 aa
133	pep-RIA-133	[614-621] PALLTSRL	8 aa
134	pep-RIA-134	[614-620] PALLTSR	7 aa
135	pep-RIA-135	[614-619] PALLTS	6 aa
136	pep-RIA-136	[614-618] PALLT	5 aa
137	pep-RIA-137	[614-617] PALL	4 aa
138	pep-RIA-138	[614-616] PAL	3 aa
139	pep-RIA-139	[615-625] ALLTSRLRFIP	11 aa
140	pep-RIA-140	[615-623] ALLTSRLRF	9 aa
141	pep-RIA-141	[615-621] ALLTSRL	7 aa
142	pep-RIA-142	[615-620] ALLTSR	6 aa
143	pep-RIA-143	[615-619] ALLTS	5 aa
144	pep-RIA-144	[615-618] ALLT	4 aa
145	pep-RIA-145	[615-617] ALL	3 aa
146	pep-RIA-146	[616-625] LLTSRLRFIP	10 aa
147	pep-RIA-147	[616-624] LLTSRLRFI	9 aa
148	pep-RIA-148	[616-623] LLTSRLRF	8 aa
149	pep-RIA-149	[616-622] LLTSRLR	7 aa
150	pep-RIA-150	[616-620] LLTSR	5 aa
151	pep-RIA-151	[616-619] LLTS	4 aa
152	pep-RIA-152	[616-618] LLT	3 aa
153	pep-RIA-153	[617-625] LTSRLRFIP	9 aa
154	pep-RIA-154	[617-624] LTSRLRFI	8 aa
155	pep-RIA-155	[617-623] LTSRLRF	7 aa

SEQ ID NO	名称	在端粒酶中的位置	序列	长度
156	pep-RIA-156	[617-622]	LTSRLR	6 aa
157	pep-RIA-157	[617-621]	LTSRL	5 aa
158	pep-RIA-158	[617-619]	LTS	3 aa
159	pep-RIA-159	[618-625]	TSRLRFIP	8 aa
160	pep-RIA-160	[618-624]	TSRLRFI	7 aa
161	pep-RIA-161	[618-623]	TSRLRF	6 aa
162	pep-RIA-162	[618-622]	TSRLR	5 aa
163	pep-RIA-163	[618-621]	TSRL	4 aa
164	pep-RIA-164	[618-620]	TSR	3 aa
165	pep-RIA-165	[619-625]	SRLRFIP	7 aa
166	pep-RIA-166	[619-624]	SRLRFI	6 aa
167	pep-RIA-167	[619-623]	SRLRF	5 aa
168	pep-RIA-168	[619-622]	SRLR	4 aa
169	pep-RIA-169	[619-621]	SRL	3 aa
170	pep-RIA-170	[620-625]	RLRFIP	6 aa
171	pep-RIA-171	[620-624]	RLRFI	5 aa
172	pep-RIA-172	[620-623]	RLRF	4 aa
173	pep-RIA-173	[620-622]	RLR	3 aa
174	pep-RIA-174	[621-625]	LRFIP	5 aa
175	pep-RIA-175	[621-624]	LRFI	4 aa
176	pep-RIA-176	[621-623]	LRF	3 aa
177	pep-RIA-177	[622-625]	RFIP	4 aa
178	pep-RIA-178	[622-624]	RFI	3 aa
179	pep-RIA-179	[623-625]	FIP	3 aa
[0079] 180	端粒酶	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRR LGPQGWRLVQRGDPAAAFRALVAQCLVCVP WDARPPPAAPSFRQVSCLELVARVLQRLC ERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTS VRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGD DVLVHLLARCALEFVLVAPSCAYQVCGPPLY QLGAATQARPPPHASGPRRRLCERAWNH SVREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSLPLP KRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRG PSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRH SHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPV YAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLT GARRLVETIFLGSRPWMPGTTPRRLPRLPQR YWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHC PLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEED TDPRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRR LVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHA KLSLQELTW KMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLRE EILAKFLHWMVYVVELLRSFFYVTETTF QKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLEKRVQ LRELSEAEVRQHREARPAALLTSRLRFIPKPD GLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSR VKALFSLNRYERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTG AYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAV VQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMR QFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGL FDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQG SILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLL	1132 aa

SEQ ID NO	名称	在端粒酶中的位置	序列	长度
[0080]			RLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEY GCVVNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQM PAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYART SIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLK CHSLFLDLQ VNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLP FHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAK NAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAF LLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTILD	

[0081] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种编码具有抗炎活性的肽的多核苷酸。该多核苷酸编码:包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列的肽、与上述序列具有超过80%同源性的肽、或为上述肽的片段的肽。上述多核苷酸使得能够大量制造该肽。例如,培养包括编码肽的多核苷酸的载体可容许大量制造该肽。

[0082] 本文所公开的肽可包括:包含同源性超过80%、超过85%、超过90%、超过95%、超过96%、超过97%、超过98%或超过99%的氨基酸序列的肽。并且,本发明所公开的肽可包括:包含SEQ ID NO:1或其片段的肽,和具有超过1个转变的(transformed)氨基酸、超过2个转变的氨基酸、超过3个转变的氨基酸、超过4个转变的氨基酸、超过5个转变的氨基酸、超过6个转变的氨基酸或超过7个转变的氨基酸的肽。

[0083] 在本说明书及权利要求书中,术语「同源性」及「序列同一性」可互换使用,以指示两条氨基酸(或核酸,如果有关的话)序列之间的序列重叠程度。

[0084] 除非另有说明,本文针对肽所用的术语「序列同一性」指的是按 $(n_{\text{ref}} - n_{\text{dif}}) \cdot 100 / n_{\text{ref}}$ 计算的序列同一性,其中 n_{dif} 是指当比对两个序列以使得相同的氨基酸数目最大时这两个序列中不相同的残基的数目,其中 n_{ref} 是指这些序列中最短的那个的残基数。因此,DNA序列agtcagtc与序列aatcaatc将具有75%的序列同一性($n_{\text{dif}}=2$ 且 $n_{\text{ref}}=8$)。

[0085] 在一些实施方式中,通过常规方法来确定序列同一性,例如:Smith和Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482;通过相似度寻找法(Pearson和Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444);使用CLUSTAL W算法(Thompson等, 1994, Nucleic Acids Res 22:467380);利用计算机执行这些算法(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)。也可使用BLAST算法(Altschul等, 1990, Mol. Biol. 215:403-10),其软件可通过美国国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/)获得。当使用任何上述算法时,使用「视窗(Window)」长度、空位罚分等的缺省参数。

[0086] 在本发明的一个实施方式中,氨基酸序列的改变属于对肽的物理和化学特性的修改。例如,可针对提高肽的热稳定性、改变底物特异性和改变最适pH来进行氨基酸转变(transformation)。

[0087] 在本发明的一个实施方式中,包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个的氨基酸序列的肽、包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽、或上述肽的肽片段优选由30个或更少个氨基酸组成。

[0088] 在本发明的一个实施方式中,包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个的氨基酸序列的肽、包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽、或上述肽的肽片段包含

源自端粒酶(更具体而言,智人(*Homo sapiens*)的端粒酶)的肽。

[0089] 本文的术语「氨基酸」不仅包括天然整合成肽的22种标准氨基酸,也包括D-异构物及转变的氨基酸。因此,在本发明的特定实施方式中,本文的肽包括具有D-氨基酸的肽。另一方面,肽可包括非标准氨基酸,例如那些经翻译后修饰的氨基酸。翻译后修饰的例子包括磷酸化、糖基化、酰化(包括乙酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化)、烷基化、羧基化、羟基化、糖化、生物素化、泛素化、化学性质转变(例如, β -消除脱酰亚胺作用、脱酰胺作用)及结构转变(例如,二硫键形成)。此外,也包括氨基酸的改变,氨基酸发生改变归因于在以用于形成肽缀合物的交联剂进行的结合过程中的化学反应。

[0090] 本文所公开的肽可以是已从天然来源鉴定并分离出的野生型肽。另一方面,当与SEQ ID NO:1的肽片段比较时,本文所公开的肽可以是包含一个或多个替换、缺失和/或插入的氨基酸的人工突变肽。野生型多肽中(不仅在人工突变肽中)的氨基酸变动包括不影响蛋白折叠和/或活化的保守性氨基酸替换。保守性替换的例子属于由以下氨基酸组成的组:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸及组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸及天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺及天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸及甲硫氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸)和小型氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸及苏氨酸)。通常不会改变特定活性的氨基酸替换已为本发明所属技术领域所知。最常发生的改变为Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly,以及相反的改变。保守性替换的其他实例示于下表2中。

[0091] 表2

[0092]

原始氨基酸	残基替换实例	优选的残基替换
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser

Trp (W)	tyr;phe	Tyr
Tyr (Y)	trp;phe;thr;ser	Phe
Val (V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	Leu

[0093] 通过选择在下列功效方面显著不同的替换来进行肽的生物性质的实质性转变：
(a) 在替换区域中维持多肽主干的结构(例如折叠片或螺旋三维结构)的功效；(b) 维持目标区域中的分子的电荷或疏水性的功效；或(c) 维持侧链体积的功效。天然残基可通过一般的侧链性质而分为以下组：

[0094] (1) 疏水性：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；

[0095] (2) 中性亲水性：cys、ser、thr；

[0096] (3) 酸性：asp、glu；

[0097] (4) 碱性：asn、gln、his、lys、arg；

[0098] (5) 影响链取向的残基：gly、pro；和

[0099] (6) 芳香性：trp、tyr、phe。

[0100] 可通过将上述类别的成员换成另一类别来进行非保守性替换。与维持肽的正确的三维结构无关的任何半胱氨酸残基通常都可以替换为丝氨酸，因而增加了分子的氧化稳定性并预防了不正确的交联。相反地，可通过将(多个)半胱氨酸键加入肽中来增进稳定性。

[0101] 肽的氨基酸变异的其他类型是抗体糖基化模式的改变。此处的术语「改变」是指碳水化合物残基的缺失和/或增加肽中不存在的至少一个糖基化残基。

[0102] 肽中的糖基化通常为N-连接型或O-连接型糖基化。本文的术语「N-连接型」是指碳水化合物残基接附至天冬酰胺残基的侧链上。作为三肽序列，天冬酰胺-X-丝氨酸及天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X为除了脯氨酸之外的任何氨基酸)为碳水化合物残基经由酶作用而附接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此，使一条这种三肽序列存在于多肽中，便产生了潜在的糖基化位置。「O-连接型糖基化」意指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种附接至羟基氨基酸上。最常见的羟基氨基酸为丝氨酸或苏氨酸，但也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0103] 通过改变氨基酸序列以含有上述三肽序列来将糖基化位点方便地加入肽中(以获得N-连接型糖基化位点)。这些改变可以通过将至少一个丝氨酸或苏氨酸残基加入第一抗体序列中或通过用这些残基进行替换来完成(以获得O-连接型糖基化位点)。

[0104] 在本发明的一个实施方式中，多核苷酸为核酸分子，其可为单链或双链的、天然的或人工的DNA或RNA分子。核酸分子可为相同类型的一个或多个核酸(例如，具有相同的核苷酸序列)，或为不同类型的核酸。核酸分子包含一种或多种DNA、cDNA、诱骗(decoy) DNA、RNA、siRNA、miRNA、shRNA、stRNA、snoRNA、snRNA、PNA、反义寡聚物、质粒及其它经修饰的核酸，但不限于此。

[0105] 已知HMGB1蛋白为细胞因子。其先经历乙酰化，并因外部刺激而移位至细胞质中。随后其被分泌至细胞外，因而扮演着致炎性细胞因子的角色。因为当此活性引起炎症时，HMGB1蛋白被分泌至细胞外，且炎症疾病(例如Churg strauss综合征、类风湿性关节炎和舍格伦综合征(Sjogren's syndrome))患者将呈现出升高的HMGB1血清水平。因此，如果即使在致炎刺激物存在时细胞核仍含有大量的HMGB1，则揭示了HMGB1未被分泌至细胞外的事实，这意味着炎症受到了抑制。

[0106] 在本发明的一个实施方式中,当用包含SEQ ID NO:2~179中的任一个氨基酸序列的肽处理细胞、用具有与上述序列的同源性超过80%的氨基酸序列的肽处理细胞、或用上述肽的片段处理细胞时,细胞核内的HMGB1量会增加。这代表上述肽具有卓越的炎症预防或抑制功效。

[0107] 并且,在本发明的特定实施方式中,包含SEQ ID NO:2~179中的任一个氨基酸序列的肽、具有与上述序列的同源性超过80%的氨基酸序列的肽、或上述肽的片段具有以下优点:因为在细胞内的毒性低,其具有高度可行性。

[0108] 在本发明中,「炎症性疾病」是宽泛的适应证,其指以炎症为主因的任何疾病或由疾病造成的炎症。具体而言,炎症性疾病包括:(1) 普遍的或局部的炎症性疾病(例如,过敏症;免疫复合物病;枯草热;超敏性休克;内毒素性休克;恶病质、过热;肉芽肿病;或结节病);(2) 胃肠相关疾病(例如,阑尾炎;胃溃疡;十二指肠溃疡;腹膜炎;胰腺炎;溃疡性结肠炎、急性结肠炎或缺血性结肠炎;胆管炎;胆囊炎、脂肪泻、肝炎、克罗恩氏病;或惠普尔氏病);(3) 皮肤相关疾病(例如,牛皮癣;烧伤;晒伤;皮炎;荨麻疹性疣或风团);(4) 血管相关疾病(例如,脉管炎;血管炎;心内膜炎;动脉炎;动脉硬化;血栓性静脉炎;心包炎;充血性心力衰竭;心肌炎;心肌缺血;结节性动脉周围炎;周期性狭窄;柏格氏病;或风湿热);(5) 呼吸道疾病(例如,哮喘;会厌炎;支气管炎;肺气肿;鼻炎;囊性纤维化;间质性肺炎;COPD(慢性阻塞性肺病);成人呼吸窘迫综合征;粉尘病;肺炎;细支气管炎;咽炎;肋膜炎;或鼻窦炎);(6) 骨骼、关节、肌肉及结缔组织相关疾病(例如,嗜伊红性肉芽肿;关节炎;关节痛;骨髓炎;皮炎;筋膜炎;佩吉特氏病;痛风;牙周病;类风湿性关节炎;重症肌无力;强直性脊柱炎;或滑膜炎);(7) 泌尿生殖系统失调(例如,附睾炎;阴道炎;前列腺炎;或尿道炎);(8) 中枢或周围神经系统相关疾病(例如,阿尔茨海默氏病;脑膜炎;脑炎;多发性硬化症;脑梗死;脑栓塞;格-巴二氏综合征;神经炎;神经痛;脊柱损伤;麻痹;或葡萄膜炎);(9) 病毒(例如,流行性感冒;呼吸道合胞病毒;HIV;乙型肝炎;丙型肝炎;或疱疹病毒)、感染性疾病(例如,登革热;或败血症)、真菌感染(例如,念珠菌病);或细菌、寄生虫及类似微生物感染(例如,弥散性菌血症;疟疾;盘尾丝虫病;或阿米巴病);(10) 自身免疫病(例如,甲状腺炎;红斑狼疮;古德帕斯丘综合征;同种异体移植排斥;移植物抗宿主病;或糖尿病);及(11) 癌症或肿瘤疾病(例如,霍奇金病),但不限于此。

[0109] 数十年来,治疗这些疾病的炎症组分已成为全球制药工业的主要目标,并且已开发出多种有用的治疗剂。例子包括皮质类固醇(被设计用来模拟皮质醇的效果的多种天然的、半合成的及合成的药剂,包括泼尼松龙、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、地塞米松、倍他米松、氟替卡松等)、环氧合酶抑制剂(非选择性抑制剂或cox-1选择性抑制剂,例如吲哚美辛、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)及阿司匹林,以及近来的cox-2选择性抑制剂,例如塞来考昔)、白三烯阻断剂(例如孟鲁司特)及抗-TNF(例如经修饰的单克隆中和抗体,包括英夫利昔单抗(Remicade™)和阿达木单抗(Humira™);TNF受体融合蛋白,例如依那西普(Enbrel™);以及小分子TNF- α 合成抑制剂,例如沙立度胺)。

[0110] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种包含肽作为活性成分的抗炎组合物。所述肽包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个氨基酸序列,所述肽与上述序列具有超过80%的同源性,或所述肽为上述肽的片段。

[0111] 在本发明的一个实施方式中,抗炎组合物可含有0.1 μ g/mg至1mg/mg、特别是1 μ g/

mg至0.5mg/mg、更特别是10 μ g/mg至0.1mg/mg的包含SEQ ID NO:2~179中的至少一个的氨基酸序列的肽、包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽、或上述肽的肽片段。当含有上述范围内的肽时,该组合物的所有安全性及稳定性均可得到满足,且就成本效益而言为适当的。

[0112] 在本发明的一个实施方式中,所述组合物可应用于所有动物,包括人、狗、鸡、猪、牛、羊、豚鼠及猴。

[0113] 在本发明的一个实施方式中,提供了用于以活性成分治疗或预防炎症性疾病的药物组合物,所述活性成分由以下肽组成:由来自SEQ ID NO:2~179的氨基酸序列构成的肽,包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽,或SEQ ID NO:1的肽片段。在本发明的一个实施方式中,所述药物组合物可以通过口服、直肠、经皮、静脉内、肌肉内、腹膜内、骨髓内、硬膜外或皮下方式来施用。

[0114] 口服施用的形式可以是(但不限于)片剂、丸剂、软胶囊或硬胶囊、颗粒剂、粉末、溶液或乳液。非口服施用的形式可以是(但不限于)注射剂、滴剂、洗剂、软膏、凝胶、乳膏、悬浮液、乳液、栓剂、贴片或喷雾剂。

[0115] 在本发明的一个实施方式中,若有需要的话,药物组合物可含有添加剂,例如稀释剂、赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、缓冲剂、分散剂、表面活性剂、着色剂、芳香剂或甜味剂。在本发明的一个实施方式中,药物组合物可以用本领域的常规工业方法来制造。

[0116] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物的活性成分可根据患者的年龄、性别、体重、病理及状态、施用途径或处方医师的判断而有所变化。本领域技术人员可基于这些因素来确定剂量,举例而言,每日剂量可以是(但不限于)0.1 μ g/kg/日至1g/kg/日,特别是1 μ g/kg/日至10mg/kg/日,更特别是10 μ g/kg/日至1mg/kg/日,更特别是50 μ g/kg/日至100 μ g/kg/日。在本发明的一个实施方式中,可以(但不限于)每日施用1至3次所述药物组合物。

[0117] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种用于改善或防止皮肤炎症的皮肤外用组合物。所述皮肤外用组合物可含有以下活性成分:包含来自SEQ ID NO:2~179的氨基酸序列的肽,包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽,或上述肽的肽片段。

[0118] 在本发明的另一个实施方式中,提供了一种用于改善或防止皮肤炎症的化妆品组合物。所述化妆品组合物可含有以下活性成分:包含来自SEQ ID NO:2~179的氨基酸序列的肽,包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽,或上述肽的肽片段。

[0119] 在本发明的一个实施方式中,可以以所有适于局部应用的形式提供外用组合物或化妆品组合物。例如,可提供溶液、通过将油相分散于水中而获得的乳液、通过将水分散于油相中而获得的乳液、悬浮液、固体、凝胶、粉末、糊剂、泡沫或气溶胶等形式。这些形式可用本领域的常规工业方法来制造。

[0120] 在本发明的一个实施方式中,在无损于主要效果的程度内,化妆品组合物可包含能够理想地增加主要效果的其它成分。在本发明的一个实施方式中,化妆品组合物可额外包含:保湿剂、软化剂、表面活性剂、UV吸收剂、防腐剂、杀真菌剂、抗氧化剂、pH调节剂、有机或无机色素、芳香剂、冷却剂或止汗剂。本领域技术人员可在无损本发明的目的及效果的程度内决定上述成份的配制比例,且基于化妆品组合物的总重量的配制比例可以为0.01重量%至5重量%,特别是0.01重量%至3重量%。

[0121] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种用于预防或抑制炎症的食品组合物。所

述食品组合物可含有以下活性成分：包含来自SEQ ID NO:2~179的氨基酸序列的肽、包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽、或上述肽的肽片段。

[0122] 在本发明的一个实施方式中，食品组合物的形式不限，而可以是例如颗粒、粉末、液体及固体形式。除了活性成分之外，每种形式都可以用由本领域技术人员适当选择的工业常用成分来形成，并且能够与其它成分一起增加效果。

[0123] 本领域技术人员可决定上述活性成分的剂量，且每日剂量可以是例如1μg/kg/日至10mg/kg/日，更特别是10μg/kg/日至1mg/kg/日，更特别是50μg/kg/日至100μg/kg/日，但不限于这些数量，并且可依照年龄、健康状态、并发症及其它多种因素而有所变化。

[0124] 在本发明的一个实施方式中，提供了用包含来自SEQ ID NO:2~179的氨基酸序列的肽、包含与上述序列具有超过80%的同源性的氨基酸序列的肽、或上述肽的肽片段来预防或治疗炎症性疾病的用途。

[0125] 在本发明的一个实施方式中，提供了一种通过将上述肽应用至患者来预防或治疗炎症性疾病的方法。

[0126] 在本发明的一个实施方式中，提供了一种用于预防或治疗炎症性疾病的试剂盒。该试剂盒可以包含：具有抗炎活性的肽或包含该肽的组合物，其中，所述肽包含SEQ IDNO:2~179中的任一个氨基酸序列，所述肽与上述序列具有超过80%以上的同源性，或者所述肽为上述肽的片段；以及包括该肽或组合物的施用剂量、施用途径、施用频率及适应证中的至少一种的使用说明书。

[0127] 本文所用的术语意在用来描述实施方式，而非限制本发明。前面没有数字的术语并非用来限制量，而是用来表示所用术语所指的事物可以超过一个。术语「包括」、「具有」、「由……构成」及「包含」应作开放性解释（即，「包括但不限于」）。

[0128] 提及数值范围是用来代替陈述该范围内的单独的数字，因此，除非明确指明，每个数字都可被解读为其中集合的单独的数字。所有范围的端值都包括在该范围内，且可以独立地组合。

[0129] 除非在上下文中有另外注明或明显矛盾，否则本文所述的所有方法都可以以合适的顺序进行。除非包括在权利要求中，否则任一个实施方式及所有实施方式或示例性语言（如使用「例如」的语言）的使用是为了更清楚地描述本发明，而非限制本发明的范围。本文中，权利要求书以外的任何语言都不应被解读为本发明的必需要素。除非另有定义，本文所用的科技术语具有本发明所属领域的技术人员所通常理解的意义。

[0130] 本发明的优选实施方式是本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读之前的描述后，优选实施方式的变化形式对本领域技术人员而言将是清楚的。本发明人希望本领域技术人员可充分使用这些变化形式，且本发明可以以本文所列方式以外的其它方式来实施。因此，在专利法允许下，本发明包括所附权利要求中所述的发明的关键点的等价形式及其变化形式。此外，除非上下文中另有明确陈述或矛盾，否则上述组成部分的任何组合情况中的所有可能的变化形式皆包括在本发明中。尽管通过示例性实施方式说明并示出了本发明，但本领域技术人员将充分理解，在不悖离权利要求所限定的本发明的精神及范围的情况下，在形式和细节上可以有多种变化。

[0131] 已知炎症细胞会释出肿瘤坏死因子(TNF)，特别是TNF-α，其造成多种细胞毒性反应、免疫反应及炎症反应。已知TNF-α涉及许多炎症性疾病和自身免疫病的发生及延长，且当

其被释放进入血液并全身作用时,会进一步导致严重的败血病和败血性休克。因为TNF- α 是与活体的免疫系统广泛相关的因子,所以正在积极地开发TNF- α 抑制剂。TNF- α 以非活性形式被生物合成,并因受到蛋白酶的切割而变成活性形式;负责该活化的酶称作肿瘤坏死因子转化酶(TACE)。因此,抑制TACE的物质可治疗、改善或防止归因于TNF- α 的疾病、病理状态、异常状态、困扰和不良症状等(KR2011-0060940A)。

[0132] 高迁移率族蛋白1(HMGB1)以高浓度存在于胸腺、淋巴结、睪丸中,以及胎儿肝脏中,并且除了肝细胞及脑细胞外,其通常存在于细胞核内。所述HMGB1蛋白具有由A-box、B-box及C-末端组成的3个结构域。

[0133] 据Tracey等,1999报道,HMGB1蛋白扮演着炎症诱导性细胞因子的角色,且所述HMGB1的炎症诱导机制是:通过外部刺激物导致HMGB1乙酰化,其随后从细胞核移动进入细胞质。此后,已知其会被分泌至细胞外,或被分泌至坏死的细胞外(Bonaldi T等,EMBO J, (22) 5551-60,2003)。

[0134] 通过附图、以下实施例及实验来进一步描述本发明,所述附图、实施例及实验仅为了阐明本发明的特定实施方式,且无论如何都不应被解释为限制本发明的范围。

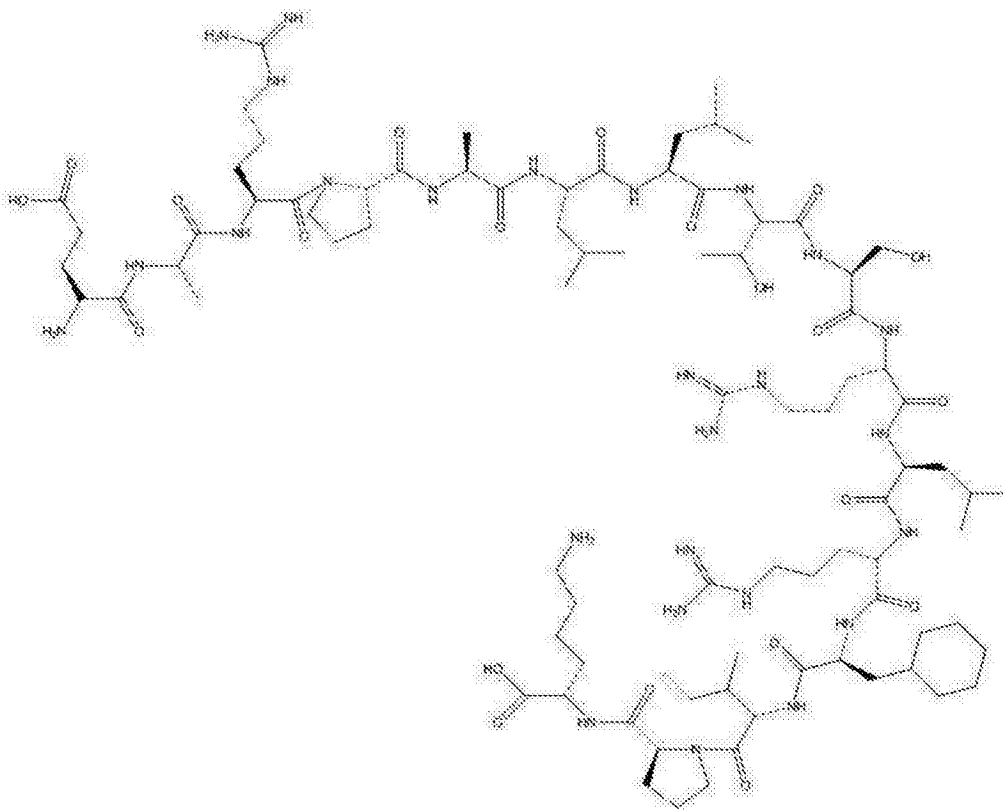
[0135] 实施例1

[0136] PEP-1的合成以及对PEP-1(SEQ ID NO:1)的抗炎活性的测量

[0137] 实验1:合成PEP-1(SEQ ID NO:1)

[0138] 合成了由16个氨基酸组成的具有如下化学结构1的肽(PEP-1),该肽源自人类端粒酶,序列为SEQ ID NO:1:

[0139] <化学结构1>



[0140]

[0141] SEQ ID NO:1(PEP-1)按照现有的固相肽合成方法合成。具体而言,通过Fmoc固相肽合成(SPPS)、使用ASP48S(Pepton, Inc., Daejeon, ROK)从C-端偶联各氨基酸,由此合成

肽。使用了下述肽(其C-端的第一个氨基酸附接至树脂):

[0142] $\text{NH}_2\text{-Lys (Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0143] $\text{NH}_2\text{-Ala-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0144] $\text{NH}_2\text{-Arg (Pbf)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0145] 用于合成肽的所有氨基酸材料在N-端都受到Fmoc保护,且氨基酸残基受到可溶于酸中的Trt、Boc、t-Bu(叔丁酯)、Pbf(2,2,4,6,7-五甲基二氢-苯并呋喃-5-磺酰基)的保护。例如:

[0146] Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Trp (Boc) -OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Ahx-OH、Trt-巯基乙酸。

[0147] 使用HBTU[六氟磷酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵]/HOBt[N-羟基苯并三唑]/NMM[4-甲基吗啉]作为偶联试剂。在20%的DMF中,使用哌啶移除Fmoc。为了从残基上移除保护或为了将合成的肽与树脂分离,使用切割混合剂[TFA(三氟乙酸)/TIS(三异丙基硅烷)/EDT(乙二硫醇)/ $\text{H}_2\text{O}=92.5/2.5/2.5/2.5$]。

[0148] 通过使用固相支架并重复以下过程来合成肽:氨基酸从氨基酸保护开始,使对应的氨基酸单独反应,用溶剂洗涤并除去保护。在从树脂上切下合成的肽之后,用HPLC进行纯化,并用MS验证合成状况,随后冷冻干燥。

[0149] PEP 1的具体合成过程描述如下。

[0150] 1) 偶联

[0151] 将受 $\text{NH}_2\text{-Lys (Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$ 保护的氨基酸(8当量)和偶联剂HBTU(8当量)/HOBt(8当量)/NMM(16当量)熔融并加入DMF中,随后使其在室温下反应2小时,接着用DMF、MeOH和DMF依次进行洗涤。

[0152] 2) Fmoc去保护

[0153] 将20%的哌啶加入DMF中并于室温下进行2次为期5分钟的反应,接着用DMF、MeOH和DMF依次进行洗涤。

[0154] 3) 通过重复进行反应1和2来制造肽的基本骨架。

[0155] 4) 切割:将切割混合剂加入完全合成的肽中,将肽与树脂分离。

[0156] 5) 将冷却用乙醚加入所获得的混合物中,随后用离心来沉淀出所收集的肽。

[0157] 6) 在用制备型HPLC纯化之后,用LC/MS检查分子量,冻干以产生粉末形式。

[0158] 实验2: PEP-1的抗炎活性测量

[0159] 细胞系培养

[0160] 在37℃和5%的 CO_2 下,将来自韩国细胞库(Korea Cell Bank)的Raw 264.7巨噬细胞(KCBL, 40071)维持在含有10%的胎牛血清(FBS; Gibco Laboratories)、100单位/mL的链霉素-青霉素(Gibco Laboratories)的达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM; PAA, 奥地利)中。以 1×10^6 个细胞/mL的密度将Raw 264.7细胞接种至96孔板中并温育过夜。

[0161] 次日,用新鲜的培养基替换上述培养基,并将5μg/mL的肽(按实验实施例1的描述获得)加至细胞中。将细胞与肽温育30分钟后,加入50μL LPS(至1μg/mL的最终浓度),并将细胞再温育24小时。用1μg/mL脂多糖(LPS; Sigma, USA)处理诱导了炎症应答的实验样品,并

用磷酸盐缓冲盐水 (PBS; pH 7.2) 处理对照样品。将来自每种条件的上清液样品收集于 eppendorf 管中, 并执行进一步分析。

[0162] 实验2-1: 分析NO水平

[0163] 使用 Griess 试剂系统 (Promega, USA) 测量 Raw 264.7 细胞 (1×10^6 个细胞/ml) 中的一氧化氮 (NO) 水平。将 50 μ l 培养基加入 96 孔板, 接着加入相同量的 Griess 试剂 I (NED) 溶液和 Griess 试剂 II (对氨基苯磺酰胺溶液)。将细胞与这些试剂温育 10 分钟, 之后, 使用微孔板读取仪 (Molecular Devices, USA) 在 30 分钟内测量 540nm 下的光密度。使用亚硝酸钠标准曲线 (0~100 μ M) 来计算 NO 的浓度。

[0164] 如下表 3 所示, 以 LPS 刺激细胞增加了 NO 的表达, 但在以 LPS 与 PEP-1 共同处理时, 上述 NO 表达水平降低了。NO 是在炎症期间产生的, 且结果显示 PEP-1 使 NO 水平减少至了对照的 65%, 这强力支持了 PEP-1 的抗炎效果。

[0165] 表 3: 源自人类端粒酶的 PEP-1 的抗炎效果测量

测试样品		相对于对照的 NO 表达水平(%)	降低的 NO 表达水平(%)
PBS		0	-
LPS 1 μ g/mL	PBS	100	0
	PEP 1 (0.5 μ g/mL)	35	65

[0167] 实验2-2: 对细胞因子抑制效果的分析

[0168] 为了研究 PEP-1 对抑制促炎细胞因子产生的影响, 以浓度为 5 μ g/mL 的 PEP-1 预先处理被浓度为 1 μ g/mL 的 LPS 激发的 RAW 264.7 细胞, 将细胞再温育 24 小时。收集含有细胞培养基的上清液样品, 并使用 ELISA 试剂盒 (eBioscience, San Diego) 分析细胞因子的水平。

[0169] 在 4 $^{\circ}$ C 下用 100 μ L 捕获抗体 (在涂布缓冲液中稀释至制造商的操作规程所建议的浓度) 涂布 96 孔板过夜。接着, 在洗涤该板 5 次之后, 每孔中加入 200 μ L 测定稀释液, 并于室温下温育 1 小时以进行封闭。在用洗涤缓冲液洗涤各孔 5 次之后, 将细胞培养物样品或每个细胞因子标准蛋白样品稀释, 并在每孔中加入 100 μ L 各样品。在 4 $^{\circ}$ C 下过夜温育含有样品的板。接着, 在用洗涤缓冲液洗涤该板 5 次之后, 加入 100 μ L 与抗生物素蛋白偶联的二抗, 并在室温下温育 1 小时。

[0170] 在与二抗温育之后, 洗涤该板 5 次, 并在室温下与 100 μ L 抗生物素蛋白-HRP (BD Bioscience) 温育 30 分钟。在洗涤该板 7 次之后, 加入 100 μ L TMB 溶液 (Pierce) 并在室温下温育 15 分钟。在各孔中加入 50 μ L 2N H_2SO_4 来终止反应。使用微孔板读取仪测量 450nm 下的光密度。使用 SPSS 程序的 ANOVA 操作进行方差分析, 从而进行统计学分析, 并使用邓肯氏多变域检验法来验证分析之间的显著性。

[0171] 实验2-3: IL-6 分泌测量

[0172] 如下表 4 所示, 仅用 LPS 处理增加了细胞因子 IL-6 (白介素-6) 的分泌。然而, 用 LPS 与 PEP-1 共同处理显示出促炎细胞因子 IL-6 分泌水平的下降。更重要地, 在用 PEP-1 处理后, 促炎细胞因子的分泌水平下降了超过 70%, 这表明了 PEP-1 的强健的抗炎效果。

[0173] 表 4: PEP-1 抑制细胞因子 IL-6 的产生

测试样品		细胞因子 IL-6 的产生	
		相对于对照的%	抑制%
PBS		0	-
LPS 1 μ g/ml	PBS	100	0
	PEP 1 (5 μ g/ml)	28	72

[0175] 实验2-4:HMGB1、TNF- α 、COX-2表达抑制

[0176] 利用蛋白质印迹分析来确定蛋白表达水平。用PBS洗涤在含PEP-1培养基中生长的细胞,用0.05%的胰蛋白酶-EDTA处理,并离心收集细胞。将收集的细胞溶解在适当体积的裂解缓冲液中。通过离心使细胞内碎屑变为沉淀块,并利用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳使来自各样品的等量蛋白分离。将分离的蛋白转移至硝化纤维膜(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)上,接着测试对每种蛋白的抗体特异性。将膜与ECL(增强的化学发光)溶液(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)一起温育;使其暴露于X光;并根据X光膜上显示的曝光程度来分析蛋白的表达水平。

[0177] 进行蛋白质印迹分析来确定PEP-1对细胞因子蛋白表达的抑制效果。如下表5所示,以LPS刺激细胞增加了细胞因子的表达(HMGB1、TNF- α 及COX)。然而,若用LPS和PEP-1同时处理细胞,上述促炎细胞因子的表达水平降低。结果显示,以PEP-1进行处理使促炎细胞因子水平下降了超过70%,这提供了有力的证据支持PEP-1的抗炎效果。

[0178] 表5:PEP-1对促炎细胞因子的表达水平的抑制效果测量

测试样品	细胞因子表达水平(条带强度) 相对于对照的%		
	HMGB1	TNF- α	COX-2
PBS	-	-	-
LPS 1 μ g/ml	100	100	100
PEP 1 (5 μ g/ml)	30	25	22

[0180] 实验3:Pep 1对HepG2细胞中的TNF- α 水平的抑制效果研究

[0181] 实验3-1:细胞培养

[0182] 使用Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) 从收集自健康受试对象的血样(50ml)中分离出PBMC(外周血单个核细胞)。随后将PBMC在含有20%的人血清的完全RPMI 1640培养基中富集,接着将其转移到涂布有人血清的100mm聚苯乙烯细胞培养板上30分钟。在37℃及5%的CO₂下温育2小时后,使用冷的PBS(磷酸盐缓冲盐水)(Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)使单核细胞(monocyte)从细胞培养板底部脱离,并且在96孔板的各个孔中,在RPMI 1640培养基(补充有青霉素-链霉素100mg/ml;人血清20%)中过夜培养 1×10^5 个细胞。

[0183] 在萤光素酶分析中,使用了从国立首尔大学牙医学院获得的HEK293/空白(人类胚胎肾脏)细胞及稳定表达TLR2(toll样受体2)的HEK293/TRL细胞。在萤光素酶实验前一天,将 2.5×10^5 个细胞接种至12孔板的各孔内,并在DMEM(达尔伯克改良的伊格尔培养基)培养基(补充有杀稻瘟素10 μ g/ml;胎牛血清10%)(Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)中培养过夜。

[0184] 实验3-2:细胞因子测定

[0185] 为了在蛋白表达水平方面观察PEP-1对TNF- α 水平的影响,进行了ELISA(酶联免疫吸附测定)。在96孔板中过夜培养 1×10^5 个源自PBMC的单核细胞。接着,以LPS(脂多糖; 10ng/ml, Sigma)处理2小时,随后以PBS洗涤3次。接着以OPTI-MEM培养基(Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)处理1小时以诱导饥饿,用4 μ M的FITC(异硫氰酸荧光素)、FITC-TAT、PEP-1-FITC及FITC-PEP-1处理2小时,而后测量TNF- α 水平。在培养后,收及细胞汤(cell soup),并使用ELISA试剂盒(R&D, Minneapolis, MN, USA)如下测量TNF- α 的量:

[0186] TNF测量使用了夹心式ELISA法。将100 μ l TNF- α 一抗加入预先涂布的96孔板的各孔中,并于4 $^{\circ}$ C下过夜温育该板。次日,以0.5%的Tween20洗涤溶液洗涤该板3次,每次5分钟,随后加入100 μ l的各样品和标准溶液,并于室温下放置2小时。以如上方式洗涤该板后,将100 μ l的HRP偶联的二抗加入各孔中,并于室温下放置2小时。再次洗涤96孔板,并加入抗生物素蛋白/生物素进行吸光度测量。使用从标准溶液的吸光度计算得到的标准图形来定量确定各样品的TNF- α 量。

[0187] 以内毒素LPS (10ng/ml) 刺激源自PBMC的单核细胞2小时,用OPTI-MEM使其饥饿1小时,接着以4 μ M的FITC、FITC-TAT、PEP 1-FITC及FITC-PEP 1处理2小时。温育之后,使用ELISA测量细胞培养基中的TNF- α 水平。结果,在FITC及FITC-TAT的情况中,TNF- α 水平因LPS而增加(分别为6.2ng/ml及6.7ng/ml),但在PEP-1-FITC及FITC-PEP-1的情况中,TNF- α 水平显著下降(分别为0.17ng/ml及0.25ng/ml),且该差异具有统计学显著性($P < 0.01$) (图1)。

[0188] 实验3-3: 萤光素酶分析

[0189] 为了研究PEP 1在炎症应答中的作用,发明人通过萤光素酶分析评估了NF- κ B表达模式。首先,在12孔板中温育HEK293/空白及HEK293/TLR2(国立首尔大学牙医学院) 24小时,以获得 2.5×10^5 个细胞/孔。在以PBS洗涤3次后,将培养基换成OPTI-MEM (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 并温育4小时,接着在每孔中加入3 μ l Lipofectamine (Invitrogen/Life Technologies)、1 μ g NF- κ B萤光素酶与10ng海肾萤光素酶 (Promega, Madison, WI, USA) 的混合物,并再次温育4小时。将脂蛋白pam3cys (10ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 置于除阴性对照之外的所有孔中,并以FITC (4 μ M) 及FITC-PEP 1 (4 μ M) 处理18小时,之后以PBS洗涤3次。在通过将双萤光素酶报告基因测定系统 (Promega) 所提供的50 μ l被动性裂解缓冲液置于每孔中以溶解(裂解)细胞之后,通过TD-20/20照度计 (Turner designs, Sunnyvale, CA, USA) 确认了NF- κ B的活化。通过共转染pCMV-海肾萤光素酶 (Promega) 确认了转染功效,且通过校准萤光素酶值来分析结果。

[0190] 在将NF- κ B萤光素酶转染至HEK293/空白及HEK293/TLR2细胞系后,用pam3cys (一种合成的脂蛋白) 与FITC (4 μ M) (阴性对照) 一起进行处理,并再次用pam3cys与FITC-PEP 1 (4 μ M) 一起处理并培养18小时。用双萤光素酶报告基因测定系统 (Promega) 所提供的被动性裂解缓冲液使细胞裂解,由此利用萤光素酶强度来测量NF- κ B的表达模式,结果显示,以脂蛋白处理或以FITC-PEP-1处理或未处理的HEK293/空白细胞之间并无差异。然而,当以脂蛋白 (TLR2的激动剂) 处理HEK293/TLR2细胞系时,与未处理的细胞相比,NF- κ B的表达有所增加($P < 0.01$),这确认了炎症应答的发生。此外,与未处理的细胞相比,当以FITC-PEP 1一起进行处理时,NF- κ B的表达增加;与用脂蛋白和FITC一起处理的阴性对照相比,表达减少($P < 0.01$) (图2)。最终能够确认,当以PEP 1一起处理时降低了可由TLR 2引起的炎症应答。

[0191] 实施例2

[0192] PEP RIA系列 (SEQ ID NO: 2~179) 肽的TNF- α 抑制效果

[0193] 基于实施例1的结果(其中,SEQ ID NO: 1 (PEP1) 具有TNF- α 抑制效果),使用肽SEQ ID NO: 2~179进行了实验,以确认它们的TNF- α 抑制效果。肽SEQ ID NO: 2~179的合成使用了与上述实施例1中相同的方法(用于合成PEP1的方法),但所添加的氨基酸不同。

[0194] 实验1: 细胞培养

[0195] 使用Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin, Germany) 从收集自健

康受试对象的血样(50ml)中分离出PBMC(外周血单个核细胞)层。将收集的PBMC在含有20%的人血清的RPMI 1640培养基中富集30分钟,接着将其转移到涂布有人血清的100mm聚苯乙烯细胞培养板上,并在37℃、5%CO₂的温育器中温育2小时。使用冷的PBS使单核细胞从板底部脱离,并且在96孔板中用RPMI 1640培养基(补充有青霉素-链霉素100mg/ml;人血清20%)温育过夜,以达到 1×10^5 个细胞/孔的数量。

[0196] 实验2:TNF- α 抑制效果分析

[0197] 进行了ELISA以查明PEP RIA系列肽如何影响TNF- α 水平。在96孔板中温育源自PBMC的单核细胞以达到 1×10^5 个细胞/孔的数量,随后用LPS(脂多糖;10ng/ml, Sigma)处理2小时。向已用PBS洗涤了三次的单核细胞中加入OPTI-MEM培养基以诱导细胞饥饿1小时,取4 μ M肽并温育2小时。存在三个阴性对照组。第一组未经任何处理。第二组用雌激素处理过(在本实验中,使用雌二醇作为一种雌激素)。第三组用LPS(10ng/ml)或用LPS(10ng/ml)+雌激素(20nM)处理过。已确认具有TNF- α 抑制活性的PEP1被用作阳性对照来测量TNF- α 抑制活性。温育后,遵循ELISA试剂盒手册(R&D, Minneapolis, MN, USA)测量TNF- α 。定量方法的细节可参见实施例1的实验2.2。

[0198] 使用上述方法,筛选出了具有TNF- α 抑制效果的肽。用内毒素LPS(10ng/ml)刺激源自PBMC的单核细胞2小时,并添加OPTI-MEM诱导细胞饥饿1小时,接着用4 μ M的179种肽处理和温育2小时。使用ELISA测量细胞培养基中的TNF- α 量,并通过与阴性对照和阳性对照进行比较来筛选出具有TNF- α 抑制效果的肽(图3至图23)。

[0199] 以下肽序列与仅用LPS处理的对照组相比显示出了TNF- α 抑制效果:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:174、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:177和SEQ ID NO:178。

[0200] 此外,以下肽序列与用LPS+雌激素处理的组相比显示出了TNF- α 抑制效果:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID

NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:174。

[0201] 实验3:对影响THP1细胞系中的TNF- α 水平的肽的分析

[0202] 使用人类急性单核细胞性白血病细胞系THP-1 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (Manassas, VA, USA)) 进行了实验。

[0203] 在96孔板中用RPMI 1640培养基温育THP-1细胞24小时以达到 1×10^5 个细胞/孔的数量,随后添加100 μ M PMA (12-肉豆蔻酸-13-乙酸佛波醇酯) 以分化成巨噬细胞。在用PMA使THP-1分化1天成为巨噬细胞后,用LPS处理2小时并洗去。饥饿1小时,随后用PEP1进行处理。

[0204] 用LPS (脂多糖;10ng/ml, Sigma) 处理在PMA下分化的THP-1细胞2小时,随后用PBS洗涤2次。向细胞中添加OPTI-MEM培养基以诱导细胞饥饿1小时,接着取1 μ M的179种肽并温育1小时。温育后,使用ELISA试剂盒测量TNF- α 水平,并筛选出使TNF- α 水平下降的肽 (图24至图46)。

[0205] 结果显示,与仅用LPS处理的对照组相比,肽序列SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:179看上去能够降低TNF- α 水平。此外,与用LPS+雌激素处理的组相比,选择SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:112和SEQ ID NO:113作为降低TNF- α 表达水平的肽。

[0206] 实施例3

[0207] 对由淀粉样- β 蛋白诱导的炎症应答的分析

[0208] HMGB1先经历乙酰化,并因外部刺激而移位至细胞质中。随后其被分泌至细胞外,因而扮演着致炎性细胞因子的角色。因为当此活性引起炎症时, HMGB1蛋白被分泌至细胞外,且炎性疾病 (例如Churg strauss综合征、类风湿性关节炎和舍格伦综合征) 患者将呈现出升高的HMGB1血清水平。因此,如果即使在致炎刺激物存在时细胞核仍含有大量的HMGB1,则揭示了HMGB1未被分泌至细胞外的事实,这意味着炎症受到了抑制。

[0209] 实验1:对由PEP-1的抗炎效果导致的神经干细胞存活及增殖的分析

[0210] 首先,根据实施例1中描述的制造方法来制备PEP-1。

[0211] 实验1-1:神经干细胞的培养及淀粉样- β 毒性评估

[0212] 从孕期13天的胚胎大鼠的头部移出皮质,之后将其与碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 培养一周,以获得神经干细胞。为了分析淀粉样 β 蛋白对神经干细胞的影响,以浓度为0至40 μ M的预先寡聚化的淀粉样 β 蛋白处理神经干细胞48小时,接着使用CCK-8测定、BrdU及TUNEL测定来进行细胞毒性评估 (参考BA Yankner等,1990及KN Dahlgren等,2002)。在发明人确认了在以20 μ M的淀粉样 β 蛋白处理时细胞存活率降至60% (参见图47及图48) 之后,

