

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780019481.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

[43] 公开日 2009年6月10日

[11] 公开号 CN 101454670A

[22] 申请日 2007.3.28

[21] 申请号 200780019481.9

[30] 优先权

[32] 2006.3.28 [33] JP [31] 089306/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2007/056660 2007.3.28

[87] 国际公布 WO2007/119563 日 2007.10.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.26

[71] 申请人 国立大学法人新潟大学

地址 日本新潟县

共同申请人 电化生研株式会社

[72] 发明人 小笠原真也 三浦州平 斋藤亮彦  
竹田彻朗

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬付 磊

权利要求书 4 页 说明书 25 页 序列表 24 页  
附图 4 页

[54] 发明名称

测量人巨蛋白的方法

[57] 摘要

本发明提供了测量人巨蛋白的方法，与传统方法比较，这种方法可以在较短的时间较简单地完成，而且还可以定量人巨蛋白。本发明还提供了直接在疾病部位早期诊断细胞、组织或器官特异性功能疾病的方法。本发明还公开了通过测定人巨蛋白而检测特征性地观测到巨蛋白表达的器官疾病的方法。

1. 使用结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体以及能结合人巨蛋白的第二配体来测定样本中人巨蛋白的方法，该方法包括：使样本与结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体发生反应，使样本与能结合人巨蛋白的第二配体发生反应，对因该样本中人巨蛋白与能结合人巨蛋白的配体形成复合物而被结合于固体支持物的、能结合人巨蛋白的第二配体进行测定。

2. 权利要求1所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其包括以下两个步骤：结合于固体支持物上的能与人巨蛋白结合的第一配体与样本之间的反应，和随后的能与人巨蛋白结合的第二配体与样本之间的反应。

3. 权利要求1所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体与样本之间的反应，和能结合人巨蛋白的第二配体与样本之间的反应，是在单一的步骤中进行的。

4. 权利要求1至3中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体和能结合人巨蛋白的第二配体都是抗体。

5. 权利要求1至3中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体是特异地针对人巨蛋白糖链的凝集素，而能结合人巨蛋白的第二配体是抗体。

6. 权利要求1至3中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体是抗体，而能结合人巨蛋白的第二配体是特异地针对人巨蛋白糖链的凝集素。

7. 权利要求1至6中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体和/或能结合人巨蛋白的第二配体是选自下列物质：维生素结合蛋白，其为钴胺传递蛋白-维生素 B<sub>12</sub>、维

生素 D 结合蛋白或视黄醇结合蛋白; 脂蛋白, 其为有载脂蛋白 B、载脂蛋白 E、载脂蛋白 J/簇蛋白、或载脂蛋白 H; 激素, 其为甲状旁腺激素(PTH)、胰岛素、上皮生长因子(EGF)、催乳素、瘦蛋白或甲状腺球蛋白, 上述任一种的受体或这类激素的受体; 免疫或应激反应相关蛋白, 其为免疫球蛋白轻链、PAP-1 或  $\beta_2$ -微球蛋白; 酶, 其为 PAI-I、PAI-I-尿激酶、PAI-I-tPA、尿激酶原、脂蛋白脂肪酶、纤溶酶原、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶,  $\alpha_1$ -微球蛋白或溶菌酶, 上述任一种的抑制剂或这类酶的抑制剂; 药物或毒素, 其为氨基糖苷类、多粘菌素 B、抑肽酶或天花粉蛋白; 载体蛋白, 其为白蛋白、乳铁蛋白、血红蛋白、气味结合蛋白、甲状腺素视黄质运载蛋白或 L-FABP; 和受体相关蛋白(RAP), 其为细胞色素 c、钙( $\text{Ca}^{2+}$ )、渐进性糖化终产物(AGE)、cubilin 或  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ 交换转运蛋白同种型 3 (NHE3); 或这些物质中的结合片段。

8. 使用结合于固体支持物的人巨蛋白或人巨蛋白的部分片段以及能结合人巨蛋白的配体来测定样本中人巨蛋白的方法, 该方法包括: 使样本与能结合人巨蛋白的配体发生反应, 让反应产物与结合于固体支持物的人巨蛋白发生反应, 对结合于固体支持物的能与人巨蛋白结合的配体进行测定, 并根据结合于固体支持物的能结合人巨蛋白的配体的减少百分率来竞争性定量样本中的人巨蛋白。

9. 权利要求 8 所述的测定样本中人巨蛋白的方法, 其中, 能结合人巨蛋白的配体是抗人巨蛋白抗体。

10. 使用能结合人巨蛋白的配体测定样本中人巨蛋白的方法, 该方法包括: 使样本与结合于微粒上能结合人巨蛋白的配体发生反应以诱导凝集, 并根据导致凝集的程度来测量人巨蛋白。

11. 权利要求 10 所述的测定人巨蛋白的方法, 其中, 能结合人巨蛋白的配体是抗人巨蛋白抗体, 凝集是免疫凝集。

12. 通过权利要求 1 至 11 中任一方法测定人巨蛋白以检测其中观测到有巨蛋白表达的器官的疾病的方法。

13. 权利要求 12 所述的检测器官疾病的方法, 其中, 其中观测到

有巨蛋白表达的器官的疾病是肺病。

14. 权利要求 12 所述的检测器官疾病的方法，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官的疾病是肾病。

15. 权利要求 14 所述的检测肾脏疾病的方法，其中，肾病是肾小管性疾病。

16. 权利要求 14 或[15]所述的方法，其中，样本是尿液。

17. 用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其包含能结合人巨蛋白的配体。

18. 权利要求 17 所述的用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其中，能结合人巨蛋白的配体是抗人巨蛋白抗体。

19. 权利要求 18 所述的用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肺病。

20. 权利要求 18 所述的用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肾病。

21. 权利要求 20 所述的用于检测肾病的试剂盒，其中，肾病是肾小管性疾病。

22. 用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的疾病检测标志，其包含人巨蛋白。

23. 权利要求 22 中的疾病检测标志，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肺病。

24. 权利要求 22 中的疾病检测标志，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肾病。

25. 权利要求 24 中的疾病检测标志，其中，肾病是肾小管性疾病。

26. 人巨蛋白的用途，用作用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的疾病检测标志。

27. 权利要求 26 所述的人巨蛋白作为疾病检测标志的用途，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肺病。

28. 权利要求 26 所述的人巨蛋白作为疾病检测标志的用途，其

中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肾病。

29. 权利要求 28 所述的人巨蛋白作为疾病检测标志的用途，其中，肾病是肾小管性疾病。

## 测量人巨蛋白的方法

### 技术领域

本发明涉及测量人巨蛋白(megalin)的方法。更详细地说,本发明涉及检测人巨蛋白的方法,其包括对观测到巨蛋白表达的细胞、组织和器官中的局部而特异地表达的巨蛋白,以快速而简单的方式进行定量检测,从而能够直接和早期诊断细胞、组织和器官受影响的程度,并且通过治疗改善病状和预后并防止其恶化。本发明可用于诊断其中观测到有巨蛋白表达的器官的疾病,如肾病或肺病。

### 背景材料

#### 1. 巨蛋白的克隆

1982年,作为对 Heymann 肾炎(其为实验膜性肾病的模型)病因抗原的研究结果, Kerjaschki, D.和 Farquhar, M.G.鉴定了一种细胞膜蛋白质 - gp330 (Kerjaschki D., Farquhar M.G., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 5557-5561)。1994年, Saito, A.等测定了大鼠 gp330 的完整一级结构,并将其命名为巨蛋白,因为它是脊椎动物中已克隆的最大细胞膜蛋白质(Saito A.等, , 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729)。

#### 2. 巨蛋白表达位点

巨蛋白也被称为糖蛋白 330 (gp330)或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白 2 (LRP-2)。它是分子量约 600 kDa 的糖蛋白,在肾近端小管上皮细胞中表达,也在其它组织和细胞如 II 型肺泡细胞、精巢、子宫内膜、胎盘、或内耳上皮、肾上皮、生殖卵黄腺和神经外胚层(参见 Christensen E. I., Willnow, T.E., 1999; J.Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236; Juhlin C., Klareskog L.等, 1990, J. Biol. Chem. 265,

8275-8279; 和 Zheng G, McCluskey R. T.等, 1994, *J. Histochem. Cytochem.* 42, 531-542)。在肾脏, 巨蛋白作为内吞受体, 与排尿前近端肾小管的内吞和蛋白质重吸收等相关联。重吸收的蛋白质等随后被溶酶体降解(参见 Mausbach A. B., Christensen E. I., 1992, *Handbook of Physiology: Renal Physiology*, Windhager, editor, New York, Oxford University Press, 42-207)。

### 3. 巨蛋白的核苷酸序列

巨蛋白是一种糖蛋白, 其表达最常见于哺乳动物肾近端小管上皮细胞膜上。其 cDNA 编码序列与 Korenberg, J. R. 等(1994)公开的基因登录号 U04441 的人巨蛋白 cDNA 序列或 Hjaeln, G.等(1996)公开的基因登录号 U33837 的人巨蛋白 cDNA 序列(参见 Korenberg J. R. 等, 1994, *Genomics* 22, 88-93; 和 Hjaln G. 等, 1996, *Eur. J. Biochem.* 239, 132-137)有核苷酸同一性。

此外, Saito 等(1994)已公开了与人巨蛋白具有同源性的大鼠巨蛋白, 其基因登录号 L34049 的 cDNA 序列也已被公开(参见 Saito A.等, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 9725-9729)。

### 4. 巨蛋白的氨基酸序列和蛋白结构

巨蛋白是一种巨大的细胞膜蛋白, 由 4,655 个氨基酸(就人巨蛋白而言)或 4,660 个氨基酸(就大鼠而言)组成。由氨基酸序列推算的分子量为约 520 kDa, 含有糖链时可能高达约 600 kDa (参见 Saito A.等, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 9725-9729)。巨蛋白属于 LDL 受体基因家族, 其巨大的胞外区有 4 个功能域, 胞外区通过单一跨膜区与小的胞内区相连。巨蛋白主要存在于肾小球的披网格蛋白小窝(大鼠), 或近端小管的上皮管腔膜(luminal membrane)(肾小球上皮细胞的管腔膜和基底膜)、II 型肺泡细胞、附睾腺、甲状腺、甲状旁腺、卵黄囊膜、内耳、小肠或脉络膜, 因此, 它与细胞摄入不同配体及其代谢相关(参见 Farquhar M. G.等, 1995, *J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 35-47; 和

Christensen E. I.等, 2002, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 256-266)。巨蛋白敲除小鼠会发生低分子量蛋白尿、骨代谢紊乱、呼吸衰竭、脑畸形和其他疾病(参见 Willnow T. E.等, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 8460-8464)。在线虫(秀丽隐杆线虫(*C. elegans*))中也存在巨蛋白同源物, 其生物学重要性也已被暗示(参见 Yochem J.等, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 4572-4576)。

### 5. 作为肾炎起因的巨蛋白的重要性

巨蛋白为实验膜性肾病(Heymann 肾炎)的主要致病抗原, 是一种上皮清道夫受体, 其生物学和病理学作用已被阐明。用动物模型来阐明人膜性肾病发展的机制已有很长时间, 大鼠 Heymann 肾炎就是膜性肾病的一种模型。与其它任何模型相比, 对 Heymann 肾炎的分析取得了更大进步。Saito A.等公开了对 Heymann 肾炎的病理学表位和配体结合域的分析结果, 他们还展示了巨蛋白的主要抗原区和巨蛋白上对结合配体有主要贡献的功能域(参见 Kerjaschki D.等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 11179-11183; Saito A., Farquhar M. G.等, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 8601-8605; Yamazaki H., Farquhar M. G.等, 1998, *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1638-1644; 和 Orlando R. A., Farquhar M. G.等, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 2368-2373)。

### 6. 巨蛋白的各种配体

在体内, 巨蛋白在近端小管上皮细胞的管腔侧表达最丰富。在人类肾脏, 在近端小管上皮细胞以外的部位(包括在肾小球)未观察到巨蛋白的表达。巨蛋白通过内吞作用将由肾小球过滤的各种配体(例如低分子量蛋白或药物)摄入细胞中, 并将他们运输到溶酶体, 之后它们通过再循环重新呈现在细胞表面(参见 Farquhar M. G.等, 1995, *J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 35-47; 和 Christensen E. I.等, 2002, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 256-266)。此外, 巨蛋白与从管腔面向基底膜侧的转胞吞作用有关。巨蛋白还与结合蛋白(如维生素 A、维生素 B12 和维生素 D)的摄入和

代谢有关(参见 Christensen E. I.等 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266)。Christensen 和 Willnow 证实巨蛋白介导三种维生素载体蛋白 - 维生素 D 结合蛋白(DBP)、视黄醇结合蛋白(RBP)和钴胺传递蛋白(TC)以及与此相关的维生素即(OH)维生素 25D<sub>3</sub>、维生素 A (视黄醇)和维生素 B<sub>12</sub> 的重吸收(参见 Christensen E. I., Willnow T. E., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236)。Saito A.等证实, 瘦蛋白(其由脂肪细胞分泌, 在肥胖患者的血液中水平增加)作为巨蛋白的配体被近端小管上皮细胞摄入并代谢(参见 Saito A., Gejyo F.等, 2004, Endocrinology. 145, 3935-3940)。脂肪细胞(也就是积累的内脏脂肪)可导致复合性病理病症, 即代谢综合症。瘦蛋白为由脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子, 在代谢综合症患者的血液中水平增加。有研究认为, 肾脏是血液中瘦蛋白最有可能积累的器官, 而且瘦蛋白展现了肾病的作用(参见 Tarzi R. M. Lord G. M.等, 2004, Am. J. Pathol. 164, 385-390)。还在近端小管和收集管之间的区域(位于巨蛋白发挥功能的区域的下游)发现了所谓的瘦蛋白受体。

术语“代谢综合症”被定义为内脏肥胖、血压升高、高脂血症、糖耐量低减和其他症状的疾病并发症, 其主要的危险因素是胰岛素抵抗。该病症非常有可能导致动脉粥样硬化症和蛋白尿症的发生, 并可能导致有肾小球及肾小管肥大的组织学特征的肾病发生。当这种状况结合明显的糖尿病时, 就会进一步出现高血糖特征, 表现出糖尿病性肾病, 这种病状还可能会进一步变得严重。II型糖尿病基本上是在代谢综合症之前或同时发生。因此, 肾病的特征可以包含与代谢综合症相关的肾病。

Saito A.等用源自大鼠卵黄囊上皮的细胞(L2 细胞, 巨蛋白在其中有高水平表达)进行了一项实验, 发现抗巨蛋白抗体可以显著抑制 L2 细胞对 <sup>125</sup>I 标记的 AGE (渐进性糖化终产物)(来自葡萄糖)的摄入。因此, 他们证明了, 巨蛋白与该摄入途径关联(参见 Saito A. Gejyo F.等, 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 1123-1131)。作为糖尿病性肾病发生的机

制, 渐进性糖化终产物(AGE)通过美拉德反应与糖化和修饰型蛋白质的相关性已经有报道。血液中低分子量的 AGE 由肾小球过滤, 被近端小管上皮细胞重吸收和代谢。如果肾病的进一步发展, 则更高分子量的 AGE 也被肾小球过滤, 在近端小管上皮细胞中积累, 而施加超量的代谢负荷。进一步, Saito A.等还表明, 除了葡萄糖之外, 巨蛋白还与细胞对由甲基乙二醛、甘油醛、乙醇醛衍生的 AGE 的摄入有关。此外, 代谢综合症往往伴随肝病, 如脂肪肝。在肝脏中大量存在的肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)被释放到健康人的血液中。在肝病时, 更多的 L-FABP 被释放, 血液中含量增加。Saito A.等也表明, 血液中的 L-FABP 被肾小球迅速过滤, 并借助巨蛋白被近端小管上皮细胞重吸收(参见 Takeda T., Gejyo F., Saito A.等, 2005, *Lab. Invest.* 85, 522-531)。

## 7. 与巨蛋白相互作用的功能性蛋白

为了阐明巨蛋白在细胞中的运输机制, 研究了与巨蛋白胞内结构域结合的衔接分子, 已鉴定出各种蛋白, 如 Dab2、ANKRA、MAGI-1、GAIP、GIPC、Gα3、MegBP 和 ARH (参见 Oleinikov A. V.等, 2000, *Biochem. J.* 347, 613-621; Rader K., Farquhar M.G.等, 2000, *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2167-2178; Patrie K. M., Margolis B.等, 2001, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 667-677; Lou X., Farquhar M.G.等, 2002, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 918-927; Petersen H.H., Willnow T. E., 2003, *J. Cell. Sci.* 116, 453-461; 和 Takeda T., Farquhar M.G.等, 2003, *Mol. Biol. Cell.* 14, 4984-4996)。通过这些分子, 巨蛋白与内吞或转胞吞关联, 也和与此相关的信号传递关联。此外, 在近端小管上皮细胞中, 巨蛋白的功能还与一种细胞膜受体即 cubilin 相结合, 以进一步参与细胞对各种配体的摄入(参见 Saito A.等, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 9725-9729)。例如, cubilin 是直接结合转铁蛋白、白蛋白、内源性维生素 B<sub>12</sub> 等的受体, 而巨蛋白间接参与了对它们的内吞作用。此外, 已知在近端小管上皮细胞中巨蛋白与 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交换转运蛋白同种型 3

(Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger isoform 3, NHE3)相互作用(参见 Biemesderfer D.等, 1999, J. Biol. Chem. 274, 17518-17524)。NHE3 是在 Na<sup>+</sup>的重吸收中起重要作用的一种反向转运蛋白, NHE3 还影响一种巨蛋白对配体的摄入(参见 Hryciw D. H.等, 2004, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31, 372-379)。巨蛋白还可能涉及 NHE3 的失活和代谢。在糖尿病性肾病或代谢综合症相关性肾病的早期, 肾小球滤过变为过量。推导其首要原因是近端小管上皮对 Na<sup>+</sup>重吸收增强(参见 Vallon V.等 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 530-537), NHE3 在这种情况下发挥了关键作用, NHE3 被巨蛋白失活和代谢被认为与此有关(参见 Hryciw D. H.等, 2004, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31, 372-379)。

#### 8. 巨蛋白尿排泄和巨蛋白配体尿排泄的相关性

Leheste 等揭示, 巨蛋白敲除小鼠和近端小管功能减弱的范可尼(Fanconi)综合症患者将经历尿中蛋白质和视黄醇的排泄增加(参见 Leheste J.等, 1999, Am. J. Pathol. 155, 1361-1370)。此外, Moestrup S. K. 等表明, 范可尼综合症患者尿中排出的巨蛋白量显著低于健康个体的排出量。这导致巨蛋白功能和在近端小管中表达的削弱, 从而增加排泄在尿中的含视黄醇结合蛋白的肾小球滤过蛋白的量(参见 Anthony G. W., Moestrup S.K.等, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13, 125-133)。

#### 9. 通过使用尿毒症模型和器官再生模型的实验发现巨蛋白功能的重要性

如上所述, 巨蛋白参与将各种低分子量蛋白质摄入近端小管上皮细胞并且参与其代谢。当病理病症发展为肾衰竭时, 代谢机制被扰乱, 低分子量蛋白质因此在血液和组织作为尿毒症蛋白积累。其代表性例子是  $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2-m), 它可能导致长期透析患者的透析相关性淀粉状蛋白病(参见 Gejyo F., Schmid K.等, 1985, Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 701-706)。上述 AGE 由于其在肾衰竭或透析患者的血中

积累,也被认为是动脉粥样硬化或器官衰竭的病因,并且 AGE 被认为是一种类型的尿毒症蛋白(参见 Henle T., Miyata T., 2003, *Adv. Ren. Replace Ther.* 10, 321-331)。此外,瘦蛋白在透析患者的血中积聚,因此被认为与营养不良或免疫妥协有关。Tabata Y.和 Gejyo F.等公开了利用巨蛋白功能的尿毒症蛋白代谢模式的效果和有效性(参见 Saito A., Tabata Y., Gejyo F.等, 2003, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2025-2032 和 WO 02/091955)。即,巨蛋白表达细胞在体内被移植作为支架蛋白,从外周血管(新生血管)渗漏的低分子量蛋白在巨蛋白的帮助下被摄入细胞以进行代谢。用于移植的巨蛋白表达细胞(即卵黄囊上皮来源的 L2 细胞)在巨蛋白帮助下摄入和代谢  $\beta_2$ -m (参见 Saito A., Tabata Y., Gejyo F.等, 2003, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2025-2032)。将皮下移植了 L2 细胞的裸鼠的两个肾脏摘除,诱导肾衰竭病症,测定移植组织块和器官中经腹腔注射的  $^{125}\text{I}$  标记  $\beta_2$ -m 的细胞摄入。结果发现,与其它器官比较,移植了 L2 细胞的细胞块更显著地摄入  $^{125}\text{I}$  标记的  $\beta_2$ -m; 并且发现,与无 L2 细胞移植的对照组比较,在 L2 细胞移植组中  $^{125}\text{I}$  标记  $\beta_2$ -m 的清除有显著加强(参见 Saito A., Tabata Y., Gejyo F.等, 2003, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2025-2032)。

#### 10. 巨蛋白的蛋白水解和尿排泄

近年来,已经提出了巨蛋白在 Notch 样信号转导途径中被蛋白水解的可能性(参见 Zou Z., Biemesderfer D.等., 2004, *J. Biol. Chem.* 279, 34302-34310; 和 Grigorenko A. P.等, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 14955-14960)。这还包括一个两步切割系统:由金属蛋白酶介导的外结构域的脱落和  $\gamma$ -分泌酶介导的膜内蛋白水解。

此外,已知巨蛋白在 II 型肺泡细胞中表达。

因此,巨蛋白与器官(如肾脏)代谢的相关性已被广泛地研究。然而,器官(包括肾脏)的疾病和巨蛋白间的相关性尚未被阐明,巨蛋白的表达或其排泄入体液与各种器官疾病的相关性也尚未被研究。

迄今为止，作为检测巨蛋白的方法，业已知晓使用多克隆抗体的组织染色法或免疫印迹法，其中该多克隆抗体通过对免疫动物(如兔子)免疫而获得。

但是，该技术涉及到细胞或借助电泳分离的蛋白的染色，这需要非常复杂的程序，并需要长时间来固定组织、准备组织切片、电泳并转移到膜上。因此，它难以定量巨蛋白。

从诊断组织或器官的功能紊乱(尤其就肾病而言)程度的角度看，没有以特异性且简单的方式来诊断肾小管衰竭的有效方法。目前，已使用了许多诊断方法，检测尿液或血液中的白蛋白、肌酐、 $\beta$ 2-微球蛋白、L-FABP 等作为肾病的诊断标志。但是，这些诊断标志并非源自肾组织，它们仅仅缘于在肾脏肾小球滤过和肾脏肾小管重吸收过程中的所有现象和功能。也就是说，即使使用这种标志，也难以鉴别肾脏的肾小球衰竭与肾小管衰竭。此外，这种标志是一种来自肾脏以外的器官的间接标志。因此，对疾病早期诊断的有效性差。这同样适用于KL-6 (急性炎症的标志物)，KL-6 是现有的肺病(特别是炎症)诊断标志。

## 本发明的公开内容

本发明提供了测量人巨蛋白的方法，与传统技术比较，这种方法可以在较短的时间以较简单方法完成，而且还可以定量人巨蛋白。本方法还使得能够在早期以定点方式诊断功能疾病，这种方法对细胞、组织或器官是特异性的。特别是，本发明提供了一种测定尿中巨蛋白水平以检测肾病的方法。

如上所述，已有许多关于人巨蛋白的报道，并已提示其与器官(如肾或肺)代谢的相关性。然而，目前还不了解在器官功能受损时巨蛋白表达变化的方式和巨蛋白流行性改变的方式。

本发明人在用快速方式高灵敏度测定人巨蛋白的方面进行了大量研究。他们因此发现了一种方法，使用能与人巨蛋白结合的配体，

尤其是抗人巨蛋白抗体，可以准确测量体液样本(如尿)中的巨蛋白。

进一步，本发明人测定了器官功能受损患者体液中的人巨蛋白，发现人巨蛋白可能是检测和诊断器官疾病的标志。这导致了本发明的完成。

具体来说，本发明如下。

[1] 使用结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体和能结合人巨蛋白的第二配体测定样本中人巨蛋白的方法，该方法包括：使样本与结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体发生反应，使样本与能结合人巨蛋白的第二配体发生反应，对因该样本中的人巨蛋白与能结合人巨蛋白的配体形成复合物而被结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第二配体进行测定。

[2] 按照[1]所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其包括以下两个步骤：结合于固体支持物上的能与人巨蛋白结合的第一配体与样本之间的反应，以及随后的能与人巨蛋白结合的第二配体与样本之间的反应。

[3] 按照[1]所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体与样本之间的反应以及能结合人巨蛋白的第二配体与样本之间的反应是在一个的步骤中进行。

[4] 按照[1]至[3]中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体和能结合人巨蛋白的第二配体都是抗体。

[5] 按照[1]至[3]中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体是特异地针对人巨蛋白的糖链的凝集素，而能结合人巨蛋白的第二配体是抗体。

[6] 按照[1]至[3]中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其中，能结合人巨蛋白的第一配体是抗体，而能结合人巨蛋白的第二配体是特异地针对人巨蛋白糖链的凝集素。

[7] 按照[1]至[6]中任一项所述的测定样本中人巨蛋白的方法，其

中,能结合人巨蛋白的第一配体和/或能结合人巨蛋白的第二配体是选自下列物质:维生素结合蛋白,其为钴胺传递蛋白-维生素 B<sub>12</sub>、维生素 D 结合蛋白或视黄醇结合蛋白;脂蛋白,其为载脂蛋白 B、载脂蛋白 E、载脂蛋白 J/簇蛋白、或载脂蛋白 H;激素,其为甲状旁腺激素(PTH)、胰岛素、上皮生长因子(EGF)、催乳素、瘦蛋白或甲状腺球蛋白,上述任一种的受体或这类激素的受体;免疫或应激反应相关蛋白,其为免疫球蛋白轻链、PAP-1 或  $\beta_2$ -微球蛋白;酶,其为 PAI-I、PAI-I-尿激酶、PAI-I-tPA、尿激酶原、脂蛋白脂肪酶、纤溶酶原、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\alpha_1$ -微球蛋白或溶菌酶,上述任一种的抑制剂或这种酶的抑制剂;药物或毒素,其为氨基糖苷类、多粘菌素 B、抑肽酶或天花粉蛋白;载体蛋白,其为白蛋白、乳铁蛋白、血红蛋白、气味结合蛋白、甲状腺素视黄质运载蛋白(transthyretin)或 L-FABP;和受体相关蛋白(RAP),其为细胞色素 c、钙(Ca<sup>2+</sup>)、渐进性糖化终产物(AGE)、cubilin 或 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交换转运蛋白同种型 3 (NHE3);或这些物质中的结合片段。

[8] 使用结合于固体支持物上的人巨蛋白或人巨蛋白的部分片段以及能结合人巨蛋白的配体测定样本中人巨蛋白的方法,该方法包括:使样本与能结合人巨蛋白的配体发生反应,使该反应产物与结合于固体支持物上的人巨蛋白反应,对结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的配体进行测定,并根据结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的配体的减少百分率,来竞争性定量样本中的人巨蛋白。

[9] 按照[8]所述的测定样本中人巨蛋白的方法,其中,能结合人巨蛋白的配体是抗人巨蛋白抗体。

[10] 使用能结合人巨蛋白的配体测定样本中人巨蛋白的方法,该方法包括:使样本与结合于微粒上的能结合人巨蛋白的配体发生反应以诱导凝集,并根据导致凝集的程度来测量人巨蛋白。

[11] 按照[10]所述的测定人巨蛋白的方法,其中,能结合人巨蛋白的配体是抗人巨蛋白抗体,凝集是免疫凝集。

[12] 用[1]至[11]中任一项的方法测定人巨蛋白以检测其中观测

到有巨蛋白表达的器官的疾病的方法。

[13] 按照[12]所述的检测器官疾病的方法，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官的疾病是肺病。

[14] 按照[12]所述的检测器官疾病的方法，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官的疾病是肾病。

[15] 按照[14]所述的检测肾病的方法，其中，肾病是肾小管性疾病。

[16] 按照[14]或[15]中的方法，其中，样本是尿液。

[17] 用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其包含能结合人巨蛋白的配体。

[18] 按照[17]所述的用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其中，能结合人巨蛋白的配体是抗人巨蛋白抗体。

[19] 按照[18]所述的用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肺病。

[20] 按照[18]所述的用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的试剂盒，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肾病。

[21] 按照[20]所述的用于检测肾病的试剂盒，其中，肾病是肾小管性疾病。

[22] 用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的疾病检测标志，其包含人巨蛋白。

[23] 按照[22]所述的疾病检测标志，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肺病。

[24] 按照[22]所述的疾病检测标志，其中，其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肾病。

[25] 按照[24]所述的疾病检测标志，其中，肾病是肾小管性疾病。

[26] 人巨蛋白作为用于检测其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病的疾病检测标志的用途。

[27] 按照[26]所述的人巨蛋白作为疾病检测标志的用途，其中，

其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肺病。

[28] 按照[26]所述的人巨蛋白作为疾病检测标志的用途, 其中, 其中观测到有巨蛋白表达的器官疾病是肾病。

[29] 按照[28]所述的人巨蛋白作为疾病检测标志的用途, 其中, 肾病是肾小管性疾病。

## 本发明的效果

本发明的方法能够以高灵敏度和准确性测量样本(如尿)中的人巨蛋白。当表达巨蛋白的细胞、组织或器官的功能受损时, 巨蛋白从细胞中逸出并在样本中积累。具体说来, 样本中人巨蛋白的测量使得可以直接检测和诊断细胞、组织或器官的功能障碍, 而不是间接的检测和诊断。因此, 用本发明的方法测量样本中人巨蛋白, 使得可以在早期以高准确性检测观察到巨蛋白表达的器官的疾病, 如肾或肺疾病。

本说明书包括日本专利申请号 2006-089306 的说明书和/或附图中所公开的部分或全部内容, 该专利申请是本申请的优先权文件。

## 附图简述

图 1 显示人巨蛋白的基因座和一般蛋白结构。

图 2 显示使用标准人巨蛋白检测人巨蛋白的 ELISA 校准曲线。

图 3 显示尿中人巨蛋白的临床结果(第 1 部分)。

图 4 显示尿中人巨蛋白的临床结果(第 2 部分)。

## 实施本发明的最佳模式

本发明涉及测量样本中人巨蛋白的方法。SEQ ID NO: 1 显示了人巨蛋白的核苷酸序列, SEQ ID NO: 2 显示了人巨蛋白的氨基酸序列。

在本发明中, 使用结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体来测量人巨蛋白。用于常规免疫分析的任何固体支持物都可以使用。例如, 塑料微量滴定板的孔或磁性微粒可能优选被使用。

能结合人巨蛋白的配体的一个例子是抗人巨蛋白抗体, 单克隆抗

体或多克隆抗体均可使用。

此外，特异针对人巨蛋白糖链的凝集素可用作能结合人巨蛋白的配体。凝集素的例子包括但不限于：伴刀豆球蛋白 A、麦胚凝集素(WGA)、蓖麻(*Ricinus communis*)凝集素(RCA)和小扁豆凝集素(LCA)。

另外，能结合人巨蛋白的配体的例子包括选自下列的物质：维生素结合蛋白，如钴胺传递蛋白-维生素 B<sub>12</sub>、维生素 D 结合蛋白或视黄醇结合蛋白；脂蛋白，如载脂蛋白 B、载脂蛋白 E、载脂蛋白 J/簇蛋白、或载脂蛋白 H；激素，如甲状旁腺激素(PTH)、胰岛素、上皮生长因子(EGF)、催乳素、瘦蛋白或甲状腺球蛋白，上述任一种的受体或这类激素的受体；免疫或应激反应相关蛋白，如免疫球蛋白轻链、PAP-1 或  $\beta_2$ -微球蛋白；酶，如 PAI-I、PAI-I-尿激酶、PAI-I-tPA、尿激酶原、脂蛋白脂肪酶、纤溶酶原、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\alpha_1$ -微球蛋白或溶菌酶，上述任一种的抑制剂或这类酶的抑制剂；药物或毒素，如氨基糖苷类、多粘菌素 B、抑肽酶或天花粉蛋白；载体蛋白，如白蛋白、乳铁蛋白、血红蛋白、气味结合蛋白、甲状腺素视黄质运载蛋白或 L-FABP；和受体相关蛋白(RAP)，如细胞色素 c、钙(Ca<sup>2+</sup>)、渐进性糖化终产物(AGE)、cubilin 或 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交换转运蛋白同种型 3 (NHE3)] 或这些物质的结合片段。用于此处的术语“结合片段”是指上述物质中包含结合人巨蛋白的位点的片段。

能结合人巨蛋白的配体，如抗人巨蛋白抗体，可以通过本领域众所周知的技术结合到固体支持物上。当将配体结合到微量滴定板孔上时，将约 3-10  $\mu\text{g/ml}$  (优选约 5 $\mu\text{g/ml}$ )的能结合人巨蛋白的配体(如抗体)施加到固体支持物，然后使生成物在 4°C 静置过夜(优选 12 小时或更长时间)。当固定全长抗体时，根据理论确定出上述提到的固体支持物的推荐密度。

