

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780029402.2

[43] 公开日 2009 年 8 月 5 日

[11] 公开号 CN 101501220A

[22] 申请日 2007.6.6

[21] 申请号 200780029402.2

[30] 优先权

[32] 2006.6.6 [33] US [31] 60/811,154

[86] 国际申请 PCT/US2007/013364 2007.6.6

[87] 国际公布 WO2007/146023 英 2007.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.6

[71] 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 伦纳德·古亚兰迪 蒙迪·克里格尔
李小玲

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 杨淑媛 郑霞

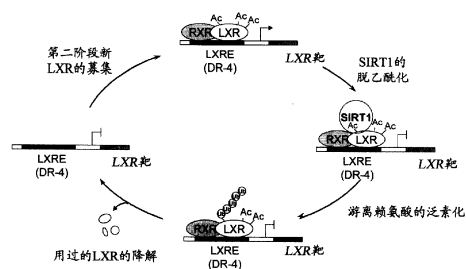
权利要求书 3 页 说明书 67 页 序列表 35 页
附图 5 页

[54] 发明名称

SIRT1 和 LXR 的胆固醇调节复合体以及使用
方法

[57] 摘要

公开了一种 SIRT1 和 LXR 的胆固醇调节复合体以及使用方法。SIRT1 与结合于 LXR 元件的 LXR 形成复合体。公开了形成复合体的方法、识别调节复合体形成的试剂的方法、增加哺乳动物血浆中结合高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比的方法、促进 ABCA1 介导的哺乳动物细胞胆固醇流出的方法、治疗被认为具有 SIRT1 活性水平低于正常的受治疗者的方法、评估候选物质是否调节 LXR 依赖性过程的方法、以及评估候选物质是否调节 LXR 的 SIRT1 依赖效应的方法。



1. 一种分离的复合体,其包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质。

2. 如权利要求 1 所述的复合体,其进一步包括一种 LXR 响应元件。

3. 一种形成包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体的方法,所述方法包括组合含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质的第一组合物、含有哺乳动物 LXR 蛋白质的第二组合物和含有细胞核酸片段的第三组合物,所述细胞核酸片段包括 LXR 响应元件。

4. 一种识别调节包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体形成的试剂的方法,所述方法包括:

a) 组合含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质的第一组合物、含有哺乳动物 LXR 蛋白质的第二组合物和含有细胞核酸片段的第三组合物以提供复合组合物,所述细胞核酸片段包括 LXR 响应元件;

b) 进一步

i) 在所述组合步骤前用含有所述试剂的第四组合物接触所述第一组合物、所述第二组合物或所述第三组合物,或

ii) 在所述组合步骤后用含有所述试剂的第四组合物接触所述复合组合物;

从而提供测试组合物,以及

c) 确定所述试剂是否调节所述复合体的形成。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述试剂增加所述复合体的形成。

6. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述确定进一步包括:

d) 组合含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质的第一组合物、含有哺乳动物 LXR 蛋白质的第二组合物和含有细胞核酸片段的第三组合物以提供一种不含有所述试剂的对照组合物,所述细胞核酸片段包括 LXR 响应元件,以及

e) 通过与所述对照组合物中所述复合体的形成对比,确定是否调节所述测试组合物中所述复合体的形成。

7. 刺激 SIRT1 活性的试剂在药物制备中的用途, 所述药物通过向哺乳动物施用所述试剂, 增加哺乳动物血浆中结合到高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比。

8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述哺乳动物是人。

9. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述试剂包括 T0901317。

10. 促进包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体形成的试剂在药物制备中的用途, 所述药物通过向哺乳动物施用所述试剂, 增加哺乳动物血浆中结合到高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比。

11. 如权利要求 10 所述的用途, 其中所述哺乳动物是人。

12. 如权利要求 10 所述的用途, 其中所述试剂包括 22(R)-羟基胆固醇或 9-顺式视黄酸, 或两者。

13. 一种促进 ABCA1 介导的哺乳动物细胞胆固醇流出的方法, 其包括向所述细胞引入含有编码蛋白质脱乙酰酶序列的核酸。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

15. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述蛋白质脱乙酰酶是真核 Sir2。

16. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述蛋白质脱乙酰酶是哺乳动物 SIRT1。

17. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述细胞进一步与刺激 SIRT1 活性的试剂接触。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中所述试剂包括 T0901317。

19. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述细胞进一步与促进包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体形成的试剂接触。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其中所述试剂包括 22(R)-羟基胆固醇或 9-顺式视黄酸, 或两者。

21. 一种评估候选物质是否调节 LXR 依赖性过程的方法, 其包括:

a) 用含有报道基因的载体转染细胞, 所述报道基因由 LXRE 可操作地驱动;

b) 用候选物接触所述细胞; 以及

c) 通过与没有用所述候选物接触的细胞对比, 确定所述候选物是否调节所述报道基因的表达;

从而在所述候选物存在和不存在时, 检测到的 LXR 依赖性过程发生程度的差异表明所述候选物调节所述 LXR 依赖性过程。

22. 一种评估候选物质是否调节 LXR 的 SIRT1 依赖效应的方法, 其包括:

a) 用含有 SIRT1 基因的载体转染细胞;

b) 用含有报道基因的载体进一步转染所述细胞, 所述报道基因由 LXRE 启动子可操作地驱动;

c) 用候选物接触所述细胞; 以及

d) 通过与没有用所述候选物接触的细胞对比, 确定所述候选物是否调节所述报道基因的表达;

从而在所述候选物存在和不存在时, 检测到的 LXR 的 SIRT1 依赖效应程度的差异表明所述候选物调节所述 LXR 的 SIRT1 依赖效应。

23. 一种评估候选物质是否调节含有特异性结合对成分 SIRT1 和 LXR 的特异性结合对形成的方法, 其包括:

a) 用含有编码所述特异性结合对已附加表位的第一成分的序列的载体转染细胞;

b) 用含有编码所述特异性结合对第二成分的序列的载体进一步转染所述细胞;

c) 用所述候选物质接触所述细胞;

d) 裂解所述细胞, 用所述附加表位的特异性抗体接触细胞裂解产物, 并且用抗体特异性吸附剂回收包含 SIRT1 和 LXR 复合体的免疫沉淀物;

e) 使用 SIRT1 和 LXR 特异性抗体执行蛋白质印迹程序;

从而对比候选物存在和候选物不存在时检测到的复合物形成的差异表明所述候选物调节 SIRT1 与 LXR 的相互作用。

SIRT1 和 LXR 的胆固醇调节复合体以及使用方法

发明背景

胆固醇体内稳态通过饮食摄取、从头合成、转运、代谢和排泄之间的平衡维持。高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的低水平和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的高水平与以下相关:高胆固醇血症、高甘油三酯血症、以及增加的心血管疾病¹和阿尔茨海默病²⁻⁶的风险、以及主要引起中老年人死亡的年龄相关的疾病。遗传因子和环境均导致了心血管疾病和阿尔茨海默病的发展,这些病症的风险随着年龄而升高。然而,很少了解遗传因子识别环境以介导这些衰老相关的疾病的潜在机理。

沉默信息调节子 2(Sir2)是一种响应环境变化的重要寿命调节子。所述 Sir2 基因是酵母、秀丽线虫(*C. elegans*)⁷和果蝇^{8,9}的长寿决定子。在酵母^{10,11}和果蝇^{8,9}中,由热卡限制提供的寿命的延长也需要 Sir2 活性。生物化学方面, Sir2 及其同系物(sirtuin)是一组高保守 NAD⁺依赖性蛋白质脱乙酰酶¹²⁻¹⁴。对 NAD⁺的需要可使 sirtuin 监控细胞代谢和调节影响衰老的细胞过程。在哺乳动物中,一种 Sir2 蛋白质的哺乳动物直系同源物(orthologue) SIRT1 具有多个蛋白质底物且能够调节衰老相关的过程,如细胞周期、凋亡、氧化应激反应、以及神经变性¹⁵⁻²⁰。在这些过程中, SIRT1 可以转移细胞死亡和细胞生存之间的平衡,因而提供胁迫抗性²¹。

胆固醇和脂肪代谢通过多种普通细胞和环境因子调节。脂质传感核受体(lipid-sensing nuclear receptors)的两种亚类,过氧化物酶体增生物激活受体(PPAR)和肝 X 受体(LXR)在脂质和碳水化合物的代谢中具有重要的作用。最近研究表明在白脂肪组织中, SIRT1 与核受体 PPAR γ 通过核受体协阻抑物(N-CoR)相互作用,且促进了食物剥夺时脂肪的动员²²。SIRT1 也可以与 PPAR γ 辅激活物 PGC-1 α 相互作用和修饰 PPAR γ 辅激活物 PGC-1 α 以调节肝脏葡萄糖体内稳态^{23,24}。美国专利 6,048,903 报道了人受治疗者的血

液中重密度脂蛋白(heavy density lipoprotein, HDL)的水平可以通过向受治疗者施用反式白藜芦醇来增加(in eased), 且这一物质降低了受治疗者血液中轻密度脂蛋白(light density lipoprotein, LDL)的水平。

SIRT1 在脂肪代谢和葡萄糖体内稳态的参与赋予这种蛋白质也可以调节哺乳动物胆固醇体内稳态的潜力。本发明提出了这些胆固醇体内稳态的新颖机理。

发明概述

本发明一般涉及胆固醇体内稳态和胆固醇逆向传递领域中有效的组合物和方法。

在第一个方面, 本发明提供了一种含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的分离的复合体。在某些实施方案中, 这一复合体额外含有 LXR 响应元件(element)。

在一个相关方面, 本发明提供了一种形成含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体的方法。所述方法包括组合含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质、哺乳动物 LXR 蛋白质和细胞核酸片段的组合物, 所述细胞核酸片段包括 LXR 响应元件。

在又一进一步方面, 本发明提供了一种识别调节复合体形成的试剂的方法, 所述复合体包括哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质。所述方法包括以下步骤:

组合含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质、哺乳动物 LXR 蛋白质和细胞核酸片段的组合物, 所述细胞核酸片段包括 LXR 响应元件, 因此提供一种复合体组合物;

进一步, 在结合步骤前, 将含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质的组合物、含有哺乳动物 LXR 蛋白质的组合物、或含有细胞核酸片段的组合物中的一种与含有试剂的第四组合物相接触; 或者在结合步骤后, 将所述复合体组合物与含有试剂的第四组合物相接触; 以及

确定复合体的形成是否受到试剂的调节。

在本方法的某些实施方案中，试剂增加了复合体的形成。在额外的实施方案中，通过与不含试剂的对照组合物的比较而进行确定。

在又一额外方面，本发明提供了一种增加哺乳动物血浆中结合高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比的方法，其中所述方法包括向哺乳动物施用刺激 SIRT1 活性的试剂。在有利的实施方案中，所述试剂包括 T0901317。

在又一进一方面，本发明提供了一种增加哺乳动物血浆中结合高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比的方法，其中所述方法包括向哺乳动物施用促进含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体形成的试剂。在本方法有利的实施方案中，所述试剂包括 22(R)-羟基胆固醇或 9-顺式视黄酸或两者。

在又一额外方面，本发明提供了一种促进 ABCA1 介导的哺乳动物细胞胆固醇流出的方法，其中所述方法包括向细胞引入含有编码蛋白质脱乙酰酶的序列的核酸。在本方法的若干实施方案中，所述蛋白质脱乙酰酶是真核 Sir2 或哺乳动物 SIRT1。仍旧本方法的其他实施方案，包括一个进一步用刺激 SIRT1 活性的试剂(如 T0901317)接触细胞的步骤。在本方法的其他实施方案中，细胞进一步接触促进含有哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质的复合体形成的试剂。在某些实施方案中，所述复合体促进试剂包括 22(R)-羟基胆固醇或 9-顺式视黄酸或两者。

本发明的一个进一步方面提供了一种治疗被认为具有 SIRT1 活性水平低于正常的受治疗者的方法。这种受治疗者表现出 HDL-胆固醇的水平，以及 HDL-胆固醇同 LDL-胆固醇的比被认为低于正常。所述方法包括向受治疗者施用编码物种特异性 SIRT1 的核酸，其中所述核酸在受治疗者细胞中有效表达治疗有效量的 SIRT1。

在进一步方面，本发明提供了一种评估一种候选物质 (candidate substance) 是否调节 LXR 依赖性过程的方法。所述方法包括以含有 (harboring) 由 LXRE 可操作地驱动的报道基因的质粒转染细胞；用候选

物 (candidate) 与细胞接触; 以及通过与没有接触候选物的细胞比较, 确定候选物是否调节报道基因的表达; 如此检测到的候选物存在和不存在时的差异表明候选物调节 LXR 依赖性过程。

在一个额外方面, 本发明提供了一种评估一种候选物质是否调节 LXR 的 SIRT1 依赖效应的方法。所述方法包括以含有 SIRT1 基因的质粒转染细胞; 以含有由 LXRE 启动子可操作地驱动的报道基因的质粒进一步转染细胞; 用候选物与细胞接触; 以及通过与没有接触候选物的细胞比较, 确定候选物是否调节报道基因的表达; 借以, 检测到的候选物存在和不存在时的差异表明候选物调节 LXR 的 SIRT1 依赖效应。

在进一步方面, 本发明提供了一种评估候选物质是否调节 LXR 与 SIRT1 的相互作用的方法。所述方法包括用含有编码已附加表位的 LXR 的序列的载体 (vector) 转染细胞; 用含有编码 SIRT1 的序列的载体进一步转染细胞; 用候选物质与细胞接触; 裂解细胞, 用附加表位特异的抗体接触细胞裂解产物, 以及用抗体特异性吸附剂回收包括 SIRT1 和 LXR 复合体的免疫沉淀物; 使用 SIRT1 和 LXR 特异的抗体执行蛋白质印迹程序; 借以, 对比候选物存在和候选物不存在时, 检测到的复合体形成的差异表明候选物调节 SIRT1 和 LXR 的相互作用。

附图简述

图 1. SIRT1 功能的缺失导致改变的胆固醇体内稳态。

(a-c) 来自野生型(实心柱)、 $SIRT1^{+/-}$ (斜阴影柱)、和 $SIRT1^{-/-}$ (空白柱)的小鼠血浆样品用于分析(a)总胆固醇、(b)HDL 胆固醇、(c)LDL 胆固醇。

(d) 野生型(实心菱形)和 $SIRT1^{-/-}$ (空白菱形)小鼠的 FPLC 血浆脂蛋白胆固醇分布图。

(e) 野生型(实心柱)和 $SIRT1^{-/-}$ (空白柱)小鼠的 HDL 馏分中相对脂质含量。

(f) 来自野生型对照(实心柱)和同窝出生仔畜 $SIRT1^{-/-}$ (空白柱)的睾丸和肝脏的总胆固醇。

(g) 有或没有使用烟酰胺预处理的初生鼠胚胎成纤维细胞(MEF) (左图) 或 THP-1 人单核细胞(右图)的 ApoAI 介导的 $[^3\text{H}]$ 胆固醇流出。

图 2. ABCA1 的表达和与 LXR 核受体的相互作用。

(a) 肝脏中(左图, 由定量实时 PCR 确定), 以及睾丸和卵巢中(右图, 由野生型(+/+)和 *SIRT1*^{-/-} (-/-)动物的 RNA 印迹确定)ABCA1 mRNA 的表达。

(b) SIRT1 活性的抑制降低 ABCA1 启动子活性。

(c) SIRT1 缺陷对 MEF 中 ABCA1 启动子活性的影响。

(d) SIRT1 与 ABCA1 启动子的 LXRE 的相互作用。

(e) SIRT1 与 LXR α 和 LXR β 的相互作用。

图 3. SIRT1 缺陷损害了体内对 LXR 激动剂的正常应答。

(a) 在 *SIRT1*^{-/-}小鼠肝脏中, LXR 靶向 mRNA。

(b) 在用 LXR 激动剂 T0901317 处理的小鼠的肝脏中, LXR 靶向 mRNA 的相对水平。

(c) 在用或没用 T0901317 的野生型和 *SIRT1*^{-/-}小鼠中, ABCA1 蛋白质水平。

(d) 向在血浆和肝脏中积累了低水平甘油三酯的 *SIRT1*^{-/-}小鼠施用 T0901317 后的甘油三酯水平。

(e) T0901317 给食后, 血浆中胆固醇的诱导。

(f) T0901317 给食前(实心方形)和后(空白方形)野生型和 *SIRT1*^{-/-}小鼠中典型 FPLC 血浆脂蛋白分布图。

图 4. SIRT1 通过 LXR 蛋白质脱乙酰调节 LXR 稳定性和活性。

(a) SIRT1 对 LXR 蛋白质表达 *SIRT1* 的影响。

(b) RNA 干扰敲低 SIRT1 对 LXR 水平的影响。

(c) 抑制剂对 LXR 蛋白质表达的影响。

(d) SIRT1 促进 LXR 的泛素化 (ubiquitination)。

(e) 体内 LXR 的乙酰化和 22(R)-HC 和 9-顺式 RA 对 LXR 的激活。

(f) SIRT1 脱乙酰化 HA-LXR β 。

图 5. SIRT1 的抑制或蛋白酶体介导的 LXR 降解对 ABCA1 启动子上 LXR 的转录活性的影响的图示。

发明详述

序列表

表 1. 本公开的序列表

SED ID NO:	鉴定	GENBANK ACC 号	类型
1	人 SIRT1	NP_036370	蛋白质
2	鼠 SIRT1	NP_062786	蛋白质
3	人肝 X 受体 α	NP_062786	蛋白质
4	人肝 X 受体 β	NP_009052.3	蛋白质
5	鼠肝 X 受体 α	NP_038867.1	蛋白质
6	鼠肝 X 受体 β	NP_033499.1	蛋白质
7	人 SIRT1	NM_012238	mRNA
8	鼠 SIRT1	NM_019812	mRNA
9	人肝 X 受体 α	NM_005693	mRNA
10	人肝 X 受体 β	NM_007121	mRNA
11	鼠肝 X 受体 α	NM_013839	mRNA
12	鼠肝 X 受体 β	NM_009473	mRNA
13	引物		DNA
14	引物		DNA
15	引物		DNA
16	引物		DNA
17	引物		DNA
18	引物		DNA
19	引物		DNA
20	引物		DNA

根据本文所使用的, HDL(高密度脂蛋白)是指一类具有高蛋白质比例的血浆脂蛋白, 包括载脂蛋白 A、C、D 和 E。HDL 在血浆中以 HDL-胆固醇

醇复合体结合并运输胆固醇(不论是游离的还是酯化的)。术语 HDL 以依赖上下文的方式用于表示胆固醇与 HDL 粒子的结合。

根据本文所使用的, LDL(低密度脂蛋白)是指一类具有高脂质比例的血浆脂蛋白, 包括胆固醇、胆固醇酯和甘油三酯。它主要包括载脂蛋白 B-100 和载脂蛋白 E。LDL 在血浆中结合并运输胆固醇。术语 LDL 以依赖上下文的方式用于表示胆固醇与 LDL 粒子的结合。

根据本文所使用的, 术语“分离的”和相似术语是指从自然存在状态中纯化的物质, 所述纯化通过清除至少一种与该物质共同存在于自然状态中的组分来完成。术语“纯化的”可以与“分离的”做同义使用。应了解这些术语不需要物质具有任何预设的纯度水平。

根据本文所使用的, 术语“复合体”和相似术语是指两种或多种物质的组合, 所述物质互相充分地稳定地组合以经受分离过程, 以及以这种组合为特点。复合体的组分可以互相直接结合, 或组合可以包括中间的促进组分(facilitating component)以致那些被识别(identified)的组分不与另一个直接接触。复合体可以通过非共价相互作用结合所述组分或通过它们之间的共价键来形成。

根据本文所使用的, 术语“胆固醇”一般指作为胆固醇和胆固醇酯存在的总胆固醇。在某些对本领域技术人员明显的情况中, 这里使用的“胆固醇”可以仅指游离胆固醇。

根据本文所使用的, 术语“治疗”和相似术语和词组是指向具有疾病或病症、疾病的症状、或对疾病的易感性 (predisposition) 的受治疗者应用或施用治疗剂, 或者向源自受治疗者的分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂。治疗是为了促进其治愈或愈合, 或减轻、缓解、改变、补救、改善、促进或影响疾病、疾病的症状、或对疾病的易感性。

根据本文所使用的, 词组“治疗有效量”和“预防有效量”分别是指在疾病治疗中提供治疗益处的量, 或者提供预防或者减少疾病严重性的效应的量。治疗有效的具体量可以由普通医学从业者通过对被处理的受治疗者的反应的评估而容易地确定, 而且可以根据本领域所知的因素变化, 如疾病

的性质、受治疗者的病史和年龄、疾病的阶段、以及其他治疗剂的施用。

根据本文所使用的，“药物组合物”是指一种组合物，其包括药理学有效量的多核苷酸和药学可接受载体 (carrier)。根据本文所使用的，“药理学有效量”，“治疗有效量”或简单地“有效量”是指有效的产生计划中的药理学的、治疗的或预防的结果的抑制多核苷酸的量。例如，如果当与疾病或病症相关的临床参数有至少最小的可以测量的变化时，给定的临床治疗被认为是有效的，那么用于治疗那种疾病或病症的药物的治疗有效量是实现参数至少变化范围(extent of change)所需的量。

术语“药学可接受载体”是指至少生理学可接受的且被管理机构批准的用于治疗剂施用的组分。

SIRT1 多肽

根据本文所使用的，术语“SIRT1 多肽”、“SIRT1 蛋白质”和相关术语和词组是指野生型 SIRT1、突变体 SIRT1、变体 SIRT1、以及其生物活性片段和成熟形式。本发明使用的一种重要的 SIRT1 蛋白质是人 SIRT1。人 SIRT1 的氨基酸序列在 GenBank Acc.号 NP_036370 中给出，公开其由 747 个氨基酸残基组成，在表 2 中使用传统的单字母氨基酸密码给出 (International Union Of Biochemistry And Molecular Biology, Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc., Part 1, Section A: Amino-Acid Nomenclature, Section 3AA-1. Names Of Common Alpha-Amino Acids(国际生物化学与分子生物学联合会推荐的生物化学&有机命名、符号及术语规则等，第一部分，A 部分：氨基酸命名，3AA-1 部分：普通 α 氨基酸命名)，<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>和 *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 14-42)。

表 2. 人 SIRT1 的氨基酸序列

```

1 madeaalalq pggspsaaga dreaasspag eplrkrprrd gpglerspge pggaaperev
61 paaargcpga aaaalwrae aeaaaaggeq eaqataaage gdngpglqgp sreppladnl
121 ydeddddege eeeeeaaaai gyrdnlifgd eiitngfhsc esdeedrash assdwtprp
181 rigpytfvqg hlmigtprt ilkdllpeti pppelddmtl wqiviniise ppkrkrkrdi
241 ntiedavkl1 geckkiivlt gagvsvscgi pdfrrrdgiy arlavdfpdl pdpqamfdie
301 yfrkdprpff kfakeiypgq fqpelchfkfi alsdkegkl1 rnytnidtl eqvagiqrii

```

```

361 qchgsfatas cclickykvdc eavrgdifnq vvprcprcpa deplaimkpe ivffgenlpe
421 qfhramkydk devdliivig sslkvrpval ipssiphevp gilinreplp hlhfdvellg
481 dcdviinelc hrlggyakl ccnpvklsei tekpprtqke laylselppt plhvsedsss
541 pertsppdss vivtildqaa ksnddlvse skgcmeekpq evqtsrnves iaegmenpdl
601 knvgsstgek nertsvagtv rkcpnrvak eqisrrldgn qylflppnry ifhgaevysd
661 seddvlssss cgsnsdsgtc qspsleepme deseieefyn gledepdvpe raggagfgtd
721 gddqeaanea isvkqevtdm nypsnks

```

(SEQ ID NO:1)

鼠 SIRT1 的氨基酸序列在 GenBank Acc.号 NP_062786 中给出,公开其由 737 个氨基酸残基组成,如表 3 所示。

表 3. 鼠 SIRT1 的氨基酸序列

```

1 madevalalq aagspaaaa meaasqpade plkrprrrdg pglgrspgpe saavapaaag
61 ceaasaaapa alwreaagaa asaereapat avagdgngs glrrepraad dfdddegeee
121 deaaaaaaaa aigyrnlll tdglltngfh scesddddrt shassdwtpr prigpytfv
181 qqhlmigtdp rtilkdllpe tippelddm tlwqivini seppkrkkkrk dintiedavk
241 llqeckkiiv ltgagvsvsc gipdfrrsdg iyarlavdfp dlpdqamfd ieyfrkdprp
301 fffkakeiyp gqfgpslchk fialsdkegk llrnytqnid tleqvagiqr ilqchgsfat
361 asclickykv dceavrgdif nqvprcprc padeplaimk peivffgenl peqfhramky
421 dkdevdliiv igsslkvrpv alipssiphe vpqilinrep lphlhfdvel lgdcdviine
481 lchrlggya klccnpvkl eitekpprpq kelvhlsepl ptplhiseds sspertvpqd
541 ssviatlvdq atnnnvndle vsesscveek pgevqtsrnv eninvenpdf kavgsstadk
601 nertsvaetv rkcpnrak eqiskrlegn qylfvppnry ifhgaevysd seddvlssss
661 cgsnsdsgtc qspsleeple deseieefyn glddterpe caggsgfgad ggdqevvnea
721 iatrqeltdv nypsdks

```

(SEQ ID NO:2)

人肝 X 受体 α 的氨基酸序列在 GenBank Acc.号 NP_062786 中给出,公开其由 447 个氨基酸残基组成,如表 4 所示。

表 4. 人肝 X 受体 α 的氨基酸序列

```

MSLWLGAPVPDIPDSSAVELWKPGAQDASSQAQGGSSCILREEA
RMPHSAGGTAGVGLAAEPTALLTRAEPPEPTAIRPQKRKKGPAPKMLGNELCVCG
DKASGFHYNVLSCEGCKGFFRRSVIKGAHYICHSGGHCPMDTYMRRKCQECRLRKCRQ
AGMREECVLSEEQIRLKKLKRQEEQAHATSLPPRRSSPPOILPQLSPEQLGMIEKLV
AAQQQCNRRSFSDRLRVTPWPMAPDPSREARQORFAHFTELAIIVSVQEIIVDFAKQLP
GFLQLSREDQIALKTSIAIEVMLLETSSRYNPGSESITFLKDFSYNREDFAKAGLOVE
FINPIFEFSRAMNELQLNDAEFALLIAISIFSADRPNVQDQLQVERLQHTYVEALHAY
VSIHHPHDLRMFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKLPLLLSEIWDVHE

```

(SEQ ID NO:3)

人肝 X 受体 β 的氨基酸序列在 GenBank Acc.号 NP_009052.3 中给出,公开其由 461 个氨基酸残基组成,如表 5 所示。

表 5. 人肝 X 受体 β 的氨基酸序列

MSSPTTSSLDTPLPNGPQPAPSSSPTVKEEGPEPWPGGPDP
 DVPGTDEASSACSTDWVIPDPEEPEPERKRKKGPAKMLGHELRCVCGDKASGFHYNVL
 SCEGCKGFFRRSVVRGGARRYACRGGGTCQMDAFMRRKCQQCRLRKCEAGMREQCVL
 SEEQIRKKKIRKQQQQESQSQSQSPVGPQSSSSASGPGASPGGSEAGSQSGEGEGV
 QLTAAQELMIQQLVAAQLQCNKRSFSDQPKVTPWPLGADPQSRDARQORFAHFTELAI
 ISVQEIIVDFAKQVPGFLQLGREDQIALLKASTIEIMLLETARRYNHETECITFLKDFT
 YSKDDFHRAGLQVEFINPIFEFSRAMRRLGLDDAEYALLIAINIFSA DRPNVQEPGRV
 EALQQPYVEALLSYTRIKRPQDQLRFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKL
 PLLSEIWDVHE

(SEQ ID NO:4)

鼠肝 X 受体 α 的氨基酸序列在 GenBank Acc. 号 NP_038867.1 中给出，公开其由 445 个氨基酸残基组成，如表 6 所示。

表 6. 鼠肝 X 受体 α 的氨基酸序列

MSLWLEASMPDVSPDSATELWKTEPQDAGDQGGNTCILREEARM
 POSTGVALGIGLESAEPTALLPRAETLPEPTELRPQKRKKGPAKMLGNE LCSVCGDK
 ASGFHYNVLSCEGCKGFFRRSVIKGARYVCHSGGHC PMDTYMRKQCRCRLRKCRQAG
 MREECVLSEEQIRLKKLKRQEEEAQATS SVSPRVSSPPQVLPQLSPEQLGMIEKLVA
 QQCNRRSFSDRLRVTPWPIAPDPQSRDARQORFAHFTELAI SVQEIIVDFAKQLPGF
 LQLSREDQIALLKTS AIEVM LLET SRRYNPGSESITFLKDFSYNREDFAKAGLQVEFI
 NPIFEFSRAMNELQLNDAEFALLIAISIFSA DRPNVQDQLQVERLQHTYVEALHAYVS
 INHPHDLRMFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKL PLLSEIWDVHE

(SEQ ID NO:5)

