

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61P 9/12

G01N 33/68



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818115.2

[43] 公开日 2003 年 4 月 30 日

[11] 公开号 CN 1414871A

[22] 申请日 2000.11.10 [21] 申请号 00818115.2

[30] 优先权

[32] 1999.11.16 [33] GB [31] 9927125.6

[86] 国际申请 PCT/GB00/04315 2000.11.10

[87] 国际公布 WO01/36979 英 2001.5.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.2

[71] 申请人 里丁大学

地址 英国里丁市

[72] 发明人 奈杰尔·佩奇 菲利浦·劳里

[74] 专利代理机构 中国商标专利事务所

代理人 许天易

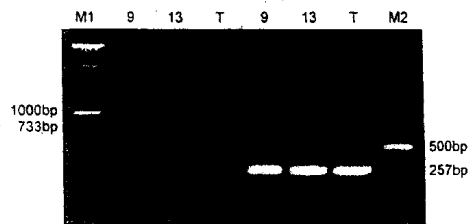
权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 20 页

[54] 发明名称 胎盘人神经激肽 B 前体

[57] 摘要

本发明提供了一种通过测定神经激肽 B、它的前体及其片段的生成而诊断妊娠性高血压或子痫前期的方法，以及用于这些方法的药盒。本发明还提供了这些疾病的治疗方法以及制备适宜的药物方法，以及抗体和有用的抗原材料。

完全人神经激肽 B 前体的定量 PCR  
神经激肽 B β-肌动蛋白



ISSN 1008-4274

- 1、一种用于预测或诊断妊娠性高血压、子痫前期或相关的胎儿并发症的药盒，该药盒包括一种针对神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的结合对（例如抗体）。
- 2、根据权利要求 1 所述的药盒，其特征在于还包括如何实施测定方法的说明书，该测定方法用于预测生物样品中的神经激肽 B 的水平，并使测定结果分别与妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来发展程度相关联。
- 5 3、一种用于评估妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来发展程度的药盒，该药盒包括针对神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的一种结合对例如抗体，以及如何实施测定方法的说明书，该测定方法用于预测生物样品中的神经激肽 B 的水平，并使测定结果分别与妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的预期未来严重性相关联。
- 10 4、根据权利要求 1—3 任一项所述的药盒，其特征在于所述结合对是针对神经疾病 B 前体或神经激肽 B 或其表位片段或表位变体的抗体。
- 5、根据权利要求 1—4 任一项所述的药盒，其特征在于所述结合对是针对具有图 1 序列的人神经激肽 B 前体或其表位变体或表位片段的抗体。
- 15 6、根据权利要求 1—5 任一项所述的药盒，其特征在于所述药盒是放射免疫分析药盒、酶联免疫吸附分析药盒、免疫放射性分析药盒或放射性受体分析药盒。
- 7、一种通过服用抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂而预防或治疗人受体中的妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的方法。
- 8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂是 20 NK<sub>1</sub>、NK<sub>2</sub> 或 NK<sub>3</sub> 拮抗剂。
- 9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于 NK<sub>3</sub> 拮抗剂是 SR142801 或者具有以下分子式的十肽菌素：A<sup>1</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>，其中 A<sup>1</sup> 和 D<sup>4</sup> 是 Asp 或 D-Asp 氨基酸。
- 10、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂是 25 调节神经激肽 B 前体基因启动子活性的药剂。
- 11、根据权利要求 7—10 任一项所述的方法，其特征在于选择并服用所述药剂，从而使其在 24 小时期间都有效。
- 12、人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段在用于预测或诊断妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的诊断剂生产中的应用。
- 30 13、根据权利要求 12 所述的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的应用，

其特征在于所述基因产物是人神经激肽 B 前体或人神经激肽 B 或其表位变体或表位片段。

14、根据权利要求 12 或 13 所述的人神经激肽 B 在用于预测或诊断妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的诊断剂生产中的应用。

5 15、用于抑制人神经激肽 B 的生物效应的药剂在用于预防或治疗妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的药物生产中的应用。

16、根据权利要求 15 所述的应用，其特征在于抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂是 NK<sub>1</sub>、NK<sub>2</sub> 或 NK<sub>3</sub> 拮抗剂。

10 17、根据权利要求 15 所述的应用，其特征在于 NK<sub>3</sub> 拮抗剂是 SR142801 或者具有以下分子式的十肽菌素：A<sup>1</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>，其中 A<sup>1</sup> 和 D<sup>4</sup> 是 Asp 或 D-Asp 氨基酸。

18、根据权利要求 15 所述的应用，其特征在于抑制神经激肽 B 生物效应的药剂是调节神经激肽 B 前体基因启动子活性的药剂。

15 19、根据权利要求 15—18 任一项所述的应用，其特征在于调制药物的配方，从而使其在 24 小时期间都有效。

20、一种预测或诊断人受体中早期阶段的妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的方法，该方法包括评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 基因产物或其变体或片段的浓度。

20 21、一种预测或诊断人受体中早期阶段的妊娠性高血压或预测人受体中早期阶段的子痫前期或相关的胎儿并发症的方法，该方法包括评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 或其前体的浓度。

22、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于神经激肽 B 及其前体分别具有图 1 和 2 的序列。

25 23、根据权利要求 20—22 所述的方法，其特征在于包括使用权利要求 1 或 2 任一项所限定的药盒。

24、一种用于评估人受体中妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来发展程度的方法，该方法包括评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，并使测定结果与妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的预期未来严重性相关联。

30 25、根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于包括评估生物样品（例如血液）中的神经激肽 B 的浓度。

- 
- 26、根据权利要求 24 或 25 任一项所述的方法，其特征在于包括使用权利要求 3—5 任一项所限定的药盒。
- 27、根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于所述药盒包括一种特异于神经激肽 B 的抗体。
- 5 28、根据权利要求 26 或 27 所述的方法，其特征在于所述药盒是放射免疫分析药盒、酶联免疫吸附分析药盒、免疫放射性分析药盒或放射性受体分析药盒。
- 29、神经激肽 B 或其兴奋剂在减小高血压的血容积中的应用。
- 30、神经激肽 B 或其兴奋剂在用于减小高血压的血容积的药物制备中的应用。
- 31、一种改善人受体中子痫前期的方法，该方法通过调节人受体的饮食而减小了体内毒素生成物质的含量。
- 10 32、一种改善人受体中子痫前期的方法，该方法通过调节受体的食谱而减小了门静脉中潜在毒素的浓度。
- 33、一种用于改善人受体中子痫前期的食疗方法，其中毒素生成物质的量被减小了。

## 胎盘人神经激肽 B 前体

5 本发明涉及检测由胎盘产生的人神经激肽 B 前体的生成以及检测神经激肽 B 基因产物或变体或其片段的生成，从而作为预测妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症（或者其次的发展过程）发作的一种手段。本申请还涉及通过抑制母亲血液中所分泌的过量神经激肽 B 的效应而预防或治疗妊娠性高血压或子痫前期的方法。

10 妊娠性高血压（PIH）和子痫前期这两种最难以捉摸和最复杂的妊娠疾病，还很难定义和对付。子痫前期在西方世界还是最普遍和最威胁生命的并发症之一。子痫前期的主要病因还很难阐明，这是因为该病的征兆和症状总是表现为一系列的现象。由此，它还被定义为一种综合征，这种综合征通常表现为具有母亲高血压和蛋白尿的特征，但包括广泛的涉及母亲肝脏、凝固和神经系统的并发症（Henriksen, T., (1998) Scand. J. Rheumatol. Suppl. 107 86-91）。子痫前期的临床问题一般只有在妊娠的后半期才显现出来，并且据信这些问题是在妊娠的前三个月形成的。似乎只有当  
15 胎盘组织存在于母亲的子宫内时子痫前期并发症才呈现出来。的确，葡萄胎情况可发生在子痫前期中，而其中子宫仅仅含有紊乱的胎盘组织（Nugent, C. E.等人(1966) Obstet. Gynecol. 87 829-31）。一旦在妊娠期间诊断出子痫前期并在分娩过程中通过外科手术去除或排除了胎盘组织，那么该疾病最终可治愈。业已有许多有关子痫前期病因的暗示，这些暗示包括从不良胎盘/子宫血管系统的发育到母亲与胎儿之间的免疫学不相容性这些病因。虽然这些理论的确有一些道理，但是它们没有考虑该综合征的系统效应。许多症状可能是高血压副作用的结果而不是综合征的直接病因。因此，PIH 或子痫前期发展的早期检测对将要采取的预防性措施是非常有益的，这些措施包括对高血压和与子痫前期有关的其它并发症（例如癫痫发作、污渍凝块问题等）进行专门治疗。

25 在子痫前期的预期母亲中所观察到的胎盘损伤和高血压，业已被认为与胎儿并发症（包括生长发育迟缓和胎儿缺氧）的危险性增大有关。在极端的情况中，这可能是流产的一个原因。在其它研究中，子痫前期已被假定成是母亲和胎儿对胎儿生长发育迟缓的适应。由于不是所有具有胎儿生长发育迟缓的母亲都发展为子痫前期，因此这个决定性因素是母亲的反应（Walker, J. (2000) The Lancet 356 1260-1265）。这

种适应症的特征不仅存在于子痫前期中，而且还存在于胎儿生长发育迟缓和流产的情况中。例如，母亲体内血浆容积正常膨胀的失败就与受损的胎儿生长和子痫前期有关（Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ (2000) *Cochrane Database Syst Rev* 2 CD000167）。在子痫前期中所观察到的问题（例如血栓形成倾向）被暗示成是致病胎盘中血栓性损害的结果（Mousa HA, Alfirevic Z (2000) *Hum Reprod* 151830-3）。因此，显然，子痫前期与胎儿生长发育及胎儿缺氧是有联系的，并且对子痫前期的诊断方法和治疗也适用于对这些胎儿疾病的预测、诊断和/或治疗。

神经激肽 B 属于被称作速激肽的肽类一族，其中第一个也是最著名的一员是在 1931 年发现的物质 P（von Euler, U. S. And Gaddum, J. H. (1931) *J Physiol* 72: 74-87）。又经过了五十年才发现了另外两个速激肽族成员，其中一个被指定为物质 K 或者称作神经激肽 A（Kimura, S., 等人(1983) *Proc. Japan Acad* 59B 101-104），另一个被指定为神经调节肽 K，而现在称作神经激肽 B（Kangawa, K., 等人(1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 533-540）。速激肽业已被认为具有从平滑肌收缩、血管舒张、疼痛传导、神经炎到免疫系统的激活的各种生物作用（Longmore, J., 等人(1997) *Canadian J. Physio. & Pharmacol.* 75 612-621）。也已发现，神经激肽 B 是导致肠系膜血管底层收缩（D'Orleans-Juste, P. 等人(1991). *Eur. J. Pharmacol.* 204 329-334）和肝门静脉收缩（Mastrangelo, D., 等人(1987) *Eur J Pharmacol.* 134, 321-6）的最有效力的神经激肽。神经激肽 B 还是作用于 NK<sub>3</sub> 受体的最有效力的速激肽族成员，同时物质 P 和 K 使心率减慢，而这个 NK<sub>3</sub> 受体兴奋剂在灌注到犬的冠状动脉血管内时具有相反的作用即，使心率加快（Thompson, G. W. 等人(1998) *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 275 (5), 1683-1689）。在动物模型中，在给荷兰猪静脉注射神经激肽 B 之后业已显示出，可产生与高血压相关的剂量以及很高水平的使动物不舒服的神经激肽 B 兴奋剂（Roccon, A., 等人(1996) *Brit. J. Pharmacol.* 118 1095-1102）。类似的试验已经表明，在给兔子静脉灌输神经激肽 B 之后可导致血压上升（Page 等人(2000) *Nature* 405 797-800）。在从试验动物身上取出的任何外周组织内还没有确切发现神经激肽 B；例如，Moussaoui 等人（*Neuroscience* (1992) 48, 967-978）利用非常灵敏和特异的分析系统测试了宽阔范围的外周组织，但是根本没有发现痕量的神经激肽 B。

业已鉴定了人神经激肽 B 前体，该物质在加工时产生一种与其它哺乳动物样本（牛、猪、兔和鼠）的神经激肽 B 相同的肽（Incyte Pharmaceuticals Inc., International

patent application no. WO98/57986)。我们已经最为惊奇地发现，这种人神经激肽 B 前体是由妊娠中的胎盘组织产生的，并且神经激肽 B 和前体片段流入母亲的血流。

5 我们业已发现，在正常妊娠中，在接近足孕的母亲血流中发现了相当水平（例如 100 摩尔范围）的神经激肽 B（以及人神经激肽 B 前体的其它断裂产物），但是在此之前只发现了零或非常低水平的上述物质。然而，在一些情况中，在妊娠早期（例如只有 9 周）也鉴定出接近足孕水平的上述物质，并且在妊娠性高血压或子痫前期的情况中，在接近足孕的母亲血浆中发现了很高（纳摩尔）浓度的神经激肽 B。于是，在妊娠早期增高的血浆水平的神经激肽 B、神经激肽 B 前体、它的断裂产物或其变体的检测，将为妊娠性高血压或子痫前期的可能性发展提供一个指征，并且  
10 甚至可以为这些疾病可能的未来严重性提供一个指征。另外，循环神经激肽 B 水平的减小（或其效力的减小）将改善在这些疾病中所看到的对母亲的不利作用。作为子痫前期与胎儿并发症（包括胎儿生长发育迟缓和/或胎儿缺氧）之间的联系结果，神经激肽 B 兴奋剂或拮抗剂在改善这些疾病中是有用的。人神经激肽 B 前体的过量产生也可是非妊娠个体中某些高血压疾病的诱因（通过神经激肽 B 或前体的一种或  
15 多种断裂产物的作用）。

本发明的第一方面是，通过评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，而提供一种人受体中妊娠性高血压的预测方法。

本发明的第二方面是，通过评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，而提供一种人受体中子痫前期或相关的胎儿并发症的预测方法。  
20

本发明的第三方面是，通过评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，而提供一种人受体中妊娠性高血压的诊断方法。

本发明的第四方面是，通过评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，而提供一种人受体中子痫前期或相关的胎儿并发症的诊断方法。  
25

优选的是，第一、第二、第三或第四方面的方法都包括评估生物样品（例如血液）中的神经激肽 B 的浓度。

本发明的第五方面是，提供一种人受体中妊娠性高血压的可能性未来发展程度的评估方法，该方法包括：评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，并使该结果与妊娠性高血压的预期未来严重性相关联。  
30

本发明的第六方面是，提供一种人受体中子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来发展程度的评估方法，该方法包括：评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度，并使该结果与子痫前期或相关的胎儿并发症的预期未来严重性相关联。

- 5 优选的是，第五和第六方面的方法都包括：评估生物样品（例如血液）中的人神经激肽 B 的浓度，并使该结果分别与妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的预期未来严重性相关联。

本发明的第七方面是，通过服用一种抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂，而提供一种人受体中妊娠性高血压的预防或治疗方法。

- 10 本发明的第八方面是，通过服用一种抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂，而提供一种人受体中子痫前期或相关的胎儿并发症的预防或治疗方法。

本发明的第九方面是，提供了人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段在用于妊娠性高血压的预测或诊断的诊断剂生产中的应用。

- 15 本发明的第十方面是，提供了人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段在用于子痫前期或相关的胎儿并发症的预测或诊断的诊断剂生产中的应用。

优选的是，第九和第十方面都包括应用人神经激肽 B 前体的表位变体或表位片段。更优选的是，这些方法包括人神经激肽 B 在用于妊娠性高血压、子痫前期或相关的胎儿并发症的预测或诊断的诊断剂生产中的应用。

- 20 本发明的第十一方面是，提供了抑制神经激肽 B 生物效应的药剂在用于预防或治疗妊娠性高血压的药物生产中的应用。

本发明的第十二方面是，提供了抑制神经激肽 B 生物效应的药剂在用于预防或治疗子痫前期或相关的胎儿并发症的药物生产中的应用。

- 25 在第十一和第十二方面的一个优选实施例中，本发明提供了一种包括抑制神经激肽 B 生物效应的药剂的药物组合物，该组合物可用于预防或治疗妊娠性高血压、子痫前期或相关的胎儿并发症。

本发明的第十三方面是，提供一种用于预测或诊断妊娠性高血压的药盒，该药盒包括神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的一种结合对（例如抗体）。

- 30 本发明的第十四方面是，提供一种用于预测或诊断子痫前期或相关的胎儿并发症的药盒，该药盒包括神经激肽 B 前体基因产物或其变体或其片段的一种结合对（例如抗体）。

本发明的第十五方面是，提供一种用于预测或诊断妊娠性高血压的药盒，该药盒包括神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的一种结合对（例如抗体），以及如何实施测定方法的说明书，该测定方法用于预测生物样品中的神经激肽 B 的水平，并使测定结果与妊娠性高血压的可能性未来发展相关联。

5 本发明的第十六方面是，提供一种用于预测或诊断子痫前期或相关的胎儿并发症的药盒，该药盒包括神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的一种结合配体（例如抗体），以及如何实施测定方法的说明书，该测定方法用于预测生物样品中的神经激肽 B 的水平，并使测定结果与子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来发展相关联。

10 本发明的第十七方面是，提供一种用于评估妊娠性高血压的可能性未来发展程度的药盒，该药盒包括神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的一种结合对（例如抗体），以及如何实施测定方法的说明书，该测定方法用于预测生物样品中的神经激肽 B 的水平，并使测定结果与妊娠性高血压的预期未来严重性相关联。

15 本发明的第十八方面是，提供一种用于评估子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来发展程度的药盒，该药盒包括神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的一种结合对（例如抗体），以及如何实施测定方法的说明书，该测定方法用于预测生物样品中的神经激肽 B 的水平，并使测定结果与子痫前期或相关的胎儿并发症的预期未来严重性相关联。

20 优选的是，本发明的第十三至十八方面的药盒包括神经激肽 B 前体、神经激肽 B 或其表位变体或片段的结合对（例如抗体）。更优选的是，这些药盒包括图 1 或 2 的多肽序列或其表位变体或表位片段的结合对。

本发明的第十九方面是，提供神经激肽 B 的兴奋剂或神经激肽 B 在用于减小高血压中血液容积的药物制备中的应用。

25 本发明的第二十方面是，提供神经激肽 B 的兴奋剂或神经激肽 B 在用于减小高血压中的血液容积的应用。

本发明的第二十一方面是，通过调节人受体的饮食以便减小体内毒素生成物质的含量，而提供一种改善人受体中子痫前期的方法。

本发明的第二十二方面是，提供一种改善人受体中子痫前期的方法，该方法包括调节受体的饮谱以便减小门静脉中的潜在毒素的浓度。

30 本发明的第二十三方面是，提供一种用于改善人受体中子痫前期的饮食方法，

其中体内毒素生成物质的量被减小了。

图 1 示出了可从 Accession No. aaf76980 得到的克隆化人神经激肽 B 前体的多肽序列。

图 2 示出了活性神经激肽 B 肽的多肽序列。

5 图 3 示出了人神经激肽 B 前体的胎盘 cDNA 的多核苷酸序列，其中 ATG 是起始密码子；TAG 是终止密码子；AATAAA 是聚腺苷酸化信号；AAAAA 是聚腺苷酸尾；以及 GGCACAGAGCTGCTCCACAGGCACC 是基于 Homo sapiens cDNA clone 138761(Accession No. R63635)的 PCR 引物，而 Homo sapiens cDNA clone 138761(Accession No. R63635)类似于用来扩增完全基因的 Accession No. P08858 神经激肽 B 前体的牛克隆。

10 图 4 示出了神经激肽 B 的基因组序列，包括 27928 碱基对启动子区域、内含子以及七个外显子（下划线的）。

图 5 示出了利用在孕 9、13 周以及足孕时收集的 mRNA 对完全人神经激肽 B 前体测定的半定量 PCR 结果。利用在孕 9、13 和足孕 (T) 时收集的 mRNA 实施反转录 PCR，以便扩增 733bp 的全长度神经激肽 B 前体 cDNA。 $\beta$ -肌动蛋白的引物可用作对照物 (257bp)。M1 代表 1kb 的 DNA 序列梯；而 M2 代表 100bp 的 DNA 序列梯。

