



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105814195 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201480065134.X

F·E·克鲁斯

(22)申请日 2014.11.26

U·施罗泽尔-施瑞哈特

(30)优先权数据

2013-244972 2013.11.27 JP

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.27

(51)Int.Cl.

G12N 5/079(2010.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/081917 2014.11.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/080297 EN 2015.06.04

(71)申请人 京都府公立大学法人

地址 日本京都府京都市

申请人 学校法人同志社

千寿制药株式会社

(72)发明人 小泉范子 奥村直毅 木下茂

权利要求书1页 说明书33页

序列表67页 附图13页

(54)发明名称

层粘连蛋白应用于角膜内皮细胞培养

(57)摘要

本发明提供了培养角膜内皮细胞的方法。更具体而言,本发明提供了用于培养角膜内皮细胞或使其生长的组合物,其包含至少一种由在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白及其片段组成的试剂。具体而言,本发明可包括层粘连蛋白511($\alpha 5\beta 1 \gamma 1$)和层粘连蛋白512($\alpha 5\beta 2 \gamma 1$)。本发明还提供了用于角膜内皮细胞的培养容器,其被本发明的组合物包被。此外,本发明提供了用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用本发明的组合物或容器以培养角膜内皮细胞的步骤。

1. 一种用于培养角膜内皮细胞或使其生长的组合物,其包含至少一种由在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白及其片段组成的试剂。
2. 权利要求1的组合物,其中所述层粘连蛋白包含层粘连蛋白511($\alpha 5\beta 1 \gamma 1$)和层粘连蛋白512($\alpha 5\beta 2 \gamma 1$)。
3. 权利要求1的组合物,其中所述片段具有角膜内皮细胞的细胞粘附能力。
4. 权利要求1的组合物,其中所述试剂是层粘连蛋白511、层粘连蛋白521或层粘连蛋白511-E8片段。
5. 权利要求1的组合物,其中所述角膜内皮细胞来自人。
6. 一种用于培养角膜内皮细胞的培养基,其包含权利要求1的组合物。
7. 一种用于角膜内皮细胞的培养容器,其被权利要求1的组合物包被。
8. 一种用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用权利要求1的组合物的步骤。
9. 一种用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用权利要求6的培养基的步骤。
10. 一种用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用权利要求7的容器的步骤。

层粘连蛋白应用于角膜内皮细胞培养

技术领域

[0001] 本发明涉及层粘连蛋白作为培养角膜内皮细胞培养物或使其生长的组分的用途。具体而言,本发明涉及用于角膜内皮细胞的培养或生长的包含层粘连蛋白的组合物、容器、培养方法等。

背景技术

[0002] 出生时人角膜内皮细胞以约3000细胞/平方毫米的密度存在。但是,一旦损伤,人角膜内皮细胞不具有再生的能力。因此,角膜内皮细胞被认为难以培养。由于在移植技术中难以培养角膜内皮细胞或使其生长的现状,对角膜内皮的治疗或手术实际上是不可能的。在日本,角膜捐赠短缺,每年国内进行的角膜移植约有1700例,相比之下,约2600名患者在等待角膜移植。

[0003] [引用文献列表]

[0004] [专利文献]

[0005] [PTL 1]日本公开No.2011-78370

[0006] [PTL 2]WO 2013/047763

[0007] [PTL 3]WO 2011/024070

[0008] [PTL 4]WO 2010/140464

[0009] [非专利文献]

[0010] [NPTL 1]Journal of the Medical Society of Toho University Vol.56, No.1,Page.39(2009年1月1日)

[0011] [NPTL 2]Nippon Ganka Gakkai Zasshi[Journal of Japanese Ophthalmological Society]Vol.105,extra edition.Page.196(2001年3月15日)

[0012] [NPTL 3]J Biol Chem.Sep 13,2013.[在印刷前以电子文档公开]

[0013] [NPTL 4]PLoS One.2013;8(1):e53648.doi:10.1371/journal.pone.0053648.Epub Jan 7,2013

[0014] [NPTL 5]Cell Adh Migr.Jan-Feb 2013;7(1):142-9.doi:10.4161/cam.22125.Epub Oct 17,2012

[0015] [NPTL 6]J Cell Biochem.Feb 15,2007;100(3):545-56.

发明内容

[0016] [技术方案]

[0017] 本申请的发明人已通过发现特定的层粘连蛋白可用于培养角膜内皮并使其生长而完成本发明。因此,本发明提供了以下代表性的项(item):

[0018] (1)用于培养角膜内皮细胞或使其生长的组合物,其包含至少一种由在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白及其片段组成的试剂。

[0019] (2)项1的组合物,其中所述层粘连蛋白包含层粘连蛋白511($\alpha 5\beta 1 \gamma 1$)和层粘连蛋

白512($\alpha 5\beta 2 \gamma 1$)。

[0020] (3)项1或2的组合物,其中所述片段具有角膜内皮细胞的细胞粘附能力。

[0021] (4)项1-3中任一项的组合物,其中所述试剂是层粘连蛋白511、层粘连蛋白521或层粘连蛋白511-E8片段。

[0022] (5)项1-4中任一项的组合物,其中所述角膜内皮细胞来自人。

[0023] (6)用于培养角膜内皮细胞的培养基,其包含项1-5中任一项的组合物。

[0024] (7)用于角膜内皮细胞的培养容器,其包被有项1的组合物。

[0025] (8)用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用项1-5中任一项的组合物步骤。

[0026] (9)用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用项6的培养基的步骤。

[0027] (10)用于培养角膜内皮细胞的方法,包括使用项7的容器的步骤。

[0028] 应理解,可结合使用以上提及的特征。在阅读和理解以下提供的必要的对本发明的详述之后,本领域技术人员将理解本发明的其他实施方案和优势。

[0029] [发明的有益效果]

[0030] 本发明提供了使得能够进行角膜内皮细胞(特别是人角膜内皮细胞)的培养、维持及生长的组分。

附图说明

[0031] [图1]图1是示出了人角膜内皮细胞中多种层粘连蛋白链的mRNA表达的图。该图从左侧开始示出了分子量标记物、层粘连蛋白 $\alpha 1$ 链、 $\alpha 2$ 链、 $\alpha 3$ 链、 $\alpha 4$ 链、 $\alpha 5$ 链、 $\beta 1$ 链、 $\beta 2$ 链、 $\beta 3$ 链、 $\beta 4$ 链、 $\gamma 1$ 链、 $\gamma 2$ 链和 $\gamma 3$ 链。

[0032] [图2]图2示出了人角膜内皮细胞中多种整联蛋白(integrin)链的mRNA表达。上行从左侧开始示出了整联蛋白 $\alpha 1$ 链、 $\alpha 2$ 链、 $\alpha 3$ 链、 $\alpha 4$ 链、 $\alpha 5$ 链、 $\alpha 6$ 链、 $\alpha 7$ 链、 $\alpha 8$ 链、 $\alpha 9$ 链、 $\alpha 10$ 链、 $\alpha 11$ 链、 αE 链、 αV 链和 αL 链。下行从左侧开始示出了整联蛋白 αM 链、 αX 链、 αD 链、 αIIb 链、 $\beta 1$ 链、 $\beta 2$ 链、 $\beta 3$ 链、 $\beta 4$ 链、 $\beta 5$ 链、 $\beta 6$ 链、 $\beta 7$ 链和 $\beta 8$ 链。

[0033] [图3A]图3A-图3C共同示出了通过流式细胞术对人角膜内皮细胞中多种整联蛋白链的表达分析。图3A示出了通过流式细胞术对人角膜内皮细胞中多种整联蛋白链的表达分析。上行从左侧开始示出了整联蛋白 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 。下行左侧开始示出了整联蛋白 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 。

[0034] [图3B]图3B也示出了通过流式细胞术对人角膜内皮细胞中多种整联蛋白链的表达分析。上行从左侧开始示出了整联蛋白 αE 、 αV 和 αL 。下行从左侧开始示出了整联蛋白 αM 、 αX 和 αIIb (CD41a)。

[0035] [图3C]图3C也示出了通过流式细胞术对人角膜内皮细胞中多种整联蛋白链的表达分析。上行从左侧开始示出了整联蛋白 αIIb (CD41a)、 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 。下行从左侧开始示出了整联蛋白 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 和 $\beta 7$ 。

[0036] [图4]图4是示出了层粘连蛋白511和层粘连蛋白521促使人角膜内皮细胞的细胞粘附的图像。上行从左侧开始示出了层粘连蛋白511、层粘连蛋白521和层粘连蛋白211。下行从左侧开始示出了无包被、FNC包被和明胶包被。比例尺为50 μm 。

[0037] [图5]图5是示出了层粘连蛋白511和层粘连蛋白521促进人角膜内皮细胞的细胞粘附的图表。Y轴表示细胞数目(%对照)。X轴从左侧开始表示无包被(对照)、层粘连蛋白511、层粘连蛋白521、层粘连蛋白211、FNC包被、明胶包被和层粘连蛋白511-E8片段。

[0038] [图6]图6是示出了层粘连蛋白511-E8片段促进人角膜内皮细胞的细胞粘附的图表。Y轴表示细胞数目(%对照)。X轴从左侧开始表示无包被(对照)、层粘连蛋白511-E8片段的每种浓度(依次为:0.001 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$),以及FNC包被混合物。

[0039] [图7]图7是示出了层粘连蛋白511、层粘连蛋白521和层粘连蛋白511-E8片段促进人角膜内皮细胞的细胞粘附的图表。Y轴表示与对照相比的BrdU吸光度的相对值(%)。X轴从左侧开始表示无包被(对照)、层粘连蛋白511、层粘连蛋白521、层粘连蛋白211、FNC包被混合物和层粘连蛋白511-E8片段(从左侧开始:0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

[0040] [图8]图8是培养第2天时的相差显微镜的图像,示出了层粘连蛋白511和层粘连蛋白521增强了培养人角膜内皮细胞的效率。左上图表示层粘连蛋白511,右上图表示层粘连蛋白521,左下图表示层粘连蛋白211,右下图表示无包被。比例尺(bar)表示100 μm 。

[0041] [图9]图9是培养第20天时的相差显微镜的图像,表明层粘连蛋白511和层粘连蛋白521使得能够以高细胞密度培养人角膜内皮细胞。左上图表示层粘连蛋白511,右上图表示层粘连蛋白521,左下图表示层粘连蛋白211,右下图表示无包被。比例尺表示100 μm 。

[0042] [图10]图10是示出了层粘连蛋白511和层粘连蛋白521使得能够以高细胞密度培养人角膜内皮细胞的图像。红色染料表示 Na^+/K^+ -ATP酶,蓝色染料表示DAPI。左上图表示层粘连蛋白511,右上图表示层粘连蛋白521,左下图表示层粘连蛋白211,右下图表示无包被。比例尺表示100 μm 。

[0043] [图11]图11是示出了层粘连蛋白511和层粘连蛋白521使得能够以高细胞密度培养人角膜内皮细胞的图像。绿色染料表示ZO-1,蓝色染料表示DAPI。左上图表示层粘连蛋白511,右上图表示层粘连蛋白521,左下图表示层粘连蛋白211,右下图表示无包被。比例尺表示100 μm 。

[0044] [图12]图12是表明甚至在其中培养基中添加了层粘连蛋白521和层粘连蛋白511-E8片段的培养物中人角膜内皮细胞的细胞粘附也得到促进的图表。Y轴表示细胞数目(%对照)。X轴从左侧开始表示无包被(对照)、层粘连蛋白521的每种浓度(依次为:1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、层粘连蛋白511-E8片段的每种浓度(依次为:1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$),以及FNC包被混合物。

具体实施方式

[0045] 本发明在下文中描述。除非另有明确说明,在本说明书通篇中,单数形式的表述应当被理解为包含所述概念的复数形式。因此,除非另有明确说明,单数形式的冠词(例如,英语中的“一”、“一个”、“所述”等)应当被理解为包含所述概念的复数形式。此外,除非另有明确说明,本文使用的术语应当被理解为是以本领域中常规使用的含义使用的。因此,除非另有定义,本文使用的所有具体的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。如果出现矛盾,以本发明的说明书(包括定义)为准。

[0046] 定义

[0047] 本文使用的“角膜内皮细胞”是以本领域中常规使用的含义使用的。角膜是组成眼的薄层组织之一。角膜是透明的并且位于最接近于外部环境的部位。人的角膜被认为由五层组成,从外侧(身体表面)开始依次为角膜上皮、前弹性层、固有质(substantia propia)、

后弹性层(角膜内皮基底膜)和角膜内皮。具体地,除非另有说明,上皮和内皮以外的部分可一起被称为“角膜基质”并在本文中如此命名。本文使用的“HCEC”是人角膜内皮细胞的缩写。应理解,对于本发明中使用的角膜内皮细胞,可使用天然存在的细胞,以及分化自干细胞的细胞(即来自iPS的分化诱导细胞)等。

[0048] 本文使用的“分离的”是指在正常环境中与细胞天然在一起的物质的量至少减少的状态,优选基本上没有这类物质的状态。因此,分离的细胞、组织等是指基本上没有天然环境中与所述细胞在一起的其他物质(例如,其他细胞、蛋白质或核酸)的细胞。

[0049] 本文使用的“角膜内皮制剂”是指包含角膜内皮或角膜内皮细胞的任何制剂或药剂。因为可对用本发明的方法产生和培养的角膜内皮细胞进行制剂,使用通过本发明的方法培养和产生的角膜内皮细胞可制备角膜内皮制剂/试剂。

[0050] 本文使用的“胞外基质”也被称为(ECM),其是指存在于体细胞——不管所述细胞是上皮细胞或非上皮细胞——之间的物质。因为胞外基质通常是由细胞产生,胞外基质是生物材料。胞外结构域不但参与支持组织,还构成所有体细胞生存所需的内部环境。胞外基质通常是由结缔组织细胞产生。但是,一些胞外基质是由具有基底膜的细胞(例如上皮细胞或内皮细胞)自身分泌。胞外基质大致分成纤维组分和填充纤维组分之间间隙的基质。所述纤维组分包括胶原纤维和弹性纤维。所述基质的基本成分是葡糖胺聚糖(酸性粘多糖),其大多数通过与非胶原蛋白结合而形成蛋白聚糖(酸性粘多糖-蛋白复合物)大分子。此外,基质包括基底膜中的层粘连蛋白、弹性纤维周围的微纤维、纤维、以及细胞表面的糖蛋白(例如纤维连接蛋白)。在特化的组织中,基础结构是相同的。例如,在透明软骨中,由成软骨细胞产生软骨基质,其包含特征性大量的蛋白聚糖;在骨中,由成骨细胞产生骨基质,在这里发生钙质沉着。在这方面,组成胞外基质的代表性物质包括但不限于胶原蛋白I、胶原蛋白III、胶原蛋白IV、胶原蛋白V、弹性蛋白、胶原蛋白VIII、玻璃体结合蛋白、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、凝血酶敏感蛋白,以及蛋白聚糖(例如,核心蛋白多糖、双糖链蛋白多糖、纤调蛋白聚糖、基膜聚糖(lumican)、透明质酸、聚集蛋白聚糖等)。本发明中可使用在细胞粘附中起作用的多种胞外基质。

[0051] 本文使用的“层粘连蛋白”是组成胞外基质的基底膜的蛋白。层粘连蛋白促进多细胞性/组织构建及其维持、细胞粘附、细胞迁移和细胞生长,并且与癌细胞关系密切。层粘连蛋白被认为在胚细胞样转化(blastogenesis)的早期(2细胞期)表达。层粘连蛋白是由各一条 α 链、 β 链和 γ 链组成的异质三聚体。对于层粘连蛋白的命名,已知按照发现次序的命名法(层粘连蛋白-1,层粘连蛋白-2等)。但是,因为未考虑与亚基的对应关系,本文使用一种更新的命名法,在该方法中共同描述亚类 α 、 β 或 γ (三位数编号,百位数表示为 α ,十位数表示为 β ,个位数表示为 γ)的名称。在 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 和 $\gamma 1$ 的情况下,这样的层粘连蛋白被称为层粘连蛋白111。对于层粘连蛋白,已发现五种类型的 α 链、三种类型的 β 链和三种类型的 γ 链。因此,理论上的最大组合数为 $5 \times 3 \times 3 = 45$,可能存在45种层粘连蛋白分子。但是,已认为并非所有组合都是天然存在的。 α 链的每种亚基被称为LAMA1、LAMA2、LAMA3、LAMA4或LAMA5, β 链的每种亚基被称为LAMB1、LAMB2或LAMB3, γ 链的每种亚基被称为LAMC1、LAMC2或LAMC3。用于本发明中的层粘连蛋白可以是天然形式的蛋白或是其中一个或多个氨基酸残基被修饰而同时保持生物活性(特别是促进细胞粘附的活性)的修饰形式的蛋白。此外,本发明的层粘连蛋白的来源、其产生方法等不受限制,只要所述层粘连蛋白具有本文所述的特征。因此,

本发明中所使用的层粘连蛋白可以是任何天然存在的蛋白、通过基因工程方法从重组DNA表达的蛋白,或化学合成的蛋白。用于本发明中的层粘连蛋白的来源不受特别限制,但是优选地来自人。当出于获得医学材料的目的来培养人细胞时,优选地但不限于使用来自人的层粘连蛋白,以避免使用来自其他动物的材料。

[0052] 已知层粘连蛋白的结合分子。 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 2$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 7\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha v\beta 8$ 是已知为层粘连蛋白受体的整联蛋白。

[0053] 下表描述了代表性的层粘连蛋白及对其进行的解释。

[0054]

三聚体组成 (名称)	主要表达位点	整联蛋白结合特异性
$\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (层粘连蛋白-1)	胎儿组织	$\alpha 6\beta 1$
$\alpha 1\beta 2\gamma 1$ (层粘连蛋白-3)		
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$ (层粘连蛋白-2)	肌肉, 神经 (施旺细胞)	$\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$
$\alpha 2\beta 2\gamma 1$ (层粘连蛋白-4)		
$\alpha 2\beta 1\gamma 3$ (层粘连蛋白-12)		
$\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (层粘连蛋白-5)	皮肤, 肺和其他表皮组织	$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$
$\alpha 3\beta 1\gamma 1$ (层粘连蛋白-6)		
$\alpha 3\beta 2\gamma 1$ (层粘连蛋白-7)		
$\alpha 4\beta 1\gamma 1$ (层粘连蛋白-8)	血管	$\alpha 6\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$
$\alpha 4\beta 2\gamma 1$ (层粘连蛋白-9)		

[0055]

$\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (层粘连蛋白-10)	血管, 肝, 肺和其他表皮	$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$
$\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (层粘连蛋白-11)	组织	

[0056] 本文使用的“ $\alpha 1$ 链”(LAMA1)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMA1、LAMA、S-LAM- α 等。对于人LAMA1,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_005559和NP_005550。使用登录号150320鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ $\alpha 1$ 链”或“LAMA1”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0057] 本文使用的“ $\alpha 2$ 链”(LAMA2)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMA2、LAMM等。对于人LAMA2,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_000426和NP_000417。使用登录号156225鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ $\alpha 2$ 链”或“LAMA2”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0058] 本文使用的“ α 3链”(LAMA3)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMA3、BM600、E170、LAMNA、LOCS、lama3a等。对于人LAMA3,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_000227和NP_000218。使用登录号600805鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ α 3链”或“LAMA3”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0059] 本文使用的“ α 4链”(LAMA4)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMA4、LAMA3、LAMA4*-1、CMD1JJ等。对于人LAMA4,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_001105206和NP_001098676。使用登录号600133鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ α 4链”或“LAMA4”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0060] 本文使用的“ α 5链”(LAMA5)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMA5、KIAA1907等。对于人LAMA5,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_005560和NP_005551。使用登录号601033鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ α 5链”或“LAMA5”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0061] 本文使用的“ β 1链”(LAMB1)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMB1、CLM、LIS5等。对于人LAMB1,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_002291和NP_002282。使用登录号150240鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ β 1链”或“LAMB1”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0062] 本文使用的“ β 2链”(LAMB2)(层粘连蛋白S)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMB2、LAMS、NPHS5等。对于人LAMB2,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_002292和NP_002283。使用登录号150325鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ β 2链”或“LAMB2”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0063] 本文使用的“ β 3链”(LAMB3)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMB3、BM600-125KDA、LAM5、LAMNB1等。对于人LAMB3,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_000228和NP_000219。使用登录号150310鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ β 3链”或“LAMB3”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0064] 本文使用的“ γ 1链”(LAMC1)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMC1、LAMB2等。对于人LAMC1,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_002293和NP_002284。使用登录号150290鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ γ 1链”或

“LAMC1”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0065] 本文使用的“ γ 2链”(LAMC2)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMC2、B2T、BM600、CSF、EBR2、EBR2A、LAMB2T、LAMNB2等。对于人LAMC2,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_005562和NP_005553。使用登录号150292鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ γ 2链”或“LAMC2”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0066] 本文使用的“ γ 3链”(LAMC3)是胞外基质中细胞粘附分子的层粘连蛋白的亚基,被称为LAMC3、OCCM等。对于人LAMC3,将所述基因和蛋白的序列分别登记为NCBI登记号NM_006059和NP_006050。使用登录号604349鉴定OMIM。当用于本文的目的时,应理解“ γ 3链”或“LAMC3”不仅意指具有以具体的序列号或登录号所述的氨基酸序列的蛋白(或编码所述蛋白的核酸),还意指其功能活性衍生物、功能活性片段或同源物,或由在高或低严格条件下与编码蛋白的核酸杂交的核酸所编码的突变体。

[0067] 本文使用的“在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白”是指在角膜内皮细胞中以正常状态表达或优选地在蛋白水平显著表达的层粘连蛋白基因类型。通过本文的分析确认 α 5、 β 1、 β 2和 γ 1表达(图2)。因此,确认了至少层粘连蛋白511和层粘连蛋白521在角膜内皮细胞中表达。Dev.Dyn.218,213-234,2000和J.Biol.Chem.277(15),12741-12748,2002详细描述了层粘连蛋白511。因此,这些文件中公开的内容以引用的方式纳入本文。对于层粘连蛋白511等,可使用可商购的蛋白。例如,层粘连蛋白511和层粘连蛋白521的重组蛋白是可商购的并可获自BioLamina AB。

[0068] 本文使用的基因、多核苷酸、多肽等的“表达”是指基因经历某种体内作用而成为另一种形式。优选地,所述术语是指基因、多核苷酸等经转录和翻译而成为多肽形式。但是,基因、多核苷酸等经转录产生mRNA可以是一种表达形式。仍然优选地,这样的多肽形式可以是接受翻译后加工的那些(在本文中被称为衍生物)。例如,可通过任何方法确定每种层粘连蛋白链的表达水平。具体地,可通过评估每种层粘连蛋白链的mRNA的量,每种层粘连蛋白链的蛋白的量,以及每种层粘连蛋白链的蛋白的生物活性来发现每种层粘连蛋白链的表达水平。可通过本文所述的方法来确定每种层粘连蛋白链的mRNA或蛋白的量。

[0069] 本文使用的“功能等价物”是指具有与原来的主体相同的目标功能但是结构不同的任何物质。因此,应理解,当提及“由层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链或其功能等价物组成的组”或“由层粘连蛋白、每种层粘连蛋白链及其功能等价物组成的组”时,其中包含以下内容:具有一种或多种对眼细胞等的细胞粘附、分化调控和/或生长促进作用的能力的层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链本身,以及所述层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链的片段、突变体或变体(例如,氨基酸序列变体等);以及在作用时能转变为层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链本身,或所述层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链的片段、突变体或变体的物质(包括,例如,编码层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链本身,或层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链的片段、突变体或变体的核酸,以及包含所述核酸的载体、细胞等)。“由层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链或其功能等价物组成的组”或“由层粘连蛋白、每种层粘连蛋白链及其功能等价物组成

的组”的代表性实例包括至少一种选自层粘连蛋白及其片段的试剂。在本发明中,应理解,层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链的功能等价物与层粘连蛋白或每种层粘连蛋白链可以类似地使用,而不对其进行任何具体说明。

[0070] 本文使用的“片段”是指相对于多肽或多核苷酸的全长(长度为n)具有1至n-1的序列长度的多肽或多核苷酸。可根据目的对片段的长度进行适当的改变。例如,对于多肽,其长度的下限包括3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50和更多个氨基酸。此外,由本文中未具体列出的整数代表的长度(例如,11等)也适合作为下限。此外,对于多核苷酸,其长度的下限包括5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100或更多个核苷酸。此外,由本文中未具体列出的整数代表的长度(例如,11等)也适合作为下限。应理解,在本文中,当作为活性(例如,生长促进或维持)因子发挥作用时,所述层粘连蛋白链的片段本身在本发明的范围内。根据本发明,本文使用的术语“活性”是指最广义的分子功能。活性通常包括但不意欲限于分子的生物功能、生物化学功能、物理功能或化学功能。活性包括,例如,酶活性,与另一分子相互作用的能力,激活、促进、稳定、抑制、遏制(suppress)或破坏另一分子的功能、稳定性的能力,以及在细胞中的特定位置定位的能力。适用时,所述术语涉及最广义的蛋白复合物的功能。当提及相关的基因或核酸或多肽时,本文使用的“生物功能”是指在活体生物中所述基因、核酸或多肽可具有的特定功能。“生物功能”包括但不限于产生特定的抗体、酶活性、给予抗性等。可通过“生物活性”发挥本文使用的生物功能。本文使用的“生物活性”是指在活体生物中因子(例如,多核苷酸和蛋白)可具有的活性,其中包含了发挥多种功能的活性(例如,促进转录的活性)。例如,也包含激活与另一分子相互作用的分子或使其失活的活性。当两个因子相互作用时,其生物活性可视为所述两个分子的结合和从中产生的生物学改变,例如,在两个分子结合的情况下(例如,当使用针对两个分子中任一个的抗体时,如果两个分子共沉淀则它们结合)。因此,测定方法包括观察所述共沉淀。例如,当因子是酶时,其生物活性包括其酶活性。在另一个实例中,当因子是配体时,包括与所述配体相匹配的受体的结合。可通过本领域中公知的技术来测量所述生物活性。因此,“活性”是指指示或显示所述结合(直接或间接地)或引发的反应(即,具有响应于一些暴露或刺激的可测量的效应)的多种可测量的指示剂。例如,“活性”包括与本发明的多肽或多核苷酸结合的化合物,在一些暴露或刺激后上游或下游受到影响的蛋白的量,或另一相似功能的量度。

[0071] 本文使用的“功能活性的”是指根据与本发明的多肽、片段或衍生物相关的实施方案,具有蛋白的生物化学功能、调控功能或结构功能(例如生物活性)的多肽、片段或衍生物。

[0072] 本文使用的层粘连蛋白的“片段”是指层粘连蛋白的任何片段。作为本发明中使用的试剂,应理解不仅可使用层粘连蛋白的全长,还可使用层粘连蛋白的片段,只要所述片段具有层粘连蛋白的全长的功能,特别是内皮细胞的细胞粘附能力。因此,本发明中使用的层粘连蛋白的片段通常具有层粘连蛋白的至少一个特征。具体而言,所述特征可包含内皮细胞的细胞粘附能力。

[0073] 下文将描述本发明中在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白的序列。应理解,这些层粘连蛋白表示本发明优选的代表性实例,本发明不限于这些具体的层粘连蛋白亚型。

[0074] 层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链的代表性核苷酸序列可以是:

[0075] (a)具有SEQ ID NO:1所述的碱基序列或其片段序列的多核苷酸;

- [0076] (b)编码由SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的多核苷酸;
- [0077] (c)编码变体多肽或其片段的多核苷酸,所述多肽或其片段中的一个或多个氨基酸具有选自SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列中置换、添加和缺失的突变,其中所述变体多肽具有生物活性;
- [0078] (d)为SEQ ID NO:1所述的碱基序列或其片段的等位基因或剪接突变体的多核苷酸;
- [0079] (e)编码由SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的物种同源物的多核苷酸;
- [0080] (f)在严格条件下与(a)-(e)之一的多核苷酸杂交并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸;或
- [0081] (g)由与(a)-(e)之一的多核苷酸具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的碱基序列或其互补序列组成,并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸。在这方面,生物活性通常是指层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链的活性。对于 $\alpha 5$ 链,可参考DoiM et al., J.Biol.Chem.277(15),12741-12748,2002和美国专利No.6,933,273。
- [0082] 层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链的氨基酸序列可以是:
- [0083] (a)由SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽;
- [0084] (b)具有生物活性以及一个或多个具有突变的氨基酸的多肽,所述突变选自SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列中的置换、添加和缺失;
- [0085] (c)由SEQ ID NO:1所述的碱基序列的等位基因或剪接突变体编码的多肽;
- [0086] (d)为SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列的物种同源物的多肽;或
- [0087] (e)具有与(a)至(d)之一的多肽有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的多肽。在这方面,生物活性通常是指层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链的活性。对于 $\alpha 5$ 链,可参考DoiMet et al., J.Biol.Chem.277(15),12741-12748,2002和美国专利No.6,933,273。
- [0088] 层粘连蛋白 $\beta 1$ 链的代表性核苷酸序列可以是:
- [0089] (a)具有SEQ ID NO:3所述的碱基序列或其片段序列的多核苷酸;
- [0090] (b)编码由SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的多核苷酸;
- [0091] (c)编码变体多肽或其片段的多核苷酸,所述多肽或其片段中的一个或多个氨基酸具有选自SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列中置换、添加和缺失的突变,其中所述变体多肽具有生物活性;
- [0092] (d)为SEQ ID NO:3所述的碱基序列或其片段的等位基因或剪接突变体的多核苷酸;
- [0093] (e)编码由SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的物种同源物的多核苷酸;
- [0094] (f)在严格条件下与(a)-(e)之一的多核苷酸杂交并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸;或
- [0095] (g)由与(a)至(e)之一的多核苷酸有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的碱基序列或其互补序列组成,并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸。在这方面,生物活性通常是指层粘连蛋白 $\beta 1$ 链的活性。对于 $\beta 1$ 链,可参考Pillarainen et

al., J. Biol. Chem. 262(22), 10454-10462, 1987 和美国专利 No. 6, 933, 273。

[0096] 层粘连蛋白 β 1链的氨基酸序列可以是：

[0097] (a)由SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽；

[0098] (b)具有生物活性以及一个或多个具有突变的氨基酸的多肽，所述突变选自SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列中的置换、添加和缺失；

[0099] (c)由SEQ ID NO:3所述的碱基序列的等位基因或剪接突变体编码的多肽；

[0100] (d)为SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列的物种同源物的多肽；或

[0101] (e)具有与(a)至(d)之一的多肽有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的多肽。对于 β 1链，可参考Pillarainen et al., J. Biol. Chem. 262(22), 10454-10462, 1987 和美国专利 No. 6, 933, 273。

[0102] 层粘连蛋白 β 2链的代表性核苷酸序列可以是：

[0103] (a)具有SEQ ID NO:5所述的碱基序列或其片段序列的多核苷酸；

[0104] (b)编码由SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的多核苷酸；

[0105] (c)编码变体多肽或其片段的多核苷酸，所述多肽或其片段中的一个或多个氨基酸具有选自SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列中的置换、添加和缺失的突变，其中所述变体多肽具有生物活性；

[0106] (d)为SEQ ID NO:5所述的碱基序列或其片段的等位基因或剪接突变体的多核苷酸；

[0107] (e)编码由SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的物种同源物的多核苷酸；

[0108] (f)在严格条件下与(a)-(e)之一的多核苷酸杂交并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸；或

[0109] (g)由与(a)至(e)之一的多核苷酸有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的碱基序列或其互补序列组成，并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸。在这方面，生物活性通常是指层粘连蛋白 β 2链的活性。对于 β 2链，可参考Wewer UM et al., Genomics. Nov 15, 1994; 24(2): 243-52., 1987 和美国专利 No. 6, 933, 273。

[0110] 层粘连蛋白 β 2链的氨基酸序列可以是：

[0111] (a)由SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽；

[0112] (b)具有生物活性以及一个或多个具有突变的氨基酸的多肽，所述突变选自SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列中的置换、添加和缺失；

[0113] (c)由SEQ ID NO:5所述的碱基序列的等位基因或剪接突变体编码的多肽；

[0114] (d)为SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列的物种同源物的多肽；或

[0115] (e)具有与(a)至(d)之一的多肽有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的多肽。在这方面，生物活性通常是指层粘连蛋白 β 2链的活性。对于 α 5链，可参考Wewer UM et al., Genomics. Nov 15, 1994; 24(2): 243-52., 1987 和美国专利 No. 6, 933, 273。

[0116] 层粘连蛋白 γ 1链的代表性核苷酸序列可以是：

[0117] (a)具有SEQ ID NO:7所述的碱基序列或其片段序列的多核苷酸；

[0118] (b)编码由SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的多核苷酸；

[0119] (c)编码变体多肽或其片段的多核苷酸,所述多肽或其片段中的一个或多个氨基酸具有选自SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列中的置换、天津爱和缺失的突变,其中所述变体多肽具有生物活性;

[0120] (d)为SEQ ID NO:7所述的碱基序列或其片段的等位基因或剪接突变体的多核苷酸;

[0121] (e)编码由SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽的物种同源物的多核苷酸;

[0122] (f)在严格条件下与(a)-(e)之一的多核苷酸杂交并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸;或

[0123] (g)由与(a)至(e)之一的多核苷酸有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的碱基序列或其互补序列组成,并且编码具有生物活性的多肽的多核苷酸。在这方面,生物活性通常是指层粘连蛋白 γ 1链的活性。对于 γ 1链,可参考Pillarainen et al., J.Biol.Chem.263(14),6751-6758,1988和美国专利No.6,933,273。

[0124] 层粘连蛋白 γ 1链的氨基酸序列可以是:

[0125] (a)由SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列或其片段组成的多肽;

[0126] (b)具有生物活性以及一个或多个具有突变的氨基酸的多肽,所述突变选自SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列中的置换、添加和缺失;

[0127] (c)由SEQ ID NO:7所述的碱基序列的等位基因或剪接突变体编码的多肽;

[0128] (d)为SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列的物种同源物的多肽;或

[0129] (e)具有与(a)至(d)之一的多肽有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的多肽。在这方面,生物活性通常是指层粘连蛋白 γ 1链的活性。对于 γ 1链,可参考Pillarainen et al., J.Biol.Chem.263(14),6751-6758,1988和美国专利No.6,933,273。

[0130] 本文使用的“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”和“肽”具有相同的含义并可互换使用,它们是指任意长度的氨基酸序列的聚合物。该聚合物可以是直链或支链或环链。氨基酸可以是天然或非天然氨基酸,或可以是改变的氨基酸。该术语也可包括组装成多条多肽链的复合物的那些。该术语也包括天然或人工改变的氨基酸聚合物。所述改变包括,例如,二硫键形成、糖基化、脂质化(lipidation)、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或改变(例如,与经标记的组分缀合)。该定义也包括,例如,包含一个或多个氨基酸类似物(例如,包含非天然氨基酸)的多肽,类肽化合物(例如,类肽)和其他本领域中公知的改变。对于本发明的蛋白(例如,层粘连蛋白的每种链),将编码每种靶链基因的DNA整合至适合的载体,使用能够在各宿主中表达的表达载体,将所述适合的载体引入至真核细胞或原核细胞,使各链表达,从而获得所需的蛋白。可用于表达层粘连蛋白的宿主细胞包括但不特别限于,原核宿主细胞,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);以及真核宿主细胞,例如酵母、真菌、昆虫细胞、植物和植物细胞,以及哺乳动物细胞。使用转化、转染、接合、原生质体融合、电穿孔、粒子枪技术、磷酸钙沉淀、农杆菌(*Agrobacterium*)法、直接微注射等,可将所构建的用于表达靶层粘连蛋白链等的载体引入上述宿主细胞。使包含载体的细胞生长在适合的培养基中以产生用于本发明中的层粘连蛋白链,从细胞或培养基中纯化所述层粘连蛋白链,从而获得层粘连蛋白链等。使用分子筛色谱法、HPLC、离子交换色谱法、免疫亲

和色谱法等进行纯化。

[0131] 本文使用的“氨基酸”可以是天然的或非天然的,只要能实现本发明的目的。

[0132] 本文使用的“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”具有相同含义并可互换使用,它们是指任何长度的核苷酸的聚合物。这些术语也包括“寡核苷酸衍生物”或“多核苷酸衍生物”。所述“寡核苷酸衍生物”或“多核苷酸衍生物”是指包含核苷酸衍生物或其中核苷酸之间的键(bonding)不同于正常键的寡核苷酸或多核苷酸,并且它们可互换使用。对于所述寡核苷酸,具体举例说明下述:2'-O-甲基-核糖核苷酸;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的磷酸二酯键被转化为硫代磷酸酯键;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的磷酸二酯键被转化为N3'-P5'氨基磷酸酯键;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的核糖和磷酸二酯键被转化为肽核酸键;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的尿嘧啶被C-5丙炔基尿嘧啶取代;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的尿嘧啶被C-5噻唑尿嘧啶取代;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的胞嘧啶被C-5丙炔基胞嘧啶取代;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的胞嘧啶被吩噻嗪修饰的胞嘧啶取代;一种寡核苷酸衍生物,其中DNA中的核糖被2'-O-丙基核糖取代;一种寡核苷酸衍生物,其中寡核苷酸中的核糖被2'-甲氧基乙氧基核糖取代。除非另有说明,特定的核酸序列意欲包括与明确说明的序列相似的经保守性改变的变体(例如,简并密码子取代物)及其互补序列。特别地,可通过产生其中一个或多个经选择的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列而获得简并密码子取代物(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。本文使用的“核酸”可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸互换使用。本文使用的“核苷酸”可以是天然或非天然的。