鼠肝 X 受体 β 的氨基酸序列在 GenBank Acc. 号 NP_033499.1 中给出，公开其由 446 个氨基酸残基组成，如表 7 所示。

表 7. 鼠肝 X 受体 β 的氨基酸序列

MSSPTSSLDTPVPGNGSPQSTSATSPITKEEGQETDPPPGSEG
 SSSAYIVVILEPEDEPERKRKKGPAKMLGHELRCVCGDKASGFHYNVLSCEGCKGFF
 RRSVVHGGAGRYACRSGGTCQMDAFMRRKCQLCRLRKCEAGMREQCVLSEEQIRKKR
 IQKQQQQQPPPPSEPAASSSSGRPAASPGTSEASSQSGEGEGIQLTAAQELMIQQLVA
 AQLQCNKRSFSDQPKVTPWPLGADPQSRDARQORFAHFTELAI SVQEIIVDFAKQVPG
 FLQLGREDQIALLKASTIEIMLLETARRYNHETECITFLKDFTY SKDDFHRAGLQVEFI
 INPIFEFSRAMRRLGLDDAEYALLIAINIFSA DRPNVQEPSRVEALQQPYVEALLSYT
 RIKRPQDQLRFPRMLMKLVSLRTLSSVHSEQVFALRLQDKKL PLLSEIWDVHE

(SEQ ID NO:6)

通常，本发明的方法和组合物中使用的“SIRT1 多肽”和各种“LXR 多肽”包括如表 2-7 中所示的野生型人 SIRT1 和 LXR 多肽或者野生型鼠 SIRT1 和鼠 LXR 多肽、以及其野生型脊椎动物直系同源物、和其结构域、基序和片段。此外，这些术语包括重组突变体的多肽、结构域、基序和片段，在所述多肽、结构域、基序和片段中至少有一个氨基酸残基被改为不同的

氨基酸残基；或者一个或多个残基被缺失；或者一个或多个残基插入原序列相邻的残基之间。突变体或变体 SIRT1 多肽可以由野生型或参照序列变化 1 个氨基酸残基到多达 1% 的残基、或变化多达 2%、或多达 5%、或多达 8%、或多达 10%、或多达 15%、或多达 20%、或略微更高的百分比的残基而得到。所述 SIRT1 的重组突变体或变体的多肽、结构域、基序和片段被用于本方法和组合物中，只要其确实地表现出至少一种野生型 SIRT1 和 LXR 的生物活性或功能。生物活性或功能的拥有可以被涉及本发明领域的技术人员确定，通过包括且不限于例如，分子生物学、细胞生物学、病理学、临床医学及类似学科。本发明领域的技术人员至少可以通过本发明实施例中描述的方法测定重组突变体 SIRT1 和 LXR 的多肽、结构域、基序和片段。

本领域将认可 SIRT1 或 LXR 多肽的氨基酸序列可以改变且不显著影响蛋白质的结构或功能。如果考虑这种序列中的差异，应该知道蛋白质中的某些区域对其活性是重要的。通常，替代形成三级结构的残基是可能的，只要使用提供相似功能的残基。在其他的例子中，残基的类型可以完全不重要，如果改变是发生在蛋白质不重要的区域。

核酸

根据本文所使用的，术语“SIRT1 多核苷酸”或“SIRT1 核酸”，或“LXR 多核苷酸”或“LXR 核酸”或相关术语和词组，是指本文描述的任何编码任何 SIRT1 多肽的多核苷酸。通常，上述编码 SIRT1 多肽的任何核苷酸序列包括在本发明中。在一些实施方案中，编码含有表 2 所示的人 SIRT1 氨基酸序列的多肽的核酸包括 mRNA 核酸序列(公开于 GenBank Acc 号 NM_012238 中)的编码序列(表 8 所示)或其片段。在表 8 中，编码序列从 54 位延伸到 2297 位。

表 8

1	gtcagagcggg	agcagaggag	gcgagggagg	agggccagag	aggcagttgg	aagatggcgg
61	acgaggcggc	cctcgccctt	cagcccggcg	gtccccctc	ggcggcgggg	gccgacaggg
121	aggccgcgtc	gtcccccgcc	ggggagccgc	tccgcaagag	gccgcggaga	gatggtcccg
181	gcctcagcgc	gagccccggc	gagcccgggt	gggcggcccc	agagcgtgag	gtgccggcgg
241	cggccagggg	ctgccccggg	gcggcggcgg	cggcgctgtg	gcgggagggc	gaggcagagg
301	cggcggcggc	aggcggggag	caagagggcc	aggcgactgc	ggcggctggg	gaaggagaca
361	atgggccggg	cctgcagggc	ccatctcggg	agccaccgct	ggccgacaac	ttgtacgacg
421	aagacgacga	cgacgagggc	gaggaggagg	aagaggcggc	ggcggcggcg	attgggtacc
481	gagataacct	tctgttcggg	gatgaaatta	tactaatgg	ttttcattcc	tgtgaaagtg
541	atgaggagga	tagagcctca	catgcaagct	ctagtactg	gactccaagg	ccacggatag
601	gtccatatac	ttttgttcag	caacatctta	tgattggcac	agatcctcga	acaattctta
661	aagattttatt	gccggaaaca	atacctccac	ctgagttgga	tgatatgaca	ctgtggcaga
721	ttgttattaa	tatcctttca	gaaccaccaa	aaaggaaaaa	aagaaaagat	attaatacaa
781	ttgaagatgc	tgtgaaatta	ctgcaagagt	gcaaaaaaat	tatagttcta	actggagctg
841	gggtgtctgt	tccatgtgga	atacctgact	tcagggtcaag	ggatggtatt	tatgctcgcc
901	ttgctgtaga	cttcccagat	cttccagatc	ctcaagcgat	gtttgatatt	gaatatttca
961	gaaaagatcc	aagaccattc	ttcaagtttg	caaaggaaat	atatcctgga	caattccagc
1021	catctctctg	tcacaaattc	atagccttgt	cagataagga	aggaaaacta	cttcgcaact
1081	ataccagaa	catagacacg	ctggaacagg	ttgcgggaat	ccaaaggata	attcagtgtc
1141	atggttcctt	tgcaacagca	tcttgccctga	tttgtaaata	caaagttgac	tgtgaagctg
1201	tacgaggaga	tatttttaat	caggtagttc	ctcgatgtcc	taggtgcccc	gctgatgaac
1261	cgcttgctat	catgaaacca	gagattgtgt	tttttggtga	aaatttacca	gaacagtttc
1321	atagagccat	gaagtatgac	aaagatgaag	ttgacctcct	cattgttatt	gggtcttccc
1381	tcaaagtaag	accagtagca	ctaattccaa	gttccatacc	ccatgaagtg	cctcagatat
1441	taattaatag	agaacctttg	cctcatctgc	attttgatgt	agagcttctt	ggagactgtg
1501	atgtcataat	taatgaattg	tgtcataggt	taggtgggtga	atatgccaaa	ctttgctgta
1561	accctgtaaa	gctttcagaa	attactgaaa	aacctccacg	aacacaaaaa	gaattggctt
1621	atttgtcaga	gttgccaccc	acacctcttc	atgtttcaga	agactcaagt	tcaccagaaa
1681	gaacttcacc	accagattct	tcagtgattg	tcacactttt	agaccaagca	gctaagagta
1741	atgatgattt	agatgtgtct	gaatcaaaag	gttgatgga	agaaaaacca	caggaagtac
1801	aaacttctag	gaatgttgaa	agtattgctg	aacagatgga	aaatccggat	ttgaagaatg
1861	ttggttctag	tactggggag	aaaaatgaaa	gaacttcagt	ggctggaaca	gtgagaaat
1921	gctggcctaa	tagagtggca	aaggagcaga	ttagtaggcg	gcttgatggt	aatcagtatc
1981	tgtttttgcc	accaaatcgt	tacattttcc	atggcgctga	ggtatattca	gactctgaag
2041	atgacgtctt	atcctctagt	tcttggtggc	gtaacagtga	tagtgggaca	tgccagagtc
2101	caagtttaga	agaacccatg	gaggatgaaa	gtgaaattga	agaattctac	aatggcttag
2161	aagatgagcc	tgatgttcca	gagagagctg	gaggagctgg	atttgggact	gatggagatg
2221	atcaagaggc	aattaatgaa	gctatatctg	tgaaacagga	agtaacagac	atgaactatc
2281	catcaacaaa	atcatagtgt	aataattgtg	caggtagcag	aattgttcca	ccagcattag
2341	gaacttttagc	atgtcaaaat	gaatgtttac	ttgtgaactc	gatagagcaa	ggaaaccaga
2401	aaggtgtaat	atttataggt	tggtaaaata	gattgttttt	catggataat	ttttaacttc
2461	attattttctg	tacttgtaca	aactcaacac	taactttttt	ttttttaaaa	aaaaaaaggt
2521	actaagtatac	ttcaatcagc	tggtgggtcaa	gactaacttt	cttttaaagg	ttcatttgta
2581	tgataaattc	atatgtgtat	atataatttt	ttttgttttg	tctagtgagt	ttcaacattt
2641	ttaaagtttt	caaaaagcca	tcggaatgtt	aaattaatgt	aaaggacag	ctaactctaga
2701	ccaaagaatg	gtattttcac	ttttctttgt	aacattgaat	ggtttgaagt	actcaaaaac
2761	tgttacgcta	aacttttgat	tctttaacac	aattattttt	aaacactggc	attttccaaa
2821	actgtggcag	ctaacttttt	aaaatctcaa	atgacatgca	gtgtgagtag	aaggagtgca
2881	acaatatgtg	gggagagcac	tcggttgtct	ttacttttaa	aagtaataca	tggtgctaag


```

2941 aatttcagga ttattgtatt tacgttcaaa tgaagatggc ttttgtactt cctgtggaca
3001 tgtagtaatg tctatattgg ctcataaaac taacctgaaa aacaaataaa tgctttggaa
3061 atgtttcagt tgcttttagaa acattagtgc ctgcctggat ccccttagtt ttgaaatatt
3121 tgccattgtt gtttaaatac ctatcactgt ggtagagctt gcattgatct tttccacaag
3181 tattaaactg ccaaaatgtg aatatgcaaa gcctttctga atctataata atgggtacttc
3241 tactggggag agtgtaatat tttggactgc tgttttccat taatgaggag agcaacaggc
3301 ccctgattat acagttccaa agtaataaga tgttaattgt aattcagcca gaaagtacat
3361 gtctcccatt gggaggattt ggtgttaa at accaaactgc tagccctagt attatggaga
3421 tgaacatgat gatgtaactt gtaatagcag aatagttaat gaatgaaact agttcttata
3481 atttatcttt atttaaaagc ttagcctgcc ttaaaactag agatcaactt tctcagctgc
3541 aaaagcttct agtctttcaa gaagttcata ctttatgaaa ttgcacagta agcattttatt
3601 tttcagacca tttttgaaca tcactcctaa attaataaag tattcctctg ttgctttagt
3661 atttattaca ataaaaaggg tttgaaatat agctgttctt tatgcataaa acaccagct
3721 aggaccatta ctgccagaga aaaaaatcgt attgaatggc catttcccta cttataagat
3781 gtctcaatct gaatttattt ggctacacta aagaatgcag tatatttagt tttccatttg
3841 catgatgttt gtgtgtctata gatgatattt taaattgaaa agtttgtttt aaattatttt
3901 tacagtgaag actgttttca gctcttttta tattgtacat agtcttttat gtaatttact
3961 ggcataatgt ttgtagactg tttaatgact ggatatcttc cttcaacttt tgaaatacaa
4021 aaccagtgtt ttttacttgt acactgtttt aaagtctatt aaaattgtca tttgactttt
4081 ttctgttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

(SEQ ID NO:7)

在一些实施方案中，编码含有表3所示的鼠 SIRT1 氨基酸序列的多肽的核酸包括 mRNA 核酸序列(公开于 GenBank Acc 号 NM_019812 中)的编码序列(表9所示)或其片段。在表9中，编码序列从48位延伸到2261位。

表9

```

1 gcggagcaga ggaggcgagg gcggagggcc agagaggcag ttggaagatg gcggacgagg
61 tggcgctcgc cttcagggcc gcgggctccc ctccgcgggc ggccgcatg gaggcgcggt
121 cgcagccggc ggacgagccg ctccgcaaga gggcccgccg agacgggctt ggcctcgggc
181 gcagcccggy cgagccgagc gcagcagtgg cgccggcggc cgcggggtgt gaggcggcga
241 gcgcccgggc cccggcggcg ctgtggcggg aggcggcagg ggcgcgggcg agcgcgaggc
301 gggaggcccc ggcgacggcc gtggccgggg acggagacaa tgggtccggc ctgcgcgggg
361 agccgagggc ggctgacgac ttcgacgacg acgagggcga ggaggaggac gaggcggcgg
421 cggcagcggc ggcggcagcg atcggctacc gagacaacct cctgttgacc gatggactcc
481 tcaactaatg ctttcattcc tgtgaaagtg atgacgatga cagaacgtca cacgccagct
541 ctagtgactg gactccgcgg ccgcggatag gtccatatac tttgtttcag caacatctca
601 tgattggcac cgatcctcga acaattctta aagatttatt accagaaaca attcctccac
661 ctgagctgga tgatatgacg ctgtggcaga ttgttattaa tatcctttca gaaccacaa
721 agcggaaaaa aagaaaagat atcaatacaa ttgaagatgc tgtgaagtta ctgcaggagt
781 gtaaaaagat aatagtcttg actggagctg gggtttctgt ctctgtggg attcctgact
841 tcagatcaag agacggtatc tatgctcgcc ttgcggtgga cttcccagac ctcccagacc
901 ctcaagccat gtttgatatt gagtatttta gaaaagaccc aagaccattc ttcaagtttg
961 caaaggaaat atatcccgga cagttccagc cgtctctgtg tcacaaattc atagctttgt
1021 cagataagga aggaaaacta cttcgaaatt atactcaaaa tatagatacc ttggagcagg
1081 ttgcaggaat ccaaaggatc cttcagtgct atggttcctt tgcaacagca tcttgctga
1141 tttgtaaaata caaagttgat tgtgaagctg ttcgtggaga catttttaat caggtagttc
1201 ctcggtgccc taggtgccc a gctgatgagc cacttgccat catgaagcca gagattgtct
1261 tctttggtga aaacttacca gaacagtttc atagagccat gaagtatgac aaagatgaag
1321 ttgacctcct cattgttatt ggatcttctc tgaaagtgag accagtagca ctaattccaa

```

```

1381 gttctatacc ccatgaagtg cctcaaatat taataaatag ggaacctttg cctcatctac
1441 attttgatgt agagctcctt ggagactgcg atgttataat taatgagttg tgcataggc
1501 taggtggtga atatgccaaa ctttggttga accctgtaaa gctttcagaa attactgaaa
1561 aacctccacg cccacaaaag gaattggttc atttatcaga gttgccacca acacctcttc
1621 atatttcgga agactcaagt tcacctgaaa gaactgtacc acaagactct tctgtgattg
1681 ctacacttgt agaccaagca acaaaacaaca atgttaatga tttagaagta tctgaatcaa
1741 gttgtgtgga agaaaaacca caagaagtac agactagtag gaatgttgag aacattaatg
1801 tggaaaatcc agattttaag gctgttggtt ccagtagtgc agacaaaaat gaaagaactt
1861 cagttgcaga aacagtgaga aaatgctggc ctaatagact tgcaaggag cagattagta
1921 agcggcttga gggtaatcaa tacctgtttg taccaccaa tctgtacata ttccacggtg
1981 ctgagggtata ctacagactct gaagatgacg tcttgtcctc tagttcctgt ggcagtaaca
2041 gtgacagtgg cacatgccag agtccaagtt tagaagaacc cttggaagat gaaagtgaaa
2101 ttgaagaatt ctacaatggc ttggaagatg atacggagag gccggaatgt gctggaggat
2161 ctggatttgg agctgatgga ggggatcaag aggttggtta tgaagctata gctacaagac
2221 aggaattgac agatgtaaac tatccatcag acaaatcata acactattga agctgtccgg
2281 attcaggaat tgctccacca gcattgggaa ctttagcatg tcaaaaaaat gaatgtttac
2341 ttgtgaactt gaacaaggaa atctgaaaga tgtattattt atagactgga aatatagattg
2401 tcttcttgga taatttctaa agttccatca tttctgtttg tacttgtaga ttcaacactg
2461 ttggttgact tcatcttctt ttcaagggtt atttgtagta tacattcgta tgtatgtata
2521 attttgtttt ttgcctaatt agtttcaacc ttttaaagtt ttcaaaagcc attggaatgt
2581 taatgtaaag ggaacagctt atctagacca aagaatggta tttcacactt ttttggttgt
2641 aacattgaat agtttaaaag cctcaatttc tgttctgctg aacttttatt tttaggacag
2701 ttaacttttt aaacactggc attttccaaa acttgtggca gctaactttt taaaatcaca
2761 gatgacttgt aatgtgagga gtcagcaccg tgtctggagc actcaaaact tgggctcagt
2821 gtgtgaagcg tacttactgc atcgtttttg tacttgctgc agacgtggta atgtccaaac
2881 aggccctga gactaatctg ataaatgatt tggaaatgtg tttcagttgt tctagaaaca
2941 atagtgcctg tctatatagg tccccttagt ttgaatattt gccattgttt aattaaatac
3001 ctatcactgt ggtagagcct gcatagatct tcaccacaaa tactgccaa atgtgaatat
3061 gcaaagcctt tctgaatcta ataatggtac ttctactggg gagagtgtaa tattttggac
3121 tgctgttttt ccattaatga ggaagcaat aggcctctta attaaagtcc caaagtcata
3181 agataaattg tagctcaacc agaaagtaca ctgttgcttg ttgaggattt ggtgtaatgt
3241 atcccaaggt gttagccttg tattatggag atgaatacag atccaatagt caaatgaaac
3301 tagttcttag ttatttaaaa gcttagcttg ccttaaaact agggatcaat tttctcaact
3361 gcagaaactt ttagcctttc aaacagttca cacctcagaa agtcagtatt tattttacag
3421 acttcttttg aacattgcc ccaaatttaa atattcatgt gggtttagta tttattacaa
3481 aaaaatgatt tgaatatag ctgttcttta tgcataaaat acccagttag gaccattact
3541 gccagaggag aaaagtatta agtagctcat ttccctacct aaaagataac tgaatttatt
3601 tggctacact aaagaatgca gtatatttag ttttccattt gcatgatgtg tttgtgctat
3661 agacaatatt ttaaattgaa aaatttggtt taaattattt ttacagtga gactgttttc
3721 agctcttttt atattgtaca tagactttta tgtaatctgg catatgtttt gtagaccgtt
3781 taatgactgg attatcttcc tccaactttt gaaatacaaa aacagtgttt tatactaaaa
3841 aaaaaaaaa

```

(SEQ ID NO:8)

在一些实施方案中，编码含有表 4 所示的人肝 X 受体 α 氨基酸序列的多肽的核酸包括 mRNA 核酸序列(公开于 GenBank Acc 号 NM_005693 中)的编码序列或其片段。在表 10 中，编码序列从 36 位延伸到 1379 位。

表 10. 编码人肝 X 受体 α 的多核苷酸序列

```

1  cagtgccttg gtaatgacca gggctccaga aagagatgtc cttgtggctg gggggccctg
61  tgcctgacat tcctcctgac tctgcggtgg agctgtggaa gccaggcgca caggatgcaa
121  gcagccaggc ccagggaggc agcagctgca tcctcagaga ggaagccagg atgccccact
181  ctgctggggg tactgcaggg gtggggctgg aggctgcaga gccacagcc ctgctacca
241  gggcagagcc cccttcagaa cccacagaga tccgtccaca aaagcggaaa aaggggcccag
301  cccccaaaat gctggggaac gagctatgca gcgtgtgtgg ggacaaggcc tcgggcttcc
361  actacaatgt tctgagctgc gagggctgca agggattcct ccgccgcagc gtcataaagg
421  gagcgcacta catctgccac agtggcggcc actgccccat ggacacctac atgcgtcgca
481  agtgccagga gtgtcggtt cgcaaatgcc gtcaggctgg catgcgggag gagtgtgtcc
541  tgtcagaaga acagatccgc ctgaagaaac tgaagcggca agaggaggaa caggctcatg
601  ccacatcctt gccccccagg cgttcctcac cccccaaat cctgccccag ctcagcccg
661  aacaactggg catgatcgag aagctcgtcg ctgccagca acagtgtaac cggcgctcct
721  tttctgaccg gcttcgagtc acgccttggc ccatggcacc agatccccat agccgggagg
781  cccgtcagca gcgttttggc cacttcactg agctggccat cgtctctgtg caggagatag
841  ttgactttgc taaacagcta cccggcttcc tgcagctcag ccgggaggac cagattgccc
901  tgctgaagac ctctgcgac gaggtgatgc ttctggagac atctcggagg tacaacctg
961  ggagtgaag tatcacctt ctcaaggatt tcagttataa ccgggaagac ttgccaag
1021  cagggtgca agtggaaatc atcaaccca tcttcgagtt ctccagggcc atgaatgagc
1081  tgcaactcaa tgatgccgag tttgccttgc tcattgctat cagcatcttc tctgcagacc
1141  ggccaacgt gcaggaccag ctccaggctg agaggctgca gcacacatat gtggaagccc
1201  tgcatgccca cgtctccatc cccatcccc atgaccgact gatgttccca cggatgctaa
1261  tgaaactggt gagcctccgg accctgagca gcgtccactc agagcaagtg tttgcactgc
1321  gtctgcagga caaaaagctc ccaccgctgc tctctgagat ctgggatgtg cacgaatgac
1381  tgttctgtcc ccataatttc tgttttcttg gccggatggc tgaggcctgg tggctgcctc
1441  ctagaagtgg aacagactga gaagggcaa cattcctggg agctgggcaa ggagatcctc
1501  ccgtggcatt aaaagagagt caaagggg

```

(SEQ ID NO:9)

在一些实施方案中, 编码含有表 5 所示的人肝 X 受体 β 氨基酸序列的多肽的核酸包括 mRNA 核酸序列(公开于 GenBank Acc 号 NM_007121 中)的编码序列或其片段。在表 11 中, 编码序列从 259 位延伸到 1644 位。

表 11. 编码人肝 X 受体 β 的多核苷酸序列

```

1  ctcttccgga cgtgacgcaa gggcgggggt gccggaagaa gtggcgaagt tacttttgag
61  ggtattttgag tagcggcggt gtgtcagggg ctaaagagga ggacgaagaa aagcagagca
121  agggaaccca gggcaacagg agtagttcac tccgcgagag gccgtccacg agacccccgc
181  gcgcagccat gagccccgcc ccccgctgtt gcttgagagag gggcgggacc tggagagagg
241  ctgctccgtg accccaccat gtcctctcct accacgagtt ccctggatac cccctgcct
301  ggaaatggcc cccctcagcc tggcgccctt tcttcttcac ccactgtaaa ggaggagggt
361  ccggagccgt ggcccggggg tccggaccct gatgtccag gcactgatga ggccagctca
421  gcctgcagca cagactgggt catcccagat ccgaagagg aaccagagcg caagcgaag
481  aaggggccag ccccgaaagt gctgggccac gagctttgcc gtgtctgtgg ggacaaggcc
541  tccggcttcc actacaacgt gctcagctgc gaaggctgca agggcttctt ccggcgagct
601  gtggtccgtg gtggggccag gcgctatgcc tgcgggggtg gcggaacctg ccagatggac
661  gctttcatgc ggcgcaagtg ccagcagtg cggctgcgca agtgcaagga ggcagggatg
721  agggagcagt gcgtcctttc tgaagaacag atccggaaga agaagattcg gaaacaacag
781  cagcaggagt cacagtcaca gtcgcagtca cctgtggggc cgcagggcag cagcagctca
841  gcctctgggc ctggggcttc ccctggtgga tctgaggcag gcagccaggg ctccggggaa
901  ggcgagggtg tccagctaac agcggctcaa gaactaatga tccagcagtt ggtggcgggc
961  caactgcagt gcaacaaacg ctcttcttcc gaccagccca aagtcacgcc ctgcccctg
1021  ggcgcagacc ccagtcocg agatgcggc cagcaacgct ttgcccactt cagcgagctg
1081  gccatcatct cagtcacaga gatcgtggac ttcgctaagc aagtgcctgg tttcctgcag
1141  ctgggcccgg aggaccagat cgccctctc aaggcatcca ctatcgagat catgctgcta

```

```

1201 gagacagcca ggcgctacaa ccacgagaca gagtgtatca ccttcttgaa ggacttcacc
1261 tacagcaagg acgacttcca ccgtgcaggc ctgcaggtgg agttcatcaa ccccatcttc
1321 gagttctcgc gggccatgog gcggctgggc ctggacgacg ctgagtagcg cctgctcatc
1381- gccatcaaca tcttctcggc cgaccggccc aacgtgcagg agccggggcg cgtggaggcg
1441 ttgcagcage cctacgtgga ggcgctgctg tctacacgc gcacaaagag gccgcaggac
1501 cagctgcgct tcccggocat gctcatgaag ctggtagacc tgcgcacgct gagctctgtg
1561 cactcggagc aggtcttcgc cttgcggctc caggacaaga agctgccgcc tctgctgtcg
1621 gagatctggg acgtccacga gtgaggggct ggccaccag cccacacagc ttgcctgacc
1681 accctccagc agatagacgc cggcaccctc tctcttctct aggggtggaag gggccctggg
1741 ccgagcctgt agacctatcg gctctcatcc cttgggataa gcccagtcac aggtccagga
1801 ggctccctcc ctgcccagcg agtcttccag aagggttgaa agggttgcag gtcccagca
1861 ctgaccttc ccggtgccc tccctcccca gcttacacct caagcccagc acgcagtgc
1921 ccttgaacag agggagggga ggacccatgg ctctccccc tagcccgga gaccagggc
1981 cttctcttc ctctgctttt atttaataaa aactaaaaac agaaaaaaa aaaaaaa

```

(SEQ ID NO:10)

在一些实施方案中,编码含有表6所示的鼠肝X受体 α 氨基酸序列的多肽的核酸包括 mRNA 核酸序列(公开于 GenBank Acc 号 NM_013839 中)的编码序列或其片段。在表12中,编码序列从190位延伸到1527位。

表12. 编码鼠肝X受体 α 的多核苷酸序列

```

1  gggaacgctg actctggagg ctgctgggat tagggtgggg gtgactgaga agcagtcctt
61  ctgtcagagc aaagagcctc cagggtgagg agaggaagga gagagatgga actagaccgg
121 tctgcgggga aacgcgacag ttttggtaga gggacagtgt cttggtaatg tccaggggctc
181 caggaagaga tgtccttgtg gctggaggcc tcaatgcctg atgtttctcc tgattctgca
241 acggagttgt ggaagacaga acctcaagat gcaggagacc agggaggcaa cacttgcatc
301 ctcaggaggg aagccaggat gccccagtca actgggggtg ctttagggat agggttggag
361 tcagcagagc ctacagccct gctccccagg gcagagaccc tcccagagcc gacagagctt
421 cgtccacaaa agcggaaaaa gggcccagcc cccaaaatgc tggggaacga gctgtgcagt
481 gtctgtgggg acaaagcctc tggcttccat tacaacgtgc tgagctgcga gggctgcag
541 ggattcttcc gccgcagtgt catcaaggga gcacgctatg tctgccacag cgggtggccac
601 tgccccatgg acacctacat gcggcggaaa tgccaggagt gtgacttcg caaatgccgc
661 caggcaggca tgagggagga gtgtgtgctg tcagaagaac agatccgctt gaagaaactg
721 aagcggcaag aagaggaaca ggtcaagcc acttcggtgt ccccaagggt gctctcactt
781 cctcaagtec tgccacagct cagcccagag cagctgggca tgatcgagaa gctggtggct
841 gccagcaaac agtgtaacag gcgctccttc tcagaccgcc tgcgctcac gccttgcccc
901 attgcacccg acctcagag ccgggaagcc cgacaacagc gctttgcccc ctttactgag
961 ctggccatcg tgtccgtgca ggagattgtt gactttgcca aacagctccc tggcttcccta
1021 cagctcagca gggaggacca gatcgcttg ctgaagacct ctgcaatcga ggtcatgctt
1081 ctggagacgt cacggaggta caaccccgcc agtgagagca tcaccttctt caaggacttc
1141 agttacaacc gggaagactt tgccaaagca gggctgcagg tggagttcat caaccccatc
1201 tttgagttct ccagagccat gaatgagctg caactcaatg atgctgagtt tgcctgtctc
1261 attgccatca gcatcttctc tgacagccgg cccaacgtgc aggaccagct ccaagttaga
1321 aggctgcaac acacatatgt ggaggccctg cagccctacg tctccatcaa ccacccccac
1381 gaccgactga tgttcccacg gatgctaata aagctggtga gcctccgtac tttgagcagc
1441 gtccattcag agcaagtgtt tgcccttcgc ctgcaggaca aaaagcttcc cctctgtctg
1501 tctgagatct gggatgtcca cgagtgactg tttcacctgt tcctttgtgt tggccacatg
1561 gcgaaggctc actgactgct tcccacgggt ggagcagact gagaagggca gacattcctg
1621 ggagctgggt gaaggagaga gccttgctga gcattaaggg agagtcaaca ggttgggtgt
1681 tttctggctg ctgggcagtt gggatctact aacgttgtat accatctgaa gacctgtgtg
1741 acccaaccaaa ata

```

(SEQ ID NO:11)

在一些实施方案中,编码含有表7所示的鼠肝X受体 β 氨基酸序列的多肽的核酸包括 mRNA 核酸序列(公开于 GenBank Acc 号 NM_009473 中)

的编码序列或其片段。在表 13 中，编码序列从 271 位延伸到 1611 位。

表 13. 编码鼠肝 X 受体 β 的多核苷酸序列

