



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105408744 B

(45)授权公告日 2019.05.21

(21)申请号 201480040284.5

(22)申请日 2014.06.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105408744 A

(43)申请公布日 2016.03.16

(30)优先权数据
61/835,698 2013.06.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.01.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2014/050568 2014.06.17

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/201560 EN 2014.12.24

(73)专利权人 圣-贾斯汀大学中心医院
地址 加拿大魁北克

(72)发明人 A·莫罗 M-Y·阿库姆 东
M·埃尔巴克利

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 黄草生 林柏楠

(51)Int.Cl.
G01N 33/48(2006.01)
A61K 31/135(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)

审查员 于园园

权利要求书2页 说明书29页
序列表29页 附图17页

(54)发明名称

特发性脊柱侧凸的严重进展的新标记物及其用于分层脊柱侧凸患者和预测发展脊柱侧凸的风险的用途

(57)摘要

提供将患有青少年特发性脊柱侧凸(AIS)或处于发展青少年特发性脊柱侧凸(AIS)的风险的受试者分层为诊断上或临床上有用的亚类的方法。所述分层是基于所述受试者的PTP μ 表达和/或活性和/或PIP1 γ 表达和/或活性。还提供也基于所述受试者的PTP μ 表达和/或活性和/或PIP1 γ 表达和/或活性预测发展脊柱侧凸的风险的方法;以及增加有需要的受试者的细胞中的GiPCR信号传导的方法,所述方法包括向所述受试者的细胞施用有效量的PIP1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;PIP1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂;和/或PIP1 γ 表达和/或活性的抑制剂。

1. 一种用于检测细胞中的蛋白质酪氨酸磷酸酶 μ , PTP μ 和磷脂酰肌醇(4)磷酸5激酶1型 γ , PIPK1 γ 表达和/或活性的药剂在制备用于分层患有脊柱侧凸或处于发展脊柱侧凸的风险的受试者的检测药剂中的用途, 所述分层包括:

(i) 提供从所述受试者分离的细胞样品;

(ii) (a) 用一种所述药剂检测所述细胞样品中的PTP μ 表达和/或活性;

(b) 用另一种所述药剂检测所述细胞样品中的PIPK1 γ 表达和/或活性; 或

(c) (a) 和 (b) 的组合; 以及

(iii) 基于所述受试者的所述细胞样品中的PTP μ 和/或PIPK1 γ 的表达或活性的水平将所述受试者分层为AIS亚类, 其中步骤 (iii) 还包括将所述受试者分层为属于:

(1) 第一亚类, 其特征在于:

(a) PTP μ 蛋白的水平相较于对照中的水平降低;

(b) PTP μ 蛋白的磷酸酶活性相较于对照中的水平降低;

(c) PIPK1 γ 蛋白的水平相较于对照中的水平增加;

(d) PIPK1 γ 蛋白激酶活性相较于对照中的水平增加; 或

(e) (a) 至 (d) 中的至少两者的任何组合; 或

(2) 第二亚类, 其特征在于:

(a) PTP μ 蛋白的水平相较于对照中的水平相等或增加;

(b) PTP μ 蛋白的磷酸酶活性相较于对照中的水平相等或增加;

(c) PIPK1 γ 蛋白的水平相较于对照中的水平相等或降低;

(d) PIPK1 γ 蛋白激酶活性相较于对照中的水平相等或降低; 或

(e) (a) 至 (d) 中的至少两者的任何组合。

2. 一种用于检测细胞中的PTP μ 和PIPK1 γ 表达和/或活性的药剂在制备用于预测受试者中发展脊柱侧凸的风险的检测药剂中的用途, 所述预测包括:

(i) 提供从所述受试者分离的细胞样品;

(ii) (a) 用一种所述药剂检测所述细胞样品中的PTP μ 表达和/或活性;

(b) 用另一种所述药剂检测所述细胞样品中的PIPK1 γ 表达和/或活性; 或

(c) (a) 和 (b) 的组合; 以及

(iii) 当: 在所述受试者的样品中相较于对照样品中的水平,

(a) PTP μ 表达和/或活性降低; 和/或

(b) PIPK1 γ 表达和/或活性增加时;

确定所述受试者处于发展脊柱侧凸的风险。

3. 如权利要求2所述的用途, 其中确定所述受试者处于发展脊柱侧凸的风险的步骤 (iii) 是当: 在所述受试者的样品中相较于对照样品中的水平,

(a) PTP μ 蛋白水平降低;

(b) PTP μ 蛋白磷酸酶活性降低;

(c) PIPK1 γ 蛋白水平增加;

(d) PIPK1 γ 蛋白激酶活性增加; 或

(e) (a) 至 (d) 中的至少两者的任何组合时。

4. 如权利要求1或3所述的用途, 其中步骤 (iii) 中的所述PIPK1 γ 蛋白水平是酪氨酸磷

酸化的PIP₃ γ 蛋白。

5. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中在步骤(ii) (b)中检测PIP₃ γ 表达和/或活性包括检测所述样品中的酪氨酸磷酸化的PIP₃ γ 蛋白的水平。

6. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述脊柱侧凸是特发性脊柱侧凸。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述特发性脊柱侧凸是青少年特发性脊柱侧凸(AIS)。

8. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述受试者处于发展青少年特发性脊柱侧凸的风险。

9. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述受试者被预先诊断为患有特发性脊柱侧凸,并且发展所述特发性脊柱侧凸的所述风险是发展更严重的特发性脊柱侧凸的风险。

10. 如权利要求9所述的用途,其中所述受试者被预先诊断为患有青少年特发性脊柱侧凸(AIS),并且发展AIS的所述风险是发展更严重的AIS的风险。

11. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述细胞样品包含成骨细胞、成肌细胞或外周血单核细胞(PBMC)。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述细胞样品包含PBMC。

13. 如权利要求12所述的用途,其中所述PBMC包含淋巴细胞。

14. 一种用于检测细胞中的PTP μ 和PIP₃ γ 表达和/或活性的药剂在制备用于选择作为降低或预防脊柱侧凸的潜在候选物的药剂的检测药剂中的用途,所述用途包括使候选药剂与表达(i) PTP μ 和/或(ii) PIP₃ γ 的细胞相接触,并且(i)用一种所述药剂检测PTP μ 的表达和/或活性和/或(ii)用另一种所述药剂检测PIP₃ γ 的表达和/或活性,其中(a)当PTP μ 的所述表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更高时;和/或(b)当PIP₃ γ 的所述表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

15. 一种用于检测细胞中的PTP μ 和PIP₃ γ 表达和/或活性的药剂在制备用于选择作为增加细胞中的GiPCR信号传导的潜在候选物的药剂的检测药剂中的用途,所述用途包括使候选药剂与表达(i) PTP μ 和/或(ii) PIP₃ γ 的细胞相接触,并且(i)用一种所述药剂检测PTP μ 的表达和/或活性和/或(ii)用另一种所述药剂检测PIP₃ γ 的表达和/或活性,其中(a)当PTP μ 的所述表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更高时;和/或(b)当PIP₃ γ 的所述表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

16. 如权利要求14或15所述的用途,其中当PIP₃ γ 的所述表达在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

17. 如权利要求14至15中任一项所述的用途,其中检测PIP₃ γ 的所述表达包括检测所述细胞中的酪氨酸磷酸化的PIP₃ γ 蛋白的水平。

特发性脊柱侧凸的严重进展的新标记物及其用于分层脊柱侧凸患者和预测发展脊柱侧凸的风险的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2014年6月17日提交并且根据PCT条约第21条(2)款以英文公布的PCT申请序列号PCT/CA2014/*,本申请要求2013年6月17日提交的美国临时申请序列号61/835,698的权益。以上所有文件以引用的方式整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 不适用。

发明领域

[0005] 本发明涉及脊柱侧凸和脊柱侧凸进展的标记物。更具体地说,本发明涉及特发性脊柱侧凸的进展的新标记物及其用于分层脊柱侧凸患者和预测发展脊柱侧凸的风险的用途。

[0006] 对序列表的引用

[0007] 本申请含有名称为14033_124_ST25的计算机可读形式的序列表,所述序列表在2014年6月17日创建且具有95千字节的大小,所述序列表以引用的方式并入本文。

[0008] 发明背景

[0009] 特发性脊柱侧凸是不明原因的脊柱畸形,其通常被定义为伴有脊椎旋转的大于10度的侧弯¹。青少年特发性脊柱侧凸(AIS)是全世界最频繁的幼年期畸形之一,其特征在于不明原因的3D脊柱畸形,并且既代表直接的医学挑战,又代表终生影响个体的慢性病状。它是青少年中最常见的需要外科手术的矫形病状,并且影响4%的此群体。所述病状最常见地在9至13岁的年龄之间被诊断^{2,3,4}。所述诊断主要是排除并且仅在排除脊柱畸形如椎骨畸形、神经肌肉病症或综合征病症的其他原因之后进行。传统地,躯干不对称在身体检查期间通过亚当斯前屈测试揭示并且用脊柱侧凸测量计测量。然后可以使用科布方法通过弯曲的影像学观察和角度测量来确认所述诊断。

[0010] 一旦诊断,医师在管理脊柱侧凸儿童方面的主要关注是弯曲是否将进展。确实,弯曲进展经常是不可预测的并且在女孩之中比在男孩中更频繁地观察到。如果未经治疗,弯曲可能急剧进展,从而产生显著身体畸形且甚至心肺问题。当弯曲超过70度时,这些表现形式变得威胁生命。用于预防或终止弯曲进展的当前治疗选择包括装矫正架和外科手术。一般来说,对于在25与40度之间的弯曲推荐装矫正架,而对大于45度的弯曲或对装矫正架无反应的弯曲保留外科手术。当前在美国,大约一百万的10与16岁之间的儿童具有某种程度的IS。大约10%的被诊断具有特发性脊柱侧凸的儿童具有需要矫形外科手术的弯曲进展。每年在北美进行约29,000例脊柱侧凸外科手术,从而导致显著的心理和生理发病率。(Goldberg MS, Mayo NE, Poitras B等The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part I: Description of the study. Spine 1994;19:1551-61; Poitras B, Mayo NE, Goldberg MS等The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part IV: Surgical correction and back pain. Spine 1994;

19:1582-8)。

[0011] 当前,没有可靠的方法或测试可供用于鉴定处于发展IS的风险的受试者以预测哪些受影响的个体需要治疗来预防或终止所述疾病的进展,以使得可以尽早提供适当治疗并且预防外科手术并发症以及心脏和/或呼吸问题。(Weinstein SL,Dolan LA,Cheng JC等 Adolescent idiopathic scoliosis.Lancet 2008;371:1527-37)。

[0012] 因此,当前治疗如装矫正架或外科手术矫正的应用被延迟直到检测到显著畸形或直到清楚地展示显著进展,从而导致延迟的、不太理想的治疗并且通常导致严重的心理后遗症(Society SR.Morbidity&Mortality Committee annual Report 1997)。

[0013] 当前,为了检测畸形,使诊断的儿童在几年内经受多次射线照相,通常直到他们达到骨骼成熟。据估计,患有脊柱侧凸的典型患者将在3年时期内具有大约22次放射学检查。多次射线照相检查存在潜在风险。也是由于这一原因,能够允许进行特发性脊柱侧凸的预后的替代方法是强烈合乎需要的。

[0014] 在开发能够有助于患者的治疗选择的诊断测试方面的主要限制是AIS的异质性质。在临床水平,AIS的异质性通过弯曲形态的变化性、定位和弯曲幅度、甚至在具有多个受影响的成员的家庭清楚地显示。

[0015] 在不存在可靠的AIS表型的情况下,需要更好地了解与疾病发作和脊柱畸形进展相关的分子变化。疾病的分子定义正在迅速替代传统的基于病理学的疾病描述,这是部分由于其在鉴定针对患者的最佳治疗方案中的效用。

[0016] 为此目的,在AIS患者之中报道了差别褪黑激素信号传导功能障碍的存在,从而导致他们分层为三种功能组或生物内在表型(Moreau等,2004);(Azeddine等,2007);(Letellier等,2008)以及Moreau的W02003/073102。更具体地说,AIS患者被分层为代表不同生物内在表型的三个功能组(FG1、FG2和FG3)。根据此分层,当与健康对照受试者相比时,脊柱侧凸患者和处于更高发展脊柱侧凸风险的儿童对Gi蛋白刺激的反应较小,并且所述分层是基于相对于对照组的减少程度的百分比。分类范围对于FG3被固定在10%与40%之间,对于FG2被固定在40%与60%之间且对于FG1被固定在60%与90%之间。

[0017] 最近,使用细胞介电谱(CDS)技术(其是用于G蛋白以及偶联至所述蛋白的内源性受体的功能评价的无标记方法(Verdonk等,2006)),据发现,在通过褪黑激素刺激褪黑激素受体之后的细胞反应在正常成骨细胞中主要是Gi依赖性的并且在来源于AIS患者的成骨细胞中减少至不同程度(Akoume等,2010)。大约33%的被诊断具有缺陷型Gi蛋白功能的无症状儿童已在许多年之后发展脊柱侧凸(Akoume等,2010)。

[0018] 脊柱侧凸的早期检测/预后不仅是对于成功的和侵入性更小的临床结果来说关键的,而且扩大临床医师的治疗选择范围。确实,改进患者分层和疾病分期代表在患者的脊柱畸形太晚期之前选择用于微创外科手术的AIS患者的关键步骤。OPN(多功能细胞因子)已被鉴定为特发性脊柱侧凸的发展中的潜在关键病理生理促成因素。具体地,患有特发性脊柱侧凸的患者中和双足小鼠(所述疾病的完善确立的动物模型)中的血浆OPN水平增加与所述疾病相关(参见Moreau的W0 2008/119170)。

[0019] 普遍认为脊柱侧凸的发展受姿势机制影响。天然地存在于人中或在动物中实验诱导的双足病状似乎在脊柱侧凸畸形的表现中起重要作用(Machida等,1999)。重要地,据报道,当C57B1/6或C3HHe背景的小鼠在其前肢和尾部的切断之后获得40周的双足姿势时,所

述小鼠发展密切类似于人特发性脊柱侧凸的脊柱侧凸 (Machida等, 2006); (Oyama等, 2006)。

[0020] 本说明书参考多个文献, 所述文献的内容以引用的方式整体并入本文。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明提供以下证据: 在高血浆OPN条件下蛋白质酪氨酸磷酸酶 μ (PTP μ) 的缺乏可能加剧脊柱畸形进展而不会影响循环OPN水平或OPN受体水平。确实, 本文呈现的数据揭示双足PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠 (缺失编码PTP μ 的基因受体型酪氨酸-蛋白质磷酸酶 μ (PTPRM)) 展示更高的脊柱侧凸发病率且表现出比双足WT小鼠更显著的侧弯。更具体地说, PTP μ 缺乏导致OPN对GiPCR信号传导的抑制作用的增大。此外, 本文呈现的结果将磷脂酰肌醇 (4) 磷酸5激酶1型 γ (PIP3K1 γ) (一种PTP μ 底物) 由于PTP μ 的损失所致的失调鉴别为在高血浆OPN条件下发展严重侧弯的潜在独特机制: PTP μ 的缺乏有利于OPN与整联蛋白经由PIP3K1 γ 作用的相互作用。

[0023] 整联蛋白与其配体的缔合可以在粘着斑激酶 (FAK) 依赖性C肉瘤酪氨酸激酶 (Src) 活化之后通过PIP3K1 γ 的酪氨酸磷酸化进行调控^{12, 13}, 并且PIP3K1 γ 通过PTP μ 去磷酸化¹⁴。本文显示在来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞中观察到增加的酪氨酸磷酸化的PIP3K1 γ , 并且这种增加的磷酸化通过用药理学抑制剂抑制FAK和Src而减弱。因此, 本文呈现的数据证明PIP3K1 γ 促成在PTP μ 不存在下观察到的GiPCR信号传导的降低增加。这由以下观察结果进一步支持: 通过siRNA沉默PIP3K1 γ 消除WT与PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞之间的反应程度的差异。不受此假设的限制, 总的来说, 这些结果表明PTP μ 的损失引起PIP3K1 γ 活性的失调, 这进而导致OPN对GiPCR信号传导的抑制作用的增大以及随后的严重侧弯。

[0024] 来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞显示对OPN对GiPCR信号传导的抑制作用更敏感。此发现连同PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠表现出更严重的侧弯的事实支持以下见解: 阻抑GiPCR信号传导是驱动脊柱侧凸的发展的生物过程中的重要事件, 并且指示PTP μ 蛋白的减少促成脊柱侧凸的病理学的变化且在双足小鼠中脊柱侧凸的严重进展中起重要作用。

[0025] 本申请还显示所检查的脊柱侧凸人患者表现出比对照个体更低水平的PTP μ 蛋白和更高水平的PIP3K1 γ 蛋白。

[0026] 因此, 在本发明的一方面, 提供一种分层患有青少年特发性脊柱侧凸 (AIS) 的受试者的方法, 所述方法包括: (i) 提供从所述受试者分离的细胞样品; 和 (ii) (a) 检测所述细胞样品中的PTP μ 表达或活性; (b) 检测所述细胞样品中酪氨酸磷酸化的PIP3K1 γ 表达或活性; (c) 检测所述细胞样品中的总PIP3K1 γ 表达或活性; 或 (d) (a) 至 (c) 中的至少两者的任何组合; 由此检测步骤的结果使能够将患有AIS的受试者分层为属于AIS亚类。

[0027] 根据本发明的另一方面, 提供一种预测发展脊柱侧凸的风险的方法, 所述方法包括: (i) 提供从所述受试者分离的细胞样品; 和 (ii) (a) 检测所述细胞样品中的PTP μ 表达或活性; (b) 检测所述细胞样品中酪氨酸磷酸化的PIP3K1 γ 表达或活性; (c) 检测所述细胞样品中的总PIP3K1 γ 表达或活性; 或 (d) (a) 至 (c) 中的至少两者的任何组合; 其中在来自所述受试者的细胞样品中比对照样品中更低的PTP μ 表达或活性和/或在来自所述受试者的细胞样品中比对照样品中更高的酪氨酸磷酸化的PIP3K1 γ 表达或活性和/或在来自所述受试者的细胞样品中比对照样品中更高的总PIP3K1 γ 表达或活性指示所述受试者处于发展AIS的风险。

[0028] 在一个实施方案中,所述脊柱侧凸是特发性脊柱侧凸。在另一个实施方案中,所述特发性脊柱侧凸是青少年特发性脊柱侧凸(AIS)。在另一个实施方案中,所述受试者是发展青少年特发性脊柱侧凸的可能候选者。在另一个实施方案中,所述受试者被预先诊断为患有特发性脊柱侧凸,并且发展特发性脊柱侧凸的风险是发展更严重的特发性脊柱侧凸的风险。在另一个实施方案中,所述细胞样品包含成骨细胞、成肌细胞或外周血单核细胞(PBMC)。在另一个实施方案中,所述细胞样品包含PBMC。在另一个实施方案中,所述细胞样品包含淋巴细胞。

[0029] 根据本发明的另一方面,提供一种增加有需要的受试者(例如,脊柱侧凸受试者)的细胞中的GiPCR信号传导的方法,所述方法包括向所述受试者的细胞施用有效量的:(a) PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;(b) PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂;(c) PIPK1 γ 表达和/或活性的抑制剂;(d) 或(a)至(c)的任何组合,由此GiPCR信号传导在所述受试者的细胞中增加。

[0030] 根据本发明的另一方面,提供一种用途,所述用途包括有效量的:(a) PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;(b) PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂;(c) PIPK1 γ 表达和/或活性的抑制剂;(d) 或(a)至(c)的任何组合用于增加有需要的受试者(例如,脊柱侧凸受试者)的细胞中的GiPCR信号传导或用于制备用于增加有需要的受试者(例如,脊柱侧凸受试者)的细胞中的GiPCR信号传导的药剂。

[0031] 在一个实施方案中,PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂是C肉瘤酪氨酸激酶(Src)抑制剂。在另一个实施方案中,Src抑制剂是PP2。在另一个实施方案中,PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂是粘着斑激酶(FaK)抑制剂。在另一个实施方案中,所述Fak抑制剂是FAK抑制剂-14(1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐)。在另一个实施方案中,PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂是PTP μ 或PTP μ 表达和/或活性的活化剂。在另一个实施方案中,PIPK1 γ 表达的抑制剂是PIPK1 γ siRNA。在另一个实施方案中,有需要的受试者是被诊断患有脊柱侧凸的受试者。在另一个实施方案中,有需要的受试者可能发展脊柱侧凸。在另一个实施方案中,所述脊柱侧凸是青少年特发性脊柱侧凸。在另一个实施方案中,所述方法是在体外。

[0032] 根据本发明的另一方面,提供一种选择作为降低或预防脊柱侧凸的潜在候选物的药剂的方法,所述方法包括使候选药剂与表达(i) PTP μ 和/或(ii) PIPK1 γ 的细胞相接触,并且检测PTP μ 或PIPK1 γ 的表达和/或活性,其中(a)当PTP μ 的表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更高时;和/或(b)当PIPK1 γ 的表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

[0033] 在一个实施方案中,当PIPK1 γ 的表达在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

[0034] 根据本发明的另一方面,提供一种用于分层脊柱侧凸和或用于预测发展脊柱侧凸的风险的试剂盒,所述试剂盒包括(a)用于检测所述细胞样品中的PTP μ 表达或活性的配体;(b)用于检测所述细胞样品中的酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ 表达或活性的配体;和/或(c)用于检测所述细胞样品中的总PIPK1 γ 表达或活性的配体。

[0035] 根据本发明的另一方面,提供一种用于增加有需要的受试者(例如,脊柱侧凸受试者)的细胞中的GiPCR信号传导的试剂盒,所述试剂盒包括(a) PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;(b) PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂;(c) PIPK1 γ 表达和/或活性的抑制剂;(d) 或(a)

至(c)的任何组合。在具体实施方案中,本发明的试剂盒还包括载体。在一个具体实施方案中,所述试剂盒还包括用于一种或多种配体抑制剂和/或活化剂的一个或多个容器。所述试剂盒可另外包括使用所述试剂盒用于以下的说明书:i)用于分层患有AIS的受试者;ii)预测发展脊柱侧凸的风险和/或iii)用于增加有需要的受试者的细胞中的GiPCR信号传导。

[0036] 根据本发明的另一方面,提供一种(例如,用于增加有需要的受试者(例如,脊柱侧凸受试者)的细胞中的GiPCR信号传导)的组合物,所述组合物包含(a)PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;(b)PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂;(c)PIPK1 γ 表达和/或活性的抑制剂;(d)或(a)至(c)的任何组合。在具体实施方案中,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0037] 根据本发明的另一方面,提供一种分层患有脊柱侧凸或处于发展脊柱侧凸的风险的受试者的方法,所述方法包括:(i)提供从所述受试者分离的细胞样品;(ii)(a)检测所述细胞样品中的PTP μ 表达和/或活性;(b)检测所述细胞样品中的PIPK1 γ 表达和/或活性;或(c)(a)和(b)的组合;以及(iii)基于所述受试者的细胞样品中的PTP μ 和/或PIPK1 γ 的表达或活性的水平将所述受试者分层为AIS亚类。

[0038] 在一个具体实施方案中,步骤(iii)还包括将所述受试者分层为属于:(1)第一亚类,其特征在于:(a)PTP μ 蛋白的水平相较于对照中的水平降低;(b)PTP μ 蛋白的磷酸酶活性相较于对照中的水平降低;(c)PIPK1 γ 蛋白的水平相较于对照中的水平增加;(d)PIPK1 γ 蛋白激酶活性相较于对照中的水平增加;或(e)(a)至(d)中的至少两者的任何组合;或(2)第二亚类,其特征在于:(a)PTP μ 蛋白的水平相较于对照中的水平相等或增加;(b)PTP μ 蛋白的磷酸酶活性相较于对照中的水平相等或增加;(c)PIPK1 γ 蛋白的水平相较于对照中的水平相等或降低;(d)PIPK1 γ 蛋白激酶活性相较于对照中的水平相等或降低;或(e)(a)至(d)中的至少两者的任何组合。

[0039] 根据本发明的另一方面,提供一种预测受试者中发展脊柱侧凸的风险的方法,所述方法包括:(i)提供从所述受试者分离的细胞样品;(ii)(a)检测所述细胞样品中的PTP μ 表达和/或活性;(b)检测所述细胞样品中的PIPK1 γ 表达和/或活性;或(b)(a)和(b)的组合;以及(iii)当:在所述受试者的样品中相较于对照样品中的水平,(a)PTP μ 表达和/或活性降低;和/或(b)PIPK1 γ 表达和/或活性增加时;确定所述受试者处于发展脊柱侧凸的风险。

[0040] 在一个具体实施方案中,确定所述受试者处于发展脊柱侧凸的风险的步骤(iii)是当:在所述受试者的样品中相较于对照样品中的水平,(a)PTP μ 蛋白水平降低;(b)PTP μ 蛋白磷酸酶活性降低;(c)PIPK1 γ 蛋白水平增加;(d)PIPK1 γ 蛋白激酶活性增加;或(e)(a)至(d)中的至少两者的任何组合时。在另一个具体实施方案中,其中步骤(iii)中的PIPK1 γ 蛋白水平是酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ 蛋白。在另一个具体实施方案中,在步骤(ii)(b)中检测PIPK1 γ 表达和/或活性包括检测所述样品中的酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ 蛋白的水平。在另一个具体实施方案中,所述脊柱侧凸是特发性脊柱侧凸。在另一个具体实施方案中,所述特发性脊柱侧凸是青少年特发性脊柱侧凸(AIS)。在另一个具体实施方案中,所述受试者处于发展青少年特发性脊柱侧凸的风险。在另一个具体实施方案中,所述受试者被预先诊断为患有特发性脊柱侧凸,并且发展特发性脊柱侧凸的风险是发展更严重的特发性脊柱侧凸的风险。在另一个具体实施方案中,所述受试者被预先诊断为患有青少年特发性脊柱侧凸(AIS),并且发展AIS的风险是发展更严重的AIS的风险。在另一个具体实施方案中,所述细

胞样品包含成骨细胞、成肌细胞或外周血单核细胞 (PBMC)。在另一个具体实施方案中,所述细胞样品包含PBMC。在另一个具体实施方案中,所述PBMC包含淋巴细胞。

[0041] 根据本发明的另一方面,提供一种增加有需要的受试者的细胞中的GiPCR信号传导的方法,所述方法包括向所述受试者的细胞施用有效量的:(a) PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;(b) PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂;(c) PIPK1 γ 表达和/或活性的抑制剂;或(d) (a) 至 (c) 的任何组合,由此GiPCR信号传导在所述受试者的细胞中增加。

[0042] 在一个具体实施方案中,PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂是C肉瘤酪氨酸激酶 (Src) 抑制剂。在另一个具体实施方案中,Src抑制剂是PP2。在另一个具体实施方案中,PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂是粘着斑激酶 (Fak) 抑制剂。在另一个具体实施方案中,所述Fak抑制剂是FAK抑制剂-14 (1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐)。在另一个具体实施方案中,PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂是PTP μ 或PTP μ 表达和/或活性的活化剂。在另一个具体实施方案中,PIPK1 γ 表达的抑制剂是siRNA PIPK1 γ 。在另一个具体实施方案中,有需要的受试者是被诊断患有脊柱侧凸的受试者。在另一个具体实施方案中,有需要的受试者可能发展脊柱侧凸。在另一个具体实施方案中,所述脊柱侧凸是青少年特发性脊柱侧凸。在另一个具体实施方案中,所述方法是在体外。

[0043] 根据本发明的另一方面,提供一种选择作为降低或预防脊柱侧凸的潜在候选物的药剂的方法,所述方法包括使候选药剂与表达 (i) PTP μ 和/或 (ii) PIPK1 γ 的细胞相接触,并且检测 (i) PTP μ 和/或 (ii) PIPK1 γ 的表达和/或活性,其中 (a) 当PTP μ 的表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更高时;和/或 (b) 当PIPK1 γ 的表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

[0044] 根据本发明的另一方面,提供一种选择作为增加细胞中的GiPCR信号传导的潜在候选物的药剂的方法,所述方法包括使候选药剂与表达 (i) PTP μ 和/或 (ii) PIPK1 γ 的细胞相接触,并且检测 (i) PTP μ 和/或 (ii) PIPK1 γ 的表达和/或活性,其中 (a) 当PTP μ 的表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更高时;和/或 (b) 当PIPK1 γ 的表达和/或活性在所述候选药剂存在下相较于在所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。

[0045] 在一个具体实施方案中,当PIPK1 γ 的表达在所述候选药剂存在下相较于所述候选药剂不存在下更低时,选择所述候选药剂。检测PIPK1 γ 的表达包括检测所述样品中的酪氨酸磷酸化PIPK1 γ 蛋白的水平。

[0046] 本发明的其他目的、优点和特征将在阅读仅参考附图通过举例给出的本发明的具体实施方案的以下非限制性描述时变得更明显。

[0047] 附图简述

[0048] 在附图中:

[0049] 图1示出PTP μ 的缺乏影响与双足小鼠中的高血浆OPN水平相关的脊柱侧凸的性质。

(A) 在实验周期期间每12周测量60C57B1/6j野生型 (WT) 小鼠和60PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠中的血浆OPN。对于每个组示出平均OPN水平。在所有时间点未检测到WT和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的血浆OPN水平的差异。在两种表型中在术后(除去前肢)第36周注意到OPN的较高值。(B) 通过射线照相术对60WT和60PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠进行检查。图 (C) 和 (D) 示出野生型小鼠 (C) 组和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠 (D) 组

的代表性射线照片。可以观察到PTP $\mu^{-/-}$ 代表性小鼠的脊柱侧凸比野生型小鼠的脊柱侧凸更严重。PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠显示相较于野生型小鼠脊柱侧凸的发病率(图B)和严重程度(图D)的增加。

[0050] 图2示出激动剂对GiPCR信号传导的特异性。用百日咳毒素(PTX)预处理来自双足WT和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞阻断三种测试化合物中的每种与这些细胞中的其同源受体的Gi偶联,所述受体即羟甲唑啉(α_2 肾上腺素能受体(α_2 -ADR)、生长激素抑制素(生长激素抑制素受体(SSTR));以及爱帕林-17(爱帕林受体(APJR))。图A至C示出用媒介物处理的C57B1/6j野生型(WT)细胞的反应;图D至F示出用PTX处理的C57B1/6j野生型(WT)细胞的反应;图G至I示出用媒介物处理的C57B1/6j(PTP $\mu^{-/-}$)细胞的反应;并且图J至L示出用PTX处理的C57B1/6j(PTP $\mu^{-/-}$)细胞的反应。这些结果指示这些化合物引起WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的GiPCR(即,GiPCR信号传导)的典型细胞介电谱(CDS)反应概况。图A至L呈现如在CellKeyTM上观察到的原始结果。

[0051] 图3示出PTP μ 的缺乏加剧双足小鼠中的缺陷型GiPCR信号传导。图A至C显示来自双足PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞对爱帕林-17(APJR)、羟甲唑啉(α_2 -ADR)和生长激素抑制素(SSTR)的反应比来自双足WT小鼠的成骨细胞小。对于每种激动剂使用不同浓度,从而在来自WT和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞中以浓度依赖性方式产生增加的反应。对于图D和E,将OPN在WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中敲低并且通过qPCR(D)和蛋白质印迹(E)测定敲低效率。图F至H示出使用以上提及的相同三种激动剂,PTP μ 的缺乏加剧OPN对GiPCR信号传导的抑制作用。

[0052] 图4示出PTP μ 的缺乏加剧由OPN引起的缺陷型GiPCR信号传导。图A至C呈现在用不同浓度的所鉴别的激动剂GiPCR刺激之前,使用来自用不同浓度的外源性重组OPN(rOPN)处理的WT和PTP $\mu^{-/-}$ 的成骨细胞所获得的结果。

[0053] 图5示出PTP μ 的缺乏影响OPN与成骨细胞中的整联蛋白的相互作用。在图A和B中,分别使用qPCR和蛋白质印迹测定WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中OPN受体的表达。在图C中,将WT和PTP $\mu^{-/-}$ 的成骨细胞细胞裂解产物用针对特异性OPN受体亚基(即, β_1 、 β_3 、 β_5 、 β_8 、 α_1 、 α_4 、 α_5 、 α_v 以及CD44)的抗体免疫沉淀,接着进行对OPN具有特异性的蛋白质印迹。图C中的结果示出PTP μ 的缺乏增加OPN与整联蛋白而不是CD44的相互作用。

[0054] 图6示出沉默PIPK1 γ 选择性地增强PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的GiPCR信号传导。在图A中,在免疫沉淀测定之前,将来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞用Src(PP2)和FAK的抑制剂(抑制剂-14)进行处理,所述抑制剂已知防止磷酸化。虽然PIPK1 γ 的磷酸化水平通过两种处理减弱,但它们在来自PTP $\mu^{-/-}$ 的成骨细胞中比来自WT小鼠的成骨细胞中高。P-tyr:酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ ;PIPK1:PIPK1 γ 总形式。在图B和C中,使用siRNA方法敲低WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的PIPK1 γ ,如分别由qPCR和蛋白质印迹所显示。图D至H示出在PIPK1 γ 被敲低的WT和PTP μ 成骨细胞中对生长激素抑制素刺激的反应。缺失PIPK1 γ 的成骨细胞表现出对生长激素抑制素刺激的与WT成骨细胞类似程度的反应。

[0055] 图7示出PTP μ 在来自患有特发性脊柱侧凸的患者的成骨细胞中下调。在图A至C中,分别使用RT-PCT、qPCR和蛋白质印迹相对于来自对照受试者的成骨细胞测定来自脊柱侧凸患者的成骨细胞中PTP μ 的表达。

[0056] 图8示出PIPK1 γ 表达在AIS患者中相较于对照受试者上调。使用qPCR相对于来自对照受试者的成骨细胞测定来自脊柱侧凸患者的成骨细胞中PIPK1 γ 同种型90的表达。

[0057] 图9示出PIP₁ γ 同种型1至4与X2的氨基酸序列之间的多重序列比对。

[0058] 图10示出PTP μ 同种型1与2的氨基酸序列之间的多重序列比对。

[0059] 示意性实施方案的说明

[0060] 如本文所用,术语“发展脊柱侧凸的风险”是指受试者在未来发展脊柱侧凸(即,脊柱畸形)和/或发展更严重的脊柱侧凸(即,弯曲进展)的遗传或代谢素因。例如,受试者的科布角(Cobb's angle)的增加(例如,从40°至50°或从18°至25°)是脊柱侧凸的“发展”。