在后续实验中使用相同浓度的淀粉样 β 蛋白。

[0213] 实验1-2:以PEP-1处理时的细胞毒性评估

[0214] 为了评估PEP-1对培养的神经干细胞的影响,首先用熟知的方法(BA Yankner等,1990及KN Dahlgren等,2002)培养神经干细胞。接着,以不同浓度(0、1、10、50、100、200 μ M)的PEP-1处理48小时,接下来使用MTT测定、BrdU及TUNEL测定来评估细胞存活力及细胞增殖。0至200 μ M的PEP-1浓度在神经元系统中显得稳定,因为这些浓度没有抑制神经干细胞的生存及增殖(参见图49及图50)。

[0215] 实验1-3:以淀粉样 β 蛋白和端粒酶肽共同处理时的细胞毒性评估

[0216] 为了确定PEP-1是否有抑制由淀粉样 β 蛋白引起的神经毒性的效果,以20 μ M的淀粉样 β 蛋白和多种浓度的PEP-1共同处理48小时。使用MMT测定、CCK-8测定、LDH测定及TUNEL测定来测量细胞存活力及细胞凋亡,并用BrdU测定来测量神经干细胞增殖。

[0217] MMT测定及CCK-8测定的结果确认了10 μ M的PEP-1开始保护神经干细胞免受由淀粉样 β 引起的神经毒性的影响,且100 μ M提供了最有效的保护(参见图51)。进行了LDH测定作为评估细胞死亡程度的另一种方法,且确认了由淀粉样 β 导致的细胞死亡增加程度被PEP-1减少,且从1 μ M浓度开始即看到了功效(参见图52)。

[0218] 发明人还用BrdU测定确认了当以PEP-1处理时,因淀粉样 β 蛋白而减少的细胞增殖得到了恢复(参见图53)。

[0219] 由于神经干细胞的本质,细胞运动性是一种至关重要的因素。根据细胞运动性的实验结果,发明人确认,与对照相比,当以PEP-1处理时,因淀粉样 β 蛋白而减少的细胞增殖得到了恢复,且在浓度为10 μ M时细胞运动性增加得更多。这表示在未来的临床试验中,在干细胞移植前进行处理可以带来更有效的结果(参见图54)。

[0220] 为了确认神经干细胞损伤的程度,进行了TUNEL测定。在20 μ M淀粉样 β 蛋白处理组中,观察到了神经干细胞死亡显著增加;而当以1 μ M至100 μ M的PEP-1处理时,神经干细胞死亡减少(参见图55)。

[0221] 研究了PEP-1对淀粉样 β 蛋白引起的细胞凋亡起到保护效果的作用机制。首先,研究了PEP-1是否能将淀粉样 β 蛋白所造成的氧化性损伤降到最小。使用DCF-DA染色(Molecular Probes,Eugene,OR)观察用淀粉样 β 蛋白和PEP-1处理后的活性氧的产生上的变化。在活性氧因20 μ M淀粉样 β 蛋白而增加的组中,PEP-1(1 μ M、10 μ M、50 μ M)处理使增加的活性氧减少(参见图56)。

[0222] 实验1-4:对以PEP-1处理的组与未以PEP-1处理的组之间的蛋白表达水平的比较性分析

[0223] 通过2D电泳技术及抗体微阵列技术分析经PEP-1处理的组与未经PEP-1处理的组的蛋白表达水平。从实施例3的实验1-1中培养的神经干细胞中提取制备了200 μ g蛋白质组。此外,使用未经PEP-1处理的组作为相同条件下的比较组。

[0224] 使用12%的丙烯酰胺凝胶进行2D电泳。首先使用8.5 $\times$ 7cm的凝胶尺寸在P1 4~10N下进行凝胶电泳。电泳之后,用胶体考马斯蓝染色,随后使用PDQuest软件分析每个点,由此比较表达水平。

[0225] 使用MALDI-TOF MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)鉴定了超过1.5倍的表达水平差异。其中,鉴定了与炎症相关信号传导有关联的蛋白,例如i-NOS及HMGB-1(参见表

6)。蛋白表达水平的变化因淀粉样 β 蛋白而增加或减少了1.5倍,但还确认,当加入PEP-1时,表达水平被调控至接近阴性对照的水平(参见图57)。

[0226] 使用细胞信号传导试剂盒(CSAA1, Panorama™ Ab Microarray Cell Signaling kit)来进行抗体微阵列,用GenePix Personal 4100A扫描仪(Molecular Devices)扫描阵列载片,并用GenePix Pro 5.0(Molecular Devices)分析数据。

[0227] 下表6为通过2D电泳技术完成的对炎症相关蛋白的表达水平的分析。对照组呈现的是未经淀粉样 β 蛋白处理也未经PEP-1处理的细胞的蛋白表达水平。表6显示了基于对照组表达水平的蛋白表达水平增加或减少的倍数。

[0228] 根据分析结果,发明人确认,如下表6所示,炎症相关蛋白的过表达或表达不足受到了PEP-1的控制;蛋白表达水平接近阴性对照组的水平。

[0229] 表6

[0230]	蛋白质	阴性对照	以 20 μ g 淀粉样 β 蛋白处理的组(倍数)	以 20 μ g 淀粉样 β 蛋白+PEP 1 处理的组(倍数)
	HSP 70	1.0	-2.3	1.2
	HSP 90	1.0	-1.8	1.0
	HMGB1	1.0	-1.5	2.8
	GADD 153	1.0	1.6	1.2
	i-NOS	1.0	1.9	-1.1
	e-NOS	1.0	1.9	-1.1
	Pyk2	1.0	2.0	1.2
	MAP 激酶	1.0	2.2	1.0

[0231] 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/AKT信号传导途径在神经干细胞的生长及存活中扮演重要角色。PI3K途径被生长因子和调控因子活化,并参与对神经干细胞生长和存活的正常调控。AKT信号传导途径使多种促凋亡因子失效,包括熟知的凋亡信号传导分子GSK3 β 。

[0232] 为了进一步研究PEP-1的抗炎效果,发明人对HMGB1进行了蛋白质印迹,这是因为HMGB1在蛋白质分析中显示出了较大变化。结果,PEP-1的处理增加了诸如Ki67、pAKT、PI3K、HSTF-1及Bcl-2等抗凋亡蛋白的蛋白表达水平,并降低了诸如Bax、GSK3 β 、细胞色素c及半胱天冬酶-3等凋亡信号的蛋白表达水平(参见图58)。

[0233] HMGB1,一种与DNA结合的非组蛋白结构蛋白,在细胞内扮演多种角色;例如稳定核小体结构及调控基因表达。作为在炎症应答后期分泌的致炎物质之一,其在炎症被刺激时由巨噬细胞和单核细胞分泌,但当神经元显著受损并导致细胞坏死时,HMGB1会被分泌至细胞外,导致剧烈的炎症应答。在神经细胞的细胞质中,在HMGB1因淀粉样 β 处理而减少后,PEP-1处理使HMGB1增加,这反映了PEP-1抑制HMGB1因神经元细胞死亡而被分泌至细胞外的事实;因而表示PEP-1具有强的抗炎效果(参见图58)。

[0234] 此外,发明人研究了PEP-1对淀粉样 β 聚集的反应。在诱导淀粉样 β 聚集时,当以PEP-1处理时,抑制了蛋白聚集(参见图59(A)),而当用PEP-1处理已被诱导聚集的淀粉样 β 蛋白时,使蛋白发生了解聚(参见图59(B))。

[0235] 在PEP-1作用的机制中,发明人之前已确认了PI3K的细胞存活信号传导的增加以及PI3K的凋亡信号传导的减少。为了研究这些效果是直接还是间接的,发明人用PI3K抑制剂LY294002(Promega)进行了处理。结果,当以LY294002处理时,在PEP1处理后所增加的细胞存活力有所下降。因此,发明人能够得出如下结论:PI3K与PEP-1的神经保护效果直接相

关(参见图60)。

[0236] PEP-1抑制淀粉样 β 蛋白所导致的神经干细胞凋亡。并且,还确认了神经干细胞的细胞运动性的提高,由此表明了临床应用的多种可能性。对由 β -淀粉样蛋白引起的神经毒性的抑制效果通过以下现象而得到证实:PEP 1作用机制的抗炎效果、神经干细胞的存活因子的增加以及凋亡因子的减少、特别是PI3K信号传导途径及抗氧化效过的活化。

[0237] 实施例4

[0238] PEP RIA系列肽(SEQ ID NO:2~179)对由淀粉样- β 蛋白导致的炎症的效果

[0239] 实验1:细胞培养

[0240] 在用多聚L-赖氨酸(Sigma,Saint Louis,MO,USA)预先涂布的100mm盘(Corning,PA,USA)上,在包含10%热失活马血清、5%热失活胎牛血清、100单位/ml青霉素和100g/ml链霉素的RPMI 1640培养基(GIBCO,Grand Island,NY,USA)中,使未分化的PC12细胞(ATCC,Rockville,MD,USA)保持在对数生长期。在含有5%CO₂的潮湿气氛中于37℃下温育培养物。使培养物生长至50%融合,将其收集在不含Ca²⁺/Mg²⁺的含有1mM EDTA的Hank氏平衡盐溶液中。将细胞以1×10⁶个细胞/100mm盘的密度铺板,并温育24小时。为了进行神经元分化,使PC12细胞血清饥饿12小时(包含100单位/ml青霉素和100g/ml链霉素但不含马血清或胎牛血清的RPMI 1640培养基);之后,将细胞保持在无血清培养基中。两天后,将培养基更换为新鲜的无血清培养基。第三天,将NGF(50ng/ml,Sigma,Saint Louis,MO,USA)添加至培养基中,将培养物再保持三天。分化后,将nPC12细胞与20 μ M淀粉样 β 蛋白以及各种浓度的肽[0(对照)、1、10和50 μ M]一起温育48小时。

[0241] 实验2.蛋白质印迹分析

[0242] 通过蛋白质印迹分析了HMGB1的水平。简言之,用冷的PBS洗涤5×10⁶个细胞两次,在裂解缓冲液[50mM Tris(pH 8.0),150mM NaCl,0.02%叠氮化钠,0.2%SDS,100 μ g/ml苯基甲基磺酰氟(PMSF),50 μ l/ml抑肽酶,1%Igepal 630,100mM NaF,0.5%脱氧胆酸钠,0.5mM EDTA,0.1mM EGTA]中于冰上温育10分钟;在2000×g下离心10分钟以使未破碎的细胞和细胞核变为沉淀块,并在10,000×g下离心以使裂解物澄清。所使用的抗体为:抗HMGB1(1:1000,Cell Signaling,Beverly,MA,USA)和抗 β -微管蛋白(1:1000,Cell Signaling,Beverly,MA,USA)。用包含0.05%Tween-20(TBST)的Tris缓冲盐水洗涤膜,随后使用与HRP偶联的抗兔抗体(Amersham Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ,USA)进行处理,而后进行ECL检测(Amersham Pharmacia Biotech)。用图像分析仪(GE Healthcare,ImageQuant LAS 4000)对印迹进行定量。

[0243] 作为蛋白质印迹分析的结果,选出了显示出HMGB1在细胞中积累的肽。图60至图159是选出的肽的蛋白质印迹结果。这些图中的微管蛋白用于确认蛋白表达。所选的肽的序列如下:

[0244] SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID

NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:170、SEQ ID NO:171、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:178和SEQ ID NO:179。

- <110> 凯尔杰姆维克斯有限公司
金商在
- <120> 抗炎性肽及包含其的组合物
- <130> OF13P081/CN
- <150> KR 10-2012-0050529
<151> 2012-05-11
- <150> KR 10-2012-0050533
<151> 2012-05-11
- <150> KR 10-2012-0071989
<151> 2012-07-02
- <150> KR 10-2012-0104144
<151> 2012-09-19
- [0001] <150> KR 10-2012-0104207
<151> 2012-09-19
- <160> 180
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
- <400> 1
- Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
- <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15
Lys

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15
Pro Lys

[0002] <210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5 10 15
Ile Pro Lys

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys
20

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5 10 15
Arg Phe Ile Pro Lys
20

<210> 7
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

[0003]

<400> 7

Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5 10 15
Leu Arg Phe Ile Pro Lys
20

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
1 5 10 15
Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
20

<210> 9

<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr
1 5 10 15
Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
20

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

[0004] Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu
1 5 10 15
Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
20 25

<210> 11
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu
1 5 10 15
Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
20 25

<210> 12
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15
Lys Pro

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

[0006] His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15
Pro Lys Pro

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15
Pro Lys Pro Asp
20

<210> 19
<211> 19
<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro
1				5					10					15	
Lys	Pro	Asp													

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
1				5					10					15	
Ile	Pro	Lys	Pro												
				20											

[0007]

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
1				5					10					15	
Ile	Pro	Lys	Pro	Asp											
				20											

<210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1	5	10	15
	Ile	Pro Lys	Pro Asp Gly	
		20		
	<210>	23		
	<211>	21		
	<212>	PRT		
	<213>	智人		
	<400>	23		
	His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile			
	1	5	10	15
	Pro Lys	Pro Asp Gly		
		20		
	<210>	24		
	<211>	20		
[0008]	<212>	PRT		
	<213>	智人		
	<400>	24		
	Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro			
	1	5	10	15
	Lys Pro Asp Gly			
		20		
	<210>	25		
	<211>	21		
	<212>	PRT		
	<213>	智人		
	<400>	25		
	Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg			
	1	5	10	15
	Phe Ile Pro Lys Pro			
		20		

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10 15
Phe Ile Pro Lys Pro Asp
20

<210> 27
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

[0009] Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10 15
Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly
20

<210> 28
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10 15
Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
20

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
1				5				10					15		
Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu									
				20											

<210> 30

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile
1				5				10					15		
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu										
				20											

[0010]

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro
1				5				10					15		
Lys	Pro	Asp	Gly	Leu											
				20											

<210> 32

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu
1				5				10					15		
Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro										

20

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5 10 15
Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp
20

<210> 34
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

[0011]

<400> 34

Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5 10 15
Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly
20

<210> 35
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5 10 15
Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
20 25

<210> 36
<211> 26

<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu
1				5					10					15	
Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg						
			20					25							

<210> 37
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg
1				5					10					15	
Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg							
			20					25							

[0012]

<210> 38
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
1				5					10					15	
Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg								
			20												

<210> 39
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
20

<210> 40
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15
Lys Pro Asp Gly Leu Arg
20

[0013]

<210> 41
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5 10 15
Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro
20

<210> 42
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5 10 15
Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp
20

<210> 43
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg
1				5					10					15	
Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly							
			20					25							

<210> 44
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

[0014]

Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg
1				5					10					15	
Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu						
			20					25							

<210> 45
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg
1				5					10					15	
Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg					
			20					25							

<210> 46
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg
1				5					10					15	
Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro				
			20					25							

<210> 47

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu
1				5					10					15	
Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro					
			20					25							

[0015] <210> 48

<211> 26

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg
1				5					10					15	
Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro						
			20					25							

<210> 49

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
1				5					10					15	

Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
20 25

<210> 50
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
20

<210> 51
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

[0016]

<400> 51

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15
Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
20

<210> 52
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
1 5 10 15
Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro
20

<210> 53

<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser
1				5					10					15	
Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp							
			20					25							

<210> 54
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

[0017]

Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser
1				5					10					15	
Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly						
			20					25							

<210> 55
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser
1				5					10					15	
Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu					
			20					25							

<210> 56
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser
1				5				10						15	
Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg				
			20					25							

<210> 57
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57

Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser
1				5				10						15	
Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro			
			20					25							

<210> 58
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

[0018]

<400> 58

Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser
1				5				10						15	
Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile		
			20					25					30		

<210> 59
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59

Glu	Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg
1				5				10						15	
Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile			
			20					25							

<210> 60
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 60

Val	Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu
1				5				10					15		
Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile				
			20					25							

<210> 61
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61

[0019]

Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg
1				5				10					15		
Phe	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile					
			20					25							

<210> 62
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 62

Gln	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe
1				5				10					15		
Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile						
			20					25							

<210> 63
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 63

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20 25

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15
Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20

[0020]

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro

<210> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 66

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp

<210> 67
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp Gly

<210> 68
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68

[0021] Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp Gly Leu Arg
20

<210> 69
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp Gly Leu Arg Pro
20

<210> 70
<211> 23

<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20

<210> 71
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val
20

[0022]

<210> 72
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn
20 25

<210> 73
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

<210> 77
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77

Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys
1				5					10					15	
Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val		
			20					25					30		

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

[0024] Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15

<210> 79
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile
1				5					10				

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe

1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 81

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 82

[0025] Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5 10

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 84

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser

1 5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 86

[0026] Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 87

Glu Ala Arg Pro Ala Leu

1 5

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 88

Glu Ala Arg Pro Ala

	1	5
	<210> 89 <211> 4 <212> PRT <213> 智人 <400> 89 Glu Ala Arg Pro 1	
	<210> 90 <211> 3 <212> PRT <213> 智人 <400> 90 Glu Ala Arg 1	
[0027]	<210> 91 <211> 15 <212> PRT <213> 智人 <400> 91 Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys 1 5 10 15	
	<210> 92 <211> 14 <212> PRT <213> 智人 <400> 92 Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys	

1 5 10

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 93

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

[0028]

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 95

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 96

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 97

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 98

[0029] Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 99

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5

<210> 100

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 100

Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101

Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

<210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

[0030] Phe Ile Pro Lys
1

<210> 103
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Ile Pro Lys
1

<210> 104
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro

	1	5	10
	<210> 105 <211> 12 <212> PRT <213> 智人 <400> 105 Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile 1 5 10		
	<210> 106 <211> 10 <212> PRT <213> 智人 <400> 106		
[0031]	Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe 1 5 10 <210> 107 <211> 8 <212> PRT <213> 智人 <400> 107 Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg 1 5 <210> 108 <211> 6 <212> PRT <213> 智人 <400> 108 Leu Leu Thr Ser Arg Leu		

	1	5
	<210> 109 <211> 4 <212> PRT <213> 智人 <400> 109 Leu Thr Ser Arg 1	
	<210> 110 <211> 13 <212> PRT <213> 智人 <400> 110	
[0032]	Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile	
	1	5 10
	<210> 111 <211> 12 <212> PRT <213> 智人 <400> 111 Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe 1 5 10	
	<210> 112 <211> 11 <212> PRT <213> 智人 <400> 112 Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg	

1 5 10

<210> 113
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5 10

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

[0033] Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
1 5

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr

1 5

<210> 117

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 117

Ala Arg Pro Ala Leu Leu

1 5

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 118

[0034] Ala Arg Pro Ala Leu
1 5

<210> 119

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 119

Ala Arg Pro Ala

1

<210> 120

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 120

Ala Arg Pro

1

<210> 121

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 121

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 122

[0035] Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5 10

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 123

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 124

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg

1 5

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 125

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser

1 5

<210> 126

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

[0036] Arg Pro Ala Leu Leu Thr
1 5

<210> 127

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 127

Arg Pro Ala Leu Leu

1 5

<210> 128

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 128

Arg Pro Ala Leu

1

<210> 129

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 129

Arg Pro Ala

1

<210> 130

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 130

[0037] Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 131

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile

1

5

10

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 132

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg

1 5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 133

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu

1 5

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 134

[0038] Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg

1 5

<210> 135

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 135

Pro Ala Leu Leu Thr Ser

1 5

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 136

Pro Ala Leu Leu Thr

1 5

<210> 137
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137

Pro Ala Leu Leu
1

<210> 138
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138

[0039] Pro Ala Leu
1

<210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 139

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 140

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe

	1	5
	$\langle 210 \rangle$ 141	
	$\langle 211 \rangle$ 7	
	$\langle 212 \rangle$ PRT	
	$\langle 213 \rangle$ 智人	
	$\langle 400 \rangle$ 141	
	Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu	
	1	5
	$\langle 210 \rangle$ 142	
	$\langle 211 \rangle$ 6	
	$\langle 212 \rangle$ PRT	
	$\langle 213 \rangle$ 智人	
	$\langle 400 \rangle$ 142	
[0040]	Ala Leu Leu Thr Ser Arg	
	1	5
	$\langle 210 \rangle$ 143	
	$\langle 211 \rangle$ 5	
	$\langle 212 \rangle$ PRT	
	$\langle 213 \rangle$ 智人	
	$\langle 400 \rangle$ 143	
	Ala Leu Leu Thr Ser	
	1	5
	$\langle 210 \rangle$ 144	
	$\langle 211 \rangle$ 4	
	$\langle 212 \rangle$ PRT	
	$\langle 213 \rangle$ 智人	
	$\langle 400 \rangle$ 144	
	Ala Leu Leu Thr	

1

<210> 145

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 145

Ala Leu Leu

1

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 146

[0041] Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 147

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 148

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe

1 5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 149

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg

1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 150

[0042] Leu Leu Thr Ser Arg
1 5

<210> 151

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 151

Leu Leu Thr Ser

1

<210> 152

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 152

Leu Leu Thr

1

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 153

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro

1

5

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 154

[0043]

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile

1

5

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 155

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe

1

5

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 156

Leu Thr Ser Arg Leu Arg

1 5

<210> 157
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157

Leu Thr Ser Arg Leu
1 5

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 158

[0044] Leu Thr Ser
1

<210> 159
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 159

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 160

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile

1 5

<210> 161

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 161

Thr Ser Arg Leu Arg Phe

1 5

<210> 162

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 162

[0045] Thr Ser Arg Leu Arg
1 5

<210> 163

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 163

Thr Ser Arg Leu

1

<210> 164

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 164

Thr Ser Arg

1

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 165

Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro

1 5

<210> 166

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 166

[0046] Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

<210> 167

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 167

Ser Arg Leu Arg Phe

1 5

<210> 168

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 168

Ser Arg Leu Arg

1

<210> 169

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 169

Ser Arg Leu

1

<210> 170

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 170

[0047] Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5

<210> 171

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 171

Arg Leu Arg Phe Ile

1 5

<210> 172

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 172

Arg Leu Arg Phe

1

<210> 173

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 173

Arg Leu Arg

1

<210> 174

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 174

[0048]

Leu Arg Phe Ile Pro

1

5

<210> 175

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 175

Leu Arg Phe Ile

1

<210> 176

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 176

Leu Arg Phe

1

<210> 177
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 177

Arg Phe Ile Pro
1

<210> 178
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 178

[0049] Arg Phe Ile
1

<210> 179
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 179

Phe Ile Pro
1

<210> 180
<211> 1132
<212> PRT
<213> 智人

<400> 180

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser

	1			5					10					15		
	His	Tyr	Arg	Glu	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly
				20					25					30		
	Pro	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg
			35					40					45			
	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Val	Pro	Trp	Asp	Ala	Arg	Pro
	50						55				60					
	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Gln	Val	Ser	Cys	Leu	Lys	Glu	Leu
	65					70					75				80	
	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Cys	Glu	Arg	Gly	Ala	Lys	Asn	Val
				85						90				95		
	Leu	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro
				100					105					110		
	Glu	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Thr
			115					120					125			
	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val
	130						135					140				
	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val
	145					150					155				160	
	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr
				165						170				175		
[0050]	Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	His	Ala	Ser	Gly
				180					185					190		
	Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg
			195					200					205			
	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg
	210						215					220				
	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg
	225					230					235				240	
	Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp
				245						250				255		
	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val
			260						265					270		
	Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala
			275					280					285			
	Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His
	290						295					300				
	Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro
	305					310					315				320	
	Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly
				325						330					335	
	Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro
			340						345					350		
	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

705	710	715	720
Pro Gln Asp Arg	Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln		
	725	730	735
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His			
	740	745	750
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp			
	755	760	765
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser			
	770	775	780
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu			
785	790	795	800
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His			
	805	810	815
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro			
	820	825	830
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp			
	835	840	845
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu			
	850	855	860
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala			
865	870	875	880
Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys			
	885	890	895
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu			
	900	905	910
Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe			
	915	920	925
Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser			
	930	935	940
Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe			
945	950	955	960
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly			
	965	970	975
Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn			
	980	985	990
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln			
	995	1000	1005
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln			
	1010	1015	1020
Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp			
	1025	1030	1035
Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly			
	1040	1045	1050
Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu			

[0052]

	1055		1060		1065
	Ala Val Gln Trp Leu Cys His	Gln Ala Phe Leu Leu	Lys Leu Thr		
	1070		1075		1080
	Arg His Arg Val Thr Tyr Val	Pro Leu Leu Gly Ser	Leu Arg Thr		
	1085		1090		1095
[0053]	Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg	Lys Leu Pro Gly Thr	Thr Leu Thr		
	1100		1105		1110
	Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn	Pro Ala Leu Pro Ser	Asp Phe Lys		
	1115		1120		1125
	Thr Ile Leu Asp				
	1130				