20 图 6 示出了人妊娠血浆和人足孕胎盘中的氧化与还原神经激肽 B 的 HPLC 结果。胎盘提取物揭示出，以显著量（孕早期胎盘中含有  $21\text{pg g}^{-1}$ ，而足孕的胎盘中含有  $25\text{pg g}^{-1}$ ）存在的肽及其层析行为与合成的 NKB 相同。在提取过程中胎盘 NKB 的部分氧化导致产生三中氧化形式，其中两个甲硫氨酸残基中的一个或两个都被氧化了（血浆中的 a 和胎盘中的 b）。所生成的甲硫氨酸磺氧化物具有减小的疏水性，从而在还原形式之前洗脱出来。该洗脱图谱与由过氧化氢所导致的合成 NKB 的部分氧化而产生的图谱相吻合。有过氧化氢产生的完全氧化导致所有的 NKB 在第一个峰位置洗脱出来。在从足孕胎盘样品 (b) 中提取出 NKB 之后也可观察到类似的洗脱图谱。

25 图 7 示出了清醒兔子体内的神经激肽 B 的心血管作用效果。即，在将盐水或增大剂量的 NKB 灌输到清醒的未束服的雌兔体内的过程中血压和心率的变化。以时间=0 的  $1.8\text{ nmol h}^{-1}$  (每 kg)、时间=16 小时的  $18\text{ nmol h}^{-1}$  (每 kg)和时间=20 小时的  $180\text{ nmol h}^{-1}$  (每 kg)的剂量来灌输 NKB。所得到的值是平均值  $\pm$  s. e. 平均值。\* 代

表原始基线与 t=20 小时时的值的显著差 (Freedman's 试验)。

图 8 示出了人和兔子的胎盘中的神经激肽 B mRNA 的原位杂交。a, 具有人反义探针的足孕 (39 周) 时的人; b, 具有人反义探针的足孕 (39 周) 时的人; c, 具有兔反义探针的兔 18 天的胎盘; 以及 d, 兔胎盘表达神经激肽 B 的高放大率显示的巨细胞。放大率: a, 10 x 原始尺寸, b, 10 x, c, 16x, d, 40x。

本发明部分是基于以下发现: 即, 在母亲血流中由正在发育的胎盘所产生的神经激肽 B 的早期和/或过量释放, 是妊娠性高血压和子痫前期的一个病因。特别是, 业已假定, 那些可能得妊娠性高血压或子痫前期的受体在进入妊娠大约 10—12 周时, 母亲血流中的神经激肽 B 水平稍稍升高。因此, 例如在 10—12 周或者更早期对妊娠中的神经激肽 B 进行早期监测, 将有助于预测个体在妊娠后期是否可能得妊娠性高血压或子痫前期, 以及她们是否得子痫前期相关的胎儿并发症 (例如胎儿生长发育迟缓、胎儿缺氧或流产)。在进入妊娠的 10—12 周之后 (例如在 18 周) 对神经激肽 B 水平进行测定, 可使预测得到肯定并诊断将要发作的妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症。而且, 业已观察到, 在高血压或子痫前期的任何初始预测之后神经激肽 B 水平的增加与疾病的未来严重性有关。特别是, 已经表明, 在神经激肽 B 的增大程度与疾病的未来严重性之间存在着一种关系。这些观察可用于预测疾病的未来严重性。而且, 在这些疾病的发展中可涉及到人神经激肽 B 前体的其它加工后的片段。另外, 神经激肽 B 和/或人神经激肽 B 前体的其它片段的产生与非妊娠个体中的高血压的发展有关。

在本发明中, 胎儿并发症包括与子痫前期有关的任何胎儿并发症。特别是, 这些胎儿并发症包括胎儿生长发育迟缓、胎儿缺氧、足孕前分娩以及严重时的流产。

为了达到本发明的目的, 神经激肽 B 前体基因产物包括编码神经激肽 B 前体或神经激肽 B 的多核苷酸, 以及神经激肽 B 前体多肽。多核苷酸序列包括基因组或 cDNA 序列, 诸如图 3 或 4 所示出的那些, 优选的是 mRNA 序列。优选的是, 神经激肽 B 前体多肽具有图 1 中所示的序列。神经激肽 B 前体基因产物的片段是由前体基因产物衍生的那些片段并且包括编码神经激肽 B 及其片段以及前体的其它加工后片段的多核苷酸或多肽。优选的是, 由前体衍生的神经激肽 B 的肽具有图 2 的序列。表位片段或变体是包括一般至少有 4 个残基的氨基酸序列的片段, 该序列构成了抗体可结合的位点。优选的表位片段是图 1 的氨基酸序列 DMHD。

还包括的是神经激肽 B 前体基因产物的变体。优选的是, 变体具有至少 80%、

至少 90%、至少 95%、至少 98% 以及最优的至少 99% 的序列与神经激肽 B 前体基因产物或其片段同一，并且还优选地保留了与基因产物或片段相同的生物活性。

正如本领域所公知的，“%同一性”是两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间的两个多肽序列的相关性测定结果（正如通过比较它们的序列而测定的）。通常，排列待比较的两个序列，以便给出这两个序列之间的最大相关性。检查这两个序列的排列，并且给出所测定的这两个序列之间的精确氨基酸或核苷酸对应的位置数被排列的整个长度除并乘以 100，从而得到%同一数。这个%同一数是在待比较的序列的整个长度上测定的，因此它尤其适用于相同或非常相似长度并高度同源的序列，或者在较短的确定长度上，其更适用于长度不等并具有较低水平同源性的序列。

10 用于比较两个或多个序列同一性的方法在本领域内是公知的。于是例如，从 the Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 得到的程序（Devereux J 等人, Nucleic Acids Res. 12: 387-395, 1984, available from Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA），诸如程序 BESTFIT 和 GAP，可用来测定两个多核苷酸之间的%同一性和两个多肽序列之间的%同一性。BESTFIT 利用 Smith 和 Waterman 的“局部同源性”算法（Advances in Applied Mathematics, 2: 482-489, 1981）并发现了两个序列之间相似性的最佳单个区域。BESTFIT 更适合比较长度不相似的两个多核苷酸或两个多肽，该序列假设较短的序列代表较长序列的一部分。在比较时，GAP 根据 Needleman 和 Wunsch 的算法（J. Mol. Biol. 48: 443-354, 1970）排列发现“最大相似性”的两个序列。GAP 更适合比较长度大约相同的两个序列并且期望排列在整个长度上进行。优选的是，每个程序中所用的参数“Gap Weight”和“Length Weight”在用于多核苷酸序列时分别是 50 和 3，而在用于多肽序列时分别是 12 和 4。优选的是，在被比较的这两个序列排列最佳时测定%同一性和相似性。

20 用于测定序列之间的同一性和/或相似性的其它方法在本领域内也是公知的，例如 BLAST 程序族（Altschul S. F. 等人, J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990, Altschul S. F. 等人, Nucleic Acids Res., 25: 289-3402, 1997, available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA and accessible through the home page of the NCBI at [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)）和 FASTA（Pearson W. R. And Lipman D. J., Proc. Nat. Acac. Sci., USA, 85: 2444-2448, 1988, available as part of the Wisconsin Sequence Analysis Package）。优选的是，BLOSUM62 氨基酸取代矩阵  
30 （Henikoff S. and Henikoff J. G., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 89: 10915-10919, 1992）可

用于多肽序列的比较，其中在比较之前首先将核苷酸序列翻译成氨基酸序列。

优选的是，程序 BESTFIT 可用来测定询问多核苷酸或多肽序列相对于本发明的多核苷酸或多肽序列的%同一性，询问和参照序列被最佳排列并将程序参数设置在缺席值。

5 本发明的第一、第二、第三和第四方面涉及人受体中妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的预测或诊断方法。这些方法包括：例如，评估生物样品中神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段的浓度。这些方法优选地包括将样品中人神经激肽 B 基因产物（例如神经激肽 B 或其前体）浓度的评估结果与预期值或在较早期的受体内发现的值进行比较。

10 优选的是，在妊娠早期实施这些方法，例如在 10—12 周进行预测方法，或者在 18 周进行诊断方法。

这些方法包括本领域技术人员可得到的任何测定神经激肽 B 基因产物的装置。优选的是，这些方法采用本发明的药盒。本发明的这些方法至少包括测定生物样品中神经激肽 B mRNA、神经激肽 B 或其前体或二者的变体或片段的存在的步骤；然而，其它步骤也可包括在这些方法中。这些其它步骤可包括以下一个或多个步骤：  
15 收集生物样品；制备生物样品；测定样品中靶神经激肽 B 基因产物（例如多肽或多肽类）的浓度；制作非妊娠个体或相同或不同妊娠阶段的妊娠个体中靶神经激肽 B 基因产物的预期浓度的标准曲线；将由特定生物样品得到的结果与适当的期望值或适当的标准曲线进行比较，以便测定疾病的严重性；或者在随后的时期重复上述步  
20 骤中的一些或全部，以便测定疾病的严重性是否改变了。

基于药盒的适当检测方法对于本领域的技术人员来说是清楚的并包括放射性免疫分析法（RIA）、酶联免疫吸附分析法（ELISA）、免疫放射分析法（IRMA）、反义技术或放射性受体分析法（RRA）。其次，诸如 NK<sub>3</sub> 受体或其它神经激肽 B 结合对可用于检测系统或生物传感器系统。也可包括其它检测方法诸如放射性方法、非  
25 放射性方法（荧光法和化学发光法）。

优选的方法是放射免疫分析法，该方法依赖于少量放射性标记肽（例如神经激肽 B）与有限量的结合对诸如抗体（例如特异于 NKB）的相关作用。由渐增剂量的标准肽对放射性标记的肽的取代与由未知量的取代进行比较。虽然有能够结合游离标记部分并且然后可通过离心除去的吸附剂（例如活性炭）存在，但是一般可通过  
30 以下方式进行监测：首先利用下沉结合对的沉淀步骤，然后进行离心，从而使结合

对相连的标记物与游离标记物分离。IRMA 抗原是一位点或二位点法，并且使用过量的此时被放射性标记的特异性结合对（例如抗体）。在一位点分析法中，通过使肽连接到可除去未反应的结合对的固相上，而有效地进行了分离。在二位点法中，采用特异于肽上的一个单独表位的第二特异性结合对（通常连接到固相上）。通过除去固相上的复合物可容易有效地进行分离。RRA 类似于 RIA，其中用有限量的受体来取代抗体。受体制剂通常是膜制剂形式，从而可通过诸如离心来进行结合标记物的洗涤和分离。通过以下方式一般可利用酶作为免疫分析法中的信号组分：即，将酶交联到特异性抗体上，或者在鼠单克隆抗体用于初始反应时，例如采用交联到酶上的猪抗鼠抗体。

10 上述方法还可用于评估妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的可能性未来严重程度。这些方法优选地包括：将样品中的人神经激肽 B 基因产物（例如神经激肽 B 或其前体）浓度的评估结果与期望值进行比较。据信，妊娠的第十周或者更靠后例如 18 周之后，可以是评估人神经激肽 B 基因产物的存在（和浓度）的特别有价值的时间。

15 本发明的方法优选的是在活体外部、对从身体中取出的样品进行实施的。任何生物样品都可用于本发明的方法。优选的生物样品包括血液、唾液和尿液。

本发明还提供了一种通过服用抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂而预防或治疗人受体中妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的方法。优选的是，利用本发明的药盒来实施这些方法。抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂可包括例如通过以下方式起作用的任何药剂：从血浆中除去神经激肽 B；改变神经激肽 B 的结构从而避免其结合到受体上；直接结合到受体上，从而封闭神经激肽 B 在受体上的结合（但其本身不会在受体上产生神经激肽 B 通常所产生的那些作用）；对相同或不同的受体起到与神经激肽 B 相反的作用，或者例如通过调节神经激肽 B 基因启动子的活性和/或利用反义技术来减小或抑制基因的表达或翻译。还包括的是为了阻止神经激肽 B 的产生而抑制前体的生成或加工的药剂。在这个概念内，抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂包括抑制神经激肽 B 或其前体的任何变体或片段的生物效应的药剂，在妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的发展中涉及到这些变体或片段。人神经激肽 B 的主要作用位点是 NK<sub>3</sub> 受体，并且因此用于本发明的抑制神经激肽 B 的生物效应的优选药剂包括 NK<sub>3</sub> 受体拮抗剂。然而，在接近足孕的妊娠尤其是在妊娠性高血压或子痫前期的受体中发现的高循环浓度中，神经激肽 B 还可对其它受体

20

25

30

(例如 NK<sub>1</sub> 或 NK<sub>2</sub> 受体) 具有显著的作用, 并且因此用于本发明的抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂包括抑制神经激肽 B 对这些其它特异性受体的作用的药剂, 以及广谱的神经激肽拮抗剂和这些药剂的组合体。

自从 1991 年以来, 业已报道了许多高亲和的非肽拮抗剂。Snider R. M., 等人  
5 (Science, 251: 435(1991)) 以及 Garret C., 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10208(1991)) 分别描述了作为 NK<sub>3</sub> 拮抗剂的 CP-96, 345 和 RP67580, 而 Advenier C., 等人 (Brit. J. Pharmacol., 105: 78(1992)) 展示了对 NK<sub>2</sub> 受体显示出高亲和性和选择性的 SR 48968 的数据。更加最近的是, Macleod, 等人 (J. Med. Chem., 36: 2044(1993)) 已经公布了一系列新的作为 NK<sub>1</sub> 受体拮抗剂的色氨酸衍生物。最近, 描述了 FK888, 即一种对  
10 NK<sub>1</sub> 受体具有高亲和性的“二肽”(Fujii J., 等人, Neuropeptide, 22: 24(1992))。

用于本发明的合适的 NK<sub>3</sub> 受体拮抗剂包括封闭或减小神经激肽 B 对 NK<sub>3</sub> 受体的作用的所有材料, 例如在以下文献中所描述的那些材料: Gao and Peet (Current Medicinal Chemistry, 1999, 6, 375-388)、Khavaga and Rogers (Int. J. Biochem Cell Biol. 1996, 28, 7, 721-738)、US 5,942,523、US 5,846,973、US 5,491,140、US 5,328,927、  
15 US 5,360,820、US 5,344,830、US 5,331,089、US 4,742,156、US 4,665,157、EP 591,040A、WO 94/01401、WO 94/04494、WO 93/011609、加拿大专利申请 2,154,116、EP 693,489 以及加拿大专利申请 2,151,116。合适的拮抗剂的特定例子包括受体选择性配体、SR142801 (Edmonds-Alt, 等人, Life Sciences, 56: 27(1995)) 以及具有以下分子式的十肽菌素: A<sup>1</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>, 其中 A<sup>1</sup> 和 D<sup>4</sup>  
20 是 Asp 或 D-Asp 氨基酸。

用于抑制神经激肽 B 的生物效应的优选药剂包括那些调节神经激肽 B 前体基因启动子的活性并由此改变神经激肽 B 前体基因的转录水平的物质。这些药剂的例子包括神经激肽 B 前体基因启动子转录因子的竞争性或非竞争性拮抗剂、抑制神经激肽 B 前体基因启动子转录因子的生物效应的药剂、神经激肽 B 前体基因启动子抑制  
25 剂的兴奋剂以及结合或抑制神经激肽 B 前体基因启动子活性的多核苷酸序列。优选的是, 这些多核苷酸与启动子序列的全部或部分互补, 从而它们可杂交到其上并抑制启动子活性 (优选的是在活体内部)。合适的多核苷酸序列的例子是那些具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98% 和优选的 99% 的序列与启动子的全部或部分  
30 互补体同一。优选的是, 多核苷酸序列将与启动子的调节区域 (例如转录因子结合位点) 互补。

当药剂是多核苷酸序列时，其优选的是以载体的形式服用。该载体还可包括一个或多个用于激活多核苷酸序列的表达的调节序列，例如启动子包括：效应元件、共有位点、甲基化位点、基因座控制区、转录后修饰、剪切变体、同源框、诱导因子、DNA 结合结构域、增强子序列、起始密码子以及 polyA 序列。可利用任何适当的基因治疗技术来服用这些药剂，这将是本领域技术人员所公知的。

可通过任何有效途径（例如口服或非肠道的）来完成药物组合物的服用。非肠道传送的方法包括表面的、动脉内的、皮下的、髓内的、静脉内的或鼻内的服药形式。利用与羊膜穿刺术有关的技术也可有效地服药。仅次于口服的皮下注射是有效的摄取途径；也可采用长效固定术。而且，当胎盘 NKB 作用于外周受体上时，对中枢神经系统无副作用的有效药物优选地应该是其分配性质类似于肽的物质。除了活性成分之外，这些药物组合物还可包括赋形剂和易于将活性化合物加工成可药用的制剂的其它化合物。在最近一版的“REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES”(Maack Publishing Co, Easton PA) 中可找到有关配方和服药技术的其它细节。

可以利用本领域内公知的药物可接受的载体、以适合口服的剂量来制备口服药物组合物。这些载体可将药物组合物制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、胶体、糖浆、泥浆、悬浮液等并适合病人摄入。

可如下获得口服的药物制剂：首先将活性化合物与固体赋形剂合并，其次随机研磨所得到的化合物并在加入其它适当的化合物（如果需要的话）之后加工成颗粒混合物，从而得到片剂或糖衣丸的核。适宜的赋形剂是碳水化合物或蛋白填充剂。它们包括（但不限于）糖类，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇，或者山梨糖醇、来自玉米、小麦、大米、土豆或其它植物的淀粉；纤维素诸如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠；以及树胶，包括阿拉伯胶和黄耆胶；还有蛋白质例如明胶和胶原蛋白。如果需要的话，可加入分裂剂或增溶剂，诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸及其盐（例如藻酸钠）。

糖衣丸核具有合适的包衣例如浓缩的糖溶液，还可含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、carbopol 胶体、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆液和适当的有机溶剂或溶剂混合物。可将颜料或色素加入到片剂或糖衣丸的包衣中，以便进行产品鉴定或者使活性化合物的量（即剂量）特征化。

口服的药物制剂包括用明胶制成的推入配合式胶囊以及用明胶和包衣（例如甘

油或山梨糖醇)制成的软密封胶囊。推入配合式胶囊可含有活性成分,这些活性成分混有填充剂或结合剂(例如乳糖或淀粉)、润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)以及随机混有的稳定剂。在软胶囊中,活性化合物可溶解或悬浮于含有或没有稳定剂的适当液体(例如脂油、液体石蜡或液体聚乙二醇)内。

- 5 用于非肠道服药的药物剂型包括活性化合物的水溶液。为了注射,本发明的药物组合物可配在水溶液中,优选的是配在生理相容的缓冲液例如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液或生理缓冲盐水中。含水的注射悬浮液可含有增大悬浮液粘度的物质例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。另外,活性化合物的悬浮液可制成适当的油性注射悬浮液。适宜的亲油性溶剂或载体包括脂油(例如芝麻油)或合成的脂肪
- 10 脂肪酸脂(例如油酸乙脂或甘油三脂)或脂质体。该悬浮液还可任意地含有适当的稳定剂或试剂,这些试剂可增大化合物的溶解性,从而能够制备高浓缩溶液。

对于表面或鼻服药形式,适合特定屏障被渗透的穿透剂可用于该剂型中。这些穿透剂在本领域内一般是公知的。

- 可利用与本领域内的公知技术类似的方式(例如借助于常规的混合、溶解、制
- 15 粒、制糖衣丸、磨细、乳化、胶囊包封、截留或亲液化工工艺)来生产本发明的药物组合物。利用常规方式(例如涂布)还可改进药物组合物,以便提供合适的释放特性例如持久释放或靶向释放。

- 药物组合物可以盐的形式来提供,并且可用许多酸来形成,这些酸包括(但不限于)盐酸、硫酸、醋酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐更倾向溶解于含
- 20 水的或质子化溶剂中,这些溶剂是相应的游离碱形式。在其它情形中,优选的制剂可以是 1mM-50mM 的组氨酸、0.1%-2%的蔗糖、2%—7%的甘露糖醇的 pH 为 4.5-5.5 的亲液化粉末,该粉末在使用前与缓冲液混合。

- 还可改进用于本发明的药剂(例如  $NK_3$  受体拮抗剂),以便将其只传送到所选择的靶向部位。例如,可通过以下方式来达到这一目的:调节药剂的稳定性,从而
- 25 使其在肠内被蛋白分解消化,或者使其没有通过血/脑屏障的能力;或者制备包括靶向成分(例如为靶向部位所选择的抗体)的复合分子。

在包括本发明化合物(配伍在可接受的载体内)的药物组合物制成之后,可将这些药物放在合适的容器内并标明用于治疗所指示的疾病。对于  $NK_3$  受体拮抗剂的服用,这些标示包括服用的剂量、次数和方法。

