

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 165**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2007 E 07740098 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2006683**

54 Título: **Método de determinación de megalina humana**

30 Prioridad:

28.03.2006 JP 2006089306

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.05.2014

73 Titular/es:

NIIGATA UNIVERSITY (50.0%)
8050, Ikarashi Ninocho, Nishi-ku, Niigata-shi
Niigata 950-2181, JP y
DENKA SEIKEN CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

OGASAWARA, SHINYA;
MIURA, SHUHEI;
SAITO, AKIHIKO y
TAKEDA, TETSURO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 459 165 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de determinación de megalina humana

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para detectar nefropatía midiendo megalina humana. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para detectar megalina humana que comprende detectar cuantitativamente megalina que se expresa de manera tópica y específicamente en células, tejidos y órganos donde se observa expresión de megalina de manera rápida y sencilla, para de ese modo permitir el diagnóstico temprano y directo del grado en el que células, tejidos y órganos están afectados y mejorar y evitar el empeoramiento de las condiciones de trastornos y el pronóstico mediante tratamiento. La presente invención puede aplicarse a diagnóstico de nefropatía.

15 **Técnica anterior**

1. Clonación de megalina

Como resultado de una búsqueda de un antígeno etiológico de nefritis de Heymann, que es un modelo para nefropatía membranosa experimental, Kerjaschki, D. y Farquhar, M.G. identificaron una proteína de membrana celular, gp330, en 1982 (Kerjaschki D., Farquhar M.G., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 5557-5561). En 1994, Saito, A. *et al.* determinaron la estructura primaria completa de una gp330 de rata y la designaron como megalina, porque era la mayor proteína clonada de membrana celular de un vertebrado (Saito A. *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729).

25 2. Sitio de expresión de megalina

La megalina también se conoce como glicoproteína 330 (gp330) o proteína 2 relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (LRP-2). Es una glicoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 600 kDa, que se expresa en células epiteliales del túbulo proximal de riñón, en otros tejidos y células, tales como células alveolares de tipo II, tejido espermático, endometrio uterino, placenta o epitelio del oído interno, epitelio renal, germo-vitelario y ectodermo neural (véase Christensen E. I., Willnow, T. E., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236; Juhlin C., Klareskog L. *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265, 8275-8279; y Zheng G, McCluskey R. T. *et al.*, 1994, J. Histochem. Cytochem. 42, 531-542). En el riñón, la megalina funciona como receptor de endocitosis asociado con endocitosis y reabsorción de proteínas y similares en el túbulo proximal antes de la excreción urinaria. Las proteínas reabsorbidas y similares se degradan entonces por lisosomas (véase Mausbach A. B., Christensen E. I., 1992, Handbook of Physiology: Renal Physiology, Windhager, editor, Nueva York, Oxford University Press, 42-207).

40 3. Secuencia de nucleótidos de megalina

La megalina es una glicoproteína que es la que se expresa de manera más frecuente en la membrana epitelial del túbulo proximal de riñón de un animal mamífero. La secuencia codificante de ADNc de la misma tiene identidad de nucleótidos con la secuencia de ADNc de megalina humana que tiene el número de registro genético U04441 dado a conocer en Korenberg, J. R. *et al.* (1994) o la secuencia de ADNc de megalina humana que tiene el número de registro genético U33837 dado a conocer en Hjaeln, G., *et al.* (1996) (véase Korenberg J. R. *et al.*, 1994, Genomics 22, 88-93; y Hjaln G. *et al.*, 1996, Eur. J. Biochem. 239, 132-137).

Además, se ha descubierto megalina de rata que tiene homología con megalina humana por Saito *et al.* (1994) y la secuencia de ADNc de la misma que tiene número de registro genético L34049 ya se ha dado a conocer (véase Saito A. *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729).

50 4. Secuencia de aminoácidos y estructura proteica de megalina

La megalina es una proteína gigante de membrana celular que consiste en 4.655 aminoácidos (en el caso de la megalina humana) y en 4.660 aminoácidos (en el caso de la megalina de rata). El peso molecular deducido basándose en la secuencia de aminoácidos es aproximadamente 520 kDa y puede ser de hasta aproximadamente 600 kDa, cuando incluye una cadena de azúcar (véase Saito A. *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729). La megalina pertenece a la familia génica del receptor de LDL, teniendo una región extracelular gigante de la misma cuatro dominios funcionales y estando conectada la región extracelular a una región intracelular delgada a través de una región transmembrana individual. La megalina está principalmente presente en un hueso recubierto de clatrina en el glomérulo (rata) o la membrana luminal epitelial (membrana basal y luminal en la célula epitelial glomerular) del túbulo proximal, célula alveolar de tipo II, glándulas epididimales, glándulas tiroideas, glándulas tiroideas accesorias, membrana del saco vitelino, oído interno, intestino delgado o corioides, y se está asociada con la captación de diversos ligandos en las células y el metabolismo de las mismas (véase Farquhar M. G. *et al.*, 1995, J. Am. Soc. Nephrol. 6, 35-47; y Christensen E. I. *et al.*, 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266). Proteinuria de bajo peso molecular, trastornos del metabolismo óseo, insuficiencia respiratoria, malformación del cerebro, y otros

trastornos se producen en ratones deficientes en megalina (véase Willnow T. E. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 8460-8464). Un homólogo de megalina está también presente en nematodos (*C. elegans*) y se ha sugerido la importancia biológica de la misma (véase Yochem J. *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 4572-4576).

Norden *et al.*, 2002, describen la deficiencia en megalina urinaria en pacientes con enfermedad de Dent y síndrome de Lowe pero no síndrome de Fanconi idiopático dominante autosómico. Se analizaron muestras urinarias mediante electroforesis en gel/inmunotransferencia.

5. Importancia de megalina como causa de nefritis

La megalina, que es un antígeno etiológico principal de nefropatía membranosa experimental (nefritis de Heymann), es un receptor eliminador epitelial y se han dilucidado papeles patológicos y biológicos de la misma. Se han usado modelos animales durante mucho tiempo para dilucidar el mecanismo de desarrollo de la nefropatía membranosa humana y la nefritis de Heymann en ratas es un modelo de nefropatía membranosa. El análisis de la nefritis de Heymann ha sido más avanzado que el de cualquier otro modelo. Saito A. *et al.* dieron a conocer los resultados del análisis del epítipo patológico y el dominio de unión a ligando de la nefritis de Heymann y también han demostrado la región antigénica principal de megalina y un dominio funcional de megalina que contribuye principalmente a la unión a un ligando (véase Kerjaschki D. *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 11179-11183; Saito A., Farquhar M. G. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 8601-8605; Yamazaki H., Farquhar M. G. *et al.*, 1998, J. Am. Soc. Nephrol. 9, 1638-1644; y Orlando R. A., Farquhar M. G. *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, 2368-2373).

6. Diversos ligandos de megalina

La megalina se expresa de manera más abundante en el lado luminal de las células epiteliales del túbulo proximal *in vivo*. En el riñón humano, no se observa expresión de megalina en sitios distintos de las células epiteliales del túbulo proximal, incluyendo en los glomérulos. La megalina incorpora diversos ligandos (por ejemplo, fármacos o una proteína de bajo peso molecular) que se filtran por los glomérulos al interior de células mediante endocitosis, la megalina los transporta a lisosomas y reaparecen en la superficie celular mediante recirculación (véase Farquhar M. G. *et al.*, 1995, J. Am. Soc. Nephrol. 6, 35-47; y Christensen E. I. *et al.*, 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266). Además, la megalina está asociada con transcitosis desde el lado luminal hasta el lado de membrana basal. La megalina también está asociada con la captación y el metabolismo de proteínas de unión, tales como vitaminas A, B₁₂ y D (véase Christensen E. I. *et al.*, 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266). Christensen y Willnow demostraron que la megalina media la reabsorción de tres proteínas portadoras de vitaminas, proteínas de unión a vitamina D (DBP), proteína de unión a retinol (RBP) y transcobalamina (TC) y vitaminas asociadas con las mismas; es decir, vitamina 25D₃ (OH), vitamina A (retinol) y vitamina B₁₂ (véase Christensen E. I., Willnow T. E., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236). Saito A. *et al.* demostraron que la leptina, que se secreta a partir de adipocitos y aumenta en la sangre de pacientes obesos, se incorpora en y se metaboliza por las células epiteliales del túbulo proximal como el ligando de megalina (véase Saito A., Gejyo F. *et al.*, 2004, Endocrinology. 145, 3935-3940). Los adipocitos, es decir, grasas viscerales acumuladas, dan como resultado estados patológicos combinados, es decir, síndrome metabólico. La leptina, que es una adipocitocina secretada a partir de adipocitos, aumenta en la sangre de un paciente con síndrome metabólico. Se sugiere que el riñón es el órgano en el que es más probable que se acumule la leptina en la sangre y que la leptina desempeña un papel nefropático (véase Tarzi R. M. Lord G. M. *et al.*, 2004, Am. J. Pathol. 164, 385-390). También se encuentra un denominado receptor de leptina en una región entre el túbulo proximal y el túbulo colector ubicado posteriormente a la región de funcionamiento de la megalina.

El término "síndrome metabólico" se define como una complicación patológica de obesidad visceral, tensión arterial elevada, hiperlipidemia, tolerancia a glucosa afectada y otros síntomas, cuyo factor de riesgo principal es la resistencia a insulina. Es altamente probable que tales estados conduzcan a desarrollo de enfermedades arterioescleróticas y proteinuria, y pueden dar como resultado el desarrollo de nefropatía con hipertrofia tubular renal y del glomérulo como características histológicas. Cuando un caso de este tipo se combina con diabetes evidente, se desarrolla además la característica de hiperglucemia, se manifiesta nefropatía diabética y los estados patológicos pueden además volverse graves. La diabetes tipo II viene básicamente precedida por o se desarrolla simultáneamente con síndrome metabólico. Por consiguiente, la característica de nefropatía podría incluirse como nefropatía asociada con síndrome metabólico.

Saito A. *et al.* han realizado un experimento usando células derivadas de epitelio de saco vitelino de rata (células L2) en las que se expresa megalina en niveles altos y han encontrado que la incorporación de AGE (productos finales de glicación avanzada) marcado con ¹²⁵I (derivado de glucosa) en células L2 estaría significativamente inhibida por un anticuerpo anti-megalina. Por tanto, demostraron que la megalina está asociada con una ruta para tal incorporación (véase Saito A. Gejyo F. *et al.*, 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 1123-1131). Como mecanismo de desarrollo de nefropatía diabética, se ha señalado la asociación de productos finales de glicación avanzada (AGE) con proteínas glicadas y modificadas mediante la reacción de Maillard. Un AGE de bajo peso molecular en la sangre se filtra por los glomérulos y se reabsorbe y metaboliza por las células epiteliales del túbulo proximal. Si la nefropatía avanza adicionalmente, también se filtra un AGE de peso molecular superior por los glomérulos, se acumula en las células

epiteliales del túbulo proximal e impone cargas metabólicas excesivas. Además, Saito A. *et al.* también demuestran que la megalina también está asociada con la incorporación de AGE derivado de metilglicoxal, gliceraldehído o glicolaldehído en células, además de glucosa. Además, el síndrome metabólico a menudo se complica con hepatopatía, tal como hígado graso. Las proteínas de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP) que están presentes de manera abundante en el hígado se liberan a la sangre de una persona sana. En caso de hepatopatía, se libera más L-FABP y aumenta en la sangre. Saito A. *et al.* también han demostrado que L-FABP en la sangre se filtra rápidamente por los glomérulos y se reabsorbe por las células epiteliales del túbulo proximal a través de la megalina (véase Takeda T., Gejyo F., Saito A. *et al.*, 2005, Lab. Invest. 85, 522-531).

7. Proteína funcional que interacciona con megalina

Con el fin de dilucidar el mecanismo del transporte de megalina en las células, se buscan moléculas adaptadoras que se unen a dominios intracelulares de megalina y se han identificado diversas proteínas, tales como Dab2, ANKRA, MAGI-1, GAIP, GIPC, Galphai3, MegBP y ARH (véase Oleinikov A. V. *et al.*, 2000, Biochem. J. 347, 613-621; Rader K., Farquhar M.G. *et al.*, 2000, J. Am. Soc. Nephrol. 11, 2167-2178; Patrie K. M., Margolis B. *et al.*, 2001, J. Am. Soc. Nephrol. 12, 667-677; Lou X., Farquhar M.G. *et al.*, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13, 918-927; Petersen H.H., Willnow T. E., 2003, J. Cell. Sci. 116, 453-461; y Takeda T., Farquhar M.G. *et al.*, 2003, Mol. Biol. Cell. 14, 4984-4996). A través de tales moléculas, la megalina está asociada con endocitosis o transcitosis, y la megalina está asociada también con transmisión de señales relacionada con la misma. Además, la megalina funciona de manera conjugada con un receptor de membrana celular, es decir, cubilina, en las células epiteliales del túbulo proximal, de manera que además está implicada en la incorporación de diversos ligandos en células (véase Saito A. *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729). Por ejemplo, la cubilina es un receptor que se une directamente a transferrina, albúmina, vitamina endógena B₁₂ o similares, y la megalina está implicada indirectamente en la endocitosis de las mismas. Además, se sabe que la megalina interacciona con la isoforma 3 del intercambiador de Na⁺-H⁺ (NHE3) en las células epiteliales del túbulo proximal (véase Biemesderfer D. *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. 274, 17518-17524). NHE3 es un antiportador que desempeña un papel importante en la reabsorción de Na⁺, y NHE3 también influye en la incorporación de un ligando por megalina (véase Hryciw D. H. *et al.*, 2004, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31, 372-379). Además, la megalina puede estar implicada en la inactivación y el metabolismo de NHE3. En una fase temprana de nefropatía diabética o nefropatía relacionada con síndrome metabólico, la filtración glomerular se vuelve excesiva. Se deduce que la reabsorción potenciada de Na⁺ del túbulo proximal es una causa principal (véase Vallon V. *et al.*, 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 530-537), NHE3 desempeña un papel clave en tal caso y se considera que la inactivación y el metabolismo de NHE3 por megalina están implicados en ello (véase Hryciw D. H. *et al.*, 2004, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31, 372-379).

8. Correlación de la excreción urinaria de megalina y la excreción urinaria de ligando por megalina

Lehste *et al.* dan a conocer que ratones deficientes en megalina y pacientes con síndrome de Fanconi con funciones del túbulo proximal debilitadas experimentarían excreción incrementada de proteínas y retinol en la orina (véase Lehste J. *et al.*, 1999, Am. J. Pathol. 155, 1361-1370). Además, Moestrup S. K. *et al.* demostraron que la cantidad de megalina excretada en orina de pacientes de síndrome de Fanconi es significativamente inferior que la excretada por individuos sanos. Esto produce deterioro de las funciones de megalina y expresión en el túbulo proximal y por consiguiente aumenta la cantidad de proteínas filtradas por el glomérulo que contienen proteínas de unión a retinol excretadas en orina (véase Anthony G. W., Moestrup S.K. *et al.*, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13, 125-133).