[0061] 在一个实施方案中,上述受试者是发展脊柱侧凸,如特发性脊柱侧凸(例如,婴儿特发性脊柱侧凸、少年型特发性脊柱侧凸或青少年特发性脊柱侧凸(AIS))的可能候选者。如本文所用,表述“发展脊柱侧凸的可能候选者”或“可能发展脊柱侧凸”包括父母中至少有一人具有脊柱侧凸(例如,青少年特发性脊柱侧凸)的受试者(例如,儿童)。在其他因素之中,年龄(青春期)、性别和其他家族前因是已知促成发展脊柱侧凸风险的因素并且在一定程度上用于评定发展脊柱侧凸的风险。在某些受试者中,脊柱侧凸在短时期内迅速发展至需要矫正外科手术的地步(经常是畸形达到科布角 $\geq 50^\circ$ 时)。从脊柱侧凸如AIS被诊断的时刻(当脊柱侧凸明显时)可供使用的当前做法包括观察(当科布角在约10°-25°时)、矫形装置(当科布角在约25°-30°时)和外科手术(超过45°)。进展风险的更可靠的确定可以使得能够1)选择适当的饮食以除去被鉴定为脊柱侧凸的促成因素的某些食品;2)选择最佳治疗剂;和/或3)选择侵入性最小的可用治疗如姿势锻炼、矫形装置或侵入性较小的外科手术或无需融合的外科手术(一种不融合脊椎且保留脊柱运动性的外科手术)。本发明涵盖鉴于发展脊柱侧凸的确定的风险选择最有效的且侵入性最小的已知预防措施或治疗。

[0062] 如本文所用,术语“受试者”意指任何哺乳动物,包括人、小鼠、大鼠、狗、鸡、猫、猪、猴、马等。在一个具体实施方案中,受试者是指人。

[0063] 在本发明的背景下“有需要的受试者”或“患者”旨在包括将受益于或可能受益于GiPCR信号传导的增加了的任何受试者。在一个实施方案中,有需要的受试者是将受益于或可能受益于以下的受试者:i)PIP₁ γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂;ii)PIP₁ γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂(例如,PTP μ 或能够增加PTP μ 的水平(即,在转录和/或翻译水平下的PTP μ 表达和/或PTP μ 稳定性)或活性(例如,去磷酸化活性)的任何化合物);iii)PIP₁ γ 表达或活性的抑制剂;或iv)以上的任何组合。在一个实施方案中,有需要的受试者是被诊断患有脊柱侧凸(例如,AIS)的受试者。在另一个实施方案中,有需要的受试者处于发展脊柱侧凸的风险或可能发展脊柱侧凸(例如,AIS)。

[0064] 如本文所用,术语“生物样品”是指从生物分离的任何固体或液体样品。在一个具体实施方案中,生物样品是指从人分离的任何固体或液体样品。不受如此限制,生物样品包括活组织检查材料、血液、泪液、唾液、母乳、滑液、尿液、耳液、羊水和脑脊液。在一个具体实施方案中,生物样品是指血液样品。

[0065] 如本文所用,术语“血液样品”意指血液、血浆或血清。

[0066] 如本文所用,术语“对样品”意指不来自已知i)具有降低的GiPCR信号传导;ii)患有脊柱侧凸或iii)是发展脊柱侧凸的可能候选者的受试者的样品。在用于确定被预先诊断患有脊柱侧凸的受试者中发展脊柱侧凸风险的方法中,然而所述对样品还可来自在所述疾病或病症的早期阶段在密切注意下的受试者。在一个具体实施方案中,对样品可来自被诊断患有脊柱侧凸且属于同一功能组(例如,FG1、FG2或FG3)在所述疾病或病症的早期

阶段(或晚期阶段)的另一个受试者。

[0067] 如本文所用,术语“对照”意指涵盖“对照样品”。在某些实施方案中,术语“对照”还指在测定多种样品(例如,从未知患有脊柱侧凸且未知是发展脊柱侧凸的可能候选者的一些受试者获得的样品)中的PTP μ 表达(例如,蛋白质水平)和/或活性(例如,磷酸酶活性)和/或PIPK1 γ 表达(例如,蛋白质水平)和/或活性(例如,蛋白激酶活性)之后获得的平均值或中值。

[0068] 如本文所用,关于脊柱侧凸的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指以下中的至少一种:预先存在的脊柱畸形的科布角的减小;改善脊柱运动性;保留/维持脊柱运动性;改善具体计划中的均衡和平衡;维持/保留具体计划中的均衡/平衡;改善具体计划中的功能性;保留/维持具体计划中的功能性;美容学改善;以及任何以上的组合。

[0069] 如本文所用,关于脊柱侧凸的术语“预防(preventing)”或“预防(prevention)”意指以下中的至少一种:患有脊柱侧凸的患者中或无症状患者中科布角进展的降低;脊柱畸形的出现(包括在3D上影响肋架和骨盆的变化)的完全预防;以及任何以上的组合。

[0070] 术语“抑制因子”、“抑制剂”和“拮抗剂”是本领域中熟知的并且在本文可互换地使用。它们包括细胞内以及细胞外抑制剂。

[0071]

基因(基因 ID)	蛋白质(登录号)	mRNA 序列	氨基酸序列
PIPK1 γ (23396)	PIPK1 γ 同种型 1 (NP_001182662.1) (NM_001195733.1)	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
PIPK1 γ (23396)	PIPK1 γ 同种型 2 (NP_036530.1) (NM_012398.2)	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
PIPK1 γ (23396)	PIPK1 γ 同种型 3(或 X1) (XP_005259580.1) (XM_005259523)	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
PIPK1 γ (23396)	PIPK1 γ 同种型 4	不适用	SEQ ID NO: 33
PIPK1 γ (23396)	PIPK1 γ 同种型 X2 (XP_006722775) (XM_006722712.1)	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
PTP μ (5797)	PTP μ 同种型 1 (NP_001098714.1) (NM_001105244)	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37
PTP μ (5797)	PTP μ 同种型 2 (NP_002836.3) (NM_002845.3)	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39

[0072] 术语“PIPK1 γ 活性的抑制剂”包括能够不利地影响PIPK1 γ (例如,基因ID:23396, NM_012398.2, NP_036530.1)的活性(例如,催化活性)的任何化合物并且包括促进PIPK1 γ 的去磷酸化的药剂(即,PIPK1 γ 酪氨酸去磷酸化的活化剂)以及抑制PIPK1 γ 的磷酸化的药剂(即,PIPK1 γ 酪氨酸磷酸化的抑制剂)。PIPK1 γ 活性的抑制剂包括但不限于抗体、抗体片段、小分子、肽等。它们还包括但不限于PP-242、R406、TG-100-115、鲁伯斯塔(ruboxistaurin)、GSK690693、帕唑帕尼、阿伏西地(alvocidib)、SB203580以及星孢菌素(staurosporine)。还可使用US20070161060A1中描述的用于鉴别调节E-钙粘着蛋白的

PIP $\text{K1 } \gamma$ 运输的药剂的筛选方法来鉴别相关化合物。

[0073] 在一个实施方案中,PIP $\text{K1 } \gamma$ 活性的抑制剂是针对(或特异性地结合)人PIP $\text{K1 } \gamma$ 多肽的中和抗体。抗体在以下进一步描述。

[0074] 术语“PIP $\text{K1 } \gamma$ 酪氨酸去磷酸化的活化剂”包括能够不利地影响PIP $\text{K1 } \gamma$ 的酪氨酸去磷酸化(即,降低PIP $\text{K1 } \gamma$ 的磷酸化水平)的任何化合物。不受如此限制,这类活化剂包括磷酸酶,如PTP μ (例如,NM_001105244.1、NP_001098714.1)以及能够增加PTP μ 的表达(即,在转录和/或翻译水平下和/或稳定性)或活性(例如,磷酸酶活性)的任何化合物。

[0075] 表述“PIP $\text{K1 } \gamma$ 酪氨酸磷酸化的抑制剂”包括能够不利地影响PIP $\text{K1 } \gamma$ 的酪氨酸磷酸化的任何化合物。不受如此限制,这类抑制剂包括Src抑制剂(例如,PP2,来自供应商Sigma Aldrich:Src-抑制剂-1(4-(4'-(苯氧基苯胺基)-6,7-二甲氧基喹唑啉);来自供应商Tocris:A419259三盐酸化物、AZM 475271、博舒替尼、除莠霉素A、MNS、1-萘基PP1、PD 166285二盐酸化物、PP1)以及Fak抑制剂(例如,抑制剂-14(即1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐),来自供应商Sigma Aldrich(作为供应商):PF-573228,来自供应商Medkoo Bioscience:PF-562271;来自供应商Selleckche:NVP-TAE226)。

[0076] 术语“PIP $\text{K1 } \gamma$ 表达的抑制剂”包括能够不利地影响PIP $\text{K1 } \gamma$ 的表达(即,在转录和/或翻译水平)、即PIP $\text{K1 } \gamma$ mRNA和/或蛋白质的水平或所述蛋白质的稳定性的任何化合物。不受如此限制,这类抑制剂包括RNA干扰剂(siRNA、shRNA、miRNA)、反义分子、核酶、蛋白质(例如,显性阴性、无活性变体)、肽、小分子、抗体、抗体片段等。这类RNA干扰剂被设计成在适合条件下与其靶核酸特异性地杂交并且因此与其靶核酸大致上互补。

[0077] 术语“PTP μ 表达的刺激剂/增强剂”包括能够积极地影响PTP μ 的表达(即,在转录和/或翻译水平)、即PTP μ mRNA和/或蛋白质的水平或所述蛋白质的稳定性的任何化合物。

[0078] 本发明还涉及用于测定PTP μ 和/或PIP $\text{K1 } \gamma$ 的表达(即转录物(RNA)或翻译产物(蛋白质))水平、稳定性和/或活性的方法。在具体实施方案中,本发明还包括一种方法,所述方法包括测定一种或多种其他脊柱侧凸标记物的表达水平和/或活性。例如,本发明可包括如Moreau的WO 2008/119170中所公开测定OPN、sCD44等的表达(即转录物或翻译产物)水平和/或活性。本发明因此涵盖用于这种测定的任何已知的方法,包括Elisa(酶联免疫吸附测定)、RIA(放射免疫测定)、免疫荧光、实时PCR和竞争性(或定量)PCR(qPCR)、RNA印迹、核酸酶保护、噬菌斑杂交以及狭线印迹。

[0079] 本发明还涉及分离的核酸分子,包括用于检测PTP μ 和/或PIP $\text{K1 } \gamma$ (以及任选地其他脊柱侧凸标记物(例如,OPN、sCD44等))的探针和引物。在具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有不超过300、或不超过200、或不超过100、或不超过90、或不超过80、或不超过70、或不超过60、或不超过50、或不超过40或不超过30个核苷酸。在具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少17、或至少18、或至少19、或至少20、或至少30、或至少40个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过300个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过200个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过100个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过90个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过80个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过70个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20

且不超过60个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过50个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过40个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少17且不超过40个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少20且不超过30个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少17且不超过30个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过300个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过200个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过100个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过90个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过80个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过70个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过60个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过50个核苷酸。在其他具体实施方案中,所述分离的核酸分子具有至少30且不超过40个核苷酸。应理解在实时PCR中,引物还构成探针,而不是所述术语的传统意义。适用于检测本发明的方法中的PTP μ 和/或PIP1 γ 的引物或探针可使用分布在其各自核苷酸序列上的序列用已知的方法来设计。本发明的探针和/或引物被设计成与其靶核酸(PIP1 γ (例如,SEQ ID NO:27、29、31和/或34)和PTP μ (SEQ ID NO:36和/或38))特异性地杂交。在一个实施方案中,本发明的引物和探针与其靶核酸大致上互补。

[0080] 大致上互补的核酸是其中一个分子的互补序列与另一分子大致上相同的核酸。在最优比对时,如果两个核酸或蛋白质序列共享至少约70%序列同一性,那么它们被认为是大致上相同的。在替代实施方案中,序列同一性可以是例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少98%或至少99%。用于同一性比较的序列最优比对可使用多种算法进行,如Smith和Waterman,1981,Adv. Appl. Math 2:482的局部同源性算法;Needleman和Wunsch,1970,J. Mol. Biol. 48:443的同源性比对算法;Pearson和Lipman的相似性搜索方法;以及这些算法的计算机化实施(如Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, U.S.A. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)。序列同一性还可使用描述于Altschul等1990中的BLAST算法(使用公开的默认设置)来测定。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心获得(通过互联网<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。所述BLAST算法涉及首先通过鉴定查询序列中长度为W的短字串来鉴定高得分序列对(HSP),所述短字串在与数据库序列中具有相同长度的字串比对时匹配或满足某些正值的阈值分数T。T被称为指邻近字串得分阈值。初始邻近字串命中充当种子用于起始搜索以发现较长的HSP。所述字串命中沿着每个序列在两个方向延伸,远至能够增加累积比对得分。每个方向上字串命中的延伸在满足以下参数时停止:累积比对得分由其达到的最大值降低数量X;由于一个或者多个残基比对负值的积累而使累积得分降至0或者以下;或者达到任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。一种使用BLAST算法的两个序列之间的统计相似性量度是最小和概率(P(N)),其提供两个核苷酸或者氨基酸序列之间将偶然发生匹配的概率的指示。在本发明的替代实施方案中,如果测试序列的比较中的最小和概率小于约1、优选小于约0.1、更优选小于约0.01、并且最优选小于约0.001,则认为核苷酸或氨基酸序列大致上相同。

[0081] 两个核酸序列大致上互补的替代指示是所述两个序列在中等严格条件或优选地严格条件下彼此杂交。在中等严格条件下与滤膜结合的序列杂交可以例如在65°C下在0.5M NaHPO₄、7%十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM EDTA中进行,并且在42°C下在0.2x SSC/0.1%SDS中洗涤。或者,在严格条件下与滤膜结合的序列杂交可以例如在65°C下在0.5M NaHPO₄、7%SDS、1mM EDTA中进行,并且在68°C下在0.1x SSC/0.1%SDS中洗涤。杂交条件可取决于目标序列根据已知的方法进行修改。总体上,严格条件被选择为在限定离子强度和pH下比针对所述特定序列的热解链点低约5°C。

[0082] 本发明的探针可用于天然存在的糖-磷酸主链以及修饰的主链(包括硫代磷酸酯、连二硫酸酯、烷基磷酸酯以及 α -核苷酸等)。修饰的糖-磷酸主链通常是已知的。本发明的探针可由核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)构建,且优选地由DNA构建。

[0083] 可使用探针的检测方法的类型包括DNA印迹(DNA检测)、斑点或狭线印迹(DNA、RNA)和RNA印迹(RNA检测)。虽然是次优选的,但标记的蛋白质也可用于检测它所结合的特核酸序列。其他检测方法包括含有在浸渍片装置上的探针的试剂盒等。

[0084] 如本文所用,术语“可检测标记的”是指标记根据本发明的探针或抗体,这将允许检测根据本发明的PTP μ 和/或PIP3K1 γ 。虽然本发明不具体地依赖于使用用于检测特定核酸序列的检测的标记,但是这种标记通过增加检测的灵敏度而可能是有益的。此外,所述标记能实现自动化。探针可根据众多熟知的方法进行标记。标记的非限制性实例包括³H、¹⁴C、³²P和³⁵S。可检测标记物的非限制性实例包括配体、荧光团、化学发光剂、酶和抗体。用于与探针一起使用的能够实现本发明的方法的灵敏度增加的其他可检测的标记物包括生物素和放射性核苷酸。对于本领域的普通技术人员将变得显而易见的是具体标记的选择决定它结合探针的方式。

[0085] 如通常所已知,放射性核苷酸可通过几种方法并入本发明的探针中。其非限制性实例包括使用 γ 32P ATP和多核苷酸激酶来激酶化(kinasing)探针的5'端、在放射性dNTP存在下使用大肠杆菌的Pol I的Klenow片段(例如,在低熔点凝胶中使用随机寡核苷酸引物均匀标记的DNA探针)、在一种或多种放射性NTP存在下使用SP6/T7系统来转录DNA区段等。

[0086] 本发明还涉及选择化合物的方法。如本文所用,术语“化合物”意指涵盖天然、合成或半合成的化合物,包括但不限于化学品、大分子、细胞或组织提取物(来自植物或动物)、核酸分子、肽、抗体以及蛋白质。

[0087] 本发明还涉及阵列。如本文所用,“阵列”是可合成或生物合成制备的有意产生的分子的集合。阵列中的分子可以彼此相同或不同。所述阵列可采取多种型式,例如可溶性分子的文库;连接至树脂珠粒、二氧化硅芯片或其他固相支持体的化合物的文库。

[0088] 如本文所用,“核酸分子的阵列”是可以多种不同型式合成或生物合成制备的有意产生的核酸的集合(例如,可溶性分子的文库;以及连接至树脂珠粒、二氧化硅芯片或其他固相支持体的寡核苷酸的文库)。此外,术语“阵列”意指包括可通过将基本上任何长度(例如,1至约1000个核苷酸单体长度)的核酸点样至衬底上来制备的核酸的那些文库。如本文所用的术语“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或肽核酸(PNA))的聚合形式,其包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、合成或生物合成修饰的、非天然或衍生化的核苷酸碱基。多核苷酸的主链可包含糖和磷酸基团(如通常可在RNA或DNA中发现)或修饰的或取代的糖或磷酸基团。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类

似物。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分间断。因此，术语核苷、核苷酸、脱氧核苷和脱氧核苷酸通常包括类似物，如本文所描述的那些。这些类似物是与天然存在的核苷或核苷酸具有一些共同结构特征的那些分子，以使得当并入核酸或寡核苷酸序列中时，所述分子允许与溶液中的天然存在的核酸序列杂交。通常，这些类似物通过替代和/或修饰碱基、核糖或磷酸二酯部分源自天然存在的核苷和核苷酸。所述变化可定制进行以根据需要使杂合体形成稳定或不稳定或增强与互补核酸序列的杂交的特异性。

[0089] 如本文所用，“固相支持体”、“支持体”和“衬底”可互换地使用并且是指具有一个或多个刚性或半刚性表面的材料或一组材料。在许多实施方案中，所述固相支持体的至少一个表面将是大致上平坦的，但是在一些实施方案中，可能希望针对不同化合物用例如孔、隆起区域、销、蚀刻槽等来物理上分离合成区域。根据其他实施方案，所述固相支持体将采取珠粒、树脂、凝胶、微球的形式或其他几何构型。

[0090] 可根据本发明使用任何已知的核酸阵列。例如，这类阵列包括基于短或较长寡核苷酸探针以及cDNA或聚合酶链式反应(PCR)产物的阵列。其他方法包括基因表达的系列分析(SAGE)、差别显示以及消减杂交方法、差异筛选(DS)、RNA任意引物(RAP)-PCR、差异表达序列的限制性内切核苷酸分析(READS)、扩增的限制性片断长度多态性(AFLP)。

[0091] 抗体

[0092] 本发明涵盖使用用于检测或测定例如受试者的样品中的PTP μ 和/或PIPK1 γ (例如，酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ) 水平且用于包括在本发明的试剂盒中的抗体。中和抗体也可用于抑制PIPK1 γ 的磷酸化以增加细胞(例如，有需要的受试者中)中的GiPCR信号传导。特异性地结合这些生物标记物的抗体可用以下进一步描述的方法常规地产生。本发明还涵盖使用可商购的抗体。不受如此限制，特异性地结合PTP μ 和/或PIPK1 γ 的抗体包括以下表1中列出的那些。

[0093] 表1用于PTP μ 和PIPK1 γ (例如，酪氨酸磷酸化的)的可商购的抗体和ELISA试剂盒

描述	供应商	目录号	宿主	反应性	应用
[0094] 针对 PTP μ 的小鼠	Abcam	AB30321	小鼠	人	IP, WB

[0095]

单克隆 SK15					
抗 PTP μ 抗体	Abcam	AB111207	山羊	人	ELISA , IHC-P
PTPRM 单克隆抗体, 克隆 T10-AF1 A8	Abnova	MAB6540	小鼠	人	WB, IP
PTPRM 多克隆抗体	Abnova	PAB7422	山羊	人	ELISA
PTPRM 抗体	Acris Antibodies	18315-1-AP	兔	人, 小鼠	WB , ELISA
PTPRM 抗体	Acris Antibodies	AM05259PU-N	小鼠	人, 小鼠, 大鼠, 牛	WB
PTPRM 抗体	Acris Antibodies	AM12097PU-N	小鼠	人	IP, WB
PTPRM 抗体	Acris Antibodies	AM32664SU-N	小鼠	人, 小鼠, 大鼠, 牛, 狗	IP, IH, WB
PTPRM 抗体	Acris Antibodies	H00005797-A01	小鼠	人	ELISA, WB
PTP μ 抗体	antibodies-online.com	ABIN306639	小鼠	人, 小鼠	WB , ELISA
PTPRM 抗体	Aviva Systems Biology	OAEB00215	山羊	牛, 狗, 人, 小鼠, 大鼠, 兔, 鸡	ELISA
PTPRM 多克隆抗体 II	Biorbyt	orb19714	山羊	人, 小鼠, 狗	ELISA
抗 PTP μ 抗体	Everest Biotech	EB08229	山羊	人	ELISA
PTP μ	Exalpha	P100M	小鼠	人	WB
PTP μ	Exalpha Biologicals	P100M	小鼠	人, 小鼠	WB
RPTP μ 抗体	Fitzgerald	10R-8633	小鼠	人	IP, WB
PTPRM 抗体 [SK15]	Gene Tex	GTX78230	小鼠	人	IP, WB
PTPRM 抗体 [SK15], PTPRM 抗体, 内部	Gene Tex	GTX88875	山羊	人, 小鼠, 狗	ELISA
针对 PTPRM 的肽亲和力纯化的多克隆抗体	Imgenex	IMX-30612	山羊	狗, 人, 小鼠	ELISA
抗 PTPRM / PTP μ 抗体 LS-B4352 IHC-plus	LifeSpan BioSciences, Inc.	LS-B4352	山羊	人	ELISA , IHC-P
抗 PTPRM / PTP μ 抗体 LS-B4352 IHC-plus	LifeSpan BioSciences, Inc.	LS-C3174	兔	人	ELISA
抗 PTPRM / PTP μ	LifeSpan BioSciences,	LS-C26528	小鼠	牛, 人,	WB

[0096]

抗体 LS-B4352 IHC-plus	Inc.			小鼠, 大鼠	
抗 PTPRM / PTP μ 抗体 LS-B4352 IHC-plus	LifeSpan BioSciences, Inc.	LS-C75231	小鼠	人, 小鼠, 大鼠	WB, ELISA
抗蛋白质酪氨酸磷酸酶 μ 抗体, 克隆 BK2	Millipore	MAB3740(CH)	小鼠	人, 小鼠, 大鼠, 牛, 青蛙	ICC, IP, WB
抗蛋白质酪氨酸磷酸酶 μ 抗体, 克隆 SBK15	Millipore	MAB3741(CH)	小鼠	人, 小鼠, 大鼠, 狗, 牛	ICC, IP, WB
PTP μ (BK2) 小鼠 mAb	New England Biolabs	4485S	小鼠	人, 大鼠, 貂	WB, IP
PTPRM 抗体 (SK15)	Pierce Antibodies	MA1-90601	小鼠	人	IP, WB
PTPu(2C10)	Santa Cruz	sc-56957	小鼠	小鼠, 大鼠, 人, 貂	WB, IP, FCM
PTPu(BK2)	Santa Cruz	sc-33651	小鼠	人	WB, IP, IF
PTPu(SBK10)	Santa Cruz	sc-65228	小鼠	小鼠, 大鼠, 人	WB, IP
PTPu(H80)	Santa Cruz	sc-25433	兔	小鼠, 大鼠, 人, 马, 牛, 鸟	WB, IP, IF, ELISA
PTPu(SK15)	Santa Cruz	sc-56959	小鼠	人	WB, IP
PTPu(C-20)	Santa Cruz	sc-1115	山羊	小鼠, 大鼠, 人, 马, 狗, 牛, 猪, 鸟	WB, IF, ELISA
在小鼠中产生的单克隆抗蛋白质酪氨酸磷酸酶 μ 抗体	Sigma Aldrich	P8984	小鼠	大鼠, 小鼠, 人, 牛	WB, IP
蛋白质酪氨酸磷酸酶, 受体型, M (PTPRM)	antibodies-online.com	ABIN1154945			人 ELISA
PIPKI g 多克隆抗体	ImmunoWay	YT3735	兔	人	WB, ELISA
PIPK I α 抗体	Pierce Antibodies	PA5-28215	兔	人	WB
PIPK I γ (H-9)	Santa Cruz	sc-377061	小鼠	小鼠, 大鼠, 人	WB, IP, IF, IHC(P), ELISA
PIPK I γ (A-19)	Santa Cruz	sc-11782	山羊	人	WB, IP

					, IF, ELISA
[0097]	PIP5KIC 抗体	MyBiosource.com	MBS856298	兔	人 WB , ELISA

[0098] 针对PTP μ 和/或PIPK1 γ 的单克隆抗体和多克隆抗体两者包括于本发明的范围内,因为它们可通过本领域的技术人员已知的完善建立的工序来产生。此外,针对第一抗体的任何第二抗体(单克隆或多克隆)也包括于本发明的范围内。

[0099] 如本文所用,表述“抗PTP μ 抗体”或“免疫特异性抗PTP μ 抗体”是指与PTP μ 蛋白特异性地结合(相互作用)且不展示与除了与PTP μ 蛋白共享相同抗原决定簇的蛋白质以外的其他天然存在的蛋白质实质性结合的抗体。类似的,涵盖“抗磷酸酪氨酸PIPK1 γ 抗体”的表述“抗PIPK1 γ 抗体”是指与PIPK1 γ (例如,酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ 蛋白)特异性地结合(相互作用)且不展示与除了与PIPK1 γ (例如,酪氨酸磷酸化的PIPK1 γ 蛋白)共享相同抗原决定簇的蛋白质以外的其他天然存在的蛋白质实质性结合的抗体。术语抗体或免疫球蛋白以最广泛意义使用且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体以及抗体片段,只要其表现出所需的生物活性。抗体片段包含全长抗体的一部分,通常是其抗原结合或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;单结构域抗体(例如,来自骆驼科动物);鲨NAR单结构域抗体;以及从抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段还可指包含CDR或抗原结合结构域的结合部分,包括但不限于,VH区(V_H、V_H-V_H)、anticalin、PepBodies™、抗体-T-细胞表位融合体(Troybodies)或肽抗体。此外,针对第一抗体的任何第二抗体(单克隆或多克隆)也包括于本发明的范围内。

[0100] 总之,用于制备抗体(包括单克隆抗体和杂交瘤)和使用抗体检测抗原的技术是本领域中熟知的(Campbell,1984,刊于“Monoclonal Antibody Technology:Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology”,Elsevier Science Publisher,Amsterdam,The Netherlands)和Harlow等,1988(刊于:Antibody A Laboratory Manual,CSH Laboratories中)。术语抗体在本文中涵盖多克隆抗体、单克隆抗体和抗体变体,如单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体以及抑制或中和其Hyphen中的对应相互作用结构域和/或对其有特异性的抗体的免疫活性片段(例如,Fab和Fab'片段)。

[0101] 优选通过多次皮下(sc)、静脉内(iv)或腹膜内(ip)注射相关抗原(用或不用佐剂)在动物中产生多克隆抗体。使用双功能或衍生剂,例如,马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R¹N=C=NR(其中R和R¹是不同的烷基),将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如匙孔蛾血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合可能是有用的。

[0102] 可针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物,通过将抗原或缀合物(例如,对于兔是100 μ g或对于小鼠是5 μ g)与3体积的完全弗氏佐剂混合并且在多个部位皮内注射所述溶液来免疫动物。一个月后,通过在多个部位皮下注射用完全弗氏佐剂中的抗原或缀合物(例如,用于免疫的原始量的1/5至1/10)来加强免疫动物。7至14天后,对动物采血,并且针对抗体滴度测定血清。对动物加强免疫,直到滴度达到稳定。优选地,对于缀合物免疫,用相同抗原但缀合至不同蛋白质和/或通过不同交联试剂缀合的缀合物对动物加强免疫。还可在重组细

胞培养物中将缀合物制备成蛋白质融合体。此外,聚集剂如明矾也适用于增强免疫反应。

[0103] 可使用最初由Kohler等,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备或可通过重组DNA方法(例如,美国专利号6,204,023)来制备单克隆抗体。还可使用美国专利号6,025,155和6,077,677以及美国专利申请公布号2002/0160970和2003/0083293中所描述的技术来制备单克隆抗体。

[0104] 在杂交瘤方法中,免疫(例如,如上所述)小鼠或其他适当的宿主动物,如大鼠、仓鼠或猴以引发产生或能够产生将特异性地结合用于免疫的抗原的抗体的淋巴细胞。或者,可体外免疫淋巴细胞。然后使用适合的融合剂(如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞。

[0105] 将如此制备的杂交瘤细胞接种且生长在优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的物质的适合培养基中。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),那么用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),所述物质防止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0106] 如本文所用,表述“纯化抗体”中的术语“纯化”仅意味着区分人造抗体与动物针对其自己的抗原而天然产生的抗体。因此,含有抗-OPN抗体的原始血清和杂交瘤培养基是本发明意义内的“纯化抗体”。

[0107] 本发明还涵盖用于检测和/或定量PTP μ 和/或PIP3K1 γ 的翻译产物的阵列。所述阵列包括蛋白质微阵列或大阵列,包括高分辨2D-凝胶方法在内的凝胶技术,可能在细胞水平与质谱成像系统联用,如显微镜与荧光标记系统组合。

[0108] 本发明还涵盖使用全细胞测定筛选/选择潜在有用的治疗剂的方法,所述治疗性化合物能够增加i) PTP μ 的转录和/或合成和/或稳定性;ii) PTP μ 的活性(磷酸酶);和/或能够降低ii) PIP3K1 γ 的转录和/或合成和/或稳定性;或ii) PIP3K1 γ 的活性(例如,通过降低PIP3K1 γ 的酪氨酸磷酸化)。用于所述方法中的细胞包括任何来源(包括内部或可商购的细胞系)和类型(任何组织)的细胞。可通过例如无限增殖来自AIS受试者的细胞来制备内部细胞系。在具体实施方案中,本发明的筛选方法寻求鉴别抑制PIP3K1 γ 的酪氨酸磷酸化的药剂和增加PTP μ 表达(转录和/或翻译)、稳定性或活性(例如,磷酸酶)的药剂。对于这些实施方案有用的细胞系包括产生低水平的PTP μ 和/或高水平的酪氨酸磷酸化PIP3K1 γ 的那些细胞系。有用的细胞系还包括PBMC。

[0109] 在一个具体实施方案中,所述细胞包括源自脊柱侧凸患者的任何细胞类型的细胞。(全细胞测定)。在具体实施方案中,所述细胞包括成骨细胞、软骨细胞、成肌细胞或血细胞,包括PBMC(包括淋巴细胞)。如本文所用,术语“源自脊柱侧凸患者的细胞”是指从脊柱侧凸患者直接分离的细胞,或源自从脊柱侧凸患者直接分离的细胞的无限增殖细胞系。在具体实施方案中,所述细胞是脊柱旁肌肉细胞。这类细胞可通过例如穿刺活检从受试者分离。

[0110] 本发明还涉及用于调节(增加或降低)GiPCR细胞信号传导的药物组合物。在一个实施方案中,所述组合物包括用于增加有需要的受试者的GiPCR信号传导的药剂。例如,本发明的药物组合物可包含药剂,所述药剂增加i) PTP μ 的转录和/或合成和/或稳定性;或ii) PTP μ 的活性(磷酸酶);和/或降低iii) PIP3K1 γ (例如,siRNA)的转录和/或合成和/或稳定性;或iv) PIP3K1 γ 的活性(例如,通过降低PIP3K1 γ 的酪氨酸磷酸化)。药物组合物可通过任何适合的途径施用,所述途径如经鼻、静脉内、肌肉内、皮下、舌下、鞘内或皮内。施用途径可

取决于多种因素,如环境和治疗目的。

[0111] 剂量

[0112] 可将任何适合量的药物组合物施用至受试者。剂量将取决于包括施用方式在内的许多因素。通常,单次剂量内所包含的抗脊柱侧凸组合物(例如,增加有需要的受试者中的GiPCR细胞信号传导的药剂,如增加PTP μ 表达或活性或降低PIP 1γ 表达或活性的药剂)的量将是有效预防、延迟或减轻脊柱侧凸而不会诱导显著毒性的量,即“治疗有效量”。

[0113] 还可直接测量增加PTP μ 的药剂的有效量。可每日或每周给予所述有效量或其几分之一。通常,本发明的药物和/或营养制品和/或饮食补充剂组合物可按每日每kg体重约0.001mg至最多约500mg(例如,10mg、50mg、100mg或250mg)的量施用。可按单次或多次剂量方案提供剂量。例如,在一些实施方案中,有效量是在以下范围内的剂量:每天约1mg至约25克抗脊柱侧凸制剂、每天约50mg至约10克抗脊柱侧凸制剂、每天约100mg至约5克抗脊柱侧凸制剂、每天约1克抗脊柱侧凸/GiPCR信号传导制剂、每周约1mg至约25克抗脊柱侧凸/GiPCR信号传导制剂、每周约50mg至约10克抗脊柱侧凸/GiPCR信号传导制剂、每隔一天约100mg至约5克抗脊柱侧凸/GiPCR信号传导制剂以及每周一次约1克抗脊柱侧凸/GiPCR信号传导制剂。

