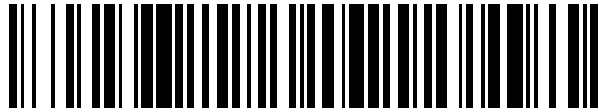


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 126**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/EP2013/078076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13814575 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2938629**

54 Título: **Variante de proteína bpifb4**

30 Prioridad:

28.12.2012 EP 12425208

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.11.2019

73 Titular/es:

**LGV1 S.R.L. (100.0%)
via Carducci 6
80121 Napoli, IT**

72 Inventor/es:

**ANNIBALE ALESSANDRO PUCA y
CARMINE VECCHIONE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 731 126 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variante de proteína bpi4b

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una variante de la proteína BPIFB4 (familia de proteínas bactericidas/aumento de la permeabilidad B, miembro 4) para su uso en el tratamiento de ciertas patologías asociadas con disfunción endotelial debida a alteración de la eNOS y vasodilatación mediada por NO.

10

Antecedentes de la invención

La BPIFB4 humana (también conocida como C20orf186; RY2G5; LPLUNC4) es un miembro de las proteínas secretado de la familia de tipo BPI/LBP/PLUNC, que se ha relacionado con los procesos de defensa del hospedador
15 contra las bacterias. La proteína existe en dos isoformas diferentes de distinta longitud con secuencias de aminoácidos de 575 (Acc. P-59827-2) y 613 (Acc. EAW76337.1) aminoácidos (Bingle CD y col., Biochem Soc Trans. (2011) 39 (4):977-83; Andrault J.-B y col., Genomics (2003) 82:172-184; Bingle CD y col., Hum.Mol. Genet. (2002) 11:937-943; Bingle C. D y col., Protein Sci. (2004) 13:422-430).

20 Se han descrito varios polimorfismos de un solo nucleótido para esta proteína en los siguientes sitios, indicados con referencia a la secuencia de 575 aminoácidos: rs2070325-Ile229Val, rs 571391-Asn281Thr, rs7583529Phe488Leu y rs285097-Thr494Ile, lo que puede llevar a la generación de una serie de diferentes variantes de la proteína. Los autores de la presente invención han identificado y caracterizado una serie de variantes de BPIFB4. Después de un análisis minucioso de las fases del haplotipo (es decir, la combinación de los alelos) de los cuatro polimorfismos
25 descritos anteriormente, los autores de la presente invención han encontrado que el haplotipo más común (65 % de los cromosomas analizados) es la combinación AACT que codifica los aminoácidos Ile229/Asn281/Leu488/Ile494 (INLI); el segundo haplotipo más frecuente es la combinación GCTC (30 % de los cromosomas contienen este haplotipo) que codifica los aminoácidos Val229/Thr281/Phe488/Thr494 (VTFT) y, finalmente, la combinación de AATC está representada solo en el 2 % de los cromosomas caucásicos humanos que codifican
30 Ile229/Asn281/Phe488/Thr494 (INFT).

El endotelio vascular está formado por una capa de células situadas entre la luz de los vasos y las células de músculo liso vascular. Estas células producen continuamente óxido nítrico (NO), un gas soluble que es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) endotelial. Esta sustancia tiene un papel crucial en la regulación de la homeostasis
35 vascular y la función endotelial, lo que incluye la modulación del tono vascular, la regulación del crecimiento de células locales y la protección del vaso frente a las consecuencias perjudiciales de las plaquetas y las células que circulan en la sangre.

Una lista creciente de afecciones se ha asociado con una disminución en la liberación de óxido nítrico por la pared arterial debido a una síntesis deficiente por eNOS o a una degradación oxidativa excesiva (American Journal of
40 Physiology, Endocrinology and metabolism 2012 Mar 1; 302 (5) y Current Vascular Pharmacology 2012 Ene; 10 (1): páginas 4-18). La mayoría de estas condiciones patológicas están asociadas con el envejecimiento. Por ejemplo, se ha comunicado un deterioro de la señalización del óxido nítrico en la angina coronaria espástica (Miyamoto y col. Hum Mol Genet.2000 nov. 1; 9 (18): páginas 2629-37), trombosis (Loscalzo J, Circulation Research.2001; 88, páginas 756-
45 762), hipertensión pulmonar (D'Uscio LD., Cardiovasc Res 2011, 92 (3), páginas 359-360), preeclampsia (The Lancet, volumen 361, 9368, páginas 1511-1517), vasculitis (Kanwar JR y col., Curr Med Chem.2009; 16 (19):2373-2394), cáncer (Kanwar JR y col. Curr Med Chem.2009; 16 (19): páginas 2373-2394), trastornos inflamatorios (Kanwar JR y col., Curr Med Chem.2009; 16 (19): páginas 2373-2394, insuficiencia venosa (Förstermann U y col. Circulation.2006; 113: páginas 1708-1714), en enfermedades genéticas con actividad reducida de la eNOS y producción de NO, por
50 ejemplo en las variaciones del gen MTHFR (Lemarie CA y col., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011, vol. 300: H745-53), hipertensión arterial (Sparacino-Watkins CE y col., Circulation, 2012; vol.125 (23), páginas 2824-6; Böger RH y col., Circulation2009, vol. 119 (12), páginas 1592-600), aterosclerosis, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal (Jiang B y col., Hum Gene Ther. 2012; 23 (11), páginas 1166-75 Ponnuswamy P y col. PLoS One.2012; 7 (1): e30193; Vita JA. y col., Circulation2011, vol. 124 (25), páginas 906-12; Li ZL y col., PLoS One.2012, vol. 7 (6): e38787),
55 síndrome metabólico (Quyyumi AA y col., Circulation 1995, vol. 92: páginas 320-326), accidente cerebrovascular (Madden JA., Neurology.2012 sep. 25; 79 (13 Suppl 1): S58-62), infarto de miocardio (Nakata S y col., Circulation2008 abr. 29; vol. 117 (17): páginas 2211-23), disfunción eréctil (Bianca Rd y col., PLoS One.2012, vol. 7 (2): e31019), enfermedades neurodegenerativas y esclerosis múltiple (Faraci FM., Circulation Research.2006, volumen 99, páginas 1029-1030; Wu M, y col. Glia.2009, vol. 57 (11), páginas 1204-15), trastornos cognitivos (Rayatnia y col., Eur J
60 Pharmacol.2011, vol. 666 (1-3), páginas 122-30; Paydar y col., Brain Res.2011; vol. 1386, páginas 89-99),

degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, cataratas y glaucoma (Chiou y col. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. Abril 2001, 17 (2): páginas 189-198, Li Q y col., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 oct., 51 (10): páginas 5240-6, Kwak HJ y col., Mol Cells.2001 oct. 31; 12 (2): páginas 178-84).

- 5 La disminución de la producción de NO y el consiguiente desequilibrio en la función endotelial se han identificado como uno de los factores clave responsables de los estados patológicos anteriores. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos en la técnica para identificar posibles terapias candidatas para revertir la disfunción endotelial potenciando la liberación de óxido nítrico desde el endotelio.
- 10 Además, se ha demostrado que un aumento en la actividad de la eNOS/producción de NO es beneficioso en la fatiga posterior al ejercicio en pacientes con distrofia muscular (Nature. 2008 nov. 27; 456, páginas 511-515) y en la implantación de endoprótesis para oclusiones vasculares (Sharif F, y col. Mol Ther. 2008 oct.; 16 (10): páginas 1674-80).
- 15 Los autores de la presente invención han identificado ahora sorprendentemente que una variante específica de la proteína BPIFB4 está asociada con una longevidad excepcional. Los autores de la invención han encontrado además que la variante identificada es sorprendentemente capaz de aumentar la activación de eNOS y la producción de NO en células endoteliales. Estas propiedades biológicas dependen de la presencia en la proteína de cuatro aminoácidos específicos en las posiciones 229, 281, 488 y 494, ya que la sustitución de cualquiera de estas posiciones con diferentes aminoácidos conduce a la pérdida de actividad de la proteína.
- 20

Resumen de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona una variante de proteína BPIFB4, que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 85 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma y caracterizada porque la secuencia de dicha variante o fragmento comprende una valina en la posición correspondiente a la posición 229 de la SEQ ID NO:1, una treonina en la posición correspondiente a la posición 281 de la SEQ ID NO:1, una fenilalanina en una posición correspondiente a la posición 488 de la SEQ ID NO:1 y una treonina en una posición correspondiente a la posición 494 de la SEQ ID NO:1 y dicha variante o fragmento tiene actividad para aumentar la actividad de eNOS y/o la producción de NO, para su uso (i) en la prevención, reducción del riesgo, mejoría o tratamiento de una patología seleccionada de entre hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, disfunción eréctil, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, trastornos cognitivos, degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, glaucoma, angina espástica coronaria, trombosis, hipertensión pulmonar, preeclampsia, vasculitis, trastornos inflamatorios e insuficiencia venosa; o (ii) en la mejoría de la fatiga posterior al ejercicio en la distrofia muscular o como coadyuvante en la implantación de una o más endoprótesis para oclusiones vasculares.

25

30

35

Además, se proporciona un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una variante de proteína BPIFB4 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 85 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma y caracterizada porque la secuencia de dicha variante o fragmento comprende una valina en la posición correspondiente a la posición 229 de la SEQ ID NO:1, una treonina en la posición correspondiente a la posición 281 de la SEQ ID NO:1, una fenilalanina en una posición correspondiente a la posición 488 de la SEQ ID NO:1 y una treonina en una posición correspondiente a la posición 494 de la SEQ ID NO:1 y dicha variante o fragmento tiene actividad para aumentar la actividad de eNOS y/o la producción de NO, ligada operativamente a secuencias de control de la expresión, para su uso en (i) la prevención, reducción del riesgo, mejoría o tratamiento de una patología seleccionada de entre hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, disfunción eréctil, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, trastornos cognitivos, degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, glaucoma, angina espástica coronaria, trombosis, hipertensión pulmonar, preeclampsia, vasculitis, trastornos inflamatorios e insuficiencia venosa; o (ii) la mejoría de la fatiga posterior al ejercicio en la distrofia muscular o como coadyuvante en la implantación de una o más endoprótesis para oclusiones vasculares.

40

45

50

Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector para su uso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, mezclado con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en (i) la prevención, reducción del riesgo, mejoría o tratamiento de una patología seleccionada de entre hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, disfunción eréctil, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, trastornos cognitivos, degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, glaucoma, angina espástica

55

60

coronaria, trombosis, hipertensión pulmonar, preeclampsia, vasculitis, trastornos inflamatorios e insuficiencia venosa; o (ii) la mejoría de la fatiga posterior al ejercicio en la distrofia muscular o como coadyuvante en la implantación de una o más endoprótesis para oclusiones vasculares.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia del vector pRK5 que codifica INFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:3) o VTFT hBPIFB4 (SEQ ID NO: 1) usado en el ejemplo 3, con la secuencia de la proteína BPIFB4 subrayada y la de EGFP en cursiva.

10 La figura 2 muestra la detección de la proteína fluorescente verde en vasos mesentéricos perfundidos ex vivo con un plásmido que codifica INFT BPIFB4 (panel izquierdo) o un plásmido pRK5 vacío de control (panel derecho) en el ejemplo 3.

La figura 3 representa la expresión de la proteína BPIFB4 y la activación de la eNOS en vasos mesentéricos perfundidos con un vector vacío (EV), un plásmido que codifica INFT hBPIFB4 o VTFT hBPIFB4. El panel a muestra una Western blot de siete experimentos combinados y la detección de BPIFB4 (arriba) y P-eNOS S1177 (centro). El panel b muestra la cuantificación de la expresión de BPIFB4 y el panel c muestra la cuantificación de la fosforilación en la serina 1177 de eNOS.

20 Figuras 4, 5 y 6: los paneles 4a, 5a y 6a representan la vasoconstricción inducida por KCl observada en el ejemplo 3 en vasos mesentéricos perfundidos ex vivo con un plásmido vacío pRK5 (EV/fig. 4a), un plásmido pRK5 que codifica INFT hBPIFB4 (INFT/fig. 5a) o un plásmido pRK5 que codifica VTFT hBPIFB4 (VTFT/fig. 6a). Los paneles 4b, 5b y 6b representan la vasoconstricción inducida por fenilefrina observada en el ejemplo 3 en vasos mesentéricos perfundidos ex vivo con un plásmido vacío pRK5 (EV/fig. 4b), un plásmido pRK5 que codifica INFT hBPIFB4 (INFT/fig. 5b) o un pRK5 que codifica plásmido VTFT hBPIFB4 (VTFT/fig. 6b). Los paneles 4c, 5c y 6c representan la vasodilatación inducida por acetilcolina observada en el ejemplo 3 en vasos mesentéricos perfundidos ex vivo con un plásmido vacío pRK5 (EV/fig. 4c), un plásmido pRK5 que codifica INFT hBPIFB4 (INFT/fig. 5c) o un plásmido pRK5 que codifica VTFT BPIFB4 (VTFT hBPIFB4/fig. 6c). Los resultados observados con el plásmido que codifica VNFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:4), ITFT hBPIFB4 (SEQ ID NO:5), VTLI hBPIFB4 (SEQ ID NO:6) e INLI hBPIFB4 (SEQ ID NO:7) observados en la vasoconstricción inducida por KCl, la vasoconstricción inducida por fenilefrina o la vasodilatación inducida por acetilcolina en los vasos mesentéricos examinados son superponibles a los obtenidos con el vector vacío (datos no mostrados).