9. Importancia de la función de megalina hallada mediante experimentos usando modelos para uremia y modelos para regeneración de órganos

Tal como se describió anteriormente, la megalina está implicada en la captación de diversas proteínas de bajo peso molecular en las células epiteliales del túbulo proximal y en el metabolismo de las mismas. Cuando el estado patológico avanza hacia insuficiencia renal, el mecanismo del metabolismo se ve alterado y se acumulan por consiguiente proteínas de bajo peso molecular en la sangre y los tejidos como proteínas urémicas. Un ejemplo representativo de las mismas es β_2 -microglobulina (β_2 -m), que puede producir amiloidosis relacionada con diálisis en un paciente sometido a diálisis a largo plazo (véase Gejyo F., Schmid K. *et al.*, 1985, Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 701-706). También se sugiere que el AGE mencionado anteriormente es una causa de arteriosclerosis o insuficiencia orgánica debido a su acumulación en la sangre de pacientes con insuficiencia renal o diálisis, y se considera AGE un tipo de proteína urémica (véase Henle T., Miyata T., 2003, Adv. Ren. Replace Ther. 10, 321-331). Además, la leptina se acumula en la sangre de un paciente de diálisis y por tanto se considera que está implicada en malnutrición o inmunidad comprometida. Tabata Y. y Gejyo F. *et al.* dan a conocer los efectos y la eficacia de modelos para metabolizar la proteína urémica usando funciones de megalina (véase Saito A., Tabata Y., Gejyo F. *et al.*, 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2025-2032 y documento WO 02/091955). Es decir, se trasplantan células que expresan megalina como proteínas de soporte *in vivo* y se incorporan proteínas de bajo peso molecular filtradas de vasos sanguíneos periféricos (vasos sanguíneos de nueva formación) en las células con la ayuda de megalina para la metabolización. Las células que expresan megalina usadas para el trasplante (es decir, células L2 derivadas del epitelio de saco vitelino) se incorporan y metabolizan β_2 -m con la ayuda de megalina (véase Saito A., Tabata Y., Gejyo F. *et al.*, 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2025-2032). Se extirparon ambos riñones de un ratón

atímico en el que se habían trasplantado células L2 de manera subcutánea, se indujo el estado de insuficiencia renal y se midió la incorporación de células en la masa tisular en la que se había trasplantado β_2 -m marcada con ^{125}I y en los órganos mediante inyección intraperitoneal. Como resultado, se encontró que la masa celular en la que se habían trasplantado células L2 incorporaba de manera más significativa β_2 -m marcada con ^{125}I en comparación con otros órganos, y se encontró que el aclaramiento de β_2 -m marcada con ^{125}I avanzaba significativamente en un grupo al que se habían trasplantado células L2, en comparación con un grupo control en el que no se habían trasplantado células L2 (véase Saito A., Tabata Y., Gejyo F. *et al.*, 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2025-2032).

10. Proteólisis y excreción urinaria de megalina

En los últimos años, se ha sugerido la posibilidad de que la megalina se someta a proteólisis en una ruta de señalización de tipo Notch (véase Zou Z., Biemesderfer D. *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279, 34302-34310; y Grigorenko A. P. *et al.*, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 14955-14960). Esto también incluye un sistema de escisión de dos etapas de pérdida de un ectodominio mediada por metaloproteasa y proteólisis intramembrana mediada por gamma-secretasa.

También, se sabe que la megalina se expresa en la célula alveolar de tipo II.

Por tanto, se ha estudiado ampliamente la megalina con respecto a su correlación con el metabolismo en órganos tales como el riñón. Sin embargo, la correlación entre enfermedades de órganos, incluyendo el riñón y megalina aún no se ha dilucidado y aún no se ha estudiado la expresión de megalina o la excreción de la misma al fluido corporal en relación con una variedad de enfermedades de órganos.

Hasta la fecha, se ha conocido un método que implica tinción tisular o inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo policlonal obtenido mediante inmunización de un animal inmune, tal como un conejo, como método para detectar megalina.

Esta técnica, sin embargo, implica tinción de una célula o una proteína separada a través de electroforesis y esto necesita procedimientos muy complicados y un largo periodo de tiempo para inmovilizar tejidos, preparar cortes de tejido, electroforesis y transferencia sobre la membrana. Por tanto, la megalina es difícil de cuantificar.

Desde el punto de vista del diagnóstico de los grados de trastornos funcionales de tejidos u órganos, particularmente en el caso de trastornos de riñón, no hay medios eficaces para diagnosticar la insuficiencia del túbulo renal de una manera sencilla y específica. Actualmente, se han empleado muchos métodos de diagnóstico que detectan albúmina, creatinina, β_2 -microglobulina, L-FABP o similares en orina o sangre como marcador de diagnóstico para enfermedades renales. Tales marcadores de diagnóstico, sin embargo, no se derivan de tejido renal y simplemente resultan de todos los fenómenos y funciones durante la filtración en los glomérulos renales y la reabsorción en los túbulos renales. Es decir, es difícil identificar insuficiencia del glomérulo e insuficiencia del túbulo renal, insuficiencia en el riñón incluso con el uso de tal marcador. Además, un marcador de este tipo es un marcador indirecto derivado de órganos distintos del riñón. Por tanto, la eficacia es escasa para el diagnóstico temprano de una enfermedad. Esto mismo se aplica a KL-6 (marcadores de inflamación aguda) que es un marcador de diagnóstico existente para enfermedades pulmonares y particularmente para inflamación.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar nefropatía midiendo megalina humana que puede realizarse de una manera más sencilla y en un periodo de tiempo más corto de lo que es posible con técnicas convencionales y que también puede cuantificar la megalina humana. Este método permite el diagnóstico de nefropatía. En particular, la presente invención proporciona un método de medición de los niveles de megalina en orina para detectar nefropatía.

Tal como se describió anteriormente, se han elaborado muchos informes en referencia a megalina humana y se ha sugerido la correlación de la misma con el metabolismo de órganos tales como el riñón o el pulmón. Sin embargo, cuando están afectadas las funciones orgánicas, se desconoce la forma en que varía la expresión de megalina y la forma en que cambia la prevalencia de megalina.

Los presentes inventores han realizado estudios intensos y continuados en cuanto a un método para medir megalina humana con alta sensibilidad de manera rápida. Por consiguiente, descubrieron un método para medir de manera precisa megalina en una muestra de fluido corporal, tal como orina, usando un ligando que puede unirse a megalina humana, y en particular, un anticuerpo anti-megalina humana.

Además, los presentes inventores midieron megalina humana en el fluido corporal de un paciente con funciones orgánicas afectadas y descubrieron que la megalina humana podría ser un marcador para detectar y diagnosticar nefropatía. Esto ha conducido a la conclusión de la presente invención.

Específicamente, la presente invención es tal como se describe en las reivindicaciones.

Efectos de la invención

El método de la presente invención permite la medición de megalina humana en una muestra, tal como orina, con alta sensibilidad y precisión. Cuando las funciones de células, tejidos u órganos que expresan megalina están dañadas, la megalina escapa de las células y se acumula en una muestra. Específicamente, la medición de megalina humana en una muestra permite la detección y el diagnóstico directos de nefropatía en lugar de la detección y el diagnóstico indirectos. Por consiguiente, la medición de megalina humana en una muestra mediante el método de la presente invención permite la detección de nefropatía en una fase temprana con alta precisión.

Esta descripción incluye parte o todo el contenido tal como se da a conocer en la descripción y/o los dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2006-089306, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un locus génico y una estructura proteica general de megalina humana.

La figura 2 muestra una curva de calibración de ELISA para detectar megalina humana con el uso de megalina humana patrón.

La figura 3 muestra los resultados clínicos de megalina humana en orina (parte 1).

La figura 4 muestra los resultados clínicos de megalina humana en orina (parte 2).

Mejores modos para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un método para medir megalina humana en una muestra. La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos de megalina humana y la SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de megalina humana.

En la presente invención, la megalina humana se mide usando un primer ligando que puede unirse a megalina humana que se une a un soporte sólido. Puede usarse cualquier soporte sólido usado en inmunoanálisis convencional. Por ejemplo, pueden usarse preferiblemente pocillos de una placa de microtitulación de plástico o partículas magnéticas.

Un ejemplo de un ligando que puede unirse a megalina humana es un anticuerpo anti-megalina humana y puede usarse un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Además, puede usarse lectina que es específica para una cadena de azúcar de la megalina humana como ligando que puede unirse a megalina humana. Los ejemplos de lectina incluyen, pero no se limitan a, concanavalina A, lectina de germen de trigo (WGA), lectina de *Ricinus communis* (RCA) y lectina de lenteja (LCA).

Además, los ejemplos de un ligando que puede unirse a megalina humana incluyen sustancias seleccionadas del grupo que consiste en: proteínas de unión a vitaminas, tales como transcobalamina-vitamina B₁₂, proteína de unión a vitamina D o proteína de unión a retinol; lipoproteínas, tales como apolipoproteína B, apolipoproteína E, apolipoproteína J/clusterina o apolipoproteína H; hormonas, tales como hormona paratiroidea (PTH), insulina, factor de crecimiento epitelial (EGF), prolactina, leptina o tiroglobulina, un receptor de cualquiera de las mismas o un receptor de tales hormonas; proteínas asociadas a respuesta al estrés o inmunitaria, tales como cadena ligera de inmunoglobulina, PAP-1, o β_2 -microglobulina; enzimas, tales como PAI-I, PAI-I-urocinasa, PAI-I-tPA, prourocinasa, lipoproteína lipasa, plasminógeno, α -amilasa, β -amilasa, α_1 -microglobulina o lisozima, un inhibidor de cualquiera de las mismas o un inhibidor de tales enzimas; fármacos o toxinas, tales como aminoglucósido, polimixina B, aprotinina o tricosantina; proteínas portadoras, tales como albúmina, lactoferrina, hemoglobina, proteína de unión a moléculas odorantes, transtiretina o L-FABP; y proteínas asociadas a receptores (RAP), tales como citocromo-c, calcio (Ca²⁺), productos finales de glicación avanzada (AGE), cubilina o isoforma 3 del intercambiador de Na⁺-H⁺ (NHE3) o fragmentos de unión de tales sustancias. El término "fragmento de unión" usado en el presente documento se refiere a un fragmento de la sustancia mencionada anteriormente que incluye un sitio que se une a megalina humana.

Un ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana, puede unirse a un soporte sólido mediante una técnica bien conocida en la técnica. Cuando un ligando va a unirse a pocillos de placa de microtitulación, por ejemplo, se aplican aproximadamente de 3 a 10 μ g/ml (de manera preferible aproximadamente 5 μ g/ml) de una disolución de un ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo, a un soporte sólido y entonces se permite que el producto resultante repose a 4°C durante la noche (preferiblemente 12 horas o más). La densidad recomendada de un soporte sólido mencionado anteriormente se determinó teóricamente cuando se inmovilizó un anticuerpo de longitud completa.

La densidad se determina mediante las fórmulas teóricas:

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

- 5 Q: densidad de peso molecular (ng/cm²)
 MW: peso molecular (dalton: Da)
 N: número de Avogadro = 6·10²³ (mol⁻¹)
- 10 r: radio de Stokes de molecular = (R·T₂₀) / (6·π·η₂₀·D₂₀·N) (cm)
 R: constante de gas = 8,3·10⁷ (g·cm²·s⁻²·°K⁻¹·mol⁻¹)
 T₂₀: temperatura ambiente (20°C) = 293°K
- 15 η₂₀: viscosidad de agua a 20°C = 1·10⁻² (g·cm⁻¹·s⁻¹)
 D₂₀: coef. de dif. de ref. molecular con respecto al agua a 20°C (cm²·s⁻¹)
- 20 Tal valor se aplica cuando la inmovilización es a través de adsorción física. Cuando se inmoviliza un ligando que puede unirse a megalina humana, se determina la densidad teórica del soporte sólido relevante y tal densidad está afectada por los factores de variación mencionados anteriormente, tales como el peso molecular individual. Por tanto, la densidad varía dependiendo del tipo de molécula del soporte sólido individual, de la configuración de la fase sólida o de otras condiciones. Por consiguiente, la densidad no se limita a los valores mencionados anteriormente.
- 25 Cuando se absorbe sobre un soporte sólido mediante unión covalente, además, tal densidad se utiliza en la presente invención. En tal caso, también se tiene en cuenta el número de grupos funcionales que están presentes sobre la superficie de adsorción y que se usan para la unión covalente. La densidad de un soporte sólido no está limitada. Tras la unión, se lleva a cabo el bloqueo usando albúmina sérica bovina (abreviada a continuación en el presente documento como "BSA") o caseína, para el fin de bloquear sitios de adsorción no específicos de una proteína, basándose en una técnica convencional. Cuando un soporte sólido es una perla magnética, el soporte sólido se trata de la misma manera que en el caso de una placa de microtitulación.
- 30 Se permite que un ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido reaccione con una muestra y la megalina humana en una muestra se une a un soporte sólido con la ayuda del ligando que puede unirse a megalina humana unido al soporte sólido mediante una reacción de unión ligando-receptor, tal como una reacción antígeno-anticuerpo. Específicamente, se forma un complejo de un primer ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido y megalina humana. Puede usarse cualquier muestra, siempre que contenga megalina humana. Los ejemplos de muestra incluyen orina, un lavado alveolar, sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo y un condensado de aire exhalado. Una reacción antígeno-anticuerpo de este tipo puede llevarse a cabo a de 4°C a 45°C, más preferiblemente de 20°C a 40°C, y preferiblemente de manera adicional de 25°C a 38°C. La duración de la reacción es de aproximadamente 10 minutos a 18 horas, más preferiblemente de 10 minutos a 1 hora y preferiblemente de manera adicional de 30 minutos a 1 hora.
- 35
- 40
- 45 Tras el lavado, se permite entonces que el segundo ligando que puede unirse a megalina humana reaccione con la megalina humana en una muestra unida a un soporte sólido. Específicamente, se forma un complejo de un primer ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido, megalina humana y un segundo ligando que puede unirse a megalina humana. Como segundo ligando que puede unirse a megalina humana, puede usarse la misma sustancia usada como primer ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana. Sin embargo, cuando tanto el primer ligando que puede unirse a megalina humana como el segundo ligando que puede unirse a megalina humana son anticuerpos monoclonales anti-megalina humana, es necesario que un epítipo reconocido por y al que se une el primer anticuerpo anti-megalina humana sea diferente de un epítipo reconocido por y al que se une el segundo anti-megalina humana. Una combinación del primer anticuerpo anti-megalina humana y el segundo anticuerpo anti-megalina humana puede ser cualquier combinación de un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal, un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal, y un anticuerpo policlonal y un anticuerpo policlonal. La reacción puede llevarse a cabo a de 4°C a 45°C, más preferiblemente de 20°C a 40°C y preferiblemente de manera adicional de 25°C a 38°C. La duración de la reacción es de aproximadamente 10 minutos a 18 horas, más preferiblemente de 10 minutos a 1 hora y preferiblemente de manera adicional de 30 minutos a 1 hora. Por tanto, el segundo ligando que puede unirse a megalina humana se une a un soporte sólido con la ayuda de megalina humana y el primer ligando que puede unirse a megalina humana.
- 50
- 55
- 60
- Tras el lavado, se mide entonces el segundo ligando que puede unirse a megalina humana, tal como el segundo anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido. Esto puede llevarse a cabo mediante una variedad de

técnicas que se emplean comúnmente en el campo del inmunoanálisis. Por ejemplo, el segundo ligando que puede unirse a megalina humana se marca con una enzima, fluorescencia, biotina o marcador de radiación para preparar una sustancia marcada con enzima. Al someter a ensayo un marcador de este tipo, puede medirse el segundo ligando que puede unirse a megalina humana unida a un soporte sólido. El marcaje con una enzima o fluorescencia es particularmente preferible. Los ejemplos de enzima incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y glucosa oxidasa, y un ejemplo de fluorescencia es isotiocianato de fluoresceína (FITC), aunque los marcadores no se limitan a los mismos. Un marcador puede detectarse permitiendo que un sustrato relevante reaccione con una sustancia marcada con enzima, y luego midiendo el colorante, fluorescencia, emisión resultantes, o similares. Cuando el segundo ligando que puede unirse a megalina humana no está marcado, se permite que un tercer anticuerpo marcado reaccione con el segundo ligando que puede unirse a megalina humana, y el tercer anticuerpo puede medirse basándose en tal marcaje. Por tanto, puede medirse el segundo ligando que puede unirse a megalina humana.

