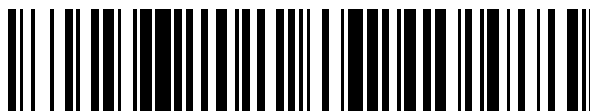


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 333**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010** **E 10769753 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 2426496**

54 Título: **Uso de megalina en orina como marcador para la detección de nefropatía por IgA**

30 Prioridad:

27.04.2009 JP 2009108493

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2015

73 Titular/es:

NIIGATA UNIVERSITY (33.3%)
8050 Ikarashi ni-nocho Nishi-ku Niigata-shi
Niigata 950-2181, JP;
JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION
(33.3%) y
DENKA SEIKEN CO., LTD. (33.3%)

72 Inventor/es:

SAITO, AKIHIKO;
TOMINO, YASUHIKO;
ASANUMA, KATSUHIKO;
OGASAWARA, SHINYA;
KUROSAWA, HIROYUKI y
HIRAYAMA, YOSHIAKI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 532 333 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

Uso de megalina en orina como marcador para la detección de nefropatía por IgA

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al uso de megalina urinaria humana para el diagnóstico de nefropatía por IgA.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La megalina es una glucoproteína expresada en las células epiteliales tubulares renales proximales con un peso molecular de aproximadamente 600 kDa. Es también conocida como glucoproteína 330 (gp330) o proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 2 (LDL) (LRP2) (documentos no de patente 1 y 2).

La megalina sirve como receptor endocítico asociado a la endocitosis/resorción de una proteína o similar en el lumen tubular proximal del riñón antes de la excreción urinaria. Se degrada entonces un ligando de la proteína resorbida o similar por un lisosoma en las células epiteliales tubulares proximales (documento no de patente 3).

Clínicamente, un paciente con nefropatía diabética está aquejado en primer lugar por diabetes, y el paciente desarrolla entonces microalbuminuria, que conduce a una proteinuria continuada y después a insuficiencia renal terminal. Se presenta una investigación que destaca la importancia de la hiperfiltración glomerular y la microalbuminuria como cuadros clínicos que aparecen en una etapa temprana de la nefropatía. Específicamente, se conocía que los pacientes con diabetes de tipo I exhiben aumentos del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular en la fase temprana de la enfermedad, se destacó entonces el desarrollo de microalbuminuria como un cambio de fase temprana que da como resultado el desarrollo futuro de nefropatía, y se propuso el concepto de etapa temprana de nefropatía. Además, se descubrió que la cantidad de albúmina excretada en la orina aumentaba a niveles anormales en esta etapa, aunque no conducía al desarrollo de proteinuria. Por tanto, dicho síntoma se designó como "microalbuminuria" (documento no de patente 4).

Después de ello, se estableció la importancia clínica de la "microalbúmina" por Mogensen C. E., Viberti G. C. *et al.*, y la presencia de microalbuminuria está fuertemente correlacionada con la progresión posterior a nefropatía. Por tanto, se usa la microalbúmina para diagnóstico clínico actualmente. Se ha reseñado que la microalbuminuria está causada por el equilibrio y fallo de funciones de filtración glomerular y resorción tubular (documentos no de patente 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

Se ha reseñado también que la resorción tubular de albúmina está causada por endocitosis mediada por megalina (documentos no de patente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19).

Cuando un trastorno renal progresa desde microalbuminuria, se desarrolla una proteinuria continuada (concretamente proteinuria manifiesta). En esta etapa, se encuentran resultados positivos de proteinuria continuamente con el uso de una prueba de tira de papel, y la enfermedad se vuelve detectable por chequeos médicos en esta etapa.

Según el informe de Araki S. *et al.*, los resultados de un estudio de seguimiento de 6 años del tratamiento de 216 casos de nefropatía en etapa temprana demostraron que un 51 % de los casos exhibían remisión de la nefropatía (concretamente, mejoraron a albuminuria normal), que apareció con más frecuencia que la progresión (concretamente, progresión hasta nefropatía manifiesta, 28 %) (documento no de patente 22).