```

1  ggCGaagtta cttttgcttt tcGctcagca agcGctgttg cttcGagcta ctccagget
61  tctgaagtta cttccaaagt gctgtggagg cacaatcacc ggtgcggaca cagaggcaac
121 tctgcctcc cagggcgtt tccagggcaa cagagtcgga gacccctgc gacccctc
181 ccgatcgccg gtgcagtcac gagccccgcc tccccctggt gcacggagag gggcggggcc
241 tggaacaagc aggtctcttc gtgaccact atgtcttccc ccacaagttc tctggacact
301 cccgtgcctg ggaatggttc tcctcagccc agtacctccg ccacgtcacc cactattaag
361 gaagaggggc aggagactga tcctcctcca ggctctgaag ggtccagctc tgcctacatc
421 gtggtcatct tagagccaga ggatgagcct gagcgcaagc ggaagaaggg gccggccccg
481 aagatgctgg gccatgagct gtgcgcgtg tgcggagaca aggcctcggg cttccactac
541 aacgtgctca gctgtgaagg ctgcaaaggc ttcttcgggc gcagtgtggt ccacgggtgg
601 gccgggcgt atgcctgtcg gggcagcgga acctgccaga tggatgcctt catgcgcgcg
661 aagtgccagc tctgccggct gcgaagtgc aaggaggctg gcagtgcgga gcagtgcgtg
721 ctctctgagg agcagattcg gaagaaaagg attcagaagc agcaacagca gcagccacca
781 ccccatctg agccagcagc cagcagctca ggccggccag cggcctcccc tggcacttcg
841 gaagcaagca gccagggtc cggggaagga gagggcatcc agctgaccgc ggctcaggag
901 ctgatgatcc agcagttagt tgccgcgag ctgcagtgca acaaacgac tttctccgac
961 cagcccaaag tcacgccctg gccctgggt gcagaccctc agtcccgaga tgcctcag
1021 caacgctttg cccacttcac cgagctagcc atcatctcgg tccaggagat tgtggacttt
1081 gccagcagg tgccagggtt cttgcagttg ggccgggagg accagatcgc cctcctgaag
1141 gcgtccacca ttgagatcat gttgctagaa acagccagac gctacaacca cgagacagaa
1201 tgcattcacgt tcctgaagga cttcacctac agcaaggacg acttccaccg tgcaggcttg
1261 caggtggaat tcatcaatcc catcttcgag ttctgcggg ccatgcggcg gctgggctg
1321 gacgatgcag agtatgcctt gcttatcgcc atcaacatct tctcagccga tcggccta
1381 gtgcaggagc ccagccgtgt ggaggccctg cagcagccat acgtggaggc gctcctctcc
1441 tacacgagga tcaagcgccc acaggaccag ctccgcttcc cagcatgct catgaagctg
1501 gtgagcctgc gcaccctcag ctccgtgcac toggagcagg tctttgcatt gcgactccag
1561 gacaagaagc tgccgccctt gctgtccgag atctgggatg tgcacgagta ggggcagcca
1621 caagtgcctc agccttggtg gtgtcttctt gaagatggac tcttcacctc tcctcctggg
1681 gtgggaggac attgtcacgg cccagtcctt cgggctcagc ctcaaactca gcggcagttg
1741 gcactagaag gccccacccc acccattgag tcttccaaga gtggtgaggg tcacaggtcc
1801 tagcctctga ccgttcccag ctgccctccc accacgctt acacctcagc ctaccacacc
1861 atgcaccttg agtggagaga ggttagggca ggtggcccc cagagttggg agaccacagg
1921 cctctctctc tgcccccttt atttaataaa aaaacaaaaa taaa

```

(SEQ ID NO:12)

此外，本发明包括多核苷酸，其是表 8-13 所示的序列的突变体或变体核酸、或其片段，他们的任何碱基可以从所公开的序列变化而来，而且仍然编码维持其 SIRT1 蛋白质-样活性和生理学功能的多肽。SIRT1 突变体或变体多核苷酸编码突变体或变体 SIRT1 或 LXR 多肽，其可以由野生型或参照序列变化从 1 个氨基酸残基到多达 1% 的残基、或变化多达 2%、或多达 5%、或多达 8%、或多达 10%、或多达 15%、或多达 20%、或略微更高的百分比的残基而得到。“核酸”或“多核苷酸”是指一种 DNA、一种 RNA、一种 DNA 或 RNA，其包括一个或多个被修饰的核苷酸或被修饰的戊糖磷酸酯主链结构、一种多肽核酸及其相似构建体，其保留包含在构建体中的碱基序列的编码性质。本发明进一步包括任何编码 SIRT1 或 LXR 序列的核酸序列的补体，包括其片段、衍生物、类似物和同系物。此外，本发明

包括核酸或核酸片段、或其补体，他们的结构包括化学修饰。

也包括核酸片段。核酸片段可以编码 SIRT1 或 LXR 多肽的片段。此外，SIRT1 或 LXR 核酸（nucleic）片段可以被用作杂交探针来识别 SIRT1 或 LXR 蛋白质编码核酸(如 SIRT1 或 LXR mRNA)和片段，所述核酸和片段被用作了 SIRT1 或 LXR 核酸分子扩增或突变的聚合酶链式反应(PCR)的引物。根据本文所使用的，术语“核酸分子”预期包括 DNA 分子(如 cDNA 或基因组 DNA)、RNA 分子(如 mRNA)，使用核苷酸类似物产生的 DNA 或 RNA 类似物、以及其衍生物、片段及同系物。所述核酸分子可以是单链的或双链的，但是优选双链 DNA。

核酸

根据本文所使用的，“核酸”或“多核苷酸”，以及类似术语和词组是指由自然存在的核苷酸组成的多聚体（polymer），以及指由合成的或被修饰的核苷酸组成的多聚体。因此，如本文所用，一种 RNA 多核苷酸、或一种 DNA 多核苷酸、或一种包括脱氧核苷酸和核糖核苷酸的多核苷酸，可以包括自然存在的部分，如自然存在的碱基和核糖或脱氧核糖环；或者他们可以由如下文所述的那些合成的或被修饰的部分组成。本发明所使用的多核苷酸可以是单链的或者它可以是碱基配对双链结构、或甚至三链碱基配对结构。

核酸和多核苷酸可以是长度为 20 或更多的核苷酸、或长度为 30 或更多的核苷酸、或长度为 50 或更多的核苷酸、或长度为 100 或更多、或 1000 或更多、或数万或更多、或数十万或更多。如本文所用，“寡核苷酸”和类似术语是指由自然存在的核苷酸组成的短多聚体，以及指由合成的或被修饰的核苷酸组成的多聚体(如接下来的自然段中描述的)。寡核苷酸可以是长度为 10 或更多的核苷酸、或长度为 15、或 16、或 17、或 18、或 19、或 20 或更多的核苷酸、或长度为 21、或 22、或 23、或 24 或更多的核苷酸、或长度为 25、或 26、或 27、或 28 或 29、或 30 或更多的核苷酸、长度为 35 或更多、40 或更多、45 或更多、多达约 50 个的核苷酸。寡核苷酸可以被化学合成且可以被用作 siRNA、PCR 引物、或探针。

应该明白，由于在后续自然段中提供的长度范围的重叠，本文中术语

“多核苷酸”和“寡核苷酸”可以等同使用。

如本文所用,“核苷酸序列”、“寡核苷酸序列”或“多核苷酸序列”以及类似术语可互换地指寡核苷酸或多核苷酸具有的碱基序列和指拥有该序列的寡核苷酸或多核苷酸结构。核苷酸序列或多核苷酸序列进一步指任何自然的或合成的多核苷酸或寡核苷酸,在所述多核苷酸或寡核苷酸中,通过指定碱基(本领域通常使用的)的字母的特殊序列的描述或叙述而定义碱基序列。

如生物化学、分子生物学、基因组学、以及与本发明领域相关的领域中的技术人员常规理解“核苷”为包括通过糖苷键连接到嘌呤或嘧啶碱基上的单糖;以及“核苷酸”包括含有至少一个附加磷酸酯基的核苷,通常在糖的3'或5'位置(对于戊糖),但也可以在糖的其它位置。在多核苷酸或寡核苷酸中,核苷酸残基占据顺序位置。在多核苷酸或寡核苷酸中,核苷酸的修饰或衍生可以发生在任何顺序位置。所有修饰的或衍生的寡核苷酸和多核苷酸均包含在本发明中并属于权利要求的范围。修饰或衍生可以发生在磷酸酯基、单糖或碱基。

通过非限制性的例子,以下的描述提供了某些修饰的或衍生的核苷酸,其所有均属于本发明多核苷酸的范围。所述单糖可以通过例如成为除核糖或脱氧核糖外的戊糖或己糖来修饰。所述单糖也可以通过用氢或氨基取代羟基,通过烷基化或酯化额外的羟基以及其它来修饰。在2'位的取代基(如2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-丙基、2'-O-烯丙基、2'-O-氨烷基或2'-脱氧-2'-氟基)向寡核苷酸提供了增强的杂交性。

寡核苷酸和多核苷酸中的碱基可以是“未修饰的”或“天然的”碱基,包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、和尿嘧啶(U)。此外,他们可以是具有修饰或取代的碱基。被修饰碱基的非限制例子包括其他合成的和天然的碱基如次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖Q核苷(beta-D-galactosylqueosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺

嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖 Q 核苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟基乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q 核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟基乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-羟基乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w、和 2,6-二氨基嘌呤、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其他烷基衍生物、以及腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物。

核苷酸之间的键通常是 3'-5'磷酸键，其可以为天然的磷酸二酯键、磷酸硫酯(phosphothioester)键、以及其他合成键。含有硫代磷酸主链的寡核苷酸具有加强的核酸酶稳定性。被修饰主链的非限制例子包括，硫代磷酸、手性硫代磷酸、二硫代磷酸、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括 3'-烯化磷酸酯(3'-alkylene phosphonate)、5'-烯化磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯，包括 3'-氨基氨基磷酸酯(3'-amino phosphoramidate)和氨烷基氨基磷酸酯的氨基磷酸酯、硫羰氨基磷酸酯(thionophosphoramidate)、硫羰烷基磷酸酯、硫羰烷基磷酸三酯、硒基磷酸酯和硼烷磷酸酯(boranophosphate)。

包括以上描述中举例的那些的任何修饰可以容易地并入，且包含在本发明多核苷酸的范围中。如本领域技术人员所知，任何被修饰的核苷酸的用途和具有同样碱基配对性质的天然出现的核苷酸的用途是相当的。如本发明所公开的和要求的，所有相当的被修饰核苷酸均落在本发明的范围之内。

“分离的”核酸分子是与存在于核酸自然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。分离的核酸分子的例子包括但不限于：包含于载体中的重组 DNA 分子、维持于异种宿主细胞中的重组 DNA 分子、部分或充分纯化的核酸分子、以及合成 DNA 或 RNA 分子。

使用标准分子生物学技术以及本文提供的序列信息可以分离本文公开的核酸分子(如含有表 8-13 的核苷酸序列的核酸分子或其补体)。使用全

部或部分表 8-13 的核酸序列作为杂交探针,使用标准杂交和克隆技术可以分离 SIRT1 或 LXR 核酸序列(如描述于 Sambrook 等编辑, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed. (分子克隆: 实验室手册第 2 版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 以及 Ausubel 等编辑, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (最新分子生物学实验方法汇编), John Wiley & Sons, New York, NY, 1993)。

根据标准 PCR 扩增技术,使用 cDNA、mRNA 或可选地基因组 DNA 作为模板和合适的寡核苷酸引物可以扩增本发明所公开的核酸。如此扩增的核酸可以被克隆到合适的载体并且由 DNA 序列分析而表征。此外,相应于 SIRT1 或 LXR 核苷酸序列的寡核苷酸可以通过标准合成技术(如使用 DNA 自动合成仪)制备。

多核苷酸的合成

通过标准合成技术(如使用 DNA 自动合成仪)可以制备寡核苷酸和多核苷酸。合成寡核苷酸的方法包括众所周知的化学过程,包括且不限于:对表面衍生粒子的核苷酸亚磷酰胺依序加入,如由 T. Brown 和 Dorcas J. S. Brown 描述于 Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach(寡核苷酸及类似物的一种实践方法), F. Eckstein 编辑, Oxford University Press, Oxford, pp. 1-24(1991), 在此通过引用并入。

合成程序的一个例子使用加速 RNA 亚磷酰胺 (Expedite RNA phosphoramidites) 和胸腺嘧啶亚磷酰胺(Proligo, Germany)。合成寡核苷酸被脱保护和凝胶纯化(Elbashir 等(2001) Genes & Dev. 15, 188-200), 接着 Sep-Pak C18 柱体(Waters, Milford, Mass., USA)纯化(Tuschl 等(1993) Biochemistry, 32: 11658-11668)。互补 ssRNA 在复性缓冲液(100 mM 乙酸钾, 30 mM pH4.2 的 HEPES-KOH, 2 mM 乙酸镁)中 90℃孵育 1 分钟接着 37℃孵育 1 小时以杂交成相应的 ds-多核苷酸。

寡核苷酸合成的其他方法包括且不限于: 根据磷酸三酯和磷酸二酯方法的固相寡核苷酸合成(Narang 等, (1979) Meth. Enzymol. 68:90)、以及 H-磷酸酯方法(Garegg, P. J.等, (1985)“Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates(经磷酸酯中间体的核苷酸间键合的形成)”, Chem.

Scripta. 25, 280-282; 以及 Froehler, B. C.等, (1986a)“Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates(经脱氧核苷 H-磷酸酯中间体的 DNA 合成)”, Nucleic Acid Res. 14, 5399-5407, 以及其他)和在支持体 (support) 上的合成(Beaucage 等(1981) Tetrahedron Letters 22: 1859-1862) 以及氨基磷酸酯技术(Caruthers, M. H.等“Methods in Enzymology(酶学中的方法)”, Vol. 154, pp. 287-314 (1988), 美国专利 5,153,319、5,132,418、4,500,707、4,458,066、4,973,679、4,668,777 和 4,415,732 以及其他描述于 “Synthesis and Applications of DNA and RNA(DNA 和 RNA 的合成和应用)”, S. A. Narang 编辑, Academic Press, New York, 1987, 以及其中包含的参考文献, 和非亚磷酰胺技术。固相合成帮助从杂质和过多的试剂中分离出寡核苷酸。一旦从固相支持体分开, 寡核苷酸可以进一步通过已知技术分离。

载体

本发明提供了多种载体, 其包括一种或多种本发明的多核苷酸。有益地, 本发明公开的任何载体包括可操作地连接到核苷酸序列的启动子、增强子或两者。

本发明公开的制备载体的方法被分子生物学、细胞生物学、肿瘤学领域、以及医学相关领域、和其他与本发明相关的领域所广泛熟知。通过非限定性的例子, 有效制备载体的方法在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition)(分子克隆: 实验室手册(第三版))(Sambrook, J 等(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)和 Short protocols in molecular biology(5th Ed.)(精编分子生物学实验指南(第五版))(Ausubel FM 等(2002) John Wiley & Sons, New York City)中描述。

抗体

如本文所用, 术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分, 即包含特异性地结合(免疫反应)一种抗原的抗原结合位点的分子。这种抗体包括且不限于多克隆的、单克隆的、嵌合的、单链、F_{ab}、F_{ab}' 以及 F_{(ab')₂} 片段, 以及 F_{ab} 表达文库。通常, 源于人类的抗体分子是指 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD 类中的任何一个, 根据其分子中存在重链的

属性,其彼此不同。某些类也具有亚类,如 IgG₁ 和 IgG₂,以及其他。此外,在人类中,轻链可以是 κ 链或 λ 链。这里涉及到的抗体包括涉及到的所有这种类、亚类以及人抗体种类的类型。本文公开的任何抗体“免疫特异性地”结合到其相关抗原。免疫特异性结合是指用特定的免疫原攻击宿主产生的抗体以高亲和力结合到包含免疫原部分的分子如抗原,以及仅以弱亲和力或根本没有亲和力的连接到非免疫原包含分子。如在这个定义中所使用的,高亲和力是指具有解离常数低于约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$,以及弱亲和力是指具有解离常数高于约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 。

意为作为一种抗原的本发明的一种分离的蛋白质,或包含这种蛋白质的复合体、或其部分或片段,可以被用作免疫原通过使用多克隆和单克隆抗体制备的标准技术去产生抗体,所述抗体免疫特异性地结合抗原。可以使用全长的蛋白质,或者代替地,本发明提供了抗原的抗原性肽片段作为免疫原使用。抗原性肽片段包括全长蛋白质氨基酸序列的至少 6 个氨基酸残基,如表 2-7 所示的氨基酸序列,以及包括其表位以致所产生的针对所述肽的抗体与全长蛋白质或与包含这种表位的任何片段形成特异性免疫复合体。优选地,所述抗原性肽包括至少 10 个氨基酸残基、或至少 15 个氨基酸残基、或至少 20 个氨基酸残基、或至少 30 个氨基酸残基。被抗原性肽包含的优选的表位是位于蛋白质表面的蛋白质的区域;通常它们是亲水区。

在本发明的某些实施方案中,至少一个被抗原性肽包含的表位是 SIRT1 或 LXR 蛋白质的一个区,其位于蛋白质的表面,如亲水区。人 SIRT1 或 LXR 蛋白质序列的疏水性分析将表明成长促进多肽的哪个区是特别亲水的以及,因此,可能编码对靶向抗体生产有用的表面残基。作为一种靶向抗体生产的方法,表明亲水性区和疏水性区的亲水性图可以通过本领域任何熟知的方法制作,包括例如 Kyte Doolittle 或 Hopp Woods 方法,有或没有傅里叶变换。见,例如 Hopp 和 Woods, 1981, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78: 3824-3828; Kyte 和 Doolittle 1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105- 142, 其全部内容通过引用并入本文。本文也提供了抗体,其对抗原性蛋白质中的一个或多个结构域,或其衍生物、片段、类似物或同系物具有特异性。

本发明的蛋白质，或其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物在抗体的产生中可以被用作免疫原，所述抗体免疫特异性地结合这些蛋白质组分。

本领域内多种已知程序可以被用于针对本发明的蛋白质，或针对其衍生物、片段、类似物、同系物或直系同源物的多克隆或单克隆抗体的制备(见，例如，Antibodies: A Laboratory Manual(抗体：实验室手册)，Harlow E 和 Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 通过引用并入本文)。这些抗体中的一些在下面讨论。

多克隆抗体

为了生产多克隆抗体，多种合适的宿主动物(如兔、山羊、鼠或其他哺乳动物)可以通过一次或多次注射天然蛋白质、其合成变体或上述的衍生物被免疫。合适的免疫原性配制品可以包括，例如，天然存在的免疫原性蛋白质、代表免疫原性蛋白质的化学合成的多肽、或重组表达的免疫原性蛋白质。此外，所述蛋白质可以被接合到第二蛋白质上，所述第二蛋白质已知在被免疫的哺乳动物中具有免疫原性。这种免疫原性蛋白质的例子包括且不限于钥孔戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、以及大豆胰蛋白酶抑制物。所述配制品可以进一步包含佐剂。

针对免疫原性蛋白质的多克隆抗体分子可以从哺乳动物分离(如从血液)并通过熟知的技术进一步纯化，如使用蛋白质 A 或蛋白质 G 的亲色谱，或在抗原柱上。免疫球蛋白的纯化被例如，D. Wilkinson 讨论(The Scientist, 由 The Scientist, Inc. 出版, Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28)。

单克隆抗体

单克隆抗体可以通过使用杂交瘤方法制备，如由 Kohler 和 Milstein 在 Nature, 256:495(1975)中描述的那些。在杂交瘤方法中，鼠、仓鼠、或其他合适的宿主动物被通常地用免疫剂免疫以诱发淋巴细胞，其产生或能够产生抗体，所述抗体特异性地结合免疫剂。替代地，淋巴细胞可以在体外免疫。

免疫剂将通常包括蛋白质抗原、其片段或其融合蛋白。然后，通过使用合适的融合剂如聚乙二醇，淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice(单克隆抗体：原理与实践), Academic Press (1986) pp. 59-103]。

然后可以测定培养基中针对抗原的单克隆抗体的存在，在所述培养基中杂交瘤细胞被培养。在期望的杂交瘤细胞被鉴定后，克隆可以通过有限稀释程序被亚克隆，并通过标准方法培养(Goding, 1986)。为这一目的，合适的培养基包括，例如，Dulbecco 改良的 Eagle 培养基以及 RPMI-1640 培养基。替代地，杂交瘤细胞可以作为哺乳动物的腹水在体内培养。

由亚克隆分泌的单克隆抗体可以从培养基或腹水中通过传统的免疫球蛋白纯化程序(如，例如，蛋白质 A 琼脂糖凝胶、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析、或亲和色谱)分离或纯化。

重组载体和宿主细胞

本发明的某些方面公开了促进 ABCA1 介导的从哺乳动物细胞中胆固醇流出的方法，其包括将一种核酸引入细胞，所述核酸包括编码蛋白质脱乙酰酶的序列。所述哺乳动物细胞可以是人细胞。不同地，蛋白质脱乙酰酶可以是真核 Sir2 蛋白质，或哺乳动物 SIRT1 蛋白质。用期望的核酸序列转染哺乳动物细胞的技术被本发明领域技术人员广泛知晓。以下详细描述了这种方法的一些非限制性例子。

本发明公开的一个方面是关于载体，优选地表达载体，其包括编码蛋白质、或其衍生物、片段、类似物或同系物的核酸。如本文所用，术语“载体”是指一种能够将已经被其连接的另一种核酸运输的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”，其是指一种环状双链 DNA 环，额外的 DNA 区段可以被连接于其中。载体的另一类型是病毒载体，其中额外的 DNA 区段可以被连接到病毒基因组。某些载体可以在引入它们的宿主细胞中自主复制(如，具有细菌复制起始位点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。当引入宿主细胞时，其他的载体(如，非游离型哺乳动物载体)被整合到宿主细胞的基因组，并且因此跟随宿主基因组复制。而且，一些载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。这种载体此处称为“表达载体”。通常，在重组 DNA

技术中应用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中，由于质粒是最普通的载体使用形式，“质粒”和“载体”可以互换使用。然而，本发明意为包括表达载体的这种其他形式，如病毒载体(如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒、以及腺伴随病毒)，其以相当的功能工作。

本发明公开的重组表达载体包括以适合在宿主细胞中核酸表达的形式出现的本发明公开的核酸，其表示重组表达载体包括一个或多个在将被用于表达的宿主细胞的基础上选择的调节序列，其可操作地连接到待表达的核酸序列上。在重组表达载体中，“可操作地连接”意为关注的核苷酸序列以允许核苷酸序列表达的方式被连接到调节序列(如，在体外转录/翻译系统或当载体被引入宿主细胞时在宿主细胞中)。术语“调节序列”意为包括启动子、增强子和其他表达控制元件(如加 A 信号)。这种调节序列在，例如，Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY (基因表达技术：酶学方法) 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990) 中描述。调节序列包括在多种类型宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的那些以及只在特定的宿主细胞中指导核苷酸序列表达的那些(如组织特异性调节序列)。本领域技术人员将理解表达载体的设计可以依靠这种因素如待转化的宿主细胞的选择，期望蛋白质的表达水平等。本发明公开的表达载体可以被引入宿主细胞，因而产生蛋白质或肽，包括融合蛋白或肽，所述蛋白质或肽由本文所述的核酸编码(如 SIRT1 或 LXR 蛋白质、SIRT1 或 LXR 蛋白质的突变体形式、融合蛋白等)。

本发明公开的重组表达载体可以被设计用于原核细胞或真核细胞中 SIRT1 或 LXR 蛋白质的表达。例如，所述 SIRT1 或 LXR 蛋白质可以在细菌细胞如大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞、昆虫细胞(使用杆状病毒表达载体) 酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。合适的宿主细胞在 Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY(基因表达技术：酶学方法) 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990) 中进一步讨论。替代地，重组表达载体可以在体外被转录和翻译，例如使用 T7 启动子调节序列和 T7 聚合酶。

在原核生物中蛋白质的表达最通常是在含有载体的大肠杆菌中被执

行的, 所述载体包含指导融合蛋白或非融合蛋白表达的组成型或诱导型启动子。融合载体将许多氨基酸加到在其中编码的蛋白质上, 通常是加到重组蛋白的氨基末端。这种融合载体通常有三个目的: (1)增加重组蛋白的表达; (2)增加重组蛋白的溶解度; 以及(3)通过作为亲和纯化中的配体帮助重组蛋白纯化。典型的融合表达载体包括 pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith 和 Johnson (1988) *Gene* 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.)以及 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), 其分别地将谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、麦芽糖 E 结合蛋白或蛋白质 A 融合到靶重组蛋白。

合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的例子包括 pTrc (Amrann 等, (1988) *Gene* 69:301-315)以及 pET11d (Studier 等, *GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY*(基因表达技术: 酶学方法) 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990) 60-89)。

在另一实施方案中, 本发明公开的蛋白质通过使用酵母表达载体被表达。用于在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中表达的载体的例子包括 pYepSec1 (Baldari 等, (1987) *EMBO J* 6:229-234)、pMFa (Kurjan 和 Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultz 等, (1987) *Gene* 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)以及 picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)。

替换地, 公开于本发明复合体的蛋白质可以通过使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中被表达。在培养的昆虫细胞(如 SF9 细胞)中蛋白质表达的可行杆状病毒载体包括 pAc 系(Smith 等(1983) *Mol Cell Biol* 3:2156-2165)以及 pVL 系 (Lucklow 和 Summers (1989) *Virology* 170:31-39)。

在又一实施方案中, 本发明公开的核酸通过使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中被表达。哺乳动物表达载体的例子包括 pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329:840)以及 pMT2PC (Kaufman 等(1987) *EMBO J* 6: 187-195)。当在哺乳动物细胞中使用时, 通常由病毒调节元件提供表达载体控制功能。例如, 通常使用的启动子源于多瘤、腺病毒 2、巨细胞病毒以及猿猴病毒 40。原核细胞和真核细胞的其它适合表达系统见, 例如, Sambrook 等, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd ed. (分

子克隆：实验室手册第2版), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 的 16 和 17 章。

在另一实施方案中, 所述重组哺乳动物表达载体可以优先地在特定的细胞类型中指导核酸的表达(如组织特异性调节元件被用于表达核酸)。本领域已知组织特异性调节元件。适当组织特异性启动子的非限制性例子包括白蛋白启动子(肝特异性; Pinkert 等(1987) *Genes Dev* 1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame 和 Eaton (1988) *Adv Immunol* 43:235-275)、特别是 T 细胞受体启动子 (Winoto 和 Baltimore (1989) *EMBO J* 8:729-733) 和免疫球蛋白启动子(Banerji 等(1983) *Cell* 33:729-740; Queen 和 Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748)、神经元特异性启动子(如神经丝启动子; Byrne 和 Ruddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477)、胰特异性启动子 (Edlund 等 (1985) *Science* 230:912-916)、以及乳腺特异性启动子(如乳清启动子; 美国专利第 4,873,316 号和欧洲申请公开第 264,166 号)。也包括发育调节启动子, 如鼠同源盒 (hox) 启动子(Kessel 和 Gruss (1990) *Science* 249:374-379) 以及甲胎蛋白启动子(Campes 和 Tilghman (1989) *Genes Dev* 3:537-546)。

本发明公开的另一个方面是关于已经引入本发明公开的重组表达载体的宿主细胞。在本文中, 术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”互换使用。应该明白, 这些术语不但指专门的对象细胞, 而且指这种细胞的后代或潜在后代。由于突变或环境影响, 某些修饰可以出现在下一代, 事实上, 这种后代与母细胞可以是不一样的, 但是仍然包含在本文所使用的术语的范围中。

宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如, SIRT1 或 LXR 蛋白质可以在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或 COS 细胞)中表达。其他合适的宿主细胞为本领域技术人员所知。

载体 DNA 经传统转化或转染技术可以被引入原核或真核细胞。如本文所用, 术语“转化”和“转染”意指用于将外来核酸(如 DNA)引入宿主细胞的领域所知的多种技术, 包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE 葡聚糖介导转染、脂转染、或电穿孔。合适的转化或转染宿主细胞的方法可以在

Sambrook 等(2001), Ausubel 等(2002), 以及其他实验室手册中找到。

为了哺乳动物细胞的稳定转染, 已知依靠使用的表达载体和转染技术, 只有小部分细胞可以将外来 DNA 整合到它们的基因组上。为了识别和选择这些整合子, 一种编码可选择标记(如, 对抗生素的抗性)的基因通常和关注的基因一同被引入宿主细胞。各种可选择标记包括使其具有针对药物(如 G418、潮霉素、氨甲喋呤)的抗性的那些。编码可选择标记的核酸可以与编码生长促进剂的核酸在同一载体上被引入宿主细胞, 或可以通过单独的载体引入。用引入的核酸稳定转染的细胞可以通过药物选择来识别(如, 具有并入的可选择标记基因的细胞将会生存, 而其他细胞死亡)。

本发明的宿主细胞, 如培养的原核或真核宿主细胞, 可以被用于生产(即表达)所述 SIRT1 或 LXR 蛋白质。因此, 本发明进一步提供了用本发明的宿主细胞生产 SIRT1 或 LXR 蛋白质的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞(编码 SIRT1 或 LXR 蛋白质的重组表达载体被引入所述宿主细胞中)以致生产 SIRT1 或 LXR 蛋白质。在另一实施方案中, 本方法进一步包括从培养基或宿主细胞中分离 SIRT1 或 LXR 蛋白质。

通过使用重组载体, 可以进一步完成脊椎动物细胞的转染, 除了将 DNA 引入细胞的其他粒子(如脂质体)外, 所述载体包括且不限于腺病毒、腺伴随病毒、以及逆转录病毒载体。如以上描述的那些技术可以被应用于编码任何 SIRT1 或 LXR 多肽的核苷酸序列向脊椎动物细胞的引入。例如, 为了哺乳动物细胞的转染, 可以应用许多病毒为基础的表达系统。在腺病毒被用作表达载体的例子中, 关注的 SIRT1 或 LXR 核苷酸序列可以被连接到腺病毒转录/翻译控制复合体上, 如晚期启动子和三联前导序列。然后, 这一嵌合基因通过体内或体外重组可以被插入到腺病毒基因组。在病毒基因组的非必需区(如区 E1 或 E3)插入将导致重组病毒存活且能够在感染的宿主中表达 SIRT1 或 LXR 产物(如见 Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659)。在只有部分的 SIRT1 或 LXR 编码序列被插入的例子中, 必须提供外源翻译控制信号, 包括可能的 ATG 起始密码子。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的和合成的各种来源。表

达的效率可以通过包含合适的转录增强子元件、转录终止子等来增强(见 Bitter 等, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544)。

治疗处理