[0133] 本文使用的“基因”是指定义遗传性状的试剂(agent)。通常,基因在染色体上以给定的次序排列。定义蛋白的一级结构的基因被称为结构基因,影响其表达的基因被称为调控基因。在本文中,“基因”可指“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”。

[0134] 在本文中可通过公知的IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的三字母密码子或单字母密码子来提及氨基酸。类似地,可通过通常认可的单字母密码子提及核苷酸。在本文中,使用默认参数和序列分析工具BLAST计算氨基酸序列和碱基序列的相似性、同一性和同源性。使用例如NCBI的BLAST 2.2.26(2011年10月30日发布)进行同一性检索。本文使用的同一性值通常是指使用BLAST在默认条件下比对的值。但是,如果由于参数改变而获得更高的值,则将最高值定义为同一性的值。如果在多个区域评估同一性,则将所述区域的最高值定义为同一性的值。相似性是除同一性以外在计算中考虑相似氨基酸的数值。

[0135] 本文使用的“在严格条件下杂交的核苷酸”是指通常用于本领域的公知的条件。应理解,对于本发明中使用的层粘连蛋白,也可使用与各具体公开的层粘连蛋白的核酸序列“在严格条件下杂交的多核苷酸”编码的那些蛋白。将选自本发明的多核苷酸的多核苷酸用作探针,使用菌落杂交技术、噬菌斑杂交技术或DNA杂交技术允许获得所述多核苷酸。具体而言,其意指通过如下获得的多核苷酸:在65°C、0.7至1.0M NaCl存在的条件下,使用固定有菌落或噬菌斑来源的DNA的滤器进行杂交,然后在65°C的条件下使用0.1至2倍浓度的SSC(柠檬酸钠盐水)溶液(其中1倍浓度的SSC溶液的组成为150mM氯化钠和15mM柠檬酸钠)冲洗所述滤器。根据实验文献(例如Molecular Cloning第二版,Current Protocols in

Molecular Biology, Supplement 1-38, DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)) 中所述的方法进行杂交。在此处, 从在严格条件下杂交的序列中优选地排除仅包含A序列或T序列的序列。因此, 用于本发明中的多肽(例如, 转甲状腺素蛋白)也包括在严格条件下与编码本发明具体所述的多肽的核酸分子杂交的核酸分子编码的多肽。这些低严格条件包括在40℃下在包含35%甲酰胺、5×SSC、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、5mM EDTA、0.02%PVP、0.02%BSA、100g/ml变性的鲑鱼精子DNA和10%(重量/体积)硫酸葡聚糖的缓冲液中进行杂交18至20小时; 在55℃下在由2×SSC、25mM Tris-HCl(pH 7.4)、5mM EDTA和0.1%SDS组成的缓冲液中冲洗1至5小时; 在60℃下在由2×SSC、25mM Tris-HCl(pH 7.4)、5mM EDTA和0.1%SDS组成的缓冲液中冲洗1.5小时。

[0136] 对于本发明的功能等价物, 可使用其氨基酸序列的一端或两端插入、置换或缺失、或添加一个或多个氨基酸的那些。在本文中, “在氨基酸序列的一端或两端插入、置换或缺失、或添加一个或多个氨基酸”意指通过公知的技术方法(例如定点诱变)或天然存在的突变对多个可天然存在的氨基酸进行置换等而产生的改变。

[0137] 改变的氨基酸序列(例如, 本发明中使用的层粘连蛋白的每种链)可以是这样的序列: 例如, 其一端或两端插入、置换、或缺失、或添加1至30, 优选1至20, 更优选1至9, 仍然更优选1至5, 特别优选1至2个氨基酸。所述改变的氨基酸序列可优选是这样的氨基酸序列: 其在层粘连蛋白的每种链等的氨基酸序列中具有一个或多个(优选1或若干, 或1、2、3或4个)保守性置换。在本文中, “保守性置换”意指用不同的化学上相似的氨基酸残基置换一个或多个氨基酸残基以使得蛋白质的功能基本上不会发生改变。例如, 当给定的疏水残基被另一个疏水残基置换时, 或当给定的极性残基被另一个具有相同电荷的极性残基置换时, 可提及这类保守性置换。对于每个氨基酸而言, 能够进行所述置换的功能上相似的氨基酸在本领域中是公知的。非极性(疏水)氨基酸的具体实例包括丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸等。极性(中性)氨基酸的具体实例包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等。具有正电荷的(碱性)氨基酸的具体实例包括精氨酸、组氨酸、赖氨酸等。此外, 具有负电荷的(酸性)氨基酸的具体实例包括天冬氨酸、谷氨酸等。

[0138] 本文使用的“试剂”在广义上可以是任何物质或任何其他元素(例如, 能量如光、辐射、热和电), 只要所述物质可交换使用并且可实现预期的目的。所述物质包括但不限于, 例如, 蛋白质、多肽、寡肽、肽、多核苷酸、寡核苷酸、核苷酸、核酸(包括, 例如, DNA如基因组DNA和cDNA, RNA如mRNA)、多糖、寡糖、脂质、有机小分子(例如, 激素、配体、信使分子、有机小分子、通过组合化学合成的分子、可用作药物的小分子(例如, 小分子配体)等)及其复合物分子。特异性针对多核苷酸的试剂通常包括但不限于, 具有与上述多核苷酸的序列有给定的序列同源性(例如, 70%或更高的序列同一性)的互补性的多核苷酸, 多肽如结合于启动子区的转录因子等。特异性针对多肽的试剂通常包括但不限于, 特异性针对多肽的抗体, 或其衍生物或其类似物(例如, 单链抗体), 在所述多肽是受体或配体的情况下的特异性配体或受体, 在所述多肽是酶的情况下的其底物(matrix)等。

[0139] 本文使用的“培养”是指使受试细胞生长, 在狭义上, 其是指维持受试细胞的状况(否则状况将恶化)的状态(例如, 细胞的数目不会显著减少的状态)。在狭义上, 所述术语用

于意指与培养的维持或维持相同的含义。

[0140] 本文使用的“生长”是指其中细胞数目增加的状态。

[0141] 本文使用的“生长能力”是指细胞生长的能力。除非本文具体说明,生长状态是指以稳定状态生长的可能性。“稳定状态”是指活体生物的正常情况,其中维持活体生物的稳态。本领域技术人员可容易地确定所述状态。例如,可通过细胞密度分析(其中细胞密度几乎恒定而没有改变,或识别出细胞生长标记物的表达等)确认所述状态。本文使用的“生长的促进”是指给定细胞的生长状态。如果起初靶细胞未在生长,则开始甚至少许的生长就相当于生长的促进。如果细胞已经在生长并且生长水平得到维持或提高(优选地提高),则相当于生长的促进。

[0142] 本文使用的“干细胞”是指同时具有分化为多种细胞系统(多系分化潜能)的能力和甚至在细胞分裂后维持多系分化潜能的能力(自我更新的能力)的细胞。干细胞包括胚胎干细胞、生殖细胞、iPS细胞、组织干细胞等。本发明所针对的角膜内皮细胞可以是从小干细胞分化的细胞。使用本领域中公知的方法可实现从干细胞到角膜内皮细胞的分化。

[0143] 本文使用的细胞的“正常的细胞功能”是指当提及特定的细胞(例如角膜内皮细胞)时细胞最初具有的功能。对于角膜内皮细胞,所述功能包括但不限于,ZO-1和 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶,对角膜移植的适应性能(Matsubara M,Tanishima T:Wound-healing of the corneal endothelium in the monkey:a morphometric study,Jpn J Ophthalmol 1982,26:264-273;Matsubara M,Tanishima T:Wound-healing of corneal endothelium in monkey:an autoradiographic study,Jpn J Ophthalmol 1983,27:444-450;Van Horn DL,Hyndiuk RA:Endothelial wound repair in primate cornea,Exp Eye Res 1975,21:113-124和Van Horn DL,Sendele DD,Seideman S,Buco PJ:Regenerative capability of the corneal endothelium in rabbit and cat.Invest Ophthalmol Vis Sci 1977,16:597-613)等。

[0144] 可通过免疫方法观察蛋白的表达或在mRNA水平(例如RT-PCR)上评估ZO-1和 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶。对 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶和ZO-1在与正常细胞相同的水平上的表达和/或功能的确认使得能够确认受试细胞是否具有正常功能。

[0145] 对于对角膜移植的适应性能,可使用实验动物(例如兔)通过机械刮除角膜内皮作为大泡性角膜病变模型,进行培养细胞的移植测试。但是,因为兔的角膜内皮细胞在体内生长,不能否认由于宿主角膜内皮细胞的生长而自然愈合的可能性(Matsubara M,et al.,Jpn J Ophthalmol 1982,26:264-273;Matsubara M,et al.,Jpn J Ophthalmol 1983,27:444-450;Van Horn DL,et al.,Exp Eye Res 1975,21:113-124和Van Horn DL,et al.,Invest Ophthalmol Vis Sci 1977,16:597-613)。因此,为了评估更准确的移植适应性能,优选评估对灵长类动物的移植物植入。当评估对人的移植适应性能时,例如,在至少1个月,优选至少两个月,更优选至少3个月,仍然更优选至少6个月,还更优选至少12个月之后,在灵长类动物(例如食蟹猴)中评估适应性。对在灵长类动物(例如猴)中的移植适应性能的确认为对于应用于人尤为重要。

[0146] 本文使用的“BrdU”是溴脱氧尿苷的缩写。因为在DNA合成中BrdU作为dTTP的类似物被掺入,可通过特异性针对被掺入到DNA中的BrdU的抗体来检测其中掺入BrdU的DNA(细胞核)。因此,BrdU被用作表示高生长能力/分化能力的指标(index)。

[0147] 本文使用的“BrdU阳性”是指其中细胞标记物BrdU在靶细胞中表达的状态。

[0148] 本文使用的“培养物”是指通过培养细胞(例如角膜内皮)而生成的那些物质。因此,“角膜内皮培养物”是指角膜内皮的培养物,所述术语通常是指以与体内存在状态不同的状态存在的那些物质。通过常规方法获得的角膜内皮培养物的问题在于,所述培养物的生长能力低并且易于被转化和丧失功能(Peh GS,Beuerman RW,Colman A,Tan DT,Mehta JS(2011)Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation:an overview.Transplantation 91:811-819.,Okumura N,Kay E,Nakahara M,Hamuro J,Kinoshita S,et al.(2013)Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine.PLoS One 8:e58000.)。因此,从培养物的角度而言,对于那些培养了特别长时间的培养物或传代培养的培养物,无法获得这样的细胞密度。特别地,角膜内皮细胞的密度在培养过程中容易降低。角膜内皮密度是健康程度的临床上最重要的指标之一。因此,从再生医学的观点而言,培养至高密度是重要的。此外,可预先增加内皮细胞的密度,然后进行体内给药,所述内皮细胞可以是极其重要的治疗剂。从这种意义上讲,重要的事实是,过去通过正常的培养方法会降低的细胞密度现在能够增加。人角膜内皮在体内的正常水平在约2500-3000/mm²范围内。本发明的有益之处在于,本发明提供了使培养物的细胞密度达到上述水平或超过所述水平的技术。

[0149] 本文使用的“培养基”是指能够培养角膜内皮细胞或使其生长的任何培养基,所述培养基根据需要可以采取任何形式,例如液体培养基(培养基)、悬液培养基和固体培养基。用于所述角膜内皮细胞的培养基的组分包括,例如,DMEM(GIBCO BRL)、OptiMEM(Life Technologies)、血清(例如,胎牛血清(FBS)、人血清)、增殖因子/生长因子(例如,b-FGF)、抗生素物质(例如,青霉素、链霉素、庆大霉素)等。

[0150] 本文使用的“(培养)容器”是指培养角膜内皮细胞的容器。所述培养容器的类型不受特别限制,可使用任何被灭菌以防止细菌污染以及具有适于培养细胞的任何材料和任何形状的容器。所述培养容器的实例包括但不限于,本领域中通常使用的培养皿、培养瓶(culture flask)、培养Schales、培养板(例如,96孔、48孔、12孔、6孔和4孔)、培养瓶(culture bottle)。

[0151] (一般技术)

[0152] 本文使用的分子生物学技术、生物化学技术、微生物方法是本领域中公知的和通常使用的,所述技术和方法记载于,例如,Sambrook J.et al.(1989).Molecular Cloning: A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor and its 3rd Ed.(2001);Ausubel,F.M.(1987).Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates and Wiley-Interscience;Ausubel,F.M.(1989).Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates and Wiley-Interscience;Innis,M.A.(1990).PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press;Ausubel,F.M.(1992).Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates;Ausubel,F.M.(1995).Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press; Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press, and Bessatsu Jikken Igaku "Idenshi Dounyu" & Hatsugen Kaiseki Jikken Hou "Yodosha Co., Ltd.", 1997。关于角膜内皮细胞, Nancy Joyce 等人的报告 {Joyce, 2004#161} {Joyce, 2003#7} 是公知的; 但是, 如之前所述, 成纤维细胞的转化是由于长期培养和传代培养。因此, 现在仍在继续关于有效的培养方法的研究。其相关部分(其可以是完整的部分)以引用的方式纳入本文。

[0153] 实施方式的描述

[0154] 以下将描述优选的实施方案。但是, 应理解, 所述实施方案是本发明的实施例, 本发明的范围并不限于所述优选的实施方案。此外, 应理解, 本领域技术人员在参考以下优选的实施方案的同时可在本发明的范围内容易地进行修改、改变等。此外, 应理解, 可组合任何实施方案。

[0155] (用于培养角膜内皮细胞或使其生长的组合物和培养容器)

[0156] 一方面, 本发明提供了用于培养角膜内皮细胞或使其生长的组合物, 其包含至少一种由在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白及其片段组成的试剂。

[0157] 尽管本发明的试剂(层粘连蛋白等)可被包含在培养基中以备使用, 所述试剂可被包被(或可覆盖)于培养皿上以备使用。为了进行靶细胞的原代培养和/或传代培养, 使用适合的培养基(例如, DMEM(达尔贝科改良伊格尔培养基)或 OptiMEM)并在用于培养的培养皿中接种收集和分离到的细胞, 用于进行原代培养和传代培养。在本发明中, 甚至在添加到培养基中的血清量少于 10% 时也能获得良好的生长结果。此外, 在本发明中, 除了层粘连蛋白或除了层粘连蛋白的包被, 可将细胞因子(例如成纤维细胞生长因子(FGF))作为添加剂添加到培养基中。本发明的试剂可用于实施例所述的分离细胞和从 iPS 或 ES 细胞诱导的内皮细胞。此外, 应理解, 所述试剂对诱导本身是有效的。

[0158] 使用的层粘连蛋白在培养基溶液(例如, PBS)中的浓度包括, 例如, 约 0.1 μg 至约 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对于包被, 可将每单位面积(例如, cm^2)约 0.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的量用于包被。对于处理培养容器的用途, 不特别限制本发明的层粘连蛋白或其片段的量。当使用层粘连蛋白或其片段的溶液进行处理时, 优选地以约 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更多, 优选地以约 0.01 至 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 仍然优选地以约 0.01 至约 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的量, 可获得有利结果。约 0.01 至 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或约 0.01 至约 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的层粘连蛋白或其片段相当于固相中每单位培养容器面积上层粘连蛋白或其片段的量为约 0.0015 至 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 或约 0.0015 至 0.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0159] 在一个优选的实施方案中,所述层粘连蛋白包括层粘连蛋白511和层粘连蛋白521。因此,在本实施方案中,本发明的试剂可以是层粘连蛋白511、层粘连蛋白521或其片段。

[0160] 可将任何片段用作本发明的层粘连蛋白511的片段或层粘连蛋白521的片段,只要所述片段可用于培养(在本文中可被称为“维持”或“维持培养物”,但是以与培养相同的含义使用)角膜内皮细胞或使其生长。所述片段包括但不限于层粘连蛋白511-E8片段和层粘连蛋白521片段(分别为序列编号9、10(核酸序列,氨基酸序列)和序列编号11、12(核酸序列,氨基酸序列))(参见Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K. The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. *J Biol Chem*. 284:7820-7831, 2009. Available from Nippi, Incorporated)。层粘连蛋白511-E8片段和层粘连蛋白521片段是通过弹性蛋白酶处理获得的片段,并且在异质三聚体的 α 链C末端区域包含卷曲螺旋结构域和3个LG结构域(LG1至LG3)的部分。E8片段被认为对应于异质三聚体分子的整联蛋白结合位点,在所述异质三聚体分子中层粘连蛋白的 α 链、 β 链和 γ 链经由卷曲螺旋结构域相互组装在一起。因此,可将层粘连蛋白全长中基本上保留了整联蛋白结合位点的那些作为优选的片段使用。应理解,可基于关于层粘连蛋白511-E8和层粘连蛋白521片段的信息通过适当的改变产生这样的片段。

[0161] 在这方面,人层粘连蛋白 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ 的E8片段(在本文中也称为“人层粘连蛋白511-E8”)意指人层粘连蛋白 $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ (在本文中也称为“人层粘连蛋白511”)的片段,其对应于鼠层粘连蛋白 $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ 的E8片段(在本文中也称为“鼠层粘连蛋白111-E8”)。层粘连蛋白的E8片段已被鉴定为通过用弹性蛋白酶消化鼠层粘连蛋白 $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$ (在下文中将其描述为“鼠层粘连蛋白111”)而获得的片段中具有强细胞粘附活性的片段(Edgar D., Timpl R., Thoenen H. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.*, 3:1463-1468, 1984., Goodman SL., Deutzmann R., von der Mark K. Two distinct cell-binding domains in laminin can independently promote nonneuronal cell adhesion and spreading. *J. Cell Biol.*, 105:589-598, 1987.)。对于人层粘连蛋白511和人层粘连蛋白332,用弹性蛋白酶消化之后推定存在对应于鼠层粘连蛋白111-E8的片段。用于本发明的人层粘连蛋白511-E8不需要为人层粘连蛋白511的弹性蛋白酶消化产物。用于本发明的人层粘连蛋白511-E8可以是与鼠层粘连蛋白111-E8有相似的细胞粘附活性、相似的结构和大约相同的分子量的人层粘连蛋白511的片段。制备人层粘连蛋白511-E8的方法并不受特别限制。例如,所述方法包括允许通过蛋白水解酶(例如弹性蛋白酶)消化全长的人层粘连蛋白511以片段化(fractionate)和纯化靶片段的方法,制备重组蛋白的方法等。从制备量、质量的均一性、制备成本等角度而言,优选制备重组蛋白。通过恰当地使用已知的基因重组技术可制备重组的人层粘连蛋白511-E8。制备重组的人层粘连蛋白511-E8的方法,例如,可通过如下方式制备重组的人层粘连蛋白511-E8:获得编码人层粘连蛋白511-E8的 α 链、 β 链和 γ 链中的每种链的蛋白的DNA,将每种所获得的DNA插入表达载体,通过共转染至适合的宿主细胞来表达所得的三种表达载体,以及通过已知的方法纯化三聚体蛋白(例如,参见Hiroyuki Ido, et al., "The requirement of the glutamic acid residue at the third

position from the carboxyl termini of the laminin γ chains in integrin binding by laminins" *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 11144-11154, 2007.). 可参考 JP 2011-78370 中的具体制备方法。通过使用人层粘连蛋白 521 可制备类似的片段, 其被称为“层粘连蛋白 521-E8 片段”。应理解, 可通过与层粘连蛋白 511-E8 相似的方式来制备所述片段, 这些片段保留了与层粘连蛋白 511-E8 相似的活性。

[0162] 在一个优选的实施方案中, 所述试剂是层粘连蛋白 511、层粘连蛋白 521、层粘连蛋白 511-E8 片段或层粘连蛋白 521-E8 片段。

[0163] 在一个优选的实施方案中, 所述角膜内皮细胞来自人。

[0164] 可通过移除供体角膜的天然角膜内皮从剥脱的角膜制备本发明所靶向的内皮细胞, 而不损害后弹性层的完整性以及基质层的结构和功能(例如, WO 2005/038015)。剥脱的角膜可用作人角膜内皮培养细胞。

[0165] 在另一方面, 本发明提供了用于角膜内皮细胞的培养容器, 其被本发明的试剂或组合物包被。

[0166] 通过参考本领域中已知的方法可进行用于培养角膜内皮细胞的用于层粘连蛋白等的经覆盖的容器或培养板的制备。可如下进行培养容器的制备(包被): 例如, 在将用磷酸缓冲液稀释到 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的层粘连蛋白溶液添加到培养皿中之后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 (5% CO_2) 孵育两小时, 然后除去溶液并分别用磷酸缓冲液在培养基中冲洗两次以备使用。

[0167] 因此, 在另一方面, 本发明涉及用于固相化(solid-phasing)(包被)细胞培养容器(所述容器用于培养角膜内皮细胞中的细胞)的组合物——所述包被使用包含至少一种选自在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白或其片段(例如, 层粘连蛋白 511、层粘连蛋白 521 或其片段)的试剂的系统; 或涉及用于固相化(包被)细胞培养容器的试剂。在一个实施方案中, 本发明的组合物或试剂是包被组合物或包被试剂。在培养容器的表面上固相化层粘连蛋白的处理技术是本领域中已知的。因此, 本领域技术人员可根据本发明的目的使用任何培养容器并对所述容器进行处理以将所述容器用于本发明的方法。

[0168] 在另一方面, 本发明还涉及包含上述组合物或试剂的试剂盒。本发明的试剂盒可还包含细胞培养基、细胞培养容器等。细胞培养容器可以是, 例如, 预包被的培养皿或预包被的培养板。或者, 试剂盒的细胞培养容器可处于这样的状态: 至少一种选自在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白或其片段(例如, 层粘连蛋白 511、层粘连蛋白 521 或其片段)的试剂处于固相。本发明的细胞培养容器、组合物、试剂和试剂盒可用于在系统中培养哺乳动物细胞的方法, 所述系统包含至少一种选自在角膜内皮细胞中表达的层粘连蛋白或其片段(例如, 层粘连蛋白 511、层粘连蛋白 521 或其片段)的因子。

[0169] (培养角膜内皮细胞的方法)

[0170] 在另一方面, 本发明提供了培养角膜内皮细胞的方法, 所述方法使用本发明的组合物。即, 本发明提供了培养角膜内皮细胞或使其生长的方法, 包括使用本发明的试剂(层粘连蛋白、其片段等)培养角膜内皮细胞的步骤。用于本发明中的方法的试剂(层粘连蛋白、其片段等)被认为能够以本文所述的任何形式使用。此外, 任何培养组分均可用于本发明的方法, 只要所述组分可用于培养角膜内皮, 并且能够举例说明具有本文所述的任何形式的培养组分。

[0171] 在一个实施方案中, 本发明中培养的角膜内皮细胞来自灵长类动物。在一个优选

的实施方案中,本发明中培养的角膜内皮细胞来自人。

[0172] 在一个优选的实施方案中,通过本发明的方法培养靶细胞是用于预防或治疗角膜内皮病症,尤其可用于产生用于移植的细胞、组织等。

[0173] 培养角膜内皮细胞时的温度条件并不特别限制在使角膜内皮细胞生长的范围内。但是考虑到生长效率,例如,温度条件为约25℃至约45℃,或优选约30℃至约40℃,或仍然优选约37℃。在CO₂浓度为约5至10%的增湿环境下在常用的细胞培养箱中实施培养方法。

[0174] 可以将可用于培养角膜内皮的任何组分用作可用于本发明的培养组分。此外,所述培养组分可以是常规出售和使用的培养基组分,或单独开发用于角膜内皮的组分。所述培养基组分的实例包括但不限于OptiMEM、DMEM、M199、MEM等(可获自IVITROGEN等)。

[0175] 本发明的特征在于,通过在包含本发明的试剂(例如,特定的层粘连蛋白或其片段)的细胞培养系统中使用特定的多肽和/或肽,提高了细胞培养中多种特定的层粘连蛋白或其片段的活性。所述多肽选自非胞外基质蛋白的血液蛋白,其为血清、血清白蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白、 α -球蛋白、 β -球蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶(α 1-AT)、结合珠蛋白(Hp)、 α 2-巨球蛋白(α 2-M)、 α -甲胎蛋白(AFP)、转铁蛋白、视黄醇结合蛋白(RBP)或脂连素(adiponectin),以及明胶、肿瘤坏死因子(TNF)家族的蛋白和蛋白胨。在本发明的一个实施方案中,可用作额外组分的多肽和/或肽为,但不限于,血清白蛋白、肿瘤坏死因子(TNF)蛋白家族或蛋白胨,或者所述多肽和/或肽是免疫球蛋白或明胶。

[0176] 在本发明中,可优选地使用血液蛋白,仍然优选地使用非胞外基质蛋白的血液蛋白,以及本发明的试剂(特定的层粘连蛋白或其片段)。所述血液蛋白优选地选自血清、血清白蛋白、前白蛋白、免疫球蛋白、 α -球蛋白、 β -球蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶(α 1-AT)、结合珠蛋白(Hp)、 α 2-巨球蛋白(α 2-M)、 α -甲胎蛋白(AFP)、转铁蛋白、视黄醇结合蛋白(RBP)或脂连素,其全部为非胞外基质蛋白的血液蛋白。“胞外基质”是填充胞外空间的物质。同时,胞外基质具有骨架作用(例如,动物的软骨或骨)、在细胞粘附中的支架作用(例如,基底膜或纤连蛋白)、在保留或提供细胞生长因子等中的作用(例如,结合于硫酸乙酰肝素的细胞生长因子FGF)等。许多被识别为存活的组成多细胞生物的单细胞被包埋于胞外基质的床(bed)或巢(nest)中。脊椎动物(包括人)的胞外基质的主要组分为糖蛋白,例如胶原、蛋白聚糖、纤连蛋白和层粘连蛋白(部分地细胞粘附分子)。“胞外基质蛋白”意指组成所述胞外基质的蛋白。

[0177] 本发明中的“非胞外基质蛋白的血液蛋白”意指参与细胞粘附等的非胞外基质蛋白的血液蛋白。它们全部为本领域技术人员能够适当地获得的已知蛋白。非胞外基质蛋白的血液蛋白优选但不限于人血清白蛋白(HSA/例如,可获自Nacalai Tesque)、重组人血清白蛋白(rHSA/例如,可获自SIGMA-A1DRICH)或牛血清白蛋白(BSA/例如,可获自SIGMA-A1DRICH)。此外,“非胞外基质蛋白的血液蛋白”可以是免疫球蛋白。包括IgG、IgA、IgM、IgD和IgE的免疫球蛋白是本领域技术人员公知的。例如,可使用人免疫球蛋白(IgG/例如,可获自Oriental Yeast Col,Ltd.)但不限于此。

[0178] 在本文中,“明胶”是指通过对胶原加热而提取的物质,其为结缔组织(例如,动物的皮肤、骨或肌腱(tendon))的主要成分。明胶的主要成分是蛋白质。

[0179] 在本文中,可将肿瘤坏死因子(TNF)家族的蛋白作为额外的组分使用。“肿瘤坏死因子(TNF)”是一种类型的细胞因子。狭义上有三种类型的TNF,即TNF- α 、TNF- β (淋巴毒素

(LT)- α)和LT- β 。“TNF家族的蛋白”包括至少19种类型的分子,例如,受体激活剂NF κ B配体(RANKL)、Fas配体和CD40配体。优选地,可将受体激活剂NF κ B配体(RANKL、sRANKL)可作为TNF家族的蛋白——其被用作本发明中使用的额外组分——的实例使用。

[0180] 在本发明中,蛋白胨可作为额外的组分使用。“蛋白胨”是通过用蛋白水解酶溶解蛋白而获得的蛋白质。蛋白质是在体内被胃中的胃蛋白酶消化成蛋白胨,所得的蛋白胨被胰腺分泌的胰液和空肠分泌的肠液进一步消化为氨基酸。因为蛋白胨适合作为微生物的营养源,它经常被添加到培养基中。通过将蛋白质水解为氨基酸和低分子量的肽获得作为这类用于培养基的营养源的蛋白胨。通常使用从经过酶解作用(使用蛋白酶,例如从猪的胰腺提取的胰酶)的乳蛋白(乳酪蛋白)获得的蛋白胨。优选地使用来自植物的蛋白胨,但是不限于此。例如,蛋白胨是选自来自棉籽的蛋白胨、来自大豆的蛋白胨、来自小麦的蛋白胨和来自豌豆的蛋白胨。

[0181] (角膜内皮细胞和角膜内皮制剂)

[0182] 本发明提供了通过本发明的方法培养和产生的角膜内皮细胞。可将本发明视为具有常规细胞中不存在的特征,该特征在于,甚至当进行正常的培养时以及进行传代培养时也可获得正常培养或生长的细胞。此外,最重要的特征在于,所述细胞具有功能正常的角膜内皮特征。因此,本发明提供的角膜内皮细胞可被作为制剂提供,这意指本发明提供了角膜内皮制剂。因此,本发明提供了制备角膜内皮制剂的方法,包括使用包含本发明的试剂或组合物的培养溶液或其上包被有本发明的试剂或组合物的培养容器来培养角膜内皮细胞的步骤。

[0183] 在一方面,本发明的角膜内皮制剂包含基质材料(base material),以及在所述基质材料上的角膜内皮细胞层。

[0184] 用于本发明中的基质材料不受特别限制,只要它可支持所培养的角膜内皮细胞层,并且在移植后在体内维持其形状达给定的时间段,优选地至少3天。此外,用于本发明中的基质材料可以是在试管中培养角膜内皮细胞时发挥支架作用的那些材料,或者可以是在培养后仅具有支持角膜内皮细胞层的作用的那些材料。优选地,用于本发明中的基质材料为具有支架作用的那些材料,所述支架用于培养角膜内皮细胞并在培养完成后直接接受移植。

[0185] 用于本发明中的基质材料包括,例如,来自天然产品的高聚物材料,例如胶原、明胶和纤维素;合成的大分子材料,例如聚苯乙烯、聚酯、聚碳酸酯和聚(N-异丙基丙烯酰胺);生物可降解的聚合物材料,例如聚乳酸和聚乙醇酸;羟基磷灰石、羊膜(amnion)等。

[0186] 用于本发明中的基质材料的形状不受特别限制,只要它支持角膜内皮细胞层并且是适合于移植的形状。但是,所述形状优选地为片状。当本发明的制剂为片状时,可在移植时对其进行切割并制成与施用位置一致的大小。此外,也可将所述片状物紧紧卷起并插入到创口中。作为优选的具体实例,举例说明了圆形形状,其覆盖了受损伤的角膜上皮区域的约80%。此外,也优选地切开所述圆的周围部分以紧密附着于施用位置。

[0187] 在一个优选的实施方案中,用于本发明的基质材料的实例是胶原。对于胶原,可优选地使用日本公开No.2004-24852中所述的胶原片层。例如,可根据日本公开No.2004-24852中所述的方法从羊膜制备所述胶原片层。

[0188] 在下文中将描述角膜内皮细胞层的制备,其作为角膜内皮制剂的实例。

[0189] 用于本发明中的角膜内皮细胞层优选地包括以下特征的至少一个。更优选地,用于本发明中的角膜内皮细胞层包括以下特征的两个或多个。仍然更优选地,用于本发明中的角膜内皮细胞层包括以下特征的全部。

[0190] (1)所述细胞层具有单层结构。这是活体生物的角膜内皮细胞层所包含的特征之一。

[0191] (2)细胞层中的细胞密度为约1000至约4000个细胞/ mm^2 。具体而言,当成年人是受体时,所述细胞密度优选地为约2000至约3000个细胞/ mm^2 。

[0192] (3)组成所述细胞层的细胞的平面形状基本上是六边形。这是活体生物中组成角膜内皮细胞层的细胞所包含的特征之一。本发明的制剂类似于活体生物的角膜内皮细胞层,其能够发挥与天然的角膜内皮细胞层相似的功能,也能够发挥体内生长能力。

[0193] (4)所述细胞在细胞层中规则排列。在活体生物的角膜内皮细胞层中,组成所述层的细胞规则排列。因此,认为将维持角膜内皮细胞的正常功能和高透明度,并适当地发挥角膜的润湿功能。因此,通过包括所述形态特征,预期本发明的制剂将发挥与活体生物中的角膜内皮细胞层的功能相似的功能。

[0194] 本发明的制备方法包括使用本发明的试剂、组合物或容器来培养角膜内皮细胞的步骤,并且可通过例如以下方法来实施。

[0195] <1>在试管中收集和培养角膜内皮细胞

[0196] 使用常规方法从受体自身或适合供体的角膜收集角膜内皮细胞。考虑到本发明的移植条件,可制备来自相同种族的角膜内皮细胞。例如,从角膜的薄壁组织剥脱角膜组织的后弹性层和内皮细胞层,将其转移至培养皿并用中性蛋白酶等处理。因此,角膜内皮细胞将从后弹性层脱落。可通过移液(pipetting)等使残留在后弹性层上的角膜内皮细胞脱落。移除后弹性层之后,在本发明的培养溶液中培养角膜内皮细胞。对于培养物或培养溶液,例如,可使用以下试剂:FBS(胎牛血清)(例如,BIOWEST,目录编号:S1820-500)、b-FGF(碱性成纤维细胞生长因子)(例如,INVITROGEN,目录编号:13256-029),可适当地将抗生素物质(例如,青霉素和链霉素)添加到可商购的DMEM(达尔贝科改良伊格尔培养基)(例如,INVITROGEN,目录编号:12320等)中,然后添加本发明的培养标准化物(culture normalizer)的组分。通过包被本发明的试剂以进行培养,促进角膜内皮细胞粘附到培养容器的表面,从而进行有利的生长。此外,当通过将层粘连蛋白添加到培养溶液中进行培养时,优选地使用培养皿,所述培养皿的表面包被有I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白或牛角膜内皮细胞的胞外基质等。或者,可使用采用可商购的包被试剂(例如,FNC包被混合物®(50ml(AES-0407),ATHENA,目录编号:0407))处理的常规培养容器。培养角膜内皮细胞的温度条件不受特别限制,只要角膜内皮细胞生长。例如,温度在约25℃至约45℃的范围内,当考虑生长效率时,优选地为约30℃至约40℃,仍然优选约37℃。在常规细胞培养箱中,在增湿的约5至10%CO₂浓度的环境中进行所述培养方法。

[0197] <2>传代培养

[0198] 在使接受培养的角膜内皮细胞生长之后,可进行传代培养。优选地,在近汇合或汇合时进行传代培养。可如下进行传代培养。首先,用胰蛋白酶-EDTA等处理细胞,从而使得从培养容器的表面移出细胞。然后收集细胞。将本发明的培养标准化物或培养基添加到所收集的细胞中以获得细胞悬液。优选地在收集细胞时或收集后进行离心处理。所述离心处理

使得能够制备具有高细胞密度的细胞悬液。优选地细胞密度为约 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/ml。注意,所述离心处理的条件包括但不限于,例如,500rpm(30g)至1000rpm(70g),离心1至10分钟。

[0199] 将所述细胞悬液接种至与上述初始培养的容器类似的培养容器,因此对其进行培养。尽管传代培养的稀释率根据细胞的状态而改变,但是所述稀释率为约1:2至1:4,优选1:3。可在与上述初始培养的条件类似的培养条件下进行传代培养。孵育时间根据待使用的细胞的状态等而改变,但是例如为7至30天。可根据需要多次进行上述传代培养。当在本发明的试剂、组合物、培养基或容器中使用促进细胞粘附的试剂(例如,ROCK抑制剂等)时,可增强培养初期的细胞粘附,从而可缩短培养期。

[0200] <3>角膜内皮细胞层的制备

[0201] 将所述细胞悬液接种到基质材料(例如,胶原片层)上以进行培养。在这一阶段,调整待接种的细胞数目,从而在最终制备的角膜内皮制剂中形成所需的细胞层的细胞密度。具体而言,接种所述细胞,从而使得形成细胞密度在约1000至约4000个细胞/ mm^2 范围内的细胞层。在与上述初始培养条件类似的条件下进行所述培养。孵育时间根据待使用的细胞的状态而改变,但是,例如,3至30天。

[0202] 通过如上所述进行培养,获得角膜内皮制剂,其中在试管中培养的角膜内皮细胞层是在基质材料上形成。

[0203] 在本发明中,所述角膜内皮制剂可包含本发明的试剂或组合物,或包含它们中任一种的培养基,或者可将所述角膜内皮制剂维持在包含它们中任一种的容器中,以培养角膜内皮细胞或使其生长。所述角膜内皮制剂可包含本发明的试剂或组合物,或包含它们中任一种的培养基,或者可将所述角膜内皮制剂维持在包含它们中任一种的容器中,直至进行移植。本发明可包括角膜内皮制剂、本发明的试剂或组合物,或包含它们中任一种的培养基;或者,本发明提供了与包含它们中任一种的容器的组合。

