[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025621.4

[43] 公开日 2007 年 7 月 4 日

[11] 公开号 CN 1993620A

[22] 申请日 2005.7.19
[21] 申请号 200580025621.4
[30] 优先权
[32] 2004.7.28 [33] EP [31] 04103611.2
[86] 国际申请 PCT/EP2005/007854 2005.7.19
[87] 国际公布 WO2006/010530 英 2006.2.2
[85] 进入国家阶段日期 2007.1.29
[71] 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 A·克里斯滕 S·埃弗斯
K·克拉普费鲍尔 E·谢伯科娃

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 3 页 说明书 19 页 序列表 2 页

[54] 发明名称

作为 β 细胞衰竭靶标/标志的胰岛素启动因子 1

[57] 摘要

本发明涉及通过测定液体样品中的 IPF-1 水平来监测疾病进展和诊断糖尿病中的 β 细胞衰竭，并且涉及筛选用于预防和/或治疗糖尿病的新化合物。

1. 筛选与 IPF-1 相互作用的化合物的方法，其包括步骤:

a) 将蛋白质 IPF-1 与化合物或多种化合物在允许所述的化合物或多种化合物与 IPF-1 相互作用的条件下接触；和

b) 检测所述化合物或多种化合物与所述多肽的相互作用。

2. 筛选能够预防和/或抑制和/或减弱 β 细胞衰竭的化合物的方法，其包括步骤:

a) 将化合物与蛋白质 IPF-1 接触;

b) 测定蛋白质 IPF-1 的活性;

其中刺激或抑制蛋白质 IPF-1 活性的化合物是能够预防和/或抑制和/或减弱 β 细胞衰竭的化合物。

3. 权利要求 1 和 2 中任意一项的方法，其还在步骤 a)之前或者在步骤 a)和 b)之间包括将蛋白质 IPF-1 固定化的步骤。

4. 筛选预防和/或抑制和/或延缓 β 细胞衰竭的化合物的方法，其包括检测在所述化合物存在或缺乏条件下宿主分泌的可溶性 IPF-1 的步骤，其中预防和/或抑制和/或延缓 β 细胞衰竭的化合物是在其存在下宿主分泌的 IPF-1 水平发生变化的化合物。

5. 蛋白质 IPF-1 的用途，其用作筛选预防和/或抑制 β 细胞衰竭的化合物的靶标和/或标志。

6. 监测糖尿病进展的方法，其包括步骤:

a) 提供从个体得到的液体样品，

b) 将所述样品与 IPF-1 特异性结合试剂在适合所述结合试剂与 IPF-1 之间形成复合物的条件下接触，和

c) 将 b)中形成的复合物的数量与 β 细胞衰竭中形成的复合物的数量相关联。

7. 监测糖尿病治疗效果的方法，其包括步骤:

a) 提供从针对糖尿病治疗的患者得到的液体样品，

b) 将所述样品与 IPF-1 特异性结合试剂在适合所述结合试剂与 IPF-1 之间形成复合物的条件下接触，和

c) 将 b)中形成的复合物的数量与缺乏治疗情况下形成的复合物的数量相关联。

8. 诊断 β 细胞衰竭的方法，其包括步骤:

a) 提供从个体得到的液体样品，

b) 将所述样品与 IPF-1 特异性结合试剂在适合所述结合试剂与 IPF-1 之间形成复合物的条件下接触，和

c) 将 b)中形成的复合物的数量与 β 细胞衰竭的诊断相关联。

9. 根据权利要求 6-8 中任意一项的方法，其特征还在于所述样品为血清。

10. 根据权利要求 6-8 中任意一项的方法，其特征还在于所述样品为血浆。

11. 根据权利要求 6-8 中任意一项的方法，其特征还在于所述样品为全血。

12. 蛋白质 IPF-1 的用途，其用作从得自于个体的液体样品诊断 β 细胞衰竭的标志分子。

13. 蛋白质 IPF-1 的用途，其用作从得自于个体的液体样品早期诊断 II 型糖尿病的标志分子。

14. 根据权利要求 13 的用途，其中早期诊断是使用源自患有葡萄糖耐受的患者的样品做出的。

15. 蛋白质 IPF-1 的用途，其用于监测糖尿病进展。

16. 蛋白质 IPF-1 的用途，其用于监测糖尿病治疗效果。

17. 蛋白质 IPF-1 的用途，其在从源自个体的液体样品诊断 β 细胞衰竭中用作与至少一种用于 β 细胞衰竭的其它标志分子组合的用于 β 细胞衰竭的标志分子。

18. 免疫学试剂盒，其包含至少一种 IPF-1 特异性结合试剂和用于测定 IPF-1 的辅助试剂。

19.基本如上所述、特别是关于前述实施例的方法、用途和试剂盒。

作为β细胞衰竭靶标/标志的胰岛素启动因子1

II型糖尿病是快速增长的世界性的重要疾病，其特征是胰腺β细胞的衰竭(β 细胞衰竭)以通过增加 β 细胞的胰岛素分泌来补偿外周的胰岛素抵抗。 这种衰竭可通过β细胞质量的相对损失以及分泌缺陷(其包括增强的β 细胞基础胰岛素分泌以及骨骼肌及其它器官对胰岛素敏感性的选择性丢失)来解释。β细胞功能的损失被认为是由长期暴露于提高水平的葡萄糖和脂类下造成的(糖毒性和脂毒性)。

当前还没有临床证实的治疗可以预防或延缓脂/糖毒性条件下的 β 细胞衰竭。鉴定治疗β细胞衰竭的更好的靶标和检测β细胞衰竭或功能的更好的标志(其比常用的标志如胰岛素、胰岛素原或C-肽更敏感或更可靠)也是有用的。

此为，鉴定能够在血液中被检测的标志是有利的。

发明描述

本发明的目标是鉴定和提供用于筛选预防、减弱或抑制β细胞衰竭的化合物的新靶标以及允许在 II 型糖尿病的较早期阶段监测和/或诊断 β 细胞衰竭且比当前所用标志更可靠的标志。