某些病状和医学病症被认为对在受治疗者细胞中异源 SIRT1 或 LXR 或异源 LXR α 或 LXR β 的表达具有很好的响应。因此, 本发明公开了一种在受治疗者中治疗病状、疾病或医学病症的方法, 其中所述病状对 SIRT1 或 LXR、LXR α 或 LXR β 多肽有响应。所述方法包括以有效减弱或改善病状的量向受治疗者施用编码 SIRT1 或 LXR、LXR α 或 LXR β 多肽的核酸。减弱病状是指恶化症状学的趋势被减弱到缓慢或更加温和趋势的恶化。改善病状是指在患者中实际的改善, 以致病状的信号和指征减弱, 以及患者向更加健康改善。在本方法的重要执行中, 病状选自心肌梗塞、脑血管病发作(cerebrovascular stroke)、肾脏疾病、神经系统疾病包括阿尔茨海默病、以及类似疾病。在治疗一种病状的方法的有利实施方案中, 所述受治疗者是人。

在本文所述治疗方法的各种实施方案中, 编码 SIRT1 或 LXR、LXR α 或 LXR β 多肽、其变体、或其片段的核酸可以以各种组合物中的任何一种被施用于受治疗者, 所述组合物保证核酸序列向细胞的有效传递, 包括向受治疗者细胞的传递。

用 SIRT1 或 LXR 核酸序列治疗受治疗者可以通过以下完成: 施用有效地将 SIRT1 或 LXR 核酸序列引入脊椎动物细胞的合适的核酸、质粒、载体、病毒载体、脂质体或相似组合物。使用阳离子两亲分子可以帮助核酸转染(美国专利 6,503,945 和其公开的文献)。间接体内(ex vivo)逆转录病毒基因疗法由, 例如, Hacein-Bey-Abina 等描述(2003, Science 302:415-419)。用于转基因向受治疗者的治疗引入的方法在“Gene Transfer Methods: Introducing DNA Into Living Cells and Organisms(基因转移方法: 向活细胞和有机体引入 DNA)”P.A. Norton 以及 L.F. Steel, Eaton Publishing, 2000 中描述。转基因向细胞和有机体治疗引入的手段在“Gene Therapy Protocols(基因治疗规程)”Paul D. Robbins (Ed.), Humana Press(1997)中提供。

包含多核苷酸的药物组合物

用于治疗应用的药物组合物包括一种或多种多核苷酸和载体。包含一种或多种多核苷酸的药物组合物对治疗与靶基因表达或活性相关的疾病或病症是有效的。载体包括且不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇、以及其组合。对于口服施用的药物，药学可接受载体包括且不限于，药学可接受赋性剂如惰性稀释剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、甜化剂、调味剂、着色剂以及防腐剂。

5 mg 多核苷酸每千克接受者体重每天的最大剂量足以抑制或完全地压制靶基因的表达。通常，多核苷酸的合适剂量将在 0.01 到 5.0 毫克每千克接受者体重每天的范围内，优选在 0.1 至 200 微克每千克体重(mcg/kg)每天的范围内、更优选在 0.1 至 100 mcg/kg 每天的范围内、甚至更优选 1.0 至 50 mcg/kg 每天的范围内、以及最优选 1.0 至 25 mcg/kg 每天的范围内。药物组合物可以以每天一次施用，或所述多核苷酸可以以合适的间隔以全天二、三、四、五、六次或更多的亚剂量施用。在这种情况下，每个亚剂量所包含的多核苷酸必须相应地变小以确保完成当天的总剂量。所述剂量单位也可以被制成持续释放制剂以传递数天，例如，使用传统制剂，其可以在数天的周期中提供多核苷酸的持续释放。持续释放制剂在本领域中被熟知。在这一实施方案中，剂量单位包括日用剂量的相应倍数。

本领域技术人员将理解某些因素可以影响有效治疗受治疗者需要的剂量和时间安排，包括且不限于疾病或病症的严重性、此前处理、受治疗者的整体健康和/或年龄、以及出现的其他疾病。此外，用有效治疗量的组合物治疗受治疗者可以包括单一治疗或一系列治疗。本发明包含的单个多核苷酸的有效剂量和体内半衰期的评估可以通过使用传统方法学或依靠使用合适动物模型的体内测试来进行，且可以在治疗期间根据建立的标准调整以确定合适的剂量响应特性。

本发明包括的药物组合物可以通过本领域所知的任何方法施用，包括且不限于口服或肠胃外途径，包括静脉内的、肌内的、腹膜内的、皮下的、经皮的、气道的(气溶胶)、直肠的、阴道的以及局部的(包括颊的和舌下的)施用。在某些实施方案中，通过静脉内的或肠胃内的(intraparenteral)输注

或注射施用所述药物组合物，以及在额外普通的实施方案中，通过使用腹腔镜的或相似显微外科程序直接可以将包含多核苷酸的药物组合物直接从原位传递到肿瘤、癌症或癌症前期生长物。

对于肌内的、腹膜内的、皮下的和静脉内的用途，本发明的药物组合物将一般以无菌水溶液或悬浮液提供，所述无菌水溶液或悬浮液被缓冲到适当的 pH 和等渗性。合适的水性运载体包括林格溶液以及等渗氯化钠。在一个优选实施方案中，载体专有地由含水缓冲液组成。在这一内容中，“专有地”是指不存在助剂或包封物质（encapsulating substance），所述助剂或包封物质可以影响或介导表达靶基因的细胞中多核苷酸的摄取。这种物质包括，例如，胶束结构，如脂质体或壳体，其在下文描述。令人惊讶地，本发明人已经公开了仅包含裸(naked)多核苷酸和生理学可接受溶剂的组合物被细胞摄取，在所述细胞中多核苷酸有效地抑制了靶基因的表达。尽管需要显微注射、脂转染、病毒、类病毒、壳体或类壳体(capsoid)、或其他助剂将多核苷酸引入细胞培养物，但是令人惊讶地这些方法和试剂对体内多核苷酸的摄取不是必须的。根据本发明的含水悬浮液可以包括悬浮剂如纤维素衍生物、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮和黄蓍树胶、以及润湿剂如卵磷脂。含水悬浮液的合适的防腐剂包括对羟基苯甲酸乙酯以及对羟基苯甲酸丙酯。

依据本发明有效的药物组合物也包括被囊制剂（encapsulated formulation），其保护所述多核苷酸免于从体内迅速消除，例如控释制剂，包括埋植剂（implant）和微胶囊化传递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合体（polymer），如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、以及聚乳酸。这些制剂的制备方法对于本领域技术人员是明显的。所述材料也可以通过商业途径从 Alza 公司和 Nova Pharmaceuticals, Inc 处获得。脂质体悬浮液(包括靶向用针对病毒抗原的单克隆抗体感染的细胞的脂质体)也可以被用作药学可接受载体。这些可以根据本领域技术人员所知的方法制备，例如，如描述于美国专利第 4,522,811 号；PCT 公开 WO 91/06309；以及欧洲专利公开 EP-A-43075 中的，其通过引用并入本文。

在某些实施方案中，被囊制剂包括病毒衣壳蛋白质。在这一实施方案

中,所述多核苷酸可以被结合到、伴随着至少一种病毒衣壳蛋白质、或被至少一种病毒衣壳蛋白质包围。所述病毒衣壳蛋白质可以源于或伴随着一种病毒,如多瘤病毒,或其可以是部分或全部人造的。例如,衣壳蛋白质可以是多瘤病毒的病毒蛋白 1 和/或病毒蛋白 2,或其衍生物。

这些化合物的毒性和治疗有效性可以通过在细胞培养或实验动物中的标准药物规程确定,如确定 LD50(总数 50%的致死剂量)以及 ED50(对总数的 50%治疗有效的剂量)。毒性和治疗效应之间的剂量比是治疗指数且其可以被表达为 LD50/ ED50 比。优选表现出高治疗指数的化合物。

从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可以被用于制定用于人的剂量范围。本发明组合物的剂量优选位于包含 ED50 的循环浓度的范围,其带有很少或没有毒性。剂量可以根据使用的剂量形式和应用的施用路线在这一范围内变化。对于在本发明的方法中使用的任何化合物,最初可从细胞培养测定和动物模型获得包括在细胞培养中确定的 IC50(即,完成症状半数最大抑制的测试化合物的浓度)的化合物循环血浆浓度范围来估算治疗有效剂量。这些信息可以被用于更加准确地确定对人的有效剂量。

除了如上所述的它们的单独或多元化施用外,依据本发明的有效多核苷酸可以与疾病治疗中有效的其他已知试剂组合施用。在任何情况下,主管医生可以根据使用本领域所知的或本文所述的效力标准测量观察的结果调整多核苷酸施用的量和时间安排。

药物组合物

本发明公开的多核苷酸这里被指定为“活性化合物”或“治疗物(therapeutics)”。这些治疗物可以被并入适合于向受治疗者施用的药物组合物。

本发明包括通过施用一种刺激 SIRT1 活性的试剂增加哺乳动物血浆中结合到高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比的方法;以及刺激 SIRT1 活性的试剂在药物制备中的用途(se),所述药物用于增加哺乳动物血浆中结合到高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比,其通过向哺乳动物施用这种试剂实现。这种试剂在这里被指定为“活性化合物”或“治疗

物”。这种试剂的一个例子是 T0901317。这些治疗物可以被并入适合于向受治疗者施用的药物组合物。

本发明也包括通过施用一种促进包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质复合体形成的试剂增加哺乳动物血浆中结合到高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比的方法。此外本发明公开了促进包含哺乳动物 SIRT1 蛋白质和哺乳动物 LXR 蛋白质复合体形成的试剂在药物制备中的用途,所述药物用于增加哺乳动物血浆中结合到高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比,其通过向哺乳动物施用这种试剂实现。这种试剂在这里被指定为“活性化合物”或“治疗物”。这种试剂的例子包括 22(R)-羟基胆固醇、或 9-顺式视黄酸、或 22(R)-羟基胆固醇和 9-顺式视黄酸的组合。这些治疗物可以被并入适合于向受治疗者施用的药物组合物。

如本文所用,“药学可接受载体”意为包括与药物施用相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂、以及类似物。合适的载体在教科书(如 Remington's Pharmaceutical Sciences(雷氏药物科学), Gennaro AR (Ed.) 第 20 版编辑(2000) Williams & Wilkins PA, USA, 以及 Wilson 和 Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry(有机药学及药物化学教材), 由 Delgado 和 Remers, Lippincott-Raven 编写)中描述,其通过引用并入本文。可以在这种载体或稀释剂中使用的组分的优选例子包括且不限于水、盐水、磷酸盐、羧酸盐、氨基酸溶液、林格溶液、葡萄糖(dextrose)(葡萄糖(glucose)的同义词)溶液、以及 5%人血清白蛋白。通过非限制性例子,葡萄糖可以以 5%或 10%水溶液使用。脂质体和非水性运载体如不挥发油也可以被使用。药物活性物质的这种介质和试剂的应用在本领域中被熟知。补充的活性化合物也可以被并入组合物。

本发明药物组合物的配制与其期望施用路线相容。施用路线的例子包括肠胃外的,如静脉内的、皮内的、皮下的、口服的、鼻的、吸入、经皮的(局部的)、经粘膜的(transmucosal)、以及直肠施用。用于肠胃外的、静脉内的、皮内的或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下组分: 无菌稀释剂如注射用水、盐溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成

溶剂；抗菌剂如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及渗透性调节剂如氯化钠或葡萄糖。

对于通过吸入施用，所述化合物从加压容器或分配器或喷雾器中以气溶胶喷雾的形式传递，所述加压容器或分配器包含合适的推进剂如一种气体如二氧化碳。

在一个实施方案中，活性化合物与载体一起制备，载体将保护所述化合物免于从体内迅速消除，例如控释制剂，包括埋植剂和微胶囊化传递系统。持续释放配制品的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合体半透性基质，所述基质是成型制品(shaped articles)的形式，如膜、或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如，聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯)、或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第 3,773,919 号)、左旋谷氨酸和 γ 乙基左旋谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT[™] (乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)、以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。而聚合体如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够使分子的释放超过 100 天，某些水凝胶以较短的时间周期释放药物活性剂。有利的聚合体是生物可降解的或生物相容的。脂质体悬浮液(包括靶向用针对病毒抗原的单克隆抗体感染的细胞的脂质体)也可以被用作药学可接受载体。这些可以根据本领域技术人员所知的方法制备，例如，如描述于美国专利第 4,522,811 号中的。持续释放配制品的有利形式如微球，可以由材料(如上文所述的那些)制备。

本发明公开的多核苷酸可以被插入到载体且被用作基因治疗载体。可通过许多途径(如美国专利第 5,703,055 号中描述的)中的任何一条将基因治疗载体传递到受治疗者。因此，传递也可以包括，如静脉内注射、局部施用(见美国专利第 5,328,470 号)或立体定位注射(见如 Chen 等(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057)。基因治疗载体的药物配制品可以包括在可接受稀释剂中的基因治疗载体，或可以包括缓释基质，基因传递运载体被嵌入在其中。替换地，在完整基因传递载体从重组细胞，如逆转录病毒载体中完整产生的情况，药物配制品可以包括一种或多种产生基因传递

系统的细胞。

药物组合物可以包含在一种试剂盒中，如在具有施用说明书的容器、包或分配器中。

同样在本发明中的是治疗物在药物组合物或药物的制备中的用途，所述药物组合物或药物用于治疗受治疗者呼吸道感染。

在若干实施方案中，本发明公开的多核苷酸通过脂质体介导的转染传递，例如通过使用可以购买的试剂或技术，如 OligofectamineTM、LipofectAmineTM 试剂、LipofectAmine 2000TM(Invitrogen)、也通过电穿孔、和相似技术。此外，多核苷酸通过吸入和滴注到呼吸道被传递到动物模型，如啮齿类或非人灵长类。使用动物模型的额外途径包括静脉内的(IV)、皮下的(SC)，以及相关的施用途径。药物组合物包括额外组分，其保护多核苷酸的稳定性、延长其寿命、增强其功能、或将它们靶向到特定组织/细胞。这些包括多种生物可降解聚合体、阳离子聚合体(如聚乙烯亚胺)、阳离子共聚肽(copolypeptides)如组氨酸-赖氨酸(HK)多肽(见，例如 Mixson 等的 PCT 公开 WO 01/47496, Biomerieux 的 WO 02/096941, 以及 Massachusetts Institute of Technology (麻省理工学院)的 WO 99/42091)、聚乙二醇化(PEGylated)阳离子多肽、以及配体并入的聚合体等、带正电的多肽、PolyTran 聚合体(天然多糖，被称为硬葡聚糖 (scleroglucan); Pillsbury Co., Minneapolis, Minn)、表面活性剂(Infasurf; Forest Laboratories, Inc.; ONY Inc.)、以及阳离子聚合体(如聚乙烯亚胺)。Infasurf® (calfactant)是一种从牛肺中分离的用于气管内滴注的天然肺表面活性剂；其包括磷脂、中性脂质、以及疏水性表面活性剂相关的蛋白质 B 和 C。所述聚合体可以是单维的或多维的，并且也可以是直径小于 20 微米、在 20 和 100 微米之间、或大于 100 微米的微粒或纳米颗粒。所述聚合体可以运送特定组织或细胞的受体或分子的特异性配体分子，因此被用于多核苷酸的靶向传递。所述多核苷酸也可以通过以阳离子脂质体为基础的载体(如 DOTAP、DOTAP/胆固醇(Qbiogene, Inc.)以及其他类型的脂质水溶液)传递。此外，低百分比(5-10%)葡萄糖水溶液，以及 Infasurf 是多核苷酸气道传递的有效载体。

基因治疗

当前基因治疗处在用于治疗 and 预防（如免疫）背景的开发的高状态。新的传递方法是可行的，而且各种基因治疗模式的若干项临床试验正在进行。美国专利申请公开 20060115462 题为“Direct DNA delivery to bone cells (DNA 直接向骨细胞传递)”，其公开了一种方法，该方法能使多核苷酸例如裸多核苷酸或基因表达载体在体内向哺乳动物骨肢（bone limb）细胞传递。

美国专利申请公开 20060115456 题为“Replication-competent adenoviral vectors(复制型腺病毒载体)”，其公开了改进的复制型腺病毒载体，包括腺病毒型 2、4、5 和 7，用于治疗 and 预防应用的核酸和多核苷酸的传递。

美国专利申请公开 20060104950 题为“Methods of Transducing genes into T cells(将基因转导入 T 细胞的方法)”，其公开了通过使用副黏病毒载体将基因向活化 T 细胞的转导。

美国专利申请公开 20060110361 题为“Methods of making viral particles having a modified cell binding activity and uses thereof(制备具有改进的细胞结合活性的病毒颗粒的方法及其应用)”，其公开了包装病毒颗粒以致制品表面上的一个或多个肽源于包装细胞的方法。该申请阐明了这种系统在例如基因治疗处理中的用途。

美国专利申请公开 20060110364 题为“Vector-mediated delivery of polynucleotides encoding soluble VEGF receptors(编码可溶 VEGF 受体的多核苷酸的载体介导的传递)”，其公开了用于表达 VEGFR3 可溶形式的载体组合物以及它们在癌症治疗中使用的方法。

美国专利申请公开 20050239204 题为“Multifunctional molecular complexes for gene transfer to cells(为了基因向细胞转移的多功能分子复合体)”，其公开了为了核酸组合物向靶细胞转移的非病毒多功能分子复合体。

VandenDriessche 等表明血友病 A 可以通过一种体内基因疗法有效治疗，所述基因疗法通过逆转录病毒载体将人因子 VIII 基因引入因子 VIII 缺陷型小鼠⁷⁹。基因转移至少发生在肝、脾和肺。在具有严重的血友病 A 的患者中，Roth 等已经测定了非病毒体细胞基因治疗系统的安全性⁸⁰。

由于其稳定性,有丝分裂状态后的骨骼肌是通过使用整合和非整合病毒和非病毒载体的遗传操纵的重要目标。Goudy 等报道了肌肉导向的基因治疗方法在非肥胖糖尿病(NOD)小鼠中预防自身免疫糖尿病⁸¹。他们开发了含有用于免疫调节细胞因子 IL4 或 IL10 的鼠 cDNA 的重组腺伴随病毒载体。具有 IL10 而没有 IL4 的雌 NOD 小鼠的骨骼肌转导完全消除了糖尿病。

根据 Wells⁸²,腺伴随病毒载体和裸质粒 DNA 是为了基因向肌肉转移的当前选择载体。在载体传递系统的领域中,主要的突破,特别是那些使用脉管途径的已经发生在大约最近两年内,以致肌肉萎缩症的基因治疗和使用肌肉作为平台生产分泌蛋白已经变为临床可能。

肿瘤消解治疗是一种新的抗癌症治疗,其依靠被削弱的裂解病毒如腺病毒(Ad)⁸³。这些病毒通过溶胞作用诱导宿主细胞的破裂并且因此区别于传统基因治疗病毒。肿瘤消解腺病毒被遗传设计以便仅在癌症细胞中复制。三种肿瘤消解腺病毒已经在癌症患者中完成了 I 和 II 期临床试验。这些病毒被进一步设计以便向他们提供额外的治疗基因⁸³。

Takahashi 等已经开始多重耐药(MDR1)基因治疗的临床研究。迄今为止被治疗的两名患者完全缓解并且没有明显的源于 MDR1 基因转移副反应的困扰⁸⁴。

Broedl 等描述,尽管各种高脂血症的当前治疗无效,但是体细胞基因治疗被认为是一种潜在的治疗方法。在许多实例中,临床前原理求证研究已经开始执行,并且在纯合家族高胆固醇血症病例中,临床试验已经实施⁸⁵。

针对簇蛋白的反义寡脱氧核苷酸已经被用于前列腺癌治疗的 I 期临床试验⁸⁶。在前列腺癌中,治疗提供了对簇蛋白多达 90%的抑制。Miyake 等表明 II 期研究计划于 2005 年初开始⁸⁶。

Satoh 等回顾了前列腺癌基因治疗的状态,包括病毒介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因的转导,之后是前药更昔洛韦过程⁸⁷。他们报道对人前列腺癌基因治疗的临床试验证明是安全、临床有效、以及抗肿瘤活性的生

物效应。根据 Satoh 等,在数次有利的临床前研究后,若干项临床研究已经认可了使用免疫调节细胞因子(如白介素 2、白介素 12、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)的前列腺癌基因治疗⁸⁷。

鉴别潜在活性剂的测定方法

在本发明的许多方面公开了测定方法,其用以确定在本发明中候选化合物或试剂是否调节关注的活性。这些方法包括以下内容。

本发明公开了一种方法,其用于评估候选物质是否调节 LXR 依赖性过程,包括:

- a) 用含有报道基因的载体转染细胞,所述报道基因由 LXRE 可操作地驱动;
- b) 用候选物接触细胞; 以及
- c) 通过与没有用候选物接触的细胞对比,确定候选物是否调节报道基因的表达;

从而在候选物存在和不存在时,检测到的 LXR 依赖性过程发生程度的差异表明候选物调节 LXR 依赖性过程。

本发明还公开了一种方法,其用于评估候选物质是否调节 LXR 的 SIRT1 依赖效应,包括:

- a) 用含有 SIRT1 基因的载体转染细胞;
- b) 用含有报道基因的载体进一步转染细胞,所述报道基因由 LXRE 启动子可操作地驱动;
- c) 用候选物接触细胞; 以及
- d) 通过与没有用候选物接触的细胞对比,确定候选物是否调节报道基因的表达;

从而在候选物存在和不存在时,检测到的 LXR 的 SIRT1 依赖效应程度的差异表明候选物调节 LXR 的 SIRT1 依赖效应。

本发明进一步公开了一种方法,其用于评估候选物质是否调节含有特异性结合对成分 SIRT1 和 LXR 的特异性结合对的形成,包括:

a) 用含有编码特异性结合对已附加表位的第一成分的序列的载体转染细胞;

b) 用含有编码特异性结合对第二成分的序列的载体进一步转染细胞;

c) 用候选物质接触细胞;

d) 裂解细胞, 用附加表位的特异性抗体接触细胞裂解产物, 并且用抗体特异性吸附剂回收包含 SIRT1 和 LXR 复合体的免疫沉淀物;

e) 使用 SIRT1 和 LXR 特异性抗体执行蛋白质印迹程序;

从而对比候选物存在和候选物不存在时检测到的复合体形成的差异表明候选物调节 SIRT1 与 LXR 的相互作用。

在这些测定方法中, 用载体转染可以通过如那些已经在上文中表述的技术执行, 通过引用并入全文。本发明领域技术人员已知的任何相当的技术, 没有在本文特别表述的, 可以同样的被用于完成转染。

各种测定方法进一步包括用包含报道基因的载体转染, 所述报道基因由 LXRE 可操作地驱动。报道基因将被一种细胞组分激活, 所述细胞组分特异性地结合 LXRE 以表达报道基因。所述报道基因产物在设计用于执行测定的实验系统中是可以检测的。通常, 报道基因编码蛋白质、因子或酶, 其表达后的活性通过化学或物理检测方法容易地检测到。报道基因的非限制性例子包括编码酶如辣根过氧化物酶或萤火虫荧光素酶、生色蛋白或荧光蛋白如绿色荧光蛋白、以及类似物的基因。本发明领域技术人员已知的任何相当的报道基因, 没有在本文特别表述的, 可以同样的被用于转染细胞以执行用于鉴别潜在活性剂的测定。

测定方法的各种额外实施方案包括用含有序列的载体转染细胞, 所述序列编码由 SIRT1 和 LXR 组成的特异性结合对的已附加表位的第一成分。为这一目的, 可用的表位包括由特异性抗体结合的任何表位。表位的非限制性例子是 FLAG 表位; 其他也被本发明领域技术人员所熟知。任何相当的表位, 没有在本文特别表述的, 可以被用作与特异性结合对一个成分的嵌合体以执行用于鉴别潜在活性剂的测定。

在高复制平行测定仪器中, 通常使用高通量筛选执行潜在活性剂的测

定。在这些系统中，可以使用多孔板以致许多测定可以同时执行。在用于检测潜在活性剂的测定中，使用的候选化合物通常获得于化合物组合库的化学合成，其中系列相关化合物中的各种部分和/或取代基被系统地变化。在人或实体易得到的化合物库存（stocks）中，通常已经获得了类似化合物库。进一步类似化合物库包括源于不同种类自然资源的化学品，以及这种自然化合物的衍生物，其已经通过使用组合化学的方法被进一步改性。通常，化合物库被本发明领域技术人员所熟知。用于制备候选化合物或制备候选化合物库的任何相当的方法可以被用在执行用于鉴别潜在活性剂的测定中，所述方法被本发明领域技术人员所知。

实施例

方法

质粒

已经描述质粒 pBabe-SIRT1 和 pCMV-FLAG-HsSIRT1^{15,16}。

动物和血浆脂蛋白分析

在混合 129/sv-CD1 背景中的 SIRT1^{+/+}、SIRT1^{+/-}和 SIRT1^{-/-}小鼠被圈养于具有从 7 a.m.到 7 p.m.的日光循环的温度控制(22℃)设施，并且准许随意进食(含 0.02%胆固醇)和饮水。

细胞、逆转录病毒感染以及转染

如前所述⁷³，SIRT1^{+/+}、SIRT1^{+/-}和 SIRT1^{-/-}小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)从 E14.5 胚胎中分离，并且在具有 10%FBS 和抗生素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)中培养。通过用 pRS-SV40T 质粒转染原代 MEF 产生永生化 MEF(MEFI)。HEK293T 和 Phoenix 细胞(ATCC, Rockville, MD)在具有 10%FBS 和抗生素的 DMEM 中培养。THP-1 细胞(ATCC, Rockville, MD)在具有 10%FBS 和 0.5 mM β-巯基乙醇(mecaptoethanol)的 RPMI 1640 中培养。

根据生产商(Invitrogen, Carlsbad, Ca)的说明书，用 lipofectamine 2000

plus reagent 执行所有的转染。对于逆转录病毒感染, 用 pBabe 或 pBabe-SIRT1 转染 Phoenix 细胞。包含逆转录病毒的培养基在 48 小时后收集、过滤, 用聚凝胺(1 mg/ml)处理, 并且转移到 MEF 上。然后, 感染的细胞在含有 1 μ g/ml 嘌呤霉素的正常培养基中培养。

实施例 1. 野生型和 SIRT1 敲除小鼠中的血浆胆固醇

对每组中 10 只野生型、13 只 *SIRT1*^{+/-}、以及 13 只同窝出生 *SIRT1*^{-/-} 雄性小鼠进行分析。动物从日光循环开始被禁食 4 小时, 然后收集血液并用 K₃-EDTA 处理获得血浆。用酶的、比色的测定试剂盒(Wako Diagnostics, Richmond, Va.)测量血浆总胆固醇、HDL、以及 LDL 水平。100 μ l 来自 4 只 *SIRT1*^{-/-}和 4 只同窝出生 *SIRT1*^{+/+}雄性小鼠的混合血浆通过使用两个快速液相色谱(fast-performance liquid chromatography) (FPLC)柱(Superose 6B 柱, Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 进行大小分馏 (size fractionated)。从三个独立实验显示出代表性的分布(profile)。用来自 Wako 的酶的、比色的测定试剂盒分析来自 FPLC 的馏分的胆固醇含量。实验用总共 12 只 *SIRT1*^{-/-}和 12 只 *SIRT1*^{+/+}同窝出生雄性小鼠重复三次。结果以 student's t 检验比较。

图 1a 表明与年龄和性别吻合的野生型小鼠比较, *SIRT1*^{-/-}小鼠具有稍微较低的总血浆胆固醇水平。根据图 1 图片 b(直接酶测定)和 d(尺寸排阻色谱/酶测定)的检查, 可以发现这主要是由于载于 HDL(鼠科动物血浆中主要的富含胆固醇的脂蛋白(总量的 80-90%))的胆固醇减少了约 40%(*, $p < 0.001$)。在 *SIRT1*^{-/-}和对照小鼠中, 血浆 LDL 胆固醇水平是相似的(图 1c 和 d)。结果, *SIRT1*^{-/-}小鼠的总胆固醇/HDL 比是异常地高(野生型对照, 2.57 ± 0.98 vs. 1.36 ± 0.19 , $p < 0.001$), 而 HDL/LDL 比是异常地低(1.92 ± 0.94 vs. 3.56 ± 1.24 , $p < 0.001$)。由于在 *SIRT1*^{-/-}小鼠中的多效(pleiotropic)影响, 也检测了 *SIRT1*^{+/-}杂合子, 其与野生型表型相似。同样发现在 *SIRT1*^{+/-}杂合子中, HDL 水平显著减少(图 1b, (*, $p < 0.001$))。

在来自 12 对动物的 HDL 馏分(馏分#25-38)中测量总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)、胆固醇酯(CE)、以及磷脂(PL)含量, 示于图 1, 图片 e。在

$SIRT1^{-/-}$ 小鼠血浆 HDL 中总胆固醇、游离胆固醇、胆固醇酯以及磷脂水平的相对减少是相似的,约 25-30%(图 1e; **, $p<0.01$)。在 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠中 HDL 的大小分布是正常的(图 1d),提示 HDL 的减少是极少数颗粒的结果而不是具有改变的组成或结构的颗粒的结果。

实施例 2. 野生型和 $SIRT1$ 敲除小鼠组织中的胆固醇。

为了确定小鼠组织中总胆固醇水平, $SIRT1^{-/-}$ 小鼠和对照同窝出生小鼠在处死前从日光循环开始禁食四小时。然后收获组织并称重。提取来自肝和睾丸的总胆固醇并按照前述^{70,71}的 GC 测量。包括甘油三酯的总脂质也被溶于包含 60%丁醇、13%甲醇以及 27% Triton X-100 的溶液,并用来自 Wako 的酶的、比色的测定试剂盒测量。

在 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠中,异常低的血浆 HDL(实施例 1)伴随着在两个组织中胆固醇积累的增加,对这两个组织来说, HDL 作为外来胆固醇来源是重要的: 睾丸,其为了固醇储存和类固醇生成而使用 HDL 胆固醇²⁵并且其是具有最高相对水平 $SIRT1$ 蛋白质的器官^{26,27}; 以及肝,其在胆固醇和 HDL 体内稳态中扮演中心角色(central role)²⁸(图 1f; $n=8$; ***, $p<0.01$)。

在 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠肝和睾丸中血浆 HDL 胆固醇的减少和组织胆固醇积累的增加可能是由于脂蛋白胆固醇摄取的增加或向脂蛋白的细胞胆固醇流出(输出)的减少而发生。组织胆固醇的增加也可以是由于局部胆固醇合成的增加。然而,我们在肝和睾丸中观察到对于高灵敏的,编码胆固醇生物合成中速率控制酶(HMG-CoA 还原酶)的胆固醇调节基因, mRNA 基本为正常水平(数据没有显示)。同样,在这些组织中主要 HDL 受体 SR-BI(其介导 HDL 胆固醇的细胞摄取)的蛋白质水平没有明显的提高(数据没有显示)²⁹,在 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠胚胎成纤维细胞中来自 HDL 的脂质摄取速率也没有明显提高(MEF; 数据没有显示)。此外,在睾丸和肝中,其他两种主要的脂蛋白受体 LDL 受体(LDLR)和 VLDL/乳糜微粒受体 LRP 的 mRNA 水平不但没有增加,反而大幅度减少(数据没有显示)。由于从头胆固醇合成的增加和受体介导的输入似乎都不能解释在组织中的增加和在 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠中血浆胆固醇的减少,似乎有可能由细胞胆固醇流出的减少可以解释这些

观察结果。

实施例 3. 野生型和 *SIRT1*^{-/-} 细胞的胆固醇流出。

逆向胆固醇转运是外周组织中过多的胆固醇藉以转运到肝而从体内消除的过程^{30,31}。这一过程的第一步是胆固醇从细胞流出到脂蛋白,特别是 HDL。许多细胞表面胆固醇转运蛋白可以介导胆固醇流出,包括 SR-BI³²⁻³⁵、ABCG1^{36,37},以及这些中最良好表征的,称为 ABCA1 的 ATP 结合盒 (ABC) 转运蛋白,其向贫脂的载脂蛋白(主要是 apoA-I)转运未酯化的胆固醇和磷脂以形成 HDL 颗粒^{30,38-44}。为检验 SIRT1 对这一过程的影响,在两种不同的培养细胞系统中测量 apoA-I 介导的胆固醇流出,其中细胞用 [³H] 胆固醇标记并且在细胞外培养基中监测标记胆固醇向 apoA-I 的流出。

对于 MEF, 胆固醇流出测定根据修改的所述方法⁷²执行。原代 *SIRT1*^{-/-} 和同窝出生对照 *SIRT1*^{+/+} 或 *SIRT1*^{+/-} MEF 以 50% 融合被铺于 12 孔板并且过夜培养。然后细胞被转移到 RPMI 1640/0.2% 牛血清白蛋白 (BSA) 中 24 小时并且通过用 50 µg/ml 的 LDL 和 1 µCi/ml 的 [³H] 胆固醇 (NEN Life Science Products, Boston, Ma.) 额外孵育 24 小时来载入胆固醇。细胞用 PBS 洗涤, 在 RPMI 1640/0.2% BSA 中平衡 4 小时, 然后在有或没有 15 µg/ml apoA I 的 RPMI 1640/0.2% BSA 中孵育 24 小时。然后收集培养基, 并用 0.2 N NaOH 裂解细胞。测量在培养基和细胞裂解产物中恢复的放射性, 并且 apoA I 介导的胆固醇流出以培养基中恢复的放射性与在无 apoA I 培养基中总放射性减去非特异性流出的百分比计算。胆固醇流出测定用 7 对 *SIRT1*^{-/-} 以及来自 3 只同窝的对照 *SIRT1*^{+/+} 或 *SIRT1*^{+/-} MEF 执行, 重复两次。

使用原代 MEF, 将野生型对照细胞和用 [³H] 胆固醇载入的 *SIRT1*^{-/-} 细胞在有或没有 15 µg/ml apoA I 的 RPMI 1640 培养基中孵育。24 小时后测量细胞和培养基中 [³H] 胆固醇水平并计算 apoA I 介导的胆固醇流出。图 1g (左图) 显示原代对照 *SIRT1*^{+/+} MEF (实心柱) 的流出几乎比 *SIRT1*^{-/-} MEF (空白柱) 的流出高 3 倍 (n=7; ****, p<0.001)。

对于人单核细胞系 THP-1 细胞, 细胞用 10 mM 烟酰胺在 RPMI 1640/10% FBS 中处理 48 小时, 然后用 50 µg/ml 的 LDL 和 1 µCi/ml 的 [³H]

胆固醇在 RPMI 1640/1% FBS/0.2% BSA 培养基中持续 24 小时载入胆固醇。细胞用 PBS 洗涤并且在有或没有 15 $\mu\text{g/ml}$ apoA I 的 RPMI 1640/0.2% BSA 中孵育 24 小时。然后分离培养基和细胞，并且用 0.2 N NaOH 裂解细胞。测量在培养基和细胞裂解产物中恢复的放射性，并且 apoA I 介导的胆固醇流出按上文描述的计算。

用 SIRT1 抑制剂烟酰胺(Nico)⁴⁵ 处理 THP-1 也抑制大概 3 倍的 [³H]胆固醇流出 (图 1g, 右图)。实验执行三次并且重复两次 ($p < 0.01$)。因此，在 MEF 中 SIRT1 的缺少和单核细胞中 SIRT1 活性的抑制减少了 apoA I 介导的胆固醇流出。这些结果证明了胆固醇流出的减少可以导致 *SIRT1*^{-/-}小鼠中减少的血浆 HDL 胆固醇和增加的组织胆固醇的可能性。

实施例 4. 野生型和 SIRT1 敲除组织中 ABCA1 mRNA 的水平。

为了检查降低胆固醇流出是否可以在 *SIRT1*^{-/-}小鼠中产生减少的血浆 HDL 胆固醇和增加的组织胆固醇，对比了肝、睾丸和卵巢中 ABCA1 mRNA 的水平。

通过 Qiagen RNeasy mini-kit(Qiagen Inc., Calencia, Ca.)从小鼠肝、睾丸、巯基乙酸盐 (thioglycolate) 刺激的腹腔巨噬细胞以及卵巢中分离总 RNA。为了实时 PCR 分析，通过 Superscript III 逆转录酶(Invitrogen, Carlsbad, Ca)和随机引物合成 cDNA。然后，在 Cybergreen(Qiagen Inc., Calencia, Ca.)存在下，对所得的 cDNA 以基因特异性引物进行 PCR 分析。mRNA 的相对丰度通过对亲环蛋白水平的归一化获得。对于 RNA 杂交，将 RNA(10 $\mu\text{g/泳道}$)在甲醛琼脂糖凝胶(1.0%)上分离，转移到 GeneScreen Plus 膜上(NEN Life Science Products, Boston, Ma.)，并且根据标准程序杂交。ABCA1 的 mRNA 水平由磷光影像分析系统(phosphoimager)量化，并针对相应的肌动蛋白水平标准化。

与野生型相比，*SIRT1*^{-/-}小鼠三个被检测的组织中，ABCA1 mRNA 表达减少了 40-50%(图 2a)。与这种减少也许已经导致血浆 HDL 水平的下降的观点相符，在 *ABCA1*^{+/-}杂合小鼠中，HDL 胆固醇减少到 *ABCA1*^{+/-}对照的 ~60%⁴⁶，与 *SIRT1*^{-/-}小鼠中的减少相似。

实施例 5. ABCA1 启动子的活性