[0204] 可将通过本发明的制备方法获得的角膜内皮制剂作为移植物用于治疗需要移植角膜内皮的疾病,例如,大泡性角膜病变、角膜水肿、角膜白斑,特别是角膜营养不良,以及由于外部损伤或内部眼科手术导致的角膜内皮病症而引起的大泡性角膜病变。除了手术以外,所述大泡性角膜病变、角膜内皮病症等的原因还包括Fuchs角膜内皮营养不良、假鳞片样剥脱综合征、角膜内皮炎等。

[0205] 给予本发明的角膜内皮制剂的受试者包括哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猫、狗、奶牛、绵羊、猴等),优选灵长类动物(例如,人)。

[0206] (角膜内皮疾病、疾患或病症的治疗和预防)

[0207] 本发明提供了用于治疗或预防角膜内皮疾病、疾患或病症的药物,其包含通过培养角膜内皮细胞或使其生长的方法而产生的角膜内皮细胞,所述方法包括使用本发明的试剂、组合物或培养基或容器培养角膜内皮细胞的步骤。应理解,能够以本文所述的任何形式使用本发明的试剂、组合物或培养基或容器。例如,可考虑本文所述的内容,例如,(用于培养角膜内皮细胞或使其生长的组合物)、(用于培养角膜内皮细胞的方法)和(角膜内皮细胞和角膜内皮制剂)。此外,应理解,用作药物的角膜内皮细胞可采用本文使用的任何形式。例如,可考虑(角膜内皮细胞和角膜内皮制剂)中所述的内容。

[0208] 在一个实施方案中,本发明的药物用于治疗 and 预防灵长类动物的角膜内皮的目

的。优选地,所述治疗或预防的对象为人角膜内皮。

[0209] 在一个实施方案中,本发明的药物中使用的角膜内皮细胞来自灵长类动物。优选地,本发明的药物中使用的角膜内皮细胞来自人。

[0210] 在一个实施方案中,本发明的药物所针对的角膜内皮疾病、疾患或病症是大泡性角膜病变、角膜内皮炎、角膜水肿、角膜白斑等。

[0211] 在一个实施方案中,本发明的药物以片状形式或作为悬液提供。

[0212] 在一个实施方案中,本发明的药物还包括促进细胞粘附的试剂。促进细胞粘附的试剂对从角膜组织分离的角膜内皮细胞或分离并传代培养的角膜内皮细胞发挥促进粘附的作用。可将所述促进细胞粘附的试剂与作为药物提供的角膜内皮细胞一起或分开提供。在一个具体的实施方案中,本发明的药物中使用的促进细胞粘附的试剂包括Rho激酶抑制剂。Rho激酶抑制剂包括以下文献中公开的化合物:美国专利No. 4678783、日本专利No. 3421217、国际公开No. WO 95/28387、国际公开No. WO 99/2062、国际公开No. WO 99/6140、国际公开No. WO 02/076976、国际公开No. WO 02/076977、国际公开No. WO 2002/083175、国际公开No. WO 02/100833、国际公开No. WO 03/059913、国际公开No. WO 03/062227、国际公开No. WO 2004/009555、国际公开No. WO 2004/022541、国际公开No. WO 2004/108724、国际公开No. WO 2005/003101、国际公开No. WO 2005/039564、国际公开No. WO 2005/034866、国际公开No. WO 2005/037197、国际公开No. WO 2005/037198、国际公开No. WO 2005/035501、国际公开No. WO 2005/035503、国际公开No. WO 2005/035506、国际公开No. WO 2005/080394、国际公开No. WO 2005/103050、国际公开No. WO 2006/057270和国际公开No. WO 2007/026664。所述化合物可通过每篇所公开的参考文献中所述的方法制备并且包括,例如,1-(5-异喹啉磺酰基)高哌嗪或其盐(例如,法舒地尔(1-(5-异喹啉磺酰基)高哌嗪)),以及(+)-反式-4-(1-氨基乙基)-1-(4-吡啶基氨基甲酰基)环己烷甲酰胺或其盐(例如,Y-27632((R)-(+)-反式-(4-吡啶基)-4-(1-氨基乙基)-环己烷甲酰胺二盐酸盐一水合物))。

[0213] 给予(移植)本发明的药物或方法的靶标包括哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猫、狗、奶牛、绵羊、猴等)。但是,优选灵长类动物,特别优选人。对于灵长类动物,角膜内皮治疗尚未取得令人满意的结果。在这个意义上,本发明提供了开创性的治疗方法和药物。

[0214] 在另一方面,本发明提供了用与治疗或预防角膜内皮疾病、疾患或病症的方法,包括使用通过以常规方式培养角膜内皮细胞的方法而产生的角膜内皮细胞的步骤,所述方法包括使用本发明的试剂、组合物、培养基或容器培养角膜内皮细胞的步骤。

[0215] 本文中引用的所提及的参考文献,例如,科学出版物、专利和专利申请,以引用的方式全文纳入本文,所述引用方式与每篇参考文献的内容具体地记载于其中的方式相同。

[0216] 如上所述,在提供优选的实施方案的同时对本发明进行描述以有助于理解。在下文中,将根据实施例对本发明进行描述。但是,提供以上说明和以下实施例的目的仅为举例说明,而非限制本发明。因此,本发明的范围仅通过权利要求来限定,而非通过本文具体记载的实施方案或实施例来限定。

[0217] [实施例]

[0218] 在下文中将描述实施例,在实施例中对本发明的角膜内皮细胞进行常规培养。当适用时,遵守厚生劳动省(Ministry of Health, Labour and Welfare)、文部科学省

(Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology)等针对处理生物样品等设置的标准,并且当适用时,根据《赫尔辛基宣言》或基于《赫尔辛基宣言》生成的伦理规定进行所述处理。对于用于研究的眼的捐献,从所有已故捐赠者的近亲属获得同意书。本研究获得SightLife™(美国华盛顿州,西雅图)眼库的伦理审查的许可。

[0219] (实验方法:研究级的人角膜组织)

[0220] 分别从SightLife™眼库获得12个人供体角膜,在原代培养之前在4℃下将全部角膜保存在保藏培养基(Optisol;Chiron Vision Corporation,Irvine,CA)中少于14天的时间。

[0221] (统计分析)

[0222] 使用Student's t-检验的t-检验确定两个样品比较的平均值中的统计学上显著差异(P值)。使用Dunnett's多重比较检验来分析多个样品组的比较中的统计学上显著差异。图表中所示的值代表平均值±SE。

[0223] (实施例1:层粘连蛋白链和整联蛋白链在角膜内皮细胞和后弹性层中的表达)

[0224] 在本实施例中,观察到层粘连蛋白链在后弹性层——其为角膜内皮细胞的基底膜——中的表达。

[0225] (材料和方法)

[0226] 使用PCR法进行层粘连蛋白链mRNA的表达。尽管未示出数据,但通过免疫染色确认了蛋白的表达。

[0227] 用PBS稀释二级抗体,在室温下孵育所得溶液30分钟。将Alexa™ Fluor 488标记的(缀合的)山羊抗兔IgG(目录编号:A11034;1:1500;Molecular Probe-Invitrogen)用作二级抗体。在振荡并用0.15%Triton/PBS冲洗两次及用PBS冲洗一次之后,使用碘化丙锭(目录编号:SP29004-41;PI;Nacalai Tesque,Inc.Kyoto,Japan)进行核染色,并且通过用盖玻片覆盖来包埋所述二级抗体。使用共焦激光扫描显微镜(Olympus Fluoview,Tokyo,Japan)观察荧光标记的二级抗体并拍照。

[0228] 用于PCR法中的层粘连蛋白链的引物序列示于下表1中。用于PCR法中的整联蛋白链的引物序列示于下表2中。所述引物是从Life Technologies Japan Ltd.获得(目录编号:10336022)。

[0229] 表1:PCR的寡核苷酸序列

[0230]

基因	正义引物	反义引物	大小 (bp)
层粘连蛋白 $\alpha 1$	5'-GACTCCGTCTCTCTGGACATAG-3' (SEQ ID NO: 9)	5'-CGTGGCATTACAGGGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 10)	180
层粘连蛋白 $\alpha 2$	5'-TGCTAGAATTTACCTCCGCTCG-3' (SEQ ID NO: 11)	5'-GATCAAGTGGACAAGCCCTG-3' (SEQ ID NO: 12)	203
层粘连蛋白 $\alpha 3$	5'-CTCCAAAGGCCCAACTCAAG-3' (SEQ ID NO: 13)	5'-CCATACTGCCCTCCTTAGTCTC-3' (SEQ ID NO: 14)	304
层粘连蛋白 $\alpha 4$	5'-CTTACGCCAACACCACCGATTG-3' (SEQ ID NO: 15)	5'-CCTTCTTCCAAGCATTCTCCG-3' (SEQ ID NO: 16)	140
层粘连蛋白 $\alpha 5$	5'-GAGGACTGAAGTGAAAACCTCAA-3' (SEQ ID NO: 17)	5'-CCACTGAAGTTGTAAATGGTG-3' (SEQ ID NO: 18)	221
层粘连蛋白 $\beta 1$	5'-GATGGTGAACCTTGATGAAAAGT-3' (SEQ ID NO: 19)	5'-GGCTTATATCCTTAGGAGTGA-3' (SEQ ID NO: 20)	258
层粘连蛋白 $\beta 2$	5'-GATGATCGCATCCAAGGGAC-3' (SEQ ID NO: 21)	5'-GTCCAGAGTAGGGAGTCTCAG-3' (SEQ ID NO: 22)	150
层粘连蛋白 $\beta 3$	5'-CCCAGATGGAGGAAGATGTC-3' (SEQ ID NO: 23)	5'-GTAGCTGAGTCTGTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 24)	144
层粘连蛋白 $\beta 4$	5'-GGCAGGCTACTTTGGATTTC-3' (SEQ ID NO: 25)	5'-GCTTGAGGGATCATCTGCAC-3' (SEQ ID NO: 26)	204
层粘连蛋白 $\gamma 1$	5'-GATGAGATGGTGACAGATCAAG-3' (SEQ ID NO: 27)	5'-TTTCCAGTCTCTTCAATGGTAT-3' (SEQ ID NO: 28)	199
层粘连蛋白 $\gamma 2$	5'-ATCGAAGGTACTGCGGAATC-3' (SEQ ID NO: 29)	5'-GTAGCCAGAAGCACAATCCTG-3' (SEQ ID NO: 30)	193
层粘连蛋白 $\gamma 3$	5'-GGGATACAAGAGGGAGATGC-3' (SEQ ID NO: 31)	5'-CATAGAAACCTGGCAAACAGC-3' (SEQ ID NO: 32)	157

[0231] 表2:PCR的寡核苷酸序列

[0232]

基因	正义引物	反义引物	大小 (bp)
整联蛋白 $\alpha 1$	5'-gaagaacctcctgaaaccttt-3' (SEQ ID NO: 33)	5'-tgtatcatattgggaatgaa-3' (SEQ ID NO: 34)	254
整联蛋白 $\alpha 2$	5'-tgatgggacagaagtaacatgc-3' (SEQ ID NO: 35)	5'-tggaccaacatctcaaaactg-3' (SEQ ID NO: 36)	333
整联蛋白 $\alpha 3$	5'-gcctgcctttgtttatcigt-3' (SEQ ID NO: 37)	5'-tccccactagaaggctcggga-3' (SEQ ID NO: 38)	257
整联蛋白 $\alpha 4$	5'-ataticagtcggagctggatc-3' (SEQ ID NO: 39)	5'-gcataattgtcacttccaaga-3' (SEQ ID NO: 40)	338
整联蛋白 $\alpha 5$	5'-tccicagcaagaatcacaacaa-3' (SEQ ID NO: 41)	5'-gttgagtcctcgaactcgggc-3' (SEQ ID NO: 42)	304
整联蛋白 $\alpha 6$	5'-agcaaggcagatggaataatgt-3' (SEQ ID NO: 43)	5'-cagggtaggaatttcgatcaag-3' (SEQ ID NO: 44)	275
整联蛋白 $\alpha 7$	5'-caggtcacctctaccatcc-3' (SEQ ID NO: 45)	5'-accgtgacctcacttgacct-3' (SEQ ID NO: 46)	262
整联蛋白 $\alpha 8$	5'-atggaaaatgtaaccaggatgg-3' (SEQ ID NO: 47)	5'-cagttatgaatgggcagaacaa-3' (SEQ ID NO: 48)	265
整联蛋白 $\alpha 9$	5'-cacttcagcccaacaatatca-3' (SEQ ID NO: 49)	5'-acagtgtgctgttaggcaagaa-3' (SEQ ID NO: 50)	305
整联蛋白 $\alpha 10$	5'-atcagtggtggtcagaggact-3' (SEQ ID NO: 51)	5'-gccctggctttgtagtatgtc-3' (SEQ ID NO: 52)	330
整联蛋白 $\alpha 11$	5'-ggacactgctgactacgigaag-3' (SEQ ID NO: 53)	5'-gcgtgtgctctctatgatgaag-3' (SEQ ID NO: 54)	294
整联蛋白 αE	5'-tagcaglgagaagcgcagag-3' (SEQ ID NO: 55)	5'-tcttcaggaagacgacagtg-3' (SEQ ID NO: 56)	300
整联蛋白 αV	5'-atctgtgaggtcgaacaggat-3' (SEQ ID NO: 57)	5'-accttgccaataaaagclacca-3' (SEQ ID NO: 58)	255
整联蛋白 αL	5'-gaaccattgacaccagaagiga-3' (SEQ ID NO: 59)	5'-ttctcaaaccccaactgtctt-3' (SEQ ID NO: 60)	341
整联蛋白 αM	5'-gatcggctaagagaaggacaga-3' (SEQ ID NO: 61)	5'-catggccacaattctctcaaa-3' (SEQ ID NO: 62)	330
整联蛋白 αX	5'-ccaacatcgccttacattga-3' (SEQ ID NO: 63)	5'-cgtgaagiatctcagcatcg-3' (SEQ ID NO: 64)	331
整联蛋白 αD	5'-ttaaccagatgaaggccttgi-3' (SEQ ID NO: 65)	5'-ggctttgtactctgcccac-3' (SEQ ID NO: 66)	296
整联蛋白 αIIb	5'-gaaaagactgaggaggctgaga-3' (SEQ ID NO: 67)	5'-gagaaaataccgcaactggag-3' (SEQ ID NO: 68)	245
整联蛋白 $\beta 1$	5'-gcigaagacatccccattgac-3' (SEQ ID NO: 69)	5'-atttcagatagcgcgtgttt-3' (SEQ ID NO: 70)	321
整联蛋白 $\beta 2$	5'-tgatggacctctccatccat-3' (SEQ ID NO: 71)	5'-gaaactgggtggagttgtgt-3' (SEQ ID NO: 72)	258
整联蛋白 $\beta 3$	5'-tgttaccactgatccaagac-3' (SEQ ID NO: 73)	5'-tccataagcatcaacaatgag-3' (SEQ ID NO: 74)	308
整联蛋白 $\beta 4$	5'-gttcacacctatttccctgc-3' (SEQ ID NO: 75)	5'-gaagggaaggttcagatggatg-3' (SEQ ID NO: 76)	316
整联蛋白 $\beta 5$	5'-gctgggtgtcacaacagatgat-3' (SEQ ID NO: 77)	5'-atcccagactgacaactccact-3' (SEQ ID NO: 78)	349
整联蛋白 $\beta 6$	5'-tgtgactgtgggaatgtgt-3' (SEQ ID NO: 79)	5'-caccagctagttgcactgtc-3' (SEQ ID NO: 80)	289
整联蛋白 $\beta 7$	5'-cacttcagacgacacattcat-3' (SEQ ID NO: 81)	5'-cccaactgcagacttaggaatc-3' (SEQ ID NO: 82)	250
整联蛋白 $\beta 8$	5'-gcattatgtgcacaaactca-3' (SEQ ID NO: 83)	5'-atttctcaggctctcactgc-3' (SEQ ID NO: 84)	255

[0233] *PCR法:通过RT-PCR(半定量逆转录聚合酶链式反应)对每种层粘连蛋白链和整联

蛋白链进行PCR法。引物购自寡核苷酸合成公司INVITROGEN,并且使用那些已进行脱盐处理的引物。RNEasy Mini试剂盒(QIAGEN GmbH, 目录编号:74106)用于从细胞中提取总RNA。从购自西雅图眼库的用于研究的角膜剥脱包含角膜内皮细胞的后弹性层,并且从基底膜机械剥脱角膜内皮细胞以用于从所述角膜内皮细胞中提取RNA。使用ReverTra Ace(Toyobo Co., Ltd.(目录编号:TRT-101))对RNA进行逆转录反应(42℃, 60分钟),使用DNA聚合酶的TAKARA Taq HotStart版本(Takara Bio Inc., 目录编号:RR001A),将GAPDH作为内标,扩增CD166和CD73。通过PCR设备(GeneAmp 9700;Applied Biosystems)和以下引物对扩增相同量的cDNA。在PCR反应中,使用表1、表2中所示的引物和以下所述的引物。

[0234] *GAPDH-F:GAGTCAACGGATTTGGTCGT(SEQ ID NO:85)

[0235] *GAPDH-R:TTGATTTTGGAGGGATCTCG(SEQ ID NO:86)

[0236] 使用1.5%琼脂糖凝胶(Nacalai Tesque, 目录编号:01149-76)对经扩增的cDNA片段进行电泳,并通过溴化乙锭(Nacalai Tesque, 目录编号:14603-51)染色检测所述片段。

[0237] *流式细胞术:将经培养的人角膜内皮接种到包被有FNC包衣的培养皿并在37℃、5%CO₂的条件下培养约14天直至达到汇合状态。使用TrypLE™ Select剥脱细胞并收集细胞。然后,根据指导手册使用流式细胞仪(BD FACSCanto™ II(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ))对整联蛋白链的表面抗原进行分析,同时使用人细胞表面标记物筛选板(BD Lyoplate™, BD Bio-sciences, Franklin Lakes, NJ)。

[0238] 如下所述培养人角膜内皮细胞。从购自西雅图眼库的用于研究的角膜剥脱包含角膜内皮细胞的后弹性层,并且从基底膜机械剥脱角膜内皮细胞。使用胶原酶(ROCHE, 目录编号:10 103 586 001)从基底膜分离(通常在37℃下使用1mg/ml胶原酶A(Roche Applied Science)处理2小时)和收集细胞之后,进行原代培养。对于培养基,使用其中针对3T3饲养细胞对以下进行条件化(conditioned)的培养基:Opti-MEM I-Reduced-Serum Medium,液态(INVITROGEN, 目录编号:31985-070)+8%胎牛血清(FBS)(BIOWEST, 目录编号:S1820-500)+200mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA, 目录编号:C7902-500G)+0.08%硫酸软骨素(SIGMA, 目录编号:C9819-5G)+20μg/ml抗坏血酸(SIGMA, 目录编号:A4544-25G)+50μg/ml庆大霉素(INVITROGEN, 目录编号:15710-064)+5ng/ml EGF(INVITROGEN, 目录编号:PHG0311)。具体而言,在37℃下消化之后,将从单个角膜获得的HCEC重悬于培养基中并铺板在包被有FNC Coating Mix™的12孔板的一个孔中。根据公开的方案制备所述培养基,对所述方案增加部分改变。简言之,制备基本培养基,其包含OptiMEM-I(Life Technologies)、8%FBS、5ng/ml表皮生长因子(EGF)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)、1μM SB431542(Merck Millipore)、20μg/ml抗坏血酸(Sigma-Aldrich)、200mg/L氯化钙(Sigma-Aldrich)、0.08%硫酸软骨素(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka)和50μg/ml庆大霉素。接下来,在培养灭活的3T3成纤维细胞之后收集条件化的培养基。如上文所述进行3T3成纤维细胞的灭活。简言之,使用4μg/ml丝裂霉素C(MMC)(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., Tokyo)在37℃、5%CO₂下孵育汇合的3T3成纤维细胞2小时,然后用胰蛋白酶处理所得细胞,并以2×10⁴个细胞/cm²的密度将其铺板在塑料平板上。在37℃、5%CO₂的增湿空气中培养HCEC,每3天更换培养基。当HCEC在14-28天中达到汇合状态时,在无Ca²⁺和Mg²⁺的PBS中冲洗HCEC,在37℃下用0.05%胰蛋白酶-EDTA进行胰蛋白酶处理5分钟,然后以1:2的比例传代培养。

[0239] (结果)

[0240] 当观察到层粘连蛋白链在后弹性层(角膜内皮细胞基底膜)中的表达时,层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链、层粘连蛋白 $\beta 1$ 链和层粘连蛋白 $\gamma 1$ 链的表达是显著的。另一方面,层粘连蛋白 $\alpha 1$ 链、层粘连蛋白 $\alpha 2$ 链和层粘连蛋白 $\alpha 3$ 链的表达是不明显的(数据未示出)。

[0241] 如图1所示,当观察到人角膜内皮细胞的层粘连蛋白链的mRNA表达时,层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链、层粘连蛋白 $\beta 1$ 链、层粘连蛋白 $\beta 2$ 链和层粘连蛋白 $\gamma 1$ 链的表达是显著的。另一方面,层粘连蛋白 $\alpha 1$ 链、层粘连蛋白 $\alpha 2$ 链、层粘连蛋白 $\alpha 3$ 链、层粘连蛋白 $\alpha 4$ 链、层粘连蛋白 $\beta 3$ 链、层粘连蛋白 $\gamma 2$ 链和层粘连蛋白 $\gamma 3$ 链的表达是不明显的。

[0242] 如图2所示,识别出整联蛋白 $\alpha 1$ 链、整联蛋白 $\alpha 2$ 链、整联蛋白 $\alpha 3$ 链、整联蛋白 $\alpha 6$ 链、整联蛋白 $\alpha 10$ 链、整联蛋白 $\alpha 11$ 链、整联蛋白 $\beta 1$ 链、整联蛋白 $\beta 5$ 链、整联蛋白 $\beta 8$ 链和整联蛋白 αV 链的表达。也识别出整联蛋白 $\beta 3$ 链、整联蛋白 $\beta 4$ 链和整联蛋白 $\beta 6$ 链的少量表达。因此,以上内容表明,角膜内皮细胞表达 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 7\beta 1$ 和 $\alpha 6\beta 4$ ——已知它们是结合层粘连蛋白的整联蛋白——中的至少一种。

[0243] 如图3(图3A、3B和3C)所示,整联蛋白 $\alpha 1$ 链、整联蛋白 $\alpha 2$ 链、整联蛋白 $\alpha 3$ 链、整联蛋白 $\alpha 5$ 链和整联蛋白 $\beta 1$ 链的表达被识别为作为表面抗原的表达。

[0244] (实施例2:促进人角膜内皮细胞的细胞粘附)

[0245] 在本实施例中,包被有层粘连蛋白等的培养容器用于确认是否有助于人角膜内皮细胞的细胞粘附。

[0246] (材料和方法)

[0247] *层粘连蛋白511(LN511,VERITAS公司)

[0248] *层粘连蛋白521(LN521,VERITAS公司)

[0249] *层粘连蛋白511-E8片段(382-02413,Nippi.Inc.)

[0250] *FNC coating **mix**®(50ml(AES-0407),ATHENA,目录编号:0407)

[0251] *明胶(G1890-500G,Sigma-Aldrich Co.LLC.)

[0252] *容器(3526,CORNING)

[0253] (方法)*人角膜内皮细胞(HCEC,来源和培养方法):如以上所述的实施例1进行HCEC培养。在无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS中冲洗经培养的细胞,并在37℃下用0.05%胰蛋白酶-EDTA进行胰蛋白酶化5分钟,然后接种到包被有FNC Coating **Mix**®的12孔板中。根据公布的方案制备培养基,对所述方案增加部分改变。简言之,制备基础培养基,其包含OptiMEM-I(Life Technologies)、8%FBS、5ng/ml表皮生长因子(EGF)(Sigma-Aldrich Co., St.Louis,MO)、10 μM SB431542(Merck Millipore)、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗坏血酸(Sigma-Aldrich)、200mg/L氯化钙(Sigma-Aldrich)、0.08%硫酸软骨素(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.,Osaka)和50g/ml庆大霉素。然后,培养灭活的3T3成纤维细胞之后,回收条件化的培养基。如以上所述进行3T3成纤维细胞的灭活。简言之,在37℃、5%CO₂的条件下将汇合的3T3成纤维细胞与4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丝裂霉素C(MMC)(Kyowa Hakko Kirin Co.,Ltd.,Tokyo)一起孵育2小时,然后进行胰蛋白酶处理,并以2 $\times 10^4$ 个细胞/cm²的密度将其铺板在塑料平板上。在37℃、5%CO₂的增湿空气中培养HCEC,每3天更换培养基。

[0254] (方法)将HCEC接种到包被有层粘连蛋白511、层粘连蛋白521、层粘连蛋白211、明胶、FNC Coating **Mix**®的96孔板的每个孔中,24小时后使用相差显微镜观察所形成的细胞。以5000个细胞/孔的接种密度接种到96孔培养板,在细胞接种后24小时使用

CellTiter-Glo®发光细胞存活测定法(Promega Corporation, Madison, WI, USA)检查粘附的细胞的数目。此外,评估包被有层粘连蛋白511-E8片段($0.001-1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)的培养板的细胞粘附。此外,将各种浓度的层粘连蛋白521和层粘连蛋白511-E8片段添加到用于接种的培养基中,并以类似方式对24小时后的细胞数目进行评估。

[0255] (通过BrdU吸收测量细胞生长)

[0256] 类似地,通过ELISA评估包被有各种基质的HCEC的BrdU吸收。以5000个细胞/孔的接种密度接种到96孔培养板,然后过夜培养。然后,将5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)添加到培养基中,然后过夜培养。除去培养基,添加固定液(Amersham细胞增殖biotrak ELISA系统,版本2)以在室温下孵育30分钟。然后,除去固定液,添加封闭液(Amersham细胞增殖biotrak ELISA系统,版本2),然后在室温下孵育30分钟。接着除去封闭液,添加过氧化酶缀合的抗BrdU抗体,然后在室温下孵育90分钟。使用洗涤缓冲液冲洗平板三次,添加TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)基质(Amersham细胞增殖biotrak ELISA系统,版本2),然后孵育5至30分钟。使用1M硫酸终止反应,使用酶标仪(plate reader)测量450nm处的吸光度。结果表示为5次测量的平均值±标准误差。

[0257] (结果)

[0258] 如图4所示,在存在层粘连蛋白511和层粘连蛋白521的情况下,有利于角膜内皮细胞的粘附和延伸,而在其他条件下不利于生长。

[0259] 如图5所示,与其他条件相比,在存在层粘连蛋白511和层粘连蛋白521的情况下,有利于角膜内皮细胞的细胞粘附。

[0260] 如图6所示,与其他条件相比,在存在层粘连蛋白511-E8片段的情况下,有利于角膜内皮细胞的细胞生长。具体而言,在 0.1 至 $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的浓度下有利地促进了细胞粘附。

[0261] 如图7所示,与其他条件相比,在存在层粘连蛋白511、层粘连蛋白521和层粘连蛋白511-E8片段的情况下,有利于角膜内皮细胞的细胞生长。

[0262] (实施例3:层粘连蛋白511和层粘连蛋白521在人角膜内皮细胞的细胞培养中的功能分析)

[0263] 在本实施例中,进行层粘连蛋白511和层粘连蛋白521在人角膜内皮细胞的细胞培养中的功能分析。

[0264] (材料和方法)

[0265] *人角膜内皮细胞(HCEC,来源和培养方法):如下进行HCEC的培养。简言之,从购自西雅图眼库的用于研究的角膜剥脱包含角膜内皮细胞的后弹性层;然后机械剥脱基底膜与角膜内皮细胞,然后使用胶原酶(ROCHE,目录编号:10103586001)从基底膜剥脱角膜内皮细胞(通常在 37°C 下使用 $1\text{mg}/\text{ml}$ 胶原酶A(Roche Applied Science)处理2小时)。回收后,进行原代培养。在原代培养中,铺板到包被有层粘连蛋白511、层粘连蛋白521、层粘连蛋白211、FNC Coating **Mix®**的12孔板的1个孔中。对于培养基,使用与实施例1中的培养基相同的培养基。使用相差显微镜观察细胞一段时间。

[0266] *染色等细胞观察方法(组织学测试):固定经培养的HCEC之后,使用ZO-1、 Na^+/K^+ -ATP酶作为功能相关的标记物,进行免疫染色,然后使用荧光显微镜进行观察。在室温(RT)下使用4%甲醛固定HCEC 10分钟,然后用1%胎牛血清(BSA)孵育30分钟。对紧密连接相关蛋白ZO-1和泵功能相关蛋白 Na^+/K^+ -ATP酶进行免疫组织化学分析。以1:200稀释度使用每种

一级抗体。对于二级抗体,使用1:2000稀释度的Alexa Fluor™ 488标记的或Alexa Fluor™ 594标记的山羊抗小鼠IgG(Life Technologies)。然后,使用DAPI(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)对细胞核进行染色。然后,使用荧光显微镜(BZ-9000;Keyence, Osaka, Japan)观察载玻片。

[0267] *Na⁺/K⁺-ATP酶的抗体:使用MILLIPORE(MILLIPORE目录编号:05-369)制备的那些抗体。

[0268] *ZO-1的抗体:使用Rabbit ZYMED LABORATORIES(ZYMED LABORATORIES目录编号:61-7300)制备的那些抗体。

[0269] 如图8所示,层粘连蛋白511和层粘连蛋白521被证明可使人角膜内皮细胞的细胞培养更有效。相差显微镜的照片示出原代培养2天后的细胞。

[0270] 如图9所示,层粘连蛋白511和层粘连蛋白521被证明可允许具有高细胞密度的人角膜内皮细胞的细胞培养。相差显微镜的照片示出原代培养20天后的细胞。

[0271] 如图10和11所示,层粘连蛋白511和层粘连蛋白521被证明可保持ZO-1和Na⁺/K⁺-ATP酶的活性,并且证明了使用本发明方法进行的培养允许在生长的同时维持正常功能。与层粘连蛋白211和未包被的对照相比,层粘连蛋白511和层粘连蛋白521中的细胞密度更高。

[0272] 如图12所示,将各种浓度的层粘连蛋白521和层粘连蛋白511-E8片段添加到待接种的培养基中,因此促进了角膜内皮细胞的细胞粘附。

[0273] (实施例4:示例性制剂:用与制备角膜内皮片层的培养溶液)

[0274] 在本实施例中,作为制剂的实例,如下所述制备包含本发明试剂的培养溶液,所述培养溶液用于制备角膜内皮片层。

[0275] 使用常规方法制备以下所示的培养溶液。

[0276] 层粘连蛋白511、层粘连蛋白521和/或其片段(0.75μg/cm²)

[0277] 胎牛血清(FBS) 10ml

[0278] 青霉素-链霉素溶液 1ml

[0279] 碱性FGF 200ng

[0280] DMEM 适量

[0281] 总量 100ml

[0282] 例如,可将BIOWEST(目录编号:S1820-500)或Invitrogen制备的那些用于FBS。对于青霉素-链霉素溶液,可使用Nacalai Tesque制备的那些(包含青霉素5000μg/ml,链霉素5000μg/ml)。此外,例如,对于碱性FGF,可使用Invitrogen制备的那些(INVITROGEN,目录编号:13256-029)。对于SB431542,可使用Tocris Cookson Ltd.制备的那些,对于SB203580,可使用商标CALBIOCHEM的那些。对于DMEM,可使用Invitrogen制备的那些。

[0283] (实施例5:示例性制剂:用于保存或扩增角膜的容器的组合物)

[0284] 在本实施例中,作为制剂的实例,如下所述制备用于包被容器的溶液,其包含本发明的试剂。

[0285] 通过常规方法制备以下所示的保存溶液。

[0286] 层粘连蛋白511、层粘连蛋白521和/或其片段(0.75μg/cm²)

[0287] 适合的缓冲液 适量

[0288] 总量 100ml

[0289] 可以与实施例4类似的方式获得每种成分。

[0290] 如以上所述,通过使用本发明的优选实施方案来举例说明本发明。但是,应理解,本发明的范围应当仅根据权利要求来解释。此外,应理解,本文引用的任何专利、任何专利申请和任何文献以引用的方式纳入本文,所述引用方式与所述内容具体记载于其中的方式相同。本申请要求2013年11月27日提交的日本专利申请No.2013-244972的优先权,该专利申请以引用的方式全文纳入本文。

[0291] [工业应用]

[0292] 本申请提供了用于促进角膜内皮细胞生长的培养组分和培养方法。本申请提供了在与角膜移植相关技术有关的工业(细胞培养工业、制药业等)中可用的技术。

[0293] (序列表独立文本)

[0294] SEQ ID NO:1层粘连蛋白 α 5链核酸序列(NM_005560)

[0295] SEQ ID NO:2层粘连蛋白 α 5链氨基酸序列(NP_005551)

[0296] SEQ ID NO:3层粘连蛋白 β 1链核酸序列(NM_002291)

[0297] SEQ ID NO:4层粘连蛋白 β 1链氨基酸序列(NP_002282)

[0298] SEQ ID NO:5层粘连蛋白 β 2链核酸序列(NM_002292)

[0299] SEQ ID NO:6层粘连蛋白 β 2链氨基酸序列(NP_002283)

[0300] SEQ ID NO:7层粘连蛋白 γ 1链核酸序列(NM_002293)

[0301] SEQ ID NO:8层粘连蛋白 γ 1链氨基酸序列(NP_002284)

[0302] SEQ ID NO:9层粘连蛋白 α 1链正义引物序列:5'-GAGTCCGTCTCTCTGGACATAG-3'

[0303] SEQ ID NO:10层粘连蛋白 α 1链反义引物序列:5'-CGTGGCATTACAGGGTTGAC-3'

[0304] SEQ ID NO:11层粘连蛋白 α 2链正义引物序列:5'-TGCTAGAATTTACCTCCGCTCG-3'

[0305] SEQ ID NO:12层粘连蛋白 α 2链反义引物序列:5'-GATCAAGTGGACAAGCCCTG-3'

[0306] SEQ ID NO:13层粘连蛋白 α 3链正义引物序列:5'-CTCCAAAGGCCCAACTCAAG-3'

[0307] SEQ ID NO:14层粘连蛋白 α 3链反义引物序列:5'-CCATAACTGCCTCCTTAGTCTC-3'

[0308] SEQ ID NO:15层粘连蛋白 α 4链正义引物序列:5'-CTTACGCAACACCACCGGATTC-3'

[0309] SEQ ID NO:16层粘连蛋白 α 4链反义引物序列:5'-CCTTCTTCCAAGCATTCTCCG-3'

[0310] SEQ ID NO:17层粘连蛋白 α 5链正义引物序列:5'-GAGGACTGAAGTGA AAAACTCAA-3'

[0311] SEQ ID NO:18层粘连蛋白 α 5链反义引物序列:5'-CCACTGAAGTTGTAAATGGTG-3'

[0312] SEQ ID NO:19层粘连蛋白 β 1链正义引物序列:5'-GATGGTGA ACTTGATG AAAAGT-3'

[0313] SEQ ID NO:20层粘连蛋白 β 1链反义引物序列:5'-GGCTTATATCCTTTAGGAGTGA-3'

[0314] SEQ ID NO:21层粘连蛋白 β 2链正义引物序列:5'-GATGATCGCATCCAAGGGAC-3'

[0315] SEQ ID NO:22层粘连蛋白 β 2链反义引物序列:5'-GTCCAGAGTAGGGAGTCTCAG-3'

[0316] SEQ ID NO:23层粘连蛋白 β 3链正义引物序列:5'-CCCAGATGGAGGAAGATGTC-3'

[0317] SEQ ID NO:24层粘连蛋白 β 3链反义引物序列:5'-GTAGCTGAGTCTGTGGGCAG-3'

[0318] SEQ ID NO:25层粘连蛋白 β 4链正义引物序列:5'-GGCAGGCTACTTTGGATTTC-3'

[0319] SEQ ID NO:26层粘连蛋白 β 4链反义引物序列:5'-GCTTGAGGGATCATCTGGAC-3'

[0320] SEQ ID NO:27层粘连蛋白 γ 1链正义引物序列:5'-GATGAGATGGTGACAGATCAAG-3'

[0321] SEQ ID NO:28层粘连蛋白 γ 1链反义引物序列:5'-TTTCCAGTCTCTTCAATGGTAT-3'

[0322] SEQ ID NO:29层粘连蛋白 γ 2链正义引物序列:5'-ATCGAAGGTTACTGCGGAATC-3'