Un soporte sólido o un anticuerpo anti-megalina humana usado para marcaje puede ser un fragmento de inmunoglobulina, tal como Fab o $F(ab')_2$, específico para megalina humana o un anticuerpo recombinante, tal como scFv, dsFv, díacuerpo o minicuerpo, expresado como recombinante. En la presente invención, el término "anticuerpo" también se refiere a un fragmento específico para megalina humana. Un método para preparar un fragmento de este tipo se conoce bien en la técnica.

El método mencionado anteriormente comprende las dos etapas de la reacción entre un primer ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido y una muestra, seguido por lavado, y la reacción de un segundo ligando que puede unirse a megalina humana con una muestra. Alternativamente, un método que comprende una única etapa en el que la reacción entre un primer ligando que puede unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido y una muestra se lleva a cabo simultáneamente con la reacción entre un segundo ligando que puede unirse a megalina humana y una muestra.

La presente invención comprende además un método para medir megalina humana en una muestra usando megalina humana o un fragmento parcial de megalina humana que se une a un soporte sólido y un ligando que puede unirse a megalina humana, comprendiendo el método permitir que una muestra reaccione con un ligando que puede unirse a megalina humana, permitir que el producto de reacción reaccione con la megalina humana que se une a un soporte sólido, medir el ligando que puede unirse a megalina humana que se une a un soporte sólido y cuantificar competitivamente la megalina humana en una muestra basándose en una disminución en un porcentaje del ligando que puede unirse a megalina humana que se une a un soporte sólido. Este método requiere la unión de megalina humana a un soporte sólido, y tal unión puede llevarse a cabo según el método para unir una sustancia a un soporte sólido. Además, un fragmento parcial de megalina humana no está limitado y puede usarse un fragmento parcial de megalina humana al que se une un ligando que puede unirse a megalina humana. Como fragmento parcial de megalina humana, puede prepararse una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos de megalina humana tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 mediante síntesis química o ingeniería genética. Puede usarse el ligando mencionado anteriormente que puede unirse a megalina humana y es particularmente preferible un anticuerpo anti-megalina humana. En un método competitivo, es importante la cantidad de megalina humana o un fragmento parcial de megalina humana que se une a un soporte sólido y un ligando que puede unirse a megalina humana que va a usarse. Un método competitivo es una técnica conocida y tal cantidad puede determinarse de manera adecuada basándose en una técnica conocida.

Además, la presente invención comprende un método para medir megalina humana usando un ligando que puede unirse a megalina humana, comprendiendo el método permitir que una muestra reaccione con un ligando que puede unirse a megalina humana que se une a una partícula para inducir aglutinación y medir la megalina humana basándose en el grado de aglutinación resultante.

Los ejemplos de partículas que se usan en un método de este tipo incluyen partículas que tienen diámetros de 0,05 a 10 μm , preferiblemente partículas de látex que tienen diámetros de 0,1 a 0,4 μm , partículas de gelatina que tienen diámetros de 0,5 a 10 μm y eritrocitos animales. Un anticuerpo puede unirse a una partícula mediante un método bien conocido en la técnica, tal como adsorción física o unión covalente.

En este método, se mezclan partículas que comprenden anticuerpos anti-megalina humana unidos a las mismas con una muestra sobre, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio negro, y se observan las partículas precipitadas como resultado de la aglutinación. Por tanto, puede detectarse la megalina humana en una muestra. También, puede medirse la absorción del aglutinado para cuantificar la megalina humana. Además, también puede detectarse la megalina humana mediante inmunoensayo por pulsos.

El método para medir megalina humana de la presente invención permite la medición no sólo de la megalina humana intacta sino también de fragmentos de megalina humana.

Mediante la medición de la megalina humana en una muestra, puede evaluarse, detectarse o diagnosticarse si un sujeto del que se ha obtenido una muestra tiene o no nefropatía.

En enfermedades renales, puede detectarse particularmente nefritis o trastorno tubular renal. Además, puede detectarse adecuadamente nefropatía diabética. Además, tales células, tejidos u órganos pueden usarse también para detectar síndrome metabólico o nefropatía asociada a síndrome metabólico.

5 En el sujeto mencionado anteriormente que tiene trastornos funcionales de células, tejidos u órganos, la megalina humana escapa de las células y aumenta la cantidad de megalina humana en una muestra. Cuando la megalina humana en una muestra obtenida del sujeto se mide *in vitro* y la concentración de megalina humana en una muestra está significativamente potenciada en comparación con la concentración de megalina humana obtenida de un individuo sano, puede diagnosticarse que el sujeto tiene una nefropatía.

Tal como se describió anteriormente, puede usarse orina como muestra.

15 Además, la medición de megalina humana en una muestra obtenida de un sujeto permite la evaluación del riesgo de estar aquejado de nefropatía. Cuando la megalina humana en una muestra obtenida del sujeto se mide *in vitro* y la concentración de megalina humana en una muestra está significativamente potenciada en comparación con la concentración de megalina humana obtenida de un individuo sano, puede evaluarse que el sujeto tiene probabilidad elevada de estar aquejado de nefropatía. Es decir, la medición de megalina humana en una muestra permite examinar sujetos que tienen probabilidad elevada de estar aquejados de nefropatía tal como futuros pacientes con nefropatía y proporcionar el tratamiento adecuado.

Además, la medición periódica de megalina humana en una muestra obtenida del sujeto y la monitorización de la concentración de megalina humana permiten la gestión de las funciones orgánicas.

25 Además, cuando se detecta o diagnostica, pueden medirse fragmentos de megalina humana, así como megalina humana intacta.

Ejemplos

30 A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en mayor detalle con referencia a los ejemplos, aunque la presente invención no se limita a esos ejemplos. Debe observarse que el método de ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) usado en los ejemplos se ha notificado hasta ahora por muchos investigadores, desde que Engvall E. y Perlmann P. presentaron el primer informe en 1971. Hay bases sólidas para usar esta técnica (Engvall E, Perlmann P., 1971, *Immunochemistry*, 8, 871-874).

35 A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en mayor detalle con referencia a los ejemplos, aunque la presente invención no se limita a esos ejemplos.

Detección de megalina humana en orina mediante ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA)

40 (1) Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-megalina humana

Se inmunizó un ratón por vía intraperitoneal con 50 µg de megalina humana con un adyuvante varias veces y se confirmó el elevado título en sangre sérica. Se extrajo el bazo 3 días después de una dosis de refuerzo (inmunización intravenosa) y se obtuvieron células del bazo. Se fusionaron las células del bazo con células de mieloma de ratón (10:1) en presencia de polietilenglicol 3500 para preparar células de hibridoma. Las células resultantes se cultivaron durante una semana en presencia de CO₂ a 37°C y se inspeccionó la presencia o ausencia de un anticuerpo anti-megalina humana en el sobrenadante de cultivo. Se diluyeron las células en los pocillos positivos en los que se observó producción de anticuerpos mediante dilución limitativa, se cultivaron los productos resultantes durante 2 semanas y se inspeccionó la presencia o ausencia de un anticuerpo anti-megalina humana en el sobrenadante de cultivo de la misma manera. Después, se diluyeron las células en los pocillos positivos en los que se observó producción de anticuerpos mediante dilución limitante, y se cultivaron los productos resultantes de la misma manera. En esta fase, se cultivaron las células en las que se habían producido anticuerpos anti-megalina humana en un matraz, se suspendió parte de las mismas en suero de ternero fetal (FCS) que contenía dimetilsulfóxido al 10% (DMSO) (5x10⁶ células/ml) y se almacenó el producto resultante en nitrógeno líquido.

Posteriormente, se usaron los sobrenadantes en los pocillos para inspeccionar la reactividad de los anticuerpos frente a megalina humana producidos en los sobrenadantes en cultivo. Se disolvió la megalina humana en NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1,8 mM (pH 7,3; abreviado a continuación en el presente documento como "PBS, pH 7,3"). A los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (Nunc-Immuno™ Module F8 Maxisorp™ Surface plate, Nalge Nunc International), se añadieron 100 µl de la disolución de megalina humana en PBS (pH 7,3) por pocillo y entonces se inmovilizó la megalina humana en la placa de microtitulación a 3 pmol/pocillo a 4°C durante 12 horas. Después, se eliminó a través de decantación la disolución de megalina humana en PBS (pH 7,3) que se había añadido a los pocillos, se aplicaron a los pocillos NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 3,6 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM y Tween 20 al 0,05% (v/v) (abreviado a continuación en el presente documento como "PBS-T") a los pocillos de la placa de microtitulación a 200 µl/pocillo, se eliminó a través de decantación el PBS-T y

se lavó la megalina humana adsorbida en exceso en los pocillos. Este proceso de lavado se llevó a cabo dos veces en total. A continuación, se aplicaron NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 7,2 mM, KH₂PO₄ 2,8 mM, BSA al 1% (p/v) y lactosa al 5% (p/v) (abreviado a continuación en el presente documento como una “disolución de bloqueo para una placa con antígeno inmovilizado”) a 200 µl/pocillo y se bloqueó la parte interior de los pocillos de la placa de microtitulación en la que se había inmovilizado la megalina humana a 4°C durante 12 horas. A continuación, se almacenó el producto resultante a 4°C. Para inspeccionar la reactividad de los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo, se usó la placa de microtitulación en la que se había inmovilizado la megalina humana tras el tratamiento de bloqueo. A los pocillos de la placa de microtitulación en la que se había inmovilizado la megalina humana, se añadió un sobrenadante de cultivo de hibridoma a 100 µl/pocillo y se calentó la placa a 37°C durante 1 hora. A continuación, se retiró a través de decantación el sobrenadante de cultivo que se había aplicado a los pocillos, se aplicó PBS-T a los pocillos de la placa de microtitulación a 200 µl/pocillo, se eliminó a través de decantación el PBS-T y se lavó entonces la parte interior de los pocillos. Este proceso de lavado se llevó a cabo tres veces en total. A continuación, se aplicaron inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con peroxidasa (DAKO) a los pocillos a 100 µl/pocillo (diluidas 2.000 veces, 0,55 µg/ml) y se calentó el producto resultante a 37°C durante 1 hora. Se diluyó el anticuerpo marcado con enzima usando NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 3,6 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, Tween 20 al 0,05% (v/v) y BSA al 0,5% (p/v) (denominado a continuación en el presente documento “diluyente de anticuerpo marcado con enzima”). A continuación, se eliminaron a través de decantación los anticuerpos marcados con enzima que se habían aplicado a los pocillos, se aplicó PBS-T a los pocillos de la placa de microtitulación a 200 µl/pocillo, se eliminó a través de decantación el PBS-T y se lavó entonces la parte interior de los pocillos. Este proceso de lavado se llevó a cabo tres veces en total. A continuación, se aplicó a los pocillos una disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (abreviada a continuación en el presente documento como “TMB”) (sistema de sustrato de una etapa TMB: DAKO) a 100 µl/pocillo como una disolución de sustrato para la reacción de la enzima peroxidasa y se dejó reposar el producto resultante a 25°C durante 30 minutos. Inmediatamente a continuación, se aplicó una disolución de H₂SO₄ 313 mM (denominada a continuación en el presente documento “terminador de reacción”) a 100 µl/pocillo a la disolución de sustrato para su reacción en los pocillos para terminar la reacción enzimática en los pocillos. A continuación, se midió la absorción de los pocillos y se designó el valor obtenido restando la absorción a 630 nm de la obtenida a 450 nm como un indicador para la evaluación de reactividad (Josephy P.D., Mason R.P. *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257, 3669-3675). Hasta ahora se han elaborado muchos informes en cuanto a colorimetría basada en TMB desde que Bos E. S. *et al* elaboraron el primer informe en 1981 y hay bases sólidas para usar esta técnica (Bos E. S. *et al.*, 1981, J. Immunoassay, 2, 187-204).

Como resultado, se seleccionaron células de hibridoma monoclonadas que mostraban fuerte reactividad de un anticuerpo anti-megalina humana con megalina humana inmovilizada y se examinó la clase y la subclase de inmunoglobulina en el sobrenadante de cultivo en cuanto a cada clon a partir de 100 µl de la disolución de sobrenadante de cultivo madre usando el kit de tipificación de inmunoglobulina de ratón (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Basándose en los resultados, se seleccionaron clones de la clase de IgG de la biblioteca de células monoclonales resultante y luego se llevó a cabo el proceso de preparación de líquido de ascitis tal como se describe a continuación.

Posteriormente, se cultivaron estas células en un matraz de 25 ml y luego en un matraz de 75 ml. Se inyectaron las células por vía intraperitoneal en un ratón tratado con pristano y se tomaron muestras de líquido de ascitis.

(2) Purificación de anticuerpo monoclonal (IgG) de ratón anti-megalina humana

Se mezcló el líquido de ascitis obtenido (10 ml) con un agente de tratamiento de suero sanguíneo opacificado (FRIGEN (marca comercial registrada) II: Kyowa Pure Chemical Co., Ltd.) a una razón de 1:1,5 en volumen y se removió y se agitó el producto resultante durante de 1 a 2 minutos para deslipidar el líquido de ascitis. Se centrifugó el líquido de ascitis usando una centrífuga a 3.000 rpm (1930x g) durante 10 minutos y se fraccionó el sobrenadante centrifugado del líquido de ascitis aclarado (10 ml). Se sometió el sobrenadante centrifugado del líquido de ascitis (10 ml) a fraccionamiento con sulfato de amonio (concentración final: sulfato de amonio saturado al 50%) en un baño de hielo durante 1 hora y se suspendió la fracción de inmunoglobulina precipitada y se disolvió en PBS. Este proceso de fraccionamiento con sulfato de amonio se llevó a cabo dos veces en total para obtener una fracción de inmunoglobulina en bruto a partir del líquido de ascitis. Se mezcló la fracción de inmunoglobulina en bruto resultante (10 ml) con una cantidad equivalente de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0; denominado a continuación en el presente documento “NaPB 20 mM (pH 7,0)”) y luego se sometió a purificación por afinidad usando una columna de proteína G (HiTrap Protein G HP, 5 ml; Amersham BioSciences). Se adsorbió la muestra sobre una columna de proteína G, se purgó NaPB 20 mM (pH 7,0, 50 ml) a través de la columna de proteína G y se eliminaron por lavado los contaminantes distintos a la IgG en la muestra. A continuación, se eluyó la IgG adsorbida por afinidad en la columna de proteína G con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7) y se neutralizó la fracción de elución inmediatamente tras la elución de las columnas con tris(hidroximetil)aminometano-HCl 1 M (pH 9,0) y luego se recuperó (a continuación en el presente documento el “tris(hidroximetil)aminometano”) se abrevia como “Tris”). Tras la neutralización, se dializó el producto purificado por afinidad frente a PBS en una cantidad 500 veces mayor que el producto purificado en volumen a 4°C durante 6 horas y este proceso de diálisis se llevó a cabo dos veces en total. La membrana de diálisis usada para la diálisis fue un tubo de celulosa para diálisis (Viskase Companies). La fracción de elución de IgG resultante se designó anticuerpo monoclonal anti-megalina humana purificado y se sometió a almacenamiento a 4°C y a los

procedimientos descritos a continuación. El proceso de purificación se llevó a cabo conectando la columna de proteína G mencionada anteriormente al sistema BioLogic LP (Bio Rad Laboratories) a una velocidad de flujo constante de 1 ml/min.