[0114] 作为举例,本发明的药物组合物(例如,含有增加有需要的受试者中的GiPCR细胞信号传导的药剂,如增加PTP μ 表达和/或活性或降低PIP 1γ 表达和/或活性的药剂)可以是以下形式:液体、溶液、混悬液、丸剂、胶囊、片剂、软胶囊、粉末、凝胶、软膏、乳膏、喷雾剂、轻雾、雾化蒸汽、气溶胶或磷脂复合物(phytosome)。对于口服施用,可通过常规方法,用至少一种药学上可接受的赋形剂如粘合剂、填充剂、润滑剂、崩解剂或润湿剂来制备片剂或胶囊。可通过本领域中已知的方法包衣片剂。用于口服施用的液体制剂可采取例如溶液、糖浆或混悬液的形式,或它们可呈现为用于在使用之前用盐水或其他适合的液体媒介物复原的干燥产品。用于口服施用的制剂还可适合地配制以给予活性成分的控制释放。

[0115] 此外,本发明的药物组合物(例如,含有增加有需要的受试者中的GiPCR细胞信号传导的药剂,如增加PTP μ 表达或活性或降低PIP 1γ 表达或活性的药剂)可含有用于施用至哺乳动物的药学上可接受的载体,包括但不限于无菌水性或非水性溶液、混悬液和乳液。非水性溶剂的实例包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油以及可注射有机酯。水性载体包括但不限于,水、醇、盐水和缓冲溶液。药学上可接受的载体还可包括生理学上可接受的水性媒介物(例如,生理盐水)或对于特定施用途径来说适当的其他已知的载体。

[0116] 可将增加GiPCR细胞信号传导(例如,增加PTP μ 表达或活性或降低PIP 1γ 表达或活性)的药剂与药物制剂中通常采用的任何媒介物,例如滑石、阿拉伯胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、可可脂、水性或非水性溶剂、油、石蜡衍生物或乙二醇结合并入剂型中。还可使用乳液,如美国专利号5,434,183中所述的那些,其中将植物油(例如,大豆油或红花油)、乳化剂(例如,卵黄磷脂)和水与甘油组合。用于制备适当制剂的方法是本领域中熟知的(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,1980,A.Oslo Ed.,Easton,Pa.)。

[0117] 在选择胃肠外施用作为施用途径的情况下,可将含有增加GiPCR细胞信号传导(例如,增加PTP μ 表达或活性或降低PIP 1γ 表达或活性)的药剂的制剂与药学上可接受的无菌水性或非水性溶剂、混悬液或乳液组合提供给患者。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油、鱼油以及可注射有机酯。水性载体包括水、水-醇溶液、乳液或混悬液,包括盐水

或缓冲的医学胃肠外媒介物,包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖溶液、葡萄糖加氯化钠溶液、含乳糖的林格氏溶液或不挥发性油。静脉内媒介物可包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,如基于林格氏葡萄糖的那些补充剂等。

[0118] 由于实际剂量必须由主治医师基于各个患者的独特临床因素或由营养学家仔细选择和滴定,因此这些仅为简单的指导。最佳每日剂量将通过本领域中已知的方法测定,并且将受如患者的年龄的因素以及其他临床相关因素影响。此外,患者可正在服用用于其他疾病或病状的药物。可在增加GiPCR细胞信号传导(例如,增加PTP μ 表达或活性或降低PIPK1 γ 表达或活性)的药剂给予患者期间继续其他药物治疗,但在这类情况下特别建议以低剂量开始以测定是否经历不良副作用。

[0119] 本发明还涉及试剂盒。不受如此限制,本发明涉及用于分层脊柱侧凸受试者和/或预测受试者是否处于发展脊柱侧凸的风险的试剂盒,所述试剂盒包括分离的核酸、蛋白质或配体,如如上所述的根据本发明的抗体。例如,根据本发明的分隔式试剂盒(compartmentalized kit)包括试剂包含于单独容器中的任何试剂盒。这类容器包括小玻璃容器、塑料容器或塑料或纸条带。这类容器允许将试剂从一个隔室有效转移至另一个隔室,以使得所述样品和试剂不会交叉污染,并且可将每个容器中的试剂或溶液以定量方式从一个隔室添加至另一个。这类容器将包括将接受受试者样品(DNA基因组核酸、细胞样品或血液样品)的容器、含有(在本发明的一些试剂盒中)本发明的方法中所用的探针的容器、含有酶的容器、含有洗涤试剂的容器以及含有用于检测延伸产物的试剂的容器。本发明的试剂盒还可包括使用这些探针和或抗体来分层脊柱侧凸受试者或预测受试者是否处于发展脊柱侧凸风险的说明书。

[0120] 冠词“一个/种(a/an)”和“所述”在本文中用来指代冠词的语法对象中的一个或多个(即,指代“至少一个”)。

[0121] 术语“包括(including)”和“包含(comprising)”在本文用于意指短语“包括但不限于”和“包含但不限于”且可与所述短语互换使用。

[0122] 术语“如”在本文用于意指短语“如但不限于”且可与所述术语互换使用。

[0123] 术语“约”用以指示值包括用以测定所述值的装置或方法的误差的标准偏差。一般来说,术语“约”意指指定多达10%的可能变化。因此,值的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%以及10%的变化包括于术语“约”中。

[0124] 通过以下非限制性实施例进一步详细地说明本发明。

[0125] 实施例1:材料和方法

[0126] 患者招募

[0127] 魁北克省(Quebec)蒙特利尔(Montreal)圣贾斯汀医院(Sainte-Justine Hospital)的机构审查委员会批准该研究。所有参与者的父母或法定监护人给出它们的书面知情同意书,并且未成年人给出他们的同意。圣贾斯汀儿童医院的矫形外科医师在临床上上评定每个患者,并且在矫正外科手术期间收集所有骨活检标本。

[0128] 表II用于通过qPCR和蛋白质印迹测试PTP μ 和PIPK γ 的患者的临床数据

[0129]

患者编号	性别	年龄	诊断	科布角度	弯曲类型	疼痛	脊柱侧凸家族史	病史	组
T-26	男性	14.6	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-29	男性	15.8	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-32	女性	8.8	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-22	女性	14.0	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-8	女性	15.1	外伤	不适用	不适用	否	不适用	骨软骨病	对照
T-19	女性	15.5	外伤	不适用	不适用	否	不适用	畸形足	对照
T-34	男性	14.1	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-44	男性	12.6	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-18	女性	19.0	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-51	女性	不适用	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-41	男性	17.2	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-14	女性	11.6	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-2	女性	14.1	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-11	女性	15.7	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-20	女性	18.7	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-1	女性	15.9	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
T-13	女性	18.7	外伤	不适用	不适用	否	不适用	不适用	对照
1075	女性	13.1	AIS	59-73	rTIL	否	姑母,叔叔	不适用	1
1032	女性	11.4	AIS	62-47	rTIL	否	不适用	不适用	1
1038	女性	17.2	AIS	47	ITL	否	不适用	不适用	1
1267	男性	14.6	AIS	54	rTL	否	母亲	不适用	1
1388	女性	14.6	AIS	46	rTL	否	不适用	不适用	1
1025	女性	15.3	AIS	53-42	rTIL	否	不适用	不适用	1
1090	女性	18.0	AIS	45-57	rTIL	是	同父异母或同母异父姐妹,母亲	心房中隔缺损,哮喘,扁桃腺切除术	1
1423	女性	14.6	AIS	73-45	rTIL	是	不适用	不适用	1
1237	女性	11.7	AIS	63	rT	否	不适用	不适用	1
1061	男性	12.8	AIS	75	rT	否	不适用	脊髓空洞症	1
1012	女性	11.8	AIS	74-56	rTIL	否	不适用	不适用	1
1266	男性	15.6	AIS	52	rT	是	不适用	不适用	1
1282	女性	16.4	AIS	49	rTL	是	不适用	不适用	2

	1081	女性	13.6	AIS	60	ITL	是	不适用	不适用	2
	1391	女性	15.0	AIS	54	IL	是	不适用	半椎体外 科手术	2
	1418	女性	13.1	AIS	41	rT	否	不适用	智力迟钝, 癫痫	2
	1066	女性	17.3	AIS	53	rT	否	姑母	重症肌无 力	2
	1063	女性	14.8	AIS	67	rT	是	不适用	不适用	2
	1013	女性	15.0	AIS	54	rT	是	姑母,母亲	不适用	2
	1060	女性	14.4	AIS	53-55	rTIL	否	祖母	扁桃体切 除术,腺样 体切除术	2
	1042	女性	14.2	AIS	70-48	rTIL	否	兄弟,母亲	不适用	2
	1112	女性	13.3	AIS	58-49	rTIL	否	姑母	Chiari, 脊 髓空洞症, 哮喘	2
	1020	女性	13.3	AIS	59-57	rTIL	是	不适用	不适用	3
[0130]	1143	女性	16.9	神经 性脊 柱侧 凸	83	rT	否	不适用	脊柱裂, Chiari, 斜 视手术	3
	1071	女性	15.9	AIS 脊 柱 后 凸	57-60	rTIL	是	不适用	中隔手术	3
	1373	女性	14.6	AIS	41-48	rTIL	是	不适用	脑震荡(3 岁)	3
	1036	女性	13.0	AIS	57	rT	否	不适用	不适用	3
	1003	男性	18.0	AIS	64-54	rTIL	否	不适用	哮喘	3
	1064	女性	15.2	AIS	90-90	rTIL	否	不适用	肘关节骨 折	3
	1665	女性	12.6	AIS	28-58-2 1	rTITIL	是	不适用	不适用	3
	1653	女性	11.2	JIS	68	rT	是	母亲	哮喘,鼻出 血	3
	1439	女性	17.7	AIS	69	rT	是	母亲	不适用	3
	1058	女性	14.4	AIS	90-66	rTIL	是	不适用	不适用	3

[0131] 实验动物模型

[0132] 研究中使用的动物的护理和处理审查委员会(CHU Sainte-Justine)已根据加拿大动物护理委员会(Canadian Council of Animal Care)的准则批准了所述方案。

[0133] 已经如Oyama等(2006)所描述产生了双足小鼠模型。在断奶(出生后5周)后在麻醉下进行前肢和尾部的截断,如由Oyama等(2006)和(Machida等,2006)所报道。Faxitron™X-射线仪器(Faxitron™MX20-Faxitron Co.,Arizona,USA)用于在断奶后每月成像且检查这些小鼠的脊柱,直到其在九月龄时杀死。对来自每种野生型和PTPμ敲除(来自Dr.Gebbink MF的馈赠,Laboratory of Thrombosis and Haemostasis,Department of Clinical Chemistry and Haematology,University Medical Center Utrecht,Heidelberglaan

100,3584CX Utrecht, The Netherlands) 的120只小鼠进行双足外科手术。

[0134] 原代成骨细胞培养物的衍生

[0135] 在人受试者中,原代成骨细胞培养物来源于术中获得的AIS和对照患者活检标本。对于AIS患者,从椎骨术中获得骨标本(根据所进行的外科手术从T3至L4变化),而在外伤情况下(用作非脊柱侧凸对照),从其他解剖部位(胫骨、股骨或髌骨)获得骨标本。

[0136] 来自小鼠的骨标本是在安乐死之后从脊柱获得的。在无菌条件下用切割器将骨片段减小至更小碎片。在10-cm²培养皿中在37°C下在5%CO₂中含有10%胎牛血清(FBS;合格的FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)和1%青霉素/链霉素(Invitrogen)的 α MEM培养基中孵育所述较小骨碎片。在一个月之后,通过胰蛋白酶化将自所述骨碎片出现的成骨细胞与剩余的骨片段分离。使用TRIzolTM方法(Invitrogen)从所述成骨细胞提取RNA。通过qPCR研究PTP μ 和PIP1 γ 基因的表达谱。用StratageneTMMx3000P(Agilent Technologies, La Jolla, CA)评定转录物表达。

[0137] 定量逆转录-聚合酶链式反应(qPCR)

[0138] Thermo-ScriptTM逆转录酶(Invitrogen)用于将mRNA逆转录成cDNA(1mg总浓度)。测试了几种稀释液以选择产生最有效扩增的浓度。所使用的人引物是以下:

- [0139] β -肌动蛋白正向 5'-GGAAATCGTGCCTGACAT-3'(SEQ ID NO:1),
- [0140] β -肌动蛋白反向 5'-TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTT-3'(SEQ ID NO:2),
- [0141] PTP μ 正向 5'-GGCCGGACTTTTGCTAACT-3'(SEQ ID NO:3),
- [0142] PTP μ 反向 5'-TGTGCTATACGGCTCATCAAA-3'(SEQ ID NO:4),
- [0143] CD44正向 5'-AGCATCGGATTTGAGACCTG-3'(SEQ ID NO:5),
- [0144] CD44反向 5'-TGAGTCCACTTGGCTTTCTG-3'(SEQ ID NO:6),
- [0145] β 1整联蛋白正向 5'-ATGTGTCAGACCTGCCTTG-3'(SEQ ID NO:7),
- [0146] β 1整联蛋白反向 5'-TTGTCCCGACTTTCTACCTTG-3'(SEQ ID NO:8),
- [0147] β 3整联蛋白正向 5'-GGAAAGTCCATCCTGTATGTGG-3'(SEQ ID NO:9),
- [0148] β 3整联蛋白反向 5'-GAGTTTCCAGATGAGCAGGG-3'(SEQ ID NO:10),
- [0149] α _v整联蛋白正向 5'-GTCCCCACAGTAGACACATATG-3'(SEQ ID NO:11),
- [0150] α _v整联蛋白反向 5'-TCAACTCCTCGCTTTCCATG-3'(SEQ ID NO:12),
- [0151] α 1整联蛋白正向 5'-GACATTTGGATGAACTTTAGTCACC-3'(SEQ ID NO:13),
- [0152] α 1整联蛋白反向 5'-GGCAATGGAATTCACGACTTG-3'(SEQ ID NO:14),
- [0153] α 4整联蛋白正向 5'-GGATGAGACTTCAGCACTCAAG-3'(SEQ ID NO:15),
- [0154] α 4整联蛋白反向 5'-GGTGAATAACGTTTGGGTCTTTG-3'(SEQ ID NO:16),
- [0155] β 3整联蛋白正向 5'-GGAAAGTCCATCCTGTATGTGG-3'(SEQ ID NO:17),
- [0156] β 3整联蛋白反向 5'-GAGTTTCCAGATGAGCAGGG-3'(SEQ ID NO:18),
- [0157] β 5整联蛋白正向 5'-CTTGCACTCCTGGCTATCTG-3'(SEQ ID NO:19),
- [0158] β 5整联蛋白反向 5'-TGCGTGGAGATAGGCTTTC-3'(SEQ ID NO:20),
- [0159] β 8整联蛋白正向 5'-GATTGGGTTGCTTAAAGTCTCTG-3'(SEQ ID NO:21),
- [0160] β 8整联蛋白反向 5'-GGTAGGTGACTGCT CTTGTG-3'(SEQ ID NO:22),
- [0161] PIP1 γ 正向 5'-CAGATTACAGTGCAGGTGGAG-3'(SEQ ID NO:23),
- [0162] PIP1 γ 反向 5'-GCTGGCAGTTTCTACTTCAAC-3'(SEQ ID NO:24)。

[0163] 每个扩增一式两份进行,使用5ml稀释的cDNA、7.5ml的3mM引物溶液和12.5ml的2X QuantiTect™SYBR Green PCR主混合物(QIAGEN Inc,Ontario,Canada)。将所有反应混合物在来自Stratagene(Agilent Technologies Company,La Jolla,CA)的Mx3000P系统上运行且用也来自Stratagene的MxPro™QPCR软件进行分析。使用β-肌动蛋白作为内源对照用ΔCT方法计算相对定量。

[0164] 从细胞培养物分离质膜(PM)

[0165] 将来自人受试者的成骨细胞用冷PM(质膜)缓冲液[0.25M蔗糖、1mM EDTA以及20mM Tricine]洗涤3次并且添加2ml的冷PMC缓冲液(PM缓冲液加1X蛋白酶抑制剂、1mM PMSF、0.4mM原钒酸钠)。将细胞从皮氏培养皿刮下且在1000xg下离心5分钟。将沉淀(5cm)溶解于600μl的冷PMC缓冲液中。然后使用陶瓷珠粒(Precellys™)3x 5500xg将沉淀均化持续20",每个循环之间2分钟,并且然后在4℃下在1000xg下离心10分钟。将核后上清液(PNS)保持在冰上。将沉淀重新悬浮于300μl PMC缓冲液中,再一次重复均化步骤并且然后在4℃下在1000xg下离心10分钟。测量蛋白质浓度;将PNS层叠在15ml的具有PMC缓冲液的30%percoll(于25x 89mm管)的顶上。将样品在固定角转子中在4℃、84,000xg(50.2Ti转子)下离心30分钟。PM级分作为离管的底部5.7cm距离处的条带可见。为了除去任何痕量percoll,将样品在S45-A转子中在sorval M150微型超离心机中在105,000xg(TLA100.4转子)下离心90分钟。紧密填装的沉淀是由percoll形成的并且将PM级分小心除去且储存在-80℃下以用于免疫沉淀和蛋白质印迹方法。使用Protein Bio Rad(Bio-Radlaboratories,California, U.S.A)测量蛋白质的浓度。

[0166] 免疫沉淀和蛋白质印迹

[0167] 进行一个预先清洁步骤以减少蛋白质与琼脂糖或琼脂糖凝胶(sepharose)珠粒的非特异性结合。简言之,将25μl的蛋白质琼脂糖凝胶(A)珠粒(GE Healthcare Bioscience AB,Canada)添加至PM蛋白质溶液(1.5mg)。将混合物在4℃下在温和搅拌下孵育30分钟。然后将溶液在4℃下在16,200xg下离心1分钟。将沉淀丢弃并且保持上清液以用于免疫沉淀。为了免疫沉淀PTPμ,添加1μg的抗PTPμ抗体(SC-25433)(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz,CA)/1mg蛋白质。将样品与所述抗体在4℃下在搅拌下孵育过夜。向各样品中添加50μl的蛋白质琼脂糖凝胶(A)珠粒且然后使用宽口移液管尖端轻轻混合。将裂解产物-珠粒混合物在4℃下在搅拌下孵育2小时。在孵育之后将管离心,除去上清液且将珠粒在PM缓冲液中洗涤三次(每次在4℃下离心且除去上清液)。最后,将上清液除去且添加50μl的3x负载(Laemmli)缓冲液。将样品在100℃下煮沸5分钟以使蛋白质变性且使其与珠粒分离,然后将样品离心且将上清液保持用于蛋白质标记物。使样品经受5%-12%梯度SDS-PAGE,转移至PVDF(聚偏二氟乙烯)膜且使用抗PTPμ抗小鼠(第一抗体的1:500稀释液;Santa Cruz Biotechnology Inc.,Santa Cruz,CA;辣根过氧化物酶缀合的第二抗体的1:10,000稀释液,BioSource Inc.Camarillo,CA)免疫印迹。使用增强的化学发光试剂盒(BM化学发光印迹底物POD)根据制造商的说明书(Roche Diagnostic Corp.,Indianapolis,IN)可视化反应性条带。相同方案用于免疫沉淀PIPK1γ。使用小鼠抗PIPK1γ(H-9,来自Santa Cruz的#sc-377061),其识别小鼠、大鼠和人PIPK1γ以及抗磷酸酪氨酸抗体[PY20](#ab10321,来自abcam)。

[0168] 类似地,为了验证OPN与其同源受体之间的相互作用,将OPN的不同受体使用不同

抗体进行免疫沉淀。对于每种受体,每1mg蛋白质添加1 μ g这些抗体,整联蛋白 β 1 (SC-6622)、整联蛋白 β 3 (SC-6627)、整联蛋白 β 5 (SC-5401)、整联蛋白 α 4 (sc-6589)、整联蛋白 α 5 (sc-166681)、整联蛋白 α 8 (sc-30983) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 以及整联蛋白 α v (4711) (Cell signaling technology, Ontario, Ca)。所述免疫沉淀之后是使用抗OPN抗小鼠 (1/2000) (Dr. Marc D. McKee的惠赠, McGill University) 进行的蛋白质印迹。先前抗体用于蛋白质印迹检测 (1/1000)。

[0169] G蛋白信号传导的分析

[0170] 使用在CellKey™设备 (MDS Sciex, San Francisco, CA) 上进行的细胞介电谱 (CDS) 来评定来自成骨细胞培养物的G蛋白的信号传导能力,如Akoume等, 2010和Moreau等的WO 2010/040234, 2010中所描述。为了评定GiPCR细胞信号传导,使用结合GiPCR且调控Gi蛋白的特异性激动剂:爱帕林-17、羟甲唑啉和生长激素抑制素 (Som) (Tocris Bioscience, Canada)。

[0171] 此外,百日咳毒素 (PTX) (Sigma Aldrich, Canada) 用于测定所述激动剂的作用是否与G α i蛋白有关。所述毒素由百日咳博德特氏杆菌 (*Bordetella pertussis*) 产生并且它催化在C末端附近的半胱氨酸残基处的一些G蛋白的腺苷二磷酸 (ADP) 核糖基化,从而导致受体与G蛋白的解偶联。

[0172] 细胞系和siRNA转染

[0173] 培养来自C57B1/6j WT和C57B1/6j PTP μ ^{-/-}的原代成骨细胞细胞培养物 (如上所述)。根据制造商的说明书将Lipofectamine™RNAiMAX (Invitrogen) 用于siRNA转染。用于敲低OPN的RNA寡聚物的序列是 (CCA CAG CCA CAA GCA GUC CAG AUU A (SEQ ID NO:25))。在48小时之后收获细胞以用于RNA提取。对于磷脂酰肌醇-磷酸激酶I型 γ (PIP1K1 γ) 进行相同工序。用于敲低PIP1K1 γ 的RNA寡聚物的序列是 (CCU CCA CAU CGG GAU UGA UAU U (SEQ ID NO:26))。

[0174] 骨桥蛋白免疫吸附测定

[0175] 将来自小鼠的外周血样品收集在EDTA处理的管中且然后离心。将获得的血浆样品分成等分且在-80℃下冷冻保持直到解冻且分析。根据由制造商 (IBL, Hamburg, Germany) 提供的方案通过捕获酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测量OPN的血浆浓度。OPN ELISA试剂盒测量血浆中OPN的磷酸化形式和非磷酸化形式两者的总浓度。所有ELISA测试一式两份进行并且使用DTX880酶标仪 (Beckman Coulter, USA) 在450nm下进行读数。

[0176] 统计分析

[0177] 数据被呈现为平均值 \pm SE,并且使用GraphPad™Prism 4.0软件通过ANOVA或学生t检验对所述数据进行分析。使用单向ANOVA、接着使用邓尼特 (Dunnett) 事后检验进行平均值的多重比较。仅P值<0.05被认为是显著的。

[0178] 实施例2:PTP μ 的缺乏影响与双足小鼠中的高血浆OPN相关的脊柱侧凸的性质

[0179] 在双足步行40周之后截断前肢和尾部在小鼠中诱导脊柱侧凸^{16, 15}并且增加其血浆OPN水平。与所述方法一致,在雌性野生型 (WT) 和PTP μ 敲除 (PTP μ ^{-/-}) 小鼠中诱导脊柱侧凸以检查在高血浆OPN条件下PTP μ 缺乏对脊柱侧凸的发展的影响。在实验周期期间每12周进行来自PTP μ ^{-/-}小鼠的血浆中的OPN的测量。呈现在图1A中的结果已经揭示在正常脊柱侧凸C57B1/6双足小鼠与PTP μ ko脊柱侧凸小鼠之间的血浆OPN水平无显著差异。在所有时间点,

WT和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠中的血浆OPN的水平是类似的。在通过射线照相术检查的所有小鼠中,在最终时间点术后第36周,侧弯在55%的WT和85%的PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠中明显,从而指示在PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠中比WT小鼠中更高的脊柱侧凸发病率(图1B)。侧弯也在PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠中更显著,如由图1C和1D中的代表性射线照片所示,从而表明脊柱侧凸在PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠中比WT小鼠中更严重。这些数据强调PTP μ 的缺乏加剧脊柱畸形进展,并且支持双足小鼠中的脊柱侧凸的发展与高血浆OPN水平之间的联系。

[0180] 实施例3:PTP μ 的缺乏增大双足小鼠中的缺陷型GiPCR信号传导

[0181] 双足小鼠中缺陷型GiPCR信号传导出现的证据由各种GiPCR选择性激动剂促进细胞信号传导的能力降低(如通过CDS所测量)证明(WO 2010/040234Moreau等)。为了检查PTP μ 缺乏对此缺陷的影响,将来自双足WT和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞针对其在(图2)中鉴别的三种GiPCR选择性激动剂的反应进行筛选。与先前结果(Akoume等Spine 2010)一致,所有三种化合物引起WT成骨细胞中的GiPCR的典型CDS反应概况。与Gi对这些细胞中的其同源受体的偶联一致,对三种测试化合物中的每种反应通过用PTX预处理阻断(图2A-2F)。用PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞获得类似结果(图2G-2L)。图3中所示的结果显示所有三种化合物以浓度依赖性方式增加来自WT和PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞中的反应。然而,在每种情况下,来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞比来自WT小鼠的成骨细胞反应更小,但EC50值在两个组中是类似的(图3A-3C)。这些结果表明PTP μ 的缺乏独立于受体影响Gi蛋白活性。

[0182] 实施例4:PTP μ 的缺乏增大OPN对GiPCR信号传导的抑制作用-OPN沉默

[0183] 为了使这些发现与OPN作用相关联,小干扰RNA(siRNA)方法用于敲低WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中OPN的表达。通过qPCR和蛋白质印迹分析证明siRNA在这些成骨细胞中的效率(图3D和3E)。据发现缺失OPN增强WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中对GiPCR刺激的反应并且消除其反应程度的差异(图3F-3H)。这些结果支持OPN在双足小鼠中的缺陷型GiPCR信号传导中的作用,并且表明PTP μ 的缺乏加剧OPN对GiPCR信号传导的抑制作用。

[0184] 实施例5:PTP μ 的缺乏增大OPN对GiPCR信号传导的抑制作用-外源性OPN

[0185] 在用图4A-4C中鉴别的激动剂GiPCR刺激之前将WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞用不同浓度的外源性重组OPN(rOPN)处理。在每种情况下,rOPN以浓度依赖性方式引起综合反应的降低,在WT成骨细胞和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中一样。然而,IC50值在PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中相较于WT成骨细胞中更低,从而表明来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞使OPN对GiPCR信号传导的抑制作用更敏感。

[0186] 实施例6:PTP μ 的缺乏不会影响成骨细胞中的整联蛋白表达

[0187] OPN与不同受体,包括由成骨细胞表达的受体: $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 以及 $\alpha_8\beta_1$ 整联蛋白和CD44相互作用^{17,18,19,20,21,22}。令人感兴趣的是检查哪些受体负责与PTP μ 缺乏相关的作用。出于这一目的,使用qPCR分析检查了这些受体的表达水平。如在图5A中所示,在WT与PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞之间未发现mRNA水平下整联蛋白表达的显著差异。当通过蛋白质印迹测定这些受体的蛋白质水平时获得类似的概况(图5B)。这些结果排除了与PTP μ 缺乏相关的作用影响受体表达的变化可能性。

[0188] 实施例7:PTP μ 的缺乏影响OPN与成骨细胞中的整联蛋白的相互作用

[0189] 然后,检查OPN与受体的相互作用是否受PTP μ 缺乏影响。出于这一目的,将来自WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞的细胞裂解产物用针对不同OPN受体的抗体免疫沉淀并且使用对OPN具

有特异性的抗体通过蛋白质印迹揭示与OPN的相互作用(图5C)。结果显示在WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中OPN与所有受体共免疫沉淀。然而,OPN免疫沉淀物中的 β_1 和 α_5 整联蛋白的水平在PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中相较于WT成骨细胞增加超过30倍,而在两个细胞组之间仅存在其他整联蛋白水平的中度差异(0.8至2.3倍)。相比之下,OPN免疫沉淀物中的CD44水平在WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中是类似的。这些结果表明PTP μ 的损失有利于OPN与成骨细胞中的整联蛋白的相互作用并且指示 $\alpha_5\beta_1$ 整联蛋白可能是负责与PTP μ 缺乏相关的作用的最有希望的受体。

[0190] 实施例8:沉默PIPK1 γ 选择性地增强PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的GiPCR信号传导

[0191] 为了理解在PTP μ 不存在下OPN与整联蛋白的相互作用的分子基础,对PIPK1进行检查,因为PIPK1 γ 通过酪氨酸磷酸化的催化活性对于增强整联蛋白对配体的亲和力来说是关键的,并且所述酶已经显示通过PTP $\mu^{-/-}$ 去磷酸化。因此,检查PTP μ 的损失是否通过PIPK1 γ 的持续活化增大GiPCR信号传导的降低。首先检查WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中PIPK1 γ 的磷酸化状态。

[0192] 将细胞裂解产物用PIPK1 γ 抗体免疫沉淀并且用磷酸-酪氨酸抗体探测。PIPK1 γ 的磷酸化水平在来自PTP $\mu^{-/-}$ 的成骨细胞中比来自WT小鼠的成骨细胞中更高(比较Wt媒介物对比PTP $\mu^{-/-}$ 媒介物列中的P-tyr行),而PIPK1 γ 总形式的水平(即磷酸化和未磷酸化的)在两种表型之间是可比较的(比较Wt媒介物对比PTP $\mu^{-/-}$ PP2或Fak抑制剂列中的PIPK1行)(图6A)。

[0193] 实施例9:抑制FAK和Src减少PIPK1 γ 磷酸化

[0194] 然后检查粘着斑激酶(FAK)和C肉瘤酪氨酸激酶(Src)是否负责来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞中观察到的PIPK1 γ 的增加的磷酸化。在免疫沉淀测定之前将细胞用Src(PP2)和FAK(抑制剂-14)的抑制剂处理。如所预期,PIPK1 γ 磷酸化的水平通过两种处理减弱(图6A)。这表明PIPK1 γ 的活性在FAK和Src作用时在来自PTP $\mu^{-/-}$ 小鼠的成骨细胞中异常升高。

[0195] 实施例10:沉默PIPK1 γ 增加PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的GiPCR信号传导

[0196] 为了进一步评定PIPK1 γ 在PTP μ 缺乏之后的作用机制中的牵涉,SiRNA方法用于在用生长激素抑制素刺激引发GiPCR信号传导之前敲低WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的PIPK1 γ 的表达。siRNA在WT和PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中的效率通过qPCR和蛋白质印迹分析证实(图6B和6C)。

[0197] 图6D-6G中所示的代表性CellKey™原始数据曲线显示阻抗特征在WT成骨细胞和缺失PIPK1 γ 的PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞中未受影响。两种细胞在生长激素抑制素刺激之后均表现出典型GiPCR的CDS反应。相比之下,在不同浓度的生长激素抑制素下筛选揭示缺失PIPK1 γ 增强来自PTP μ 缺乏小鼠的成骨细胞中对生长激素抑制素刺激的反应,但在来自WT小鼠的成骨细胞中未增强。(图6H,比较PTP $\mu^{-/-}$ +siPIPK1(更高反应)对比PTP $\mu^{-/-}$ +scrb(更低反应)和WT+siPIPK1对比WT+scrb(相同反应))。此外,缺失PIPK1 γ 的PTP $\mu^{-/-}$ 成骨细胞对生长激素抑制素刺激表现出与WT成骨细胞类似程度的反应,从而指示缺失PIPK1 γ 消除其对GiPCR刺激的反应能力的差异。(图6H)。

[0198] 总的来说,这些结果表明在来自PTP $\mu^{-/-}$ 缺乏小鼠的成骨细胞中观察到的GiPCR信号传导的降低增大是由于由PTP μ 的损失引起的PIPK1 γ 活性的失调。

[0199] 实施例11:在来自患有特发性脊柱侧凸的患者的成骨细胞中PTP μ 下调且PIPK1 γ 上调

[0200] 为了探究PTP μ 的损失在脊柱侧凸的发展中的临床相关性,首先研究患有特发性脊

柱侧凸的患者(34)中的PTP μ 表达水平和健康对照受试者(17)。据发现PTP μ 表达在来自对照受试者的成骨细胞中清楚地检测到,但在来自患有特发性脊柱侧凸的患者的成骨细胞中降低,而 β -肌动蛋白的表达水平在两个组之间是类似的(图7A和7B)。相对于对照受试者在来自脊柱侧凸患者的成骨细胞中的PTP μ mRNA中发现至少50%的降低。当通过蛋白质印迹分析细胞裂解产物以检查PTP μ 的蛋白质水平时获得类似的结果(图7C)。这些数据清楚地指示PTP μ 在患有特发性脊柱侧凸的患者中下调。这些结果还显示可在脊柱侧凸患者间观察到PTP μ 蛋白水平的变化。

[0201] 此外,通过qPCR测量人AIS和对照成骨细胞中PIP3K1 γ 的表达(RNA)。它显示在AIS患者(n=11)中相较于对照受试者(n=4)上调(图8)。

[0202] 权利要求的范围不应受实施例中阐明的优选实施方案的限制,而是应给予总体上与说明书一致的最广泛的解释。

[0203] 参考文献

[0204] 1.Kane,W.J.(1977) Scoliosis prevalence:a call for a statement of terms.Clinical orthopaedics and related research,43-46

[0205] 2.Dickson,R.A.(1992) The etiology and pathogenesis of idiopathic scoliosis.Acta orthopaedica Belgica 58Suppl 1,21-25

[0206] 3.Machida,M.(1999) Cause of idiopathic scoliosis.Spine 24,2576-2583

[0207] 4.Burwell,R.G.(2003) Aetiology of idiopathic scoliosis:current concepts.Pediatric rehabilitation 6,137-170

[0208] 5.Moreau,A.,Wang,D.S.,Forget,S.,Azeddine,B.,Angeloni,D.,Fraschini,F.,Labelle,H.,Poitras,B.,Rivard,C.H.,and Grimard,G.(2004) Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis.Spine 29,1772-1781

[0209] 6.Azeddine,B.,Letellier,K.,Wang da,S.,Moldovan,F.,and Moreau,A.(2007) Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis.Clinical orthopaedics and related research 462,45-52

[0210] 7.Akoume,M.Y.,Azeddine,B.,Turgeon,I.,Franco,A.,Labelle,H.,Poitras,B.,Rivard,C.H.,Grimard,G.,Ouellet,J.,Parent,S.,and Moreau,A.(2010) Cell-based screening test for idiopathic scoliosis using cellular dielectric spectroscopy.Spine 35,E601-608

[0211] 8.Tozer,E.C.,Hughes,P.E.,and Loftus,J.C.(1996) Ligand binding and affinity modulation of integrins.Biochemistry and cell biology 74,785-798

[0212] 9.Hynes,R.O.(2002) Integrins:bidirectional,allosteric signaling machines.Cell 110,673-687

[0213] 10.Calderwood,D.A.(2004) Integrin activation.Journal of cell science 117,657-666

[0214] 11.Martel,V.,Racaud-Sultan,C.,Dupe,S.,Marie,C.,Paulhe,F.,Galmiche,A.,Block,M.R.,and Albiges-Rizo,C.(2001) Conformation,localization,and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides.The Journal of biological chemistry 276,21217-21227

- [0215] 12. Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M.R., and De Camilli, P. (2002) Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 γ by the FERM domain of talin. *Nature* 420, 85-89
- [0216] 13. Ling, K., Doughman, R.L., Iyer, V.V., Firestone, A.J., Bairstow, S.F., Mosher, D.F., Schaller, M.D., and Anderson, R.A. (2003) Tyrosine phosphorylation of type 1 γ phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *The Journal of cell biology* 163, 1339-1349
- [0217] 14. Sakamoto, Y., Ogita, H., Komura, H., and Takai, Y. (2008) Involvement of nectin in inactivation of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ after the establishment of cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 283, 496-505
- [0218] 15. Oyama, J., Murai, I., Kanazawa, K., and Machida, M. (2006) Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels. *Journal of pineal research* 40, 219-224
- [0219] 16. Machida, M., Dubousset, J., Yamada, T., Kimura, J., Saito, M., Shiraishi, T., and Yamagishi, M. (2006) Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *Journal of pineal research* 41, 1-7
- [0220] 17. Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A., and Ginsberg, M.H. (1997) Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 88, 521-530
- [0221] 18. Gronthos, S., Stewart, K., Graves, S.E., Hay, S., and Simmons, P.J. (1997) Integrin Expression and Function on Human Osteoblast-like Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 12, 1189-1197
- [0222] 19. Grzesik, W.J., and Robey, P.G. (1994) Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9, 487-496
- [0223] 20. Clover, J., Dodds, R.A., and Gowen, M. (1992) Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *Journal of cell science* 103 (Pt 1), 267-271
- [0224] 21. Moursi, A.M., Globus, R.K., and Damsky, C.H. (1997) Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *Journal of cell science* 110 (Pt 18), 2187-2196
- [0225] 22. Pistone, M., Sanguineti, C., Federici, A., Sanguineti, F., Defilippi, P., Santolini, F., Querze, G., Marchisio, P.C., and Manduca, P. (1996) Integrin synthesis and utilization in cultured human osteoblasts. *Cell biology international* 20, 471-479.
- [0226] 23. Letellier K, Azeddine B, Parent S, Labelle H, Rompré PH, Moreau A, Moldovan F. Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human

osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients. *J Pineal Res.* 2008 Nov;45(4):383-93

[0227] 24. Verdonk E, Johnson K, McGuinness R, Leung G, Chen YW, Tang HR, Michelotti JM, Liu VF. Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug Dev Technol.* 2006 Oct;4(5):609-19.