ABCA1 的转录由增加的细胞胆固醇诱导, 并且 LXR 细胞核受体转录因子介导这个反应⁴⁷⁻⁴⁹。LXR/类视黄醇 X 受体(RXR)异源二聚体被氧固醇(oxysterols)激活⁵⁰并且在全身胆固醇体内稳态、脂质生物合成、炎症反应、碳水化合物代谢以及肥胖的调节中起到关键作用。为了确定 SIRT1 对 ABCA1 表达的影响是否被 LXR 介导, 产生报道基因构建体, 其中小鼠 ABCA1 启动子或对照突变体启动子驱动萤火虫荧光素酶基因表达, 对照突变体启动子中八个核苷酸缺失移除 LXR 响应元件(LXRE)。过去的研究已经表明 22(R)-羟基胆固醇(22(R)-HC, LXR 激动剂)以及 9-顺式视黄酸(9-顺式 RA, RXR 激动剂)的组合显著刺激了 ABCA1 启动子中 LXRE 的活性⁴⁷。

萤火虫酶报道基因质粒 pGL3-ABCA1 通过将小鼠 ABCA1 启动子区的 -847 到+244 插入到 pGL3 载体(Promega, Madison, WI)的 KpnI-XhoI 位点制备。pGL3-ABCA1-LXRE (pGL3-ABCA1 的 LXRE 突变版本)通过小鼠 ABCA1 的野生型启动子缺失 LXRE 制备。

对于萤火虫酶测定, 铺于 24 孔板的 MEF1 或 HEK293T 细胞用 100 ng pGL3-ABCA1 或 pGL3-ABCA1-LXRE, 和 10 ng pRL-TK (海肾萤火虫酶 (renilla luciferase); Promega)转染。用野生型(WT)或 LXRE 突变体(-LXRE)小鼠 ABCA1 启动子驱动的萤火虫酶报道基因载体转染的细胞用 1 μ M 曲谷抑菌素 A(TSA) (脱乙酰酶 I 和 II 类的抑制剂)、或 10 mM 烟酰胺(Nico)、或 10 mM 烟酰胺+1 μ M TSA 处理。用 LXRE 突变体载体转染的细胞在含有 10%FBS 的 DMEM 中, 在没有(实心柱)或有(空白柱)10 μ M 22(R)-HC 和 1 μ M 9-顺式 RA 存在的情况下培养(图 2b)。然后在 6 或 24 小时后, 通过使用双萤火虫酶报道基因测定系统 (Dual-Luciferase Reporter Assay System) (Promega)测量萤火虫酶活性。最终 GL(萤火虫荧光素酶)活性以协同表达的 RL(海肾萤火虫酶)活性归一化。实验按双份执行并且重复 3 次。

野生型和突变体报道基因构建体在 HEK293T 细胞中表达(图 2b, WT(左图)或-LXRE(右图))。通过用 22(R)-HC+9-顺式 RA 处理, 对来自野生型的萤火虫酶表达的刺激为 8 倍(图 2b, 左图)。此外, 这种诱导的表达

被抑制剂烟酰胺(其抑制脱乙酰酶III, 如 SIRT1(a))抑制 50%, 但是不被 TSA 抑制。缺失 LXRE 的构建体对 LXR 激动剂没有响应并且表现出低基础活性(图 2b, 右图)。总之, 这些发现表明 SIRT1 而不是其他类型的脱乙酰酶, 调节在 ABCA1 启动子的 LXR 活性, 有趣地成为正调节子。

此外, 由此可以看到在这些实验中使用的系统提供了一种方法, 其用于评估候选物质对 LXR 依赖性过程的调节。

实施例 6. SIRT1 活性对 ABCA1 启动子的影响。

为了直接确定 SIRT1 对 ABCA1 启动子的影响, 这些启动子报道基因构建体被引入永生化的 *SIRT1*^{+/+} 和 *SIRT1*^{-/-}MEF(其有或没有用 pBabe-mT1 载体感染)中以表达 SIRT1 蛋白质(图 2c)。如实施例 3 所述, 产生 *SIRT1*^{+/+} 和 *SIRT1*^{-/-}MEF 并用 pBabe-SIRT1 (+) 或 pBabe 对照载体(-)感染。

图 2c 右图的插图表示在这四种细胞系中, SIRT1 表达水平的免疫印迹结果; 微管蛋白被用作上样对照。从这一载体的 SIRT1 的表达稍微低于在 *SIRT1*^{+/+} MEF 中内源 SIRT1 的表达。

然后用野生型(WT)或 LXRE 突变体(-LXRE)小鼠 ABCA1 启动子驱动的荧光素酶报道基因载体, 在没有(实心柱)或有(空白柱)10 μ M 22(R)-HC 和 1 μ M 9-顺式 RA 存在的情况下转染 MEF。24 小时后测量荧光素酶活性。所有含有野生型启动子的细胞在用 LXR/RXR 激活剂处理时, 表现出荧光素酶表达的显著刺激(图 2c, 左图), 而在含有对照突变(-LXRE)报道基因的细胞中, 低基础活性没有被这些激活剂刺激(图 2c, 右图)。最重要地, 在 SIRT1 缺陷的细胞(*SIRT1*^{-/-}MEF)中, 野生型启动子构建体的 LXRE 依赖活性比在 *SIRT1*^{+/+} 细胞或用 SIRT1 重组的细胞(pBabe-T1)中低 40%($p < 0.02$)。这些发现支持了 SIRT1 经在 LXRE 的 LXR/RXR 作用刺激 ABCA1 启动子的模型。

在这一实施例中, 实验系统提供了一种方法, 其评估候选物质对 LXR 的 SIRT1 依赖效应的调节影响。

实施例 7. SIRT1 与 ABCA1 启动子的 LXRE 的相互作用。

为了确定 SIRT1 是否直接结合到 ABCA1 启动子中的 LXRE, 我们使用染色质免疫沉淀(ChIP)测定并用不同的引物探测小鼠 ABCA1 启动子。

使用修改过的如所述⁷⁶的方法执行 ChIP 分析。简单地说, 在室温下, 细胞在 1%多聚甲醛培养基中交联 15 分钟并且交联用 0.125 M 甘氨酸终止。然后从 HEPES 缓冲溶液(50 mM HEPES-NaOH, pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10%甘油, 0.5% NP40, 0.25% Triton X-100, 以及 Complete™ 蛋白酶抑制剂混合物(Roche, Indianapolis, In))中获取细胞, 并纯化细胞核。纯化的细胞核被再悬浮于 TE 缓冲溶液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 以及 Complete™蛋白酶抑制剂混合物), 并且在冰上超声处理至平均长度为 1kb。超声上清液被稀释于 IP 缓冲溶液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10%甘油, 1% Triton X-100, 0.1%脱氧胆酸钠, 以及 Complete™蛋白酶抑制剂混合物), 用蛋白质 A 微珠预清洗两次。预清洗的染色质样品用抗 SIRT1 兔多克隆抗体(Upstate, Charlottesville, Va)在 4℃下过夜培养, 并且通过加入蛋白质 A 微珠 2 小时回收免疫复合体。然后回收的免疫沉淀物用 IP 缓冲溶液洗涤两次, 用 IP 缓冲溶液和 500 mM NaCl 洗涤两次, 并用 RIPA 缓冲溶液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5%脱氧胆酸钠, 以及 Complete™蛋白酶抑制剂混合物)洗涤两次。然后在 65℃, 免疫沉淀物中的染色质用 10×TE/1% SDS 洗脱 15 分钟。在 65℃下培养洗脱的染色质至少 6 小时以逆转交联, 用蛋白酶 K 和核糖核酸酶处理, 并用苯酚/氯仿和氯仿提取。最终的 DNA 片段用 LiCl/糖原/乙醇沉淀回收, 粒状沉淀在水中再悬浮, 并用 PCR 测定。

对于小鼠 ABCA1 启动子的 LXRE, 使用引物:

5'-GCTTTCTGCTGAGTGACTGAACTAC-3' (SEQ ID NO: 13):以及

5'-GAATTACTGCTTTTGGCCGCG-3' (SEQ ID NO: 14)执行 PCR 反应。

作为上述 ChIP 测定的阴性对照, ABCA1 启动子上的 LXRE 上游片段 6.2kb 也使用引物:

5'-GCAGCCCAACTCTTCAGAAC-3' (SEQ ID NO: 15)以及

5'TCCCCTTTGTCTTTGTGGAC-3' (SEQ ID NO: 16)扩增。

对于人启动子的 LXRE, 使用引物

5'-GCTTTCTGCTGAGTGAAGTAC-3' (SEQ ID NO: 17)以及

5'-TGCCTCTCTTTCTCCTACCC-3' (SEQ ID NO: 18) 执行 PCR 反应。

作为阴性对照, LXRE 上游片段 7.5kb 使用引物

5'-AGGCAGGTGGATCATTGAG-3' (SEQ ID NO: 19)以及

5'-CCAAACATCTGGGCTTCTGT-3' (SEQ ID NO:20)扩增。执行实验至少三次, 并且给出代表性数据。

图 2d 上图表示在用针对 SIRT1 的抗体免疫沉淀前(输入)或后(α SIRT1), 用 LXRE 特异性或上游特异性 PCR 探针探测的结果。可以看到在实验处理中, (α SIRT1)抗体处理沉淀包含来自 *SIRT1*^{+/+} MEF 的 LXRE 的染色质片段(左泳道, 上方图像显示暗灰带), 但是不沉淀 *SIRT1*^{-/-} MEF 对照(右泳道, 上方图像显示全黑), 并且不沉淀包含来自任何细胞系的 LXRE 上游 DNA 6.2kb 的片段(下方图像, 全部泳道, 显示全黑)。相似的结果出现在用载体(为表达已附加 FLAG 表位的人 SIRT1)或阴性对照载体转染的, 并用抗 FLAG 抗体沉淀的人 HEK293T (图 2d, 底部)以及 THP-1 (数据未显示) 细胞中。因此, SIRT1 结合到紧邻 LXRE 的 ABCA1 启动子。

实施例 8. SIRT1 与 LXR α 和 LXR β 的相互作用。

SIRT1 不能直接结合 DNA²⁶, 因此其在 ABCA1 启动子上的存在需要结合到 DNA 相关的蛋白质, 如 LXR。LXR 转录因子家族有两个成员, LXR α 和 LXR β ^{50,52}。LXR α 的表达是组织特异性的, 而 LXR β 的表达是普遍存在的。为了确定 SIRT1 与 LXR 是否通过协同免疫沉淀作用结合, 小鼠 LXR α 和 LXR β cDNA 被克隆到 HA 标记的表达载体。然后, 用或不用载体(针对 HA 标记的 LXR)将 SIRT1 表达载体 pBabe-SIRT1 转染到 HEK293T 细胞。

在这一实施例中, 研究 SIRT1 与 LXR α 或 LXR β 之间可能的相互作用。表达 NH₂ 末端 HA 标记的 LXR α (HA-LXR α)和 LXR β (HA-LXR β)的质粒通过克隆在修饰的 pcDNA3-NHA 载体中的 HA 表位下游(阅读框内)的全长小鼠 LXR α 或 LXR β cDNA 来制备。过度表达小鼠 SIRT1 (MmSIRT1)和

HA-LXR α 、或 MmSIRT1 以及 HA- LXR β 的 HEK293T 细胞在 NP40 缓冲溶液(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 以及 Complete™蛋白酶抑制剂混合物)中收获,并通过穿过 18 规格的注射针头 10 次裂解细胞。4℃下震动 1 小时后,裂解产物以 16,000×g 离心 15 分钟。然后,产生的上清液被稀释于含有 1%BSA 的 NP40 缓冲溶液,并且通过加入 3 μ g 抗 HA 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology)开始免疫沉淀。然后 4℃下震动孵育混合物持续 2 小时至过夜。通过加入蛋白质 A 微珠持续额外 1 小时回收免疫复合体并且用 1 ml NP40 缓冲溶液洗涤免疫沉淀五次。然后通过 SDS-PAGE 分离总裂解产物和相应的免疫沉淀样品并且用抗 SIRT1 多克隆抗体和抗 myc 或抗 HA 抗体进行免疫印迹。

单克隆小鼠抗 LXR α 抗体来自 R&D 系统并且多克隆羊抗 LXR α/β 抗体来自 Santa Cruz Biotechnology。人 HEK293T 细胞表达表明蛋白质被溶解并且与抗 HA 单克隆抗体免疫沉淀(IP),如上文所述(图 2e)。然后,总裂解产物(泳道 1-4)和抗 HA 免疫沉淀样品(泳道 5-8)通过 SDS- PAGE 分离并用抗 SIRT1 多克隆抗体(上部影像)和用抗 HA-LXR α 抗体(上图)或抗 HA-LXR β 抗体(下图)探测。如图 2e 所示,只有当标记的 LXR α 或 LXR β 在细胞中协同表达时,抗 HA 抗体交叉沉淀转染的小鼠 SIRT1 蛋白质(mT1)(泳道 8, 上下图)。HA-LXR 也共沉淀内源人 SIRT1 蛋白质(hT1),所述蛋白质在凝胶中表现出稍微低的移动性。因此,在完整细胞中,SIRT1 对 LXR 的直接或间接结合可能对 SIRT1 和 ABCA1 启动子的 LXRE 的结合负责。

此外,在这一实施例中描述的免疫沉淀实验提供了一种敏感的测定,其用于测定检验物质调节 SIRT1 与 LXR α 或 LXR β 相互作用的能力。

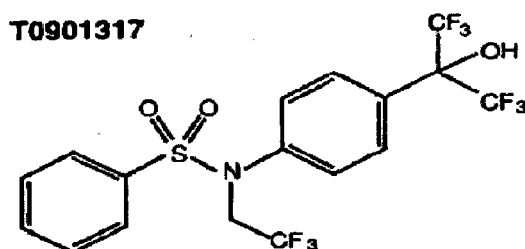
实施例 9. 在 *SIRT1*^{-/-}小鼠肝中的 LXR 靶向 mRNA。

LXR 和 SIRT1 之间的相互作用引起一种可能性: SIRT1 功能的缺失可以损伤响应饮食胆固醇的 LXR 介导的脂质体内稳态。为检验这一假设,在 *SIRT1*^{-/-}小鼠肝中(图 3a),使用来自野生型对照动物(实心柱)和 *SIRT1*^{-/-}动物(空白柱)的肝脏的总 RNA 分析一批 LXR 靶基因,包括 ABCA1 的 mRNA 水平。通过实时 PCR 进行分析。虽然在 *SIRT1*^{-/-}肝中 LXR mRNA

水平正常,但是与 $SIRT1^{+/+}$ 对照比较,许多 LXR 靶如 SREBP1、ABCA1、ABCG1、ABCG5 以及 LDLR 是减少的($n=3$, *, $P<0.05$)。在 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠中,已知不是 LXR 靶^{53,54} 的对照基因的 mRNA 水平没有显著改变。

实施例 10. 在 LXR 激动剂 T0901317 处理鼠的肝中代谢物的相对水平。

为了获得关于体内 SIRT1 对 LXR 功能的影响的更加深入的认识,分析野生型和 $SIRT1^{-/-}$ 动物对 8 天口服施用 LXR 激动剂 T0901317(N-(2,2,2-三氟-乙基)-N-[4-(2,2,2-三氟-1-羟基-1-三氟甲基-乙基)-苯基]-苯磺酰胺)⁵³ 的反应。



为了检测小鼠组织中 ABCA1 蛋白质,在 RIPA 缓冲溶液中将 $SIRT1^{+/+}$ 或 $SIRT1^{-/-}$ 肝均质化。然后肝提取物与 SDS 样品缓冲溶液混合并且在 37°C 下变性 20 分钟以防止在高温下 ABCA1 的聚合。然后,样品溶解到 7.5% SDS-PAGE 并且用抗 ABCA1 多克隆抗体(R80 抗体,由 M. Fitzgerald 博士和 M. Freeman 博士赠送)进行印迹。

通过口管饲法向 2-6 月大的 $SIRT1^{-/-}$ 和对照雄性动物喂食 T0901317 (10 mg/kg),在喂食前后收集血浆用于血浆脂质分析。喂食后收集组织用于进一步分析。通过实时 PCR 分析来自没有喂食(黑色实心柱)或喂食(黑色斑纹柱)10 mg/kg T0901317 的野生型动物以及没有(空白柱)喂食或喂食(灰色斑纹柱)T0901317 的 $SIRT1^{-/-}$ 小鼠肝的总 RNA。野生型动物的 T0901317 喂食显著诱导许多 LXR 靶的表达: RNA 水平的 SREBP-1c、LPL 和 ABCA1(图 3b) ($n=4$, **, $p<0.05$)。然而, $SIRT1^{-/-}$ 小鼠中这些靶的诱导被减弱了。从所述小鼠的肝中获得总蛋白质溶解产物并通过免疫印迹分析 ABCA1 蛋白质水平(图 3c)。(如前所观察到的,通过蛋白质印迹法,ABCA1 蛋白质包含多个条带⁷⁸。)

图 3 中, 图 d、e 和 f 所示的血浆结果代表 8 天施用 T0901317 前后的相同的小鼠。图 3 中, 图 d 所示的肝结果与没有或有施用 T0901317 的同窝出生鼠比较, 如上述图 3 的图 b(实施例 9)和 c(本实施例)。分析来自没有(黑色实心柱)或有施用(左斑纹柱)T0901317 的野生型小鼠和没有(空白柱)或有施用(右斑纹柱)T0901317 的 *SIRT1*^{-/-}动物的血浆(图 3d, 左图)和肝(图 3d, 右图)的甘油三酯。观察到在 *SIRT1*^{-/-}动物中, 对 LXR 激动剂 T0901317 诱导⁵³的血浆和肝甘油三酯积累的响应减弱(图 3d; n=5, ***, $p<0.001$)。也观察到处理的小鼠中较低的血浆胆固醇水平(图 3e; n=5, ****, $p<0.02$), 特别是在通过 FPLC 脂蛋白馏分的胆固醇测定而确定的 HDL 大小颗粒中(图 3f; n=5)。由于 T0901317 通过 SREBP-1c 的诱导而导致血浆和肝甘油三酯的升高⁵³, 在 *SIRT1*^{-/-}小鼠中, SREBP-1c mRNA 的低水平(图 3a)可以解释 T0901317 诱导的甘油三酯的减少。因此, 在报道基因测定中, 不仅 SIRT1 对 ABCA1 启动子的影响依赖于 LXR, 而且 LXR 和其激动剂的体内功能也依赖 SIRT1。

实施例 11. SIRT1 对 LXR 蛋白质表达的影响

SIRT1 直接与许多靶蛋白质(如组蛋白 12、p53 15-17、FOXO 转录因子 18、19 以及 PGC-1 α 23、24)相互作用, 并且脱去它们的乙酰基。由 SIRT1 引起的这些靶的脱乙酰化抑制(某些启动子的 p53 和 FOXO)或活化(其他启动子的 PGC-1 α 和 FOXO)它们的转录活性。为了研究 SIRT1 如何正调节 LXR, 首先确定在 *SIRT1*^{+/+}和 *SIRT1*^{-/-}小鼠肝中内源 LXR 蛋白质的水平。令人惊讶地, 尽管与野生型相比 LXR 活化靶的能力减弱(实施例 9; 图 3a), 但是在 *SIRT1*^{-/-}动物中 LXR 蛋白质水平显著增加(图 4a)。

用 pSuper 载体或 pSuper-SIRT1 RNAi 构建体转染 HEK293T 细胞, 外源 CMV 启动子驱动所述细胞表达 HA-LXR β 。转染 3 天后收获细胞, 并且通过使用针对 HA 或 SIRT1 的抗体以蛋白质印迹法分析 HA-LXR β 和 SIRT1 的水平。发现 RNAi 介导的 SIRT1 表达的敲低(knockdown)(图 4b, 泳道 3 和 4), 和烟酰胺对 SIRT1 活性的抑制-而不是 TSA 对其他脱乙酰酶的抑制(图 4c)-导致了升高的 HA-LXR β 蛋白质水平。由于 *SIRT1*^{-/-}小鼠的 LXR mRNA 没有可检测的减少(图 3a), 所以 SIRT1 调节转录后 LXR 的蛋白质

水平。

用对照培养基(图 3c, 泳道 1), 或含有 1 μ M TSA (泳道 2)、10 mM 烟酰胺(泳道 3)、25 μ M MG132 (苄氧羰基(carbobenzoyloxy)-Leu-Leu-Leu-al, 蛋白酶体抑制剂)(泳道 4)、或 10 mM 烟酰胺加 25 μ M MG132 (泳道 5)的培养基处理表达 HA-LXR β 的 HEK293T 细胞 6 小时。然后收获细胞, 并且通过使用针对 HA(上影像)或 SIRT1(中影像)的抗体以蛋白质印迹法分析 HA-LXR β 和 SIRT1 的水平。烟酰胺对 SIRT1 活性的抑制(泳道 3)-而不是 TSA 对其他脱乙酰酶的抑制(泳道 2)-导致了升高的 HA-LXR β 蛋白质水平(上影像)。由于 SIRT1^{-/-}小鼠的 LXR mRNA 没有可检测的减少(见实施例 9, 图 3a), 所以 SIRT1 调节转录后 LXR 的蛋白质水平。相信烟酰胺对 SIRT1 活性的抑制通过干扰蛋白酶体介导的 LXR 降解而增加 LXR 的蛋白质水平。

下一个检查该发现(LXR 活性与蛋白质水平负相关)的根据。由于赖氨酸残基的乙酰化可以妨碍泛素化并且 SIRT1 是脱乙酰酶, 因此 SIRT1 活性的缺失可以稳定 LXR 蛋白质, 这是由于增加 LXR 乙酰化的稳定状态水平, 因此抑制泛素/蛋白酶体降解路径。如果是这样的, 当 SIRT1 活化时, MG132 对蛋白酶体活性的抑制可以增加 LXR 的稳定状态水平, 但是当烟酰胺抑制了 SIRT1 的时候就不能这样。事实上, 在表达 HA-标记的-LXR β 的 HEK293T 细胞中观察到这一现象(图 4c, 泳道 4 vs. 泳道 5)。

HEK293T 细胞以表达空 pBabe 载体、HA-LXR β 、pBabe-SIRT1 和 pBapbe-hSIRT1HY (一种无活性脱乙酰酶 SIRT1 变异体(见 Vaziri 等, 2000))的构建体共转染(co-transfected)。40 小时后, 用 25 μ M MG132 孵育细胞 1 小时并收获细胞。然后使用 HA 的抗体免疫沉淀 HA-LXR β 接着用泛素、HA 和 SIRT1 的抗体进行蛋白质印迹。结果表明在转染的 HEK293T 细胞中, 活性 SIRT1 转基因(hSIRT1)的表达而不是无活性突变体 hSIRT1HY 的表达增加了泛素共轭的(ubiquitin-conjugated)LXR 的量(图 4d, 泳道 3 vs. 泳道 4)。

实施例 12. 体内 LXR 的乙酰化。

为了检测体内 LXR 的乙酰化和 SIRT1 对 LXR 的脱乙酰化, 按修改过

的所述方法⁷⁷在含有[3H]乙酸钠的培养基中,培养 HEK293T 细胞,所述细胞用 HA-LXR β 并用 pBabe、pBabe-HsSIRT1 或 pBabe-HsSIRT1H355Y 共转染。简短地,转染后 40 小时,向培养物加入 2 mCi/ml [3H]乙酸钠、蛋白酶体抑制剂 MG132 (25 μ M)、22(R)-HC (10 μ M)和 9-顺式 RA (1 μ M),持续 1 小时。然后用冷磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞并在 NP40 缓冲溶液中裂解。4℃下以 16,000 $\times$ g 离心裂解产物 15 分钟。然后,用抗 HA 抗体免疫沉淀 HA-LXR β 并用 SDS-PAGE 分离。用考马斯亮蓝首先染色包含[3H]乙酸盐标记的 HA-LXR β 的凝胶,然后通过用商品化的荧光自显影增强溶液 (Amplify, Amersham Biosciences)浸渍 30 分钟来加强。干燥的凝胶在-70℃进行放射自显影 3 至 7 天。同样的样品也用抗 SIRT1 抗体进行免疫印迹。

结果如图 4e 所示。在正常培养条件下,HA-LXR β 被乙酰化(泳道 1)。此外,用 22(R)-HC + 9-顺式 RA 处理而活化 LXR β 刺激脱乙酰化(和/或可能抑制乙酰化;泳道 2)。可能是: SIRT1 对 LXR 的脱乙酰化负责(至少部分负责),因为如图 4f 所示,与用空载体(pBabe;泳道 1)或编码酶促(enzymatically)无活性 SIRT1 的载体(pBabe-hSIRT1HY;泳道 3)转染的对照细胞比较,在表达 hSIRT1 (pBabe-hSIRT1;泳道 2)的细胞中,[3H]乙酸盐标记的 HA-LXR 水平相当低。这些发现表明 SIRT1 对 LXR β 的脱乙酰化推动其循环并增加其活性。

实施例 13. SIRT1 的抑制或蛋白酶体介导的 LXR 降解对 ABCA1 启动子上 LXR 的转录活性的影响。

用野生型 (WT; 图 4g, 左图)或 LXRE 突变体(-LXRE; 图 4g, 右图)小鼠 ABCA1 启动子驱动的荧光素酶报道基因载体转染的 HEK293T 细胞在有(实心柱)或没有(空白柱)10 μ M 22(R)-HC 和 1 μ M 9-顺式 RA 的情况下,用 10 mM 烟酰胺(Nico)、25 μ M MG132、或 10 mM 烟酰胺+25 μ M MG132 处理 6 小时。根据实施例 5 测量并归一化荧光素酶活性。

发现烟酰胺减弱了荧光素酶报道基因的诱导(由 ABCA1 启动子显著驱动)(图 4g, 左图)。此外,蛋白酶体抑制剂 MG132 以与烟酰胺相同的程度抑制报道基因,并且烟酰胺和 MG132 的组合没有导致进一步的抑制。缺

失 LXRE 的对照报道基因表现基础活性, 其没有被烟酰胺或 MG132 改变(图 4g, 右图)。这些发现表明 SIRT1 对 LXR β 的脱乙酰化以及蛋白酶体对其随后的泛素化和降解帮助活化 ABCA1 启动子(如下文所述)。

这些实施例表明 SIRT1 正调节 LXR 转录因子, 并且因此在胆固醇体内稳态的调节中具有重要的作用。LXR 和 SIRT1 活化编码 ABCA1 转运蛋白基因的转录, 所述转运蛋白介导胆固醇逆向运输和 HDL 的合成。由于遗传学和流行病学研究表明血浆 HDL 水平与心血管疾病³⁰和可能的阿尔茨海默病的风险^{5,6}负相关, 因此这些发现可能与人类医学直接相关。介导胆固醇逆向运输的 HDL 可以通过从动脉细胞中清除过多的胆固醇预防动脉粥样硬化^{55,56}并且通过减少脑中富含胆固醇的筏(raft)形成而保护免于阿尔茨海默病^{57,58}。通过活化 LXR, SIRT1 可以减少老年相关动脉粥样硬化和可能的阿尔茨海默病的风险。

SIRT1 和 LXR 之间生理和功能的相互作用表明通过调节 LXR, SIRT1 在体内至少发挥了其部分功效。事实上, SIRT1 缺陷小鼠和 LXR 缺陷小鼠具有很多共同的代谢缺陷^{53,54,63}, 如减少的 HDL 胆固醇(图 1)和甘油三酯(图 3d)水平。同样, 在 SIRT1^{-/-}小鼠中诱导 PEPCK (在糖质新生(gluconeogenesis)中, 肝 LXR 激动剂⁶⁴可以抑制的速率限制酶)¹⁹。最近 LXR 依赖性基因表达和能量体内稳态已经表现出其对针对微生物的先天免疫应答的重要性, 并且缺失 LXR 的小鼠很容易受到细菌感染⁶⁵。因此, 观察到的 SIRT1 敲除动物对肺感染²⁶和眼感染(未公开的观察)的易感性可能是由于这些动物中减弱的 LXR 活性。

本发现表明 SIRT1 通过对 LXR 脱乙酰化提高了其活性并且引起其循环(图 5)。SIRT1 对 LXR 的调节将这种 sirtuin 置于胆固醇体内稳态路径的中心。

参考文献

1. Grundy, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. (肥胖症、代谢综合征和冠状动脉粥样硬化。) Circulation 105,

2696-2698 (2002).

2. Kivipelto, M 等. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. (中年血管风险因子和生命最后阶段阿尔茨海默病: 纵向的、人群为基础的研究) *Bmj* 322, 1447-51 (2001).

3. Kivipelto, M 等. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. (载脂蛋白 E ϵ 4 等位基因、升高的中年总胆固醇水平和高中年收缩压是生命最后阶段阿尔茨海默病的独立风险因子。) *Ann Intern Med* 137, 149-55 (2002).

4. Wolozin, B. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. (胆固醇和阿尔茨海默病的生物学。) *Neuron* 41, 7-10 (2004).

5. Merched, A, Xia, Y., Visvikis, S., Serot, J. M. & Siest, G. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. (减少的高密度脂蛋白胆固醇和血清载脂蛋白 AI 浓度与阿尔茨海默病的严重度密切相关。) *Neurobiol Aging* 21, 27-30 (2000).

6. Bonarek, M 等. Relationships between cholesterol, apolipoprotein E polymorphism and dementia: a cross-sectional analysis from the PAQUID study. (胆固醇、载脂蛋白 E 多态性和痴呆之间的关系: 来自 PAQUID 研究的横断面分析。) *Neuroepidemiology* 19, 141-8 (2000).

7. Blander, G. & Guarente, L. The Sir2 family of protein deacetylases. (蛋白质脱乙酰酶的 Sir2 族。) *Annu Rev Biochem* 73, 417-35 (2004).

8. Wood, J. G 等. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. (Sirtuin 活化剂模拟热卡限制并且延迟多细胞动物的衰老。) *Nature* 430, 686-9 (2004).

9. Rogina, B. & Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a

pathway related to calorie restriction. (Sir2 通过热卡限制相关的途径调节苍蝇的寿命。) Proc Natl Acad Sci U S A 101, 15998-6003 (2004).

10. Lin, S. J., Defossez, P. A. & Guarente, L. Requirement of NAD and SIR2 for lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. (需要 NAD 和 SIR2 通过热卡限制延长酿酒酵母的寿命。) Science 289, 2126-8 (2000).

11. Lin, S. J. 等. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. (热卡限制通过增加呼吸延长酿酒酵母的寿命。) Nature 418, 344-8 (2002).

12. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. (转录沉默和长寿蛋白质 Sir2 是 NAD 依赖性组蛋白脱乙酰酶。) Nature 403, 795-800 (2000).

13. Landry, J 等. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. (沉默蛋白质 SIR2 和其同系物是 NAD 依赖性蛋白质脱乙酰酶。) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5807-11 (2000).

14. Smith, J. S 等. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. (Sir2 蛋白质族中系统发生地保守的 NAD⁺依赖性蛋白质脱乙酰酶活性。) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6658-63 (2000).

15. Luo, J 等. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. (应激下 Sir2 α 对 p53 的负调节提高细胞生存。) Cell 107, 137-48 (2001).

16. Vaziri, H 等. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. (hSIR2(SIRT1)作为 NAD 依赖性 p53 脱乙酰酶起作用。) Cell 107, 149-59 (2001).

17. Langley, E 等. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes

PML/p53-induced cellular senescence. (人 SIR2 脱乙酰化 p53 和拮抗 PML/p53 诱导的细胞衰老。) *Embo J* 21, 2383-96 (2002).

18. Brunet, A 等. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. (SIRT1 脱乙酰酶对 FOXO 转录因子的应激依赖性调节。) *Science* 303, 2011-5 (2004).

19. Motta, M. C 等. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. (哺乳动物 SIRT1 抑制叉头样转录因子。) *Cell* 116, 551-63 (2004).

20. Araki, T., Sasaki, Y. & Milbrandt, J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. (增加的核 NAD 生物合成和 SIRT1 活化预防轴索变性。) *Science* 305, 1010-3 (2004).

21. Giannakou, M. E. & Partridge, L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. (FOXO 和 SIRT1 之间的相互作用使生存平衡倾斜。) *Trends Cell Biol* 14, 408-12 (2004).

22. Picard, F 等. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. (Sirt1 通过抑制 PPAR γ 促进白脂肪细胞的脂肪动员。) *Nature* 429, 771-6 (2004).

23. Rodgers, J. T 等. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. (通过 PGC-1 α 和 SIRT1 复合体的葡萄糖体内稳态的营养控制。) *Nature* 434, 113-8 (2005).

24. Nemoto, S., Fergusson, M. M. & Finkel, T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 { α }. (SIRT1 与代谢调节子和转录共活化剂 PGC-1 { α } 的功能地相互作用。) *J Biol Chem* 280, 16456-60 (2005).

25. Rigotti, A., Miettinen, H. E. & Krieger, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. (内分泌和其他组织脂质代谢中高密度脂蛋白受体 SR-BI 的作用。) *Endocr Rev* 24, 357-87 (2003).

26. McBurney, M. W 等. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. (哺乳动物 SIR2 α 蛋白质在胚胎发生和配子形成中的作用。) Mol Cell Biol 23, 38-54 (2003).

27. Cheng, H. L 等. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. (Sir2 同系物(SIRT1)缺陷型小鼠的发育缺陷和 p53 超乙酰化。) Proc Natl Acad Sci U S A (2003).

28. Brewer, H. B., Jr. & Santamarina-Fojo, S. New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. (在高密度脂蛋白代谢和胆固醇逆向运输中三磷酸腺苷结合盒转运蛋白作用的新观点。) Am J Cardiol 91, 3E-11E (2003).

29. Krieger, M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the HDL receptor SR-BI. (记述“好胆固醇”的命运: HDL 受体 SR-BI 的识别和表征。) Annu Rev Biochem 68, 523-588 (1999).

30. Oram, J. F. & Lawn, R. M. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. (ABCA1:消除过多组织胆固醇的守门人。) J Lipid Research 42, 1173-1179 (2001).

31. Lewis, G. F. & Rader, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. (HDL 代谢和胆固醇逆向运输的调节的新观点。) Circ Res 96, 1221-32 (2005).

32. Ji, Y 等. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. (清道夫受体 BI 促进高密度脂蛋白介导的细胞胆固醇流出。) J Biol Chem 272, 20982-5 (1997).

33. Liu, T., Krieger, M., Kan, H. Y. & Zannis, V. I. The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA- I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required

for efficient lipid transport. (ApoA- I 的 4 和 6 螺旋构形的突变体对清道夫受体 B 族 I 型(SR-BI)介导的胆固醇流出的影响表明有效的脂质运输需要重组高密度脂蛋白和 SR-BI 之间有效复合体的形成。) J Biol Chem 277, 21576-84 (2002).

34. Gu, X., Kozarsky, K. & Krieger, M. Scavenger receptor class B, type I -mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. (向高和低密度脂蛋白的清道夫受体 B 族 I 型介导的[3H]胆固醇流出依赖于结合受体的脂蛋白。) J Biol Chem 275, 29993-30001 (2000).

35. Zhang, Y 等. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. (体内清道夫受体 B 族 I 型(SR-BI)的肝表达是巨噬细胞胆固醇逆向运输的正调节子。) J Clin Invest 115, 2870-4 (2005).

36. Nakamura, K 等. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. (刺激细胞胆固醇向高密度脂蛋白流出的多种鼠 ATP 结合盒转运蛋白 G1 mRNA/同种型的表达和调节。) J Biol Chem 279, 45980-9 (2004).

37. Kennedy, M. A 等. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. (ABCG1 在介导胆固醇向 HDL 的流出和预防细胞脂质积累中具有重要作用。) Cell Metab 1, 121-31 (2005).