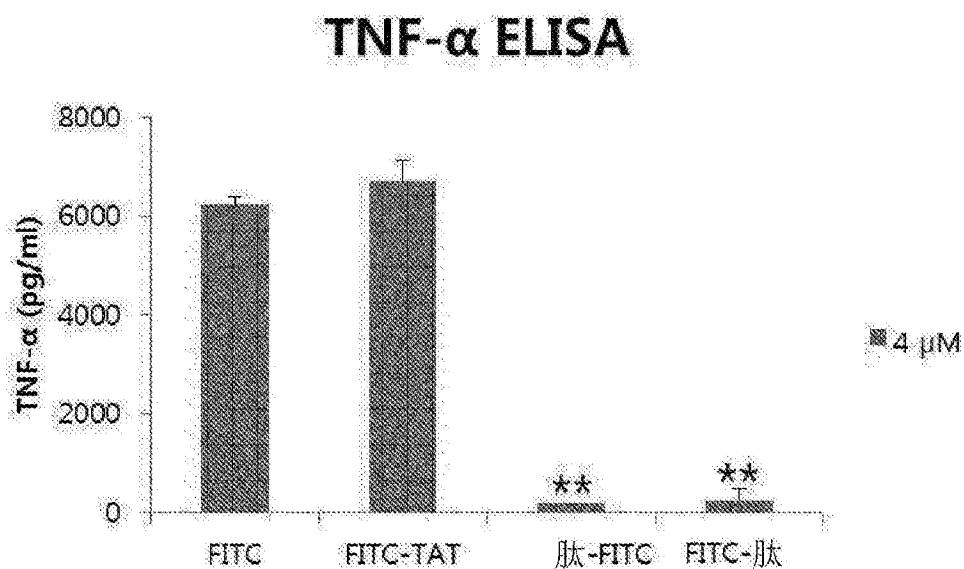


图1

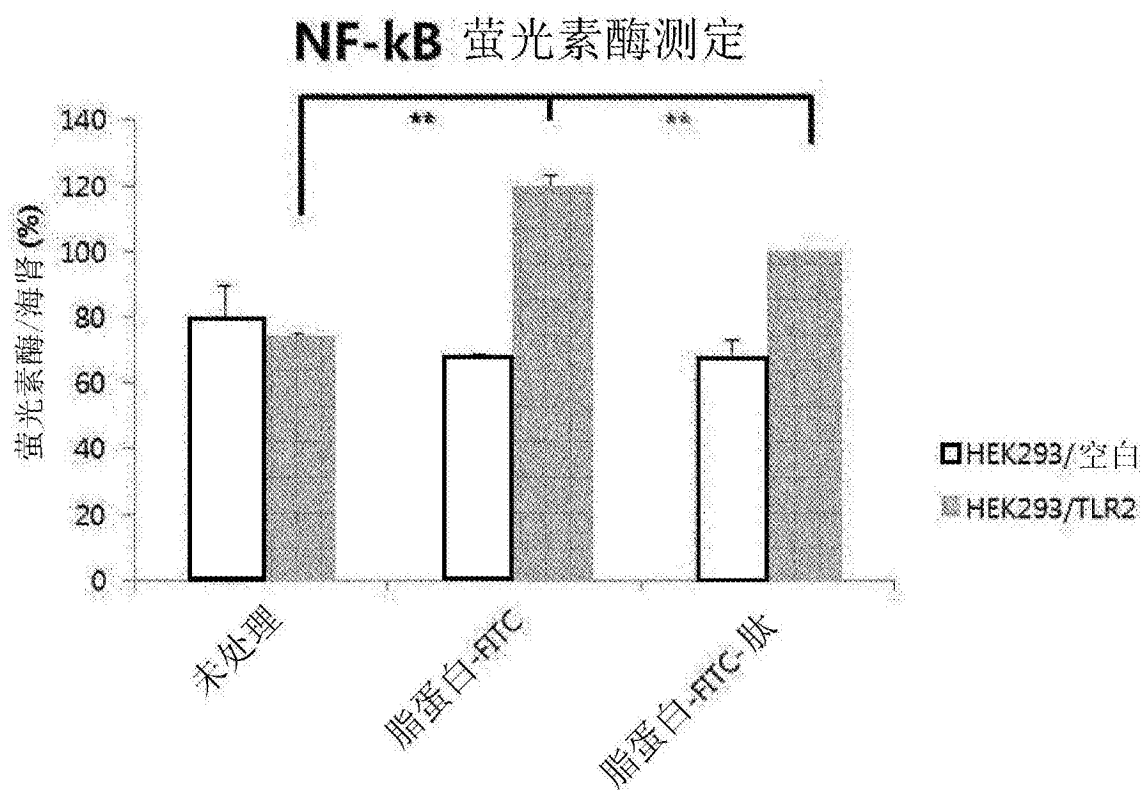


图2

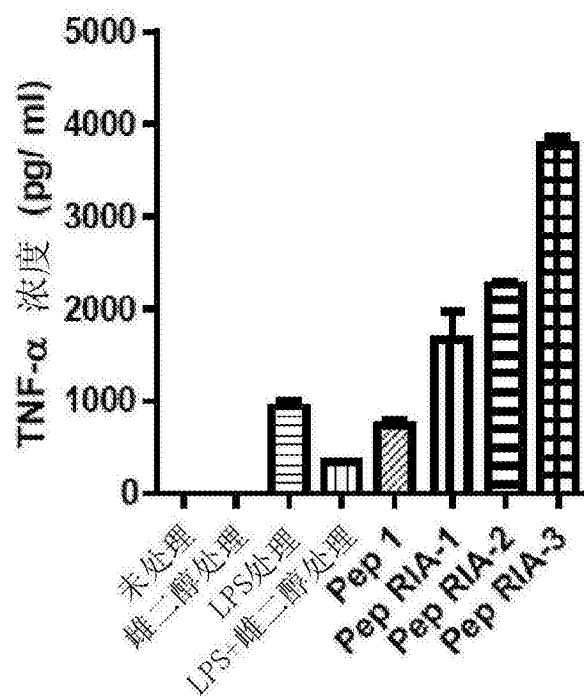


图3

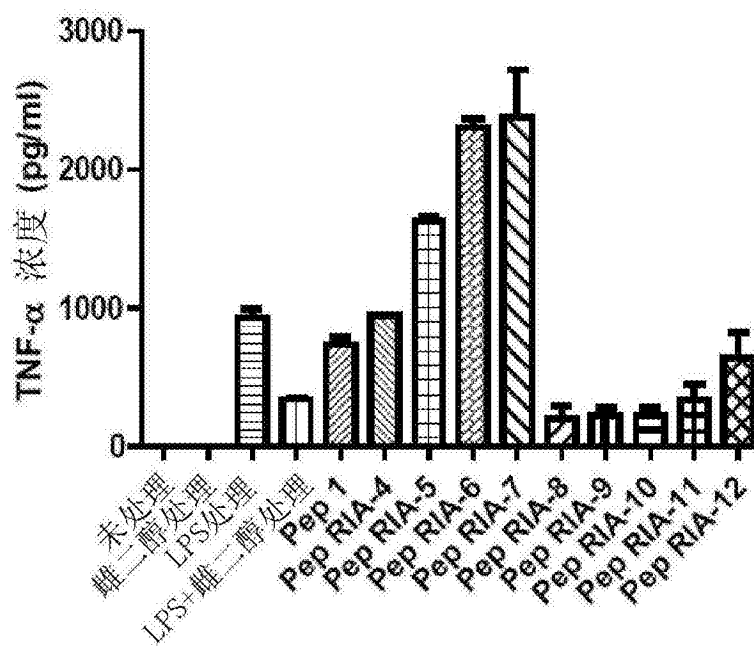


图4

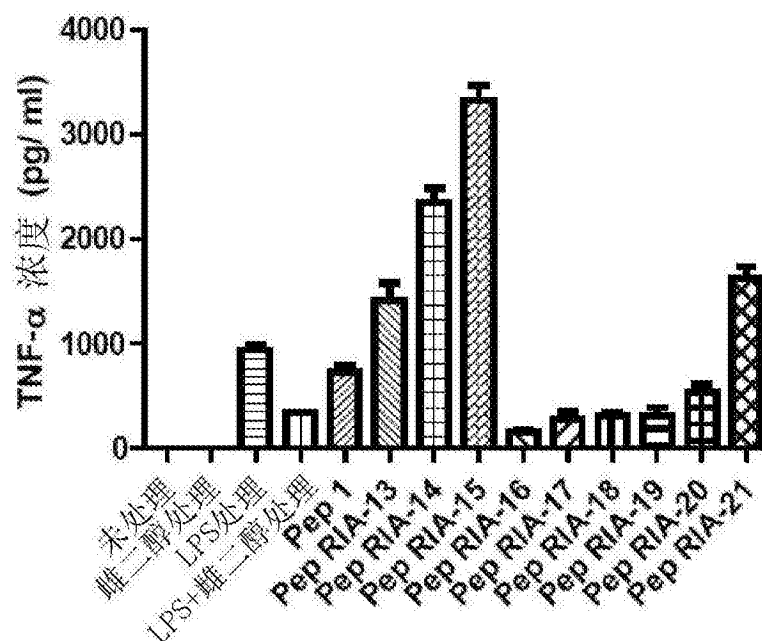


图5

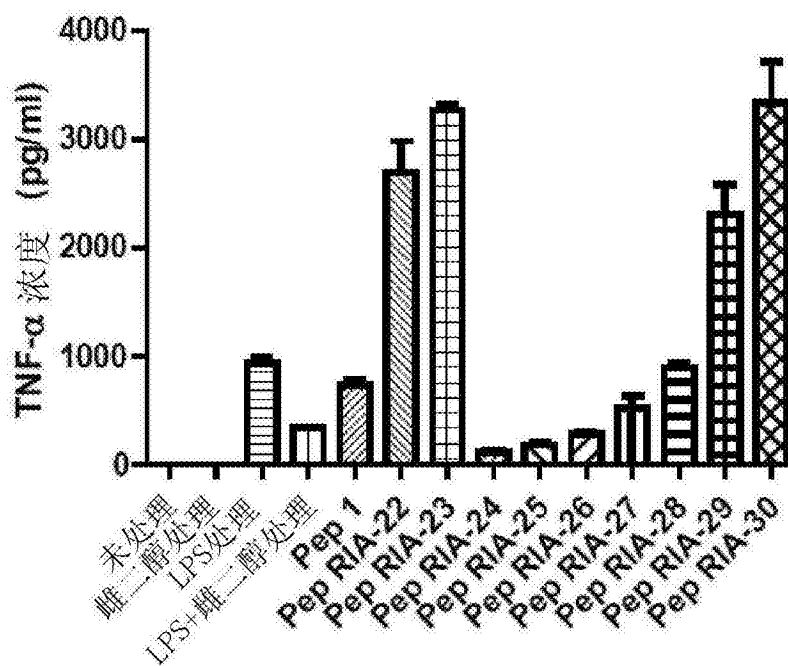


图6

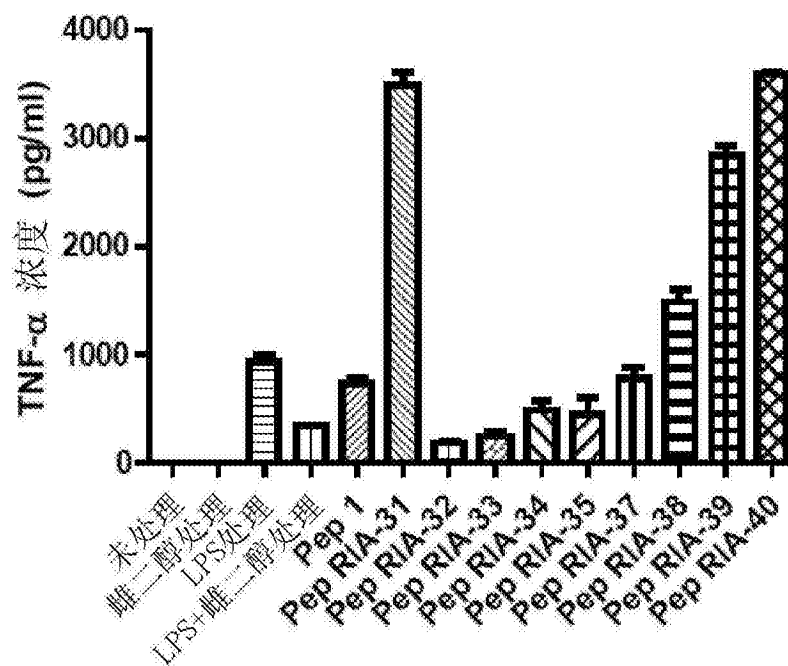


图7

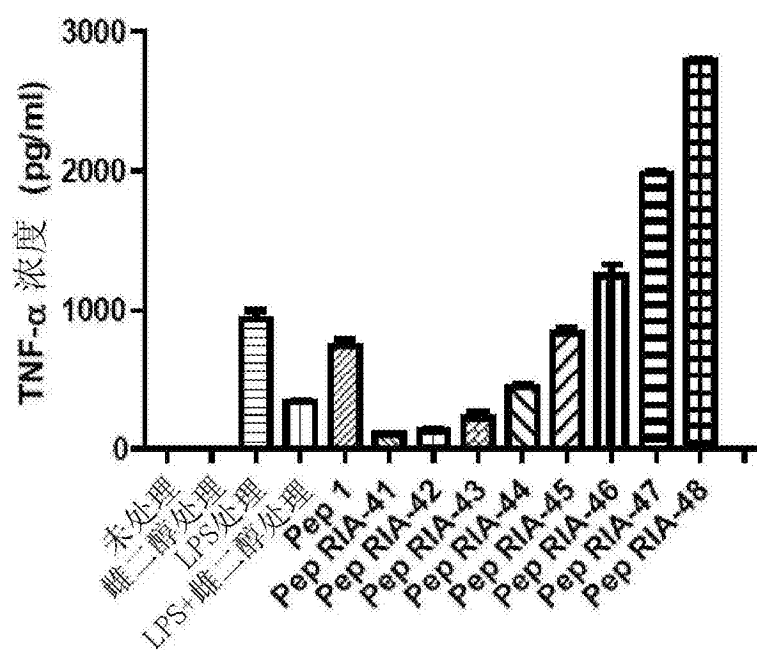


图8

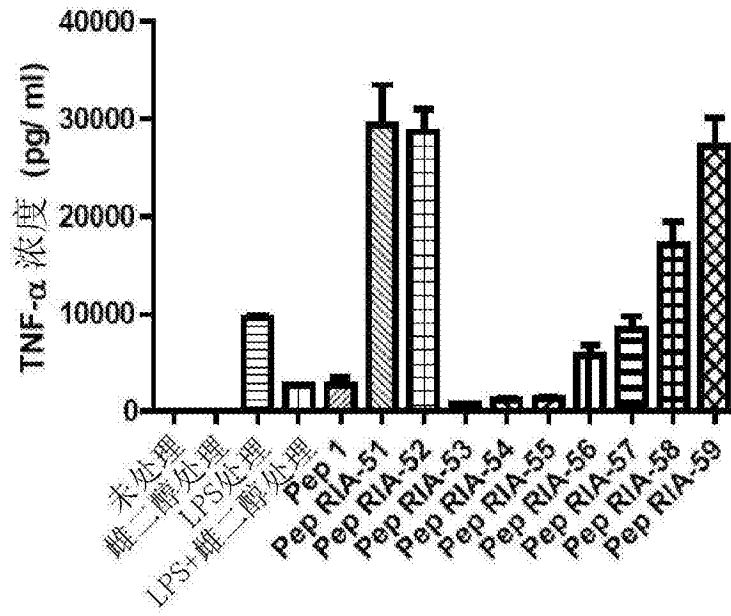


图9

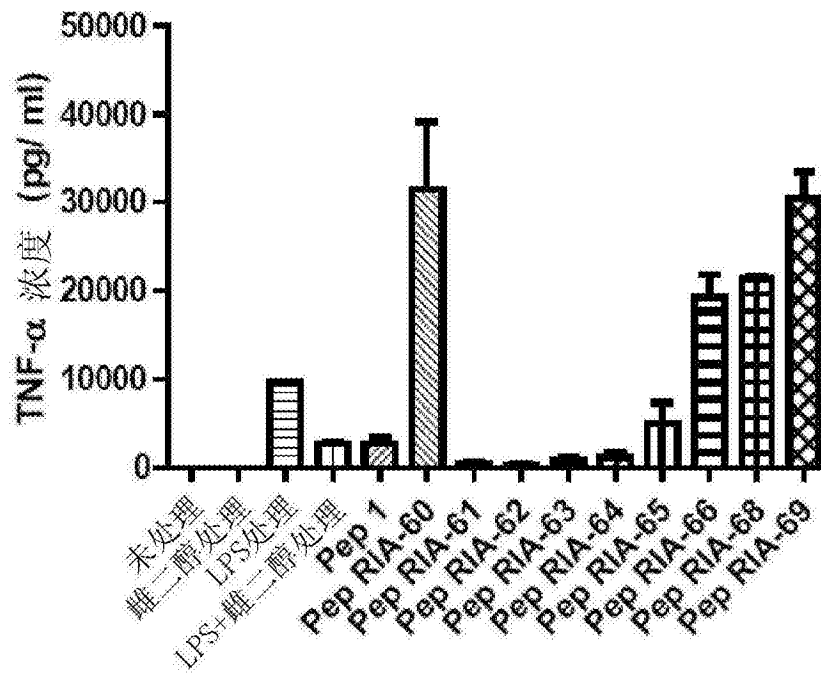


图10

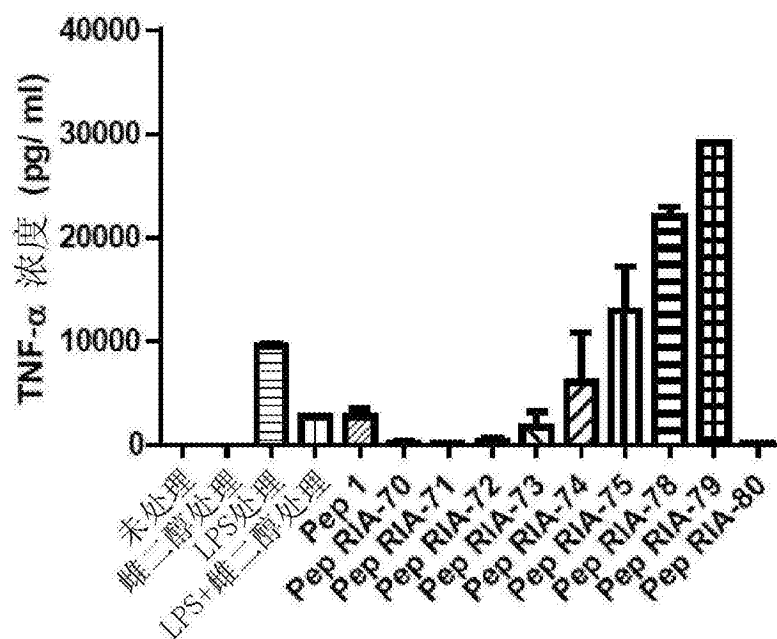


图11

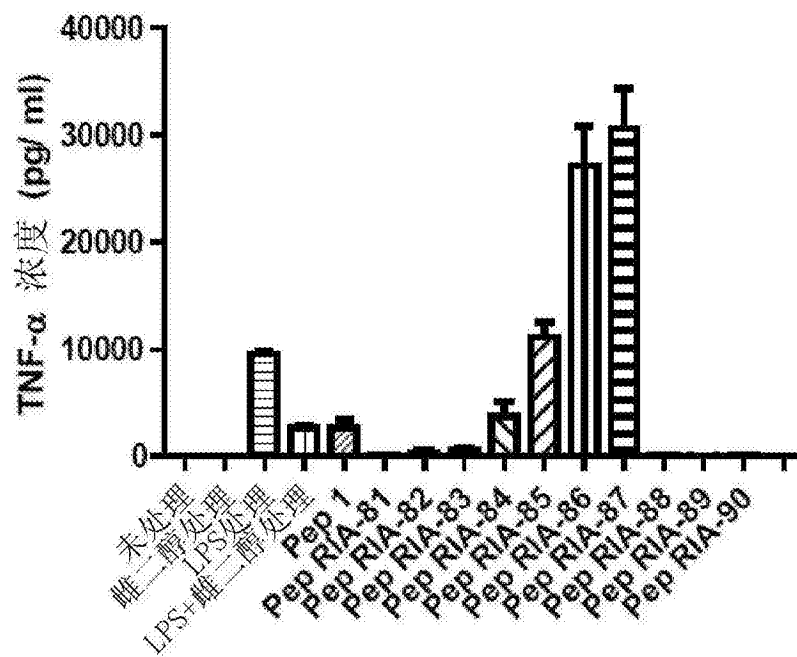


图12

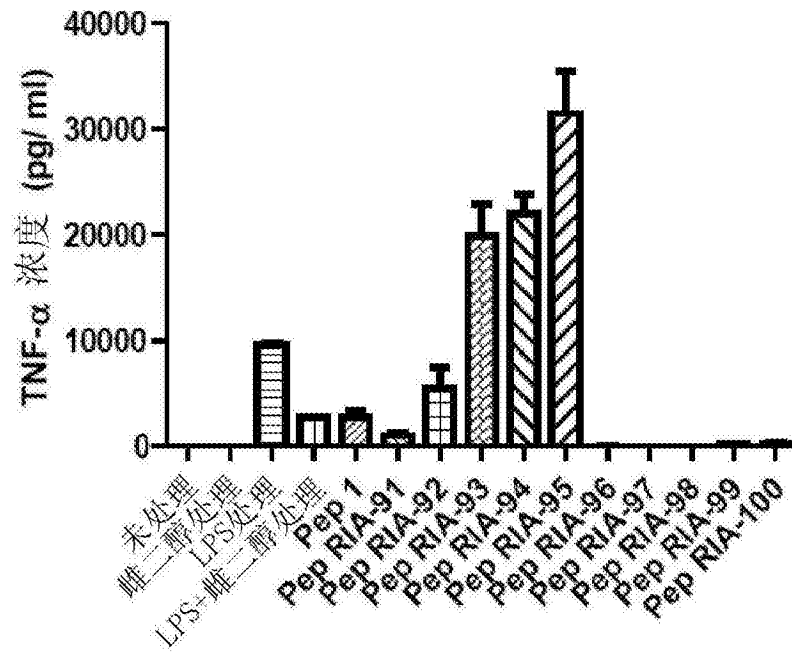


图13

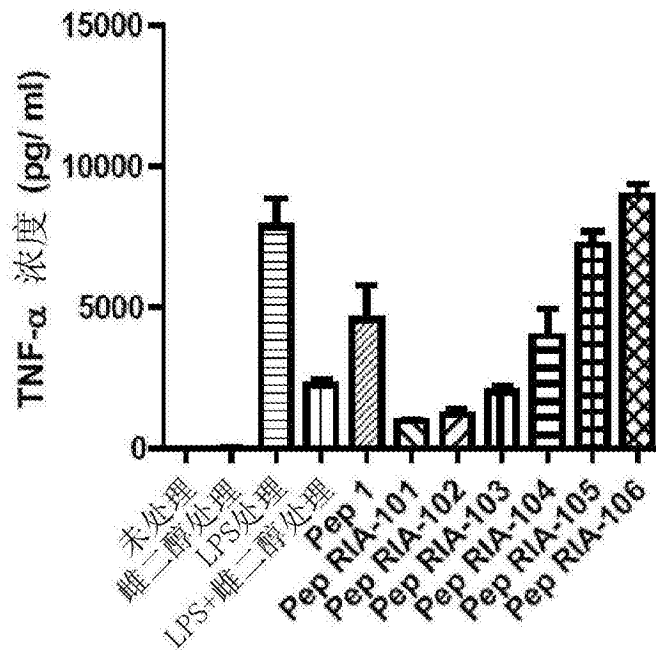


图14

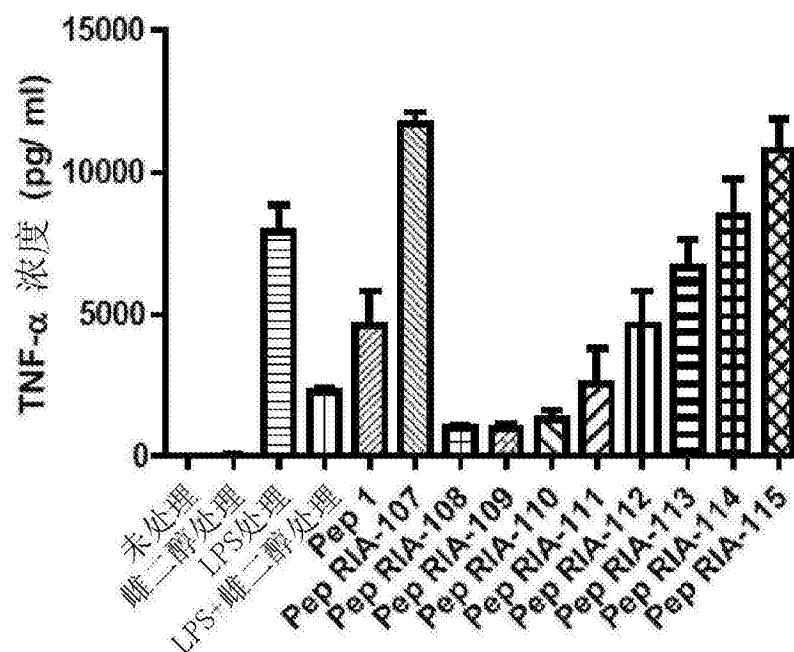


图15

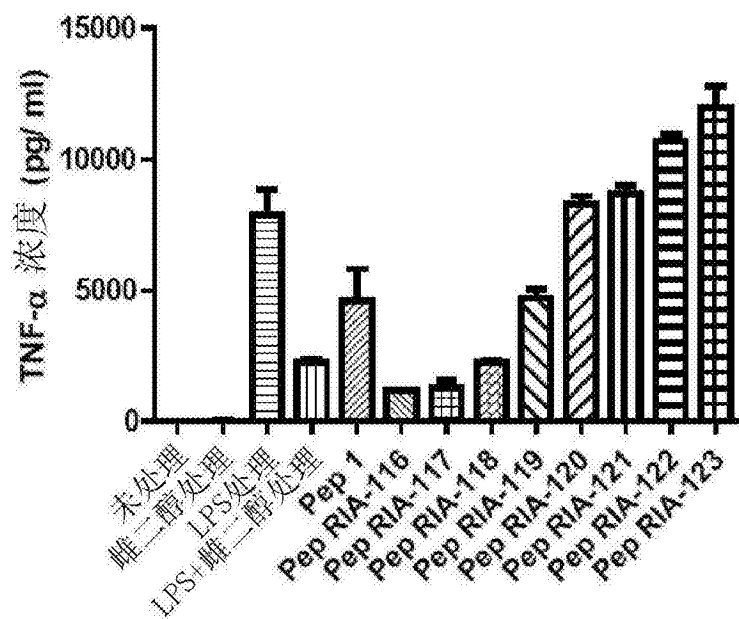


图16

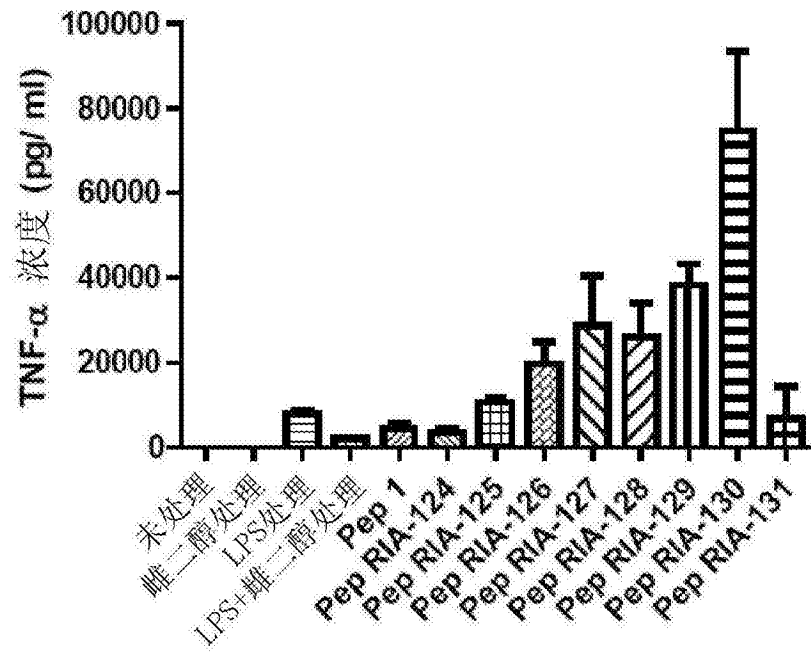


图17

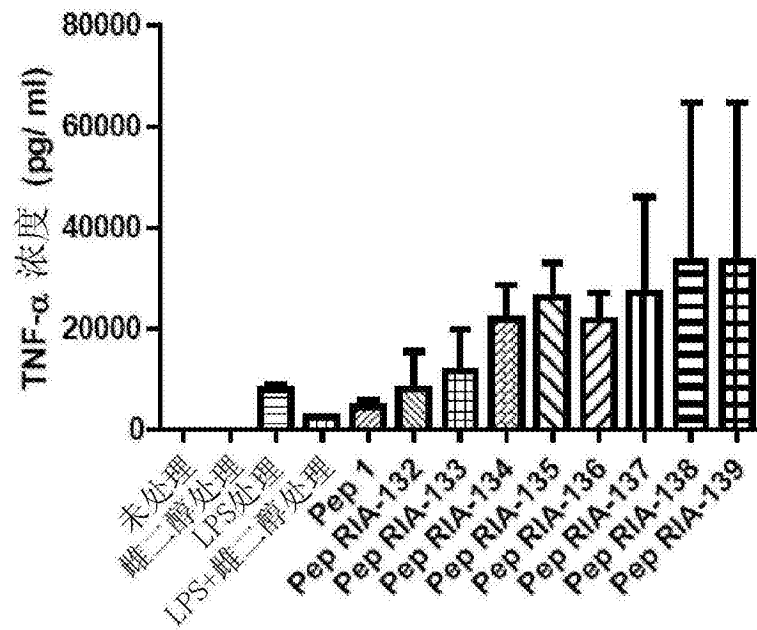


图18

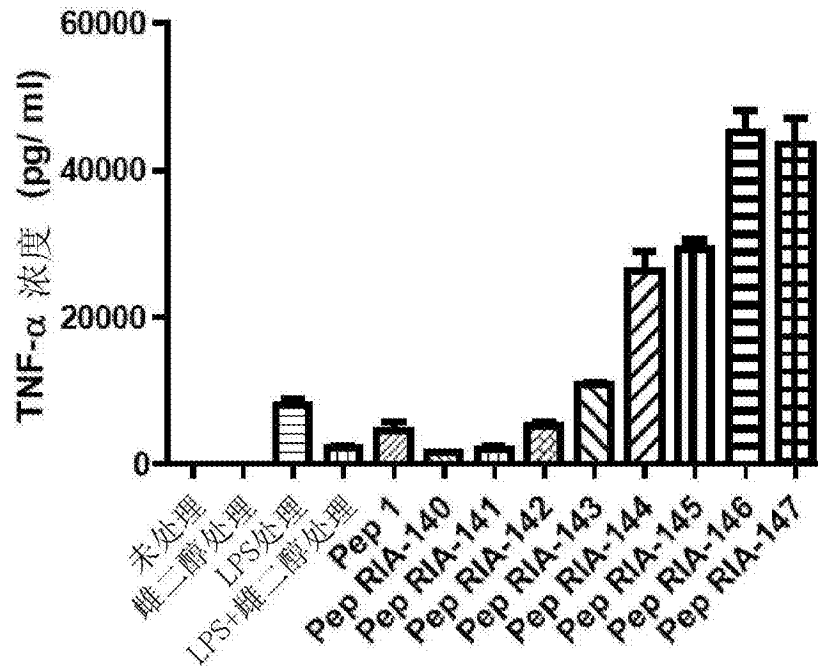


图19

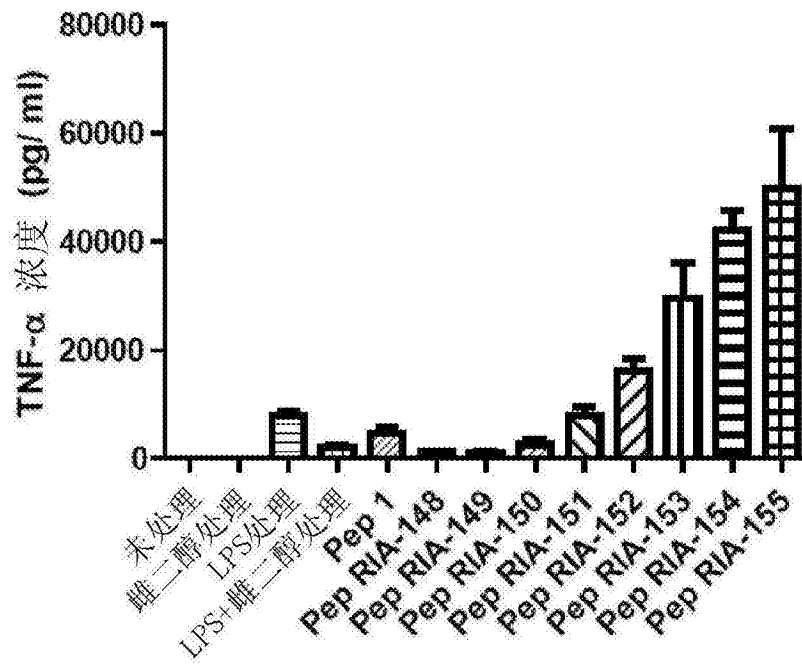


图20

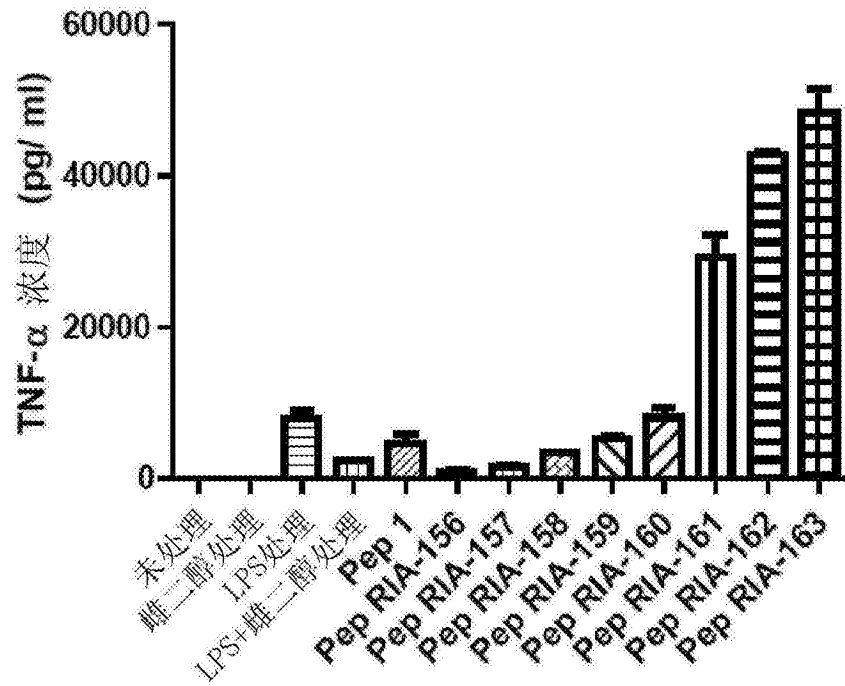


图21

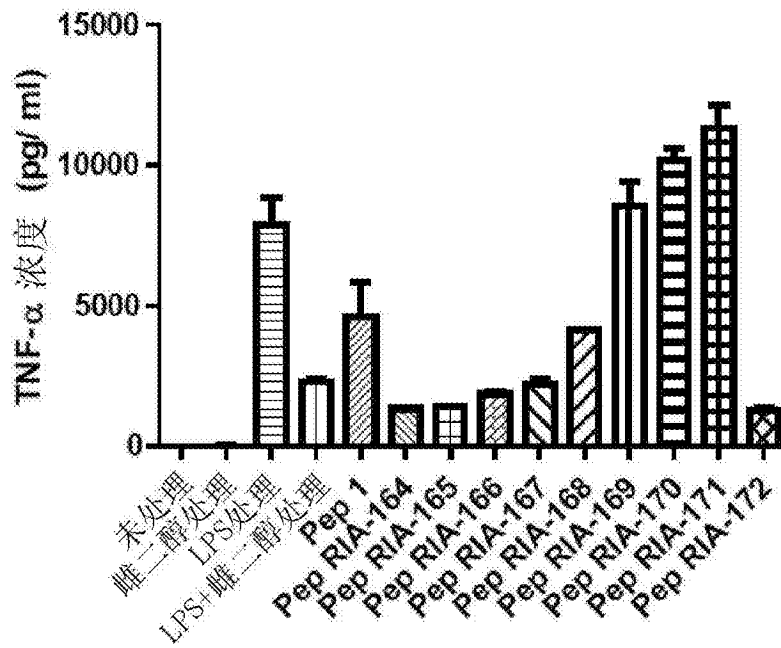


图22

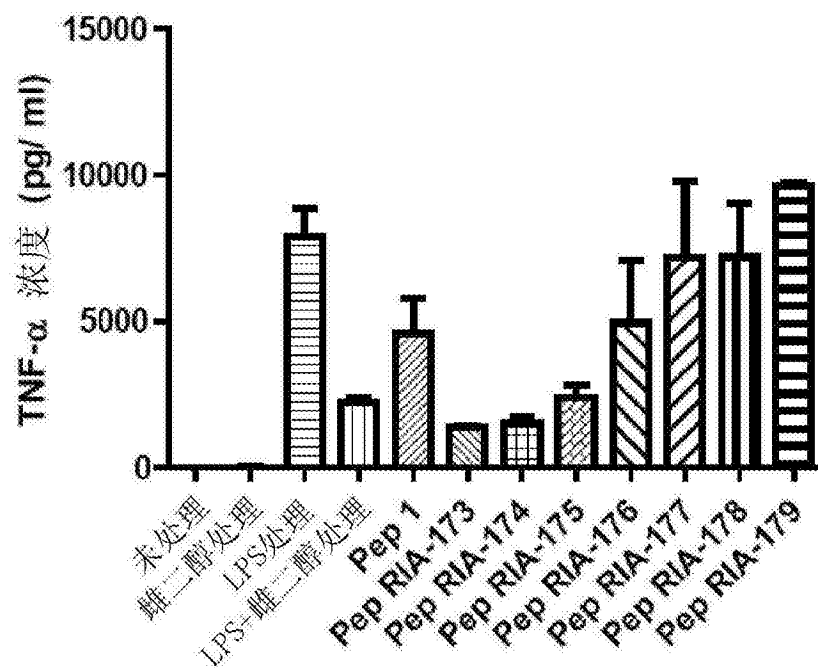


图23

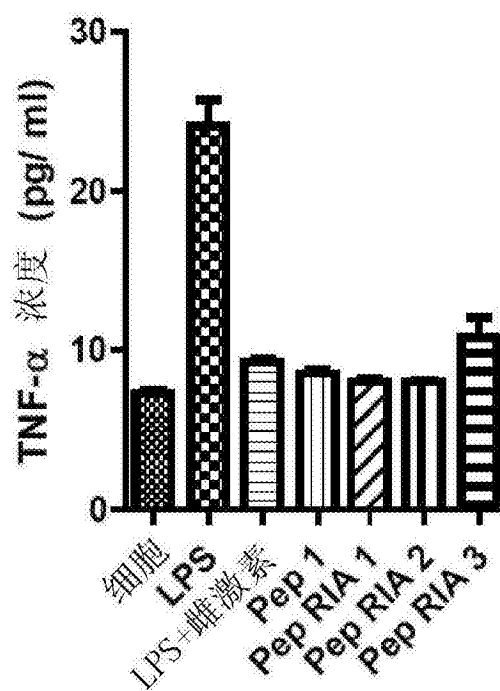


图24

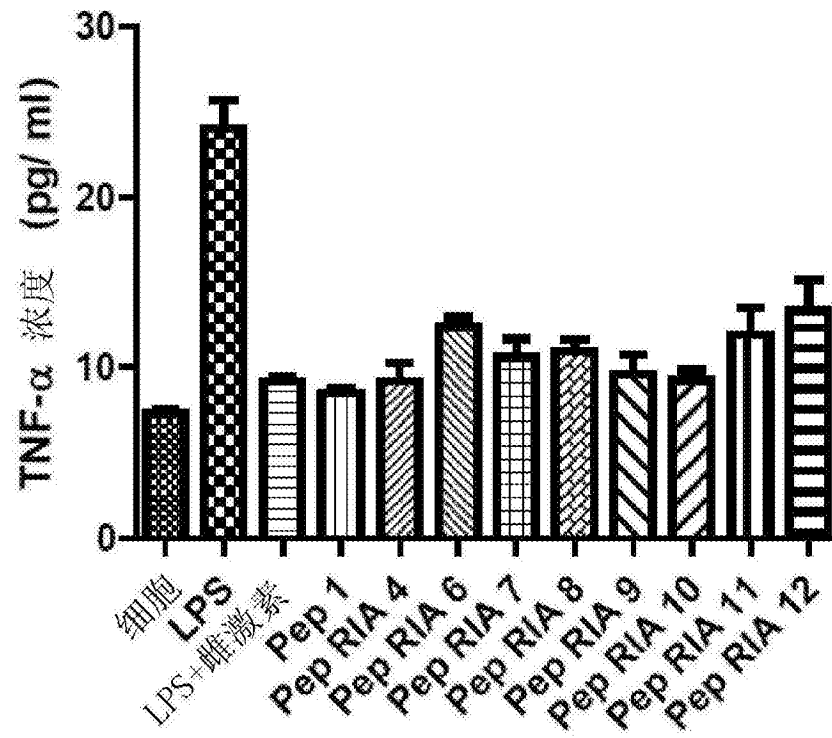


图25

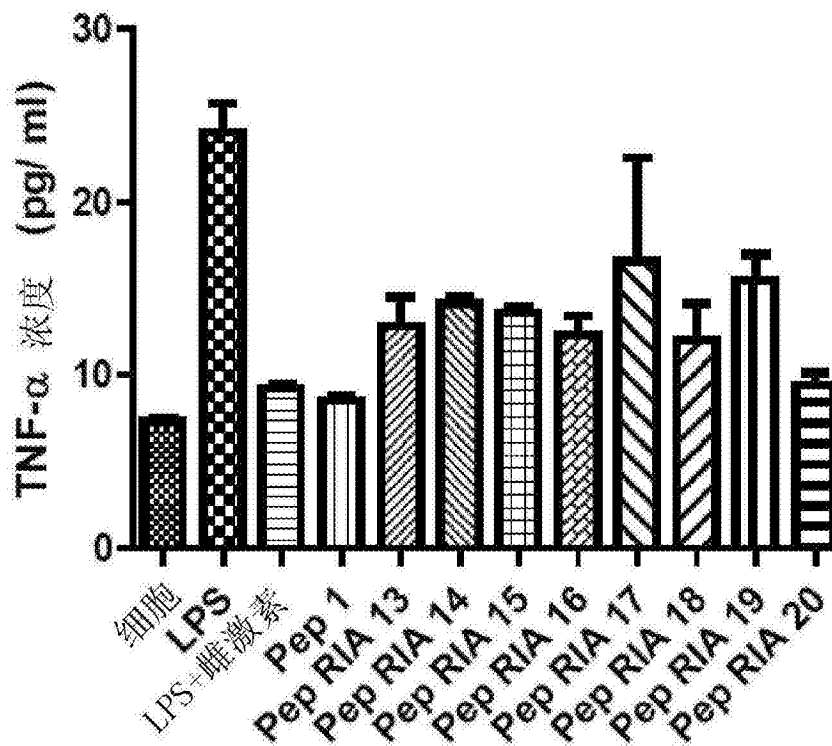


图26