- 30 适用于本发明的药物组合物包括为了达到预期目的而使活性成分以有效量包括

在其中的组合物。于是，有效的治疗量是足以改善所治疗的疾病症状的量。实际上服用的量将取决于接受治疗的个体，并且该量优选地将是一个最佳量，从而获得所期望的效果而没有明显的副作用。有效治疗量的测定在本领域技术人员的能力范围内。当然，技术人员将意识到，分次或部分剂量也在本发明的范围内。

5       对于任何化合物，最初都可以在细胞培养分析或任何适当的动物模型（例如用于子痫前期的灵长目动物、用于高血压的兔子和荷兰猪以及用于诱发性高血压和诱发性子痫前期的小实验室动物）中来估计有效的治疗量。这些测定方法应该考虑受体活性以及后序的加工活性。动物模型还可用来获得服药的预期浓度范围和途径。这些信息然后可用来测定人服用的有效剂量和途径。

10       治疗的有效量是指改善症状或疾病的药剂的量。利用标准的药物方法在细胞培养或试验动物（例如  $ED_{50}$ ，在 50% 的群体中治疗有效的剂量；以及  $LD_{50}$ ，使 50% 的群体致死的剂量）中可测定这些化合物的治疗有效性和毒性。治疗效果与毒性效果之间的剂量比就是治疗系数，它可表达成  $ED_{50}/LD_{50}$ 。具有较大治疗系数的药物组合物是优选的。从细胞培养和动物研究中得到的数据可用于调配人用的剂量范围。

15       这些化合物的剂量最好在包括极少或无毒性的  $ED_{50}$  的循环浓度范围内。该剂量可在这个范围内变化，它取决于所采用的剂量形式、对病人的敏感性以及服药途径。

对于接受治疗的病人，可根据个体的生理条件来选择精确的剂量。调节剂量和服药方式，以便提供足够的活性组分水平或维持预期效果。可以考虑的其它因素包括疾病状态的严重性。长效药物组合物可以每 3—4 天、每周或每两周服用一次，这取决于特定剂型的半衰期和清除速度。一些文献中提供了有关具体剂量和服药方法的指南（参见 US4,657,760; 5,206,344 以及 5,225,212，这些文献在此全部作为本文的参考文献）。

在本发明预防或治疗子痫前期的方法中或者在预防或治疗子痫前期的药物制备中所用的、抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂，可以优选地进行调制，以便使所用的药剂在膳食后阶段也是有效的，而不会局限于此。例如可选择药剂，使其在 24 小时期间都有效，而不排除膳食后阶段。膳食后阶段是特别重要的时间，这是由于门静脉的高压导致血液不能通过肝脏（通常起除去毒素的作用），从而使子痫前期与母亲血管内的毒素增多有关。这样，饭后高血压的瞬间缓解将使血液通过肝脏，而此时存在最高浓度的毒素，因此将大大降低子痫前期的危险性，同时仅仅使胎盘产生的神经激肽 B 的作用稍稍减小。通过选择具有短活性期的药剂并使用适当的剂型

和剂量表，可获得这种受时间限制的效果。

优选的是，本发明的或者本文提到的疾病治疗方法都将在一完成初始预测或诊断之后就开始，例如进入妊娠的 10 周后。而关于治疗过程何时开始的决定当然将由医生来作出，并因此可以或早或晚些开始。典型的是，该治疗过程在妊娠的整个过程中实施或者直到症状消退时为止。该过程可持续到分娩之后的 8 周时为止。在已经确定具有正在发展的胎儿疾病（诸如生长发育迟缓或缺氧）或子痫前期的危险的个体中（通过考虑诸如在以前的妊娠中具有流产或并发症历史这些其它因素），在怀孕一得到证实就开始治疗过程，并且该过程可以持续到足孕时为止。

本发明的又一方面是，提供了人神经激肽 B 前体基因产物或其变体或片段在用于预测或诊断妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的诊断剂的制备中的应用。优选的是，诸如在包括特异于神经激肽 B 的结合对的诊断剂的制备中，所用的基因产物是神经激肽 B 或其变体或片段。优选的是，变体或片段是表位的。应该预见见到，还可以使用其它基因产物，例如神经激肽 B 前体基因组序列的调节序列或者反义序列制备中的神经激肽 B 前体 mRNA。

所用的多肽包括人神经激肽 B 或其前体，或者二者的变体或片段。优选的是，多肽分别包括图 1 或图 2 的序列。优选的是，片段或变体是表位的（如上所述）。

这些多肽可以分离的、基本上纯的形式或作为重组多肽而产生。这些分离或制备方法对于本领域的技术人员来说是清楚的。它们包括例如重组技术或萃取法、凝胶分离法或更普遍的化学合成法（对于肽，可化学合成神经激肽 B 的大小，例如液相或固相肽）。

本发明的再一方面是，提供了抑制神经激肽 B 的生物效应的药剂在用于预防或治疗妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的药物制备中的应用。优选的是，该药剂是以上限定的那些物质。

本发明的再一方面是，提供了用于预测妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的发作、诊断这些疾病或评估这些疾病的未来严重性的药盒。本发明的药盒包括用于检测由受体导致的人神经激肽 B 基因产物（例如编码神经激肽 B 或其前体或二者的片段或变体的多核苷酸或多肽）的生成的装置。于是，这些药盒一般包括以下一种或多种物质：神经激肽 B 或其前体的结合对；神经激肽 B 多肽或其变体或片段；和/或杂交到编码神经激肽 B 或其变体或片段的序列上的多核苷酸序列。

结合对是指能够检测（和结合到）靶物上的任何物质。用于本发明的药盒的优

选结合对是特异于神经激肽 B 前体或其表位片段或表位变体的抗体。优选的抗体是针对神经激肽 B 的抗体和针对人神经激肽 B 前体的抗体。最优选的抗体是特异于神经激肽 B 的抗体,但还可以使用特异于神经激肽 B 前体的任何其它断裂产物的抗体,这些断裂产物在可进行测定的时间内保留在体内。这些抗体能够结合神经激肽 B 前体的片段,从而能够鉴定出人体导致的前体的生成。本发明的抗体可以是例如多克隆、单克隆、嵌合的或人源化的抗体或其片段。与诸如物质 P 或 NKA 这些相关的肽发生交联反应的结合对例如可以用作药物或用于诊断。此时它们与神经激肽 B 分享一个共同序列 (FVGLM-NH<sub>2</sub>)。

制备这些抗体的方法对于本领域的技术人员来说是显而易见的。例如,对于多克隆抗体,可以利用标准的动物免疫方法,对于单克隆抗体,可以利用著名的 Kohler 和 Milstein 方法,或者利用 US 5,844,080 中描述的方法。嵌合抗体可以利用基因工程技术来制备,并且它的恒定区是人源的,但可变区是由例如鼠抗体衍生的。嵌合抗体的优点是减小了免疫原性。人源化抗体只是在互补性测定区采用了该原理,并且在可变区中只有极少数的氨基酸是由动物例如鼠衍生的。该抗体结构的剩余部分是人源序列,因此它可被人免疫系统(例如人类)所识别(参见例如,Queen 等人,PNAS, USA 86 (12, 1989), 10029-10033)。

本发明药盒的多核苷酸优选的是那些在严格条件下杂交到编码神经激肽 B 或其前体或二者的变体或片段或补体的序列上的多核苷酸。优选的多核苷酸是在严格的杂交条件下杂交到图 3 或图 4 的核苷酸序列或它们的补体上的多核苷酸。严格条件是例如在 65°C 下 6 x SSC。优选的是,这些多核苷酸序列具有至少 85%、至少 90%、至少 95%、优选地至少 98%和最优选地至少 99%的序列与参比序列的补体同一。这些多核苷酸优选地具有至少 10 个核苷酸的长度,并且将用于检测神经激肽 B 或其前体的表达。这些多核苷酸在反义技术或诊断 PCR 中也是有用的。本发明的多核苷酸的制备方式对于本领域的技术人员来说是清楚的,例如,通过合成或者通过探查适当的 cDNA 或基因组文库(尤其是胎盘 cDNA 文库)可以生成这些多核苷酸。

本发明的药盒还可包括用于指导如何实施预测或诊断生物样品中神经激肽 B 水平的分析方法的说明书(既可以直接测定神经激肽,也可以先测定人神经激肽 B 前体或其片段的浓度,然后利用该值预测所存在的神经激肽 B 的量)。由 Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA 制备的商品神经激肽 B 放射免疫分析药盒 RIK 7357 可用于本发明。本发明的药盒优选地还包括一个解答,该解答指示出生物样品中神

经激肽B基因产物的水平与妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的诊断和/或这些疾病的可能性未来发作和/或严重性之间的关系。

本发明还提供了治疗妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症的药盒，该药盒包括用于抑制受体中神经激肽B或其前体的生物作用的物质。优选的是，这些物质包括上述限定的那些药剂。特别是，如上所述的抗体或多核苷酸序列也可用于这些药盒中，以便抑制神经激肽B或其前体的生物效应。这些药盒优选地还包含用于指导如何使用该药盒的说明书，以便预防或治疗妊娠性高血压或子痫前期或相关的胎儿并发症，以及/或者还包含一个解答，该解答指示出所用的药剂与对疾病所产生的可能性效果之间的关系。

10 通过调节人受体的饮食以便减少体内毒素（例如生物碱）和毒素生成物质的含量，也可改善子痫前期。毒素生成物质包括在肠中被消化并作为氨基酸被吸收的蛋白质，这些氨基酸的大多数如果以太高的浓度在血液中循环都是有利的。正常情况下，超过每日需求量的任何氨基酸都可被肝脏立即脱去氨基并代谢掉。增加饮食中碳水化合物的比例也是特别有益的。例如通过大大减少每顿的饭量（并增加小饭量的餐数，即少食多餐）还可调节受体的食谱，从而避免门静脉中出现峰浓度的毒素。

神经激肽B的兴奋剂也可用作药剂，其中血压的升高或血容量的减少都是有利的。适当的兴奋剂包括补充或模拟神经激肽B对NK<sub>3</sub>受体（或者对任何其它受体）（例如 senktide 或 (MePhe<sup>7</sup>) NKB）所起的作用的任何物质。

20 本发明还提供了筛分潜在有效剂（例如NK<sub>3</sub>受体拮抗剂和兴奋剂）的方式，该方式是通过以适当的模型测试有效剂封闭（或增强）神经激肽B的高血压作用的能力来达到筛分目的的。一旦已经鉴定出适宜的药剂，就可对其进行测试，以便测定它们在预防或治疗高血压；妊娠性高血压或子痫前期中的潜能，并据此而使用这些药剂。利用这样的方法鉴定的药剂（而不是目前公知的材料）可包括在本发明中。筛分方法包括大阵列技术例如 Affymetrix Inc.的 Vilsips<sup>TM</sup> 技术（参见例如，EPB No. 25 0476014）。

含有克隆化NK<sub>3</sub>（或NK<sub>1</sub>或NK<sub>2</sub>）受体的转染细胞系可以一种本领域的技术人员都清楚的方式用于受体结合与细胞信号途径研究中。实质上，内源性表达高水平的神经激肽受体的细胞系或者用神经激肽受体的克隆化cDNA结构转染的细胞系都可用于产生膜制剂。溶液中的纯化受体的膜制剂或者重建成磷脂膜之后的膜制剂然后30 后可用来评估与神经激肽B的标记兴奋剂和/或拮抗剂结合的受体。利用标准的细胞

信号分析法可以评估兴奋剂和拮抗剂的作用效果。当以一种本领域内技术人员都清楚的方式（包括诸如受体结合、循环 AMP 测定、蛋白激酶 C、肌醇三磷酸浓度等等这些测定方法）使用 G-蛋白偶合的受体系统时，这些将是常规实施的那些技术中的典型范例。还可在包括与兴奋剂慢性融合的荷兰猪和兔子的动物模型中进行这些研究，以便测定神经激肽 B、神经激肽 B 兴奋剂和神经激肽 B 拮抗剂的长期和短期效应。可以测定诸如心率、血压、血容量和内部器官（例如子宫、胎盘）重量的变化这些效果。

### 例子

#### 例 1

#### 10 人神经激肽 B 前体 cDNA 的生成

利用以下方法对胎盘 cDNA 进行的克隆可用来鉴定具有图 1 所示多肽序列的人神经激肽 B 前体。前体中的神经激肽 B 的肽序列具有下划线（C-末端的 G 残基以图 2 最终加工成的肽中的 C-末端 M 上的酰胺而告终）。人神经激肽 B 前体的克隆化胎盘 cDNA 如图 3 所示并具有（下划线部分）26-28 部位的 ATG 起始密码子、15 389-391 部位的 TAG 终止密码子、659-663 部位的 AATAAA 聚腺苷化信号以及 680 部位的 polyA 尾部起始。在怀孕 9 和 13 周以及足孕时结束妊娠而得到人胎盘组织。按照 the Local Research Ethics Committee 的批准来收集样品、如 Chomozinski, P. and Sacchi, N. (1987) Analytical Biochemistry, 162, 156-159 所述的那样，对 RNA 进行实质性提取。

20 利用 RT-PCR 从总的人足孕胎盘 RNA 中扩增全长的前神经激肽 B 前体。利用 SMART RACE cDNA 扩增方法 (Chemchik, A.等人(1998). In RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis. Eds. Siebert, P. and Larrick, J. (Bio Techniques Books, MA), 305-319) 可实现这一目的。实质上，总的 RNA 提取之后，利用含有 3'锚定序列的 cDNA 合成引物 (5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC (T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N<sub>3</sub>') 可实施 25 反转录。利用由类似于牛 P08858 神经激肽 B 前体的 the Homo sapiens cDNA clone 138761 衍生的 5'基因特异性引物 (5'GGCACAGAGCTGCTCCACAGGCACCAT3') 来实施 3'人种。所生成的 PCR 片段在凝胶电泳之后进行凝胶纯化，并克隆到表达载体 pGEM-T Easy 内。使所得到的克隆序列化并利用 BLAST 程序与 the GenBank 数据库中的建议序列进行比较 (Altschul, S. F.等人(1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410)。

#### 30 例 2

### 为了测定胎盘中的 NKB 而进行半定量的 PCR

以下所述的半定量 PCR 可用来测定在 9 周、13 周和足孕时收集的胎盘中的神经激肽 B 的 mRNA 表达。其结果显示出，头三个月与足孕胎盘之间的表达程度的差异。足孕时的表达水平可高达 5 倍（如图 5 所示）。

- 5 利用由类似于牛 P08858 神经激肽 B 前体的 the Homo sapiens cDNA clone 138761 衍生的 5' 基因特异性引物（5'GGCACAGAGCTGCTCCACAGGCACCAT3'）和 3'SMART 锚定序列引物来扩增 SMART RACE 胎盘的 cDNA。用于  $\beta$  -肌动蛋白的特异性引物对可用于归一化。利用 95<sup>0</sup>C30 秒和 68<sup>0</sup>C2 分钟的 21 次循环来实施 PCR。为了具有较高的退火温度，慎重选择引物，从而二步实施 PCR 反应，以便减小形成
- 10 非特异性产物的可能性。通过分别在 15、18、21、24 和 30 周期终止控制反应，可测定为了获得  $\beta$  -肌动蛋白 RT-PCR 产物的可再现指数式扩增而需要的循环数。利用这些试验可检查为了获得半定量扩增所需的准确度、效率和总的 RNA 的量，以便使所生成的  $\beta$  -肌动蛋白 PCR 产物的水平最佳。利用 UV 照明跟踪电泳可观察到 PCR 产物（1kb 的 DNA 序列梯（M1）和 100bp 的 DNA 序列梯（M2）也如图 5
- 15 所示）。

### 例 3

#### 从胎盘组织和血浆中提取神经激肽 B

- 对利用以下技术获得的胎盘提取物的测试揭示出，以显著量存在的神经激肽 B 及其在 HPLC 中的色谱性质都与合成的神经激肽 B 相同。还显示出，在对其蛋氨酸
- 20 残基进行氧化之后它们（在 HPLC 上）疏水性的损失程度相同。发现氧化反应给出了双氧化形式（1）、单氧化形式（2）和未氧化形式（3）这三个峰（参见图 6）。图 6(a)示出了利用 RPHPLC 从人妊娠血浆中分离的氧化和还原的神经激肽 B，而图 6(b)示出了利用 RPHPLC 从人足孕胎盘中提取的凝聚和还原的神经激肽的分离形式。

#### 从胎盘中提取神经激肽 B

- 25 在分娩之后立即对整个胎盘进行称重并用含有 10mM EDTA、pH7.5 的 150mM 氯化钠溶液进行洗涤。切除不超过 100g 的组织样品并且用带有玻璃器皿的混合器将其匀浆到 100ml 的盐水/EDTA 溶液中。将蛋白酶抑制剂、苯基甲基磺基氟化物、N -乙基顺丁烯二酰亚胺和胃蛋白酶抑制剂从储液中加入到甲醇中。20 秒之后，加入
- 30 800ml 的甲醇并继续混合 1 分钟。将混合物离心到 200ml 的聚丙烯离心管中并在 4<sup>0</sup>C 和 3000 x g 的条件下离心 30 分钟。将上清液分离出来并在 4<sup>0</sup>C 贮存过夜，从而产生

沉淀。通过离心除去这些沉淀。每一份提取液的体积都减少到小于初始体积的八分之一，然后通过加入三份体积的含有 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的水来进行稀释。利用最后的离心步骤除去任何痕量的悬浮物。记录提取液的体积并将相当于 20g 胎盘的量的提取液储备起来，以便利用 Sep-Pak C18 3CC 柱 (Waters Chromatography Division, Millipore Corporation, Milford, MA, U. S. A.) 进行固相提取。柱子在使用之前通过用 2ml 以下溶液灌注来进行填充：1) 含有 0.1% TFA 和 0.1% Polypep 明胶水解产物 (Sigma-Aldrich, Poole, UK) 的水，2) 含有 0.1% TEA 的水，3) 含有 80% v/v 乙腈的水以及 4) 含有 0.1% TFA 的水。每份提取液通过制备柱，然后用 2ml 的 0.1% TFA 水溶液、2ml 的 0.1% TFA 水溶液 (含有乙腈 10% 和 20% 的 TFA) 进行洗涤。用 2ml 的 30%、40% 和 50% 的乙腈水溶液 (含有 1% 的 TFA) 进行洗脱。洗脱组分在加入 1mg 的甘露糖醇和 100 $\mu$ g 的 Polypep 之后在真空下浓缩成干燥状态。如上处理来自于小产的较小胎盘，但在玻璃匀浆器中进行离解，该匀浆器中保留有对胎盘重量比例相同的缓冲液和甲醇。

#### 从血浆中提取神经激肽 B

用来自于五个服用 EDTA 的年轻男性的集合血浆制备神经激肽标准品。标准品含有 1280、640、320、160 和 80pg/ml 的神经激肽 B。每 12ml 的血浆标准品样品通过加入 220 $\mu$ l 含有 0.21M 甘氨酸的 1M HCl 来进行酸化。然后用 0.9% 的盐水将其稀释到 10ml 并在 3000 x g 的条件下离心 20 分钟，以确保完全澄清。用如上所述的用于 Sep-Pak C18 3CC 柱的方法来填充 Sep-Pak C18 1CC 柱。装载之后，柱子先用 1ml 含有 0.02M 甘氨酸的 0.1M HC 洗涤，然后用 1ml 0.1% TFA 水溶液进行洗涤。再用 1ml 0.1% TFA 水溶液 (含有 10 和 20% 的乙腈) 洗涤之后，用 1ml 0.1% TFA 的 50% 水和乙腈的混合物进行洗脱。洗脱组分在加入 1mg 的甘露糖醇和 100 $\mu$ g 的 Polypep 之后在真空下浓缩成干燥状态。酸化步骤确保我们正在提取已经加工的成熟肽，这是由于如果不注意，就有可能由内源性血浆蛋白酶裂解失活的循环前体，从而产生免疫反应性肽。

#### 例 4

#### 测定胎盘组织和血浆中的 NKB

胎盘和血浆提取物被重建在 500 $\mu$ l 的缓冲液中，该缓冲液是作为由 Peninsula Laboratories, Belmont, CA, UAS 制备的商品神经激肽 B 放射免疫测定药盒 RIK 7357 的一部分而提供的，并且向其中加入了 0.2% 的 Igepal CA-630 非粒子去污剂

(Sigma)。从提取或未提取的标准品中取出 25 $\mu$ l 的子样品，并与 75 $\mu$ l 的上述缓冲液混合。在含有 Igepal 的缓冲液中制备标准品，但该缓冲液中已经加入了 200 $\mu$ g/ml 的 Polypep。除了空白管之外，向所有测定管加入抗-神经激肽抗体溶液 (100 $\mu$ l)，并如“General Protocol for Radioimmunoassay Kit”说明书中所述的那样来进行测定。