5 (3) Preparación de placa de microtitulación en la que se ha inmovilizado anticuerpo monoclonal anti-megalina humana

Se disolvió el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana purificado en PBS (pH 7,3) para dar como resultado una concentración final de 5 µg/ml en el mismo. A los pocillos de una placa de microtitulación de plástico (Nunc-Immuno™ Module F8 Maxisorp™ Surface plate, Nalge Nunc International), se añadieron 100 µl de la disolución del anticuerpo monoclonal anti-megalina humana en PBS (pH 7,3) por pocillo y se inmovilizó el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana en la placa de microtitulación a 4°C durante 12 horas. A continuación, se eliminó a través de decantación la disolución del anticuerpo monoclonal anti-megalina humana en PBS (pH 7,3) que se había añadido a los pocillos, se añadió PBS-T a los pocillos de la placa de microtitulación a 200 µl/pocillo, se eliminó a través de decantación el PBS-T y se lavó el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana adsorbido en exceso en los pocillos. Este proceso de lavado se llevó a cabo dos veces en total. A continuación, se añadieron NaCl 86 mM, Tris 100 mM, BSA al 0,5% (p/v) y Tween 20 al 0,05% (v/v) (denominado a continuación en el presente documento disolución de bloqueo para una placa con antígeno inmovilizado) a 200 µl/pocillo y se sometió la parte interior de los pocillos de la placa de microtitulación inmovilizada con megalina humana a bloqueo a 4°C durante 12 horas. A continuación, se almacenó el producto resultante a 4°C.

(4) Preparación de anticuerpo monoclonal anti-megalina humana marcado con peroxidasa

Se disolvió peroxidasa del rábano (abreviada a continuación en el presente documento como "HRP") (peroxidasa del rábano, tipo VI, Sigma) en agua pura a una concentración de 4 mg/ml, se añadieron 100 µl de una disolución de metaperyodato de sodio 100 mM a 500 µl de la disolución de HRP (2 mg) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se dializó el producto resultante frente a una disolución de acetato de sodio 1 mM (pH 4,0) (denominada a continuación en el presente documento "tampón acetato 1 mM") en una cantidad 500 veces mayor que la de la disolución de HRP en volumen a 4°C durante 6 horas y este procedimiento se llevó a cabo dos veces. La membrana de diálisis usada para la diálisis fue un tubo de celulosa para diálisis (Viskase Companies). Posteriormente, se disolvió el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana en una disolución de Na₂CO₃ 2,4 mM y NaHCO₃ 7,6 mM (pH 9,6) (denominada a continuación en el presente documento "tampón carbonato 10 mM") a una concentración de 8 mg/ml. Se añadió una disolución de Na₂CO₃ 120 mM y NaHCO₃ 380 mM (pH 9,6) (denominada a continuación en el presente documento "tampón carbonato 0,5 M") a 500 µl de la disolución de HRP (2 mg) en una cantidad de un tercio de la misma en volumen, se añadieron a la misma 500 µl del anticuerpo monoclonal anti-megalina humana mencionado anteriormente (4 mg) y se agitó el producto resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se añadieron 50 µl de una disolución de borohidruro de sodio (4 mg/ml) y se agitó el producto resultante en un baño de hielo durante 2 horas. Se sometió el producto resultante a fraccionamiento con sulfato de amonio (concentración final: sulfato de amonio saturado al 50%) en un baño de hielo durante 1 hora, y se suspendió la fracción precipitada y se disolvió en 1 ml de una disolución de Tris 100 mM, NaCl 145 mM y BSA al 1% (v/v) (pH 7,6) (denominada a continuación en el presente documento "suspensión de anticuerpo marcado"). Este fraccionamiento con sulfato de amonio se llevó a cabo dos veces en total y se añadió una disolución de KH₂PO₄ 2,8 mM, Na₂HPO₄ 7,2 mM, NaCl 145 mM, BSA al 1% (p/v), fenol al 0,02% (v/v) y D-sorbitol al 40% (p/v) (denominada a continuación en el presente documento disolución madre de anticuerpo marcado) a la disolución del anticuerpo marcado en una cantidad de tres cuartos de la disolución del anticuerpo marcado (denominada a continuación en el presente documento disolución madre de anticuerpo marcado). Se obtuvo el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana marcado con HRP. Hasta ahora se han elaborado muchos informes en cuanto al método de marcaje con HRP, desde que Nakane, P. K. y Kawaoi, A. elaboraron el primer informe en 1974. Por tanto, hay bases sólidas para usar esta técnica (Nakane, P. K., Kawaoi, A., 1974, J. Histochem. Cytochem. 22, 1084).

50 (5) Medición de megalina humana en orina

Se usaron la placa de microtitulación con anticuerpo monoclonal anti-megalina humana inmovilizado y el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana marcado con HRP mencionados anteriormente para medir megalina humana en orina. Al comienzo, se mezclaron 90 µl de filtrado glomerular con 10 µl de una disolución de Tris 2 M y ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético 0,2 M (a continuación en el presente documento el "ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético" se abrevia como EDTA, pH 8,0) y se aplicaron 100 µl de la disolución resultante a los pocillos de la placa de microtitulación en la que se ha inmovilizado el anticuerpo monoclonal anti-megalina humana. Se dejó reposar el producto resultante a 37°C durante 1 hora, se eliminó a través de decantación la disolución de muestra de orina que se había aplicado a los pocillos, se aplicó PBS-T a los pocillos de la placa de microtitulación a 200 µl/pocillo y se eliminó el PBS-T a través de decantación, seguido por lavado. El proceso de lavado se llevó a cabo tres veces. A continuación, se añadió la disolución de anticuerpo monoclonal anti-megalina humana marcado con HRP (la disolución madre anterior se diluyó hasta 10.000 veces con la disolución del anticuerpo marcado diluido) a 100 µl/pocillo. Se dejó reposar el producto resultante a 37°C durante 1 hora, se eliminó a través de decantación la disolución de anticuerpo marcado con HRP que se había aplicado a los pocillos, se añadió PBS-T a

los pocillos de la placa de microtitulación a 200 µl/pocillo y se eliminó el PBS-T a través de decantación, seguido por lavado. El proceso de lavado se llevó a cabo tres veces. Posteriormente, se aplicó una disolución de TMB (sistema de sustrato de una etapa TMB: DAKO) a los pocillos como una disolución de sustrato para la reacción de enzima peroxidasa a 100 µl/pocillo y se dejó reposar el producto resultante a 25°C durante 30 minutos. Inmediatamente a continuación, se añadió el terminador de reacción a la disolución de sustrato en los pocillos a 100 µl/pocillo para terminar la reacción enzimática en los pocillos. A continuación, se midió la absorbancia de los pocillos y se designó el valor obtenido restando la absorbancia a 630 nm de la obtenida a 450 nm como un indicador para la evaluación de medición de megalina humana en la orina. Como muestra de referencia para la curva de calibración, se usó megalina humana que se usó como antígeno inmunológico en el momento de la preparación de un anticuerpo monoclonal anti-megalina humana y los resultados del análisis se muestran en la tabla 1 y en la figura 2. Los resultados de la medición clínica real de megalina humana en la orina se muestran en la tabla 2, figura 3 y figura 4. Como resultado, se encontró que la cantidad de megalina humana excretada a la orina era significativamente mayor en pacientes con enfermedades renales y en futuros pacientes de enfermedades renales, en comparación con los individuos sanos (figuras 3 y 4). Los resultados de las pruebas de aclaramiento de creatinina en cuanto a la cantidad de megalina excretada a la orina también fueron similares. Esto indica que la concentración en el momento de la excreción urinaria no importaría (figuras 3 y 4). La presente invención proporciona un método para medir megalina humana que puede realizarse de una manera más sencilla dentro de un periodo de tiempo más corto de lo que es posible con técnicas convencionales y que también puede cuantificar megalina humana. Además, este método permite el diagnóstico de enfermedades funcionales que son específicas para células, tejidos u órganos, de una manera dirigida al sitio en una fase temprana. Los resultados clínicos mostrados anteriormente apoyan aparentemente tal característica de la presente invención.

Tabla 1

[megalina h] (nM)	Curva de calibración de ELISA para detectar megalina humana				
	n = 1	n = 2	n = 3	Promedio	D.E.
6,250	2,4356	2,4416	2,3576	2,4116	0,0469
3,125	1,2551	1,2596	1,2261	1,2469	0,0182
1,563	0,6288	0,6576	0,6358	0,6407	0,0150
0,781	0,3282	0,3296	0,3282	0,3287	0,0008
0,313	0,1341	0,1359	0,1370	0,1357	0,0015
0,156	0,0788	0,0917	0,0858	0,0854	0,0065
0,078	0,0582	0,0638	0,0727	0,0649	0,0073
0,031	0,0390	0,0503	0,0468	0,0454	0,0058
0,000	0,0465	0,0409	0,0431	0,0435	0,0028

25

Tabla 2

Elemento		Creatinina en orina	Megalina en orina		
Método de medición		Método enzimático: Método de color	ELISA		
Fondo de muestras	N.º de muestra	[Cre-o] (mg/dl)	D.O. (450 nm) – D.O. (630 nm)	[Megalina] (nM)	Aclaramiento de creatinina (nmol de megalina/g de Cre)
Diabetes	D-1	117,96	0,241	0,513	0,435
	D-2	68,16	0,110	0,168	0,246
	D-3	102,53	0,102	0,146	0,142
Nefropatía	N-1	178,52	2,472	6,398	3,584
	N-2	33,55	0,459	1,088	3,243
	N-3	41,24	0,161	0,302	0,732
	N-4	78,29	0,110	0,168	0,215
	N-5	36,97	0,129	0,218	0,590
Síndrome metabólico	M-1	302,32	0,169	0,323	0,107
	M-2	59,56	0,086	0,104	0,175
Individuos sanos	H-1	44,11	0,061	0,038	0,086
	H-2	92,72	0,082	0,094	0,101
	H-3	134,72	0,056	0,025	0,019
	H-4	123,59	0,063	0,044	0,036
	H-5	104,31	0,052	0,015	0,014
	H-6	96,64	0,050	0,009	0,009

Lista de secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE NIIGATA \201G DENKA SEIKEN Co., Ltd.