序列表

	<110> Hopital Ste-Justine Moreau, Alain Elbakry, Mohamed Akoume Ndong, Marie-Yvonne	
	<120> 特发性脊柱侧凸的严重进展的新标记物及其用于分层脊柱侧凸患者和预测发展脊柱侧凸的风险的用途	
	<130> 765/14033_124	
	<140> N/A	
	<141> 2014-06-17	
	<150> US 61/835,698	
	<151> 2013-06-17	
	<160> 39	
	<170> PatentIn 3.5版	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 1 ggaaatcgtg cgtgacat	18
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 2 tcgatgga gttgaagta gtt	23
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
[0001]	<400> 3 ggcggactt ttgctaact	19
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 4 tgtgtatac ggctcatcaa a	21
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 5 agcatcgat ttgagacctg	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 6 tgagtccact tggctttctg	20
	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 7 atgtgcaga cctgccttg	19

	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 8	
	ttgtcccgac ttctacctt g	21
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 9	
	ggaaagtcca tcctgtatgt gg	22
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 10	
	gagtttccag atgagcaggg	20
	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 11	
	gtccccacag tagacacata tg	22
[0002]	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 12	
	tcaactcctc gctttccatg	20
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 13	
	gacatttgga tgaactttag tcacc	25
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 14	
	ggcaatggaa ttcacgactt g	21
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 15	
	ggatgagact tcagcactca ag	22
	<210> 16	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 16	

	ggtgaaataa cgtttgggtc ttg	24
	<210> 17 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 17 ggaagtcca tcctgtatgt gg	22
	<210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 18 gagtttccag atgagcaggg	20
	<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 19 cttgcactcc tggctatctg	20
	<210> 20 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 20 tgcgtggaga taggctttc	19
[0003]	<210> 21 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 21 gattgggtg cttaaagtcc tg	22
	<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 22 ggtagtgac tgctcttgtg	20
	<210> 23 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 23 cagattacag tgcaggtgga g	21
	<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成构建体	
	<400> 24 gctggcagti tctacttcaa c	21
	<210> 25 <211> 25 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220>	

<223> 合成构建体

<400> 25
ccacagccac aagcagucca gauua 25

<210> 26
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 26
ccuccacauc gggauugaua uu 22

<210> 27
<211> 4998
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27
ctcccttggc cggcggcgt tgttgtcgg cggcggcgt cgcagctcg gtccccctcg 60
ggcggccccg ccgcccctcg cgcgcggcca tggagctgga ggtaccggac gaggcggaga 120
gcgctgagge gggggccgtg cccctggagg cggcgtgggc ggcagagagc gggcgggcgg 180
caggtttggc tcagaagaag gggcccccac cagaggttct gtccatgacg gcacagccgg 240
gcccctggca tgggaagaag ttggccatc gaggtgtgga cgcacccggc gaaaccacct 300
acaagaagac cactcctcc accctgaagg gtgccatcca gctgggcatc ggetacaccg 360
tggcccaact gagctcaag ccggaacgag acgtgctcat gcaggacttc tacgtggtgg 420
agagcatctt ctccccagc gaaggcagca acctacccc cggccaccac ttcagagact 480
tccgctcaa gacctatgca cctgtcgcct tccgctactt cgggagctc tttgggatcc 540
ggccagatga ttacttgtac tcccgtgca atgagccgct gatcgagctg tccaaccggg 600
gcgccagtgg ctccctcttc tacgtcacca gcgacgacga gttcatcacc aagaccgtca 660
tgcacaagga gggcagttc ctgcagaagc tgcctcctgg ctactacatg aacctcaacc 720
agaaccggcg gacgtgctg cccaagtct atgggctgta ctgctgacg tcggggggca 780
agaacatccg cgtcgtggtc atgaacaaca tccctgcccc cgtggtcaag atgcacctca 840
agttcgacct caaggctcc acctacaagc ggcgcgccag caagaaggag aaggagaaga 900
gcttccccac ctacaaggac ctggacttca tgcaggacat gcccaggggg ctctgctgg 960
acgcccacac ctccagccc ctggtaaga cgtcgcagcg ggaactgctg gctctgaaa 1020
gtttcaagat catgactac agcctgctgc tggcgtgca caacatgac cagcagagc 1080
gcgagcggca ggcgcagggc gccagagca cctcagatga gaagcggcct gtggccaga 1140
aggcgtctta ctccacggc atggagtcca tccagggtgg cggcgcgcgc ggggagcca 1200
tcgaatcgga tgacacgatg ggcgggatcc ccgctgtgaa cggcgcggg gagcggctc 1260
tgtcgcacat tggcatcacc gacatcctgc agtccacag gttcatcaag aaactggagc 1320
acacctgaa ggcctctgt caccatgggg acacgtgtc cgtccaccgc cccagctct 1380
atgccagcgc cttttcaag ttcatgagca acacgtctt tcggaagaac tctcctctga 1440
agtctctgcc ctccaagaag gggcgcggcg gaccttctc agctgtgaaa ccgctggggc 1500
ccaccgtgc ctctctggcc agccagatcc ctagcagcgc gtaggagcc cagtacagc 1560
tgcggggggc ccgcagetac cccacgctgg aggacgaagg ccggcccac ctctgcct 1620
gcacgccacc tctttcgaa gaagccaacta cagctccat tgcccagact ctgtcatcca 1680
catcctctc cattctgag cggctcccct cggagacgtc gtagcagccg cgttacagc 1740
ggcgcacaca gtgtctgga caggatggca ggcgcagga gtagccccc gcggaagagg 1800
atctgcagca gattacagt caggtggagc ctgctgacg cgtggagatt gtgtccccca 1860
aagaggagga cgcaggggtg gaggcttccc cggccgtgc ctctgctgct gttgaagtag 1920
aaactgccac ccagccctca gacagggagg ggcacctgc cagccagcc tcggacagag 1980
aggacgcgcc cggcaccgac atctactttt aatttctatg cagccccga cccagagccg 2040
agctccactt ctgctccggc tgcctcccga ggcgtgccc accccctga gggccagagc 2100
tggggagatg cccgctcgc cggcccaccg gacctctgc tccccctgca cggatgccga 2160
cggccggccc cctccccgac aagcctccca gggccccgce accccggtcg gcagcctgcc 2220
cctgtgagac ccacctccc gacggcccaa tcgcatttga gtcttattt ggcacagaga 2280
cggaaacagc tgtgtgcctt tttaggaaaa gaacaaaaa gacacaaaca aaccaaccag 2340
aggagaaga gccctgccc actgcaactt ttggttctct gctgtgctg cctgtgtcct 2400
gaggagaagc ccagcgtgtt cgcggtggcc tctggggacc tgagccccg gggcccacc 2460

[0004]

[0005]

```

ggcctcaga ggggacggt ggggtcccga gcaactctgc ctccatccac gtgggaagcg 2520
gacctctctg ccctcagctt gggtttgggg gcctcagtgc aggacatctg gcctgaacat 2580
cgactgtggg gacagccctc gccctgccaa gcaactcggc cactcagcag ctatgttccc 2640
ggcagctgg ggcctgacg cccacctccc agtgcccct cgagcaaaaa cctctggcgc 2700
ctccaatcca gaccaccac agctggaggg ccaggcctcc tcttcccag getgccccc 2760
acgtggcgg agctcagggc tgggacttg tccttctctt ccaactagg ccactcagca 2820
actggcatgg agggcccagg caacggagac gttttctcca tggcaggaca gagcgggagg 2880
ccggccttg ggccacagga gaccagctca gggcggaagg tcaggtccc cggcccctcc 2940
acgtggagac atggcctagg gggccaggcc cggctccaca ggagtctctc tcaggactgg 3000
tgtgatgtc cgccgctctt ttctgttta agtcatgta tgtctccag gaggggagag 3060
aagactttgt tccgactca tcacctcca agagggcagc gctcccagtg gtggactca 3120
ggccagactg ccttgggcca gcttcttggg cccgctcgcg tcagagggtg ctgtttggag 3180
ggcagagctc ggcagagtca cccacctcgc cttcccag gaccttgag agggccttat 3240
tggtagtggc tgtgggaatc cccacttcc aagatgtgcc caggatgta ggagctggag 3300
tggagctgc acctttggga agaattctc tcagacctg gcagagcctg gtgtggggtc 3360
tgagcggcc ggagaacctc ccaggcaggg ctctgtgttt tgtctgttac aacctcgtg 3420
tgacgcacg ccaccgctg ttcactccc gtcgcccctc tgcacagccc acacgtcgg 3480
cccgaagcc cctgtctg gagaagccgg acctatccc gagtccccg gcagagacac 3540
acctccacg agagcagccc ctccactctg cccagagag gggccgacc tctctggaa 3600
ccggccagc gcgtggctcc cagcatccat caggacaagc ccactgggg tcttctctg 3660
gtgctcagag ggtctgtcca gccctgggaa ggcacctgg cctcagtca cagcctggg 3720
ctcatctgct ggcaccgggc atccacctc cagccccgc cctgtccctc ggaagacac 3780
ccagcagca cccccgggg aggcagggc agaggtcaga aggggtgtct gggacctgga 3840
tggccagcag gacagggggc attgtcatc caaaggccca acccccagag gccaccag 3900
tctcccagg gagtctcga gtcgcccgc ccagagcct ggcaccagag acgccaagag 3960
cctgtgggt gactcagagc agcaggtgtg gcccccggcg ggcggaccg cgtccagggc 4020
agcctcctc cgtgagtga cacggacac cagtccccg ccagcgcgc tttgacagag 4080
aaatgtcaa acctctgtg ataccattc atttccatc ttgtgtgtc tccaaggccc 4140
ttttgagat atactgtgt ttgtgtgtt ttttggttc cttttcagag aactgtaaac 4200
cgagctgac gtctccact gactgtccc agggcgggg gcagagagc gccaagacct 4260
atttataata tttagcaac tcggtctccc tcagatccc cgcgaggag gctgctggac 4320
ccaccctgt gtcctccatg atagaagtct gtaaatacct tggtagccaa tgcccctc 4380
cctctctgg tcacctctga tggctgctg ccaactgaga cgtgggcagt gtccaaatc 4440
ctgtactgta aagactaaaa ggcgtttgct ctgagactga caagcggaa acttcaigt 4500
gtctctgcc agctctgtc cccctacgc atcccagac gtcctccgtc ccccgaacc 4560
tgctcagtg caatactccc attgccatg ggtccttcc catgtactg tetccacag 4620
cctcagccc caccacagga gaggcctg ccacctctc ctcatctcc gtggttcaat 4680
cgtccgctg gtcaccaacc cagtccatt tttatgcca aactgattct gaacaaaa 4740
gaaactcaa acctctgtg tcttaactc cccagggat gccactcat tctctcgccc 4800
cgtggtctg tgcgtgaaa tccaagcgc cgagacgagg gtgtgtgtc cctcaaaccc 4860
agagtgtgg gcgctctga aaccatacag ccaactctg ccccaaacac tggtttgc 4920
cccaggttc tgcacctc acccccgca cccccgtct ttttagagat ctcttaata 4980
aatcggtaa taagcatc 4998

```

```

<210> 28
<211> 668
<212> PRT
<213> 智人
<400> 28

```

```

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

Val Pro Ser Glu Ala Ala Trp Ala Ala Glu Ser Gly Ala Ala Ala Gly
20          25          30

Leu Ala Gln Lys Lys Ala Ala Pro Thr Glu Val Leu Ser Met Thr Ala
35          40          45

```

Gln Pro Gly Pro Gly His Gly Lys Lys Leu Gly His Arg Gly Val Asp
 50 55 60
 Ala Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Lys Lys Thr Thr Ser Ser Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Gly Ala Ile Gln Leu Gly Ile Gly Tyr Thr Val Gly His Leu Ser Ser
 85 90 95
 Lys Pro Glu Arg Asp Val Leu Met Gln Asp Phe Tyr Val Val Glu Ser
 100 105 110
 Ile Phe Phe Pro Ser Glu Gly Ser Asn Leu Thr Pro Ala His His Phe
 115 120 125
 Gln Asp Phe Arg Phe Lys Thr Tyr Ala Pro Val Ala Phe Arg Tyr Phe
 130 135 140
 Arg Glu Leu Phe Gly Ile Arg Pro Asp Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Cys
 145 150 155 160
 Asn Glu Pro Leu Ile Glu Leu Ser Asn Pro Gly Ala Ser Gly Ser Leu
 165 170 175
 Phe Tyr Val Thr Ser Asp Asp Glu Phe Ile Ile Lys Thr Val Met His
 180 185 190
 Lys Glu Ala Glu Phe Leu Gln Lys Leu Leu Pro Gly Tyr Tyr Met Asn
 195 200 205
 Leu Asn Gln Asn Pro Arg Thr Leu Leu Pro Lys Phe Tyr Gly Leu Tyr
 210 215 220
 Cys Val Gln Ser Gly Gly Lys Asn Ile Arg Val Val Val Met Asn Asn
 225 230 235 240
 Ile Leu Pro Arg Val Val Lys Met His Leu Lys Phe Asp Leu Lys Gly
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Lys Arg Arg Ala Ser Lys Lys Glu Lys Glu Lys Ser Phe
 260 265 270
 Pro Thr Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Met Gln Asp Met Pro Glu Gly Leu
 275 280 285
 Leu Leu Asp Ala Asp Thr Phe Ser Ala Leu Val Lys Thr Leu Gln Arg
 290 295 300
 Asp Cys Leu Val Leu Glu Ser Phe Lys Ile Met Asp Tyr Ser Leu Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Val His Asn Ile Asp Gln His Glu Arg Glu Arg Gln Ala Gln
 325 330 335
 Gly Ala Gln Ser Thr Ser Asp Glu Lys Arg Pro Val Gly Gln Lys Ala
 340 345 350
 Leu Tyr Ser Thr Ala Met Glu Ser Ile Gln Gly Gly Ala Ala Arg Gly
 355 360 365
 Glu Ala Ile Glu Ser Asp Thr Met Gly Gly Ile Pro Ala Val Asn
 370 375 380
 Gly Arg Gly Glu Arg Leu Leu Leu His Ile Gly Ile Ile Asp Ile Leu
 385 390 395 400
 Gln Ser Tyr Arg Phe Ile Lys Lys Leu Glu His Thr Trp Lys Ala Leu
 405 410 415
 Val His Asp Gly Asp Thr Val Ser Val His Arg Pro Ser Phe Tyr Ala
 420 425 430
 Glu Arg Phe Phe Lys Phe Met Ser Asn Thr Val Phe Arg Lys Asn Ser
 435 440 445
 Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ser Lys Lys Gly Arg Gly Gly Ala Leu Leu
 450 455 460

[0006]

Ala Val Lys Pro Leu Gly Pro Thr Ala Ala Phe Ser Ala Ser Gln Ile
465 470 475 480

Pro Ser Glu Arg Glu Glu Ala Gln Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Arg Ser
485 490 495

Tyr Pro Thr Leu Glu Asp Glu Gly Arg Pro Asp Leu Leu Pro Cys Thr
500 505 510

Pro Pro Ser Phe Glu Glu Ala Thr Thr Ala Ser Ile Ala Thr Thr Leu
515 520 525

Ser Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Glu Arg Ser Pro Ser Glu Thr Ser
530 535 540

Glu Gln Pro Arg Tyr Arg Arg Arg Thr Gln Ser Ser Gly Gln Asp Gly
545 550 555 560

Arg Pro Gln Glu Glu Pro Pro Ala Glu Glu Asp Leu Gln Gln Ile Thr
565 570 575

Val Gln Val Glu Pro Ala Cys Ser Val Glu Ile Val Val Pro Lys Glu
580 585 590

Glu Asp Ala Gly Val Glu Ala Ser Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Val
595 600 605

Glu Val Glu Thr Ala Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Gly Ala Pro Ala
610 615 620

Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Asp Ala Pro Ala Thr Asp Ile Tyr Phe
625 630 635 640

Pro Thr Asp Glu Arg Ser Trp Val Tyr Ser Pro Leu His Tyr Ser Ala
645 650 655

Gln Ala Pro Pro Ala Ser Asp Gly Glu Ser Asp Thr
660 665

[0007]

<210> 29
<211> 5082
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
ctcccttggc cgccggcgcct tgttgttcgg cggcggcggc cgcagctcgg gtccccctcg 60
ggcggccccg ccgcccgtcc gcgcggccca tggagctgga ggtaccggac gagcgggaga 120
gcgctgaggc gggggccgtg ccctcggagg cggcgtgggc ggccagagac gggcgggcgg 180
caggtttggc tcagaagaag gcggccccaa cacaggttct gtccatgacg gcacagccgg 240
gcccctggca tgggaagaag ttggccatc gagtgtgga cgcctccggc gaaaccact 300
acaagaagac cacctctcc accctgaagg gtgccatcca gctggcctc ggotacaccg 360
tggcccact gagctccaag cccgaacgg acgtgctcat gcaggacttc tacgtgtggtg 420
agagcatctt ctccccagc gaaggcagca acctcaccgc cggccaccac ttccaggact 480
tcgcttcaa gacctatgca cctgtcgcct tccgctactt ccgggagctc ttgggatcc 540
ggccagatga ttacttgtac tccctgtgca atgagccgct gatcgagctg tccaaccggg 600
gcgccagtgg ctcccccttc tacgtcacca ggcagcagca gttcatcctc aagaccgtca 660
tgcacaagga ggccgagttc ctgcagaagc tgcctcctgg ctactacatg aacctcaacc 720
agaaccggcg gacgctgctg cccaagttct atgggctgta ctgcgtgcag tcggggggca 780
agaacatccg cgtcgtggtc atgaacaaca tctgccccg cgtggtcaag atgcacctca 840
agttcgacct caaggctcc acctacaagc ggcgcgccag caagaaggag aaggagaaga 900
gcttccccac ctacaaggac ctggacttca tgcaggacat gcccaggggg ctctgctggtg 960
acgcccagac ctccagcgc ctggtaaga cgtgcagcg gactgcctg gtcttggaaa 1020
gtttcaagat catggactac agcctgtgct tggcggtgca caacatgac cagcagcagc 1080
ggagcggca ggcgcagggc gccagagca cctcagatga gaagcggcct gtggccaga 1140
aggcgtctca ctccagcgc atggagtcca tccagggtgg cgccggcgcg gggaggccca 1200
tcgaatcgga tgacacgatg ggcgggatcc ccgctgtaa cgcccgcggg gagcagctgc 1260
tgtgcaeat tggcatcctc gacatcctgc agtcctacag gttcatcaag aaactggagc 1320
acacctgaaa ggcctcgtc cacgatgggg acacggtgct cgtccaccgc cccagcttct 1380

[0008]

atgccagcg cttttcaag ttcatgagca acacggtctt tcggaagaac tcttccctga	1440
agtccctgcc ctccaagaag gggcgcggcg gagccttgct agctgtgaaa ccgctggggc	1500
ccaccgtgc cttctcgccc agccagatcc ctagcgagcg ggaggaggcc cagtacgacc	1560
tgcggggggc cgcagctac cccacgctgg aggacgaag ccggcccgc cctctgccct	1620
gcacgcacc tctttcgaa gaagccacta cagcctccat tgccacgact ctgtcatcca	1680
catccctctc catctctgag cggteccctc cggagacgtc ggagcagccg cggtagagcc	1740
ggcgcacaca gtcgtctgga caggatggca ggcccgagga ggagccacc cgggaagagg	1800
atctgcagca gattacagtg caggtggagc ctgctgtcag cgtggagatt gtgtcccca	1860
aagaggagga cgcaggggtg gagccttccc cggccggtgc cctctgctct gttgaagtag	1920
aaactgccag ccaggcctca gacgagagg gcgcacctgc cagccagcc tcggcagagg	1980
aggacgcgcc cggcaccgac atctacttcc ccaccgatga gaggagctgg gtgtactccc	2040
cgtccacta tagcggcccag gccccccgg cctccgacgg cgagagcgac acataatttc	2100
tatgcagccc ccgaccaga gccagctccc acttctgctc cggctgcccc cgaagcgcct	2160
gcccccccg ctgagggccc gagctggga gatccccccc tcgcccgcc accggacctc	2220
gtcctcccc tgcacggatg ccgacggccc ggccccccc cgacaagcct cccagggccc	2280
cggcaccggc gtcggcagcc tgccccgtg agaccacccc tcccagcgg ccaatcgcat	2340
ttgagctctt atttggcaca gagcgggaag cacgtgtgtg ccgttttagg aaaaacaaca	2400
aaaagacaca aacaaccaa ccagagggag aagaccctc gccactgca ccttttggtt	2460
ctctgtgtg cctgctgtg tcttgaggaa gaagccaggc tgttcgggt ggctctggg	2520
gacctgacc ccggggccc catcgccctg cagaggggac ggctggggtc ccgagcaact	2580
ctgctccat ccacgtggga agcggaccct cctgccctca gcttgggtt gggggcctca	2640
gtgcaggaca tctggcctga acatcgactg tggggacagc cctgccctg ccaagcactg	2700
cggccactca gcagctatgt tcccgcgca gtggggccct gaccccacc tcccaggtgc	2760
ccctcgagca aaaactctg gcgcctccaa tccagaccca ccacagctg agggccaggc	2820
ctcctctcc ccaggctgcc acccagctg gcgagctca ggctgggga ctgtctcttc	2880
tcttcaacg taggccactc agcaactgac atgagggccc caggcaacgg agacgttttc	2940
tccatggcag gacagagcgg gaggccggc cttggccac aggagaccag ctcaggcggg	3000
aagtcagcc tcccggccc ctccacgtgg agacatggcc tagggggcca ggcccggctc	3060
cacaggagtc tcttcagga ctgggtgga tgtccgccc cctctcttg tttaaagtat	3120
gtgatctctc cgaggagggg agagaagact ttgtttccga ctcatcacc tccaagagg	3180
cagcctccc agtgggtggga ctacgcccag actgcccctg ggcagcttc tggcccctg	3240
gcgctcagag ggtgctggtt ggaggccaga gctcgccaga gtcaccacc ctgcccctc	3300
ccaggacccc tgagaggggc ttatfgtga tggctgtggg aatccccac tccaagatg	3360
tgccaggat gtgaggact ggagtgaag ctgcacctt gsgaagaatt cctctccaga	3420
cctggcagag cctggtgtgg ggtctgagac ggccggagaa cctcccagc agggctctgt	3480
gtttgtctg ttacaacctc cgtatgacg cacgccacc gctgttcag tcccctggc	3540
ctcctgaca gccacacgc tgcgcccga agcccctgc tgtggagaag ccggaccat	3600
cccagggtc cccagcgagg acacacactc cagcagagca gccctccac tctgccag	3660
agaggggccc accctctctg gaaaccgccc agcccgctgg cctccagcat ccatcaggac	3720
aagcccacgt ggggtctctc ctgctgctc agagggtctg tccagccctg ggaagcacc	3780
ttggcctcag ttacagcct ggtgctcctc tctgtgccc ggcctccac ccatcagccc	3840
ccgcccctg cctccgaagg acaccagca ggcaccccc gggagggcag gggcagaggt	3900
cagaaggggt gcttgggacc tggatggcca gcaggacag ggcattgtc atctcaagg	3960
cccaacccc agaggccaca ccagctctcc caggagctcc tcgagctgcc ctgcccagag	4020
ccctggcacc agagacgcca agagcctgtg gsgtgactcg gacgacagg tgtggcccc	4080
ggcggcgccc acccgtcca gggcagcctc cctccctga gtgacacggg acaccagtgc	4140
ccggccgagc cgcctttgca ggagaaatgt gcaacctct gtggatacca tttcatttcc	4200
attcttgtgt tgcctcaag gcccttttgg agatatactt ggtgttggtt gtgtttttg	4260
gttcccttcc agagaactgt aaaccgagcc tgacgtgctc cactgactgt gccgagggc	4320
ggggcgagga ggacggcaag acctatttat aatatttagc gaactcggtc tcccctagat	4380
cccccgag ggaggctgct ggaccacccc cgtgtcccc catgatagaa gctctgaaat	4440
accttggta ccaatgccca cttcccctcc tgggtcaact ctgatggctg ctgtccactg	4500
agaacgtggg cagtgtccaa attcctgtac tgaagactc aaaagcggtt tgcctgaga	4560

```

ctgacaaggc ggaacttcc atgtgtctcc tgcaggctc tgtccccta cgcctcccg 4620
acacgtccce gttccccega aacctggctc agtgcatac tccattgcc atgggtcct 4680
tcaccatggt actgtctcca cagccctcag tcccacccc aggagagcg cctgccact 4740
cctctcacc tccggtggtt caatcctcc gccgtcccc aaccagctc cattttatg 4800
gccaaactga tctgaaaca aatgaaact gcaaacctcg tgtgtcttaa ctccccccag 4860
ggatgccact ccattctccc gccccgtggt ctggtgcgtg acaatccaaa gcgccagac 4920
gagggtgctg tgtccctcaa acccagagtg gtgggcctc ctgaaacat acagccactc 4980
ctggccccaa acactggttt gcatcccagg tctctgccc acctaccccc gccacaccc 5040
gtctttttag agatctctct aataaatcgg gtaataagca tc 5082

```

```

<210> 30
<211> 700
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 30

```

```

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

Val Pro Ser Glu Ala Ala Trp Ala Ala Glu Ser Gly Ala Ala Ala Gly
20 25 30

Leu Ala Gln Lys Lys Ala Ala Pro Thr Glu Val Leu Ser Met Thr Ala
35 40 45

Gln Pro Gly Pro Gly His Gly Lys Lys Leu Gly His Arg Gly Val Asp
50 55 60

Ala Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Lys Lys Thr Thr Ser Ser Thr Leu Lys
65 70 75 80

Gly Ala Ile Gln Leu Gly Ile Gly Tyr Thr Val Gly His Leu Ser Ser
85 90 95

Lys Pro Glu Arg Asp Val Leu Met Gln Asp Phe Tyr Val Val Glu Ser
100 105 110

Ile Phe Phe Pro Ser Glu Gly Ser Asn Leu Thr Pro Ala His His Phe
115 120 125

Gln Asp Phe Arg Phe Lys Thr Tyr Ala Pro Val Ala Phe Arg Tyr Phe
130 135 140

Arg Glu Leu Phe Gly Ile Arg Pro Asp Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Cys
145 150 155 160

Asn Glu Pro Leu Ile Glu Leu Ser Asn Pro Gly Ala Ser Gly Ser Leu
165 170 175

Phe Tyr Val Thr Ser Asp Asp Glu Phe Ile Ile Lys Thr Val Met His
180 185 190

Lys Glu Ala Glu Phe Leu Gln Lys Leu Leu Pro Gly Tyr Tyr Met Asn
195 200 205

Leu Asn Gln Asn Pro Arg Thr Leu Leu Pro Lys Phe Tyr Gly Leu Tyr
210 215 220

Cys Val Gln Ser Gly Gly Lys Asn Ile Arg Val Val Val Met Asn Asn
225 230 235 240

Ile Leu Pro Arg Val Val Lys Met His Leu Lys Phe Asp Leu Lys Gly
245 250 255

Ser Thr Tyr Lys Arg Arg Ala Ser Lys Lys Glu Lys Glu Lys Ser Phe
260 265 270

Pro Thr Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Met Gln Asp Met Pro Glu Gly Leu
275 280 285

Leu Leu Asp Ala Asp Thr Phe Ser Ala Leu Val Lys Thr Leu Gln Arg
290 295 300

Asp Cys Leu Val Leu Glu Ser Phe Lys Ile Met Asp Tyr Ser Leu Leu
305 310 315 320

```

[0009]

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

Gly Ala Gln Ser Thr Ser Asp Glu Lys Arg Pro Val Gly Gln Lys Ala
 340 345 350

Leu Tyr Ser Thr Ala Met Glu Ser Ile Gln Gly Gly Ala Ala Arg Gly
 355 360 365

Glu Ala Ile Glu Ser Asp Asp Thr Met Gly Gly Ile Pro Ala Val Asn
 370 375 380

Gly Arg Gly Glu Arg Leu Leu Leu His Ile Gly Ile Ile Asp Ile Leu
 385 390 395 400

Gln Ser Tyr Arg Phe Ile Lys Lys Leu Glu His Thr Trp Lys Ala Leu
 405 410 415

Val His Asp Gly Asp Thr Val Ser Val His Arg Pro Ser Phe Tyr Ala
 420 425 430

Glu Arg Phe Phe Lys Phe Met Ser Asn Thr Val Phe Arg Lys Asn Ser
 435 440 445

Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ser Lys Lys Gly Arg Gly Gly Ala Leu Leu
 450 455 460

Ala Val Lys Pro Leu Gly Pro Thr Ala Ala Phe Ser Ala Ser Gln Ile
 465 470 475 480

Pro Ser Glu Arg Glu Glu Ala Gln Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Arg Ser
 485 490 495

Tyr Pro Thr Leu Glu Asp Glu Gly Arg Pro Asp Leu Leu Pro Cys Thr
 500 505 510

Pro Pro Ser Phe Glu Glu Ala Thr Thr Ala Ser Ile Ala Thr Thr Leu
 515 520 525

Ser Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Glu Arg Ser Pro Ser Glu Thr Ser
 530 535 540

Glu Gln Pro Arg Tyr Arg Arg Arg Thr Gln Ser Ser Gly Gln Asp Gly
 545 550 555 560

Arg Pro Gln Glu Glu Pro Pro Ala Glu Glu Asp Leu Gln Gln Ile Thr
 565 570 575

Val Gln Val Glu Pro Ala Cys Ser Val Glu Ile Val Val Pro Lys Glu
 580 585 590

Glu Asp Ala Gly Val Glu Ala Ser Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Val
 595 600 605

Glu Val Glu Thr Ala Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Gly Ala Pro Ala
 610 615 620

Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Asp Ala Pro Ala Thr Asp Ile Tyr Phe
 625 630 635 640

Trp Arg Leu Trp Gly Pro His Ala Pro Thr Trp Pro Trp Arg Arg Glu
 645 650 655

Gly Arg Ala Ala Cys Leu Cys Pro Tyr Pro Pro His Val Val Thr Pro
 660 665 670

Phe Pro Gly Thr Gly Leu Cys Ala Ser Trp Ser Pro Asp Gly Thr Gly
 675 680 685

Gly Leu Gly Ala Met Ser Cys Cys Val Ser Val Ser
 690 695 700

[0010]

<210> 31
 <211> 3471
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 31
 ggcgcctc ccttgccgg cggcgttgt tgttcggcg cggcggtcgc agctcgggtc