令人惊奇地发现，蛋白质 IPF-1 的使用可以克服、至少部分克服当今技术水平已知的难题。

胰岛素启动因子-1(IPF-1)是包含同源异型域的转录因子，其对于胰腺的胚胎发育以及成人中胰腺特异性内分泌基因(例如胰岛素)的转录控制是严格必需的。已经表明，导致 IPF-1 功能缺陷的突变与 2 型糖尿病相关(Macfarlane 等，1999, J. Clin. Invest. 104, R33-R39)。

令人惊奇地发现，在β细胞衰竭中分泌的 IPF-1 水平变化增加。因此本发明提供了治疗和/或预防β细胞衰竭的靶标以及对糖尿病中β细胞衰竭

早期诊断的新的标志。

在优选的实施方案中，新的靶标和/或标志 IPF-1 可以用于诊断、监测以及筛选的目的。

当用于病人监测时，根据本发明的方法可以帮助评价追踪调查病人的治疗效果和 β 细胞衰竭的复发。因此，本发明提供了蛋白质 IPF-1 用于检测糖尿病治疗效果的用途。

在优选的实施方案中，根据本发明的诊断方法用于筛选患者的目的。即其用于通过测定 IPF-1 水平并将 IPF-1 水平与 β 细胞衰竭存在与否相关联来对先前没有糖尿病诊断的受试者进行评价。

根据本发明的方法用于在导致产生糖尿病的不同阶段，即胰岛素抵抗、葡萄糖耐受受损和糖尿病阶段监测疾病进展。

因此，本发明提供了监测糖尿病进展的方法，其包括步骤：(a) 提供从个体得到的液体样品，(b) 将所述样品与 IPF-1 特异性结合试剂在适合所述结合试剂与 IPF-1 之间形成复合物的条件下接触，和(c) 将(b)中形成的复合物的数量与 β 细胞衰竭中形成的复合物的数量相关联。

本发明还提供了监测糖尿病治疗效果的方法，其包括步骤：(a) 提供从针对糖尿病治疗的患者得到的液体样品，(b) 将所述样品与 IPF-1 特异性结合试剂在适合所述结合试剂与 IPF-1 之间形成复合物的条件下接触，和(c) 将(b)中形成的复合物的数量与缺乏治疗的情况下形成的复合物的数量相关联。

本发明提供了筛选与 IPF-1 相互作用的化合物的方法，其包括步骤：a) 将蛋白质 IPF-1 与化合物或多种化合物在允许所述化合物或多种化合物与 IPF-1 相互作用的情况下接触；和 b) 检测所述化合物或多种化合物与所述多肽之间的相互作用。

本发明提供了筛选预防和/或抑制和/或减弱 β 细胞衰竭的化合物的方法，其包括步骤：a) 将化合物与蛋白质 IPF-1 接触；和 b) 测定蛋白质 IPF-1 的活性；其中刺激或抑制蛋白质 IPF-1 活性的化合物是预防和/或抑制和/或减弱 β 细胞衰竭的化合物。优选地，所述方法还包括在步骤 a)之前或者

在步骤 a)和 b)之间将蛋白质 IPF-1 固定化的步骤。

如文中所使用，术语“活性”指测定 IPF-1 与启动子序列的结合(例如 Staffers 等，J. Clin. Invest. 102, 1998, 232-241)或者分析靶基因通过 IPF-1 的转录激活(Serup 等，1995, Biochem. J. 310, 997-1003; Lu 等，1996, Endocrinology, 2959-2967; Waeber 等，1996, Mol. Endocrinol. 10, 1327-1334)。

本发明还包括无细胞分析法。此分析法包括一种形式的 IPF-1(例如全长多肽、所述多肽的生物活性片段或者包含所有或全部所述多肽的融合蛋白)与测试化合物接触，以及测定测试化合物结合所述多肽的能力。如上所述，可以直接或间接测定测试化合物与所述多肽的结合。在一个实施方案中，分析法包括将所述多肽与结合该多肽的已知化合物接触以便形成分析混合物、将分析混合物与测试化合物接触、以及测定测试化合物与所述多肽相互作用的能力，其中测定测试化合物与所述多肽相互作用的能力包括测定测试化合物与已知化合物相比优先结合所述多肽的能力。

本发明的无细胞分析法适用于膜结合形式的多肽或其可溶性片段。在包含膜结合形式多肽的无细胞分析法的情况下，可以利用增溶剂，从而膜结合形式的多肽可以保持在溶液中。此种增溶剂的实例包括非离子去污剂，例如 n-辛基葡糖苷、n-十二烷基葡糖苷、n-十二烷基麦芽糖苷、辛酰基-N-甲基葡糖胺、癸酰基-N-甲基葡糖胺、Triton X-100、Triton X- 114、Thesit、异十三烷基聚乙二醇醚、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲铵基]-1 -丙磺酸(CHAPS)、3-[(3-胆酰胺丙基) 二甲铵基]-2-羟基-1-丙磺酸(CHAPSO)或者 N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸。

在上述本发明分析法的多种实施方案中，可以将多肽固定化以便利于从非复合形式的多肽中分离出与结合分子结合的复合形式多肽以及适应分析法的自动化。测试化合物与多肽的结合或者在候选化合物存在和缺乏条件下多肽与结合分子的相互作用可以在适于包含试剂的任何容器中实现。此类容器的实例包括微量滴定板、试管和微量离心管。在一个实施方案中，提供了这样的融合蛋白，即加入了一个允许一种或两种蛋白质结合至基质

的结构域。例如，谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白可以被吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠(Sigma Chemical; St. Louis, Mo.)或者谷胱甘肽衍生化的微量滴定板上，然后将它们与测试化合物或者测试化合物和非吸附结合蛋白质或多肽混合，并在有利于复合物形成的条件下(例如在生理盐度和 pH 的条件下)孵育混合物。孵育后，洗涤珠或微量滴定板孔以除去任何未结合成分，然后如上所述直接或间接测定复合物的形成。备选地，将复合物从基质上分离下来，并使用标准技术测定上述多肽的结合水平或活性水平。