根据下述公式确定密度：

$$Q = (2 / \sqrt{3}) \cdot (MW / N) \cdot (2r)^2 \cdot 10^9 \quad (\text{ng} / \text{cm}^2)$$

Q: 分子量密度( $\text{ng}/\text{cm}^2$ )

MW: 分子量 (道尔顿: Da)

N: 阿伏伽德罗数 =  $6 \cdot 10^{23}$  (mole<sup>-1</sup>)

r: 分子的斯托克斯半径 =  $(R \cdot T_{20}) / (6 \cdot \pi \cdot \eta_{20} \cdot D_{20} \cdot N)$  (cm)

R: 气体常数 =  $8.3 \cdot 10^7$  (g·cm<sup>2</sup>·sec<sup>-2</sup>·°K<sup>-1</sup>·mole<sup>-1</sup>)

T<sub>20</sub>: 室温 (20°C) = 293°K

η<sub>20</sub>: 在 20°C 时水的粘度 =  $1 \cdot 10^{-2}$  (g·cm<sup>-1</sup>·sec<sup>-1</sup>)

D<sub>20</sub>: 在 20°C 时分子参考物对水的差分系数 (cm<sup>2</sup>·sec<sup>-1</sup>)

在借助物理吸附进行固定时这种值是适用的。当固定能结合人巨蛋白的配体时，确定相应固体支持物的理论密度，该密度受上述变异系数(如各自的分子量)影响。所以，密度随各个固体支持分子的类型、固相的构造或其它条件而变化。因此，密度并不限于上述的值。此外，当通过共价结合附着于固体支持物上时，在本发明中使用该密度。在这种情况下，存在于吸附表面并用于共价结合的官能团数目也被纳入考虑。固体支持物的密度并没有限制。基于常规技术，在结合后，用牛血清白蛋白(以下简称为“BSA”)或酪蛋白进行封闭，目的是封闭蛋白质的非特异性吸附位点。当固体支持物是磁珠时，用与微量滴定板同样的方法处理固体支持物。

使结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的配体(如抗人巨蛋白抗体)与样本反应，样本中的人巨蛋白通过配体-受体结合反应，如抗原抗体反应，借助于结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的配体而结合于固体支持物。具体地讲，形成结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体(如抗人巨蛋白抗体)和人巨蛋白的复合物。任何样本均可使用，只要它含有人巨蛋白。样本的实例包括尿、肺泡洗液、血液、血清、血浆和呼出空气的凝结物。该抗原抗体反应可在 4°C 至 45°C 进行，更优选在 20°C 至 40 °C、进一步优选在 25°C 至 38°C 进行。反应的持续时间是大约 10 分钟至 18 小时，更优选 10 分钟至 1 小时，进一步优选 30 分钟到 1 小时。

在洗涤后，使能结合人巨蛋白的第二配体与结合于固体支持物的

样本中的人巨蛋白反应。具体地讲，形成结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体(如抗人巨蛋白抗体)、人巨蛋白和能结合人巨蛋白的第二配体的复合物。作为能结合人巨蛋白的第二配体，可以使用与用作能结合人巨蛋白的第一配体相同的物质，如抗人巨蛋白抗体。但是，当能结合人巨蛋白的第一配体和能结合人巨蛋白的第二配体都是抗人巨蛋白的单克隆抗体时，被第一抗人巨蛋白抗体识别和结合的表位需要与被第二抗人巨蛋白抗体识别和结合的表位不同。第一抗人巨蛋白抗体和第二抗人巨蛋白抗体的组合可以是下列任意组合：单克隆抗体和单克隆抗体、单克隆抗体和多克隆抗体、多克隆抗体和单克隆抗体以及多抗体和多克隆抗体。反应可在 4°C 至 45°C 进行，更优选在 20 °C 至 40 °C、进一步优选在 25°C 至 38°C 进行。反应的持续时间是大约 10 分钟至 18 小时，更优选 10 分钟至 1 小时，进一步优选 30 分钟到 1 小时。于是，能结合人巨蛋白的第二配体，借助于人巨蛋白和能结合人巨蛋白的第一配体而被结合于固体支持物。

经过洗涤后，测量结合于固体支持物上的能与人巨蛋白结合的第二配体(如第二抗人巨蛋白抗体)。这可以借助在免疫分析领域普遍采用的各种各样技术来进行。例如，将能结合人巨蛋白的第二配体标记上酶、荧光、生物素或放射性标记，以制备酶标记物质。通过分析这类标记，可以测量能与结合于固体支持物的人巨蛋白结合的第二配体。特别优选用酶或荧光来标记。酶的例子包括过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶；荧光的例子是异硫氰酸荧光素(FITC)，虽然标记并不仅限于此。标记的检测可以如下进行：使相应底物与酶标记的物质发生反应，然后测量所产生的染料、荧光、发射等。当能与人巨蛋白结合的第二配体未被标记时，使带标记的第三抗体与能结合人巨蛋白的第二配体发生反应，可以基于这种标记来测量第三抗体。于是，也可以测量能结合人巨蛋白的第二配体。

固体支持物或用于标记的抗人巨蛋白抗体可以是对人巨蛋白有特异性的免疫球蛋白片段(如 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub>)，或以表达为重组子的重

组抗体(如 scFv、dsFv、双倍体或微型抗体(minibody))。在本发明中,术语“抗体”还指对人巨蛋白有特异性的片段。制备这类片段的方法是本领域众所周知的。

上述方法包含以下两个步骤:结合于固体支持物上的能与人巨蛋白结合的第一配体(如抗人巨蛋白抗体)与样本之间的反应,随后是在洗涤后能与人巨蛋白结合的第二配体与样本之间的反应。可替代地,也可以采用包含单一步骤的方法,其中结合于固体支持物上的能结合人巨蛋白的第一配体(如抗人巨蛋白抗体)与样本之间的反应,和能结合人巨蛋白的第二配体与样本之间的反应同时进行。

本发明还包括用人巨蛋白或人巨蛋白的部分片段和能结合人巨蛋白的配体来测量样本中人巨蛋白的方法,其中所述人巨蛋白或人巨蛋白部分片段被结合于固体支持物上,该方法包括:使样本与能结合人巨蛋白的配体反应,使反应产物与结合于固体支持物上的人巨蛋白反应,测量能与被结合于固体支持物的人巨蛋白结合的配体,根据能与被结合于固体支持物的人巨蛋白结合的配体百分率的减少,竞争性定量样本中的人巨蛋白。此方法需要将人巨蛋白结合到固体支持物,这种结合可按照将物质结合到固体支持物的方法进行。此外,对人巨蛋白的部分片段并没有限制,可以使用能结合人巨蛋白的配体所结合的人巨蛋白部分片段。作为人巨蛋白的部分片段,SEQ ID NO:2 所示的人巨蛋白氨基酸序列的部分序列可以通过化学合成或基因工程来制备。可以使用上述能结合人巨蛋白的配体,特别优选抗人巨蛋白抗体。在竞争性方法中,结合于固体支持物的人巨蛋白或人巨蛋白部分片段和能结合人巨蛋白的配体的用量是重要的。竞争性方法是已知的技术,可以基于已知技术可以适当地确定该量。

进一步,本发明包含用能结合人巨蛋白的配体来测量人巨蛋白的方法,该方法包括:使样本同能与结合于微粒上的人巨蛋白结合的配体发生反应以诱导凝集,基于所导致的凝集程度测量人巨蛋白。

用于本方法的微粒的例子包括直径为 0.05 - 10 $\mu$ m 的微粒,优选

直径为 0.1 - 0.4 $\mu\text{m}$  的乳胶微粒、直径在 0.5 - 10 $\mu\text{m}$  的明胶微粒和动物红细胞。可以通过本领域众所周知的方法如物理吸附或共价结合，将抗体结合到微粒上，。

在此方法中，如在黑色载玻片上将结合有抗人巨蛋白抗体的微粒与样本混合，观察由于凝聚而产生的微粒沉淀。于是，可检测样本中的人类巨蛋白。此外，可测量凝集的吸收以定量人巨蛋白。此外，也可以通过脉冲免疫测定法来检测人巨蛋白。

本发明的测量人巨蛋白的方法使得不仅可以测量完整的人巨蛋白，还可以测量人巨蛋白的片段。

通过测量样本中的人巨蛋白，可评估从中获取样本的受试者在表达人巨蛋白的细胞、组织、器官中是否患有疾病。具体地讲，可检测或诊断器官疾病等。

任何细胞、组织或器官都可以是靶标，只要其中观察到巨蛋白表达。优选肺和肾，更优选肾脏。就肾病而言，可特别检测肾炎或肾小管性疾病。另外，糖尿病性肾病也能够得到充分检测。此外，这些细胞、组织或器官也可用于检测代谢综合症或代谢综合症相关性肾病。

在上述患有细胞、组织或器官功能障碍的受试者中，人巨蛋白从细胞泄露，样本中人巨蛋白量增加。当体外测量取自受试者的样本中的人巨蛋白，而且与取自健康个体的人巨蛋白浓度比较，样本中人巨蛋白的浓度显著增强时，该受试者可以被诊断为患有细胞、组织或器官功能障碍。

如上所述，尿、肺泡洗液、血液、血清、血浆、呼出的空气冷凝等均可用作样本。在欲检测肺病时，特别优选使用肺泡洗液。在欲检测肾脏病时，优选使用尿液。

此外，测量从受试者取得的样本中的人巨蛋白，使得可以评估患有细胞、组织或器官功能障碍如肾病的危险性。当体外测量取自受试者的样本中的人巨蛋白，而且与取自健康个体的人巨蛋白浓度比较，样本中人巨蛋白的浓度显著增强时，该受试者可被评估为很可能患有

有细胞、组织或器官功能障碍。也就是说，测量样本中人巨蛋白使得能够筛选很有可能患病的受试者，如将出现肾病的患者，并提供适当的治疗。

进一步，定期测量从受试者获得的样本中人巨蛋白和监测人巨蛋白浓度，使得可以控制器官功能。

人巨蛋白可用作标志，用于检测或诊断其中观测有人巨蛋白表达的细胞、组织或器官的功能障碍。本发明包括人巨蛋白的应用，用作用于检测功能障碍、即其中观测有巨蛋白表达的器官的疾病的标志。本发明还进一步包括疾病检测/诊断标志，用于检测和诊断功能紊乱，即其中观测有巨蛋白表达的细胞、组织或器官的疾病。

此外，当检测或诊断功能紊乱、即其中观测有巨蛋白表达的细胞、组织或器官的疾病时，也可以通过测量人巨蛋白的片段以及完整的人巨蛋白。

## 实施例

以下将参考实施例更详细地描述本发明，尽管本发明并不限于这些实施例。应该指出的是，实施例中使用的酶联免疫吸附测定(ELISA)，自 Engvall E.和 Perlmann P.在 1971 年首次报道后，迄今为止已有许多研究人员报道。这种技术的使用已有坚实的基础(Engvall E, Perlmann P., 1971, *Immunochemistry*, 8, 871-874)。

以下将参考实施例更详细地描述本发明，尽管本发明并不限于这些实施例。

## 借助酶联免疫吸附测定(ELISA)检测尿中的人巨蛋白

### (1)制备小鼠抗人巨蛋白单克隆抗体

用 50 $\mu$ g 带佐剂的人巨蛋白经腹腔免疫小鼠几次，确认了血清效价升高。在加强注射(静脉免疫)后 3 天，取出脾脏并获得脾细胞。在聚乙二醇 3500 存在下，将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合(10:1)以制备

杂交瘤细胞。将产生的细胞在 CO<sub>2</sub> 存在下于 37°C 培养 1 周，监测在培养液上清中是否存在抗人巨蛋白抗体。通过限制稀释法对其中观察到有抗体产生的阳性孔内的细胞进行稀释，将产物培养 2 周，以同样的方式检查培养液上清中是否存在抗人巨蛋白抗体。此后，通过限制稀释法对其中观察到有抗体产生的阳性孔内的细胞进行稀释，并以同样的方式培养产物。在这一阶段，将其中有抗人巨蛋白抗体产生的细胞在烧瓶中培养，将其中的部分悬浮在含 10% 二甲基亚砷(DMSO)(5×10<sup>6</sup> 细胞/ml)的胎牛血清(FCS)，将产物储存在液氮中。

随后，用孔内的上清检查培养液上清内产生的抗人巨蛋白抗体的反应性。将人巨蛋白溶解于 140 mM 氯化钠、2.7 mM 氯化钾、10 mM 磷酸氢二钠和 1.8 mM 磷酸二氢钾(pH 值 7.3; 以下简称“PBA, pH7.3”)。向塑料微量滴定板(Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Module F8 Maxisorp<sup>TM</sup> Surface plate, Nalge Nunc International)的孔内，每孔加入 100 μl 人巨蛋白的 PBS 溶液(pH 7.3); 然后，将人巨蛋白以 3 pmol/孔的浓度固定在微量滴定板上，于 4°C 固定 12 小时。之后，通过倾析去除已经加入孔内的人巨蛋白的 PBS 溶液(pH 7.3)，将 145 mM 氯化钠、3.6 mM 磷酸氢二钠、1.4 mM 磷酸二氢钾和 0.05% (v./v.) 吐温 20 (以下简称为“PBS-T”)加入微量滴定板的孔内(200 μl/孔)，通过倾析去除 PBS-T，洗去孔内超量吸附的人巨蛋白。该洗涤程序总共进行两次。随后，加入含 145 mM 氯化钠、7.2 mM 磷酸氢二钠、2.8 mM 磷酸二氢钾、1% (wt./v.) BSA 和 5% (wt./v.) 乳糖 (以下简称为“抗原结合化板的封闭溶液)，200 μl / 孔，将已结合有人巨蛋白的微量滴定板孔内壁于 4°C 封闭 12 个小时。此后，将所得物储存在 4°C。为了检查培养上清内抗体的反应性，可使用封闭处理后已结合有人巨蛋白的微量滴定板。向固定有人巨蛋白的微量滴定板孔内加入 100 μl/孔的杂交瘤细胞培养液上清，将微量滴定板在 37°C 加热 1 个小时。此后，通过倾析去除已加入孔内的培养液上清，将 PBS-T 以 200 μl/孔加入微量滴定板的孔内，通过倾析去除 PBS-T，并洗涤孔的内壁。该洗涤程序总共进行三次。此后，将过氧

化物酶缀合的山羊抗小鼠免疫球蛋白(DAKO)以 100  $\mu\text{l}$ /孔加入孔内(2000 倍稀释, 0.55  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 将产物在 37°C 加热 1 小时。用 145mM 氯化钠、3.6mM 磷酸氢二钠、1.4mM 磷酸二氢钾、0.05% (v./v.)吐温 20 和 0.5% (wt./v.)BSA 的溶液(以下简称为“酶标记抗体的稀释液”)稀释酶标记抗体。此后, 通过倾析去除已加入孔内的酶标记抗体, 将 PBS-T 以 200 $\mu\text{l}$ /孔加入微量滴定板的孔内, 通过倾析去除 PBS-T, 并且洗涤孔的内壁。该洗涤程序总共进行三次。此后, 将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(以下简称“TMB”)溶液(TMB 一步法底物系统: DAKO)加入孔内(100  $\mu\text{l}$ /孔), 作为过氧化物酶反应的底物溶液, 使产物在 25°C 静置 30 分钟。紧接着, 将 313 mM 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液(以下简称为“反应终止液”)以 100  $\mu\text{l}$ /孔加入到孔内的反应底物溶液中, 以终止孔内的酶反应。此后, 测量各孔的吸光度, 用 450 nm 的吸光度减去 630 nm 的吸光度, 得到的值被指定为反应性评价指标(Josephy P.D., Mason R.P.等, 1982, J. Biol. Chem. 257, 3669-3675)。自 Bos E. S.等在 1981 年首次报道后, 迄今为止, 已有许多有关基于 TMB 的比色法的报导, 该技术的使用有坚实的基础(Bos E. S.等, 1981, J. Immunoassay, 2, 187-204)。

结果, 筛选出了对固定化人巨蛋白表现出强反应活性的抗人巨蛋白抗体的单克隆杂交瘤细胞, 用小鼠免疫球蛋白分类试剂盒(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 在培养液上清中检查了有关来自 100  $\mu\text{l}$  贮存培养液上清溶液的每一个克隆的免疫球蛋白类别和亚类。基于所述结果, 从所得的单克隆细胞库中筛选出 IgG 类克隆, 然后按如下所述程序进行腹水制备。

随后, 在 25 毫升烧瓶中培养这些细胞, 然后在 75 毫升烧瓶中培养。将这些细胞腹腔注射到经姥鲛烷处理的小鼠, 并抽取腹水样本。

## (2) 纯化小鼠抗人巨蛋白单克隆(IgG)抗体

将获得的腹水(10 毫升)按 1:1.5 体积比与混浊血清处理试剂 [FRIGEN (注册商标) II: Kyowa Pure Chemical Co., Ltd.]混合, 振荡和