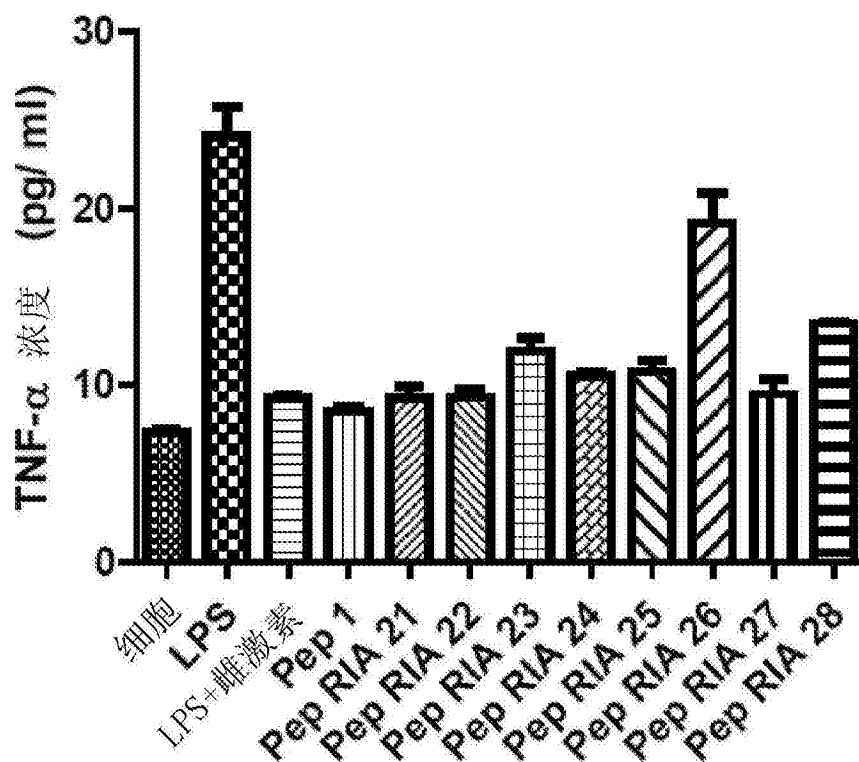


图27

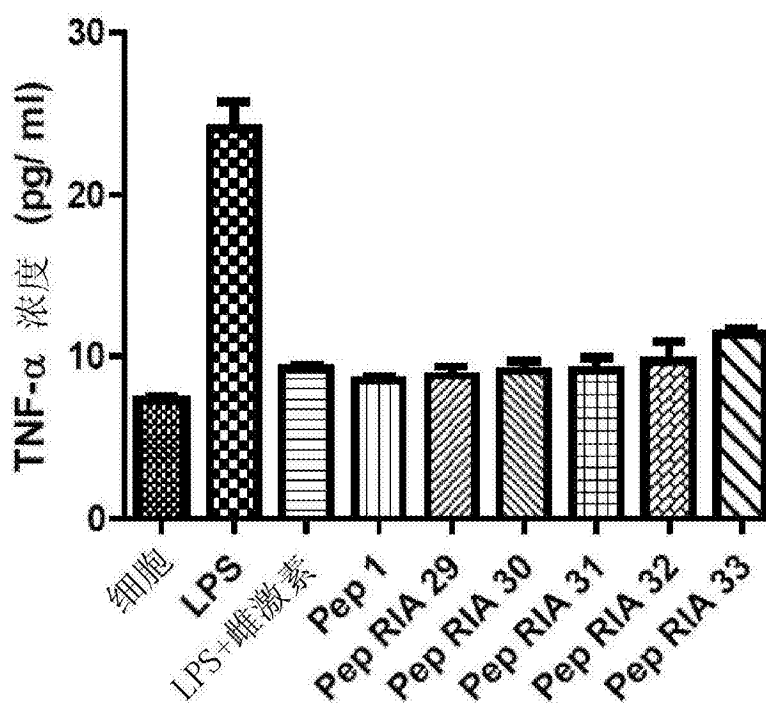


图28

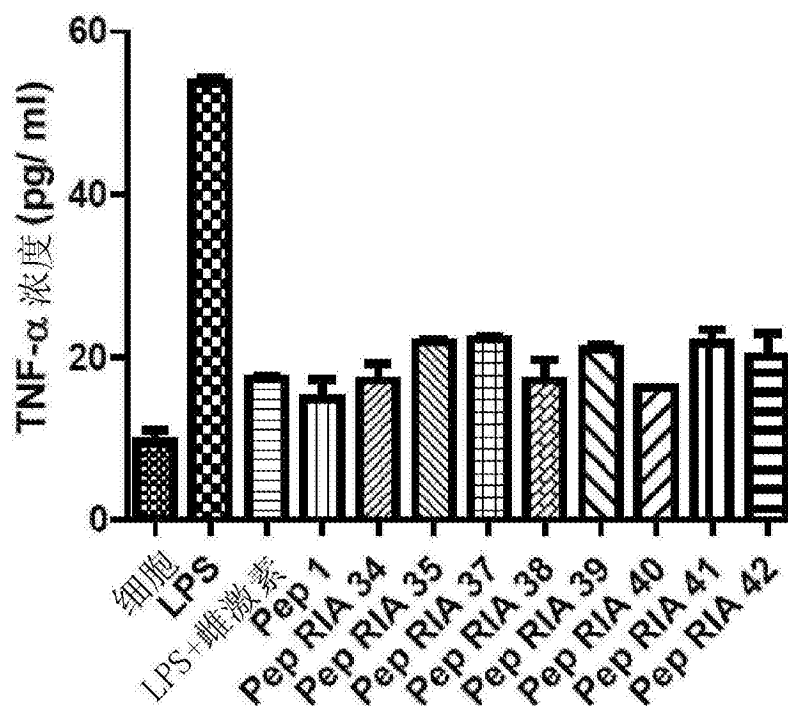


图29

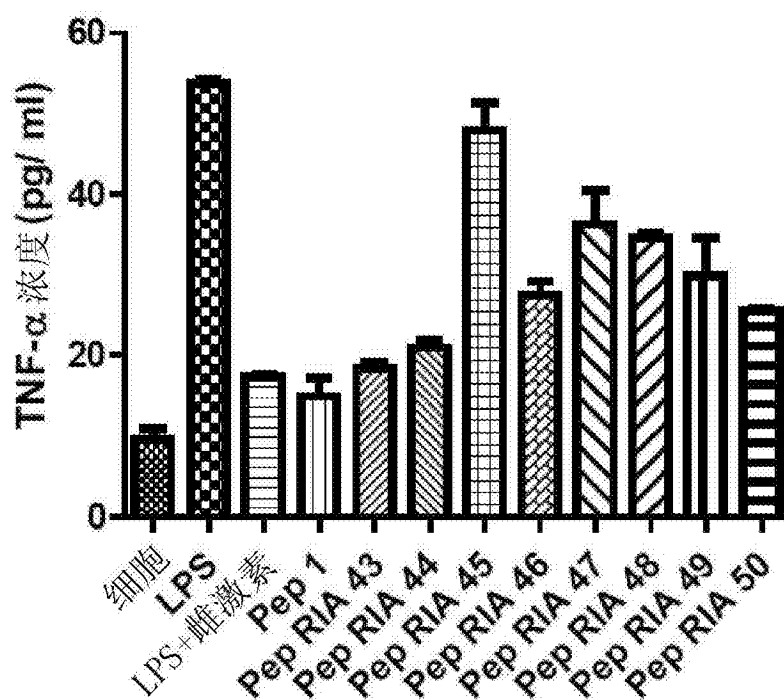


图30

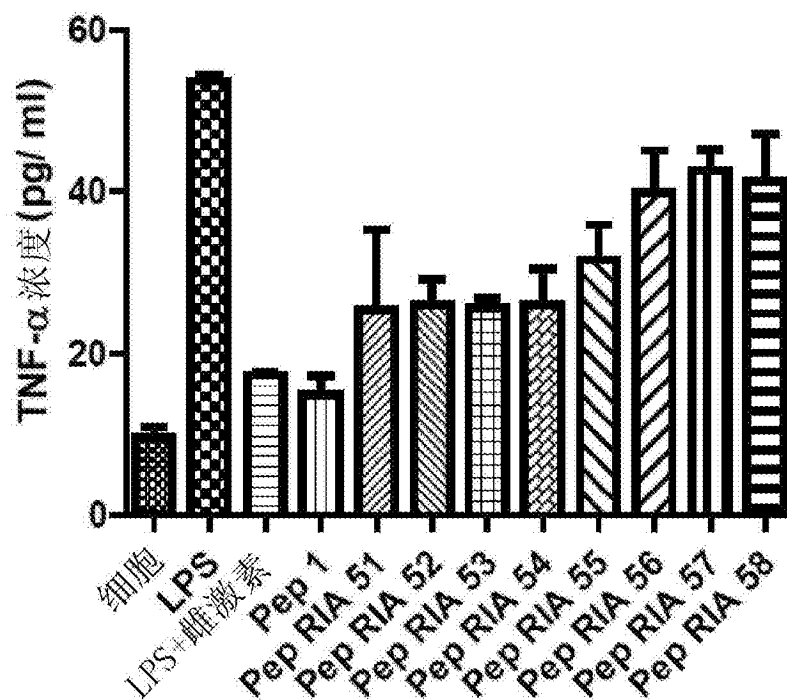


图31

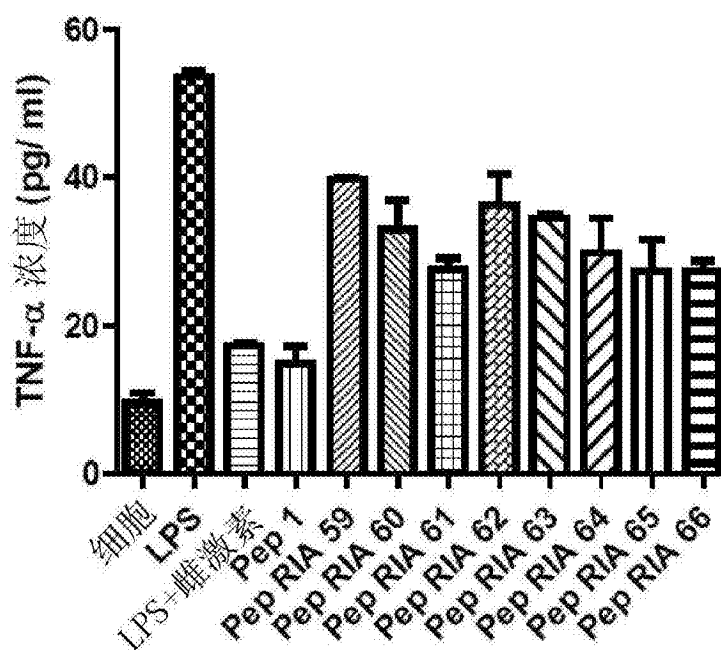


图32

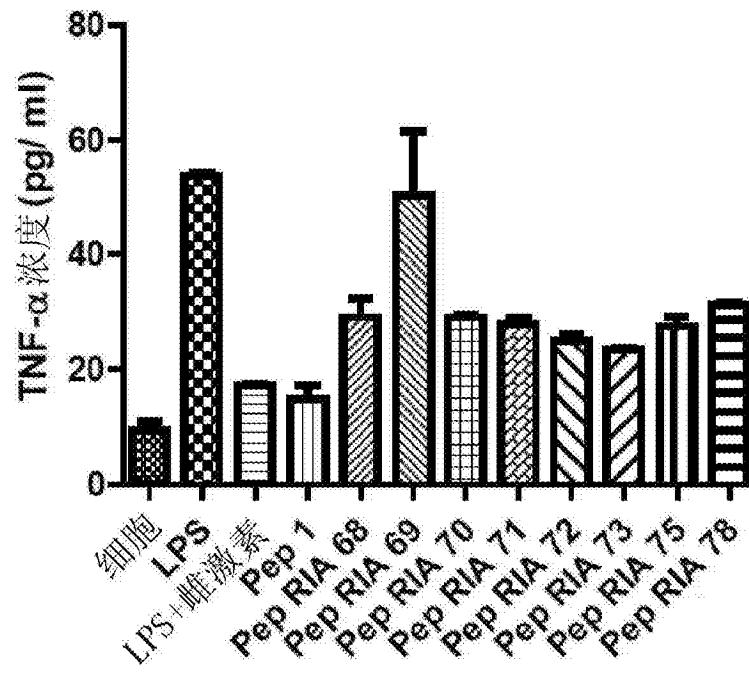


图33

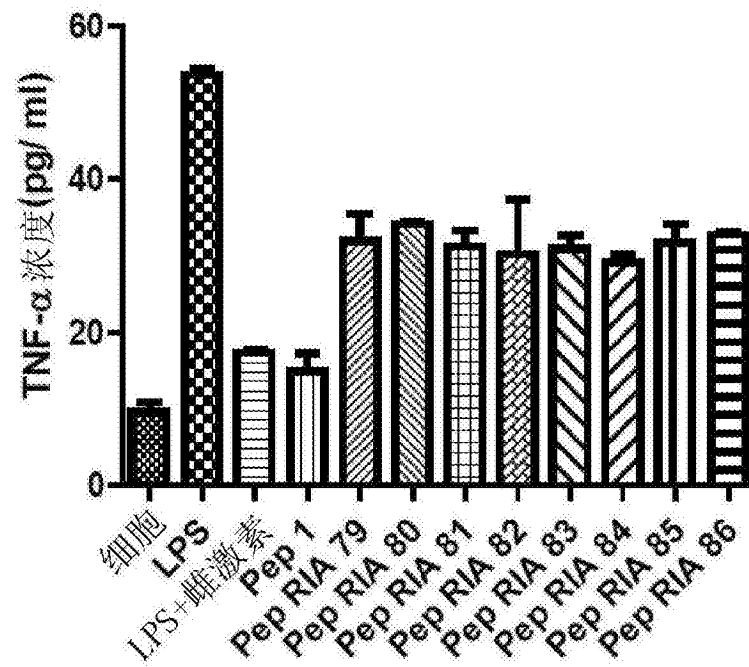


图34

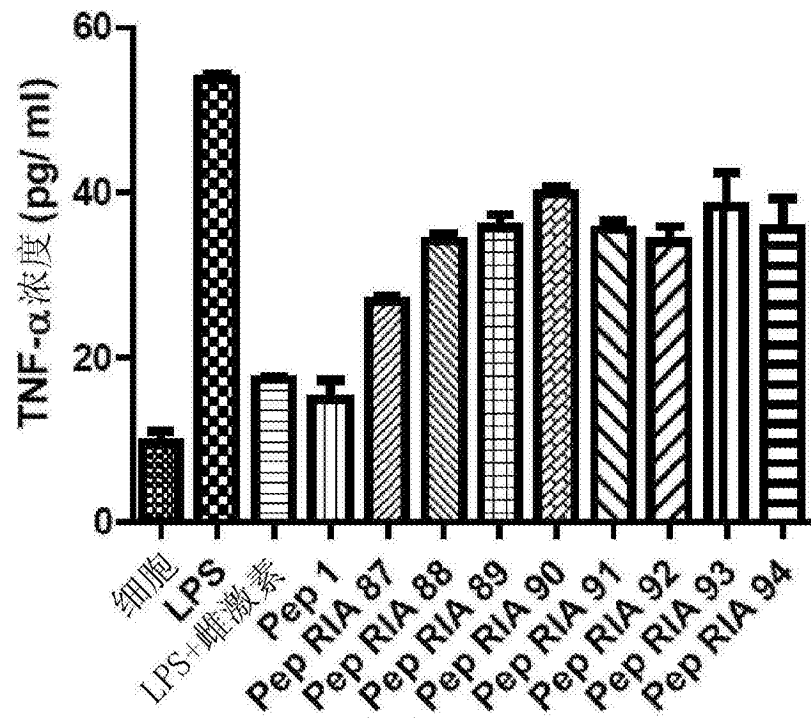


图35

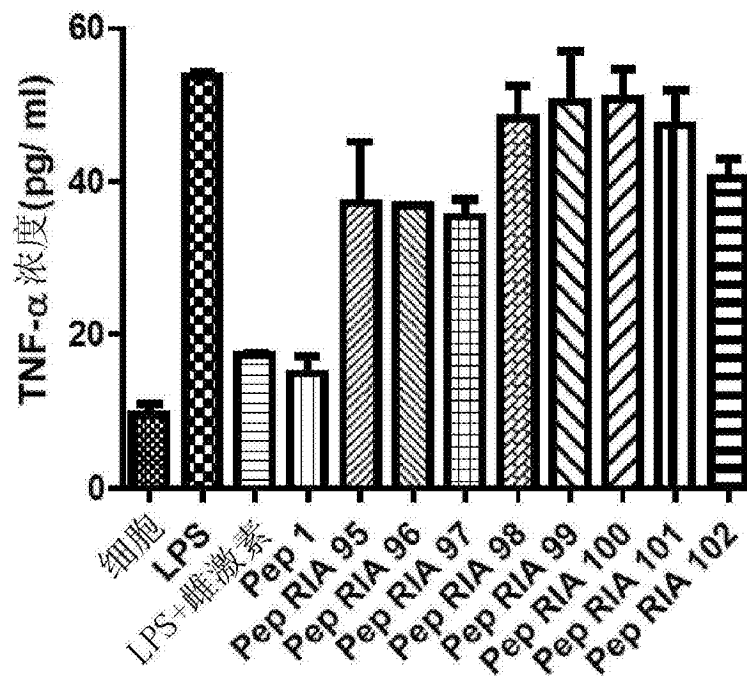


图36

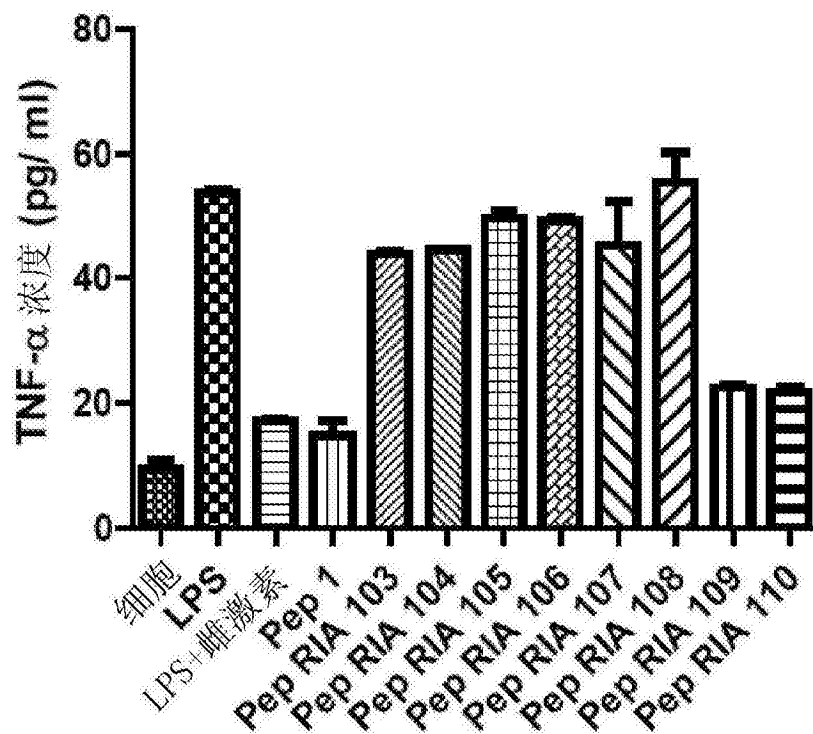


图37

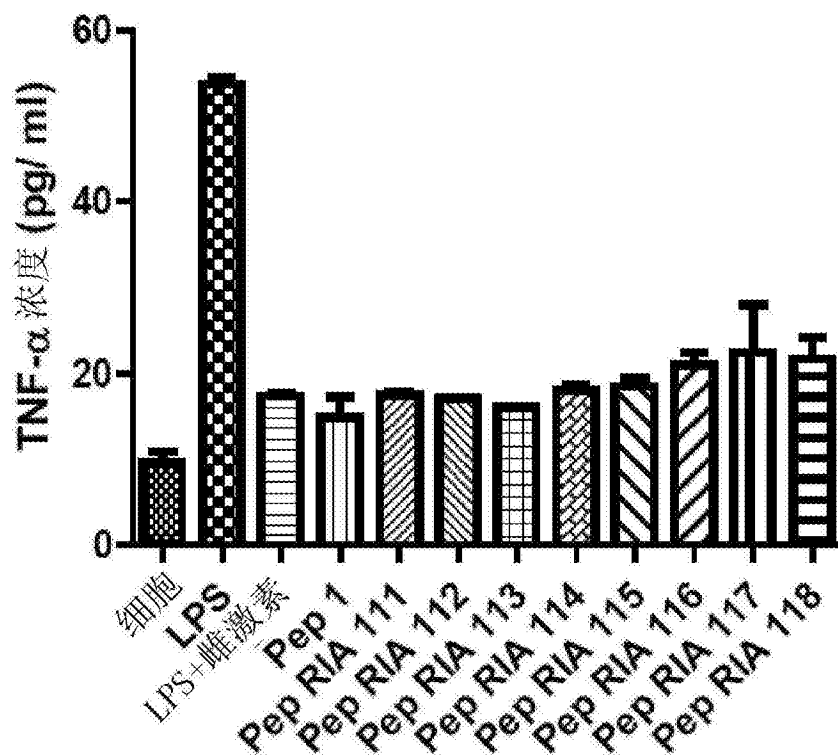


图38

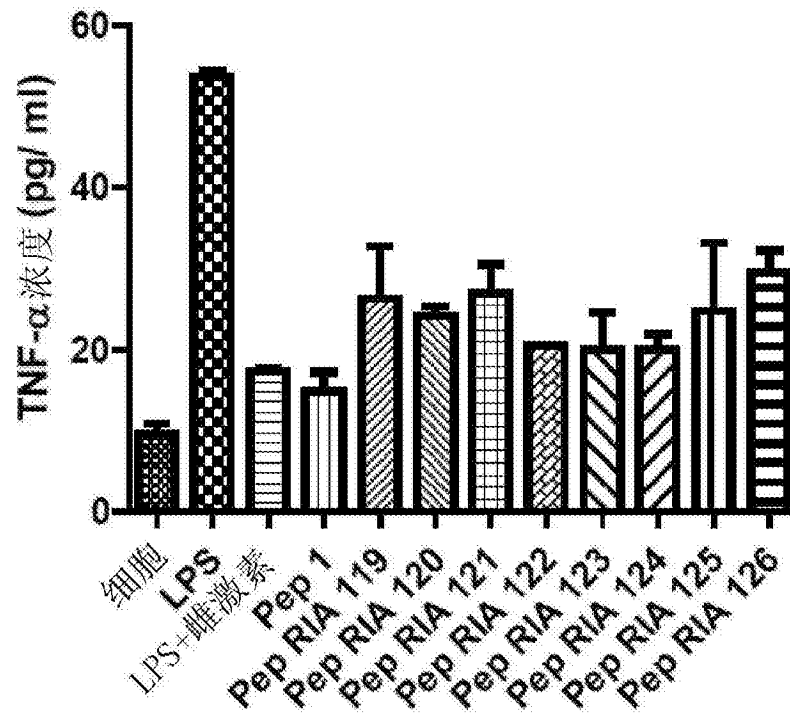


图39

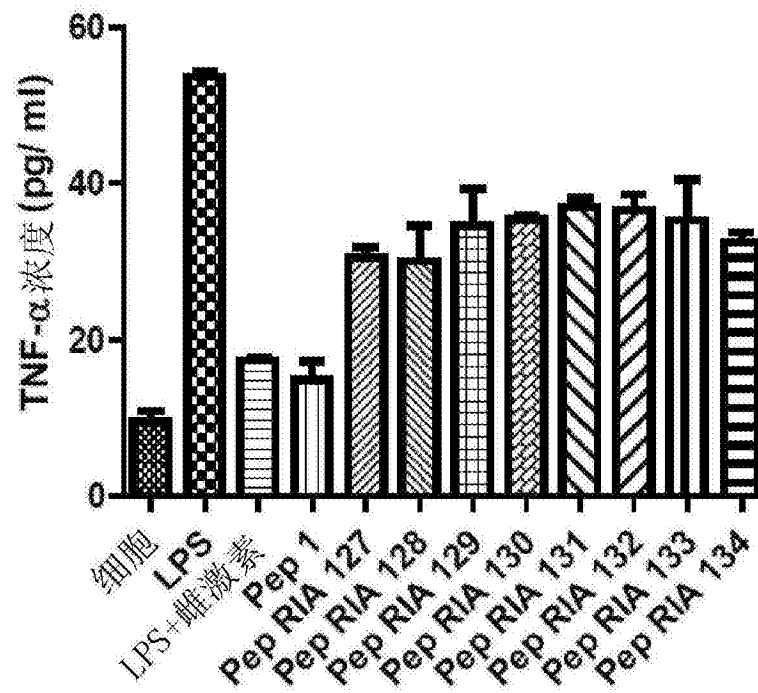


图40

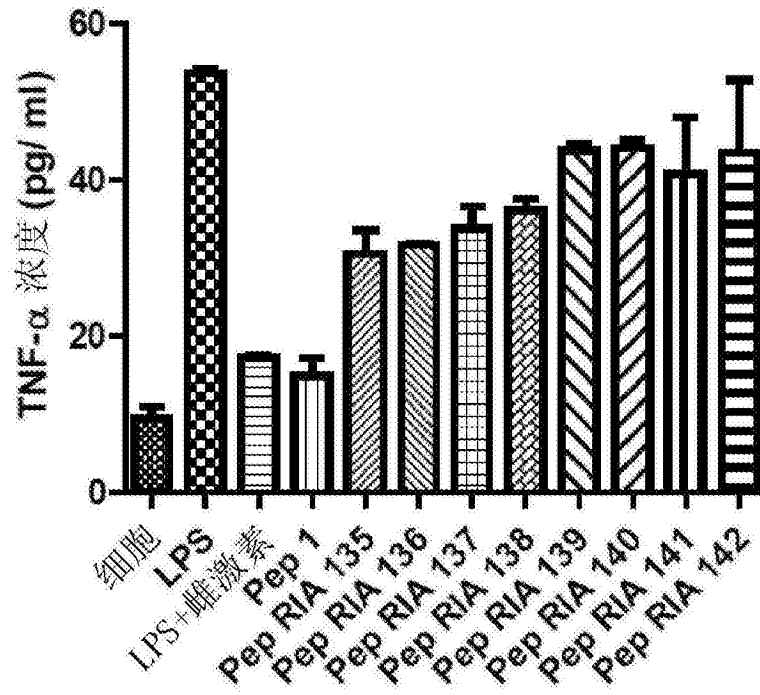


图41

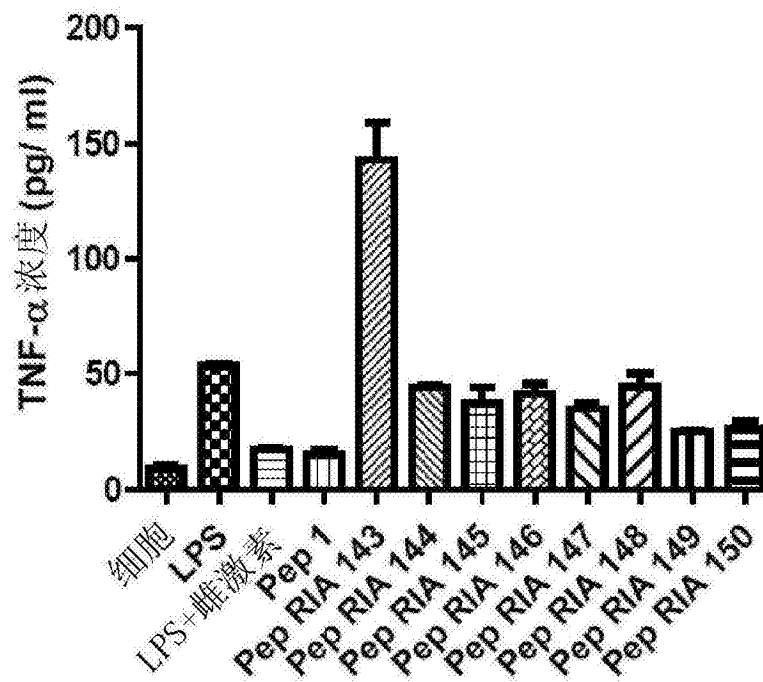


图42

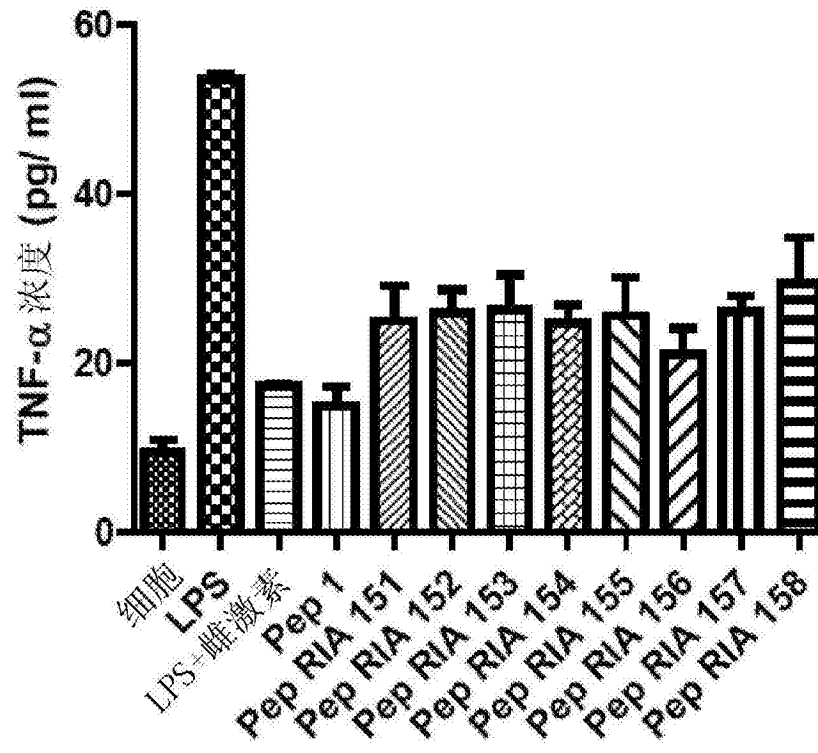


图43

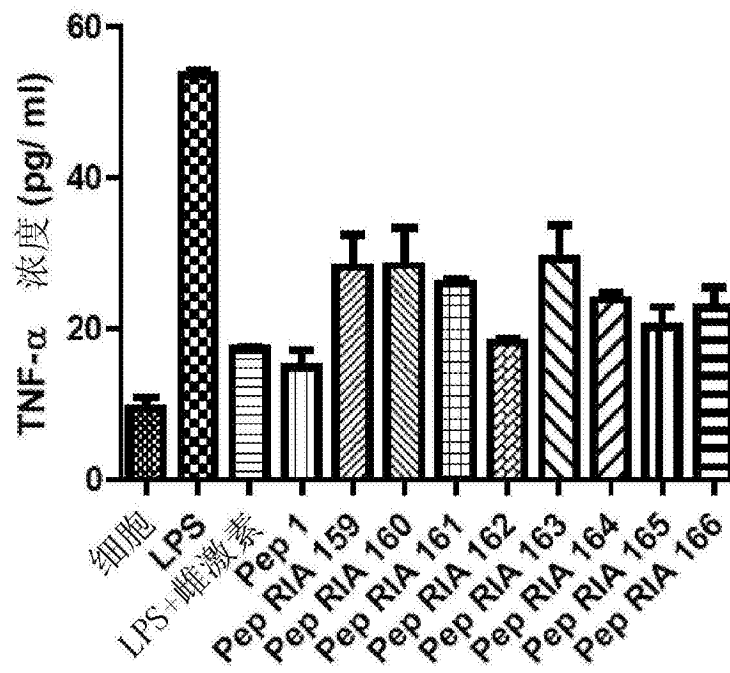


图44

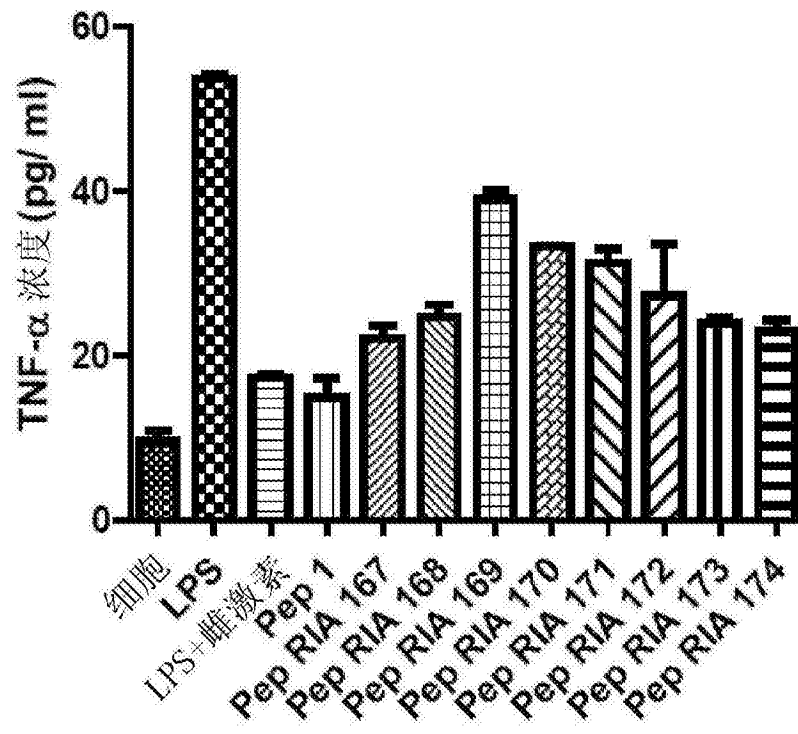


图45

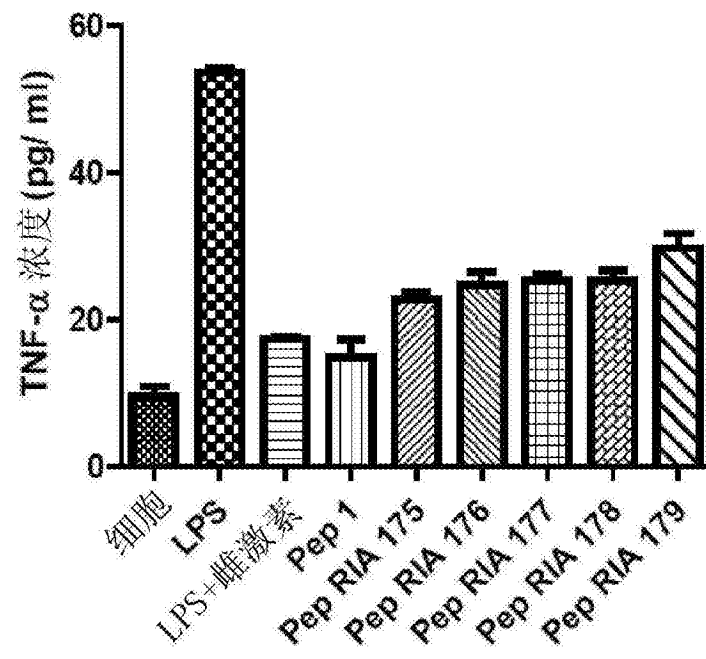


图46

细胞活力

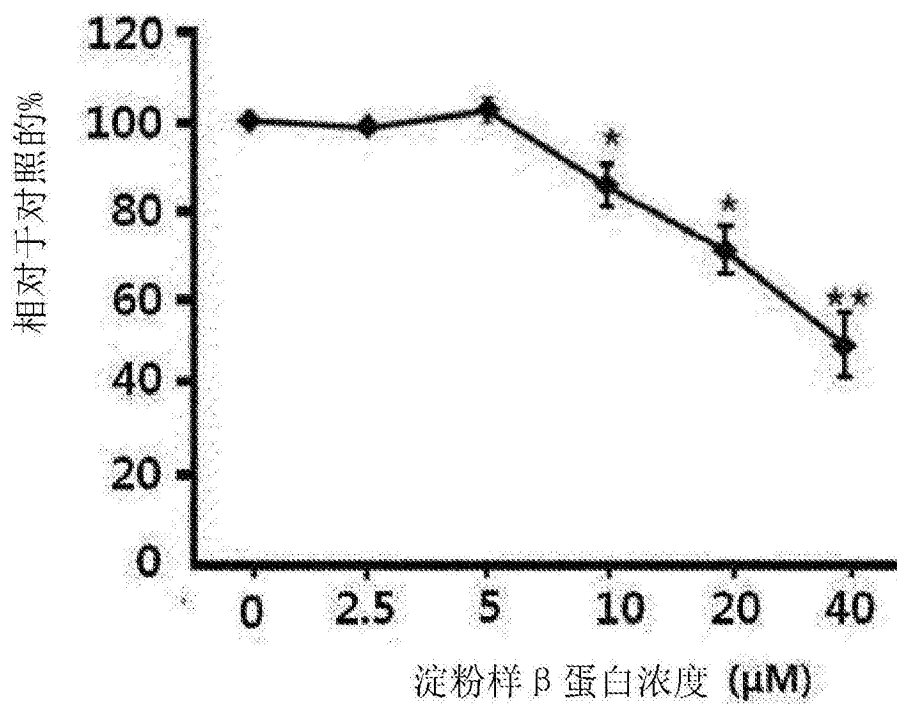


图47

细胞增殖

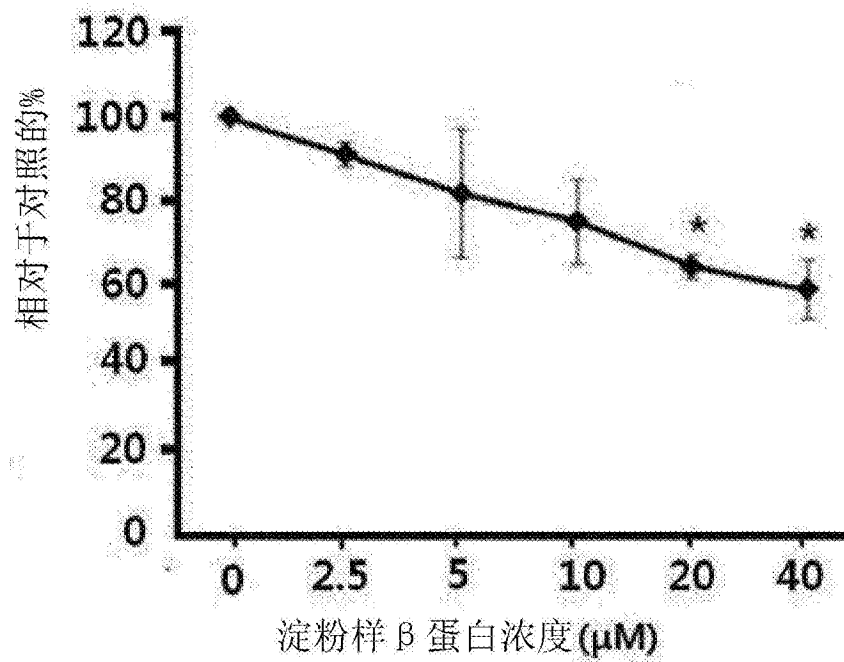


图48

细胞存活力

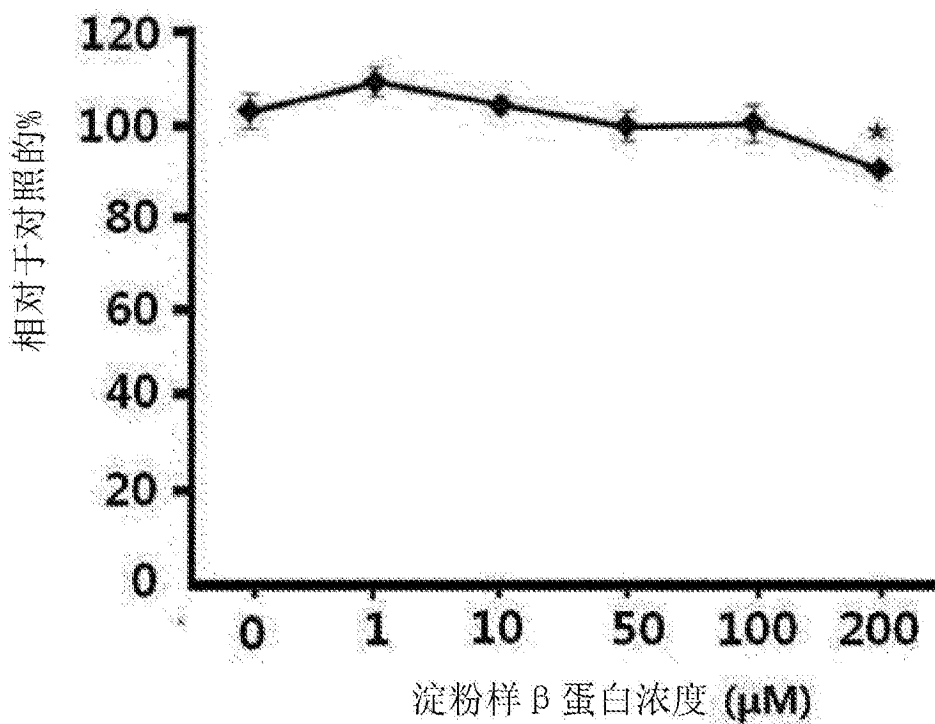


图49

细胞增殖

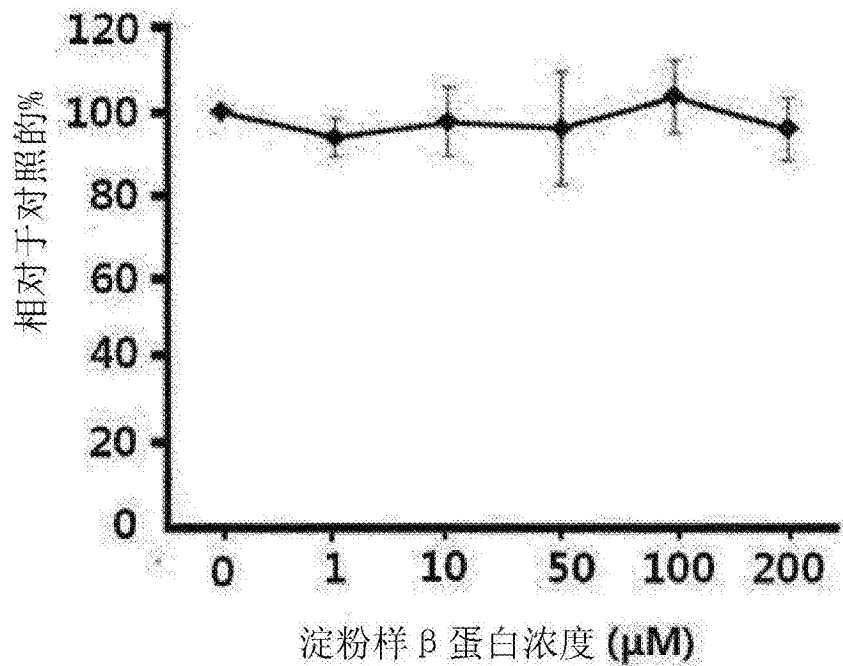


图50

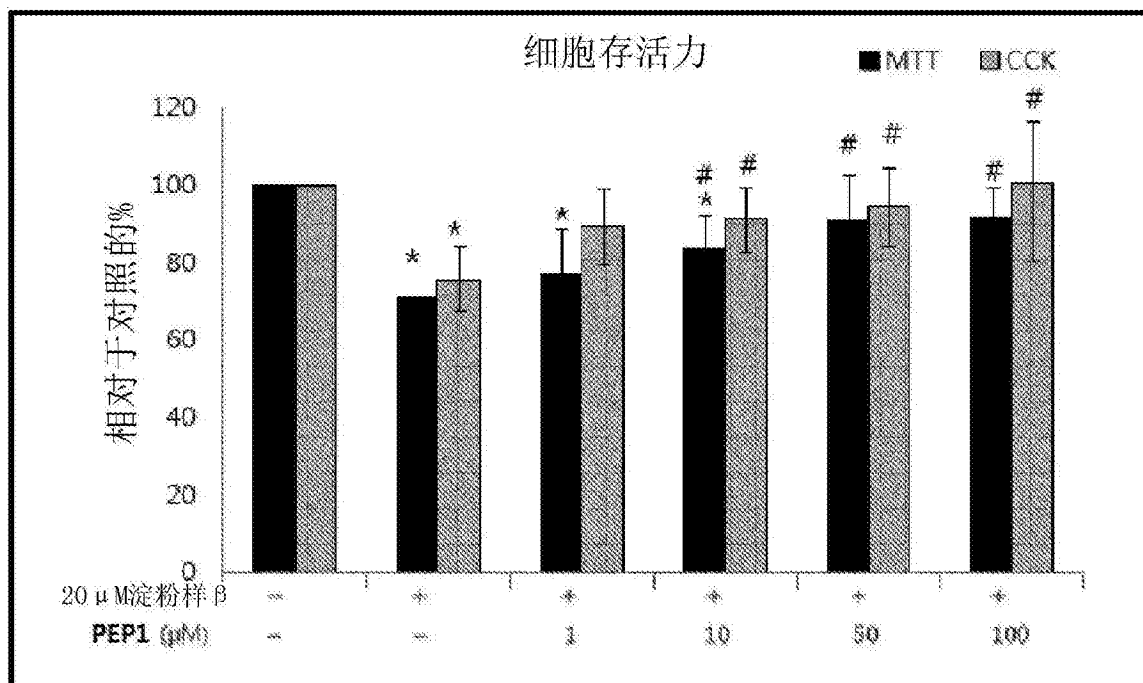


图51