<120> Método para detectar megalina humana

<130> PH-3116-PCT

5

<150> documento JP 2006-089306

<151> 28-03-2006

<160> 2

10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13968

15

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

atggatcgcg ggccggcagc agtggcgtgc acgctgctcc tggctctcgt cgcctgccta 60
gcgccggcca gtggccaaga atgtgacagt gcgcattttc gctgtggaag tgggcattgc 120
atccctgcag actggagggtg tgatgggacc aaagactggt cagatgacgc ggatgaaatt 180
ggctgcgctg ttgtgacctg ccagcagggc tatttcaagt gccagagtga gggacaatgc 240
atcccagct cctgggtgtg tgaccaagat caagactgtg atgatggctc agatgaacgt 300
caagattgct cacaaagtac atgctcaagt catcagataa catgctcaa tggtcagtgt 360
atcccaagtg aatacaggtg cgaccacgtc agagactgcc ccgatggagc tgatgagaat 420
gactgccagt acccaacatg tgagcagctt acttgtgaca atggggcctg ctataacacc 480
agtcagaagt gtgattgga agttgattgc agggactcct cagatgaaat caactgcact 540
gagatatgct tgcacaatga gttttcatgt ggcaatggag agtgtatccc tctgtcttat 600
gtctgtgacc atgacaatga ttgccaagac ggcaagtgtg aacatgcttg caactatccg 660
acctgcggtg gttaccagtt cacttgcccc agtggccgat gcatttatca aaactgggtt 720
tgtgatggag aagatgactg taaagataat ggagatgaag atggatgtga aagcggctct 780
catgatgttc ataaatgttc cccaagagaa tggctctgcc cagagtcggg acgatgcac 840
tccatttata aagtttgtga tgggatttta gattgccag gaagagaaga tgaaaacaac 900
actagtaccg gaaaactg tagtatgact ctgtgctctg ccttgaactg ccagtaccag 960
tgccatgaga cgccgtatgg aggagcgtgt tttgtcccc caggttatat catcaaccac 1020
aatgacagc gtacctgtgt tgagtttgat gattgccaga tatggggaat ttgtgaccag 1080
aagtgtgaaa gccgacctgg ccgtcacctg tgccactgtg aagaagggtg tatcttggag 1140
cgtggacagt attgcaaagc taatgattcc tttggcgagg cctccattat cttctccaat 1200
ggctcgggatt tgtaattggt tgatattcat ggaaggagct tccggatcct agtggagtct 1260
cagaatcgtg gagtggccgt ggggtgtggct tccactatc acctgcaaag agttttttgg 1320
acagacaccg tgcaaaaataa ggttttttca gttgacatta atggtttaaa tatccaagag 1380
gttctcaatg tttctgttga aaccccagag aacctggctg tggactgggt taataataaa 1440
atctatctag tggaaaccaa ggtcaaccgc atagatatgg taaatttggg tggaaagctat 1500
cgggttacc ttataactga aaacttgggg catcctagag gaattgccgt ggaccaact 1560
gttgggtatt tatttttctc agattgggag agcctttctg gggaaacctaa gctggaaagg 1620
gcattcatgg atggcagcaa ccgtaaagac ttggtgaaaa caagctggg atggcctgct 1680
ggggtaactc tggatatgat atcgaagcgt gttactggg ttgactctcg gtttgattac 1740
attgaaactg taacttatga tggaaattcaa aggaagactg tagttcatgg aggctccctc 1800
attcctcatc cctttggagt aagcttattt gaaggtcagg tgttctttac agattggaca 1860
aagatggccg tgctgaaggc aaacaagttc acagagacca accacaagt gtactaccag 1920
gcttccctga ggcctatgg agtgactgtt taccattccc tcagacagcc ctatgctacc 1980
aatccgtgta aagataacaa tgggggctgt gagcaggtct gtgttctcag ccacagaaca 2040
gataatgatg gtttgggttt ccgttgcaag tgcacattcg gttccaact ggatacagat 2100
gagcggcaact gcattgctgt tcagaatttc ctcatTTTTT catcccaagt tgctattcgt 2160
gggatcccgt tcaccttgtc taccaggaa gatgtcatgg ttccagttc ggggaatcct 2220
tctttctttg tcgggattga ttttgacgcc caggacagca ctatcttttt ttcagatatg 2280
tcaaaacaca tgatttttaa gcaaaagatt gatggcacag gaagagaaat tctcgcagct 2340
aacaggggtg aaaatgttga aagtttggct tttgattgga tttcaagaa tctctattgg 2400
acagactctc attacaagag tatcagtgtc atgaggctag ctgataaaac gagacgcaca 2460

```

20

gtagttcagtt atttaataa cccacggtcg gtggtagttc atccttttgc cgggtatcta 2520
 ttcttcaactg attggttccg tcctgctaaa attatgagag catggagtga cggatctcac 2580
 ctcttgccctg taataaacac tactcttgga tggcccaatg gcttggccat cgattgggct 2640
 gcttcacgat tgtactgggt agatgcctat tttgataaaa ttgagcacag cacctttgat 2700
 ggtttagaca gaagaagact gggccatata gagcagatga cacatccgtt tggacttgcc 2760
 atctttggag agcatttatt ttttactgac tggagactgg gtgccattat tccgagtccg 2820
 aaagcagatg gtggagaaat gacagttatc cgaagtggca ttgcttacat actgcatttg 2880
 aaatcgtatg atgtcaacat ccagactggg tctaaccgct gtaatcaacc cagcatcct 2940
 aacggtgact gcagccactt ctgcttcccg gtgccaaatt tccagcgagt gtgtgggtgc 3000
 ccttatggaa tgaggctggc ttccaatcac ttgacatgcg aggggggacc aaccaatgaa 3060
 ccacccacgg agcagtgtgg cttattttcc ttcccctgta aaaatggcag atgtgtgccc 3120
 aattactatc tctgtgatgg agtcgatgat tgcctatgata acagtgatga gcaactatgt 3180
 ggcacactta ataatacctg ttcatcttcg gcgttcacct gtggccatgg ggagtgcatt 3240
 cctgcacact ggcgctgtga caaacgcaac gactgtgtgg atggcagtga tgagcacaac 3300
 tgccccacc acgcacctgc ttctgtcctt gacaccaat acacctgtga taatcaccag 3360
 tgtatctcaa agaactgggt ctgtgacaca gacaatgatt gtggggatgg atctgatgaa 3420
 aagaactgca attcgacaga gacatgccaa cctagtcagt ttaattgccc caatcatcga 3480
 tgtattgacc tatcgtttgt ctgtgatggg gacaaggatt gtgttgatgg atctgatgag 3540
 gttggttgtg tattaactg tactgcttct caattcaagt gtgccagtgg ggataaatgt 3600
 attggcgtca caaatcgttg tgatgggtgt tttgatgca gtgacaactc ggatgaagcg 3660
 ggctgtccaa ccaggcctcc tggatgtgc cactcagatg aatttcaagt ccaagaagat 3720
 ggtatctgca tcccgaactt ctgggaatgt gatgggcatc cagactgcct ctatggatct 3780
 gatgagcaca atgcctgtgt ccccaagact tgccctcat catatttcca ctgtgacaac 3840
 ggaactgca tccacagggc atggctctgt atgactgcgg ggatattgat 3900
 gatgagaagg atgccttac tcagcccttt cgctgtccta gtggcaatg gcagtgtctt 3960
 ggccataaca tctgtgtgaa tctgagtga gtgtgtgatg gcatctttga ctgccccaat 4020
 gggacagatg agtcccact ttgcaatggg aacagctgct cagatttcaa tgggtggtgt 4080
 actcacgagt gtgttcaaga gccctttggg gctaaatgcc tatgtccatt gggattctta 4140
 cttgccaatg attctaagac ctgtgaagac atagatgaat gtgatattct aggctcttgt 4200
 agccagcact gttacaatat gagaggttct ttccggtgct cgtgtgatac aggctacatg 4260
 ttagaagtgt atgggaggac ttgcaaagtt acagcatctg agagtctgct gttacttgtg 4320
 gcaagtgcga acaaaattat tgccgacagt gtcacctccc aggtccacaa tatctattca 4380
 ttggtcgaga atggttctta cattgtagct gttgattttg attcaattag tggctgtatc 4440
 ttttggctcg atgcaactca gggtaaaacc tggagtgcgt ttcaaaatgg aacggacaga 4500
 agagtgggat ttgacagtag catcatcttg actgaaacta ttgcaataga ttgggtaggt 4560
 cgtaatcttt actggacaga ctatgctctg gaacaattg aagtctccaa aattgatggg 4620
 agccacagga ctgtgctgat tagtaaaaac ctaacaaatc caagaggact agcattagat 4680
 cccagaatga atgagcatct actgttctgg tctgactggg gccaccaccc tccgatcgag 4740
 cgagccagca tggacggcag catctgtccc aggacaagat cttctggccc 4800
 tgccgcttaa ctattgacta ccccaacaga ctgctctact tcatggactc ctatcttgat 4860
 tacatggact tttgcgatta taatggacac catcggagac aggtgatagc cagtgatattg 4920
 attatacggc acccctatgc cctaactctc tttgaagact ctgtgtactg gactgaccgt 4980
 gctactcgtc gggttatgcg agccaacaag tggcatggag ggaaccagtc agttgtaatg 5040
 tataatattc aatggcccct tgggattggt gcggtcatc cttcgaaaca accaaattcc 5100
 gtgaatccat gtgccttttc ccgctgcagc catctctgcc tgctttcctc acaggggct 5160
 catttttact cctgtgtttg tccttcagga tggagtctgt ctctgatct cctgaattgc 5220
 ttgagagatg atcaaccctt ctttaataact gtaaggcaac atataattt tggaaatctcc 5280
 cttaatcctg aggtgaagag caatgatgct atggtcccca tagcagggat acagaatggt 5340
 ttagatggtg aatttgatga tgctgagcaa tacatctatt gggttgaaa tccaggtgaa 5400
 attcacagag tgaagacaga tggcaccaac aggacagtat ttgcttctat atctatggtg 5460
 gggccttcta tgaacctggc cttagattgg atttcaagaa acctttattc taccaatcct 5520
 agaactcagt caatcgaggt tttgacactc cacggagata tcagatacag aaaaacattg 5580
 attgccaatg atgggacagc tcttggagtt ggctttccaa ttggcataac tgttgatcct 5640
 gctcgtggga agctgtactg gtcagacca ggaactgaca gtggggttcc tgccaagatc 5700
 gccagtgcta acatgtagg cacatctctt aaaactctct ttactgggaa cctcgaacac 5760
 ctggagtgtg tcaactctga catcgaagag cagaaactct actgggcagt cactggaaga 5820
 ggagtgattg aaagaggaaa cgtggatgga acagatcgga tgatcctggt acaccagctt 5880
 tcccaccctt ggggaattgc agtccatgat tctttccttt attatactga tgaacagtat 5940
 gaggtcattg aaagagttga taaggccact ggggccaaca aaatagtctt gagagataat 6000
 gttccaaatc tgaggggtct tcaagtttat cacagacgca atgccgccga atcctcaaat 6060
 ggctgtagca acaacatgaa tgcctgtcag cagatttgcc tgctgtacc aggaggattg 6120
 ttttctgcg cctgtgccac tggatttaaa ctcaatcctg ataatcggtc ctgctctcca 6180
 tataactctt tcattgttgt ttcaatgctg tctgcaatca gaggctttag cttggaattg 6240

tcagatcatt cagaaacat ggtgccggtg gcaggccaag gacgaaacgc actgcatgtg 6300
gatgtggatg tgtcctctgg ctttatttat tgggtgtgatt ttagcagctc agtggcatct 6360
gataatgcga tccgtagaat taaaccagat ggatcttctc tgatgaacat tgtgacacat 6420
ggaataggag aaaatggagt cccgggtatt gcagtgatt gggtagcagg aaatctttat 6480
ttaccaatg cctttgtttc tgaaacactg atagaagttc tgcggatcaa tactacttac 6540
cgccgtgttc ttcttaaagt cacagtggac atgcctaggc atattgttgt agatcccaag 6600
aacagatacc tcttctgggc tgactatggg cagagaccaa agattgagcg ttctttcctt 6660
gactgtacca atcgaacagt gcttgtgtca gaggcattg tcacaccacg gggcttggca 6720
gtggaccgaa gtgatggcta cgtttattgg gttgatgatt ctttagatat aattgcaagg 6780
attcgtatca atggagagaa ctctgaagtg attcgttatg gcagtcgta cccaactcct 6840
tatggcatca ctgtttttga aaattctatc atatgggtag ataggaattt gaaaaagatc 6900
ttccaagcca gcaaggaacc agagaacaca gagccacca cagtataag agacaatatc 6960
aactggctaa gagatgtgac catctttgac aagcaagtcc agcccggtc accagcagag 7020
gtcaacaaca acccttgctt ggaaaacaat ggtgggtgct ctcatctctg ctttgcctctg 7080
cctggattgc acaccccaaa atgtgactgt gcctttggga ccctgcaaaag tgatggcaag 7140
aattgtgcca ttccaacaga aaatttctct atctttgcct tgtctaattc cttgagaagc 7200
ttacacttgg accctgaaaa ccatagccca cctttccaaa caataaatgt ggaaagaact 7260
gtcatgtctc tagactatga cagtgtaatg gatagaatct acttcacaca aaatttagcc 7320
tctggagttg gacagatttc ctatgccacc ctgtcttcag ggatccatac tccaactgtc 7380
attgcttcag gtatagggac tgctgatggc attgcctttg actggattac tagaagaatt 7440
tattacagtg actacctcaa ccagatgatt aattccatgg ctgaaagatgg gtctaaccgc 7500
actgtgatag cccgcgttcc aaaaccaaga gcaatttgtt tagatccctg ccaagggtag 7560
ctgtactggg ctgactggga tacacatgcc aaaatcgaga gagccacatt gggaggaac 7620
ttccgggtac ccattgtgaa cagcagtctg gtcatgccca gtgggctgac tctggactat 7680
gaagaggacc ttctctactg ggtggatgct agtctgcaga ggattgaacg cagcactctg 7740
acgggctgg atcgtgaagt cattgtcaat gcagccgttc atgcttttgg cttgactctc 7800
tatggccagt atatttactg gactgacttg tacacacaaa gaatttaccg agctaacaaa 7860