5 进行重复测定并且参照所提取的标准品来校正结果。利用上述方法测定不同人类志愿者和兔子体内的神经激肽 B 的血浆及胎盘水平。血浆样品的结果汇总在表 1 中。从 7—15 周的妊娠中收集胎盘样品，并且全部七个样品都显示出含有相同显量的神经激肽 B；然而，在足孕时所检测的血浆 NKB 浓度在 100 皮摩尔的范围内，期望这个量对母亲的心血管具有效应。取自于非妊娠志愿者的血浆样品都具有低水平的

10 肽，这与从在 7—15 周选择流产的个体中取出的大多数血浆样品的结果一样。来自后一组的四个样品具有与足孕时相同的浓度。这暗示，来自该个体的胎盘在妊娠早期可能已经开始分泌超生理浓度的神经激肽 B。从具有高血压和子痫前期的妊娠后期的病人体内取出的样品全部具有纳摩尔范围的浓度，这个量暗示，增多的神经激肽 B 是产生疾病症状的原因。

15

表1

妊娠周	正常血压的妊娠中的 Nmol/l NKB
6	0
9	0
9	0.97
10	0.535
13	0
13	0
13	0.083
13	0.511
14	0
14	0
14	0.511
17	0.182
17	0.182
18	0
23	0.12
24	0
25	0.17
27	0
28	0
28	0.033
31	0
31	0.031
32	0
33	0
37	0
38	0.07
39	0.138
40	0.05
40	0.2
41	0.118

表2

妊娠周	子痫前期妊娠中的 Nmol/l NKB
30	3.964
34	6.156
36	3.796
37	2.141
38	2.752
39	2.004
39	6.288
39	0.98

表3

病人数	足孕时正常血压的妊娠中的 Nmol/l NKB
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0.084
9	0.118
10	0.143
11	0.22
12	0.226
13	0.228
14	0.398
15	0.521
16	1.317

## FIG. 1

人神经激肽 B 前体的氨基酸序列

MRIMLLFTAILAFSLAQSF~~GA~~VCKEPQEEVVPGGGRSKRDPDLYQLLQRLFKSHSSLEGLLKALSQASTDPK  
 ESTSPEKRDDMHDFVGLMGKRSVQPDSPDQENVPSFGILKYPPRAE

## FIG. 2

神经激肽的氨基酸序列

DMHDFVGLM-NH<sub>2</sub>

## FIG. 3

人神经激肽 B 前体的克隆化全长度胎盘 cDNA

<u>GGCACAGAGC</u>	<u>TGCTCCACAG</u>	<u>GCACCATGAG</u>	<u>GATCATGCTG</u>	<u>CTATTCACAG</u>	50
CCATCCTGGC	CTTCAGCCTA	GCTCAGAGCT	TTGGGGCTGT	CTGTAAGGAG	100
CCACAGGAGG	AGGTGGTTCC	TGGCGGGGGC	CGCAGCAAGA	GGGATCCAGA	150
TCTCTACCAG	CTGCTCCAGA	GACTCTTCAA	AAGCCACTCA	TCTCTGGAGG	200
GATTGCTCAA	AGCCCTGAGC	CAGGCTAGCA	CAGATCCTAA	GGAATCAACA	250
TCTCCCGAGA	AACGTCACAT	GCATGACTTC	TTTGTGGGAC	TTATGGGCAA	300
GAGGAGCGTC	CAGCCAGACT	CTCCTACGGA	TGTGAATCAA	GAGAACGTCC	350
CCAGCTTTGG	CATCCTCAAG	TATCCCCCGA	<u>GAGCAGAATA</u>	<u>GGTACTCCAC</u>	400
TTCCGGACTC	CTGGACTGCA	TTAGGAAGAC	CTCTTTCCCT	GTCCCAATCC	450
CCAGGTGCGC	ACGCTCCTGT	TACCCTTTCT	CTTCCCTGTT	CTTGTAACAT	500
TCTTGCTGCTT	TGACTCCTTC	TCCATCTTTT	CTACCTGACC	CTGGTGTGGA	550
AACTGCATAG	TGAATATCCC	CAACCCCAAT	GGGCATTGAC	TGTAGAATAC	600
CCTAGAGTTC	CTGTAGTGTC	CTACATTAAA	AATATAATGT	CTCTCTCTAT	650
TCCTCAACAA	<u>TAAAGGATTT</u>	<u>TTGCATACGA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	700
<u>AAAAAA</u>					706

## FIG. 4

```

1  AGGCTACTGT  AGGTAACCAC  CCAGCTTGGT  TCTTCAGCTC  CACATGGTGG  GGTTAGGAGA
61  GGAGGAGGAG  GGAGATGGAT  GGAACCAATT  AGGAACAGCA  CCTGGGCTCC  TCACAGGAAT
121  GAACCAGTCA  TGCCATTTGC  ATGTAAACAG  CTTCCCCTT  CTCTCCTCAT  CCTACCAAAT
181  GCTCCAAC  CTGGTCTG  GCCCATGTT  TTTGCCACA  CAGCCCTGTA  ATTAGCTGGG
241  TAATGAGAAG  CTTTAAATGA  GTCCATTAG  CATCTCGTGT  AATAAAGAGG  CCTTGAGACC
301  CAGCTGCTGT  CCTCACTTTG  GGATGAACAC  GGGTCCCTGT  GTAGCCAGTG  ACTTCTGTCA
361  GTACAGTCTA  AGTTCTCGGA  TGGGGTGGGA  GACAAACATT  TCAGGACCCC  AGCAGCACTT
421  GAGAGGTTCC  ATGGTGGATC  CATGTTTTTG  ACTGTGATAC  AAGAACTTG  GCTCTGGCTT
481  CTTGTTTCAT  TTTGTAAATA  ACATTTTTTC  TTCTTTAAG  AGACAGAGTC  TTTACTTTGT
541  GCCCAGGCTG  GAGGTAGCA  ATGCAATTAT  AGCTCACTGC  AGCCTCAACC  TCCTGGGCTC
601  AAGTGATCCT  CCTGCCTCAG  CCTCTGGGAT  AGCTGGGGCC  ACAGGCATGC  ACCACCATGC
661  CTGGCTAATT  TTTAAAATG  TTTTTGTAGA  GATGGGGTCT  TACTTGCTAT  GTTGCTCAGA
721  CTGGTCTCGA  ACTTCTGGCT  TCAAGCAATT  CTCCCACCTC  GCCCTCCTAA  AGTGCTGGGA
781  GTATGGGCAT  GAGCCACCAT  GTCCAGCCTT  GTAAATACAT  TTTTATTGAG  CACCTATTAT
841  ATGTCAAACA  TTATAAAGTG  AGGGATACAG  TAGCAAACAA  AACAGACAAA  AATTTTGCC
901  ATCATGACAC  TTATATTCCT  GGGTGGGAGT  GGTGATAGAA  AGACAATAAG  TAAAATACTT
961  AGCATAGTGG  ATGTAATAAG  TTCATGAAGG  GAAAATGGG  AGTGAGGTAT  ATGGAATTTT
1021  GGGGTGGTGA  TAATTTTAAA  TAGGGTGATT  GGGGAATGCT  TTGTTGCACA  GATTGTTTTT
1081  GTAGTAAATA  TGAGATAAAG  ATACGGTCT  CTCCAAACT  CAAAATGTAG  AAGAGTAGAA
1141  GGTCCCAAAT  CTTCAAGTCT  CTTGGAGAGG  GGGGCCACCC  ATTCCGTCTG  GGACAGTTAA
1201  CTGTTCCCTC  ACAGGTCAA  GTTATGCCA  GTGCAGTAAA  AAGAGTGGGA  GACCTGGGGT
1261  GAGACAAACC  TGGATTTGAG  GCTGTTCTT  ACTGATTAGT  AGCCATATGT  ACTGGAGCAA
1321  GTGACTGAAC  CTTCTGAGCC  TGTCTCTCA  TCTGGAAAAT  CAGAATATTT  CCTACTTACA
1381  TGGTCATGGT  GATGAAAACC  AGATGGACTG  CTCCATGCCA  AAGCACCCTG  CAAACATTCA
1441  AACCCATGCAC  CCATTACAAA  TACTGGGCTG  ACGGATGGCT  CTGGCTTTGC  TTTTGCATCT
1501  CCGCTGTCTC  ATTCAGCAGC  AGCATCTGGC  TCTGGCTCTC  GGCTCTGATC  CTGGTTCTGA
1561  CTCTCCCCTG  GAGCTCTCTC  CCTTGGGTGA  GAAATAAGCA  GATAATCTCC  CTCATCTGTG
1621  TGTGGTGTGA  ACAAGAGGCT  TGAAAGGTCA  GAGAAGAAGA  TGCCTGAACT  GCAGGGAGAC
1681  AGATTAGAGT  GGGGAAAATG  TAACTCTGAG  GAAAAGGGA  AGCAATTAAG  AGATCAAGGC
1741  CAGGGGAGT  GGCTCATGCC  TGAATCCCA  ACCTTTGGG  AGGCTGAGGC  GGGCAGACCA
1801  TGAGGTCAGG  AGTTCGAGAC  CAGTCTGGCC  AACATAGTGA  AACCCGCTCT  CTACTAAAAA
1861  TACAAAAAAA  TTAGCCAGGT  ATGGTGGTGT  GCACCTGTAA  TCCAGCTAC  TTGGGAGGCT

```

```

1921 GAGGCAGAAG AATTGCATGA ACCCGGGAGG CAGAGGTTGC GGTGAGCCGA GATTGAACCA
1981 TTGCACTCCA ACCTGGGCAA CAGTGTGAGA CTCTGTCTCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2041 AAATCAAGGC CGGGGAGGGG GCAGGGGTGG CACAGCTATC GAGTTCGTGT CATCCTCTGT
2101 GAGATTACAT CAGGAGGTGT AAAAGAATC TAGAAGAATG AAGCTAAGTC CAGCTGATTC
2161 AGGGTTCAAG AAGGATTGAG GTGGGAGAGG CATCATGACC ACTGGTGAGG AGTGGAGGAA
2221 GGCCGACACT GGAGCTTTCT TTGCCCAAGC AGAGGAGGGG TGTGACACTC TTGAGGACCA
2281 ATGTAATGGC GCAGCTCCCT CTGGGAGGGG GAAAGGAGAG GACTGGAGGG GATGCTAAAC
2341 TGACCTTCTA ACCTTCAGGG GCCTGAGTCT GGTGTCTCTG GGTGGGGAGG GCGCCTGCC
2401 TGAAACTGTT TTAGCCCAAG AGTCAGGCCT GAAGGTTAAA GGGCAAGGAG CTGGTGGATG
2461 AACAAAGTGG GGAAAGAGGC CCAGGGTCCA CATCTACTGA GCTGGACTCA GGCATGGGAA
2521 TTGGTGTGTG GAGGGCCAAG ACACTTGGCC TCCTAAAAGT TTGCTGAAA TCACTGACAT
2581 GAGAGTAATT GATTTATAGG AGAAAAGGTA GATAAATTTA TTTAATATGT ATATATGAGC
2641 ACCTTTAGAA TGAAGACCCA AAGATATAGG GGAAATTGCC AGTTATTTAT TTATTTTTTT
2701 TGGAGATGGA GTCTCACTGT GTCTGCCAGG CTAGAGTGCA GTGGCATGAT CTCGGCTCAC
2761 TGCAACCTCC GCCTGCTGGG TTCAAGCAAT TCTCCTGCCT CATCCTCCTG AGCAGCTGTG
2821 ACTACAGGCA CGCACCACCA TGCCCGGCTA ATTTTTTGTA TTTTTTAGTA GAGACAGGGT
2881 TTCACCATGC TGGCCAGGCT GGTCTGGAAC TCCTGACCTT GTGATCCGCC CGCCTGGCC
2941 TCCCAGAGTG CTGGGATTAT AGGCATGAGC CACCGCCCCC AGCCTGAAAT CGCCAATTTT
3001 ATGTTTATGT TTACAAAGT ATGGACAGCT GTGTAGAAAT ATGACTGGAC AGAAGGGCAT
3061 GCTCTAATGT TAACAGACTG AGTGGGGAAA CCCAGGAAGG CCTGTTGAGA TTCCTCCTGG
3121 CCTCTCTCAT TCCTTCCTTC TGGGTATGGG GCAGGACCCT CTCTGGAATG GGGAGATCTT
3181 AGGACCTAAG TTAATAAAG TAGGTCAGAT AATTTTTTAT GGCCAGTTTT TACATACAGT
3241 AATTTTAGGT TTTATGGCTG GCTTTGGGGA AAAGAGGTCC TGGTTTTTAT AGCTGGCCTT
3301 GGGGGAGAAT GGGACCCAGC AACAGGAGGA CAGGAGAGGG TCAGAGAAA ACTTCTGCTT
3361 CTGAGGCTGC TACTGAGGCC TTCATTTTAG GGTATTGTCT TCTGAGCCCC AGCATTCCCTC
3421 GGTGTGAAAA ATTTTAAAGA AATTTTATAG TCCAGAAAT GAGTTGGTGA ATGTCTTAT
3481 AAGCCATGGA ACTAGTCTCT TAGTCCTGAG AATAGGCCAG TCTAGTTAAA TAGTTATTAG
3541 TTGTGTCTAA TTTTAGGCAG TGTGTTGCAG ATGGGCTTCC ACCAAAGCCA GGCCTCTATA
3601 TGATATGAGT AATCAGTTAT TTAGTAAGAG GCATTTTTGT CTCAAAAAAT AAATAAATAA
3661 AAATATATGA ATAAATGAAT GTATGTTTCT TATCAGACTA CGTCTGTTCT ATCATTAAAT
3721 CCAGAAGGGA GGAGGTCTG GTCCCCCTT CCCATCATGG CCTGACCTAG TTTCAGGTT
3781 AATTTTAGAA CACCCTTGGC TGTGAGGAGT GGTCCATTCG GATGGTTAGG GAGCTTTAGG
3841 ATTTTACTTT TGTTTACAA AGTAATGTGA ATTAACAGA CATTGAGTT AAAGTTTTTA

```

FIG. 4续

```

3901 TTTTTAATA AAATATTTGA TTTAAGCATT TTTTAACTG AATTAATTAG AGCTCTTTTA
3961 TATATTTTGA TAATGGAACA TTACATACAC AGGCACATAT AAATATATAG ACACATAAAC
4021 AGAAGTAGAG CTTATAGATT TATACTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTAAT GAGACAGGTT
4081 CTCCTTCTGT CATCTAGGCT GGAGTGCAGT GGTGCCATCA CAGCTCACTG CAGCCTTGAC
4141 CTCCAAGGCT CAAGCAATCC TTCTACCTGA CTGGCTAGCT GGGACTACAG GCGCGTGCCA
4201 CCATGCTGG CTAATTCGTG TATTTTTTGT AGATATGGGG AGTTTACCA TCTTGCCAG
4261 GCTGGTCTTG AACTCCTGGG CTCAAGAAAT TTTCCCTAAT TGACCTCCCA AAGTGTGGA
4321 ATTACAGGCA TGAGGCACTA CGCCAGACCA GATTTTTTAT TTGTCAGTTT CTAGGTAGTT
4381 TTCCCAACT TCAGACTATC AATTTTTAAA TTATCTGTTT TATGTCTTAA TTATTAACTA
4441 GGCAACTCTA AACTTGTATC TCTAAGACAT GACTTTTAGA TGAAATAAGG TAGAAAATGT
4501 ATATTTCAA GGCATAGAAT TTAGATCTAA ATAAAGGTAA AGTTATCTAA ATTTTAAGCC
4561 ATTGTCTTTT CTATTCTAAA AGGTTTTGGA GGTTTGGGTG TAGAGAGGGA GATGCCTTTA
4621 CAAATGGAAT TTTTGTTGTT GTTTTTGTTT TGAGACGGAG TCTTGCTCTG TCACCCAGAG
4681 TCTCGCTCTG TCGCCAGGC TGGAGTGAC TGGCACGATC TCCGCTCACT GCAACCTCTG
4741 CCTCCCGGCT TCAAGTGATT CTCCCACCTC AACCTCCTGA GTAGTGGGGA TTACAGCTGT
4801 GTGCCACCAC GCCCAGCTAA TTTTTGTATT TTTAGTAGAG ACCGAGTTTC ACCATGCTGG
4861 CCAGGCTGAT CTCGAACTCC CACCTCAGGT GATCCGCTCG CCTTGGCCTC CCAAAGTCTC
4921 GGGATAACAG GCATGAGCCA CTGCACCTGG CCTTTTCTGA GTTTTTTAAG GAGTCTGAGT
4981 CATTAGAAGT CTTTTCTAGA TTTTTTAAAA ATGTGGTATT GAAGATGGCA AAGAGGAAGG
5041 AGGAATAGGG TGGAGTAAAA GTAAATGGGA GGATAGTTT TAAGAAAGGA AGTGAATAGA
5101 GACATCAAAC ACATTTTAAA AAAAAGATTT TAGTCTACTG AACAAAATTT TTTAAATAG
5161 GATTTAAAGA GAAAACACAG AAGGCTTAA AAATATACAC ATAGCTTGAA TATTAGCTTT
5221 TAATTAAGCT GACTTCTAAC CATGGAGCTC TTTAACAAAA ATTCTTTTAA ATTTGTCTCT
5281 CTCCTCCTTT AAAACTTTTT GTAGAGATGG GGTTCGCCC TGTTACCCAG GCTGGTCTCA
5341 AGTCCGGGCA ACTTCTGGGC TAAAGTGATC TGCCTGTCTC GGCCTCCCAA GTGATAGGAT
5401 TACAGGTGTG AGCCACTGCG ACTCACCTTA AATCTCTTGT TACCAGATTT TAGTTGGGAC
5461 AAATGCTGAT ATTTTAAAAG TCACATAAAT ATTAAGCCGA AAAGGACTGA TTTCTGATTA
5521 GGAAGGAAAC CTAAGCCACG GTGGGAATTT TAATTATTA ACTGTAAAAT GGAGCAGCCT
5581 CCATTGTTAA TTTTGTATGG AATCCAAAGT GGCAGTTTGA GTGTAATTGT TTTAGGTCAG
5641 GTTTTTGTGC TTTAATTTAA TCAAGACAAT TGTTAAGGAT AGCTGTGACA CTATTATGTG
5701 TCCTTTTAA TTTGATCTATC AATTCTTTAG AACAAGTAAT TTTTTTAAAT TTAGGAATTT
5761 TAGTCTAAAG GATTTATCTT TTGGCCATTG ACAATTAGAA TTTTTAATGG GGTATTTAAT
5821 TCCAATAGCA ACTTAATCCA AAGTTTTCTT TATGTCAAAG AAAACAGAAG CCCAGGAGGG
5881 ATGAGACCTT GTAAGACAAA ACTCCCCTAG GAGCTTGGA TGTTTGAAAA TACATGTGTT
5941 GGGCTCCCAA TCTTTTCATA CTGGCTGTGA TGTTACCTGA AAAATCATAT CCTTTGGATG
6001 GTGGAGACCA AGCGGGAATA TCCCCATCTA GTCACGTCAT GCTCTCAAGG ACATGAGACA
6061 AGAGGGAAC CTCTCACCTT GTTTTTATTT CAGGGACTGG CAGCAAAGTT TGTCATAACA
6121 GAAGTCAGCA TAACCAGAAC CACGAACTG ACCAGTTTGC AGGGCCAGTT CAAACAGTGG