60

[0011]

ccccctgggc gccccgccc ccgtccgcgc gcggccatgg agctggaggt accggacgag	120
gcggagagcg ctgaggcggg ggccgtgccc tcggaggcgg cgtgggccc agagacggg	180
gcggcgccag gtttgctca gaagaaggcg gcccacacag aggttctgtc catgacggca	240
cagccgggccc ctggccatgg gaagaagtgg ggccatcgag gtgtggacgc atccggcgaa	300
accacctaca agaagaccac ctctccacc ctgaagggtg ccatccagct gggcatcggc	360
tacacctgg gccacctgag ctccaagccc gaacgcgacg tgctcatgca ggacttctac	420
gtggtggaga gcatcttctt ccccagcgaa ggcagcaacc tcacccccg ccaccacttc	480
caggacttcc gcttcaagac ctatgcacct gtgccttcc gtaacttcc ggagctcttt	540
gggatccggc cagatgatta ctgtactcc ctgtgcaatg agccgctgat cgagctgtcc	600
aacccgggcg ccagtggtcc cctcttctac gtcaccagcg acgacgagtt catcatcaag	660
accgtatgc acaaggagcg cgagttcctg cagaagctgc tccttggcta ctacatgaac	720
ctcaaccaga acccgcgac gctgctgccc aagtctatg ggctgtactg cgtcagctg	780
gggggcaaga acatcccgct cgtggtcatg aacaacatcc tgccccgct ggtcaagatg	840
cacctcaagt tegacctcaa ggctccacc tacaagcggc gcgccagcaa gaaggagaag	900
gagaagagct tcccacccta caaggacctg gacttcatgc aggcacatgcc cgaggggctc	960
ctgctggacg ccgacacctt cagcgcctg gtcaagacgc tgacgggga ctgcttggtc	1020
ctgaaagt tcaagatcat ggactacagc ctgctgtgg gcgtgcacaa catcgaccag	1080
cacgagcggc agcggcagge gcagggccc cagagcacct cagatgagaa gcgacctgtg	1140
ggccagaagg cgtctactc cacggccatg gactccatcc aggtggcgc cgcgcgggg	1200
gagccatcg aatcgatga cacgatggc gggatcccc ctgtgaacgg ccgccccgag	1260
cggtctgc tgcacattgg catcatcgac atcctcagtt cctacagtt catcaagaaa	1320
ctggagcaca cctggaagge cctcgtccac gatgggaca cgggtccgt ccaccgccc	1380
agcttctatg ccgagcctt tttcaagttc atgagcaaca cggctttcg gaagaactcc	1440
tcctgaagt cctgccttc caagaaggcg cgcggcggag ccttctagc tgtgaaaccg	1500
ctggggccca ccgctgctt ctgcccagc cagatcccta gcgagcggga ggagcccag	1560
tacgacctgc gggggcccc cagctacccc acgctggagg acgaaggccg gcccgacctc	1620
ctgcccctca ccgccacttc tttcgaagaa gccactacag cctccattgc cagactctg	1680
tcattccat cctctccat tctgagcgg tccccctcg agacgtcga gcagccggg	1740
tacagcggc gcacacagtc gtctggacag gatggcagcg cgcaggagga gccaccgcg	1800
gaagagatc tgcagcagat tacagtcag gtggagcctg cgtcagcgt ggagattgtg	1860
gtccccaaag aggagcagc aggggtggag gcttccccg ccggctcctc tgcctgtgt	1920
gaagtagaaa ctgccagcca ggctcagac gaggaggcg cactgccag ccaggcctcg	1980
gacgagagg acgcccgc caccgacatc tactttttca cggatggag gtactggatt	2040
tacttcccc gccatcgccg actgcggcc gtacgctga gcgctcggg gactgtaagt	2100
gaccgagccc ggccccttg gggagaaggc gcagtcccc tcggcagca gggagccgca	2160
ggtccccggc ccgaaagctca gtgtctgac tcagttgttt tccagaagg ctttgggtaa	2220
atcacggctg caattgaggt cagccacgt ggccccggac caggcctgg gctcagtcg	2280
tcactgggaa tgtcattcgg tcccacgtc aaccggcgc tccataggc agcaccatca	2340
ccaggtgac agctgagccc cagggtctgc ttcggacccc ggccagacce cagcagccc	2400
ctctctccc ctggacccag cctctctgtg tcagggtgtc ttgggtggac gcttctact	2460
cgtgcagacc tggctcccc tggccccgt ggtgcacag gggaggtgc acagtcagc	2520
agagtggctg caggccggg ctctgaaccg caggccatg gagacggga ggagatggtc	2580
tctccaccc cactcacag atggaggcgc tgaggcctcg gctcccctgg gacctggga	2640
gaccacagc tttagtcaaa atccagatcc ccaagctctc aaggaggtcc cctgggacg	2700
ccacatggc cccacgtagc tgtgagatcc tcaggcctg ctgttctcat tatgaccaat	2760
aagcaagggg cccagagagc ctaagagacc tgcccagcac cgcacagcca gaacggggcg	2820
cagacccaaa gcaggagtgt ccccctgaga caaacctcc gccagggccg ccgtgactcc	2880
ccgccatca gcaaacctct ccgagcacct ctgtgtgcca ggcactgtgg agtgacccca	2940
agaggtggag accacttccc cggctgctct aggcagctcc gtcccacgga gccagcggga	3000
agccagccac cgcgaagccc tgccccggag atcgtccagg agctgccag agggcctgc	3060
tggagggagg agcactggag agaccacgc gccctgtgg ccaccccacc ataggcaggg	3120
agcagctgc agaggcccgc tacggagggg ggtccttga cttgaaaa cactgactt	3180

gaagggcag acgtggggag ggtgtctcg gcagcaggca cagcagaagc ggaagtgtg 3240
 gggccagaag ggagcaggg cagccattga aagcaccca aggcctgagt gctgaagagg 3300
 ctgtgccctt ggttctgttc ttctggggt caccgggttc tgggtccag ctgtactgc 3360
 ccccccttc cctgtctgc ccagctgctg gctgagggtg tccctctctg tcccccaac 3420
 tctgcagga caaggaagcc acctgtctg ccctttctt ttttcaatt t 3471

<210> 32
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

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

[0012]

Leu Tyr Ser Thr Ala Met Glu Ser Ile Gln Gly Gly Ala Ala Arg Gly
 355 360 365
 Glu Ala Ile Glu Ser Asp Asp Thr Met Gly Gly Ile Pro Ala Val Asn
 370 375 380
 Gly Arg Gly Glu Arg Leu Leu Leu His Ile Gly Ile Ile Asp Ile Leu
 385 390 395 400
 Gln Ser Tyr Arg Phe Ile Lys Lys Leu Glu His Thr Trp Lys Ala Leu
 405 410 415
 Val His Asp Gly Asp Thr Val Ser Val His Arg Pro Ser Phe Tyr Ala
 420 425 430
 Glu Arg Phe Phe Lys Phe Met Ser Asn Thr Val Phe Arg Lys Asn Ser
 435 440 445
 Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ser Lys Lys Gly Arg Gly Ala Leu Leu
 450 455 460
 Ala Val Lys Pro Leu Gly Pro Thr Ala Ala Phe Ser Ala Ser Gln Ile
 465 470 475 480
 Pro Ser Glu Arg Glu Glu Ala Gln Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Arg Ser
 485 490 495
 Tyr Pro Thr Leu Glu Asp Glu Gly Arg Pro Asp Leu Leu Pro Cys Thr
 500 505 510
 Pro Pro Ser Phe Glu Glu Ala Thr Thr Ala Ser Ile Ala Thr Thr Leu
 515 520 525
 Ser Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Glu Arg Ser Pro Ser Glu Thr Ser
 530 535 540
 Glu Gln Pro Arg Tyr Arg Arg Arg Thr Gln Ser Ser Gly Gln Asp Gly
 545 550 555 560
 Arg Pro Gln Glu Glu Pro Pro Ala Glu Glu Asp Leu Gln Gln Ile Thr
 565 570 575
 Val Gln Val Glu Pro Ala Cys Ser Val Glu Ile Val Val Pro Lys Glu
 580 585 590
 Glu Asp Ala Gly Val Glu Ala Ser Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Val
 595 600 605
 Glu Val Glu Thr Ala Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Gly Ala Pro Ala
 610 615 620
 Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Asp Ala Pro Ala Thr Asp Ile Tyr Phe
 625 630 635 640
 Phe Thr Asp Gly Arg Tyr Trp Ile Tyr Ser Pro Arg His Arg Arg Leu
 645 650 655
 Arg Ala Val Thr Leu Ser Ala Ser Gly Thr Val Ser Asp Arg Ser Arg
 660 665 670
 Pro Pro Trp Gly Glu Gly Ala Val Pro Leu Gly Gln Gln Gly Ala Ala
 675 680 685
 Gly Pro Arg Pro Glu Ala Gln Cys Leu Thr Ser Val Val Phe Gln Lys
 690 695 700
 Gly Phe Gly
 705
 <210> 33
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 33
 Met Glu Leu Glu Val Pro Asp Glu Ala Glu Ser Ala Glu Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Ser Glu Ala Ala Trp Ala Ala Glu Ser Gly Ala Ala Ala Gly

[0013]

20 25 30
 Leu Ala Gln Lys Lys Ala Ala Pro Thr Glu Val Leu Ser Met Thr Ala
 35 40 45
 Gln Pro Gly Pro Gly His Gly Lys Lys Leu Gly His Arg Gly Val Asp
 50 55 60
 Ala Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Lys Lys Thr Thr Ser Ser Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Gly Ala Ile Gln Leu Gly Ile Gly Tyr Thr Val Gly His Leu Ser Ser
 85 90 95
 Lys Pro Glu Arg Asp Val Leu Met Gln Asp Phe Tyr Val Val Glu Ser
 100 105 110
 Ile Phe Phe Pro Ser Glu Gly Ser Asn Leu Thr Pro Ala His His Phe
 115 120 125
 Gln Asp Phe Arg Phe Lys Thr Tyr Ala Pro Val Ala Phe Arg Tyr Phe
 130 135 140
 Arg Glu Leu Phe Gly Ile Arg Pro Asp Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Cys
 145 150 155 160
 Asn Glu Pro Leu Ile Glu Leu Ser Asn Pro Gly Ala Ser Gly Ser Leu
 165 170 175
 Phe Tyr Val Thr Ser Asp Asp Glu Phe Ile Ile Lys Thr Val Met His
 180 185 190
 Lys Glu Ala Glu Phe Leu Gln Lys Leu Leu Pro Gly Tyr Tyr Met Asn
 195 200 205
 Leu Asn Gln Asn Pro Arg Thr Leu Leu Pro Lys Phe Tyr Gly Leu Tyr
 210 215 220
 Cys Val Gln Ser Gly Gly Lys Asn Ile Arg Val Val Val Met Asn Asn
 225 230 235 240
 Ile Leu Pro Arg Val Val Lys Met His Leu Lys Phe Asp Leu Lys Gly
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Lys Arg Arg Ala Ser Lys Lys Glu Lys Glu Lys Ser Phe
 260 265 270
 Pro Thr Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Met Gln Asp Met Pro Glu Gly Leu
 275 280 285
 Leu Leu Asp Ala Asp Thr Phe Ser Ala Leu Val Lys Thr Leu Gln Arg
 290 295 300
 Asp Cys Leu Val Leu Glu Ser Phe Lys Ile Met Asp Tyr Ser Leu Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Val His Asn Ile Asp Gln His Glu Arg Glu Arg Gln Ala Gln
 325 330 335
 Gly Ala Gln Ser Thr Ser Asp Glu Lys Arg Pro Val Gly Gln Lys Ala
 340 345 350
 Leu Tyr Ser Thr Ala Met Glu Ser Ile Gln Gly Gly Ala Ala Arg Gly
 355 360 365
 Glu Ala Ile Glu Ser Asp Asp Thr Met Gly Gly Ile Pro Ala Val Asn
 370 375 380
 Gly Arg Gly Glu Arg Leu Leu Leu His Ile Gly Ile Ile Asp Ile Leu
 385 390 395 400
 Gln Ser Tyr Arg Phe Ile Lys Lys Leu Glu His Thr Trp Lys Ala Leu
 405 410 415
 Val His Asp Gly Asp Thr Val Ser Val His Arg Pro Ser Phe Tyr Ala
 420 425 430
 Glu Arg Phe Phe Lys Phe Met Ser Asn Thr Val Phe Arg Lys Asn Ser
 435 440 445

[0014]

Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ser Lys Lys Gly Arg Gly Gly Ala Leu Leu
450 455 460

Ala Val Lys Pro Leu Gly Pro Thr Ala Ala Phe Ser Ala Ser Gln Ile
465 470 475 480

Pro Ser Glu Arg Glu Glu Ala Gln Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Arg Ser
485 490 495

Tyr Pro Thr Leu Glu Asp Glu Gly Arg Pro Asp Leu Leu Pro Cys Thr
500 505 510

Pro Pro Ser Phe Glu Glu Ala Thr Thr Ala Ser Ile Ala Thr Thr Leu
515 520 525

Ser Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Glu Arg Ser Pro Ser Glu Thr Ser
530 535 540

Glu Gln Pro Arg Tyr Arg Arg Arg Thr Gln Ser Ser Gly Gln Asp Gly
545 550 555 560

Arg Pro Gln Glu Glu Pro Pro Ala Glu Glu Asp Leu Gln Gln Ile Thr
565 570 575

Val Gln Val Glu Pro Ala Cys Ser Val Glu Ile Val Val Pro Lys Glu
580 585 590

Glu Asp Ala Gly Val Glu Ala Ser Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Val
595 600 605

Glu Val Glu Thr Ala Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Gly Ala Pro Ala
610 615 620

Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Asp Ala Pro Ala Thr Asp Ile Tyr Phe
625 630 635 640

<210> 34
<211> 2724
<212> DNA
<213> 智人

[0015]

<400> 34
ggcgccctc ccttggccgg cggcgttgt tgttcggcgg cggcggctgc agctcgggtc 60
cccctcgggc gccccccggc ccgtccgcgc gcggccatgg agctggaggt accggacgag 120
ggcgagagcg ctgaggcggg ggccgtgccc tcggaggcgg cgtggggcggc agagagcggg 180
ggcgccgagc gtttgctca gaagaaggcg gcccacaagc aggttctgtc catgacggca 240
cagccggccc ctggccatgg gaagaagtgt ggccatcgag gtgtggacgc atccggcgaa 300
accacctaca agaagaccac ctctccacc ctgaagggtg ccatecagct gggcatcggc 360
tacaccctgg gccacctgag ctccaagccc gaacgcgacg tgcctatgca ggacttctac 420
gtggtgaga gcattctctt ccccagcgaa ggcagcaacc tcaccccgc ccaccacttc 480
caggacttcc gcttcaagac ctatgcacct gtcgcttcc gctacttccg ggagctcttt 540
gggatccggc cagatgatta ctgtactcc ctgtcaatg agccgctgat cgagctgtcc 600
aacccggcgg ccagtggctc cctctttcac gtcaccagcg acgacgagtt catcatcaag 660
accgtcatgc acaaggagcg cgagttcctg cagaagctgc tccctggcta ctacatgaac 720
ctcaaccaga acccgggac gctgctgccc aagtctatg ggctgtactg cgtgcagtcg 780
gggggcaaga acatcccgct cgtggctatg aacaacatcc tgcccccgct ggtcaagatg 840
cacctcaagt tcgacctcaa gggctccacc tacaagcggc gcgccagcaa gaaggagaag 900
gagaagagct tccccacta caaggacctg gacttcatgc aggacatgcc cgaggggctc 960
ctgctggacg ccgacacctt cagcgccttg gtaagacgc tgcagcggga ctgcctggtc 1020
ctgaaagtt tcaagatcat ggactacagc ctgctgtggc gcgtgcacaa catcgaccag 1080
cagcagcggc agcggcagcg gcagggcggc cagagcactc cagatgagaa gcgcctgtg 1140
ggccagaagg cgctctaetc cagggccatg gactccatcc aggtggcgc cgcgcgggg 1200
gaggccatcg aatcggatga cagatgggc gggatccccg ctgtgaacgg ccggggggag 1260
cggctgtcgc tgcacattgg catcatcgac atcctgcagt cctacaggtt catcaagaaa 1320
ctggagcaca cctggaagcg cctcgtccac gatggggaca cgggtgtccg ccaccgcccc 1380
agcttctatg ccgagcgtt ttccaagttc atgagcaaca cgggttttcg gaagaactcc 1440
tcctgaagt cctgcacctc caagaagggg cgcggcggag ccttgctagc tgtgaaaccg 1500

```

ctggggccca ccgctgcctt ctgcccagc cagatcccta gcgagcggga ggaggcccag 1560
tacgacctgc ggggggcccc cagctacccc acgtggagg acgaaggccg gcccgacctc 1620
ctgccctgca cgcacccttc tttcgaagaa gccactacag cctccattgc cagactctg 1680
tcattccaat cctcttccat tcctgagcgg tcccctcgg agacgtcggg gcagcccgcg 1740
tacagccgc aggaggagcc acccgcggaa gaggatctgc agcagattac agtcagctg 1800
gagcctcgt gcagcgtgga gattgtggtc cccaagagg aggacgcagg ggtggagct 1860
tccccgcggt gtccctctgc tgctgtgaa gtagaaactg ccagccaggc ctcagacgag 1920
gagggcgcac ctgccagcca gcctcggac gaggaggacg cgcgccac cgacatctac 1980
tttttcacgg atgggagga ctggatttac tctccccgc atgccgactc ggggctgtg 2040
acgtgagcgc cctcgggac tgtaagtgc cgcagccgc caccctggg agaagggca 2100
gtgccctcg ggcagcagg agccgcaggt ccccgccgg aagctcagtg tctgactca 2160
gtgttttcc agaaggcctt tgggtaaatc acggtgcaa ttaggtcag ccacgtggtc 2220
ccggaccag gcgctgggt gcattgcgta ctgggaatgt cattcggtcc cagtcgaac 2280
cggcgctcc atagggcagc accatcacca ggtgcacagc tgaggcccag ggtctgttc 2340
ggacccccgc cagaccagc cgacccttc tctgccctg gaccagccc tctctgtca 2400
gggtgtctg ggtggagct tctcactct gcagacctgg ctccccgtg ccccctggc 2460
tgcacaggg aggttcaca ggtcagcaga gtgctgcag ggccggctc tgaaccgag 2520
ggccatgag acggggagga gatgtctct ccacaccac ctacagatg gaggcgtga 2580
ggcctggct cccctggag cctggagac cacacggtt agtcaaatc cagatccca 2640
agcttcaag gagtcccc tggagcaca catggcccc acgtagctgt gagatctca 2700
ggcctgctg ttgtcattat gacc 2724

```

```

<210> 35
<211> 696
<212> PRT
<213> 智人
<400> 35

```

[0016]

```

Met Glu Leu Glu Val Pro Asp Glu Ala Glu Ser Ala Glu Ala Gly Ala 1 5 10 15
Val Pro Ser Glu Ala Ala Trp Ala Ala Glu Ser Gly Ala Ala Ala Gly 20 25 30
Leu Ala Gln Lys Lys Ala Ala Pro Thr Glu Val Leu Ser Met Thr Ala 35 40 45
Gln Pro Gly Pro Gly His Gly Lys Lys Leu Gly His Arg Gly Val Asp 50 55 60
Ala Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Lys Lys Thr Thr Ser Ser Thr Leu Lys 65 70 75 80
Gly Ala Ile Gln Leu Gly Ile Gly Tyr Thr Val Gly His Leu Ser Ser 85 90 95
Lys Pro Glu Arg Asp Val Leu Met Gln Asp Phe Tyr Val Val Glu Ser 100 105 110
Ile Phe Phe Pro Ser Glu Gly Ser Asn Leu Thr Pro Ala His His Phe 115 120 125
Gln Asp Phe Arg Phe Lys Thr Tyr Ala Pro Val Ala Phe Arg Tyr Phe 130 135 140
Arg Glu Leu Phe Gly Ile Arg Pro Asp Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Cys 145 150 155 160
Asn Glu Pro Leu Ile Glu Leu Ser Asn Pro Gly Ala Ser Gly Ser Leu 165 170 175
Phe Tyr Val Thr Ser Asp Asp Glu Phe Ile Ile Lys Thr Val Met His 180 185 190
Lys Glu Ala Glu Phe Leu Gln Lys Leu Leu Pro Gly Tyr Tyr Met Asn 195 200 205
Leu Asn Gln Asn Pro Arg Thr Leu Leu Pro Lys Phe Tyr Gly Leu Tyr 210 215 220

```

Cys Val Gln Ser Gly Gly Lys Asn Ile Arg Val Val Val Met Asn Asn
 225 230 235 240

Ile Leu Pro Arg Val Val Lys Met His Leu Lys Phe Asp Leu Lys Gly
 245 250 255

Ser Thr Tyr Lys Arg Arg Ala Ser Lys Lys Glu Lys Glu Lys Ser Phe
 260 265 270

Pro Thr Tyr Lys Asp Leu Asp Phe Met Gln Asp Met Pro Glu Gly Leu
 275 280 285

Leu Leu Asp Ala Asp Thr Phe Ser Ala Leu Val Lys Thr Leu Gln Arg
 290 295 300

Asp Cys Leu Val Leu Glu Ser Phe Lys Ile Met Asp Tyr Ser Leu Leu
 305 310 315 320

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

Gly Ala Gln Ser Thr Ser Asp Glu Lys Arg Pro Val Gly Gln Lys Ala
 340 345 350

Leu Tyr Ser Thr Ala Met Glu Ser Ile Gln Gly Gly Ala Ala Arg Gly
 355 360 365

Glu Ala Ile Glu Ser Asp Asp Thr Met Gly Gly Ile Pro Ala Val Asn
 370 375 380

Gly Arg Gly Glu Arg Leu Leu Leu His Ile Gly Ile Ile Asp Ile Leu
 385 390 395 400

Gln Ser Tyr Arg Phe Ile Lys Lys Leu Glu His Thr Trp Lys Ala Leu
 405 410 415

Val His Asp Gly Asp Thr Val Ser Val His Arg Pro Ser Phe Tyr Ala
 420 425 430

Glu Arg Phe Phe Lys Phe Met Ser Asn Thr Val Phe Arg Lys Asn Ser
 435 440 445

Ser Leu Lys Ser Ser Pro Ser Lys Lys Gly Arg Gly Gly Ala Leu Leu
 450 455 460

Ala Val Lys Pro Leu Gly Pro Thr Ala Ala Phe Ser Ala Ser Gln Ile
 465 470 475 480

Pro Ser Glu Arg Glu Glu Ala Gln Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Arg Ser
 485 490 495

Tyr Pro Thr Leu Glu Asp Glu Gly Arg Pro Asp Leu Leu Pro Cys Thr
 500 505 510

Pro Pro Ser Phe Glu Glu Ala Thr Thr Ala Ser Ile Ala Thr Thr Leu
 515 520 525

Ser Ser Thr Ser Leu Ser Ile Pro Glu Arg Ser Pro Ser Glu Thr Ser
 530 535 540

Glu Gln Pro Arg Tyr Arg Pro Gln Glu Glu Pro Pro Ala Glu Glu Asp
 545 550 555 560

Leu Gln Gln Ile Thr Val Gln Val Glu Pro Ala Cys Ser Val Glu Ile
 565 570 575

Val Val Pro Lys Glu Glu Asp Ala Gly Val Glu Ala Ser Pro Ala Gly
 580 585 590

Ala Ser Ala Ala Val Glu Val Glu Thr Ala Ser Gln Ala Ser Asp Glu
 595 600 605

Glu Gly Ala Pro Ala Ser Gln Ala Ser Asp Glu Glu Asp Ala Pro Ala
 610 615 620

Thr Asp Ile Tyr Phe Phe Thr Asp Gly Arg Tyr Trp Ile Tyr Ser Pro
 625 630 635 640

[0017]

Arg His Arg Arg Leu Arg Ala Val Thr Leu Ser Ala Ser Gly Thr Val
645 650 655

Ser Asp Arg Ser Arg Pro Pro Trp Gly Glu Gly Ala Val Pro Leu Gly
660 665 670

Gln Gln Gly Ala Ala Gly Pro Arg Pro Glu Ala Gln Cys Leu Thr Ser
675 680 685

Val Val Phe Gln Lys Gly Phe Gly
690 695

<210> 36
<211> 5624
<212> DNA
<213> 智人

<400> 36
agtccagtcgg ggagcaagag ccccgcgcgc agccggcgcg ggctcggtea tcggcgcgcg 60
gcccccggg gctgggcttg gggctgcctg tggagagcgc gcggcggaa cgcgcgcgcg 120
cacggccacg gccaccgcca cggccacggc cggcagctcg ggtcccggg cccgggcagg 180
ggaaggggag agcggcgag ctcagcaacc ggaaccgagg gaagatttg gctccgcggg 240
ctcgcctcc gctccctctg ccagcgcgcg cagacgcga gtgggcccag ggacagggga 300
ggaggaccga ggaccctgtg cccgcgcccc tggagccgct ggagttcgga cttctgcaac 360
tgttggcact ttgggggett ggcttagcgc tctgctgttt acccgtctct cctcgtgccc 420
tggaaaccaa agctcccggc cccctccgcc ctgcgcgcgc caccaccgc cggcggggag 480
cggcccggcc cgcactcagc accatgaggg gacttgggac ttgcctggcg actttggccc 540
gacttttgct aactgcggcg ggcgagacgt tctcagtggt ctgcctcttt gatgagcct 600
atagcacatg tggatatagt caatctgaag gtgatgactt caattgggag caagtgaaca 660
ccttgactaa accgactctt gatccatgga tggcatcagg ttcttctatg ctggtgaatg 720
cctctgggag acctgagggg cagagagccc acctgctctt accccaactt aaagaaaatg 780
acaccactg catcgatttt cactattttg tctccagcaa gactaattct cctccggggt 840
tactcaatgt ctacgtgaag gtaataaac ggccactggg gaatcctatc tggaaatat 900
ctggagacc aacacgtaca tggaaacagg cagaactggc cattagtact ttctggccta 960
acttttatca ggtgattttt gaagtataa cttctggaca tcaaggctat ctgcctatcg 1020
atgagtgaa ggtgttagga catccatgta ccagactcc tcacttctct cggattcaga 1080
atgiggaagt taatgctggc cagtttgcta cctccagtg cagtgccatc ggcaggaccg 1140
tggcaggaga cagctctgg ttacagggca ttgatgtgc agatgctcct ctgaaggaaa 1200
tcaagtgac cagctcccga cgttctattg cttcatttaa tgttgtgaat accaccaaac 1260
gagatctgg aaagtaccgc tgcattgatc gactgaagg aggtgttga atatcaaac 1320
atgcagagtt ggtagtataa gaaccaccgc ttctatttgc cccacctcag ctgcctctg 1380
taggagccac ctaccttgg atacagctca acgccaactc catcaatggg gatggccca 1440
ttgtggccc agaggtggag tactgcacgg ccagtgggag ctggaatgac cggcagccag 1500
tcgattccac gagctataaa attggacacc ttgaccaga tacagaata gagattagt 1560
tgcctctgac cagccagggg gaggtggca ctggctctcc tggctcagct ctgaggacaa 1620
gaacaagtgt tctgatccc atgcgagccc caaaaaact agaagtagtg gagtcaaat 1680
ctcgcaaat cactatccgc tgggagccat ttggatataa tgtaactcgt tgccacagt 1740
ataatctcac tgtccactac tgttaccagg ttggaggaca agaacaagtg cgagaagaag 1800
taagctggga tacagaaaac tcacaccctc aacacacgat cactaacctg tcaccataca 1860
ccaatgtcag tgtgaaactg atctctatga acccagaggg ccggaaggaa agccaagaac 1920
tcatagtca gacagatgaa gacctcccag gtgctgttcc cactgaatcc atacaaggaa 1980
gtaccttga agagaagata tttcttcagt ggagagaacc aactcaaca tatggtgtaa 2040
tcactttata tgagatcacc tacaagcag tcagtctctt tgaccagaa atagatttat 2100
ccaatcagag tggaaagatt tcaaagctgg gaaatgaaac ccattttctg tttttggac 2160
tgtatccggg gaccacatac tcctttacca tccgagctag cacagctaac ggttttgggc 2220
ctccagcaac aaaccagttc accaccaaaa taccagcacc ctctatgcca gtttatgaac 2280
ttgagacacc tttgaatcaa actgacaata ccgtgacagt catgctgaaa cctgccacaa 2340
gcagaggagc acctgtcagt gtctatcaaa tagttgttga ggaagaact cctcgaagaa 2400
ctaaaaagac gacagaatc ttaaagtgtc acccagtgcc aattcacttc cagaatgctt 2460

[0018]

[0019]

ctctgctgaa ctcacagtac tactttgctg cagaatttcc tgcagacagc ctccaagctg	2520
cgcagccttt tacaattggt gataataaga catataatgg atactggaac actccccttc	2580
tcccataaa aagctacaga atttatttcc aagctgctag tagagccaat ggggaacca	2640
aaatagactg tgcacaagt gccacaaaag gagctgccac tccgaaacca gtcccagaac	2700
ccgagaaca gacagaccat acagttaaaa ttgctggagt catcgccggc atcttctgt	2760
tcgtgattat atttcttggg gttgtgtgg taatgaaga aaggaaactg gccagaagc	2820
ggaaagagac catgagcagc acccgacagg agatgactgt gatggtgac tcaatggaca	2880
agagctatgc tgagcagggc acaactcgc acgagcttt ctattcatg gacacgaca	2940
atctgaatgg gagatctgtg tcttaccat cgtccttcac aatgaaaaca aatacactga	3000
gcacatcggc gctaatcc tattaccag acccattgt gccactgca attttagtgc	3060
caataaatga tgaaccacc acaatggcca gcgataccag cagcctggcg cagtcaccata	3120
cttacaagaa gcgagagccg gccgacgtgc cctatcagac tggcagctc caccgcgcca	3180
tccgggtggc agacctcctt cagcacatca cacagatgaa gtgtcggag ggctacggct	3240
tcaaggagga atacgagagc ttctttgaag ggcagctgc accatggac tcggctaaga	3300
aagatgagaa cagaatgaag aacagatagc ggaatatcat tgcatacagc catcccgag	3360
tgaggtgca gacaatagaa ggagacacaa actcagacta tatcaatggc aatataatcg	3420
atggttatca tcgaccaat cattacatg ctaccaagg gccaatgcag gaaaccatct	3480
atgactctg gaggatggtg tggcacgaaa acactgcaag tatcatcatg gtgaccaatc	3540
ttgtggaagt gggagggtc aaatgctgca aatactggcc agatgacaca gagatata	3600
aagacattaa agttacccta atagaacag aactactgac agaatatgt ataagaacat	3660
ttgctgttga aaagagaggt gtgcatgaaa tccgagagat cagacagitt cacttcactg	3720
gctggccgga tcattgggtc cctaccatg ccaccggct gctgggattc gtgcccag	3780
tcaagtcmaa gagcccgcc agtgcaggcc cactggtgtg gcactgcagt gctgtgcag	3840
ggaggactgg ctgtttcatc gtcattgata tcattgttga catggccgaa agggaagggg	3900
tcgtagacat ctacaactgc gtcaggagc tgcggtcag gagggtgac atggtgcaa	3960
cagaggagca gtatgtgttt atccacgat cgtacctgga agcctgtctt tgtgggaca	4020
ctctgtgcc tgcctccaa gttagttctc tgtattatga catgaacaaa ctgattccac	4080
agacaaactc aagccagatt aaagaggaat tccggacgtc aaacatggtg acaccaacgc	4140
tgcgagtaga ggactgcagc atcgactgt tgcctggaa ccatgagaaa aaccgtgca	4200
tggacatcct gccccagac cgtgcctgc cttctctcat caccatcagc ggggagagca	4260
gcaactacat caatgctgcc ctcatggaca gctataaaca gccttcagct tttatagtea	4320
cccagatcc tttgcaaac acagtgaag acttttggag actgtcctg gattatact	4380
gcacatccgt agttatgcta aatgatgtgg atcctccca gttgtgtcca cagtactggc	4440
cagaaaacgg agtacacaga cacggcccca tccaggtgga atttgtctc gctgacctgg	4500
aagaggacat catcagcagg atattccgca ttacaatgc cgcagagacc caagatggat	4560
atcggtggt gcagcaatc cagttcctgg gctgcccgat gtacagggac acaccagtgt	4620
ctaagcctc cttcttgaag ctattcggc aggtggacaa gtggcaagag gactacaatg	4680
gsgggaagg ccgacaggt gtgcaactgt tgaacgggg agccgcagc gggacttct	4740
gcgccatcag catcgtatgt gagatgctcc ggcaccagag aaccgtggat gtctttcag	4800
ctgtgaagac actgaggaac aacaagccca acatggtcga cctctggat cagtacaagt	4860
tcgtctacga ggtggccctg gaatacttga atctgctg atggtgtaaa cagctctgca	4920
aacaatccct tcataccac aaagccaaga cgttccatgg tatttgtgca aaagatga	4980
agacttctca atatgcttat ttgctttgc ataattgctc ctttttaaga gcccagaaa	5040
gtgtttctaa aattgcttgc actgccaat cccagtaatg ctgctgctg acagaaacac	5100
acacacagcc acagttgcca aatccctgac tcttgccac cggcttctca gacagcgtg	5160
gacagctggt aaactgaaga gcacaactat atcttatga aggaattgt acccttggg	5220
tattattttg tggcccgtga cctcgttat tgttacagct gagtctatgt tttgttctg	5280
tggagaatgc tatctggcat tatgtaata tattatttta ggtaatattt gtactttaac	5340
atgtgcata atatatgctt atgtagcttt ccaggactaa cagataaatg tgaatgaac	5400
aaagatatgt tgtatgagtc gtcgtttctg tcagatttgt atgtttcca agggaaaagc	5460
tggggggagg actcagttca caaaatgcaa aactcaacga tcagattcac ggaccagag	5520
cttttccatg tgtttatatt gtaaatattt ttgatttcat caaattttt attcattaaa	5580
agaaatttt gtgaagcaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	5624