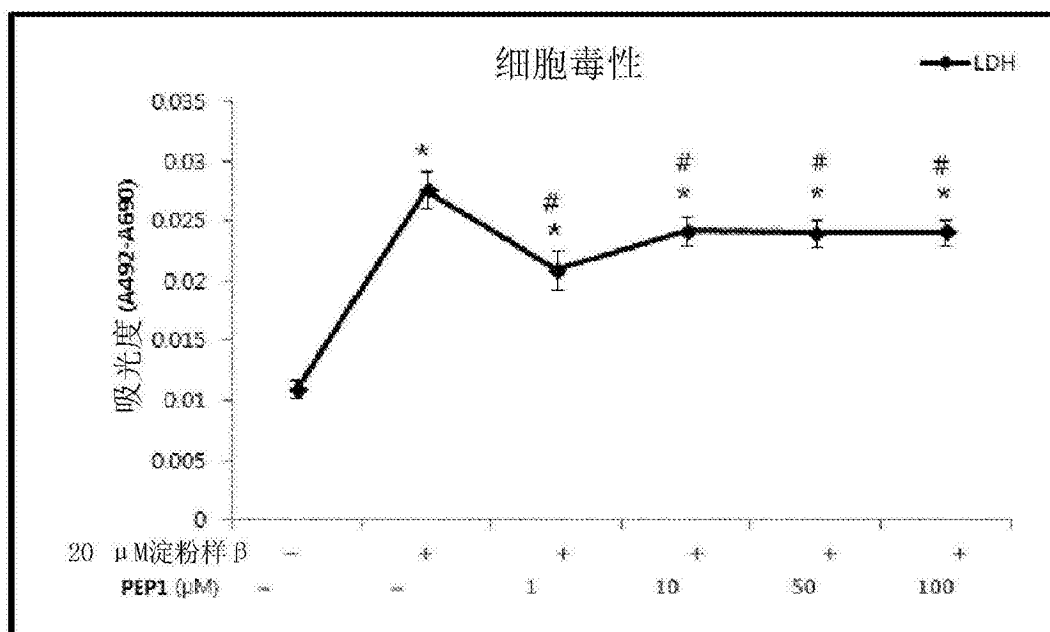


图52

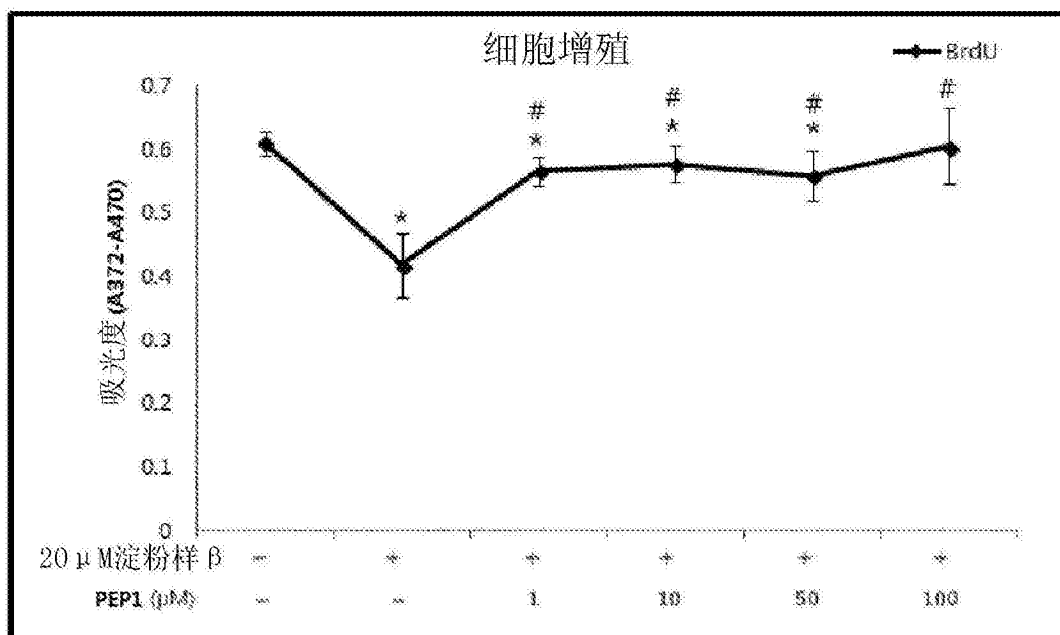


图53

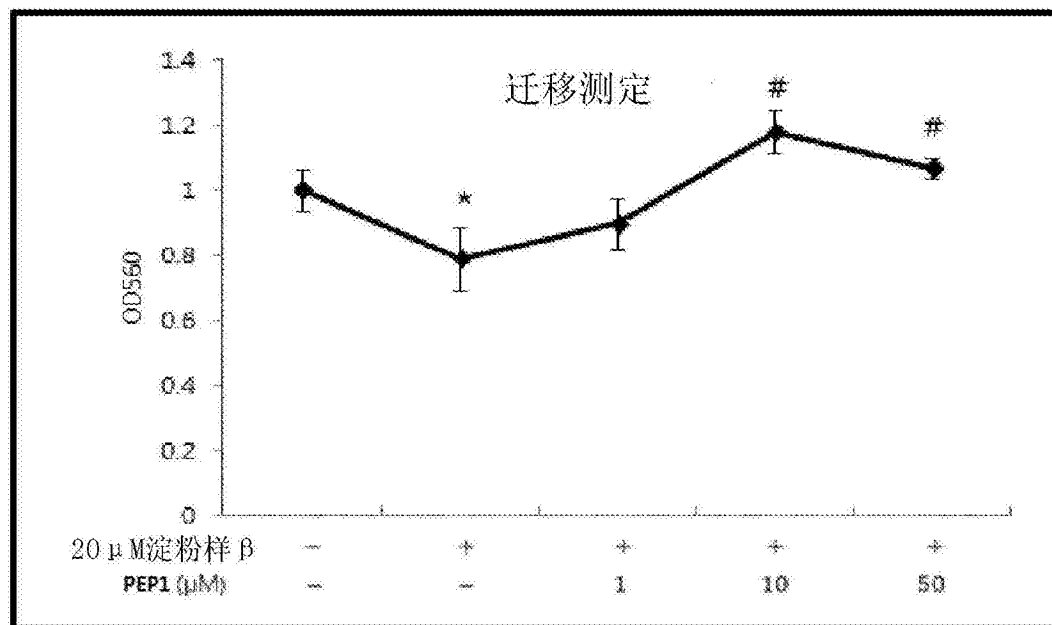


图54

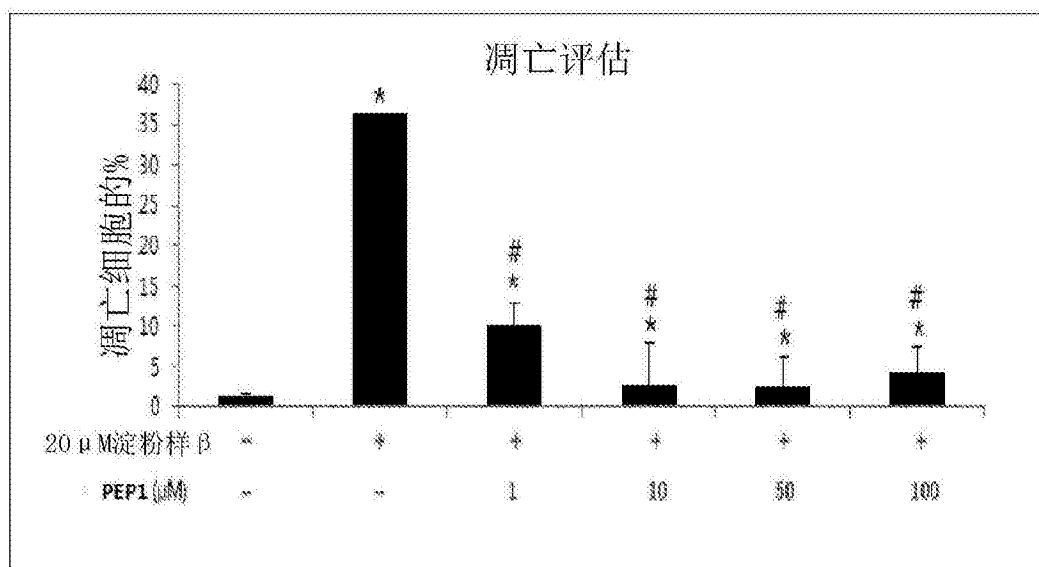


图55

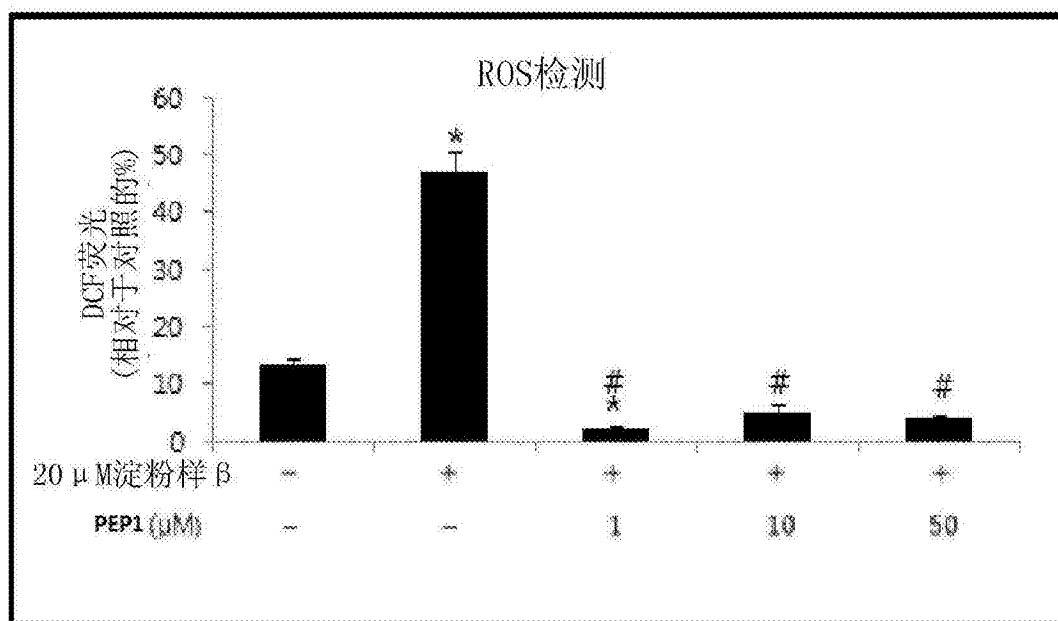


图56

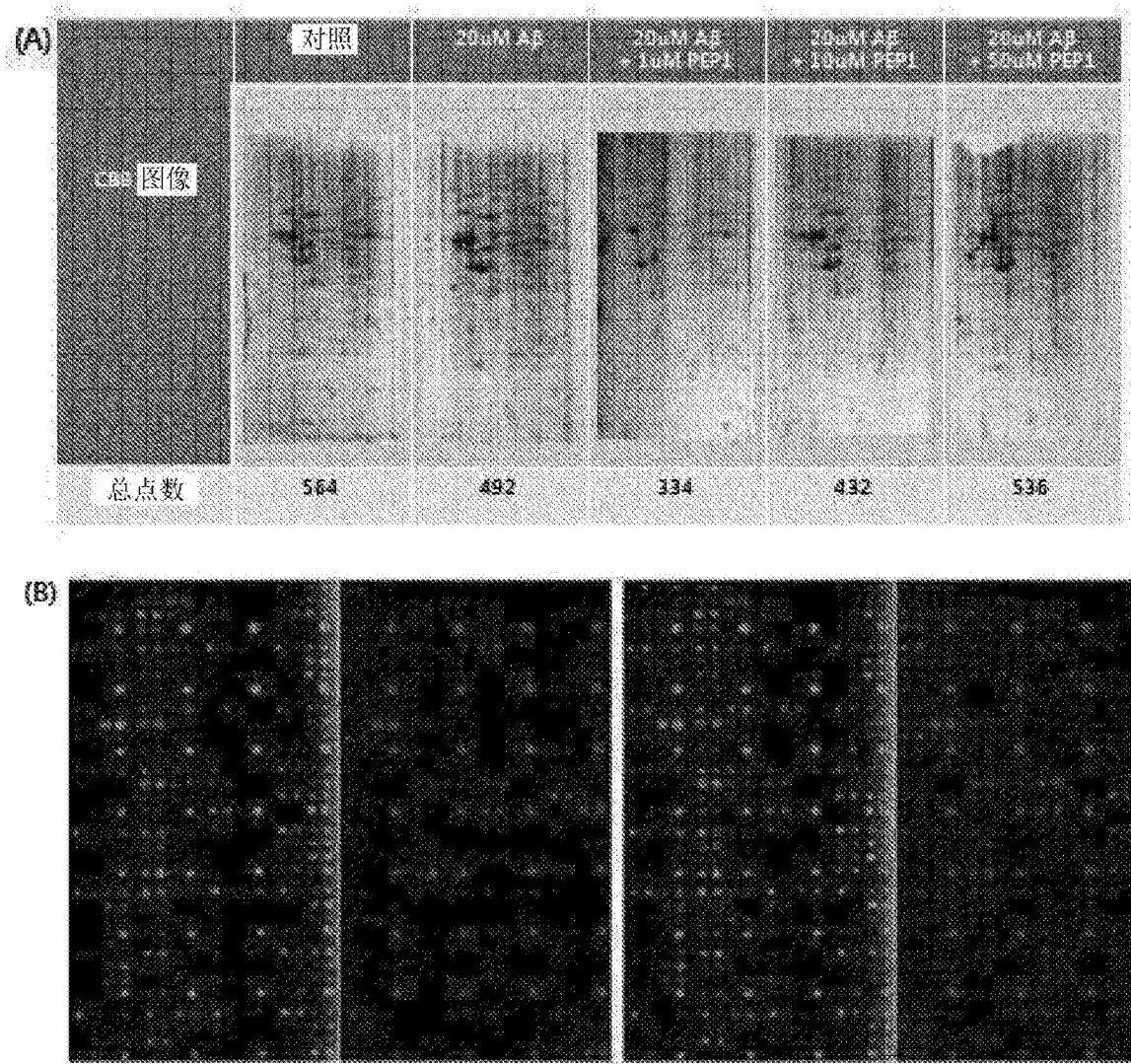


图57

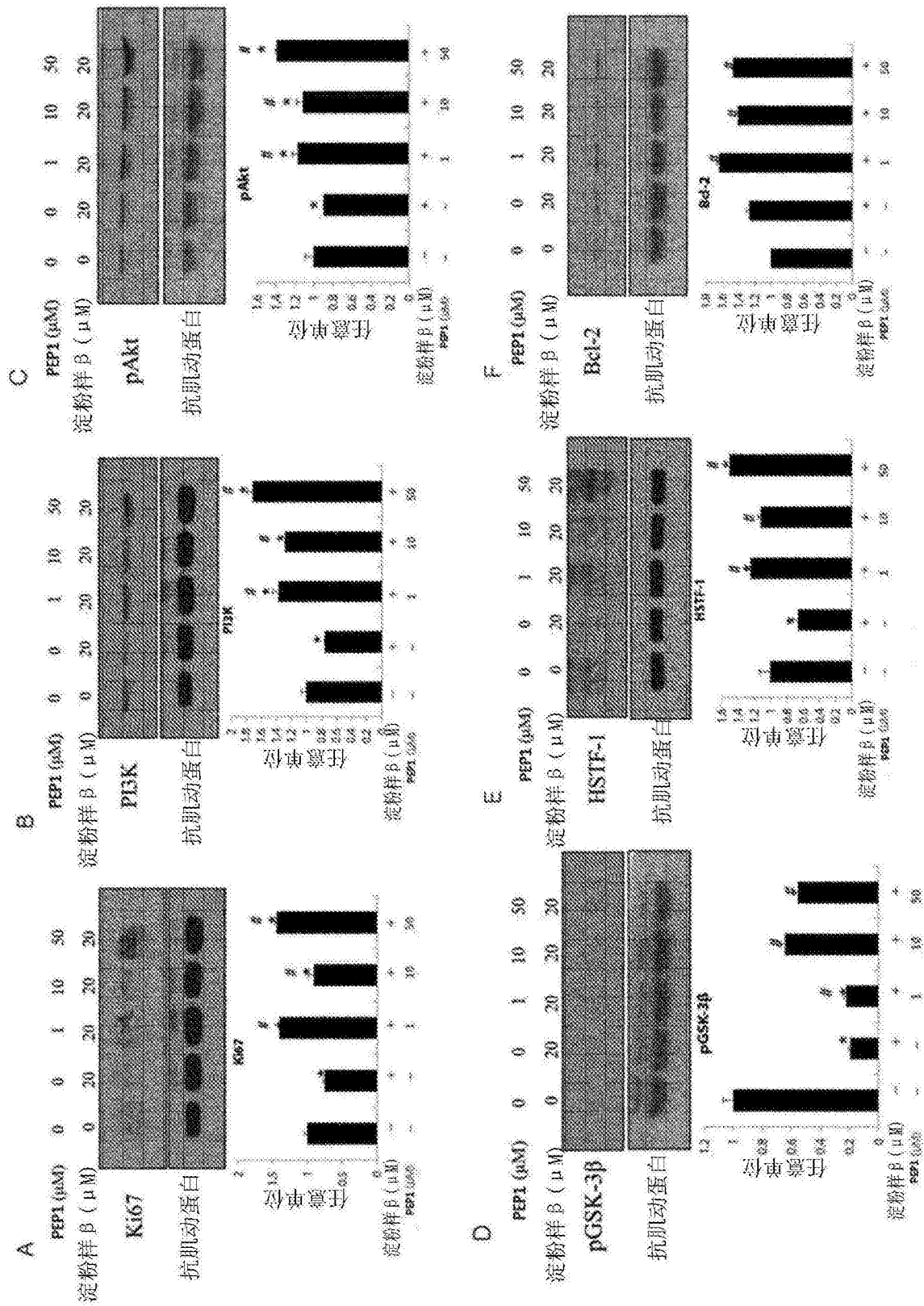


图58

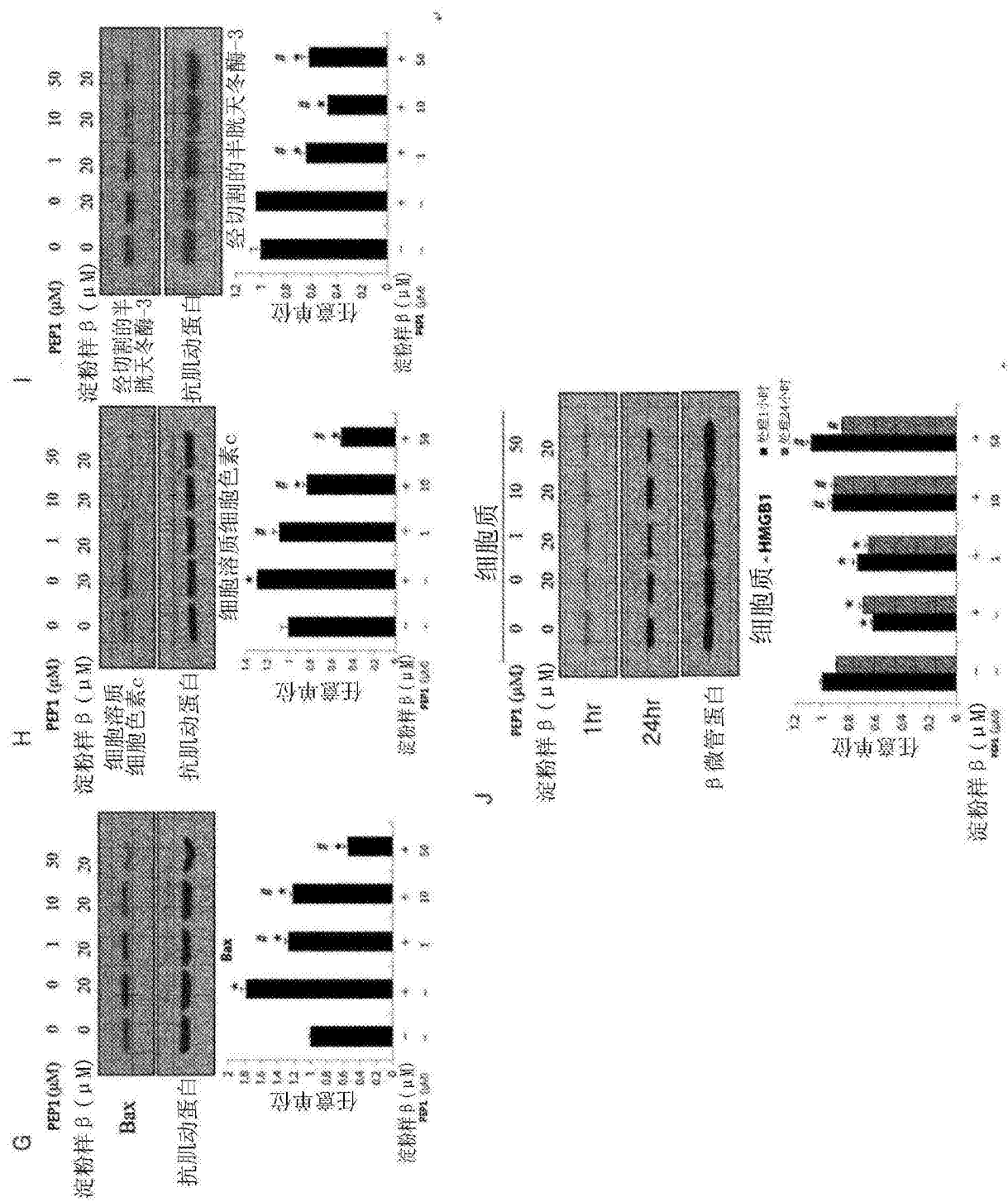


图58续

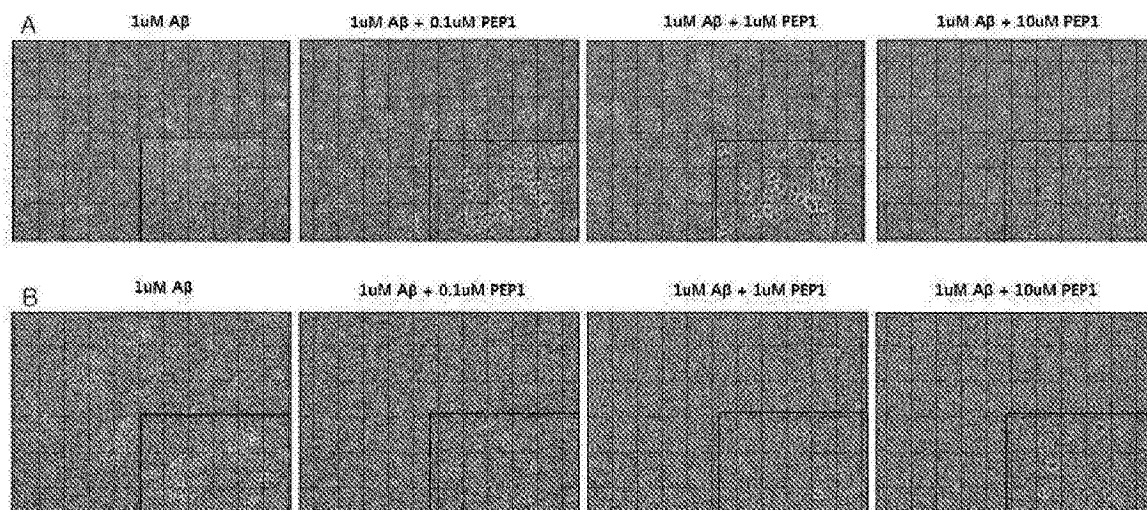


图59

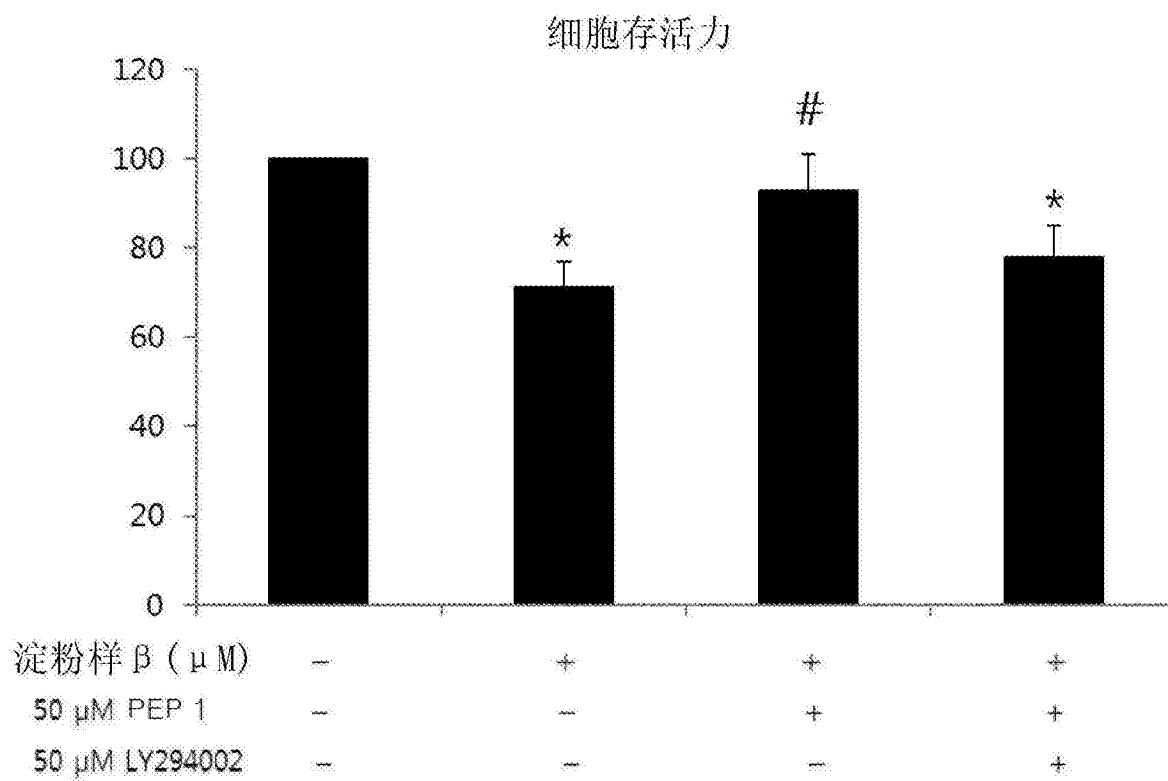


图60

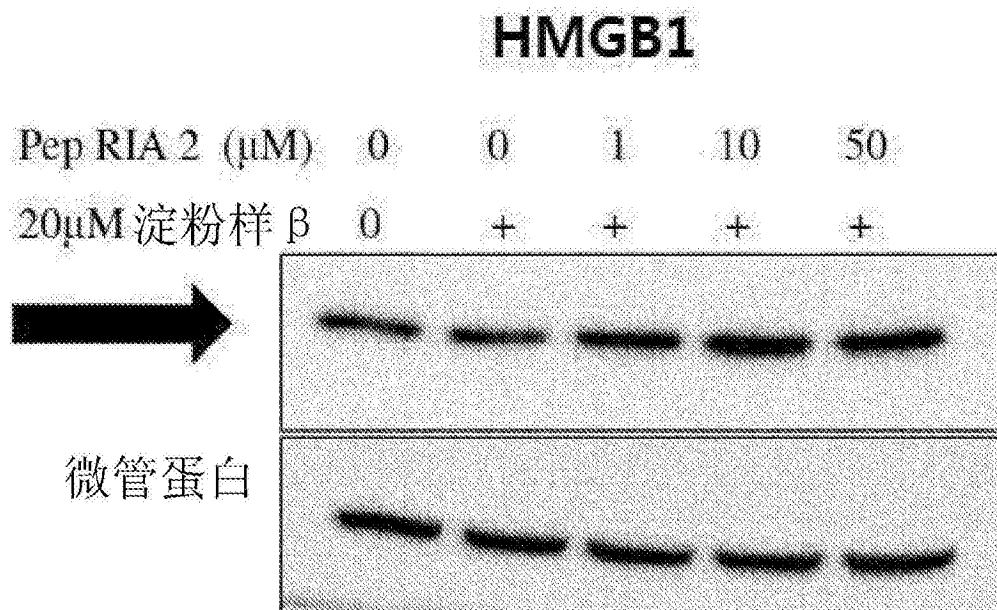


图61

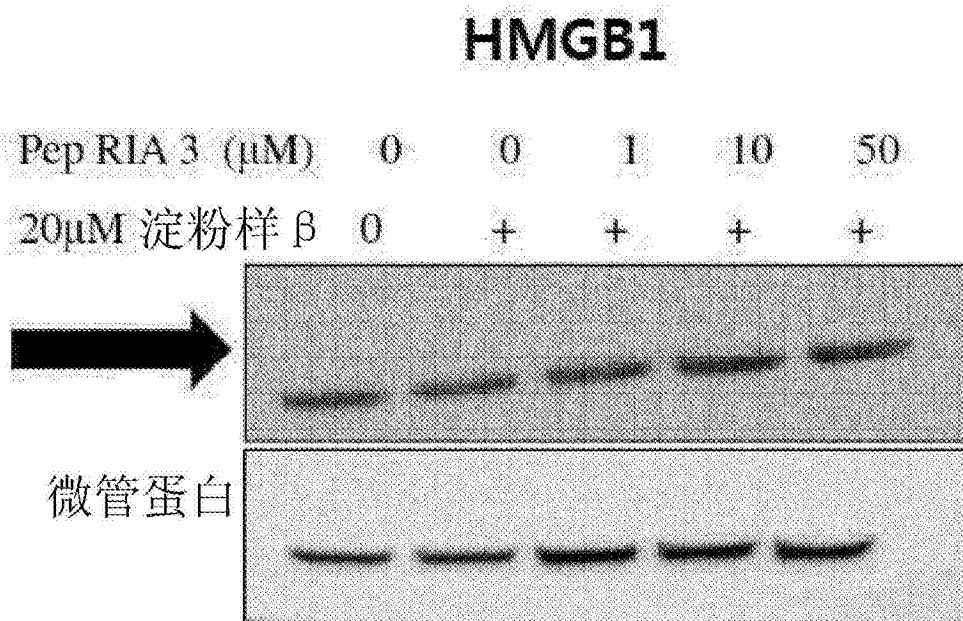


图62

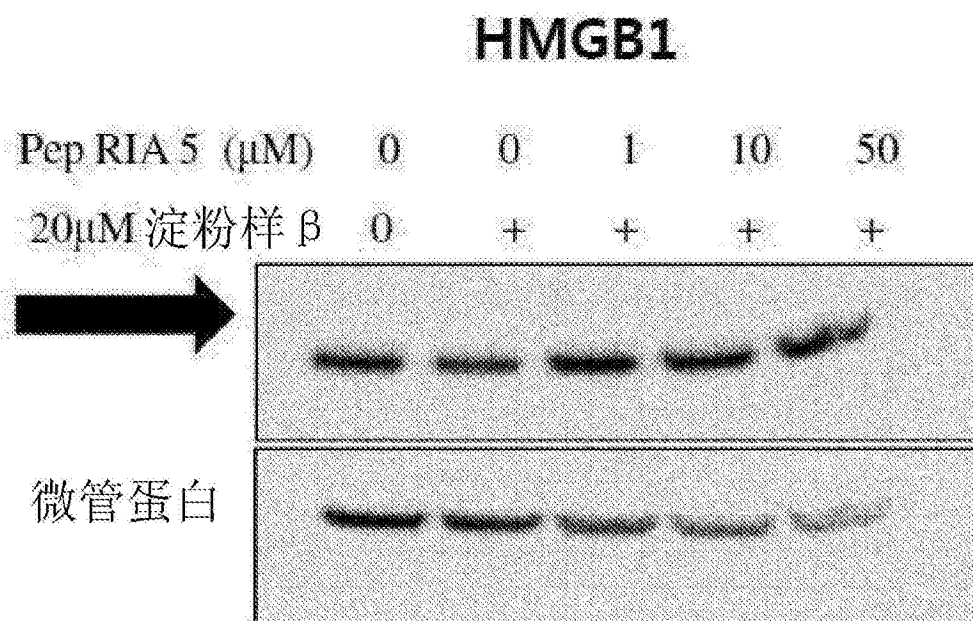


图63

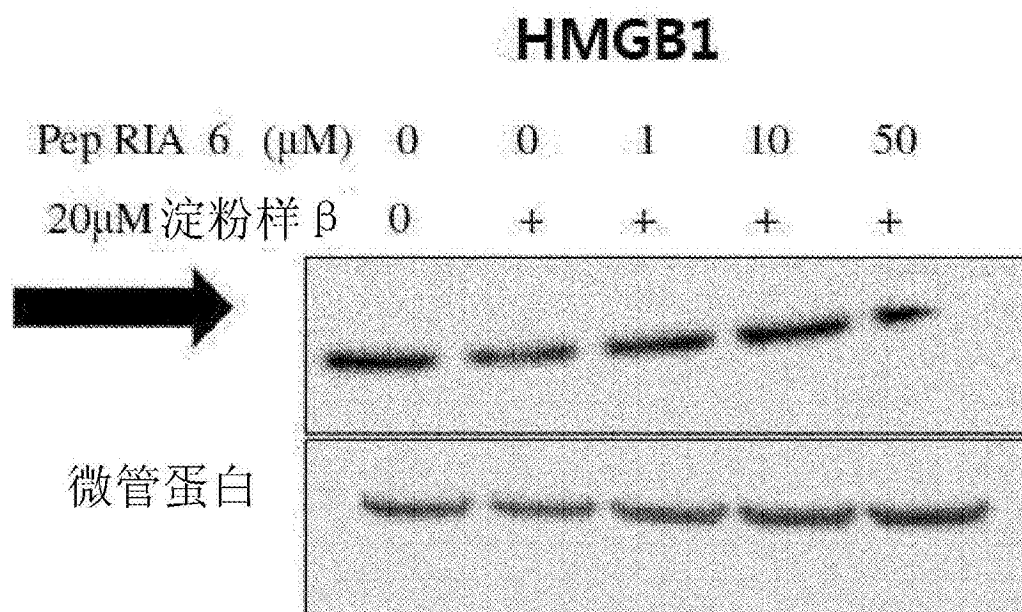


图64

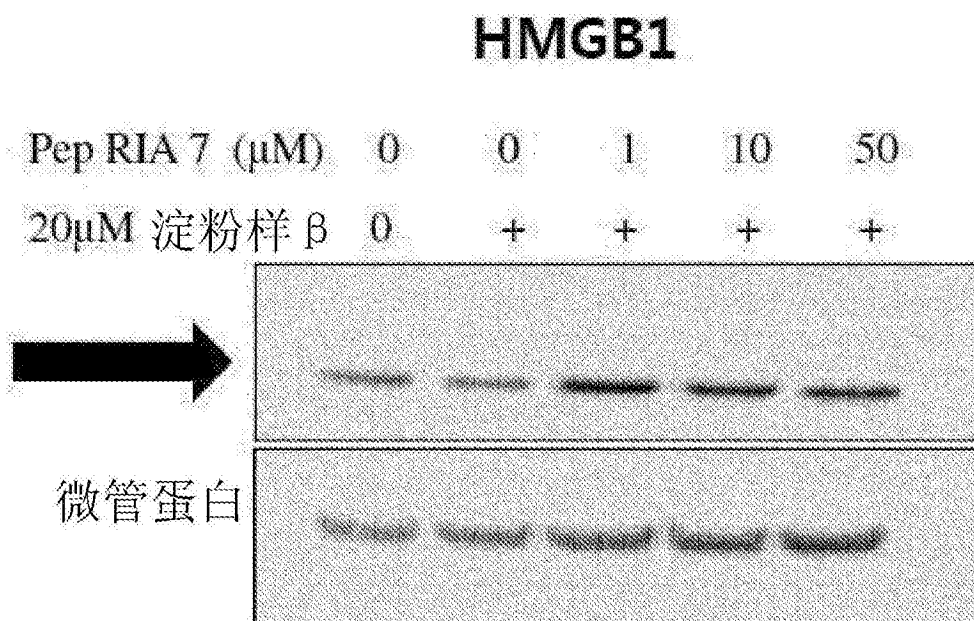


图65

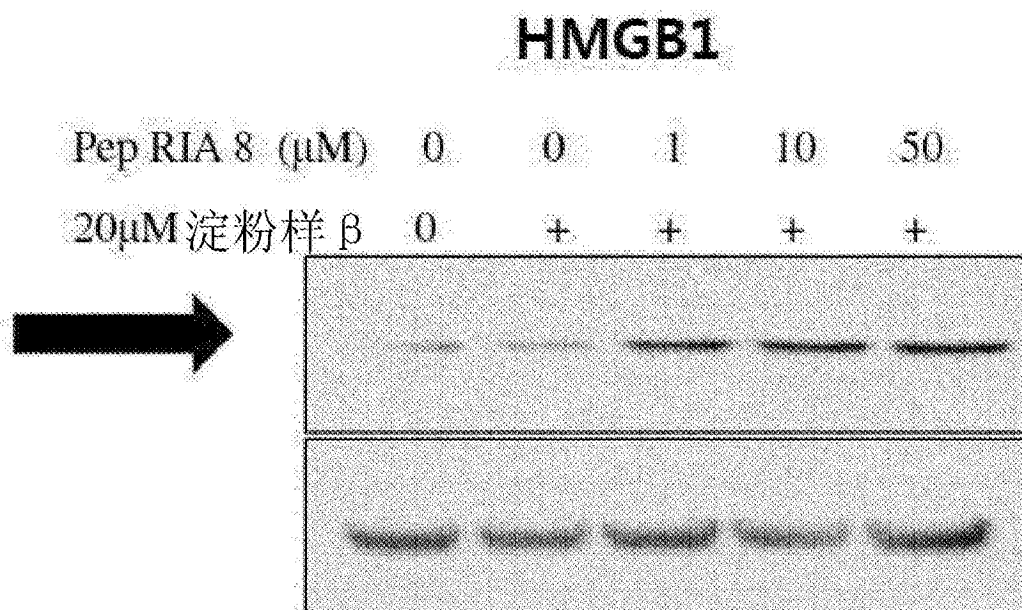


图66

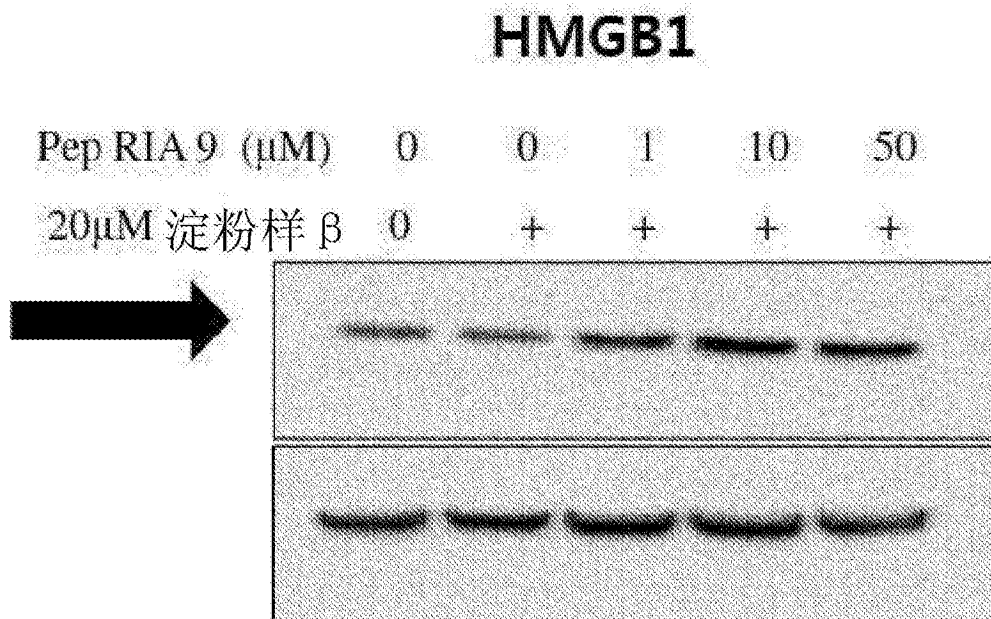


图67

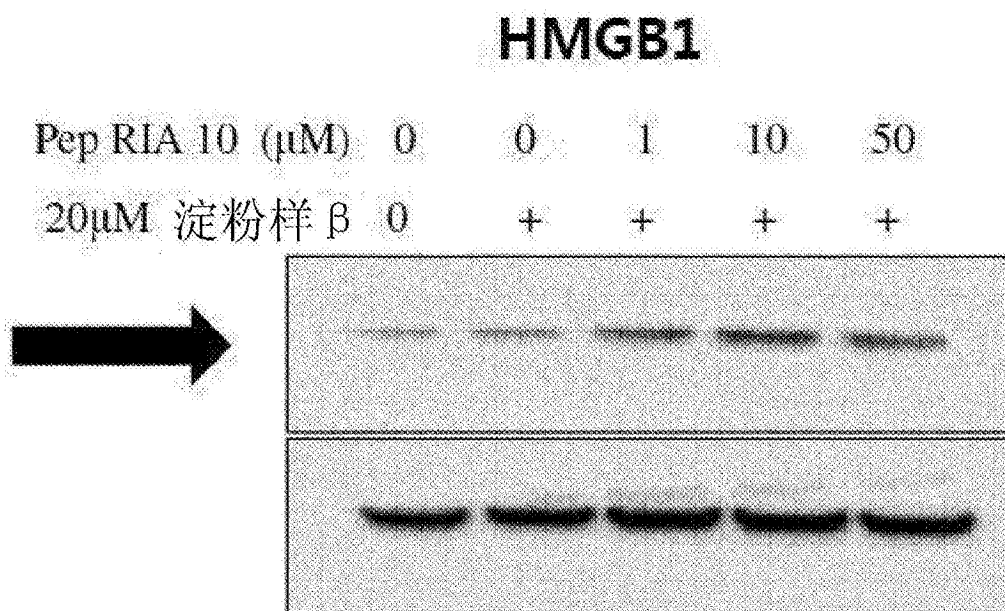


图68

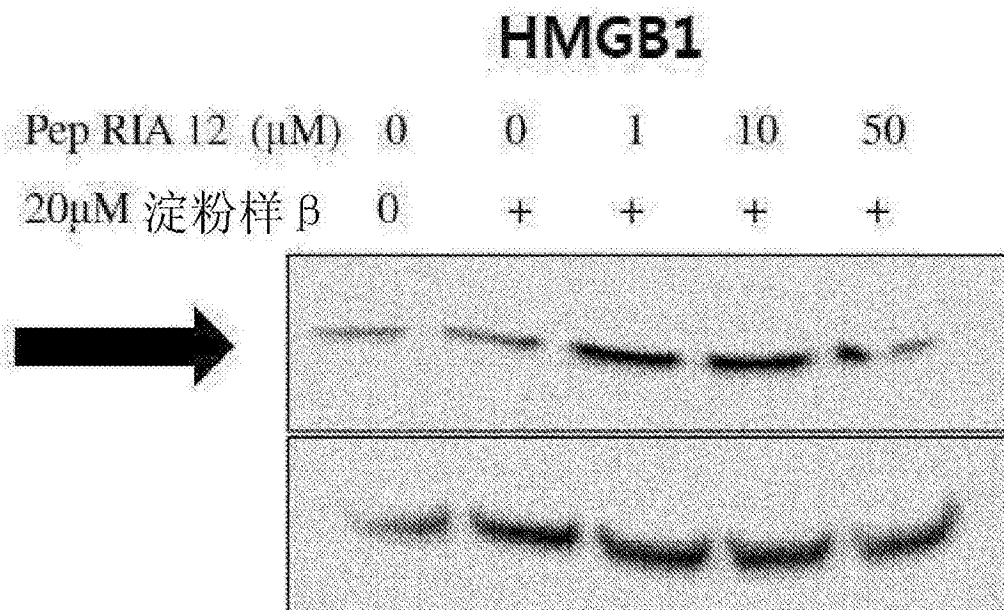


图69

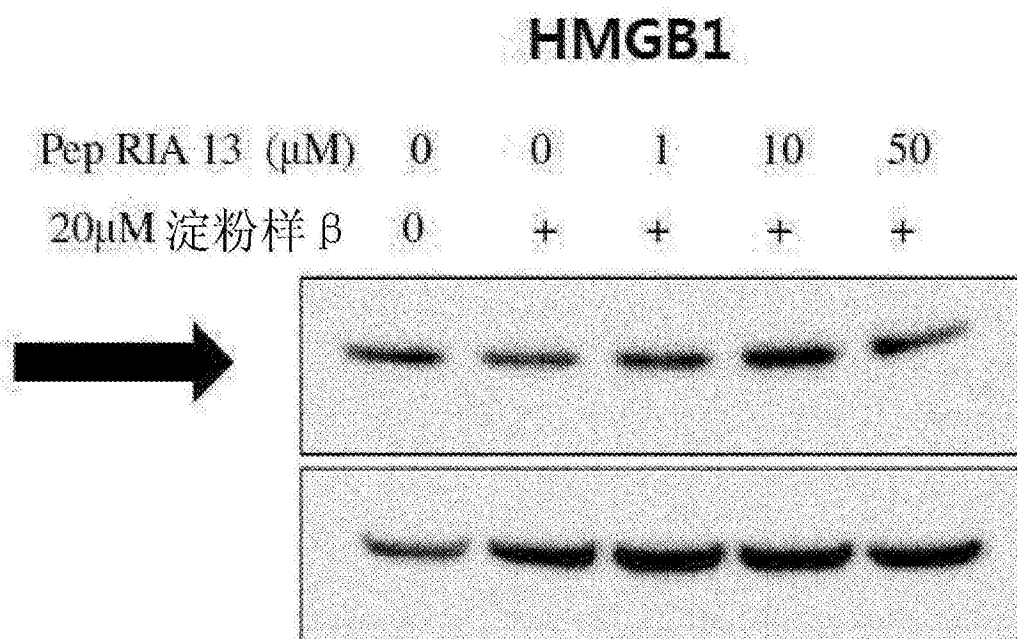


图70

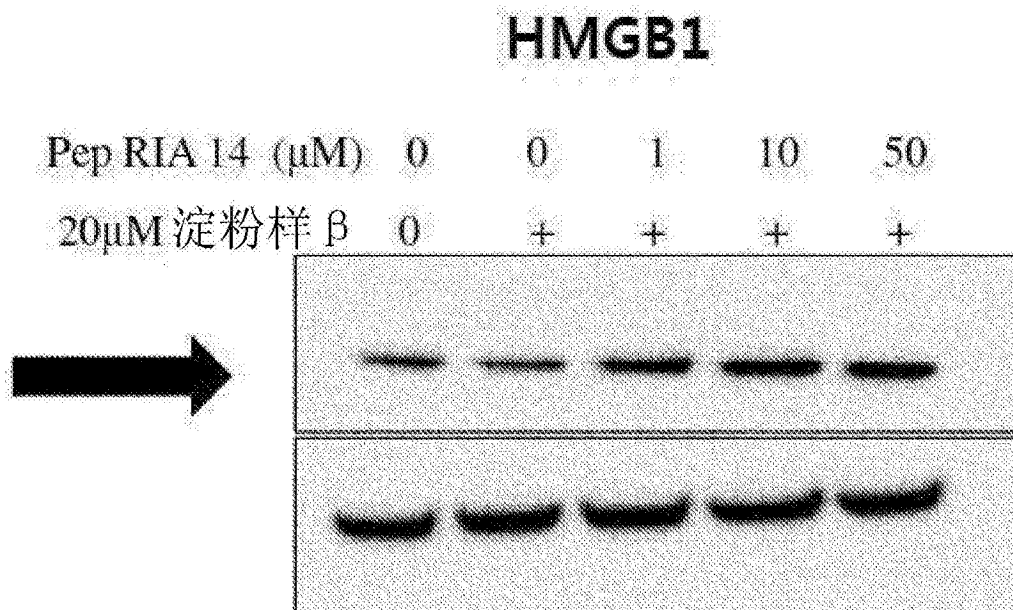


图71

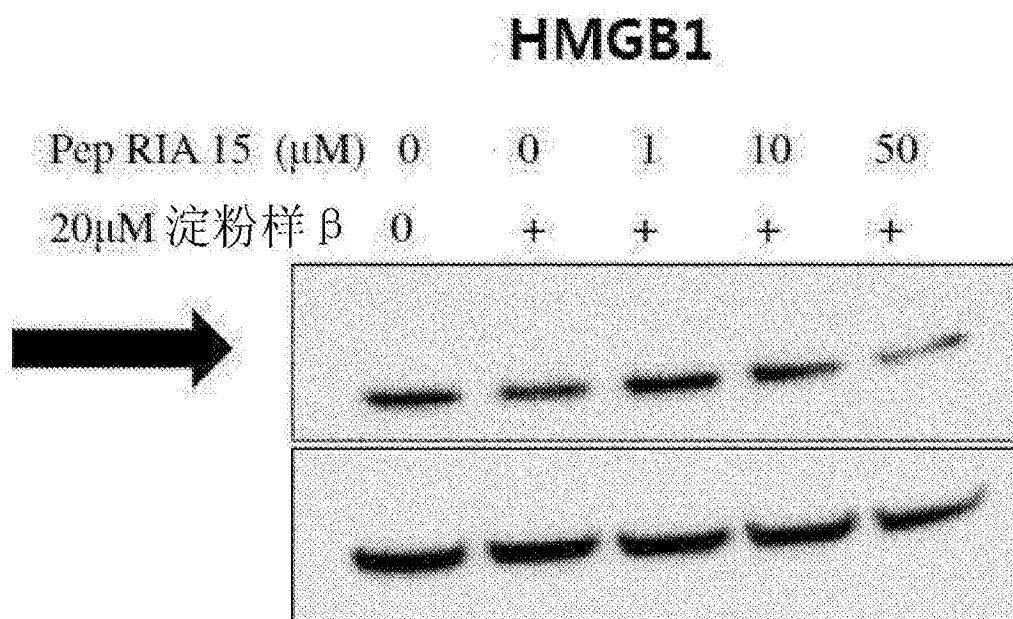


图72

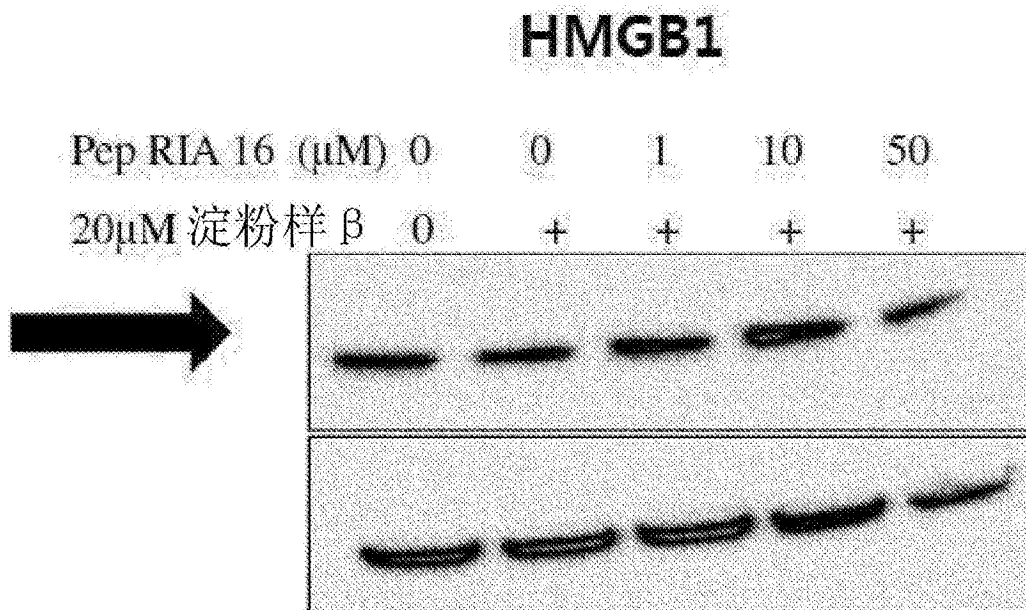


图73

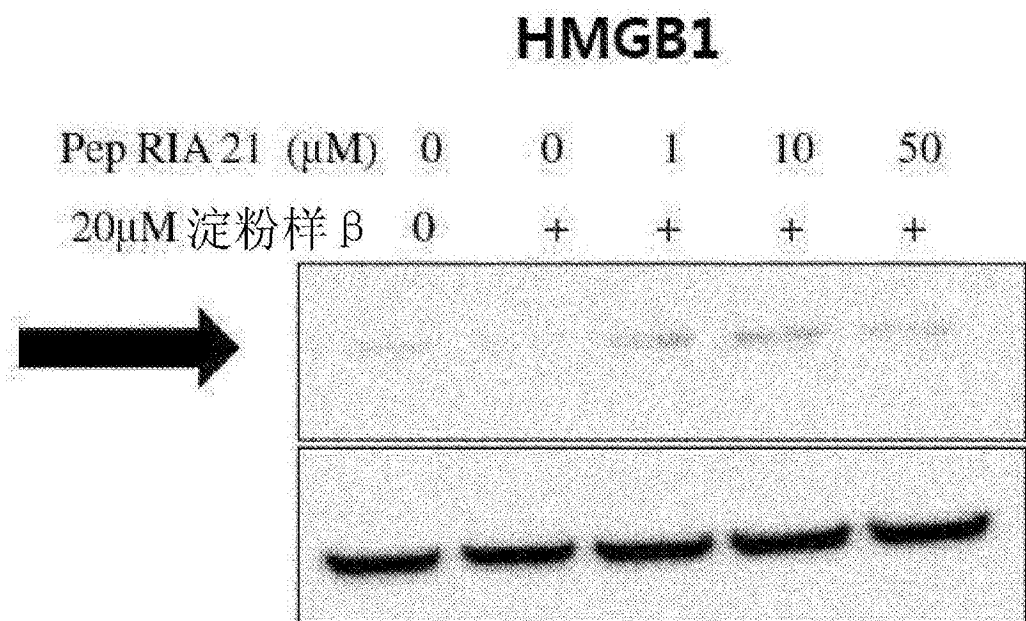


图74

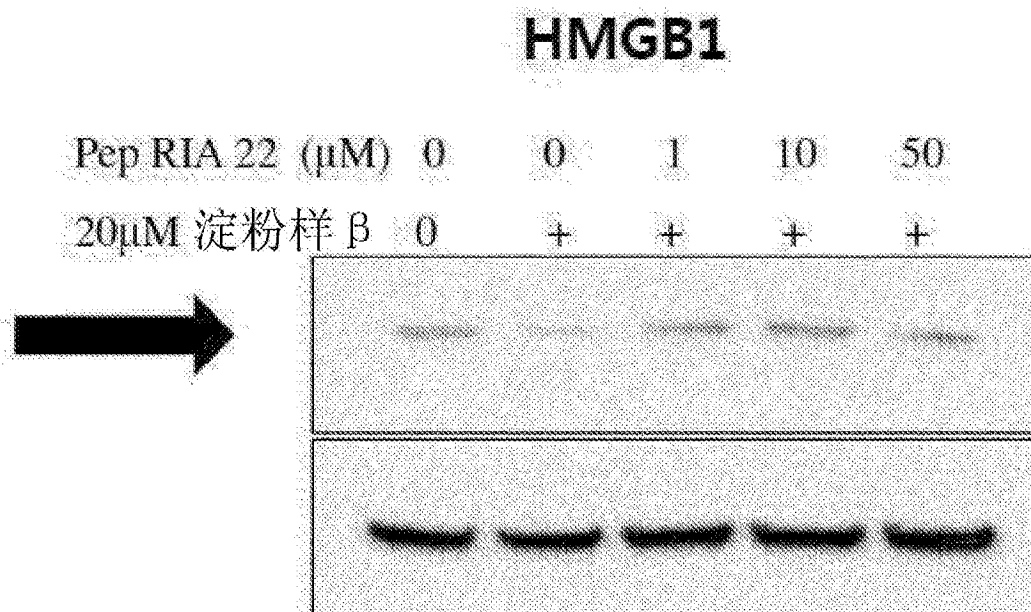


图75

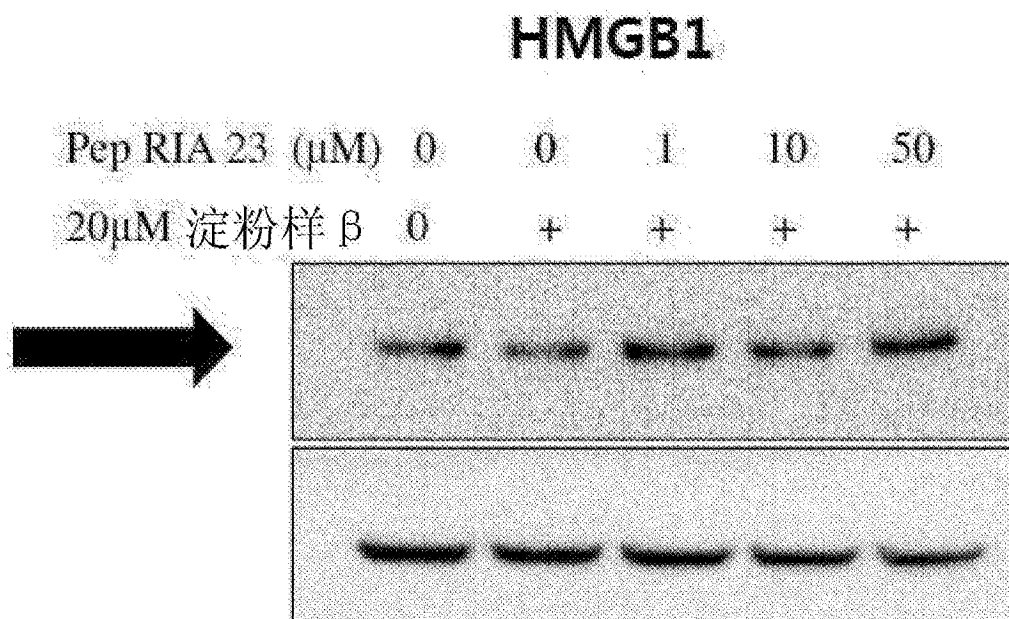


图76