```

FIG. 4续

```

6181 GTTGCAGGCC TGTTCTACCC TAGGGTACCC CTCCTTATGA CAGAACACCA AAAGACAAGA
6241 CAAAAACGAA GGAAAACGGC AACAAACAAA AAGCTATTTC TGAAAGGAAA ATGGCAACAA
6301 CAACAACAAA AGCTATTTCT GAAGGGAATG GGGTCAAAC ATGAATACTT ATACCACAAA
6361 GTACTAAAAA ATATATCAGA CTCACTATAC CAAGGTTAGT CACACACAAA ACCTGTTCTC
6421 TCATTAATCT TACATTTGGA AAGGAAAAGG GAAACAATGA TTTTACTGT CCACTCATCC
6481 AGAGTCCACA GAGAGAGGAA AACTGGAAAA CTGGGAGTCT GGCAGGAAAT TCTCACTCCT
6541 CTGCTGGCTT GCCAGGTTCC TGTATTTCCCT TCTCTGTGGC TTCCAGAAAA GCACAATAGC
6601 TTTGGTGGTC TTATTTGTGA TGCCAAACFG TGGTCTTGGC CCCCTAAAGT TTCAGTGAAA
6661 ATCACTGACA TGAAGCAGAT TAATAGGGAA AAAGGCATAC AAATTTATTA AATACGAATG
6721 GGAGCCTTTA GAATGAAGCC TTGAAGCTAT AGGGGAAATT GTCTATTTTT ATGTTTAGGT
6781 TTAACAAAGT ATGGACAGCT GTGTAGAAAT ATGACTGGAC AGAAAGGGCA CGATCTAATG
6841 TTAACAGACT GAGTGGGGAA ACCCAGCAAG GCCTGTCTGT TGAGATTCCCT CCTAGCCTCT
6901 CTCATTCCTT CTTCTGGTG TGGGGCAGGA CCCTCTCTGG AATGGAGGTT TTATGACCTA
6961 AGTCAAATAA CGTAGGTCAG ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGTAGC TGGAGTCTCT
7021 CTGTCAACAG GCTGGAGTGC AGTGGCGTGA CCTTGGCTCA CTGAAACCTC CGCCCCCTGG
7081 GTTCAAGCCA TTCTCCTGCC TTAGCCTCCT GAGTAGCTGG GATTACAGGG GTGTGCCACC
7141 ACGCCAGCT AATTTTTGTA TTTTAGTAC AGACAGGGTT TCACCTTGTT GGTCAAGCTG
7201 GTCTCAAATT CCTGACCTTG TGATCCACCT GCCTCGGCCT CCCAAAGTGC TAGGATTACA
7261 GCGGTGAGCC ACTGTGCCCG GCCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTAGGAA GTTGTATTTT
7321 GGGCTTTTTA ACTAGCTTGT TTTTAAATTA GATTATTGCC TTAGGGTGG AGCCCTTTAA
7381 TAAAAAGGGG GAAGAAAACA TAGGTTTTAG GGCCTCATAT TTAATGGGT AAAGCAGGCA
7441 TAGCTGGAAG GCAGAATACA GAACCCCTT AATCAAGGAT CTCATTTTTA TATTGAATCC
7501 TAGGCCCCCC AAAAGAGGGA AATGTCATGG GACGAGATGT GTGCATTTT TATCGAGTGC
7561 CCCACTGTAA AGATGCTCCC CCAAGGCTGG CAGGCAGCCC AGTGCCGATT AGCCACTCT
7621 GTGCTTAGTC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GAGGTGGAGT CTTGCTCTGT TGCCAGGCT
7681 GGAGTGCAAT GCGGTGATCT CGGCTCAATG CAATCTCTGT CTCGTGGGT CAAGCGATTC
7741 TCCTGCCCTA GCCTCCCAAG TAGCTGAGAT TACAGGCACC AGCCACTATG CTCAGCTAAT
7801 TTTTGTATT TTTAGTAGAG ATGGGGTTTC AACATGTTGG CCAGGCTGGT CTCGAACTC
7861 TGACCCCAAG TGATCCGCCC GCCTCGGCCT CCCAAAGTGC TGGGATTACA GCGGTGAGCC
7921 ACCATGCCTG GCGTGCTTAG CCTATTTTTA ATGGGAGTTT CATCCTCAAT GGTGAGTGTCT
7981 TTCATTGTCT TTAGGTGCCC CAGACCATGT TTTTAAAAAT TTAATGCAC GAAGAAATAA
8041 GTAGCCCTGT ATAGTAGTAA TACTTTGTTG TGAATAACTG TCATAAGTCA TCTCTAAAAC
8101 TGTATTTTTT ATCTAGTTAT TATATATGAC TAGCTATATG TCTAGTTTTT TAAATAATAC
8161 AAAGTAATTT ATTTTTGGCA TCCTCAAAAA CCAAAGAGAT TAGGTAATGT AGTGTAGAAG
8221 AGAGCAGAGC TTTAGACCTG AGAAGAATCT GCCCATGACT CGTGAACTC CACAACGAAA
8281 GTAGGAGACC CCAAAAAAGG GGTGAGTGTG ATCTTTTCTG AATTTTTTTT TTTTTTTAGA
8341 TGGAGTCTTG CTCTGCCACC AGGCTGGAGT GCAGTGGTGC AATCTCGGCT CAGCCTCCCC
8401 AGTAGCTAGG ATTACAAGCA CGCGCCACCA TGACCAGCTA ATTTTTGTAT TTTTAGTAGA
8461 GACAGCGTTT CACCATGTTG GCCAGGATGG TCTCGGTCTC TTGACCTCGT GATCCGCCCC

```

FIG. 4续

```

8521 CCTCGGCCCTC CCAAAGTGCT GGGATTACAA GCGTGAGCCA CTGCACTCGG CCGGTCAGAT
8581 AATTTTTTTTG GCCAGTTTTT ACATAGAGTA ATTTTAGGTT TTATGGCTGG CTTTGGGGCA
8641 AAGGGGTTCT GGTTTTTATA GCTGGTCTTG GGGGAGAATG GAACCGAGTG ACAAGAGGAC
8701 AAGAGAGGGT CAGAGAAAAA CTTCTGCTTC TGAGGCGGCT ATTGAGGCCT TCATTTTGGA
8761 GTATTGTCCT CTAAGCCCCA GCAGTGTCAA ACTGTACACA AACCATACAC AGCAGCCAGC
8821 TCGGGTGCTG TTAGGAAATG GTCTCACTGC TGGGTCTGTG GGGTATGTGT GTGTCTGGGT
8881 GTGTGGCTAC TGTCTGCATC CTCCTCCCCC CTACAGCCTC CCCGCCCTCC CTCCAGCCAC
8941 CCTGGGATTG GTGACTCTCA GCCCCTCCCC TCAGCTCCCC TAGACCCTCC CAGAGCCTTT
9001 ATCAGGGAGC TGGGACTGAG TGACTGCAGC CTTCTAGAT CCCCTCCACT CGGTTTCTCT
9061 CTTTGCAGGA GCACCGGCAG CACCAGTGTG TGAGGAGAGC AGGCAGCGST CCTAGCCAGT
9121 TCCTTGATCC TGCCAGACCA CCCAGCCCCC GGCACAGAGC TGCTCCACAG GTAGGCAAGT
9181 GGGAGAATGC TGGATGGACC AGAGCTGGCA CCAGGGGGCT GTTATCTCCT GACTGCCCTT
9241 CTTCTTCCTT TTCTTTCATC TGTGTATTGT CAGGCAGCTA CTAATTGTCA ACCCAGAAGC
9301 TGCTGGGTTT AGACCAGGGT CTCAATAAAT CACACCCCA CAGAAGCCTG CGGGCACTGG
9361 GCACTGATTC CCCAGTGT TCTGAGTATT CCAGTTTGCC ACTGCCTTGA CTGTAACTAA
9421 TGCTAGTATC CATTCTCATT TTTTAAATTT TATTTTATTT ATTTATTTAT TTTTGGAGAC
9481 AGAGTTTCAC TCTTGTCAAC CAGGCTGGAG TACAATGGCG CGATCTCAGC TCACTGCAAC
9541 CTCCGCCTCC CAGGTTCAAG TGATTATCCT GCCTCAGCCT CCTGAGCTGG GATTACAGGC
9601 ATGCGCCACC ATGCCAGCT AATTTTTGTA TTTTAGTAG AGACAGAGTT TCACCATGTT
9661 GGCCAGGCTG GTCTTGAAC TCTGACCTCA AGTGACCCGC CCATCTCGGC CTCCCAAAGT
9721 GCTAGGATTA CAGGTGTGAG CCACTGCGCC CAGCCTATTT CTTTTTTGAG ATGGAATCTT
9781 GCTCTCTCGC CCAGGCTGGA ATGCAGCAAG CATGATCTCG GCTCACTGCA ACCTCCATCT
9841 CCCGGGCTCA AGCCATCCTT CAGCCTCGGC CTCCCAGTA GCTGAGACCA CAGGCACATG
9901 CCACCACGCC TGGCTAATTT TTTATATTTT TGGTAAAGAT GTGGTTTCAC CATGTTGCC
9961 AGGCTGGTCT CAAACTCCTG AGCTCAAGTG ATTCACTCGC CTTGGCCTCC CAAAGTGCTA
10021 GGATTACAGG TGTGAGCCAC TGCACCCGGC CTTACCCATT ATCTTTTGAA CATCTACTAT
10081 GCATTAAGCT CTTTACATGC ATTAACCTCA ATACTTCAA TAACCCTGTG AGGTAGGCTC
10141 TTTTCTTTCT CCCATTTTGT AGTTAAAAAG CCAAGGCTCA GAGAGTTAA ATAACCTGCC
10201 GGGGGTTCCA CAGCTGTAAG TGGTAAAGCT GGGTTACAAA CTATTTGACT CTAGAGCTTT
10261 TAACCACTGC CTAAGACTGC CCCTCATCAA TAGAGGCTTG GGCAACCCAT GGCCCTAGGC
10321 AGACCTGGGG GCAGGAGGGC TGCATAGGAA AGGGCAGAAC TTTCTAGTTC TAGAACAAAC
10381 AATAAAAAGA AGAAAGCCTT CAGAGGCTCC ACATTAATTG GAACAAAGGG GATTATGACA
10441 GATGCTTAGG CATGTTTGTT GAATTATTAA TAAATAAAAT CAGACTAGGG ACTGGGGACT
10501 CCAGTCTTGG AGGCCTTCAC AGGCCAGAT CCCAAACCCA CCAAACCCAC TAGACCTGCA
10561 GTGGAAGCTA CAATGAGCTT GGATAGTTC TGCAAGTAAAC AGCAATATAC TATGTATTCT
10621 GCCTCTTTCT ATTTAAATTT TTTAACCTGA TATCTTAGTA AAACTTTTTC ATAAAAATTC
10681 CAGACATTTG GAAGTGCCAA AAATCAAGTC ATTTTTTATA TCTTCAGTAA TTCTGTGCCA
10741 TAAACAAACA GGTGCTAGG TGCTCTATGG GATGTAAAC CTTGGCCAGG CAAGGTGACT

```

FIG. 4续

```

10801 CACTCCTGTA ATCCTAGCAC TTTGGGAGGC TGAGGCGGGA ATATTGCTTG AGCCAGGAA
10861 TTTGTGACCA GTCTGGGCAA CATAGTGAGA CCTAGACTCT AAAAAAAAAA TTTAAAAATT
10921 AGGTGGGTGT GGTGGCTCAT ACCTGTAGTC CCAGCTACTT GGAAGGCTGA GGTGGGAGGA
10981 TCGCTTGAGC CCAGGAGGCG GGCAAGGCTG CAGTGAGCTG TGATGGTGGC ACTGCACTCC
11041 AGCCTGGGCG ACAGAGCAAA ACCCTGTCTC AAAAAAGAG GCAAAAACAA AACTTAAGA
11101 ATCCTTGTTT TAGATTGGGG CAGACTAAAG AGTCAGTTGC CATGGATGAA GCTTGATTGG
11161 ATCCTGGAAA AGGAAAAATA AAGCTTCAAA GGACATGTTT AGAAGTTTAT AAAGGACATG
11221 TAGAGAAATC TGAGAGTGGG TCGCTGTTGG ATGAGTGATG TTGATTTTCT TAGGTGTGGT
11281 GATGGAGTTA TGATTGTGTA AGAGAATGTT CCAGTCTTG GGAGAGGCAT GCTGACATTT
11341 TAGGGTAAAA TGTCATGATA TCTATAACCT ACTTTAGGAT GGTAGGGTAG CAAGGATTTG
11401 TGTAATGTG TATATGCATG TATTTATATG CACACATATG TGTGTGTGTC AGAGCACACA
11461 GATAGTGCAA GGTGTTAACA TTATCAGTTG GTGCATTTAG ATGAGGAACA TACAGTATAC
11521 AGATGTTAAT TGTATCTTTT TTCAACTTTT CTGTAAGTTA AAAAACTTT CAAAATAATA
11581 AGCTATATTG AATTTTTAAA ACATCATATT ATGCTATTCT TCTGTATAAA TTCTCCAATG
11641 GTGTTCCATT TCACCTCTTA CCACAGCCTA CAAGGCCCAT CATGATCTGC CCCGACCTAC
11701 TCTCTGATCC TCTCTCTCC TGCTCAAGTG ATTCTGGCCA CCCTTTTTTT TTCTCTTTT
11761 TTAGACAGTC TTGCTCTGTC ACCCAAGCTG GAGTGCAGTG GTGCGATCTT GGCTCACTGC
11821 AACCTCCACC TCCCGGGTTC AAGCGATTCT CCTGTCTCAA CCTCTAGAGT AGCTGGGATT
11881 ACAGGCATGC GCCACCATGC CCAGCTAATT TTTGCTCACC CTGGCTTTTT AATGTCTCTG
11941 GAATATGCTG CCACTCATTC CTGCCTCAGG GTCTACTTCT TTGCATCACA GCAGATGCCA
12001 TTATCTGACA TCACACTATA TATTTATTTG CTTGTGTAGT TGGTCCCCTT CTCCACCCTA
12061 CAGTAGAATG TAAGTCCAGT GAAAATGAAG ACTTTGTTCA CTGTTATGTC CCAGTACCTA
12121 GAACAGTTCC AGGCACTAAG TAGACACTCA ATAAATGTTG ACTAGTGAAA AAAAATGTGA
12181 GACCTGGGAT CCTGCCTTAT AAGGACTCAG TGTCTAGAAA AGGGAGCTGT TTTCCATGCA
12241 AATAACTGTA GTACAAAGAC GAGTGTAGGC AAATTGCTAT GGGGCTTCAA AGAAAGGAGA
12301 GGCAATCCGG GGCTTGGGGA ATCAGGGAGG GCTTTGAGCT GATCTCCCAG GTTGGCAGAG
12361 TTGAGTCAAG AGAGCATCGA GAGCTAAGGC ACACAGTGAT CATGCATGGG CTGGGTAGGG
12421 GCATGGGAAA GAGTCCGTC CGGGTGGTGT GCCCAGGAA TGCAGGGGTC CTGGCAGATG
12481 AGGCTGGGCT CTTAAGTGTC AGGGAGGAAA CCCAGGAGAG AAAAGCACTT CCAGTGAAAC
12541 CCTGGGAAAG GCCAGAGAGA AGGAGGAAGA GCATGGGATC TTGGACAGAG GCTGGAGCAA
12601 ATTGTAACAT ACCTCCGCTG ATTTGGATTTT TGACCGTGGT TAGGACCCTG ACTATTGCTC
12661 ATTCAGACAT GAGACACATT TGCTTACAGC CTCTCTTGTG TGTTTCGAGG TCTGGATCCC
12721 TCAGCTTAAG AGAGGAATGG GGGCTCTGAA GCTCTGGGCC TCTTCATTGT CTCCTGAAT
12781 TCATTTGCTC TTTCTCTTTT GCTCCTTTAT TTGCTCCTTC TTCCTTTGAA TGGAGGCTGA
12841 CATGTTTGGG CTTGACTGAT TTGAGAGGAG GGGAAATTTG GTACCTAGCC AACAGCTGAC
12901 ACAGACAGTG GCTGCCACCT GTAGGCAATT GTGAACAGAA GGAATAGAAA GCTACAGGAG
12961 CAAAACCTTTG AGACCAGCTT TCATATTGGT TCCTCTTACC TCACTGCCCT GGTAGCAGG
13021 TCTTTGGTTG GAACTAATCG TTCTCTCCCT CCAGTCTCCT ATTCATGCTC TTACCTCCCG
13081 GCCTCAAGCC TGCACCTCTT GCTGAAAAAG ATCCAAGAGG TGACTCCCTT CCATCTCTTC

```

FIG. 4续

```

13141 AGCTCCACCC CTTGCTTCTC ACTGTGGGTT AACTTCCTCC TTTGAAGTGG CAGGATCTGG
13201 GTGCCAGTTT GCCTGTCAGG AAGTGTTCCT TATCACTCCA CTCCCAATCC CCCTGGTCCC
13261 AAAC TAGGTA CAGAAATTC TACTGGGGCT GAAGAACAAT TTGCCATCCA CAAACGTCTT
13321 AGACAAGACA TGGCCAGCCG CCCCCTACAA GTGCCTCAGC ACAGCAAATC AGGAGCTGCA
13381 GCAGCTCTTC TACCAGTGGA AGGCAAGTGG AGCCCAGGCA CCCCTCCTCT CATTTCTGCT
13441 TTTTTTTCCC TCCCCTGAT TTTCTCTTT TGCCCTCCCTC TTCTATTTTT TTCCATTAA
13501 AAAAATTGTG GTAAAATATA CATAACATAC AATCTACCAT TTTAACGGTG TTTAAGTGTA
13561 TAGTTCAGTG GCATGAGCGA CATTTCATGTT GTTCTGCAGC CATCACTGCC ATCCATCTCC
13621 ATATGCGTTT TTCATCACCC CAAACTGAAA CTCGTACCC ATTAAGCAAT AACCCCTAT
13681 TCTCCCATTC CCCTAGCCCC TGATATCTTA TAATCTACTT TCTGTTTCTA TGAATTTTAC
13741 TTTTCCAAGT GCCTCATATA AGTGGGAATC ATATTTGTCC TTTTGTGTCT GGCTTATTTT
13801 ACTTAGCATA AAGTAATTG TTCTTTTATT CAGGAAATGC TTATTGAGCA CCTGTCTGGG
13861 ACTAAGCCTT GCCCTGAGAG CTGAGCATAG AGCCCTCCTG GTGCTTTTAT TTGATGGTGT
13921 CCATTCCCCTC CCCTAGCCTC CCTCAGTTCT CGCACTCCTC CTCAATGGTC CTCCAGCCCC
13981 GGCCTCTCCC TGAGGTGTCT AGTGCCTGTC CTTTTTCCTC AGTCTCTCTC CTCTCCTAGT
14041 GTCTTCTAGT CAATATTTCT CACCTCCCTC CCCAGCCCTG CCCTCCCCTC CTATGATTTT
14101 AGCTCCTGTC CCTCCTTCCT CACAGTGCAA GAGGTTCGG GATCAGCTGT CCCCAGCA
14161 GGTAGAGATC CTGAGGGAAA AGCTCTGTGC CAGTGAAGT TCAAGGGCA AGAAGGCTTC
14221 ATATCCCAG AGGTGAGGGC CTCCCAGACC CTGCACAGCC AGTTCATCA CGCAGCAGTT
14281 CTCAAACCTT AGCGTGCCTT AGAATCACCT GGCAGGATTG TCACCCCCAG GTGCTGTGTC
14341 CCTCCTCAGA GTCTCTGATC CAGCAGGCTT TGGGGTGAGG ACCAAAATT GCCTTTCTAA
14401 CAACTCCCCA GGTGGTGCTG ATGTCTTGGT CCTGGACTGT GCTCTGTGGA CACTGACAGA
14461 GGATACGTGG ATGTGGGGGA AGGGCCCGG AGGACTAGGA TGGGAACTCT GGGGGTGGGG
14521 AAGAGGCCTC TGGGCCTTGT CGCGCTGCAC ACCTCCATG TGTCTCAGT GTCCCATT
14581 CATTCTGTGG TGACTACATT GGGCTGCAAG GGAACCCAA GCTGCAGAAG CTGAAAGGCG
14641 GGGAGGAGGG GCCTGTTCCTG ATGGCAGAGG CCGTGAAGAA GGTCAATCGT GGCAATGGCA
14701 AGGTAAGGGC CTGCAGGCTG AACTCCTCCC GCAGCTAGTG CAGAGCTGTG GGCTGGCATC
14761 TGGAGAGCAG ATGGCAGGCT GTGTTTGCCT CCTGCCAGG GGAGTGGGG CAATTAATCC
14821 TGCCTTTCCCT CACCCTGCC TGTTCCGTCC CTAGACTTCT TCTCGGATTC TCCTCTGAC
14881 CAAGGGCCAT GTGATTCTCA CAGACACCAA GAAGTCCCAG GCCAAAATTG TCATTGGGCT
14941 AGACAATGTG GCTGGGGTGT CAGTCACCAG CCTCAAGGAT GGGCTCTTTA GCTTGCATCT
15001 GAGTGAGGTA TCAGAGCTGG GTGGGGCAAG CCTTGGACTG GAGAAGGTGG TATGCATCCC
15061 AGGGCTGGGG CAGGCTGGAG GTGATGGGGA CCAGACCTTT CGCTCTGGGC CTTTGTGTC
15121 CCTCAGGTGC TCCTGAAGAG AAAAAATGAA TCCCTTCCT GCTATTTTTT CCTCTCCTA
15181 AGATGTCATC GGTGGGCTCC AAGGGGGACT TCCTGCTGGT CAGCGAGCAT GTGATTGAAC
15241 TGCTGACCAA AATGTACCGG GCTGTGCTGG ATGCCACGCA GAGGCAGCTT ACAGTCACCG
15301 TGACTGAGAA GTGAGGCCAT GAACTGGGG TGAGGGGCGG CTTACGGTAG ATGGCCAGGC
15361 TGATGGTCAT CGTGACCAGG ATCAGAAAGC GAAGCATGTA GGGCAGTGCA GGCCGGGCT