搅拌生成物 1 - 2 分钟以使腹水脱脂。将腹水以 3000 rpm ( $1930 \times g$ ) 离心 10 分钟, 分级分离出澄清腹水的离心上清液(10 ml)。将该腹水离心上清(10 ml)在冰浴中用硫酸铵分级分离(终浓度: 50 %饱和硫酸铵) 1 小时, 用 PBS 悬浮并溶解沉淀的免疫球蛋白部分。此硫酸铵分级分离过程共进行两次, 以从腹水中获得免疫球蛋白组分粗制品。将所得的免疫球蛋白组分粗制品(10 ml)与等量的 20 mM 磷酸钠[pH 7.0; 以下简称“20 mM NaPB (pH 7.0)”]混合, 然后用 G 蛋白柱(HiTrap Protein G HP, 5 ml; Amersham BioSciences)进行亲和纯化。将样本吸附在 G 蛋白柱后, 用 20 mM NaPB (pH 7.0, 50 ml)冲洗该 G 蛋白柱, 样本中除 IgG 以外的杂质被洗去。然后, 亲和吸附在 G 蛋白柱的 IgG 抗体用 0.1 M 盐酸甘氨酸(pH 2.7)洗脱, 洗脱后即刻从柱中流出的洗脱部分用 1M 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(pH 9.0)中和并回收(以下“三(羟甲基)氨基甲烷”缩写为“Tris”)。中和后, 在 4°C 用以 500 倍于亲和纯化产物的量的 PBS 透析该亲和纯化产物 6 小时, 此透析过程共进行两次。透析用的透析膜是透析用纤维素管(Viskase Companies)。所得的 IgG 洗脱部分被称为纯化的抗人巨蛋白单克隆抗体, 并储存于 4°C, 再进行如下所述的程序。通过将上述 G 蛋白柱以恒定流速 1 ml/min 连接到 BioLogic LP System (Bio Rad Laboratories), 进行纯化过程。

### (3)制备固定有抗人巨蛋白单克隆抗体的微量滴定板

用 PBS (pH 7.3)溶解纯化抗人巨蛋白单克隆抗体, 使其终浓度为 5 $\mu$ g/ ml。向塑料微量滴定板(Nunc-Immuno<sup>TM</sup>Module F8 Maxisorp<sup>TM</sup> Surface plate, Nalge Nunc International)的孔内, 加入抗人巨蛋白单克隆抗体的 PBS 溶液(pH 7.3), 每孔 100 $\mu$ l, 并使抗人巨蛋白单克隆抗体在微量滴定板上于 4°C 固定 12 小时。之后, 通过倾析去除孔内的抗人巨蛋白单克隆抗体的 PBS 溶液(pH 7.3), 将 PBS-T 加入微量滴定板的孔内(200  $\mu$ l/孔), 通过倾析去除 PBS-T, 洗去孔内超量吸附的抗人巨蛋白单克隆抗体。该洗涤程序总共进行两次。然后, 加入 86 mM 氯化钠、

100 mM Tris、0.5% (wt./v.) BSA 和 0.05% (v./v.)吐温 20(以下简称为“抗体固定化板的封闭溶液”), 200  $\mu$ l /孔, 将已固定有抗人巨蛋白单克隆抗体的微量滴定板孔内壁于 4 $^{\circ}$ C 封闭 12 个小时。然后, 将生成物储存于 4 $^{\circ}$ C。

#### (4)制备过氧化物酶标记的抗人巨蛋白单克隆抗体

将辣根过氧化物酶(以下简称为“HRP”)(源自辣根的过氧化物酶, VI 型, Sigma)以 4 mg/ml 溶解于纯水, 向 500 $\mu$ l HRP 溶液(2 mg)加入 100 $\mu$ l 的 100 mM 偏过碘酸钠溶液, 在室温搅拌混合物 20 分钟。用体积量 500 倍于该 HPR 溶液的 1 mM 醋酸钠溶液(pH 4.0)(以下称为“1 mM 醋酸缓冲液”)透析此生成物, 4 $^{\circ}$ C 透析 6 小时, 该程序进行两次。透析用的透析膜是透析用纤维素管(Viskase Companies)。随后, 将抗人巨蛋白单克隆抗体溶解于 2.4 mM 碳酸钠和 7.6 mM 碳酸氢钠的溶液(pH 9.6)(以下简称为“10 mM 碳酸缓冲液”), 浓度为 8 mg/ml。向 500 $\mu$ l HRP 溶液(2 mg)加入 1/3 体积的 120 mM 碳酸钠和 380 mM 碳酸氢钠的溶液(pH 9.6)(以下简称为“0.5 M 碳酸缓冲液”), 再加入 500  $\mu$ l 上述抗人巨蛋白单克隆抗体(4 mg), 此生成物在室温下搅动 2 小时。此后, 加入 50  $\mu$ l 硼氢化钠溶液(4 mg/ml), 此生成物在室温下搅动 2 小。在冰浴中将此生成物用硫酸铵分级分离(终浓度: 50%饱和硫酸铵) 1 小时, 沉淀部分悬浮和溶解在 1 ml 的 100 mM Tris、145 mM 氯化钠和 1% (v./v.) BSA 溶液(pH 7.6) (以下被称为“标记抗体的悬浮液”)中。该硫酸铵分级分离处理共进行两次, 将 2.8 mM 磷酸二氢钾、7.2 mM 磷酸氢二钠、145 mM 氯化钠、1% (wt./v.) BSA、0.02% (v./v.)苯酚和 40% (wt./v.) D-山梨醇溶液(以下被称为“标记抗体储存液”), 按标记抗体溶液的 3/4 体积, 加入到标记抗体溶液(以下被称作“标记抗体储存液”)中。获得 HRP 标记的抗人巨蛋白单克隆抗体。自从 Nakane, P. K.和 Kawaoui, A.在 1974 年首次报导后, 已有许多关于 HRP 标记方法的报导。因此, 该技术的使用有坚实基础(Nakane, P. K., Kawaoui, A., 1974, J.

Histochem. Cytochem. 22, 1084).

### (5)测量尿中的人巨蛋白

使用上述固定有抗人巨蛋白单克隆抗体的微量滴定板和 HRP 标记的抗人巨蛋白单克隆抗体来测量尿液中的人巨蛋白。首先, 将 90 $\mu$ l 肾小球滤过液与 10  $\mu$ l 2 M Tris 和 0.2 M 乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸溶液(以下“乙二胺-N,N,N',N'-四乙酸”缩写为 EDTA, pH 为 8.0)混合, 将 100 $\mu$ l 所得溶液加入到固定有抗人巨蛋白单克隆抗体的微量滴定板的孔中。使生成物在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时, 通过倾析去除孔中已加入的尿样溶液, 向微量滴定板的孔中加入 PBS-T (200 ml/孔), 通过倾析去除 PBS-T, 然后洗涤。洗涤过程进行三次。此后, 加入 HRP 标记的抗人巨蛋白单克隆抗体溶液(用稀释标记抗体溶液将上述储存液稀释 10000 倍), 100  $\mu$ l/孔。使生成物在 37 $^{\circ}$ C 静置 1 小时, 通过倾析去除孔中已加入的 HRP 标记抗体溶液, 向微量滴定板的孔中加入 PBS-T (200  $\mu$ l/孔), 通过倾析去除 PBS-T, 然后洗涤。洗涤过程进行三次。随后, 将 100  $\mu$ l/孔的 TMB 溶液(TMB 一步法底物系统; DAKO)加入孔中作为过氧化物酶反应的底物溶液, 让生成物在 25 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。紧接着, 将反应终止液加入到孔内的底物溶液中, 100  $\mu$ l/孔, 以终止孔内的酶反应。此后, 测量孔内的吸光度, 450 nm 的吸光度减去 630 nm 的吸光度得到的值被指定作为评价尿中人巨蛋白测量值的指标。作为校准曲线的参考样本, 在使用抗人巨蛋白单克隆抗体制剂时, 使用人巨蛋白作为免疫抗原, 分析结果示于表 1 和图 2。尿液中人巨蛋白的实际临床测量结果示于表 2、图 3 和图 4。结果发现, 与健康个体相比, 肾病患者和将患肾病的患者排出到尿液中的人巨蛋白量显著增高(图 3 和 4)。有关排出到尿液中的巨蛋白量的肌酐清除试验也得到类似结果。这表明, 尿排泄时间的浓度将无关紧要(图 3 和 4)。本发明提供了测量人巨蛋白的方法, 与传统的技术比较, 这种方法可以在较短的时间以较简单方法完成, 而且还可以定量人巨蛋白。进一步, 本发明使得能够在

早期以定点方式诊断细胞、组织或器官特有的功能性疾病的方法。上述临床结果明显支持本发明的这种特征。

表 1

[h-巨蛋白] (nM)	检测人巨蛋白的ELISA校准曲线				
	n = 1	n = 2	n = 3	平均值	S.D.
6.250	2.4356	2.4416	2.3576	2.4116	0.0469
3.125	1.2551	1.2596	1.2261	1.2469	0.0182
1.563	0.6288	0.6576	0.6358	0.6407	0.0150
0.781	0.3282	0.3296	0.3282	0.3287	0.0008
0.313	0.1341	0.1359	0.1370	0.1357	0.0015
0.156	0.0788	0.0917	0.0858	0.0854	0.0065
0.078	0.0582	0.0638	0.0727	0.0649	0.0073
0.031	0.0390	0.0503	0.0468	0.0454	0.0058
0.000	0.0465	0.0409	0.0431	0.0435	0.0028

表 2

项目		尿肌酐	尿巨蛋白		
测量方法		酶法: 比色法	ELISA		
样本背景	样本号	[u-Cre]	O.D. (450nm)- O.D. (630nm)	[巨蛋白]	肌酐清除
		(mg/dl)		(nM)	(nmol巨蛋白 /g Cre)
糖尿病	D-1	117.96	0.241	0.513	0.435
	D-2	68.16	0.110	0.168	0.246
	D-3	102.53	0.102	0.146	0.142
肾病	N-1	178.52	2.472	6.398	3.584
	N-2	33.55	0.459	1.088	3.243
	N-3	41.24	0.161	0.302	0.732
	N-4	78.29	0.110	0.168	0.215
	N-5	36.97	0.129	0.218	0.590
代谢综合症	M-1	302.32	0.169	0.323	0.107
	M-2	59.56	0.086	0.104	0.175
健康个体	H-1	44.11	0.061	0.038	0.086
	H-2	92.72	0.082	0.094	0.101
	H-3	134.72	0.056	0.025	0.019
	H-4	123.59	0.063	0.044	0.036
	H-5	104.31	0.052	0.015	0.014
	H-6	96.64	0.050	0.009	0.009

此文中引用的所有出版物、专利和专利申请的全部内容在此引作参考。

<110> NIIGATA UNIVERSITY; DENKA SEIKEN Co., Ltd.