tatgacgggt caggctcagat tgcaatgacc acaaatttgc tctcccagcc caggggaatc 7920
aacactggtg tgaagaacca gaaacaacag tgtaacaatc cttgtgaaca gtttaatggg 7980
ggctgcagcc atatctgtgc accaggtcca aatggtgccg agtgccagtg tccacatgag 8040
ggcaactggt atttggccaa caacaggaag cactgcattg tggacaatgg tgaacgatgt 8100
ggtgcatctt ccttcacctg ctccaatgg cgtgcattc cggaaagatg gaagtgtgat 8160
aatgacaacg actgtgggga tggcagtgat gagatggaaa gtgtctgtgc acttcacacc 8220
tgctcaccga cagccttcac ctgtgccaat gggcgatgtg tccaatactc ttaccgctgt 8280
gattactaca atgactgtgg tgatggcagt gatgaggcag ggtgcctgtt cagggactgc 8340
aatgccacca cggagtttat gtgcaataac agaaggtgca tacctcgtga gtttatctgc 8400
aatggtgtag acaactgcc a tgataataac acttcagatg agaaaaattg ccctgatcgc 8460
acttgccagt ctggatacac aaaatgtcat aattcaaata tttgtattcc tccggttat 8520
ttgtgtacg gagacatga ctgtggagat aaaaccctac ttatgtgacc 8580
actcacacat gcagcagcag tgagttccaa tgcgcattct ggcgctgtat tcctcaacat 8640
tggatattgtg atcaagaaac agattgtttt gatgcctctg atgaacctgc ctcttgggt 8700
cactctgagc gaacatgcct agctgatgag ttcaagtgtg atggtgggag gtgcatcca 8760
agcgaatgga tctgtgacgg tgataatgac tbtggggata tgagtacga ggataaaagg 8820
caccagtgtc agaatcaaaa ctgctcggat tccgagtttc tctgtgtaaa tgacagacct 8880
ccggacagga ggtgcattcc ccagtcttg gtctgtgatg gcgatgtgga ttgtactgac 8940
ggctacgatg agaatcagaa ttgcaccagg agaactgtct ctgaaaatga attcacctgt 9000
ggttacggac tgtgtatccc aaagatattc aggtgtgacc ggcacaatga ctgtggtgac 9060
tatagcgacg agaggggctg cttataccag acttgccaac agaatcagtt tacctgtcag 9120
aacgggctgct gcattagtaa aaccttcgtc tgtgatgagg ataatgactg tggagacgga 9180
tctgatgagc tgatgcacct gtgccacacc ccagaaccca cgtgtccacc tcacgagttc 9240
aagtgtgaca atgggctgct catcgagatg atgaaactct gcaaccacct agatgactgt 9300
ttggacaaca gcgatgagaa aggtgtggc attaatgaat gccatgacct ttcaatcagt 9360
ggctgcgatc acaactgcac agacacctta accgattctc attgttctctg tctcctggt 9420
tacaagctca tctctgacaa cgggacttga gttgatattg atgaaatgac agagatgact 9480
tttgtctgta ggcagaagtg tgagaatgta attagctcct acatctgtaa gtgtgcccc 9540
ggctacctcc gagaaccaga tggaaagacc tgccggcaaa acagtaacat cgaaccctat 9600
ctcattttta gcaaccgtta ctatttgaga aatttaacta tagatggcta tttttactcc 9660
ctcatcttgg aaggactgga caatgttgtg gcattagatt ttgaccgagt agagaagaga 9720
ttgtattgga ttgatacaca gaggcaagtc attgagagaa tgtttctgaa taagacaaac 9780
aaggagacaa tcataaacca cagactacca gctgcagaaa gtctggctgt agactgggtt 9840
tccagaaagc tctactggtt ggatgcccgc ctggatggcc tctttgtctc tgacctcaat 9900
ggtggacacc gccgcatgct ggcccagcac tgtgtggatg ccaacaacac cttctgctt 9960
gataatccca gaggacttgc ccttcacct caatatgggt acctctactg ggcagactgg 10020

ggtcaccgcg catacattgg gagagtaggc atggatggaa ccaacaagtc tgtgataatc 10080
 tccaccaagt tagagtggcc taatggcadc accattgatt acaccaatga tctactctac 10140
 tgggcagatg cccacctggg ttacatagag tactctgatt tggagggcca ccatcgacac 10200
 acggtgtatg atggggcact gcctcaccct ttcgctatta ccatttttga agacactatt 10260
 tattggacag attggaatac aaggacagtg gaaaagggaa acaaatatga tggatcaaat 10320
 agacagacac tgggtgaacac aacacacaga ccatttgaca tccatgtgta ccatccatat 10380
 aggcagccca ttgtgagcaa tcctgtgggt accaacaatg gtggctgttc tcatctctgc 10440
 ctcatcaagc caggaggaaa agggttcact tgcgagtgc cagatgactt cgcaccctt 10500
 caactgagtg gcagcaccta ctgcatgccc atgtgctcca gcacccaagt cctgtgcgct 10560
 aacaatgaaa agtgcattcc tatctgggtg aaatgtgatg gacagaaaga ctgctcagat 10620
 ggctctgatg aactggccct ttgcccgcag cgcttctgcc gactgggaca gttccagtgc 10680
 agtgacggca actgcaccag cccgcagact ttatgcaatg ctacacaaa ttgccctgat 10740
 gggctctgatg aagaccgtct tctttgtgag aatcaccact gtgactccaa tgaatggcag 10800
 tgcgccaaca aacgttgcat cccagaatcc tggcagtgtg acacatttaa cgactgtgag 10860
 gataactcag atgaagacag ttcccactgt gccagcagga cctgcccggcc gggccagttt 10920
 cgggtgtgcta agtggccgctg catcccgcag gcctggaagt gtgatgtgga taatgattgt 10980
 ggagaccact cggatgagcc cattgaagaa tgcattgagct ctgcccactct ctgtgacaac 11040
 ttcacagaat tcagctgcaa aacaaattac cgctgcatcc caaagtgggc cgtgtgcaat 11100
 ggtgtagatg actgcagggg caacagtgat gagcaaggct gtgaggagag gacatgccat 11160
 cctgtggggg atttccgctg taaaaatcac cactgcatcc ctcttcgctg gcagtgtgat 11220
 gggcaaaatg actgtggaga taactcagat gaggaaaact gtgctccccg ggagtgcaca 11280
 gagagcgagt ttcgatgtgt caatcagcag tgcattccct cgcgatggat ctgtgaccat 11340
 tacaacgact gtggggacaa ctcagatgaa cgggactgtg agatgaggac ctgccatcct 11400
 gaatattttc agtgtacaag tggacattgt gtacacagt aactgaaatg cgatggatcc 11460
 gctgactgtt tggatgcgtc tgatgaagct gattgtccca cacgctttcc tgatggtgca 11520
 tactgccagg ctactatggt cgaatgcaa aaccatgttt gtatcccccc atattggaaa 11580
 tgtgatggcg atgatgactg tggcgatggt tcagatgaag aacttcacct gtgcttggat 11640
 gttccctgta attcacacaa ccgtttccgg tgtgacaaca atcgctgcat ttatagtcat 11700
 gaggtgtgca atggtgtgga tgactgtgga gatggaactg atgagacaga ggagcactgt 11760
 agaaaaccga cccctaaacc ttgtacagaa tatgaatata agtgtggcaa tgggcatgac 11820
 attccacatg acaatgtgtg tgatgatgcc gatgactgtg gtgactggtc cgatgaactg 11880
 ggttgcaata aaggaaaaga aagaacatgt gctgaaaata tatgagagca aaattgtacc 11940
 caattaaatg aaggaggatt tatctgctcc tgtacagctg ggttcgaaac caatgttttt 12000
 gacagaacct cctgtctaga tatcaatgaa tgtgaacaat ttgggacttg tccccagcac 12060
 tgcagaaata ccaaaggaag ttatgagtgt gtctgtgctg atggcttcac gtctatgagt 12120
 gaccgccctg gaaaacgatg tgcagctgag ggtagctctc ctttgttgt actgcctgac 12180
 aatgtccgaa ttcgaaaata taatctctca tctgagaggt tctcagagta tcttcaagat 12240
 gaggaatata tccaagctgt tgattatgat tgggattccca aggacatagg cctcagtgtt 12300
 gtgtattaca atgtgcgagg ggagggtctc aggtttgggt ctatcaaacy tgcacatc 12360
 cccaactttg aatccggccg caataatctt tggcaggaag ttgacctgaa actgaaatac 12420
 gtaatgcagc cagatggaat agcagtggac tgggttggaa ggcataatta ctggtcagat 12480
 gtcaagaata aacgcattga ggtggctaaa ctgatggaa ggtacagaaa gtggctgatt 12540
 tccactgacc tggaccaacc agctgctatt gctgtgaatc ccaaactagg gcttatgttc 12600
 tggactgact ggggaaagga acctaaaatc gagtctgcct ggatgaatgy agaggaccgc 12660
 aacatcctgy ttttcgagga ccttggttgg ccaactggcc tttctatcga ttatttgaac 12720
 aatgaccgaa tctactggag tgacttcaag gaggacgta ttgaaacat aaaatatgat 12780
 gggactgata ggagagtcat tgcaaaggaa gcaatgaacc cttacagcct ggacatcttt 12840
 gaagaccagt tatactggat atctaaggaa aagggagaag tatggaaaca aaataaattt 12900
 gggcaaggaa agaaagagaa aacgctggta gtgaaccctt ggctcactca agttcgaatc 12960
 tttcatcaac tcagatacaa taagtcaagt cccaaccttt gcaaacagat ctgcagccac 13020
 ctctgccttc tgagacctgy aggatacagc tgtgcctgtc cccaaggctc cagctttata 13080
 gaggggagca ccaactgagt tgatgcagcc atcgaactgc ctatcaacct gccccccca 13140
 tgcaggtgca tgcacggagg aaattgctat tttgatgaga ctgacctccc caaatgcaag 13200
 tgtcctagcy gctacaccgy aaaatattgt gaaatggcgt tttcaaaag catctctcca 13260
 ggaacaaccg cagtgtgaca gctgttgaca atcctctga tctgctaat tggagctcy 13320
 gcaattgcag gattcttcca ctatagaagg accggtctcc ttttgcctgc tctgcccag 13380
 ctgccaagct taagcagtct cgtcaagccc tctgaaaatg ggaatggggt gaccttcaga 13440
 tcaggggcag atcttaacat ggatattgga gtgtctggtt ttggacctga gactgctatt 13500
 gacaggtcaa tggcaatgag tgaagacttt gtcatggaaa tggggaagca gcccataata 13560
 tttgaaaacc caatgtactc agccagagac agtgctgtca aagtggttca gccaatccag 13620
 gtgactgtat ctgaaaatgt ggataataag aattatggaa gtcccataaa cccttctgag 13680
 atagttccag agacaaacc aacttcacca gctgctgatg gaactcaggt gacaaaatgy 13740
 aatctcttca aacgaaaatc taacaaact accaactttg aaaatccaat ctatgcacag 13800

ES 2 459 165 T3

atggagaacg agcaaaagga aagtgttgct gcgacaccac ctccatcacc ttcgctccct 13860
 gctaagccta agcctccttc gagaagagac ccaactccaa cctattctgc aacagaagac 13920
 acttttaaag acaccgcaaa tcttgtaaa gaagactctg aagtatag 13968

<210> 2
 <211> 4655
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Asp Arg Gly Pro Ala Ala Val Ala Cys Thr Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Ala Cys Leu Ala Pro Ala Ser Gly Gln Glu Cys Asp Ser Ala His
 20 25 30
 Phe Arg Cys Gly Ser Gly His Cys Ile Pro Ala Asp Trp Arg Cys Asp
 35 40 45
 Gly Thr Lys Asp Cys Ser Asp Asp Ala Asp Glu Ile Gly Cys Ala Val
 50 55 60
 Val Thr Cys Gln Gln Gly Tyr Phe Lys Cys Gln Ser Glu Gly Gln Cys
 65 70 75 80
 Ile Pro Ser Ser Trp Val Cys Asp Gln Asp Gln Asp Cys Asp Asp Gly
 85 90 95
 Ser Asp Glu Arg Gln Asp Cys Ser Gln Ser Thr Cys Ser Ser His Gln
 100 105 110
 Ile Thr Cys Ser Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Glu Tyr Arg Cys Asp
 115 120 125
 His Val Arg Asp Cys Pro Asp Gly Ala Asp Glu Asn Asp Cys Gln Tyr
 130 135 140
 Pro Thr Cys Glu Gln Leu Thr Cys Asp Asn Gly Ala Cys Tyr Asn Thr
 145 150 155 160
 Ser Gln Lys Cys Asp Trp Lys Val Asp Cys Arg Asp Ser Ser Asp Glu
 165 170 175
 Ile Asn Cys Thr Glu Ile Cys Leu His Asn Glu Phe Ser Cys Gly Asn
 180 185 190
 Gly Glu Cys Ile Pro Arg Ala Tyr Val Cys Asp His Asp Asn Asp Cys
 195 200 205
 Gln Asp Gly Ser Asp Glu His Ala Cys Asn Tyr Pro Thr Cys Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Gln Phe Thr Cys Pro Ser Gly Arg Cys Ile Tyr Gln Asn Trp Val
 225 230 235 240
 Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Lys Asp Asn Gly Asp Glu Asp Gly Cys
 245 250 255
 Glu Ser Gly Pro His Asp Val His Lys Cys Ser Pro Arg Glu Trp Ser
 260 265 270
 Cys Pro Glu Ser Gly Arg Cys Ile Ser Ile Tyr Lys Val Cys Asp Gly

ES 2 459 165 T3

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

ES 2 459 165 T3

1285					1290					1295					
Gly	Asp	Met	Ser	Asp	Glu	Lys	Asp	Cys	Pro	Thr	Gln	Pro	Phe	Arg	Cys
		1300					1305					1310			
Pro	Ser	Trp	Gln	Trp	Gln	Cys	Leu	Gly	His	Asn	Ile	Cys	Val	Asn	Leu
		1315					1320					1325			
Ser	Val	Val	Cys	Asp	Gly	Ile	Phe	Asp	Cys	Pro	Asn	Gly	Thr	Asp	Glu
		1330					1335					1340			
Ser	Pro	Leu	Cys	Asn	Gly	Asn	Ser	Cys	Ser	Asp	Phe	Asn	Gly	Gly	Cys
		1345					1350					1355			1360
Thr	His	Glu	Cys	Val	Gln	Glu	Pro	Phe	Gly	Ala	Lys	Cys	Leu	Cys	Pro
				1365					1370						1375
Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Cys	Glu	Asp	Ile	Asp