```

FIG. 4续

```

15421 TGGAGGTGTT TCTCAGGCC CCACCCAGGT TCTCTGGGGC CTCAAGTCCT CTGACTCGCA
15481 TGATGGGGGG GCCATCATGG AAATGCGGGA GTCGGGGTGA GGGGATGGGC ACTAGACTTG
15541 GTTTTCTGTT CCCTCTCCAG GTTCTCAGTG AGGTTCAAGG AGAACAGTGT GGCTGTCAAG
15601 GTCGTCCAGG GCCCTGCAGG TGGTGACAAC AGCAAGCTAC GCTACAAAAA AAAGGGGAGT
15661 CATTGCTTGG AGGTGACTGT GCAGTGAGGA GGGGGCACCA TGCAGAGATG GCAGTTGCTT
15721 CCTCCTGAAC CAGCACTAAT CCCCTCTGC CCTCCTGTGT GGGAGGATCT CTAACCCCTC
15781 TGATCGTGGC GCATGGCTTG GGGATTAAC TACCCTTGAA GAGGACCCTT GTCCCAAACC
15841 CTTCTTGTTT TCTCCTCAA AAGTAGCTT CTCCAACCCG CAGCCTCTCT GCACACTAAT
15901 AAAACATGTG GCTTGAAAG GTTCAGTCAG GGTGGGTGGG TCCTTGTTCC CCCTATCTTT
15961 TCACCCAGGT GTACTTAGAC CCCTGCCCCC ATGCCCTTTT TCCTCCTCAA GCTCCTTGGA
16021 GCCAGCTAGT GAGGTAATAA GAAAGGAAA GAAGGAAAAT TGTCTCCGGG CTCCTTGACC
16081 GGCTGAGCTC TGGGGGGTG TTTAGAGAGA CTGCGGTGGG TGGAGGGGCT GCGGGGGGAG
16141 TTAAGGATGG GGCTCAGGTC GCAGGTGGCC AGTGGACTGA TTCATTAAGT GTGTCCCTGG
16201 AGGAAAGAAG TGAGCATCCC TGTCTGGCA GAAACTGGGG TCCTTTGGCG ATTTAGCCTG
16261 AAAAGCAGCC CAAGGCTGGA GGGCTTATGT ATGCTGGGGT GCTGGGGAAT GCAGGGTCTC
16321 CTGTACTTGG GAACGCCATC ACCCTTCTA CTCCCACACA CAGCACAGG CTCCACACA
16381 CCAGCCTCCC CGACACCCCC TTCCTTCTCA CACACCCGAG ATGCCAACT GCTGCCAACA
16441 GTTATCTTGC TCGTCTCTGT CCCACAGCTG GGGCCTGCAG CAGGTGGCAC TTCACATCAC
16501 TCACTTGATG AGGCTCCCTC ATCAAGACCC TCCCATCCCT GTAACCTGGC CCTTTCCTCT
16561 CCTTTCCTT TATTTTCCT GCGTCATTGT CATTATCTTT TTCTACCCT CCAACTATC
16621 TCACACCATC TCATTGTCCT TGTTTCTGTG AGCTCTGACT AATATCAATA TGTAATATTT
16681 TGTAATATGC TTTAAATATT TTCCTACTCC CCCTCATATC TATTTTCTCA TAGATTCTGT
16741 CTTGTCTGTC TTGTCTCTAC CTTCTGTCTG GCCTTACCT TTGGGGAACA AGCTGTCTAT
16801 GTAGTCACAG TAAAATTTAG ATCTGTGCTC TGTGAGAGCT TAGCAGGTC TGCTTTGTT
16861 TTTGTCTCTG GCTGTCTCTT CCTCTTCTCA AGATCTCTAC CTTGCCTACC TCTTCCCGCT
16921 TCCTTCCCTT AACTCACTAT GCCTTGGGGC TGGGGTCTCC CTCCACCTGA CTTCCATCTG
16981 CAGGCAGCTC ACGGCCGGCT ATCATGCTGG CCAGGGAGAA CTGATTAAT TCTTTCCTG
17041 CCTGCAGATT AATCTGCTGT CTGAGCACAA GCCACGTGCT TCTGGCACAC CCTGCTTTGA
17101 GCTGAGATAG AACCTGGGGA ATCATCTGTT TTCAGGCGGG TGAGGGGCTA GAGCCTGCCT
17161 TGTTTGGGAG GAGGGTGGCT CTGTTCAGAA TAGGGGTAGC TCAGGCTCTG GCCAGCCTTC
17221 TCCCGCCCC AACAGCTCCC CCCATCCTTG ACTTCTCAGA ATCAGGCCGA GAAGAGCCTA
17281 TCTGGCCGAG AGTGGGGTGG TGACCTGCGC CTCATCGCCC CCGCTCTCCA TCTCATCTCC
17341 TGCTCCAGG GCCCAAATG TCGTCACTTT CCCAGTGAAG TGTCTGGTCA TTTTCAGAAG
17401 CAATTTAGG AGAACATGCA GCTGCCGCTC CCTATCCTGC ATTTCCCTTC ACAGGGCTGA
17461 AGGCACTGTC AGCTCCCTGG GCTGGGGTGG ATGGGAGAGG GGAAGGGCTA GGGCCCTCAC
17521 CCCTGTCCCT ACTGTGCCCA TCATGTAGAT GGACTGGAGT TCAAGGAAGG GCAGGCACTC
17581 CCCTCCTCCT TTACTCTTCT GTCACTCTCT TCCTCCTCTT CTTTCTGTG TCTGCTCTC
17641 TTTTETGGAG CCTAGGAGTG TGTGTTTTCA TCCCCTGAAA CAAATAGGGA CTCAGTTTCC
17701 CCACCTGTGT TACAGGGTTG GAATTGGCTC CATCACTGTG GGAGAAGCTG GAGTTCTGTG

```

FIG. 4续

```

17761 ACCAGTCCTC CCCTCCCCAG CCCTGCCTCT TCTCTCCCAG CCCTCTCCCT TCAGCCAGTT
17821 CAGCGCTCTG AGAGTCTGGG TTGTTTCAGC CTCTGAGGGG CACAAGCCAT CCTGGATTCC
17881 CCTAACCCCA TGAGGAGCCA TTCTAGCATC TCACAGCTTA AACCAGCTCT AGCTCAGTCC
17941 TCCTGGCTTA GTCCATTTTT CTTCCTCAGG CTCTGAGGGC CTCTGTTCCT TTGCTCTGTG
18001 GGGTTTTCTC CAGTTGTCTC CTGGCTGCAG GACATGGCAG GACATAGAAT GCTGTCATCC
18061 TTCCACTCTT CATTGGCATC TCCACCAGT GTCACATATG ACCCTAGCCC TGCTCTCCCC
18121 TTGCCAGTAC CCCTCTGGGA TTTTGCGAGA GTCCACAAGT TGTGCATGTG GTGGATATAT
18181 TCAGGCCATC TTGTGTGTAC AAGCTAGAGG GTCTGCTTCC ACCTCTGGCC CTCAGTGAAT
18241 TGCTGACTAA CCTGTCTCAA CACAGCACAA CTGTACACAC CTTTTCTGG CCTCATCCCT
18301 AACCCATCAT AGCAGCAAAG AGGGGAAGTT GCAGGGGAGG AGCTGCTAAG GACCCTGGAC
18361 TCCAAGTACC CTGCTCCTCT AGGCCAGGGA CATCATCTGA GATGTGGCTC AAATAAAGGG
18421 TGGGTGTTCA AGAAAAACA CTTGGGGACT CTATAGCTGC AACACCCACT TTACATGTCA
18481 TTTCCATATG ATTTGTAGGC AAAATGAAGC CCAGGCTGTC CTAGCCCTCC AATACCTCCC
18541 TCTCTCATCA CCTCTCCAAC ATAGCCTAGC ATTAGCTCTT TCAAGTCTTT GCTAATCCCA
18601 GAGATCAAGG GGTGATCAAC TCTCCCTGCC ATCCCCTTGT TCCCGCACC CCCC GCCCG
18661 GCTCCCCCAC CATCCTTGGC TCCTGCCATC CTCTTTGAGA TGCTGCATCA TCAAAGGACA
18721 TTATTTATGG TGTACCTTTG CTGAAGCCCT GCTTCCCTGG TGCCAGGGCT TGGGAGCAGG
18781 GATGGGTGGG TTGGTGGGGG AGAGGGGTGG ATGCAGAGAT TGGACCCAGG AGGCTTTTAG
18841 TCCTCAGCTC TTGGCTTAAC ACCTCCTCCT CTTACACACC CAACTCCCTC CAGCCTGCCC
18901 AGCTTGGGCC TTCAGCTCCA GATTGGTGGG GTTAGGAGAG GAGGAGGAGG GAGATGGATG
18961 GAACCAATTA GGAACAGCAC CTGGGCTCCT CACAGGAATG AACCAGTCAT GCCATTTGCA
19021 TGTAACAGC TTCCCACTTC TCTCCTCATC CTACCAAATG CTCCCAACCC TGGGTTCTGG
19081 CCCATGTTCT TTGCCACAC AGCCCTGTA TTAGCTGGGT AATGAGAAGC TTTTAATGAG
19141 TCCCATTAGC ATCTCGTGTA ATAAAGAGC CTTGAGACCC AGCTGCTGTC CTCATTTGG
19201 GATGAACACG GGTCCCTGTG TAGCCAGTGA CTTCTGTCAG TACAGTCTAA GTTCTCGGAT
19261 GGGGTGGGAG ACAAACATTT CAGGACCCCA GCAGCACTTG AGAGGTTCCA TGGTGGATCC
19321 ATGTTTTTGA CTGTGATACA AGAAACTTGG CTCTGGCTTC CTTGTTTATT TTGTAATAA
19381 CATTTTTTCT TCTTTTAAGA GACAGAGTCT TACTTTGTTG CCCAGGCTGG AGTGTAGCAA
19441 TGCAATTATA GCTCACTGCA GCCTCAACCT CCTGGGCTCA AGTGATCCTC CTGCCTCAGC
19501 CTCTGGGATA GCTGGGGCCA CAGGCATGCA CCACCATGCC TGGCTAATTT TTAATAATGT
19561 TTTTGTAGAG ATGGGGTCTT ACTTGCTATG TTGCTCAGAC TGGTCTCGAA CTTCTGGCTT
19621 CAAGCAATTC TCCCACCTCG CCCTCCTAAA GTGCTGGGAG TATGGGCATG AGCCACCATG
19681 TCCAGCCTTG TAAATACATT TTTATTGAGC ACCTATTATA TGTCAAACAT TATAAAGTGA
19741 GGGATACAGT AGCAAACAAA ACAGACAAAA ATTTTTGCCA TCATGACACT TATATTCCTG
19801 GGTGGGAGTG GTGATAGAAA GACAATAAGT AAAATACTTA GCATAGTGGA TGTAAATAAGT
19861 TCATGAAGGG AAAAATGGGA GTGAGGTATA TGGAATTTTG GGGTGGTGAT AATTTTAAAT
19921 AGGGTGATTG GGGAAATGCTT TGTGCACAG ATTTGTTTTG TAGTAAATAT GAGATAAAGA
19981 TACGGTTCTC TCCCAAATC AAAATGTAGA AGAGTAGAAG GTCCCAAATC TTCAAGTCTC

```

FIG. 4续

20041 TTGGAGAGGG GGGCCACCCA TTCCGTCTGG GACAGTTAAC TGTTCCTCA CAGGTCAAAG  
 20101 TTTATGCCAG TGCAGTAAAA AGAGTGGGAG ACCTGGGGTG AGACAAACCT GGATTTGAGG  
 20161 CTGTTCTTCA CTGATTAGTA GCCATATGTA CTGGAGCAAG TGACTGAACC TTCTGAGCCT  
 20221 GTTTTCTCAT CTGGAAAATC AGAATATTTT CTAATTACAT GGTCATGGTG ATGAAAACCA  
 20281 GATGGACTGC TCCATGCCAA AGCACCCTGC AAACATTCAA ACCCTGCACC CATTACAAAT  
 20341 ACTGGGCTGA CGGATGGCTC TGGCTTTGCT TTTGCATCTC CGCTGTCTCA TTCAGCAGCA  
 20401 GCATCTGGCT CTGGCTCTCG GCTCTGATCC TGGTTCTGAC TCTCCCCTGG AGCTCTCTCC  
 20461 CTTGGGTGAG AAATAAGCAG ATAATCTCCC TCATCTGTGT GTGGTGTGAA CAAGAGGGTT  
 20521 GAAAGGTCAG AGAAGAAGAT GCCTGAAGT CAGGGAGACA GATTAGAGTG GGGAAAATGT  
 20581 AACTCTGAGG AAAAAGGGAA GCAATTAAGA GATCAAGGCC AGGGGCAGTG GCTCATGCCT  
 20641 GTAATCCCA CACTTTGGGA GGCTGAGGCG GGCAGACCAT GAGGTCAGGA GTTCGAGACC  
 20701 AGTCTGGCCA ACATAGTGAA ACCCCGTCTC TACTAAAAAT ACAAAAAAT TAGCCAGGTA  
 20761 TSGTGGTGTG CACCTGTAAT CCCAGCTACT TGGGAGGCTG AGGCAGAAGA ATTGCATGAA  
 20821 CCCGGGAGGC AGAGGTTGCG GTGAGCCGAG ATTGAACCAT TGCACTCCAA CCTGGGCAAC  
 20881 AGTGTGAGAC TCTGTCTCCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AATCAAGGCC GGGGAGGGGG  
 20941 CAGGGGTGGC ACAGCTATCG AGTTCGTGTC ATCCTCTGTG AGATTACATC AGGAGGTGTA  
 21001 AAAGAACTCT AGAAGAATGA AGCTAAGTCC AGCTGATTCA GGGTTCAAGA AGGATTGAGG  
 21061 TGGGAGAGGC ATCATGACCA CTGGTGAGGA GTGGAGGAAG GCCGACACTG GAGCTTTCTT  
 21121 TGCCAAGCA GAGGAGGGGT GTGACACTCT TGAGGACCAA TGTAATGGCG CAGCTCCCTC  
 21181 TGGGAGGGGG AAAGGAGAGG ACTGGAGGGG ATGCTAAACT GACCTTCTAA CCTTCAGGGG  
 21241 CCTGAGTCTG GTTGTCTCTG GTGGGGAGGG GCGCCTGCCT GAACTGTTT TAGCCCAGAA  
 21301 GTCAGGCCTG AAGGTTAAAG GGCAAGGAGC TGGTGGATGA ACAAGGTGGG GAAAGAGGCC  
 21361 CAGGGTCCAC ATCTACTGAG CTGGACTCAG GCATGGGAAT TGGTGTGTG AGGGCCAAGA  
 21421 CACTTGGCCT CCTAAAAGTT TGCTGAAAAT CACTGACATG AGAGTAATTG ATTTATAGGA  
 21481 GAAAAGGTAG ATAAATTTAT TTAATATGTA TATATGAGCA CCTTTAGAAAT GAAGACCCAA  
 21541 AGATATAGGG GAAATTGCCA GTTATTTATT TATTTTTTTT GGAGATGGAG TCTCACTGTG  
 21601 TCTGCCAGGC TAGAGTGCAG TGGCAATGAT CTCGGCTCAC TGCAACCTCC GCCTGCTGGG  
 21661 TTCAAGCAAT TCTCCTGCCT CATCCTCCTG AGCAGCTGTG ACTACAGGCA CGCACCACCA  
 21721 TGCCCGGCTA ATTTTTTTGTA TTTTTTAGTA GAGACAGGGT TTCACCATGC TGGCCAGGCT  
 21781 GGTCTGGAAC TCCTGACCTT GTGATCCGCC CGCCTTGGCC TCCAGAGTG CTGGGATTAT  
 21841 AGGCGTGAGC CACCGCCCCC AGCCTGAAAT CGCCAATTTT ATGTTTATGT TTTACAAAGT  
 21901 ATGGACAGCT GTGTAGAAAT ATGACTGGAC AGAAGGGCAT GCTCTAATGT TAACAGACTG  
 21961 AGTGGGAAAA CCCAGGAAGG CCTGTGAGA TTCCTCCTGG CCTCTCAT TCCTTCCTC  
 22021 TGGGTATGGG GCAGGACCCT CTCTGGAATG GGGAGATCTT AGGACCTAAG TTAATAAAGG  
 22081 TAGGTCAGAT AATTTTTTAT GGCCAGTTTT TACATACAGT AATTTTAGGT TTTATGGCTG  
 22141 GCTTTGGGGA AAAGAGGTCC TGGTTTTTAT AGCTGGCCTT GGGGGAGAAAT GGGACCCAGC  
 22201 AACAGGAGGA CAGGAGAGGG TCAGAGAAAA ACTTCTGCTT CTGAGGCTGC TACTGAGGCC  
 22261 TTCATTTTAG GGTATTGTCT TCTGAGCCCC AGCATTCCTC GGTGTGAAAA ATTTTAAAGA  
 22321 AATTTTATAG TCCAGAAATT GAGTTGGTGA ATTGTCTTAT AAGCCATGGA ACTAGTCTCT