<120> 检测人巨蛋白的方法

<130> PH-3116-PCT

<150> JP 2006-089306

<151> 2006-03-28

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13968

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggatcgcg ggccggcagc agtggcgtgc acgctgctcc tggctctcgt cgcctgccta 60
gcgccggcca gtggccaaga atgtgacagt gcgcattttc gctgtggaag tgggcattgc 120
atccctgcag actggagggtg tgatgggacc aaagactgtt cagatgacgc ggatgaaatt 180
ggctgcgctg ttgtgacctg ccagcagggc tatttcaagt gccagagtga gggacaatgc 240
atccccagct cctgggtgtg tgaccaagat caagactgtg atgatggctc agatgaacgt 300
caagattgct cacaaagtac atgctcaagt catcagataa catgctcaa tggtcagtgt 360
atcccaagtg aatacaggtg cgaccacgtc agagactgcc ccgatggagc tgatgagaat 420
gactgccagt acccaacatg tgagcagctt acttgtgaca atggggcctg ctataacacc 480
agtcagaagt gtgattgga agttgattgc agggactcct cagatgaaat caactgcact 540
gagatatgct tgcacaatga gttttcatgt ggcaatggag agtgtatccc tcgtgcttat 600
gtctgtgacc atgacaatga ttccaagac ggcagtgatg aacatgcttg caactatccg 660
acctgcggtg gttaccagtt cacttgcccc agtggccgat gcatttatca aaactgggtt 720
tgtgatggag aagatgactg taaagataat ggagatgaag atggatgtga aagcggctct 780
catgatgttc ataatgttc cccaagagaa tggctttgcc cagagtcggg acgatgcac 840
tccatttata aagtttgtga tgggatttta gattgccag gaagagaaga tgaaaacaac 900
actagtaccg gaaaatactg tagtatgact ctgtgctctg ccttgaactg ccagtaccag 960
tgccatgaga cgccgtatgg aggagcgtgt tttgtcccc caggttatat catcaaccac 1020
aatgacagcc gtacctgtgt tgagtttgat gattgccaga tatggggaat ttgtgaccag 1080
aagtgtgaaa gccgacctgg ccgtcacctg tgccactgtg aagaagggtat tatcttgag 1140
cgtggacagt attgcaaagc taatgattcc tttggcgagg cctccattat cttctccaat 1200
ggtcgggatt tgtaattgg tgatattcat ggaaggagct tccggatcct agtggagtct 1260
cagaatcgtg gaggggccgt ggtgtggct ttccactatc acctgcaaag agtttttttg 1320
acagacaccg tgcaaaataa gttttttca gttgacatta atggttttaa tatccaagag 1380
gttctcaatg tttctgttga aacccagag aacctggctg tggactgggt taataataaa 1440
atctatctag tggaaaccaa ggtcaaccgc atagatatgg taaatttggga tggagctat 1500
cgggttacc ttataactga aaacttgggg catcctagag gaattgccgt ggaccaact 1560

```

gttggttatt tatttttctc agattgggag agcctttctg gggaacctaa gctggaaagg 1620  
 gcattcatgg atggcagcaa ccgtaaagac ttggtgaaaa caaagctggg atggcctgct 1680  
 gggtaactc tggatatgat atcgaagcgt gtttactggg ttgactctcg gtttgattac 1740  
 attgaaactg taacttatga tggaaattcaa aggaagactg tagttcatgg aggctccctc 1800  
 attcctcatc cctttggagt aagcttattt gaaggtcagg tgttctttac agattggaca 1860  
 aagatggccg tgctgaagc aaacaagttc acagagacca acccacaagt gtactaccag 1920  
 gcttccctga ggccctatgg agtgactggt taccattccc tcagacagcc ctatgctacc 1980  
 aatccgtgta aagataacaa tgggggctgt gagcaggctt gtgttctcag ccacagaaca 2040  
 gataatgatg gtttggggtt ccgttgcaag tgcacattcg gcttccaact ggatacagat 2100  
 gagcgcact gcattgctgt tcagaatttc ctcatTTTT catccaagt tgctattcgt 2160  
 gggatcccg tccactgtc taccaggaa gatgtcatgg ttccagtttc ggggaatcct 2220  
 tctttctttg tcgggattga ttttgacgcc caggacagca ctatctttt ttcagatatg 2280  
 tcaaacaca tgatttttaa gcaaaagatt gatggcacag gaagagaaat tctcgcagct 2340  
 aacagggttg aaaatgttga aagtttggct tttgattgga ttcaaagaa tctctattgg 2400  
 acagactctc attacaagag tatcagtgtc atgaggctag ctgataaac gagacgcaca 2460  
 gtagttcagt atttaaataa cccacggtcg gtggtagttc atccttttgc cgggtatcta 2520  
 ttcttactg attggttccg tctgtctaaa attatgagag catggagtga cggatctcac 2580  
 ctcttgctg taataaacac tactcttggg tggccaatg gcttggccat cgattgggct 2640  
 gcttcacgat tgtactgggt agatgcctat tttgataaaa ttgagcacag cacctttgat 2700  
 ggtttagaca gaagaagact gggccatata gagcagatga cacatccgtt tggacttgc 2760  
 atctttggag agcatttatt ttttactgac tggagactgg gtgccattat tcgagtcagg 2820  
 aaagcagatg gtggagaaat gacagttatc cgaagtggca ttgcttcat actgcatttg 2880  
 aaatcgtatg atgtcaacat ccagactggt tctaacgcct gtaatcaacc cacgcacct 2940  
 aacggtgact gcagccactt ctgcttccc gtgccaaatt tccagcgagt gtgtgggtgc 3000  
 ccttatggaa tgaggctggc ttccaatcac ttgacatgcg agggggacc aaccaatgaa 3060  
 ccaccacagg agcagtggtg cttatittcc tccccgtga aaaatggcag atgtgtgccc 3120  
 aattactatc tctgtgatgg agtcgatgat tgtcatgata acagtgatga gcaactatgt 3180  
 ggcacactta ataatactg ttcatcttcg gcgttacct gtggccatgg ggagtgcatt 3240  
 cctgcacact ggcgctgtga caaacgcaac gactgtgtgg atggcagtga tgagcacaac 3300  
 tgccccacc acgcacctgc ttctgcctt gacaccaat acacctgtga taatcaccag 3360  
 tgatctcaa agaactgggt ctgtgacaca gacaatgatt gtgggatgg atctgatgaa 3420  
 aagaactgca attcgacaga gacatgcaa cctagtcagt ttaattgccc caatcatcga 3480  
 tgtattgacc tatcgtttgt ctgtgatggt gacaaggatt gtgtgatgg atctgatgag 3540  
 gttggttg tattaactg tactgcttct caattcaagt gtgccagtgg ggataaatgt 3600  
 attggcgtca caaatcgtt tgatggtgtt tttgattgca gtgacaactc ggatgaagcg 3660  
 ggctgtcaa ccaggctcc tggatgtgc cactcagatg aattcagtg ccaagaagat 3720  
 ggtatctgca tcccgaact ctgggaatg gatggcacc cagactgcct ctatggatct 3780  
 gatgagcaca atgcctgtgt ccccaagact tgcccttcat catatttcca ctgtgacaac 3840  
 ggaaactgca tccacagggc atggctctgt gatcgggaca atgactgcgg ggatatgagt 3900  
 gatgagaagg actgccttac tcagccctt cgctgccta gttggcaatg gcagtgtctt 3960  
 ggccataaca tctgtgtgaa tctgagtgtg gtgtgtgatg gcacttttga ctgccccaat 4020  
 gggacagatg agtccccact ttgcaatggg aacagctgct cagatttcaa tgggtggtgt 4080  
 actcagcagt gtgttcaaga gccctttggg gctaaatgcc tatgtccatt gggattctta 4140  
 cttgccaatg attctaagac ctgtgaagac atagatgaat gtgatattct aggcctttgt 4200  
 agccagcact gttacaatat gagaggttct ttccggtgct cgtgtgatac aggcctacatg 4260  
 ttagaaagtg atgggaggac ttgcaaagt acagcatctg agagtctgct gttacttgtg 4320  
 gcaagtcaga acaaaattat tgccgacagt gtcacctccc aggtccaca tatctattca 4380  
 ttggtcgaga atggttctta cattgtagct gttgattttg attcaattag tggctgtatc 4440  
 ttttggctc atgcaactca gggtaaaacc tggagtgctt ttcaaaaigg aacggacaga 4500

agagtggat ttacagtag catcatctt actgaaacta ttgcaataga ttggtaggt 4560  
 cgtaatcttt actggacaga ctatgctctg gaaacaattg aagctccaa aattgatggg 4620  
 agccacagga ctgtgctgat tagtaaaaac ctaacaaatc caagaggact agcattagat 4680  
 cccagaatga atgagcatct actgttcttg tctgactggg gccaccacc tcgcatcgag 4740  
 cgagccagca tggacggcag catgcgact gtcattgtcc aggacaagat cttctggccc 4800  
 tgcggcttaa ctattgacta cccaacaga ctgctctact tcatggactc ctatcttgat 4860  
 tacatggact tttgcgatta taatggacac catcggagac aggtgatagc cagtgatttg 4920  
 attatacggc acccctatgc cctaactctc tttgaagact ctgtgtactg gactgaccgt 4980  
 gctactcgtc gggttatgcg agccaacaag tggcatggag ggaaccagtc agttgtaatg 5040  
 tataatattc aatggcccct tgggattgtt gcggttcac cttcgaaaca accaaattcc 5100  
 gtgaatccat gtgccttttc ccgctgcagc catctctgcc tgctttcctc acaggggctc 5160  
 catttttact cctgtgtttg tccttcagga tggagtctgt ctctgatct cctgaattgc 5220  
 ttgagagatg atcaaccttt ctttaataact gtaaggcaac atataatfff tggaaatctc 5280  
 cttaatcctg aggtgaagag caatgatgct atggtcccca tagcagggat acagaatggt 5340  
 ttagatggtg aatttgatga tgctgagcaa tacatctatt gggttgaaaa tccaggtgaa 5400  
 attcacagag tgaagacaga tggcaccaac aggacagtat ttgcttctat atctatgggt 5460  
 gggccttcta tgaacctggc cttagattgg atttcaagaa acctttatc taccaatcct 5520  
 agaactcagt caatcgaggt tttgacactc cacggagata tcagatacag aaaaacattg 5580  
 attgccaatg atgggacagc tcttgaggtt ggctttccaa ttggcataac tgttgatcct 5640  
 gctcgtggga agctgtactg gtcagaccaa ggaactgaca gtggggttcc tgccaagatc 5700  
 gccagtgcta acatggatgg cacatctgtg aaaactctct ttactgggaa cctcgaacac 5760  
 ctggagtgtg tcactcttga catcgaagag cagaaactct actgggcagt cactggaaga 5820  
 ggagtgattg aaagaggaaa cgtggatgga acagatcgga tgatcctggt acaccagctt 5880  
 tcccaccctt ggggaattgc agtccatgat tctttccttt attatactga tgaacagtat 5940  
 gaggtcattg aaagagttga taaggccact ggggccaaca aaatagtctt gagagataat 6000  
 gttccaaatc tgaggggtct tcaagtttat cacagacgca atgccgcca atcctcaaat 6060  
 ggctgtagca acaacatgaa tgcctgtcag cagatttggc tgctgtacc aggaggattg 6120  
 ttttctggeg cctgtgccac tggatttaaa ctcaatcctg ataactggte ctgctctcca 6180  
 tataactctt tcattgttgt ttcaatgctg tctgcaatca gaggttttag ctggaattg 6240  
 tcagatcatt cagaaacat ggtgccggtg gcaggccaag gacgaaacgc actgcatgtg 6300  
 gatgtggatg tgcctctggt ctttatttat tgggtgtgatt ttagcagctc agtggcatct 6360  
 gataatgcca tccgtagaat taaaccagat ggatcttctc tgatgaacat tgtgacacat 6420  
 ggaaataggag aaaatggagt ccgggttatt gcagtggatt gggtagcagg aaatctttat 6480  
 ttaccaatg cctttgtttc tgaaacactg atagaagttc tgcggatcaa tactacttac 6540  
 cgccgtgttc ttcttaagt cacagtggac atgcctaggc atatgttgt agatcccaag 6600  
 aacagatacc tcttctgggc tgactatggg cagagacca agattgagcg ttctttcctt 6660  
 gactgtacca atcgaacagt gcttgtgtca gagggcattg tcacaccacg gggcttgcca 6720  
 gtggaccgaa gtgatggcta cgtttatttg gttgatgatt ctttagatat aattgcaagg 6780  
 attcgtatca atggagagaa ctctgaagtg attcgtatg gcagtcgta cccaactcct 6840  
 tatggcatca ctgtttttga aaattctatc atatgggtag ataggaattt gaaaagatc 6900  
 ttccaagcca gcaaggaacc agagaacaca gagccacca cagtataag agacaatc 6960  
 aactggctaa gagatgtgac catctttgac aagcaagtcc agcccggtc accagcagag 7020  
 gtcaacaaca acccttgctt ggaaaacaat ggtgggtgct ctcatctctg ctttgctctg 7080  
 cctggattgc acacccaaa atgtgactgt gcctttggga cctgcaaag tgatggcaag 7140  
 aattgtgcca ttcaacaga aaatttctc atctttgctt tgtctaattc cttgagaagc 7200  
 ttactattgg accctgaaaa ccatagccca cttttcaaaa caataaatgt gaaagaact 7260  
 gtcatgtctc tagactatga cagtgtagt gatagaatct acttcacaca aaatttagcc 7320  
 tctggagttg gacagatttc ctatgccacc ctgtcttcag ggatccatac tccaactgct 7380  
 attgcttcag glatagggac tgctgatggc attgctttg actggattac lagaagaatt 7440

tattacagtg actacctcaa ccagatgatt aattccatgg ctgaagatgg gtctaaccgc 7500  
actgtgatag cccgcgttcc aaaaccaaga gcaattgtgt tagatccctg ccaagggtac 7560  
ctgtactggg ctgactggga tacacatgcc aaaatcgaga gagccacatt gggaggaaac 7620  
ttccgggtac ccattgtgaa cagcagtctg gtcatgcccc gtgggctgac tctggactat 7680  
gaagaggacc ttctctactg ggtggatgct agtctgcaga ggattgaacg cagcactctg 7740  
acgggcgtgg atcgtgaagt cattgtcaat gcagccgttc atgcttttgg cttgactctc 7800  
tatggccagt atatttactg gactgacttg tacacacaaa gaatttaccg agctaacaaa 7860  
tatgacgggt caggtcagat tgcaatgacc acaaatttgc tctcccagcc caggggaatc 7920  
aacactgttg tgaagaacca gaaacaacag tgtaacaatc cttgtgaaca gtttaatggg 7980  
ggctgcagcc atatctgtgc accagggtcca aatgggtgcc agtgccagtg tccacatgag 8040  
ggcaactggt atttgccaa caacaggaag cactgcattg tggacaatgg tgaacgatgt 8100  
ggtgcatctt ccttcacctg ctccaatggg cgctgcatct cggaagagtg gaagtgtgat 8160  
aatgacaacg actgtgggga tggcagtgat gagatggaaa gtgtctgtgc acttcacacc 8220  
tgctcaccca cagccttcac ctgtgccaat gggcgatgtg tccaatactc ttaccgctgt 8280  
gattactaca atgactgtgg tgatggcagt gatgaggcag ggtgcctgtt cagggactgc 8340  
aatgccacca cggagtttat gtgcaataac agaaggtgca tacctctgta gtttatctgc 8400  
aatggtgtag acaactgcca tgataataac acttcagatg agaaaaattg ccctgatcgc 8460  
acttgccagt ctggatacac aaaatgtcat aattcaaata tttgtattcc tcgcgtttat 8520  
ttgtgtgacg gagacaatga ctgtggagat aacagtgatg aaaaccctac ttattgcacc 8580  
actcacacat gcagcagcag tgagttccaa tgcgcatctg ggcgctgtat tcctcaacat 8640  
tggtattgtg atcaagaaac agattgtttt gatgcctctg atgaacctgc ctcttgtggt 8700  
cactctgagc gaacatgcct agctgatgag ttcaagtgtg atggtgggag gtgcatccca 8760  
agcgaatgga tctgtgacgg tgataatgac tgtggggata tgagtgcga ggataaaaagg 8820  
caccagtgtc agaatcaaaa ctgctcggat tccgagttc tctgtgtaa tgacagacct 8880  