Como resultado del análisis, se han ejemplificado 4 factores asociados a la remisión: (i) una duración corta después del desarrollo de microalbuminuria; (ii) el uso de un inhibidor del sistema de renina-angiotensina, (iii) una presión sanguínea sistólica baja y (iv) suficiente control del azúcar en sangre. Específicamente, el diagnóstico temprano, reconocimiento de condiciones patológicas y gestión terapéutica de los trastornos renales se consideran importantes para prevenir el avance de la nefropatía diabética. Son procedimientos de tratamiento básicos para nefropatía diabética (1) control del azúcar en sangre, (2) control de la presión sanguínea, (3) supresión del sistema de renina-angiotensina, (4) control de lípidos, (5) terapia alimentaria (restricción de la toma de sal y proteínas) y (6) mejora de las costumbres del estilo de vida, tales como abstinencia del tabaco. Para inhibir el desarrollo y progresión de la nefropatía, es necesario un tratamiento preciso y activo basado en evidencias logradas por estudios clínicos. Respecto al control del azúcar en sangre, se han logrado evidencias por DCCT, UKPDS y el estudio de Kumamoto de que ha sido importante para la prevención de la progresión de nefropatía. Respecto a la importancia del control de la presión sanguínea, se han acumulado muchas evidencias, incluyendo sobre inhibidores de ACE y ARB.

Entre los síntomas de glomerulonefritis crónica, en contraposición, se observan proliferación de células mesangiales glomerulares, agrandamiento de la matriz mesangial (hiperplasia) y depósitos granulares (principalmente de IgA) en la región mesangial en el caso de nefropatía por IgA. El diagnóstico de nefropatía por IgA se confirma por biopsia renal. La nefropatía por IgA se detecta a menudo basándose en anomalías

urinarias asintomáticas. La hematuria microscópica continua es inevitable, y se observan ocasionalmente proteinuria intermitente o continua y hematuria macroscópica. La hematuria macroscópica aparece a menudo con infección aguda del tracto respiratorio superior. El diagnóstico de anormalidad urinaria requiere al menos tres casos de análisis de orina y al menos dos de estos casos implican la visualización microscópica de sedimentos urinarios, que se realizan además del análisis cualitativo general de orina. Se observan altos niveles séricos de IgA de 315 mg/dl o mayores en la mitad de los pacientes. No debería despreciarse una anormalidad urinaria asintomática leve. Los datos de laboratorio sobre nefropatía por IgA son útiles para la evaluación de la actividad y progresión de trastornos renales. Se observa solo hematuria en la etapa temprana, y la proteinuria se desarrolla junto con la progresión de etapas de la enfermedad. Los ejemplos de factores desfavorables incluyen alta presión sanguínea, evolución de proteinuria leve a alta y disfunción renal observada en el primer examen médico. Por tanto, son necesarios una evaluación integral de los diversos datos de laboratorio y un tratamiento adecuado de acuerdo con la actividad de glomerulonefritis y progresión del trastorno renal. Puesto que la nefropatía por IgA se detecta a menudo accidentalmente por proteinuria/hematuria, se requiere en primer lugar un diagnóstico diferencial de hematuria. Se efectúa entonces una biopsia renal como diagnóstico definitivo. Existen contraindicaciones implicada en la biopsia renal, y existen muchas restricciones. En el ámbito clínico actual, la biopsia renal no puede efectuarse en muchos casos y, actualmente, no existe una indicación sólida exacta de si debería llevarse a cabo o no biopsia renal. En la biopsia renal para diagnóstico definitivo, se evalúan los síntomas de glomeruloesclerosis de focales y segmentados a difusos y globales (esféricos) con el uso de cambios proliferativos mesangiales como indicadores en datos de microscopía óptica, y se evalúan los síntomas de glomeruloesclerosis difusa con el uso de deposición de IgA granular principalmente en la región mesangial como indicador para el procedimiento de anticuerpo de agente fluorescente o procedimiento de anticuerpo de enzima (concretamente, IgA es dominante sobre las demás inmunoglobulinas). Se realiza la evaluación con la deposición de sustancias de alta densidad electrónica en la matriz mesangial (centrada en la región paramesangial, en particular) como indicador para datos de microscopía electrónica. Se determina el pronóstico basado en la biopsia renal basándose en los datos histológicos de las imágenes de microscopía óptica de muestras de biopsia renal, y se dividen los pacientes en los siguientes 4 grupos.

1) Grupo de buen pronóstico: el grupo con poca probabilidad de progresión hasta terapia de diálisis.