38. Brooks-Wilson, A 等. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. (Tangier 病和家族性高密度脂蛋白缺陷中 ABC1 的突变。) Nat Genet 22, 336-45 (1999).

39. Bodzioch, M 等. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. (编码 ATP 结合盒转运蛋白 1 的基因在 Tangier

病中突变。) Nat Genet 22, 347-51 (1999).

40. Rust, S 等. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. (Tangier 病是由编码 ATP 结合盒转运蛋白 1 的基因突变引起。) Nat Genet 22, 352-5 (1999).

41. Lawn, R. M 等. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. (Tangier 病基因产物 ABC1 控制细胞载脂蛋白介导的脂质去除途径。) J Clin Invest 104, R25-31 (1999).

42. Joyce, C, Freeman, L., Brewer, H. B., Jr. & Santamarina-Fojo, S. Study of ABCA1 function in transgenic mice. (转基因鼠中 ABCA1 功能的研究。) Arterioscler Thromb Vase Biol 23, 965-71 (2003).

43. Oram, J. F., Wolfbauer, G., Vaughan, A. M., Tang, C. & Albers, J. J. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. (磷脂转运蛋白与 ATP 结合盒转运蛋白 A 1 相互作用并且稳定 ATP 结合盒转运蛋白 A1, 以及加强细胞的胆固醇流出。) J Biol Chem 278, 52379-85 (2003).

44. Smith, J. D 等. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. (ABCA1 介导胆固醇和磷脂对载脂蛋白 A-I 的同时流出。) J Lipid Res 45, 635-44 (2004).

45. Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. & Sinclair, D. A. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. (一种酵母 sir2 和人 SIRT1 的推定负调节剂烟酰胺对沉默和加速老化的抑制。) J Biol Chem 277, 45099-45107 (2002).

46. McNeish, J 等. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. (小鼠中高密度脂蛋白缺陷和泡沫细胞积累同 ATP 结合盒转

运蛋白-1 靶向断裂。) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 4245-50 (2000).

47. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. (肝 X 受体/类视黄醇 X 受体对 ABC1 启动子的固醇依赖性反式激活。) J Biol Chem 275, 28240-28245 (2000).

48. Schwartz, K., Lawn, R. M. & Wade, D. P. ABC1 gene expression and apoAI-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. (LXR 调节 ABC1 基因表达和 apoAI 介导的胆固醇流出。) Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 794-802 (2000).

49. Venkateswaran, A 等. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha. (细胞核氧固醇受体 LXR α 对细胞胆固醇流出的控制。) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 12097-12102 (2000).

50. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. (细胞核受体和脂质生理学: 公开的 X 档案。) Science 294, 1866-1870 (2001).

51. Steffensen, K. R. & Gustafsson, J. A. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). (肝 X 受体(LXR)的推定代谢效应。) Diabetes 53, S36-S42 (2004).

52. Peet, D. J., Janowski, B. A. & Mangelsdorf, D. J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. (LXR: 新类型氧固醇受体。) Curr Opin Genet Dev 8, 571-5 (1998).

53. Schultz, J. R 等. Role of LXRs in control of lipogenesis. (LXR 在脂肪生成的控制中的作用。) Genes Dev 14, 2831-2838 (2000).

54. Kalaany, N. Y.等. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. (LXR 调节脂肪储存和氧化之间的平衡。) Cell Metab 1, 231-44 (2005).

55. von Eckardstein, A., Nofer, J. R. & Assmann, G. High density

lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. (高密度脂蛋白和动脉硬化。胆固醇流出和胆固醇逆向运输的作用。) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 13-27 (2001).

56. Linsel-Nitschke, P. & Tall, A. R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. (在动脉粥样硬化心血管疾病治疗中作为靶的 HDL。) *Nat Rev Drug Discov* 4, 193-205 (2005).

57. Simons, M 等. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. (胆固醇损耗抑制海马神经元中 β 淀粉状蛋白的形成。) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460-4 (1998).

58. Simons, K. & Ehelalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. (胆固醇、脂筏和疾病。) *J Clin Invest* 110, 597- 603 (2002).

59. Wang, C 等. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. (p300 对雌激素受体 α 铰链区的直接乙酰化调节反式激活和激素敏感性。) *J Biol Chem* 276, 18375-83 (2001).

60. Fu, M 等. Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. (雄激素受体乙酰化控制反式激活和 MEKK1 诱导的凋亡且不影响体外苏素化和反式抑制功能。) *Mol Cell Biol* 22, 3373-88 (2002).

61. Fu, M 等. Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. (雄激素受体乙酰化加强共活化子结合并且促进前列腺癌症细胞生长。) *Mol Cell Biol* 23, 8563-75 (2003).

62. Fu, M., Wang, C., Zhang, X. & G., P. R. Acetylation of nuclear receptors in cell growth and apoptosis. (细胞生长和凋亡中细胞核受体的乙酰化。) *Biochemical Pharmacology* 68, 1199-1208 (2004).

63. Schuster, G. U 等. Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. (肝 X 受体缺陷型小鼠的泡沫细胞的积累。) *Circulation* 106, 1147-1153 (2002).

64. Cao, G 等. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. (肝糖质新生抑制介导的肝 X 受体激动剂的抗糖尿病作用。) *J Biol Chem* 278, 1131-1136 (2003).

65. Joseph, S. B 等. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. (LXR 依赖性基因表达对巨噬细胞生存和先天免疫应答的重要性。) *Cell* 119, 299-309 (2004).

66. Lipford, J. R & Deshaies, R. J. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. (转录活化中泛素依赖性蛋白质水解的不同作用。) *Nature cell Biol.* 5, 845-850 (2003).

67. Lipford, J. R., Smith, G. T., Chi, Y. & Deshaies, R. J. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. (基因表达中活化子转换的推定刺激作用。) *Nature* 438, 113-116 (2005).

68. Pagans, S 等. SIRT1 regulates HTV transcription via Tat deacetylation. (SIRT1 经 Tat 脱乙酰化调节 HTV 转录。) *PLoS Biol* 3, e41 (2005).

69. Kitamura, Y. I 等. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. (FoxO1 通过 NeuroD 和 MafA 诱导防止胰腺 β 细胞衰竭。) *Cell Metab* 2, 153-63 (2005).

70. Lutjohann, D 等. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. (人脑中胆固醇体内稳态: 24S 羟基胆固醇从脑向循环系统的年龄依赖性流动的证据。) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9799-9804 (1996).

71. Lutjohann, D 等. Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. (在老年淀粉样前体蛋白转基因鼠脑中胆固醇相关的固醇的概述。) *J Lipid Research* 43, 1078-1085 (2002).

72. Chawla, A 等. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. (胆固醇流出和动脉粥样硬化牵涉巨噬细胞中的 PPAR γ -LXR-ABCA1 路径) Mol Cell 7, 161-71 (2001).

73. Hogan, B., Beddington, R, Costantini, F. & Lacy, E. Manipulating the Mouse Embryo, a laboratory manual. (操作鼠胚胎, 实验室手册。) Second Edition, 260-261 (1994).

74. Vinals, M., Xu, S., Vasile, E. & Krieger, M. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. (高密度脂蛋白(HDL)受体 SR-BI 上 N-连接糖基化位点的识别和其对 HDL 结合和选择性脂质摄取的影响的评估。) J Biol Chem 278, 5325-32 (2003).

75. Parathath, S 等. Glycine 420 near the C-terminal transmembrane domain of SR-BI is critical for proper delivery and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. (接近 SR-BI 的 C 末端跨膜区的甘氨酸 420 对高密度脂蛋白胆固醇酯的适当传递和代谢的重要性。) J Biol Chem 279, 24976-85 (2004).

76. Takahashi, Y., Rayman, J. B. & Dynlacht, B. D. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. (体内由 E2F 和 pRB 家族结合的启动子的分析: 特有的 E2F 蛋白质介导活化和抑制。) Genes Dev 14, 804-16 (2000).

77. Blander, G 等. DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation. (乙酰化调节 Werner 解旋酶的 DNA 损坏诱导的易位。) J Biol Chem 277, 50934-40 (2002).

78. Denis, M 等. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. (寡聚人 ATP 结合盒转运蛋白 A1 的

表征。确定新生的高密度脂蛋白颗粒结构的潜在暗示。) J Biol Chem 279, 41529-36 (2004).

79. VandenDriessche, T.; Vanslembrouck, V.; Goovaerts, I.; Zwinnen, H.; Vanderhaeghen, M. -L.; Collen, D.; Chuah, M. K. L.: Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. (体内逆转录病毒基因在因子 VIII 缺陷型鼠中转移后, 人凝血因子 VIII 的长期表达和血友病 A 的矫正。) Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 10379-10384 (1999).

80. Roth, D. A.; Tawa, N. E., Jr.; O'Brien, J. M.; Treco, D. A.; Selden, R. F.: Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. (在严重血友病 A 患者中, 编码凝血因子 VIII 的基因的非病毒转移。) New Eng. J. Med. 344: 1735-1742 (2001).

81. Goudy, K.; Song, S.; Wasserfall, C; Zhang, Y. C; Kapturczak, M.; Muir, A.; Powers, M.; Scott-Jorgensen, M.; Campbell-Thompson, M.; Crawford, J. M.; Ellis, T. M.; Flotte, T. R.; Atkinson, M. A.: Adeno-associated virus vector-mediated IL-10 gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. (腺伴随病毒载体介导的 IL-10 基因传递预防 NOD 鼠的 1 型糖尿病。) Proc. Nat. Acad. Sci. 98: 13913- 13918 (2001).

82. Wells DJ. Curr Opin Drug Discov Devel. Viral and non-viral methods for gene transfer into skeletal muscle. (基因转运到骨骼肌中的病毒和非病毒方法。) 9(2): 163-8 (2006).

83. Post DE, Shim H, Toussaint-Smith E, Van Meir EG. Cancer scene investigation: how a cold virus became a tumor killer. (癌症背景调查: 感冒病毒如何成为肿瘤杀手。) Future Oncol. 1(2):247-58 (2005).

84. Takahashi S, Ito Y, Hatake K, Sugimoto Y. Gene therapy for breast cancer. -Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. (乳腺癌的基因治疗——癌症

研究医院的乳腺癌临床基因治疗试验和 MDR1 基因治疗试验的回顾。)Breast Cancer. 13(1):8-15 (2006).

85. Broedl UC, Rader DJ. Gene therapy for lipoprotein disorders. (脂蛋白病症的基因治疗。) Expert Opin Biol Ther. 5(8): 1029-38 (2005).

86. Miyake H, Hara I, Gleave ME. Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic. (靶向簇蛋白基因的前列腺癌的反义寡脱氧核苷酸治疗: 温哥华经验从发现到临床。) Int J Urol. Sep. 12(9):785-94 (2005).

87. Satoh T, Irie A, Egawa S, Baba S In situ gene therapy for prostate cancer. (前列腺癌的原位基因治疗。) Curr Gene Ther. 5(1):111-9 (2005).

<110> 麻省理工学院

伦纳德·古亚兰迪

蒙迪·克里格尔

李小玲

<120> SIRT1 和 LXR 的胆固醇调节复合体以及使用方法

<130> 407-02-PCT

<150> US 60/811,154

<151> 2006-06-06

<160> 20

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 747

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gln Pro Gly Gly Ser Pro Ser
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ala Asp Arg Glu Ala Ala Ser Ser Pro Ala Gly Glu Pro
20 25 30

Leu Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Glu Arg Ser Pro
35 40 45

Gly Glu Pro Gly Gly Ala Ala Pro Glu Arg Glu Val Pro Ala Ala Ala
50 55 60

Arg Gly Cys Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Glu
65 70 75 80

Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Glu Gln Glu Ala Gln Ala Thr Ala
85 90 95

Ala Ala Gly Glu Gly Asp Asn Gly Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Arg
100 105 110

Glu Pro Pro Leu Ala Asp Asn Leu Tyr Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu
115 120 125

Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp
130 135 140

Asn Leu Leu Phe Gly Asp Glu Ile Ile Thr Asn Gly Phe His Ser Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Glu Glu Asp Arg Ala Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp
165 170 175

Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu
180 185 190

Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu
195 200 205

Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val
210 215 220

Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile
225 230 235 240

Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile
245 250 255

Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp
260 265 270

Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro
275 280 285

Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys
290 295 300

Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln
305 310 315 320

Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu
325 330 335

Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln
340 345 350

Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr
355 360 365

Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg
370 375 380

Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala
385 390 395 400

Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu
405 410 415

Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu
420 425 430

Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val
435 440 445

Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile
450 455 460

Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly
465 470 475 480

Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu
485 490 495

Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu
500 505 510

Lys Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro
515 520 525

Pro Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr
530 535 540

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala Ala
545 550 555 560

Lys Ser Asn Asp Asp Leu Asp Val Ser Glu Ser Lys Gly Cys Met Glu
565 570 575

Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala
580 585 590

Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly
595 600 605

Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp
610 615 620

Pro Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn
625 630 635 640

Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu
645 650 655

Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly
660 665 670

Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro
675 680 685

Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp
690 695 700

Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp
705 710 715 720

Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu
725 730 735

Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser
740 745

<210> 2

<211> 737

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

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

Ala Ala Ala Ala Met Glu Ala Ala Ser Gln Pro Ala Asp Glu Pro Leu
 20 25 30

Arg Lys Arg Pro Arg Arg Asp Gly Pro Gly Leu Gly Arg Ser Pro Gly
 35 40 45

Glu Pro Ser Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Ala Gly Cys Glu Ala Ala
 50 55 60

Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Leu Trp Arg Glu Ala Ala Gly Ala Ala
65 70 75 80

Ala Ser Ala Glu Arg Glu Ala Pro Ala Thr Ala Val Ala Gly Asp Gly
 85 90 95

Asp Asn Gly Ser Gly Leu Arg Arg Glu Pro Arg Ala Ala Asp Asp Phe
 100 105 110

Asp Asp Asp Glu Gly Glu Glu Glu Asp Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 115 120 125

Ala Ala Ala Ile Gly Tyr Arg Asp Asn Leu Leu Leu Thr Asp Gly Leu
 130 135 140

Leu Thr Asn Gly Phe His Ser Cys Glu Ser Asp Asp Asp Asp Arg Thr
145 150 155 160

Ser His Ala Ser Ser Ser Asp Trp Thr Pro Arg Pro Arg Ile Gly Pro
 165 170 175

Tyr Thr Phe Val Gln Gln His Leu Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr
180 185 190

Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp
195 200 205

Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro
210 215 220

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

Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val
245 250 255

Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr
260 265 270

Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met
275 280 285

Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe
290 295 300

Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys
305 310 315 320

Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr
325 330 335

Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Leu
340 345 350

Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr
355 360 365

Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg Gly Asp Ile Phe Asn Gln Val Val
370 375 380

Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys
385 390 395 400

Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg
405 410 415

Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly
420 425 430

Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro
435 440 445

His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu
450 455 460

His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu
465 470 475 480

Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro
485 490 495

Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu Lys Pro Pro Arg Pro Gln Lys Glu
500 505 510

Leu Val His Leu Ser Glu Leu Pro Pro Thr Pro Leu His Ile Ser Glu
515 520 525

Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr Val Pro Gln Asp Ser Ser Val Ile
530 535 540

Ala Thr Leu Val Asp Gln Ala Thr Asn Asn Asn Val Asn Asp Leu Glu
545 550 555 560

Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr
565 570 575

Ser Arg Asn Val Glu Asn Ile Asn Val Glu Asn Pro Asp Phe Lys Ala
580 585 590

Val Gly Ser Ser Thr Ala Asp Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Glu
595 600 605

Thr Val Arg Lys Cys Trp Pro Asn Arg Leu Ala Lys Glu Gln Ile Ser
610 615 620

Lys Arg Leu Glu Gly Asn Gln Tyr Leu Phe Val Pro Pro Asn Arg Tyr
625 630 635 640

Ile Phe His Gly Ala Glu Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu
645 650 655

Ser Ser Ser Ser Cys Gly Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser
660 665 670

Pro Ser Leu Glu Glu Pro Leu Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe
675 680 685

Tyr Asn Gly Leu Glu Asp Asp Thr Glu Arg Pro Glu Cys Ala Gly Gly
690 695 700

Ser Gly Phe Gly Ala Asp Gly Gly Asp Gln Glu Val Val Asn Glu Ala
705 710 715 720

Ile Ala Thr Arg Gln Glu Leu Thr Asp Val Asn Tyr Pro Ser Asp Lys
725 730 735

Ser

<210> 3

<211> 447

<212> PRT

<213> 人类

<400> 3

Met Ser Leu Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Asp Ile Pro Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Val Glu Leu Trp Lys Pro Gly Ala Gln Asp Ala Ser Ser Gln Ala
20 25 30

Gln Gly Gly Ser Ser Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro His
35 40 45

Ser Ala Gly Gly Thr Ala Gly Val Gly Leu Glu Ala Ala Glu Pro Thr
50 55 60

Ala Leu Leu Thr Arg Ala Glu Pro Pro Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
65 70 75 80

Pro Gln Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu
85 90 95

Leu Cys Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val
100 105 110

Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys
115 120 125

Gly Ala His Tyr Ile Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr
130 135 140

Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln
145 150 155 160

Ala Gly Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu
165 170 175

Lys Lys Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala His Ala Thr Ser Leu
180 185 190

Pro Pro Arg Arg Ser Ser Pro Pro Gln Ile Leu Pro Gln Leu Ser Pro
195 200 205

Glu Gln Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys
210 215 220

Asn Arg Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Met
225 230 235 240