- [0323] SEQ ID NO:30层粘连蛋白 γ 2链反义引物序列:5'-GTAGCCAGAAGCACAAATCCTG-3'
- [0324] SEQ ID NO:31层粘连蛋白 γ 3链正义引物序列:5'-GGGATACAAGAGGGAGATGC-3'
- [0325] SEQ ID NO:32层粘连蛋白 γ 3链反义引物序列:5'-CATAGAAACCTGGCAAACAGC-3'
- [0326] SEQ ID NO:33整联蛋白 α 1链正义引物序列:5'-gaagaacctcctgaaacctttt-3'
- [0327] SEQ ID NO:34整联蛋白 α 1链反义引物序列:5'-tgatgtcatattggggaatgaa-3'
- [0328] SEQ ID NO:35整联蛋白 α 2链正义引物序列:5'-tgatgggacagaagtaacatgc-3'
- [0329] SEQ ID NO:36整联蛋白 α 2链反义引物序列:5'-tggaaccaacatcttcaaaactg-3'
- [0330] SEQ ID NO:37整联蛋白 α 3链正义引物序列:5'-gctctgccttttggtttatctgt-3'
- [0331] SEQ ID NO:38整联蛋白 α 3链反义引物序列:5'-ttcccactagaaggctctgggta-3'
- [0332] SEQ ID NO:39整联蛋白 α 4链正义引物序列:5'-atattcagtcggagctggatcat-3'
- [0333] SEQ ID NO:40整联蛋白 α 4链反义引物序列:5'-gcatatttgtcacttccaacga-3'
- [0334] SEQ ID NO:41整联蛋白 α 5链正义引物序列:5'-tcctcagcaagaatctcaacaa-3'
- [0335] SEQ ID NO:42整联蛋白 α 5链反义引物序列:5'-gttgagtcctgtaactctggtc-3'
- [0336] SEQ ID NO:43整联蛋白 α 6链正义引物序列:5'-agcaaggcagatggaataatgt-3'
- [0337] SEQ ID NO:44整联蛋白 α 6链反义引物序列:5'-cagggtaggaatttcgatcaag-3'
- [0338] SEQ ID NO:45整联蛋白 α 7链正义引物序列:5'-caggtcaccttctacctcatcc-3'
- [0339] SEQ ID NO:46整联蛋白 α 7链反义引物序列:5'-accgtgacctcatacttgacct-3'
- [0340] SEQ ID NO:47整联蛋白 α 8链正义引物序列:5'-atggaaaatgtaaccaggatgg-3'
- [0341] SEQ ID NO:48整联蛋白 α 8链反义引物序列:5'-cagttatgaatgggcagaacaa-3'
- [0342] SEQ ID NO:49整联蛋白 α 9链正义引物序列:5'-cactttcagcccatcaatatca-3'
- [0343] SEQ ID NO:50整联蛋白 α 9链反义引物序列:5'-acagtgtgctgttaggcaagaa-3'
- [0344] SEQ ID NO:51整联蛋白 α 10链正义引物序列:5'-atcagtgtggttcagagggact-3'
- [0345] SEQ ID NO:52整联蛋白 α 10链反义引物序列:5'-gccctggctttgtagtattgtc-3'
- [0346] SEQ ID NO:53整联蛋白 α 11链正义引物序列:5'-ggacactgctgactacgtgaag-3'
- [0347] SEQ ID NO:54整联蛋白 α 11链反义引物序列:5'-gcgtgtgctctctatgatgaag-3'
- [0348] SEQ ID NO:55整联蛋白 α E链正义引物序列:5'-tagcagtgaagaagctgacgag-3'
- [0349] SEQ ID NO:56整联蛋白 α E链反义引物序列:5'-tccttcaggaagacgacagtga-3'
- [0350] SEQ ID NO:57整联蛋白 α V链正义引物序列:5'-atctgtgaggtcgaaacaggat-3'
- [0351] SEQ ID NO:58整联蛋白 α V链反义引物序列:5'-accttgccaataaaagctacca-3'
- [0352] SEQ ID NO:59整联蛋白 α L链正义引物序列:5'-gaaccattgacaccagaagtga-3'
- [0353] SEQ ID NO:60整联蛋白 α L链反义引物序列:5'-ttcttcaaaccccaactgtctt-3'
- [0354] SEQ ID NO:61整联蛋白 α M链正义引物序列:5'-gatcggctaagagaaggacaga-3'
- [0355] SEQ ID NO:62整联蛋白 α M链反义引物序列:5'-cattgccacaattcttctcaaa-3'
- [0356] SEQ ID NO:63整联蛋白 α X链正义引物序列:5'-ccaacatctgcctttacattga-3'
- [0357] SEQ ID NO:64整联蛋白 α X链反义引物序列:5'-cgtgaagtatctctgagcatcg-3'
- [0358] SEQ ID NO:65整联蛋白 α D链正义引物序列:5'-ttaaccagatgaagggtttgt-3'
- [0359] SEQ ID NO:66整联蛋白 α D链反义引物序列:5'-ggctcttgtacttctgcccac-3'
- [0360] SEQ ID NO:67整联蛋白 α IIb链正义引物序列:5'-gaaaagactgaggaggctgaga-3'
- [0361] SEQ ID NO:68整联蛋白 α IIb链反义引物序列:5'-gagaaaatatccgcaactggag-3'

- [0362] SEQ ID NO:69整联蛋白β1链正义引物序列:5'-gctgaagactatcccattgacc-3'
- [0363] SEQ ID NO:70整联蛋白β1链反义引物序列:5'-atttccagatatgcgctgtttt-3'
- [0364] SEQ ID NO:71整联蛋白β2链正义引物序列:5'-tgatggacctctcctactccat-3'
- [0365] SEQ ID NO:72整联蛋白β2链反义引物序列:5'-gaaactggttggagttgttggt-3'
- [0366] SEQ ID NO:73整联蛋白β3链正义引物序列:5'-tgtttaccactgatgccaaagac-3'
- [0367] SEQ ID NO:74整联蛋白β3链反义引物序列:5'-tcccataagcatcaacaatgag-3'
- [0368] SEQ ID NO:75整联蛋白β4链正义引物序列:5'-gcttcacacctatttccctgtc-3'
- [0369] SEQ ID NO:76整联蛋白β4链反义引物序列:5'-gaaggaaggtttcagatggatg-3'
- [0370] SEQ ID NO:77整联蛋白β5链正义引物序列:5'-gctggtgttcacaacagatgat-3'
- [0371] SEQ ID NO:78整联蛋白β5链反义引物序列:5'-atcccagactgacaactccact-3'
- [0372] SEQ ID NO:79整联蛋白β6链正义引物序列:5'-tgtgactgtggtgaatgtgtgt-3'
- [0373] SEQ ID NO:80整联蛋白β6链反义引物序列:5'-caccagctagtttgcacttgtc-3'
- [0374] SEQ ID NO:81整联蛋白β7链正义引物序列:5'-cacttcagacgacacattccat-3'
- [0375] SEQ ID NO:82整联蛋白β7链反义引物序列:5'-cccaactgcagacttaggaatc-3'
- [0376] SEQ ID NO:83整联蛋白β8链正义引物序列:5'-gcattatgtcgaccaaacttca-3'
- [0377] SEQ ID NO:84整联蛋白β8链反义引物序列:5'-atttcttcaggttctcacgtc-3'
- [0378] SEQ ID NO:85GAPDH-F:GAGTCAACGGATTTGGTCGT
- [0379] SEQ ID NO:86GAPDH-R:TTGATTTTGAGGGATCTCG

序列表

<110> Kyoto Prefectural Public University corporation
The Doshisha
Senju Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> 层粘连蛋白应用于角膜内皮细胞培养

<130> DS010PCT

<150> JP2013-244972

<151> 2013-11-27

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11445

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

[0001] agaccgcgcg ggctcccgcc gcgcgcgctg tccctggagc tcggggacgc ggcccggagc 60
cggaagatg gcgaagcggc tetgcgcggg gagegcactg tgtgttcgcg gccccgggg 120
ccccgcgcg ctgctgctgg tcgggctggc gctgctgggc gcggcgcggg cgcgggagga 180
ggcgggcggc ggcttcagcc tgcaccgcc ctacttcaac ctggccgagg gcgccgcat 240
cgccgcctcc gcgacctcg gagaggagge cccggcgcgc ggctcccgcc gccccaccga 300
ggacctttac tgcaagctgg tagggggccc cgtggccggc ggcgacccca accagaccat 360
ccggggccag tactgtgaca tctgcacggc tgccaacage aacaaggcac acccccgag 420
caatgccatc gatggcacgg agcgttggtg gcagagtcca ccgtgtccc gcggcctgga 480
gtacaacgag gtcaacgtca ccctggacct gggccaggtc ttccacgtgg cctacgtcct 540
catcaagttt gccaactcac cccggccgga cctctgggtg ctggagcggc ccatggactt 600
cgccgcacc taccagcct ggagttctt tgcctctcc aagagggact gtctggagcg 660
gttcgggcca cagacgtgg agcgcacac acgggacgac gcggccatct gcaccaccga 720
gtactcacgc atcgtgcccc tggagaacgg agagatcgtg gtgtccctgg tgaacggacg 780
tcgggcgcgc atgaatttct ctactcgcc gctgtacgt gagtcacca aggccaccaa 840
cgteccgctg cgttctctgc gtaccaaac gctgctgggc catctcatgg ggaaggcgt 900
gcgggacccc acggtcaccc gccggtatta ttacagcate aaggatatea gcatcgagg 960
ccgtgtgtc tgccacggcc acgcggatgc ctgcgatgcc aaagacccca cggaccggtt 1020
caggctgcag tgcaactgcc agcacaacac ctgcgggggc acctgcgacc gctgtgtccc 1080
cggttcaat cagcagccgt ggaagcctgc gactgccaac agtgccaacg agtgccagtc 1140
ctgtaactgc taaggccatg ccaccgactg ttactacgac ctgaggtgg acgggcgcc 1200
cgccagccag agcctggatg gcacctatca ggggtgggggt gctgtatcg actgccagca 1260

	ccacaccacc ggcgtcaact gtgagcgtg cctgcccggc ttctaccgt ctcccaacca	1320
	ccctctcgac tcgcccacg tctgccggc ctgcaactgc gagtcgact tcacggatgg	1380
	cacctgcgag gacctgacgg gtcgatgcta ctgccgccc aacttctctg gggagcggtg	1440
	tgacgtgtgt gccgagggt tcacgggctt cccaagctgc taccgacgc cctegtcctc	1500
	caatgacacc agggagcagg tctgccagc cggccagatt gtgaattgtg actgcagcgc	1560
	ggcagggacc cagggcaacg cctgccggaa ggacccaagg gtgggacgct gctgtgcaa	1620
	acccaacttc caaggacccc attgtgagct ctgcgcgcca gggttctacg gcccggctg	1680
	ccagccctgc cagtgttcca gccctggagt ggccgatgac cgtgtgacc ctgacacagg	1740
	ccagtgcagg tgccgagtgg gcttcgaggg ggccacatgt gatcgtgtg cccccgcta	1800
	ctttcaactc cctctctgcc agttgtgtgg ctgcagccct gcaggaaact tgcccagggg	1860
	ctgcgatgag gccggccgct gccatgcca gccagatgtt gctggacctc attgtgaccg	1920
	gtgcgcgccc ggctaccatg gtttcccaaa ctgccaagca tgcacctgcg accctcgggg	1980
	agccctggac cagctctgtg gggcgggagg ttgtgcccgc tgccgccccg gctacacagg	2040
	cactgcctgc caggaatgca gcccggcctt tcacggcttc ccagctgtg tccctgcc	2100
	ctgctctgct gaaggctccc tgcacgcagc ctgtgacccc cggagtgggc agtgcagctg	2160
	ccggccccgt gtgacgggga tgcggtgtga cacatgtgtg cccggtgcct acaacttccc	2220
[0002]	ctactgcgaa gctggctctt gccacctgc cggctctgcc ccagtggatc ctgcccttc	2280
	tgaggcacag gtacctgta tgtgccgggc tcacgtggag gggecgagct gtgaccgtg	2340
	caaacctggg ttctggggac tgagccccag caaccccgag ggctgtaccg gctgcagctg	2400
	cgacctcagg ggcacactgg ttggagtgtc tgagtgccag cggggcaccg gccagtgtt	2460
	ctgcaagccc cacgtgtgcg gccaggcctg cgcgtcctgc aaggatggt tctttggaact	2520
	ggatcaggct gactatittg gctgccgcag ctgccggtgt gacattggcg gtgcaactggg	2580
	ccagagctgt gaaccgagga cgggcgtctg ccggtgccgc cccaacaccc agggccccac	2640
	ctgcagcgag cctgcgaggg accaactaact cccggacctg caccacctgc gcctggagct	2700
	ggaggaggct gccacacctg agggtcacgc cgtgcgcttt ggttcaacc cctcagatt	2760
	cgagaacttc agctggaggg gctacgcgca gatggcacct gtccagccc ggatcgtggc	2820
	caggctgaac ctgacctccc ctgacctttt ctggctcgtc ttccgatacg tcaaccgggg	2880
	ggccatgagt gtgagcgggc ggttctctgt gcgagaggag ggcaggtcgg ccacctgcgc	2940
	caactgcaca gcacagatc agcccgtggc ctccccacc agcacggagc ctgccttcat	3000
	caccgtgccc cagaggggct tcggagagcc ctttgtgtg aaccctggca cctgggcct	3060
	gcgtgtggag gccgaagggg tctctctgga ctacgtggtt ctgctgcta gcgcatacta	3120
	cgaggcggcg ctctgcagc tgggggtgac tgaggcctgc acataccgtc cctctgccc	3180
	gcagcttggc gacaactgcc tctctacac acacctcccc ctggatggt tccccctggc	3240

	cgcgggctg gaggccctgt gtcgccagga caacagcctg ccccgccct gccccacgga	3300
	gcagctcagc ccgtcgacc cgccactgat cacctgcacg ggcagtgatg tggacgtcca	3360
	gttcaagtg gcagtgccac agccaggccg ctatgcccta gtggtggagt acgccaatga	3420
	ggatgcccgc caggaggtgg gcgtggccgt gcacacccca cagcgggcc cccagcagg	3480
	gtgtctctcc ctgcaccctt gcctgtacag caccctgtgc cggggcacig cccgggatac	3540
	ccaggaccac ctggtgtgtt tccacctgga ctcgaggcc agcgtgaggc tcacagccga	3600
	acaggcacgc ttcttcttgc acggggtcac tctggtgccc attgaggagt tcagcccgga	3660
	gttcgtggag ccccggttca gctgcatac cagccacggc gcctttggcc ccaacagtgc	3720
	cgctgtctg ccctcgctt tcccaaagcc gccccagccc atcatctca gggactgcca	3780
	ggtgatcccg ctgcgcgcc gcctccgct gaccacgcg caggatctca ctccagccat	3840
	gtccccaget ggaccccgac ctggccccc caccgtgtg gacctgatg cagagccac	3900
	ctgtctgct gaggccagc ccacctggt cttaccacc catgtgccc cgtgggccg	3960
	ctatgcctt ctgtgcacg gtaccagcc agccacccc accttcccg tggagtcct	4020
	catcaacgcc ggccgctgt ggccaggcca cgcacgcc agcttctgt cacatgcta	4080
	cggctgccc acctgtgtg tgtgtgagg ccaggccctg ctggacgtga cccacagca	4140
[0003]	gtcactgtg acctgtgtg tgcccaagg ccggtggctc tggctggatt atgtactgt	4200
	ggtccctgag aacgtctaca gctttggcta cctcgggag gagccctgg ataatctta	4260
	tgaattcatc agccactgc cagcccagg ctaccacatc agcccagca gctcatcct	4320
	gttctgccga aacgtgtgt ctccctctc cctcttctat aacaacggag cccgtccatg	4380
	tgtgtgccac gaagtaggtg ctacaggccc cactgtgag cccttcgggg gccagtgtcc	4440
	ctgccatgcc catgtcattg gccgtgactg ctccgctgt gccaccgat actgggctt	4500
	ccccactgc aggcctgtg actgcggtg ccgctctgt gacgagctc cgggccagt	4560
	catctgccg ccacgcacca tccgccga ctgctgtg tgccagccc agacctttg	4620
	ctgccacccc ctggtcggct gtgaggagt taactgtca gggcccgc tccaggagt	4680
	cacagacct acctgtgaca cagacagcg ccagtgaag tgcagacca acgtgactgg	4740
	gcgcgctgt gatacctgt ctcgggctt ccattgctac ccccgctgc gccctgtga	4800
	ctgtcacgag gcgggcactg cgcctggct gtgtgacccc ctacagggc agtctactg	4860
	taaggagaac gtgcagggcc ccaaatgtga ccagtgcag cttgggacct tctactgga	4920
	tgtgtccaa cccaaaggtt gaacccgtg cttctgttt ggggccacgg agcgtgccg	4980
	gagctgtcc tacacccgc aggagttcgt ggatatggag ggatgggtgc tctgagcac	5040
	tgaccggcag gtgtgcccc acgagcggca gccagggaag gagatgtcc gtgcagacct	5100
	gcggcacgtg cctgaggtg tgcccaggc tttcccag ctgtactggc aggcccac	5160

	ctcctacctg ggggaccggg tgtcactcta cgggtgggacc ctccgttatg aactgcactc	5220
	agagacceag cggggagatg tctttgtccc catggagagc aggccggatg tgggtgtgca	5280
	gggcaaccag atgagcatac catctctgga gccggcatac cccacgctg gccacgttca	5340
	ccgtgggcag ctgcagctgg tggaggggaa ctcccggeat acggagacgc gcaaacactgt	5400
	gtcccgcgag gagctcatga tgggtgtggc cagcctggag cagctgcaga tccgtgccct	5460
	cttctcacag atctcctcgg ctgtcttctt gcgcagggtg gcactggagg tggccagccc	5520
	agcaggccag ggggccctgg ccagcaatgt ggagctgtgc ctgtgccccg ccagctaccg	5580
	gggggactca tgccaggaat gtgcccccg cttctatcgg gacgtcaaag gtctcttctt	5640
	gggccgatgt gtcccttgtc agtgccatgg aactcagac cgtgcctcc ctggctctgg	5700
	cgtctgtgtg gactgccage acaacaccga aggggccca cgtgagcgt gccaggctgg	5760
	cttcgtgagc agcaggagc accccagcgc cccctgtgtc agctgccccf gccccctc	5820
	agtgccttcc aacaacttcg ccgagggctg tgtcctgcga ggccggccga cccagtgcct	5880
	ctgcaaacct ggttatgcag gtgcctcctg cgagcgggtg ggcgccgat tctttgggaa	5940
	cccactggtg ctgggcagct cctgccagcc atgcgactgc agcggcaacg gtgaccccaa	6000
	cttgcctctc agcgaactgc accccctgac gggcgccctg cgtggctgcc tgcgccacac	6060
	cactgggccc cgctgcgaga tcgtgcccc cggttcttac ggcaacgcc tctgccccg	6120
[0004]	caactgcacc cgggtgcgact gtaccccatg tgggacagag gcctgcgacc cccacagcgg	6180
	gcactgcctg tgcaaggcgg gcgtgactgg gggcgctgt gaccgctgc aggagggaca	6240
	ttttggtttc gatggctgag ggggctgccc cccgtgtgct tgtggaccgg ccgccagggg	6300
	ctccgagtgc cacccccaga ggggacagt ccactgccga ccagggacca tgggacccca	6360
	gtgccgcgag tgtgccccg gctactgggg gctccctgag caggcgtgca ggcgtgcca	6420
	gtgccctggg ggccgctgtg accctcacac gggccgctgc aactgcccc cggggctcag	6480
	cggggagcgc tgcgacacct gcagccagca gcatcaggtg cctgttccag gcgggcctgt	6540
	ggggcacagc atccactgtg aagtgtgtga ccaactgtgtg gtccctgctc tggatgacct	6600
	ggaacgggcc ggccgccctc tccccccat tcacagcaa ctgcgtggca tcaatgccag	6660
	ctccatggcc tgggcccgte tgcacaggt gaacgcctc atcgtgacc tgcagagcca	6720
	gtcccgagc cccctgggcc cccgccatga gacggcacag cagctggagg tctggagca	6780
	gcagagcaca agcctcgggc aggaagcacg gcgctaggg gccagggcc tggggaccgc	6840
	agaccaggcg agccaattgc tggccggcac cgaggccaca ctgggccatg cgaagacgt	6900
	gttggcggcc atccgggctg tggaccgcac cctgagcgag ctcatgtccc agacgggcca	6960
	cctggggctg gccaatgcct cggctccatc aggtgagcag ctgctccgga cactggccga	7020
	ggtggagcgg ctgctctggg agatgcgggc ccgggacctg ggggccccgc aggcagcagc	7080
	tgaggctgag ttggctgcag cacagagatt gctggccccg gtgcaggagc agctgagcag	7140

[0005]	cctctgggag gagaaccagg cactggccac acaaacccgc gaccggctgg cccagcacga	7200
	ggccggcctc atggacctgc gagaggettt gaaccgggca gtggacgcca caccggaggc	7260
	ccaggagctc aacagccgca accaggagcg cctggaggaa gccctgcaaa ggaagcagga	7320
	gctgtcccgg gacaatgcca ccctgcaggc cactctgcat gcggtaggg acaccctggc	7380
	cagcgtcttc agattgctgc acagcctgga ccaggctaag gaggagctgg agcgccctgc	7440
	cgccagcctg gacggggctc ggacccact gctgcagagg atgcagacct tctcccggc	7500
	gggcagcaag ctgcgtctag tggaggccgc cgaggccac gcacagcagc tgggccagct	7560
	ggcactcaat ctgtcagca tcctctgga cgtcaaccag gaccgectca ccagagggc	7620
	categaggcc tccaacgcct acagccgcat cctgcaggcc gtgcaggetg ccgaggatgc	7680
	tgttgccag gccctgcagc agggcgacca cacgtgggcg acggtggtgc ggcaggcct	7740
	ggtggaccga gccagcagc tectggccaa cagcactgca ctagaagagg ccatgtcca	7800
	ggaacagcag aggetgggccc ttgtgtgggc tgccctccag ggtgccagga ccagctccg	7860
	agatgtccgg gccagaagg accagctgga ggcgcacate caggcggcgc aggccatgct	7920
	tgccatggac acagacgaga caagcaagaa gatcgacat gccaaaggctg tggtctgtga	7980
	agcccaggac accgccacc gtgtgcagtc ccagctgcag gccatgcagg agaatgtgga	8040
	gcggtggcag ggccagtagc agggcctgcg gggccaggac ctgggccagg cagtgttga	8100
	cgcaggccac tcagtgtcca ccctggagaa gacgtgccc cagctgettg ccaagctgag	8160
	cactctggag aaccgtgggg tgcacaacgc cagcctggcc ctgtccgcca geattggccg	8220
	cgtgcgagag ctcatgtccc aggccegggg ggetgccagt aaggteaagg tgcccatgaa	8280
	gttcaacggg cgtcagggg tgcagctgc caccacagg gatcttgccg accttctgc	8340
	ctacactgcc ctcaagttct acctgcaggg ccagagcct gaccctgggc aggggtaccga	8400
	ggatcgcttt gtgatgtaca tgggcagccg ccaggccact ggggactaca tgggtgtgtc	8460
	tctgcgtgac aagaaggctc actgggtgta tcagctgggt gaggcgggcc ctgcagtcct	8520
	aagcatcgat gaggacattg gggagcagtt cgcagctgtc agcctggaca ggactetcca	8580
	gtttggccac atgtccgtca cagtggagag acagatgate caggaaacca agggtgacac	8640
	ggtggccctt ggggcagagg ggctgtcaa cctgcggcca gacgacttcg tcttctaagt	8700
	cggggggtae ccagttacct tcacgcccc tcccctgctt cgcttccccg gctaccggg	8760
	ctgcategag atggacacgc tgaatgagga ggtggtcagc ctetacaact tegagaggac	8820
	cttccagctg gacacggctg tggacaggcc ttgtgcccgc tccaagtcga ccggggaccc	8880
	gtggctcacg gacggctcct acctggacgg caccggcttc gcccgcatca gcttcgacag	8940
	tcagatcagc accaccaagc gcttcgagca ggagctgegg ctctgttcct acagcggggt	9000
	gctcttcttc ctgaagcagc agagccagtt cctgtgcttg gccgtgcaag aaggcagcct	9060

	cgtgctgttg tatgactttg gggctggcct gaaaaaggcc gtcccactgc agccccacc	9120
	gccccagacc tgggccagca aggcgatcca ggtgttcctg ctggggggca gccgaagcg	9180
	tgtgctggtg cgtgtggagc gggccacggt gtacagcgtg gagcaggaca atgatctgga	9240
	gctggccgac gcctactacc tggggggcgt gccgcccagc cagctgcccc cgagcctgcg	9300
	acggtctctt cccaccggag gctcagtcctg tggtgctgtc aaagcateca aggccttggg	9360
	caagtatgtg gacctcaagc ggcagaacac gacaggcgtg agcggcggct gcaccgccga	9420
	cctgctggtg gggcgcgcca tgactttcca tggccacggc ttccttcgcc tggcgtctc	9480
	gaacgtggca ccgtcactg gcaacgtcta ctccggttc ggttcacaca gcgccagga	9540
	cagtgccttg ctctactacc gggcgtcccc ggaagggtta tgccaggtgt cctgcagca	9600
	gggccgtgtg agcctacagc tcctgaggac tgaagigaaa actcaagcgg gcttcgccga	9660
	tgggtcccc cttacgtcg cttctacag caatgccagc ggagtctggc tgtatgtcga	9720
	tgaccagctc cageagatga agccccaccg gggaccacce cccgagctcc agccgcagcc	9780
	tgaggggccc ccgaggtccc tcctgggagg cctgcctgag tctggcacca ttacaaactt	9840
	cagtggctgc atcagcaacg tcttcgtgca gcggtctctg ggcccacagc gcgtatttga	9900
	tctgcagcag aacctgggca gcgtcaatgt gagcacgggc tgtgcacccg cctgcaagc	9960
	ccagaccccc ggcttggggc ctagaggact gcagggcacc gcccggaagg cctcccgccg	10020
[0006]	cagccgtcag ccgccccgcg atcctgcctg catgtgcc ccacacctca ggaccacccg	10080
	agactcctac cagtttgggg gtccctgtc cagtcacctg gagtttgttg gcatcctggc	10140
	ccgacatagg aactggccca gtctctccat gcaagtcctc ccgcgaagct cccgagcct	10200
	cctcctcttc actgcccgtc tgaggcccgg cagccctcc ctggcgtctt tcctgagcaa	10260
	tggccacttc gttgcacaga tggaaaggct cgggactcgg ctccgcgccc agagccgcc	10320
	gcgtcccg cctggccgct ggcacaaggt ctccgigcgc tgggagaaga accggatcct	10380
	gctggtgacg gaaggggccc gggcctggag ccaggagggg ccgcaccggc agcaccaggg	10440
	ggcagagcac cccagcccc acacctctt tgtggcgggc ctcccgcca gcagccacag	10500
	ctccaaactt ccggtgaccg tcgggttcag cggtgtgtg aagagactga ggtgcacgg	10560
	gagggccctg ggggccccca caaggatggc aggggtcaca cctgcatct tgggccccct	10620
	ggaggcgggc ctgtttcttc caggcagcgg gggagttatc acttttagacc tcccaggagc	10680
	tacactgctt gatgtgggcc tggaaactgga ggtgcggccc ctggcagtea ccgactgat	10740
	cttccacttg ggccaggccc ggaagccccc ctactgcag ttgcaggtga ccgagaagca	10800
	agtcctgctg cgggcgggatg accgagcagg ggagttcttc acgtcagtga cccgccccct	10860
	agtgtgtgt gatggccagt ggcaccggct agcggigtatg aaaagcggga atgtgtccg	10920
	gclggaggtg gacgcgcaga gcaaccacac cgtgggcccc ttgctggcgg ctgcagctgg	10980
	tgccccagcc cctctgtacc tcgggggcct gcctgagccc atggccgtgc agccctggcc	11040

```

ccccgcctac tgcggctgca tgaggaggct ggcgggtgaac cggteccccg tgcceatgac 11100
tcgtctctgtg gaggtccacg gggcagtgga ggcagtgge tgcceagccg cctaggacac 11160
agccaacccc ggccectggt caggccccctg cagctgectc acaccgeccc ttgtgctcgc 11220
ctcataggig tetatttgga ctctaagctc tacgggtgac agatcttggt tetgaagatg 11280
gtttaagtta tagcttctta aacgaaagaa taaaatactg caaaatgttt ttataattgg 11340
ccctccacc catttttaat tgtgagagat ttgtcaceaa tcatcactgg ttctctctta 11400
aaaattaaaa agtaacttct gtgtaaccga aaaaaaaaaa aaaaa 11445

```

<210> 2
 <211> 3695
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

```

Met Ala Lys Arg Leu Cys Ala Gly Ser Ala Leu Cys Val Arg Gly Pro
1           5           10           15

```

```

Arg Gly Pro Ala Pro Leu Leu Leu Val Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala
20           25           30

```

```

Ala Arg Ala Arg Glu Glu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Leu His Pro Pro
35           40           45

```

[0007]

```

Tyr Phe Asn Leu Ala Glu Gly Ala Arg Ile Ala Ala Ser Ala Thr Cys
50           55           60

```

```

Gly Glu Glu Ala Pro Ala Arg Gly Ser Pro Arg Pro Thr Glu Asp Leu
65           70           75           80

```

```

Tyr Cys Lys Leu Val Gly Gly Pro Val Ala Gly Gly Asp Pro Asn Gln
85           90           95

```

```

Thr Ile Arg Gly Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Thr Ala Ala Asn Ser Asn
100          105          110

```

```

Lys Ala His Pro Ala Ser Asn Ala Ile Asp Gly Thr Glu Arg Trp Trp
115          120          125

```

```

Gln Ser Pro Pro Leu Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Asn Glu Val Asn Val
130          135          140

```

```

Thr Leu Asp Leu Gly Gln Val Phe His Val Ala Tyr Val Leu Ile Lys
145          150          155          160

```

```

Phe Ala Asn Ser Pro Arg Pro Asp Leu Trp Val Leu Glu Arg Ser Met
165          170          175

```

Asp Phe Gly Arg Thr Tyr Gln Pro Trp Gln Phe Phe Ala Ser Ser Lys
180 185 190

Arg Asp Cys Leu Glu Arg Phe Gly Pro Gln Thr Leu Glu Arg Ile Thr
195 200 205

Arg Asp Asp Ala Ala Ile Cys Thr Thr Glu Tyr Ser Arg Ile Val Pro
210 215 220

Leu Glu Asn Gly Glu Ile Val Val Ser Leu Val Asn Gly Arg Pro Gly
225 230 235 240

Ala Met Asn Phe Ser Tyr Ser Pro Leu Leu Arg Glu Phe Thr Lys Ala
245 250 255

Thr Asn Val Arg Leu Arg Phe Leu Arg Thr Asn Thr Leu Leu Gly His
260 265 270

Leu Met Gly Lys Ala Leu Arg Asp Pro Thr Val Thr Arg Arg Tyr Tyr
275 280 285

Tyr Ser Ile Lys Asp Ile Ser Ile Gly Gly Arg Cys Val Cys His Gly
290 295 300

[0008]

His Ala Asp Ala Cys Asp Ala Lys Asp Pro Thr Asp Pro Phe Arg Leu
305 310 315 320

Gln Cys Thr Cys Gln His Asn Thr Cys Gly Gly Thr Cys Asp Arg Cys
325 330 335

Cys Pro Gly Phe Asn Gln Gln Pro Trp Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser
340 345 350

Ala Asn Glu Cys Gln Ser Cys Asn Cys Tyr Gly His Ala Thr Asp Cys
355 360 365

Tyr Tyr Asp Pro Glu Val Asp Arg Arg Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asp
370 375 380

Gly Thr Tyr Gln Gly Gly Gly Val Cys Ile Asp Cys Gln His His Thr
385 390 395 400

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

Asn His Pro Leu Asp Ser Pro His Val Cys Arg Arg Cys Asn Cys Glu
420 425 430

Ser Asp Phe Thr Asp Gly Thr Cys Glu Asp Leu Thr Gly Arg Cys Tyr
 435 440 445
 Cys Arg Pro Asn Phe Ser Gly Glu Arg Cys Asp Val Cys Ala Glu Gly
 450 455 460
 Phe Thr Gly Phe Pro Ser Cys Tyr Pro Thr Pro Ser Ser Ser Asn Asp
 465 470 475 480
 Thr Arg Glu Gln Val Leu Pro Ala Gly Gln Ile Val Asn Cys Asp Cys
 485 490 495
 Ser Ala Ala Gly Thr Gln Gly Asn Ala Cys Arg Lys Asp Pro Arg Val
 500 505 510
 Gly Arg Cys Leu Cys Lys Pro Asn Phe Gln Gly Thr His Cys Glu Leu
 515 520 525
 Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Gly Cys Gln Pro Cys Gln Cys Ser
 530 535 540
 Ser Pro Gly Val Ala Asp Asp Arg Cys Asp Pro Asp Thr Gly Gln Cys
 545 550 555 560
 Arg Cys Arg Val Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Asp Arg Cys Ala Pro
 565 570 575
 Gly Tyr Phe His Phe Pro Leu Cys Gln Leu Cys Gly Cys Ser Pro Ala
 580 585 590
 Gly Thr Leu Pro Glu Gly Cys Asp Glu Ala Gly Arg Cys Leu Cys Gln
 595 600 605
 Pro Glu Phe Ala Gly Pro His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Tyr His
 610 615 620
 Gly Phe Pro Asn Cys Gln Ala Cys Thr Cys Asp Pro Arg Gly Ala Leu
 625 630 635 640
 Asp Gln Leu Cys Gly Ala Gly Gly Leu Cys Arg Cys Arg Pro Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Gly Thr Ala Cys Gln Glu Cys Ser Pro Gly Phe His Gly Phe Pro
 660 665 670
 Ser Cys Val Pro Cys His Cys Ser Ala Glu Gly Ser Leu His Ala Ala
 675 680 685

[0009]

	Cys	Asp	Pro	Arg	Ser	Gly	Gln	Cys	Ser	Cys	Arg	Pro	Arg	Val	Thr	Gly	
	690						695					700					
	Leu	Arg	Cys	Asp	Thr	Cys	Val	Pro	Gly	Ala	Tyr	Asn	Phe	Pro	Tyr	Cys	
	705					710					715					720	
	Glu	Ala	Gly	Ser	Cys	His	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro	Val	Asp	Pro	Ala	
					725					730						735	
	Leu	Pro	Glu	Ala	Gln	Val	Pro	Cys	Met	Cys	Arg	Ala	His	Val	Glu	Gly	
				740					745						750		
	Pro	Ser	Cys	Asp	Arg	Cys	Lys	Pro	Gly	Phe	Trp	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	
			755					760						765			
	Asn	Pro	Glu	Gly	Cys	Thr	Arg	Cys	Ser	Cys	Asp	Leu	Arg	Gly	Thr	Leu	
	770						775					780					
	Gly	Gly	Val	Ala	Glu	Cys	Gln	Pro	Gly	Thr	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Lys	
	785					790					795					800	
	Pro	His	Val	Cys	Gly	Gln	Ala	Cys	Ala	Ser	Cys	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	
					805					810						815	
[0010]	Gly	Leu	Asp	Gln	Ala	Asp	Tyr	Phe	Gly	Cys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	Asp	
				820					825					830			
	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Gln	Ser	Cys	Glu	Pro	Arg	Thr	Gly	Val	Cys	
			835					840						845			
	Arg	Cys	Arg	Pro	Asn	Thr	Gln	Gly	Pro	Thr	Cys	Ser	Glu	Pro	Ala	Arg	
	850						855						860				
	Asp	His	Tyr	Leu	Pro	Asp	Leu	His	His	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Glu	Glu	
	865					870					875					880	
	Ala	Ala	Thr	Pro	Glu	Gly	His	Ala	Val	Arg	Phe	Gly	Phe	Asn	Pro	Leu	
					885					890					895		
	Glu	Phe	Glu	Asn	Phe	Ser	Trp	Arg	Gly	Tyr	Ala	Gln	Met	Ala	Pro	Val	
				900					905					910			
	Gln	Pro	Arg	Ile	Val	Ala	Arg	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Pro	Asp	Leu	Phe	
			915					920						925			
	Trp	Leu	Val	Phe	Arg	Tyr	Val	Asn	Arg	Gly	Ala	Met	Ser	Val	Ser	Gly	
	930						935					940					
	Arg	Val	Ser	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Thr	Cys	Ala	Asn	Cys	

	945	950	955	960
	Thr Ala Gln Ser	Gln Pro Val Ala Phe	Pro Pro Ser Thr	Glu Pro Ala
		965	970	975
	Phe Ile Thr Val	Pro Gln Arg Gly	Phe Gly Glu Pro	Phe Val Leu Asn
		980	985	990
	Pro Gly Thr Trp	Ala Leu Arg Val	Glu Ala Glu Gly	Val Leu Leu Asp
		995	1000	1005
	Tyr Val Val Leu	Leu Pro Ser Ala	Tyr Tyr Glu Ala	Ala Leu Leu
	1010	1015	1020	
	Gln Leu Arg Val	Thr Glu Ala Cys	Thr Tyr Arg Pro	Ser Ala Gln
	1025	1030	1035	
	Gln Ser Gly Asp	Asn Cys Leu Leu	Tyr Thr His Leu	Pro Leu Asp
	1040	1045	1050	
	Gly Phe Pro Ser	Ala Ala Gly Leu	Glu Ala Leu Cys	Arg Gln Asp
	1055	1060	1065	
[0011]	Asn Ser Leu Pro	Arg Pro Cys Pro	Thr Glu Gln Leu	Ser Pro Ser
	1070	1075	1080	
	His Pro Pro Leu	Ile Thr Cys Thr	Gly Ser Asp Val	Asp Val Gln
	1085	1090	1095	
	Leu Gln Val Ala	Val Pro Gln Pro	Gly Arg Tyr Ala	Leu Val Val
	1100	1105	1110	
	Glu Tyr Ala Asn	Glu Asp Ala Arg	Gln Glu Val Gly	Val Ala Val
	1115	1120	1125	
	His Thr Pro Gln	Arg Ala Pro Gln	Gln Gly Leu Leu	Ser Leu His
	1130	1135	1140	
	Pro Cys Leu Tyr	Ser Thr Leu Cys	Arg Gly Thr Ala	Arg Asp Thr
	1145	1150	1155	
	Gln Asp His Leu	Ala Val Phe His	Leu Asp Ser Glu	Ala Ser Val
	1160	1165	1170	
	Arg Leu Thr Ala	Glu Gln Ala Arg	Phe Phe Leu His	Gly Val Thr
	1175	1180	1185	
	Leu Val Pro Ile	Glu Glu Phe Ser	Pro Glu Phe Val	Glu Pro Arg
	1190	1195	1200	