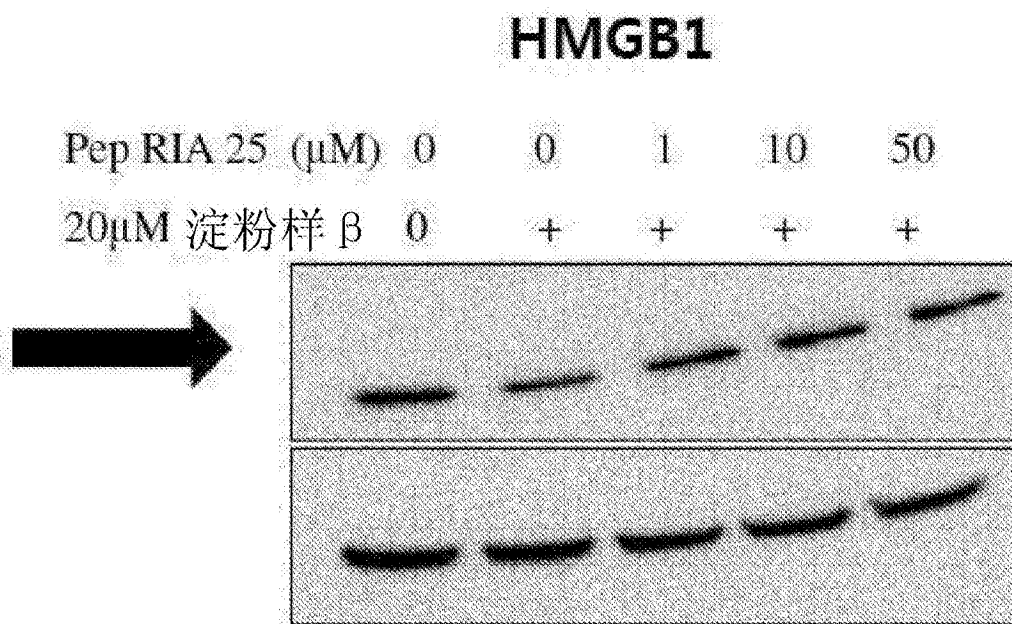


图77

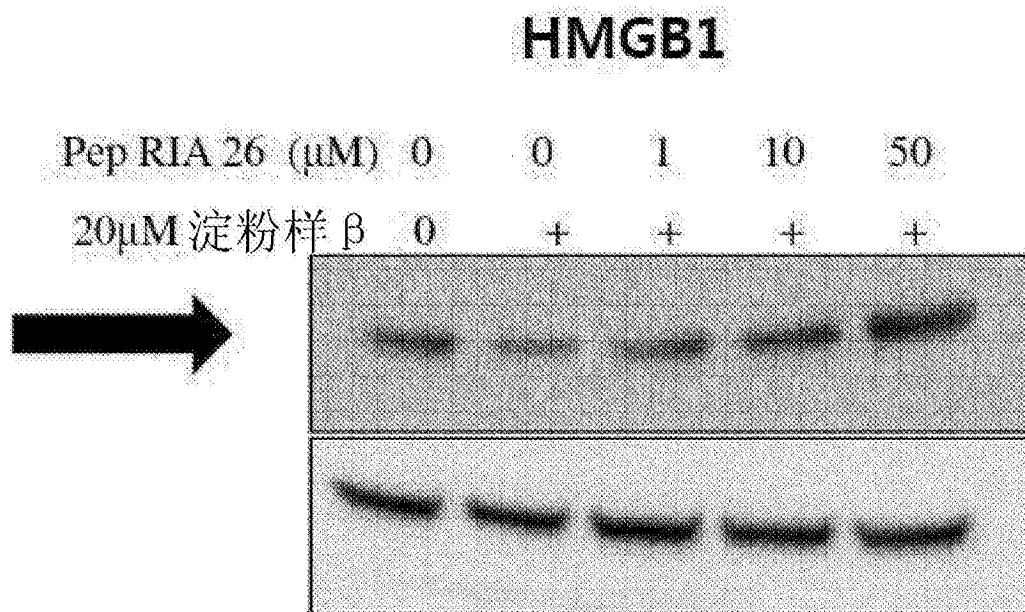


图78

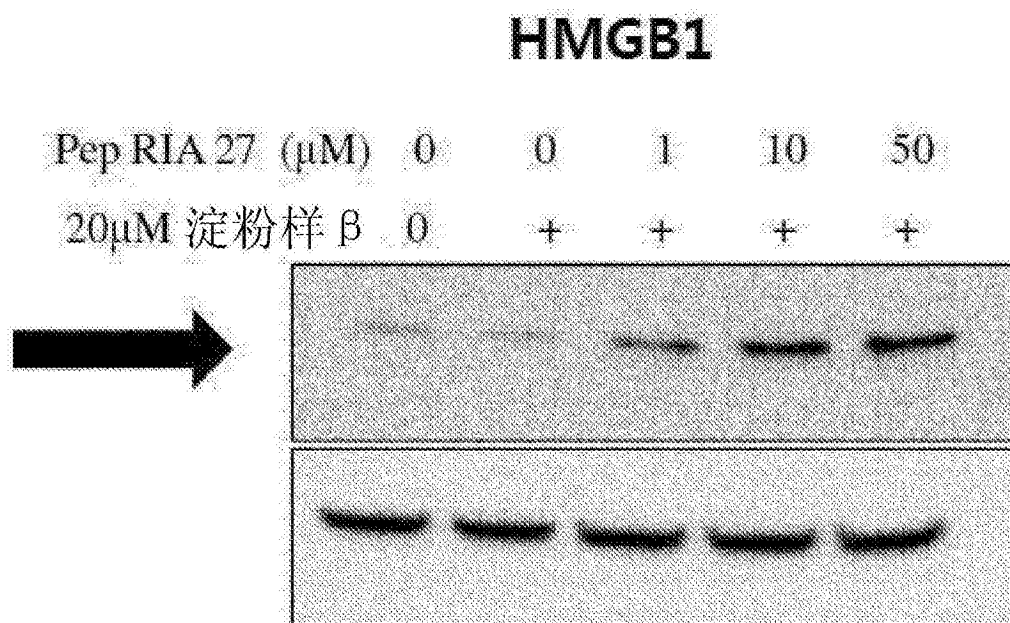


图79

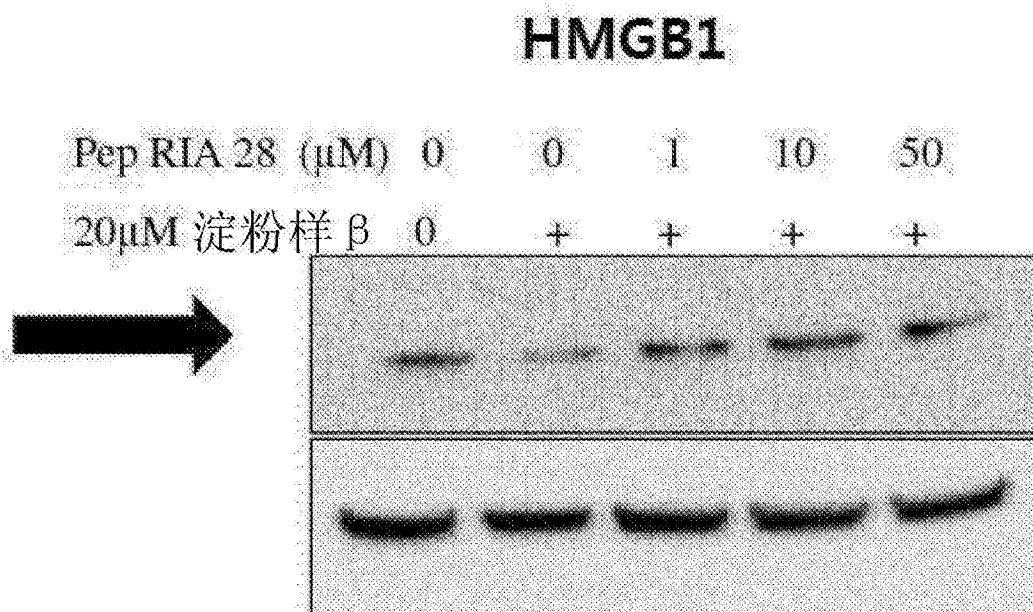


图80

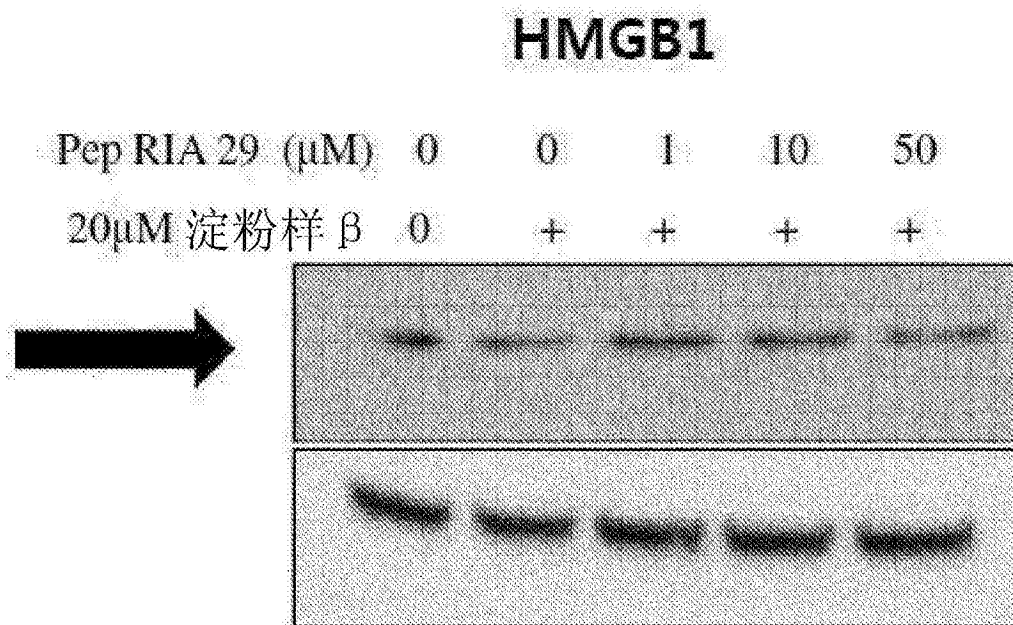


图81

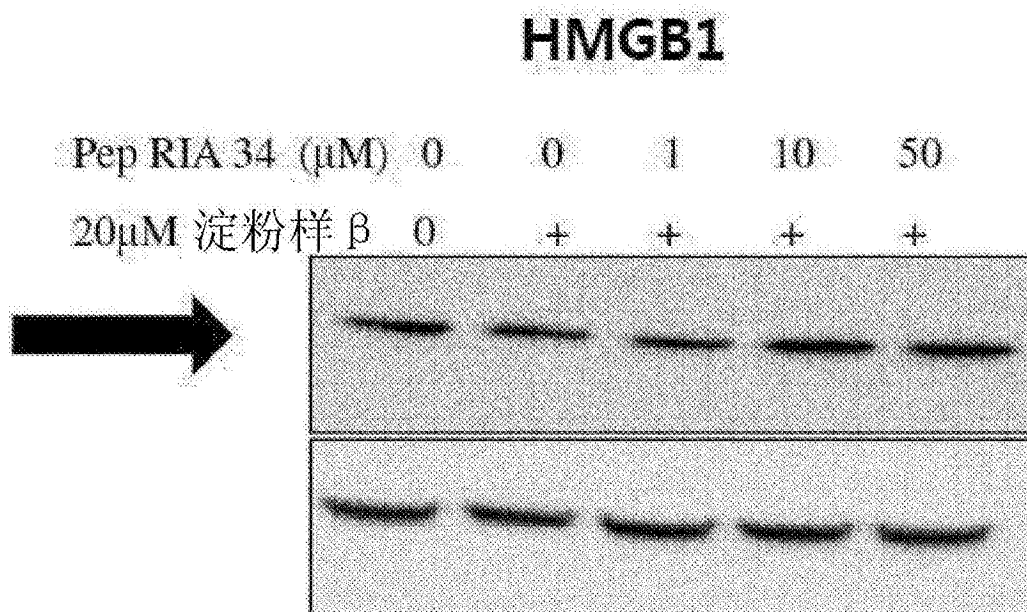


图82

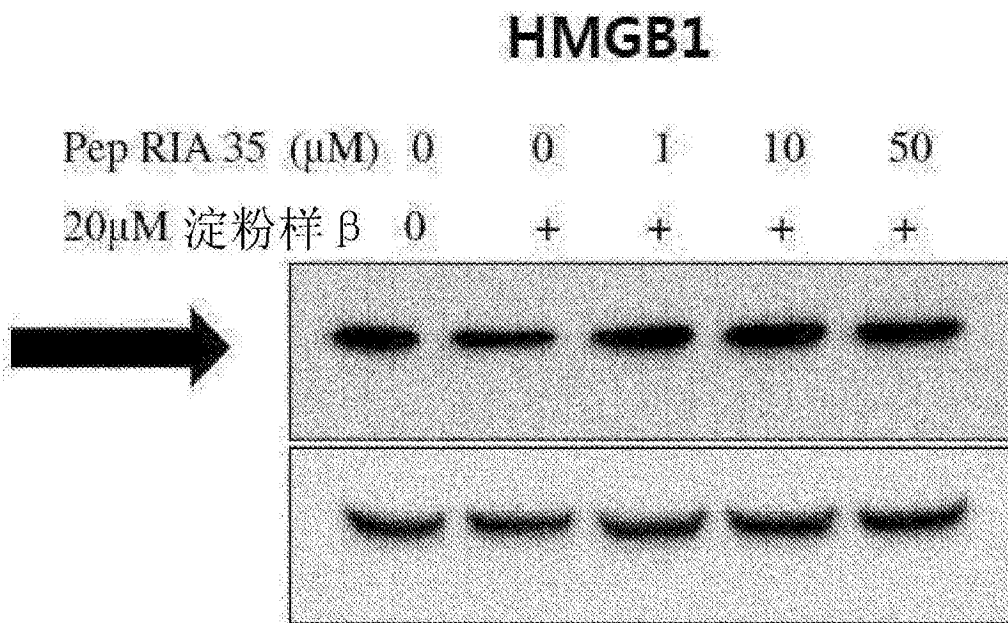


图83

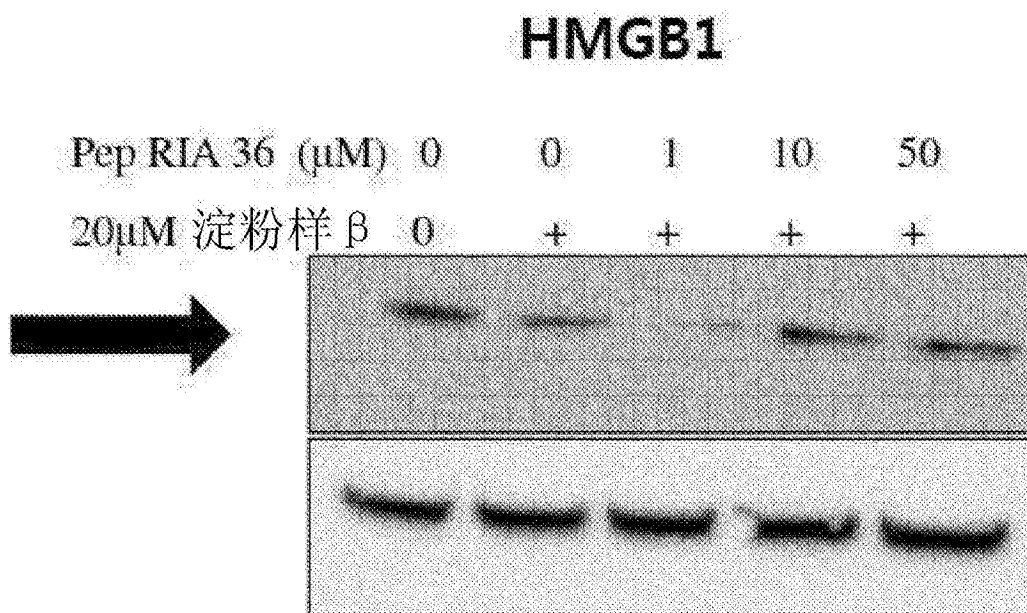


图84

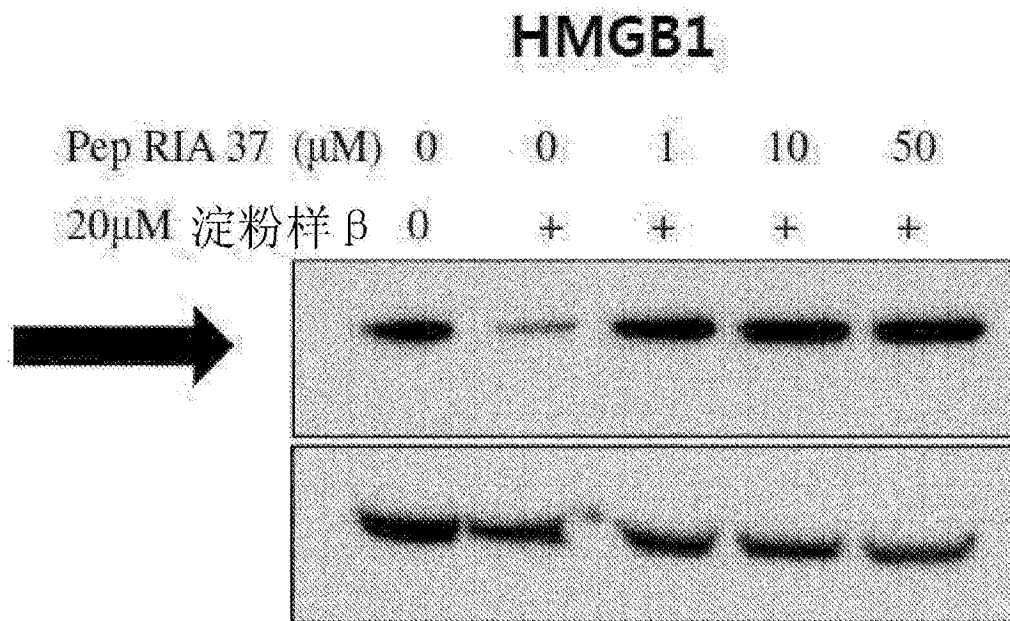


图85

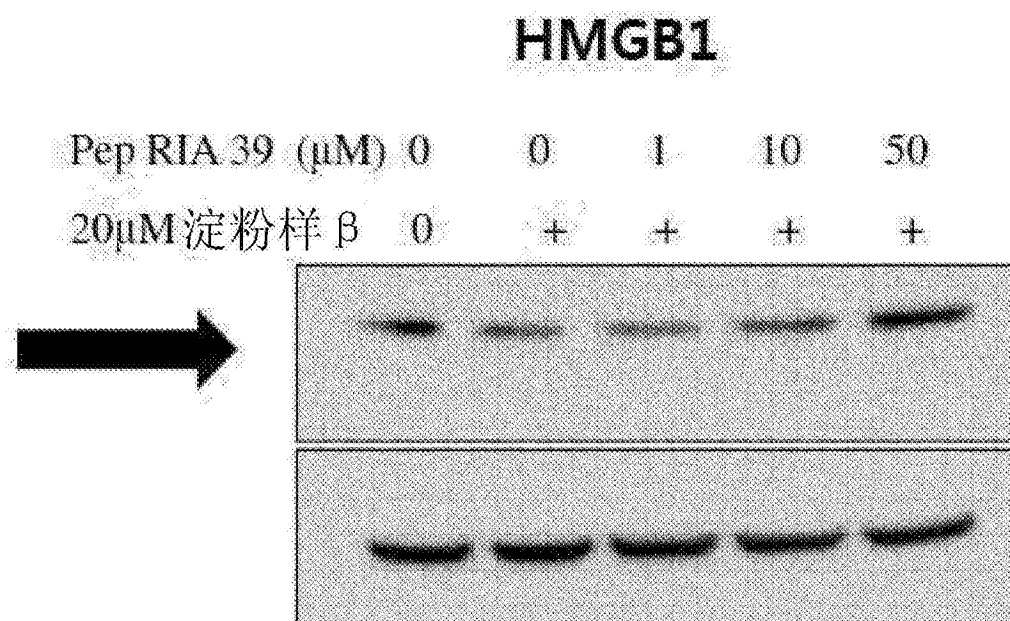


图86

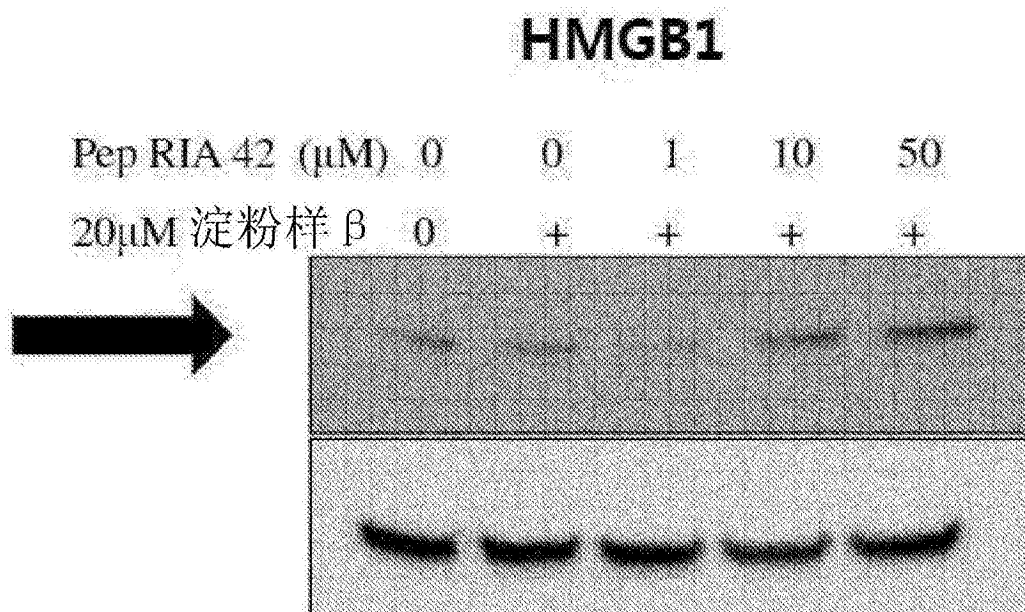


图87

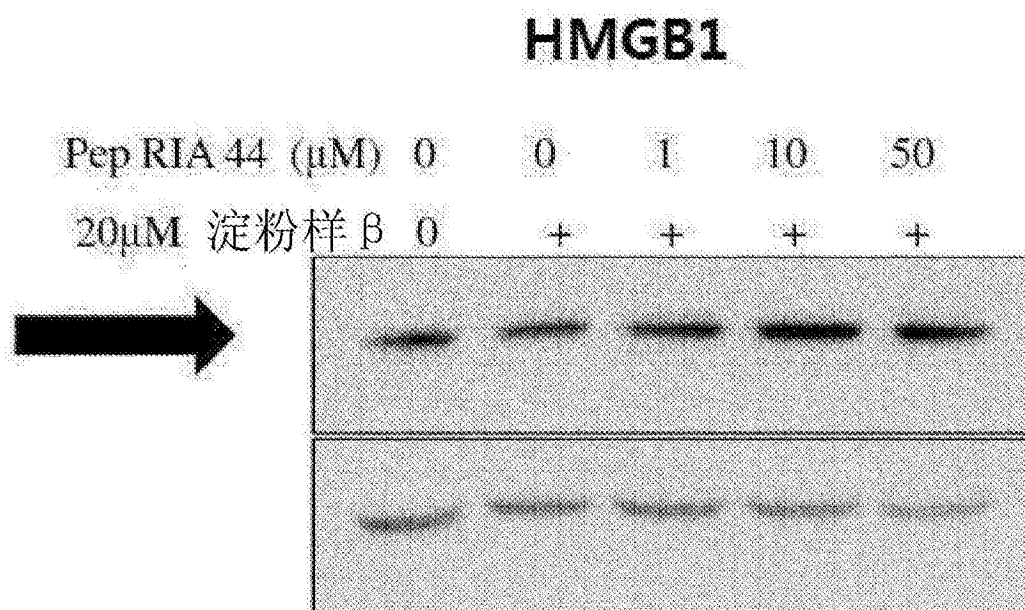


图88

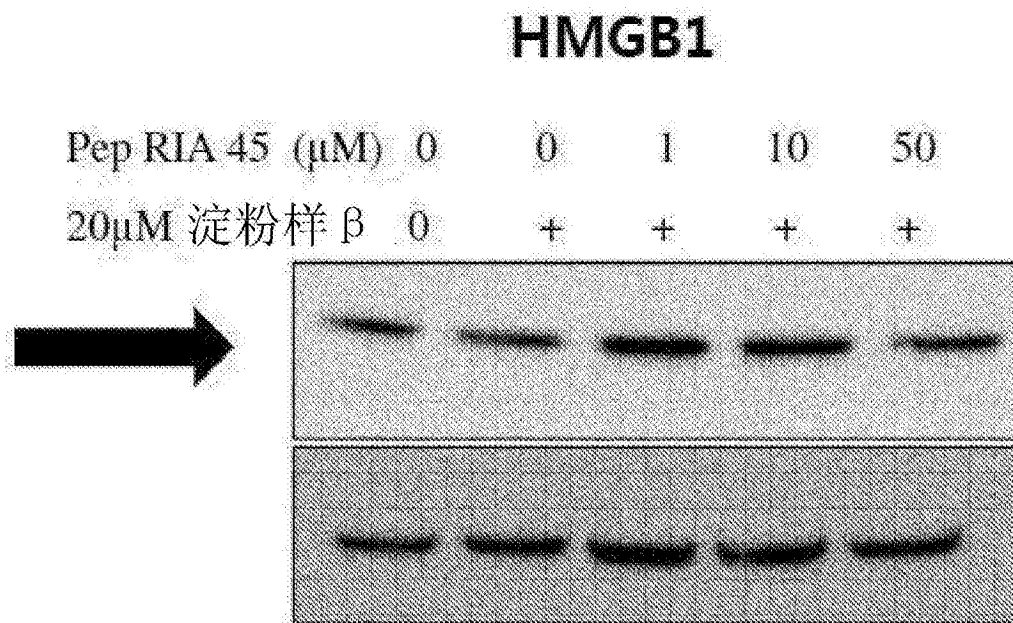


图89

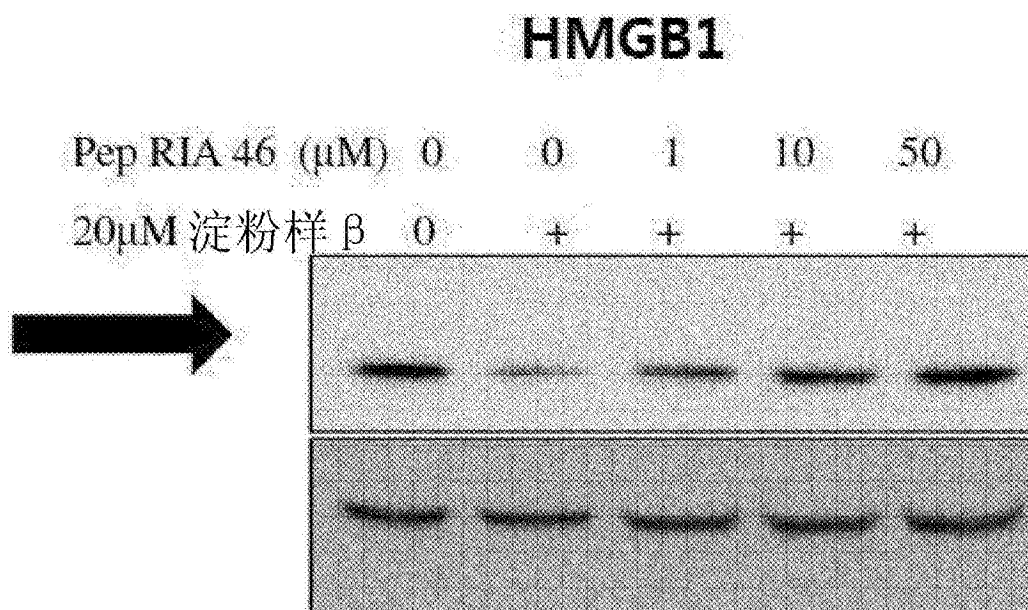


图90

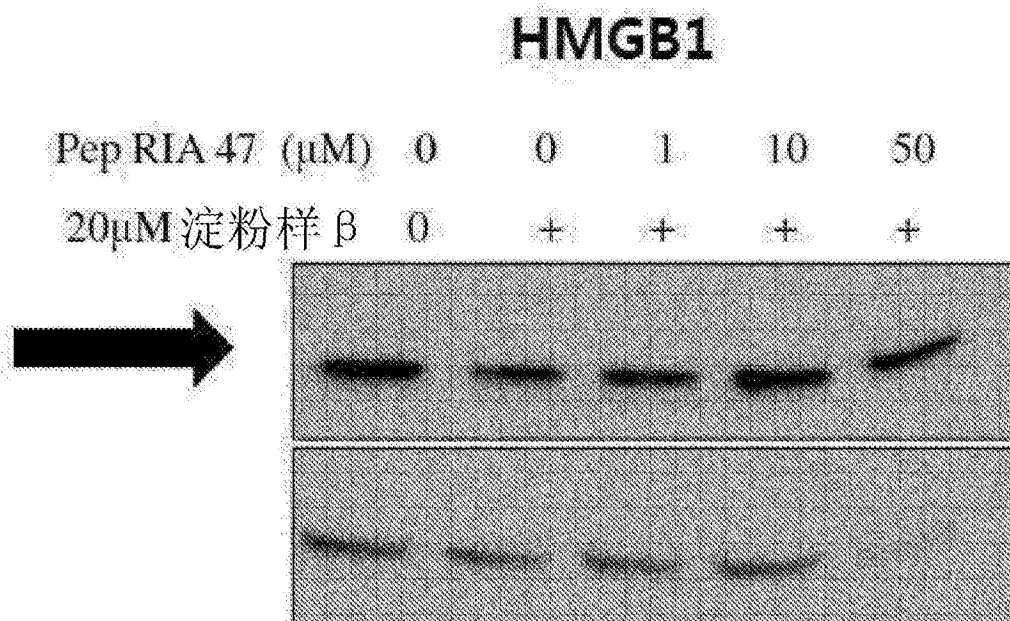


图91

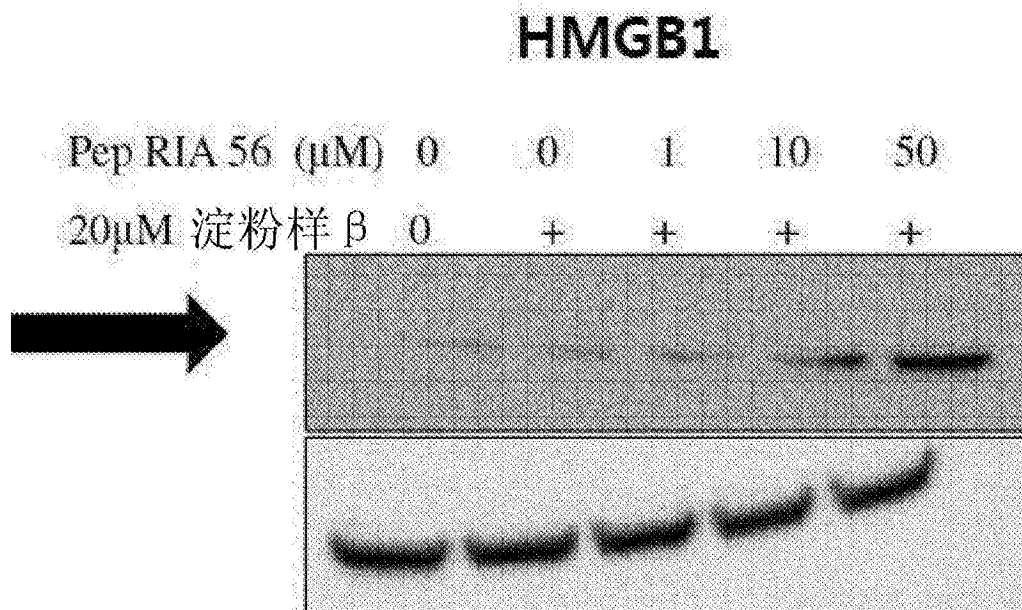


图92

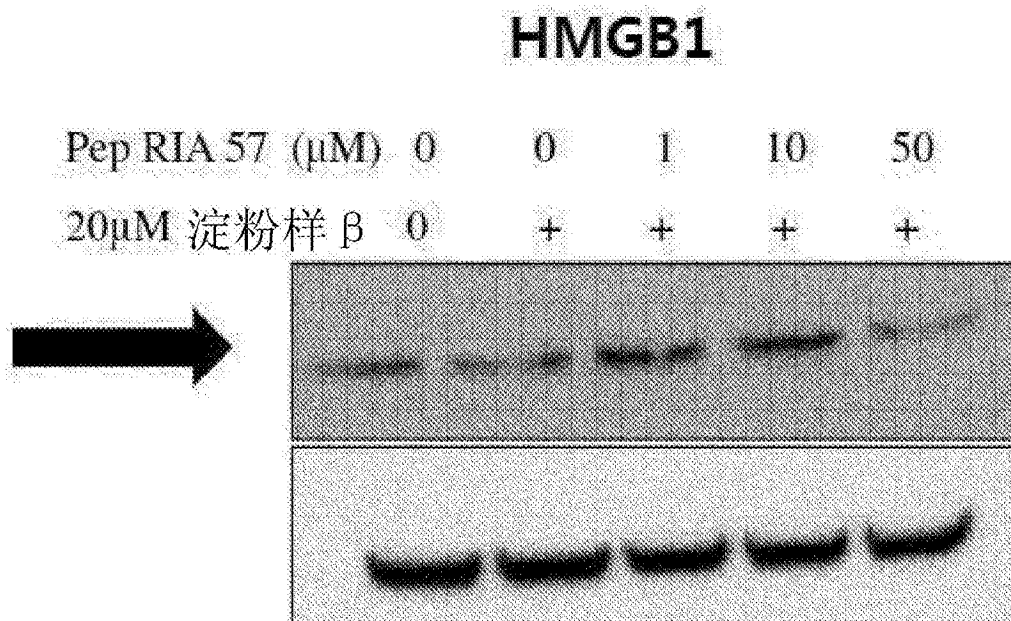


图93

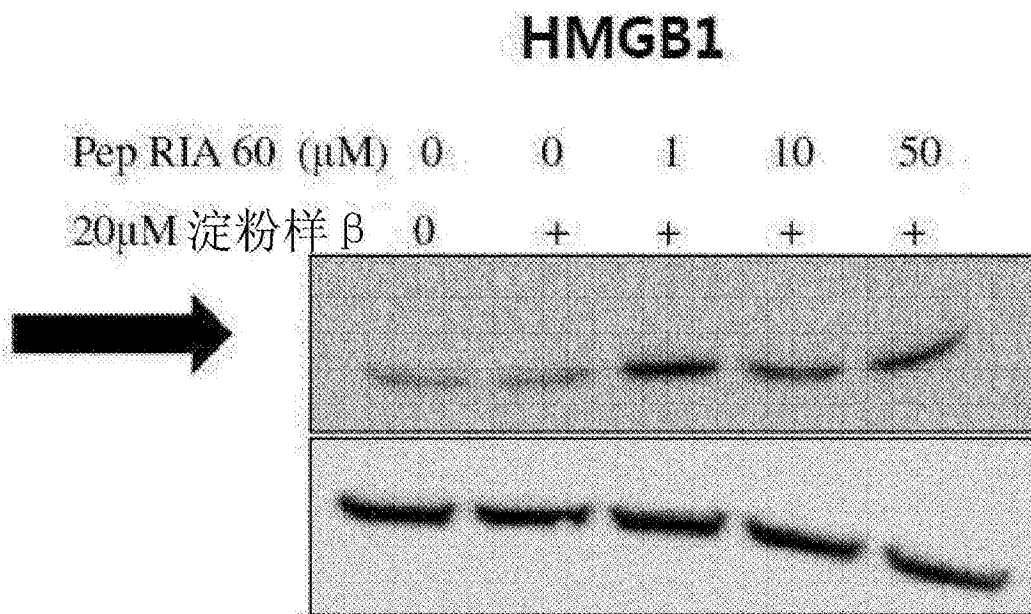


图94

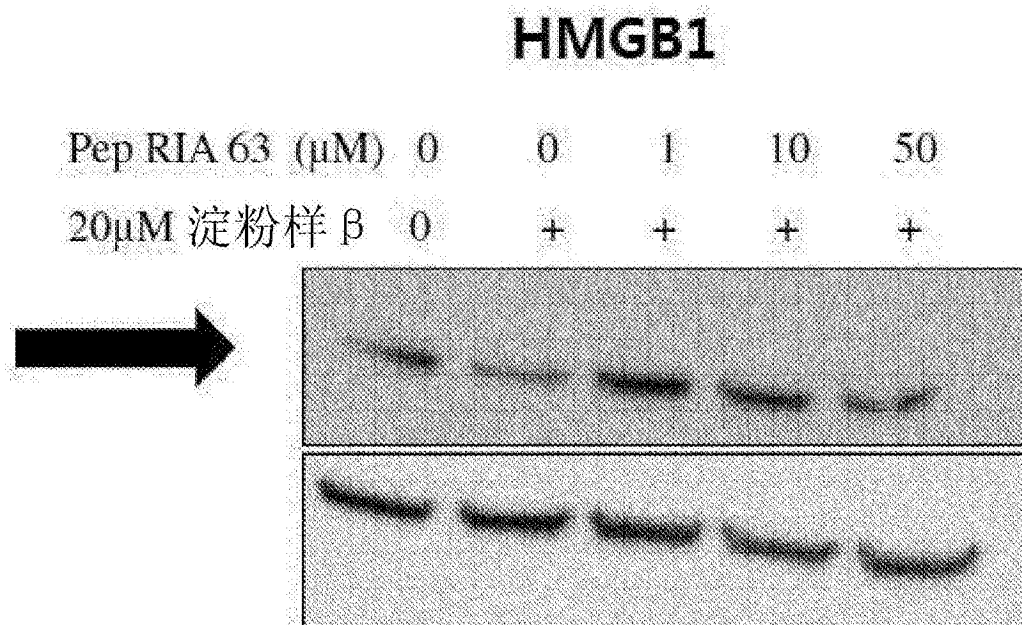


图95

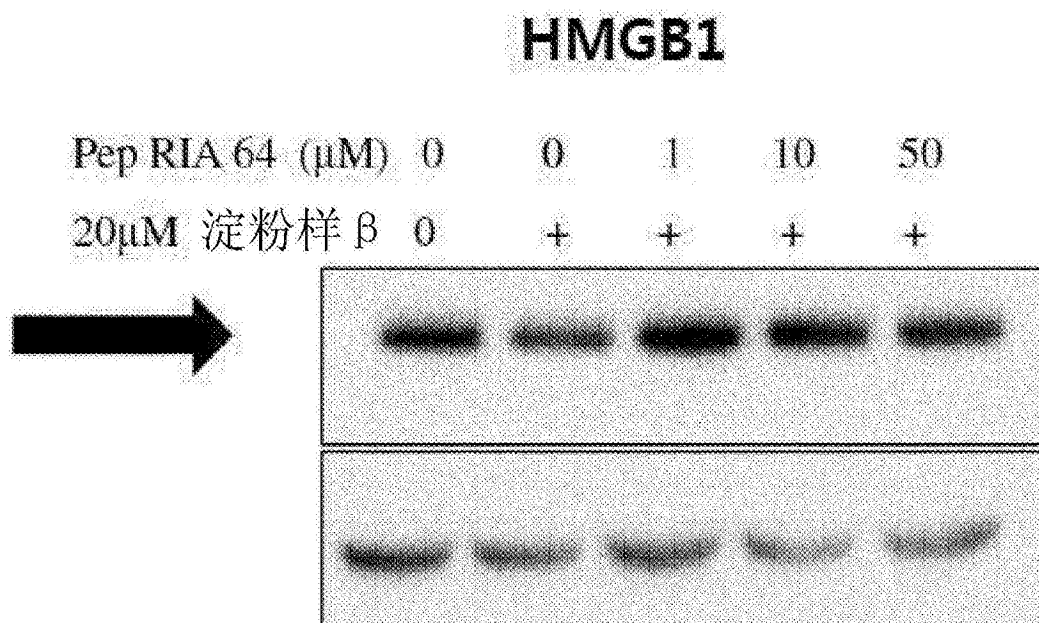


图96

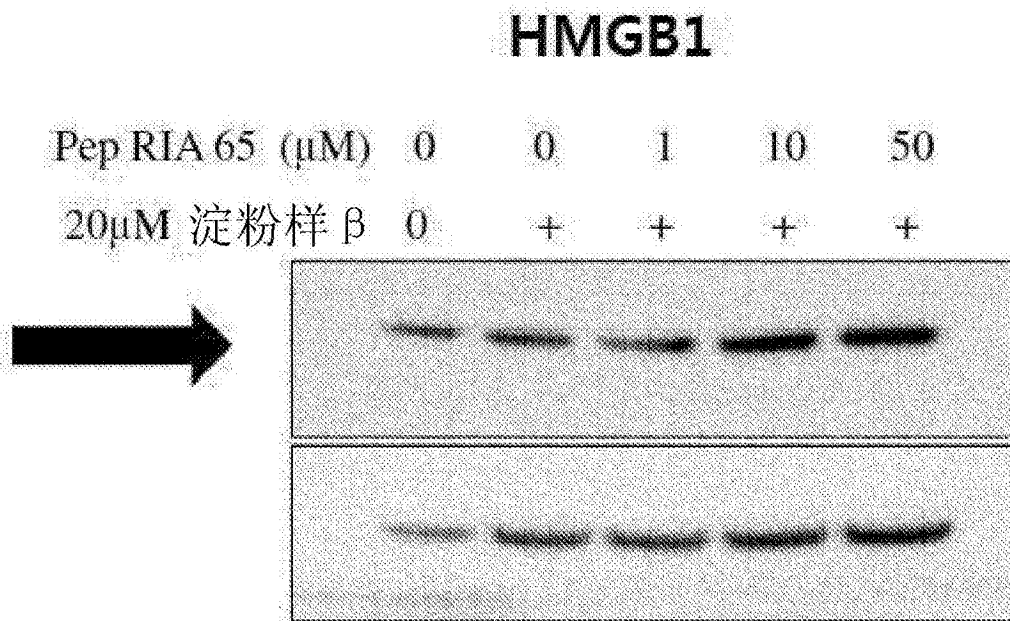


图97

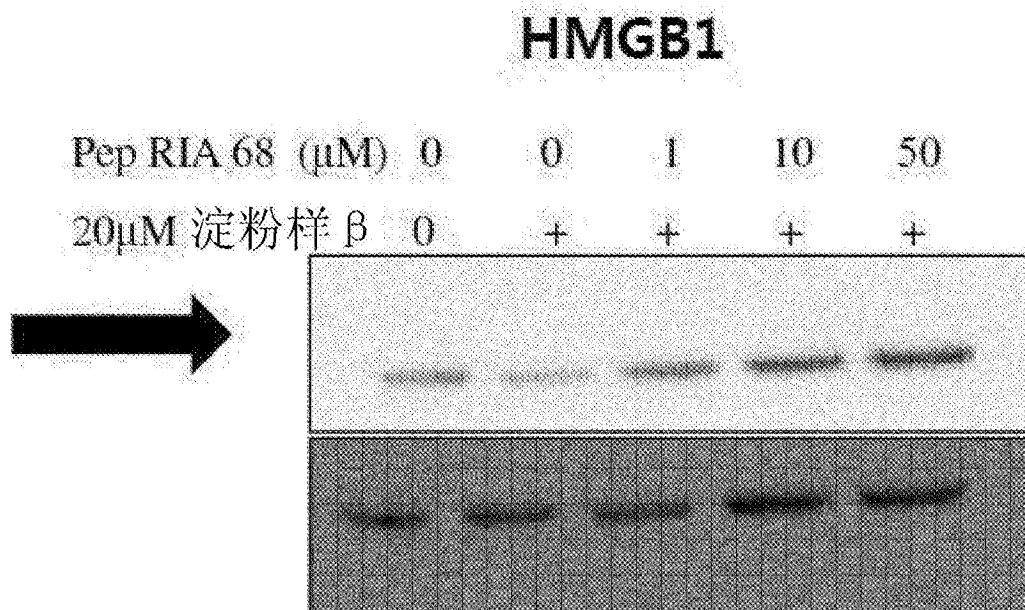


图98

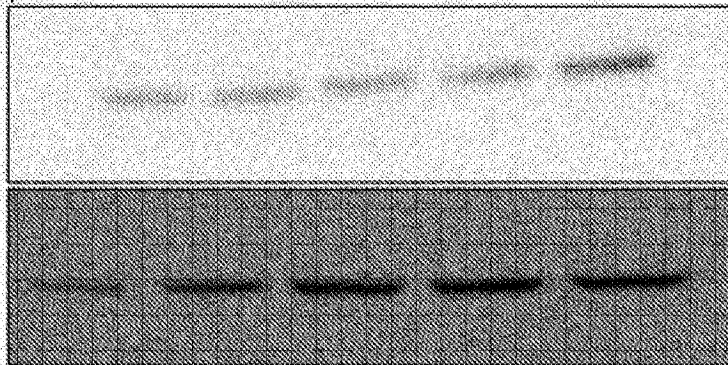
HMGB1Pep RIA 70 (μM) 0 0 1 10 5020 μM 淀粉样 β 0 + + + +

图99

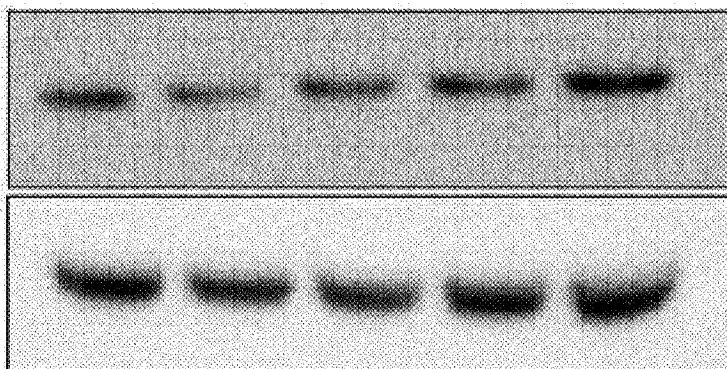
HMGB1Pep RIA 73 (μM) 0 0 1 10 5020 μM 淀粉样 β 0 + + + +