在本发明的筛选分析法中，还可使用将蛋白质固定至基质上的其它技术。例如，可以使用生物素和链亲和素的缀合作用将上述多肽或其结合分子固定化。生物素化的本发明多肽或靶标分子可以使用本领域众所周知的技术(例如生物素化试剂盒，Pierce Chemicals; Rockford, Ill.)从生物素-NHS (N-羟基-琥珀酰亚胺)制备，并且固定至链亲和素包被的 96 孔板(Pierce Chemical)的孔中。备选地，可以将与多肽或结合分子发生反应但不干扰本发明多肽与其结合分子结合的抗体衍生化至板的孔中。通过抗体结合可以在孔中捕捉到未结合的结合蛋白或本发明多肽。检测此类复合物的方法，除了上述检测 GST-固定化复合物的那些方法以外，还包括使用与上述多肽或结合分子发生反应的抗体进行的复合物的免疫检测以及依赖于检测与多肽或结合分子结合的酶活性的酶联分析法。

本发明还提供了筛选预防和/或抑制和/或延缓 β 细胞衰竭的化合物的方法，其包括检测在所述化合物存在或缺乏条件下由宿主分泌的可溶性 IPF-1，其中预防和/或抑制和/或延缓 β 细胞衰竭的化合物是在其存在下由宿主分泌的 IPF-1 水平发生变化的化合物。

宿主可以是培养中的代表 β 细胞的模型细胞，或者是可以用作 β 细胞衰竭模型的动物。

本发明还提供了蛋白质 IPF-1 的用途，其用于筛选预防和/或抑制 β 细胞衰竭的化合物的靶标和/或标志。

根据本发明的诊断、监测和患者筛选方法基于源自个体的液体样品。与本领域已知的方法不同，在这些方法中通过使用特异性结合试剂从该液

体样品中特异性测定 IPF-1。

特异性结合试剂为例如 IPF-1 受体或抗 IPF-1 抗体。本领域技术人员会意识到，术语特异性用于指样品中存在的其它生物分子与 IPF-1 特异性结合试剂没有明显的结合。低于 5%水平的交叉反应性被认为是不明显的。

优选地，特异性结合试剂为与 IPF-1 反应的抗体。术语抗体指多克隆抗体、单克隆抗体、此类抗体片段以及包含抗体结合结构域的基因构建体。通过本技术领域当前水平的方法，例如如 Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990)全文，特别是第 43-78 页; Elsevier, Amsterdam)所述的方法可产生抗体。如本发明所公开，使用了在兔中产生的多克隆抗体。然而，很明显还可以使用来自不同物种，例如大鼠或豚鼠的多克隆抗体以及单克隆抗体。由于单克隆抗体可以以任何所需量产生并具有稳定的特性，因此在开发临床常规分析法中它们代表着理想的工具。另一优选实施方案为根据本发明方法的抗 IPF-1 单克隆抗体的产生和用途。

现在，本领域的技术人员会意识到，IPF-1 已经用做诊断 β 细胞衰竭的标志，备选的方法也可以用于达到与本发明成就相比的结果。例如，可以使用产生抗体的备选策略。其中，此类策略包括代表着 IPF-1 表位的合成肽用于免疫的用途。备选地，也可以使用称作 DNA 疫苗接种的 DNA 免疫。

为了测定，将从个体得到的液体样品与 IPF-1 特异性结合试剂在适于结合试剂-IPF-1 复合物形成的条件下接触。此类条件不需要特别指明，因为本领域技术人员在不需要任何创造性工作的情况下就能够轻易地鉴定出此类孵育条件。

作为本发明公开方法的最后步骤，测定复合物的数量并将其与 β 细胞衰竭的诊断或上文所述的各个对照相关联。本领域技术人员会意识到，存在多种测量特异性结合试剂- IPF-1 复合物数量的多种方法，这些方法详细描述于相关教科书中(参考例如 Tijssen P.,同前，或者 Diamandis 等编，(1996) Immunoassay, Academic Press, Boston)。

优选地，在夹心型分析形式中检测 IPF-1。在此测定法中，第一个特异性结合试剂用于在一面捕捉 IPF-1，标记有直接或间接检测标记的第二个特异结合试剂用于另一面。

如上所述，令人惊奇地发现，可以从源自各个样品的液体样品测定 IPF-1。在诊断 β 细胞衰竭中应用 IPF-1 标志不需要使用组织和生物活检样品。

在优选的实施方案中，使用血清作为液体样品材料来实践本发明方法。

在进一步优选的实施方案中，使用血浆作为液体样品材料来实践本发明方法。

在进一步优选的实施方案中，使用全血作为液体样品材料来实践本发明方法。

虽然将常规蛋白质组学方法应用于组织样品导致鉴定出对于所选择组织的许多潜在的候选标志，但是令人惊奇的是本发明的发明人已经可以在体液样品中监测蛋白质 IPF-1。甚至更加令人惊奇的是他们已经证明源自个体的此液体样品中 IPF-1 的存在可以与 β 细胞衰竭诊断相关联。

具有极大优点的抗 IPF-1 抗体可以用于已建立的方法中，例如用于 β 细胞衰竭原位方法、活组织检查方法或者免疫组织学方法。

优选地，抗 IPF-1 抗体可用于定性(IPF-1 存在与否)或定量(测定 IPF-1 数量)免疫分析法中。

已经证实，测定蛋白质 IPF-1 的水平在 β 细胞衰竭和糖尿病领域是非常有利的。因此，在进一步优选的实施方案中，本发明涉及蛋白质 IPF-1 的用途，其用作对源自个体的液体样品进行 β 细胞衰竭诊断的标志分子。

术语标志分子用于表明，所测定的个体体液中分析物 IPF-1 水平的变化标志着 β 细胞衰竭的存在。

优选地，在 II 型糖尿病的早期诊断中使用新标志 IPF-1。

特别优选地，在葡萄糖耐受的早期诊断中使用新标志 IPF-1。

特别优选地，在糖尿病疾病进展的监测中使用新标志 IPF-1。

蛋白质 IPF-1 自身的使用代表着 β 细胞衰竭诊断这一挑战性领域的显

著进步。将 IPF-1 测定与其它已知的糖尿病标志(如胰岛素)或者其它仍有待发现的β细胞衰竭标志的组合导致进一步改进。因此，在进一步的实施方案中，本发明涉及作为糖尿病、优选β细胞衰竭标志分子的用途，其与糖尿病、优选β细胞衰竭的另一个标志分子组合用于对源自个体的液体样品进行糖尿病、优选β细胞衰竭的诊断。可以与β细胞衰竭测定相组合的、优选的所选择其它糖尿病标志为胰岛素、前胰岛素和/或 C-肽。