Datos glomerulares: se observa una proliferación leve de células mesangiales y matriz aumentada. No se observa glomeruloesclerosis, formación de medias lunas ni adhesión a la cápsula de Bowman.

Datos tubulares, intersticiales y vasculares: no se observan cambios destacados en el túbulo renal, el intersticio ni los vasos sanguíneos.

2) Grupo de pronóstico relativamente bueno: el grupo con menos probabilidad de progresión hasta terapia de diálisis.

Datos glomerulares: se observa una proliferación leve de células mesangiales y matriz aumentada. Se observan glomeruloesclerosis, formación de medias lunas y adhesión a la cápsula de Bowman en menos de un 10 % de los glomérulos de la biopsia.

Datos tubulares, intersticiales y vasculares: no se observan cambios destacados en el túbulo renal, el intersticio ni los vasos sanguíneos.

3) Grupo de pronóstico relativamente malo: el grupo con probabilidad de transición hasta terapia de diálisis en 5 a 20 años.

Datos glomerulares: se observan proliferación moderada de células mesangiales y matriz aumentada. Se observan glomeruloesclerosis, formación de medias lunas y adhesión a la cápsula de Bowman en 10 a 30 % de los glomérulos de la biopsia.

Datos tubulares, intersticiales y vasculares: se observan una ligera atrofia tubular, ligera infiltración celular en el intersticio, excepto alrededor de algunos glomérulos esclerosados, y una leve esclerosis vascular en los vasos sanguíneos.

4) Grupo de mal pronóstico: el grupo con probabilidad de transición hasta terapia de diálisis al cabo de 5 años.

Datos glomerulares: se observan proliferación grave de células mesangiales y matriz aumentada. Se observan glomeruloesclerosis, formación de medias lunas y adhesión a cápsula de Bowman en un 30 % o más de los glomérulos de biopsia. Cuando los sitios de esclerosis se suman y se convierten en esclerosis global, adicionalmente la tasa de glomeruloesclerosis es de 50 % o más. Se observa ocasionalmente hipertrofia glomerular compensatoria.

Datos tubulares, intersticiales y vasculares: se observan atrofia tubular, infiltración celular intersticial y fibrosis graves. Se observa ocasionalmente hiperplasia o degeneración en algunas paredes arteriolas renales.

La base para la medicación de nefropatía por IgA es una selección del fármaco adecuado para las condiciones patológicas de cada paciente. La terapia con esteroides corticosteroides es adecuada para un caso con aclaramiento de creatinina (Ccr) de 70 ml/min o superior, proteína urinaria de 1 a 2 g/día y síntomas de inflamación

aguda detectados por la biopsia renal como síntomas principales. En contraposición, la terapia farmacológica que implica el uso de inhibidores del sistema de renina-angiotensina o aceite de pescado se selecciona para casos que implican principalmente lesiones crónicas y que exhiben una progresión lenta. Las funciones renales de los pacientes del grupo de mal pronóstico que exhiben una disfunción renal moderada o grave y que implican principalmente lesión esclerosante crónica no pueden mantenerse solo mediante terapia de esteroides durante un largo periodo de tiempo, y se ha esperado el desarrollo de técnicas terapéuticas eficaces capaces de mejorar el pronóstico de las funciones renales. Además, se emplea ocasionalmente el uso de agentes antiplaquetarios, terapia anticoagulante, terapia de Kurernejin, terapia de tonsilectomía o similares. La nefropatía por IgA aparece a corta edad, y un 30 a 40 % de los pacientes desarrollan insuficiencia renal terminal. Las cargas económicas y sociales son importantes cuando un paciente tiene que empezar el tratamiento de diálisis a corta edad. Como se describe anteriormente, no existen indicadores exactos y precisos de diagnóstico diferencial o predicción del pronóstico que posibilite el diagnóstico de nefropatía por IgA actualmente.

El número de paciente con insuficiencia renal terminal que necesitan diálisis está creciendo en todo el mundo, y es un problema grave en términos de economía médica. La predicción y el diagnóstico de condiciones patológicas de los trastornos renales y, en particular, nefropatía diabética o nefropatía por IgA, son los más críticos para proporcionar un tratamiento adecuado. Sin embargo, la exactitud de las técnicas de diagnóstico convencionales es insuficiente para una predicción del pronóstico o diagnóstico de la graduación del trastorno.