ccggacagga ggtgcattcc ccagtcttgg gtctgtgatg gcgatgtgga ttgtactgac 8940  
ggctacgatg agaatcagaa ttgcaccagg agaacttgc ctgaaaatga attcacctgt 9000  
ggttacggac tgtgtatccc aaagatattc aggtgtgacc ggcacaatga ctgtggtgac 9060  
tatagcgacg agaggggctg cttataccag acttgccaac agaatcagtt tacctgtcag 9120  
aacgggcgct gcattagtaa aaccttcgtc tgtgatgagg ataatgactg tggagacgga 9180  
tctgatgagc tgatgcacct gtgccacacc ccagaaccca cgtgtccacc tcacgagttc 9240  
aagtgtgaca atgggcgctg catcgagatg atgaaactct gcaaccacct agatgactgt 9300  
ttgacaaca gcgatgagaa aggctgtgge attaatgaat gccatgacc ttcaatcagt 9360  
ggctgcgac acaactgcac agacacctta accagtttct attgttctg tcgtcctggt 9420  
tacaagctca tctctgacaa gcggacttgt gttgatattg atgaatgcac agagatgcct 9480  
tttgtctgta gccagaagtg tgagaatgta ataggctcct acatctgtaa gtgtgcccc 9540  
ggctacctcc gagaaccaga tggaaagacc tgccggcaaa acagtaacat cgaaccctat 9600  
ctcatTTTTA gcaaccgtta ctatttgaga aatttaacta tagatggcta ttttactcc 9660  
ctcatcttgg aaggactgga caatgttgtg gcattagatt ttgaccgagt agagaagaga 9720  
ttgtattgga ttgatacaca gaggcaagtc attgagagaa tgtttctgaa taagacaaac 9780  
aaggagacaa tcataaacca cagactacca gctgcagaaa gtctggctgt agactgggtt 9840  
tccagaaagc tctactgggt ggatgcccgc ctggatggcc tctttgtctc tgacctcaat 9900  
ggtggacacc gccgatgct ggcccagcac tgtgtggatg ccaacaacac cttctgcttt 9960  
gataatccca gaggacttgc ccttcacct caatatgggt acctctactg ggcagactgg 10020  
ggtcaccgcg catacattgg gagagtaggc atggatggaa ccaacaagtc tgtgataatc 10080  
tccaccaagt tagagtggcc taatggcatc accattgatt acaccaatga tctactctac 10140  
tgggcagatg ccacctggg ttacatagag tactctgatt tggagggcca ccctcgacac 10200  
acgggtgatg atggggcact gcctcacct ttcgctatta ccatttttga agacactatt 10260  
tattggacag attggaatac aaggacagtg gaaaagggaa acaaatatga tggatcaaat 10320  
agacagacac tggglaacac aacacacaga ccatttgaca tccaigtgta ccatccatat 10380

aggcagccca ttgtgagcaa tccctgtggt accaacaatg gtggctgttc tcatctctgc 10440  
 ctcatcaagc caggaggaaa agggttcact tgcgagtgtc cagatgactt ccgaccctt 10500  
 caactgagtg gcagcaccta ctgcatgcc atgtgctcca gcaccagtt cctgtgcgct 10560  
 aacaatgaaa agtgcattcc tatctggtgg aatgtgatg gacagaaaga ctgctcagat 10620  
 ggctctgatg aactggccct ttgcccgcag cgcttctgcc gactgggaca gtccagtg 10680  
 agtgacggca actgcaccag cccgcagact ttatgcaatg ctcacaaaa ttgccctgat 10740  
 gggctctgatg aagaccgtct tctttgtgag aatcaccact gtgactccaa tgaatggcag 10800  
 tgcgccaaca aacgttgcac ccagaatcc tggcagtggt acacatttaa cgactgtgag 10860  
 gataactcag atgaagacag ttcccactgt gccagcagga cctgccggcc gggccagttt 10920  
 cgggtgtgcta atggccgctg catcccgcag gcctggaagt gtgatgtgga taatgattgt 10980  
 ggagaccact cggatgagcc cattgaagaa tgcagtgact ctgccatct ctgtgacaac 11040  
 ttcacagaat tcagctgcaa acaaaattac cgctgcatcc caaagtgggc cgtgtgcaat 11100  
 ggtgtagatg actgcaggga caacagtgt gagcaaggct gtgaggagag gacatgccat 11160  
 cctgtggggg atttccgctg taaaaatcac cactgcatcc ctcttcgttg gcagtgtgat 11220  
 gggcaaaatg actgtggaga taactcagat gaggaaaact gtgctccccg ggagtgcaca 11280  
 gagagcgagt ttcgatgtgt caatcagcag tgcattccct cgcgatggat ctgtgaccat 11340  
 tacaacgact gtggggacaa ctcagatgaa cgggactgtg agatgaggac ctgccatcct 11400  
 gaatattttc agtgtacaag tggacattgt gtacacagtg aactgaaatg cgatggatcc 11460  
 gctgactgtt tggatgctgc tgatgaagct gattgtccca cacgctttcc tgatggtgca 11520  
 tactgccagg ctactatgtt cgaatgcaaa aacctgttt gtatcccgcc atattggaaa 11580  
 tgtgatggcg atgatgactg tggcgatggt tcagatgaag aacttcacct gtgcttgat 11640  
 gttccctgta attcaccaaa ccgtttccgg tgtgacaaca atcgtgcat ttatagtcat 11700  
 gaggtgtgca atgggtgtgga tgactgtgga gatggaactg atgagacaga ggagcactgt 11760  
 agaaaaccga ccctaaacc ttgtacagaa tatgaatata agtgtggcaa tgggcattgc 11820  
 attccacatg acaatgtgtg tgatgatgcc gatgactgtg gtgactggtc cgatgaactg 11880  
 ggttgcataa aaggaaaaga aagaacatgt gctgaaaata tatcgagca aaattgtacc 11940  
 caattaaatg aaggaggatt tatctgctcc tgtacagctg gttcgaaac caatgtttt 12000  
 gacagaacct cctgtctaga tatcaatgaa tgtgaacaat ttgggacttg tcccagcac 12060  
 tgcagaaata ccaaaggaag ttatgagtgt gtctgtgctg atggcttcac gtctatgagt 12120  
 gaccgccctg gaaaacgatg tgcagctgag ggtagctctc ctttgttgc actgcctgac 12180  
 aatgtccgaa ttcgaaaata taatctctca tctgagaggt tctcagagta tctcaagat 12240  
 gaggaatata tccaagctgt tgattatgat tgggatcca aggacatagg cctcagtgtt 12300  
 gtgtattaca ctgtgcgagg ggagggctct aggtttgtg ctatcaaacg tgcctacatc 12360  
 cccaactttg aatccggccg caataatctt gtgcaggaag ttgacctgaa actgaaatac 12420  
 gtaatgcagc cagatggaat agcagtggac tgggttgaa ggcatattta ctggtcagat 12480  
 gtcaagaata aacgcattga ggtggctaaa cttgatggaa ggtacagaaa gtggctgatt 12540  
 tccactgacc tggaccaacc agctgctatt gctgtgaatc ccaaactagg gcttatgttc 12600  
 tggactgact ggggaaagga acctaaaatc gagtctgcct ggatgaatgg agaggaccgc 12660  
 aacatcctgg ttttcgagga ccttgggttg ccaactggcc tttctatcga ttattgaaac 12720  
 aatgaccgaa tctactggag tgacttcaag gaggacgta ttgaaacct aaaatatgat 12780  
 gggactgata ggagagtcac tgcaaaggaa gcaatgaacc cttacagcct ggacatctt 12840  
 gaagaccagt tatactggat atctaaggaa aagggagaag tatggaaaca aaataaattt 12900  
 gggcaaggaa agaagagaa aacgctggta gtgaaccctt ggctcactca agttcgaatc 12960  
 tttcatcaac tcagatacaa taagtacgtg cccaacctt gcaaacagat ctgcagccac 13020  
 ctctgccttc tgagacctgg aggatacagc tgtgcctgtc cccaaggctc cagctttata 13080  
 gaggggagca ccaactgagtg tgatgcagcc atcgaactgc ctatcaacct gccccccca 13140  
 tgcaggtgca tgcacggagg aaattgctat tttgatgaga ctgacctcc caaatgcaag 13200  
 tgtcctagcg gctacaccgg aaaatattgt gaaatggcgt tttcaaaagg catctctcca 13260  
 ggaacaaccg cagtagctgt gctgttgaca atcctcttga tcgtcgtaat tggagctctg 13320

gcaattgcag gattcttcca ctatagaagg accggctccc tttgcctgc tctgccaag 13380  
ctgccaagct taagcagtct cgtcaagccc tctgaaaatg ggaatgggt gaccttcaga 13440  
tcaggggcag atcttaacat ggatattgga gtgtctggtt ttggacctga gactgctatt 13500  
gacaggcaaa tggcaatgag tgaagacttt gtcattggaaa tggggaagca gcccataata 13560  
tttgaacc caatgtactc agccagagac agtgctgtca aagtggttca gccaatccag 13620  
gtgactgtat ctgaaaatgt ggataataag aattatggaa gtcccataaa cccttctgag 13680  
atagttccag agacaaaccc aacttcacca gctgctgatg gaactcaggt gacaaaatgg 13740  
aatctcttca aacgaaaatc taaacaaact accaactttg aaaatccaat ctatgcacag 13800  
atggagaacg agcaaaagga aagtgttctc gcgacaccac ctccatcacc ttcgctcctt 13860  
gctaagccta agcctccttc gagaagagac ccaactccaa cctattctgc aacagaagac 13920  
acttttaaag acaccgcaaa tcttgtaaaa gaagactctg aagtatag 13968

<210> 2

<211> 4655

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Arg Gly Pro Ala Ala Val Ala Cys Thr Leu Leu Leu Ala Leu  
1 5 10 15

Val Ala Cys Leu Ala Pro Ala Ser Gly Gln Glu Cys Asp Ser Ala His  
20 25 30

Phe Arg Cys Gly Ser Gly His Cys Ile Pro Ala Asp Trp Arg Cys Asp  
35 40 45

Gly Thr Lys Asp Cys Ser Asp Asp Ala Asp Glu Ile Gly Cys Ala Val  
50 55 60

Val Thr Cys Gln Gln Gly Tyr Phe Lys Cys Gln Ser Glu Gly Gln Cys  
65 70 75 80

Ile Pro Ser Ser Trp Val Cys Asp Gln Asp Gln Asp Cys Asp Asp Gly  
85 90 95

Ser Asp Glu Arg Gln Asp Cys Ser Gln Ser Thr Cys Ser Ser His Gln  
100 105 110

Ile Thr Cys Ser Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Glu Tyr Arg Cys Asp  
115 120 125

His Val Arg Asp Cys Pro Asp Gly Ala Asp Glu Asn Asp Cys Gln Tyr  
130 135 140

Pro Thr Cys Glu Gln Leu Thr Cys Asp Asn Gly Ala Cys Tyr Asn Thr  
145 150 155 160

Ser Gln Lys Cys Asp Trp Lys Val Asp Cys Arg Asp Ser Ser Asp Glu  
 165 170 175  
 Ile Asn Cys Thr Glu Ile Cys Leu His Asn Glu Phe Ser Cys Gly Asn  
 180 185 190  
 Gly Glu Cys Ile Pro Arg Ala Tyr Val Cys Asp His Asp Asn Asp Cys  
 195 200 205  
 Gln Asp Gly Ser Asp Glu His Ala Cys Asn Tyr Pro Thr Cys Gly Gly  
 210 215 220  
 Tyr Gln Phe Thr Cys Pro Ser Gly Arg Cys Ile Tyr Gln Asn Trp Val  
 225 230 235 240  
 Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Lys Asp Asn Gly Asp Glu Asp Gly Cys  
 245 250 255  
 Glu Ser Gly Pro His Asp Val His Lys Cys Ser Pro Arg Glu Trp Ser  
 260 265 270  
 Cys Pro Glu Ser Gly Arg Cys Ile Ser Ile Tyr Lys Val Cys Asp Gly  
 275 280 285  
 Ile Leu Asp Cys Pro Gly Arg Glu Asp Glu Asn Asn Thr Ser Thr Gly  
 290 295 300  
 Lys Tyr Cys Ser Met Thr Leu Cys Ser Ala Leu Asn Cys Gln Tyr Gln  
 305 310 315 320  
 Cys His Glu Thr Pro Tyr Gly Gly Ala Cys Phe Cys Pro Pro Gly Tyr  
 325 330 335  
 Ile Ile Asn His Asn Asp Ser Arg Thr Cys Val Glu Phe Asp Asp Cys  
 340 345 350  
 Gln Ile Trp Gly Ile Cys Asp Gln Lys Cys Glu Ser Arg Pro Gly Arg  
 355 360 365  
 His Leu Cys His Cys Glu Glu Gly Tyr Ile Leu Glu Arg Gly Gln Tyr  
 370 375 380  
 Cys Lys Ala Asn Asp Ser Phe Gly Glu Ala Ser Ile Ile Phe Ser Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Asp Leu Leu Ile Gly Asp Ile His Gly Arg Ser Phe Arg Ile  
 405 410 415  
 Leu Val Glu Ser Gln Asn Arg Gly Val Ala Val Gly Val Ala Phe His

	420		425		430
Tyr His Leu Gln Arg Val Phe Trp Thr Asp Thr Val Gln Asn Lys Val					
	435		440		445
Phe Ser Val Asp Ile Asn Gly Leu Asn Ile Gln Glu Val Leu Asn Val					
	450		455		460
Ser Val Glu Thr Pro Glu Asn Leu Ala Val Asp Trp Val Asn Asn Lys					
	465		470		480
Ile Tyr Leu Val Glu Thr Lys Val Asn Arg Ile Asp Met Val Asn Leu					
	485		490		495
Asp Gly Ser Tyr Arg Val Thr Leu Ile Thr Glu Asn Leu Gly His Pro					
	500		505		510
Arg Gly Ile Ala Val Asp Pro Thr Val Gly Tyr Leu Phe Phe Ser Asp					
	515		520		525
Trp Glu Ser Leu Ser Gly Glu Pro Lys Leu Glu Arg Ala Phe Met Asp					
	530		535		540
Gly Ser Asn Arg Lys Asp Leu Val Lys Thr Lys Leu Gly Trp Pro Ala					
	545		550		560
Gly Val Thr Leu Asp Met Ile Ser Lys Arg Val Tyr Trp Val Asp Ser					
	565		570		575
Arg Phe Asp Tyr Ile Glu Thr Val Thr Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Lys					
	580		585		590
Thr Val Val His Gly Gly Ser Leu Ile Pro His Pro Phe Gly Val Ser					
	595		600		605
Leu Phe Glu Gly Gln Val Phe Phe Thr Asp Trp Thr Lys Met Ala Val					
	610		615		620
Leu Lys Ala Asn Lys Phe Thr Glu Thr Asn Pro Gln Val Tyr Tyr Gln					
	625		630		640
Ala Ser Leu Arg Pro Tyr Gly Val Thr Val Tyr His Ser Leu Arg Gln					
	645		650		655
Pro Tyr Ala Thr Asn Pro Cys Lys Asp Asn Asn Gly Gly Cys Glu Gln					
	660		665		670
Val Cys Val Leu Ser His Arg Thr Asp Asn Asp Gly Leu Gly Phe Arg					
	675		680		685

Cys Lys Cys Thr Phe Gly Phe Gln Leu Asp Thr Asp Glu Arg His Cys  
690 695 700

Ile Ala Val Gln Asn Phe Leu Ile Phe Ser Ser Gln Val Ala Ile Arg  
705 710 715 720

Gly Ile Pro Phe Thr Leu Ser Thr Gln Glu Asp Val Met Val Pro Val  
725 730 735

Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Val Gly Ile Asp Phe Asp Ala Gln Asp  
740 745 750

Ser Thr Ile Phe Phe Ser Asp Met Ser Lys His Met Ile Phe Lys Gln  
755 760 765

Lys Ile Asp Gly Thr Gly Arg Glu Ile Leu Ala Ala Asn Arg Val Glu  
770 775 780

Asn Val Glu Ser Leu Ala Phe Asp Trp Ile Ser Lys Asn Leu Tyr Trp  
785 790 795 800

Thr Asp Ser His Tyr Lys Ser Ile Ser Val Met Arg Leu Ala Asp Lys  
805 810 815

Thr Arg Arg Thr Val Val Gln Tyr Leu Asn Asn Pro Arg Ser Val Val  
820 825 830

Val His Pro Phe Ala Gly Tyr Leu Phe Phe Thr Asp Trp Phe Arg Pro  
835 840 845

Ala Lys Ile Met Arg Ala Trp Ser Asp Gly Ser His Leu Leu Pro Val  
850 855 860

Ile Asn Thr Thr Leu Gly Trp Pro Asn Gly Leu Ala Ile Asp Trp Ala  
865 870 875 880

Ala Ser Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ala Tyr Phe Asp Lys Ile Glu His  