FIG. 4续

```

22381 TAGTCCTGAG AATAGGCCAG TCTAGTTAAA TAGTTATTAG TTGTGTCTAA TTTTAGGCAG
22441 TGTGTTGCAG ATGGGCTTCC ACCAAAGCCA GGCCTCTATA TGATATGAGT AATCAGTTAT
22501 TTAGTAAGAG GCATTTTGT CTCAAAAAAT AAATAAATAA AAATATATGA ATAAATGAAT
22561 GTATGTTTCT TATCAGACTA CGTCTGTTCT ATCATTAAATT CCAGAAGGGA GGAGGGTCTG
22621 GTTCCCCCTT CCCATCATGG CCTGACCTAG TTTTCAGGTT AATTTTAGAA CACCCTTGGC
22681 TGTGAGGAGT GGTCATTTCG GATGGTTAGG GAGCTTTAGG ATTTTACTTT TGGTTTACAA
22741 AGTAATGTGA ATTAAACAGA CATTGAGTT AAAGTTTTTA TTTTTAATA AAATATTTGA
22801 TTTAAGCATT TTTTAACTG AATTAATTAG AGCTCTTTTA TATATTTTGA TAATGGAACA
22861 TTACATACAC AGGCACATAT AAATATATAG ACACATAAAC AGAAGTAGAG CTTATAGATT
22921 TATACTTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTAA TGAGACAGGT TCTCCTTCTG TCATCTAGGC
22981 TGGAGTGCAG TGGTGCCATC ACAGCTCACT GCAGCCTTGA CCTCCAAGGC TCAAGCAATC
23041 CTTCTACCTG ACTGGCTAGC TGGGACTACA GCGCGTGCC ACCATGCCTG GCTAATTCGT
23101 GTATTTTTTG TAGATATGGG GAGTTTTACC ATCTTGCCCA GGCTGGTCTT GAACCTCTGG
23161 GCTCAAGAAA TTTTCTAAC TTGACCTCCC AAAGTGTTGG AATTACAGGC ATGAGGCACT
23221 ACGCCAGACC AGATTTTTTA TTTGTGAGTT TCTAGGTAGT TTTCCCCAAC TTCAGACTAT
23281 CAATTTTTTAA ATTATCTGTT TTATGTCTTA ATTATTAAC AGGCAACTCT AAACCTGTAT
23341 CTCTAAGACA TGACTTTTAG ATGAAATAAG GTAGAAAATG TATATTTCAA AGGCATAGAA
23401 TTTAGATCTA AATAAAGGTA AAGTTATCTA AATTTAAGC CATTGTCTTT TCTATTCTAA
23461 AAGGTTTTGG AGGTTTGGGT GTAGAGAGGG AGATGCCTTT ACAAATGGAA TTTTGTGTGT
23521 TGTTTTTGTT TTGAGACGGA GTCTTGCTCT GTCACCCAGA GTCTCGCTCT GTCGCCCAGG
23581 CTGGAGTGCA GTGGCACGAT CTCCGCTCAC TGCAACCTCT GCCTCCCGG TCAAGTGTAT
23641 TCTCCCACCT CAACCTCCTG AGTAGTGGG ATTACAGCTG TGTGCCACCA CGCCAGCTA
23701 ATTTTTGTAT TTTTAGTAGA GACCGAGTT CACCATGCTG GCCAGGCTGA TCTCGAACTC
23761 CCAACCTCAG GTGATCCGCT CGCCTTGGCC TCCCAAAGTG CTGGGATAAC AGGCATGAGC
23821 CACTGCACCT GGCCTTTTCT GAGTTTTTTA AGGAGTCTGA GTCATTAGAA GTCTTTTCTA
23881 GATTTTTTAA AAATGTGGTA TTGAAGATGG CAAAGAGGAA GGAGGAATAG GGTGGAGTAA
23941 AAGTAAATGG GAGGATAGTT TTTAAGAAAG GAAGTGAATA GAGACATCAA ACACATTTTA
24001 AAAAAAAGAT TTTAGTCTAC TGAACAAAAT TTTTAAAAT AGGATTTAAA GAGAAAACAC
24061 AGAAGGCTTT AAAAATATAC ACATAGCTTG AATATTAGCT TTTAATTAAG CTGACTCTTA
24121 ACCATGGAGC TCTTTAACAA AAATCTTTT AAATTTGTCT CTCTCCTCCT TTAAAACCTT
24181 TTGTAGAGAT GGGGTTTCGC CCTGTTACCC AGGCTGGTCT CAAGTCCGGG CAACTTCTGG
24241 GCTAAAGTGA TCTGCCTGTC TCGGCCTCCC AAGTGATAGG ATTACAGGTG TGAGCCACTG
24301 CGACTCACCT TAAATCTCTT GTTACCAGAT TTTAGTTGGG ACAAATGCTG ATATTTTAAA
24361 AGTCACATAA ATATTAAGCC GAAAAGGACT GATTTCTGAT TAGGAAGGAA ACCCTAAGCC
24421 ACGGTGGGAA TTTTAATTAT TAAACTGTAA AATGGAGCAG CCTCCATTGT TAATTTTGTG
24481 TGGAATCCAA AGTGGCAGTT TGAGTGTAAT TGTTTAGGT CAGGTTTTTG TGCTTTAATT
24541 TAATCAAGAC AATTGTTAAG GATAGCTGTG AACTATTAT GTGCCTTTT AATTTGATCT
24601 ATCAATTCTT TAGAACAAGT AATTTTTTTA AATTTAGGAA TTTTAGTCTA AAGGATTTAT

```

FIG. 4续

```

24661 CTTTTGGCCA TTGACAATTA GAATTTTTTAA TGGGGTATTT AATTCCAATA GCAACTTAAT
24721 CCAAAGTTTT CTTTATGTCA AAGAAAACAG AAGCCCAGGA GGGATGAGAC CTTGTAAGAC
24781 AAAACTCCCC TAGGAGCTTG GAATGTTTGA AAATACATGT GTTGGGCTCC CAATCTTTTC
24841 ATACTGGCTG TGATGTTACC TGAAAAATCA CATCCTTTGG ATGGTGGAGA CCAAGCGGGA
24901 ATATCCCCAT CTAGTCACGT CATGCTCTCA AGGACATGAG ACAAGAGGGA AACCTCTCAC
24961 CCTGTTTTTA TTTCAGGGAC TGGCAGCAA GTTTGTCATA ACAGAAGTCA GCATAACCAG
25021 AACCACGAAA CTGACCAGTT TGCAGGGCCA GTTCAAACAG TGGGTGTCAG GCCTGTTCTA
25081 CCCTAGGGTA CCCCTCCTTA TGACAGAACA CAAAAGACA AGACAAAAC GAAGGAAAAC
25141 GGCAACAACA AAAAAGCTAT TTCTGAAAGG AAAATGGCAA CAACAACAAC AAAAGCTATT
25201 TCTGAAGGGA ATGGGGTCAA ACTATGAATA CTTATAACCAC AAAGTACTAA AAAATATATC
25261 AGACTACTA TACCAAGGTT AGTCACACAC AAAACCTGTT CTCTCATTA TCTTACATTT
25321 GGAAAGGAAA AGGGAACAA TGATTTTTT TGTCCACTCA TCCAGAGTCC ACAGAGAGAG
25381 GAAAAGTGA AACTGGGAG TCTGGCAGGA AATTCTCACT CCTCTGCTGG CTTGCCAGGT
25441 TCCTGTATTT CCTTCTCTGT GGCTTCCAGA AAAGCACAAT AGCTTTGGTG GTCTTATTTG
25501 TGATGCCAAA CTGTGGTCTT GGCCCCCTAA AGTTTCAGTG AAAATCACTG ACATGAAGCA
25561 GATTAATAGG GAAAAGGCA TACAAATTA TAAATACGA ATGGGAGCCT TTAGAATGAA
25621 GCCTTGAAGC TATAGGGGAA ATTGCTCTATT TTTATGTTTA GGTTTAACAA AGTATGGACA
25681 GCTGTGTAGA AATATGACTG GACAGAAAGG GCACGATCTA ATGTTAACAG ACTGAGTGGG
25741 GAAACCCAGC AAGGCCTGTC TGTTGAGATT CCTCCTAGCC TCTCTCATTC CTTCTTCTG
25801 GTGTGGGCA GGACCTCTC TGGAATGGG GTTTTATGAC CTAAGTCAA TAACGTAGGT
25861 CAGATTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GAGCTGGAGT CTCTCTGTCA ACAGGCTGGA
25921 GTGCAGTGGC GTGACCTTGG CTCACTGAAA CCTCCGCCCC CTGGGTCAA GCCATTCTCC
25981 TGCCTTAGCC TCCTGAGTAG CTGGGATTAC AGGGGTGTGC CACCACGCC AGCTAATTTT
26041 TGTATTTTTA GTACAGACAG GGTTTCACCT TGTTGGTCAG GCTGGTCTCA AATTCCTGAC
26101 CTTGTGATCC ACCTGCCTCG GCCTCCCAA GTGCTAGGAT TACAGGCGTG AGCCACTGTG
26161 CCCGGCCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GGAAGTTGTA TTTTGGCTT TTTAACTAGC
26221 TTGTTTTTTA ATTAGATTAT TGCCTTTAGG GTGGAGCCCT TTAATAAAA GGGGGAAGAA
26281 AACATAGGTT TTAGGGCCTC ATATTTAAAT GGGTAAAGCA GGCATAGCTG GAAGGCAGAA
26341 TACAGAACCC CCCTAATCAA GGATCTCATT TTTATATTGA ATCCTAGGCC CCCCAAAAGA
26401 GGGAAATGTC ATGGGACGAG ATGTGTGGCA TTTTATCGA GTGCCCACT GTAAAGATGC
26461 TCCCCAAGG CTGGCAGGCA GCCCAGTGCC GATTAGCCCA CTCTGTGCTT AGTCTTTTTT
26521 TTTTTTTTTT TTTTGAGGTG GAGTCTTGCT CTGTTGCCA GGCTGGAGTG CAATGGCGTG
26581 ATCTCGGCTC AATGCAATCT CTGTCTCGTG GGTTCAGCG ATTCTCCTGC CTCAGCCTCC
26641 CAAGTAGCTG AGATTACAGG CACCAGCCAC TATGCTCAGC TAATTTTTTG TATTTTTAGT
26701 AGAGATGGGG TTTCAACATG TTGGCCAGGC TGGTCTCGAA CTTCTGACCC CAAGTGATCC
26761 GCCCGCCTCG GCCTCCCAA GTGCTGGGAT TACAGGCGTG AGCCACCATG CCTGGCGTGC
26821 TTAGCCTATT TTTAATGGGA GTTTCATCCT CAATGGTGAG TGCTTTCATT GTCTTTAGGT
26881 GCCCAGACC ATGTTTTTAA AAATTTAAAT GCACGAAGAA ATAAGTAGCC CTGTATAGTA
26941 GTAATACTTT GTTGTGAATA ACTGTCATAA GTCATCTCTA AAAGTGTATT TTTTATCTAG

```

FIG. 4续

```

27001 TTATTATATA TGACTAGCTA TATGTCTAGT TTTTTAAATA ATACAAAGTA ATTTATTTTT
27061 GGCATCCTCA AAAACCAAAG AGATTAGGTA ATGTAGTGTA GAAGAGAGCA GAGCTTTAGA
27121 CCTGAGAAGA ATCTGCCCAT GACTCGTGAA ACTCCACAAC GAAAGTAGGA GACCCAAAAA
27181 AAGGGGTGAG TGTCATCTTT TCTGAATTTT TTTTTTTTTT TAGATGGAGT CTTGCTCTGC
27241 CACCAGGCTG GAGTGCAGTG GTGCAATCTC GGCTCAGCCT CCCGAGTAGC TAGGATTACA
27301 GGCACGCGCC ACCATGACCA GCTAATTTTT GTATTTTTAG TAGAGACAGC GTTTCACCAT
27361 GTTGGCCAGG ATGGTCTCGG TCTCTTGACC TCGTGATCCG CCCGCCTCGG CCTCCCAAAG
27421 TGCTGGGATT ACAAGCGTGA GCCACTGCAC TCGGCCGGTC AGATAATTTT TTTGGCCAGT
27481 TTTTACATAG AGTAATTTTA GGTTTATGG CTGGCTTTGG GGCAAAGGGG TCTGGTTTTT
27541 TATAGCTGGT CTTGGGGGAG AATGGAACCG AGTGACAAGA GGACAAGAGA GGGTCAGAGA
27601 AAAACTTCTG CTTCTGAGGC GGCTATTGAG GCCTTCATT TGGAGTATTG TCCTCTAAGC
27661 CCCAGCAGTG TCAAACGTGA CACAAACCAT ACACAGCAGC CAGCTCGGGT GCTGTTAGGA
27721 AATGCTCTCA CTGCTGGGTC TGTGGGTAT GTGTGTGTCT GGGTGTGTGG CTTACTGTCTG
27781 CATCTCCTC CCCCCTACAG CCTCCCAGC TCCCCTCCAG CCACCCTGGG ATTGGTGACT
27841 CTCAGCCCT CCCCTCAGCT CCCCTAGACC CTCCCAGAGC CTTTATCAGG GAGCTGGGAC
27901 TGAGTGACTG CAGCCTTCCT AGATCCCCTC CACTCGGTTT CTCTCTTTG AGGAGCACCG
27961 GCAGCACCAG TGTGTGAGGG GAGCAGGCAG CGGTCCTAGC CAGTTCCTTG ATCCTGCCAG
28021 ACCACCCAGC CCCCAGCACA GAGCTGCTCC ACAGGTAGGC AAGTGGGAGA ATGCTGGATG
28081 GACCAGAGCT GGCACCAGGG GACAGGAGCC AGCGTCAGGA GGAATAAAG CAGATGGCAG
28141 CCTCTGATAG GGGAGCAGGG GACTGGGAAG GTGAGCACAA AGCACCTGTA GGGCCGAGAG
28201 CTGGTTGGTG TTTGGAGCCT GTGGCTACAG ACTCATTCTT TCATACCAGA AAGTTTTTGC
28261 CTAAGTCTTG GGATTATCTA GTACTGAAA ATAGCATCCA GGATCCCCTC TCCAGCTGAC
28321 TGAGGAAACA GACCAGTCCA TGTCCTACAA ATCTATCATC TTTCTGGGA GCTAGAGTCC
28381 TCCTGGCACC ACTATAGCAT TGCACATCTC CTGGGGAGAT ATCTGATGGG GTAGCAGGGA
28441 AACTAAGCCC AAGGGCTGTA CCCCCTTCTC AGAAATACTT TCCACCCTCT CTCCAGACCA
28501 GGGCTTGAC AGTGGAGTTG GGGGCTGGG AAGCAGGGTC AAGCCAAGCT GCTGGTAATG
28561 AATGTCTCTT GTGTCTTAC CCATGCTGTA TCTTCTCTT CTCTCTTTA CCTGAGTCTT
28621 GTCCCTTTGC TCTCCAGGC ACCATGAGGA TCATGCTGCT ATTACAGCC ATCCTGGCCT
28681 TCAGCCTAGC TCAGAGCTTT GGGGCTGTCT GTAAGGAGCC ACAGGAGGAG GTGGTTCCTG
28741 GCGGGGCGG CAGCAAGGTA AGTCTCCCT GGCAGAGTAC TGGGGACATC ACGGGAActT
28801 GGGACTCTGC CTGTCTGGAC AGCTGTAGTG AGGAAACTGG GGTGGGGGGG TTGTCCGTCA
28861 GAGGGCATT TGCCTCCCTT TGGATTCTT TGTTTCTCTG GTCCTTTCAT GTTCCCCTG
28921 TCTCCAGGTG TGTTTGTGTC TCTGTATCTC TGCATGTCTT TGACACCTG TACATAAAAG
28981 GTCCCTACA AATATGTTGT TTGGTGGGTT GATTGATGGG AACTTGGTG ATTGGATGGT
29041 ACTGTGAGGG GTGAGTAGG GTGGTCTAAG GCTCTCTATA GTCTACCTCA GGTCCCTTTG
29101 CAAGGGACAG ATCTCTTCTA TTTCTGGAT GGTATGAAAC AGTCAGAATT TCTTTCCCAA
29161 ATGGTTATTT GTGTGCTATT TTACCTATCA GTTATGTGTA TTGTTTTATT TTCAAATGC
29221 AAATAAATTC CTTATCTTT TGCTCATCCA CCCCAGTAA CCTCAGGTG CTCTAAGATC

```

FIG. 4续

29281 CCAACCCCTT CTTCTTCTC TTTCTCCCT TGCCCGCCTC TATCCTCTGC TTAGTCAGGA  
 29341 TAGGAAAACA ACAACAGCAA AAAAACCAGA TTGAGCCTCG ATTTCCACAG TTCCTTTACG  
 29401 AAAAAAATA GGAATTGTCA GGGTAGGGT ACAGGGGGAG GATAGGGAGG AAGTCTTTTC  
 29461 AAGTTTTGA AATGACAGCA ATTACATCGG TACAAATGCT TTTAAGATGA TTGCGGGTGG  
 29521 GACTTATTAC AAATTCAATG TGTGAAGTTT AACTGCCTCT TCAGCTCAA TCTGTTTCAGC  
 29581 ATCTCATTAT AGGAGGTGGG CAGAGTATTC AACAATTTGG GAAAAGTGGC TGCCTGAACA  
 29641 CCACATGCTG GGCCAAGGGA GTTATCACCA GGGCAGCCTT GCAGGTGGCA GCAGTTGTGC  
 29701 CATATCCAAA AGGCCAGAAC CGTTAAAAA AAAAACACCC AGGGGAGTGC CAAGTATGGG  
 29761 CTGGACACCG TTTGGAGCCA CAAAGTCCA GCCCAGGATA GTTAGAGTAT CTGAGTCTTT  
 29821 CTGAGACAAA CTTGTTTCAA GACCTTGGCC AATGAGATGT CCCCTCTGCC CCTCTGGTC  
 29881 AATGAATGAG AGGGATTGCC ATCCTACCCC TTCTCCTTGA GAGTCTGTGA GGATGAGGGA  
 29941 AATTGGGGCA GGAAGAGGGT AGTACATAGG TGTGCCTAGG CAACTGGGTT GGTATGTGTG  
 30001 GGGGTGTGTT CTGTGTAAAT GCACTTCTGT GTGTGCACAA CAGCCGAAGG ATGCTGGGT  
 30061 TCTGAAAGA GAGGCGCTGC TGAGACTTGA GATTTGAGAT GAAAATCTCC AGCCATGATC  
 30121 ATGTATTATTG TCTCTCTGCA GCTGCAATTA ACTGGCTGTG TGGTGTGTGC CCACCACCT  
 30181 GCTGTACGCA AGTTGCTAAA AAAAAAAAAA AAATCACAGG GACAATCAAG AGCCCGTGCT  
 30241 GGGCAACAGT TCTAGAACTT GGGATTCAGT TGTGGAGAGA AGAAGACGTG CCTTCTGAGC  
 30301 ATGTTGCCTT CCTGGAATTC TAGACCTAGG GCCAAAAGGG AGAGGGAGAG AAACTAGAG  
 30361 CCGGAAAAGCC ATGGAGAATA GAGAAAGAGG TGGTGGAAAA CAGGGAGAGA AACATCCATG  
 30421 GACATCGTGC AGAGTGGGGG AATCACAGGT GCAGATGTGT GCCTCCAATC TCACCATGCA  
 30481 TGTGAATCAC CTGGGGGGCT GCTTAAATG CAGATTCTGT CTCAGGAGGT CTGGGGTAGG  
 30541 AACAGAGTC TGCATTTCTA ACAGGCTCTG TGTAGTGCTG GTGTTGCTGT TGGTCCACAG  
 30601 GTCACCTCTG GAGCACCTAC TTCTCGTCCA GTGTGAACCA GAGGAAACTC TGAAGAAT  
 30661 AGGGTGTCCG ATTCAGGATG GGCTCAGGAA GAGGCTGTTT CTTGTGGGAA AAGGATGAGT  
 30721 GGATCCGGGT GGGAGCCTCC TGCCTCACCC CTCTTTGTTT CTTCCCTAGA GGGATCCAGA  
 30781 TCTCTACCAG CTGCTCCAGA GACTCTCAA AAGCCACTCA TCTCTGGAGG GATTGCTCAA  
 30841 AGCCCTGAGC CAGGCTAGCA CAGGTAGGAG GCGGCCCTAG GGGAGAGGGG AATGAGGGGC  
 30901 AGGATTCTGA AGATAAGAGG CCTGGGAGAT CCTTTCAGAT GGGAGAGAGA TGGGGGATAG  
 30961 CTTAGTGAAT CGGTGAGGGT TGTGATCTGA ACCCCGCTCT CATCACTTTC CAACTTCACT  
 31021 CCCATTTAG ACATCTGTTC TTGGTTTCAC AGATCCTAAG GAATCAACAT CTCCCGAGAA  
 31081 ACCTAAGTAC CCTCTTCTCC CTCCCTATCT CTTGCCACTT GCCCAGAGCT CTGTGGGGCA  
 31141 TTGGCCCCAG GGGCCATTTT GTCCAGCCCC TTCTCACCTG GTACAAAACA TATGCCAGCT  
 31201 CCCACTGCTC AGCCAACCTT TCCTGAAAGG GAGAGGCCAT CCAGAAGTAG GAGGAAGCTG  
 31261 GTGTGAGGGG CATGGTGGGC TCTCCCTCTG CTGGCTGGTC CTTGGAAAAC AAGGGGATCT  
 31321 CTTCTGGGCC CTGAAAATTC CAAATCAGGC ACCTGCTAGA GCAGAAAATT CTTGAAATGT  
 31381 GGAGGAAGGA AAGGTGAGCA GAGAGAGTGG GTTTAGGGGA GGCACCTGCT AACTGTGAGG  
 31441 AGTCATGCTT TGACAAGAAA AAGGAACAGA GACCAGAAAC CCAGTCTCAG AAGTGTGAC  
 31501 CCATGCTGCTG GGAGATGCTT CACTTTCTCA TCATCACTGC TGACAATGTT GGCCCTTTTC  
 31561 TGCAGGTGAC ATGCATGACT TCTTTGTGGG ACTTATGGGC AAGAGGAGCG TCCAGCCAGG