图100

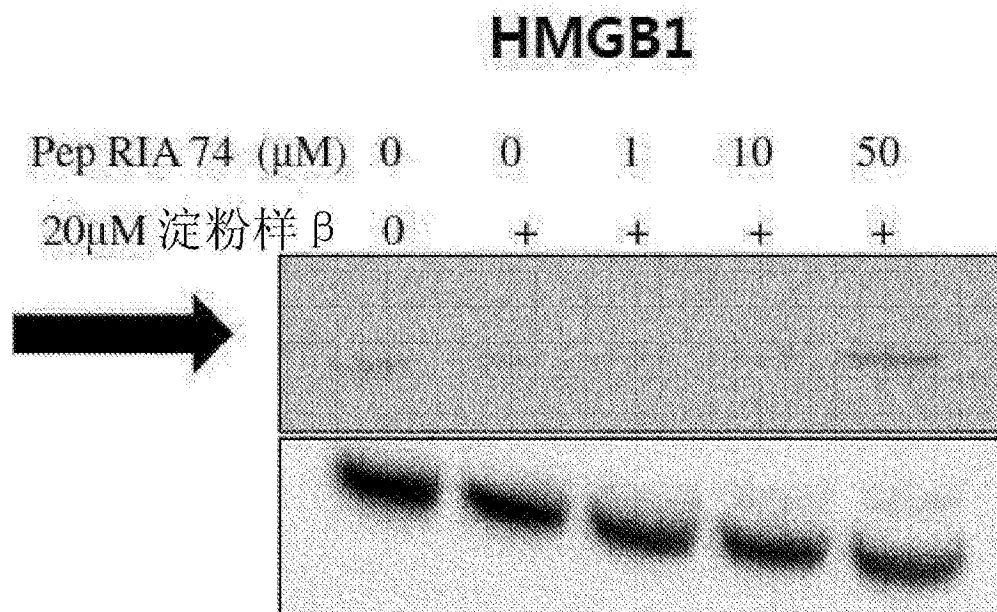


图101

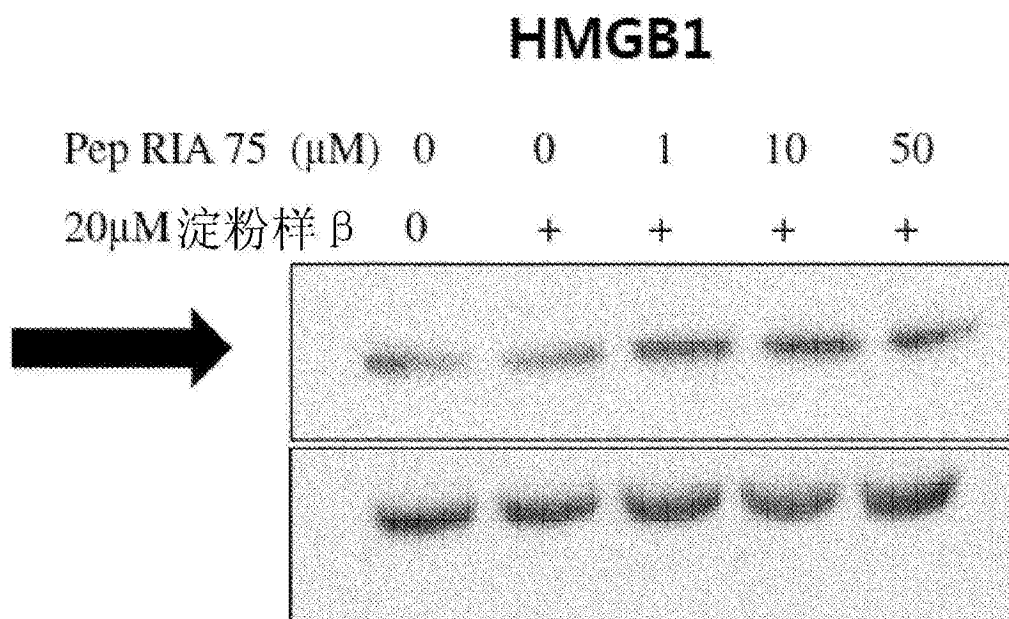


图102

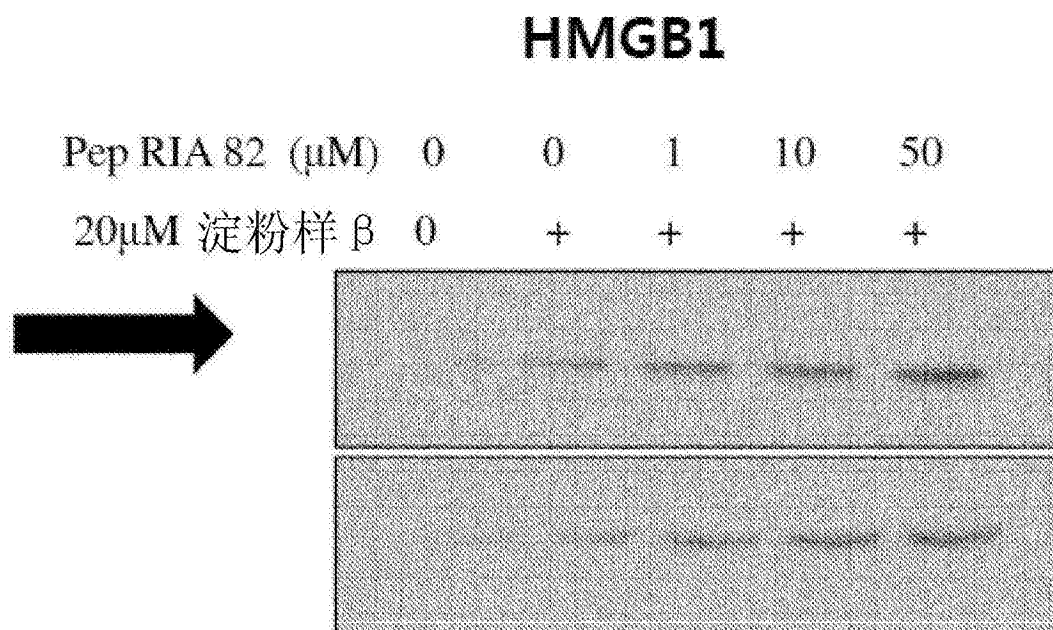


图103

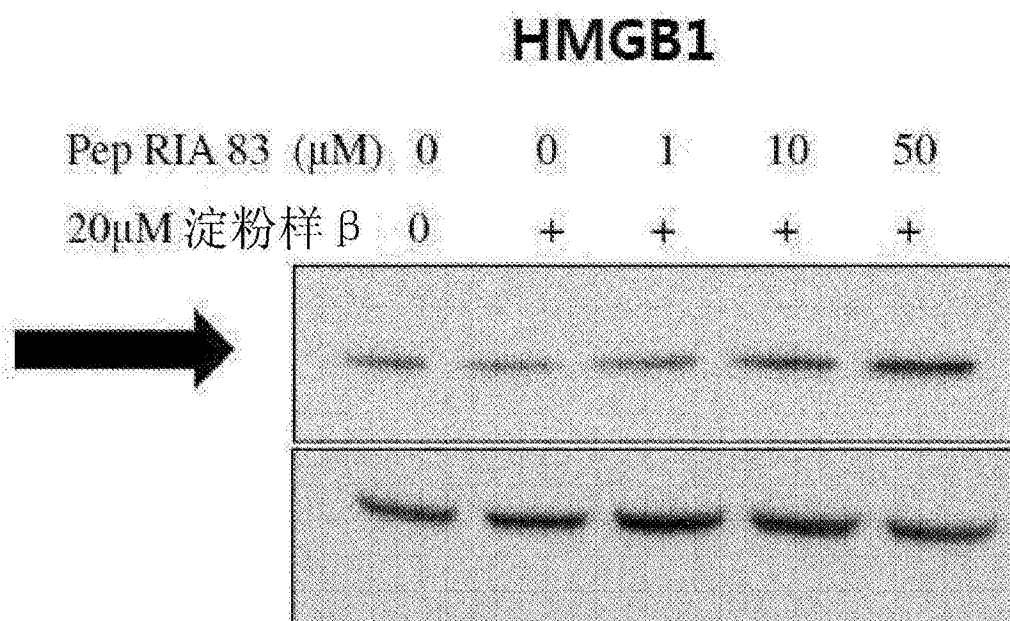


图104

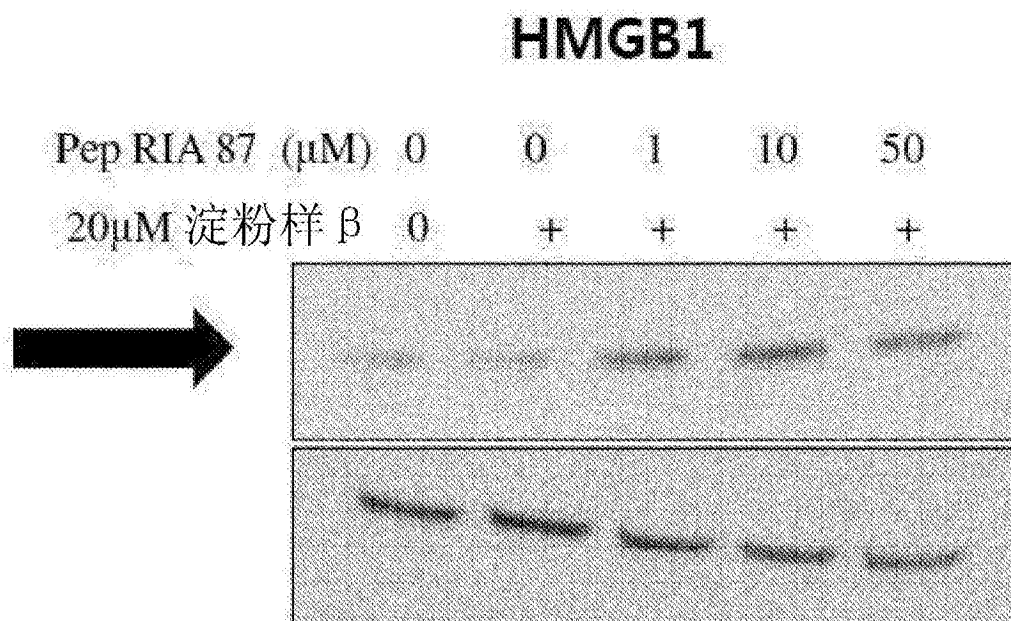


图105

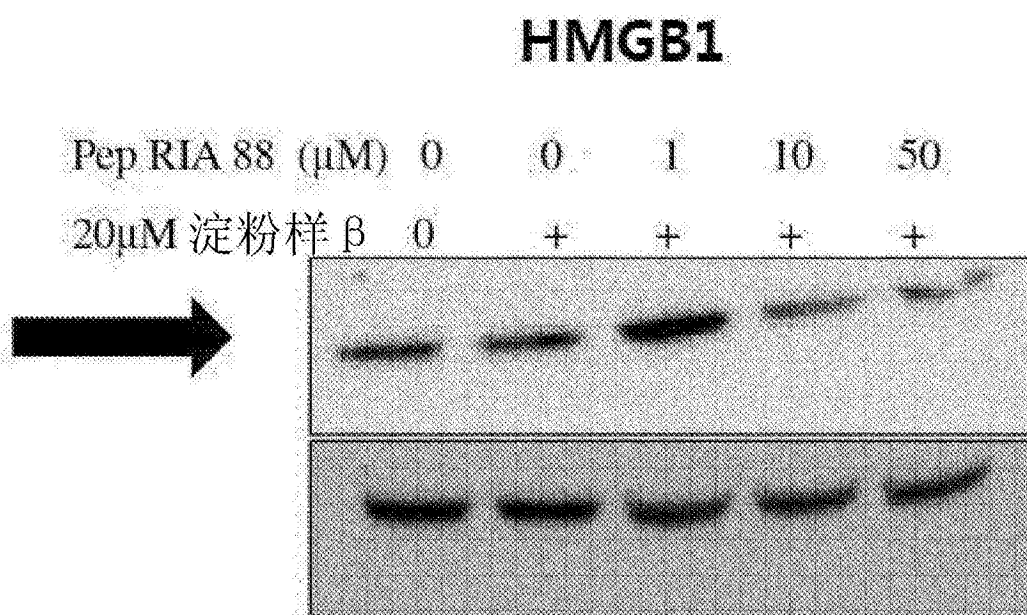


图106

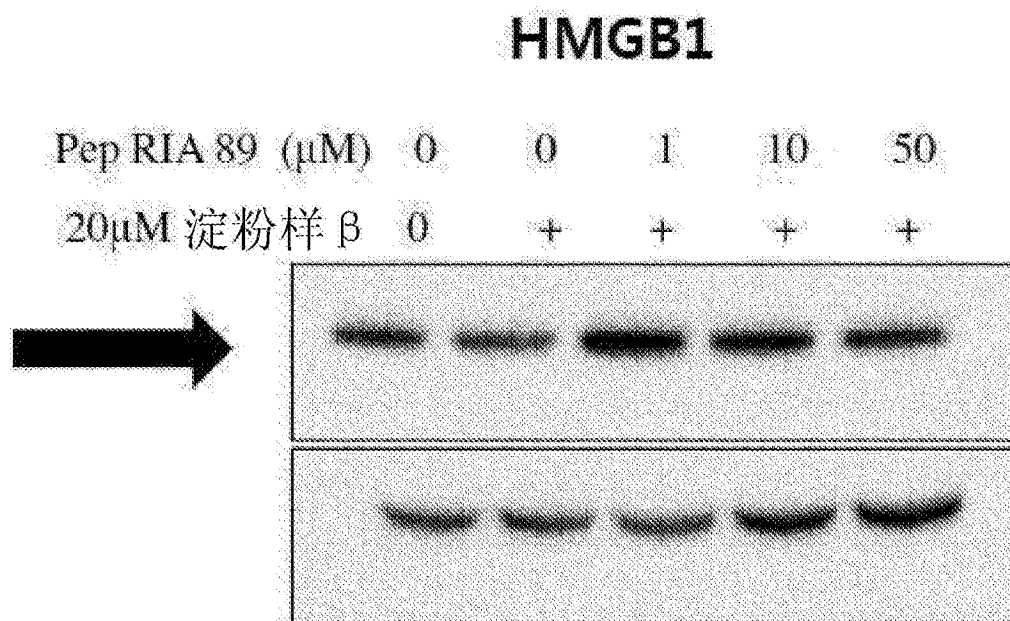


图107

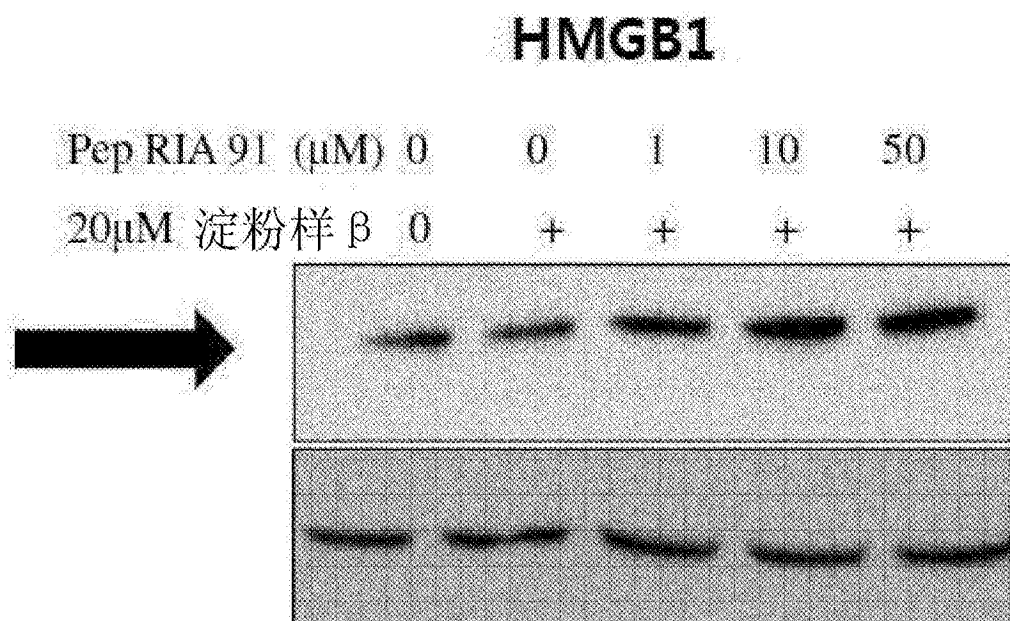


图108

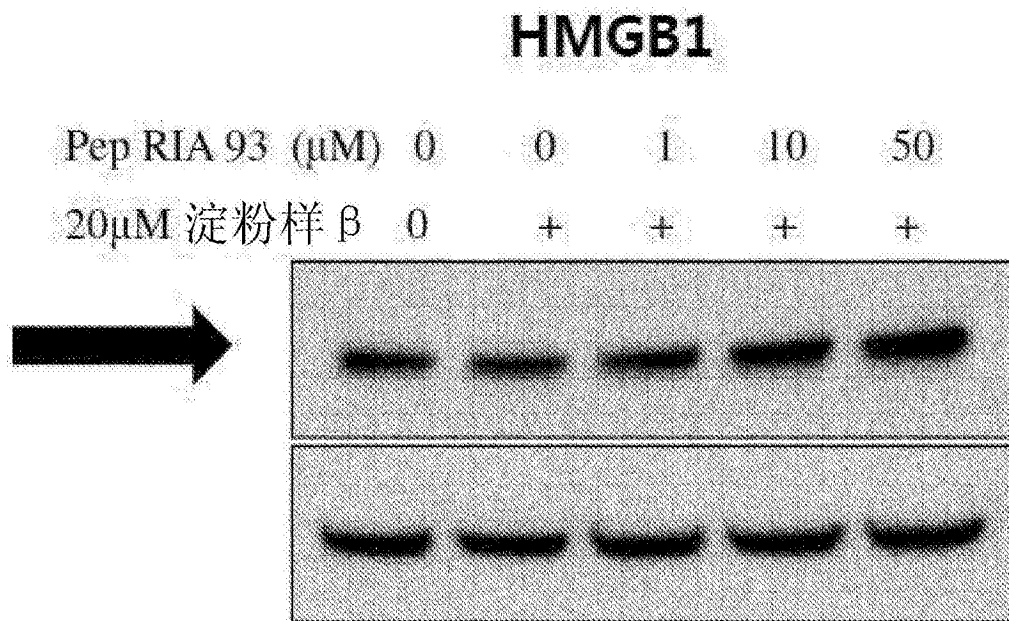


图109

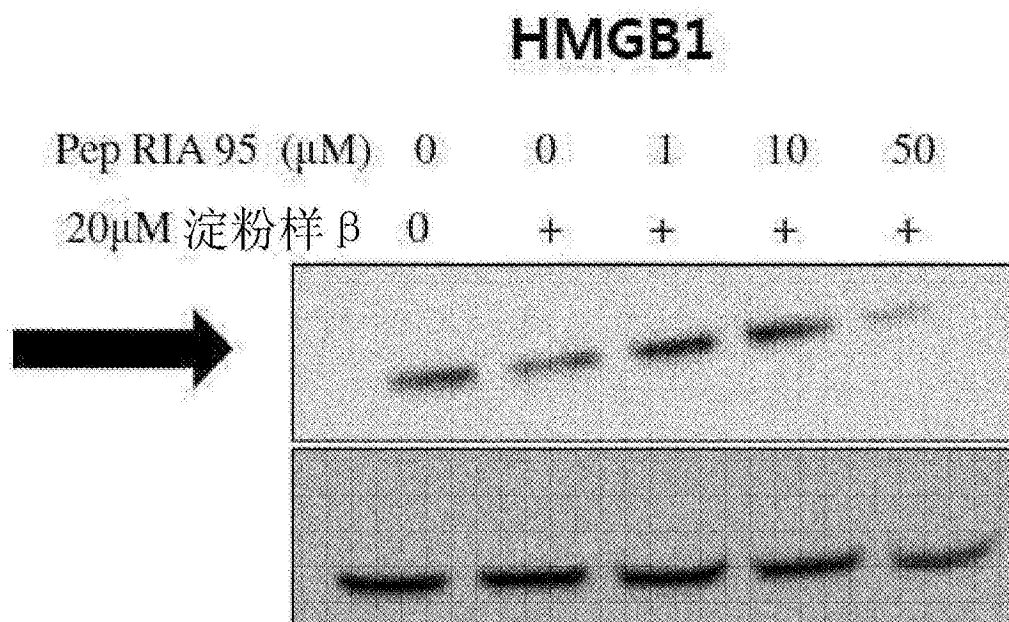


图110

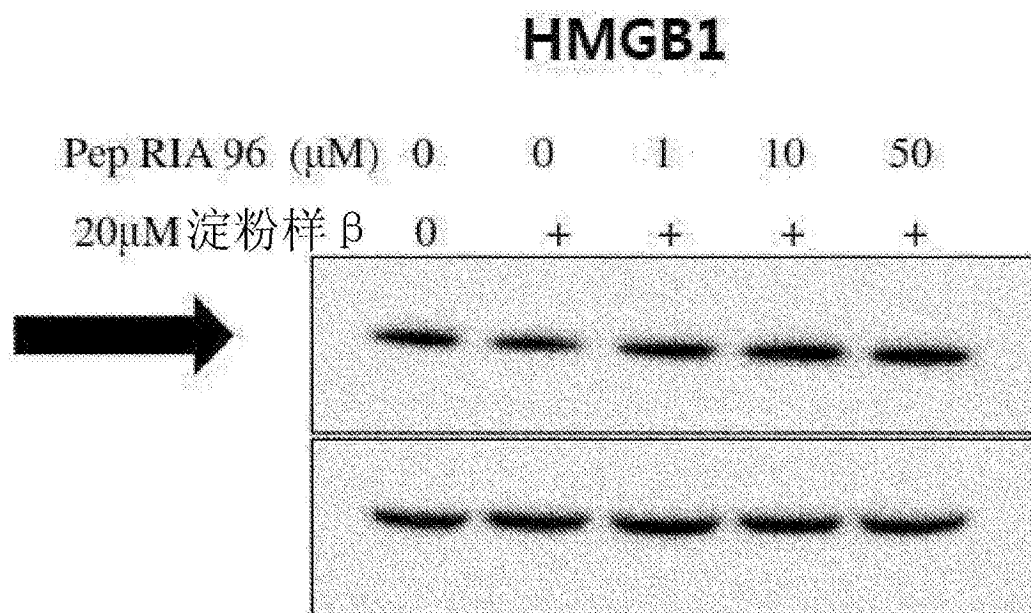


图111

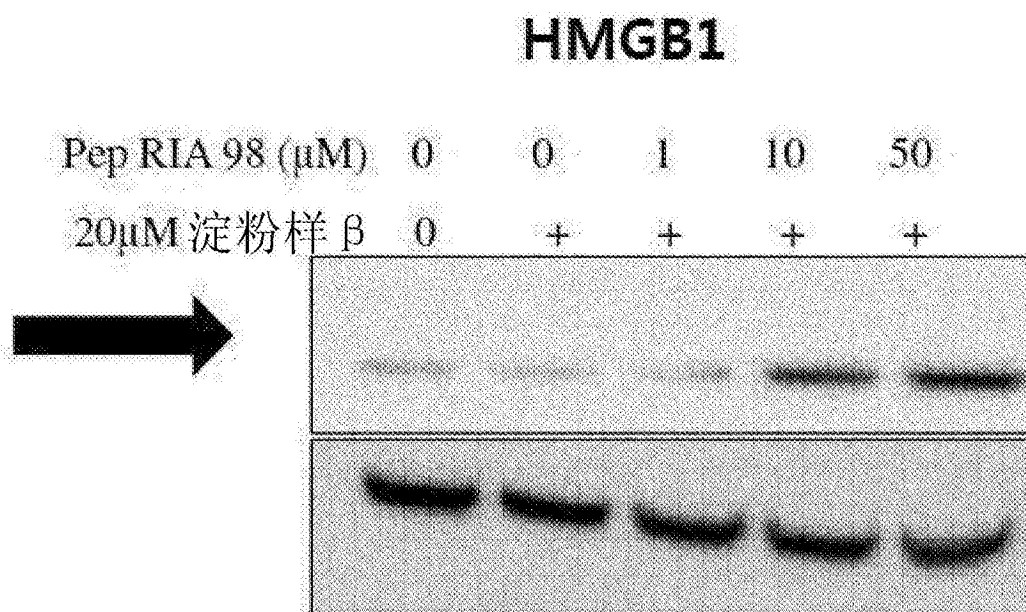


图112

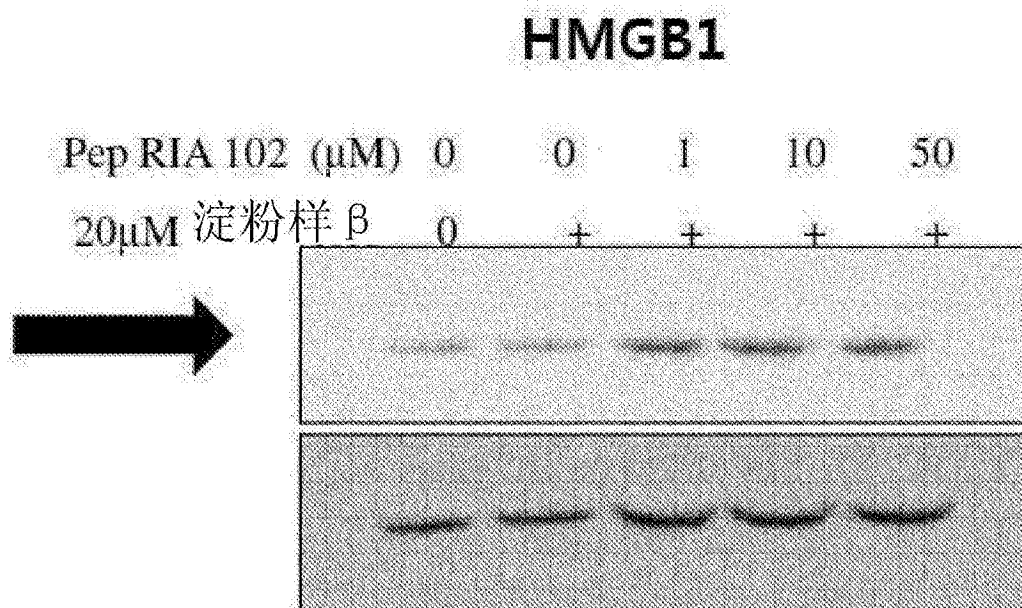


图113

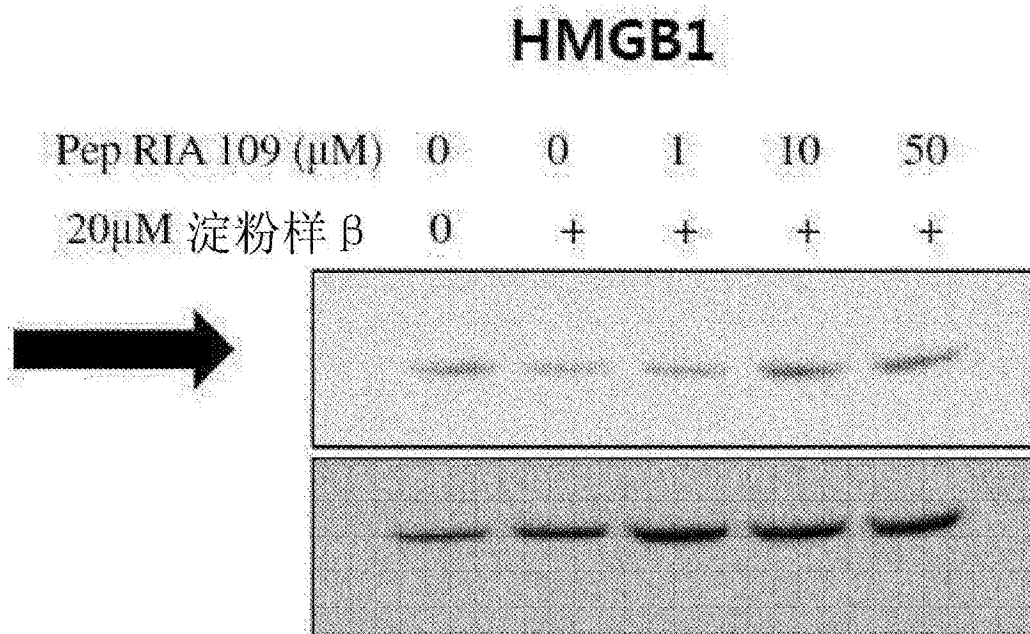


图114

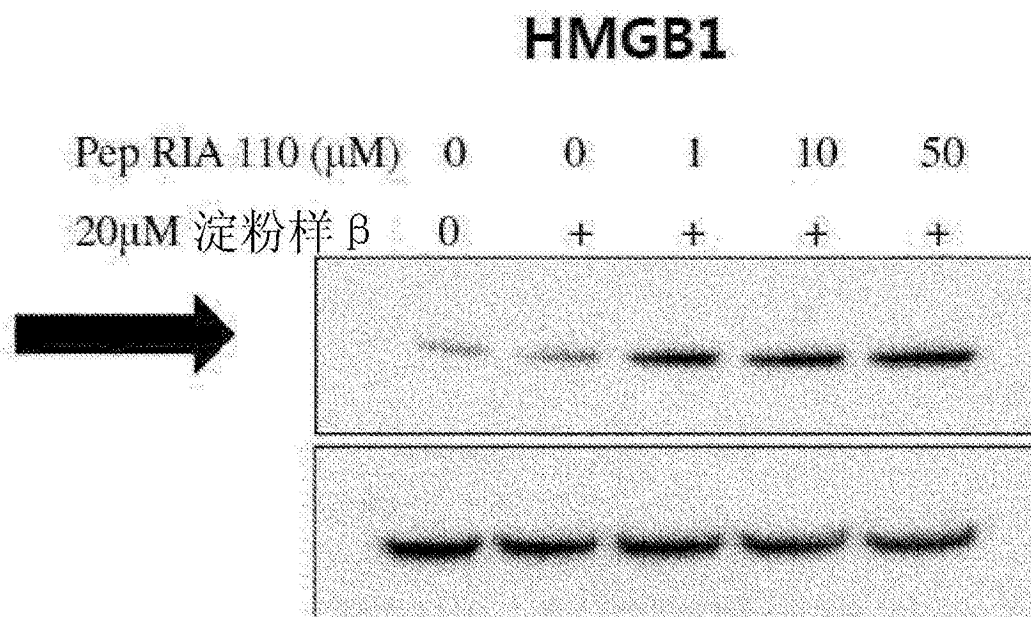


图115

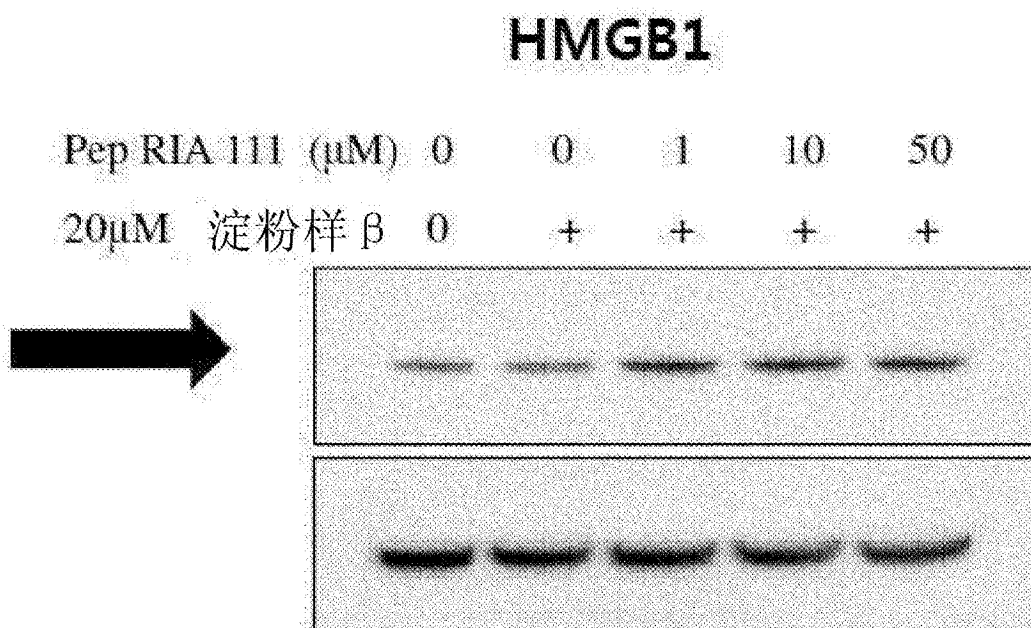


图116

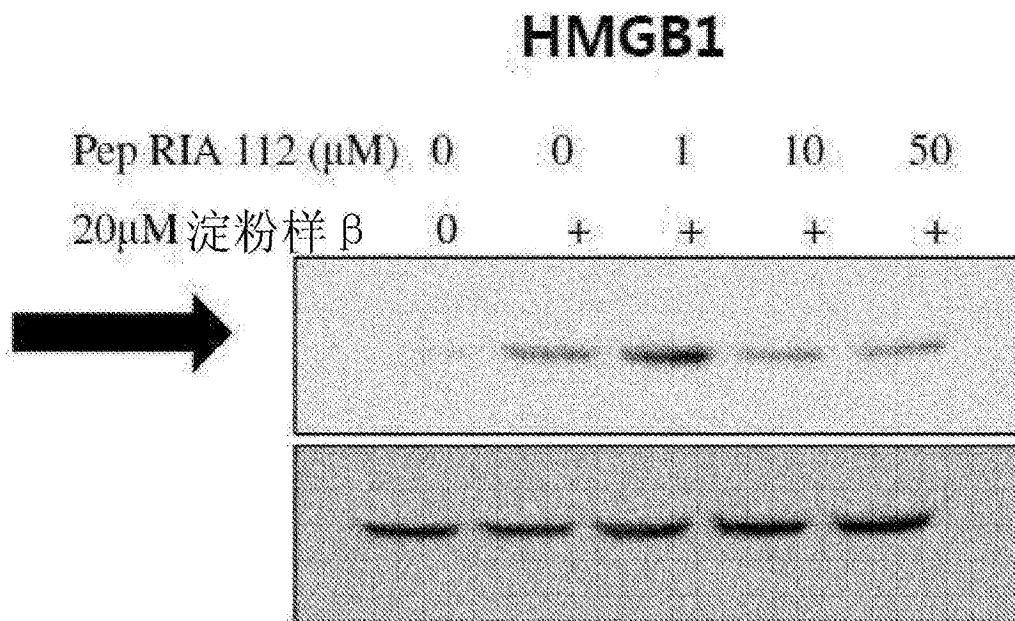


图117

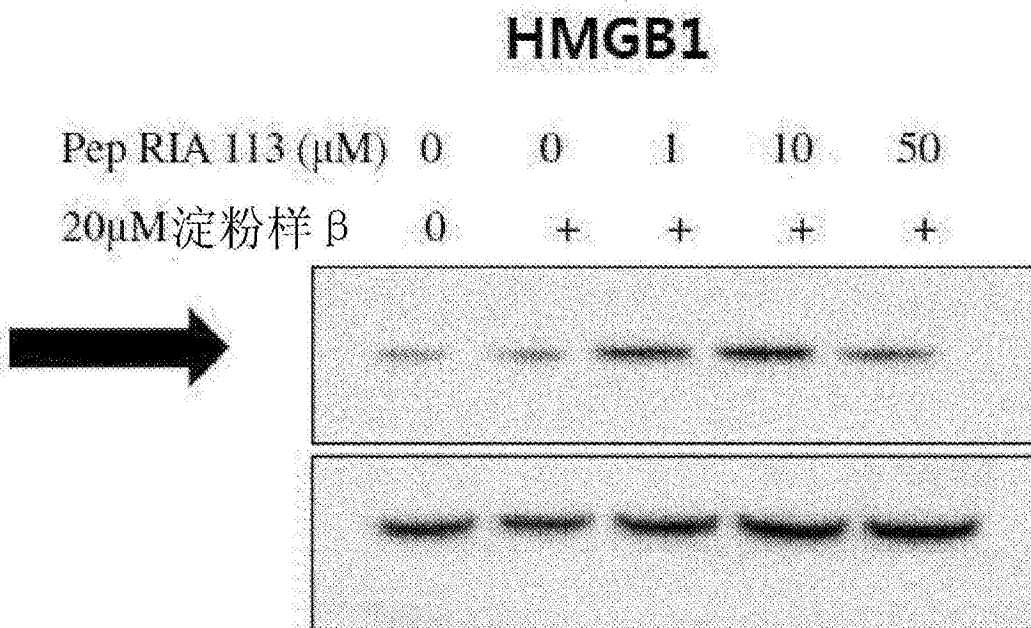


图118

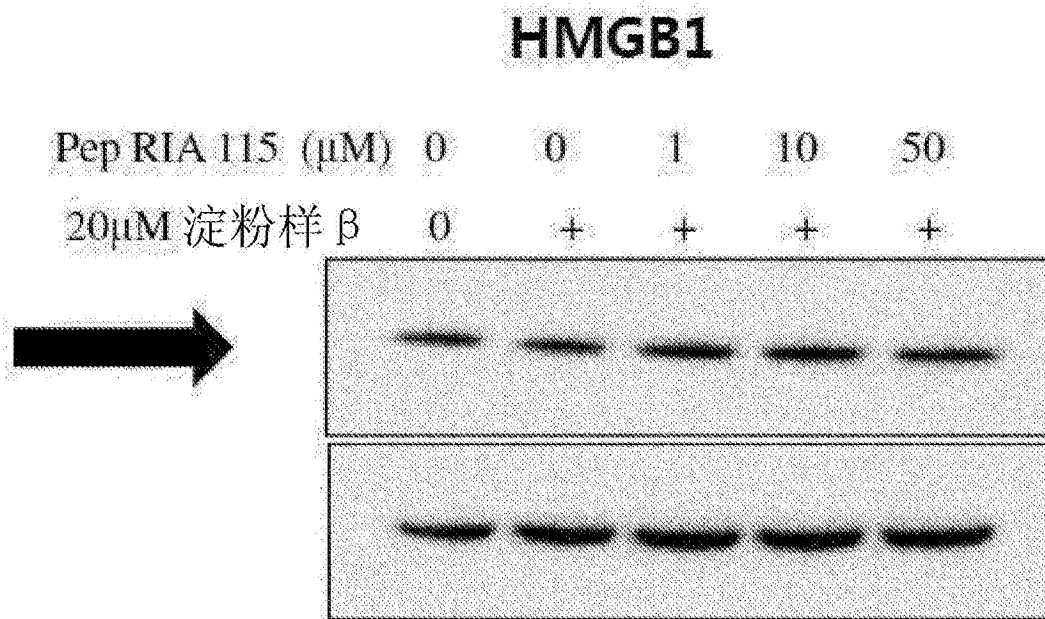


图119

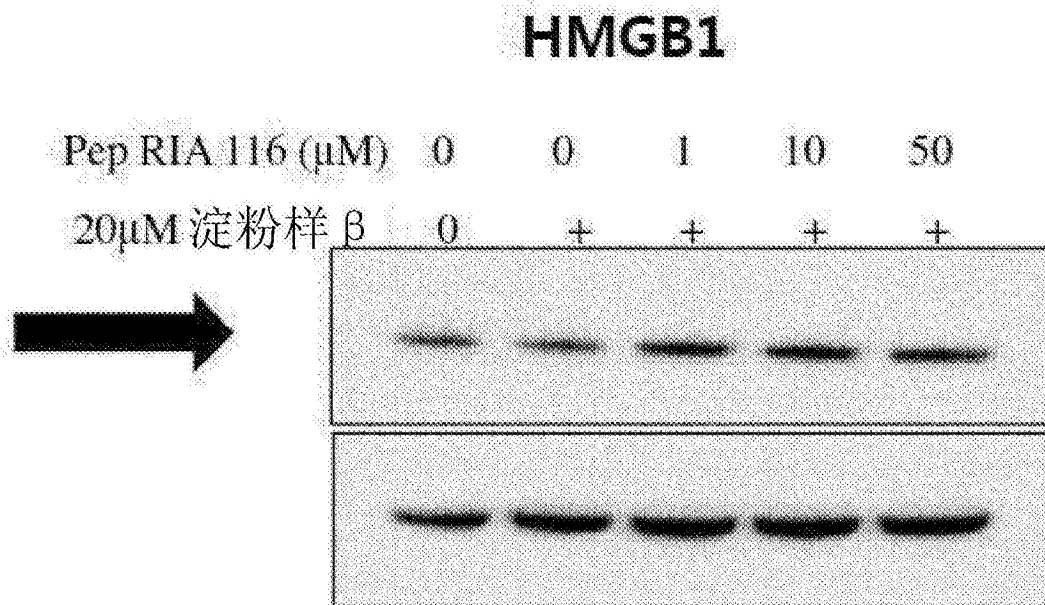


图120

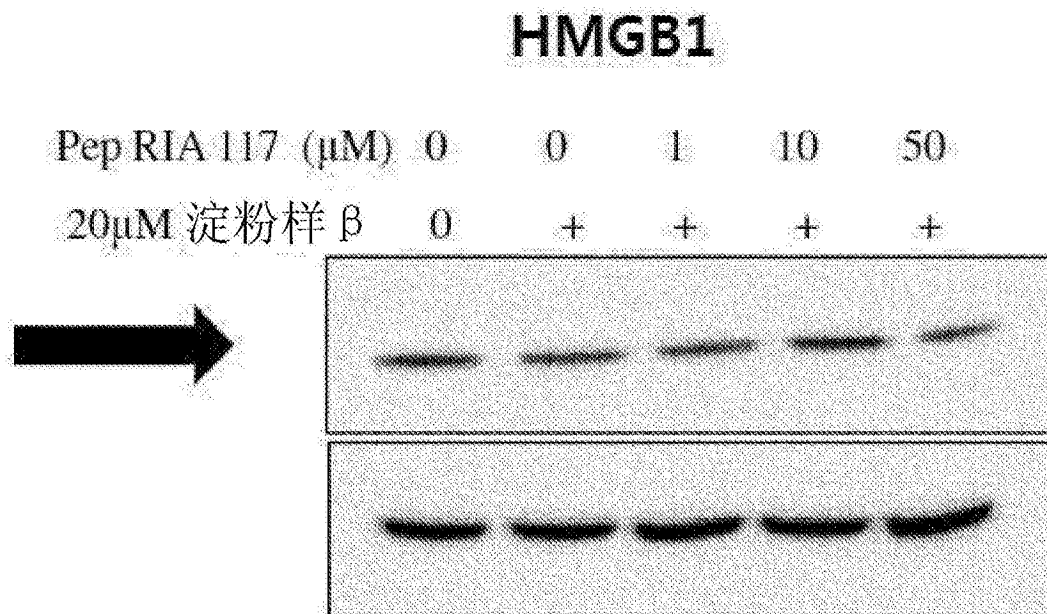


图121

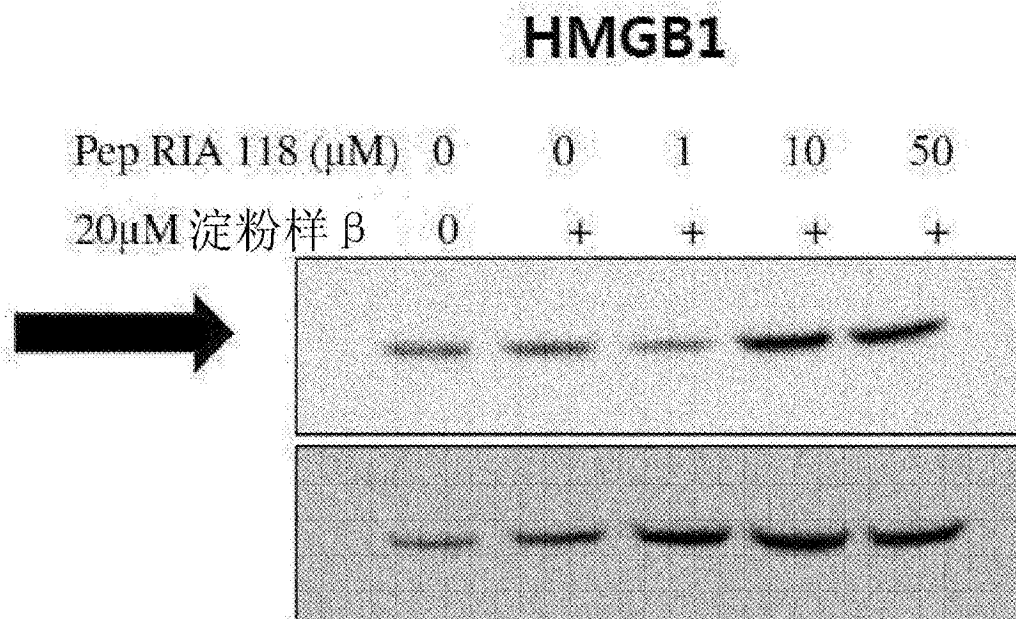


图122

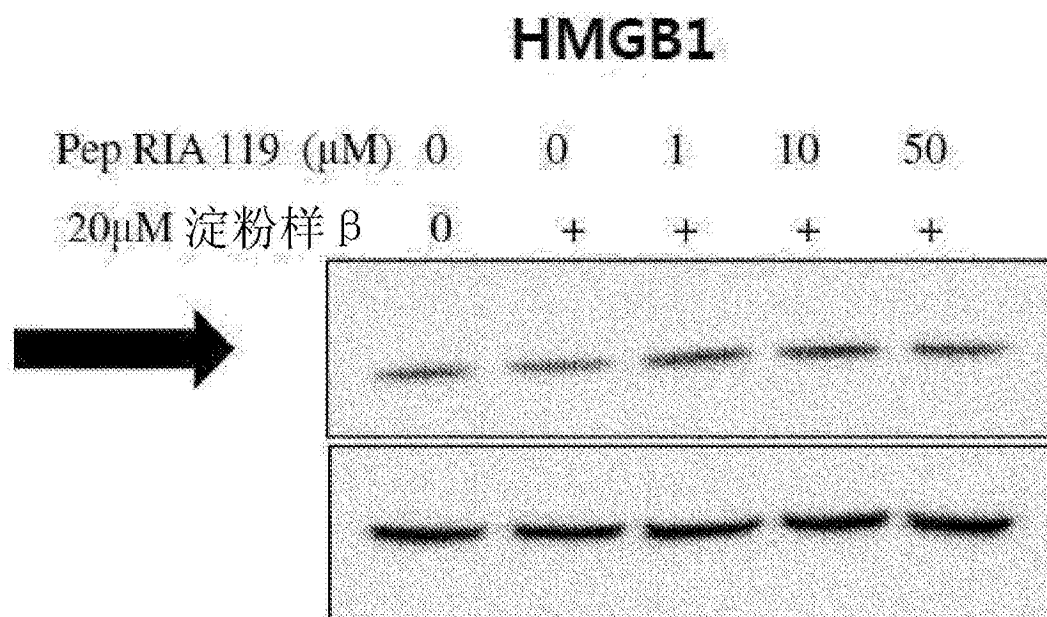


图123

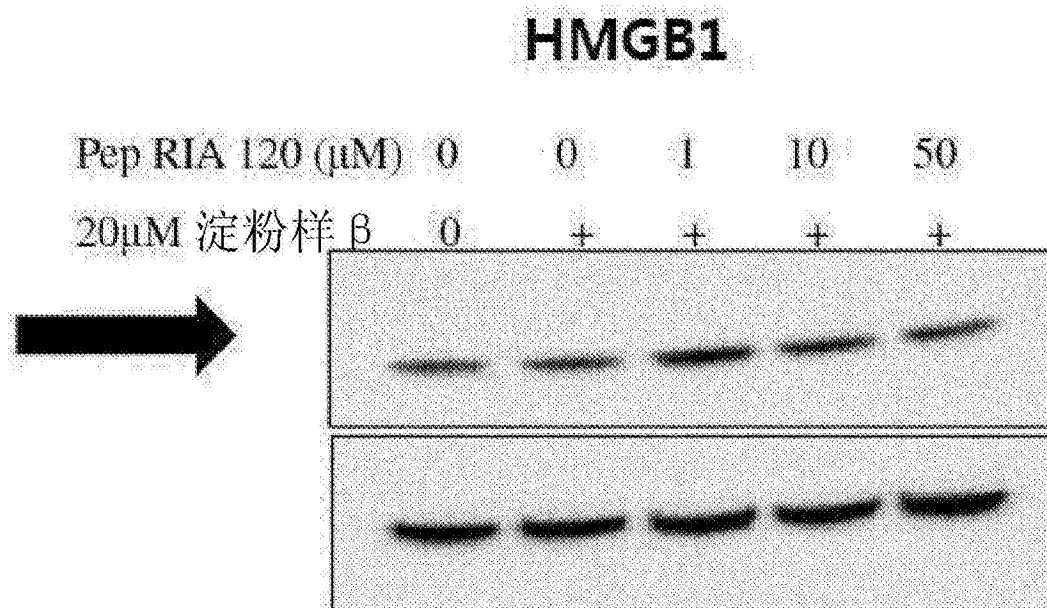


图124

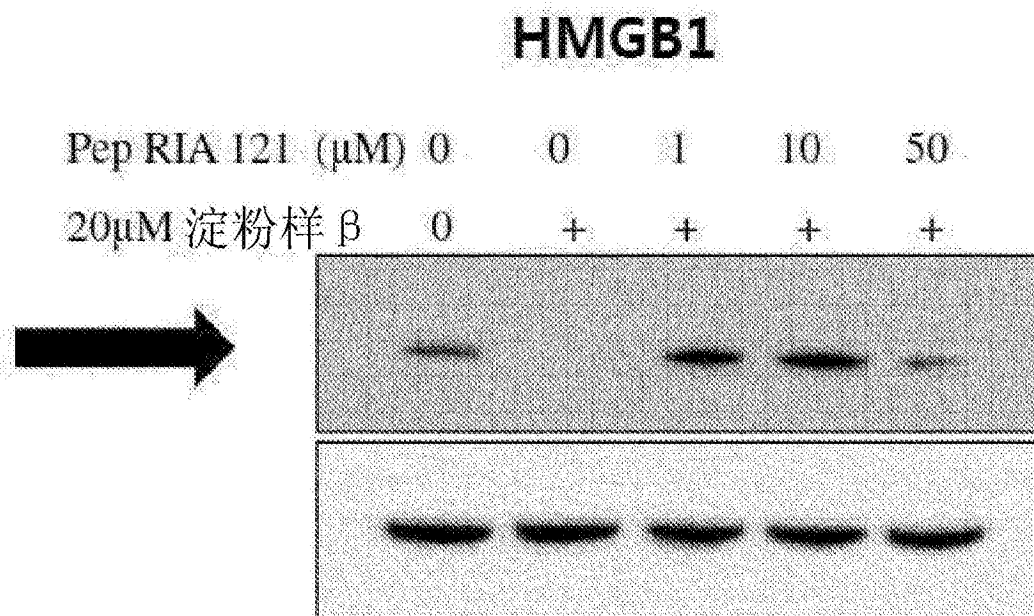


图125

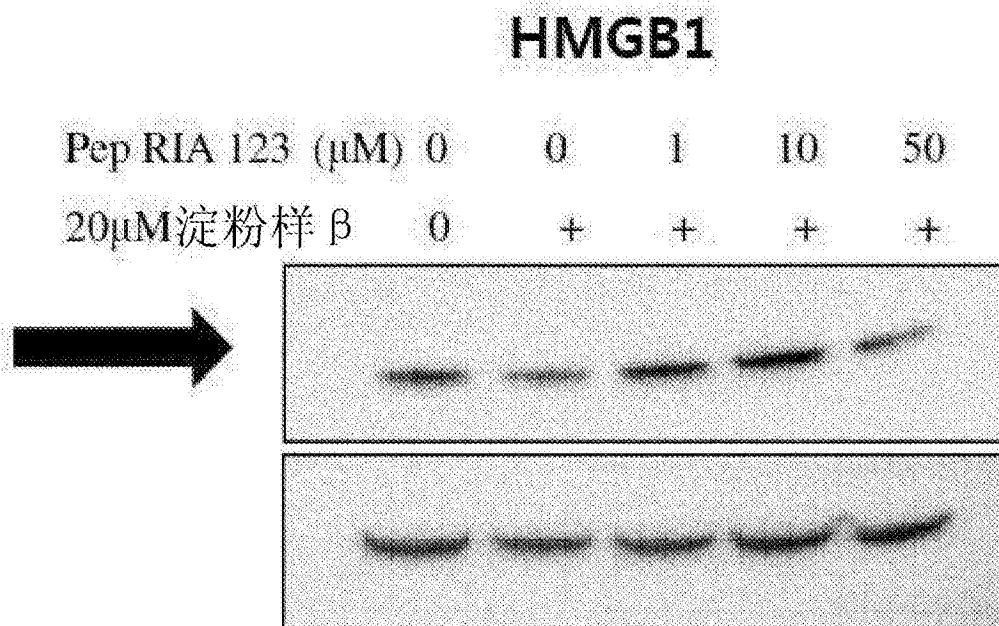


图126

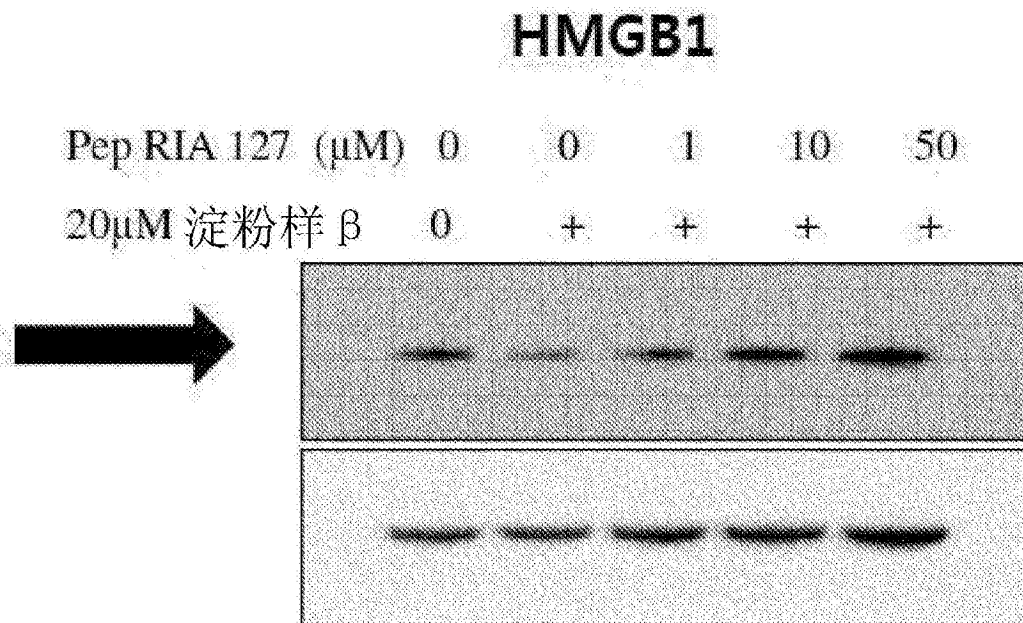


图127

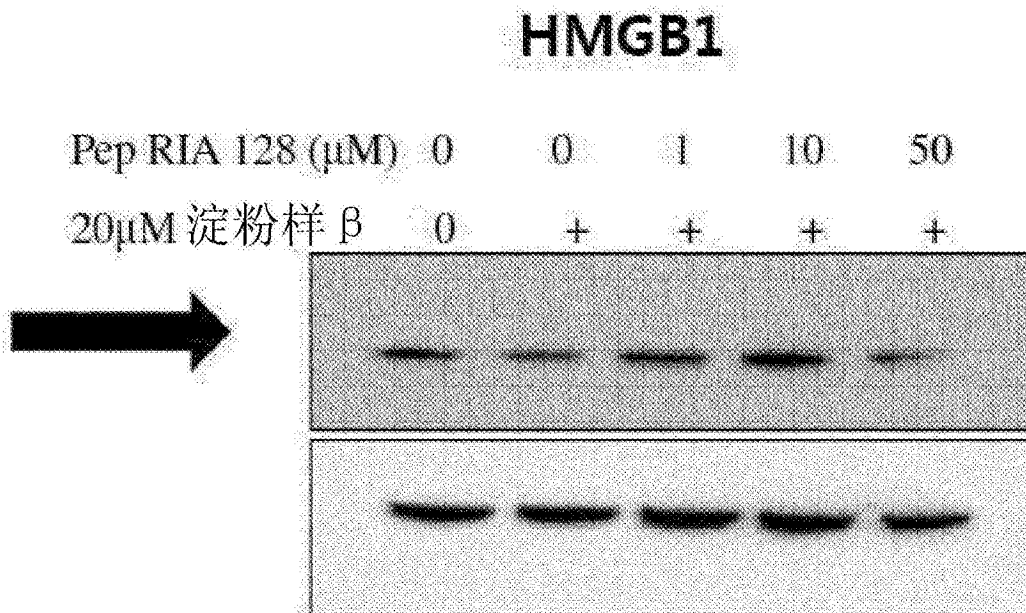


图128

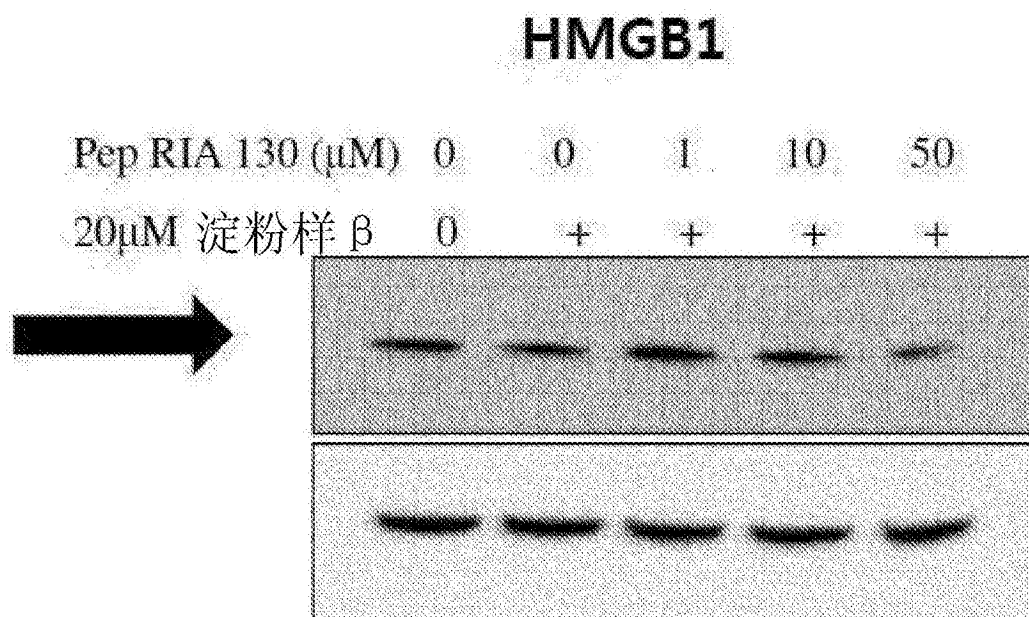


图129

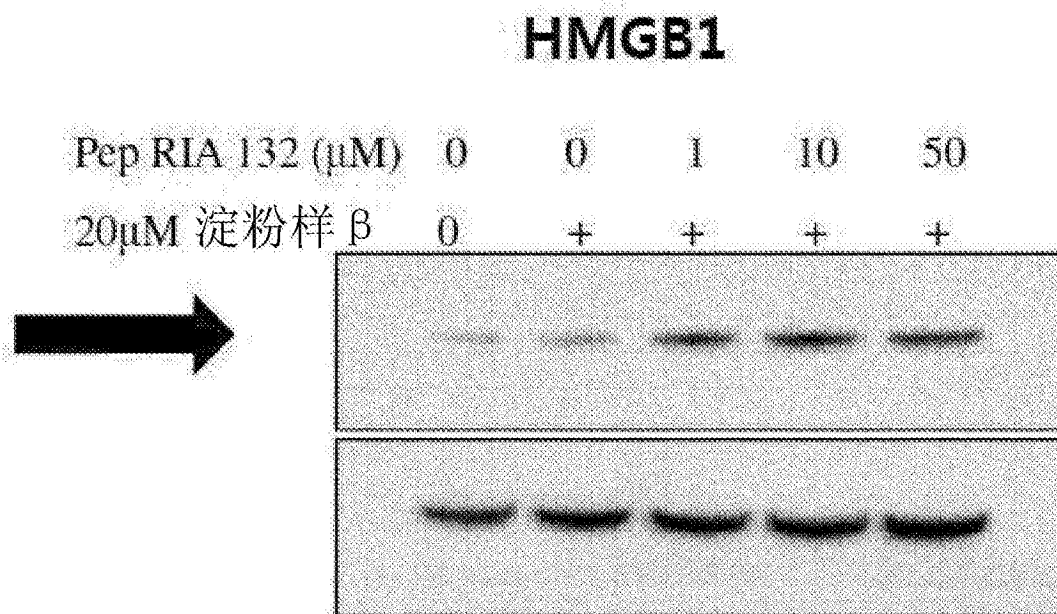