885 890 895

Ser Thr Phe Asp Gly Leu Asp Arg Arg Arg Leu Gly His Ile Glu Gln  
900 905 910

Met Thr His Pro Phe Gly Leu Ala Ile Phe Gly Glu His Leu Phe Phe  
915 920 925

Thr Asp Trp Arg Leu Gly Ala Ile Ile Arg Val Arg Lys Ala Asp Gly  
930 935 940

Gly Glu Met Thr Val Ile Arg Ser Gly Ile Ala Tyr Ile Leu His Leu  
 945 950 955 960  
 Lys Ser Tyr Asp Val Asn Ile Gln Thr Gly Ser Asn Ala Cys Asn Gln  
 965 970 975  
 Pro Thr His Pro Asn Gly Asp Cys Ser His Phe Cys Phe Pro Val Pro  
 980 985 990  
 Asn Phe Gln Arg Val Cys Gly Cys Pro Tyr Gly Met Arg Leu Ala Ser  
 995 1000 1005  
 Asn His Leu Thr Cys Glu Gly Asp Pro Thr Asn Glu Pro Pro Thr Glu  
 1010 1015 1020  
 Gln Cys Gly Leu Phe Ser Phe Pro Cys Lys Asn Gly Arg Cys Val Pro  
 1025 1030 1035 1040  
 Asn Tyr Tyr Leu Cys Asp Gly Val Asp Asp Cys His Asp Asn Ser Asp  
 1045 1050 1055  
 Glu Gln Leu Cys Gly Thr Leu Asn Asn Thr Cys Ser Ser Ser Ala Phe  
 1060 1065 1070  
 Thr Cys Gly His Gly Glu Cys Ile Pro Ala His Trp Arg Cys Asp Lys  
 1075 1080 1085  
 Arg Asn Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu His Asn Cys Pro Thr His  
 1090 1095 1100  
 Ala Pro Ala Ser Cys Leu Asp Thr Gln Tyr Thr Cys Asp Asn His Gln  
 1105 1110 1115 1120  
 Cys Ile Ser Lys Asn Trp Val Cys Asp Thr Asp Asn Asp Cys Gly Asp  
 1125 1130 1135  
 Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys Asn Ser Thr Glu Thr Cys Gln Pro Ser  
 1140 1145 1150  
 Gln Phe Asn Cys Pro Asn His Arg Cys Ile Asp Leu Ser Phe Val Cys  
 1155 1160 1165  
 Asp Gly Asp Lys Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu Val Gly Cys Val  
 1170 1175 1180  
 Leu Asn Cys Thr Ala Ser Gln Phe Lys Cys Ala Ser Gly Asp Lys Cys  
 1185 1190 1195 1200  
 Ile Gly Val Thr Asn Arg Cys Asp Gly Val Phe Asp Cys Ser Asp Asn

1205	1210	1215
Ser Asp Glu Ala Gly Cys Pro Thr Arg Pro Pro Gly Met Cys His Ser 1220	1225	1230
Asp Glu Phe Gln Cys Gln Glu Asp Gly Ile Cys Ile Pro Asn Phe Trp 1235	1240	1245
Glu Cys Asp Gly His Pro Asp Cys Leu Tyr Gly Ser Asp Glu His Asn 1250	1255	1260
Ala Cys Val Pro Lys Thr Cys Pro Ser Ser Tyr Phe His Cys Asp Asn 1265	1270	1275 1280
Gly Asn Cys Ile His Arg Ala Trp Leu Cys Asp Arg Asp Asn Asp Cys 1285	1290	1295
Gly Asp Met Ser Asp Glu Lys Asp Cys Pro Thr Gln Pro Phe Arg Cys 1300	1305	1310
Pro Ser Trp Gln Trp Gln Cys Leu Gly His Asn Ile Cys Val Asn Leu 1315	1320	1325
Ser Val Val Cys Asp Gly Ile Phe Asp Cys Pro Asn Gly Thr Asp Glu 1330	1335	1340
Ser Pro Leu Cys Asn Gly Asn Ser Cys Ser Asp Phe Asn Gly Gly Cys 1345	1350	1355 1360
Thr His Glu Cys Val Gln Glu Pro Phe Gly Ala Lys Cys Leu Cys Pro 1365	1370	1375
Leu Gly Phe Leu Leu Ala Asn Asp Ser Lys Thr Cys Glu Asp Ile Asp 1380	1385	1390
Glu Cys Asp Ile Leu Gly Ser Cys Ser Gln His Cys Tyr Asn Met Arg 1395	1400	1405
Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Met Leu Glu Ser Asp 1410	1415	1420
Gly Arg Thr Cys Lys Val Thr Ala Ser Glu Ser Leu Leu Leu Val 1425	1430	1435 1440
Ala Ser Gln Asn Lys Ile Ile Ala Asp Ser Val Thr Ser Gln Val His 1445	1450	1455
Asn Ile Tyr Ser Leu Val Glu Asn Gly Ser Tyr Ile Val Ala Val Asp 1460	1465	1470

Phe Asp Ser Ile Ser Gly Arg Ile Phe Trp Ser Asp Ala Thr Gln Gly  
 1475 1480 1485  
 Lys Thr Trp Ser Ala Phe Gln Asn Gly Thr Asp Arg Arg Val Val Phe  
 1490 1495 1500  
 Asp Ser Ser Ile Ile Leu Thr Glu Thr Ile Ala Ile Asp Trp Val Gly  
 1505 1510 1515 1520  
 Arg Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Tyr Ala Leu Glu Thr Ile Glu Val Ser  
 1525 1530 1535  
 Lys Ile Asp Gly Ser His Arg Thr Val Leu Ile Ser Lys Asn Leu Thr  
 1540 1545 1550  
 Asn Pro Arg Gly Leu Ala Leu Asp Pro Arg Met Asn Glu His Leu Leu  
 1555 1560 1565  
 Phe Trp Ser Asp Trp Gly His His Pro Arg Ile Glu Arg Ala Ser Met  
 1570 1575 1580  
 Asp Gly Ser Met Arg Thr Val Ile Val Gln Asp Lys Ile Phe Trp Pro  
 1585 1590 1595 1600  
 Cys Gly Leu Thr Ile Asp Tyr Pro Asn Arg Leu Leu Tyr Phe Met Asp  
 1605 1610 1615  
 Ser Tyr Leu Asp Tyr Met Asp Phe Cys Asp Tyr Asn Gly His His Arg  
 1620 1625 1630  
 Arg Gln Val Ile Ala Ser Asp Leu Ile Ile Arg His Pro Tyr Ala Leu  
 1635 1640 1645  
 Thr Leu Phe Glu Asp Ser Val Tyr Trp Thr Asp Arg Ala Thr Arg Arg  
 1650 1655 1660  
 Val Met Arg Ala Asn Lys Trp His Gly Gly Asn Gln Ser Val Val Met  
 1665 1670 1675 1680  
 Tyr Asn Ile Gln Trp Pro Leu Gly Ile Val Ala Val His Pro Ser Lys  
 1685 1690 1695  
 Gln Pro Asn Ser Val Asn Pro Cys Ala Phe Ser Arg Cys Ser His Leu  
 1700 1705 1710  
 Cys Leu Leu Ser Ser Gln Gly Pro His Phe Tyr Ser Cys Val Cys Pro  
 1715 1720 1725

Ser Gly Trp Ser Leu Ser Pro Asp Leu Leu Asn Cys Leu Arg Asp Asp  
 1730 1735 1740  
 Gln Pro Phe Leu Ile Thr Val Arg Gln His Ile Ile Phe Gly Ile Ser  
 1745 1750 1755 1760  
 Leu Asn Pro Glu Val Lys Ser Asn Asp Ala Met Val Pro Ile Ala Gly  
 1765 1770 1775  
 Ile Gln Asn Gly Leu Asp Val Glu Phe Asp Asp Ala Glu Gln Tyr Ile  
 1780 1785 1790  
 Tyr Trp Val Glu Asn Pro Gly Glu Ile His Arg Val Lys Thr Asp Gly  
 1795 1800 1805  
 Thr Asn Arg Thr Val Phe Ala Ser Ile Ser Met Val Gly Pro Ser Met  
 1810 1815 1820  
 Asn Leu Ala Leu Asp Trp Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Pro  
 1825 1830 1835 1840  
 Arg Thr Gln Ser Ile Glu Val Leu Thr Leu His Gly Asp Ile Arg Tyr  
 1845 1850 1855  
 Arg Lys Thr Leu Ile Ala Asn Asp Gly Thr Ala Leu Gly Val Gly Phe  
 1860 1865 1870  
 Pro Ile Gly Ile Thr Val Asp Pro Ala Arg Gly Lys Leu Tyr Trp Ser  
 1875 1880 1885  
 Asp Gln Gly Thr Asp Ser Gly Val Pro Ala Lys Ile Ala Ser Ala Asn  
 1890 1895 1900  
 Met Asp Gly Thr Ser Val Lys Thr Leu Phe Thr Gly Asn Leu Glu His  
 1905 1910 1915 1920  
 Leu Glu Cys Val Thr Leu Asp Ile Glu Glu Gln Lys Leu Tyr Trp Ala  
 1925 1930 1935  
 Val Thr Gly Arg Gly Val Ile Glu Arg Gly Asn Val Asp Gly Thr Asp  
 1940 1945 1950  
 Arg Met Ile Leu Val His Gln Leu Ser His Pro Trp Gly Ile Ala Val  
 1955 1960 1965  
 His Asp Ser Phe Leu Tyr Tyr Thr Asp Glu Gln Tyr Glu Val Ile Glu  
 1970 1975 1980  
 Arg Val Asp Lys Ala Thr Gly Ala Asn Lys Ile Val Leu Arg Asp Asn

---

1985	1990	1995	2000
Val Pro Asn Leu Arg Gly Leu Gln Val Tyr His Arg Arg Asn Ala Ala	2005	2010	2015
Glu Ser Ser Asn Gly Cys Ser Asn Asn Met Asn Ala Cys Gln Gln Ile	2020	2025	2030
Cys Leu Pro Val Pro Gly Gly Leu Phe Ser Cys Ala Cys Ala Thr Gly	2035	2040	2045
Phe Lys Leu Asn Pro Asp Asn Arg Ser Cys Ser Pro Tyr Asn Ser Phe	2050	2055	2060
Ile Val Val Ser Met Leu Ser Ala Ile Arg Gly Phe Ser Leu Glu Leu	2065	2070	2080
Ser Asp His Ser Glu Thr Met Val Pro Val Ala Gly Gln Gly Arg Asn	2085	2090	2095
Ala Leu His Val Asp Val Asp Val Ser Ser Gly Phe Ile Tyr Trp Cys	2100	2105	2110
Asp Phe Ser Ser Ser Val Ala Ser Asp Asn Ala Ile Arg Arg Ile Lys	2115	2120	2125
Pro Asp Gly Ser Ser Leu Met Asn Ile Val Thr His Gly Ile Gly Glu	2130	2135	2140
Asn Gly Val Arg Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Ala Gly Asn Leu Tyr	2145	2150	2160
Phe Thr Asn Ala Phe Val Ser Glu Thr Leu Ile Glu Val Leu Arg Ile	2165	2170	2175
Asn Thr Thr Tyr Arg Arg Val Leu Leu Lys Val Thr Val Asp Met Pro	2180	2185	2190
Arg His Ile Val Val Asp Pro Lys Asn Arg Tyr Leu Phe Trp Ala Asp	2195	2200	2205
Tyr Gly Gln Arg Pro Lys Ile Glu Arg Ser Phe Leu Asp Cys Thr Asn	2210	2215	2220
Arg Thr Val Leu Val Ser Glu Gly Ile Val Thr Pro Arg Gly Leu Ala	2225	2230	2240
Val Asp Arg Ser Asp Gly Tyr Val Tyr Trp Val Asp Asp Ser Leu Asp	2245	2250	2255

Ile Ile Ala Arg Ile Arg Ile Asn Gly Glu Asn Ser Glu Val Ile Arg  
 2260 2265 2270  
 Tyr Gly Ser Arg Tyr Pro Thr Pro Tyr Gly Ile Thr Val Phe Glu Asn  
 2275 2280 2285  
 Ser Ile Ile Trp Val Asp Arg Asn Leu Lys Lys Ile Phe Gln Ala Ser  
 2290 2295 2300  
 Lys Glu Pro Glu Asn Thr Glu Pro Pro Thr Val Ile Arg Asp Asn Ile  
 2305 2310 2315 2320  
 Asn Trp Leu Arg Asp Val Thr Ile Phe Asp Lys Gln Val Gln Pro Arg  
 2325 2330 2335  
 Ser Pro Ala Glu Val Asn Asn Asn Pro Cys Leu Glu Asn Asn Gly Gly  
 2340 2345 2350  
 Cys Ser His Leu Cys Phe Ala Leu Pro Gly Leu His Thr Pro Lys Cys  
 2355 2360 2365  
 Asp Cys Ala Phe Gly Thr Leu Gln Ser Asp Gly Lys Asn Cys Ala Ile  
 2370 2375 2380  
 Ser Thr Glu Asn Phe Leu Ile Phe Ala Leu Ser Asn Ser Leu Arg Ser  
 2385 2390 2395 2400  
 Leu His Leu Asp Pro Glu Asn His Ser Pro Pro Phe Gln Thr Ile Asn  
 2405 2410 2415  
 Val Glu Arg Thr Val Met Ser Leu Asp Tyr Asp Ser Val Ser Asp Arg  
 2420 2425 2430  
 Ile Tyr Phe Thr Gln Asn Leu Ala Ser Gly Val Gly Gln Ile Ser Tyr  
 2435 2440 2445  
 Ala Thr Leu Ser Ser Gly Ile His Thr Pro Thr Val Ile Ala Ser Gly  
 2450 2455 2460  
 Ile Gly Thr Ala Asp Gly Ile Ala Phe Asp Trp Ile Thr Arg Arg Ile  
 2465 2470 2475 2480  
 Tyr Tyr Ser Asp Tyr Leu Asn Gln Met Ile Asn Ser Met Ala Glu Asp  
 2485 2490 2495  
 Gly Ser Asn Arg Thr Val Ile Ala Arg Val Pro Lys Pro Arg Ala Ile  
 2500 2505 2510

Val Leu Asp Pro Cys Gln Gly Tyr Leu Tyr Trp Ala Asp Trp Asp Thr  
 2515 2520 2525  
 His Ala Lys Ile Glu Arg Ala Thr Leu Gly Gly Asn Phe Arg Val Pro  
 2530 2535 2540  
 Ile Val Asn Ser Ser Leu Val Met Pro Ser Gly Leu Thr Leu Asp Tyr  
 2545 2550 2555 2560  
 Glu Glu Asp Leu Leu Tyr Trp Val Asp Ala Ser Leu Gln Arg Ile Glu  
 2565 2570 2575  
 Arg Ser Thr Leu Thr Gly Val Asp Arg Glu Val Ile Val Asn Ala Ala  
 2580 2585 2590  
 Val His Ala Phe Gly Leu Thr Leu Tyr Gly Gln Tyr Ile Tyr Trp Thr  
 2595 2600 2605  
 Asp Leu Tyr Thr Gln Arg Ile Tyr Arg Ala Asn Lys Tyr Asp Gly Ser  
 2610 2615 2620  
 Gly Gln Ile Ala Met Thr Thr Asn Leu Leu Ser Gln Pro Arg Gly Ile  
 2625 2630 2635 2640  
 Asn Thr Val Val Lys Asn Gln Lys Gln Gln Cys Asn Asn Pro Cys Glu  
 2645 2650 2655  
 Gln Phe Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Ala Pro Gly Pro Asn Gly  
 2660 2665 2670  
 Ala Glu Cys Gln Cys Pro His Glu Gly Asn Trp Tyr Leu Ala Asn Asn  
 2675 2680 2685  
 Arg Lys His Cys Ile Val Asp Asn Gly Glu Arg Cys Gly Ala Ser Ser  
 2690 2695 2700  
 Phe Thr Cys Ser Asn Gly Arg Cys Ile Ser Glu Glu Trp Lys Cys Asp  
 2705 2710 2715 2720  
 Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Met Glu Ser Val Cys  
 2725 2730 2735  
 Ala Leu His Thr Cys Ser Pro Thr Ala Phe Thr Cys Ala Asn Gly Arg  
 2740 2745 2750  
 Cys Val Gln Tyr Ser Tyr Arg Cys Asp Tyr Tyr Asn Asp Cys Gly Asp  
 2755 2760 2765  
 Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Phe Arg Asp Cys Asn Ala Thr Thr



Asn Gly Arg Cys Ile Ser Lys Thr Phe Val Cys Asp Glu Asp Asn Asp  
                   3045                  3050                  3055

Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Leu Met His Leu Cys His Thr Pro Glu  
                   3060                  3065                  3070

Pro Thr Cys Pro Pro His Glu Phe Lys Cys Asp Asn Gly Arg Cys Ile  
                   3075                  3080                  3085

Glu Met Met Lys Leu Cys Asn His Leu Asp Asp Cys Leu Asp Asn Ser  
                   3090                  3095                  3100

Asp Glu Lys Gly Cys Gly Ile Asn Glu Cys His Asp Pro Ser Ile Ser  
                   3105                  3110                  3115                  3120

Gly Cys Asp His Asn Cys Thr Asp Thr Leu Thr Ser Phe Tyr Cys Ser  
                   3125                  3130                  3135