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

[0012]

Gly	Ala	Thr	Gly	Pro	Thr	Cys	Glu	Pro	Phe	Gly	Gly	Gln	Cys	Pro
1445						1450					1455			
Cys	His	Ala	His	Val	Ile	Gly	Arg	Asp	Cys	Ser	Arg	Cys	Ala	Thr
1460						1465					1470			
Gly	Tyr	Trp	Gly	Phe	Pro	Asn	Cys	Arg	Pro	Cys	Asp	Cys	Gly	Ala
1475						1480					1485			
Arg	Leu	Cys	Asp	Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Cys	Ile	Cys	Pro	Pro	Arg
1490						1495					1500			
Thr	Ile	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Leu	Cys	Gln	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly
1505						1510					1515			
Cys	His	Pro	Leu	Val	Gly	Cys	Glu	Glu	Cys	Asn	Cys	Ser	Gly	Pro
1520						1525					1530			
Gly	Ile	Gln	Glu	Leu	Thr	Asp	Pro	Thr	Cys	Asp	Thr	Asp	Ser	Gly
1535						1540					1545			
Gln	Cys	Lys	Cys	Arg	Pro	Asn	Val	Thr	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	Thr
1550						1555					1560			
Cys	Ser	Pro	Gly	Phe	His	Gly	Tyr	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Cys	Asp
1565						1570					1575			
Cys	His	Glu	Ala	Gly	Thr	Ala	Pro	Gly	Val	Cys	Asp	Pro	Leu	Thr
1580						1585					1590			
Gly	Gln	Cys	Tyr	Cys	Lys	Glu	Asn	Val	Gln	Gly	Pro	Lys	Cys	Asp
1595						1600					1605			
Gln	Cys	Ser	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Ala	Ala	Asn	Pro	Lys
1610						1615					1620			
Gly	Cys	Thr	Arg	Cys	Phe	Cys	Phe	Gly	Ala	Thr	Glu	Arg	Cys	Arg
1625						1630					1635			
Ser	Ser	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Val	Asp	Met	Glu	Gly	Trp
1640						1645					1650			
Val	Leu	Leu	Ser	Thr	Asp	Arg	Gln	Val	Val	Pro	His	Glu	Arg	Gln
1655						1660					1665			
Pro	Gly	Thr	Glu	Met	Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Arg	His	Val	Pro	Glu
1670						1675					1680			

[0013]

	Ala	Val	Pro	Glu	Ala	Phe	Pro	Glu	Leu	Tyr	Trp	Gln	Ala	Pro	Pro
	1685						1690					1695			
	Ser	Tyr	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ser	Tyr	Gly	Gly	Thr	Leu	Arg
	1700						1705					1710			
	Tyr	Glu	Leu	His	Ser	Glu	Thr	Gln	Arg	Gly	Asp	Val	Phe	Val	Pro
	1715						1720					1725			
	Met	Glu	Ser	Arg	Pro	Asp	Val	Val	Leu	Gln	Gly	Asn	Gln	Met	Ser
	1730						1735					1740			
	Ile	Thr	Phe	Leu	Glu	Pro	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	Gly	His	Val	His
	1745						1750					1755			
	Arg	Gly	Gln	Leu	Gln	Leu	Val	Glu	Gly	Asn	Phe	Arg	His	Thr	Glu
	1760						1765					1770			
	Thr	Arg	Asn	Thr	Val	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Met	Met	Val	Leu	Ala
	1775						1780					1785			
	Ser	Leu	Glu	Gln	Leu	Gln	Ile	Arg	Ala	Leu	Phe	Ser	Gln	Ile	Ser
	1790						1795					1800			
[0014]	Ser	Ala	Val	Phe	Leu	Arg	Arg	Val	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Ser	Pro
	1805						1810					1815			
	Ala	Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Leu	Cys	Leu	Cys
	1820						1825					1830			
	Pro	Ala	Ser	Tyr	Arg	Gly	Asp	Ser	Cys	Gln	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly
	1835						1840					1845			
	Phe	Tyr	Arg	Asp	Val	Lys	Gly	Leu	Phe	Leu	Gly	Arg	Cys	Val	Pro
	1850						1855					1860			
	Cys	Gln	Cys	His	Gly	His	Ser	Asp	Arg	Cys	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly
	1865						1870					1875			
	Val	Cys	Val	Asp	Cys	Gln	His	Asn	Thr	Glu	Gly	Ala	His	Cys	Glu
	1880						1885					1890			
	Arg	Cys	Gln	Ala	Gly	Phe	Val	Ser	Ser	Arg	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala
	1895						1900					1905			
	Pro	Cys	Val	Ser	Cys	Pro	Cys	Pro	Leu	Ser	Val	Pro	Ser	Asn	Asn
	1910						1915					1920			
	Phe	Ala	Glu	Gly	Cys	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Arg	Thr	Gln	Cys	Leu

50

Glu Arg Ala Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile His Glu Gln Leu Arg	2180	2185	2190
Gly Ile Asn Ala Ser Ser Met Ala Trp Ala Arg Leu His Arg Leu	2195	2200	2205
Asn Ala Ser Ile Ala Asp Leu Gln Ser Gln Leu Arg Ser Pro Leu	2210	2215	2220
Gly Pro Arg His Glu Thr Ala Gln Gln Leu Glu Val Leu Glu Gln	2225	2230	2235
Gln Ser Thr Ser Leu Gly Gln Asp Ala Arg Arg Leu Gly Gly Gln	2240	2245	2250
Ala Val Gly Thr Arg Asp Gln Ala Ser Gln Leu Leu Ala Gly Thr	2255	2260	2265
Glu Ala Thr Leu Gly His Ala Lys Thr Leu Leu Ala Ala Ile Arg	2270	2275	2280
Ala Val Asp Arg Thr Leu Ser Glu Leu Met Ser Gln Thr Gly His	2285	2290	2295
Leu Gly Leu Ala Asn Ala Ser Ala Pro Ser Gly Glu Gln Leu Leu	2300	2305	2310
Arg Thr Leu Ala Glu Val Glu Arg Leu Leu Trp Glu Met Arg Ala	2315	2320	2325
Arg Asp Leu Gly Ala Pro Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Leu Ala	2330	2335	2340
Ala Ala Gln Arg Leu Leu Ala Arg Val Gln Glu Gln Leu Ser Ser	2345	2350	2355
Leu Trp Glu Glu Asn Gln Ala Leu Ala Thr Gln Thr Arg Asp Arg	2360	2365	2370
Leu Ala Gln His Glu Ala Gly Leu Met Asp Leu Arg Glu Ala Leu	2375	2380	2385
Asn Arg Ala Val Asp Ala Thr Arg Glu Ala Gln Glu Leu Asn Ser	2390	2395	2400
Arg Asn Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Lys Gln Glu	2405	2410	2415

[0016]

Leu Ser	Arg Asp Asn Ala Thr	Leu Gln Ala Thr	Leu His Ala Ala
2420	2425	2430	
Arg Asp	Thr Leu Ala Ser Val	Phe Arg Leu Leu His	Ser Leu Asp
2435	2440	2445	
Gln Ala	Lys Glu Glu Leu Glu	Arg Leu Ala Ala Ser	Leu Asp Gly
2450	2455	2460	
Ala Arg	Thr Pro Leu Leu Gln	Arg Met Gln Thr Phe	Ser Pro Ala
2465	2470	2475	
Gly Ser	Lys Leu Arg Leu Val	Glu Ala Ala Glu Ala	His Ala Gln
2480	2485	2490	
Gln Leu	Gly Gln Leu Ala Leu	Asn Leu Ser Ser Ile	Ile Leu Asp
2495	2500	2505	
Val Asn	Gln Asp Arg Leu Thr	Gln Arg Ala Ile Glu	Ala Ser Asn
2510	2515	2520	
Ala Tyr	Ser Arg Ile Leu Gln	Ala Val Gln Ala Ala	Glu Asp Ala
2525	2530	2535	
Ala Gly	Gln Ala Leu Gln Gln	Ala Asp His Thr Trp	Ala Thr Val
2540	2545	2550	
Val Arg	Gln Gly Leu Val Asp	Arg Ala Gln Gln Leu	Leu Ala Asn
2555	2560	2565	
Ser Thr	Ala Leu Glu Glu Ala	Met Leu Gln Glu Gln	Gln Arg Leu
2570	2575	2580	
Gly Leu	Val Trp Ala Ala Leu	Gln Gly Ala Arg Thr	Gln Leu Arg
2585	2590	2595	
Asp Val	Arg Ala Lys Lys Asp	Gln Leu Glu Ala His	Ile Gln Ala
2600	2605	2610	
Ala Gln	Ala Met Leu Ala Met	Asp Thr Asp Glu Thr	Ser Lys Lys
2615	2620	2625	
Ile Ala	His Ala Lys Ala Val	Ala Ala Glu Ala Gln	Asp Thr Ala
2630	2635	2640	
Thr Arg	Val Gln Ser Gln Leu	Gln Ala Met Gln Glu	Asn Val Glu
2645	2650	2655	

[0017]

	Arg	Trp	Gln	Gly	Gln	Tyr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gly	Gln	Asp	Leu	Gly
	2660						2665					2670			
	Gln	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Gly	His	Ser	Val	Ser	Thr	Leu	Glu	Lys
	2675						2680					2685			
	Thr	Leu	Pro	Gln	Leu	Leu	Ala	Lys	Leu	Ser	Ile	Leu	Glu	Asn	Arg
	2690						2695					2700			
	Gly	Val	His	Asn	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Ile	Gly	Arg
	2705						2710					2715			
	Val	Arg	Glu	Leu	Ile	Ala	Gln	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Ser	Lys	Val
	2720						2725					2730			
	Lys	Val	Pro	Met	Lys	Phe	Asn	Gly	Arg	Ser	Gly	Val	Gln	Leu	Arg
	2735						2740					2745			
	Thr	Pro	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Leu	Lys
	2750						2755					2760			
	Phe	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Gly	Gln	Gly	Thr	Glu
	2765						2770					2775			
[0018]	Asp	Arg	Phe	Val	Met	Tyr	Met	Gly	Ser	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Asp
	2780						2785					2790			
	Tyr	Met	Gly	Val	Ser	Leu	Arg	Asp	Lys	Lys	Val	His	Trp	Val	Tyr
	2795						2800					2805			
	Gln	Leu	Gly	Glu	Ala	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Ser	Ile	Asp	Glu	Asp
	2810						2815					2820			
	Ile	Gly	Glu	Gln	Phe	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Asp	Arg	Thr	Leu	Gln
	2825						2830					2835			
	Phe	Gly	His	Met	Ser	Val	Thr	Val	Glu	Arg	Gln	Met	Ile	Gln	Glu
	2840						2845					2850			
	Thr	Lys	Gly	Asp	Thr	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	Leu	Asn
	2855						2860					2865			
	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Phe	Val	Phe	Tyr	Val	Gly	Gly	Tyr	Pro	Ser
	2870						2875					2880			
	Thr	Phe	Thr	Pro	Pro	Pro	Leu	Leu	Arg	Phe	Pro	Gly	Tyr	Arg	Gly
	2885						2890					2895			
	Cys	Ile	Glu	Met	Asp	Thr	Leu	Asn	Glu	Glu	Val	Val	Ser	Leu	Tyr

	2900		2905		2910	
	Asn Phe Glu Arg Thr Phe Gln Leu Asp Thr Ala Val Asp Arg Pro					
	2915		2920		2925	
	Cys Ala Arg Ser Lys Ser Thr Gly Asp Pro Trp Leu Thr Asp Gly					
	2930		2935		2940	
	Ser Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Phe Ala Arg Ile Ser Phe Asp Ser					
	2945		2950		2955	
	Gln Ile Ser Thr Thr Lys Arg Phe Glu Gln Glu Leu Arg Leu Val					
	2960		2965		2970	
	Ser Tyr Ser Gly Val Leu Phe Phe Leu Lys Gln Gln Ser Gln Phe					
	2975		2980		2985	
	Leu Cys Leu Ala Val Gln Glu Gly Ser Leu Val Leu Leu Tyr Asp					
	2990		2995		3000	
	Phe Gly Ala Gly Leu Lys Lys Ala Val Pro Leu Gln Pro Pro Pro					
	3005		3010		3015	
[0019]	Pro Leu Thr Ser Ala Ser Lys Ala Ile Gln Val Phe Leu Leu Gly					
	3020		3025		3030	
	Gly Ser Arg Lys Arg Val Leu Val Arg Val Glu Arg Ala Thr Val					
	3035		3040		3045	
	Tyr Ser Val Glu Gln Asp Asn Asp Leu Glu Leu Ala Asp Ala Tyr					
	3050		3055		3060	
	Tyr Leu Gly Gly Val Pro Pro Asp Gln Leu Pro Pro Ser Leu Arg					
	3065		3070		3075	
	Arg Leu Phe Pro Thr Gly Gly Ser Val Arg Gly Cys Val Lys Gly					
	3080		3085		3090	
	Ile Lys Ala Leu Gly Lys Tyr Val Asp Leu Lys Arg Leu Asn Thr					
	3095		3100		3105	
	Thr Gly Val Ser Ala Gly Cys Thr Ala Asp Leu Leu Val Gly Arg					
	3110		3115		3120	
	Ala Met Thr Phe His Gly His Gly Phe Leu Arg Leu Ala Leu Ser					
	3125		3130		3135	
	Asn Val Ala Pro Leu Thr Gly Asn Val Tyr Ser Gly Phe Gly Phe					
	3140		3145		3150	

His	Ser	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Pro
3155						3160					3165			
Asp	Gly	Leu	Cys	Gln	Val	Ser	Leu	Gln	Gln	Gly	Arg	Val	Ser	Leu
3170						3175					3180			
Gln	Leu	Leu	Arg	Thr	Glu	Val	Lys	Thr	Gln	Ala	Gly	Phe	Ala	Asp
3185						3190					3195			
Gly	Ala	Pro	His	Tyr	Val	Ala	Phe	Tyr	Ser	Asn	Ala	Thr	Gly	Val
3200						3205					3210			
Trp	Leu	Tyr	Val	Asp	Asp	Gln	Leu	Gln	Gln	Met	Lys	Pro	His	Arg
3215						3220					3225			
Gly	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Gln	Pro	Gln	Pro	Glu	Gly	Pro	Pro	Arg
3230						3235					3240			
Leu	Leu	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Glu	Ser	Gly	Thr	Ile	Tyr	Asn	Phe
3245						3250					3255			
Ser	Gly	Cys	Ile	Ser	Asn	Val	Phe	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Gly	Pro
3260						3265					3270			
Gln	Arg	Val	Phe	Asp	Leu	Gln	Gln	Asn	Leu	Gly	Ser	Val	Asn	Val
3275						3280					3285			
Ser	Thr	Gly	Cys	Ala	Pro	Ala	Leu	Gln	Ala	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu
3290						3295					3300			
Gly	Pro	Arg	Gly	Leu	Gln	Ala	Thr	Ala	Arg	Lys	Ala	Ser	Arg	Arg
3305						3310					3315			
Ser	Arg	Gln	Pro	Ala	Arg	His	Pro	Ala	Cys	Met	Leu	Pro	Pro	His
3320						3325					3330			
Leu	Arg	Thr	Thr	Arg	Asp	Ser	Tyr	Gln	Phe	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser
3335						3340					3345			
Ser	His	Leu	Glu	Phe	Val	Gly	Ile	Leu	Ala	Arg	His	Arg	Asn	Trp
3350						3355					3360			
Pro	Ser	Leu	Ser	Met	His	Val	Leu	Pro	Arg	Ser	Ser	Arg	Gly	Leu
3365						3370					3375			
Leu	Leu	Phe	Thr	Ala	Arg	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Pro	Ser	Leu	Ala
3380						3385					3390			

[0020]

Leu Phe	Leu Ser	Asn Gly	His	Phe Val	Ala Gln	Met	Glu Gly	Leu
3395			3400			3405		
Gly Thr	Arg Leu	Arg Ala	Gln	Ser Arg	Gln Arg	Ser	Arg Pro	Gly
3410			3415			3420		
Arg Trp	His Lys	Val Ser	Val	Arg Trp	Glu Lys	Asn	Arg Ile	Leu
3425			3430			3435		
Leu Val	Thr Asp	Gly Ala	Arg	Ala Trp	Ser Gln	Glu	Gly Pro	His
3440			3445			3450		
Arg Gln	His Gln	Gly Ala	Glu	His Pro	Gln Pro	His	Thr Leu	Phe
3455			3460			3465		
Val Gly	Gly Leu	Pro Ala	Ser	Ser His	Ser Ser	Lys	Leu Pro	Val
3470			3475			3480		
Thr Val	Gly Phe	Ser Gly	Cys	Val Lys	Arg Leu	Arg	Leu His	Gly
3485			3490			3495		
Arg Pro	Leu Gly	Ala Pro	Thr	Arg Met	Ala Gly	Val	Thr Pro	Cys
3500			3505			3510		
Ile Leu	Gly Pro	Leu Glu	Ala	Gly Leu	Phe Phe	Pro	Gly Ser	Gly
3515			3520			3525		
Gly Val	Ile Thr	Leu Asp	Leu	Pro Gly	Ala Thr	Leu	Pro Asp	Val
3530			3535			3540		
Gly Leu	Glu Leu	Glu Val	Arg	Pro Leu	Ala Val	Thr	Gly Leu	Ile
3545			3550			3555		
Phe His	Leu Gly	Gln Ala	Arg	Thr Pro	Pro Tyr	Leu	Gln Leu	Gln
3560			3565			3570		
Val Thr	Glu Lys	Gln Val	Leu	Leu Arg	Ala Asp	Asp	Gly Ala	Gly
3575			3580			3585		
Glu Phe	Ser Thr	Ser Val	Thr	Arg Pro	Ser Val	Leu	Cys Asp	Gly
3590			3595			3600		
Gln Trp	His Arg	Leu Ala	Val	Met Lys	Ser Gly	Asn	Val Leu	Arg
3605			3610			3615		
Leu Glu	Val Asp	Ala Gln	Ser	Asn His	Thr Val	Gly	Pro Leu	Leu
3620			3625			3630		

[0021]

Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
3635 3640 3645

Pro Glu Pro Met Ala Val Gln Pro Trp Pro Pro Ala Tyr Cys Gly
3650 3655 3660

Cys Met Arg Arg Leu Ala Val Asn Arg Ser Pro Val Ala Met Thr
3665 3670 3675

Arg Ser Val Glu Val His Gly Ala Val Gly Ala Ser Gly Cys Pro
3680 3685 3690

Ala Ala
3695

<210> 3
<211> 5866
<212> DNA
<213> 人

<400> 3
gggacctgga agcgcceccag ccccgccagcg atcgagatt cggttttcaa acaaaagagg 60
cgccccgggg ggtgggaccg ggacctcacc cggctcctgc agagttgcgg ccgccccccc 120
cttcageccc ggctctccgt atcgccatga gcagaggcgc etccctctgt tcctcccaag 180
[0022] gctaaacttt ctaattccct tctttgggct cgggggctcc cggagcaggc cgagagctcg 240
cgtcgccgga aaggaagacg ggaagaaaagg gcaggcggct cggcgggcgt cttctccact 300
cctctgcgcg gtccecgtag ctgcaggag cggccatggg gcttctccag ttgctagctt 360
tcagtttctt agccctgtgc agagcccgag tgcgcgtca ggaaccgcag ttcagctacg 420
gtgcgcgaga aggcagctgc tatcccgcca cgggcgacct tctcctggc cgagcacaga 480
agctttcggt gacctcgacg tgggggtgc acaagcccg accctactgt atcgtagcc 540
acttcagga ggacaaaaaa tgcctcatat gcaattccca agatccttat catgagaccc 600
tgaatcctga cagccatctc attgaaaatg tggcactac atttgcctca aaccgcctta 660
agatttggtg gcaatctgaa aatggtgtgg aaaaatgtaac tatcaactg gatttggag 720
cagaattcca ttttactcat ctcaaatga cttcaagac attccgtcca gtgctatgc 780
tgatagaacg atcgtccgac ttggggaaaa cctgggggtg gtatagatc ttgcctatg 840
actgtgagcg ctcgtttcca ggcatttcaa ctggcccat gaaaaagtc gatgacataa 900
tttgtgatc tcgatattct gacattgaac cctcaactga aggagaggtg atatttcgtg 960
ctttagatcc tgccttcaaa atagaagatc cttatagccc aaggatacag aatttatcaa 1020
aaattaccaa cttgagaatc aagtttgtga aactgcatac tttgggagat aaccttctgg 1080
attccaggat ggaaatcaga gaaaagtatt attatgcagt ttatgatatg gtggttcgag 1140
gaaattgctt ctgctatggt catgccagcg aatgtgccc tgtggatgga ttcaatgaag 1200

aagtggaagg aatgggttcac ggacactgca tgtgcaggca taacaccaag ggcttaaact	1260
gtgaactctg catggatttc taccatgatt taccttggag acctgtgaa ggccgaaaca	1320
gcaacgcctg taaaaaatgt aactgcaatg aacattccat ctcttgtcac ttgacatgg	1380
ctgtttacct ggccacgggg aacgtcagcg gaggcgtgtg tgatgactgt cagcacaaca	1440
ccatggggcg caactgtgag cagtgcgaagc cgttttacta ccagcaceca gagagggaca	1500
tccgagatcc taattttctgt gaacgatgta cgtgtgaccc agctggctct caaatgagg	1560
gaatttgtga cagctatact gatTTTTcta ctggtctcat tgcTggccag tgcTggtgta	1620
aattaaatgt ggaaggagaa cattgtgatg ttTgcaaaga agcttctat gatttaagca	1680
gtgaagatec atttggttgt aaatettgtg cttgcaatcc tctgggaaca attcctggag	1740
ggaatccttg tgattccgag acaggTcact gctactgcaa gcgtctggTg acaggacagc	1800
attTgacca gtgcctgcea gagcactggg gcttaagcaa tgattTggat ggatgtcgac	1860
catgtgactg tgacctTggg ggagcettaa acaacagtTg cttTgcggag tcaggecagt	1920
gtcatgcecg gcctcacatg attggacgtc agtgcacga agtTgaacct ggttactact	1980
ttgccaccct ggatcactac ctctatgaag cggaggaagc caactTgggg cctggggTta	2040
gcatagtTga gcggcaatat atccaggacc ggattccctc ctggactTga gccggtctcg	2100
tccgagtTgc tgaaggggct tattTggagt ttTtcattga caacatacca tattccatgg	2160
[0023] agtacgacat cctaattcgc tacgagccac agctaccga ccactTggaa aaagctgtca	2220
tcacagtTca gcgacctTga aggattccaa ccagcagccg atgtTgtaat accatccccg	2280
atgatgacaa ccaggTggtg tcattatcac caggctcaag atatgtcgtc cttccctggc	2340
cggTgtgctt tgagaaggga aaaaactaca cggTgaggtt ggagctgcct cagtacacct	2400
cctctgatag cgacgtTgag agcccttaca cgtgatcga ttctctTgtt ctcatgccat	2460
actgtaaatc actggacatc ttcaccgtgg gaggttcagg agatggggTg gtcaccaaca	2520
gtgcctTgga aacctttcag agataccgat gtctagagaa cagcagaagc gttgtgaaaa	2580
caccgatgac agatgtttgc agaaacatca tctttagcat ttctgcectg ttacaccaga	2640
caggccTggc ttgtgaatgc gacctcagg gttcgttaag ttccgtgtgt gatcccaacg	2700
gaggccagtTg ccagtgccgg cccaacgtgg ttggaagaac ctgcaacaga tgtgcacctg	2760
gaactttTgg cttTggcccc agtggatTca aacctTgtga tgccatctg caaggatctg	2820
tcaatgcctt ctgcaatccc gtcactggcc agtTccactg ttTccaggga gtgtatgctc	2880
ggcagtTgta tcggtgetta cctgggcact ggggctttcc aagtTgccag cctTgccagt	2940
gcaatggcca cgccgatgac tgcgaccag tgactTggga gtcttTgaac tgccaggact	3000
acaccatggg tcataactgt gaaaggTgt tggctTgTta ctatggcgac cccatcatTg	3060
ggTcaggaga tcaTgcccgc cctTgccctt gccagatTg tcccagacgt ggacgccagt	3120

	ttgccaggag ctgctaccaaa gatcctgtta ctttacagct tgcctgtgtt tgtgatcctg	3180
	gatacattgg ttccagatgt gacgactgtg cctcaggata ctttggcaat ccatcagaag	3240
	ttgggggggtc gtgtcagcct tgcagtgtc acaacaacat tgacacgaca gacccagaag	3300
	cctgtgacaa ggagactggg aggtgtctca agtgccctga ccacacggaa ggggaacact	3360
	gtcagttctg ccggtttgga tactatgggtg atgcccteca gcaggactgt cgaaagtgtg	3420
	tctgtaatta cctgggcacc gtgcaagagc actgtaacgg ccttgactgc cagtgcgaca	3480
	aagccactgg tcagtgttg tgtcttccta atgtgatcgg gcagaaactgt gaccgctgtg	3540
	cgcccaatac ctggcagctg gccagtgga ctggctgtga cccatgcaac tgcaatgctg	3600
	ctcattcctt cgggccatct tgcaatgagt tcacggggca gtgccagtgc atgcctgggt	3660
	ttggaggccg cacctgcagc gagtgccagg aactctcttg gggagacccc gacgtggagt	3720
	gccagcctg tgaactgtac ccaggggca ttgagacgce acagtgtgac cagtecacgg	3780
	gccagtgtgt ctgegttag ggtgttagg gtccacgctg tgacaagtgc acgcgagggt	3840
	actcgggggt cttccctgac tgcacacct gccaccagtg ctttgctctc tgggatgtga	3900
	tcattgccga gctgaccaac aggacacaca gattcctgga gaaagccaag gccttgaaga	3960
	tcagtgggtg gatcgggcct taccgtgaga ctgiggactc ggtggagagg aaagtcagcg	4020
	agataaaaga catcctggcg cagagccccg cagcagagcc actgaaaaac attgggaatc	4080
[0024]	tctttgagga agcagagaaa ctgattaaag atgttacaga aatgatggct caagtagaag	4140
	tgaaattatc tgacacaaact tcccaaagca acagcacagc caaagaactg gattctctac	4200
	agacagaagc cgaaagccta gacaacaactg tgaaagaact tgctgaacaa ctggaattta	4260
	tcaaaaactc agatattcgg ggtgccttgg atagcattac caagtatttc cagatgtctc	4320
	ttgaggcaga ggagagggtg aatgcctcca ccacagaacc caacagcact gtggagcagt	4380
	cagccctcat gagagacaga gtagaagacg tgatgatgga gcgagaatec cagttcaagg	4440
	aaaaacaaga ggagcaggt cgcctccttg atgaactggc aggcaagcta caaagcctag	4500
	acctttcagc cgetgccgaa atgacctgtg gaacaccccc aggggcctcc tgttccgaga	4560
	ctgaatgttg cgggccaaac tgcagaactg acgaaggaga gaggaagtgt ggggggcctg	4620
	gctgtggttg tctggttact gtgcaacac acgcctggca gaaagccatg gacttggaac	4680
	aagatgtcct gagtgccttg gctgaagtgg aacagctctc caagatggtc tctgaagcaa	4740
	aactgagggc agatgaggca aaacaaagt ctgaagacat tctgttgaag acaaatgcta	4800
	ccaaagaaaa aatggacaag agcaatgagg agctgagaaa tctaatacag caaatcagaa	4860
	actttttgac ccaggatagt gctgatttgg acagcattga agcagttgct aatgaagtat	4920
	tgaaaatgga gatgcctagc accccacagc agttacagaa ctgacagaa gatatacgtg	4980
	aacgagttga aagccttct caagtagagg ttattcttca gcatagtgct gctgacattg	5040
	ccagagctga gatgttgta gaagaagcta aaagagcaag caaaagtga acagatgtta	5100

```

aagtcactgc agatatggta aaggaagctc tggagaagc agaaaaggcc caggtcgcag      5160
cagagaaggc aattaaacaa gcagatgaag acattcaagg aaccagaac ctgttaactt      5220
cgattgagtc tgaaacagca gcttctgagg aaaccttggt caacgcgtcc cagcgcatca      5280
gcgagttaga gaggaatgtg gaagaactta ageggaaagc tgcccaaac tccggggagg      5340
cagaatatat tgaaaaagta gtatatactg tgaagcaaag tgcagaagat gttaagaaga      5400
ctttagatgg tgaacttgat gaaaagtata aaaaagtaga aaatttaatt gccaaaaaaa      5460
ctgaagagtc agctgatgcc agaaggaaag ccgaaatgct acaaaatgaa gcaaaaactc      5520
ttttagctca agcaaatagc aagctgcaac tgetcaaaga tttagaaaga aaatatgaag      5580
acaatcaaag atacttagaa gataaagctc aagaattagc aagactggaa ggagaagtcc      5640
gtteactect aaaggatata agccagaaag ttgctgtgta tagcacatgc ttgtaacaga      5700
ggagaataaaa aaatggctga ggtgaacaag gtaaaacaac tacattttaa aaactgactt      5760
aatgctcttc aaaataaaac atcacctatt taatgttttt aatcacattt tgtatggagt      5820
taaataaagt acagtgcctt tgtataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa      5866

```

<210> 4
 <211> 1786
 <212> PRT
 <213> 人

[0025]

<400> 4

Met Gly Leu Leu Gln Leu Leu Ala Phe Ser Phe Leu Ala Leu Cys Arg
 1 5 10 15

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

Gly Ser Cys Tyr Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Ile Gly Arg Ala Gln
 35 40 45

Lys Leu Ser Val Thr Ser Thr Cys Gly Leu His Lys Pro Glu Pro Tyr
 50 55 60

Cys Ile Val Ser His Leu Gln Glu Asp Lys Lys Cys Phe Ile Cys Asn
 65 70 75 80

Ser Gln Asp Pro Tyr His Glu Thr Leu Asn Pro Asp Ser His Leu Ile
 85 90 95

Glu Asn Val Val Thr Thr Phe Ala Pro Asn Arg Leu Lys Ile Trp Trp
 100 105 110

Gln Ser Glu Asn Gly Val Glu Asn Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu
 115 120 125

Ala Glu Phe His Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg
 130 135 140
 Pro Ala Ala Met Leu Ile Glu Arg Ser Ser Asp Phe Gly Lys Thr Trp
 145 150 155 160
 Gly Val Tyr Arg Tyr Phe Ala Tyr Asp Cys Glu Ala Ser Phe Pro Gly
 165 170 175
 Ile Ser Thr Gly Pro Met Lys Lys Val Asp Asp Ile Ile Cys Asp Ser
 180 185 190
 Arg Tyr Ser Asp Ile Glu Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Phe Arg
 195 200 205
 Ala Leu Asp Pro Ala Phe Lys Ile Glu Asp Pro Tyr Ser Pro Arg Ile
 210 215 220
 Gln Asn Leu Leu Lys Ile Thr Asn Leu Arg Ile Lys Phe Val Lys Leu
 225 230 235 240
 His Thr Leu Gly Asp Asn Leu Leu Asp Ser Arg Met Glu Ile Arg Glu
 245 250 255
 Lys Tyr Tyr Tyr Ala Val Tyr Asp Met Val Val Arg Gly Asn Cys Phe
 260 265 270
 Cys Tyr Gly His Ala Ser Glu Cys Ala Pro Val Asp Gly Phe Asn Glu
 275 280 285
 Glu Val Glu Gly Met Val His Gly His Cys Met Cys Arg His Asn Thr
 290 295 300
 Lys Gly Leu Asn Cys Glu Leu Cys Met Asp Phe Tyr His Asp Leu Pro
 305 310 315 320
 Trp Arg Pro Ala Glu Gly Arg Asn Ser Asn Ala Cys Lys Lys Cys Asn
 325 330 335
 Cys Asn Glu His Ser Ile Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu
 340 345 350
 Ala Thr Gly Asn Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Asp Cys Gln His Asn
 355 360 365
 Thr Met Gly Arg Asn Cys Glu Gln Cys Lys Pro Phe Tyr Tyr Gln His
 370 375 380

[0026]

Pro Glu Arg Asp Ile Arg Asp Pro Asn Phe Cys Glu Arg Cys Thr Cys
 385 390 395 400
 Asp Pro Ala Gly Ser Gln Asn Glu Gly Ile Cys Asp Ser Tyr Thr Asp
 405 410 415
 Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ala Gly Gln Cys Arg Cys Lys Leu Asn Val
 420 425 430
 Glu Gly Glu His Cys Asp Val Cys Lys Glu Gly Phe Tyr Asp Leu Ser
 435 440 445
 Ser Glu Asp Pro Phe Gly Cys Lys Ser Cys Ala Cys Asn Pro Leu Gly
 450 455 460
 Thr Ile Pro Gly Gly Asn Pro Cys Asp Ser Glu Thr Gly His Cys Tyr
 465 470 475 480
 Cys Lys Arg Leu Val Thr Gly Gln His Cys Asp Gln Cys Leu Pro Glu
 485 490 495
 His Trp Gly Leu Ser Asn Asp Leu Asp Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys
 500 505 510
 Asp Leu Gly Gly Ala Leu Asn Asn Ser Cys Phe Ala Glu Ser Gly Gln
 515 520 525
 Cys Ser Cys Arg Pro His Met Ile Gly Arg Gln Cys Asn Glu Val Glu
 530 535 540
 Pro Gly Tyr Tyr Phe Ala Thr Leu Asp His Tyr Leu Tyr Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Glu Ala Asn Leu Gly Pro Gly Val Ser Ile Val Glu Arg Gln Tyr Ile
 565 570 575
 Gln Asp Arg Ile Pro Ser Trp Thr Gly Ala Gly Phe Val Arg Val Pro
 580 585 590
 Glu Gly Ala Tyr Leu Glu Phe Phe Ile Asp Asn Ile Pro Tyr Ser Met
 595 600 605
 Glu Tyr Asp Ile Leu Ile Arg Tyr Glu Pro Gln Leu Pro Asp His Trp
 610 615 620
 Glu Lys Ala Val Ile Thr Val Gln Arg Pro Gly Arg Ile Pro Thr Ser
 625 630 635 640

[0027]

	Ser	Arg	Cys	Gly	Asn	Thr	Ile	Pro	Asp	Asp	Asp	Asn	Gln	Val	Val	Ser	
					645					650						655	
	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Arg	Tyr	Val	Val	Leu	Pro	Arg	Pro	Val	Cys	Phe	
				660					665					670			
	Glu	Lys	Gly	Thr	Asn	Tyr	Thr	Val	Arg	Leu	Glu	Leu	Pro	Gln	Tyr	Thr	
			675					680					685				
	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Val	Glu	Ser	Pro	Tyr	Thr	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	
		690					695					700					
	Val	Leu	Met	Pro	Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Asp	Ile	Phe	Thr	Val	Gly	Gly	
	705					710				715					720		
	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Val	Thr	Asn	Ser	Ala	Trp	Glu	Thr	Phe	Gln	Arg	
					725					730					735		
	Tyr	Arg	Cys	Leu	Glu	Asn	Ser	Arg	Ser	Val	Val	Lys	Thr	Pro	Met	Thr	
				740					745					750			
	Asp	Val	Cys	Arg	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	His	Gln	
			755					760					765				
[0028]	Thr	Gly	Leu	Ala	Cys	Glu	Cys	Asp	Pro	Gln	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
		770					775					780					
	Cys	Asp	Pro	Asn	Gly	Gly	Gln	Cys	Gln	Cys	Arg	Pro	Asn	Val	Val	Gly	
	785					790					795					800	
	Arg	Thr	Cys	Asn	Arg	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser	
				805						810					815		
	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Glu	Cys	His	Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Asn	Ala	Phe	
				820					825					830			
	Cys	Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Cys	His	Cys	Phe	Gln	Gly	Val	Tyr	Ala	
			835					840				845					
	Arg	Gln	Cys	Asp	Arg	Cys	Leu	Pro	Gly	His	Trp	Gly	Phe	Pro	Ser	Cys	
		850					855					860					
	Gln	Pro	Cys	Gln	Cys	Asn	Gly	His	Ala	Asp	Asp	Cys	Asp	Pro	Val	Thr	
	865					870					875				880		
	Gly	Glu	Cys	Leu	Asn	Cys	Gln	Asp	Tyr	Thr	Met	Gly	His	Asn	Cys	Glu	
				885						890					895		
	Arg	Cys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Pro	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Asp	