<210> 37
 <211> 1465
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 37
 Met Arg Gly Leu Gly Thr Cys Leu Ala Thr Leu Ala Gly Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Ala Ala Gly Glu Thr Phe Ser Gly Gly Cys Leu Phe Asp Glu Pro
 20 25 30
 Tyr Ser Thr Cys Gly Tyr Ser Gln Ser Glu Gly Asp Asp Phe Asn Trp
 35 40 45
 Glu Gln Val Asn Thr Leu Thr Lys Pro Thr Ser Asp Pro Trp Met Pro
 50 55 60
 Ser Gly Ser Phe Met Leu Val Asn Ala Ser Gly Arg Pro Glu Gly Gln
 65 70 75 80
 Arg Ala His Leu Leu Leu Pro Gln Leu Lys Glu Asn Asp Thr His Cys
 85 90 95
 Ile Asp Phe His Tyr Phe Val Ser Ser Lys Ser Asn Ser Pro Pro Gly
 100 105 110
 Leu Leu Asn Val Tyr Val Lys Val Asn Asn Gly Pro Leu Gly Asn Pro
 115 120 125
 Ile Trp Asn Ile Ser Gly Asp Pro Thr Arg Thr Trp Asn Arg Ala Glu
 130 135 140
 Leu Ala Ile Ser Thr Phe Trp Pro Asn Phe Tyr Gln Val Ile Phe Glu
 145 150 155 160
 Val Ile Thr Ser Gly His Gln Gly Tyr Leu Ala Ile Asp Glu Val Lys
 165 170 175
 Val Leu Gly His Pro Cys Thr Arg Thr Pro His Phe Leu Arg Ile Gln
 180 185 190
 Asn Val Glu Val Asn Ala Gly Gln Phe Ala Thr Phe Gln Cys Ser Ala
 195 200 205
 Ile Gly Arg Thr Val Ala Gly Asp Arg Leu Trp Leu Gln Gly Ile Asp
 210 215 220
 Val Arg Asp Ala Pro Leu Lys Glu Ile Lys Val Thr Ser Ser Arg Arg
 225 230 235 240
 Phe Ile Ala Ser Phe Asn Val Val Asn Thr Thr Lys Arg Asp Ala Gly
 245 250 255
 Lys Tyr Arg Cys Met Ile Arg Thr Glu Gly Gly Val Gly Ile Ser Asn
 260 265 270
 Tyr Ala Glu Leu Val Val Lys Glu Pro Pro Val Pro Ile Ala Pro Pro
 275 280 285
 Gln Leu Ala Ser Val Gly Ala Thr Tyr Leu Trp Ile Gln Leu Asn Ala
 290 295 300
 Asn Ser Ile Asn Gly Asp Gly Pro Ile Val Ala Arg Glu Val Glu Tyr
 305 310 315 320
 Cys Thr Ala Ser Gly Ser Trp Asn Asp Arg Gln Pro Val Asp Ser Thr
 325 330 335
 Ser Tyr Lys Ile Gly His Leu Asp Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Ser
 340 345 350
 Val Leu Leu Thr Arg Pro Gly Glu Gly Gly Thr Gly Ser Pro Gly Pro
 355 360 365
 Ala Leu Arg Thr Arg Thr Lys Cys Ala Asp Pro Met Arg Gly Pro Arg
 370 375 380

[0020]

[0021]

Lys Leu Glu Val Val Glu Val Lys Ser Arg Gln Ile Thr Ile Arg Trp
 385 390 395 400
 Glu Pro Phe Gly Tyr Asn Val Thr Arg Cys His Ser Tyr Asn Leu Thr
 405 410 415
 Val His Tyr Cys Tyr Gln Val Gly Gly Gln Glu Gln Val Arg Glu Glu
 420 425 430
 Val Ser Trp Asp Thr Glu Asn Ser His Pro Gln His Thr Ile Thr Asn
 435 440 445
 Leu Ser Pro Tyr Thr Asn Val Ser Val Lys Leu Ile Leu Met Asn Pro
 450 455 460
 Glu Gly Arg Lys Glu Ser Gln Glu Leu Ile Val Gln Thr Asp Glu Asp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Ala Val Pro Thr Glu Ser Ile Gln Gly Ser Thr Phe Glu
 485 490 495
 Glu Lys Ile Phe Leu Gln Trp Arg Glu Pro Thr Gln Thr Tyr Gly Val
 500 505 510
 Ile Thr Leu Tyr Glu Ile Thr Tyr Lys Ala Val Ser Ser Phe Asp Pro
 515 520 525
 Glu Ile Asp Leu Ser Asn Gln Ser Gly Arg Val Ser Lys Leu Gly Asn
 530 535 540
 Glu Thr His Phe Leu Phe Phe Gly Leu Tyr Pro Gly Thr Thr Tyr Ser
 545 550 555 560
 Phe Thr Ile Arg Ala Ser Thr Ala Lys Gly Phe Gly Pro Pro Ala Thr
 565 570 575
 Asn Gln Phe Thr Thr Lys Ile Ser Ala Pro Ser Met Pro Ala Tyr Glu
 580 585 590
 Leu Glu Thr Pro Leu Asn Gln Thr Asp Asn Thr Val Thr Val Met Leu
 595 600 605
 Lys Pro Ala His Ser Arg Gly Ala Pro Val Ser Val Tyr Gln Ile Val
 610 615 620
 Val Glu Glu Glu Arg Pro Arg Arg Thr Lys Lys Thr Thr Glu Ile Leu
 625 630 635 640
 Lys Cys Tyr Pro Val Pro Ile His Phe Gln Asn Ala Ser Leu Leu Asn
 645 650 655
 Ser Gln Tyr Tyr Phe Ala Ala Glu Phe Pro Ala Asp Ser Leu Gln Ala
 660 665 670
 Ala Gln Pro Phe Thr Ile Gly Asp Asn Lys Thr Tyr Asn Gly Tyr Trp
 675 680 685
 Asn Thr Pro Leu Leu Pro Tyr Lys Ser Tyr Arg Ile Tyr Phe Gln Ala
 690 695 700
 Ala Ser Arg Ala Asn Gly Glu Thr Lys Ile Asp Cys Val Gln Val Ala
 705 710 715 720
 Thr Lys Gly Ala Ala Thr Pro Lys Pro Val Pro Glu Pro Glu Lys Gln
 725 730 735
 Thr Asp His Thr Val Lys Ile Ala Gly Val Ile Ala Gly Ile Leu Leu
 740 745 750
 Phe Val Ile Ile Phe Leu Gly Val Val Leu Val Met Lys Lys Arg Lys
 755 760 765
 Leu Ala Lys Lys Arg Lys Glu Thr Met Ser Ser Thr Arg Gln Glu Met
 770 775 780
 Thr Val Met Val Asn Ser Met Asp Lys Ser Tyr Ala Glu Gln Gly Thr
 785 790 795 800
 Asn Cys Asp Glu Ala Phe Ser Phe Met Asp Thr His Asn Leu Asn Gly

	805	810	815
Arg Ser Val Ser Ser Pro Ser Ser Phe Thr Met Lys Thr Asn Thr Leu	820	825	830
Ser Thr Ser Val Pro Asn Ser Tyr Tyr Pro Asp Pro Phe Val Pro Thr	835	840	845
Ala Ile Leu Val Pro Ile Asn Asp Glu Thr His Thr Met Ala Ser Asp	850	855	860
Thr Ser Ser Leu Val Gln Ser His Thr Tyr Lys Lys Arg Glu Pro Ala	865	870	875
Asp Val Pro Tyr Gln Thr Gly Gln Leu His Pro Ala Ile Arg Val Ala	885	890	895
Asp Leu Leu Gln His Ile Thr Gln Met Lys Cys Ala Glu Gly Tyr Gly	900	905	910
Phe Lys Glu Glu Tyr Glu Ser Phe Phe Glu Gly Gln Ser Ala Pro Trp	915	920	925
Asp Ser Ala Lys Lys Asp Glu Asn Arg Met Lys Asn Arg Tyr Gly Asn	930	935	940
Ile Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Arg Leu Gln Thr Ile Glu Gly	945	950	955
Asp Thr Asn Ser Asp Tyr Ile Asn Gly Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr His	965	970	975
Arg Pro Asn His Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Met Gln Glu Thr Ile	980	985	990
Tyr Asp Phe Trp Arg Met Val Trp His Glu Asn Thr Ala Ser Ile Ile	995	1000	1005
Met Val Thr Asn Leu Val Glu Val Gly Arg Val Lys Cys Cys Lys	1010	1015	1020
Tyr Trp Pro Asp Asp Thr Glu Ile Tyr Lys Asp Ile Lys Val Thr	1025	1030	1035
Leu Ile Glu Thr Glu Leu Leu Ala Glu Tyr Val Ile Arg Thr Phe	1040	1045	1050
Ala Val Glu Lys Arg Gly Val His Glu Ile Arg Glu Ile Arg Gln	1055	1060	1065
Phe His Phe Thr Gly Trp Pro Asp His Gly Val Pro Tyr His Ala	1070	1075	1080
Thr Gly Leu Leu Gly Phe Val Arg Gln Val Lys Ser Lys Ser Pro	1085	1090	1095
Pro Ser Ala Gly Pro Leu Val Val His Cys Ser Ala Gly Ala Gly	1100	1105	1110
Arg Thr Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ile Met Leu Asp Met Ala	1115	1120	1125
Glu Arg Glu Gly Val Val Asp Ile Tyr Asn Cys Val Arg Glu Leu	1130	1135	1140
Arg Ser Arg Arg Val Asn Met Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr Val	1145	1150	1155
Phe Ile His Asp Ala Ile Leu Glu Ala Cys Leu Cys Gly Asp Thr	1160	1165	1170
Ser Val Pro Ala Ser Gln Val Arg Ser Leu Tyr Tyr Asp Met Asn	1175	1180	1185
Lys Leu Asp Pro Gln Thr Asn Ser Ser Gln Ile Lys Glu Glu Phe	1190	1195	1200
Arg Thr Leu Asn Met Val Thr Pro Thr Leu Arg Val Glu Asp Cys	1205	1210	1215

[0022]

Ser Ile Ala Leu Leu Pro Arg Asn His Glu Lys Asn Arg Cys Met
1220 1225 1230

Asp Ile Leu Pro Pro Asp Arg Cys Leu Pro Phe Leu Ile Thr Ile
1235 1240 1245

Asp Gly Glu Ser Ser Asn Tyr Ile Asn Ala Ala Leu Met Asp Ser
1250 1255 1260

Tyr Lys Gln Pro Ser Ala Phe Ile Val Thr Gln His Pro Leu Pro
1265 1270 1275

Asn Thr Val Lys Asp Phe Trp Arg Leu Val Leu Asp Tyr His Cys
1280 1285 1290

Thr Ser Val Val Met Leu Asn Asp Val Asp Pro Ala Gln Leu Cys
1295 1300 1305

Pro Gln Tyr Trp Pro Glu Asn Gly Val His Arg His Gly Pro Ile
1310 1315 1320

Gln Val Glu Phe Val Ser Ala Asp Leu Glu Glu Asp Ile Ile Ser
1325 1330 1335

Arg Ile Phe Arg Ile Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Gln Asp Gly Tyr
1340 1345 1350

Arg Met Val Gln Gln Phe Gln Phe Leu Gly Trp Pro Met Tyr Arg
1355 1360 1365

Asp Thr Pro Val Ser Lys Arg Ser Phe Leu Lys Leu Ile Arg Gln
1370 1375 1380

Val Asp Lys Trp Gln Glu Glu Tyr Asn Gly Gly Glu Gly Arg Thr
1385 1390 1395

Val Val His Cys Leu Asn Gly Gly Gly Arg Ser Gly Thr Phe Cys
1400 1405 1410

Ala Ile Ser Ile Val Cys Glu Met Leu Arg His Gln Arg Thr Val
1415 1420 1425

Asp Val Phe His Ala Val Lys Thr Leu Arg Asn Asn Lys Pro Asn
1430 1435 1440

Met Val Asp Leu Leu Asp Gln Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Val Ala
1445 1450 1455

Leu Glu Tyr Leu Asn Ser Gly
1460 1465

[0023]

<210> 38
 <211> 5585
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 38
 agtcagtcgg ggagcaagag ccccgcgcg agccggcgcg gctcggtea tcggcgcgcc 60
 gccgccccgg gctgggcttg gggctgcctg tggagagcg cggggcgaa cgcgcgggc 120
 caggccaag gccaccgcca cgccacggc cggcagctc ggtcccggg cccgggcagg 180
 ggaagggag aggcggcgag ctacgcaacc ggaaccgag gaagatttg gctccgagg 240
 ctgcctcc gctccctctg ccagcggcg cagacccga gtggggccag gacagggga 300
 ggaggacca ggaccctgtg cccgcgccc tggagccgt ggagtctgga cttctgcaac 360
 tgttgcaact ttggggcctt ggcttagcgc tctgctgtt accgctctct cctcgtgcc 420
 tcggaaccaa agctcccgcc cccctccgcc ctgcgcgcc caccaccgc cgcggggag 480
 cgcgccgcc cgcactcagc accatgagg gacttggac ttgcctggcg actttggccg 540
 gacttttct aactgcggcg ggcgagact tctcagttg ctgcctcttt gatgagcct 600
 atagcacatg tggatatagt caatctgaag gtgatgactt caattgggag caagtgaaca 660
 ccttgactaa accgactctt gatccatgga tggcatcagg ttctttcatg ctggtaagt 720
 cctctggag acctgagggg cagagagccc acctgctctt accccaactt aaagaaaatg 780
 acaccactg catgatttt cactattttg tgtccagcaa gagtaattct cctccggggt 840
 tactcaatgt ctacgtgaag gtcaataacg ggccactggg gaatcctatc tggaaatat 900

[0024]

ctggagacc	aacacgtaca	tggaacagg	cagaactgc	cattagtact	tctggccta	960
acttttaca	ggtgatttt	gaagtataa	ctctggaca	tcaaggctat	ctcgtatcg	1020
atgagtgaa	ggtgttaga	catccatga	ccaggactcc	tcacttctg	cggtatcaga	1080
atgtggaag	taatgctgg	cagtttgta	cctccagtg	cagtccatc	ggcaggaccg	1140
tggcaggaga	cagctctgg	ttacaggca	ttgatgtgc	agatgctct	ctgaaggaaa	1200
tcaagtgac	cagctcccga	cgcttcattg	cttcatttaa	tgttgtgaat	accaccaaac	1260
gagatcctg	aaagtaccg	tgcatgattc	gcactgaag	aggtgttga	atatcaaac	1320
atgcagagtt	ggtagttaa	gaaccaccg	ttcctattgc	cccacctcag	ctcgcctctg	1380
taggagccac	ctacctgtg	atacagctca	acgccaactc	catcaatggg	gatgggccc	1440
ttgtggccc	agagggtgg	tactgcacg	ccagtgggag	ctggaatgac	cgccagccag	1500
tcatctccac	gagctataa	atggacacc	ttgaccaga	tacagaatat	gagattagt	1560
tgcctctgac	caggccagg	gagggtgca	ctgctctcc	tggtccagct	ctcaggacaa	1620
gaacaagtg	tgtgatccc	atgcgagcc	caagaaaact	agaagtagtg	gaggtcaaat	1680
ctcggcaaat	cactatccg	tggagccat	ttgatataa	tgtaactcgt	tgccacagtt	1740
ataatctcac	tgctcactac	tgttaccag	ttgaggaca	agaacaagt	cgagaagaag	1800
taagctgga	tacagaaaac	tcacaccctc	aacacacgat	cactaacctg	tcaccataca	1860
ccaatgtcag	tgtgaaactg	atcctcatga	accagaggg	ccggaaggaa	agccaagaac	1920
tcatagtca	gacagatgaa	gacctcccag	gtgctgttcc	cactgaatcc	atacaaggaa	1980
gtaccttga	agagaagata	ttcttctcagt	ggagagaacc	aactcaaac	tatggtgtaa	2040
tcactttata	tgagatcacc	tacaagcag	tcagtctctt	tgaccagaa	atagatttat	2100
ccaatcagag	tggaagagtt	tcaagctgg	gaaatgaaac	ccattttctg	tttttggac	2160
tgtatccggg	gaccacatac	tcctttacca	tccagctag	cacagctaac	ggttttggc	2220
ctccagcaac	aaaccagttc	accaccaaaa	tatcagacc	ctctatgcca	gcttatgac	2280
ttgagacc	tttgaatcaa	actgacaata	ccgtgacagt	catgctgaaa	ctgcccaca	2340
gcagagagc	acctgtcagt	gtctatcaaa	tagttgtga	ggaagaact	ctcgaagaa	2400
ctaaaaagac	gacagaaatc	ttaaagtct	accagtgcc	aattcacttc	cagaatgctt	2460
ctctgtgaa	ctcacagtac	tactttgctg	cagaatttcc	tgccagacgc	ctccaagctg	2520
cgagccttt	tacaattggt	gataataaga	catataatgg	atactggaac	actccccctc	2580
tcctctataa	aagctacaga	atttatctcc	aagctgctag	tagagccaat	gggaaacca	2640
aaatagactg	tgtccaagt	gccacaaaag	gagctgccac	tccgaaacca	gtcccagaac	2700
ccgagaaca	gacagccat	acagttaaaa	ttgctggagt	catcgccggc	atcttctgt	2760
tgtgattat	atttcttgg	gtgtgttgg	taatgaaga	aaggaaactg	gccaagaagc	2820
ggaagagac	catgagcagc	accgacag	agatgactgt	gatggtgac	tcaatggaca	2880
agactatgc	tgagcagggc	acaaactgcg	acgagcttt	ctcattcatg	gacacgcaca	2940
atctgaatg	gagatctgtg	tcttaccat	ctctcttcc	aatgaaaca	aataactga	3000
gcacatcgtg	gcctaatcc	tattaccag	atgaaacca	cacaatggcc	agcgatacca	3060
gcagcctggt	gcagtcccat	acttacaaga	agcgagagcc	ggccgacgtg	ccctatcaga	3120
ctgggcagct	ccaccgcc	atccgggtgg	cagacctct	tcagcacatc	acacagatga	3180
agtgtcgga	gggctacggc	ttcaaggagg	aatacagag	cttctttgaa	ggcagctctg	3240
caccatgga	ctcggctaag	aaagatgaga	acagaatgaa	gaacagatac	gggaatatca	3300
ttgcataca	tcattcccga	gtgaggtgc	agacaataga	aggagacaca	aactcagact	3360
atatcaatgg	caattatatac	gatggtatc	atcgaccaa	tcattacatt	gctaccaag	3420
ggccaatgca	ggaaccatc	tatgacttct	ggagatggt	gtgacacgaa	aacactgcaa	3480
gtatcatcat	ggtgaccaat	cttgtggaag	tgggaagggt	caaatgctgc	aaatactggc	3540
cagatgacac	agagatata	aaagacatta	aagttaccct	aatagaaca	gaactactgg	3600
cagaatagt	gataagaaca	tttctgtgtg	aaaagagagg	tgtgcatgaa	atccgagaga	3660
tcagacagtt	tcacttctact	ggctggccgg	atcatggggt	ccctaccat	gccaccggcc	3720
tgtcgggatt	ctgtcggcaa	gtcaagtcca	agagcccgcc	cagtgcagcc	ccactggtgg	3780
tgactgcag	tgtcgtgca	gggagactg	gctgtttcat	cgctattgat	atcatgttgg	3840
acatggccga	aagggaagg	gtcgtagaca	tctacaactg	cgctcaggag	ctcggctcac	3900
ggagggtgaa	catggtgcaa	acagaggagc	agtatgtgt	tatccacgat	gcgatcctgg	3960
aagcctgtct	tttggggac	acctctgtgc	ctgcttccca	agttaggtct	ctgtattatg	4020

```

acatgaacaa acigggatcca cagacaaact caagccagat taaagaggaa ttccggacgc 4080
taaacatggt gacaccaacg ctgcgagtag aggactgcag catcgcactg ttgccccgga 4140
accatgagaa aaaccgggtc atggacatcc tgccccaga ccgctgcctg cccctctca 4200
tcaccatcga tggggagagc agcaactaca tcaatgctgc cctcatggac agctataaac 4260
agccttcagc ttttatagtc acccagcatc ctttgccaaa cacagtgaag gacttttgga 4320
gactggctct ggattatcac tgcacatccg tagttatgct aaatgatgtg gatcctgccc 4380
agttgtgtcc acagtactgg ccagaaaacg gagtacacag acacggcccc atccaggtgg 4440
aattgtctc tctgacctg gaagaggaca tcatcagcag gatattccgc atttacaatg 4500
ccgccagacc ccaagatgga taccggatgg tgcagcaatt ccagtctctg gcttgccga 4560
tgtacaggga cacaccagtg tctaagcctt ccttcttgaa gctcattcgc caggtggaca 4620
agtggcaaga ggagtacaat ggcggggaag gccgcacggt tctgcaactg ttgaacgggg 4680
gaggcccgag tgggacgttc tgcgccatca gcactgtatg tgagatgctc cggcaccaga 4740
gaaccgtgga tctctttcac gctgtgaaga cactgaggaa caacaagccc aacatggtcg 4800
acctctgga tcagtacaag ttctgctacg aggtggccct ggaatacttg aattctggct 4860
gatgggtgaa acagctctgc aaacaatccc ttctatacca caaagccaag acgttccatg 4920
gtatttgtc aaaagagatg aagacttctc aatatgetta ttttgetttg cataattggc 4980
tcttttaag agcccaagaa agtgtttcta aaattgcttg cactgcccga tcccagtaat 5040
gctgctgctt gacagaaaca cacacacagc cacagttgcc aaatcccgtc ctccttgcca 5100
ccgcttctct agagcagcgt agacagctgg taaactgaag agcacaacta tattcttatg 5160
aaggaatttg tacctttggg gtattatttt gtggcccctg accctcgta ttgttacagc 5220
tgagtgtatg tttttgtctt gtggagaatg ctatctggca ttatggtaat atattatttt 5280
aggtaatatt tgtactttaa catgttgcac aatatatgct tatgtagctt tccaggacta 5340
acagataaat gtgtaataaa caaagatatg ttgtatgagt cgtcgtttct gtcagatttg 5400
tatgtttcc aagggaanaag ctgggggag gactcagttc acaaaatgca aaactcaacg 5460
atcagattca cggaccaga gcttttccat gtgtttatat tgtaaatatt tttgatttca 5520
tcaaatatt tattcattaa aagaaatttt tgtgaagcac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5580
aaaaa 5585

```

[0025]

```

<210> 39
<211> 1452
<212> PRT
<213> 智人
<400> 39
Met Arg Gly Leu Gly Thr Cys Leu Ala Thr Leu Ala Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15
Thr Ala Ala Gly Glu Thr Phe Ser Gly Gly Cys Leu Phe Asp Glu Pro
20 25 30
Tyr Ser Thr Cys Gly Tyr Ser Gln Ser Glu Gly Asp Asp Phe Asn Trp
35 40 45
Glu Gln Val Asn Thr Leu Thr Lys Pro Thr Ser Asp Pro Trp Met Pro
50 55 60
Ser Gly Ser Phe Met Leu Val Asn Ala Ser Gly Arg Pro Glu Gly Gln
65 70 75 80
Arg Ala His Leu Leu Leu Pro Gln Leu Lys Glu Asn Asp Thr His Cys
85 90 95
Ile Asp Phe His Tyr Phe Val Ser Ser Lys Ser Asn Ser Pro Pro Gly
100 105 110
Leu Leu Asn Val Tyr Val Lys Val Asn Asn Gly Pro Leu Gly Asn Pro
115 120 125
Ile Trp Asn Ile Ser Gly Asp Pro Thr Arg Thr Trp Asn Arg Ala Glu
130 135 140
Leu Ala Ile Ser Thr Phe Trp Pro Asn Phe Tyr Gln Val Ile Phe Glu
145 150 155 160
Val Ile Thr Ser Gly His Gln Gly Tyr Leu Ala Ile Asp Glu Val Lys
165 170 175

```

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

Asn Val Glu Val Asn Ala Gly Gln Phe Ala Thr Phe Gln Cys Ser Ala
 195 200 205

Ile Gly Arg Thr Val Ala Gly Asp Arg Leu Trp Leu Gln Gly Ile Asp
 210 215 220

Val Arg Asp Ala Pro Leu Lys Glu Ile Lys Val Thr Ser Ser Arg Arg
 225 230 235 240

Phe Ile Ala Ser Phe Asn Val Val Asn Thr Thr Lys Arg Asp Ala Gly
 245 250 255

Lys Tyr Arg Cys Met Ile Arg Thr Glu Gly Gly Val Gly Ile Ser Asn
 260 265 270

Tyr Ala Glu Leu Val Val Lys Glu Pro Pro Val Pro Ile Ala Pro Pro
 275 280 285

Gln Leu Ala Ser Val Gly Ala Thr Tyr Leu Trp Ile Gln Leu Asn Ala
 290 295 300

Asn Ser Ile Asn Gly Asp Gly Pro Ile Val Ala Arg Glu Val Glu Tyr
 305 310 315 320

Cys Thr Ala Ser Gly Ser Trp Asn Asp Arg Gln Pro Val Asp Ser Thr
 325 330 335

Ser Tyr Lys Ile Gly His Leu Asp Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Ser
 340 345 350

Val Leu Leu Thr Arg Pro Gly Glu Gly Thr Gly Ser Pro Gly Pro
 355 360 365

Ala Leu Arg Thr Arg Thr Lys Cys Ala Asp Pro Met Arg Gly Pro Arg
 370 375 380

Lys Leu Glu Val Val Glu Val Lys Ser Arg Gln Ile Thr Ile Arg Trp
 385 390 395 400

Glu Pro Phe Gly Tyr Asn Val Thr Arg Cys His Ser Tyr Asn Leu Thr
 405 410 415

Val His Tyr Cys Tyr Gln Val Gly Gly Gln Glu Gln Val Arg Glu Glu
 420 425 430

Val Ser Trp Asp Thr Glu Asn Ser His Pro Gln His Thr Ile Thr Asn
 435 440 445

Leu Ser Pro Tyr Thr Asn Val Ser Val Lys Leu Ile Leu Met Asn Pro
 450 455 460

Glu Gly Arg Lys Glu Ser Gln Glu Leu Ile Val Gln Thr Asp Glu Asp
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Ala Val Pro Thr Glu Ser Ile Gln Gly Ser Thr Phe Glu
 485 490 495

Glu Lys Ile Phe Leu Gln Trp Arg Glu Pro Thr Gln Thr Tyr Gly Val
 500 505 510

Ile Thr Leu Tyr Glu Ile Thr Tyr Lys Ala Val Ser Ser Phe Asp Pro
 515 520 525

Glu Ile Asp Leu Ser Asn Gln Ser Gly Arg Val Ser Lys Leu Gly Asn
 530 535 540

Glu Thr His Phe Leu Phe Phe Gly Leu Tyr Pro Gly Thr Thr Tyr Ser
 545 550 555 560

Phe Thr Ile Arg Ala Ser Thr Ala Lys Gly Phe Gly Pro Pro Ala Thr
 565 570 575

Asn Gln Phe Thr Thr Lys Ile Ser Ala Pro Ser Met Pro Ala Tyr Glu
 580 585 590

[0026]

[0027]

Leu Glu Thr Pro Leu Asn Gln Thr Asp Asn Thr Val Thr Val Met Leu
 595 600 605
 Lys Pro Ala His Ser Arg Gly Ala Pro Val Ser Val Tyr Gln Ile Val
 610 615 620
 Val Glu Glu Glu Arg Pro Arg Arg Thr Lys Lys Thr Thr Glu Ile Leu
 625 630 635 640
 Lys Cys Tyr Pro Val Pro Ile His Phe Gln Asn Ala Ser Leu Leu Asn
 645 650 655
 Ser Gln Tyr Tyr Phe Ala Ala Glu Phe Pro Ala Asp Ser Leu Gln Ala
 660 665 670
 Ala Gln Pro Phe Thr Ile Gly Asp Asn Lys Thr Tyr Asn Gly Tyr Trp
 675 680 685
 Asn Thr Pro Leu Leu Pro Tyr Lys Ser Tyr Arg Ile Tyr Phe Gln Ala
 690 695 700
 Ala Ser Arg Ala Asn Gly Glu Thr Lys Ile Asp Cys Val Gln Val Ala
 705 710 715 720
 Thr Lys Gly Ala Ala Thr Pro Lys Pro Val Pro Glu Pro Glu Lys Gln
 725 730 735
 Thr Asp His Thr Val Lys Ile Ala Gly Val Ile Ala Gly Ile Leu Leu
 740 745 750
 Phe Val Ile Ile Phe Leu Gly Val Val Leu Val Met Lys Lys Arg Lys
 755 760 765
 Leu Ala Lys Lys Arg Lys Glu Thr Met Ser Ser Thr Arg Gln Glu Met
 770 775 780
 Thr Val Met Val Asn Ser Met Asp Lys Ser Tyr Ala Glu Gln Gly Thr
 785 790 795 800
 Asn Cys Asp Glu Ala Phe Ser Phe Met Asp Thr His Asn Leu Asn Gly
 805 810 815
 Arg Ser Val Ser Ser Pro Ser Ser Phe Thr Met Lys Thr Asn Thr Leu
 820 825 830
 Ser Thr Ser Val Pro Asn Ser Tyr Tyr Pro Asp Glu Thr His Thr Met
 835 840 845
 Ala Ser Asp Thr Ser Ser Leu Val Gln Ser His Thr Tyr Lys Lys Arg
 850 855 860
 Glu Pro Ala Asp Val Pro Tyr Gln Thr Gly Gln Leu His Pro Ala Ile
 865 870 875 880
 Arg Val Ala Asp Leu Leu Gln His Ile Thr Gln Met Lys Cys Ala Glu
 885 890 895
 Gly Tyr Gly Phe Lys Glu Glu Tyr Glu Ser Phe Phe Glu Gly Gln Ser
 900 905 910
 Ala Pro Trp Asp Ser Ala Lys Lys Asp Glu Asn Arg Met Lys Asn Arg
 915 920 925
 Tyr Gly Asn Ile Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Arg Leu Gln Thr
 930 935 940
 Ile Glu Gly Asp Thr Asn Ser Asp Tyr Ile Asn Gly Asn Tyr Ile Asp
 945 950 955 960
 Gly Tyr His Arg Pro Asn His Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Met Gln
 965 970 975
 Glu Thr Ile Tyr Asp Phe Trp Arg Met Val Trp His Glu Asn Thr Ala
 980 985 990
 Ser Ile Ile Met Val Thr Asn Leu Val Glu Val Gly Arg Val Lys Cys
 995 1000 1005
 Cys Lys Tyr Trp Pro Asp Asp Thr Glu Ile Tyr Lys Asp Ile Lys

1010	1015	1020
Val Thr 1025	Leu Ile Glu Thr 1030	Leu Leu Ala Glu Tyr 1035
Thr Phe 1040	Ala Val Glu Lys Arg 1045	Gly Val His Glu Ile 1050
Arg Gln 1055	Phe His Phe Thr 1060	Trp Pro Asp His Gly 1065
His Ala 1070	Thr Gly Leu Leu 1075	Gly Phe Val Arg Gln Val 1080
Ser Pro 1085	Pro Ser Ala Gly 1090	Leu Val Val His Cys 1095
Ala Gly 1100	Arg Thr Gly Cys 1105	Phe Ile Val Ile Asp Ile 1110
Met Ala 1115	Glu Arg Glu Gly 1120	Val Val Asp Ile Tyr Asn 1125
Glu Leu 1130	Arg Ser Arg Arg 1135	Val Asn Met Val Gln Thr 1140
Tyr Val 1145	Phe Ile His Asp 1150	Ala Ile Leu Glu Ala Cys 1155
Asp Thr 1160	Ser Val Pro Ala 1165	Ser Gln Val Arg Ser Leu 1170
Met Asn 1175	Lys Leu Asp Pro 1180	Gln Thr Asn Ser Ser Gln 1185
Glu Phe 1190	Arg Thr Leu Asn 1195	Met Val Thr Pro Thr Leu 1200
[0028] Asp Cys 1205	Ser Ile Ala Leu Leu 1210	Pro Arg Asn His Glu 1215
Cys Met 1220	Asp Ile Leu Pro 1225	Pro Asp Arg Cys Leu Pro 1230
Thr Ile 1235	Asp Gly Glu Ser 1240	Ser Asn Tyr Ile Asn Ala 1245
Asp Ser 1250	Tyr Lys Gln Pro 1255	Ser Ala Phe Ile Val Thr 1260
Leu Pro 1265	Asn Thr Val Lys 1270	Asp Phe Trp Arg Leu Val 1275
His Cys 1280	Thr Ser Val Val 1285	Met Leu Asn Asp Val Asp 1290
Leu Cys 1295	Pro Gln Tyr Trp 1300	Pro Glu Asn Gly Val His 1305
Pro Ile 1310	Gln Val Glu Phe 1315	Val Ser Ala Asp Leu Glu 1320
Ile Ser 1325	Arg Ile Phe Arg 1330	Ile Tyr Asn Ala Ala Arg 1335
Gly Tyr 1340	Arg Met Val Gln 1345	Gln Phe Gln Phe Leu Gly 1350
Tyr Arg 1355	Asp Thr Pro Val 1360	Ser Lys Arg Ser Phe Leu 1365
Arg Gln 1370	Val Asp Lys Trp 1375	Gln Glu Glu Tyr Asn Gly 1380
Arg Thr 1385	Val Val His Cys 1390	Leu Asn Gly Gly Gly Arg 1395
Phe Cys 1400	Ala Ile Ser Ile 1405	Val Cys Glu Met Leu Arg 1410

Thr Val Asp Val Phe His Ala Val Lys Thr Leu Arg Asn Asn Lys
1415 1420 1425

[0029] Pro Asn Met Val Asp Leu Leu Asp Gln Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu
1430 1435 1440