En la etapa precedente a nefropatía diabética, no se observa microalbuminuria en la orina, y la nefropatía no puede detectarse basándose en datos clínicos actuales. Se deduce que aparece una albuminuria mínima en la etapa temprana de la nefropatía. Incluso si las funciones renales son normales, o a veces aceleradas, pueden estar presentes lesiones nodulares en los glomérulos en esta etapa. Por tanto, sigue siendo problemático si la microalbuminuria es útil o no como indicador del diagnóstico temprano de nefropatía diabética. En los últimos años, se ha encontrado un caso de trastorno renal rápidamente progresivo que conduce a insuficiencia renal (nefropatía diabética de etapa IV) sin la etapa de albuminuria manifiesta (nefropatía diabética de etapa III (etapa de nefropatía manifiesta)) en los grupos de pacientes de nefropatía diabética que exhiben microalbuminuria (nefropatía diabética de etapa II; etapa temprana de nefropatía). Por tanto, se ha discutido la posible naturaleza problemática de la importancia clínica del uso de la albuminuria para la predicción del pronóstico de una enfermedad renal y para el diagnóstico preciso y temprano de la graduación del trastorno (progresión de condiciones patológicas) como indicador (Perkins B. A., Krolewski A. S. *et al.*, 2007, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (4), 1353-1361; de Boer I. H., Steffes M. W., 2007, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (4), 1036-1037).

El pronóstico de nefropatía por IgA se clasifica histológicamente basándose en los datos de la biopsia renal, y se usan los resultados para predicción del pronóstico y determinación del curso de tratamiento. Sin embargo, existen algunas restricciones sobre la biopsia renal, y la aplicación de biopsia renal está limitada a los siguientes casos: i) se observa 1,0 g o más de proteína en orina al día; ii) aunque se observa un trastorno renal de etiología desconocida, no se observa atrofia renal mediante una prueba de formación de imágenes; iii) se sospecha glomerulonefritis crónica con hematuria continua y progresiva y iv) se reducen rápidamente las funciones renales. Por su lado, las contraindicaciones de la biopsia renal son las siguientes: i) ya se ha observado atrofia renal mediante la prueba de formación de imágenes debido a disfunciones renales crónicas; ii) es difícil detener la hemorragia debido a la tendencia a sangrar o una hipertensión sanguínea incontrolable; iii) el paciente tiene un riñón poliquístico y iv) el paciente no puede mantenerse quieto o seguir las instrucciones durante la biopsia renal o durante y después del ensayo. En el ámbito clínico actual, la biopsia renal no puede efectuarse en muchos casos, y no existen actualmente indicadores exactos y definitivos para la determinación de si la biopsia renal debería efectuarse o no.

Además de los trastornos renales crónicos representados por la nefropatía diabética y la nefropatía por IgA descritos anteriormente, la lesión renal aguda (AKI) ha atraído la atención y se ha convertido en un tema de interés. Respecto a la AKI, las anomalías funcionales de la hemodinámica renal se han considerado como críticas, además de las anomalías estructurales (concretamente, necrosis tubular aguda) en los últimos años.

El término "insuficiencia renal aguda" hace referencia a una afección en que las funciones renales se reducen rápidamente, y muchos casos de insuficiencia renal aguda se caracterizan por funciones renales reducidas causadas por necrosis tubular. Las causas de la insuficiencia renal aguda incluyen insuficiencia renal prerrenal, insuficiencia renal intrínseca e insuficiencia renal postrenal. La insuficiencia renal prerrenal aparece cuando el riñón se expone a isquemia mediante un volumen de fluido extracelular reducido debido a hemorragia por lesión, deshidratación, vómitos y diarrea, volumen de sangre en circulación eficaz reducido debido a choque cardiogénico y flujo sanguíneo renal reducido debido a aneurisma disecante de aorta o trombosis arterial renal. La insuficiencia renal intrínseca es un trastorno impuesto directamente al tejido renal, tal como en enfermedades glomerulares (por ejemplo, glomerulonefritis aguda, glomerulonefritis rápidamente progresiva y poliarteritis nodular), necrosis tubular aguda (causada por el uso de un antibiótico aminoglucosídico, un agente antiinflamatorio y analgésico, un agente antitumoral o medio de contraste), o glomerulonefritis intersticial aguda (causada por el uso de un antibiótico β -lactámico, un agente antiinflamatorio o analgésico o un anticonvulsivo). En el caso de insuficiencia renal postrenal, se obstruye el flujo de orina y se evita la excreción de orina por obstrucción ureteral (cálculo ureteral), obstrucción vesical y uretral (hipertrofia prostática y cáncer de próstata) o tumores pélvicos.