	900	905	910
	His Cys Arg Pro Cys Pro Cys Pro Asp Gly Pro Asp Ser Gly Arg Gln 915 920 925		
	Phe Ala Arg Ser Cys Tyr Gln Asp Pro Val Thr Leu Gln Leu Ala Cys 930 935 940		
	Val Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Asp Cys Ala Ser 945 950 955 960		
	Gly Tyr Phe Gly Asn Pro Ser Glu Val Gly Gly Ser Cys Gln Pro Cys 965 970 975		
	Gln Cys His Asn Asn Ile Asp Thr Thr Asp Pro Glu Ala Cys Asp Lys 980 985 990		
	Glu Thr Gly Arg Cys Leu Lys Cys Leu Tyr His Thr Glu Gly Glu His 995 1000 1005		
	Cys Gln Phe Cys Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala Leu Gln Gln 1010 1015 1020		
[0029]	Asp Cys Arg Lys Cys Val Cys Asn Tyr Leu Gly Thr Val Gln Glu 1025 1030 1035		
	His Cys Asn Gly Ser Asp Cys Gln Cys Asp Lys Ala Thr Gly Gln 1040 1045 1050		
	Cys Leu Cys Leu Pro Asn Val Ile Gly Gln Asn Cys Asp Arg Cys 1055 1060 1065		
	Ala Pro Asn Thr Trp Gln Leu Ala Ser Gly Thr Gly Cys Asp Pro 1070 1075 1080		
	Cys Asn Cys Asn Ala Ala His Ser Phe Gly Pro Ser Cys Asn Glu 1085 1090 1095		
	Phe Thr Gly Gln Cys Gln Cys Met Pro Gly Phe Gly Gly Arg Thr 1100 1105 1110		
	Cys Ser Glu Cys Gln Glu Leu Phe Trp Gly Asp Pro Asp Val Glu 1115 1120 1125		
	Cys Arg Ala Cys Asp Cys Asp Pro Arg Gly Ile Glu Thr Pro Gln 1130 1135 1140		
	Cys Asp Gln Ser Thr Gly Gln Cys Val Cys Val Glu Gly Val Glu 1145 1150 1155		

Gly 1160	Pro	Arg	Cys	Asp	Lys	Cys 1165	Thr	Arg	Gly	Tyr	Ser 1170	Gly	Val	Phe
Pro 1175	Asp	Cys	Thr	Pro	Cys	His 1180	Gln	Cys	Phe	Ala	Leu 1185	Trp	Asp	Val
Ile 1190	Ile	Ala	Glu	Leu	Thr	Asn 1195	Arg	Thr	His	Arg	Phe 1200	Leu	Glu	Lys
Ala 1205	Lys	Ala	Leu	Lys	Ile	Ser 1210	Gly	Val	Ile	Gly	Pro 1215	Tyr	Arg	Glu
Thr 1220	Val	Asp	Ser	Val	Glu	Arg 1225	Lys	Val	Ser	Glu	Ile 1230	Lys	Asp	Ile
Leu 1235	Ala	Gln	Ser	Pro	Ala	Ala 1240	Glu	Pro	Leu	Lys	Asn 1245	Ile	Gly	Asn
Leu 1250	Phe	Glu	Glu	Ala	Glu	Lys 1255	Leu	Ile	Lys	Asp	Val 1260	Thr	Glu	Met
Met 1265	Ala	Gln	Val	Glu	Val	Lys 1270	Leu	Ser	Asp	Thr	Thr 1275	Ser	Gln	Ser
Asn 1280	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu 1285	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr 1290	Glu	Ala	Glu
Ser 1295	Leu	Asp	Asn	Thr	Val	Lys 1300	Glu	Leu	Ala	Glu	Gln 1305	Leu	Glu	Phe
Ile 1310	Lys	Asn	Ser	Asp	Ile	Arg 1315	Gly	Ala	Leu	Asp	Ser 1320	Ile	Thr	Lys
Tyr 1325	Phe	Gln	Met	Ser	Leu	Glu 1330	Ala	Glu	Glu	Arg	Val 1335	Asn	Ala	Ser
Thr 1340	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr 1345	Val	Glu	Gln	Ser	Ala 1350	Leu	Met	Arg
Asp 1355	Arg	Val	Glu	Asp	Val	Met 1360	Met	Glu	Arg	Glu	Ser 1365	Gln	Phe	Lys
Glu 1370	Lys	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala 1375	Arg	Leu	Leu	Asp	Glu 1380	Leu	Ala	Gly
Lys 1385	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu 1390	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu 1395	Met	Thr	Cys

[0030]

Gly Thr	Pro Pro Gly Ala Ser	Cys Ser Glu Thr Glu	Cys Gly Gly
1400	1405	1410	
Pro Asn	Cys Arg Thr Asp Glu	Gly Glu Arg Lys Cys	Gly Gly Pro
1415	1420	1425	
Gly Cys	Gly Gly Leu Val Thr	Val Ala His Asn Ala	Trp Gln Lys
1430	1435	1440	
Ala Met	Asp Leu Asp Gln Asp	Val Leu Ser Ala Leu	Ala Glu Val
1445	1450	1455	
Glu Gln	Leu Ser Lys Met Val	Ser Glu Ala Lys Leu	Arg Ala Asp
1460	1465	1470	
Glu Ala	Lys Gln Ser Ala Glu	Asp Ile Leu Leu Lys	Thr Asn Ala
1475	1480	1485	
Thr Lys	Glu Lys Met Asp Lys	Ser Asn Glu Glu Leu	Arg Asn Leu
1490	1495	1500	
Ile Lys	Gln Ile Arg Asn Phe	Leu Thr Gln Asp Ser	Ala Asp Leu
1505	1510	1515	
Asp Ser	Ile Glu Ala Val Ala	Asn Glu Val Leu Lys	Met Glu Met
1520	1525	1530	
Pro Ser	Thr Pro Gln Gln Leu	Gln Asn Leu Thr Glu	Asp Ile Arg
1535	1540	1545	
Glu Arg	Val Glu Ser Leu Ser	Gln Val Glu Val Ile	Leu Gln His
1550	1555	1560	
Ser Ala	Ala Asp Ile Ala Arg	Ala Glu Met Leu Leu	Glu Glu Ala
1565	1570	1575	
Lys Arg	Ala Ser Lys Ser Ala	Thr Asp Val Lys Val	Thr Ala Asp
1580	1585	1590	
Met Val	Lys Glu Ala Leu Glu	Glu Ala Glu Lys Ala	Gln Val Ala
1595	1600	1605	
Ala Glu	Lys Ala Ile Lys Gln	Ala Asp Glu Asp Ile	Gln Gly Thr
1610	1615	1620	
Gln Asn	Leu Leu Thr Ser Ile	Glu Ser Glu Thr Ala	Ala Ser Glu
1625	1630	1635	

[0031]

	Glu Thr Leu Phe Asn Ala Ser Gln Arg Ile Ser Glu Leu Glu Arg 1640 1645 1650	
	Asn Val Glu Glu Leu Lys Arg Lys Ala Ala Gln Asn Ser Gly Glu 1655 1660 1665	
	Ala Glu Tyr Ile Glu Lys Val Val Tyr Thr Val Lys Gln Ser Ala 1670 1675 1680	
	Glu Asp Val Lys Lys Thr Leu Asp Gly Glu Leu Asp Glu Lys Tyr 1685 1690 1695	
	Lys Lys Val Glu Asn Leu Ile Ala Lys Lys Thr Glu Glu Ser Ala 1700 1705 1710	
	Asp Ala Arg Arg Lys Ala Glu Met Leu Gln Asn Glu Ala Lys Thr 1715 1720 1725	
	Leu Leu Ala Gln Ala Asn Ser Lys Leu Gln Leu Leu Lys Asp Leu 1730 1735 1740	
	Glu Arg Lys Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Tyr Leu Glu Asp Lys Ala 1745 1750 1755	
[0032]	Gln Glu Leu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Val Arg Ser Leu Leu Lys 1760 1765 1770	
	Asp Ile Ser Gln Lys Val Ala Val Tyr Ser Thr Cys Leu 1775 1780 1785	
	<210> 5	
	<211> 5817	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 5	
	gaaggcagtt tccggaggga aggggtaggg ttggggtaggg ggcgcctctcc gcccggtggt 60	
	gcgcctccttc ccagaatccg ctccggcctt tccttcctgc cgcgattccc aaatttgcgc 120	
	aaagtcctg gactetaagc tctcggaggg accgctggac agacctggga actgacagag 180	
	ggcctggagg gaaacaggcc aaagaccac aggcagagtt gacacggaac eccaaagcaa 240	
	ggaggagggc tcgggcccg gaccgttcac ctcccttat cctgttccc ctcttcagga 300	
	tggagctgac ctcaaggga agagggagg gacagcctct gccctggga cttcgactgg 360	
	gcctactgct aagcgtgctg gctgccacac tggeacaggc cctgccccg gatgtgcctg 420	
	gctgttccag gggaagctgc taccocgcca cgggcgacct gctggtgggc cgagctgaca 480	
	gaetgaetgc ctcatccact tgtggcctga atggccccca gccetaetgc atcgteagtc 540	
	acctgcagga cgaaaagaag tgettccttt gtgactcccg gcgcctcttc tetgctagag 600	

[0033]	acaacccaca cagccatcgc atccagaatg tagtcaccag ctttgcacca cagcggcggg	660
	cagcctgggtg gcagtcagag aatggatatc ctgcggtcac catccagctg gacctggagg	720
	ctgagtttca ttcacacac ctcattatga cttcaagac atttcgccct gctgccatgc	780
	tggtggaacg ctacgagac tttggccgca cctggcatgt gtaccgatat ttctcctatg	840
	actgtggggc tgacttccca ggagteccac tagcaccccc acggcaactgg gatgaigttag	900
	tctgtgagtc cegctactca gagattgagc catccactga aggcgaggtc atctatcgtg	960
	tgctggaccc tgccatccct atccagacc cctacagctc acggattcag aacctgttga	1020
	agatcaccaa cctacgggtg aacctgactc gtctacacac gttgggagac aacctactcg	1080
	accacaggag ggagatccga gagaagtact actatgccct ctatgagctg gttgtacgtg	1140
	gcaactgctt ctgctacgga cagccctcag agtgtgcacc cgcgccaggg gcaccagccc	1200
	atgctgaggg catgggtcac ggagcttgca tctgcaaaca caacacacgt ggcctcaact	1260
	gcgagcagtg tcaggatttc tatcgtgacc tgccttggcg tccggtgag gacggccata	1320
	gtcatgcctg taggaagtgt gagtgccatg ggcacaccca cagctgccac ttcgacatgg	1380
	ccgtatacct ggcattctgc aatgtgagtg gagggtgtgt tgatggatgt cagcataaca	1440
	cagctgggcg ccaactgtgag ctctgtcggc ccttcttcta ccgtgacca accaaggacc	1500
	tgcgggatac ggctgtgtgc cgtctctgtg attgtgacc catgggttct caagacggtg	1560
	gtcgtgttga ttcccatgat gacctgcac tgggactggt ctccggccag tgcgtctgca	1620
	aagaacatgt ggtgggcact cgtgccagc aatgccgtga tggcttcttt gggctcagca	1680
	tcagtgaaccg tctgggctgc cggcgaatgc aatgtaatgc acggggcaca gtgccitgga	1740
	gcactccttg tgaccccaac agtggatcct gttactgcaa acgtctagtg actggacgtg	1800
	gatgtgaaccg ctgcctgcct ggccactggg gccagagcca cgacctgctc ggctgccgcc	1860
	cctgtgactg cgacgtgggt ggtgctttgg atccccagtg tgatgagggc acaggtaaat	1920
	gccactgccg ccagcacatg gttgggcgac gctgtgagca ggtgcaacct ggctaattcc	1980
	ggcccttctt ggaccaccta atttgggagg ctgaggacac ccgagggcag gtgctcgatg	2040
	tggtggagcg cctggtgacc cccggggaaa ctccatcctg gactggctca ggcttcgtgc	2100
	ggctacagga aggtcagacc ctggagttcc tgggtgcctc tgtgccgaag gctatggact	2160
	atgacctgct gctgcgtta gagcccccagg tccctgagca atgggcagag ttggaactga	2220
	ttgtgcagcg tccagggcct gtgcctgccc acagcctgtg tgggcatttg gtgcccagg	2280
	atgatcgcct ccaagggaact ctgcaaccac atgccaggta ctgatattt cctaattcctg	2340
	tctgccttga gcctggatc tcctacaagc tgcattctgaa gctggtaagg acagggggaa	2400
	gtgcccagcc tgagactccc tactctggac ctggcctgct cattgactcg ctggtgetgc	2460
	tgccccgtgt cctggtgcta gagatgttta gtgggggtga tgcctgctgc ctggagcgcc	2520

	aggeccacctt tgaacgtac caatgccatg aggagggtct ggtgcccagc aagacttctc	2580
	cctctgagge ctgcgcaccc ctctcatca gectgtccac cctcatctac aatggtgccc	2640
	tgccatgtca gtgcaaccct caaggttcaac tgagtctiga gtgcaaccct catggtggtc	2700
	agtgccctgt caagectgga ggggtlgggc gccgtctiga cctctgtgcc cctggctact	2760
	atggctttgg cccacagge tgcaagcct gccagtgcag ccacgagggg gcactcagca	2820
	gtctctgtga aaagaccagt gggcaatgtc tctgtcgaae tgggtccctt gggttctgct	2880
	gtgaccgctg ccagcgtgga cagtggggat tccctagctg ccggccatgt gtctgcaatg	2940
	ggcatgcaga tgagtgcac acccacacag gcgttgcct gggtgcctg gatcacacag	3000
	ggggtgagca ctgtgaaagg tgcattgtct gtttccacgg ggaccacagg ctgccatatg	3060
	ggggccagtg ccggccctgt cctgtcctg aagccctgg gagccaacgg cactttgcta	3120
	cttcttgcca ccaggatgaa tattcccagc agattgtgtg ccactgccgg gcaggctata	3180
	cgggctgctg atgtgaagct tgtgcccctg ggcacttttg ggaccatca aggccaggtg	3240
	gccggtgcca actgtgtgag tgcagtggga acattgacc aatggatcct gatgcctgig	3300
	acccccacac ggggcaatgc ctgcctgtt tacaccacac agagggtcca cactgtgccc	3360
	actgcaagcc tggttccat gggcaggctg cccgacagag ctgtcaccgc tgcacatgca	3420
	acctgtggg cacaatccg cagcagtgc catctctga ccagtccac tgtgatccaa	3480
[0034]	gcagtgggca gtgcccagc cccccaatg tccaggccc tagctgtgac cgtctgccc	3540
	ccaacttctg gaacctcacc agtggccatg gttgccagcc ttgtgcctgc caccacagcc	3600
	gggccagagg ccccacctgc aacgagtcca cagggcagtg cactgcctg gccgctttg	3660
	gaggggggac ttgttctgag tgccaagagc tccactgggg agacctggg ttgcagtgc	3720
	atgcctgtga ttgtgactct cgtggaatag atacacctca gtgtcaccgc ttcacaggtc	3780
	actgcagctg ccgccaggg gtgtctggtg tgcctgtga ccagtgtgc cgtggcttct	3840
	caggaatctt tctgcctgc catccctgcc atgcatgtt cggggatigg gaccgagtgg	3900
	tgcaggactt ggcagccctg acacagcgcc tagagcagcg ggccgaggag ttgcaacaga	3960
	cgggtgtgct ggggtgcctt gagagcagct tctggcacat gcaggagaag ctgggcattg	4020
	tgcagggcct cgtaggtgcc cgcaacacct cagccgctc cactgcacag cttgtggagg	4080
	ccacagagga gctgcggcgt gaaattgggg aggccactga gcacctgact cagctcaggg	4140
	cagacctgac agatgtgcaa gatgagaact tcaatgcaa ccatgcacta agtggcttgg	4200
	agcgagatag gcttgcaact aatctcacac tgcggcagct cgaccagcat cttgacttgc	4260
	tcaaaccatt aaacttctg ggtgccatg acagcatccg gcatgccat agccagtcig	4320
	cagaggcaga acgtcgtgcc aatacctcag cctggcagt acctagccct gtgagcaact	4380
	cggcaagtgc tcggcatcg acagaggcac tgatggatgc tcagaaggag gaattcaaca	4440
	gcaaacacat ggccaaccag cgggcacttg geaagctctc tgcccaacc cacacctga	4500

	gcctgacaga cataaatgag ctggtgtgtg gggcaccagg ggatgacccc tgtgtctaaa	4560
	gcccttgttg ggggtccggc tgtcgagatg aggatgggca gccgcgtgt gggggcctca	4620
	gctgcaatgg ggcagcggct acagcagacc tagcactggg ccgggcccgg cacacacagg	4680
	cagagctgca gcgggcactg gcagaagggt gtagcatcct cagcagagt gctgagactc	4740
	gtcggcaggc aagcgaggca cagcagcggg ccaggcagc cctggacaag gctaattgctt	4800
	ccaggggaca ggtggaacag gcccaaccagg aacttcaaga acttatccag agtgtgaagg	4860
	acttctctaa ccaggagggg gctgatcctg atagcatiga aatggtggcc acacgggtgc	4920
	tagagctctc catcccagct tcagctgagc agatccagca cctggcgggt gcgattgcag	4980
	agcgagtccg gaccttgga gatgtggatg cgatcctggc acgtactgta ggagatgtgc	5040
	gtcgtgccga gcagctactg caggatgcac ggccgggcaag gagctgggct gaggatgaga	5100
	aacagaaggc agagacagta caggcagcac tggaggaggc ccagcgggca cagggtattg	5160
	cccagggtgc catccggggg gcagtggctg acacacggga cacagagcag accctgtacc	5220
	aggtacagga gaggatggca ggtgcagagc gggcactgag ctctgcaggt gaaagggtc	5280
	ggcagttgga tgcctctctg gaggtctctga aattgaaacg ggcaggaaat agtctggcag	5340
	cctctacagc agaagaaacg gcaggcagtg cccagggtcg tgcccaggag gctgagcagc	5400
[0035]	tgtctacggg tctcttggt gatcagtacc agacggtgaa ggccctagct gagcgcaagg	5460
	cccagggtgt gctggctgca caggcaaggg cagaacaact gcgggatgag gctcgggaac	5520
	tgttgcaagc cgctcaggac aagctgcagc ggctacagga attggaaggc acctatgagg	5580
	aaaatgagcg ggcaactggag agtaaggcag cccagttgga cgggttggag gccaggatgc	5640
	gcagcgtgct tcaagccatc aacttgcagg tgcagatcta caacacctgc cagtgacccc	5700
	tgcccaaggc ctaccccagt tcttagcact gcccacatg catgtctgcc tatgcactga	5760
	agagctcttg gcccgcagg gcccacaata aaccagtgtg aacccccaaa aaaaaaa	5817

<210> 6

<211> 1798

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Met Glu Leu Thr Ser Arg Glu Arg Gly Arg Gly Gln Pro Leu Pro Trp
 1 5 10 15

Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala
 20 25 30

Gln Ala Pro Ala Pro Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr
 35 40 45

	Pro	Ala	Thr	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Arg	Ala	Asp	Arg	Leu	Thr	Ala	
	50						55					60					
	Ser	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Asn	Gly	Pro	Gln	Pro	Tyr	Cys	Ile	Val	Ser	
	65					70				75					80		
	His	Leu	Gln	Asp	Glu	Lys	Lys	Cys	Phe	Leu	Cys	Asp	Ser	Arg	Arg	Pro	
					85					90					95		
	Phe	Ser	Ala	Arg	Asp	Asn	Pro	His	Ser	His	Arg	Ile	Gln	Asn	Val	Val	
				100				105						110			
	Thr	Ser	Phe	Ala	Pro	Gln	Arg	Arg	Ala	Ala	Trp	Trp	Gln	Ser	Glu	Asn	
			115					120					125				
	Gly	Ile	Pro	Ala	Val	Thr	Ile	Gln	Leu	Asp	Leu	Glu	Ala	Glu	Phe	His	
		130						135				140					
	Phe	Thr	His	Leu	Ile	Met	Thr	Phe	Lys	Thr	Phe	Arg	Pro	Ala	Ala	Met	
	145					150					155					160	
	Leu	Val	Glu	Arg	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Arg	Thr	Trp	His	Val	Tyr	Arg	
					165					170					175		
[0036]	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Cys	Gly	Ala	Asp	Phe	Pro	Gly	Val	Pro	Leu	Ala	
				180					185					190			
	Pro	Pro	Arg	His	Trp	Asp	Asp	Val	Val	Cys	Glu	Ser	Arg	Tyr	Ser	Glu	
			195					200					205				
	Ile	Glu	Pro	Ser	Thr	Glu	Gly	Glu	Val	Ile	Tyr	Arg	Val	Leu	Asp	Pro	
		210					215					220					
	Ala	Ile	Pro	Ile	Pro	Asp	Pro	Tyr	Ser	Ser	Arg	Ile	Gln	Asn	Leu	Leu	
	225					230					235				240		
	Lys	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	Val	Asn	Leu	Thr	Arg	Leu	His	Thr	Leu	Gly	
				245						250					255		
	Asp	Asn	Leu	Leu	Asp	Pro	Arg	Arg	Glu	Ile	Arg	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	
				260					265					270			
	Ala	Leu	Tyr	Glu	Leu	Val	Val	Arg	Gly	Asn	Cys	Phe	Cys	Tyr	Gly	His	
			275					280					285				
	Ala	Ser	Glu	Cys	Ala	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	His	Ala	Glu	Gly	
		290					295					300					
	Met	Val	His	Gly	Ala	Cys	Ile	Cys	Lys	His	Asn	Thr	Arg	Gly	Leu	Asn	

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

[0037]

Gln Val Leu Asp Val Val Glu Arg Leu Val Thr Pro Gly Glu Thr Pro
580 585 590

Ser Trp Thr Gly Ser Gly Phe Val Arg Leu Gln Glu Gly Gln Thr Leu
595 600 605

Glu Phe Leu Val Ala Ser Val Pro Lys Ala Met Asp Tyr Asp Leu Leu
610 615 620

Leu Arg Leu Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu Leu Glu Leu
625 630 635 640

Ile Val Gln Arg Pro Gly Pro Val Pro Ala His Ser Leu Cys Gly His
645 650 655

Leu Val Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Thr Leu Gln Pro His Ala
660 665 670

Arg Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Pro Val Cys Leu Glu Pro Gly Ile Ser
675 680 685

Tyr Lys Leu His Leu Lys Leu Val Arg Thr Gly Gly Ser Ala Gln Pro
690 695 700

[0038]

Glu Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val Leu
705 710 715 720

Leu Pro Arg Val Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala
725 730 735

Ala Leu Glu Arg Gln Ala Thr Phe Glu Arg Tyr Gln Cys His Glu Glu
740 745 750

Gly Leu Val Pro Ser Lys Thr Ser Pro Ser Glu Ala Cys Ala Pro Leu
755 760 765

Leu Ile Ser Leu Ser Thr Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys Gln
770 775 780

Cys Asn Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Asn Pro His Gly Gly
785 790 795 800

Gln Cys Leu Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Leu Cys
805 810 815

Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Thr Gly Cys Gln Ala Cys Gln
820 825 830

Cys Ser His Glu Gly Ala Leu Ser Ser Leu Cys Glu Lys Thr Ser Gly
835 840 845

Gln Cys Leu Cys Arg Thr Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp Arg Cys
850 855 860

Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Ser Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn
865 870 875 880

Gly His Ala Asp Glu Cys Asn Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys
885 890 895

Arg Asp His Thr Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly Phe
900 905 910

His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro
915 920 925

Cys Pro Glu Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His
930 935 940

Gln Asp Glu Tyr Ser Gln Gln Ile Val Cys His Cys Arg Ala Gly Tyr
945 950 955 960

[0039]

Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Pro
965 970 975

Ser Arg Pro Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn Ile
980 985 990

Asp Pro Met Asp Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys Leu
995 1000 1005

Arg Cys Leu His His Thr Glu Gly Pro His Cys Ala His Cys Lys
1010 1015 1020

Pro Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys
1025 1030 1035

Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asn Pro Gln Gln Cys Pro Ser Pro
1040 1045 1050

Asp Gln Cys His Cys Asp Pro Ser Ser Gly Gln Cys Pro Cys Leu
1055 1060 1065

Pro Asn Val Gln Gly Pro Ser Cys Asp Arg Cys Ala Pro Asn Phe
1070 1075 1080

	Trp	Asn	Leu	Thr	Ser	Gly	His	Gly	Cys	Gln	Pro	Cys	Ala	Cys	His
	1085						1090					1095			
	Pro	Ser	Arg	Ala	Arg	Gly	Pro	Thr	Cys	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Gln
	1100						1105					1110			
	Cys	His	Cys	Arg	Ala	Gly	Phe	Gly	Gly	Arg	Thr	Cys	Ser	Glu	Cys
	1115						1120					1125			
	Gln	Glu	Leu	His	Trp	Gly	Asp	Pro	Gly	Leu	Gln	Cys	His	Ala	Cys
	1130						1135					1140			
	Asp	Cys	Asp	Ser	Arg	Gly	Ile	Asp	Thr	Pro	Gln	Cys	His	Arg	Phe
	1145						1150					1155			
	Thr	Gly	His	Cys	Ser	Cys	Arg	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Arg	Cys
	1160						1165					1170			
	Asp	Gln	Cys	Ala	Arg	Gly	Phe	Ser	Gly	Ile	Phe	Pro	Ala	Cys	His
	1175						1180					1185			
	Pro	Cys	His	Ala	Cys	Phe	Gly	Asp	Trp	Asp	Arg	Val	Val	Gln	Asp
	1190						1195					1200			
[0040]	Leu	Ala	Ala	Arg	Thr	Gln	Arg	Leu	Glu	Gln	Arg	Ala	Gln	Glu	Leu
	1205						1210					1215			
	Gln	Gln	Thr	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Glu	Ser	Ser	Phe	Trp	His
	1220						1225					1230			
	Met	Gln	Glu	Lys	Leu	Gly	Ile	Val	Gln	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Arg
	1235						1240					1245			
	Asn	Thr	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Glu
	1250						1255					1260			
	Glu	Leu	Arg	Arg	Glu	Ile	Gly	Glu	Ala	Thr	Glu	His	Leu	Thr	Gln
	1265						1270					1275			
	Leu	Glu	Ala	Asp	Leu	Thr	Asp	Val	Gln	Asp	Glu	Asn	Phe	Asn	Ala
	1280						1285					1290			
	Asn	His	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Leu	Asn
	1295						1300					1305			
	Leu	Thr	Leu	Arg	Gln	Leu	Asp	Gln	His	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	His
	1310						1315					1320			
	Ser	Asn	Phe	Leu	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ser	Ile	Arg	His	Ala	His	Ser

	1325		1330		1335
	Gln Ser Ala Glu Ala Glu Arg Arg Ala Asn Thr Ser Ala Leu Ala				
	1340		1345		1350
	Val Pro Ser Pro Val Ser Asn Ser Ala Ser Ala Arg His Arg Thr				
	1355		1360		1365
	Glu Ala Leu Met Asp Ala Gln Lys Glu Asp Phe Asn Ser Lys His				
	1370		1375		1380
	Met Ala Asn Gln Arg Ala Leu Gly Lys Leu Ser Ala His Thr His				
	1385		1390		1395
	Thr Leu Ser Leu Thr Asp Ile Asn Glu Leu Val Cys Gly Ala Pro				
	1400		1405		1410
	Gly Asp Ala Pro Cys Ala Thr Ser Pro Cys Gly Gly Ala Gly Cys				
	1415		1420		1425
	Arg Asp Glu Asp Gly Gln Pro Arg Cys Gly Gly Leu Ser Cys Asn				
	1430		1435		1440
[0041]	Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Gly Arg Ala Arg His				
	1445		1450		1455
	Thr Gln Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ala Glu Gly Gly Ser Ile				
	1460		1465		1470
	Leu Ser Arg Val Ala Glu Thr Arg Arg Gln Ala Ser Glu Ala Gln				
	1475		1480		1485
	Gln Arg Ala Gln Ala Ala Leu Asp Lys Ala Asn Ala Ser Arg Gly				
	1490		1495		1500
	Gln Val Glu Gln Ala Asn Gln Glu Leu Gln Glu Leu Ile Gln Ser				
	1505		1510		1515
	Val Lys Asp Phe Leu Asn Gln Glu Gly Ala Asp Pro Asp Ser Ile				
	1520		1525		1530
	Glu Met Val Ala Thr Arg Val Leu Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ser				
	1535		1540		1545
	Ala Glu Gln Ile Gln His Leu Ala Gly Ala Ile Ala Glu Arg Val				
	1550		1555		1560
	Arg Ser Leu Ala Asp Val Asp Ala Ile Leu Ala Arg Thr Val Gly				
	1565		1570		1575

Asp Val Arg Arg Ala Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg Arg Ala
1580 1585 1590

Arg Ser Trp Ala Glu Asp Glu Lys Gln Lys Ala Glu Thr Val Gln
1595 1600 1605

Ala Ala Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Gln Gly Ile Ala Gln Gly
1610 1615 1620

Ala Ile Arg Gly Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Thr Glu Gln Thr
1625 1630 1635

Leu Tyr Gln Val Gln Glu Arg Met Ala Gly Ala Glu Arg Ala Leu
1640 1645 1650

Ser Ser Ala Gly Glu Arg Ala Arg Gln Leu Asp Ala Leu Leu Glu
1655 1660 1665

Ala Leu Lys Leu Lys Arg Ala Gly Asn Ser Leu Ala Ala Ser Thr
1670 1675 1680

Ala Glu Glu Thr Ala Gly Ser Ala Gln Gly Arg Ala Gln Glu Ala
1685 1690 1695

[0042]

Glu Gln Leu Leu Arg Gly Pro Leu Gly Asp Gln Tyr Gln Thr Val
1700 1705 1710

Lys Ala Leu Ala Glu Arg Lys Ala Gln Gly Val Leu Ala Ala Gln
1715 1720 1725

Ala Arg Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu Gln
1730 1735 1740

Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly Thr
1745 1750 1755

Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Ser Lys Ala Ala Gln Leu
1760 1765 1770

Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile Asn
1775 1780 1785

Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln
1790 1795

<210> 7
<211> 7889
<212> DNA

<213> 人

<400> 7

	gtgcaggctg ctcccggggt aggtgagggg agcgcgagg cggcgcgcgg gggcagtggt	60
	cggcgagcag cgcggctctc gctaggggcg cccaccctc agtctctccg gcgcgagccg	120
	ccgccaccgc ccgcgcggga gtcaggcccc tgggccccca ggctcaagca gcgaagcggc	180
	ctccggggga cgccgctagg cgagagggaac gcgcgggtgc ccttgccctc gccgtgacct	240
	agcgtgcggg cggcgggatg agagggagcc atcgggccgc gccggccctg cggccccggg	300
	ggcggtctctg gcccgctgtg gccgtgctgg cggcggccgc cgcggcgggc tgtgcccagg	360
	cagccatgga cgagtgcacg gacgaggggc ggcgccgca gcgtgcatg cccgagttcg	420
	tcaacgccgc cttaacgtg actgtgggtg ccaccaaac gtgtgggact ccgcccagg	480
	aatactgtgt gcagaccggg gtgaccggg tcaccaagtc ctgtcacctg tgcgacgcg	540
	ggcagcccc cctgcagcac ggggcagcct tctgaccga ctacaacaac caggccgaca	600
	ccacctgggtg gcaaagccag accatgctgg ccgggggtga gtaccccgcc tccatcaacc	660
	tcacgtgca cctgggaaaa gcttttgaca tcacctatgt gcgtctcaag ttccacacca	720
	gccgcccggg gagctttgcc atttacaagc gcacacggga agacggggcc tggattccct	780
	accagtacta cagtgttcc tgtgagaaca cctactcaa ggcaaacgc ggttcacat	840
[0043]	ggacaggagg ggacgagcag caggccttgt gtactgatga attcagtgac atttctcccc	900
	tcactggggg caacgtggcc tttctaccc tggaggaag gcccgccgc tataactttg	960
	acaatagccc tgtgtgcag gaatgggtta ctgccactga catcagagta actcttaact	1020
	gccitgaacac ttttgagat gaagtgttta acgatcccaa agttctcaag tccattatt	1080
	atgccatctc tgattttgct gtaggtggca gatgtaaatg taatggacac gcaagcgagt	1140
	gtatgaagaa cgaatttgat aagctgggtg gtaattgcaa acataacaca tatggagtag	1200
	actgtgaaaa gtgtcttcc tcttcaatg accggccgtg gaggagggca actgcgga	1260
	gtgccagtga atgcctgcc tgtgattgca atggctgac ccaggaatgc tacttcgacc	1320
	ctgaactcta tcgttccact ggccatggg gccactgtac caactgccag gataacacag	1380
	atggcgccca ctgtgagagg tgcgagaga acttcttccg ccttggcaac aatgaagcct	1440
	gctcttcatt ccactgtagt cctgtgggt ctctaagcac acagtgtgat agttacggca	1500
	gatgcagctg taagccagga gtgatggggg acaaatgtga ccgttgccag cctggattcc	1560
	attctctcac tgaagcagga tgcaggccat gctcttgatg tccctctgga agcatagatg	1620
	aatgtaatat tgaaacagga agatgtgtt gcaaagacaa tgtcgaagc ttcaattgtg	1680
	aaagatgcaa acctggattt tttaactctg aatcatctaa tctcgggggt tgcacacct	1740
	gcttctgctt tgggcattct tetgtctgta caaacgtgt tggtacagat gtttattcta	1800
	tctctctac ctctcagatt gatgaggatg ggtggcgtgc ggaacagaga gatggctctg	1860

	aagcatctct cgagtggtec tctgagagge aagatatcgc cgtgatctca gacagctact	1920
	ttctcggta cttcattget cctgcaaagt tcttgggcaa gcagggttg agtlatggte	1980
	agaacctctc ctctccctt cgagtggaca ggcagatac tgcctctct gcagaagacc	2040
	ttgtgcttga gggagctggc ttaagagtat ctgtaccctt gategctcag ggcaattcet	2100
	atccaagtga gaccactgtg aagtatgtct tcaggctcca tgaagcaaca gattaccctt	2160
	ggaggcctgc tcttaccctt ttggaatttc agaagctcct aaacaacttg acctctatca	2220
	agntacgtgg gacatacagt gagagaagt ctggatatct ggatgatgtc acctggcaa	2280
	gtgctcgtcc tgggectgga gtccctgcaa cttgggtgga gtcctgcacc tgtcctgtgg	2340
	gatatggagg gcagttttgt gagatgtgcc tctcaggtta cagaagagaa actcctaate	2400
	ttggaccata cagtcctagt gtgctttgcg cctgcaatgg acacagcgag acctgtgac	2460
	ctgagacagg tgtttgtaac tgcagagaca atacggctgg cccgcactgt gagaagtga	2520
	gtgatgggta ctatggagat tcaactgcag gcacctctc cgattgcca cccgtccgt	2580
	gtccctggagg ttcaagttgt gctgttgtc ccaagacaaa ggaggtgggtg tgcaccaact	2640
	gtcctactgg caccactggt aagagatgtg agctctgtga tgatggctac ttgagagacc	2700
	ccctgggtag aaacggccct gtgagacttt gccgcctgtg ccagtgcagt gacaacatcg	2760
	atcccaatgc agttggaaat tgcateget tgacgggaga atgctgaag tgcctctata	2820
[0044]	acactgctgg ctctctatgt gaccgggtga aagacggatt ttttgaaat cccctggctc	2880
	ccaatccagc agacaaatgc aaagcctgca attgcaatct gtatgggacc atgaagcagc	2940
	agagcagctg taaccccggt acgggggcagt gtgaatgttt gctcaactg actggccagg	3000
	actgtggtgc ttgtgacct ggattctaca atctgcagag tgggcaagge tgtgagaggt	3060
	gtgactgcca tgccttgggc tccaccaatg ggcagtgtga catccgcacc ggccagtgtg	3120
	agtgccagcc cggcatcact ggtcagcact gtgagcgtg tgaggtaac cactttgggt	3180
	ttggacctga aggetgcaaa cctgtgact gtcactctga gggatctctt tcacttcagt	3240
	gcaaagatga tggctcgtgt gaatgcagag aaggctttgt gggaaatgc tgtgaccagt	3300
	gtgaagaaaa ctattctac aatcggtctt ggctggctg ccaggaatgt ccagcttgtt	3360
	accggtggt aaaggataag gttgetgac atagagtga gctccaggaa ttagagagtc	3420
	tcatagcaaa ccttggaaat ggggatgaga tggtagaca tcaagcttc gaggatagac	3480
	taaaggaagc agagaggga gttatggacc tcttcgtga ggcccaggat gtcaaagatg	3540
	ttgaccagaa ttgatggat gccttacaga gagtgaataa cactctgtcc agccaaatta	3600
	gccgtttaca gaataccgg aataccattg aagagactgg aaacttggct gaacaagcgc	3660
	gtgcccattg agagaacaca gagcggttga ttgaaatgc atccagagaa cttgagaaag	3720
	caaaagtcgc tgetgccaat gtgtcagtca ctacgcaga atctacagg gacccaaaca	3780
	acatgactct tttggcagaa gaggctcgaa agcttgctga acgtcataaa caggaagctg	3840