FIG. 4续

```

31621 TAGGAGTGTG TGGAGGTACA GTGGAAGGGC TTAGGGTACT GGCAGAGTAT GACAGAAGTC
31681 ACGTGCCTCA TATTTGTCAC CAGAGGGAAA GACAGGACCT TTCTACCTT CAGTGAGGGT
31741 TCCTCGGCCC CTTCATCCCA ATCAGCTTGG ATCCACAGGA AAGTCTTCCC TGGGAACAGA
31801 GGAGCAGAGA CCTTTATAAG GTAGTCCTGT TGCAGCTGGG AGGAAGGATA GGGAGACTCT
31861 GCTTCCACCC CAGTCTCCCA ACTCTGTCTT TGAACACTGC CCGTCATAGC CAGCCCTTTG
31921 CTGTTGGATC AGGGTGTAGT TCACATTGAG AAAGATCCCT CTTACTTACA CTGTTCCGTT
31981 TACCCTAGAC TCTCCTACGG ATGTGAATCA AGAGAACGTC CCCAGCTTTG GCATCCTCAA
32041 GTATCCCCCG AGAGCAGAAT AGGGTAAGGA TTGTTCATT GAGAGGGGAG AGGGGACTGG
32101 GGAGGGGGCT GTGGGGGTTG CCAGCTGTGC ATTTCTCCTCC ATGCTACAGG TATTAAGCT
32161 CATAGATTTG CCCTGAAATA CACTGCCAAT GCCCAGCACA CTGTCGGCCA AACACAAAGA
32221 CACTTAGAGG CACGTGTGTT TGTACACATC CCCCCTCTTT CATCTCTTTC CTCTGGATCA
32281 TGGACGGCAG CTGACTATTG AGCAGGAGTG AGTGTGGGA GATGAGGAGA GAGGGGCTTC
32341 CCGATGGGCA ATTTCTGTTG TTTGGACTTC ATTTCTTTGT AATCTATGCA AAAAGATGGA
32401 GAAATTATTA TCTGATAATT ACAAATACCA CAACCAATTC ACAGGCAAGC ATTTGCCTCC
32461 CAGGCAGGCT GAGCCTTCA AATCACTCA AATCCTGGGT TACGGGGCCC AGAAGGTAGT
32521 CATAACAAG GATGATTCAG GAAGAAATGC AAGGAACTCT GAAATCTAAT GGGGATTAGC
32581 AGGAAACCAT ATCTGAATCT CTCTTTAGCA TAATGAATAA GAACAATGGC CTGAATGTGA
32641 ATCCTGGATC TGCCACTCTA TCTGTATCTT TTTGGCCAAG GTACATATCC TCCTGTGCTT
32701 CAGTTTCCTC ATCTGAAAAA TGAAAGTGAT AATAGTATCT CACAGGGTTG TGGTTTTGAG
32761 GATTGAGTAT AGGTAAAGTG TTCAGAACAG TGCCGGGTGC ACAGTGCTGT GTGCCAATTT
32821 TATGATAATT GTCCCAGTTT GGGAGGTATG GGGGATGTCC TAATGTTTCC CCTGACTGGC
32881 TCTGTCTGGA CCCCAGGCCT GAGTGGGCTG ACAAATTCCT CACTTGGTAT GCGAGTGTAA
32941 GAGTCCCCCA GGGAAAGTGC TAGTCAAAAC ACGAACCTTC CGCCTTGACA CTGTCTTCCC
33001 ACACACAGCA AGAGCAGCTC CACCAATGGC TTTCTTTTCA CTAGCTTCCA AAGAATTGGG
33061 GTGGAGGGAG TGAAAAGGAG AGGGAGAGAG ATTGGGAAGG CTCGTAATCA TGGAGAGCCT
33121 CCTGCTTTTC TCTCTGTGTC CCTGTTACCC ATACTCACTG GTCTCAAGGT GGCACGCCCA
33181 AGACCCAAGG AGCTGGTGCT TGATGATGCT GCCTGTGCAT GAATTCCTGG GACCAGAGAC
33241 TGAGTCTGGC CCCCATTTA GTGTTGGGTG AGAGGCACA AAGAGCTATA ATAAGTGTAA
33301 CTTGCTGATT ACATGGTAGT TACTGTATCA TTTTGCTCTC ATTAGATGGT TATTTAGTC
33361 CTGCCGACGG CCAGATAATT ATACGAGCAG CTATATCTGG ATGACATACT CTGCTCCAGC
33421 GTTATGCACT JGCCATAAAG ATAATTACAG TGCAATTTTG CTATAGTATT TTATACAAAT
33481 GGCAAAAACA AGTGCATTGT GGAATCTAC TTTAATGCT TGTTTGTGCA TCCAGGCTCT
33541 TTCAGAGGGA CCCATAATTG CAGCTTTCAT AATCTTACCA TTGAGGGAGC ATTCCCAACC
33601 TGTTAGGTGT CAGGCAGAAT AGGACATAAG GTTTCGGGA GCTGGCATT TAAAGATTAGA
33661 TGAGATGGAT CAACACAGAT CATTGTGTCA TCTGATTTCA TTCATGTGAA ACTGTAAGTA
33721 ATCCCTGGGC CTGTGCTTCC TCTGGGAGGT TTCTGGGAAG AGGAGGAACT GGATAAGGCA
33781 GGGGGAGCAT TCATAGTAGG GCACCTTGGG CAGGGCTGTG TGTGTGTCTG GCTCATGGTG
33841 GTGCTAGGAT GGCATGAACT TGGTTCCTAC ATCTTTGGTC CACATGGGCC CCACTGGCCA

```

FIG. 4续

33901 TGCACACAGG TGTGTAGAGT AATGTAAATA TGGCAGCTGG GAAGGTGCAA GTACCTGCGG  
33961 CTAGGAGAGT TCCATCCTCA GGCCCAAAGC CTGGAGGGCA GGCTGAGGGT CAAGACTTGT  
34021 TCTTCCTCT CTCACAGACG CCTCTCCCCT TCTCTCCTGC TGCCACAGCA GGTTCAGT  
34081 GGGACTTTT TACAGGATAT AAGATGTGAT TTCAGTGTT TTTTGTGTT TGTTCGTTT  
34141 TTTGTCTCA GTACTCCACT TCCGGACTCC TGGACTGCAT TAGGAAGACC TCTTCCCTG  
34201 TCCCAATCCC CAGGTGCGCA CGCTCCTGTT ACCCTTTCTC TTCCCTGTTT TTGTAACATT  
34261 CTTGTGCTTT GACTCCTTCT CCATCTTTC TACCTGACCC TGGTGTGGAA ACTGCATAGT  
34321 GAATATCCC AACCCCAATG GGCATTGACT GTAGAATACC CTAGAGTTCC TGTAGTGTC  
34381 TACATAAAA ATATAATGTC TCTCTTATT CCTCAACAAT AAAGGATTTT TGCATATGAA  
34441 TGATGTGGTG TGTGTGTTA CTTGTTGGT TGGTGGGTT TTCTGTTCT TGACTCCTCC  
34501 AGCTACATGG TAAATACACA CATACTTATG ATACACACAC TTCATATTTA AATGTAAATA  
34561 ACTTTACATA TCTTTTTGTA TATATCTATT TCCTGAACAG TGCCCTACAC AGTGCCTTGC  
34621 ACGATGAGTA TCAGATTTAT TTAGTGATTA AAATAAATAC ACGAATTTGG AAGATGTTT  
34681 CTAACACACA AAGATTTTTA CAGACCGTT TTAGATAAAG AAAAAACAGG CCGGGCCCGG  
34741 TGGCTCACGC CTGTAATCCC AGCACTTGG GAGGCCGAGG CGGGTGGATC ACGAGGTCAG  
34801 GAGGTCGAGA CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCCCTTC TCTACTAAAA ATACAAAAAT  
34861 TAGCCAGGCA TGGTGGCGCA TGCCTGTAAT TCCAGCTACT TGGGAGGCTG AGGCAGGAGA  
34921 ATCGTTGAA CCCAGGAGGC AGGGGTGCA GTGAGCCGAG ATCACGCCAC TGCCTCCAG  
34981 CCTGGGCAAC AAGAGCAAAA AACTCCGTCT CAAAACAAA CAAACAAACA AAAAAACAA  
35041 TAAAAAAGA AAAAGAAAA GAAAAAAT ATTCAGAATG ACTTGATTA CTAGGATGGG  
35101 TCTGGGAGAT ATTCATTCCT GAATCTGACC CTACTTAAT AGAGAAGGAG GTGGGATCA  
35161 AGGCTGTCG GAGACCCAGC CACAGAGGAG GACAAATCTA TGACCCATA CAATTTTTT  
35221 GTCTCCAAAT GCTGAGCCTG GTTTCTGTA CAGATCCTGG GGATGAAATG ATGACTCATA  
35281 CACAGAGTTT ACAGTTTACG AGGGCTGTGG ACAAGCAAAC AGAACTTGAT CCAGCTAGGA  
35341 TGGGATGTGG ACAGGGAAGT TACTACCGAG GCCAAGAAAG AGAGGAGCAG ATATCTTCAC  
35401 CGTTAACTGG CTGCCTTAGT TATTATAAAG GGAAAACATT TATCTCCAC TCCTCTCTAA  
35461 AGTGCTTGT ACCAGCTCCT GCAGCTCTGA CTTAACAGTC CCCAGAATGT GTAAGGCACT  
35521 TACATGTGGT ATGCATGGGT ATGGATGTCT TTTACTAATC TATGATGTCA ACTATCACC  
35581 GCCATCCTAA GGGGGTCT GTACCCTAAT GGAACAGCCA GTGAAATCCT CAGGCTCCTT  
35641 ATCTTAGCGT GGTACAGGGG CCTTTGTTAT GCCCCTGAAT TGCACTGATA AAACATCAAC  
35701 ACATAGATTT CCCAAGGCAG TGTAAGGACA GGGCCACAGA GCCAGAGGCC ACTTCTGCA  
35761 GTCCTTTCAT TCTAGTAAA ATTCTATCTT CCTACAGCCT GACTTGGGGC CACTTTGGAA  
35821 TGACAGCTGT ATAGTGGGG GCGGGAAAG GAGGGAATAC TCACCCTAGT ATTACTTATG  
35881 TCAGCTTTAT AGCCAGAGGT CAAAGAATGC CCCCACCCA GAGCCTAGAC CCTTTTTCCA  
35941 GTGAGTCATC TCTTTGACTT TTCAAATTA TCTATCTATA GGGCTTAAA CTGGGGACAC  
36001 TTTTGCAGAG TCTAGGGGCT TTCTCTGGGT CATGAAAGCT ACAAGAGTTG GTTCTGCTCA  
36061 GACTTGGTGG GAGTTAGGCT TATAGGCTGA GATGAGACAA TTGCTTTGCA AGTAGGAACA  
36121 TTAAGTGCAG AAAGATTGCT CTCTAGTGG ACTGACAAA ATTGCAGTAC TGGGGACTCC  
36181 AGAAAAAAT GAAGACAAAT GTTAAGTTAG ATTCCTGTGT TTGTACTTGA AGAATGTGTG

FIG. 4续

```

36241 AAGGGATCCT GACCCTCCCT TTCCTGTTGT AAAACAGTTG ATGCCTAAAG AGATCTGGTC
36301 CACAAGACCT TGACTAAATT CCTGGCCCTT TCTTCTCCAT TTAAC TTGT ATATGTTTGT
36361 TATTGTGACT ATATGGTGAT TFACTTTAAA AAGACTTCAG TATAAGTGGT ATATACTTTC
36421 ACCTGCGTCT TTTGGATGAT TTGTTTTCAT GTGAAGTTTA TTGGGGTCAA CCCTCCAGAG
36481 ATGGCTGGGG CAGTTGGTTA GAAAGACTGT ATAGGCCAG GCCCTTGCAA GCCCAGCAGC
36541 CCTCTGTCTC CAGAGTCATG CTGGAGGTCT GGACCTGCTG GCTGTGTGAT ATCCACTTT
36601 AGGGAGACTC AGTCACCTTG CACAAC TGTG AGAGCTGGGC CTGCCACTGA AACATTGTGT
36661 CAACCTCTAA GTGACCCTTT CACTAGATGG TAAAGTGAGA TGCCTCATCC CCAA ACTATA
36721 AGAACAGTTC TATGGCTGTT TTTGTATCTC CTGGCTAACA AATGTTACAT GTTTGGCAGC
36781 ATTTGGTATA GTGCTTGCTT TCAGTATAGT CTGCCACCAG TTAATGAGGT TGTGAAAGG
36841 AGGACACACA ATCTCCAAA TTCATCAAGA GAATGGACAA TTGCTGAATG GCCAACTGG
36901 CTTAGATCTG TTGGCAACAT TCAGTGTGTC CCTTCCTTTC CACTTATCCA TCAAGGAATT
36961 ACTGAATCCT ACCATGCGCC TGTCTGGGA GTTTGTCCTT GGCTGCAAGC TATTTTCAGG
37021 CAGTACTGG GATGGGATGG GAGAGAGGAT GAAACTGAAG GGTCTTGGAG CCTAAGAGCT
37081 TCCTCTGTAC TGAGGGAGGG AGGGCGACAT GACGAAGACT TCTAATGTCT TTGGTGGTGG
37141 TGGGTGGGGC AGGCAGTGTA GGTGGTTTTC GTTTGATGAC AATTCTTGGG CAGAAGCATT
37201 TGAAAAGATG ATTTGGGAGA AGGGTGGGGA GGAAGAGTGA TCGAGTTCTA CACAGAGTTG
37261 GGGAGGGCAG GCTTCAGGAA GCAGGCCTGG GGTGCCAAG TACAGTGAGA TCCGGTGACT
37321 TTCTTCATTT GGCCACCTAG ATGGAAGGAG GGACAGCAGT GGATTATCAG AAGGGTCCAG
37381 TAGTAGCGGT CTAGCCCTCA AGTGCTCCTT CATTCAATCA AGCAGGCTTA ATGTATTAAG
37441 CACTTATTGT GCCAGGAAGT GTGGTAAGGG TCAGTGTGGA CCTGCGGCCG TGTGCAAAGC
37501 CACAGATCCC TGCCTTCAGG AAGCCACAG CCTAGTGGAG GAGATATATA GTAATCAAAC
37561 AATCTTACAA CATTTTGTA AATGCCATA GTAGATGTTT TGAGGAGAAG CTTTTGGAAC
37621 TGTGACGTA GAACAGGGGA GGTGAAGAGA GTTTGGATAG G

```

FIG. 4续

FIG. 5

完全人神经激肽 B 前体的定量 PCR ;  
神经激肽 B  $\beta$ -肌动蛋白

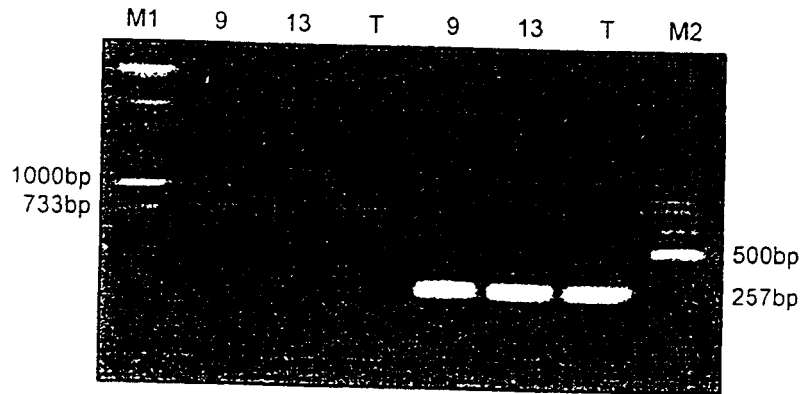
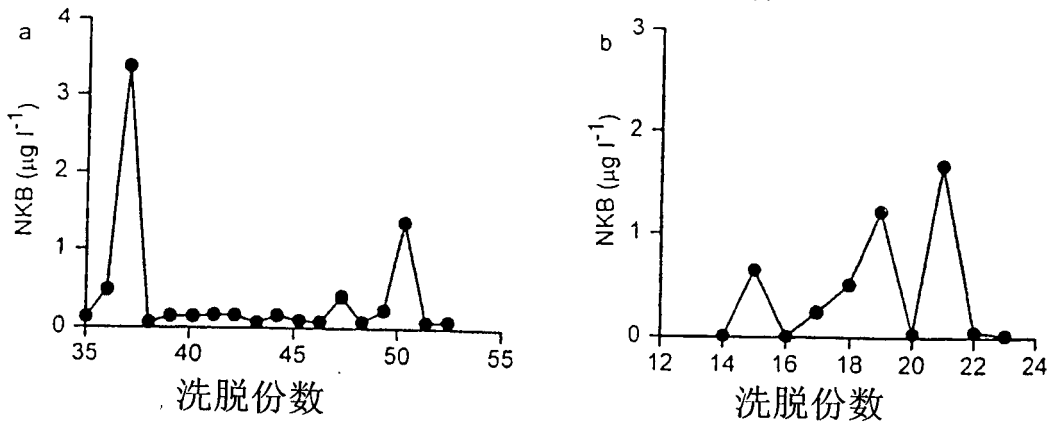


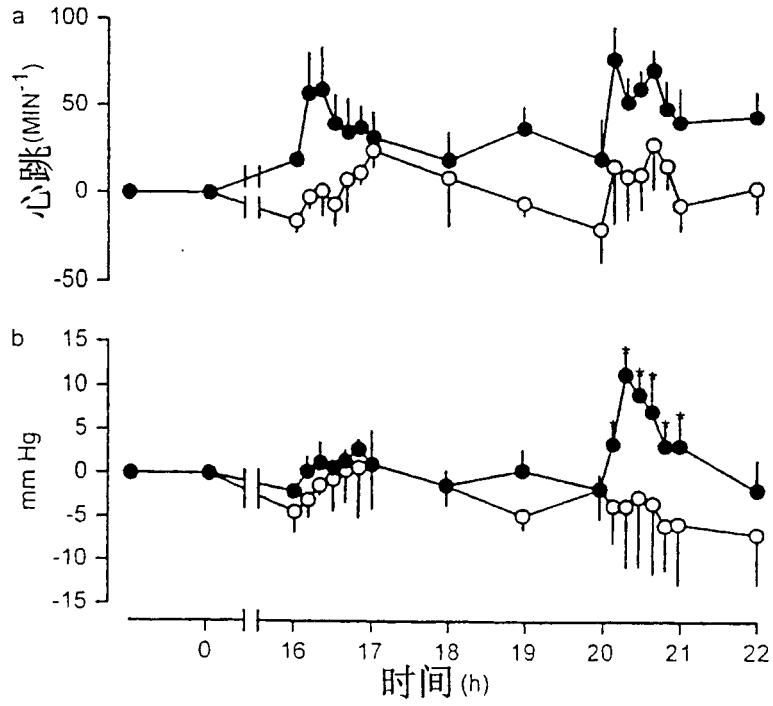
FIG. 6

神经激肽 B 的高压液相色谱



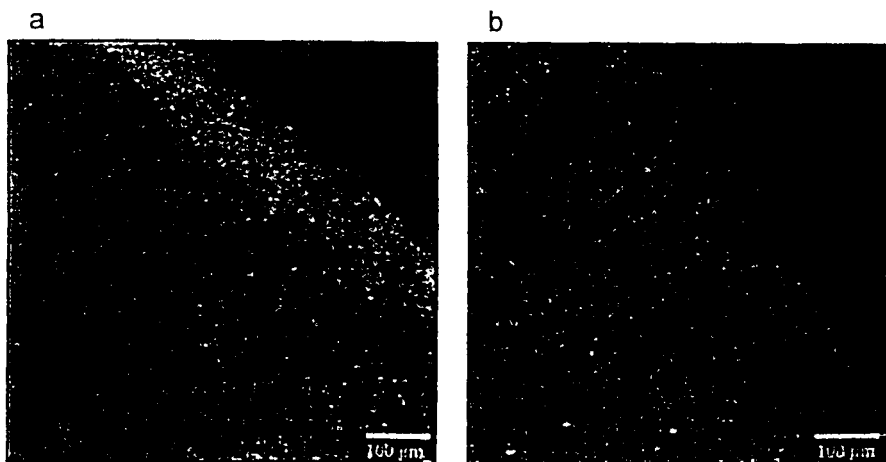
### FIG. 7

清醒兔子体内的 NKB 的心血管作用效果



### FIG. 8

神经激肽 B mRNA 表达在胎盘垂直剖面上的定位



专利名称(译)	胎盘人神经激肽B前体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1414871A</a>	公开(公告)日	2003-04-30
申请号	CN00818115.2	申请日	2000-11-10
[标]发明人	奈杰尔·佩奇 菲利浦·劳里		
发明人	奈杰尔·佩奇 菲利浦·劳里		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/04 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 C07K7/08 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2410/00 G01N2800/368 G01N33/689 A61K38/046 A61P15/00		
优先权	1999027125 1999-11-16 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种通过测定神经激肽B、它的前体及其片段的生成而诊断妊娠性高血压或子痫前期的方法，以及用于这些方法的药盒。本发明还提供了这些疾病的治疗方法以及制备适宜的药物的方法，以及抗体和有用的抗原材料。

完全人神经激肽 B 前体的定量 PCR  
神经激肽 B β-肌动蛋白