Figuras 7 y 8: los paneles 7a y 8a representan el efecto del inhibidor eNOS L-NAME sobre la relajación inducida por acetilcolina de los vasos perfundidos ex vivo o con un plásmido pRK5 vacío (EV/fig. 7a) o un plásmido pRK5 que codifica VTFT hBPIFB4 mutado (VTFT/fig. 8a). Los paneles 8b representan la recuperación de la vasorelajación de vasos de ratones inactivados de metilentetrahidrofolato reductasa (Mthfr^{-/-}) de control (Mthfr^{+/+}) y ratones inactivados tratados con plásmido pRK5 vacío ((Mthfr +/- EV) (fig. 7b) o un pRK5 que codifica el plásmido VTFT hBPIFB4 ((Mthfr^{-/-} - M) (fig. 8b).

Figura 9: el panel a) muestra una RT-PCR que demuestra la inducción de la expresión de BPIFB4 por H₂O₂ en células HEK293T. El panel b) muestra una Western blot de la fosforilación en eNOS en Ser1177 en células HEK293T que expresan VTFT hBPIFB4 (VTFT) y en células que sobreexpresan INFT hBPIFB4 (INFT) o en las expuestas a un vector vacío (EV). El panel c), en la parte superior, muestra OD normalizadas con actina β.

45 Descripción detallada de la invención

Dicha homología de la variante de la proteína BPIFB4 con la SEQ ID NO: 1 es preferentemente de al menos el 90 %, más preferentemente de al menos el 95 %, más preferentemente todavía de al menos el 99 %.

50 La secuencia de aminoácidos de la variante de la proteína BPIFB4 de la invención puede diferir de la de la SEQ ID NO: 1 en cuanto a la presencia de adiciones, eliminaciones o sustituciones adicionales de aminoácidos.

Sin embargo, una característica esencial de la variante de la invención es que contiene los cuatro aminoácidos: una valina en la posición correspondiente a la posición 229 de la SEQ ID NO: 1, una treonina en la posición correspondiente a la posición 281 de la SEQ ID NO:1, una fenilalanina en una posición correspondiente a la posición 488 de la SEQ ID NO:1 y una treonina en una posición correspondiente a la posición 494 de la SEQ ID NO:1. En el caso de homólogos que difieren de la SEQ ID NO: 1 para delecciones o adiciones de aminoácidos, los cuatro aminoácidos anteriores están presentes en la posición que corresponde a su posición original en la SEQ ID NO: 1. En el caso de homólogos que difieren de la SEQ ID NO:1 para la sustitución de aminoácidos, los cuatro aminoácidos anteriores están presentes en

la misma posición que en la SEQ ID NO:1 según una realización preferida, la proteína de la invención tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 1, donde uno o más aminoácidos en posiciones diferentes de las posiciones 229, 281, 488 y 494 de la SEQ ID NO: 1 han sido sustituidos por un aminoácido conservado. Por "aminoácido conservado" se entiende un aminoácido con propiedades fisicoquímicas funcionalmente equivalentes a las del aminoácido original.

Las proteínas particularmente preferidas según la invención tienen la secuencia de aminoácidos de proteínas BPIFB4 conocidas identificadas en *Homo Sapiens* (Acc N.NP-59827.2; SEQ ID NO:1 o AccN.NP-872325.2, correspondiente a una isoforma más larga), *Felis Catus* (Acc N.XP003983665.1); *Pan Troglodytes* (Acc N.XP525303); *Samiri boliviensis* (Acc N.XP-003932113.1); *Macaca Mulata* (Acc N.NP-001230192.1); *Pan Paniscus* (Acc N.XP-003814776.1); *Otolemur garnettii* (Acc N.XP_003788148.1); *Pongo abelii* (Acc N.XP-003780649.1); *Sarcophilus harrisii* (Acc N.XP-003758987.1); *Rattus norvegicus* (Acc N.NP-001102679.2); *Callithrix jacchus* (Acc N.XP-003732841.1); *Mus musculus* (Acc N.NP-001030047.2); *Bos taurus* (Acc N.XP-003586861.1); *Canis lupus familiaris* (Acc N.XP-534383.3); *Sus scrofa* (Acc N.XP-003134448.3); *Gallus gallus* (Acc No. XP-425718), *Didelphis virginiana* (LOC100032880) o *Xenopus* (LOC100485776), que se ha modificado de manera que incluya una valina en la posición correspondiente a la posición 229 de la SEQ ID NO: 1, una treonina en la posición correspondiente a la posición 281 de la SEQ ID NO:1, una fenilalanina en una posición correspondiente a la posición 488 de la SEQ ID NO:1 y una treonina en una posición correspondiente a la posición 494 de la SEQ ID NO:1.

20 según una realización particularmente preferida, la variante de proteína BPIFB4 de la invención tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Una proteína que tiene dicha secuencia se denominará en adelante VTFT hBPIFB4.

Otro objeto de la presente invención es una proteína que tiene una secuencia que consiste en la secuencia de aminoácidos de una variante de la proteína BPIFB4 para su uso según la invención, dicha secuencia unida a una secuencia de aminoácidos adicional capaz de impartir a la proteína propiedades particularmente ventajosas. Preferentemente, dicha secuencia de aminoácidos adicional es útil para identificar la variante de proteína BPIFB4 según la invención o para dirigir la variante de proteína BPIFB4 de la invención a un órgano o tejido específico. Preferentemente dicha proteína es una proteína quimérica.

30 Tal como se describirá en detalle en la sección experimental, los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que el VTFT hBPIFB4 anterior está asociado con una longevidad excepcional en tres poblaciones independientes. Los autores de la presente invención han demostrado además que el efecto beneficioso de la proteína mutante sobre la esperanza de vida es una consecuencia de su capacidad para modular las disfunciones vasculares asociadas con el envejecimiento. Tal como se demostró en la sección experimental, esta modulación depende de la presencia de los cuatro aminoácidos específicos en las posiciones correspondientes a las posiciones 229, 281, 488 y 494 de la SEQ ID NO: 1 en el VTFT hBPIFB4 de la invención.

Tal como se muestra en el ejemplo 3, los vasos mesentéricos de ratón se perfundieron *ex vivo* con un plásmido vacío o plásmidos que codifican VTFT hBPIFB4 o proteínas que difieren de VTFT hBPIFB4 en que muestran varias sustituciones en los 4 aminoácidos relevantes: INFT hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene isoleucina y una asparagina en las posiciones 229 y 281, respectivamente, VNFT hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene una asparagina en la posición 281, ITFT hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene isoleucina en la posición 229, VTLI hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene una leucina en la posición 488 y una isoleucina en la posición 494, INLI hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene isoleucina en las posiciones 229, asparagina en las posiciones 281, leucina en la posición 488 y una isoleucina en la posición 494. Mientras que VNFT hBPIFB4, ITFT hBPIFB4, VTLI hBPIFB4 e INLI hBPIFB4 no mostraron ningún efecto sobre la función vascular e INFT hBPIFB4 inhibió enérgicamente cualquier función vascular, bloqueando tanto la vasoconstricción como la vasodilatación, la proteína VTFT BPIFB4 mostró un efecto débil de inhibición de la vasoconstricción y una mejora importante de la vasodilatación. Se ha demostrado que este efecto está mediado por la activación de eNOS a través de la fosforilación en la serina 1177 y, por lo tanto, se asocia a un aumento en la liberación de NO por las células endoteliales. La capacidad de VTFT hBPIFB4 para inducir la activación de eNOS se ha corroborado en la línea celular HEK293T (ejemplo 5).

Los datos anteriores también se han confirmado adicionalmente en un modelo animal de enfermedad vascular relacionado con una producción deficiente de NO, ratones inactivados Mthfr heterocigóticos, donde se ha demostrado que la transfección de la proteína VTFT hBPIFB4 restaura la liberación de NO y la respuesta de vasodilatación dependiente del endotelio (ejemplo 4).

Otro objeto de la presente invención es un fragmento de la variante de la proteína BPIFB4 de la invención que tiene una secuencia que comprende dicha valina 229, treonina 281, fenilalanina 488 y treonina 494 anteriores para su uso según la invención.

5

Gracias a su actividad biológica, dicha variante de proteína de BPIFB4 o fragmento de la invención se puede usar ventajosamente en la prevención, reducción del riesgo, mejoría y/o tratamiento de condiciones patológicas del endotelio debido a la disminución en la producción de NO o la actividad de eNOS o de patologías o condiciones donde es beneficioso aumentar la actividad de eNOS y/o la producción de NO.

10

La variante de la proteína BPIFB4 o el fragmento según la invención se puede administrar a un sujeto que lo necesite, afectado por una de las patologías anteriores o en las condiciones clínicas anteriores, por administración oral, nasal, endovenosa, tópica, intraocular o retroocular.

15 Por consiguiente, otro objeto de la invención es una composición farmacéutica, preferentemente adecuada para administración oral, nasal, endovenosa tópica, intraocular o retroocular, que comprende la variante de proteína BPIFB4 o el fragmento de la invención para su uso según la invención de dicha variante o fragmento de proteína BPIFB4 en mezcla con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones adecuadas para la

composición farmacéutica de la invención son bien conocidas en la técnica y, por ejemplo, se describen en

20 "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, last o Babizhayev MA. Drug Testing and Analysis, volumen 4, número 6, páginas 468-485, junio 2012).

Una formulación farmacéutica especialmente adecuada para la administración de la variante de la proteína BPIFB4 o el fragmento según la invención se basa en copolímeros sintéticos, que usan estructuras de poliaminoácidos y

25 polisacáridos, capaces de formar complejos físicos reversibles con la variante de la proteína BPIFB4 o el fragmento de la misma mediante interacciones electrostáticas, hidrófobas u otras interacciones físicas, y generan nanoagregados a partir de los cuales la proteína o el fragmento se libera de forma intacta después de la administración. (Díaz-Fernández YA y col., Biosens Bioelectron. 2010 sep. 15;26 (1): 29-35). Un objeto de la presente descripción es un polinucleótido, preferentemente un polinucleótido de ADN, que codifica la secuencia de aminoácidos de la variante de

30 la proteína BPIFB4 o el polipéptido según la presente invención. Dicho polinucleótido tiene una secuencia que comprende o consiste en la SEQ ID NO:2 o la secuencia de un fragmento de la misma que comprende los nucleótidos que codifican dicha valina 229, treonina 281, fenilalanina 488 y treonina 494 mencionadas anteriormente.

El polinucleótido anterior se puede usar con el fin de obtener la expresión de la proteína o polipéptido mutado en

35 células hospedadoras *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* por medio de un vector de expresión adecuado que lo comprende.

Por lo tanto, un séptimo objeto de la invención es un vector que contiene dicho polinucleótido mencionado anteriormente de la invención unido operativamente a secuencias de control de expresión.

40 según una realización preferida, la variante de la proteína BPIFB4 o el fragmento de la invención se produce de forma recombinante en células hospedadoras transfectadas con dicho vector anterior. según esta realización, el vector para su uso según la invención es preferentemente uno que es adecuado para la producción de alto rendimiento de la proteína o polinucleótido. Por ejemplo, el vector pcDNA™ 3.3-TOPO® se puede usar para la expresión de alto nivel de la proteína de la invención en células adherentes de cultivo de tejidos de mamíferos después de la transfección

45 transitoria o la expresión de alto nivel de proteína secretada usando los sistemas FreeStyle™ MAX CHO y FreeStyle™ MAX 293 (Invitrogen INC.).

Por lo tanto, otro objeto de la presente descripción son las células hospedadoras transfectadas con dicho vector de la invención anterior. Otro objeto de la descripción es un procedimiento para producir de forma recombinante la variante

50 de la proteína BPIFB4, la proteína o el fragmento según la invención que comprende el cultivo de dichas células hospedadoras anteriores en condiciones que permiten la expresión de la variante de la proteína BPIFB4, la proteína o el fragmento y la recuperación de dicha variante de la proteína BPIFB4, proteína o fragmento.

De forma alternativa a la administración directa como tal, la variante de la proteína BPIFB4 o el fragmento de la

55 invención puede expresarse en el tejido diana después de la administración, preferentemente por vía endovenosa, subcutánea, intraocular o retroocular, en un sujeto que lo necesite de un vector para su uso según la presente invención, que es adecuado para inducir la expresión en dicho tejido diana de la proteína o polipéptido mutado. El tejido diana puede diferir según la patología que se tratará y puede ser, por ejemplo, el tejido endotelial, el tejido del hígado, el corazón, el riñón, el ojo o el músculo.

60

según esta realización, el vector de la invención es preferentemente uno que sea adecuado para la transfección de las células del tejido diana de interés después de la administración endovenosa.

5 según una realización preferida especialmente, dicho vector es un vector vírico, preferentemente un vector de Adenovirus, más preferentemente un vector seleccionado de entre vectores de serotipos 1 a 9 de AAV, basándose en la especificidad por el tejido diana de interés (Varadi K, y col., Gene Ther. (2012);19 (8): 800-9; Zincarelli C y col., Mol Ther. (2008), 16 (6): 1073-80, Díaz-Fernández YA y col., Oligonucleotides. 2010; 20 (4):191-8).

10 Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica, preferentemente adecuada para administración endovenosa, subcutánea, intraocular o retroocular para su uso según la invención, comprendiendo dicha composición un vector según la invención en mezcla con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones adecuadas para la composición farmacéutica de la invención son bien conocidas en la técnica. A modo de ejemplo, se pueden usar nanosistemas basados en polímeros o nanosistemas de policomplejos para administrar el vector de la invención (Murano E y col., Nat Prod Commun 2011), 6 (4):555-72, Moustafine RI y col., Int J Pharm. 15 2012 oct. 3).