Cys Arg Pro Gly Tyr Lys Leu Met Ser Asp Lys Arg Thr Cys Val Asp  
                   3140                  3145                  3150

Ile Asp Glu Cys Thr Glu Met Pro Phe Val Cys Ser Gln Lys Cys Glu  
                   3155                  3160                  3165

Asn Val Ile Gly Ser Tyr Ile Cys Lys Cys Ala Pro Gly Tyr Leu Arg  
                   3170                  3175                  3180

Glu Pro Asp Gly Lys Thr Cys Arg Gln Asn Ser Asn Ile Glu Pro Tyr  
                   3185                  3190                  3195                  3200

Leu Ile Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr Leu Arg Asn Leu Thr Ile Asp Gly  
                   3205                  3210                  3215

Tyr Phe Tyr Ser Leu Ile Leu Glu Gly Leu Asp Asn Val Val Ala Leu  
                   3220                  3225                  3230

Asp Phe Asp Arg Val Glu Lys Arg Leu Tyr Trp Ile Asp Thr Gln Arg  
                   3235                  3240                  3245

Gln Val Ile Glu Arg Met Phe Leu Asn Lys Thr Asn Lys Glu Thr Ile  
                   3250                  3255                  3260

Ile Asn His Arg Leu Pro Ala Ala Glu Ser Leu Ala Val Asp Trp Val  
                   3265                  3270                  3275                  3280

Ser Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Asp Ala Arg Leu Asp Gly Leu Phe Val  
                   3285                  3290                  3295

Ser Asp Leu Asn Gly Gly His Arg Arg Met Leu Ala Gln His Cys Val  
 3300 3305 3310

Asp Ala Asn Asn Thr Phe Cys Phe Asp Asn Pro Arg Gly Leu Ala Leu  
 3315 3320 3325

His Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Tyr Trp Ala Asp Trp Gly His Arg Ala  
 3330 3335 3340

Tyr Ile Gly Arg Val Gly Met Asp Gly Thr Asn Lys Ser Val Ile Ile  
 3345 3350 3355 3360

Ser Thr Lys Leu Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Ile Asp Tyr Thr Asn  
 3365 3370 3375

Asp Leu Leu Tyr Trp Ala Asp Ala His Leu Gly Tyr Ile Glu Tyr Ser  
 3380 3385 3390

Asp Leu Glu Gly His His Arg His Thr Val Tyr Asp Gly Ala Leu Pro  
 3395 3400 3405

His Pro Phe Ala Ile Thr Ile Phe Glu Asp Thr Ile Tyr Trp Thr Asp  
 3410 3415 3420

Trp Asn Thr Arg Thr Val Glu Lys Gly Asn Lys Tyr Asp Gly Ser Asn  
 3425 3430 3435 3440

Arg Gln Thr Leu Val Asn Thr Thr His Arg Pro Phe Asp Ile His Val  
 3445 3450 3455

Tyr His Pro Tyr Arg Gln Pro Ile Val Ser Asn Pro Cys Gly Thr Asn  
 3460 3465 3470

Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Ile Lys Pro Gly Gly Lys Gly  
 3475 3480 3485

Phe Thr Cys Glu Cys Pro Asp Asp Phe Arg Thr Leu Gln Leu Ser Gly  
 3490 3495 3500

Ser Thr Tyr Cys Met Pro Met Cys Ser Ser Thr Gln Phe Leu Cys Ala  
 3505 3510 3515 3520

Asn Asn Glu Lys Cys Ile Pro Ile Trp Trp Lys Cys Asp Gly Gln Lys  
 3525 3530 3535

Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Leu Ala Leu Cys Pro Gln Arg Phe  
 3540 3545 3550

Cys Arg Leu Gly Gln Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Thr Ser Pro

3555	3560	3565
Gln Thr Leu Cys Asn Ala His	Gln Asn Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu	
3570	3575	3580
Asp Arg Leu Leu Cys Glu Asn His His Cys Asp Ser Asn Glu Trp Gln		
3585	3590	3595
Cys Ala Asn Lys Arg Cys Ile Pro Glu Ser Trp Gln Cys Asp Thr Phe		
3605	3610	3615
Asn Asp Cys Glu Asp Asn Ser Asp Glu Asp Ser Ser His Cys Ala Ser		
3620	3625	3630
Arg Thr Cys Arg Pro Gly Gln Phe Arg Cys Ala Asn Gly Arg Cys Ile		
3635	3640	3645
Pro Gln Ala Trp Lys Cys Asp Val Asp Asn Asp Cys Gly Asp His Ser		
3650	3655	3660
Asp Glu Pro Ile Glu Glu Cys Met Ser Ser Ala His Leu Cys Asp Asn		
3665	3670	3675
Phe Thr Glu Phe Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Arg Cys Ile Pro Lys Trp		
3685	3690	3695
Ala Val Cys Asn Gly Val Asp Asp Cys Arg Asp Asn Ser Asp Glu Gln		
3700	3705	3710
Gly Cys Glu Glu Arg Thr Cys His Pro Val Gly Asp Phe Arg Cys Lys		
3715	3720	3725
Asn His His Cys Ile Pro Leu Arg Trp Gln Cys Asp Gly Gln Asn Asp		
3730	3735	3740
Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Pro Arg Glu Cys Thr		
3745	3750	3755
Glu Ser Glu Phe Arg Cys Val Asn Gln Gln Cys Ile Pro Ser Arg Trp		
3765	3770	3775
Ile Cys Asp His Tyr Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Arg Asp		
3780	3785	3790
Cys Glu Met Arg Thr Cys His Pro Glu Tyr Phe Gln Cys Thr Ser Gly		
3795	3800	3805
His Cys Val His Ser Glu Leu Lys Cys Asp Gly Ser Ala Asp Cys Leu		
3810	3815	3820

Asp Ala Ser Asp Glu Ala Asp Cys Pro Thr Arg Phe Pro Asp Gly Ala  
 3825                      3830                      3835                      3840

Tyr Cys Gln Ala Thr Met Phe Glu Cys Lys Asn His Val Cys Ile Pro  
                                  3845                      3850                      3855

Pro Tyr Trp Lys Cys Asp Gly Asp Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp  
                                  3860                      3865                      3870

Glu Glu Leu His Leu Cys Leu Asp Val Pro Cys Asn Ser Pro Asn Arg  
                                  3875                      3880                      3885

Phe Arg Cys Asp Asn Asn Arg Cys Ile Tyr Ser His Glu Val Cys Asn  
                                  3890                      3895                      3900

Gly Val Asp Asp Cys Gly Asp Gly Thr Asp Glu Thr Glu Glu His Cys  
 3905                      3910                      3915                      3920

Arg Lys Pro Thr Pro Lys Pro Cys Thr Glu Tyr Glu Tyr Lys Cys Gly  
                                  3925                      3930                      3935

Asn Gly His Cys Ile Pro His Asp Asn Val Cys Asp Asp Ala Asp Asp  
                                  3940                      3945                      3950

Cys Gly Asp Trp Ser Asp Glu Leu Gly Cys Asn Lys Gly Lys Glu Arg  
                                  3955                      3960                      3965

Thr Cys Ala Glu Asn Ile Cys Glu Gln Asn Cys Thr Gln Leu Asn Glu  
                                  3970                      3975                      3980

Gly Gly Phe Ile Cys Ser Cys Thr Ala Gly Phe Glu Thr Asn Val Phe  
 3985                      3990                      3995                      4000

Asp Arg Thr Ser Cys Leu Asp Ile Asn Glu Cys Glu Gln Phe Gly Thr  
                                  4005                      4010                      4015

Cys Pro Gln His Cys Arg Asn Thr Lys Gly Ser Tyr Glu Cys Val Cys  
                                  4020                      4025                      4030

Ala Asp Gly Phe Thr Ser Met Ser Asp Arg Pro Gly Lys Arg Cys Ala  
                                  4035                      4040                      4045

Ala Glu Gly Ser Ser Pro Leu Leu Leu Leu Pro Asp Asn Val Arg Ile  
                                  4050                      4055                      4060

Arg Lys Tyr Asn Leu Ser Ser Glu Arg Phe Ser Glu Tyr Leu Gln Asp  
 4065                      4070                      4075                      4080

Glu Glu Tyr Ile Gln Ala Val Asp Tyr Asp Trp Asp Pro Lys Asp Ile  
 4085 4090 4095

Gly Leu Ser Val Val Tyr Tyr Thr Val Arg Gly Glu Gly Ser Arg Phe  
 4100 4105 4110

Gly Ala Ile Lys Arg Ala Tyr Ile Pro Asn Phe Glu Ser Gly Arg Asn  
 4115 4120 4125

Asn Leu Val Gln Glu Val Asp Leu Lys Leu Lys Tyr Val Met Gln Pro  
 4130 4135 4140

Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Gly Arg His Ile Tyr Trp Ser Asp  
 4145 4150 4155 4160

Val Lys Asn Lys Arg Ile Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Arg Tyr Arg  
 4165 4170 4175

Lys Trp Leu Ile Ser Thr Asp Leu Asp Gln Pro Ala Ala Ile Ala Val  
 4180 4185 4190

Asn Pro Lys Leu Gly Leu Met Phe Trp Thr Asp Trp Gly Lys Glu Pro  
 4195 4200 4205

Lys Ile Glu Ser Ala Trp Met Asn Gly Glu Asp Arg Asn Ile Leu Val  
 4210 4215 4220

Phe Glu Asp Leu Gly Trp Pro Thr Gly Leu Ser Ile Asp Tyr Leu Asn  
 4225 4230 4235 4240

Asn Asp Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Phe Lys Glu Asp Val Ile Glu Thr  
 4245 4250 4255

Ile Lys Tyr Asp Gly Thr Asp Arg Arg Val Ile Ala Lys Glu Ala Met  
 4260 4265 4270

Asn Pro Tyr Ser Leu Asp Ile Phe Glu Asp Gln Leu Tyr Trp Ile Ser  
 4275 4280 4285

Lys Glu Lys Gly Glu Val Trp Lys Gln Asn Lys Phe Gly Gln Gly Lys  
 4290 4295 4300

Lys Glu Lys Thr Leu Val Val Asn Pro Trp Leu Thr Gln Val Arg Ile  
 4305 4310 4315 4320

Phe His Gln Leu Arg Tyr Asn Lys Ser Val Pro Asn Leu Cys Lys Gln  
 4325 4330 4335

Ile Cys Ser His Leu Cys Leu Leu Arg Pro Gly Gly Tyr Ser Cys Ala

4340	4345	4350
Cys Pro Gln Gly Ser Ser Phe Ile Glu Gly Ser Thr Thr Glu Cys Asp		
4355	4360	4365
Ala Ala Ile Glu Leu Pro Ile Asn Leu Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met		
4370	4375	4380
His Gly Gly Asn Cys Tyr Phe Asp Glu Thr Asp Leu Pro Lys Cys Lys		
4385	4390	4395
4400		
Cys Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Met Ala Phe Ser Lys		
4405	4410	4415
Gly Ile Ser Pro Gly Thr Thr Ala Val Ala Val Leu Leu Thr Ile Leu		
4420	4425	4430
Leu Ile Val Val Ile Gly Ala Leu Ala Ile Ala Gly Phe Phe His Tyr		
4435	4440	4445
Arg Arg Thr Gly Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu Pro Ser Leu		
4450	4455	4460
Ser Ser Leu Val Lys Pro Ser Glu Asn Gly Asn Gly Val Thr Phe Arg		
4465	4470	4475
4480		
Ser Gly Ala Asp Leu Asn Met Asp Ile Gly Val Ser Gly Phe Gly Pro		
4485	4490	4495
Glu Thr Ala Ile Asp Arg Ser Met Ala Met Ser Glu Asp Phe Val Met		
4500	4505	4510
Glu Met Gly Lys Gln Pro Ile Ile Phe Glu Asn Pro Met Tyr Ser Ala		
4515	4520	4525
Arg Asp Ser Ala Val Lys Val Val Gln Pro Ile Gln Val Thr Val Ser		
4530	4535	4540
Glu Asn Val Asp Asn Lys Asn Tyr Gly Ser Pro Ile Asn Pro Ser Glu		
4545	4550	4555
4560		
Ile Val Pro Glu Thr Asn Pro Thr Ser Pro Ala Ala Asp Gly Thr Gln		
4565	4570	4575
Val Thr Lys Trp Asn Leu Phe Lys Arg Lys Ser Lys Gln Thr Thr Asn		
4580	4585	4590
Phe Glu Asn Pro Ile Tyr Ala Gln Met Glu Asn Glu Gln Lys Glu Ser		
4595	4600	4605





图 2

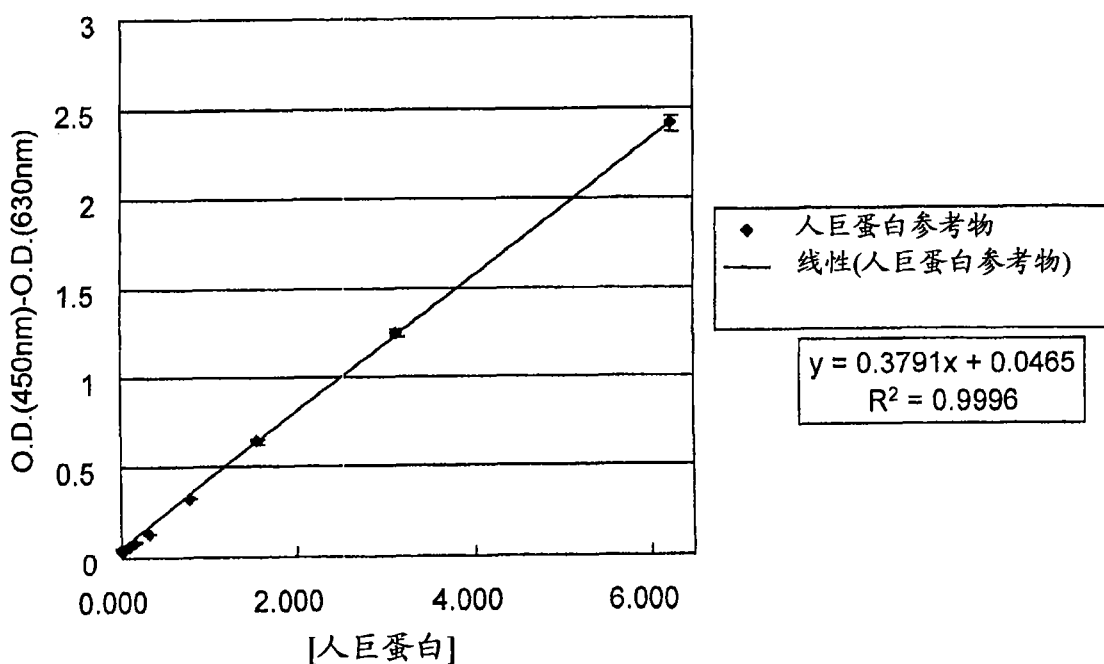


图 3

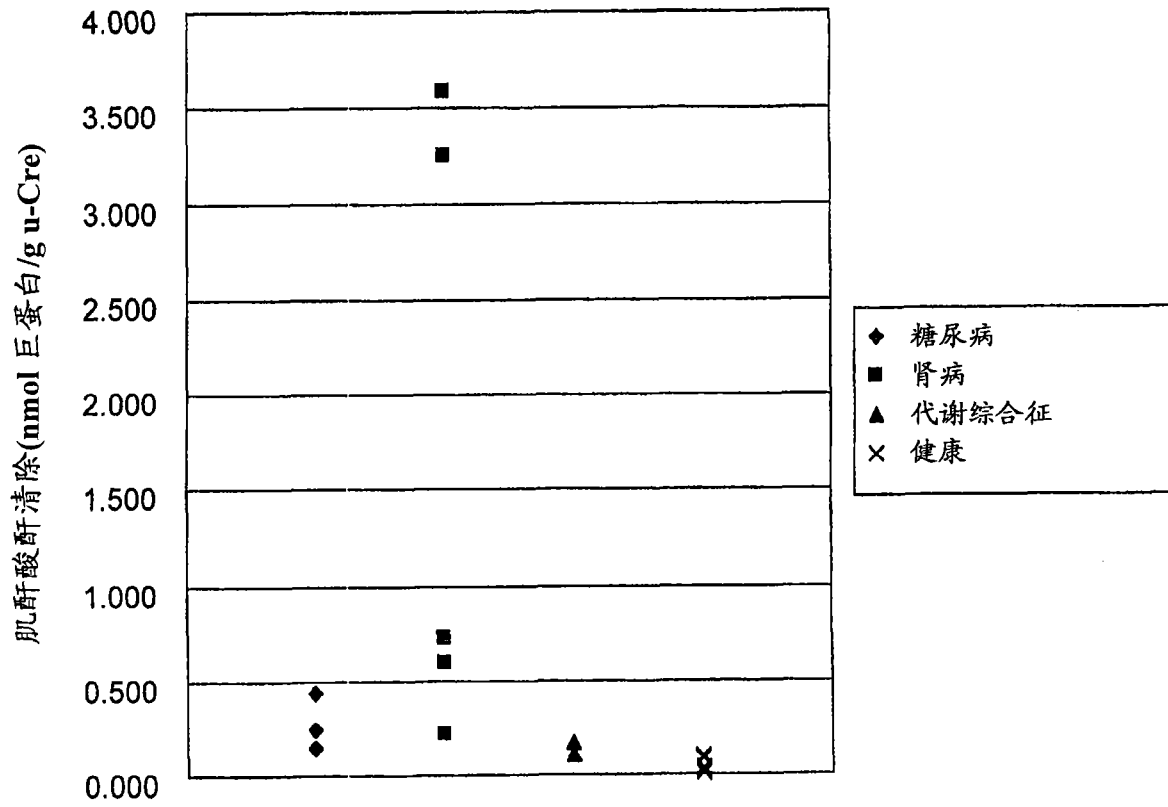
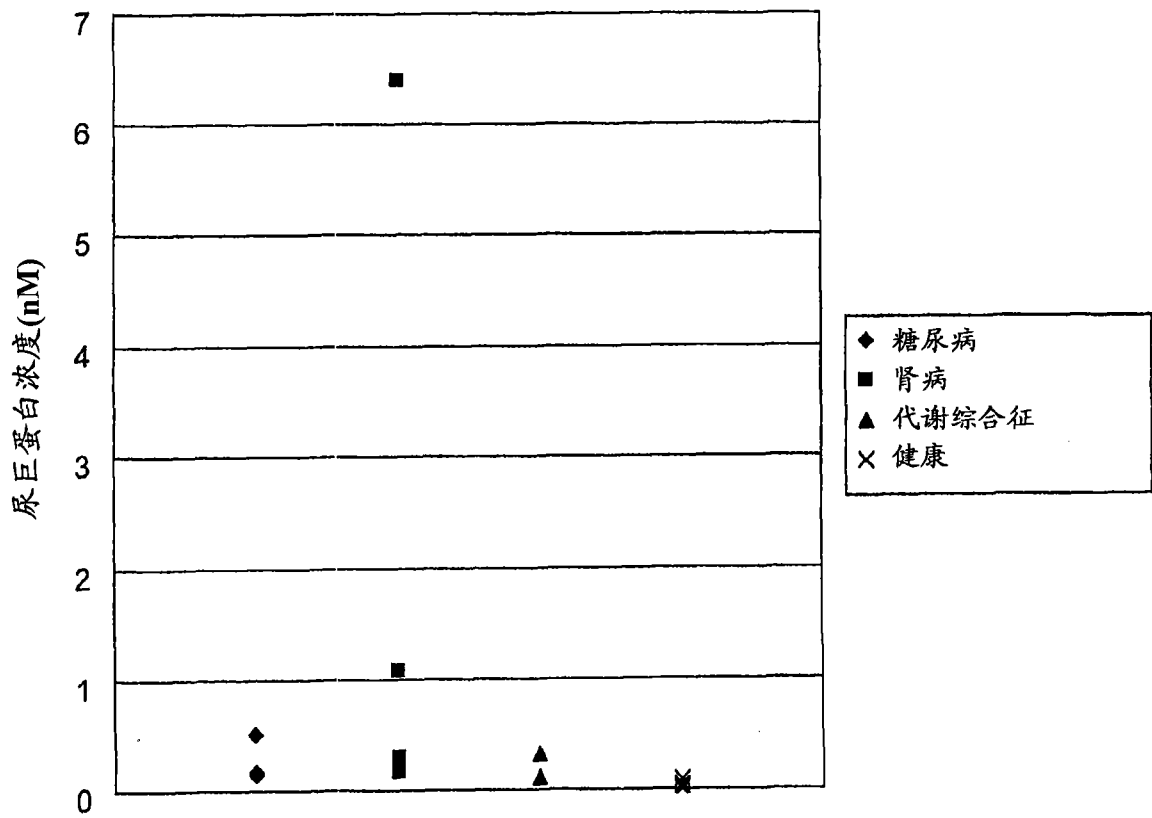


图 4



专利名称(译)	测量人巨蛋白的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101454670A</a>	公开(公告)日	2009-06-10
申请号	CN200780019481.9	申请日	2007-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	小笠原真也 三浦州平 斋藤亮彦 竹田彻朗		
发明人	小笠原真也 三浦州平 斋藤亮彦 竹田彻朗		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/6893 C07K16/28 G01N2800/00 G01N2800/12 G01N33/566 G01N2800/347		
代理人(译)	刘冬 付磊		
优先权	2006089306 2006-03-28 JP		
其他公开文献	CN101454670B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了测量人巨蛋白的方法，与传统方法比较，这种方法可以在较短的时间较简单地完成，而且还可以定量人巨蛋白。本发明还提供了直接在疾病部位早期诊断细胞、组织或器官特异性功能疾病的方法。本发明还公开了通过测定人巨蛋白而检测特征性地观测到巨蛋白表达的器官疾病的方法。

[h-巨蛋白] (nM)	检测人巨蛋白的ELISA校准曲线				
	n=1	n=2	n=3	平均值	S.D.
6.250	2.4356	2.4416	2.3576	2.4116	0.0469
3.125	1.2551	1.2596	1.2261	1.2469	0.0182
1.563	0.6288	0.6576	0.6358	0.6407	0.0150
0.781	0.3282	0.3296	0.3282	0.3287	0.0008
0.313	0.1341	0.1359	0.1370	0.1357	0.0015
0.156	0.0788	0.0917	0.0858	0.0854	0.0065
0.078	0.0582	0.0638	0.0727	0.0649	0.0073
0.031	0.0390	0.0503	0.0468	0.0454	0.0058
0.000	0.0465	0.0409	0.0431	0.0435	0.0028