			1380					1385					1390		
Glu	Cys	Asp	Ile	Leu	Gly	Ser	Cys	Ser	Gln	His	Cys	Tyr	Asn	Met	Arg
		1395					1400					1405			
Gly	Ser	Phe	Arg	Cys	Ser	Cys	Asp	Thr	Gly	Tyr	Met	Leu	Glu	Ser	Asp
		1410					1415					1420			
Gly	Arg	Thr	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Ser	Glu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val
		1425					1430					1435			1440
Ala	Ser	Gln	Asn	Lys	Ile	Ile	Ala	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Gln	Val	His
			1445					1450						1455	
Asn	Ile	Tyr	Ser	Leu	Val	Glu	Asn	Gly	Ser	Tyr	Ile	Val	Ala	Val	Asp
			1460					1465				1470			
Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Gly	Arg	Ile	Phe	Trp	Ser	Asp	Ala	Thr	Gln	Gly
		1475					1480					1485			
Lys	Thr	Trp	Ser	Ala	Phe	Gln	Asn	Gly	Thr	Asp	Arg	Arg	Val	Val	Phe
		1490					1495					1500			
Asp	Ser	Ser	Ile	Ile	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Ala	Ile	Asp	Trp	Val	Gly
		1505					1510					1515			1520
Arg	Asn	Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Leu	Glu	Thr	Ile	Glu	Val	Ser
			1525					1530						1535	
Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	His	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Ser	Lys	Asn	Leu	Thr
			1540					1545					1550		
Asn	Pro	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	Arg	Met	Asn	Glu	His	Leu	Leu
		1555					1560					1565			
Phe	Trp	Ser	Asp	Trp	Gly	His	His	Pro	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Ser	Met
		1570					1575					1580			
Asp	Gly	Ser	Met	Arg	Thr	Val	Ile	Val	Gln	Asp	Lys	Ile	Phe	Trp	Pro
		1585					1590					1595			1600
Cys	Gly	Leu	Thr	Ile	Asp	Tyr	Pro	Asn	Arg	Leu	Leu	Tyr	Phe	Met	Asp
			1605					1610						1615	
Ser	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Met	Asp	Phe	Cys	Asp	Tyr	Asn	Gly	His	His	Arg

ES 2 459 165 T3

1620	1625	1630
Arg Gln Val Ile Ala Ser Asp Leu Ile Ile Arg His Pro Tyr Ala Leu		
1635	1640	1645
Thr Leu Phe Glu Asp Ser Val Tyr Trp Thr Asp Arg Ala Thr Arg Arg		
1650	1655	1660
Val Met Arg Ala Asn Lys Trp His Gly Gly Asn Gln Ser Val Val Met		
1665	1670	1675
Tyr Asn Ile Gln Trp Pro Leu Gly Ile Val Ala Val His Pro Ser Lys		
1685	1690	1695
Gln Pro Asn Ser Val Asn Pro Cys Ala Phe Ser Arg Cys Ser His Leu		
1700	1705	1710
Cys Leu Leu Ser Ser Gln Gly Pro His Phe Tyr Ser Cys Val Cys Pro		
1715	1720	1725
Ser Gly Trp Ser Leu Ser Pro Asp Leu Leu Asn Cys Leu Arg Asp Asp		
1730	1735	1740
Gln Pro Phe Leu Ile Thr Val Arg Gln His Ile Ile Phe Gly Ile Ser		
1745	1750	1755
Leu Asn Pro Glu Val Lys Ser Asn Asp Ala Met Val Pro Ile Ala Gly		
1765	1770	1775
Ile Gln Asn Gly Leu Asp Val Glu Phe Asp Asp Ala Glu Gln Tyr Ile		
1780	1785	1790
Tyr Trp Val Glu Asn Pro Gly Glu Ile His Arg Val Lys Thr Asp Gly		
1795	1800	1805
Thr Asn Arg Thr Val Phe Ala Ser Ile Ser Met Val Gly Pro Ser Met		
1810	1815	1820
Asn Leu Ala Leu Asp Trp Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Pro		
1825	1830	1835
Arg Thr Gln Ser Ile Glu Val Leu Thr Leu His Gly Asp Ile Arg Tyr		
1845	1850	1855
Arg Lys Thr Leu Ile Ala Asn Asp Gly Thr Ala Leu Gly Val Gly Phe		
1860	1865	1870
Pro Ile Gly Ile Thr Val Asp Pro Ala Arg Gly Lys Leu Tyr Trp Ser		
1875	1880	1885
Asp Gln Gly Thr Asp Ser Gly Val Pro Ala Lys Ile Ala Ser Ala Asn		
1890	1895	1900
Met Asp Gly Thr Ser Val Lys Thr Leu Phe Thr Gly Asn Leu Glu His		
1905	1910	1915
Leu Glu Cys Val Thr Leu Asp Ile Glu Glu Gln Lys Leu Tyr Trp Ala		
1925	1930	1935
Val Thr Gly Arg Gly Val Ile Glu Arg Gly Asn Val Asp Gly Thr Asp		
1940	1945	1950
Arg Met Ile Leu Val His Gln Leu Ser His Pro Trp Gly Ile Ala Val		

ES 2 459 165 T3

1955				1960				1965			
His Asp	Ser Phe	Leu Tyr	Tyr Thr	Asp Glu	Gln Tyr	Glu Val	Ile Glu				
1970			1975				1980				
Arg Val	Asp Lys	Ala Thr	Gly Ala	Asn Lys	Ile Val	Leu Arg	Asp Asn				
1985			1990				1995				2000
Val Pro	Asn Leu	Arg Gly	Leu Gln	Val Tyr	His Arg	Arg Asn	Ala Ala				
		2005				2010					2015
Glu Ser	Ser Asn	Gly Cys	Ser Asn	Asn Met	Asn Ala	Cys Gln	Gln Ile				
	2020				2025						2030
Cys Leu	Pro Val	Pro Gly	Gly Leu	Phe Ser	Cys Ala	Cys Ala	Thr Gly				
	2035				2040						2045
Phe Lys	Leu Asn	Pro Asp	Asn Arg	Ser Cys	Ser Pro	Tyr Asn	Ser Phe				
	2050		2055			2060					
Ile Val	Val Ser	Met Leu	Ser Ala	Ile Arg	Gly Phe	Ser Leu	Glu Leu				
2065			2070				2080				
Ser Asp	His Ser	Glu Thr	Met Val	Pro Val	Ala Gly	Gln Gly	Arg Asn				
		2085					2095				
Ala Leu	His Val	Asp Val	Asp Val	Ser Ser	Gly Phe	Ile Tyr	Trp Cys				
		2100			2105						
Asp Phe	Ser Ser	Ser Val	Ala Ser	Asp Asn	Ala Ile	Arg Arg	Ile Lys				
		2115			2120		2125				
Pro Asp	Gly Ser	Ser Leu	Met Asn	Ile Val	Thr His	Gly Ile	Gly Glu				
	2130		2135				2140				
Asn Gly	Val Arg	Gly Ile	Ala Val	Asp Trp	Val Ala	Gly Asn	Leu Tyr				
2145			2150				2160				
Phe Thr	Asn Ala	Phe Val	Ser Glu	Thr Leu	Ile Glu	Val Leu	Arg Ile				
		2165					2175				
Asn Thr	Thr Tyr	Arg Arg	Val Leu	Leu Lys	Val Thr	Val Asp	Met Pro				
		2180			2185		2190				
Arg His	Ile Val	Val Asp	Pro Lys	Asn Arg	Tyr Leu	Phe Trp	Ala Asp				
		2195			2200		2205				
Tyr Gly	Gln Arg	Pro Lys	Ile Glu	Arg Ser	Phe Leu	Asp Cys	Thr Asn				
	2210		2215				2220				
Arg Thr	Val Leu	Val Ser	Glu Gly	Ile Val	Thr Pro	Arg Gly	Leu Ala				
2225			2230				2240				
Val Asp	Arg Ser	Asp Gly	Tyr Val	Tyr Trp	Val Asp	Asp Ser	Leu Asp				
		2245			2250		2255				
Ile Ile	Ala Arg	Ile Arg	Ile Asn	Gly Glu	Asn Ser	Glu Val	Ile Arg				
		2260			2265		2270				
Tyr Gly	Ser Arg	Tyr Pro	Thr Pro	Tyr Gly	Ile Thr	Val Phe	Glu Asn				
		2275			2280		2285				
Ser Ile	Ile Trp	Val Asp	Arg Asn	Leu Lys	Lys Ile	Phe Gln	Ala Ser				

ES 2 459 165 T3

2625		2630		2635		2640
Asn Thr Val Val Lys Asn Gln Lys Gln Gln Cys Asn Asn Pro Cys Glu		2645		2650		2655
Gln Phe Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Ala Pro Gly Pro Asn Gly		2660		2665		2670
Ala Glu Cys Gln Cys Pro His Glu Gly Asn Trp Tyr Leu Ala Asn Asn		2675		2680		2685
Arg Lys His Cys Ile Val Asp Asn Gly Glu Arg Cys Gly Ala Ser Ser		2690		2695		2700
Phe Thr Cys Ser Asn Gly Arg Cys Ile Ser Glu Glu Trp Lys Cys Asp		2705		2710		2715
Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Met Glu Ser Val Cys		2725		2730		2735
Ala Leu His Thr Cys Ser Pro Thr Ala Phe Thr Cys Ala Asn Gly Arg		2740		2745		2750
Cys Val Gln Tyr Ser Tyr Arg Cys Asp Tyr Tyr Asn Asp Cys Gly Asp		2755		2760		2765
Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Phe Arg Asp Cys Asn Ala Thr Thr		2770		2775		2780
Glu Phe Met Cys Asn Asn Arg Arg Cys Ile Pro Arg Glu Phe Ile Cys		2785		2790		2795
Asn Gly Val Asp Asn Cys His Asp Asn Asn Thr Ser Asp Glu Lys Asn		2805		2810		2815
Cys Pro Asp Arg Thr Cys Gln Ser Gly Tyr Thr Lys Cys His Asn Ser		2820		2825		2830
Asn Ile Cys Ile Pro Arg Val Tyr Leu Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys		2835		2840		2845
Gly Asp Asn Ser Asp Glu Asn Pro Thr Tyr Cys Thr Thr His Thr Cys		2850		2855		2860
Ser Ser Ser Glu Phe Gln Cys Ala Ser Gly Arg Cys Ile Pro Gln His		2865		2870		2875
Trp Tyr Cys Asp Gln Glu Thr Asp Cys Phe Asp Ala Ser Asp Glu Pro		2885		2890		2895
Ala Ser Cys Gly His Ser Glu Arg Thr Cys Leu Ala Asp Glu Phe Lys		2900		2905		2910
Cys Asp Gly Gly Arg Cys Ile Pro Ser Glu Trp Ile Cys Asp Gly Asp		2915		2920		2925
Asn Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Asp Lys Arg His Gln Cys Gln		2930		2935		2940
Asn Gln Asn Cys Ser Asp Ser Glu Phe Leu Cys Val Asn Asp Arg Pro		2945		2950		2955
Pro Asp Arg Arg Cys Ile Pro Gln Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Val						

ES 2 459 165 T3

2965					2970					2975									
Asp	Cys	Thr	Asp	Gly	Tyr	Asp	Glu	Asn	Gln	Asn	Cys	Thr	Arg	Arg	Thr				
2980					2985					2990									
Cys	Ser	Glu	Asn	Glu	Phe	Thr	Cys	Gly	Tyr	Gly	Leu	Cys	Ile	Pro	Lys				
2995					3000					3005									
Ile	Phe	Arg	Cys	Asp	Arg	His	Asn	Asp	Cys	Gly	Asp	Tyr	Ser	Asp	Glu				
3010					3015					3020									
Arg	Gly	Cys	Leu	Tyr	Gln	Thr	Cys	Gln	Gln	Asn	Gln	Phe	Thr	Cys	Gln				
3025					3030					3035					3040				
Asn	Gly	Arg	Cys	Ile	Ser	Lys	Thr	Phe	Val	Cys	Asp	Glu	Asp	Asn	Asp				
3045					3050					3055									
Cys	Gly	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	Met	His	Leu	Cys	His	Thr	Pro	Glu				
3060					3065					3070									
Pro	Thr	Cys	Pro	Pro	His	Glu	Phe	Lys	Cys	Asp	Asn	Gly	Arg	Cys	Ile				
3075					3080					3085									
Glu	Met	Met	Lys	Leu	Cys	Asn	His	Leu	Asp	Asp	Cys	Leu	Asp	Asn	Ser				
3090					3095					3100									
Asp	Glu	Lys	Gly	Cys	Gly	Ile	Asn	Glu	Cys	His	Asp	Pro	Ser	Ile	Ser				
3105					3110					3115					3120				
Gly	Cys	Asp	His	Asn	Cys	Thr	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Phe	Tyr	Cys	Ser				
3125					3130					3135									
Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Lys	Leu	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Thr	Cys	Val	Asp				
3140					3145					3150									
Ile	Asp	Glu	Cys	Thr	Glu	Met	Pro	Phe	Val	Cys	Ser	Gln	Lys	Cys	Glu				
3155					3160					3165									
Asn	Val	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ile	Cys	Lys	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Leu	Arg				
3170					3175					3180									
Glu	Pro	Asp	Gly	Lys	Thr	Cys	Arg	Gln	Asn	Ser	Asn	Ile	Glu	Pro	Tyr				
3185					3190					3195					3200				
Leu	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly				
3205					3210					3215									
Tyr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Asn	Val	Val	Ala	Leu				
3220					3225					3230									
Asp	Phe	Asp	Arg	Val	Glu	Lys	Arg	Leu	Tyr	Trp	Ile	Asp	Thr	Gln	Arg				
3235					3240					3245									
Gln	Val	Ile	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Lys	Glu	Thr	Ile				
3250					3255					3260									
Ile	Asn	His	Arg	Leu	Pro	Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Ala	Val	Asp	Trp	Val				
3265					3270					3275					3280				