Ala Pro Asp Pro His Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His
245 250 255

Phe Thr Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala
260 265 270

Lys Gln Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala
275 280 285

Leu Leu Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg
 290 295 300

Arg Tyr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser
 305 310 315 320

Tyr Asn Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile
 325 330 335

Asn Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn
 340 345 350

Asp Ala Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp
 355 360 365

Arg Pro Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr
 370 375 380

Tyr Val Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile His His Pro His Asp
 385 390 395 400

Arg Leu Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr
 405 410 415

Leu Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp
 420 425 430

Lys Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
 435 440 445

<210> 4

<211> 461

<212> PRT

<213> 人类

<400> 4

Met Ser Ser Pro Thr Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Leu Pro Gly Asn
1 5 10 15

Gly Pro Pro Gln Pro Gly Ala Pro Ser Ser Ser Pro Thr Val Lys Glu
20 25 30

Glu Gly Pro Glu Pro Trp Pro Gly Gly Pro Asp Pro Asp Val Pro Gly
35 40 45

Thr Asp Glu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Thr Asp Trp Val Ile Pro Asp
50 55 60

Pro Glu Glu Glu Pro Glu Arg Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys
65 70 75 80

Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly
85 90 95

Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg
100 105 110

Arg Ser Val Val Arg Gly Gly Ala Arg Arg Tyr Ala Cys Arg Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met Arg Arg Lys Cys Gln Gln Cys
130 135 140

Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly Met Arg Glu Gln Cys Val Leu
145 150 155 160

Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Lys Ile Arg Lys Gln Gln Gln Gln
165 170 175

Glu Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Val Gly Pro Gln Gly Ser Ser
180 185 190

Ser Ser Ala Ser Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Gly Ser Glu Ala Gly
195 200 205

Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Val Gln Leu Thr Ala Ala Gln
210 215 220

Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn Lys
225 230 235 240

Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly Ala
245 250 255

Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr
260 265 270

Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln
275 280 285

Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu
290 295 300

Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg Tyr
305 310 315 320

Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr Ser
325 330 335

Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro
340 345 350

Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp Ala
355 360 365

Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro
370 375 380

Asn Val Gln Glu Pro Gly Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr Val
385 390 395 400

Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln Leu
405 410 415

Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser
420 425 430

Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys
435 440 445

Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
450 455 460

<210> 5

<211> 445

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Met Ser Leu Trp Leu Glu Ala Ser Met Pro Asp Val Ser Pro Asp Ser
1 5 10 15

Ala Thr Glu Leu Trp Lys Thr Glu Pro Gln Asp Ala Gly Asp Gln Gly
20 25 30

Gly Asn Thr Cys Ile Leu Arg Glu Glu Ala Arg Met Pro Gln Ser Thr
 35 40 45

Gly Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Glu Ser Ala Glu Pro Thr Ala Leu
 50 55 60

Leu Pro Arg Ala Glu Thr Leu Pro Glu Pro Thr Glu Leu Arg Pro Gln
 65 70 75 80

Lys Arg Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly Asn Glu Leu Cys
 85 90 95

Ser Val Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser
 100 105 110

Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Ile Lys Gly Ala
 115 120 125

Arg Tyr Val Cys His Ser Gly Gly His Cys Pro Met Asp Thr Tyr Met
 130 135 140

Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Arg Gln Ala Gly
 145 150 155 160

Met Arg Glu Glu Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Leu Lys Lys
 165 170 175

Leu Lys Arg Gln Glu Glu Glu Gln Ala Gln Ala Thr Ser Val Ser Pro
 180 185 190

Arg Val Ser Ser Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Gln
 195 200 205

Leu Gly Met Ile Glu Lys Leu Val Ala Ala Gln Gln Gln Cys Asn Arg
210 215 220

Arg Ser Phe Ser Asp Arg Leu Arg Val Thr Pro Trp Pro Ile Ala Pro
225 230 235 240

Asp Pro Gln Ser Arg Glu Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe Thr
245 250 255

Glu Leu Ala Ile Val Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys Gln
260 265 270

Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu Leu
275 280 285

Lys Thr Ser Ala Ile Glu Val Met Leu Leu Glu Thr Ser Arg Arg Tyr
290 295 300

Asn Pro Gly Ser Glu Ser Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Asn
305 310 315 320

Arg Glu Asp Phe Ala Lys Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn Pro
325 330 335

Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Asn Glu Leu Gln Leu Asn Asp Ala
340 345 350

Glu Phe Ala Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Phe Ser Ala Asp Arg Pro
355 360 365

Asn Val Gln Asp Gln Leu Gln Val Glu Arg Leu Gln His Thr Tyr Val
370 375 380

Glu Ala Leu His Ala Tyr Val Ser Ile Asn His Pro His Asp Arg Leu
385 390 395 400

Met Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu Ser
 405 410 415

Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys Lys
 420 425 430

Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
 435 440 445

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

Met Ser Ser Pro Thr Ser Ser Leu Asp Thr Pro Val Pro Gly Asn Gly
 1 5 10 15

Ser Pro Gln Pro Ser Thr Ser Ala Thr Ser Pro Thr Ile Lys Glu Glu
 20 25 30

Gly Gln Glu Thr Asp Pro Pro Pro Gly Ser Glu Gly Ser Ser Ser Ala
 35 40 45

Tyr Ile Val Val Ile Leu Glu Pro Glu Asp Glu Pro Glu Arg Lys Arg
 50 55 60

Lys Lys Gly Pro Ala Pro Lys Met Leu Gly His Glu Leu Cys Arg Val
 65 70 75 80

Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Asn Val Leu Ser Cys Glu
 85 90 95

Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Val His Gly Gly Ala Gly
 100 105 110

Arg Tyr Ala Cys Arg Gly Ser Gly Thr Cys Gln Met Asp Ala Phe Met
115 120 125

Arg Arg Lys Cys Gln Leu Cys Arg Leu Arg Lys Cys Lys Glu Ala Gly
130 135 140

Met Arg Glu Gln Cys Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Arg Lys Lys Arg
145 150 155 160

Ile Gln Lys Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Ser Glu Pro Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Ser Gly Arg Pro Ala Ala Ser Pro Gly Thr Ser Glu Ala
180 185 190

Ser Ser Gln Gly Ser Gly Glu Gly Glu Gly Ile Gln Leu Thr Ala Ala
195 200 205

Gln Glu Leu Met Ile Gln Gln Leu Val Ala Ala Gln Leu Gln Cys Asn
210 215 220

Lys Arg Ser Phe Ser Asp Gln Pro Lys Val Thr Pro Trp Pro Leu Gly
225 230 235 240

Ala Asp Pro Gln Ser Arg Asp Ala Arg Gln Gln Arg Phe Ala His Phe
245 250 255

Thr Glu Leu Ala Ile Ile Ser Val Gln Glu Ile Val Asp Phe Ala Lys
260 265 270

Gln Val Pro Gly Phe Leu Gln Leu Gly Arg Glu Asp Gln Ile Ala Leu
275 280 285

Leu Lys Ala Ser Thr Ile Glu Ile Met Leu Leu Glu Thr Ala Arg Arg
290 295 300

Tyr Asn His Glu Thr Glu Cys Ile Thr Phe Leu Lys Asp Phe Thr Tyr
305 310 315 320

Ser Lys Asp Asp Phe His Arg Ala Gly Leu Gln Val Glu Phe Ile Asn
325 330 335

Pro Ile Phe Glu Phe Ser Arg Ala Met Arg Arg Leu Gly Leu Asp Asp
340 345 350

Ala Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Ala Ile Asn Ile Phe Ser Ala Asp Arg
355 360 365

Pro Asn Val Gln Glu Pro Ser Arg Val Glu Ala Leu Gln Gln Pro Tyr
370 375 380

Val Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Thr Arg Ile Lys Arg Pro Gln Asp Gln
385 390 395 400

Leu Arg Phe Pro Arg Met Leu Met Lys Leu Val Ser Leu Arg Thr Leu
405 410 415

Ser Ser Val His Ser Glu Gln Val Phe Ala Leu Arg Leu Gln Asp Lys
420 425 430

Lys Leu Pro Pro Leu Leu Ser Glu Ile Trp Asp Val His Glu
435 440 445

<210> 7

<211> 4107

<212> DNA

<213> 人类

<400> 7

gtcgcgaggc agcagaggag gcgaggagg agggccagag aggcagttgg aagatggcgg	60
acgaggcggc cctgccectt cagcccggcg gctccccctc ggcggcgggg gccgacagg	120
aggccgcgtc gtccccgcc ggggagccgc tccgcaagag gccgcggaga gatggteccg	180
gcctcgagcg gagcccgggc gagcccgtg gggcgccccc agagcgtgag gtgcccggcg	240
cggccagggg ctgcccgggt gcggcgggcg cggcgctgtg gcgggaggcg gaggcagagg	300
cggcggcggc aggcggggag caagaggccc aggcgactgc ggcggtggg gaaggagaca	360
atgggcggg cctgcagggc ccctctcggg agccaccgct ggccgacaac ttgtacgacg	420
aagacgacga cgacagggc gaggaggagg aagaggcggc ggcggcggcg attgggtacc	480
gagataacct tctgttcggg gatgaaatta tcaactaatg ttttcattcc tgtgaaagt	540
atgaggagga tagagcctca catgcaagct ctagtgactg gactccaagg ccacgatag	600
gtccatatac tttgttcag caacatctta tgattggcac agatcctcga acaattctta	660
aagatttatt gccgaaaca atacctccac ctgagttgga tgatatgaca ctgtggcaga	720
ttgttattaa taccctttca gaaccaccaa aaaggaaaaa aagaaaagat attaatacaa	780
ttgaagatgc tgtgaaatta ctgcaagagt gcaaaaaaat tatagttcta actggagctg	840
gggtgtctgt ttcattgtga atacctgact tcaggtaag ggatgggtatt tatgctcgcc	900
ttgtctaga cttccagat cttccagat ctcaagcgat gtttgatatt gaatatctca	960
gaaaagatcc aagaccatc ttcaagttg caaaggaaat atatcctgga caattccagc	1020
catctctctg tcacaaatc atagccttgt cagataagga aggaaaacta cttcgcaact	1080
ataccagaa catagacacg ctggaacagg ttgcgggaat ccaaaggata attcagtgtc	1140
atggttcctt tgcaacagea tcttgccgta ttgttaaata caaagttgac tgtgaagctg	1200
tacgaggaga tatttttaat caggtagttc ctgatgtcc taggtgccc gctgatgaac	1260

cgcttgctat catgaaacca gagattgtgt ttttgggtga aaatttacca gaacagtttc	1320
atagagccat gaagtatgac aaagatgaag ttgacctect cattgttatt gggctcttccc	1380
tcaaagtaag accagtagca ctaattccaa gttccatacc ccatgaagtg cctcagatat	1440
taattaatag agaacctttg cctcatctgc attttgatgt agagcttctt ggagactgtg	1500
atgtcataat taatgaattg tgtcataggt taggtgggtga atatgccaaa ctttgcgtga	1560
accctgtaaa gctttcagaa attactgaaa aacctccacg aacacaaaaa gaattggctt	1620
attgttcaga gttgccaccc acacctcttc atgtttcaga agactcaagt tcaccagaaa	1680
gaacttcacc accagattct tcagtgattg tcacactttt agaccaagca gctaagagta	1740
atgatgattt agatgtgtct gaatcaaaag gttgtatgga agaaaaacca caggaagtac	1800
aaacttctag gaatgttgaa agtattgctg aacagatgga aaatccggat ttgaagaatg	1860
ttggttctag tactggggag aaaaatgaaa gaacttcagt ggctggaaca gtgagaaaat	1920
gctggcctaa tagagtgga aaggagcaga ttagtaggcg gcttgatggt aatcagtatc	1980
tgtttttgcc accaaatcgt tacattttcc atggcgctga ggtatattca gactctgaag	2040
atgacgtctt atcctctagt tcttgtggca gtaacagtga tagtgggaca tgccagagtc	2100
caagtttaga agaaccatg gaggatgaaa gtgaaattga agaattctac aatggcttag	2160
aagatgagcc tgatgttcca gagagagctg gaggagctgg atttgggact gatggagatg	2220
atcaagaggc aattaatgaa gctatatctg tgaaacagga agtaacagac atgaactatc	2280
catcaaaca atcatagtgt aataattgtg caggtacagg aattgttcca ccagcattag	2340
gaactttagc atgtcaaat gaatgtttac ttgtgaactc gatagagcaa ggaaaccaga	2400
aaggtgtaat atttataggt tggtaaaata gattgttttt catggataat ttttaacttc	2460
attatttctg tacttgtaca aactcaacac taactttttt ttttttaaaa aaaaaaaggt	2520
actaagtatc ttcaatcagc tgttgggtcaa gactaacttt cttttaaagg ttcatttgta	2580

tgataaatc atatgtgat atataatfff tttgttttg tctagttagt ttcaacattt	2640
ttaaagtttt caaaaagcca tcggaatgtt aaattaatgt aaaggacag ctaatctaga	2700
ccaaagaatg gtattttcac tttctttgt aacattgaat ggtttgaagt actcaaaatc	2760
tgttacgcta aacttttgat tctttaacac aattatffff aaacactggc attttccaaa	2820
actgtggcag ctaacttttt aaaatctcaa atgacatgca gtgtgagtag aaggaaagtc	2880
acaatatgtg gggagagcac tcggttgtct ttacttttaa aagtaatact tgggtgctaag	2940
aatttcagga ttattgtatt taegtccaaa tgaagatggc ttttgtactt cctglggaca	3000
tgtagtaatg tctatattgg ctcataaaac taacctgaaa aacaaataaa tgetttggaa	3060
atgtttcagt tgetttagaa acattagtgc ctgcctggat ccccttagtt ttgaaatatt	3120
tgccattgtt gtttaatac ctactactgt ggtagagctt gcattgatct tttccacaag	3180
tattaaactg ccaaaatgtg aatatgcaaa gcctttctga atctataata atggtacttc	3240
tactggggag agtgtaatat ttggactgc tgttttccat taatgaggag agcaacaggc	3300
ccctgattat acagttccaa agtaataaga tgtaattgt aattcagcca gaaagtacat	3360
gtctcccatg gggaggattt ggtgttaaata accaaactgc tagccctagt attatggaga	3420
tgaacatgat gatgtaactt gtaatagcag aatagttaata gaatgaaact agttcttata	3480
atttatcttt atttaaaagc ttagectgcc ttaaaactag agatcaactt tctcagetgc	3540
aaaagcttct agtctttcaa gaagttcata ctttatgaaa ttgcacagta agcatttatt	3600
tttcagacca tttttgaaca tcaactctaa attaataaag tattctcttg ttgctttagt	3660
atttattaca ataaaaaggg ttgaaatat agctgttctt tatgcataaa acaccagct	3720
aggaccatta ctgccagaga aaaaaatcgt attgaatggc catttcccta cttataagat	3780
gtctcaatct gaatttattt ggctacacta aagaatgcag tatatttagt tttccatttg	3840
catgatgttt gtgtgctata gatgatattt taaattgaaa agtttgtttt aaattatttt	3900

tacagtgaag actgttttca gctcttttta tattgtacat agtcttttat gtaatttact	3960
ggcatatgtt ttgtagactg tttaatgact ggatatcttc ctteaacttt tgaaatacaa	4020
aaccagtgtt ttttacttgt aactgtttt aaagtctatt aaaattgtca tttgactttt	4080
ttctgttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	4107

<210> 8

<211> 3849

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 8

gcggagcaga ggaggcgagg gcggagggcc agagaggcag ttggaagatg gcggacgagg	60
tggcgctcgc ccttcaggcc gccggctccc ctccgcggc gcccgccatg gagcccgct	120
cgcagccggc ggacgagccg ctccgaaga gccccgcg agacgggcct ggctcgggc	180
gcagcccggg cgagccgagc gcagcagtgg cgcggcggc cgcgggtgt gagcggcga	240
gcgcccggc cccggcgcg ctgtggcggg aggcggcagg gccggcgcg agcgcgagc	300
gggaggcccc gccgacggc gtggccgggg acggagacaa tgggtccgc ctgcggcgg	360
agccgagggc ggtgacgac ttcgacgac acgaggcgga ggaggaggac gagcggcgg	420
cgccagcggc gccggcagc atcggtacc gagacaacct cctgttgacc gatggactcc	480
tcactaatgg ctttcattcc tgtgaaagt atgacgatga cagaacgtca cacgccagct	540
ctagtgactg gactccggc ccgggatag gtccatatac tttgttcag caacatctca	600
tgattggcac cgatccctga acaattctta aagatttatt accagaaaca attcctccac	660
ctgagctgga tgatatgac ctgtggcaga ttgttattaa tatcctttca gaaccacaa	720
agcgaaaaa aagaaaagat atcaatacaa ttgaagatgc tgtgaagtta ctgcaggagt	780
gtaaaaagat aatagttctg actggagctg gggtttctgt ctctgtggg attcctgact	840
tcagatcaag agacggtatc tatgctgcc ttgcggtgga ctcccagac ctcccagacc	900

ctcaagccat gtttgatatt gagtatttta gaaaagaccc aagaccattc ttcaagtttg	960
caaaggaaat atatcccgga cagttccagc cgtctctgtg tcacaaattc atagctttgt	1020
cagataagga aggaaaacta cttcgaaatt atactcaaaa tatagatacc ttggagcagg	1080
ttgcaggaat ccaaaggatc cttcagtgtc atggttcctt tgcaacagca tcttgccctga	1140
tttgtaaata caaagttgat tgtgaagctg ttcgtggaga catttttaac caggtagttc	1200
ctcggtgccc taggtgccc gctgatgagc cacttgccat catgaagcca gagattgtct	1260
tctttggtga aaacttacca gaacagtttc atagagccat gaagtatgac aaagatgaag	1320
ttgacctcct cattgttatt ggatcttctc tgaaagttag accagtagca ctaattccaa	1380
gttctatacc ccatgaagtg cctcaaatat taataaatag ggaacctttg cctcatclac	1440
attttgatgt agagctcctt ggagactgag atgttataat taatgagttg tgcataagc	1500
taggtggtga atatgcaaaa ctttggttga accctgtaaa gctttcagaa attactgaaa	1560
aacctccacg cccacaaaag gaattgggtc atttatcaga gttgccacca acacctctc	1620
atatttcgga agactcaagt tcacctgaaa gaactgtacc acaagactct tctgtgattg	1680
ctacacttgt agaccaagca acaacaaca atgttaatga tttagaagta tctgaatcaa	1740
gttgtgtgga agaaaaacca caagaagtag agactagtag gaatgttgag aacattaatg	1800
tggaaaatcc agattttaag gctgttggtt ccagtactgc agacaaaaat gaaagaactt	1860
cagttgcaga aacagtgaga aaatgctggc ctaatagact tgcaaaggag cagattagta	1920
agcggcttga gggtaatcaa tacctgtttg taccacaaa tegttacata ttccacggtg	1980
ctgaggtata ctcaactct gaagatgacg tcttgctctc tagttctgt ggcagtaaca	2040
gtgacagtgg cacatgccag agtccaagt tagaagaacc cttggaagat gaaagtga	2100
ttgaagaatt ctacaatggc ttggaagatg atacggagag gcccgaaatgt gctggaggat	2160
ctggatttgg agctgatgga ggggatcaag aggttggtta tgaagctata gctacaagac	2220

aggaattgac agatgtaaac tatccatcag acaaatcata acactattga agctgtccgg	2280
attcaggaat tgctccacca gcattgggaa ctttagcatg tcaaaaaaat gaatgtttac	2340
ttgtgaactt gaacaaggaa atctgaaaga tgtattatit atagactgga aaatagattg	2400
tcttcttgga taattttctaa agttccatca tttctgtttg tacttgtaca ttcaaacctg	2460
ttggttgact tcatcttccct ttcaaggctc atttgtatga tacattcgta tgtatgtata	2520
atthttgttt ttgcctaattg agtttcaacc ttttaaagtt ttcaaaagcc attggaatgt	2580
taatgtaaag ggaacagctt atctagacca aagaatggta tttcacactt tttgtttgt	2640
aacattgaat agtttaaagc cctcaatttc tgtctgctg aacttttatt tttaggacag	2700
ttacttttt aaacactggc attttccaaa acttgtggca gctaactttt taaaatcaca	2760
gatgacttgt aatgtgagga gtcagcaccc tgtctggagc actcaaaact tgggctcagt	2820
gtgtgaagcg tacttactgc atcgthtttg tacttgctgc agacgtggta atgtccaaac	2880
aggeccctga gactaatctg ataatgatt ttgaaatgtg tttcagttgt tctagaaaca	2940
atagtgcctg tctatatagg tccccttagt ttgaatattt gccattgttt aattaaatac	3000
ctatcactgt ggtagagcct gcatagatct tcaccacaaa tactgccaag atgtgaatat	3060
gcaaagcctt tctgaatcta ataattgtac ttctactggg gagagtgtaa tattttggac	3120
tgtgtttttt ccattaatga ggaaagcaat aggectctta attaaagtcc caaagtcata	3180
agataaattg tagctcaacc agaaagtaca ctgttgccctg ttgaggattt ggtgtaatgt	3240
atcccaaggt gttagccttg tattatggag atgaatacag atccaatagt caaatgaaac	3300
tagttcttag ttatttaaaa gcttagcttg ccttaaaact agggatcaat tttctcaact	3360
gcagaaactt ttagcctttc aaacagttca cacctcagaa agtcagtatt tattttacag	3420
acttcttttg aacattgccc ccaaatttaa atattcatgt gggtttagta tttattacaa	3480
aaaaatgatt tgaaatatag ctgttcttta tgcataaaat acccagttag gaccattact	3540