La dosis diaria media de la variante de la proteína BPIFB4 o el fragmento o vector de la invención dependerá de diversos factores, tales como la gravedad de la enfermedad y las condiciones del paciente (edad, sexo y peso). El experto en la materia puede usar medios técnicos bien conocidos en la técnica para encontrar la dosis y el régimen 20 correctos con el fin de asegurar un tratamiento óptimo en cada condición patológica en particular.

La presente invención se ilustrará mejor mediante los ejemplos que se muestran a continuación, que no deben interpretarse como limitativos de la invención.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de la proteína VTFT hBPIFB4 en tres poblaciones independientes

Un Estudio de Asociación de Genoma Amplio (GWAS, por sus siglas en inglés) publicado recientemente sobre una 30 población de Centenarios del Sur de Italia (SIC) ha identificado una serie de variantes genéticas asociadas con individuos longevos (Malovini y col., Rejuvenation Research 2011; vol. 14 (3), páginas 283-291).

Para validar las cuatro variaciones principales informadas en ese estudio ($p < 1 \times 10^{-4}$), se realizó un intento de replicación en una primera cohorte de replicación reclutada para el Estudio de Centenarios Alemanes (Keidorp y col.; 35 Aging Cell 2011; vol. 10, páginas 622-8), que comprende 1447 individuos longevos (LLI) (intervalo de edad de 95-110 años, media de edad 98,8 años) y 1029 controles más jóvenes (intervalo de edad 60-75 años y media de edad 66,8 años). Por lo tanto, mediante el análisis de Taqman se ensayaron dos polimorfismos no sinónimos de un solo nucleótido (SNP), rs2070325 y rs571391, y dos marcadores intrónicos, rs7583529 y rs285097, que etiquetan las variantes funcionales rs7917 y rs1695501.

40 En detalle, se extrajo ADN de sangre periférica (QIAamp DNA midi kit blood, Qiagen) de los individuos y se genotipó con sonda TaqMan en ABI 7900HT Real Time PCR (Applied Biosystems). Para el cribado, se usaron las siguientes sondas:

45 hCV25757827 para rs2070325;
hCV958887 para rs571391;
hCV28993331 para rs7583529; y
hCV3073023 para rs285097.

50 El análisis de los datos se realizó con Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).

Los métodos y procedimientos estadísticos aplicados al análisis de datos que se derivan de la exploración amplia del genoma se describen en Malovini A y col., Rejuvenation Res 2011, vol. 14, páginas 283-91.

55 De las cuatro variantes sometidas a ensayo, solo rs2070325, que produce el cambio de aminoácido Ile229Val en BPIFB4, replicó la asociación observada en la cohorte de SIC bajo el modelo genético recesivo (OR = 2,42, IC al 95 % = 1,56-3,77, $p = 5,98 \times 10^{-5}$) en este conjunto de LLI (OR = 1,42, IC al 95 % = 1,12-1,80, $p = 5,3 \times 10^{-3}$, Bonferroni ajustado $p = 0,021$).

60 Esta variante se sometió a ensayo a continuación mediante análisis de Taqman, tal como se describió anteriormente,

para la asociación en un segundo conjunto, representado por una colección basada en EE. UU. de 1461 LLI (intervalo de edad de 91-119 años, media de edad 100,8) y 526 controles (intervalo de edad de 0-35 años, media de edad 28,2). La regresión logarítmica confirmó la asociación del SNP anterior también en este segundo conjunto de replicación (OR: 1,62, IC al 95 % = 1,15-2,27, $p = 3,7 \times 10^{-3}$).

5

El metaanálisis de los resultados de la asociación se realizó mediante el paquete "meta" implementado en R (<http://cran.r-project.org/web/packages/meta/index.html>). La anotación posicional y funcional de los SNP identificados se realizó mediante el recurso en línea SNP Nexus ().

10 Los resultados del metaanálisis, combinando las estadísticas de asociación derivadas de la evaluación de este marcador en los conjuntos de replicación de Alemania y EE. UU., no revelaron una heterogeneidad estadísticamente significativa entre los OR estimados en las dos poblaciones (estadística Q, $p > 0,05$). Índice de heterogeneidad, $I^2 = 0\%$. según estas observaciones, las estadísticas de asociación se combinaron asumiendo un modelo de efectos fijos (OR = 1,49; IC al 95 % = 1,22-1,81; $p < 1 \times 10^{-4}$).

15

Ejemplo 2: Análisis de haplotipos del locus BPIFB4

Los análisis de haplotipos revelaron patrones de fuerte desequilibrio de enlace (LD) dentro del locus genómico BPIFB4, delimitando una región que está altamente enriquecida en SNP no sinónimos (fig. S1 en el Apéndice Suplementario).

20 La variación rs2070325 (Ile229Val) marca BPIFB4 rs2889732 (Asn288Thr), rs11699009 (Leu488Phe) y rs11696307 (Ile494Thr). La estructura tridimensional de la BPIFB4 humana se predijo mediante un modelo de homología con el programa I-TASSER, (REF: Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang. I-TASSER: una plataforma unificada para la estructura de proteínas y predicción de funciones automatizada. Nature Protocols, vol. 5, 725-738 (2010) usando como plantilla la proteína BPI de PDB (código 1EWF). En el análisis estructural visual, realizado con el programa PyMOL

25 Versión 1.2r3pre, Schrödinger, LLC (Molecular Graphics System), se consideraron todos los modelos. El análisis anterior reveló que Ile268Val y Asn320Thr están ubicados en un sitio de posible interacción proteína-proteína. Para evaluar los efectos de las variaciones, los autores de la invención predijeron la estructura de las proteínas BPIFB4 de tipo natural (WT) y mutadas (Ile229Val, Asn281Thr, leu488Phe, Ile494Thr) mediante modelización de homología. BPIFB4 es estructuralmente muy similar a BPI y CETP, para las cuales se dispone de estructuras

30 experimentales y, debido a sus similitudes estructurales, los autores de la invención piensan que es razonable esperar que BPIFB4 se una a lipopolisacáridos en regiones similares a las de las otras dos proteínas. El análisis estructural de los autores de la invención reveló que Leu488Phe está ubicada en una bolsa de unión a lípidos cuyo tamaño se predice que disminuirá como consecuencia de la mutación. La mutación Ile494Thr se sitúa en una segunda bolsa de unión a lípidos, cuya hidrofobia disminuye por la sustitución. En los dos casos, la mutación puede producir una

35 disminución de la capacidad para unir los lípidos.

En contraste, Ile229Val y Asn281Thr están situadas lejos de los sitios de unión a lípidos de las proteínas estructuralmente homólogas, por lo que probablemente afectan a funciones como la interacción con otras proteínas, en lugar de la unión de lípidos.

40

Ejemplo 3: Reactividad del vaso ex vivo a INFT hBPIFB4 y VTFT hBPIFB4

Para determinar el papel de la variante de BPIFB4 específica identificada en la función de los vasos, los autores de la invención estudiaron los efectos de la transfección *ex vivo* de vasos mesentéricos de ratón con un vector pRK5 que

45 codifica VTFT hBPIFB4 o proteínas que difieren de VTFT hBPIFB4 en que muestran varias sustituciones en los 4 aminoácidos relevantes: INFT hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene isoleucina y una asparagina en las posiciones 229 y 281, respectivamente, VNFT hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene una asparagina en la posición 281, ITFT hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

50 NO:5, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene isoleucina en la posición 229, VTLI hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, que difiere de la de VTFT hBPIFB4 en que contiene una leucina en la posición 488 y una isoleucina en la posición 494 e INLI hBPIFB4, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, que difiere de la VTFT hBPIFB4 en que contiene isoleucina en las posiciones 229, asparagina en las

55 posiciones 281, leucina en la posición 488 y una isoleucina en la posición 494. La secuencia de los vectores pRK5 usados se comunica en la figura 1 (a, secuencia del vector que codifica wtBPIFB4 y GFP y b, secuencia del vector que codifica VTFT hBPIFB4 y GFP).

Las ramas de segundo orden del árbol arterial mesentérico de ratones C57BL6 se transfectaron tal como se describió anteriormente (Vecchione C y col., J Exp Med 2005; vol. 201, páginas 1217-28).

60

En resumen, los vasos (n = 7) se colocaron en un sistema de presión Mulvany lleno de solución de Krebs a la que se añadieron 20 µg de un vector pRK5 que codifica INFT o VTFT hBPIFB4. Como control negativo se usó un plásmido vacío. Los vasos se perfundieron a 100 mmHg durante 1 hora y a continuación a 60 mmHg durante 5 horas.

- 5 La eficacia de la transfección se evaluó por la presencia de la coexpresión de la proteína fluorescente verde (GFP) (fig. 2) y por Western blot.

En detalle, el análisis de Western blot se realizó en extractos de proteínas de vasos perfundidos transfectados (n = 7 para cada vector). Los extractos de proteínas se separaron en SDS-PAGE al 10 % a 100 V durante 1 h o en SDS-PAGE al 4-12 % a 100 V durante 2 h y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Las membranas se incubaron durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios: anti-fosfo-Ser1177 eNOS (señalización celular, AMc de conejo, 1:1.000), anti-BPIFB4 (Abcam, Ac policlonal de conejo, 1:200) y anti-β-actina (señalización celular, AMc de ratón, 1:3.000). Las membranas se lavaron tres veces y a continuación se incubaron durante 1 o 2 h con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo unido a peroxidasa de rábano picante o IgG anti-ratón, Amersham Life Science) a una dilución de 1:3.000. A continuación, se lavó la membrana cuatro veces y se detectaron bandas de proteínas específicas con agentes quimioluminiscentes ECL Prime (Amersham Life Science). Los datos de la Western blot se analizaron usando el software ImageJ (desarrollado por Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE. UU.) para determinar la densidad óptica (OD) de las bandas. La lectura de la OD se normalizó a β-actina para tener en cuenta las variaciones en la carga.

20 Tal como se muestra en la figura 3, la proteína BPIFB4 se detectó abundantemente en los vasos después de la perfusión con los plásmidos que codifican INFT hBPIFB4 o VTFT hBPIFB4 tanto de tipo natural como de VTFT hBPIFB4 expresándose en cantidades comparables. Por el contrario, los vasos expuestos a plásmidos vacíos expresaron un bajo nivel de proteína BPIFB4 natural.

25 Además, los vasos que expresan VTFT hBPIFB4, pero no INFT hBPIFB4, mostraron una inducción en cadena de la fosforilación de eNOS en la serina 1177, un sitio de activación de la enzima.

30 La vasoconstricción se evaluó con KCl (80 mM) y dosis crecientes de fenilefrina (de 10⁻⁹M a 10⁻⁶M), como el porcentaje de cambio en el diámetro de la luz después de la administración del fármaco. Las respuestas vasculares fueron sometidas a ensayo antes y después de la transfección. Las relajaciones independientes y dependientes del endotelio se evaluaron midiendo las respuestas dilatadoras de las arterias mesentéricas a las concentraciones acumuladas de acetilcolina (de 10⁻⁹M a 10⁻⁵M) y nitroglicerina (de 10⁻⁹M a 10⁻⁵M), respectivamente, en vasos precontaminados con fenilefrina a una dosis necesaria para obtener un nivel similar de precontracción en cada anillo (80 % de la contracción inicial inducida por KCl). La contracción máxima evocada por la fenilefrina se consideró la línea de base para las vasorrelajaciones evocadas posteriores. Se tomaron precauciones para no dañar el endotelio: la integridad funcional se reflejó en la respuesta a la acetilcolina (10⁻⁶ M).

40 La sobreexpresión de INFT hBPIFB4 casi suprimió las vasoconstricciones inducidas por KCl y fenilefrina que podrían provocarse antes de la exposición a los plásmidos (fig. 5a). La ausencia de vasoconstricción significativa impidió la evaluación posterior de la vasorrelajación. En contraste, la expresión de VTFT hBPIFB4 rescató parcialmente los efectos inhibitorios ejercidos por INFT hBPIFB4 sobre las vasoconstricciones inducidas por KCl y fenilefrina: de hecho, las respuestas vasculares provocadas por los agonistas se redujeron cuando se compararon con las observadas antes de la perfusión, pero no se eliminaron (fig. 6a-6b). Además, tras la expresión de VTFT hBPIFB4 se produjo una mejora significativa en la vasodilatación de los vasos inducida por acetilcolina en comparación con la observada antes de la transfección (fig. 6c), pero no hubo diferencias en la relajación del músculo liso provocada por nitroglicerina (datos no mostrados), lo que indica que este efecto se debe a una mejora en la función endotelial. No se observó ningún efecto sobre la función vascular con VNFT hBPIFB4, ITFT hBPIFB4, VTLI hBPIFB4 e INLI hBPIFB4. Los autores de la invención examinaron el efecto de L-NAME, un inhibidor de la eNOS, en los vasos transfectados con un vector vacío (fig. 7, panel a, EV) o VTFT hBPIFB4 que codifica plásmidos (fig. 8, panel a, VTFT). Como se esperaba, L-NAME mitigó el efecto vasodilatador de la acetilcolina en los vasos perfundidos con plásmidos vacíos, y este efecto fue más pronunciado en los vasos que expresaban VTFT hBPIFB4, lo que indica la presencia de más NO en esta última condición.