Val Ala Leu Glu Tyr Leu Asn Ser Gly
1445 1450

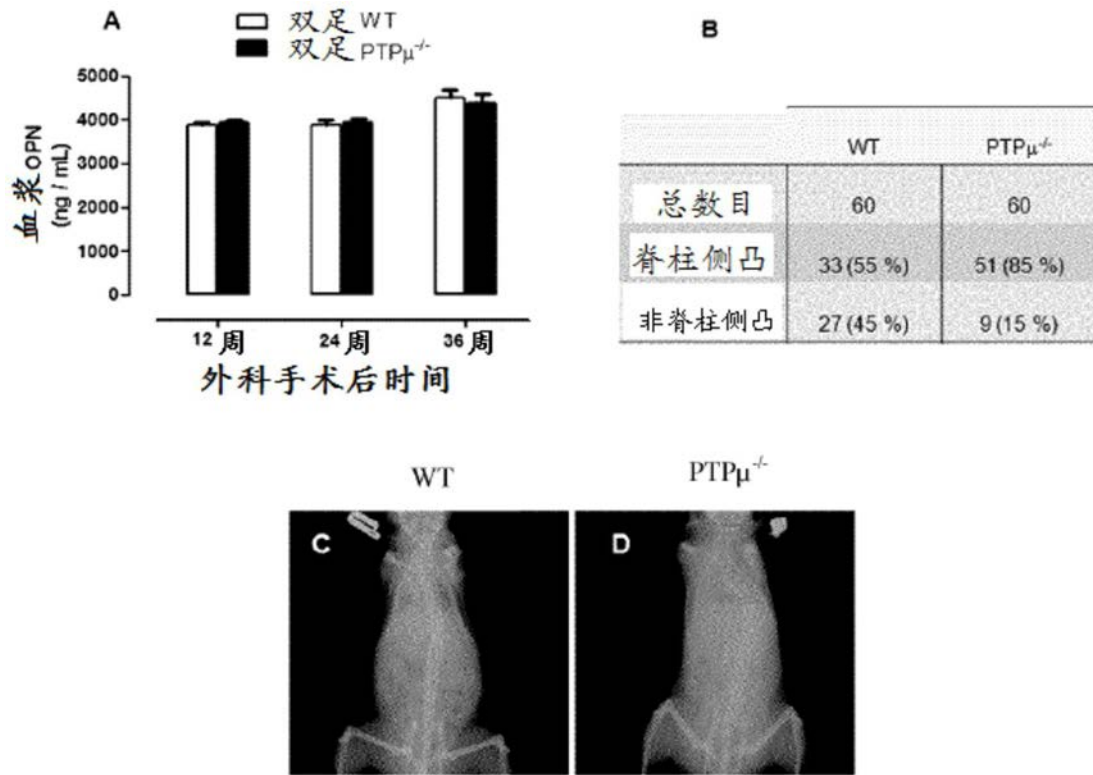


图1

WT

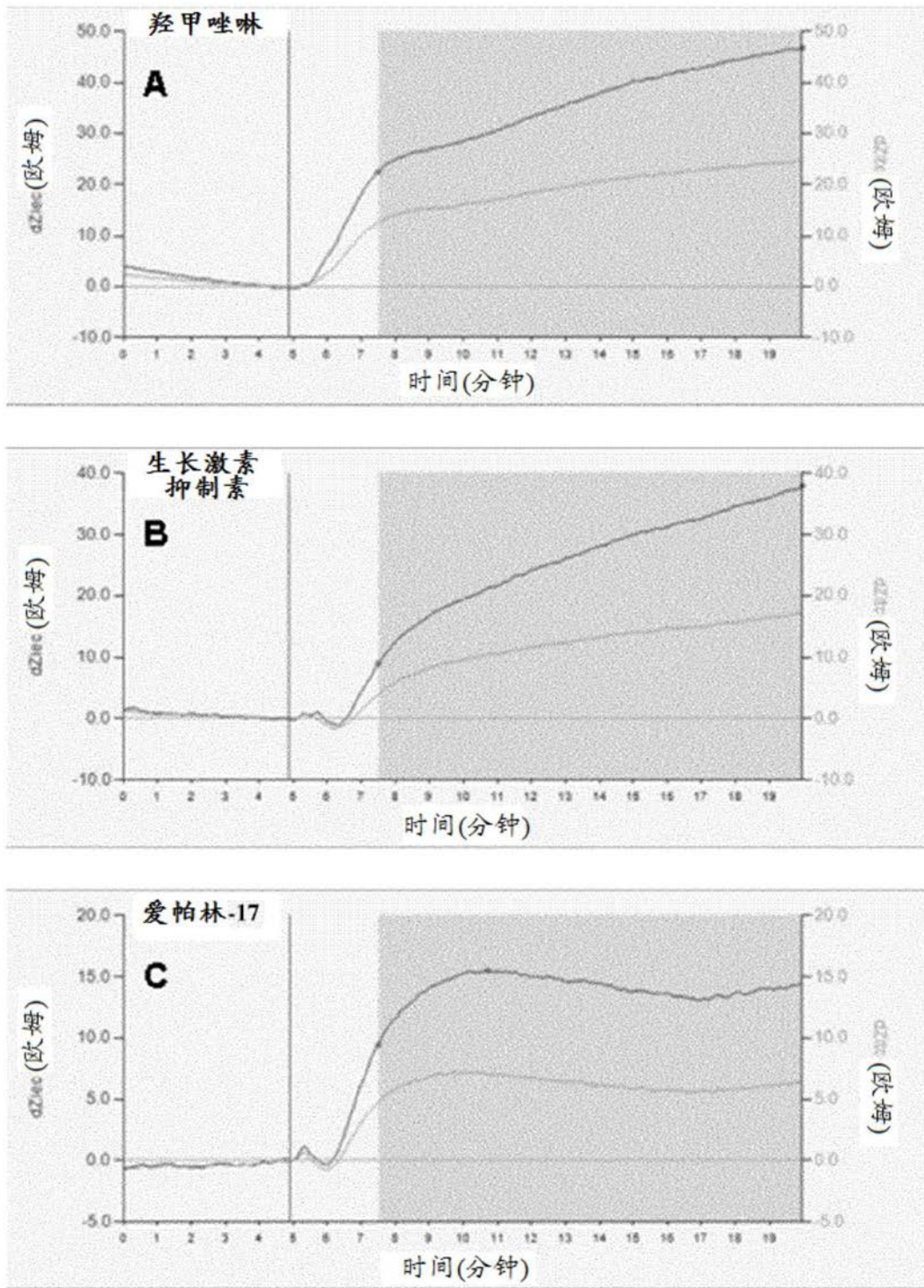


图2

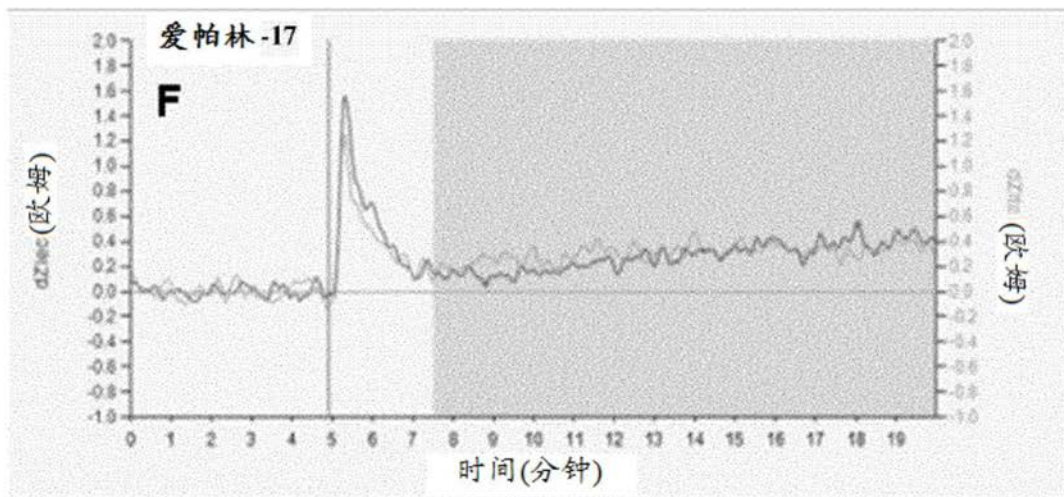
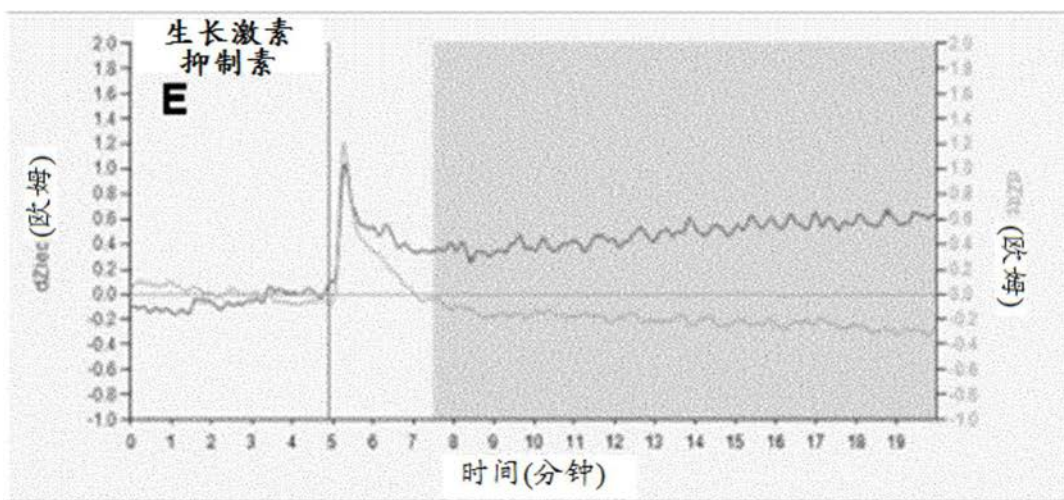
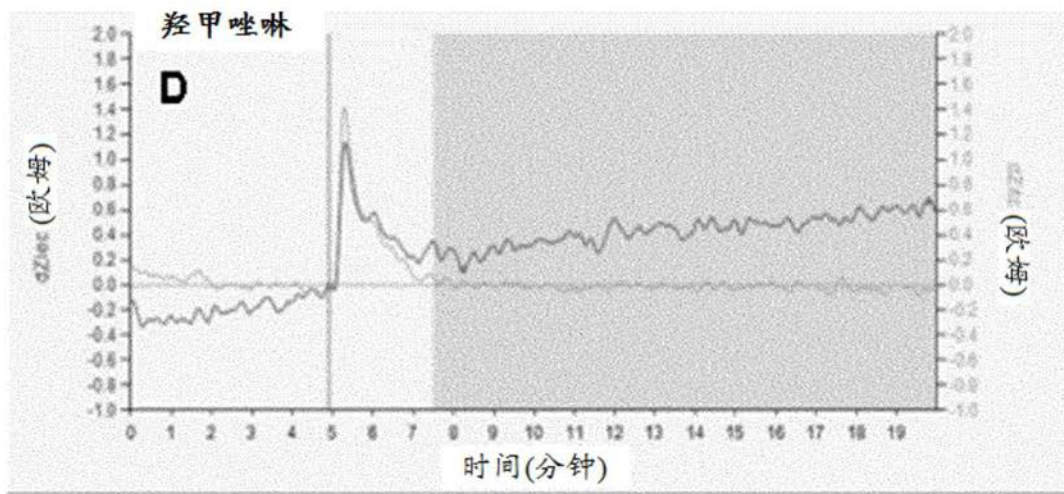


图2(续)

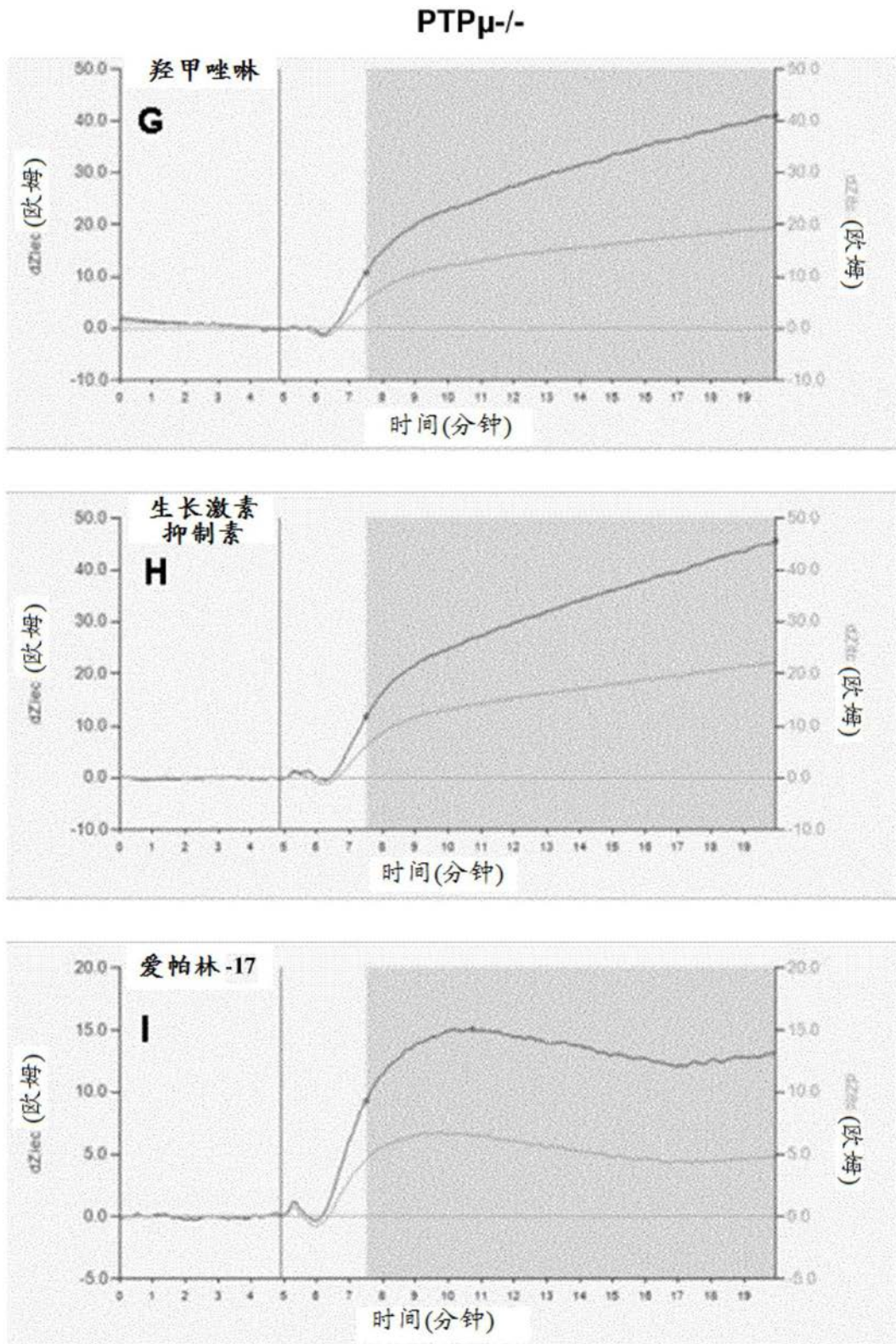


图2(续)

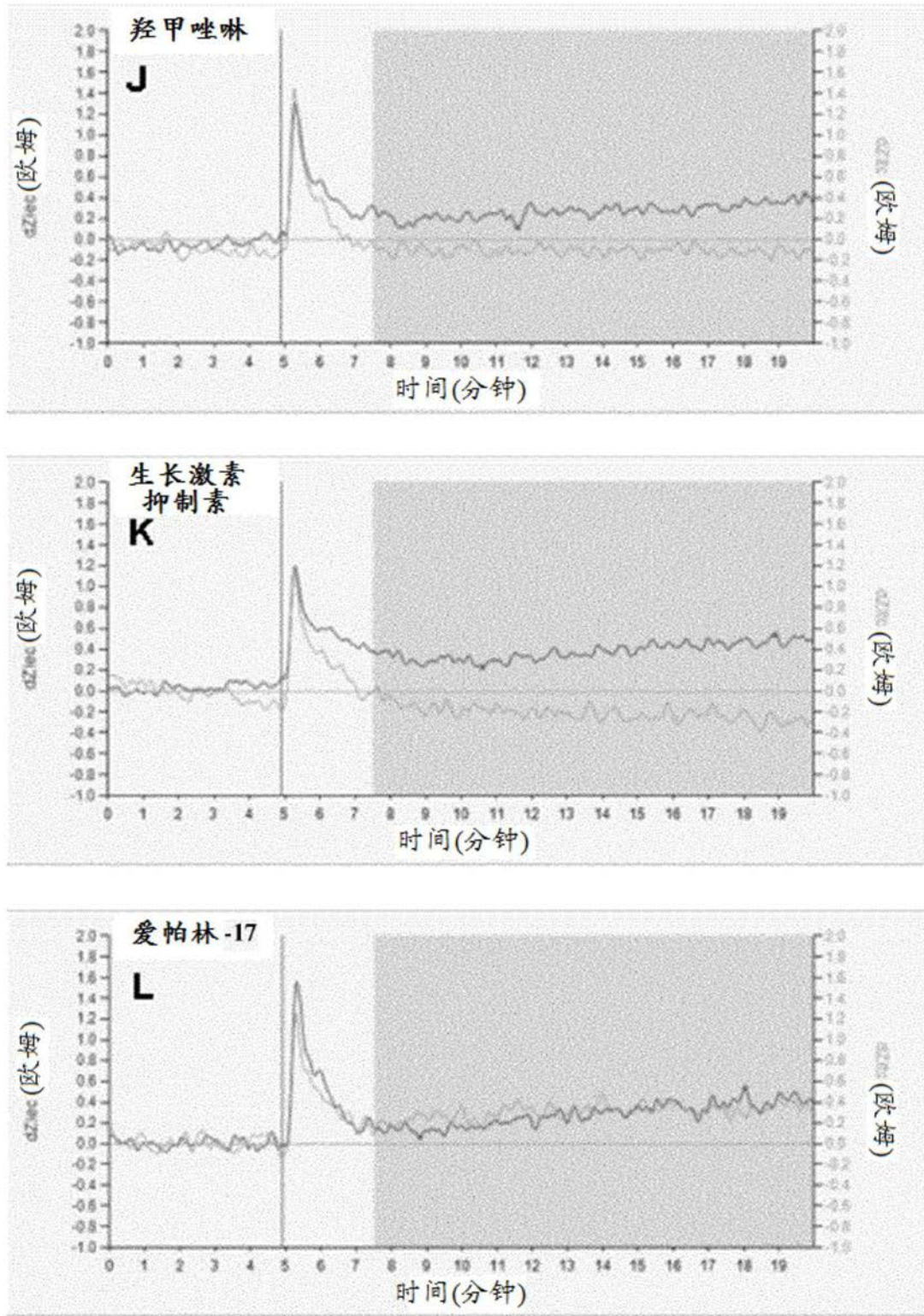


图2(续)

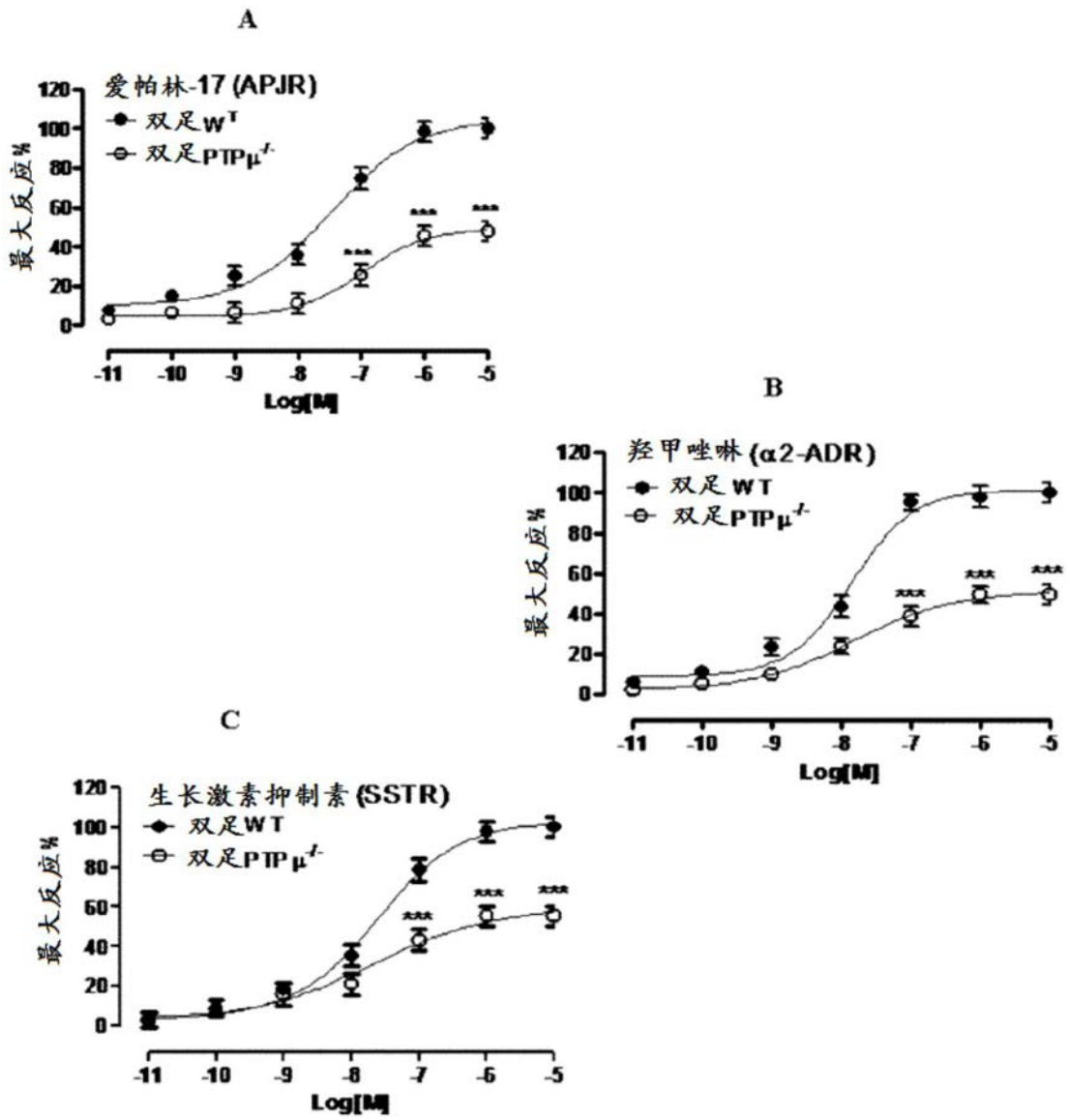


图3

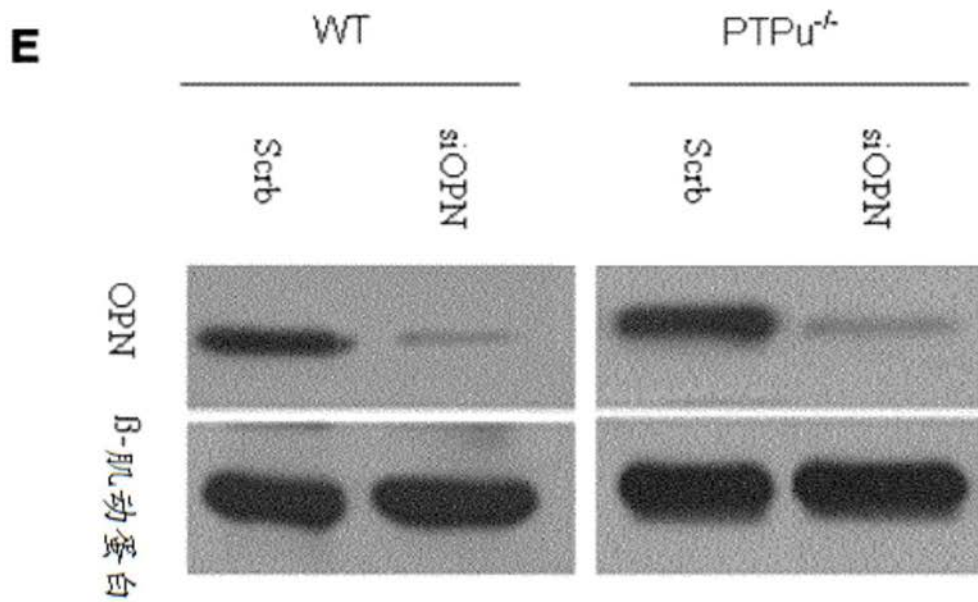
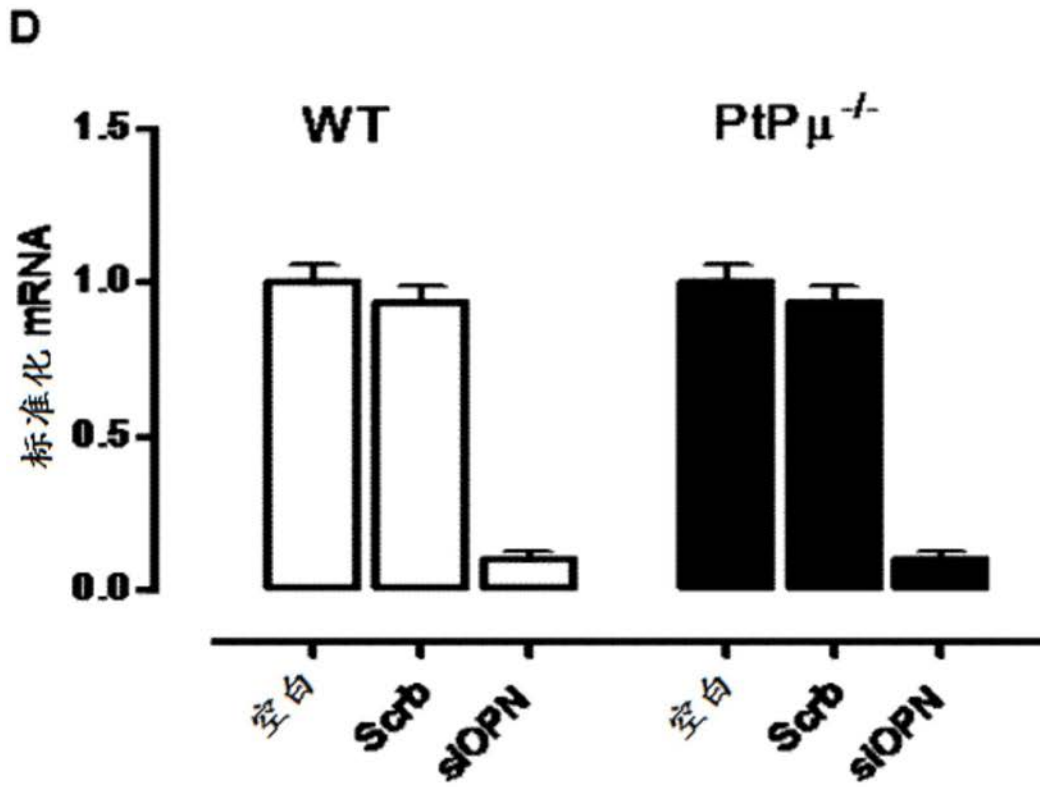


图3(续)

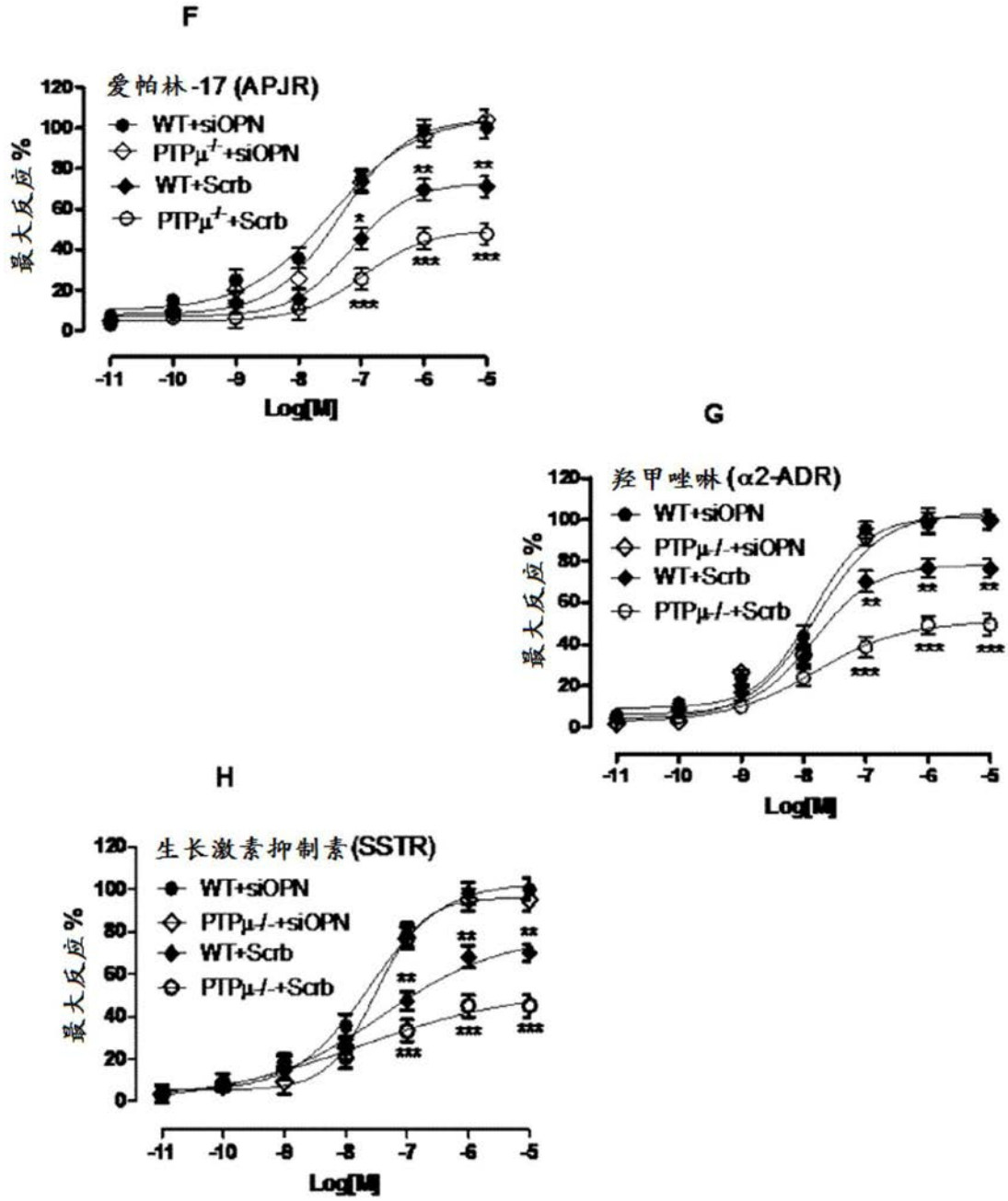


图3(续)