	atgacattgt tgcagtgga aagacagcca atgatacgtc aactgaggca tacaacctgc	3900
	ttctgaggac actggcagga gaaaatcaaa cagcatttga gattgaagag cttaatagga	3960
	agtatgaaca agcgaagaac atctcacagg atctggaaaa acaagctgcc cgagtacatg	4020
	aggaggccaa aagggccggt gacaaagctg tggagatcta tgccagcgtg gctcagctga	4080
	gcccttttga ctctgagaca ctggagaatg aagcaataaa cataaagatg gaagctgaga	4140
	atctggaaca actgattgac cagaaattaa aagattatga ggacctcaga gaagatatga	4200
	gagggaagga acttgaagtc aagaaccttc tggagaaagg caagactgaa cagcagaccg	4260
	cagaccaact cctagccccg gctgatgctg ccaaggecct cgctgaagaa gctgcaaaga	4320
	agggaaggga taccttataa gaagctaata acattctcaa caacctgaaa gattttgata	4380
	ggcgtgtgaa cgataacaag acggccgcag aggaggcact aagggaagatt cctgccatca	4440
	accagaccat cactgaagcc aatgaaaaga ccagagaagc ccagcaggcc ctgggcagtg	4500
	ctgcggcgga tgccacagag gccaagaaca aggcccatga ggccggagagg atcgcgagcg	4560
	ctgtccaaaa gaatgccacc agcaccaagg cagaagctga aagaactttt gcagaagtta	4620
	cagatctgga taatgaggtg aacaatatgt tgaagcaact gcaggaagca gaaaaagagc	4680
	taaagagaaa acaagatgac gctgaccagg acatgatgat ggcagggatg gcttcacagg	4740
[0045]	ctgtcaaga agccgagatc aatgccagaa aagccaaaaa ctctgttact agcctctca	4800
	gcattattaa tgacctcttg gagcagctgg ggcagctgga tacagtggac ctgaataagc	4860
	taaacgagat tgaaggcacc cttaaacaag ccaaagatga aatgaaggtc agcgatcttg	4920
	ataggaaagt gtctgacctg gagaatgaag ccaagaagca ggaggctgcc atcatggact	4980
	ataaccgaga tatcgaggag atcatgaagg acattcgcaa tctggaggac atcaggaaga	5040
	ccttaccatc tggttgcttc aacaccccggt ccattgaaaa gccctagtgt ctttagggct	5100
	ggaaggcagc atccctctga caggggggca gttgtgaggc cacagagtgc cttgacacaa	5160
	agattacatt tticagacce ccactctctt gctgctgtcc atgactgtcc ttttgaacca	5220
	ggaaaagtca cagagtttaa agagaagcaa attaaacatc ctgaatcggg aacaaagggt	5280
	tttatetaat aaagtgtctc ttccattcac gttgctacct taccacact ttccctctg	5340
	atttgcgtga ggacgtggca tcctacgtta ctgtacagtg gcataagcac atcgtgtgag	5400
	cccattgatg ctggggtaga gcaagtagcc ctcccctgtc tcatcgatac cagcagaacc	5460
	tcctcagtct cagtactctt gtttctatga aggaaaagtt tggtactaa cagtagcatt	5520
	gtgatggcca gtatatecag tccatggata aagaaaatgc atctgcatct cctacccctc	5580
	ttccttctaa gcaaaaggaa ataaacatcc tgtgccaaag gtatttggtca tttagaatgt	5640
	cggtagccat ccatcagtc ttttagttat tatgagtgtg ggacactgag ccatccgtgg	5700
	gtcaggatgc aattatttat aaaagtctcc aggtgaacat ggctgaagat tttctagta	5760

	tatttaataat tgactaggaa gatgaacttt ttttcagatc ttgggcagc tgataattta	5820
	aatctggatg ggcagcttgc actcaccaat agaccaaaag acatcttttg atattcttat	5880
	aaatggaact tacacagaag aaatagggat atgataacca ctaaaatttt gttttcaaaa	5940
	tcaaactaat tellacagct lllllattag ltagtcttgg aactagtggt aaglatecgg	6000
	cagagaacag ttaatcccta aggtcttgac aaaacagaag aaaaacaagc ctctctgtcc	6060
	tagtcttttc tagcaaaggg ataaaactta gatggcagct tgtactgtca gaatcccgtg	6120
	tatccatttg ttctctgtgt ggagagatga gacatttgac ccttagetcc agttttcttc	6180
	tgatgtttcc atcttcaga atccctcaaa aaacattgtt tgccaaatcc tggtagcaaa	6240
	tacttgcact cagtatttca cacagctgcc aacgtatcg agttcctgca ctitgtgatt	6300
	taaatccact ctaaaccttc cctctaagtg tagagggaag acccttacgt ggagtttctt	6360
	agtgggtctc tcaacttttg atcctcagct ctgtggtttt aagaccacag tgtgacagtt	6420
	ccctgccaca ccccccttc ctctaccaaa cccaccttg agattcatat atagecttta	6480
	acactatgca actttgtact ttgcgtagca ggggcggggg ggggggaaag aaactattat	6540
	ctgacacact ggtgctatta attatttcaa attatatatt ttgtgtgaat gttttgtgtt	6600
	ttgtttatca tgattataga ataaggaatt tatgtaata tacttagtcc tatttctaga	6660
	atgacactct gttaactttg ctcaattttt cctcttcaat ggcacaatgt atctgaatac	6720
[0046]	ctcttccct ccttctaga attctttgga ttgtactcca aagaattgtg ccttgtgttt	6780
	gcagcatctc cattctctaa aattaataa attgctttcc tccacacca gccactgtaa	6840
	agaggtaact tgggtctctt tccattgcag tctgatgat cctaacctgc agcaggtgg	6900
	ttttacaatg ttccagacea ggaacgcag gttgacaagc tatggttaga ttaggaaagt	6960
	ttgttgaaga ggatctttga cgccacagt ggaactagcca ggaatgaggg agaaatgccc	7020
	tttctggcaa ttgttggagc tggataggta agttttataa gggagtacat ttigtactgag	7080
	cacttagggc atcaggaaca gtgtactta ctgatgggta gaetgggaga ggtggtgtaa	7140
	cttagttctt gatgatccca ctctctgttt ccactctgtt gggatatacc agagtttacc	7200
	acaagtgttt tgacgatata ctctgagct ttactctgc tgettctccc aggcctcttc	7260
	tactatggca ggagatgtgg cgtgtgttg caaagtttcc acgtcattgt tteetggeta	7320
	gttcatttca ttaagtggct acatctaac atatgcattt ggtcaagggt gcagaagagg	7380
	actgaagatt gactgccaag ctagtttggg tgaagttcac tccagcaagt ctccagccac	7440
	aatggggtgg ttgtgttgg ttctcttita actttttttt tgttatttgc tttctctctc	7500
	caccigtgtg gtaatatltt taagcagaat ttatltttt aaaaataaaag gtcttllaca	7560
	agatgatacc ttaattacac tcccgcaaca cagccattat ttatttgtct agctccagtt	7620
	atctgtattt tatgtaatgt aattgacagg atggtgtctg cagaatgtg gttgacacag	7680
	ggattattat actgctattt tteectgaat tttttctt tgaattccaa ctgtggacct	7740

tttataatgtg ccttcacitc agcigtctgc cttaatctct acagecctgc tctccggggc 7800
 ggtttaataaa atgcaacact tggcattttt atgttttaag aaaaacagta ttttatttat 7860
 aataaaaatct gaatatttgt aacccttta 7889

<210> 8
 <211> 1609
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 8

Met Arg Gly Ser His Arg Ala Ala Pro Ala Leu Arg Pro Arg Gly Arg
 1 5 10 15

Leu Trp Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys
 20 25 30

Ala Gln Ala Ala Met Asp Glu Cys Thr Asp Glu Gly Gly Arg Pro Gln
 35 40 45

Arg Cys Met Pro Glu Phe Val Asn Ala Ala Phe Asn Val Thr Val Val
 50 55 60

[0047] Ala Thr Asn Thr Cys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Tyr Cys Val Gln Thr
 65 70 75 80

Gly Val Thr Gly Val Thr Lys Ser Cys His Leu Cys Asp Ala Gly Gln
 85 90 95

Pro His Leu Gln His Gly Ala Ala Phe Leu Thr Asp Tyr Asn Asn Gln
 100 105 110

Ala Asp Thr Thr Trp Trp Gln Ser Gln Thr Met Leu Ala Gly Val Gln
 115 120 125

Tyr Pro Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu His Leu Gly Lys Ala Phe Asp
 130 135 140

Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe
 145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Arg Thr Arg Glu Asp Gly Pro Trp Ile Pro Tyr Gln
 165 170 175

Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Glu Asn Thr Tyr Ser Lys Ala Asn Arg Gly
 180 185 190

Phe Ile Arg Thr Gly Gly Asp Glu Gln Gln Ala Leu Cys Thr Asp Glu
 195 200 205

Phe Ser Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr
 210 215 220

Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ala Tyr Asn Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu
 225 230 235 240

Gln Glu Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Thr Leu Asn Arg Leu
 245 250 255

Asn Thr Phe Gly Asp Glu Val Phe Asn Asp Pro Lys Val Leu Lys Ser
 260 265 270

Tyr Tyr Tyr Ala Ile Ser Asp Phe Ala Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys
 275 280 285

Asn Gly His Ala Ser Glu Cys Met Lys Asn Glu Phe Asp Lys Leu Val
 290 295 300

Cys Asn Cys Lys His Asn Thr Tyr Gly Val Asp Cys Glu Lys Cys Leu
 305 310 315 320

Pro Phe Phe Asn Asp Arg Pro Trp Arg Arg Ala Thr Ala Glu Ser Ala
 325 330 335

[0048]

Ser Glu Cys Leu Pro Cys Asp Cys Asn Gly Arg Ser Gln Glu Cys Tyr
 340 345 350

Phe Asp Pro Glu Leu Tyr Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Thr
 355 360 365

Asn Cys Gln Asp Asn Thr Asp Gly Ala His Cys Glu Arg Cys Arg Glu
 370 375 380

Asn Phe Phe Arg Leu Gly Asn Asn Glu Ala Cys Ser Ser Cys His Cys
 385 390 395 400

Ser Pro Val Gly Ser Leu Ser Thr Gln Cys Asp Ser Tyr Gly Arg Cys
 405 410 415

Ser Cys Lys Pro Gly Val Met Gly Asp Lys Cys Asp Arg Cys Gln Pro
 420 425 430

Gly Phe His Ser Leu Thr Glu Ala Gly Cys Arg Pro Cys Ser Cys Asp
 435 440 445

Pro Ser Gly Ser Ile Asp Glu Cys Asn Ile Glu Thr Gly Arg Cys Val
 450 455 460

Cys Lys Asp Asn Val Glu Gly Phe Asn Cys Glu Arg Cys Lys Pro Gly
 465 470 475 480
 Phe Phe Asn Leu Glu Ser Ser Asn Pro Arg Gly Cys Thr Pro Cys Phe
 485 490 495
 Cys Phe Gly His Ser Ser Val Cys Thr Asn Ala Val Gly Tyr Ser Val
 500 505 510
 Tyr Ser Ile Ser Ser Thr Phe Gln Ile Asp Glu Asp Gly Trp Arg Ala
 515 520 525
 Glu Gln Arg Asp Gly Ser Glu Ala Ser Leu Glu Trp Ser Ser Glu Arg
 530 535 540
 Gln Asp Ile Ala Val Ile Ser Asp Ser Tyr Phe Pro Arg Tyr Phe Ile
 545 550 555 560
 Ala Pro Ala Lys Phe Leu Gly Lys Gln Val Leu Ser Tyr Gly Gln Asn
 565 570 575
 Leu Ser Phe Ser Phe Arg Val Asp Arg Arg Asp Thr Arg Leu Ser Ala
 580 585 590
 [0049]
 Glu Asp Leu Val Leu Glu Gly Ala Gly Leu Arg Val Ser Val Pro Leu
 595 600 605
 Ile Ala Gln Gly Asn Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Thr Val Lys Tyr Val
 610 615 620
 Phe Arg Leu His Glu Ala Thr Asp Tyr Pro Trp Arg Pro Ala Leu Thr
 625 630 635 640
 Pro Phe Glu Phe Gln Lys Leu Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Lys Ile
 645 650 655
 Arg Gly Thr Tyr Ser Glu Arg Ser Ala Gly Tyr Leu Asp Asp Val Thr
 660 665 670
 Leu Ala Ser Ala Arg Pro Gly Pro Gly Val Pro Ala Thr Trp Val Glu
 675 680 685
 Ser Cys Thr Cys Pro Val Gly Tyr Gly Gly Gln Phe Cys Glu Met Cys
 690 695 700
 Leu Ser Gly Tyr Arg Arg Glu Thr Pro Asn Leu Gly Pro Tyr Ser Pro
 705 710 715 720

	Cys	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Asn	Gly	His	Ser	Glu	Thr	Cys	Asp	Pro	Glu	
					725					730					735		
	Thr	Gly	Val	Cys	Asn	Cys	Arg	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Pro	His	Cys	Glu	
				740					745					750			
	Lys	Cys	Ser	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Thr	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	
			755					760					765				
	Asp	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Cys	Pro	Gly	Gly	Ser	Ser	Cys	Ala	Val	Val	
		770					775					780					
	Pro	Lys	Thr	Lys	Glu	Val	Val	Cys	Thr	Asn	Cys	Pro	Thr	Gly	Thr	Thr	
	785					790					795					800	
	Gly	Lys	Arg	Cys	Glu	Leu	Cys	Asp	Asp	Gly	Tyr	Phe	Gly	Asp	Pro	Leu	
				805						810					815		
	Gly	Arg	Asn	Gly	Pro	Val	Arg	Leu	Cys	Arg	Leu	Cys	Gln	Cys	Ser	Asp	
				820					825					830			
	Asn	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Val	Gly	Asn	Cys	Asn	Arg	Leu	Thr	Gly	Glu	
			835					840					845				
[0050]	Cys	Leu	Lys	Cys	Ile	Tyr	Asn	Thr	Ala	Gly	Phe	Tyr	Cys	Asp	Arg	Cys	
		850					855					860					
	Lys	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ala	Asp	Lys	
	865					870					875					880	
	Cys	Lys	Ala	Cys	Asn	Cys	Asn	Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Lys	Gln	Gln	Ser	
				885						890					895		
	Ser	Cys	Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Cys	Glu	Cys	Leu	Pro	His	Val	Thr	
				900					905					910			
	Gly	Gln	Asp	Cys	Gly	Ala	Cys	Asp	Pro	Gly	Phe	Tyr	Asn	Leu	Gln	Ser	
			915					920					925				
	Gly	Gln	Gly	Cys	Glu	Arg	Cys	Asp	Cys	His	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	
		930					935					940					
	Gly	Gln	Cys	Asp	Ile	Arg	Thr	Gly	Gln	Cys	Glu	Cys	Gln	Pro	Gly	Ile	
	945					950					955					960	
	Thr	Gly	Gln	His	Cys	Glu	Arg	Cys	Glu	Val	Asn	His	Phe	Gly	Phe	Gly	
				965						970					975		
	Pro	Glu	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Asp	Cys	His	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Ser	

	980	985	990
	Leu Gln Cys Lys Asp Asp Gly Arg Cys Glu Cys Arg Glu Gly Phe Val 995 1000 1005		
	Gly Asn Arg Cys Asp Gln Cys Glu Glu Asn Tyr Phe Tyr Asn Arg 1010 1015 1020		
	Ser Trp Pro Gly Cys Gln Glu Cys Pro Ala Cys Tyr Arg Leu Val 1025 1030 1035		
	Lys Asp Lys Val Ala Asp His Arg Val Lys Leu Gln Glu Leu Glu 1040 1045 1050		
	Ser Leu Ile Ala Asn Leu Gly Thr Gly Asp Glu Met Val Thr Asp 1055 1060 1065		
	Gln Ala Phe Glu Asp Arg Leu Lys Glu Ala Glu Arg Glu Val Met 1070 1075 1080		
	Asp Leu Leu Arg Glu Ala Gln Asp Val Lys Asp Val Asp Gln Asn 1085 1090 1095		
[0051]	Leu Met Asp Arg Leu Gln Arg Val Asn Asn Thr Leu Ser Ser Gln 1100 1105 1110		
	Ile Ser Arg Leu Gln Asn Ile Arg Asn Thr Ile Glu Glu Thr Gly 1115 1120 1125		
	Asn Leu Ala Glu Gln Ala Arg Ala His Val Glu Asn Thr Glu Arg 1130 1135 1140		
	Leu Ile Glu Ile Ala Ser Arg Glu Leu Glu Lys Ala Lys Val Ala 1145 1150 1155		
	Ala Ala Asn Val Ser Val Thr Gln Pro Glu Ser Thr Gly Asp Pro 1160 1165 1170		
	Asn Asn Met Thr Leu Leu Ala Glu Glu Ala Arg Lys Leu Ala Glu 1175 1180 1185		
	Arg His Lys Gln Glu Ala Asp Asp Ile Val Arg Val Ala Lys Thr 1190 1195 1200		
	Ala Asn Asp Thr Ser Thr Glu Ala Tyr Asn Leu Leu Leu Arg Thr 1205 1210 1215		
	Leu Ala Gly Glu Asn Gln Thr Ala Phe Glu Ile Glu Glu Leu Asn 1220 1225 1230		

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

[0052]

Glu Leu Lys Arg Lys Gln Asp Asp Ala Asp Gln Asp Met Met Met
1475 1480 1485

Ala Gly Met Ala Ser Gln Ala Ala Gln Glu Ala Glu Ile Asn Ala
1490 1495 1500

Arg Lys Ala Lys Asn Ser Val Thr Ser Leu Leu Ser Ile Ile Asn
1505 1510 1515

Asp Leu Leu Glu Gln Leu Gly Gln Leu Asp Thr Val Asp Leu Asn
1520 1525 1530

Lys Leu Asn Glu Ile Glu Gly Thr Leu Asn Lys Ala Lys Asp Glu
1535 1540 1545

Met Lys Val Ser Asp Leu Asp Arg Lys Val Ser Asp Leu Glu Asn
1550 1555 1560

Glu Ala Lys Lys Gln Glu Ala Ala Ile Met Asp Tyr Asn Arg Asp
1565 1570 1575

Ile Glu Glu Ile Met Lys Asp Ile Arg Asn Leu Glu Asp Ile Arg
1580 1585 1590

[0053]

Lys Thr Leu Pro Ser Gly Cys Phe Asn Thr Pro Ser Ile Glu Lys
1595 1600 1605

Pro

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 层粘连蛋白 α 1 链正义引物序列

<400> 9
gagtcggtct ctcctggacat ag

22

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 层粘连蛋白 α 1 链反义引物序列

<400> 10
cgtggcattc acagggttga c

21

	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 α 2链正义引物序列	
	<400> 11	
	tgctagaatt tacctccgct cg	22
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 α 2链反义引物序列	
	<400> 12	
	gatcaagtgg acaagccctg	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 α 3链正义引物序列	
[0054]	<400> 13	
	ctccaaaggc ccaactcaag	20
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 α 3链反义引物序列	
	<400> 14	
	ccataactgc ctccttagtc tc	22
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 α 4链正义引物序列	
	<400> 15	
	ettaagcaac accaccgat tc	22
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	层粘连蛋白 α 4链反义引物序列	
	<400>	16	
		ccttcctcca agcattctcc g	21
	<210>	17	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	层粘连蛋白 α 5链正义引物序列	
	<400>	17	
		gaggactgaa gtgaaaactc aa	22
	<210>	18	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	层粘连蛋白 α 5链反义引物序列	
	<400>	18	
		ccactgaagt tgtaatggt g	21
[0055]	<210>	19	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	层粘连蛋白 β 1链正义引物序列	
	<400>	19	
		gatggtgaac ttgatgaaa gt	22
	<210>	20	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	层粘连蛋白 β 1链反义引物序列	
	<400>	20	
		ggettatatc ctttaggagt ga	22
	<210>	21	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	层粘连蛋白 β 2链正义引物序列	
	<400>	21	
		gatgatcgca tccaaggac	20

	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 β 2链反义引物序列	
	<400> 22	
	gtccagagta gggagttctca g	21
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 β 3链正义引物序列	
	<400> 23	
	cccagatgga ggaagatgtc	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0056]	<223> 层粘连蛋白 β 3链反义引物序列	
	<400> 24	
	gtagctgagt ctgtgggcag	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 β 4链正义引物序列	
	<400> 25	
	ggcaggctac tttagatttc	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 β 4链反义引物序列	
	<400> 26	
	gcttgaggga tcattctggac	20
	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 γ 1链正义引物序列	
	<400> 27	
	gatgagatgg tgacagatca ag	22
	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 γ 1链反义引物序列	
	<400> 28	
	tttccagtct ctccaatggt at	22
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 γ 2链正义引物序列	
	<400> 29	
	atcgaagggt actgcggaat c	21
[0057]	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 γ 2链反义引物序列	
	<400> 30	
	gtagccagaa gcacaatcct g	21
	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 γ 3链正义引物序列	
	<400> 31	
	gggatacaag agggagatgc	20
	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 层粘连蛋白 γ 3链反义引物序列	

[0058]	<400> 32 catagaaacc tggcaaacag c	21
	<210> 33 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 1 链正义引物序列	
	<400> 33 gaagaacctc ctgaaacctt tt	22
	<210> 34 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 1 链反义引物序列	
	<400> 34 tgatgtcata ttggggaatg aa	22
	<210> 35 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 2 链正义引物序列	
	<400> 35 tgatgggaca gaagtaacat gc	22
	<210> 36 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 2 链反义引物序列	
	<400> 36 tggaccaaca ttttcaaac tg	22
	<210> 37 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 3 链正义引物序列	
	<400> 37 gctctgcctt tggtttatct gt	22
	<210> 38	

	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 3链反义引物序列	
	<400> 38	
	ttcccactag aaggtctggg ta	22
	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 4链正义引物序列	
	<400> 39	
	atattcagtc ggagctgggc at	22
	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 4链反义引物序列	
[0059]	<400> 40	
	geatatttgt cacttccaac ga	22
	<210> 41	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 5链正义引物序列	
	<400> 41	
	tcctcagcaa gaatctcaac aa	22
	<210> 42	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 5链反义引物序列	
	<400> 42	
	gttgagtccc gtaactctgg tc	22
	<210> 43	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 整联蛋白 α 6链正义引物序列	
	<400> 43 agcaaggcag atggaataat gt	22
	<210> 44 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 6链反义引物序列	
	<400> 44 cagggtagga atttcgatca ag	22
	<210> 45 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 7链正义引物序列	
	<400> 45 caggtcacct tctacctcat cc	22
[0060]	<210> 46 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 7链反义引物序列	
	<400> 46 accgtgacct catacttgac ct	22
	<210> 47 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 8链正义引物序列	
	<400> 47 atggaaaatg taaccaggat gg	22
	<210> 48 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 α 8链反义引物序列	
	<400> 48 cagttatgaa tgggcagaac aa	22

	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 9链正义引物序列	
	<400> 49	
	cactttcagc ccataaatat ca	22
	<210> 50	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 9链反义引物序列	
	<400> 50	
	acagtgtgct gttaggcaag aa	22
	<210> 51	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 10链正义引物序列	
[0061]	<400> 51	
	atcagtgtgg ttcagaggga ct	22
	<210> 52	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 10链反义引物序列	
	<400> 52	
	gccctggcctt tgtagtattg tc	22
	<210> 53	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 α 11链正义引物序列	
	<400> 53	
	ggacactgct gactacgtga ag	22
	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	整联蛋白 α 11链反义引物序列	
	<400>	54	
		gcgtgtgctc tctatgatga ag	22
	<210>	55	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 α 11链正义引物序列	
	<400>	55	
		tagcagtgaag gaagctgacg ag	22
	<210>	56	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 α 11链反义引物序列	
	<400>	56	
		tctttcagga agacgacagt ga	22
[0062]	<210>	57	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 α 11链正义引物序列	
	<400>	57	
		atctgtgagg tcgaaacagg at	22
	<210>	58	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 α 11链反义引物序列	
	<400>	58	
		accttgccaa taaaagctac ca	22
	<210>	59	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 α 11链正义引物序列	
	<400>	59	

	gaaccattga caccagaagt ga	22
	<210> 60	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-L链反义引物序列	
	<400> 60	
	ttcttcaaac cccaactgtc tt	22
	<210> 61	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-M链正义引物序列	
	<400> 61	
	gateggetaa gagaaggaca ga	22
	<210> 62	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0063]	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-M链反义引物序列	
	<400> 62	
	cattgccaca atttettetca aa	22
	<210> 63	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-X链正义引物序列	
	<400> 63	
	ccaacatctg cctttacatt ga	22
	<210> 64	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-X链反义引物序列	
	<400> 64	
	cgtgaagtat ctctgagcat cg	22
	<210> 65	
	<211> 22	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-D链正义引物序列	
	<400> 65	
	ttaaccagat gaagggttt gt	22
	<210> 66	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-D链反义引物序列	
	<400> 66	
	ggtcttttga cttctgccca tc	22
	<210> 67	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-IIb链正义引物序列	
	<400> 67	
[0064]	gaaaagactg aggaggctga ga	22
	<210> 68	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白alpha-IIb链反义引物序列	
	<400> 68	
	gagaaaatat ccgcaactgg ag	22
	<210> 69	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白β 1链正义引物序列	
	<400> 69	
	gctgaagact atccattga cc	22
	<210> 70	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白β 1链反义引物序列	

	<400> 70 atttccagat atgcgctggtt tt	22
	<210> 71 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 β 2链正义引物序列	
	<400> 71 tgatggacct ctccctactcc at	22
	<210> 72 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 β 2链反义引物序列	
	<400> 72 gaaactgggtt ggagttgttg gt	22
[0065]	<210> 73 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 β 3链正义引物序列	
	<400> 73 tgtttaccac tgatgccaag ac	22
	<210> 74 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 β 3链反义引物序列	
	<400> 74 tcccataagc atcaacaatg ag	22
	<210> 75 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 整联蛋白 β 4链正义引物序列	
	<400> 75 gcttcacacc tatttcctg tc	22

	<210> 76	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 β 4链反义引物序列	
	<400> 76	
	gaaggaaggt ttcagatgga tg	22
	<210> 77	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 β 5链正义引物序列	
	<400> 77	
	gctggtgttc acaacagatg at	22
	<210> 78	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 β 5链反义引物序列	
[0066]	<400> 78	
	atcccagact gacaactcca ct	22
	<210> 79	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 β 6链正义引物序列	
	<400> 79	
	tgtgactgtg gtgaatgtgt gt	22
	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 整联蛋白 β 6链反义引物序列	
	<400> 80	
	caccagctag ttgcaattg tc	22
	<210> 81	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	整联蛋白 β 7链正义引物序列	
	<400>	81	
		cacttcagac gacacattcc at	22
	<210>	82	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 β 7链反义引物序列	
	<400>	82	
		cccaactgca gacttaggaa tc	22
	<210>	83	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 β 8链正义引物序列	
	<400>	83	
		gcattatgtc gaccaaactt ca	22
[0067]	<210>	84	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	整联蛋白 β 8链反义引物序列	
	<400>	84	
		atttcttcag gcttctcag tc	22
	<210>	85	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	GAPDH-F引物	
	<400>	85	
		gagtcaacgg atttggtcgt	20
	<210>	86	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	GADPH-R引物	
	<400>	86	
		ttgattttgg agggatctcg	20