55 Ejemplo 4: Efecto de VTFT hBPIFB4 en el modelo in vivo de enfermedad vascular debido al deterioro de la liberación de NO

Los experimentos descritos anteriormente también se realizaron en vasos mesentéricos de ratones mthfr heterocigóticos y su control, tal como se describe en Lemarie CA y col., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011; vol.300: H745-53. Los ratones Mthfr +/- muestran una disfunción de la eNOS que está asociada con la regulación descendente

del factor de longevidad surtuina 1. Por lo tanto, los autores de la invención exploraron el efecto de VTFT hBPIFB4 en los vasos mesentéricos de estos ratones. Tal como se esperaba, la vasorrelajación inducida por acetilcolina se redujo significativamente en ratones *Mthfr^{+/-}* en comparación con compañeros de camada *Mthfr^{+/+}* después de la exposición a EV (fig. 7, panel b), pero no se observaron diferencias en las respuestas vasculares evocadas por la nitroglicerina (datos no mostrados). Después de la exposición a los plásmidos *Mthfr^{+/-}* - VTFT que codifican hBPIFB4, la relajación endotelial de los vasos *Mthfr^{+/-}* mejoró significativamente, haciéndose comparable a la observada en los vasos *Mthfr^{+/+}* (fig. 8b). Esto indica que VTFT hBPIFB4 puede tener fuertes efectos terapéuticos en la lucha contra la disfunción vascular (fig. 8, panel b).

10 Ejemplo 5: Evaluación de la modulación de la eNOS por BPIFB4 en células Hek293T

Las células renales embrionarias humanas (HEK293T) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino y un 1 % de aminoácidos no esenciales en un 37 % en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células se sembraron en placas a razón de 0,25 x 10⁶ por pocillo en placas de 15 seis pocillos, y 24 horas después de la siembra en placas se transfectaron con 10 µl de Lipofectamina 2000 (LifeTechnologies) y 4 µg de plásmidos. Después de 24 h, las células se mantuvieron sin suero durante 24 h. Durante la inanición sérica, las células transfectadas se trataron con H₂O₂ 400 µM durante 24 h. La transcripción de BPIFB4 se detectó por extracción de las células de ARN total con TRIzol (Ambion), retrotranscripción (iScript BioRad). El ADNc se amplificó con cebadores específicos para *BPIFB4* (Fw:CTCTCCCCAAAATCCTCAACA, Rev:AGCCTCTCTGGGACTGGTTC) y *GAPDH* (Fw:GTGAAGGTCGGAGTCAACG, Rev:GGTGGAAATCATATTGGAACATG).

La transcripción de *BPIFB4* podría inducirse en células HEK293T tras la exposición a H₂O₂: esto demuestra un papel de BPIFB4 en la respuesta al estrés (fig. 9, panel a). Por lo tanto, los autores de la invención exploraron el modo en 25 que BPIFB4 afectó a la fosforilación mediada por el estrés de eNOS en la serina 1177.

Las células renales embrionarias humanas (HEK293T) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino y un 1 % de aminoácidos no esenciales en un 37 % en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células se sembraron en placas a razón de 0,25 x 10⁶ por pocillo en placas de 30 seis pocillos, y 24 horas después de la siembra en placas se transfectaron con 10 µl de Lipofectamina 2000 (LifeTechnologies) y 4 µg de plásmidos. Después de 24 h, las células se mantuvieron sin suero durante 24 h. Durante la privación de suero, las células transfectadas se trataron con H₂O₂ 400 µM durante 24 h. Los extractos de proteínas se separaron en SDS-PAGE al 10 % a 100 V durante 1 h o en SDS-PAGE al 4-12 % a 100 V durante 2 h y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Las membranas se incubaron durante toda la 35 noche con los siguientes anticuerpos primarios: anti-fosfo-Ser1177 eNOS (señalización celular, AMc de conejo, 1:1.000), y anti-β-actina (señalización celular, AMc de ratón, 1:3.000). Las membranas se lavaron tres veces y a continuación se incubaron durante 1 o 2 h con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo unido a peroxidasa de rábano picante o IgG anti-ratón, Amersham Life Science) a una dilución de 1:3.000. A continuación, se lavó la membrana cuatro veces y se detectaron bandas de proteínas específicas con agentes quimioluminiscentes ECL Prime 40 (Amersham Life Science). Los datos de la Western blot se analizaron usando el software ImageJ (desarrollado por Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE. UU.) para determinar la densidad óptica (OD) de las bandas. La lectura de la OD se normalizó a β-actina para tener en cuenta las variaciones en la carga.

Tal como se muestra en la figura 9, panel b y c, eNOS se activó más tras la exposición a H₂O₂ en células HEK293T 45 que expresan VTFT hBPIFB4 en comparación con células que sobreexpresan INFT hBPIFB4. Este resultado corroboró el obtenido en la activación de eNOS con la perfusión de vasos ex vivo.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Vecchione, Carmine Puca, Annibale Alessandro
 <120> Variante de la proteína BPIFB4
 <130> VecPIWO
 <160> 7
 <170> BiSSAP 1.2
 55 <210> 1

 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60

ES 2 731 126 T3

<400> 1

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

ES 2 731 126 T3

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

<210> 2

<211> 1728

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1728

<223> /organismo="Homo sapiens" /mol_type="ADN no asignado"

<400> 2

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| atgctgcagc | aaagtgatgc | tctccactcg | gccctgagag | aggtgccctt | gggtgttggt | 60 |
| gatattccct | acaatgactt | ccatgtccga | ggaccccccc | cagtatatac | caacggcaaa | 120 |
| aaacttgatg | gtatttacca | gtatggtcac | attgagacca | acgacaacac | tgctcagctg | 180 |
| gggggcaaat | accgatatgg | tgagatcctt | gagtccgagg | gaagcatcag | ggacctccga | 240 |
| aacagtggct | atcgcagtg | cgagaatgca | tatggaggcc | acaggggcct | cgggcgatac | 300 |
| agggcagcac | ctgtgggcag | gcttcaccgg | cgagagctgc | agcctggaga | aatcccacct | 360 |
| ggagttgcc | ctggggcgg | gggccaggt | ggtttctg | gcaactggagg | catgctggca | 420 |
| gctgatggca | tcctcgcagg | ccaaggtggc | ctgctcggcg | gaggtggtct | ccttggtgat | 480 |
| ggaggacttc | ttggaggagg | gggtgtcctg | ggcgtgctcg | gcgaggggtg | catcctcagc | 540 |
| actgtgcaag | gcatcacggg | gctgcgtatc | gtggagctga | ccctccctcg | ggtgtccgtg | 600 |
| cggctcctgc | ccggcgtggg | tgtctacctg | agcttgtaca | cccgtgtggc | catcaacggg | 660 |

ES 2 731 126 T3

aagagtctta ttggcttcct ggacgtcgca gtagaagtga acatcacagc caaggtccgg 720
ctgaccatgg accgcacggg ttatcctcgg ctggtcattg agcgatgtga caccctccta 780
gggggcatca aagtcaagct gctgcgaggg cttctcccca atctcgtgga caatttagtg 840
acccgagtcc tggccgaagt cctccctgac ttgctctgcc ccatcgtgga tgtggtgctg 900
ggtcttgtca atgaccagct ggcctcgtg gattctctga ttctctcggg gatattggga 960
agtgtccagt acaccttctc cagcctcccg cttgtgaccg ggaattcct ggagctggac 1020
ctcaacacgc tggttgggga ggctggagga ggactcatcg actaccatt ggggtggcca 1080
gctgtgtctc ccaagccgat gccagagctg cctcccattg gtgacaacac caagtcccag 1140
ctggccatgt ctgccaactt cctgggctca gtgctgactc tactgcagaa gcagcatgct 1200
ctagacctgg atatcaccaa tggcatgttt gaagagcttc ctccacttac cacagccaca 1260
ctgggagccc tgatcccaa ggtgttccag cagtaccccg agtcctgccc acttatcatc 1320
aggatccag tgcgaacc accatctgtg atgctgcaga aggacaaagc gctggtgaag 1380
gtgttggcca ctgccgaggt catggtctcc cagcccaaag acctggagac taccatctgc 1440
ctcattgacg tggacacaga attcttgcc tcattttcca cagaaggaga taagctcatg 1500
attgatgcca agctggagaa gaccagcctc aacctcagaa cctcaaactg gggcaacttt 1560
gatattggcc tcatggaggt gctggtggag aagatttttg acctggcatt catgcccgca 1620
atgaacgctg tgcctgggttc tggcgtcct ctccccaaa tcctcaacat cgactttagc 1680
aatgcagaca ttgacgtgtt ggaggacctt ttggtgctga gcgcatga 1728

<210> 3

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

ES 2 731 126 T3

Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
 165 170 175
 Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
 180 185 190
 Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
 210 215 220
 Gly Phe Leu Asp Ile Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 260 265 270
 Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Asn Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285
 Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300
 Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335
 Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Gly Leu
 340 345 350
 Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365
 Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser
 370 375 380
 Ala Asn Phe Leu Gly Ser Val Leu Thr Leu Leu Lys Gln His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Asp Ile Thr Asn Gly Met Phe Glu Glu Leu Pro Pro Leu
 405 410 415
 Thr Thr Ala Thr Leu Gly Ala Leu Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 420 425 430
 Pro Glu Ser Cys Pro Leu Ile Ile Arg Ile Gln Val Leu Asn Pro Pro
 435 440 445
 Ser Val Met Leu Gln Lys Asp Lys Ala Leu Val Lys Val Leu Ala Thr
 450 455 460
 Ala Glu Val Met Val Ser Gln Pro Lys Asp Leu Glu Thr Thr Ile Cys
 465 470 475 480
 Leu Ile Asp Val Asp Thr Glu Phe Leu Ala Ser Phe Ser Thr Glu Gly
 485 490 495
 Asp Lys Leu Met Ile Asp Ala Lys Leu Glu Lys Thr Ser Leu Asn Leu
 500 505 510
 Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
 530 535 540
 Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
 545 550 555 560
 Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
 565 570 575

<210> 4

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro

ES 2 731 126 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Leu | Gly | Val | Gly | Asp | Ile | Pro | Tyr | Asn | Asp | Phe | His | Val | Arg | Gly | Pro | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
| Pro | Pro | Val | Tyr | Thr | Asn | Gly | Lys | Lys | Leu | Asp | Gly | Ile | Tyr | Gln | Tyr | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | |
| Gly | His | Ile | Glu | Thr | Asn | Asp | Asn | Thr | Ala | Gln | Leu | Gly | Gly | Lys | Tyr | | |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | | |
| Arg | Tyr | Gly | Glu | Ile | Leu | Glu | Ser | Glu | Gly | Ser | Ile | Arg | Asp | Leu | Arg | | |
| | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | |
| Asn | Ser | Gly | Tyr | Arg | Ser | Ala | Glu | Asn | Ala | Tyr | Gly | Gly | His | Arg | Gly | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | | | |
| Leu | Gly | Arg | Tyr | Arg | Ala | Ala | Pro | Val | Gly | Arg | Leu | His | Arg | Arg | Glu | | |
| | | | | | | | | 105 | | | | 110 | | | | | |
| Leu | Gln | Pro | Gly | Glu | Ile | Pro | Pro | Gly | Val | Ala | Thr | Gly | Ala | Val | Gly | | |
| | | 115 | | | | | | 120 | | | | 125 | | | | | |
| Pro | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Thr | Gly | Gly | Met | Leu | Ala | Ala | Asp | Gly | Ile | | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | | 140 | | | | | |
| Leu | Ala | Gly | Gln | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Asp | | |
| | | 145 | | | | 150 | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly | Gly | Gly | Val | Leu | Gly | Val | Leu | Gly | Glu | Gly | | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | | |
| Gly | Ile | Leu | Ser | Thr | Val | Gln | Gly | Ile | Thr | Gly | Leu | Arg | Ile | Val | Glu | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| Leu | Thr | Leu | Pro | Arg | Val | Ser | Val | Arg | Leu | Leu | Pro | Gly | Val | Gly | Val | | |
| | | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| Tyr | Leu | Ser | Leu | Tyr | Thr | Arg | Val | Ala | Ile | Asn | Gly | Lys | Ser | Leu | Ile | | |
| | | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Gly | Phe | Leu | Asp | Val | Ala | Val | Glu | Val | Asn | Ile | Thr | Ala | Lys | Val | Arg | | |
| | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | |
| Leu | Thr | Met | Asp | Arg | Thr | Gly | Tyr | Pro | Arg | Leu | Val | Ile | Glu | Arg | Cys | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| Asp | Thr | Leu | Leu | Gly | Gly | Ile | Lys | Val | Lys | Leu | Leu | Arg | Gly | Leu | Leu | | |
| | | | | 260 | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| Pro | Asn | Leu | Val | Asp | Asn | Leu | Val | Asn | Arg | Val | Leu | Ala | Asp | Val | Leu | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| Pro | Asp | Leu | Leu | Cys | Pro | Ile | Val | Asp | Val | Val | Leu | Gly | Leu | Val | Asn | | |
| | | | | | 295 | | | | | | 300 | | | | | | |
| Asp | Gln | Leu | Gly | Leu | Val | Asp | Ser | Leu | Ile | Pro | Leu | Gly | Ile | Leu | Gly | | |
| | | 305 | | | | 310 | | | | 315 | | | | 320 | | | |
| Ser | Val | Gln | Tyr | Thr | Phe | Ser | Ser | Leu | Pro | Leu | Val | Thr | Gly | Glu | Phe | | |
| | | | | | 325 | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| Leu | Glu | Leu | Asp | Leu | Asn | Thr | Leu | Val | Gly | Glu | Ala | Gly | Gly | Gly | Leu | | |
| | | | | 340 | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| Ile | Asp | Tyr | Pro | Leu | Gly | Trp | Pro | Ala | Val | Ser | Pro | Lys | Pro | Met | Pro | | |
| | | | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| Glu | Leu | Pro | Pro | Met | Gly | Asp | Asn | Thr | Lys | Ser | Gln | Leu | Ala | Met | Ser | | |
| | | | | | 375 | | | | | | 380 | | | | | | |
| Ala | Asn | Phe | Leu | Gly | Ser | Val | Leu | Thr | Leu | Leu | Gln | Lys | Gln | His | Ala | | |
| | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | |
| Leu | Asp | Leu | Asp | Ile | Thr | Asn | Gly | Met | Phe | Glu | Glu | Leu | Pro | Pro | Leu | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | |
| Thr | Thr | Ala | Thr | Leu | Gly | Ala | Leu | Ile | Pro | Lys | Val | Phe | Gln | Gln | Tyr | | |
| | | | | | | | | | 425 | | | | 430 | | | | |
| Pro | Glu | Ser | Cys | Pro | Leu | Ile | Ile | Arg | Ile | Gln | Val | Leu | Asn | Pro | Pro | | |
| | | | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | |
| Ser | Val | Met | Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Ala | Leu | Val | Lys | Val | Leu | Ala | Thr | | |
| | | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | |
| Ala | Glu | Val | Met | Val | Ser | Gln | Pro | Lys | Asp | Leu | Glu | Thr | Thr | Ile | Cys | | |
| | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | |
| Leu | Ile | Asp | Val | Asp | Thr | Glu | Phe | Leu | Ala | Ser | Phe | Ser | Thr | Glu | Gly | | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | | |
| Asp | Lys | Leu | Met | Ile | Asp | Ala | Lys | Leu | Glu | Lys | Thr | Ser | Leu | Asn | Leu | | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | |

ES 2 731 126 T3

Arg Thr Ser Asn Val Gly Asn Phe Asp Ile Gly Leu Met Glu Val Leu
 515 520 525
 Val Glu Lys Ile Phe Asp Leu Ala Phe Met Pro Ala Met Asn Ala Val
 530 535 540
 Leu Gly Ser Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Leu Asn Ile Asp Phe Ser
 545 550 555 560
 Asn Ala Asp Ile Asp Val Leu Glu Asp Leu Leu Val Leu Ser Ala
 565 570 575

<210> 5

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
 35 40 45
 Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr
 50 55 60
 Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly
 85 90 95
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu
 100 105 110
 Leu Gln Pro Gly Glu Ile Pro Pro Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gly
 115 120 125
 Pro Gly Gly Leu Leu Gly Thr Gly Gly Met Leu Ala Ala Asp Gly Ile
 130 135 140
 Leu Ala Gly Gln Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Gly Gly Gly Gly Val Leu Gly Val Leu Gly Glu Gly
 165 170 175
 Gly Ile Leu Ser Thr Val Gln Gly Ile Thr Gly Leu Arg Ile Val Glu
 180 185 190
 Leu Thr Leu Pro Arg Val Ser Val Arg Leu Leu Pro Gly Val Gly Val
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Tyr Thr Arg Val Ala Ile Asn Gly Lys Ser Leu Ile
 210 215 220
 Gly Phe Leu Asp Ile Ala Val Glu Val Asn Ile Thr Ala Lys Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Met Asp Arg Thr Gly Tyr Pro Arg Leu Val Ile Glu Arg Cys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Leu Gly Gly Ile Lys Val Lys Leu Leu Arg Gly Leu Leu
 260 265 270
 Pro Asn Leu Val Asp Asn Leu Val Thr Arg Val Leu Ala Asp Val Leu
 275 280 285
 Pro Asp Leu Leu Cys Pro Ile Val Asp Val Val Leu Gly Leu Val Asn
 290 295 300
 Asp Gln Leu Gly Leu Val Asp Ser Leu Ile Pro Leu Gly Ile Leu Gly
 305 310 315 320
 Ser Val Gln Tyr Thr Phe Ser Ser Leu Pro Leu Val Thr Gly Glu Phe
 325 330 335
 Leu Glu Leu Asp Leu Asn Thr Leu Val Gly Glu Ala Gly Gly Gly Leu
 340 345 350
 Ile Asp Tyr Pro Leu Gly Trp Pro Ala Val Ser Pro Lys Pro Met Pro
 355 360 365
 Glu Leu Pro Pro Met Gly Asp Asn Thr Lys Ser Gln Leu Ala Met Ser

ES 2 731 126 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 370 | Ala | Asn | Phe | Leu | Gly | Ser | Val | Leu | Thr | Leu | Leu | Gln | Lys | Gln | His | Ala |
| 385 | Leu | Asp | Leu | Asp | Ile | Thr | Asn | Gly | Met | Phe | Glu | Glu | Leu | Pro | Pro | Leu |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 | |
| | Thr | Thr | Ala | Thr | Leu | Gly | Ala | Leu | Ile | Pro | Lys | Val | Phe | Gln | Gln | Tyr |
| | | | 420 | | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| | Pro | Glu | Ser | Cys | Pro | Leu | Ile | Ile | Arg | Ile | Gln | Val | Leu | Asn | Pro | Pro |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| | Ser | Val | Met | Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Ala | Leu | Val | Lys | Val | Leu | Ala | Thr |
| | | | 450 | | | | 455 | | | | | | 460 | | | |
| | Ala | Glu | Val | Met | Val | Ser | Gln | Pro | Lys | Asp | Leu | Glu | Thr | Thr | Ile | Cys |
| 465 | | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| | Leu | Ile | Asp | Val | Asp | Thr | Glu | Phe | Leu | Ala | Ser | Phe | Ser | Thr | Glu | Gly |
| | | | | | 485 | | | | 490 | | | | | | 495 | |
| | Asp | Lys | Leu | Met | Ile | Asp | Ala | Lys | Leu | Glu | Lys | Thr | Ser | Leu | Asn | Leu |
| | | | 500 | | | | | | 505 | | | | | 510 | | |
| | Arg | Thr | Ser | Asn | Val | Gly | Asn | Phe | Asp | Ile | Gly | Leu | Met | Glu | Val | Leu |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| | Val | Glu | Lys | Ile | Phe | Asp | Leu | Ala | Phe | Met | Pro | Ala | Met | Asn | Ala | Val |
| | | | 530 | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| | Leu | Gly | Ser | Gly | Val | Pro | Leu | Pro | Lys | Ile | Leu | Asn | Ile | Asp | Phe | Ser |
| 545 | | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| | Asn | Ala | Asp | Ile | Asp | Val | Leu | Glu | Asp | Leu | Leu | Val | Leu | Ser | Ala | |
| | | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | |

<210> 6

<211> 575

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Leu | Gln | Gln | Ser | Asp | Ala | Leu | His | Ser | Ala | Leu | Arg | Glu | Val | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Leu | Gly | Val | Gly | Asp | Ile | Pro | Tyr | Asn | Asp | Phe | His | Val | Arg | Gly | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | |
| Pro | Pro | Val | Tyr | Thr | Asn | Gly | Lys | Leu | Asp | Gly | Ile | Tyr | Gln | Tyr | |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | His | Ile | Glu | Thr | Asn | Asp | Asn | Thr | Ala | Gln | Leu | Gly | Gly | Lys | Tyr |
| | | | 50 | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Arg | Tyr | Gly | Glu | Ile | Leu | Glu | Ser | Glu | Gly | Ser | Ile | Arg | Asp | Leu | Arg |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Asn | Ser | Gly | Tyr | Arg | Ser | Ala | Glu | Asn | Ala | Tyr | Gly | Gly | His | Arg | Gly |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Leu | Gly | Arg | Tyr | Arg | Ala | Ala | Pro | Val | Gly | Arg | Leu | His | Arg | Arg | Glu |
| | | | | 100 | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Leu | Gln | Pro | Gly | Glu | Ile | Pro | Pro | Gly | Val | Ala | Thr | Gly | Ala | Val | Gly |
| | | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | |
| Pro | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Thr | Gly | Gly | Met | Leu | Ala | Ala | Asp | Gly | Ile |
| | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Leu | Ala | Gly | Gln | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Asp |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly | Gly | Gly | Val | Leu | Gly | Val | Leu | Gly | Glu | Gly |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Gly | Ile | Leu | Ser | Thr | Val | Gln | Gly | Ile | Thr | Gly | Leu | Arg | Ile | Val | Glu |
| | | | | 180 | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Leu | Thr | Leu | Pro | Arg | Val | Ser | Val | Arg | Leu | Leu | Pro | Gly | Val | Gly | Val |
| | | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | |
| Tyr | Leu | Ser | Leu | Tyr | Thr | Arg | Val | Ala | Ile | Asn | Gly | Lys | Ser | Leu | Ile |
| | | | | 210 | | | 215 | | | | | 220 | | | |
| Gly | Phe | Leu | Asp | Val | Ala | Val | Glu | Val | Asn | Ile | Thr | Ala | Lys | Val | Arg |
| 225 | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | 240 |

ES 2 731 126 T3

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

<210> 7
 <211> 575
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Gln Gln Ser Asp Ala Leu His Ser Ala Leu Arg Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Gly Val Gly Asp Ile Pro Tyr Asn Asp Phe His Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Pro Val Tyr Thr Asn Gly Lys Lys Leu Asp Gly Ile Tyr Gln Tyr
 35 40 45
 Gly His Ile Glu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Gln Leu Gly Gly Lys Tyr
 50 55 60
 Arg Tyr Gly Glu Ile Leu Glu Ser Glu Gly Ser Ile Arg Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Tyr Arg Ser Ala Glu Asn Ala Tyr Gly Gly His Arg Gly
 85 90 95
 Leu Gly Arg Tyr Arg Ala Ala Pro Val Gly Arg Leu His Arg Arg Glu

ES 2 731 126 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| Leu | Gln | Pro | Gly | Glu | Ile | Pro | Pro | Gly | Val | Ala | Thr | Gly | Ala | Val | Gly | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Pro | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Thr | Gly | Gly | Met | Leu | Ala | Ala | Asp | Gly | Ile | |
| | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | |
| Leu | Ala | Gly | Gln | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Asp | |
| | | | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | 160 | |
| Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Gly | Gly | Gly | Val | Leu | Gly | Val | Leu | Gly | Glu | Gly | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| Gly | Ile | Leu | Ser | Thr | Val | Gln | Gly | Ile | Thr | Gly | Leu | Arg | Ile | Val | Glu | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | 190 | | | |
| Leu | Thr | Leu | Pro | Arg | Val | Ser | Val | Arg | Leu | Leu | Pro | Gly | Val | Gly | Val | |
| | | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Tyr | Leu | Ser | Leu | Tyr | Thr | Arg | Val | Ala | Ile | Asn | Gly | Lys | Ser | Leu | Ile | |
| | | | | 210 | | | | 215 | | | | 220 | | | | |
| Gly | Phe | Leu | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Val | Asn | Ile | Thr | Ala | Lys | Val | Arg | |
| | | | | 225 | | | | 230 | | | | 235 | | | 240 | |
| Leu | Thr | Met | Asp | Arg | Thr | Gly | Tyr | Pro | Arg | Leu | Val | Ile | Glu | Arg | Cys | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Asp | Thr | Leu | Leu | Gly | Gly | Ile | Lys | Val | Lys | Leu | Leu | Arg | Gly | Leu | Leu | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | 270 | | | |
| Pro | Asn | Leu | Val | Asp | Asn | Leu | Val | Asn | Arg | Val | Leu | Ala | Asp | Val | Leu | |
| | | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Pro | Asp | Leu | Leu | Cys | Pro | Ile | Val | Asp | Val | Val | Leu | Gly | Leu | Val | Asn | |
| | | | | 290 | | | | 295 | | | | 300 | | | | |
| Asp | Gln | Leu | Gly | Leu | Val | Asp | Ser | Leu | Ile | Pro | Leu | Gly | Ile | Leu | Gly | |
| | | | | 305 | | | | | | | 315 | | | | 320 | |
| Ser | Val | Gln | Tyr | Thr | Phe | Ser | Ser | Leu | Pro | Leu | Val | Thr | Gly | Glu | Phe | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| Leu | Glu | Leu | Asp | Leu | Asn | Thr | Leu | Val | Gly | Glu | Ala | Gly | Gly | Gly | Leu | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | 350 | | | |
| Ile | Asp | Tyr | Pro | Leu | Gly | Trp | Pro | Ala | Val | Ser | Pro | Lys | Pro | Met | Pro | |
| | | | | 355 | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Glu | Leu | Pro | Pro | Met | Gly | Asp | Asn | Thr | Lys | Ser | Gln | Leu | Ala | Met | Ser | |
| | | | | 370 | | | | 375 | | | | 380 | | | | |
| Ala | Asn | Phe | Leu | Gly | Ser | Val | Leu | Thr | Leu | Leu | Gln | Lys | Gln | His | Ala | |
| | | | | 385 | | | | | | | 395 | | | | 400 | |
| Leu | Asp | Leu | Asp | Ile | Thr | Asn | Gly | Met | Phe | Glu | Glu | Leu | Pro | Pro | Leu | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| Thr | Thr | Ala | Thr | Leu | Gly | Ala | Leu | Ile | Pro | Lys | Val | Phe | Gln | Gln | Tyr | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Pro | Glu | Ser | Cys | Pro | Leu | Ile | Ile | Arg | Ile | Gln | Val | Leu | Asn | Pro | Pro | |
| | | | | 435 | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| Ser | Val | Met | Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Ala | Leu | Val | Lys | Val | Leu | Ala | Thr | |
| | | | | 450 | | | | 455 | | | | 460 | | | | |
| Ala | Glu | Val | Met | Val | Ser | Gln | Pro | Lys | Asp | Leu | Glu | Thr | Thr | Ile | Cys | |
| | | | | 465 | | | | | 475 | | | | | | 480 | |
| Leu | Ile | Asp | Val | Asp | Thr | Glu | Leu | Leu | Ala | Ser | Phe | Ser | Ile | Glu | Gly | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| Asp | Lys | Leu | Met | Ile | Asp | Ala | Lys | Leu | Glu | Lys | Thr | Ser | Leu | Asn | Leu | |
| | | | | 500 | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| Arg | Thr | Ser | Asn | Val | Gly | Asn | Phe | Asp | Ile | Gly | Leu | Met | Glu | Val | Leu | |
| | | | | 515 | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| Val | Glu | Lys | Ile | Phe | Asp | Leu | Ala | Phe | Met | Pro | Ala | Met | Asn | Ala | Val | |
| | | | | 530 | | | | 535 | | | | 540 | | | | |
| Leu | Gly | Ser | Gly | Val | Pro | Leu | Pro | Lys | Ile | Leu | Asn | Ile | Asp | Phe | Ser | |
| | | | | 545 | | | | | 550 | | | 555 | | | 560 | |
| Asn | Ala | Asp | Ile | Asp | Val | Leu | Glu | Asp | Leu | Leu | Val | Leu | Ser | Ala | | |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | |

REIVINDICACIONES

1. Una variante de la proteína BPIFB4, que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 85 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o un fragmento de la misma y **caracterizada porque** la secuencia de dicha variante o fragmento comprende una valina en la posición correspondiente a la posición 229 de la SEQ ID NO:1, una treonina en la posición correspondiente a la posición 281 de la SEQ ID NO:1, una fenilalanina en una posición correspondiente a la posición 488 de la SEQ ID NO:1 y una treonina en una posición correspondiente a la posición 494 de la SEQ ID NO:1 y dicha variante o fragmento tiene actividad para aumentar la actividad de eNOS y/o la producción de NO, para su uso (i) en la prevención, reducción del riesgo, mejoría o tratamiento de una patología seleccionada de entre hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, disfunción eréctil, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, trastornos cognitivos, degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, glaucoma, angina espástica coronaria, trombosis, hipertensión pulmonar, preeclampsia, vasculitis, trastornos inflamatorios e insuficiencia venosa; o (ii) en la mejoría de la fatiga posterior al ejercicio en la distrofia muscular o como coadyuvante en la implantación de una o más endoprótesis para oclusiones vasculares.
2. Una variante de proteína BPIFB4 para su uso según la reivindicación 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
3. La variante de la proteína BPIFB4 o un fragmento de la misma para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, donde la variante de la proteína BPIFB4 o un fragmento de la misma está unida a una secuencia para dirigir dicha variante de la proteína BPIFB4 o fragmento de la misma a un órgano o tejido específico.
4. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una variante de proteína BPIFB4 que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 85 % de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o un fragmento de la misma y **caracterizada porque** la secuencia de dicha variante o fragmento comprende una valina en la posición correspondiente a la posición 229 de la SEQ ID NO:1, una treonina en la posición correspondiente a la posición 281 de la SEQ ID NO:1, una fenilalanina en una posición correspondiente a la posición 488 de la SEQ ID NO:1 y una treonina en una posición correspondiente a la posición 494 de la SEQ ID NO:1 y dicha variante o fragmento tiene actividad para aumentar la actividad de eNOS y/o la producción de NO, ligada operativamente a secuencias de control de la expresión, para su uso en (i) la prevención, reducción del riesgo, mejoría o tratamiento de una patología seleccionada de entre hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, disfunción eréctil, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, trastornos cognitivos, degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, glaucoma, angina espástica coronaria, trombosis, hipertensión pulmonar, preeclampsia, vasculitis, trastornos inflamatorios e insuficiencia venosa; o (ii) la mejoría de la fatiga posterior al ejercicio en la distrofia muscular o como coadyuvante en la implantación de una o más endoprótesis para oclusiones vasculares.
5. Un vector para su uso según la reivindicación 4, donde la variante de la proteína BPIFB4 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.
6. Un vector para su uso según las reivindicaciones 4 o 5 donde la variante de proteína BPIFB4 o un fragmento de la misma está unida a una secuencia útil para dirigir dicha variante de proteína BPIFB4 o fragmento de la misma a un órgano o tejido específico.
7. Un vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que contiene un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma que comprende los nucleótidos que codifican la valina 229, la treonina 281, la fenilalanina 488 y la treonina 494 de la SEQ ID NO:1.
8. Un vector para su uso según la reivindicación 7, que contiene un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2.
9. Un vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que es un vector vírico.
10. Un vector para su uso según la reivindicación 9, que es un vector de adenovirus.
11. Un vector para su uso según la reivindicación 9, que se selecciona de entre vectores de serotipos 1-9 de AAV.

12. Una composición farmacéutica que comprende un vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, mezclado con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en (i) la prevención, reducción del riesgo, mejoría o tratamiento de una patología seleccionada de entre hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, insuficiencia renal, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, disfunción eréctil, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, trastornos cognitivos, degeneración de la retina, uveorretinitis, retinopatía vascular, glaucoma, angina espástica coronaria, trombosis, hipertensión pulmonar, preeclampsia, vasculitis, trastornos inflamatorios e insuficiencia venosa; o (ii) la mejoría de la fatiga posterior al ejercicio en la distrofia muscular o como coadyuvante en la implantación de una o más endoprótesis para oclusiones vasculares.

10

Figura 1

ttcgagctcgccccgacattgattattgactagttattaata
 gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatgg
 agttccgcggttacataacttacggtaaataggcccgctggc
 tgaccgccccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgac
 gtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgac
 gtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggca
 gtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattga
 cgtcaatgacggtaaataggcccgctggcattatgccagt
 acatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctac
 gtattagtcatcgctattaccatgggtgatgcgggttttggca
 gtacatcaatgggctggatagcgggttgactcacggggat
 ttccaagtctccacccccattgacgtcaatgggagtttggtt
 tggcaccaaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaa
 ctccgccccattgacgcaaatagggctgtaggcgtgtacgg
 gggagggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccgtcag
 atcgcttgagacgccatccacgctgttttgacctccatag
 aagacaccgggaccgatccagcctccgcccggggaacgg
 gcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagt
 accgcctatagagtctataggcccccccccttggcttcggt
 agaacgcggctacaattaatacataaccttatgtatcatac
 acatacgatttaggtgacactatagaataacatccactttg
 ctttctctccacaggtgtccactcccagggtccaactgcac
 ctcggttctaagcttgcatgcctgcaggctcactctagagg
 atccccgccaccatgctgcagcaaagtgatgctctccactc
ggcctgagagaggtgcccttgggtggttgatattccct
acaatgacttccatgtccgaggacccccccagtatatacc
aacggcaaaaaacttgatgggtatttaccagtatggtcacat
tgagaccaacgacaacactgctcagctgggggggcaatacc
gatatgggtgagatccttgagtccgaggggaagcatcagggac

ctccgaaacagtggctatcgcagtgccgagaatgcatatgg
aggccacaggggcctcgggcgatacagggcagcacctgtgg
gcaggcttcaccggcgagagctgcagcctggagaaatccca
cctggagttgccactggggcggtgggcccagggtggtttgct
gggcactggaggcatgctggcagctgatggcatcctcgcag
gccaagggtggcctgctcggcgagggtggtctccttgggtgat
ggaggacttcttggaggagggggtgtcctgggctgtcctcgg
cgagggtggcatcctcagcactgtgcaaggcatcacggggc
tgcgtatcgtggagctgaccctccctcgggtgtccgtgcgg
ctcctgcccggcgtgggtgtctacctgagcttgtacaccg
tgtggccatcaacgggaagagtcttattggcttcctggaca
/gtgcagtagaagtgaacatcacagccaagggtccggctga
ccatggaccgcacgggttatcctcggctgggtcattgagcga
tgtgacaccctcctagggggcatcaaagtcaagctgctgcg
agggttctccccaatctcgtggacaatttagtgaa**/ccc**g
agtcctggccgacgtcctcctgacttgetctgcccacatcg
tggatgtggtgctgggtcttgtcaatgaccagctgggcctc
gtggattctctgattcctctggggatattgggaagtgtcca
gtacaccttctccagcctcccgttgtgaccgggggaattcc
tggagctggacctcaacacgctgggtggggaggctggagga
ggactcatcgactaccattgggggtggccagctgtgtctcc
caagccgatgccagagctgcctcccatgggtgacaacacca
agtcccagctggccatgtctgccaacttctgggctcagtg
ctgactctactgcagaagcagcatgctctagacctggatat
caccaatggcatgtttgaagagcttcctccacttaccacag
ccacactgggagccctgatcccaagggtgttccagcagtac
cccgagtcctgcccacttatcatcaggatccagggtgctgaa
cccaccatctgtgatgctgcagaaggacaaagcgtgggtga
agggtgttggccactgccgagggtcatggtctcccagcccaa

gacctggagactaccatctgcctcattgacgtggacacaga
attcttggcctcattttccacagaaggagataagctcatga
ttgatgccaagctggagaagaccagcctcaacctcagaacc
tcaaacgtgggcaactttgatattggcctcatggaggtgct
ggtggagaagatTTTTgacctggcattcatgcccgaatga
acgctgtgctgggttctggcgtccctctccccaaaatcctc
aacatcgactttagcaatgcagacattgacgtggtggagga
cTTTTggtgctgagcgcacgggtaccggtcgccaccatgg
tgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatc
ctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcag
cgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagc
tgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtg
ccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgca
gtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgact
tcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgc
accatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcgc
cgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcg
agctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctg
gggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtcta
tatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaact
tcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctc
gccgaccactaccagcagaacccccatcggcgacggccc
cgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcgg
ccctgagcaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtc
ctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggcat
ggacgagctgtacaagtaaagcggccgcgactctagaattc
aatcgatgggccgcatggcccaacttgtttattgcagctta
taatggttacaaataaagcaatagcatcaciaatttcacia
ataaagcattTTTTTcactgcattctagttgtggtttgtcc

aaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcggaatta
attcggcgcagcaccatggcctgaaataacctctgaaagag
gaacttggttaggtaccttctgaggcggaaagaaccagctg
tggaatgtgtgtcagttaggggtgtggaaagtccccaggctc
cccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagt
cagcaaccagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggc
agaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccat
agtcccgcccctaactecgcccatacccgcccctaactecgc
ccagttccgcccattctccgcccataggctgactaattttt
tttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagct
attccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaggct
tttgcaaaaagctgttaacagcttggcactggccgctcgttt
tacaacgctcgtgactgggaaaaccctggcgttaccactt
aatcgccttgcagcacatccccctttcggccagctggcgtaa
tagcgaagaggcccgaccgatcgccttcccaacagttgc
gcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatttctc
cttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaag
caaccatagtacgcgcctgtagcggcgcattaagcgcggc
gggtgtgggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcca
gcgccttagcgcgccgctcctttcgetttcttcccttccttt
ctcggccacgttcggcggctttccccgtcaagctctaaatcg
ggggctccctttaggggttccgatttagtgctttacggcacc
tcgacccccaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagt
gggcatcgcctgatagacgggtttttcggcctttgacggt
ggagtccacgttctttaatagtgactcttgttccaaactg
gaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgattta
taagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatga
gctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatat
taacgtttacaattttatgggtgactctcagtacaatctgc

tctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaac
accgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcat
ccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatg
tgtcagagggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacg
aaagggcctcgtgatacgcctatTTTTataggttaatgtca
tgataataatgggtttcttagacgtcagggtggcacttttcgg
ggaaatgtgcgcggaacccctatTTTgtttatTTTTtctaaat
acattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgat
aatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtatt
caacatttccgtgtcgccttattccctTTTTTgcggcatt
ttgccttctgtTTTTgtcaccagaaacgctgggtgaaag
taaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttac
atcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttt
tcgccccgaagaacgTTTTccaatgatgagcactTTTaaag
ttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccggg
caagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatga
cttgggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgg
atggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacc
atgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgat
cggaggaccgaaggagctaaccgctTTTTTgcacaacatgg
gggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctg
aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcc
tgtagcaatggcaacaacgTTTgcgcaaactattaactggcg
aactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactgg
atggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggc
ccttccggctggctgggtttattgctgataaatctggagccg
gtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcca
gatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggg
gagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctg

agataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagac
caagtttactcatatacttttagattgatttaaacttca
tttttaatttaaaggatctaggtgaagatcctttttgata
atctcatgaccaaatacccttaacgtgagttttcgttccac
tgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttg
agatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaaca
aaaaaccaccgctaccagcgggtggtttggttgccggatcaa
gagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcag
agcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatac
ctcgctctgctaactctggtaccagtggtgctgcccagtg
cgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagt
taccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcg
tgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaact
gagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcaccgcttc
ccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagg
gtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaa
cgctgggtatctttatagtctgtcgggtttcgccacctct
gacttgagcgtcgatTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
agcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggtt
cctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctg
cgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttt
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcg
cagcgagtcagtgagcgaggaagcgggaagagcgccaatac
gcaaaccgcctctccccgcgcggttgccgattcattaatgc
agctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtga
gcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcac
cccaggctttacactttatgcttccggctcgatgttgtgt
ggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcta
tgacatgattacgaattaa