通常，在特异性结合分析法(例如免疫分析法)领域中的诊断试剂最好以试剂盒的形式提供，所述试剂盒包含开展分析所需要的特异结合试剂和辅助试剂。因此，本发明还涉及免疫学试剂盒，其包含至少一种 IPF-1 特异性结合试剂和用于测定 IPF-1 的辅助试剂。

评价新标志 IPF-1 的临床效果的一种方式是测定依赖外源胰岛素注射的 10 名糖尿病患者中的 IPF-1 水平以及将其与所测定的具有正常β细胞功能的 10 名患者的 IPF-1 水平相比较。

对于统计学分析，开展标准 Student t-检验，数值< 0.05 为具有显著性。

测试的精确度可以通过其接受者操作特性(receiver-operating characteristics (ROC)) (由其参见 Zweig, M. H.和 Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)来描述。ROC 图是源自将判断阈值在全部所观察数值范围内连续变化的所有灵敏度/特异性对的曲线。

实验室测试的临床工作性能取决于诊断准确度或者将受试者正确归类于临床上相关亚群的能力。测试的诊断准确度测定其正确区分所研究受试者的能力。此类情况为例如健康和疾病。

在每一情况下，ROC 图通过绘制全部范围判断阈值的灵敏度对 1-特异性来图示两种分布间的重叠。y-轴为灵敏度或者真阳性分数[定义为(真阳性测试结果数)/(真阳性测试结果数+假阴性测试结果数)]。这还称作疾病或状况存在的确实性。其是从患病亚群单独计算出来的。x-轴为假阳性分数或者 1-特异性[定义为(假阳性结果数)/(真阴性结果数+假阳性结果数)]。它是特异性的指标并且完全从非患病亚群中计算出来的。由于真阳性分数和假阳性分数是通过来自不同亚群的测试结果完全分别计算的，所以 ROC

不依赖于样本中的患病数。ROC 图上的每一个点代表着对应于特定判断阈值的灵敏度/-特异性对。具有完美差别的测试(在结果的两种分布间没有重叠)具有穿过左上角的 ROC 图，其中真阳性分数为 1.0 或 100% (完美灵敏度)，并且假阳性分数为 0(完美特异性)。对于没有差别(对于两个群体分布结果相同)的测试，理论图为从左下角至右上角的 45°对角线。大多数的图处于这两种极端情况之间。(如果 ROC 图完全处于 45°对角线之下，这可以通过将“确定性”标准从“大于”颠倒至“小于”来容易地矫正，反之亦然。) 从定性上看，图越接近于左上角，则测试的总体准确度越高。

对实验室测试的准断准确度定量的一个方便目标是通过单一数字表示其表现性能。最普通的综合测定是 ROC 图下的面积。根据惯例，该面积常常≥0.5(如果不是这样，可以将判定标准颠倒使其符合)。数值在 1.0(两个群体的测试数值完全分开)和 0.5(两个群体的测试数值之间没有出现分布差别)范围内。面积不仅依赖于图的特定部分(如最接近对角线的点或者 90%特异性时的敏感度)，还依赖于整个图。这就是对 ROC 图是多么接近完美图(面积=1.0)的定量性、描述性表示。

还要求保护的是基本如上所述、特别是关于下面实施例的方法、用途和试剂盒。

下面提供的实施例、参考资料、序列表以及附图可以帮助理解本发明，但本发明的真正范围是所附权利要求所提出的范围。应当理解，在不违背本发明精神的情况下可以对所提出的方法进行修改。

实施例

为了鉴定由 INS-1 (Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. Endocrinology. 1992 年 1 月;130(1):167-78) 或 RINm5f 胰岛素瘤细胞(Praz GA, Halban PA, Wollheim CB, Blondel B, Strauss AJ, Renold AE. Regulation of

immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F) Biochem J. 1983 年 2 月，15;210(2):345-52)分泌的蛋白质，我们采用了两种方法：(i)通过差速沉降将细胞分级分离成亚细胞区室，然后使用 MALDI-TOF 质谱基于它们的肽质量指纹鉴定蛋白质，以及(ii)通过肝素色谱富集糖蛋白，然后进行一维 SDS-PAGE，并通过使用液相色谱串联质谱对来自蛋白质消化物的胰蛋白酶消化肽段分析来鉴定蛋白质(基于蛋白质序列标签鉴定)。

这两种纯化策略的组合可以使我们提高鉴定细胞区室以及培养细胞的培养液中的蛋白质的效率。

细胞培养

通过将β细胞慢性暴露于高葡萄糖/脂肪酸(FA)下再现β细胞衰竭的特征，表明高脂血症和高血糖症促成了β细胞的代偿失调。用 10 mM 葡萄糖和 0.5 mM 棕榈酸组合预处理 24 h 的 INS-1E 和 RINm5f 细胞用于这些实验。

实施例 1

通过 2DE 电泳对细胞区室中的信号蛋白进行作图和鉴定以及通过 MALDI-MS 鉴定

如别处所述(Peyrl A, Krapfenbauer K, Slave I 等，PROTEOMICS 3 (9): 1781-1800，2003 年 9 月; Fountoulakis M., Langen H., Anal Biochem. 250 (1997) 153-156)，将从每一细胞系制备的样品进行 2-DE 电泳。2-DE 电泳基本上如所报道(Langen, H., Roeder, D., Juranville, J.-F., Fountoulakis, M., Electrophoresis 1997, 18, 2085-2090)进行。使用膜过滤管(Millipore, Art. No. UFV4BGC25)将样品脱盐，并将 2.0 mg 应用于固定化的 pH 3-10 非线性梯度条(strip) (Amersham, Pharmacia Biotechnology, Uppsala, 瑞典)上，应用于条的碱性端和酸性端。在 200 V 将蛋白质聚焦，之后以 2 V/分钟将电压逐渐增加至 5000 V。在 5000 V 继续聚焦 24 h。在 12%聚丙烯酰胺凝胶(Biosolve, Walkinswaard, 荷兰)上开展第二维分离。