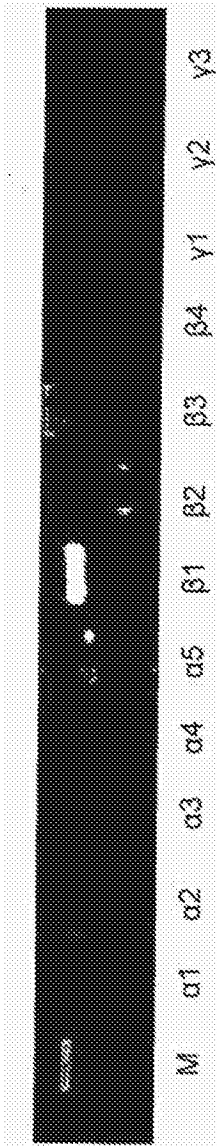


图1

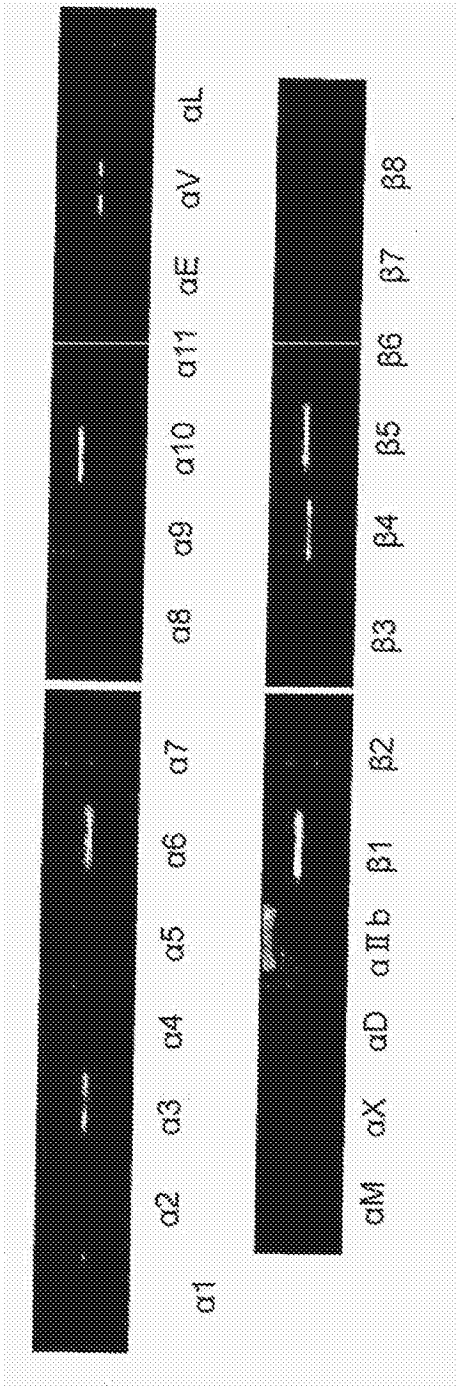


图2

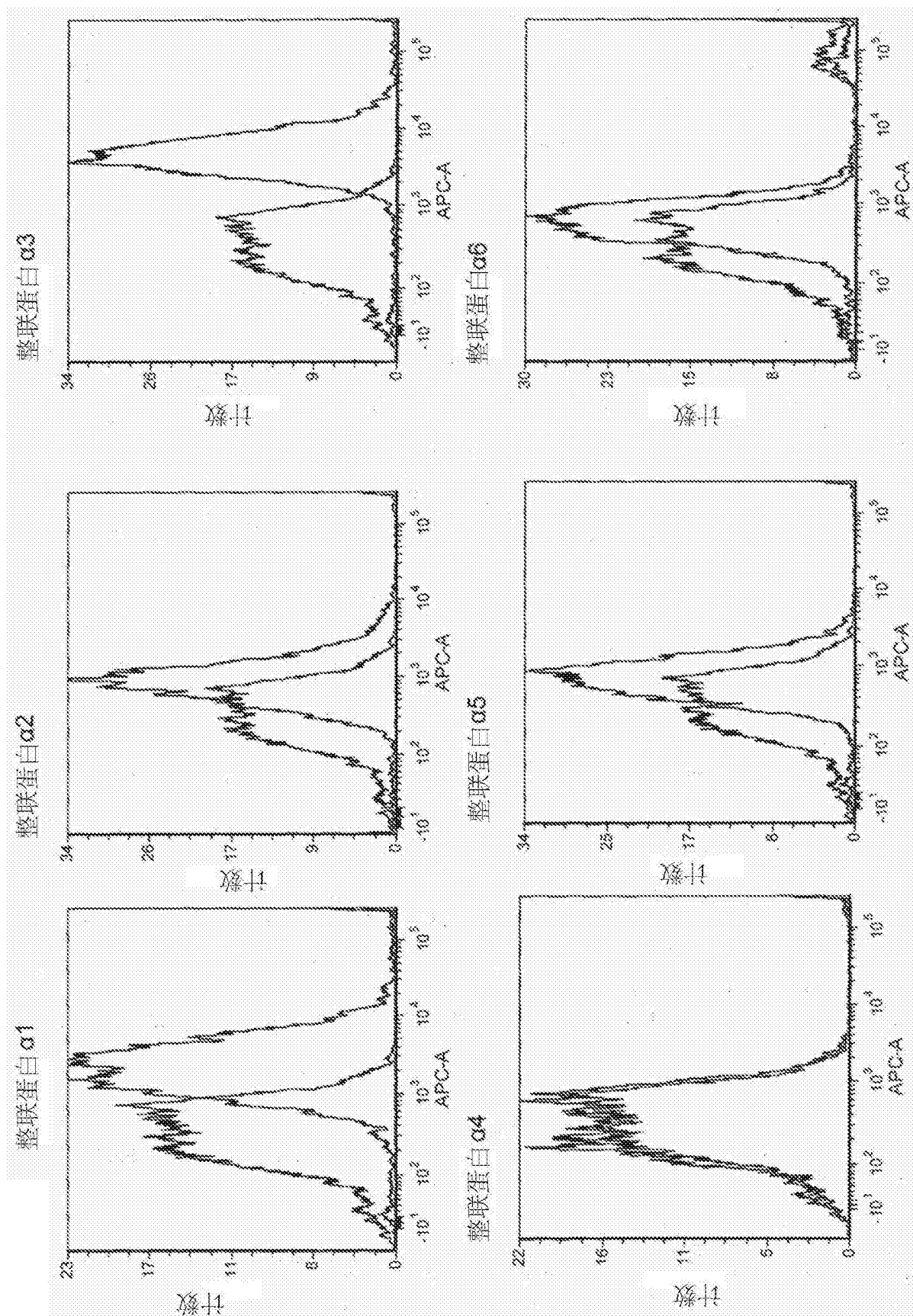


图3A

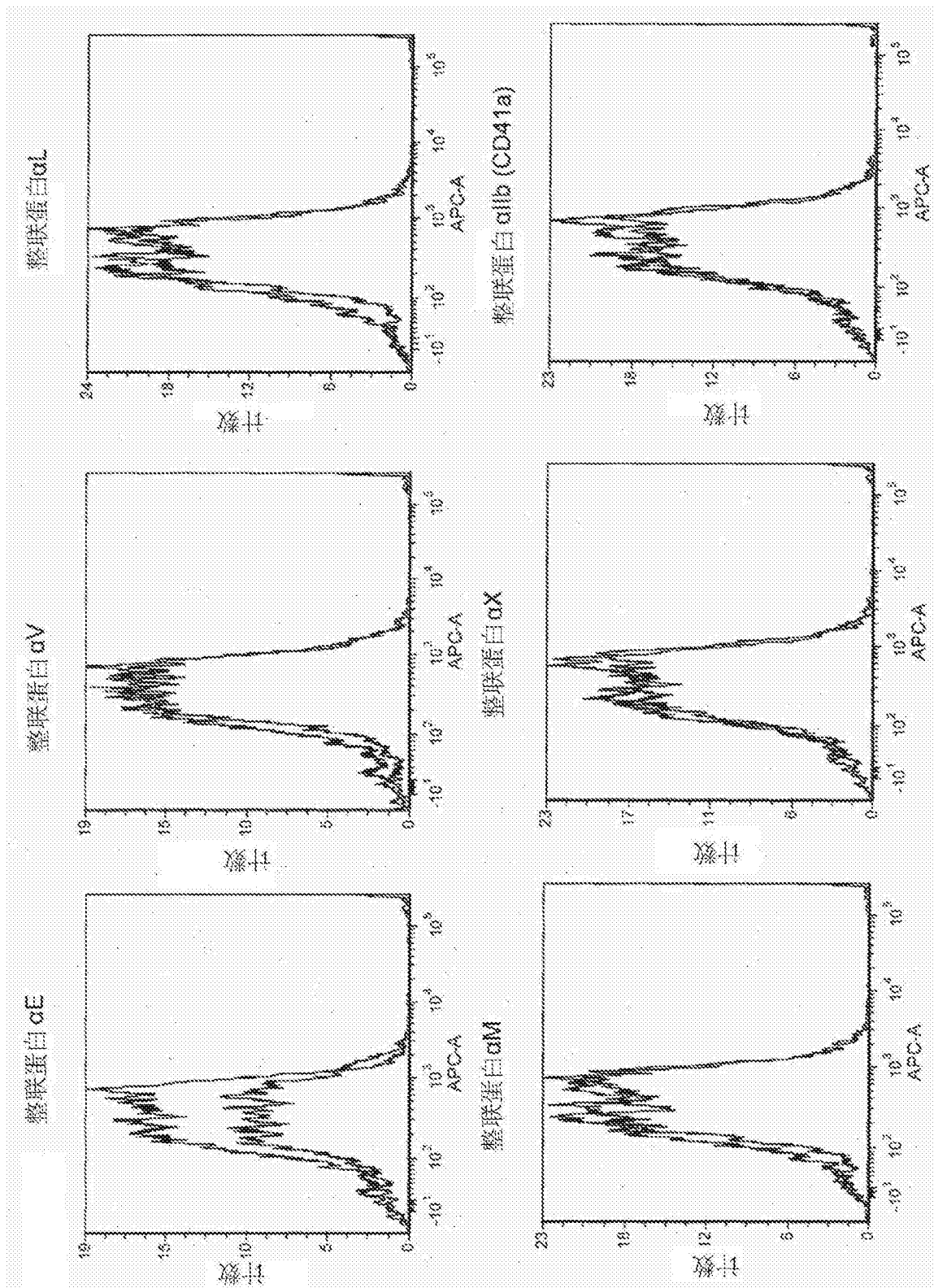


图3B

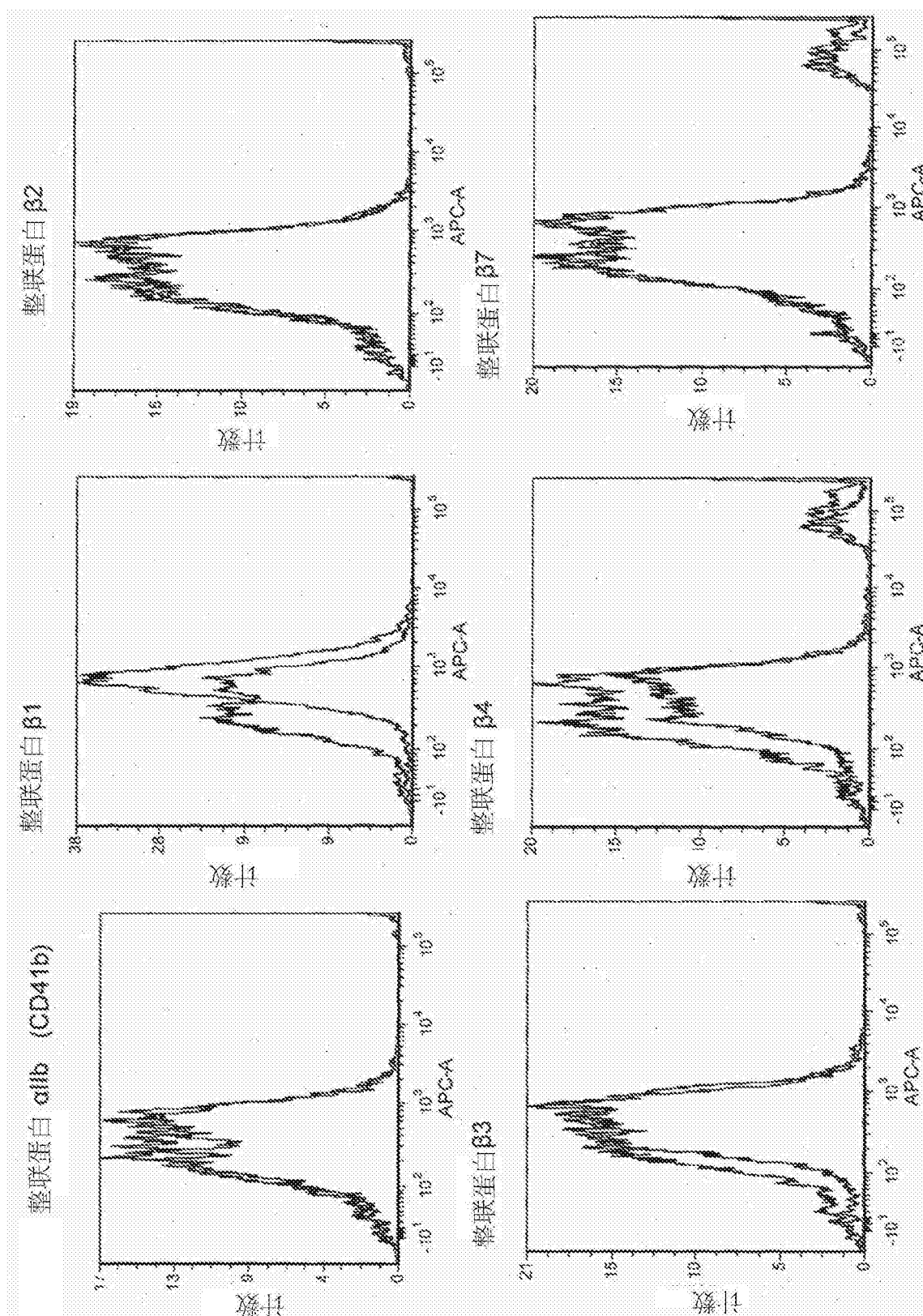


图3C

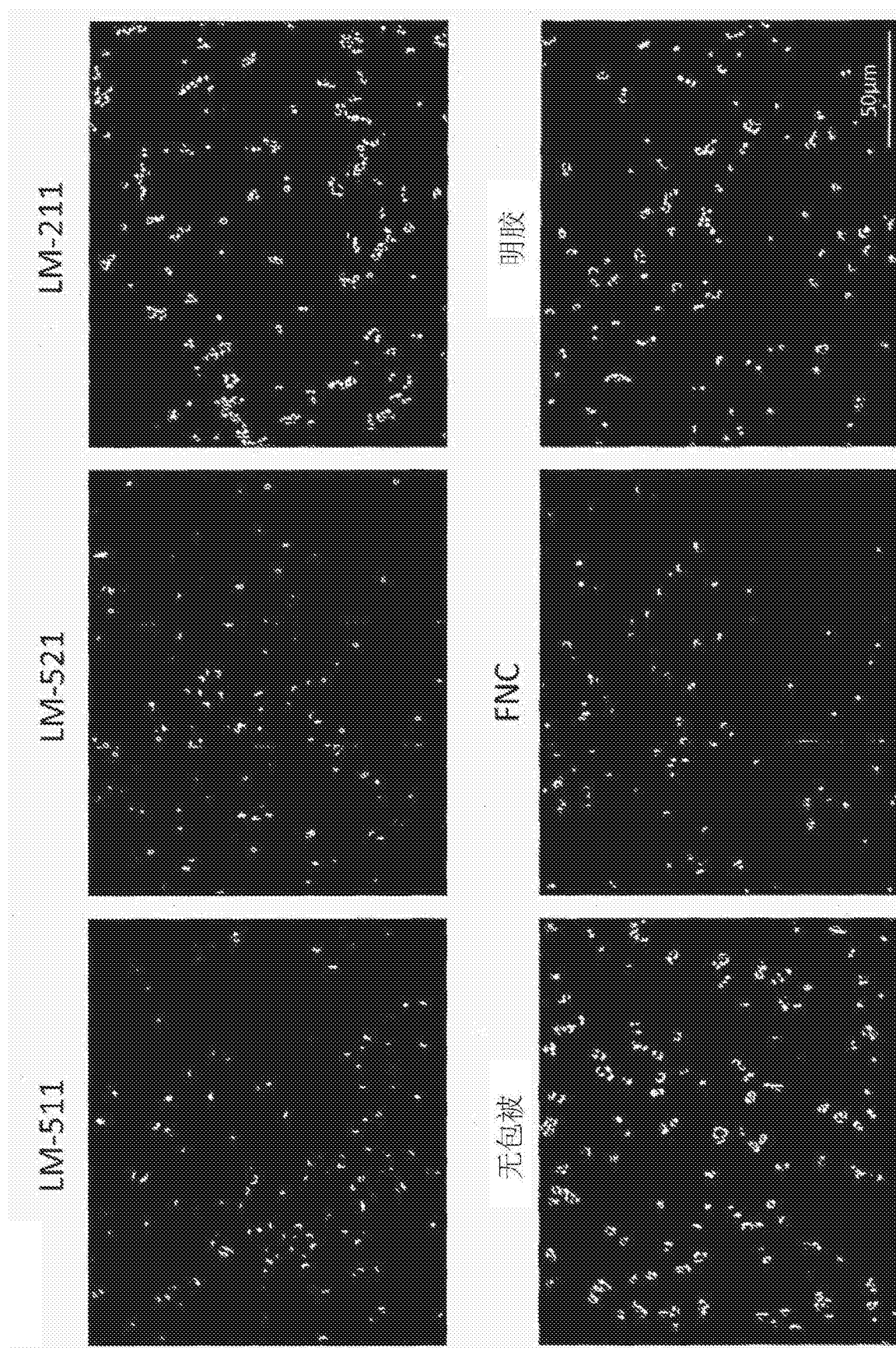


图4

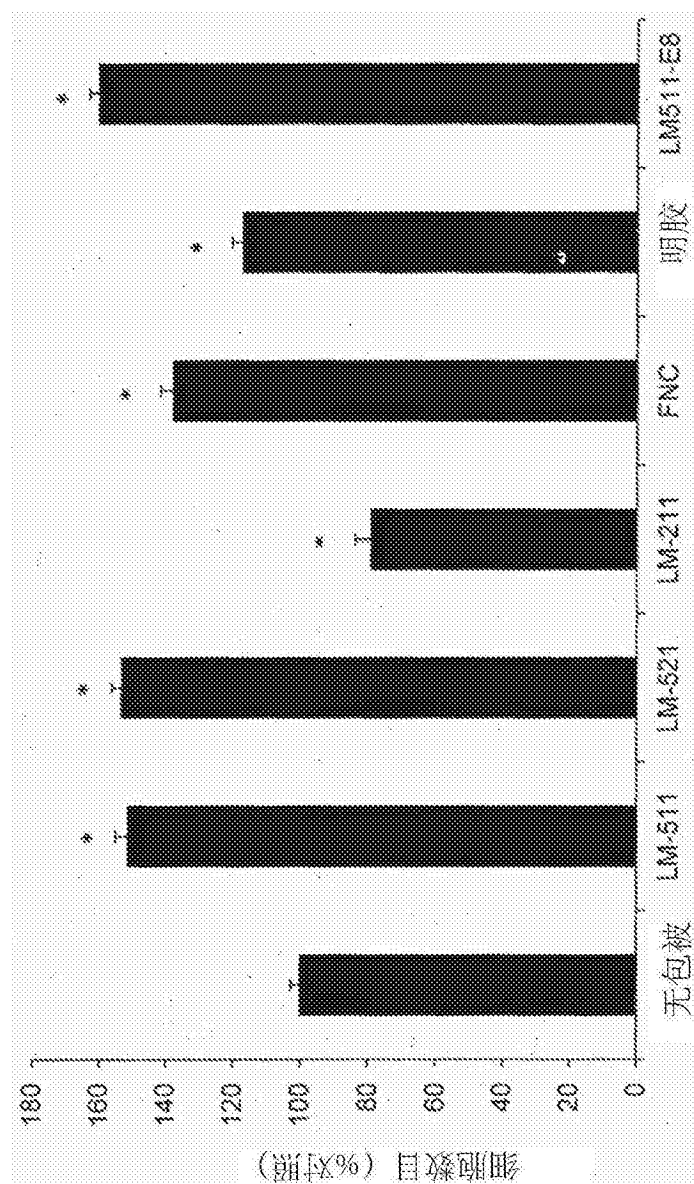


图5

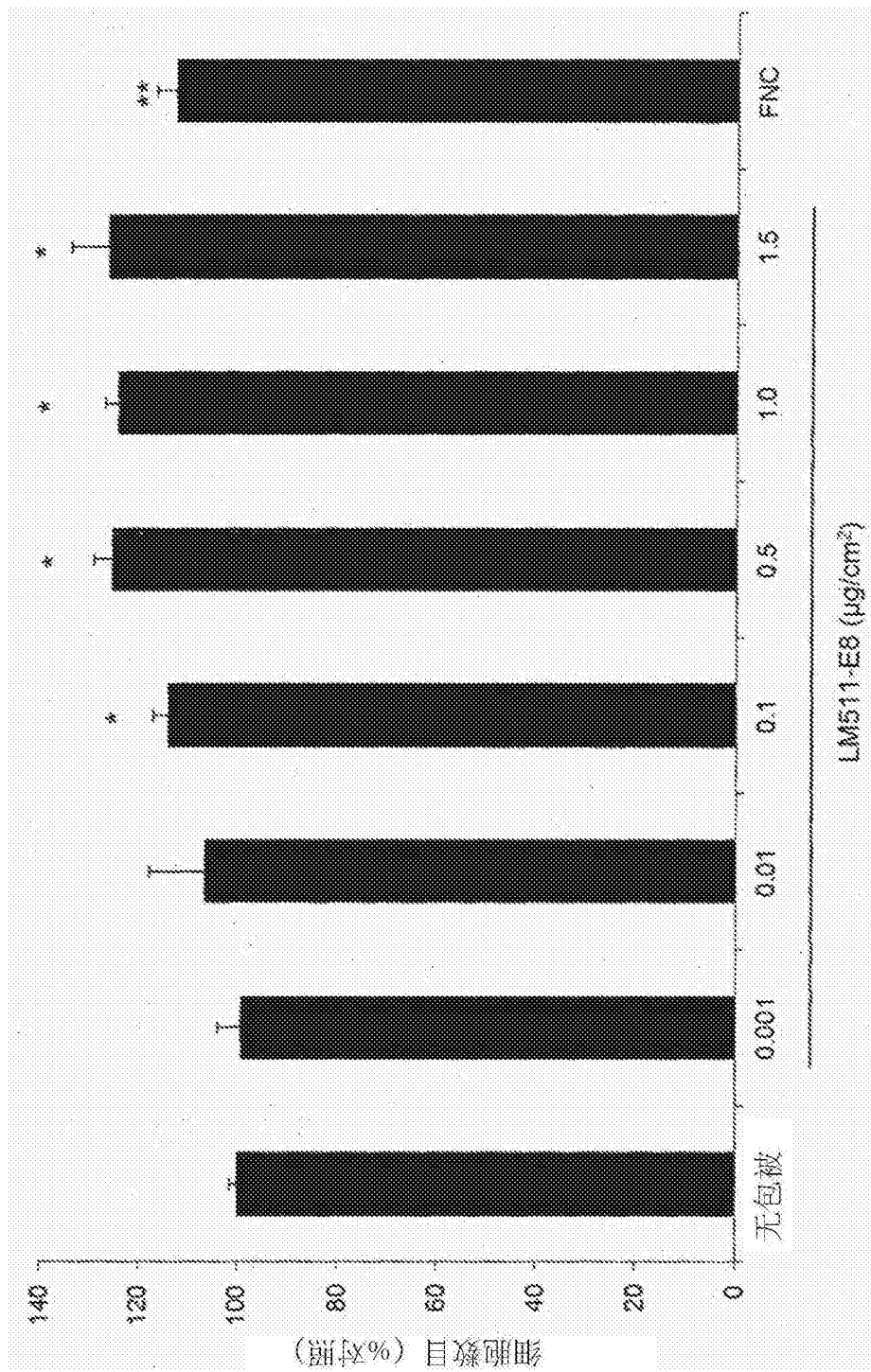


图6

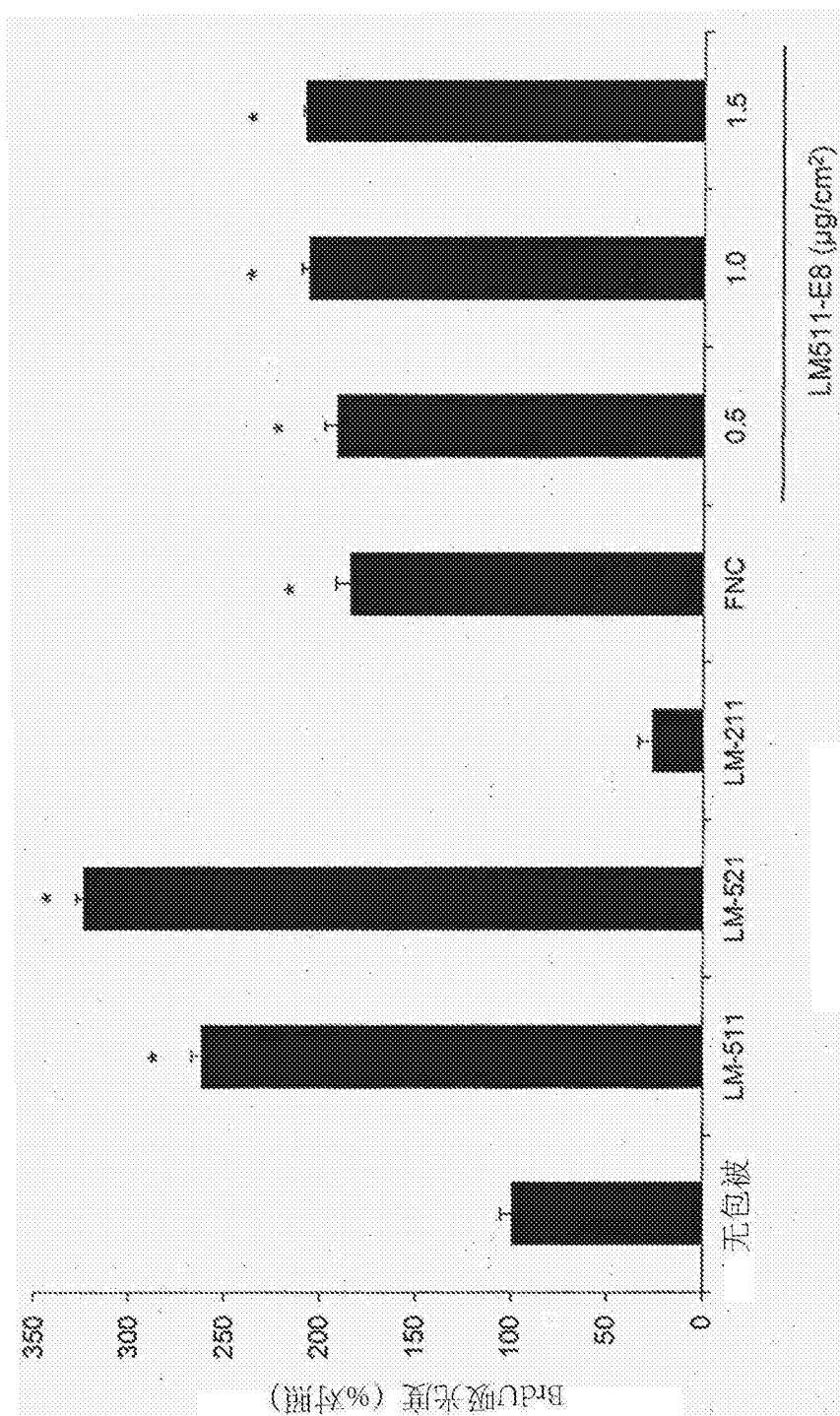


图7

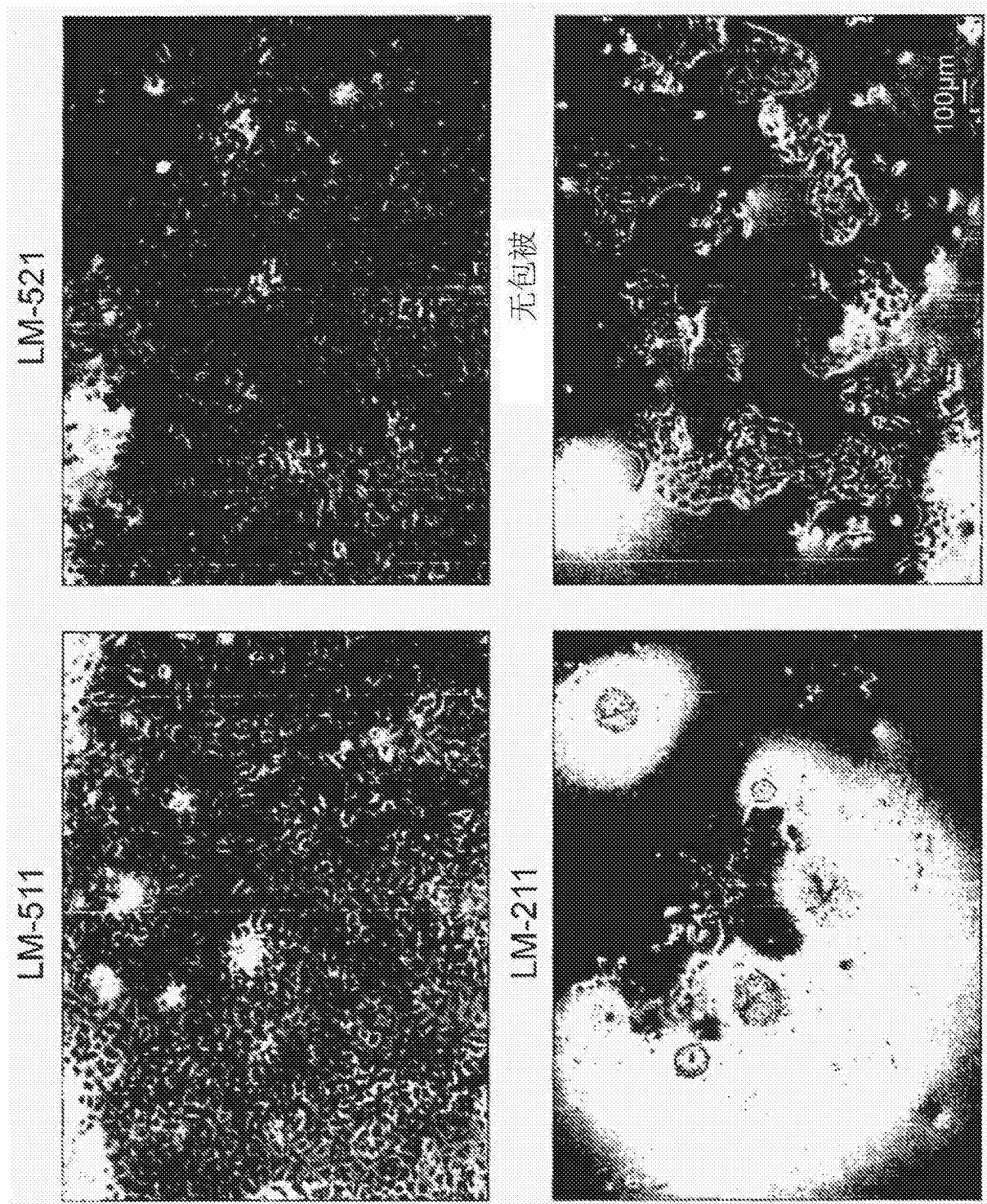


图8

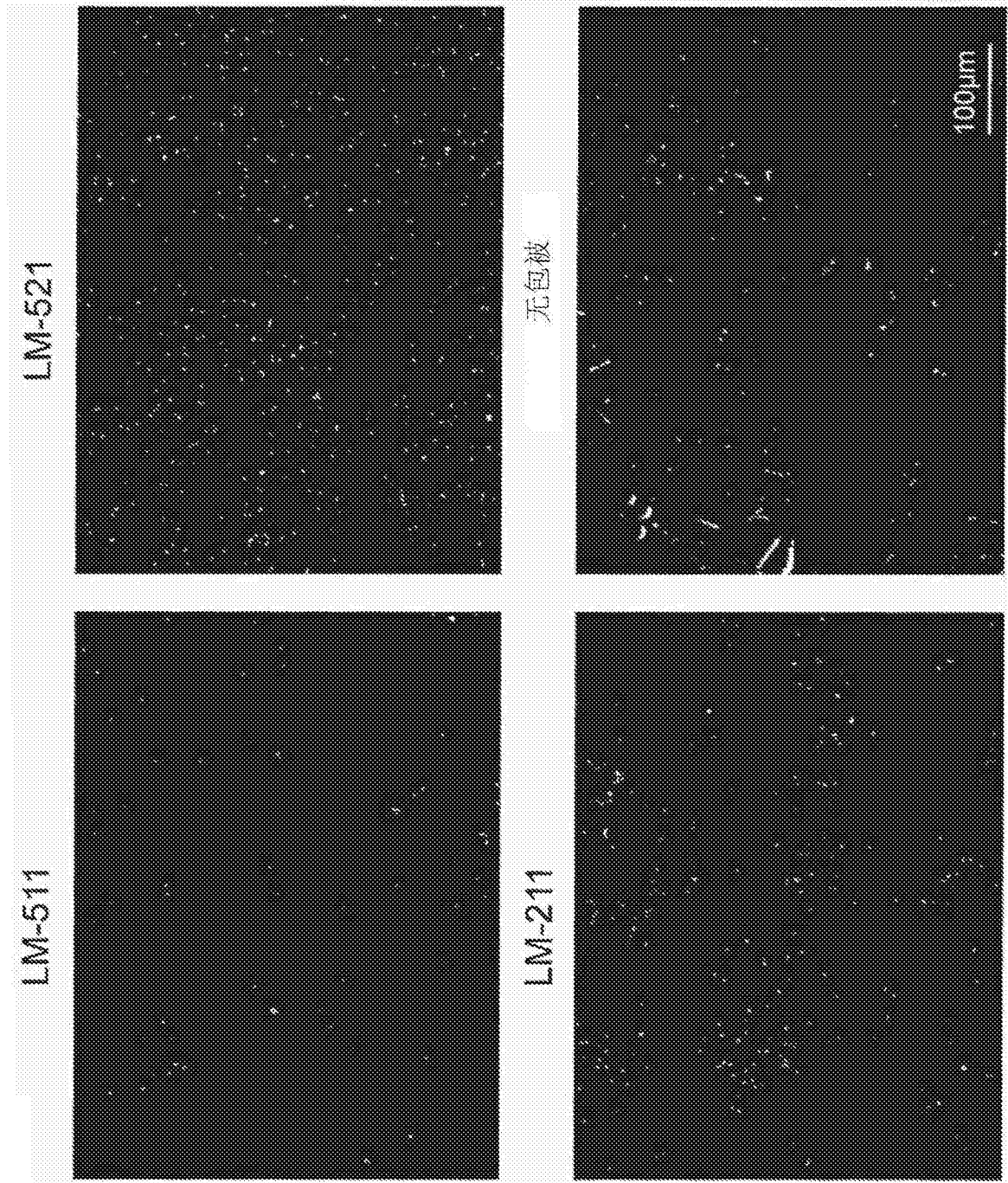


图9

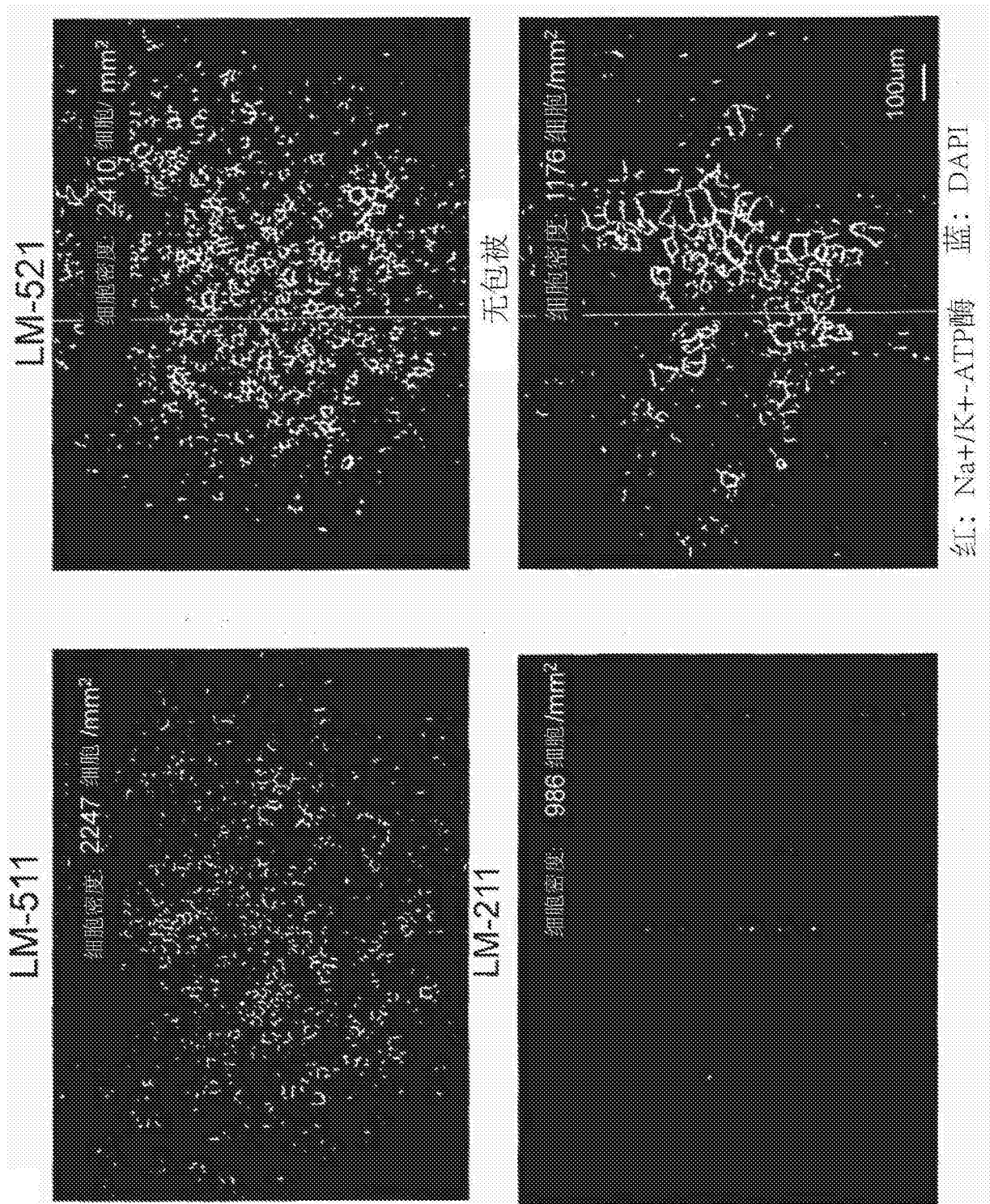


图10

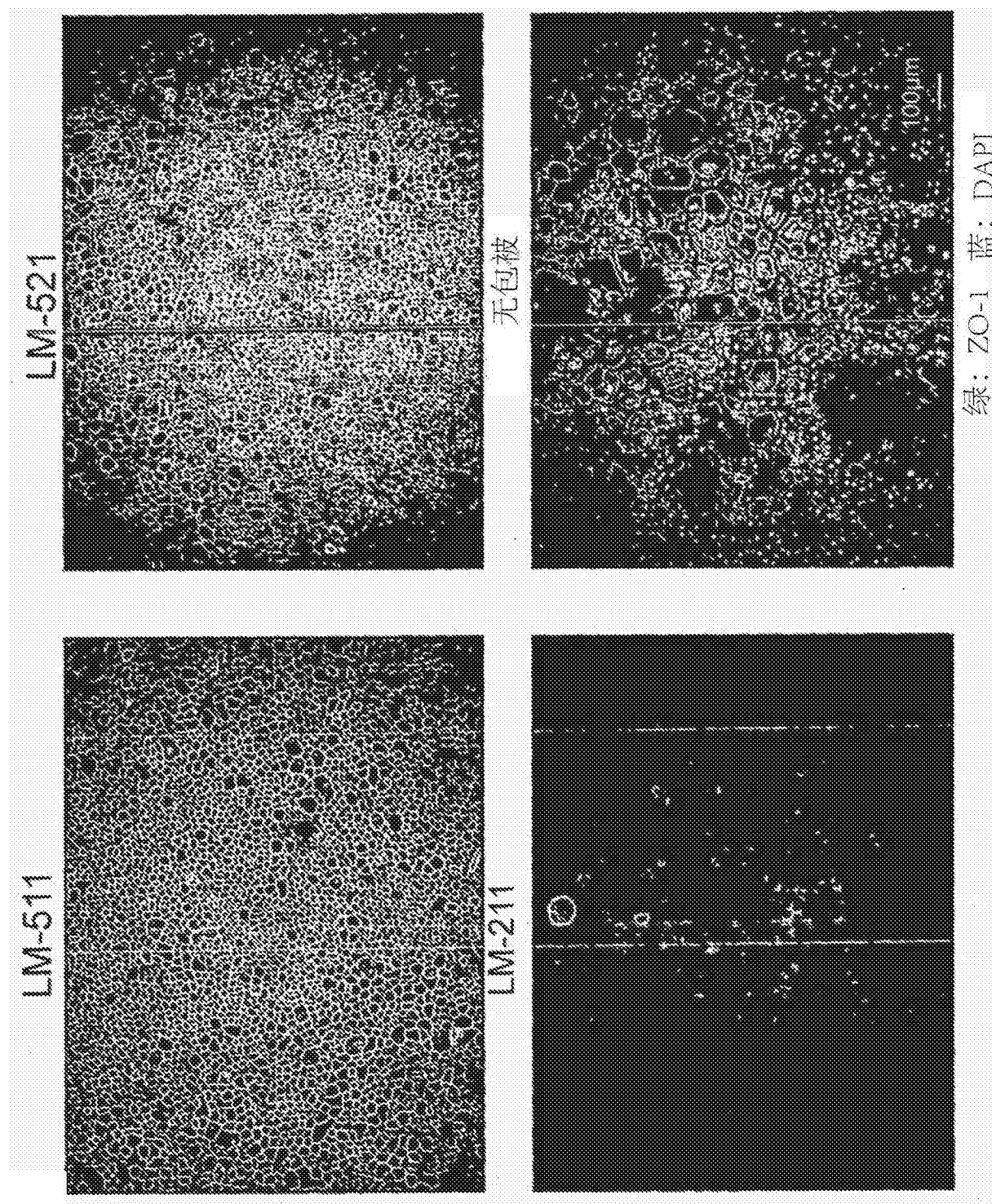


图11

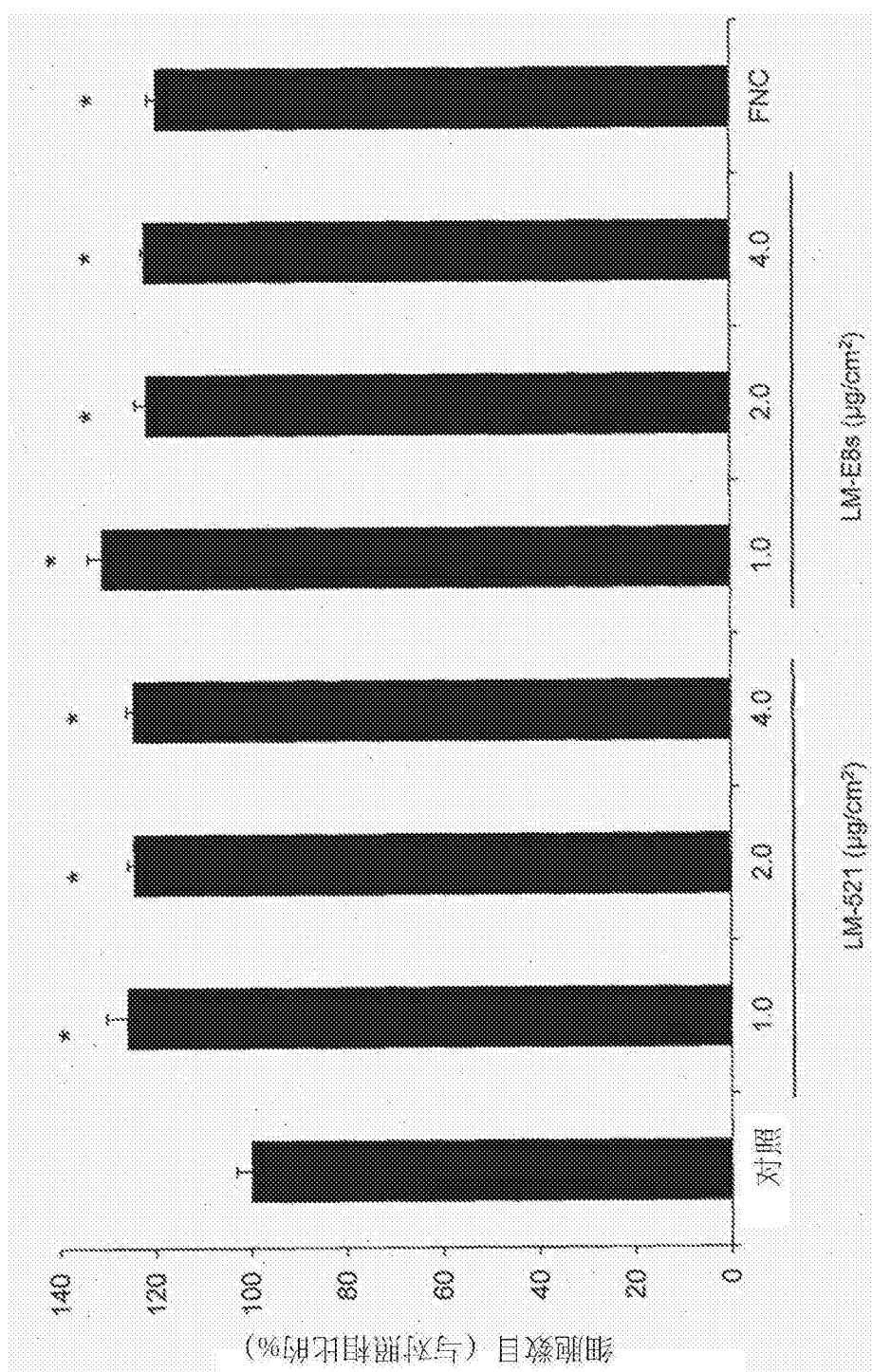


图12