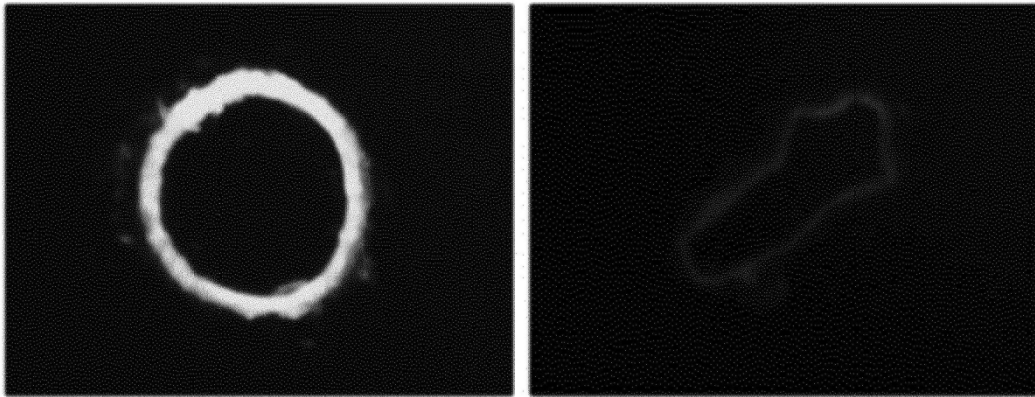


Figura 2

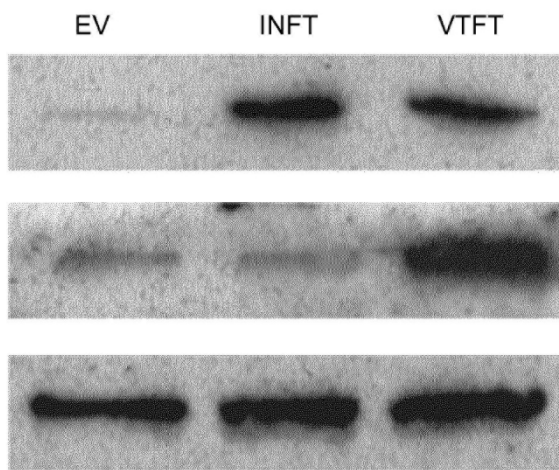


Figura 3

BPIFB4

p-eNOS (S1177)

β -actina

Figura 3a

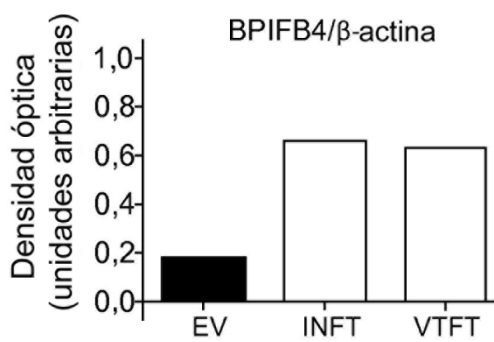


Figura 3b

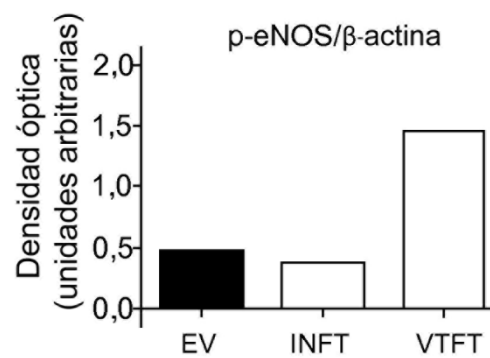


Figura 3c

Figura 4

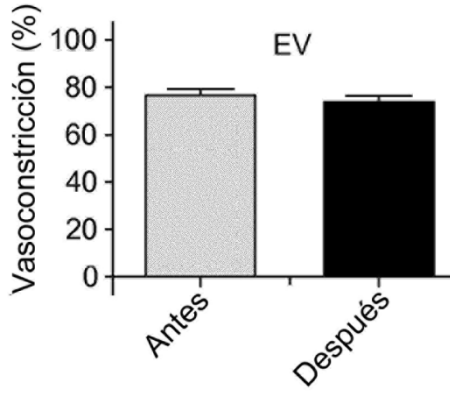


Figura 4a

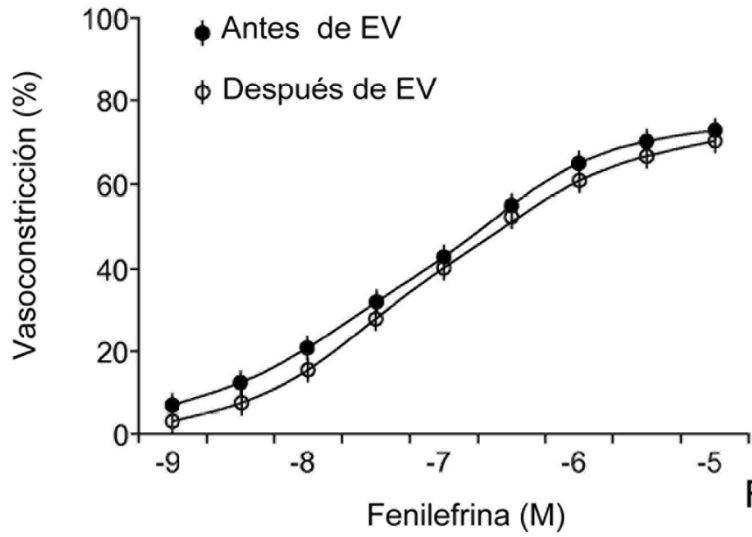


Figura 4b

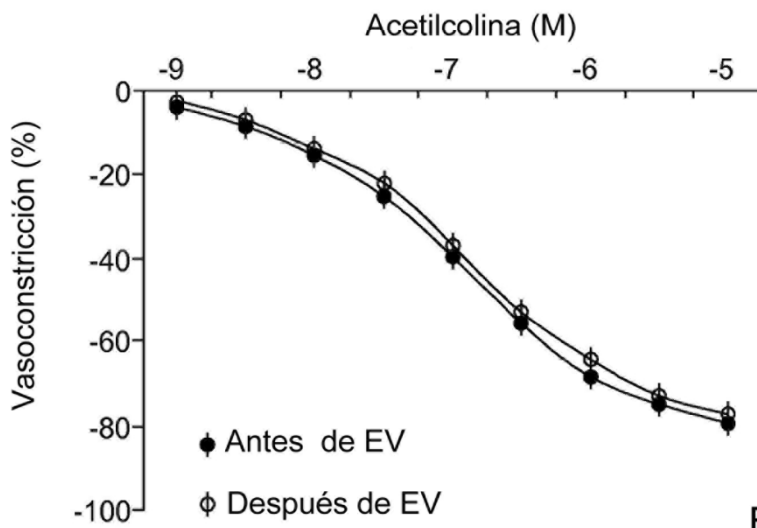


Figura 4c

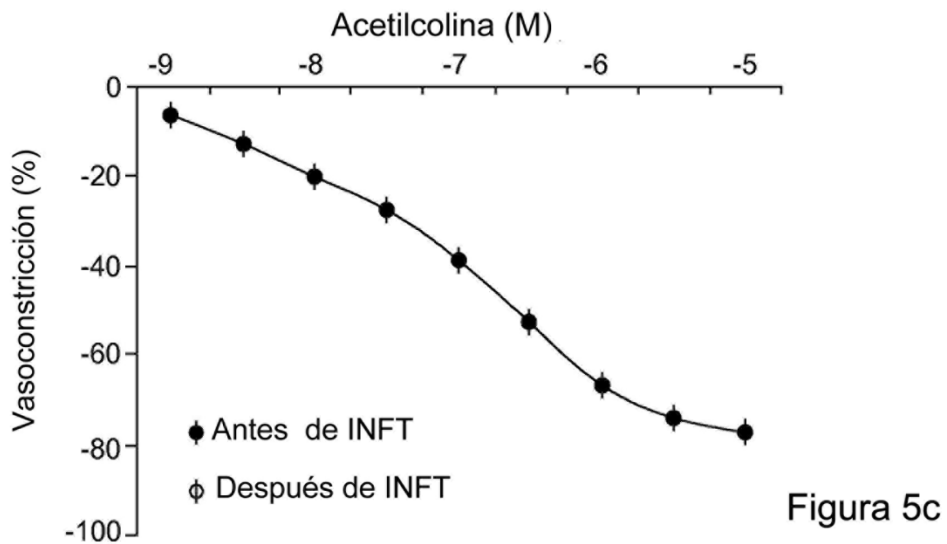
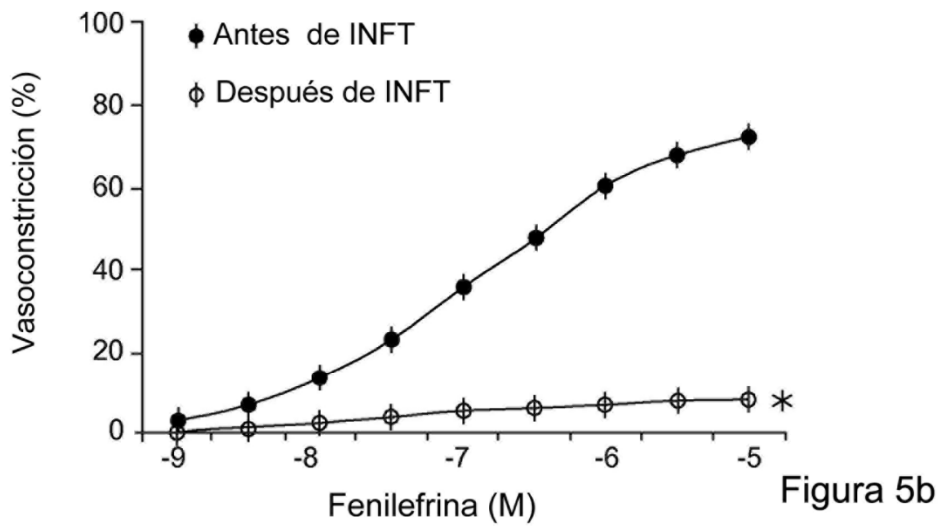
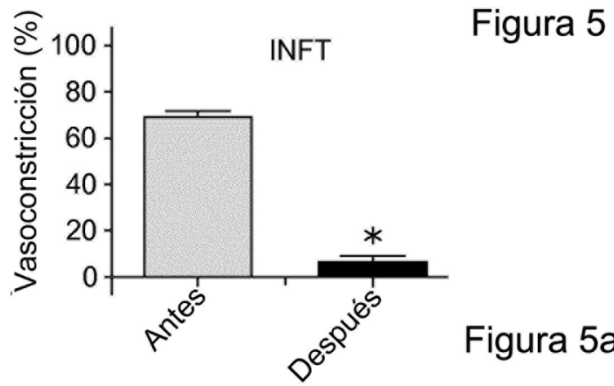