Ser	Arg	Lys	Leu	Tyr	Trp	Leu	Asp	Ala	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Phe	Val				
3285					3290					3295									
Ser	Asp	Leu	Asn	Gly	Gly	His	Arg	Arg	Met	Leu	Ala	Gln	His	Cys	Val				

ES 2 459 165 T3

3300	3305	3310
Asp Ala Asn Asn Thr Phe Cys Phe Asp Asn Pro Arg Gly Leu Ala Leu		
3315	3320	3325
His Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Tyr Trp Ala Asp Trp Gly His Arg Ala		
3330	3335	3340
Tyr Ile Gly Arg Val Gly Met Asp Gly Thr Asn Lys Ser Val Ile Ile		
3345	3350	3355
Ser Thr Lys Leu Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Ile Asp Tyr Thr Asn		
3365	3370	3375
Asp Leu Leu Tyr Trp Ala Asp Ala His Leu Gly Tyr Ile Glu Tyr Ser		
3380	3385	3390
Asp Leu Glu Gly His His Arg His Thr Val Tyr Asp Gly Ala Leu Pro		
3395	3400	3405
His Pro Phe Ala Ile Thr Ile Phe Glu Asp Thr Ile Tyr Trp Thr Asp		
3410	3415	3420
Trp Asn Thr Arg Thr Val Glu Lys Gly Asn Lys Tyr Asp Gly Ser Asn		
3425	3430	3435
Arg Gln Thr Leu Val Asn Thr Thr His Arg Pro Phe Asp Ile His Val		
3445	3450	3455
Tyr His Pro Tyr Arg Gln Pro Ile Val Ser Asn Pro Cys Gly Thr Asn		
3460	3465	3470
Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Ile Lys Pro Gly Gly Lys Gly		
3475	3480	3485
Phe Thr Cys Glu Cys Pro Asp Asp Phe Arg Thr Leu Gln Leu Ser Gly		
3490	3495	3500
Ser Thr Tyr Cys Met Pro Met Cys Ser Ser Thr Gln Phe Leu Cys Ala		
3505	3510	3515
Asn Asn Glu Lys Cys Ile Pro Ile Trp Trp Lys Cys Asp Gly Gln Lys		
3525	3530	3535
Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Leu Ala Leu Cys Pro Gln Arg Phe		
3540	3545	3550
Cys Arg Leu Gly Gln Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Thr Ser Pro		
3555	3560	3565
Gln Thr Leu Cys Asn Ala His Gln Asn Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu		
3570	3575	3580
Asp Arg Leu Leu Cys Glu Asn His His Cys Asp Ser Asn Glu Trp Gln		
3585	3590	3595
Cys Ala Asn Lys Arg Cys Ile Pro Glu Ser Trp Gln Cys Asp Thr Phe		
3605	3610	3615
Asn Asp Cys Glu Asp Asn Ser Asp Glu Asp Ser Ser His Cys Ala Ser		
3620	3625	3630
Arg Thr Cys Arg Pro Gly Gln Phe Arg Cys Ala Asn Gly Arg Cys Ile		

3635	3640	3645
Pro Gln Ala Trp Lys Cys Asp Val Asp Asn Asp Cys Gly Asp His Ser		
3650	3655	3660
Asp Glu Pro Ile Glu Glu Cys Met Ser Ser Ala His Leu Cys Asp Asn		
3665	3670	3675
Phe Thr Glu Phe Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Arg Cys Ile Pro Lys Trp		
3685	3690	3695
Ala Val Cys Asn Gly Val Asp Asp Cys Arg Asp Asn Ser Asp Glu Gln		
3700	3705	3710
Gly Cys Glu Glu Arg Thr Cys His Pro Val Gly Asp Phe Arg Cys Lys		
3715	3720	3725
Asn His His Cys Ile Pro Leu Arg Trp Gln Cys Asp Gly Gln Asn Asp		
3730	3735	3740
Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Pro Arg Glu Cys Thr		
3745	3750	3755
Glu Ser Glu Phe Arg Cys Val Asn Gln Gln Cys Ile Pro Ser Arg Trp		
3765	3770	3775
Ile Cys Asp His Tyr Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Arg Asp		
3780	3785	3790
Cys Glu Met Arg Thr Cys His Pro Glu Tyr Phe Gln Cys Thr Ser Gly		
3795	3800	3805
His Cys Val His Ser Glu Leu Lys Cys Asp Gly Ser Ala Asp Cys Leu		
3810	3815	3820
Asp Ala Ser Asp Glu Ala Asp Cys Pro Thr Arg Phe Pro Asp Gly Ala		
3825	3830	3835
Tyr Cys Gln Ala Thr Met Phe Glu Cys Lys Asn His Val Cys Ile Pro		
3845	3850	3855
Pro Tyr Trp Lys Cys Asp Gly Asp Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp		
3860	3865	3870
Glu Glu Leu His Leu Cys Leu Asp Val Pro Cys Asn Ser Pro Asn Arg		
3875	3880	3885
Phe Arg Cys Asp Asn Asn Arg Cys Ile Tyr Ser His Glu Val Cys Asn		
3890	3895	3900
Gly Val Asp Asp Cys Gly Asp Gly Thr Asp Glu Thr Glu Glu His Cys		
3905	3910	3915
Arg Lys Pro Thr Pro Lys Pro Cys Thr Glu Tyr Glu Tyr Lys Cys Gly		
3925	3930	3935
Asn Gly His Cys Ile Pro His Asp Asn Val Cys Asp Asp Ala Asp Asp		
3940	3945	3950
Cys Gly Asp Trp Ser Asp Glu Leu Gly Cys Asn Lys Gly Lys Glu Arg		
3955	3960	3965
Thr Cys Ala Glu Asn Ile Cys Glu Gln Asn Cys Thr Gln Leu Asn Glu		

ES 2 459 165 T3

3970	3975	3980
Gly Gly Phe Ile Cys Ser Cys Thr Ala Gly Phe Glu Thr Asn Val Phe 3985 3990 3995 4000		
Asp Arg Thr Ser Cys Leu Asp Ile Asn Glu Cys Glu Gln Phe Gly Thr 4005 4010 4015		
Cys Pro Gln His Cys Arg Asn Thr Lys Gly Ser Tyr Glu Cys Val Cys 4020 4025 4030		
Ala Asp Gly Phe Thr Ser Met Ser Asp Arg Pro Gly Lys Arg Cys Ala 4035 4040 4045		
Ala Glu Gly Ser Ser Pro Leu Leu Leu Leu Pro Asp Asn Val Arg Ile 4050 4055 4060		
Arg Lys Tyr Asn Leu Ser Ser Glu Arg Phe Ser Glu Tyr Leu Gln Asp 4065 4070 4075 4080		
Glu Glu Tyr Ile Gln Ala Val Asp Tyr Asp Trp Asp Pro Lys Asp Ile 4085 4090 4095		
Gly Leu Ser Val Val Tyr Tyr Thr Val Arg Gly Glu Gly Ser Arg Phe 4100 4105 4110		
Gly Ala Ile Lys Arg Ala Tyr Ile Pro Asn Phe Glu Ser Gly Arg Asn 4115 4120 4125		
Asn Leu Val Gln Glu Val Asp Leu Lys Leu Lys Tyr Val Met Gln Pro 4130 4135 4140		
Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Gly Arg His Ile Tyr Trp Ser Asp 4145 4150 4155 4160		
Val Lys Asn Lys Arg Ile Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Arg Tyr Arg 4165 4170 4175		
Lys Trp Leu Ile Ser Thr Asp Leu Asp Gln Pro Ala Ala Ile Ala Val 4180 4185 4190		
Asn Pro Lys Leu Gly Leu Met Phe Trp Thr Asp Trp Gly Lys Glu Pro 4195 4200 4205		
Lys Ile Glu Ser Ala Trp Met Asn Gly Glu Asp Arg Asn Ile Leu Val 4210 4215 4220		
Phe Glu Asp Leu Gly Trp Pro Thr Gly Leu Ser Ile Asp Tyr Leu Asn 4225 4230 4235 4240		
Asn Asp Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Phe Lys Glu Asp Val Ile Glu Thr 4245 4250 4255		
Ile Lys Tyr Asp Gly Thr Asp Arg Arg Val Ile Ala Lys Glu Ala Met 4260 4265 4270		
Asn Pro Tyr Ser Leu Asp Ile Phe Glu Asp Gln Leu Tyr Trp Ile Ser 4275 4280 4285		
Lys Glu Lys Gly Glu Val Trp Lys Gln Asn Lys Phe Gly Gln Gly Lys 4290 4295 4300		
Lys Glu Lys Thr Leu Val Val Asn Pro Trp Leu Thr Gln Val Arg Ile		

ES 2 459 165 T3

4305 4310 4315 4320
 Phe His Gln Leu Arg Tyr Asn Lys Ser Val Pro Asn Leu Cys Lys Gln
 4325 4330 4335
 Ile Cys Ser His Leu Cys Leu Leu Arg Pro Gly Gly Tyr Ser Cys Ala
 4340 4345 4350
 Cys Pro Gln Gly Ser Ser Phe Ile Glu Gly Ser Thr Thr Glu Cys Asp
 4355 4360 4365
 Ala Ala Ile Glu Leu Pro Ile Asn Leu Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met
 4370 4375 4380
 His Gly Gly Asn Cys Tyr Phe Asp Glu Thr Asp Leu Pro Lys Cys Lys
 4385 4390 4395 4400
 Cys Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Met Ala Phe Ser Lys
 4405 4410 4415
 Gly Ile Ser Pro Gly Thr Thr Ala Val Ala Val Leu Leu Thr Ile Leu
 4420 4425 4430
 Leu Ile Val Val Ile Gly Ala Leu Ala Ile Ala Gly Phe Phe His Tyr
 4435 4440 4445
 Arg Arg Thr Gly Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu Pro Ser Leu
 4450 4455 4460
 Ser Ser Leu Val Lys Pro Ser Glu Asn Gly Asn Gly Val Thr Phe Arg
 4465 4470 4475 4480
 Ser Gly Ala Asp Leu Asn Met Asp Ile Gly Val Ser Gly Phe Gly Pro
 4485 4490 4495
 Glu Thr Ala Ile Asp Arg Ser Met Ala Met Ser Glu Asp Phe Val Met
 4500 4505 4510
 Glu Met Gly Lys Gln Pro Ile Ile Phe Glu Asn Pro Met Tyr Ser Ala
 4515 4520 4525
 Arg Asp Ser Ala Val Lys Val Val Gln Pro Ile Gln Val Thr Val Ser
 4530 4535 4540
 Glu Asn Val Asp Asn Lys Asn Tyr Gly Ser Pro Ile Asn Pro Ser Glu
 4545 4550 4555 4560
 Ile Val Pro Glu Thr Asn Pro Thr Ser Pro Ala Ala Asp Gly Thr Gln
 4565 4570 4575
 Val Thr Lys Trp Asn Leu Phe Lys Arg Lys Ser Lys Gln Thr Thr Asn
 4580 4585 4590
 Phe Glu Asn Pro Ile Tyr Ala Gln Met Glu Asn Glu Gln Lys Glu Ser
 4595 4600 4605
 Val Ala Ala Thr Pro Pro Pro Ser Pro Ser Leu Pro Ala Lys Pro Lys
 4610 4615 4620
 Pro Pro Ser Arg Arg Asp Pro Thr Pro Thr Tyr Ser Ala Thr Glu Asp
 4625 4630 4635 4640
 Thr Phe Lys Asp Thr Ala Asn Leu Val Lys Glu Asp Ser Glu Val
 4645 4650 4655

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar nefropatía mediante la determinación de una cantidad aumentada de megalina humana en una muestra de orina usando un primer ligando que puede unirse a megalina humana y que se une a un soporte sólido y un segundo ligando que puede unirse a megalina humana, comprendiendo el método permitir que la muestra reaccione con dicho primer ligando, permitir que la muestra reaccione con dicho segundo ligando y medir el segundo ligando que se une a dicho soporte sólido mediante formación de un complejo con megalina humana en la muestra y dicho primer ligando.
- 10 2. Método para detectar nefropatía según la reivindicación 1, en el que el primer ligando que puede unirse a megalina humana y el segundo ligando que puede unirse a megalina humana son ambos anticuerpos.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales anti-megalina humana.
- 20 4. Método para detectar nefropatía mediante la determinación de una cantidad aumentada de megalina humana en una muestra de orina usando megalina humana o un fragmento parcial de megalina humana que se une a un soporte sólido y un ligando que puede unirse a megalina humana, comprendiendo el método permitir que la muestra reaccione con dicho ligando, permitir que el producto reaccione con la megalina humana que se une a un soporte sólido, medir el ligando que puede unirse a megalina humana que se une a un soporte sólido y cuantificar la megalina humana en la muestra basándose en una disminución en un porcentaje del ligando que puede unirse a megalina humana que se une a un soporte sólido.
- 25 5. Método para detectar nefropatía según la reivindicación 4, en el que el ligando que puede unirse a megalina humana es un anticuerpo monoclonal anti-megalina humana.
- 30 6. Uso de megalina humana como marcador de detección de enfermedad para detectar nefropatía en el método según la reivindicación 1.

Fig. 1

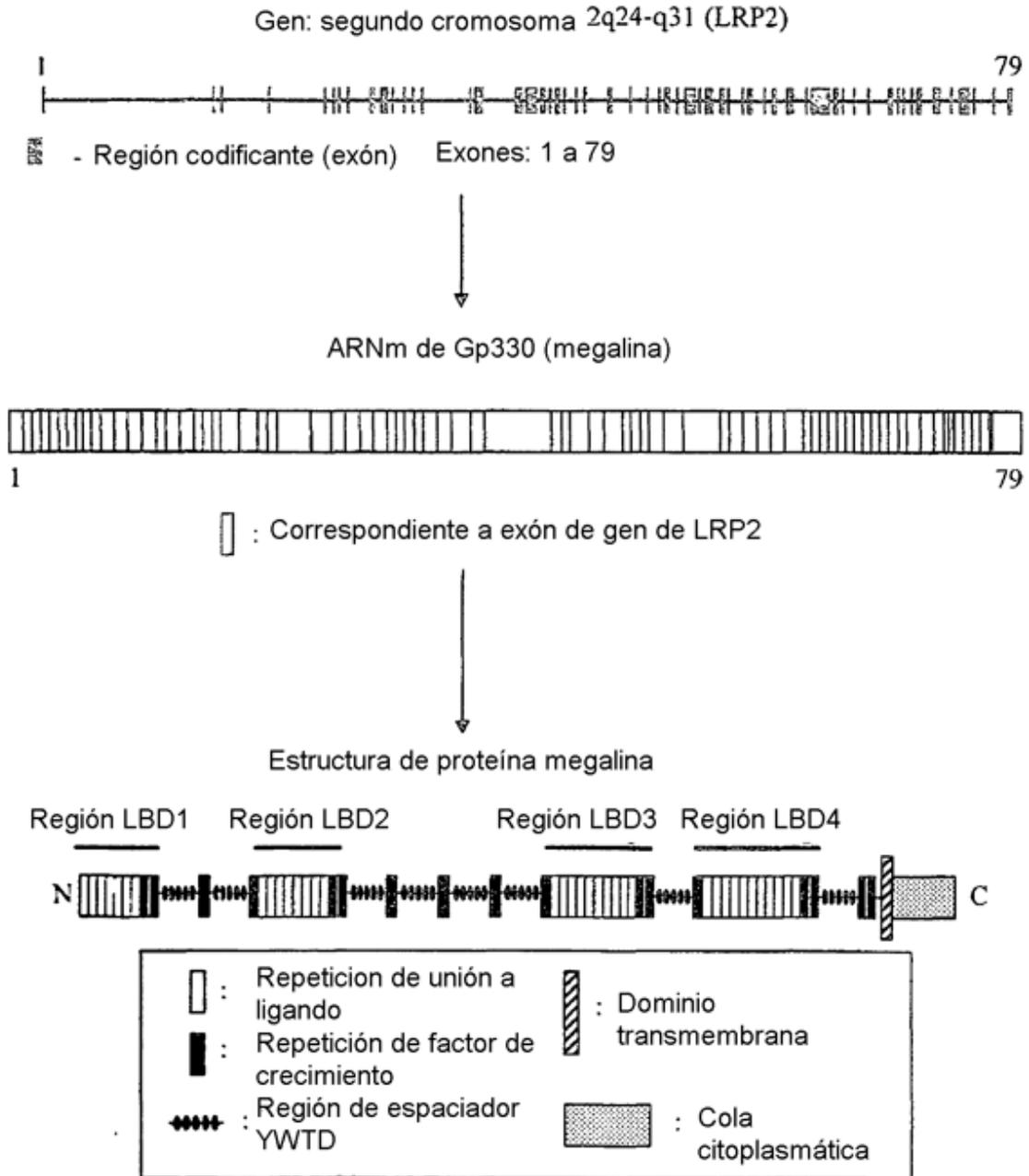


Fig. 2

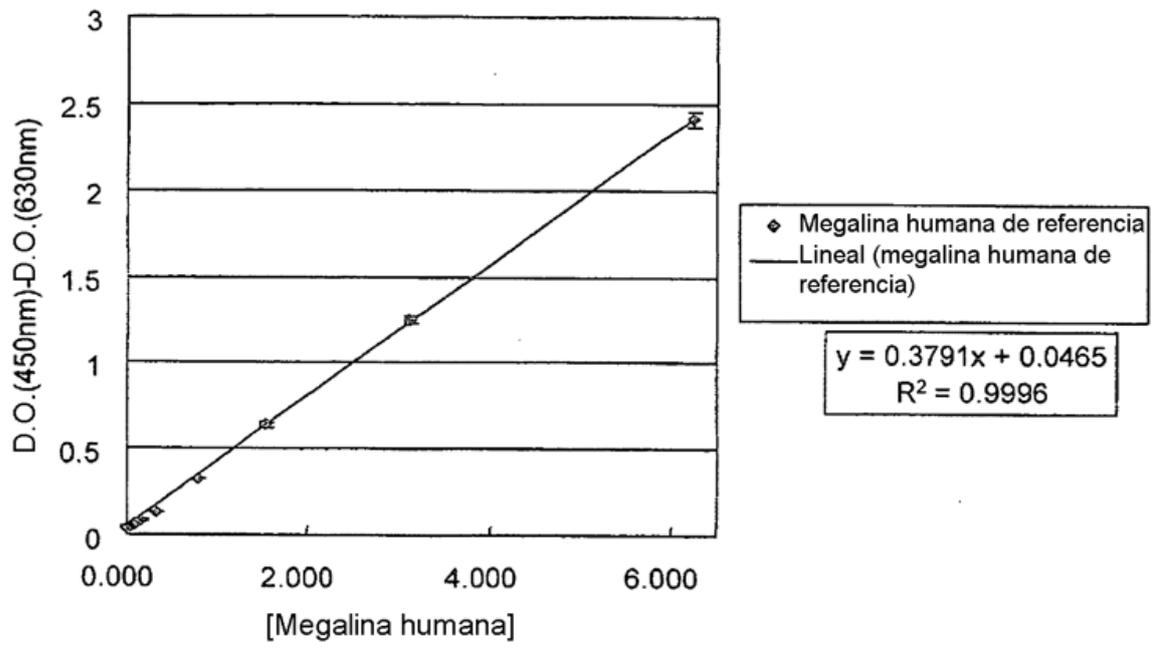


Fig. 3

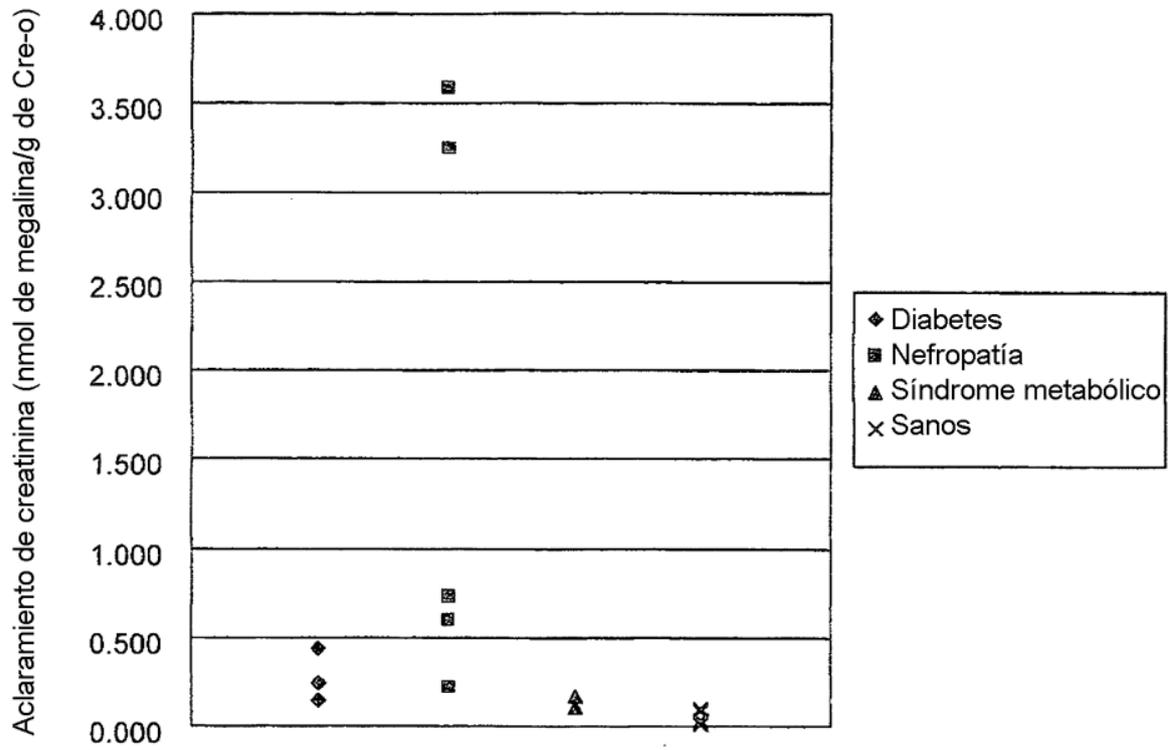


Fig. 4