在容纳 12 块凝胶的 Ettan DALT II 系统(Amersham, Pharmacia Biotechnology, Uppsala, 瑞典)中，以 50 mA /凝胶将凝胶(180×200×1.5 mm)电泳。在含 5%磷酸的 50％甲醇中将蛋白质固定 12 h，之后用胶体考马斯蓝(Novex, San Diego, CA) 将凝胶染色 24 h。通过涵盖 10-200 kDa 范围的蛋白质标准(Gibco, Basel, 瑞士)确定分子量。使用了 IPG 条(Amersham Pharmacia, Uppsala, 瑞典)供应商提供的 PI 值。用 H_2O 将凝胶脱色，并在 AGFA DUOSCAN 光密度计中扫描。使用 Photoshop (Adobe)和 PowerPoint (Microsoft)记录电子图像。

MALDI-MS:

如所述(Langen, H., Roeder, D., Juranville, J.-F, Fountoulakis, M., Electrophoresis 1997, 18, 2085-2090)并稍加修改进行 MS 分析。简言之，将斑点切下、用 0.1 M 碳酸氢铵中的 30% (v/v)乙腈脱色并在真空离心(Speed vac)蒸发器中干燥。将干燥的凝胶片用含 50 ng 胰蛋白酶(Promega, Madison, WI, 美国)的 5 µl 5 mM 碳酸氢铵(pH 8.8)重新膨胀，离心 1 分钟并且在室温放置大约 12 h。消化之后，加入 5 µl 水，10 分钟后加入含有 0.3%三氟乙酸的 75%乙腈，离心 1 分钟并将内容物涡旋 20 分钟。对于 MALDI-MS，将 1.5 µl 所分离液体与 1 µl 的 50%乙腈、0.1% TFA(溶于水)中的 α-氰基肉桂酸混合并应用到 MALDI 靶上。在配备有反射器和延时引出的飞行时间质谱仪(Ultraflex, Bruker, Bremen, 德国)中分析样品。Des-Arg-1 缓激肽(Sigma)和 ACTH (18-38) (Sigma)用作标准肽。对样品进行内部校准。将肽质量与 SWISS- Prot 数据库中来自所有物种的所有肽的理论肽质量匹配。

MALDI 质谱的峰注释:

为了确定仪器的基线，使用低通中值参数样条过滤器(low-pass median parametric spline filter)将质谱数据两次过滤。来自基线的平滑剩余平均标准差用于评估数据中的仪器噪声水平。在基线校正和高于噪声的水平调整

中的数据尺度改变之后，与基线具有最大偏差的数据点用作产生非线性(Levenberg-Marquardt) 数据拟合程序以检测可能的肽峰。具体而言，拟合程序试图产生被峰高、分辨率和单一同位素质量参数化最佳拟合平均理论肽同位素分布。以通常方式通过跟踪σ值确定显著拟合的收敛性。在收敛之后，应用 bootstrap 程序使用带有 1/3 数据点随机交换的十六次重复来估计所确定参数的误差。从数据中扣除所得到的拟合，将拟合附近的噪声水平调整至外推噪声水平与来自峰值拟合的偏差的总和，并且重复该过程以便找到下一个峰，直到找到五次以上高于噪声水平的候选峰。当已经找到多于 50 个数据峰，则停止该过程。使用从检测到的内标准峰的线性外推，校正飞行时间与质量的零级和一级转换，并且估计了对于单一同位素质量的置信区间形成峰和标准的质量准确度。

光谱峰与计算机(in-silico)蛋白质消化物的概率匹配

将质谱所列的峰质量与全部蛋白质序列数据库的理论消化物相比较。对于每一理论消化物，计算了 $[1-\Pi(1-N\,P(pi))]^{cMatches}$，其中 N 为理论消化物中肽数量，P(pi)为与峰的单一同位素质量置信区间匹配的肽数量除以序列数据库中全部肽数量，并且 cMatches 为消化物和质谱间的匹配数。可见，该数值与在消化物和光谱间得到假阳性匹配的概率成比例。为了得到产生匹配的高显著性谱峰，将概率值进一步过滤。在第一轮鉴定之后，将同一条件下所获得的质谱的鉴定偏差用于第二和第三次飞行时间与质量的转换。所得到的质量值的绝对偏差大多数小于 10ppm。然后，将这些质量值用于最后一轮匹配，其中具有 Pmism 小于 0.01/NProteins (带有 Bonferoni 修正的 1%的显著水平)的所有匹配均可接受。

实施例 2

通过肝素柱从培养基中富集假定的分泌蛋白并通过 LC-MS 鉴定

大多数具有信号功能的蛋白质为糖基化的，基于该观察结果可见，肝素琼脂糖柱的特性使得其可以作为非常通用的工具来分离许多糖基化的

蛋白质，例如具有信号功能的蛋白质、生长因子、凝固蛋白和类固醇受体。肝素琼脂糖柱中的配体是自然存在的硫酸化糖胺聚糖，其是从猪肠粘膜天然蛋白聚糖提取的。肝素由交互的糖醛酸和 D-葡糖胺单位组成，其中大多数被一个或两个硫酸基团取代。固定化的肝素与蛋白质具有两种主要的相互作用模式。肝素可作为亲和配体，例如在与凝血因子的相互作用中。由于肝素具有阴离子的硫酸基团，所以其还是高容量的阳离子交换剂。在本专利中，使用注射器作为柱子。

对于这两种情况，推荐的洗脱条件包括使用 2M NaCl 的分级梯度增加离子强度，其中结合缓冲液为 10 mM 磷酸钠，pH ~7，并且洗脱缓冲液为 10 mM 磷酸钠，2 M NaCl，pH ~7。

样品制备:

将 25 ml 培养基于 4℃、10.000 g 离心 10 分钟，以去除细胞和其它不溶物质。调整样品溶液为结合缓冲液的组成成分。这可以通过加入 25 ml 的 20 mM 磷酸钠缓冲溶液(pH = 7)实现。在马上应用至柱上之前，将样品离心。对于肝素柱(HiTrap Heparin HP，1 ml，目录号 17-0406-01，Amersham)的卸载体积为每 1 ml 柱 5 ml。

通过肝素色谱富集蛋白质的操作程序:

1. 用结合缓冲液装满 25 ml 注射器。除此之外，还要去掉塞子并且使用所提供的结合器“drop to drop”将柱与注射器连接以避免向柱中注入空气。
2. 取下扭断(twist-off)端并用 10 倍柱体积的结合缓冲液冲洗肝素琼脂糖以平衡柱。
3. 然后如上所述制备样品，并且使用适合 luer 连接器的注射器将样品注入柱中。
4. 然后，用 5 倍体积的结合缓冲液洗涤柱，或者直至流出物中没有物质。

5. 使用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液通过分级梯度洗脱样品。

6. 最后，使用 POROS R2 柱将纯化的级分脱盐。

将从肝素柱洗脱的样品级分使用反相色谱(POROS R2, PerSeptive Biosytems)脱盐并使用真空离心法干燥。干燥之后，将样品溶解于下述的样品缓冲液中并通过 Bradford 方法(BioRad potein assay, BioRad)测定蛋白质含量。

1D 电泳:

上样和电泳条件:

将 15 μg 样品溶解于 20 μl 样品缓冲液(对于 10 μl 的总体积为: 样品, 2.5 μl NuPAGE LDS 样品缓冲液(4 ×), 1.0 μl NuPAGE 还原剂(10×)并用去离子水补足至 6.5μl)，并且在加到凝胶上之前，于 70℃加热 10 分钟。上面的缓冲液室中加入 200 ml 1×NuPAGE SDS 电泳缓冲液(通过向 950 ml 去离子水中加入 50 ml 20×NuPAGE MES SDS 电泳缓冲液来制备 MES SDS 电泳缓冲液)。将 200 μl/200 ml 的抗氧化剂作为还原剂加入到上面的缓冲液室中。最后，在下面的缓冲液室中加入 600 ml 1×NuPAGE SDS 电泳缓冲液并且在 10% BT 线性梯度聚丙烯酰胺凝胶(NuPAGE, Invitrogen)上室温 200 V 恒压电泳 35 分钟。

染色和脱色方法:

用含 5% (v/v)磷酸的 50% (v/v)甲醇将蛋白质固定 12 小时，之后用胶体考马斯蓝(Novex, San Diego, CA, 美国)染色 24 小时。用水将凝胶脱色，并用标准的平底扫描仪扫描。使用 Photoshop (Adope)和 PowerPoint (Microsoft) 软件处理图像。使用 Image Master 2D Elite 软件(Amersham Pharmacia Biotechnology)将蛋白质带定量。

LC-MS:

为了鉴定所分泌的蛋白质，我们还使用称作多维蛋白质鉴定技术(MudPIT)的 LC/MS 系统开展了蛋白质组学研究，LC/MS 系统组合了多维液相色谱和电喷雾离子化串联质谱。为了分离通过肝素柱富集的所消化蛋白质，在两阶段柱中将多维液相色谱方法与强阳离子交换(SCX)树脂和反相树脂相结合。每一 MudPIT 分析一式两份进行，并且分离是可重复性的，两次分析间差别在 0.5%之内。此外，已经表明，在复杂的肽混合物中最多的和最少的蛋白质/肽间的动态范围为 10000-1。通过改进样品制备和分离，该方法增强了通过鉴定级分(富集有分泌蛋白)中蛋白质进行的全面的蛋白质组学分析。MudPIT 系统包括 4 cm×50 μm(内径)×5 μm C18 microSPE 预柱(用于样品浓缩)和 85 cm×15 μm(内径)×3 μm C18 填充毛细管柱(用于对非常少数量的样品进行高效梯度反相纳米级 LC 分离)。micro-SPE 阶段允许以大约 8 μL/min 的速度将溶液加到 nanoLC 柱上，其中在<2 分钟内能加载 10 μL 溶液并且样品损失<5%(由于注射器和阀结合器)。在 10,000 psi 的恒压下进行分离。用 3 μm 长的颗粒填充的内径为 15 μm 的毛细管提供了大约 10^3 的分离峰容量。用零死体积的不锈钢接头连接至柱，该接头适合于由 10 μm(内径)×150 μm(外经)的熔融硅毛细管和内径大约 2 μm 的口构成的、用于洗脱肽高效电离的可更换 nanoESI 发送器。ESI 源与 FTICR MS 或者离子陷 MS/MS 相连用于肽/蛋白质的检测和鉴定。FTICR 质谱仪用于基于高准确度质量测定和使用相对保留时间(RRT)信息的单一阶段 MS，并且 Finnigan 离子陷质谱仪(LCQ XP, ThermoQuest Corp., San Jose, CA)用于 MS/MS。

实施例 3

抗 β 细胞衰竭标志 IPF-1 抗体的产生

产生了抗 β 细胞衰竭标志 IPF-1 的多克隆抗体，用于通过免疫检测分析法(例如 Western 印迹和 ELISA)测定血清和血浆和体液中的 IPF-1 水平。

在大肠杆菌(E. coli)中的重组蛋白表达:

为了产生抗 IPF-1 的抗体，重组表达了蛋白质以得到抗原。应用 RTS 100 表达系统和大肠杆菌的组合进行表达。在第一步中，分析 DNA 序列，并使用“ProteoExpert RTS E.coli HY”系统得到关于高产量 cDNA 沉默突变体和各个 PCR 引物序列的推荐。这是一种基于互联网的商业服务(www.proteoexpert.com)。使用所推荐的引物对、“RTS 100 E. coli Linear Template Generation Set, His-tag” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国，目录号 3186237)从 cDNA 产生线性 PCR 模板并对编码 IPF-1 蛋白质的核苷酸序列进行体外转录和表达。为了进行 Western 印迹检测和后续纯化，所表达的蛋白质包含 His 标签。鉴定了最好的表达载体。从 PCR 至表达以及检测的所有步骤均根据生产商的说明书进行。按照生产商的说明书，将含有必需的 T7 调节区(启动子、核糖体结合位点和 T7 终止子)的各个 PCR 产物克隆进入 pBAD TOPO®载体(Invitrogen, Karlsruhe, 德国，目录号 K 4300/01)。为了使用 T7 调节序列进行表达，将构建体转化进入大肠杆菌 BL 21 (DE 3) (Studier, F.W.等，Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89)并将所转化细菌培养于 1l 培养基中以表达蛋白质。

按照标准程序在 Ni 螯合柱上纯化 His-IPF-1 融合蛋白。简言之，将 1 l 含有表达 His-IPF-1 融合蛋白的表达载体的细菌培养物离心。将细胞沉淀重悬于裂解缓冲液(含有磷酸盐，pH 8.0, 7 M 氯化胍，咪唑和硫甘油)中并使用 Ultra-Turrax®匀浆。通过高速离心去除不溶物质，并且上清液应用到 Ni 螯合色谱柱上。用几倍柱床体积的裂解缓冲液洗涤柱，然后用含有磷酸盐(pH 8.0)和尿素的缓冲液洗涤。最后，在酸性条件下用包含 SDS 的磷酸盐缓冲液将结合的抗原洗脱下来。

抗蛋白质 IPF-1 的单克隆抗体的产生：

a) 免疫小鼠

用 100 µg IPF-1 经腹膜内初次免疫 12 周龄 A/J 小鼠。6 周后，以每月一次的间隔再次经腹膜内免疫两次。在该过程中，向每只小鼠施用 100 µg 吸附至氢氧化铝和 10^9 百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)的 IPF-1。之后，分

别在融合前的第 3 天和第 2 天使用 100 μg 溶于 PBS 缓冲液中的 IPF-1 经静脉进行最后两次免疫。

b) 融合和克隆

按照 Galfre, G.和 Milstein, C(Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46)的方法将按照 a)所免疫小鼠的脾脏与骨髓瘤细胞融合。在该过程中，大约 1×10^8 个免疫小鼠脾细胞与 2×10^7 个骨髓瘤细胞(P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580)混合并离心(4℃，300 g，10 分钟)。然后，用不含胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养基洗涤细胞一次并在 50 ml 圆锥管中于 400 g 再次离心。丢弃上清液，通过敲打使细胞沉淀逐渐松散，加入 1 ml PEG (分子量为 4000, Merck, Darmstadt)并用移液管上下吸吹混合。于 37℃水浴 1 分钟之后，于室温下在 4-5 分钟内逐滴加入 5 ml 不含 FCS 的 RPMI 1640。然后，在大约 1 分钟内逐滴加入 5 ml 含 10% FCS 的 RPMI 1640，完全混合，用培养基(RPMI 1640+10% FCS)加至 50 ml，随后在 4℃下于 400 g 离心 10 分钟。将所沉淀细胞置于含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中，并散布于次黄嘌呤-重氮丝氨酸选择培养基(100 mmol/l 次黄嘌呤, 1 μg/ml 重氮丝氨酸，溶于 RPMI 1640+10% FCS)中。向培养基中加入 100 U/ml 的白细胞介素 6 作为生长因子。大约 10 天后，检测初级培养物是否含有特异抗体。通过荧光激活的细胞分选仪的方法将 IPF-1 阳性的初级培养物克隆入 96-孔细胞培养板中。在该过程中，再次加入 100 U/ml 的白细胞介素 6 作为生长添加剂。

c) 从细胞培养上清液中分离免疫球蛋白

以 1×10^5 个细胞/ml RPMI 1640 培养基(含 10% FCS)的密度将杂交瘤细胞接种，并在发酵罐(Thermodux Co., Wertheim/Main, 型号 MCS-104XL, 定购号 144-050)中增殖 7 天。

在培养上清液中得到了平均浓度为 100 μg/ml 的单克隆抗体。通过蛋白质化学的常规方法(例如根据 Bruck, C 等，Methods in Enzymology 121

(1986) 587-695)从培养上清液中纯化该抗体。

多克隆抗体的产生:

a) 免疫

为了进行免疫，新鲜制备蛋白质溶液(100 µg/ml 蛋白质 IPF-1)和弗氏完全佐剂比例为 1:1 的乳液。在第 1、7、14 以及 30、60 和 90 天用 1 ml 乳液免疫每一只兔子。如实施例 3 和 4 所述，抽取血液并将所得到的抗 IPF-1 血清用于进一步实验。

b) 通过使用辛酸和硫酸铵顺序沉淀从兔血清中纯化 IgG (免疫球蛋白 G)

用 4 体积的醋酸盐缓冲液(60 mM, pH 4.0)将 1 体积的兔血清稀释。用 2 M Tris 碱将 pH 调节至 4.5。在剧烈搅动的情况下，将辛酸(25 µl/ml 稀释样品)逐滴加入。30 分钟后离心(13,000×g, 30 分钟, 4℃)样品，弃沉淀并收集上清液。加入 2 M Tris 碱将上清液的 pH 调节至 7.5 并过滤(0.2 µm)。

通过在剧烈搅动的情况下将 4 M 硫酸铵逐滴加入直至 2 M 的终浓度，将上清液中的免疫球蛋白沉淀出来。通过离心(8000×g, 15 分钟, 4℃)收集所沉淀的免疫球蛋白。

弃去上清液。将沉淀溶于 10 mM NaH_2PO_4/NaOH, pH 7.5, 30 mM NaCl 中并彻底透析。将透析物离心(13,000×g, 15 分钟, 4℃)并过滤(0.2 µm)。

多克隆兔 IgG 的生物素化

在 10 mM NaH_2PO_4/NaOH, pH 7.5, 30 mM NaCl 中将多克隆兔 IgG 调至 10 mg/ml。以每 ml IgG 溶液 50µl 的比例加入生物素-N-羟基琥珀酰亚胺(以 3.6 mg/ml 的浓度溶于 DMSO)。室温 30 分钟后，样品通过 Superdex 200 (10 mM NaH_2PO_4/NaOH, pH 7.5, 30 mM NaCl)色谱分离。收集含有生物素化 IgG 的级分。按照同一程序将单克隆抗体生物素化。