Figura 6

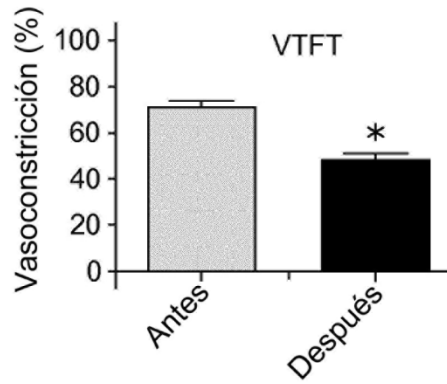


Figura 6a

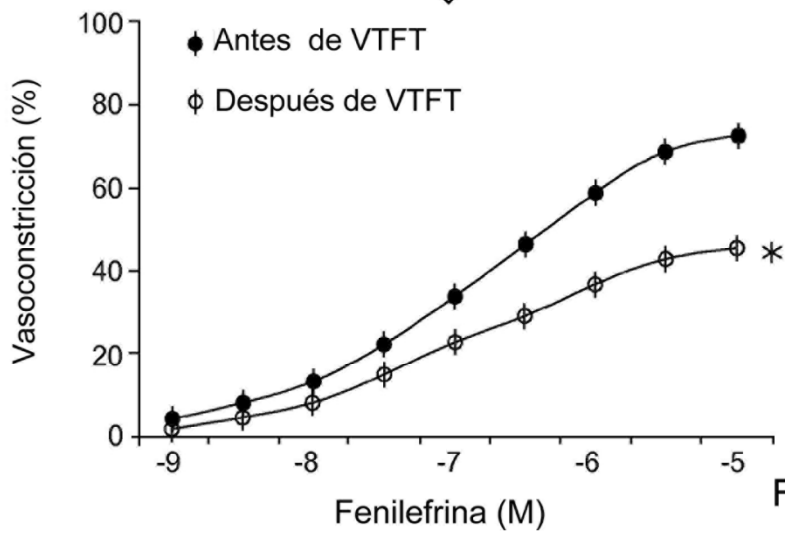


Figura 6b

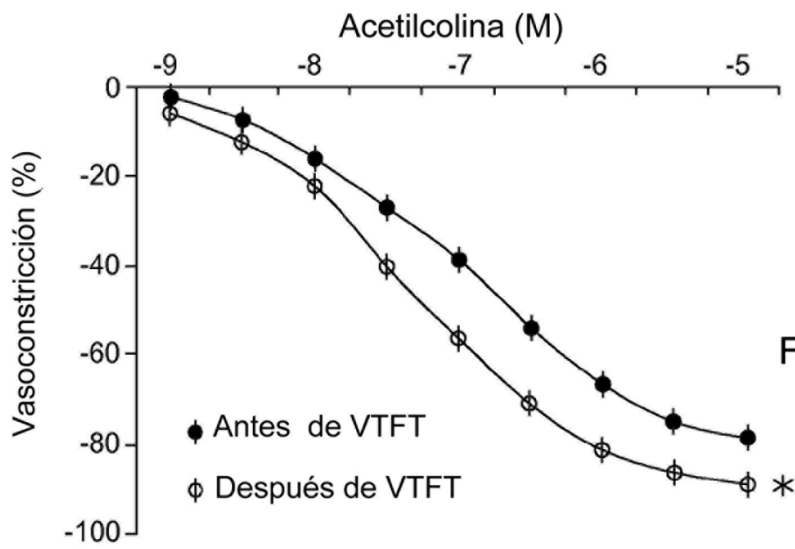


Figura 6c

Figura 7

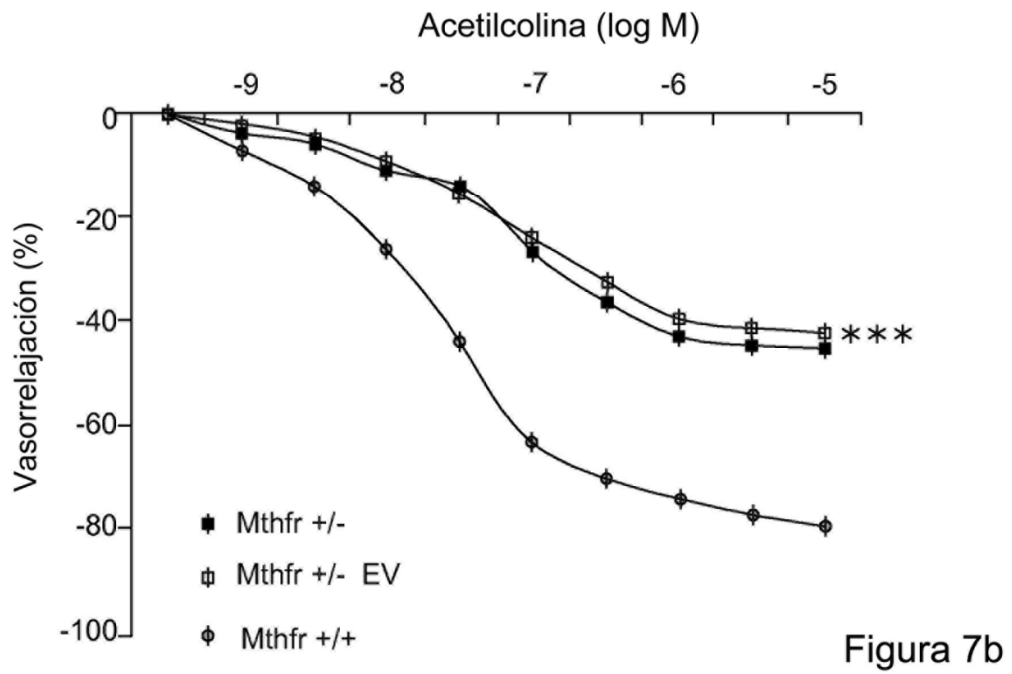
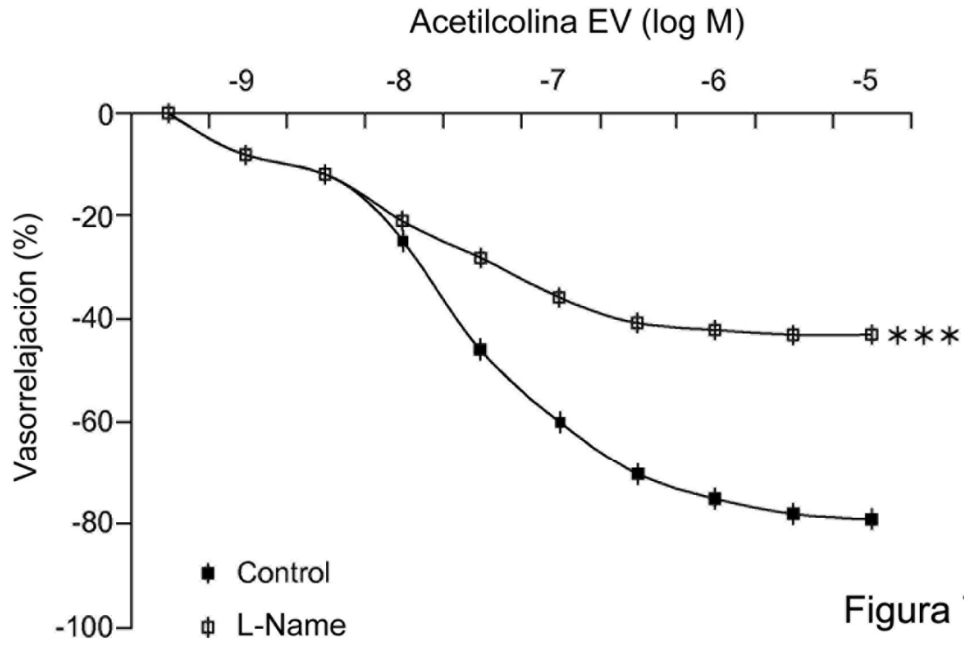
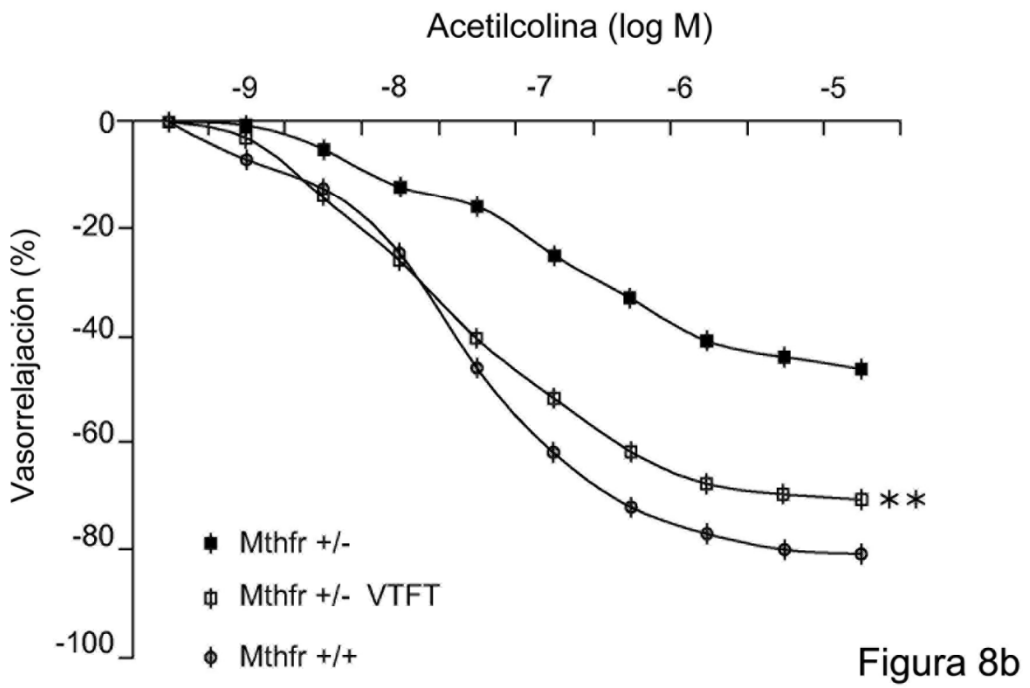
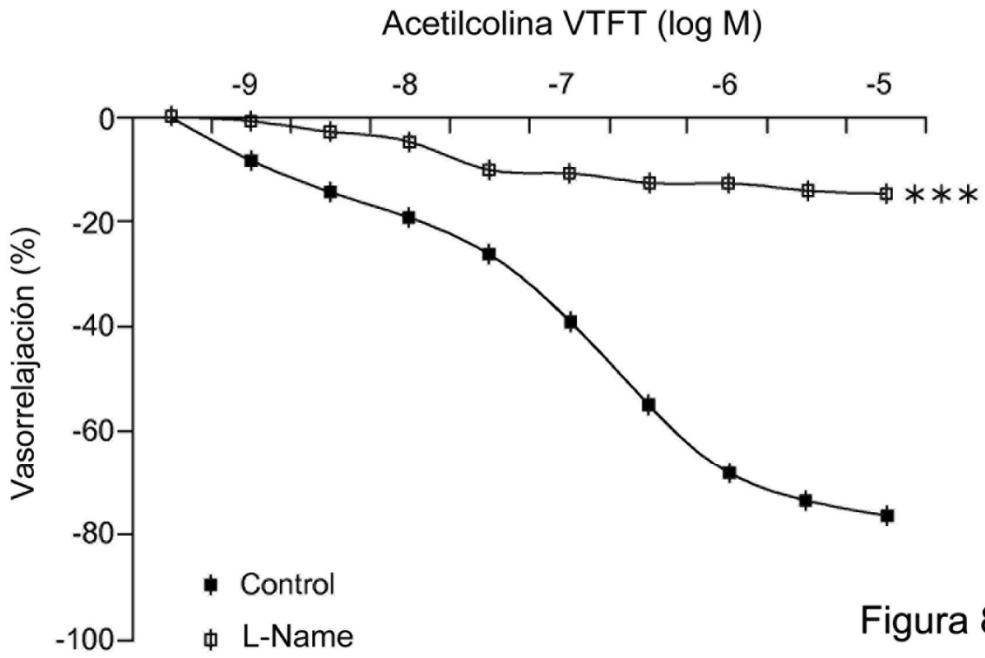


Figura 8



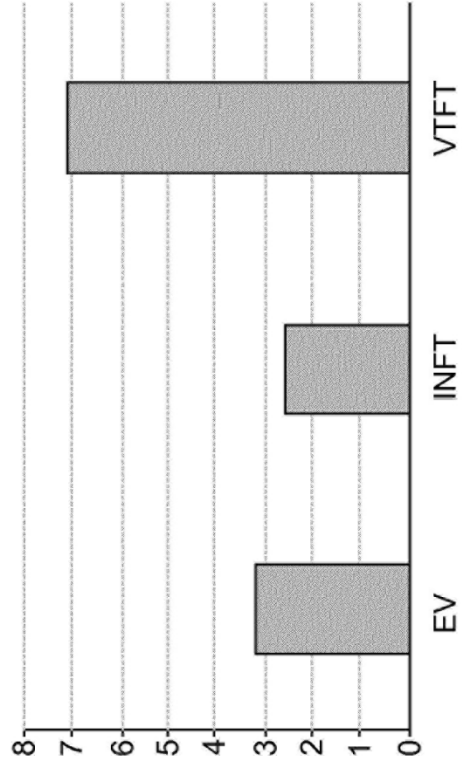


Figura 9b

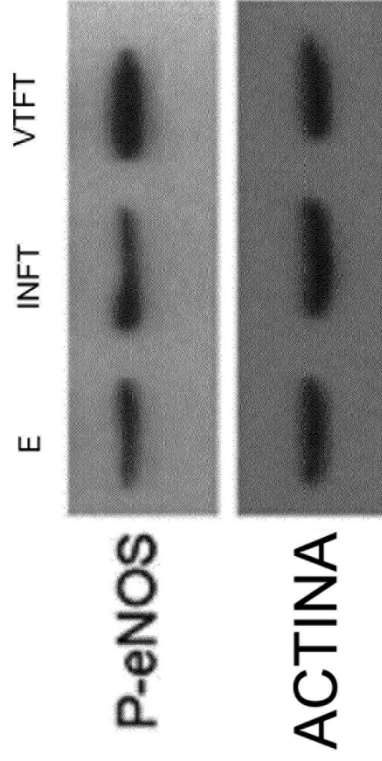


Figura 9c

Figura 9

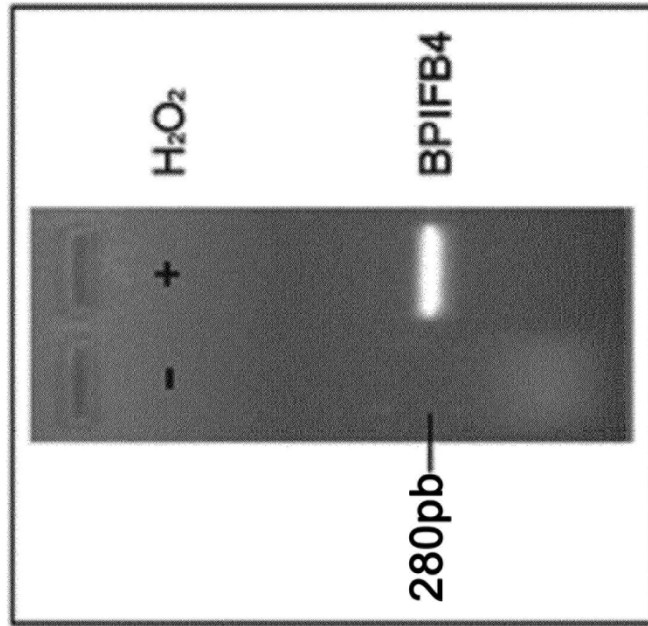


Figura 9a