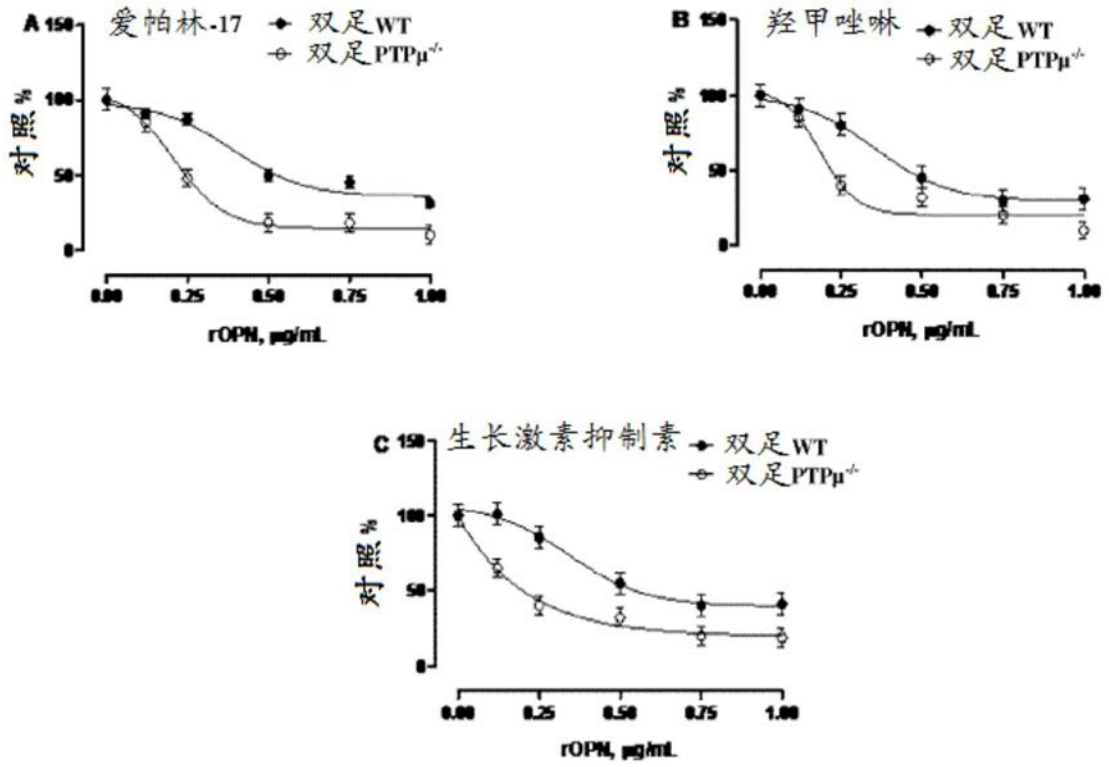


图4

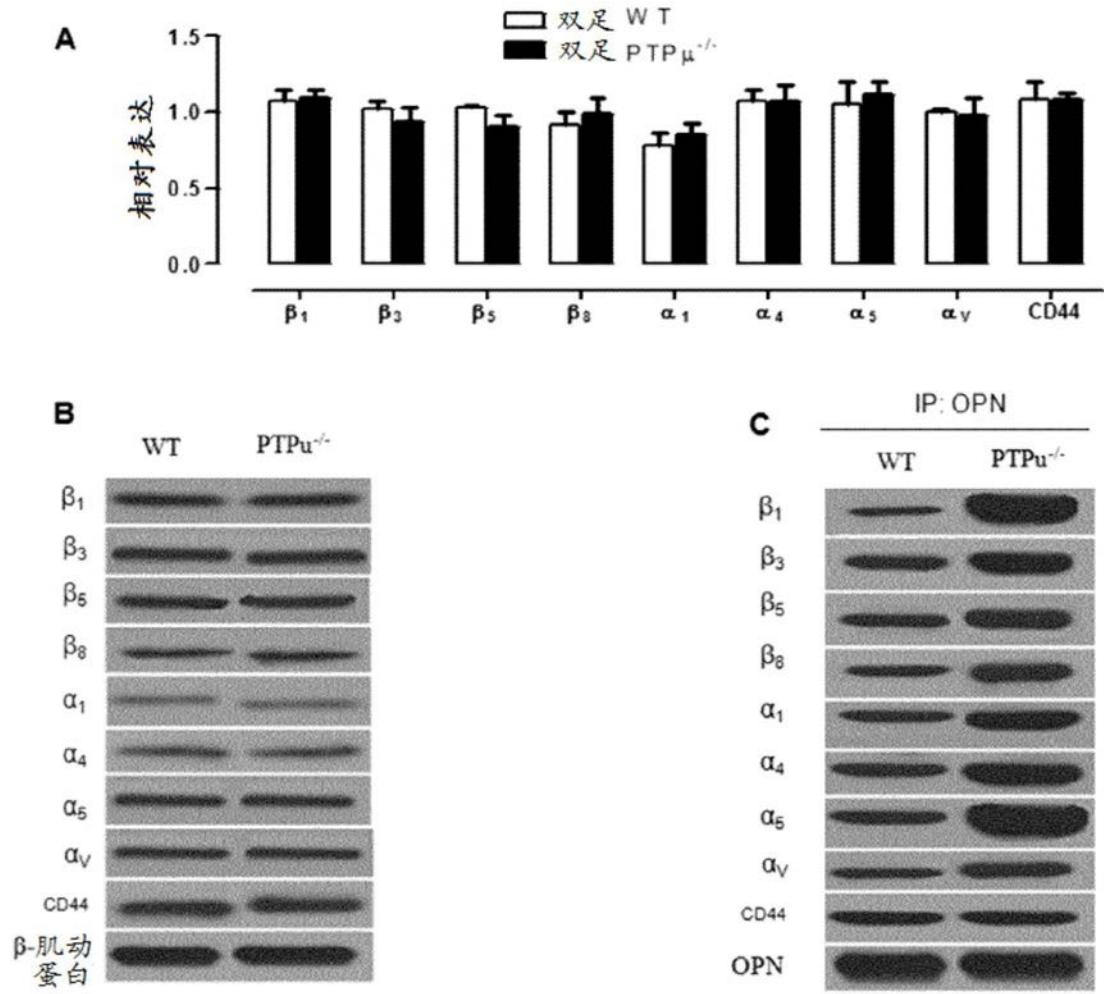


图5

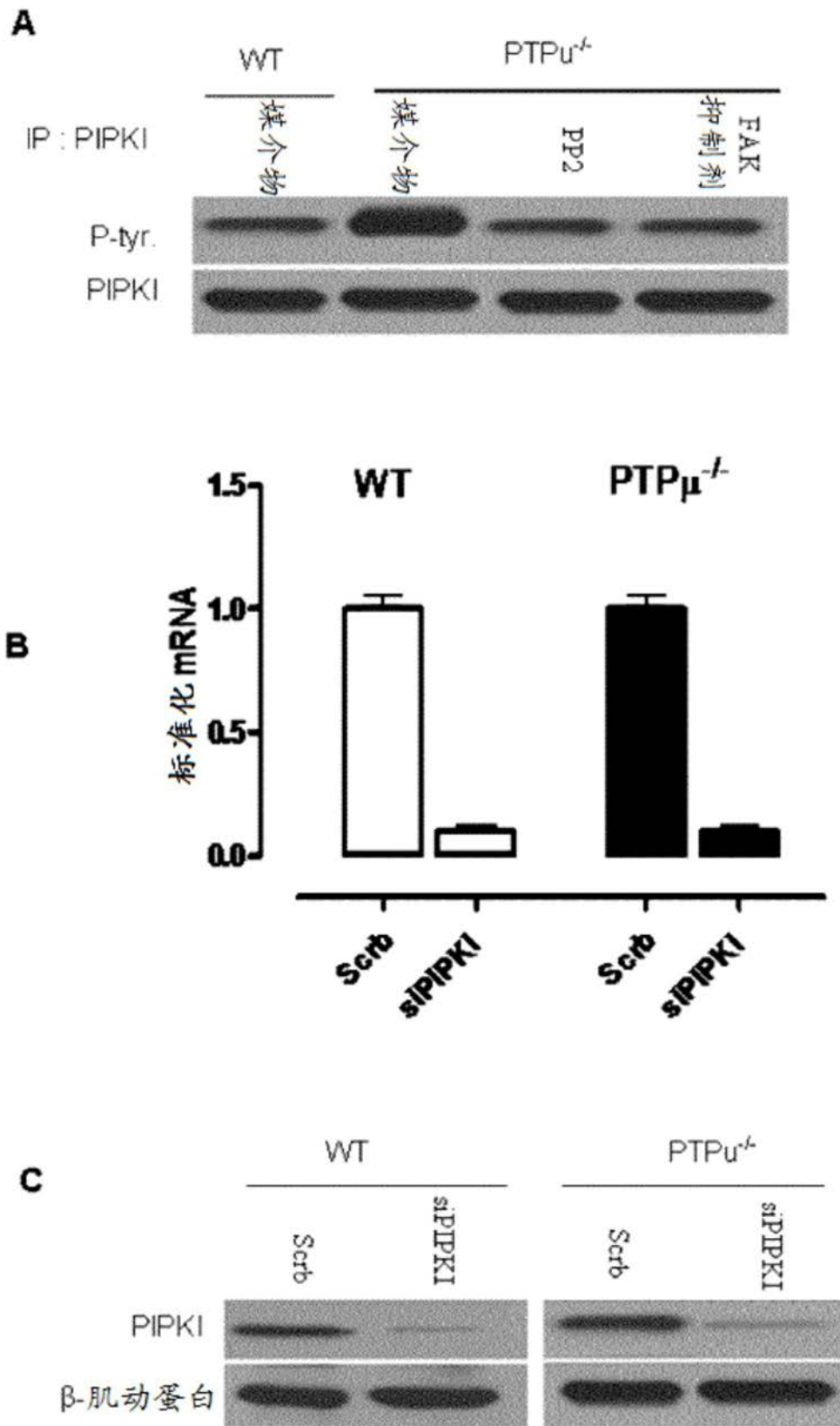


图6

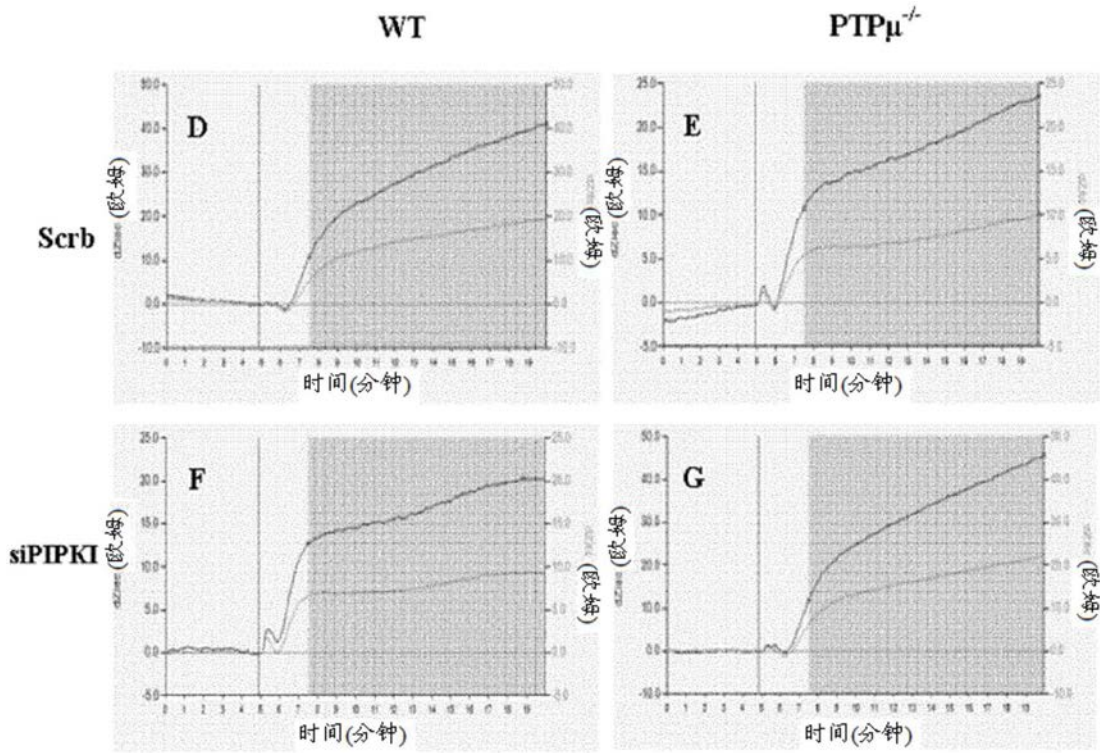


图6(续)

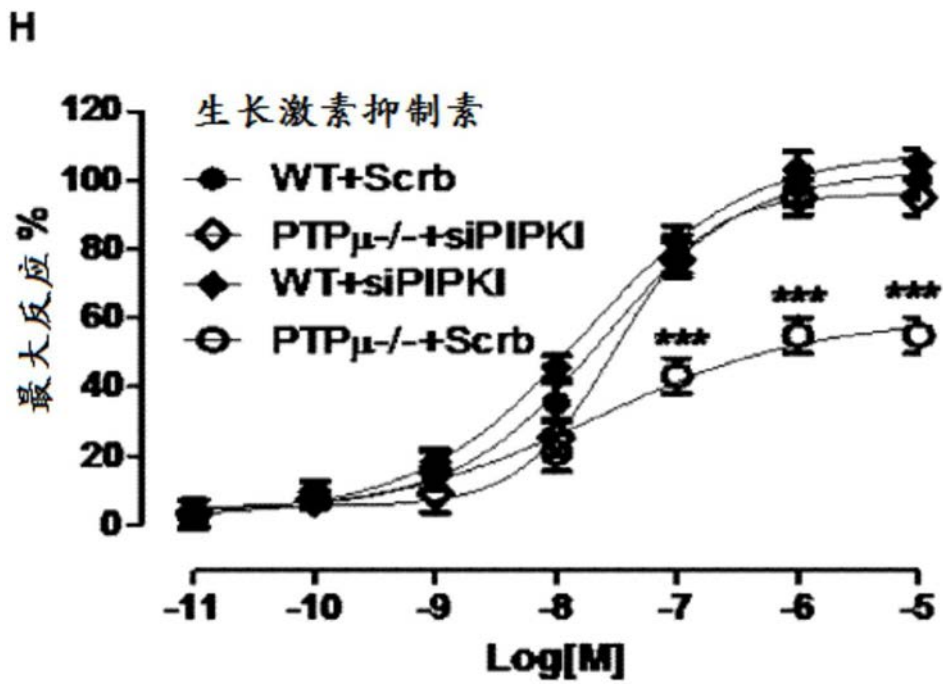


图6(续)

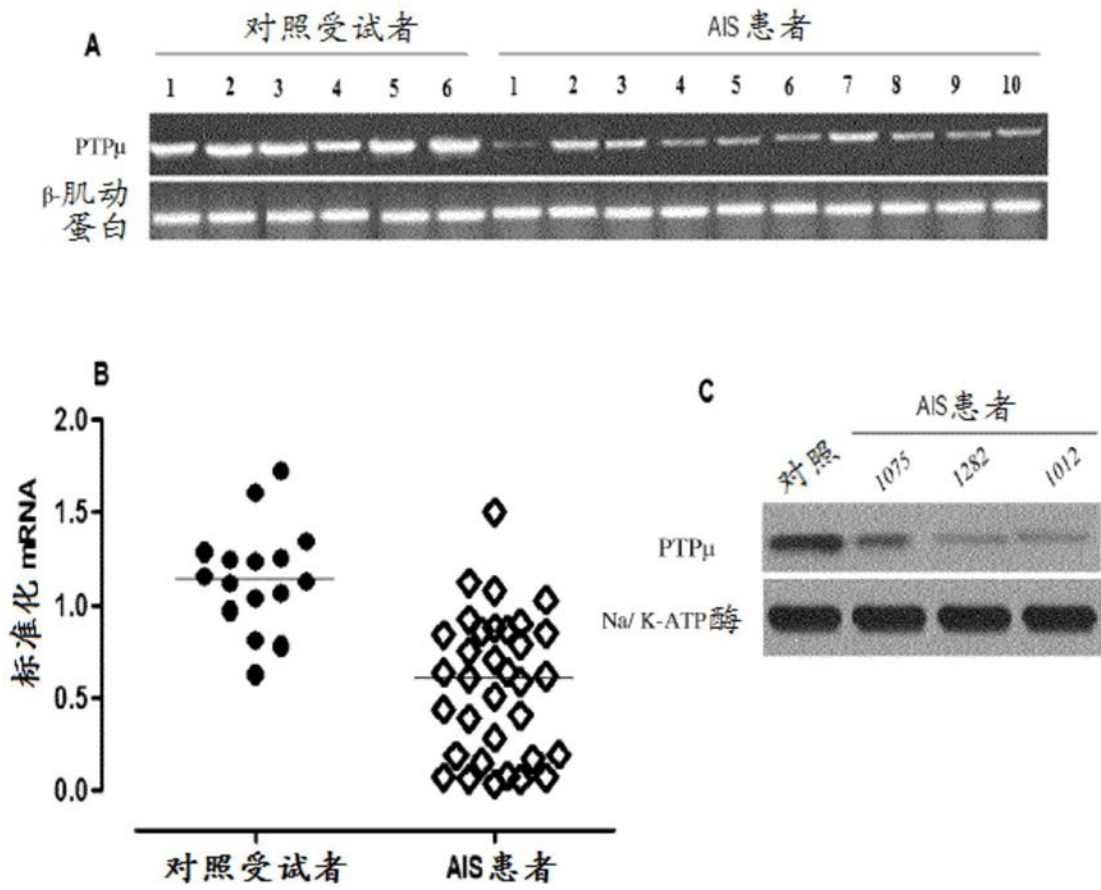


图7

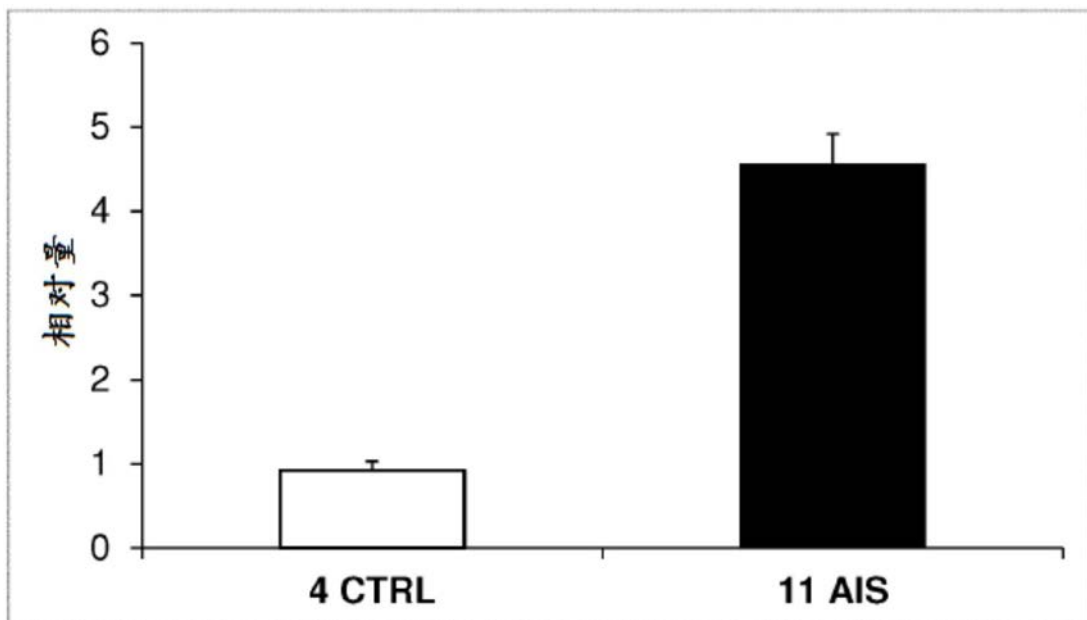


图8

PIPK1 _Y 同种型-2	MELEVPDEAESAEAGAVPSEAAWAAESGAAAGLAQKKAAPTEVL SMTAQPGPGHGKKLGH	60
PIPK1 _Y 同种型-4	MELEVPDEAESAEAGAVPSEAAWAAESGAAAGLAQKKAAPTEVL SMTAQPGPGHGKKLGH	60
PIPK1 _Y 同种型-1	MELEVPDEAESAEAGAVPSEAAWAAESGAAAGLAQKKAAPTEVL SMTAQPGPGHGKKLGH	60
PIPK1 _Y 同种型-3	MELEVPDEAESAEAGAVPSEAAWAAESGAAAGLAQKKAAPTEVL SMTAQPGPGHGKKLGH	60
PIPK1 _Y 同种型-X2	MELEVPDEAESAEAGAVPSEAAWAAESGAAAGLAQKKAAPTEVL SMTAQPGPGHGKKLGH	60

PIPK1 _Y 同种型-2	RGVDASGETTYKKTTSSTLKGAIQLGIGYTVGHLSKSPERDVL M QDFYVVESIFFPSEGS	120
PIPK1 _Y 同种型-4	RGVDASGETTYKKTTSSTLKGAIQLGIGYTVGHLSKSPERDVL M QDFYVVESIFFPSEGS	120
PIPK1 _Y 同种型-1	RGVDASGETTYKKTTSSTLKGAIQLGIGYTVGHLSKSPERDVL M QDFYVVESIFFPSEGS	120
PIPK1 _Y 同种型-3	RGVDASGETTYKKTTSSTLKGAIQLGIGYTVGHLSKSPERDVL M QDFYVVESIFFPSEGS	120
PIPK1 _Y 同种型-X2	RGVDASGETTYKKTTSSTLKGAIQLGIGYTVGHLSKSPERDVL M QDFYVVESIFFPSEGS	120

PIPK1 _Y 同种型-2	NLTPAHHFQDFRFTKYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSLCNEPLIELSNPGASGSLFYVI	180
PIPK1 _Y 同种型-4	NLTPAHHFQDFRFTKYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSLCNEPLIELSNPGASGSLFYVI	180
PIPK1 _Y 同种型-1	NLTPAHHFQDFRFTKYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSLCNEPLIELSNPGASGSLFYVI	180
PIPK1 _Y 同种型-3	NLTPAHHFQDFRFTKYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSLCNEPLIELSNPGASGSLFYVI	180
PIPK1 _Y 同种型-X2	NLTPAHHFQDFRFTKYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSLCNEPLIELSNPGASGSLFYVI	180

PIPK1 _Y 同种型-2	SDDEFI IKTVMHKEAEFLQKLLPGYYMNLNQNPR TLLPKFYGLYCVQSGGKNIRVVVMNN	240
PIPK1 _Y 同种型-4	SDDEFI IKTVMHKEAEFLQKLLPGYYMNLNQNPR TLLPKFYGLYCVQSGGKNIRVVVMNN	240
PIPK1 _Y 同种型-1	SDDEFI IKTVMHKEAEFLQKLLPGYYMNLNQNPR TLLPKFYGLYCVQSGGKNIRVVVMNN	240
PIPK1 _Y 同种型-3	SDDEFI IKTVMHKEAEFLQKLLPGYYMNLNQNPR TLLPKFYGLYCVQSGGKNIRVVVMNN	240
PIPK1 _Y 同种型-X2	SDDEFI IKTVMHKEAEFLQKLLPGYYMNLNQNPR TLLPKFYGLYCVQSGGKNIRVVVMNN	240

PIPK1 _Y 同种型-2	ILPRVVKMHLKFDLKGSTYKRRASKKEKESFPTYKDLDFM QDMPEGLLLDADTF SALVK	300
PIPK1 _Y 同种型-4	ILPRVVKMHLKFDLKGSTYKRRASKKEKESFPTYKDLDFM QDMPEGLLLDADTF SALVK	300
PIPK1 _Y 同种型-1	ILPRVVKMHLKFDLKGSTYKRRASKKEKESFPTYKDLDFM QDMPEGLLLDADTF SALVK	300
PIPK1 _Y 同种型-3	ILPRVVKMHLKFDLKGSTYKRRASKKEKESFPTYKDLDFM QDMPEGLLLDADTF SALVK	300
PIPK1 _Y 同种型-X2	ILPRVVKMHLKFDLKGSTYKRRASKKEKESFPTYKDLDFM QDMPEGLLLDADTF SALVK	300

PIPK1 _Y 同种型-2	TLQRDCLVLESFKIMDYSLLLGVHNI DQHERERQAQGAQST SDEKRPVQKALYSTAMES	360
PIPK1 _Y 同种型-4	TLQRDCLVLESFKIMDYSLLLGVHNI DQHERERQAQGAQST SDEKRPVQKALYSTAMES	360
PIPK1 _Y 同种型-1	TLQRDCLVLESFKIMDYSLLLGVHNI DQHERERQAQGAQST SDEKRPVQKALYSTAMES	360
PIPK1 _Y 同种型-3	TLQRDCLVLESFKIMDYSLLLGVHNI DQHERERQAQGAQST SDEKRPVQKALYSTAMES	360
PIPK1 _Y 同种型-X2	TLQRDCLVLESFKIMDYSLLLGVHNI DQHERERQAQGAQST SDEKRPVQKALYSTAMES	360

PIPK1 _Y 同种型-2	IQGGGAARGEAIESDDTMGGIPAVNGRGERLL LHIGIIDILQSYRF IKKLEHTWKALVHDG	420
PIPK1 _Y 同种型-4	IQGGGAARGEAIESDDTMGGIPAVNGRGERLL LHIGIIDILQSYRF IKKLEHTWKALVHDG	420
PIPK1 _Y 同种型-1	IQGGGAARGEAIESDDTMGGIPAVNGRGERLL LHIGIIDILQSYRF IKKLEHTWKALVHDG	420
PIPK1 _Y 同种型-3	IQGGGAARGEAIESDDTMGGIPAVNGRGERLL LHIGIIDILQSYRF IKKLEHTWKALVHDG	420
PIPK1 _Y 同种型-X2	IQGGGAARGEAIESDDTMGGIPAVNGRGERLL LHIGIIDILQSYRF IKKLEHTWKALVHDG	420

PIPK1 _Y 同种型-2	DTVSVHRPSFYAERFFKFSMNTVFRKNS SLKSSPSKKG RGGALLAVKPLGPTAAF SASQI	480
PIPK1 _Y 同种型-4	DTVSVHRPSFYAERFFKFSMNTVFRKNS SLKSSPSKKG RGGALLAVKPLGPTAAF SASQI	480
PIPK1 _Y 同种型-1	DTVSVHRPSFYAERFFKFSMNTVFRKNS SLKSSPSKKG RGGALLAVKPLGPTAAF SASQI	480
PIPK1 _Y 同种型-3	DTVSVHRPSFYAERFFKFSMNTVFRKNS SLKSSPSKKG RGGALLAVKPLGPTAAF SASQI	480
PIPK1 _Y 同种型-X2	DTVSVHRPSFYAERFFKFSMNTVFRKNS SLKSSPSKKG RGGALLAVKPLGPTAAF SASQI	480

PIPK1 _Y 同种型-2	PSEREEAQYDLRGARSYPTLEDEGRPDLL PCTPPSFEEATTAS IATTL SSTSLS IPERSP	540
PIPK1 _Y 同种型-4	PSEREEAQYDLRGARSYPTLEDEGRPDLL PCTPPSFEEATTAS IATTL SSTSLS IPERSP	540
PIPK1 _Y 同种型-1	PSEREEAQYDLRGARSYPTLEDEGRPDLL PCTPPSFEEATTAS IATTL SSTSLS IPERSP	540
PIPK1 _Y 同种型-3	PSEREEAQYDLRGARSYPTLEDEGRPDLL PCTPPSFEEATTAS IATTL SSTSLS IPERSP	540
PIPK1 _Y 同种型-X2	PSEREEAQYDLRGARSYPTLEDEGRPDLL PCTPPSFEEATTAS IATTL SSTSLS IPERSP	540

PIPK1 _Y 同种型-2	SETSEQPRYRRRTQSSGQDGRPQEEPPAEEDLQQ ITVQVEPAC SVEIVVPKEEDAGVEAS	600
PIPK1 _Y 同种型-4	SETSEQPRYRRRTQSSGQDGRPQEEPPAEEDLQQ ITVQVEPAC SVEIVVPKEEDAGVEAS	600
PIPK1 _Y 同种型-1	SETSEQPRYRRRTQSSGQDGRPQEEPPAEEDLQQ ITVQVEPAC SVEIVVPKEEDAGVEAS	600
PIPK1 _Y 同种型-3	SETSEQPRYRRRTQSSGQDGRPQEEPPAEEDLQQ ITVQVEPAC SVEIVVPKEEDAGVEAS	600
PIPK1 _Y 同种型-X2	SETSEQPRYR-----PQEEPPAEEDLQQ ITVQVEPAC SVEIVVPKEEDAGVEAS	589

图9

PIPK1 _Y _同种型_2	PAGASAAVEVETASQASDEEGAPASQASDEEDAPATDIYFWRLWGPHTWFWRRREGRAA	660
PIPK1 _Y _同种型_4	PAGASAAVEVETASQASDEEGAPASQASDEEDAPATDIYF-----	640
PIPK1 _Y _同种型_1	PAGASAAVEVETASQASDEEGAPASQASDEEDAPATDIYFP---IDERSWVYS-----	650
PIPK1 _Y _同种型_3	PAGASAAVEVETASQASDEEGAPASQASDEEDAPATDIYFFT-DGRYWIYSPRRRLRAV	659
PIPK1 _Y _同种型_X2	PAGASAAVEVETASQASDEEGAPASQASDEEDAPATDIYFFT-DGRYWIYSPRRRLRAV	648

PIPK1 _Y _同种型_2	CLCFY--PPHVVTFFPGTGLCASWSPDGTGGLGAMSCCVSVS-----	700
PIPK1 _Y _同种型_4	-----	
PIPK1 _Y _同种型_1	-----PLHYSAQAP-----PASDGESDI-----	668
PIPK1 _Y _同种型_3	TLASAGTVSDRSRPPWGEGAVPLGQQGAAGRPEAQCLTSVVFQKGF	707
PIPK1 _Y _同种型_X2	TLASAGTVSDRSRPPWGEGAVPLGQQGAAGRPEAQCLTSVVFQKGF	696

图9(续)

PTP μ _同种型_1	MRGLGTCLATLAGLLLTAAGETFSGGCLFDEPYSTCGYSQSEGDDFNWEQVNTLTKPTSD	60
PTP μ _同种型_2	MRGLGTCLATLAGLLLTAAGETFSGGCLFDEPYSTCGYSQSEGDDFNWEQVNTLTKPTSD	60

PTP μ _同种型_1	EWMPSGSFMLVNASGRPEGQRAHLLLPQLKENDTHCIDFHVFVSSKSNPPGLLNIVYVKV	120
PTP μ _同种型_2	EWMPSGSFMLVNASGRPEGQRAHLLLPQLKENDTHCIDFHVFVSSKSNPPGLLNIVYVKV	120

PTP μ _同种型_1	NNGPLGNPIWNI SGPDPTRTWNRAELAI STFWPNFYQVIFEVITSGHQGYLAIDEVVKVLGH	180
PTP μ _同种型_2	NNGPLGNPIWNI SGPDPTRTWNRAELAI STFWPNFYQVIFEVITSGHQGYLAIDEVVKVLGH	180

PTP μ _同种型_1	PCTRTPHFLRIQNVEVNAGQFATFQCSAIGRTVAGDRLWLQGDVDRDAPLKEIKVTSSRR	240
PTP μ _同种型_2	PCTRTPHFLRIQNVEVNAGQFATFQCSAIGRTVAGDRLWLQGDVDRDAPLKEIKVTSSRR	240

PTP μ _同种型_1	F IASFNVVNTTKRDAGKYRCMI RTEGGVGISNYAELVVKEPPVPIAPPQLASVGATYLWI	300
PTP μ _同种型_2	F IASFNVVNTTKRDAGKYRCMI RTEGGVGISNYAELVVKEPPVPIAPPQLASVGATYLWI	300

PTP μ _同种型_1	QLNANS INGDGPIVAREVEYCTASGSWDRQPV DSTSYKIGHLDPDTEYEI SVLLTRPGE	360
PTP μ _同种型_2	QLNANS INGDGPIVAREVEYCTASGSWDRQPV DSTSYKIGHLDPDTEYEI SVLLTRPGE	360

PTP μ _同种型_1	GGTGSPPGALRTRTKCADPMRGRKLEVVVKSRQITIRWEPFGYNVTRCHSYNLTVHYC	420
PTP μ _同种型_2	GGTGSPPGALRTRTKCADPMRGRKLEVVVKSRQITIRWEPFGYNVTRCHSYNLTVHYC	420

PTP μ _同种型_1	YQVGGQEQVREEVSWDTENSHPQHTITNLSPYTNVSVKLIIMNPEGRKESQELIVQTD	480
PTP μ _同种型_2	YQVGGQEQVREEVSWDTENSHPQHTITNLSPYTNVSVKLIIMNPEGRKESQELIVQTD	480

PTP μ _同种型_1	LPGAVPTESI QGSTFEKIFLQWREPTQTYGVITLYEITYKAVSSFDP EIDL SNQSGRVS	540
PTP μ _同种型_2	LPGAVPTESI QGSTFEKIFLQWREPTQTYGVITLYEITYKAVSSFDP EIDL SNQSGRVS	540

PTP μ _同种型_1	KLGNETHFLFFGLYPGTTYSFTIRASTAKGFPPATNQFTTKISAP SMPAYELETPLNQT	600
PTP μ _同种型_2	KLGNETHFLFFGLYPGTTYSFTIRASTAKGFPPATNQFTTKISAP SMPAYELETPLNQT	600

PTP μ _同种型_1	DNTVIVMLKPAHSRGAPVSVYQIVVEEERPRRTKKTTEILKCYVPV IHPQNASLLNSQYY	660
PTP μ _同种型_2	DNTVIVMLKPAHSRGAPVSVYQIVVEEERPRRTKKTTEILKCYVPV IHPQNASLLNSQYY	660

PTP μ _同种型_1	FAAEFPADSLQAAQFFTIGDNKTYNGYWNTPLLPYKSYRIYFQAASRANGETKIDCVQA	720
PTP μ _同种型_2	FAAEFPADSLQAAQFFTIGDNKTYNGYWNTPLLPYKSYRIYFQAASRANGETKIDCVQA	720

PTP μ _同种型_1	TKGAATPKPVPEPEKQTDHTVKIAGVIAGILLFV IIFLGVVLMKRRKLAKRRKETMSST	780
PTP μ _同种型_2	TKGAATPKPVPEPEKQTDHTVKIAGVIAGILLFV IIFLGVVLMKRRKLAKRRKETMSST	780

PTP μ _同种型_1	RQEMTVMVNSMDKSYAEQGTNCDEAFSFM DTHNLNGRSVSSPSSF TMKTNLSTVSPNSY	840
PTP μ _同种型_2	RQEMTVMVNSMDKSYAEQGTNCDEAFSFM DTHNLNGRSVSSPSSF TMKTNLSTVSPNSY	840

PTP μ _同种型_1	YDPDFVPTAILVP INDEHTMASD TSSLVQSHTYKKREPADVPYQ TGLHPAIRVADLLQ	900
PTP μ _同种型_2	YPD-----ETHTMASD TSSLVQSHTYKKREPADVPYQ TGLHPAIRVADLLQ	887

PTP μ _同种型_1	HITQMKCAEGYGFKEEYESFFEQQSAPWDSAKK DENRMKNRYGNI IAYDHSRVRLQ TIEG	960
PTP μ _同种型_2	HITQMKCAEGYGFKEEYESFFEQQSAPWDSAKK DENRMKNRYGNI IAYDHSRVRLQ TIEG	947

PTP μ _同种型_1	DTNSDYINGNYIDGYHRPNHYIATQGMQETIYDFWRMVHENTASI IMVTNLVEVGRVK	1020
PTP μ _同种型_2	DTNSDYINGNYIDGYHRPNHYIATQGMQETIYDFWRMVHENTASI IMVTNLVEVGRVK	1007

PTP μ _同种型_1	CCKYWPDDEIYKDIKVTLIETELLA EYVIRTFAVEKRGVHEIREIRQFHFTGWPDHGVP	1080
PTP μ _同种型_2	CCKYWPDDEIYKDIKVTLIETELLA EYVIRTFAVEKRGVHEIREIRQFHFTGWPDHGVP	1067

图10

```

PTPμ_同种型_1      YHATGLLGfVrQvKsKsPpSAGPLVvHCSAGAGRTGCFIVIDIMLDMAEREGVVDIYNcV 1140
PTPμ_同种型_2      YHATGLLGfVrQvKsKsPpSAGPLVvHCSAGAGRTGCFIVIDIMLDMAEREGVVDIYNcV 1127
*****

PTPμ_同种型_1      RELRSRRvNMVQTEEQYVFIHDAILEACLcGDTsVPASQvRSLYYDMNKLDpQTnSSQIK 1200
PTPμ_同种型_2      RELRSRRvNMVQTEEQYVFIHDAILEACLcGDTsVPASQvRSLYYDMNKLDpQTnSSQIK 1187
*****

PTPμ_同种型_1      EEFRTLNmVtPtlRvEDCSIALlPRNHekNRcMDilPPDRclPflITIDGESSNYINAA 1260
PTPμ_同种型_2      EEFRTLNmVtPtlRvEDCSIALlPRNHekNRcMDilPPDRclPflITIDGESSNYINAA 1247
*****

PTPμ_同种型_1      MDSYKQPSAFIVtQHPLentVkdFwRlVLDyHCTsvVMLNDvDPAQlCPQYWPENGvHRH 1320
PTPμ_同种型_2      MDSYKQPSAFIVtQHPLentVkdFwRlVLDyHCTsvVMLNDvDPAQlCPQYWPENGvHRH 1307
*****

PTPμ_同种型_1      GPIQVEFVSADLEEDIISrIFRIYNAARpQdGYRmVQqFqFLGWpMYRDTpVSKRSElKL 1380
PTPμ_同种型_2      GPIQVEFVSADLEEDIISrIFRIYNAARpQdGYRmVQqFqFLGWpMYRDTpVSKRSElKL 1367
*****

PTPμ_同种型_1      IRQVDKwQEEYNGGEGRTvVHCLNGGGRSGTfCAISIVCEMLRHqRTVDVfHAVKtLRNN 1440
PTPμ_同种型_2      IRQVDKwQEEYNGGEGRTvVHCLNGGGRSGTfCAISIVCEMLRHqRTVDVfHAVKtLRNN 1427
*****

PTPμ_同种型_1      KPNMVDLLDQYKfCYEVALEYLNSG 1465
PTPμ_同种型_2      KPNMVDLLDQYKfCYEVALEYLNSG 1452
*****
    
```

图10(续)