多克隆兔 IgG 的地高辛化

在 10 mM NaH_2PO_4/NaOH, 30 mM NaCl, pH 7.5 中将多克隆兔 IgG 调至 10 mg/ml。以每 ml IgG 溶液 50μl 的比例加入地高辛-3-O-甲羰基-ε-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(Roche Diagnostics, Mannheim, 德国,目录号 1 333 054) (以 3.8 mg/ml 的浓度溶于 DMSO)。室温 30 分钟后，样品通过 Superdex® 200 (10 mM NaH_2PO_4/NaOH, pH 7.5, 30 mM NaCl)色谱分离。收集含有地高辛化 IgG 的级分。按照同一程序将单克隆抗体地高辛化标记。

实施例 4

Western 印迹

将通过肝素柱从培养基富集和分离的蛋白质样品(上述)溶解于由 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 1 % SDS 组成的样品缓冲液中，并于 4℃，12,000 g 离心 10 分钟。通过 Bradford 方法，使用从广范围已知牛血清白蛋白产生的标准曲线上测定上清液的蛋白质浓度。用样品缓冲液(60 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0.1% 溴酚兰, 25% 甘油和 14.4 mM 2-巯基乙醇, pH 6.8)固定样品并在 70℃孵育 5 分钟之后，用 12.5% 均质 ExcelGel SDS 凝胶(Amersham Bioscience)分离样品并电转移至硝化纤维素膜上。在封闭溶液(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 和 5% 脱脂奶粉)中室温孵育之后，将膜与兔抗大鼠的抗体室温孵育 2 小时。用洗涤溶液(0.3% Tween 20，溶于 tris 缓冲盐)洗涤 10 分钟(3 次)之后，将膜分别与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG (H+L)、抗小鼠 IgGi 和抗小鼠 IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)室温孵育 1 小时。将膜洗涤 10 分钟(3 次)，并使用增强化学发光试剂(Western Lightning TM, PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA)按照生产商的方法在 X-光胶片上将抗原-抗体复合物显色。

实施例 5

测定人血清和血浆样品中 IPF-1 的 ELISA

为了检测人血清或血浆中的 IPF-1，开发了夹心 ELISA。为了捕获和

检测抗原，将抗 IPF-1 多克隆抗体(见实施例 2)等分试样分别与生物素和地高辛缀合。

链亲和素包被的 96-孔微量滴定板与 100 µl 生物素化抗 IPF-1 多克隆抗体孵育 60 分钟，多克隆抗体以 10 µg/ml 的浓度溶于 10 mM 磷酸盐，pH 7.4, 1% BSA, 0.9% NaCl 和 0.1% Tween 20 中。孵育之后，用 0.9% NaCl，0.1% Tween 20 将板洗涤三次。然后与作为标准抗原的系列稀释的重组蛋白(见实施例 2)或者与来自患者的稀释的血浆样品孵育 2 小时。在 IPF-1 结合之后，用 0.9% NaCl，0.1% Tween 20 洗涤板三次。将板与 100 µl 地高辛化抗 IPF-1 多克隆抗体孵育 60 分钟以特异性检测结合的 IPF-1，其中地高辛化抗 IPF-1 多克隆抗体以 10 µg/ml 的浓度溶于 10 mM 磷酸盐，pH 7.4, 1% BSA, 0.9% NaCl 和 0.1% Tween 20 中。之后，洗涤板三次以去除未结合的抗体。在下一步骤中，将孔与 10 mM 磷酸盐，pH 7.4, 1% BSA, 0.9% NaCl 和 0.1% Tween 20 中的 20 mU/ml 抗地高辛-POD 缀合物(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国,目录号 1633716)孵育 60 分钟。随后，用同样的缓冲液将板洗涤三次。为了检测抗原-抗体复合物，将孔与 100 µl ABTS 溶液(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国，目录号 11685767)孵育并在 30-60 分钟之后用 ELISA 读出器测定 405 nm 下的 OD。

实施例 6

患者数据的统计学分析

通过测定 10 位依赖于外源胰岛素注射的糖尿病患者中新标志 IPF-1 的水平并与 10 位被证明具有正常 β 细胞功能的患者中的 IPF-1 水平相比较，来评估新标志 IPF-1 的临床效用。通过标准 Student's t-检验进行统计学分析，数值<0.05 被认为具有显著性差异。

<110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 作为β细胞衰竭的标志/靶标的IPF-1

<130> case 22665

<160> 1

<170> PatentIn 3.2版

<210> 1
<211> 283
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 胰岛素启动因子 1
<222> (1)..(283)
<223> 登录号：P52945

<400> 1

Met Asn Gly Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp
1 5 10 15

Pro Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Ser Ala Ser Pro
20 25 30

Pro Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro His
35 40 45

Pro Phe Pro Gly Ala Leu Gly Ala Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp
50 55 60

Ile Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Asp Asp Pro Ala Val Ala
65 70 75 80

His Leu His His His Leu Pro Ala Gln Leu Ala Leu Pro His Pro Pro
85 90 95

Ala Gly Pro Phe Pro Glu Gly Ala Glu Pro Gly Val Leu Glu Glu Pro
100 105 110

Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala His
115 120 125

```
Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Ala Ala Glu Pro Glu
    130                 135                 140

Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu
145                 150                 155                 160

Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg Arg
                165                 170                 175

Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile
            180                 185                 190

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys Lys
        195                 200                 205

Arg Gly Gly Gly Thr Ala Val Gly Gly Gly Gly Val Ala Glu Pro Glu
    210                 215                 220

Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Pro
225                 230                 235                 240

Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala
                245                 250                 255

Arg Glu Gly Arg Leu Pro Pro Gly Leu Ser Ala Ser Pro Gln Pro Ser
            260                 265                 270

Ser Val Ala Pro Arg Arg Pro Gln Glu Pro Arg
        275                 280
```