图130

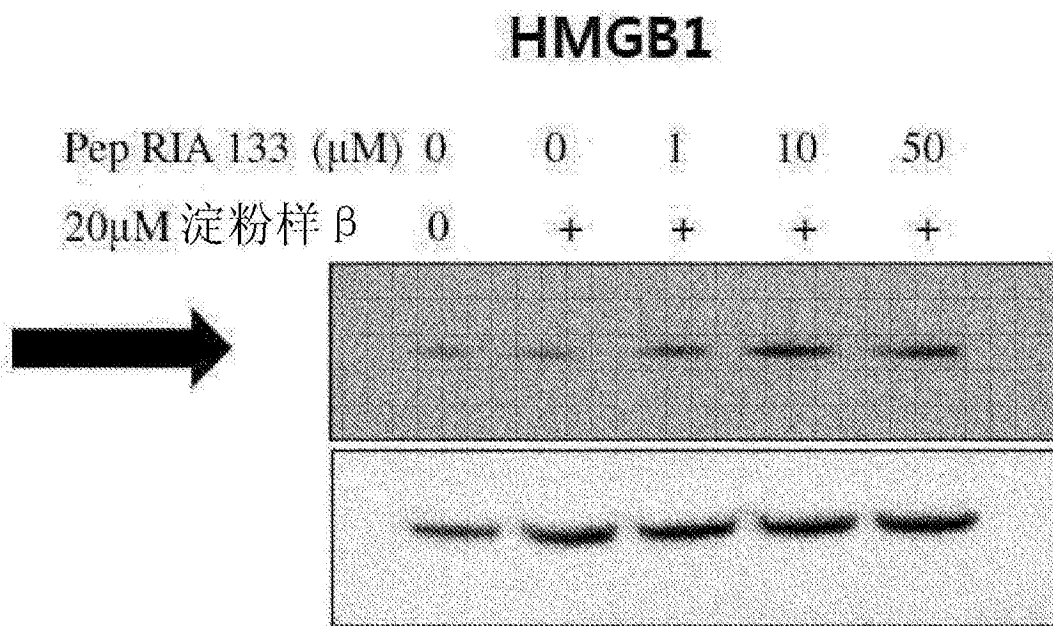


图131

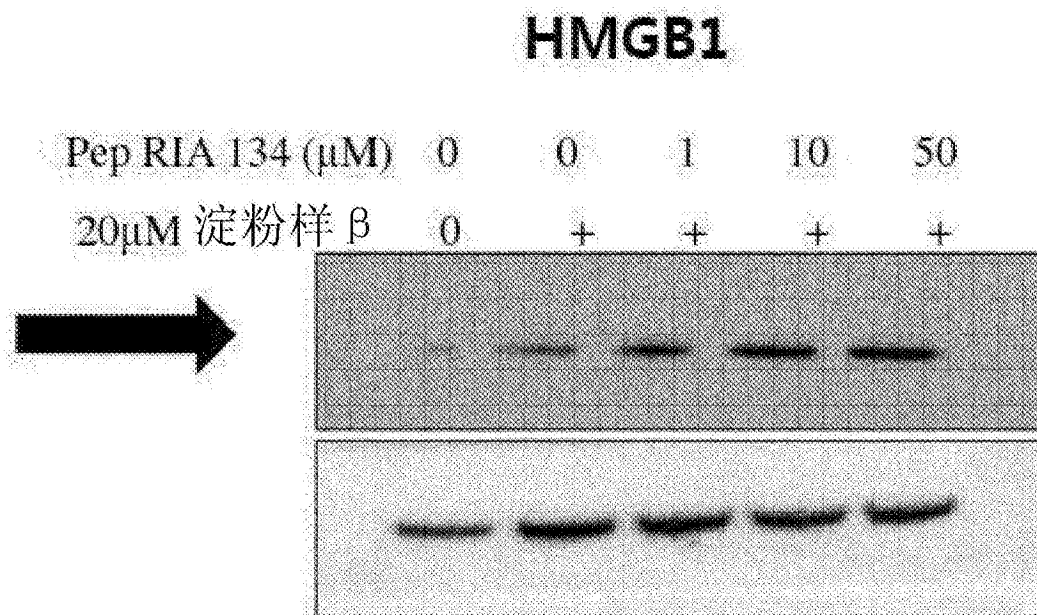


图132

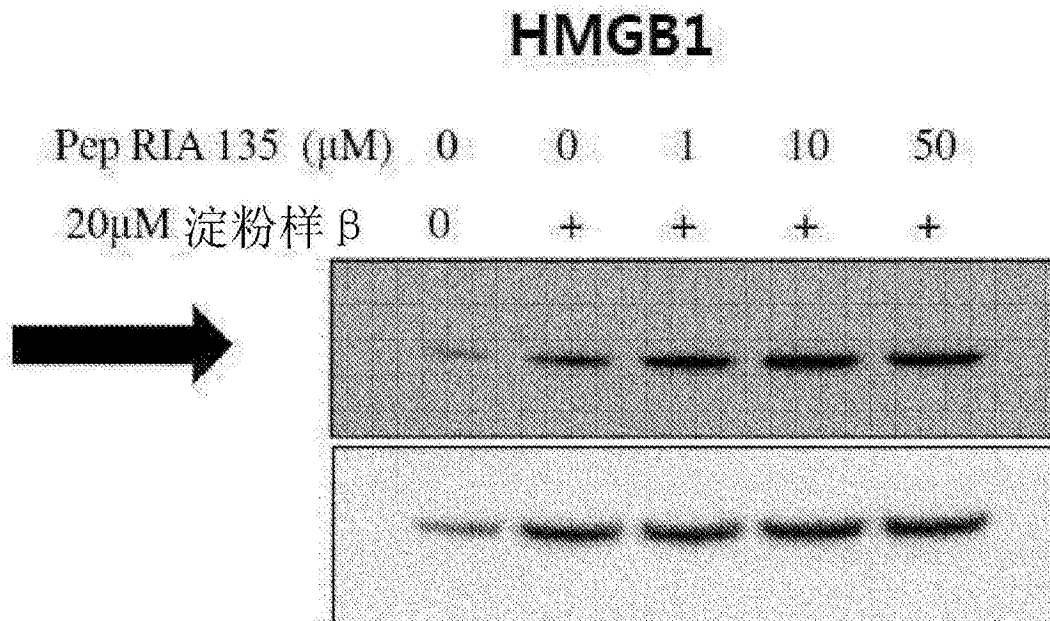


图133

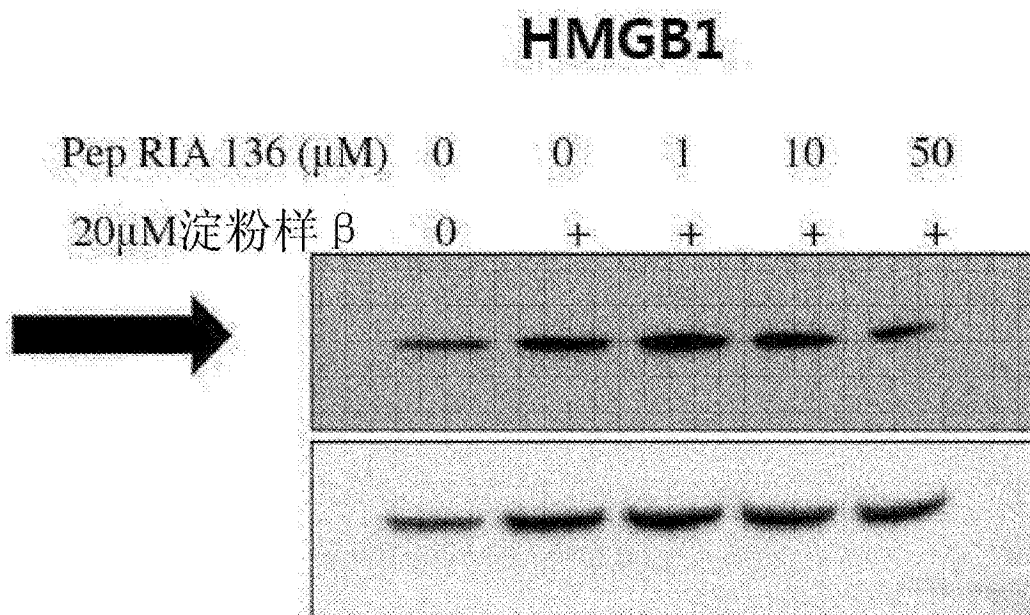


图134

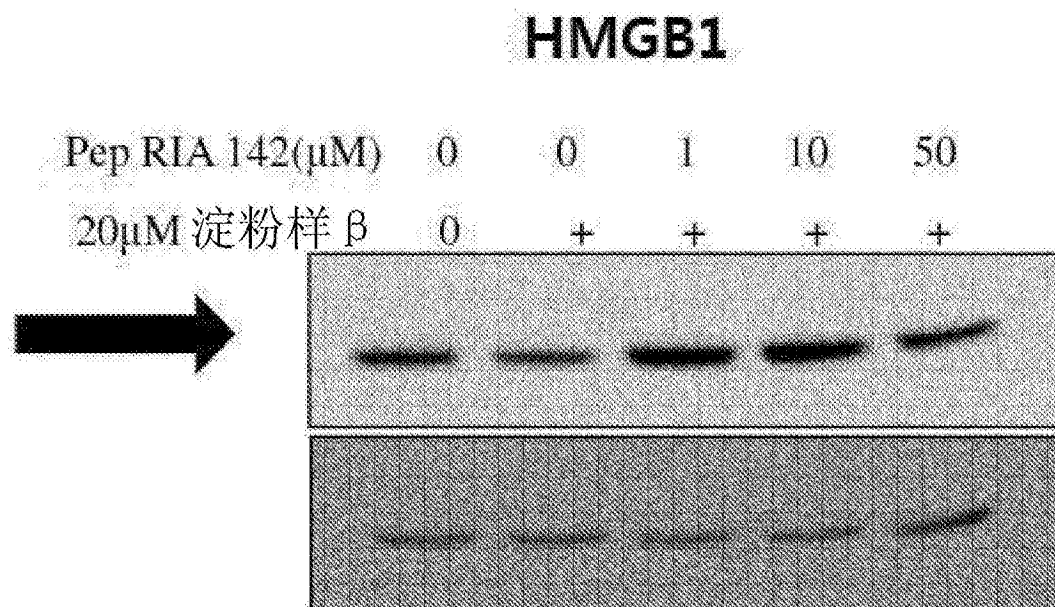


图135

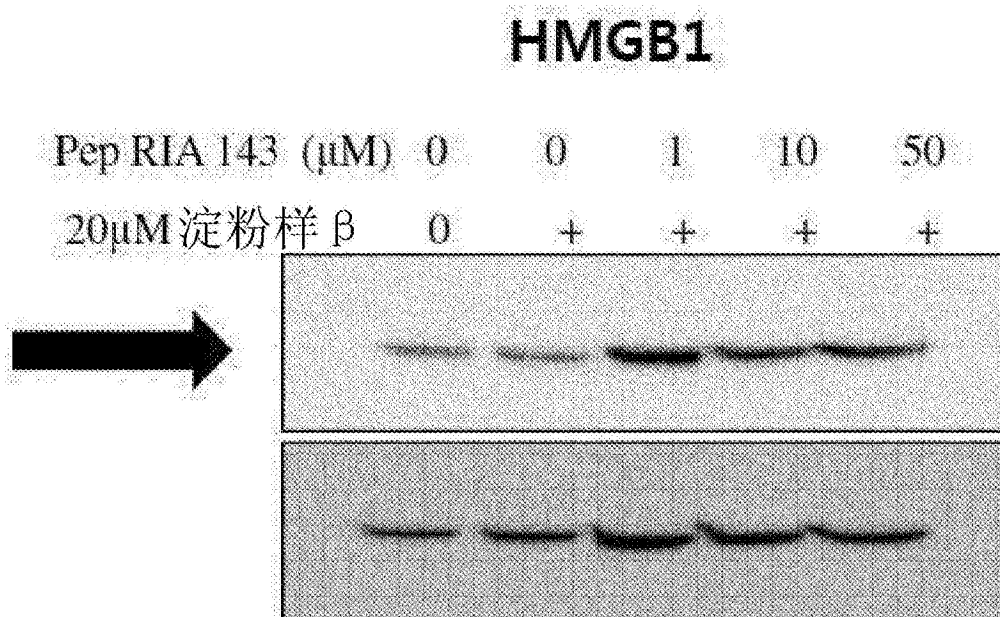


图136

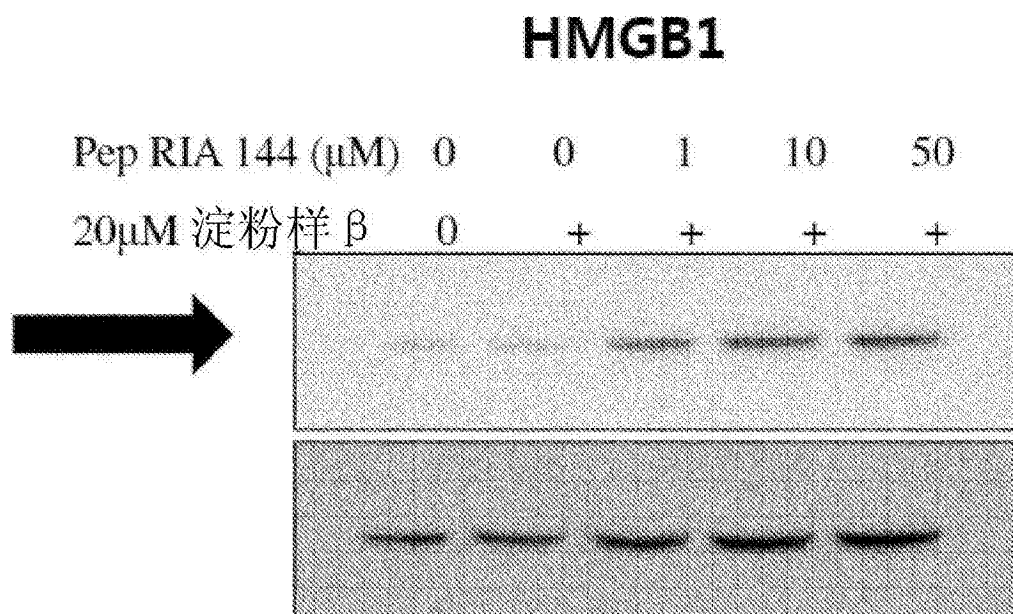


图137

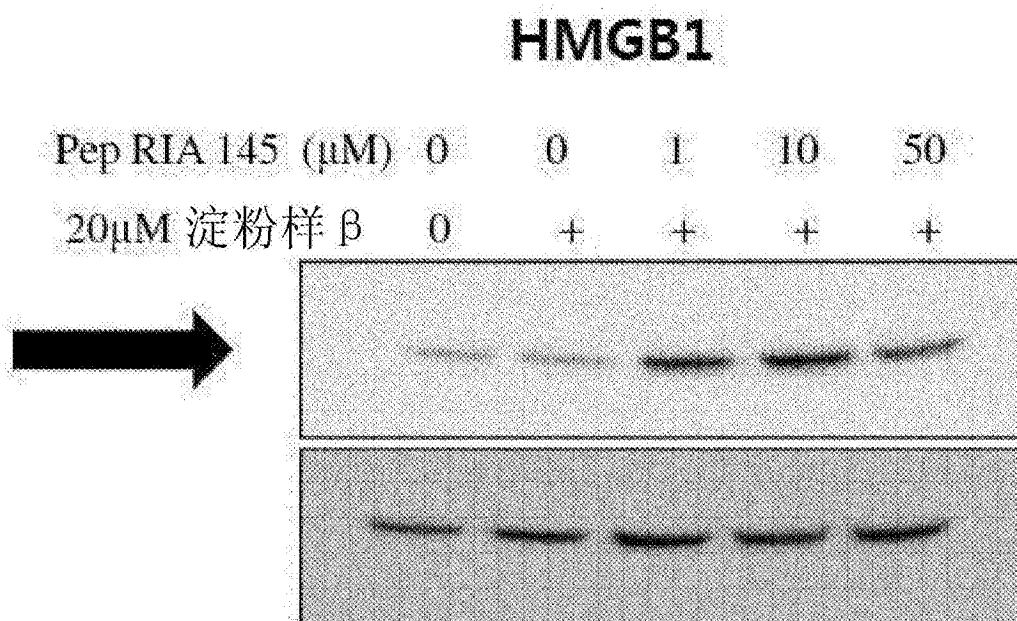


图138

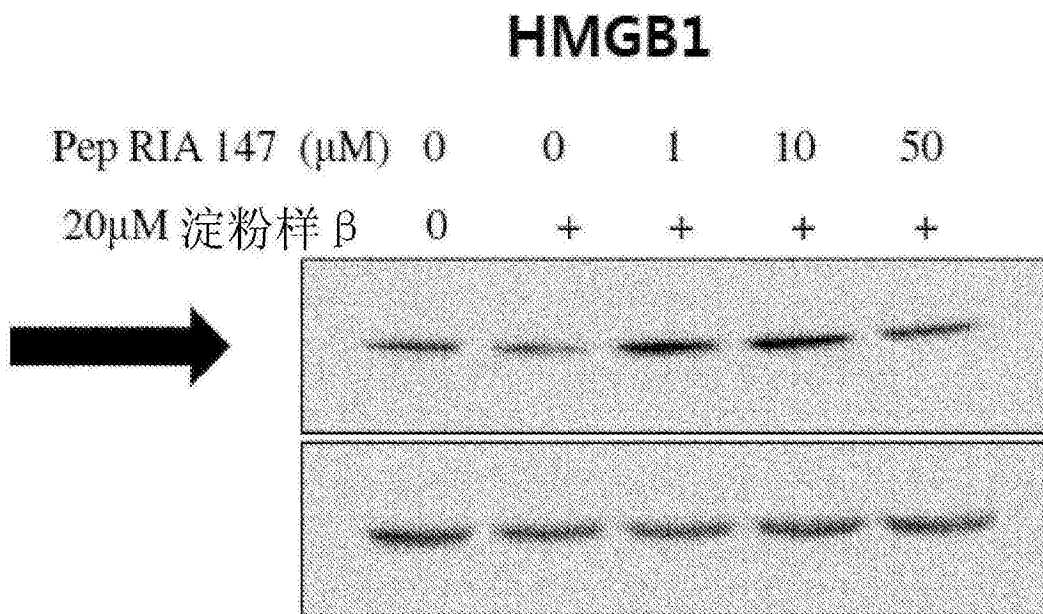


图139

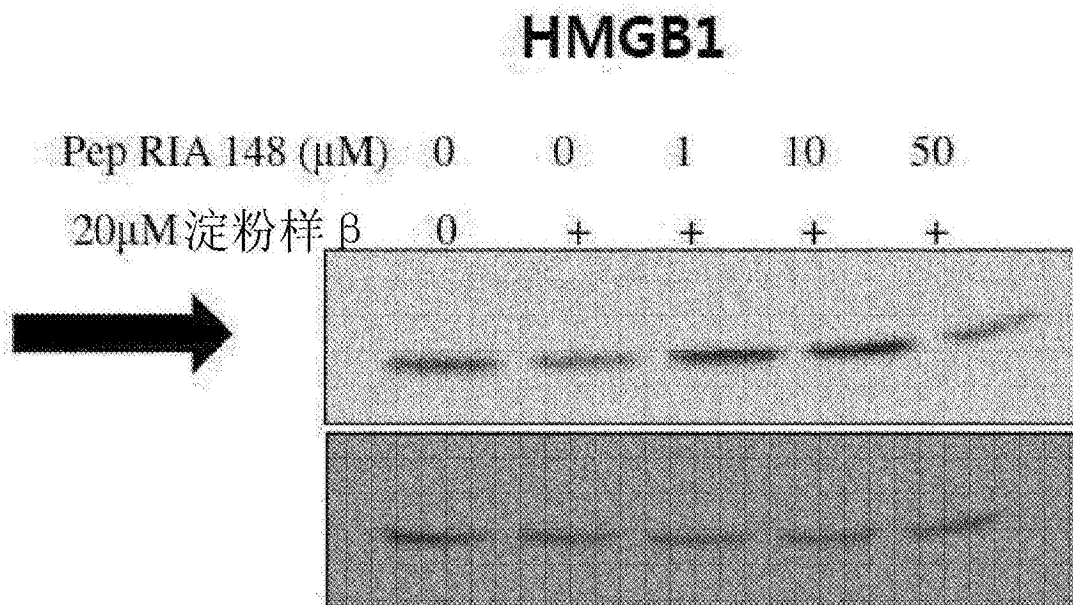


图140

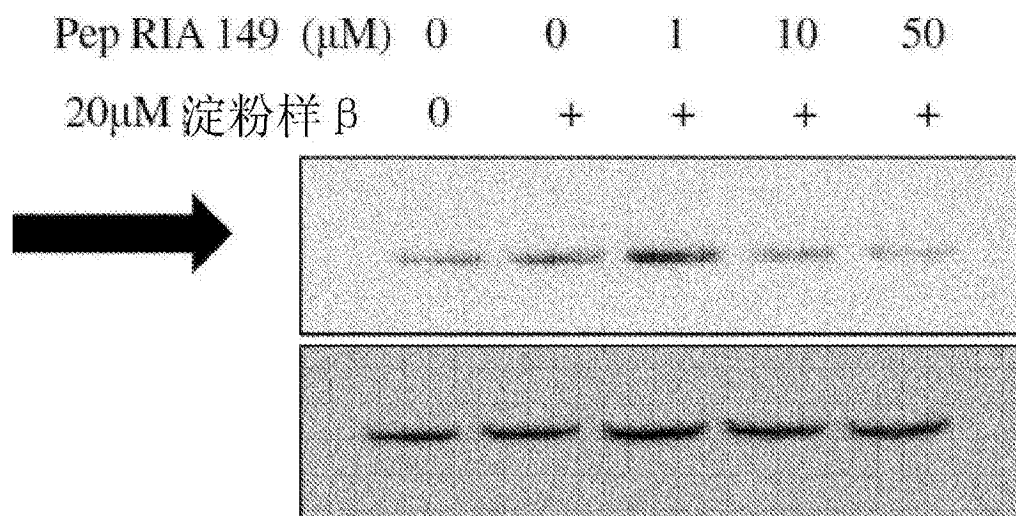
HMGB1

图141

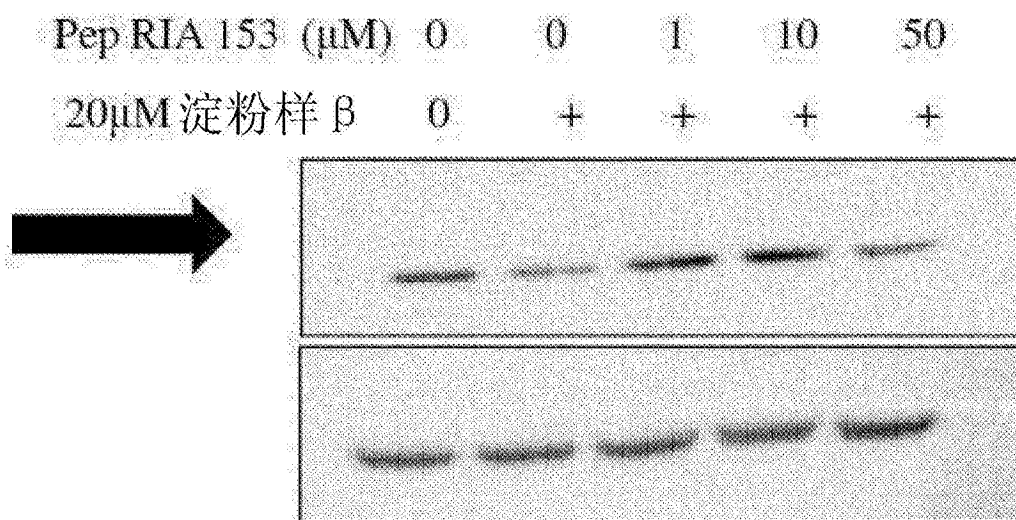
HMGB1

图142

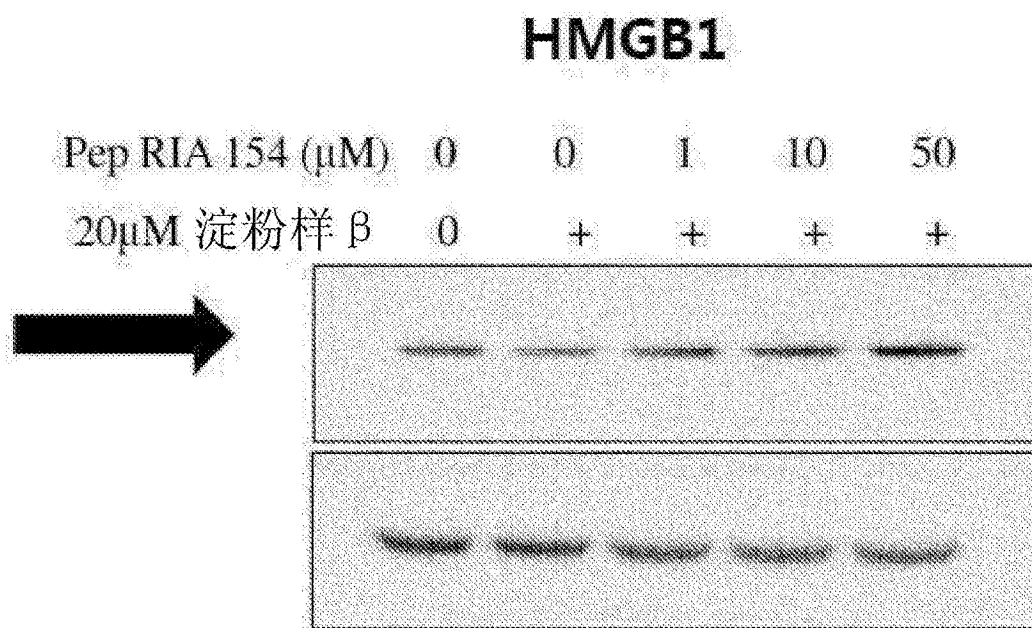


图143

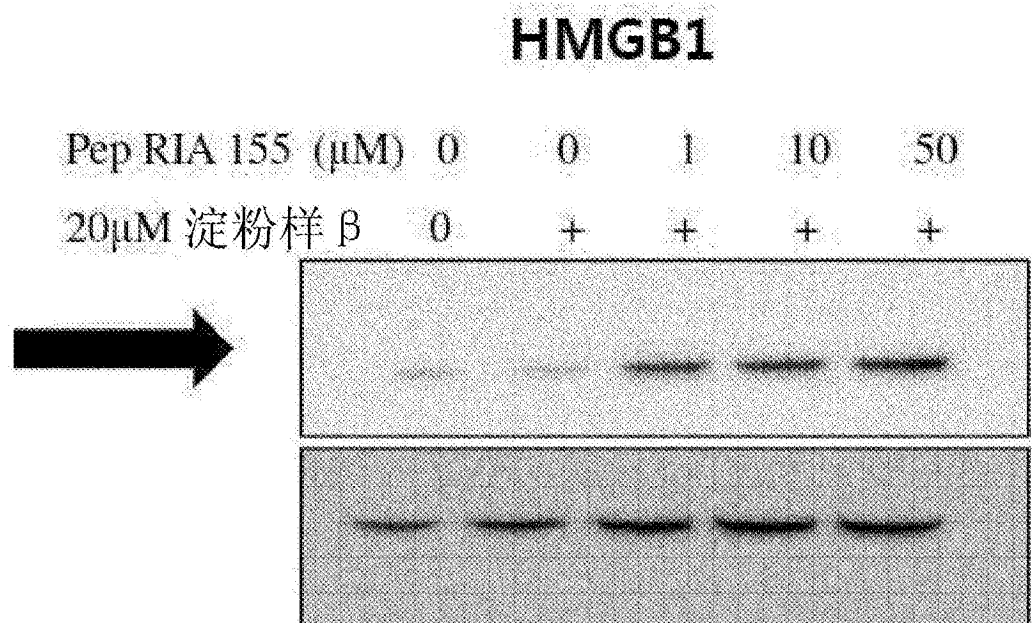


图144

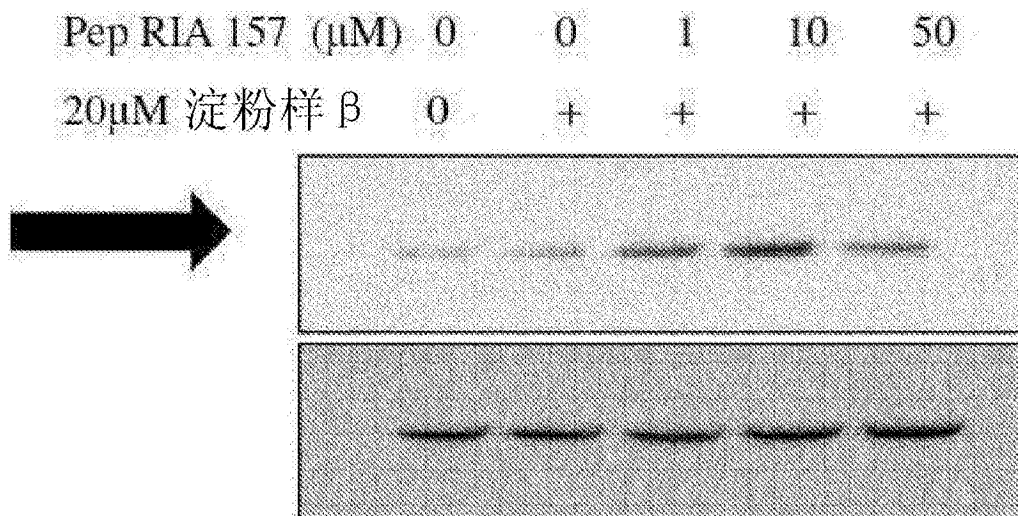
HMGB1

图145

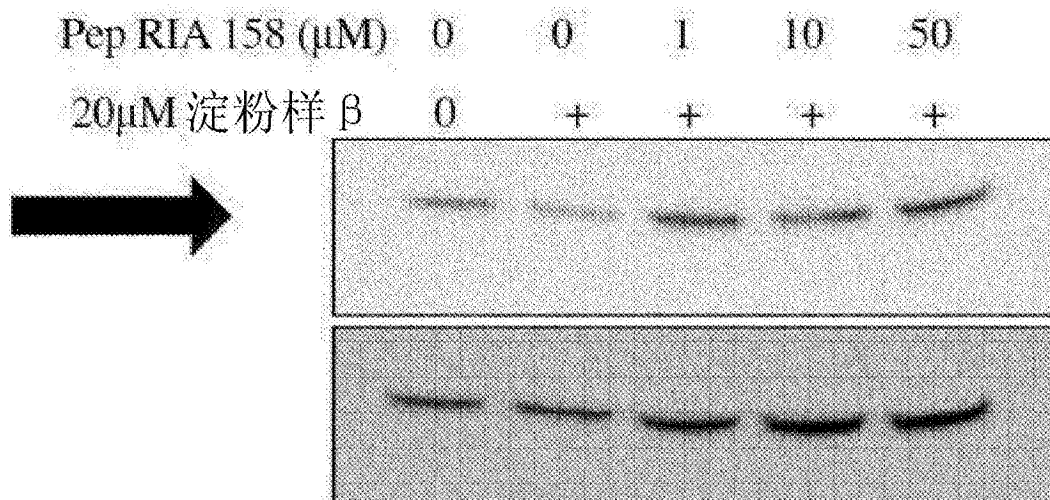
HMGB1

图146

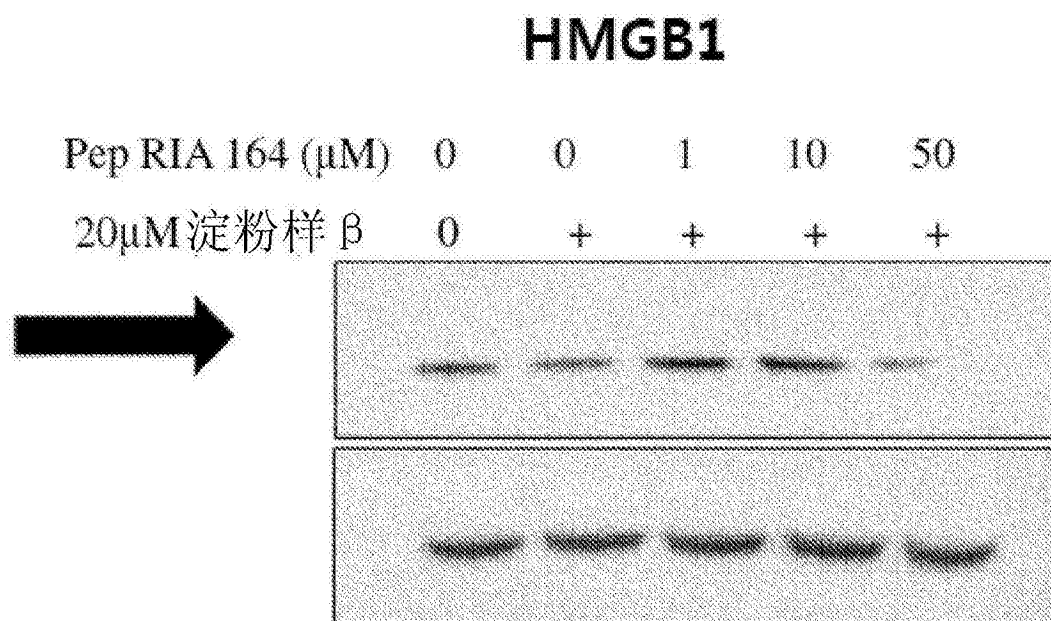


图147

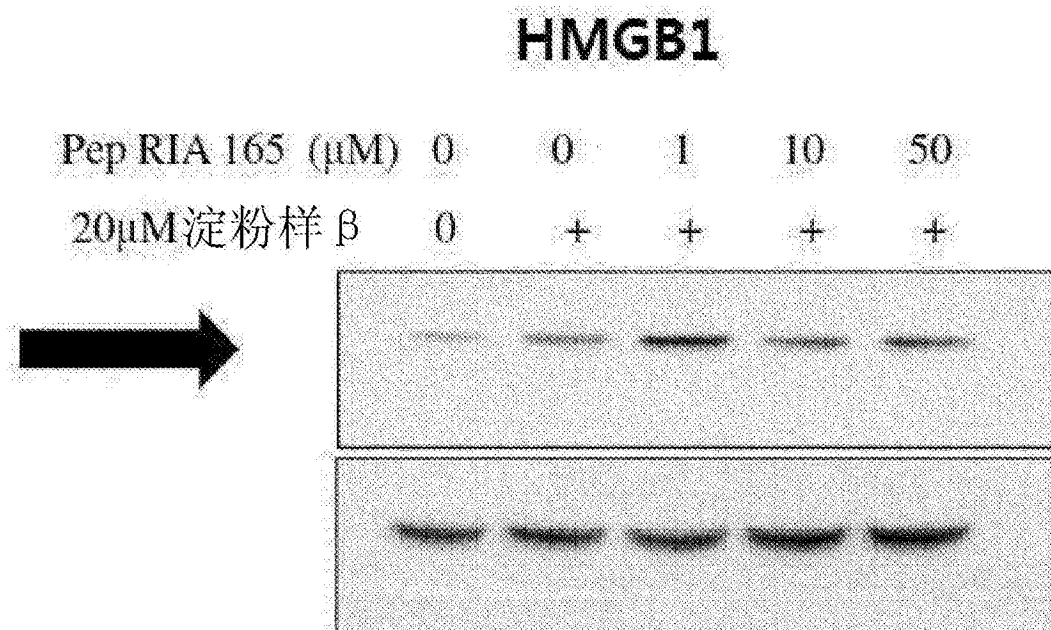


图148

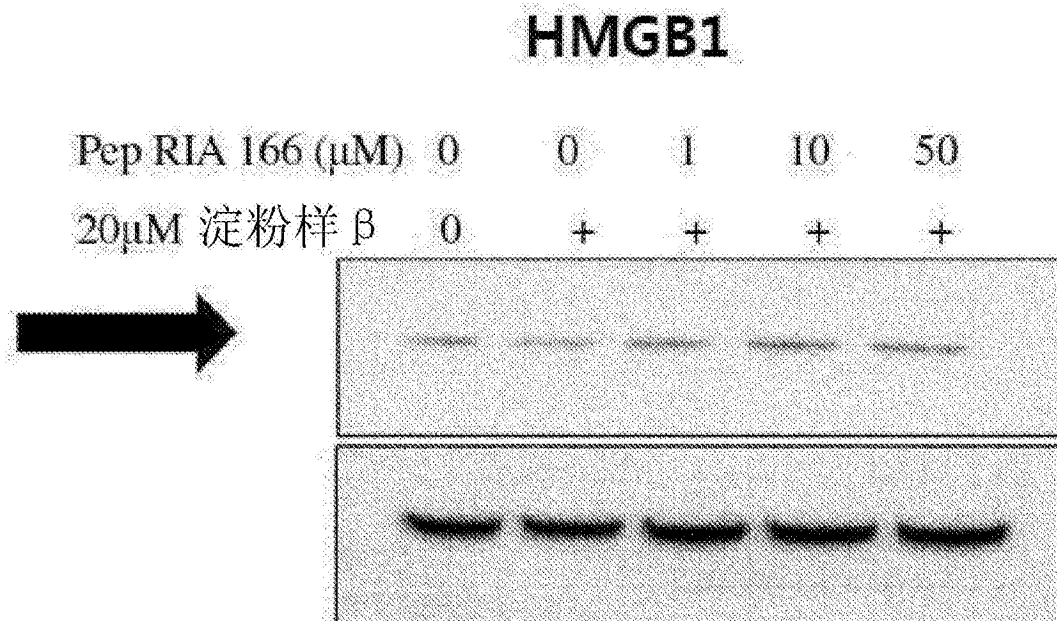


图149

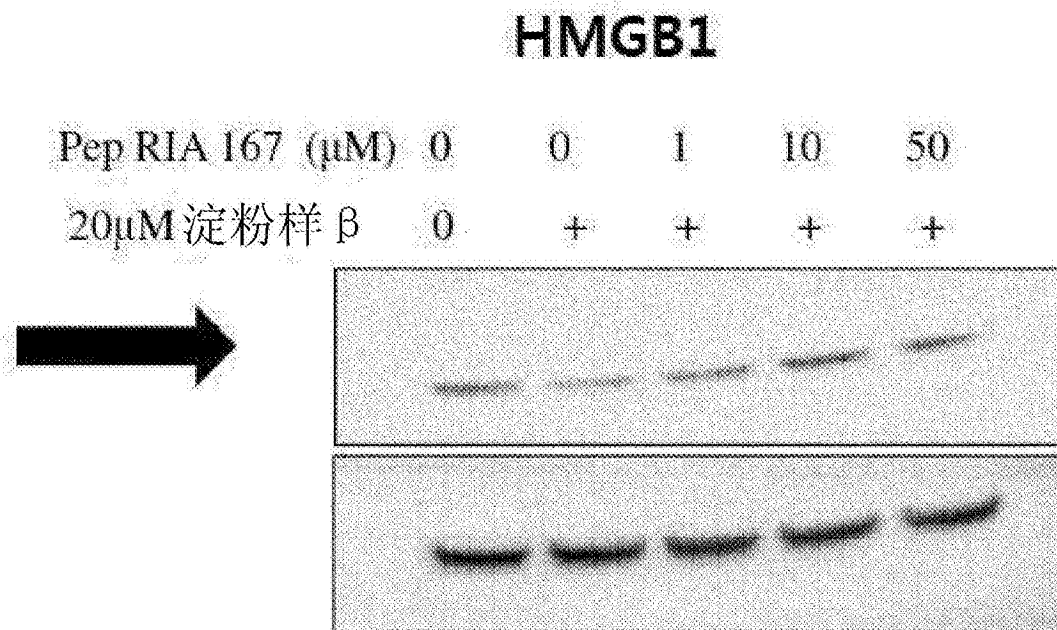


图150

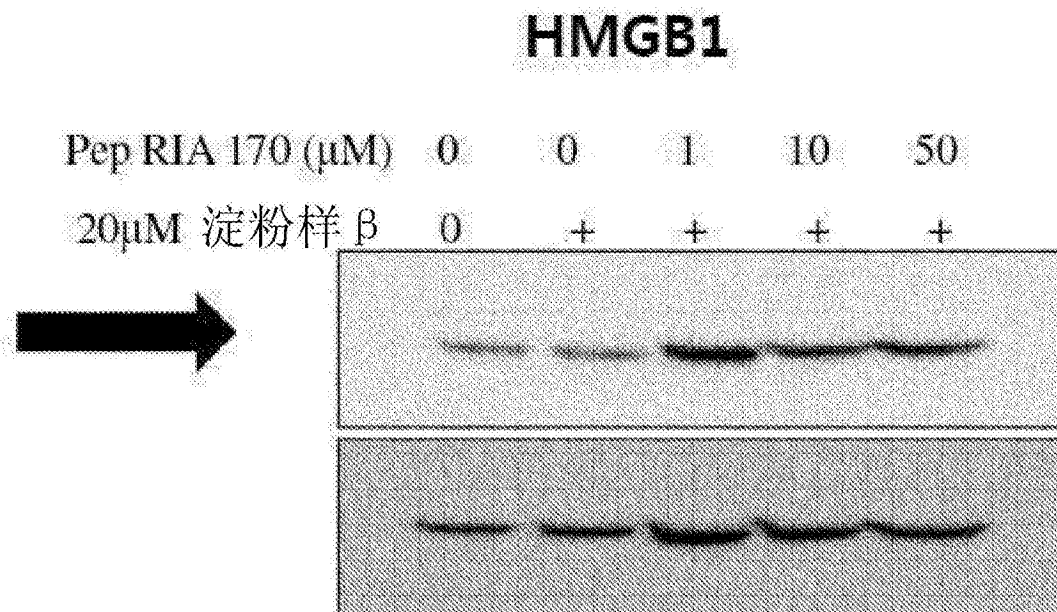


图151

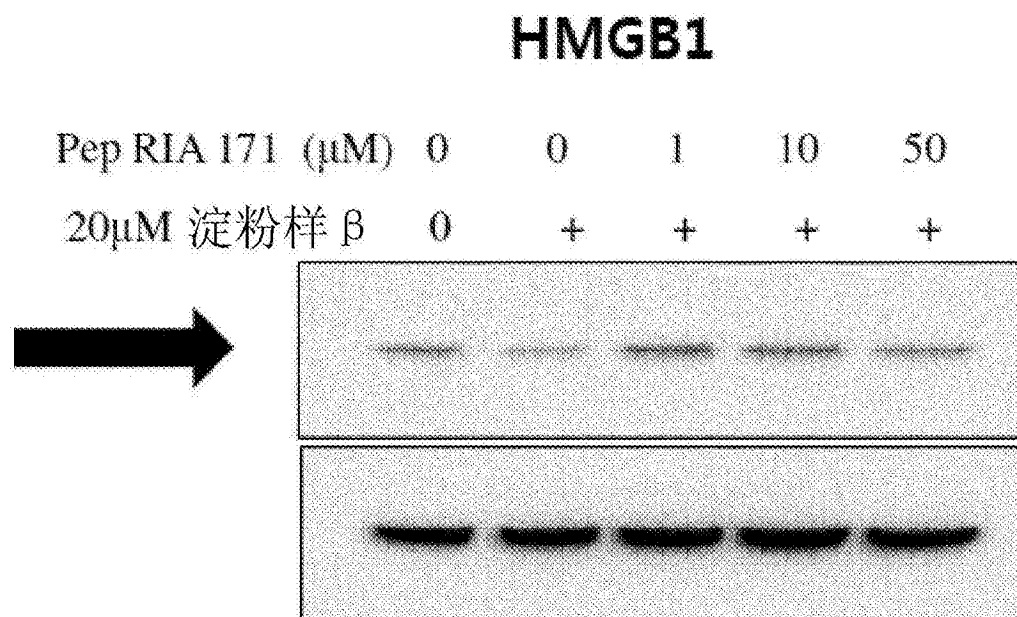


图152

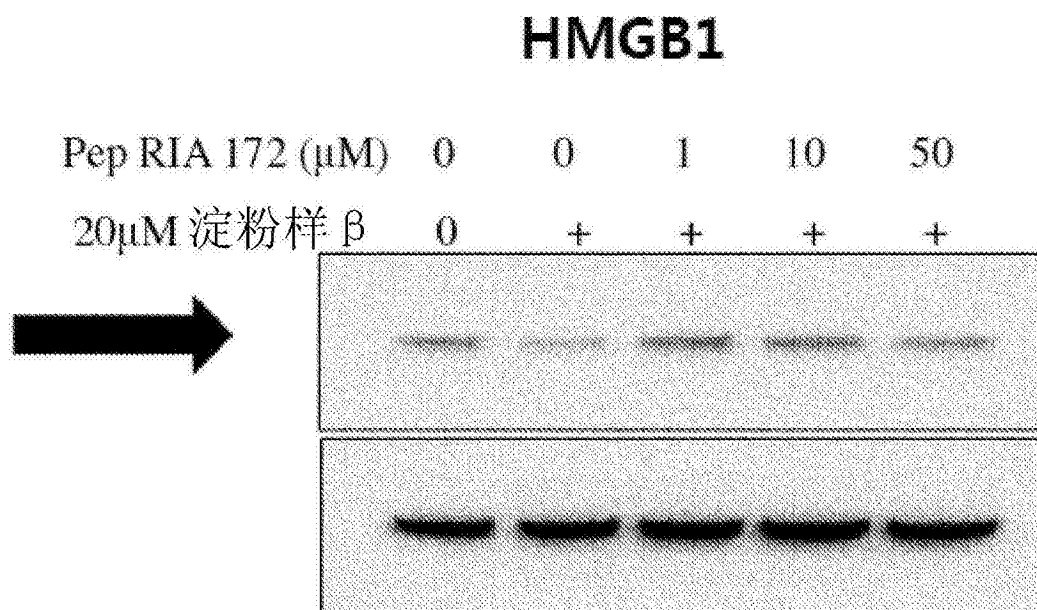


图153

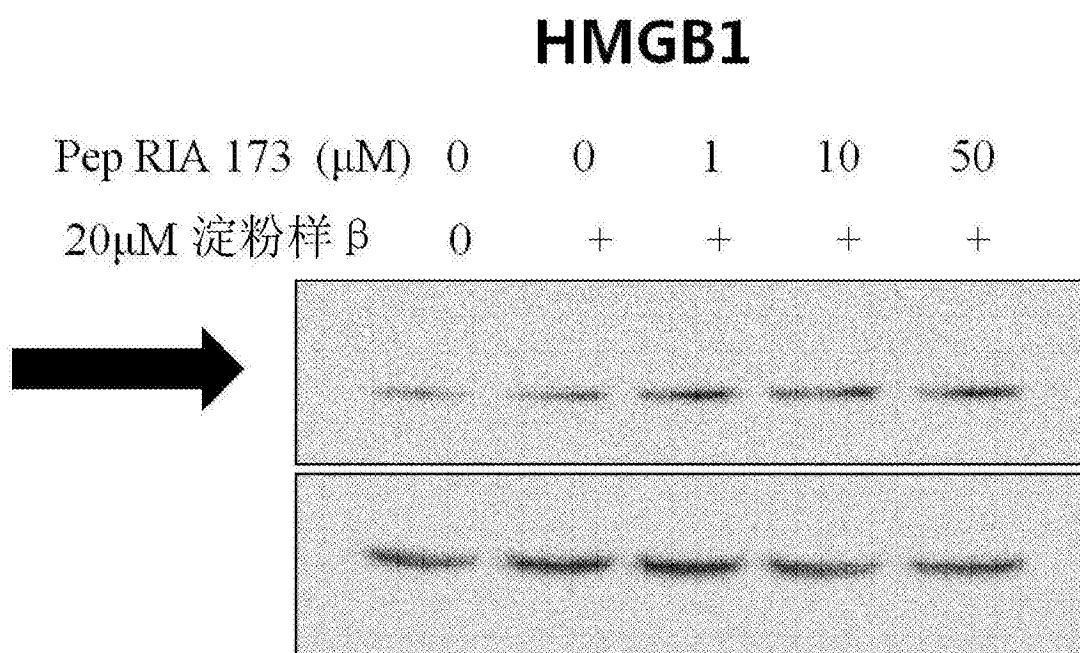


图154

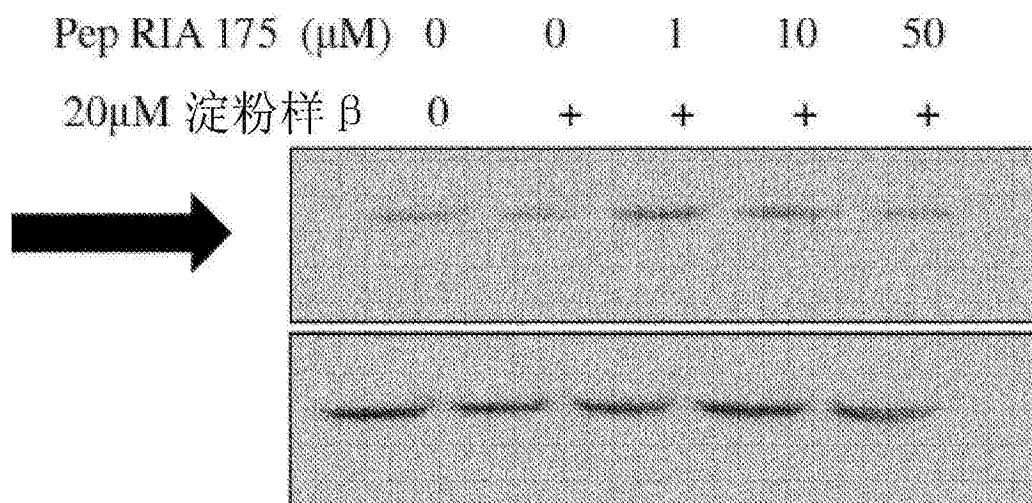
HMGB1

图155

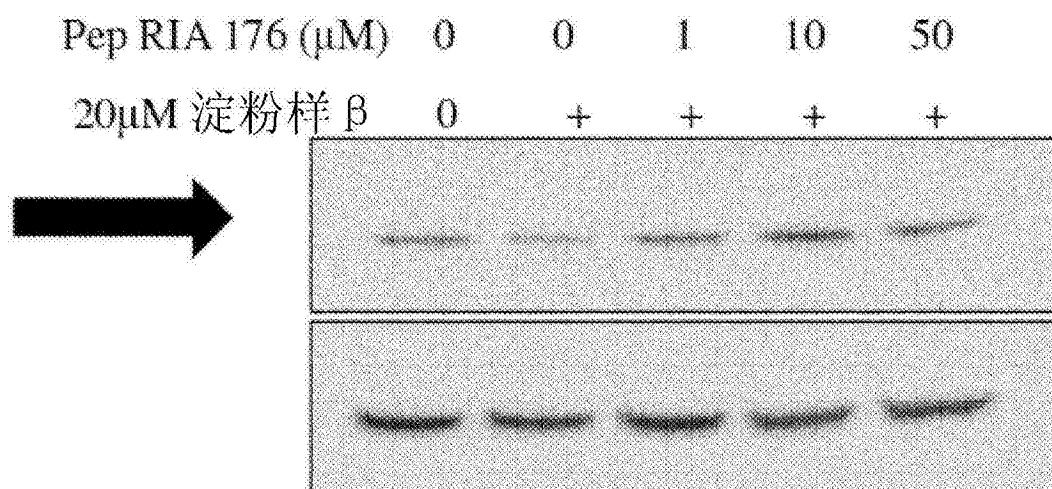
HMGB1

图156

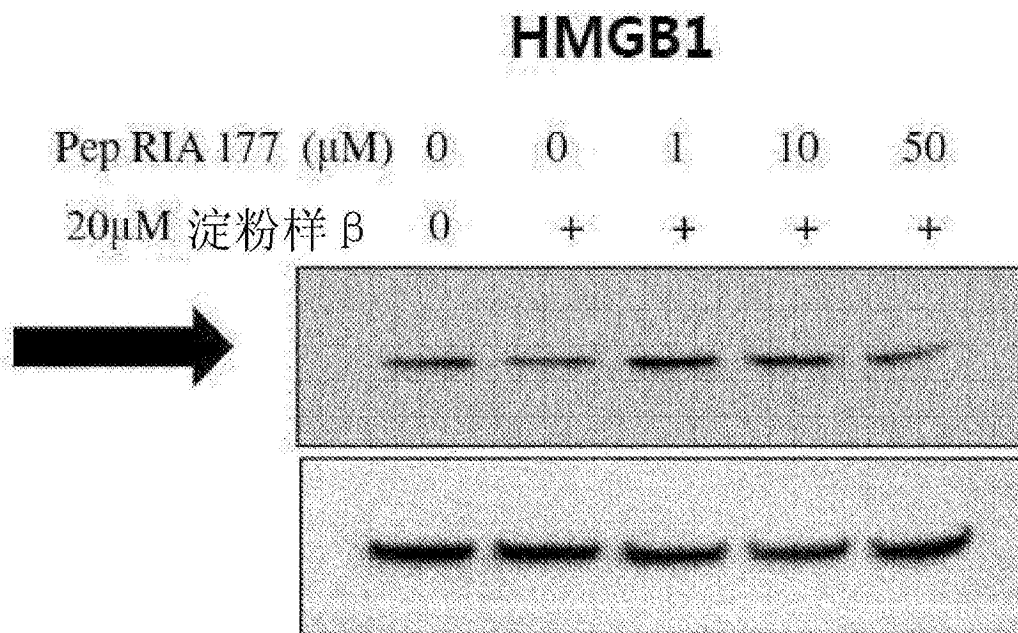


图157

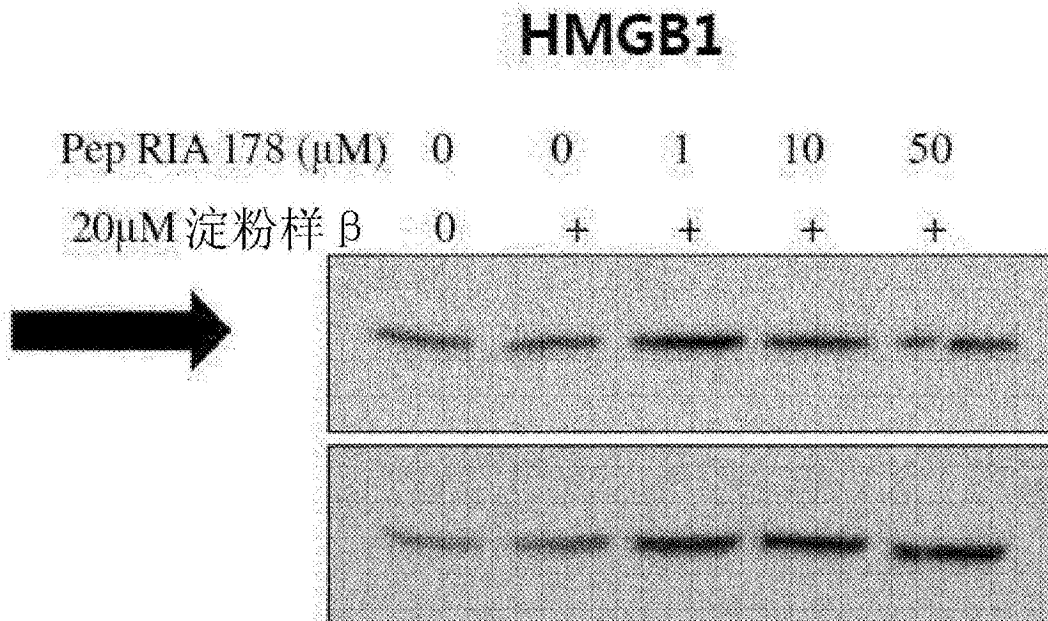


图158

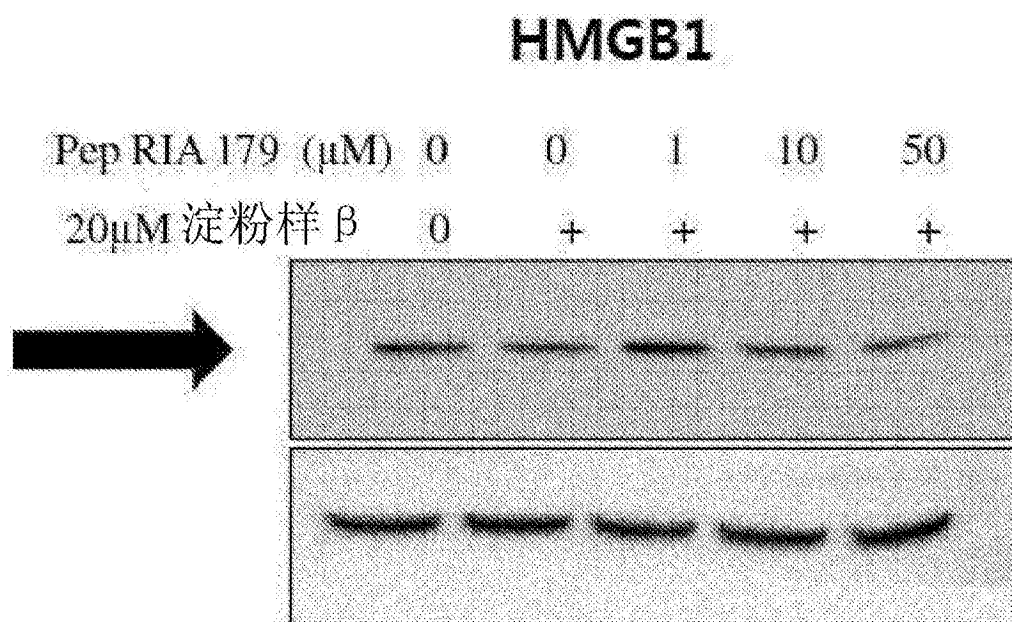


图159