```

gccagaggag aaaagtatta agtagctcat ttcctacct aaaagataac tgaatttatt 3600
tggctacact aaagaatgca gtatatttag tttccattt gcatgatgtg tttgtgctat 3660
agacaatatt ttaaattgaa aaatttgttt taaattattt ttacagtga gactgttttc 3720
agctcttttt atattgtaca tagactttta tgtaatctgg catatgtttt gtagaccgtt 3780
taatgactgg attatcttcc tccaactttt gaaatacaaa aacagtgttt tatactaaaa 3840
aaaaaaaaa 3849

```

```

<210> 9
<211> 1528
<212> DNA
<213> 人类

```

```

<400> 9
cagtgccttg gtaatgacca gggtccaga aagagatgtc cttgtggctg ggggccctg 60
tgctgacat tctctctgac tctgcggtgg agctgtggaa gccaggcga caggatgcaa 120
gcagccaggc ccagggaggc agcagctgca tctcagaga ggaagccagg atgccccact 180
ctgtggtggg taetgcaggg gtgggctgg aggtgcaga gccacagcc ctgtcacca 240
gggcagagcc ccttcagaa cccacagaga tccgtccaca aaagcggaaa aaggggccag 300
ccccaaaat gctggggaac gagctatgca gcgtgtgtgg ggacaaggcc tcgggcttcc 360
actacaatgt tctgagctgc gagggtgca agggattctt ccgccgcagc gtcataaagg 420
gagcgcacta catctgccac agtggcggcc actgccccat ggacacctac atgcgtcgca 480
agtgccagga gtgtcggttt cgcaaatgcc gtcaggctgg catgcgggag gagtgtgtcc 540
tgtcagaaga acagatccgc ctgaagaaac tgaagcggca agaggaggaa caggtcatg 600
ccacatcctt gccccccagg cgttctctac cccccaaaat cctgccccag ctgagcccg 660
aacaactggg catgatcgag aagctcgtcg ctgccagca acagtgtaac cggcgtcct 720

```

tttctgaccg gcttegagtc acgecttgge ccatggcacc agatccccat agccgggagg	780
cccgtcagca gcgctttgce cacttcactg agctggccat cgtctctgtg caggagatag	840
ttgactttgc taaacagcta cccggettec tgcagctcag ccgggaggac cagattgccc	900
tgctgaagac ctctgcgac gaggtgatgc ttctggagac atctcggagg tacaacctg	960
ggagtgcag tatcaccttc ctcaaggatt tcagttataa ccgggaagac ttgccaag	1020
cagggtgca agtggaaatc atcaacccca tcttegagtt ctccagggcc atgaatgac	1080
tgcaactcaa tgatgcgag ttgacctgc tcattgctat cagcatcttc tctgcagacc	1140
ggcccaacgt gcaggaccag ctccaggtag agaggctgca gcacacatat gtggaagccc	1200
tgcattgcta cgtctccatc caccatcccc atgaccgact gatgttccca cggatgctaa	1260
tgaaactggg gagcctccgg acctgagca gcgtccactc agagcaagtg ttgcaactgc	1320
gtctgcagga caaaaagctc ccaccgtgc tctctgagat ctgggatgtg cacgaatgac	1380
tgttctgtcc ccatattttc tgtttttctg gccggatggc tgaggcctgg tggtgcctc	1440
ctagaagtgg aacagactga gaaggcaca cattcctggg agctgggcaa ggagatctc	1500
ccgtggcatt aaaagagagt caaagggt	1528

<210> 10
 <211> 2037
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 10
 ctcttcgga cgtgacgca gggcggggtt gccggaagaa gtggcgaagt tacttttgag 60
 ggtatttgag tagcggcggg gtgtcagggg ctaaagagga ggacgaagaa aagcagagca 120
 agggaacca gggcaacagg agtagttcac tccgcgagag gccgtccacg agacccccgc 180
 gcgcagccat gagccccgc ccccgctggt gcttggagag gggcgggacc tggagagagg 240
 ctgctccgtg acccaccat gtctctctct accacagatt ccttgatac cccctgcct 300

ggaaatggcc cccctcagcc tggeccccct tcttcttcac ccactgtaaa ggaggagggt	360
cggagccgt ggcccggggg tccggaccct gatgtcccag gcaactgatga ggccagctca	420
gcctgcagca cagactgggt catcccagat cccgaagagg aaccagagcg caagcgaaaag	480
aagggeccag ccccgaaagt gctgggccac gagctttgcc gtgtctgtgg ggacaaggcc	540
tccgcttcc actacaacgt gctcagctgc gaagctgca agggcttctt ccggcgagct	600
gtggctccgtg gtggggccag gcgctatgcc tgccgggggtg gcggaacctg ccagatggac	660
gctttcatgc ggcgcaagtg ccagcagtgc cggctgcga agtgcaagga ggcagggatg	720
agggagcagt gcgtccttcc tgaagaacag atccggaaga agaagattcg gaaacaacag	780
cagcaggagt cacagtcaca gtgcagtcac cctgtggggc cgcagggcag cagcagctca	840
gcctctgggc ctggggcttc cctgtgtgga tctgaggcag gcagccaggc ctccggggaa	900
ggcgagggtg tccagctaac agcggctcaa gaactaatga tccagcagtt ggtggcggcc	960
caactgcagt gcaacaaacg ctctttctcc gaccagccca aagtcacgcc ctggcccttg	1020
ggcgagacc ccagtcaccg agatgcccgc cagcaacgct ttgcccactt cacggagctg	1080
gccatcatct cagtcagga gatcgtggac ttcgctaagc aagtgcctgg ttctctgcag	1140
ctgggcgggg aggaccagat cgcctctctg aaggcatcca ctatcgagat catgctgcta	1200
gagacagcca ggcgctacaa ccacgagaca gagtgtatca ctttcttgaa ggacttcacc	1260
tacagcaagg acgacttcca ccgtgcaggc ctgcaggtag agttcatcaa ccccatcttc	1320
gagttctcgc gggccatgcg gcggctgggc ctggacgacg ctgagtacgc cctgctcacc	1380
gccatcaaca tcttctcggc cgaccggccc aacgtgcagg agccggggccg cgtggaggcg	1440
ttgcagcagc cctacgtgga ggcgctgctg tctacacgc gcatcaagag gccgcaggac	1500
cagctgcgt tcccgcgcat gctcatgaag ctggtgagcc tgcgcacgct gagctctgtg	1560
cactcggagc aggtctctgc cttcggtctc caggacaaga agctgccgcc tctgtgtctg	1620

gagatctggg acgtccacga gtgaggggct ggccaccag cccacagcc ttgcctgacc 1680
 accctccagc agatagacgc cggcaccctt tctcttctct aggggtggaag gggccctggg 1740
 ccgagcctgt agacctatcg gctctcctcc cttgggataa gccccagtcc aggtccagga 1800
 ggctccctcc ctgcccagcg agtcttccag aaggggtgaa aggggttcag gtcccgacca 1860
 ctgacccttc ccggctgccc tccctcccca gtttacacct caagcccagc acgcagtgca 1920
 ccttgaacag agggagggga ggacccatgg ctctccccc tagcccgga gaccaggggc 1980
 ctctctcttc ctctgctttt atttaataaa aactaaaaac agaaaaaaaa aaaaaaa 2037

<210> 11
 <211> 1753
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 11
 gggaacgctg actctggagg ctgctgggat taggggtggg gtgactgaga agcagtcctt 60
 ctgtcagagc aaagagctc cagggtgagg agaggaagga gagagatgga actagaccgg 120
 tctgctggga aacgcgacag ttttggtaga gggacagtgt cttggtaatg tccagggtc 180
 caggaagaga tgtccttgtg gctggaggcc tcaatgcctg atgtttctcc tgattctgca 240
 acggagtgtg ggaagacaga acctcaagat gcaggagacc agggaggcaa caattgcate 300
 ctcaggagg aagccaggat gcccagtc actggggttg ctttagggat agggttggag 360
 tcagcagagc ctacagcctt gctccccagg gcagagacce tcccagagcc gacagagctt 420
 cgtccacaaa agcggaaaaa ggcccagcc cccaaaatgc tggggaacga gctgtgcagt 480
 gtctgtgggg acaaagctc tggttccat tacaacgtgc tgagctgca gggtgcaag 540
 ggattcttcc gccgcagtgt catcaaggga gcacgctatg tctgccacag cgggtgccc 600
 tgccccatgg acacctacat gcggcgaaa tgccaggagt gtgcacttcg caaatgcgc 660

caggcaggca tgaggagga gtgtgtgtg tcagaagaac agatccgctt gaagaaactg	720
aagcggcaag aagaggaaca ggetcaagcc acttcggtgt cccaagggt gtcctcacct	780
cctcaagtec tgccacagct cageccagag cagctgggca tgatcgagaa gctgggtggct	840
gccagcaac agtghtaacag ggcctccttc tcagaccgcc tgcgcgtcac gccttgccc	900
attgcaccg accctcagag cgggaagcc cgacaacagc gctttgccc ctttactgag	960
ctggccatcg tgtccgtgca ggagattgtt gactttgcca aacagctccc tggttctcta	1020
cagctcagea gggaggacca gatgccttg ctgaagacct ctgcaatga ggcctgctt	1080
ctggagacgt cagggaggta caaccccgcc agtgagagca tcaccttct caaggacttc	1140
agttacaacc gggaagactt tgccaaagca gggtgcagg tggagtcat caacccatc	1200
tttgagttct ccagagccat gaatgagctg caactcaatg atgtgagtt tgccttctc	1260
attgccatca gcctcttctc tgcagaccgg cccaacgtgc aggaccagct ccaagtagag	1320
aggtgcacac acacatatgt ggagccctg cagcctacg tctccatcaa ccacccccc	1380
gaccgactga tgttcccacg gatgctaag aagctgggtga gcctccgtac tttgagcagc	1440
gtccattcag agcaagtgtt tgcccttcgc ctgcaggaca aaaagcttcc ccctctgctg	1500
tctgagatct gggatgtcca cgagtactg tttaccgtg tcctttgtgt tgccacatg	1560
gcgaagctc actgactgct tcccacgggt ggagcagact gagaagggca gacattctg	1620
ggagctgggt gaaggagaga gccttcgta gcattaaggg agagtcaaca ggttgggtgt	1680
tttctggctg ctgggcagtt gggatctact aacgttgtat accatctgaa gaccttgtt	1740
acccaaccaa ata	1753

<210> 12
 <211> 1964
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 12

ggcgaagtta cttttgcttt tcgtcagca agcgtgttg cttcagcta ctcccaggt	60
tctgaagtta ctccaaagt gctgtggagg cacaatcacc ggtgcggaca cagaggcaac	120
tctgcctcc cagggcgtt tccaggcaa cagagtcgga gacccctgc gacccctc	180
ccgategcg gtgcagtcac gaccccgcc tccccctggt gcacggagag gggcggggcc	240
tggaacaagc aggtgtcttc gtgacctact atgtcttccc ccacaagttc tctggacct	300
cccgtgcctg ggaatggttc tctcagccc agtacctcg ccacgtcac cactattaag	360
gaagaggggc aggagactga tctctctcca ggtctgaag ggtccagctc tgcctacac	420
gtggtcatct tagagccaga ggatgagcct gagcgcaagc ggaagaaggg gccggccccg	480
aagatgctgg gccatgagct gtgccgcgtg tgcggagaca aggcctcggg ctccactac	540
aacgtgtcca gctgtgaagg ctgcaaagc tttctccggc gcagtgtggt ccacggtggg	600
gccgggcgt atgcctgtcg gggcagcgga acctgccaga tggatgcctt catgcggcgc	660
aagtgccagc tctgccggt gcgcaagtgc aaggaggctg gcctgcggga gcagtgcgtg	720
ctctctgagg agcagattcg gaagaaaagg attcagaagc agcaacagca gcagccacca	780
ccccatctg agccagcagc cagcagctca ggccggccag cggcctcccc tggcacttcg	840
gaagcaagca gccagggtc cggggaagga gagggcatcc agctgaccgc ggctcaggag	900
ctgatgatec agcagttagt tgccgcgcag ctgcagtga acaacgata tttctccgac	960
cagcccaaag tcacgccctg gccctgggt gcagacctc agtcccgaga tgcccgtcag	1020
caacgctttg cccacttcac cgagctagcc atcatctcgg tccaggagat tgtggacttt	1080
gccaagcagg tgccagggtt cttgcagttg ggccgggagg accagatgc cctcctgaag	1140
gcgtccacca ttgagatcat gttgctagaa acagccagac gctacaacca cgagacagaa	1200
tgcatacgt tctgaagga cttcacctac agcaaggacg acttcaccg tgcaggcttg	1260
caggtggaat tcatcaatcc catcttcgag ttctcgggg ccatgcggcg gctgggcctg	1320

gacgatgcag agtatgcctt gcttatcgcc atcaacatct tctcagccga tcggcctaata 1380
 gtgcaggagc ccagccgtgt ggaggccctg cagcagccat acgtggaggc gctcctctcc 1440
 tacacgagga tcaagcgcgc acaggaccag ctccgcttcc cagcatgct catgaagctg 1500
 gtgagcctgc gcaccctcag ctccgtgcac teggagcagg tctttgcatt gcgactccag 1560
 gacaagaagc tgccgccctt gctgtccgag atctgggatg tgcacgagta ggggcagcca 1620
 caagtgcgcc agccttggtg gtgtcttctt gaagatggac tcttcacctc tctcctctggg 1680
 gtgggaggac attgtcacgg cccagtcctt cgggctcagc ctcaaaactca gcggcagttg 1740
 gcactagaag gccccacccc acccattgag tcttccaaga gtggtgaggg tcacaggtcc 1800
 tagcctctga ccgttcccag ctgccctccc acccagctt acacctcagc ctaccacacc 1860
 atgcaccttg agtggagaga ggtagggca ggtggccccc cacagtggg agaccacagg 1920
 cctctcttc tgcccccttt atttaataaa aaaacaaaaa taaa 1964

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 13
 gctttctgct gactgactga actac 25

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 14
gaattactgc ttttgccgc g 21

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR 引物

<400> 15
gcagcccaac ttttcagaac 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR 引物

<400> 16
tccccctttgt ctttgtggac 20

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> PCR 引物

<400> 17
gctttctgct gactgactga actac 25

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> PCR 引物

<400> 18

tgcgtctctt tctcctaccc

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> PCR 引物

<400> 19

aggcaggtgg atcatttgag

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> PCR 引物

<400> 20

ccaaacatct gggtctctgt

20

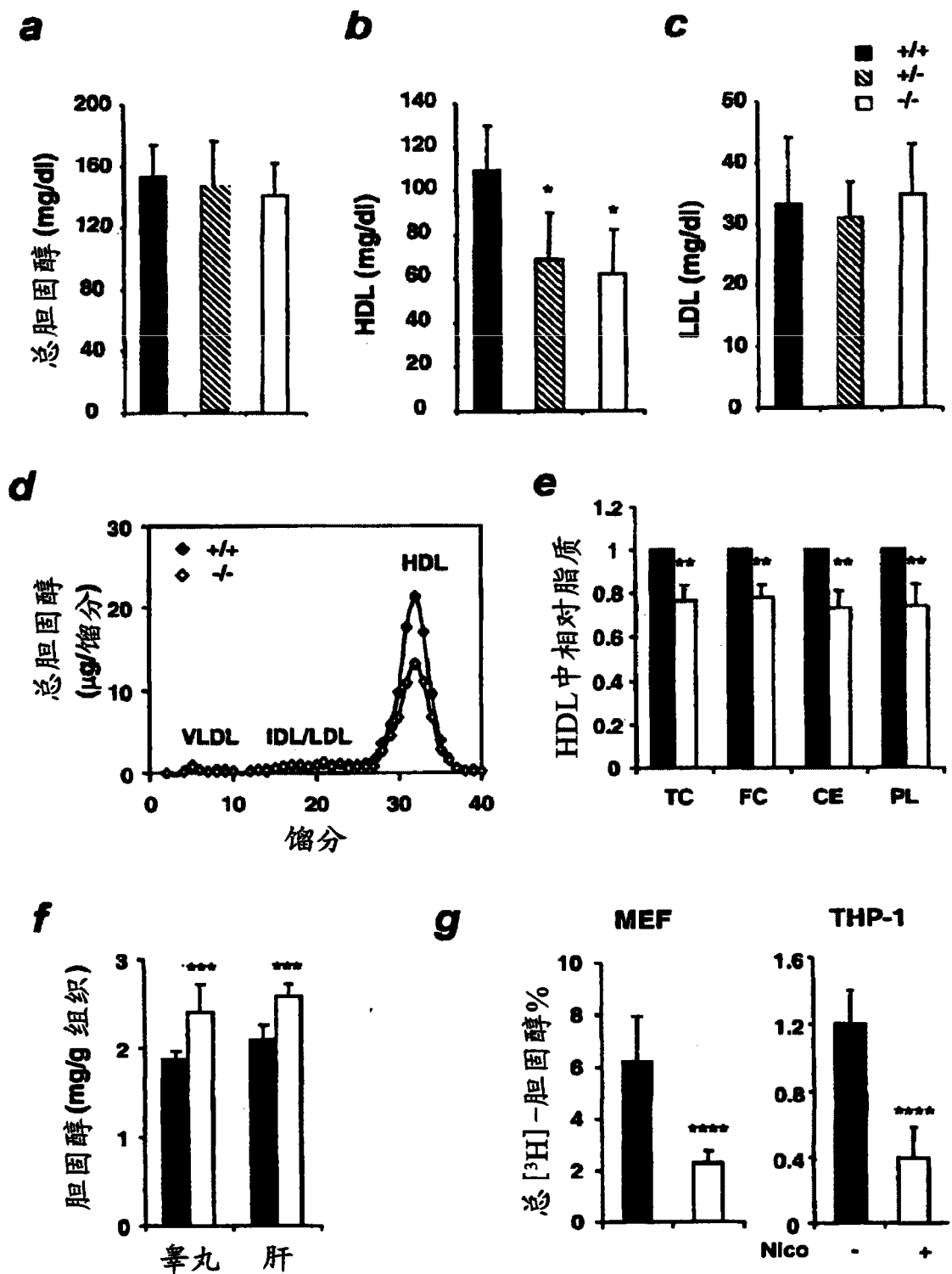


图1

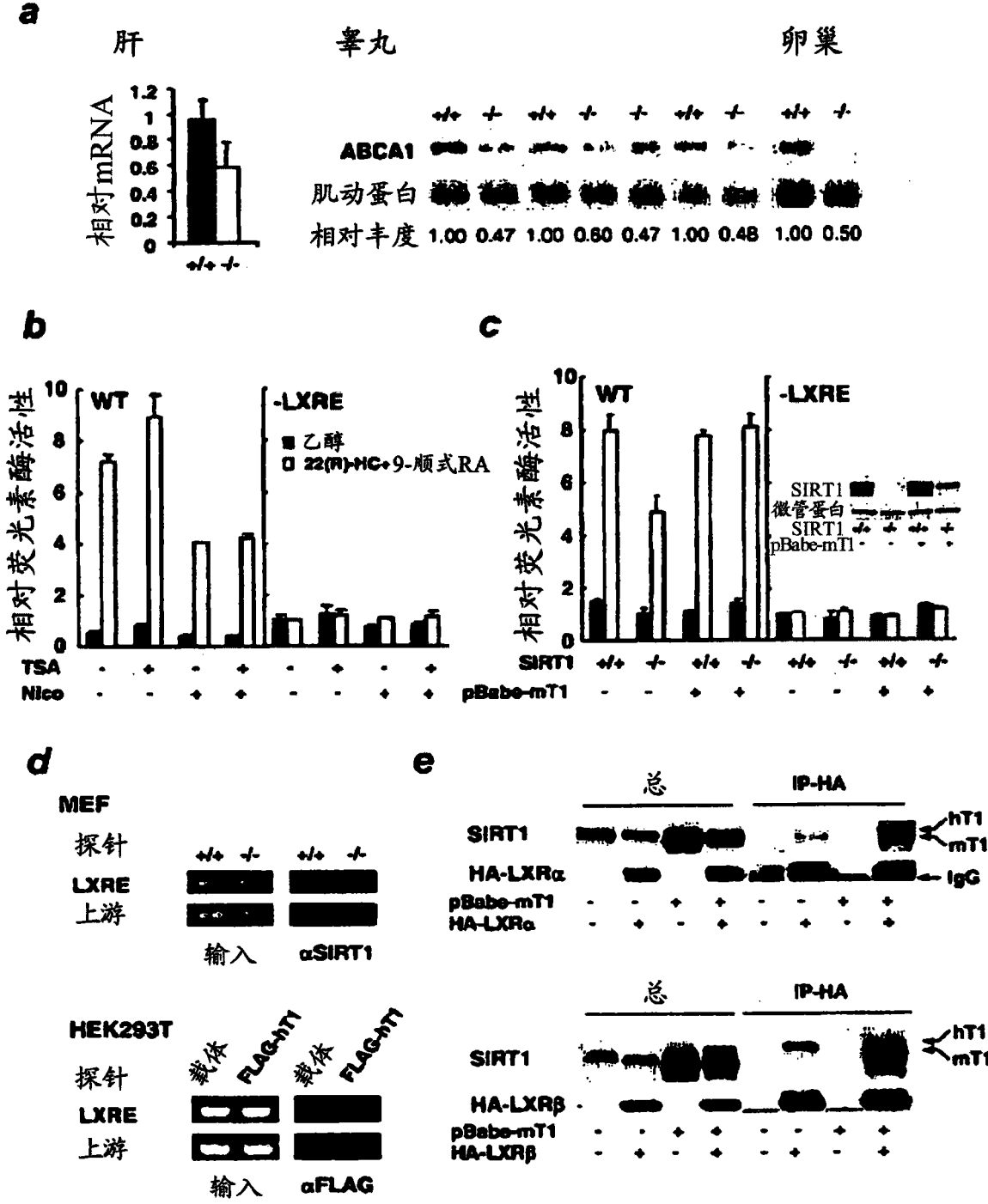


图2

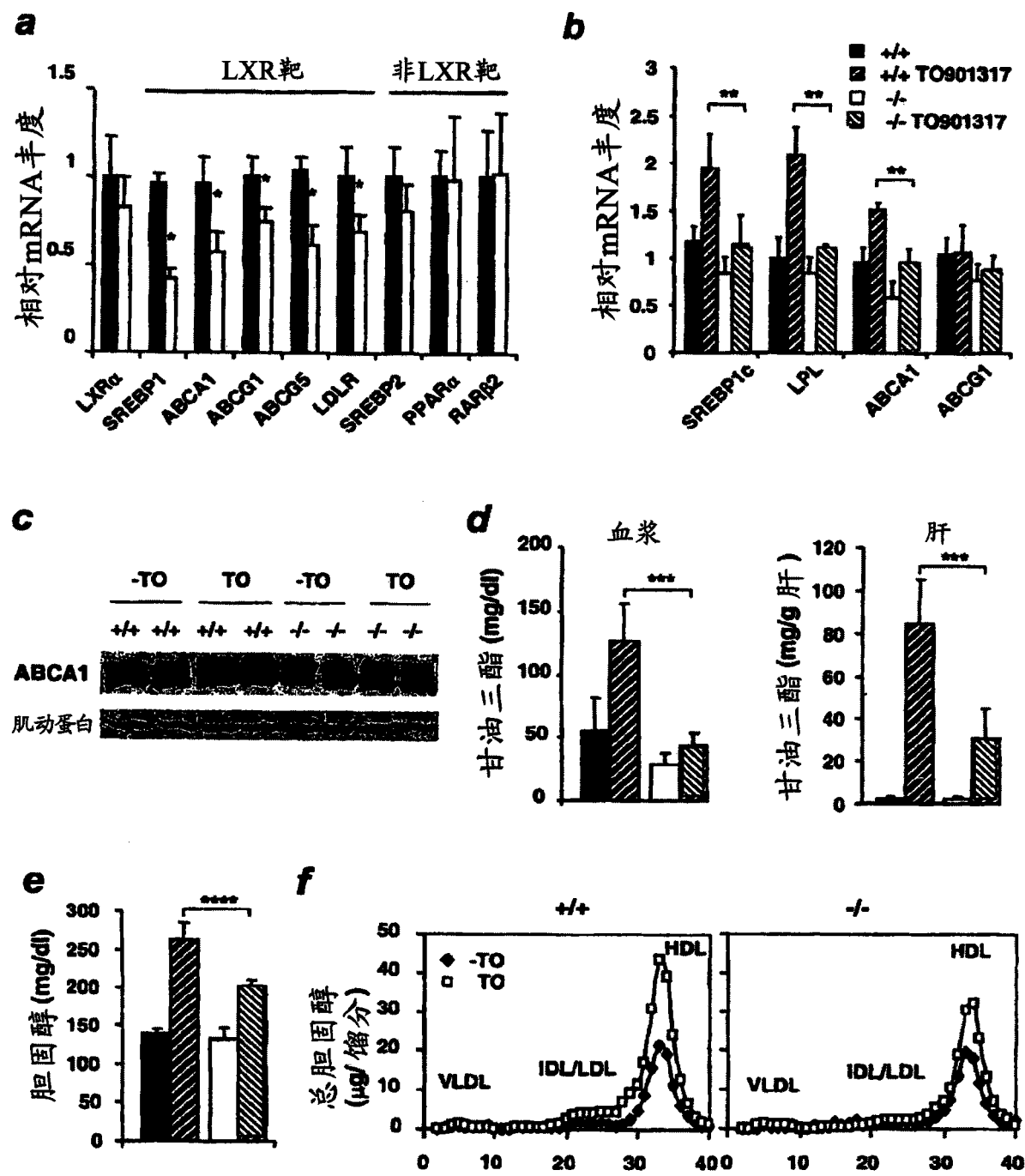


图 3

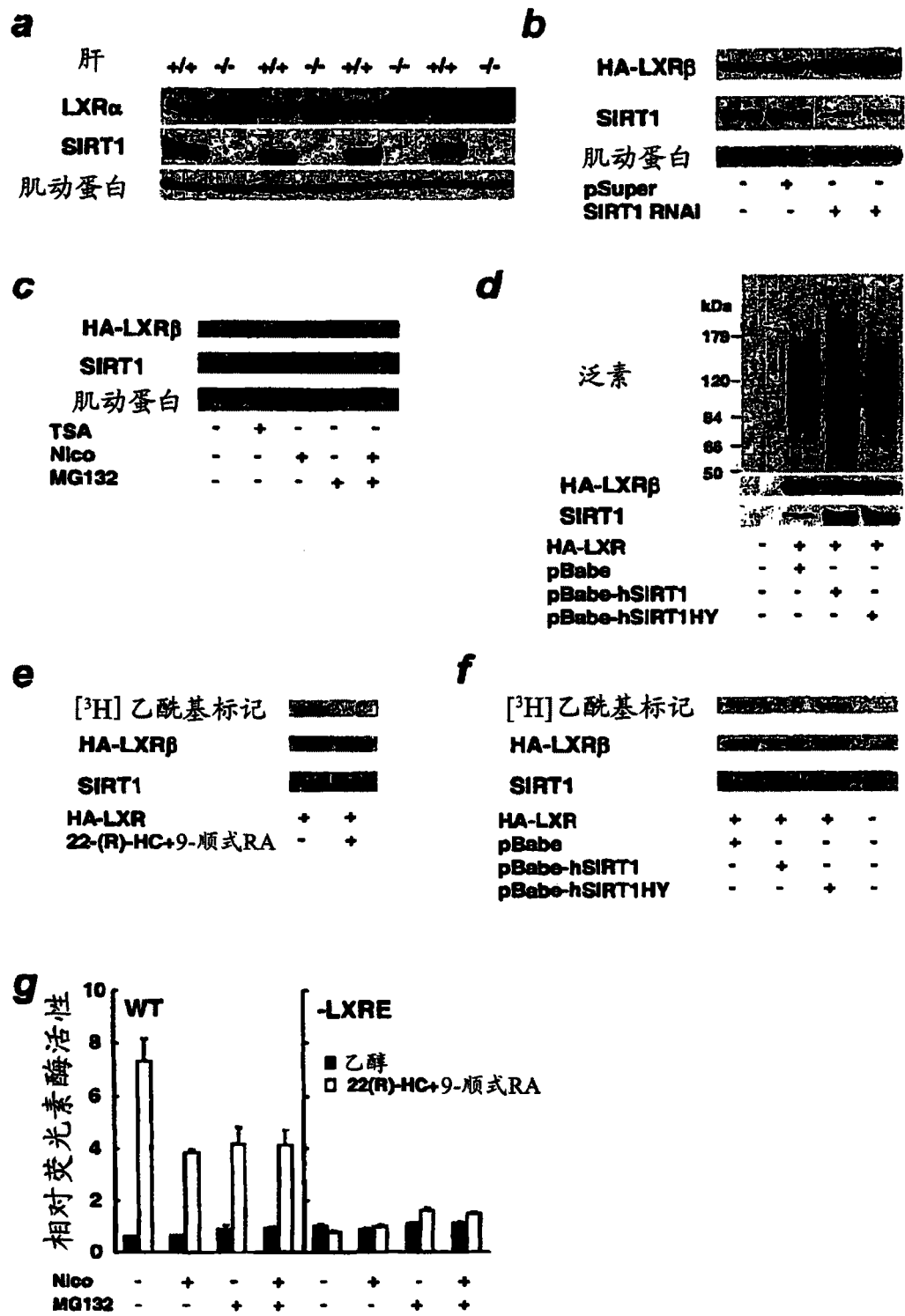


图 4

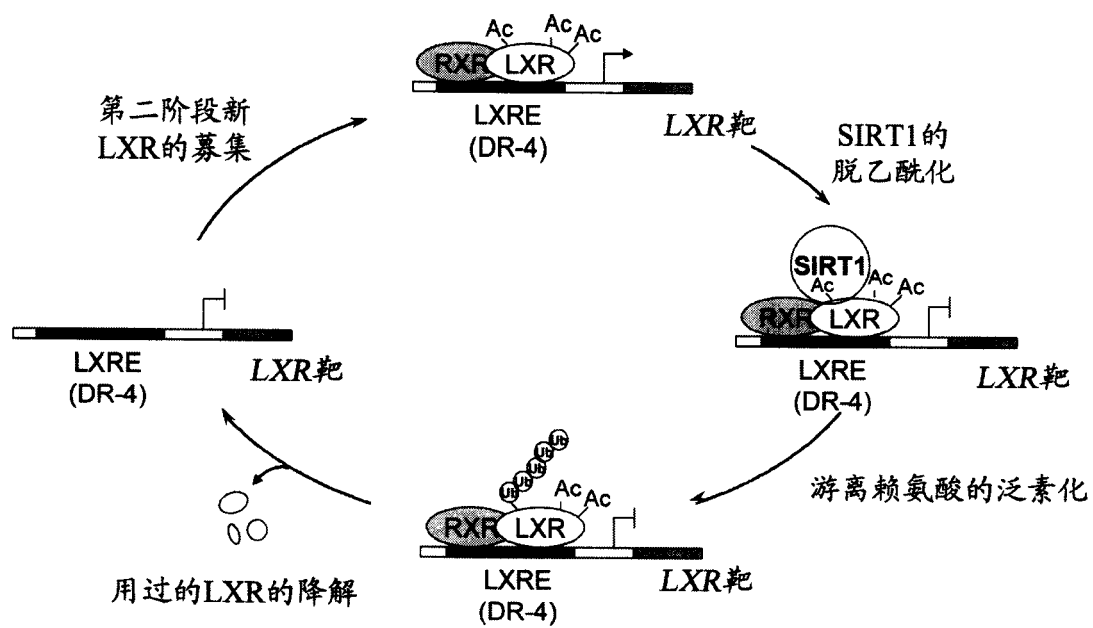


图5

专利名称(译)	SIRT1和LXR的胆固醇调节复合体以及使用方法		
公开(公告)号	CN101501220A	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	CN200780029402.2	申请日	2007-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
当前申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
[标]发明人	伦纳德古亚兰迪 蒙迪克里格尔 李小玲		
发明人	伦纳德·古亚兰迪 蒙迪·克里格尔 李小玲		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2500/02 G01N33/92 G01N33/6872 G01N2800/044 G01N2800/323		
代理人(译)	杨淑媛 郑霞		
优先权	60/811154 2006-06-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种SIRT1和LXR的胆固醇调节复合体以及使用方法。SIRT1与结合于LXR元件的LXR形成复合体。公开了形成复合体的方法、识别调节复合体形成的试剂的方法、增加哺乳动物血浆中结合高密度脂蛋白(HDL)的胆固醇与总胆固醇的比的方法、促进ABCA1介导的哺乳动物细胞胆固醇流出的方法、治疗被认为具有SIRT1活性水平低于正常的受治疗者的方法、评估候选物质是否调节LXR依赖性过程的方法、以及评估候选物质是否调节LXR的SIRT1依赖效应的方法。