Muchos daños renales agudos requieren controles de UCI después de cardiotoromía y cirugía de reemplazo de aorta, y se requiere el reconocimiento de las condiciones patológicas cada hora después del desarrollo de la enfermedad. Actualmente, no puede esperarse una mejora del pronóstico vital de insuficiencia renal aguda sin un diagnóstico temprano e intervención inmediata.

Actualmente, la insuficiencia renal aguda se diagnostica en general basándose en los niveles de creatinina en suero y orina; sin embargo, el diagnóstico basado en estos dos elementos tiene un problema. Es decir, no se han establecido estándares de diagnóstico para estos dos elementos, y había 35 definiciones diferentes de insuficiencia renal aguda. Para resolver este problema, se estableció la red de insuficiencia renal aguda como un esfuerzo global y se propusieron estándares de diagnóstico para insuficiencia renal aguda. Según estos estándares de diagnóstico, una persona se diagnostica que tiene insuficiencia renal aguda cuando (1) el nivel de creatinina en suero aumenta 1,5 veces o más o es de 0,3 mg/dl o más y (2) una oliguria de 0,5 ml/kg/hora continúa durante 6 horas o más. Como con el caso de la clasificación de la etapa de enfermedad renal crónica, se propone en particular la clasificación de la etapa de insuficiencia renal aguda (por ejemplo, clasificación RIFLE o AKIN).

Sin embargo, el diagnóstico basado en los dos elementos descritos anteriormente sigue teniendo problemas. El nivel de creatinina en suero no se eleva inmediatamente cuando se reduce la tasa de filtración glomerular debido a un trastorno renal. El nivel de creatinina en suero continúa aumentando ocasionalmente durante un tiempo aunque la tasa de filtración glomerular tenga tendencia a la recuperación. Por tanto, la utilidad del nivel de creatinina en suero como marcador temprano para monitorizar cambios agudos o marcador para monitorizar los efectos terapéuticos o la predicción del pronóstico no puede decirse que sea satisfactoria. Además, el nivel de creatinina en suero es probable que esté influido por factores extrarrenales, tales como peso corporal, raza, sexo, fármacos, metabolismo muscular o condiciones nutricionales. Puesto que el diagnóstico basado en el nivel de orina lleva un largo tiempo, tampoco es adecuado para marcador de insuficiencia renal aguda, que requiere el reconocimiento de las condiciones patológicas cada hora después del desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, es una necesidad urgente el desarrollo de un biomarcador que posibilite una medida temprana sencilla, sea menos probable que se influya por otros factores biológicos y posibilite una detección temprana, clasificación del riesgo y predicción del pronóstico de una enfermedad.

El documento EP 2.006.683A1 da a conocer un procedimiento que puede aplicarse al diagnóstico de enfermedad renal o pulmonar mediante la detección de megalina humana, comprendiendo dicho procedimiento detectar cuantitativamente megalina que se expresa tópicamente y específicamente en células, tejidos y órganos donde se observa expresión de megalina de manera rápida y sencilla, para posibilitar así un diagnóstico directo y temprano del grado en que las células, tejidos y órganos están afectados y mejorar y evitar el empeoramiento de las condiciones de los trastornos y el pronóstico mediante tratamiento.

Documentos de la técnica anterior

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: WO 2007/119563

[Documentos no de patente]

Documento no de patente 1: Christensen E. I., Willnow T. E., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236

Documento no de patente 2: Zheng G., McCluskey R. T. *et al.*, 1994, J. Histochem. Cytochem. 42, 531-542

Documento no de patente 3: Mausbach A. B., Christensen E. I., 1992, "Handbook of physiology : Renal Physiology", Windhager, editor, Nueva York, Oxford University Press, 42-207

Documento no de patente 4: Keen R., Chlouverakis C., 1963, Lancet II, 913-916

Documento no de patente 5: Tojo A., Endou H. *et al.*, 2001, Histochem. Cell. Biol. 116 (3), 269-276

Documento no de patente 6: Tucker B. J., Blantz R. C. *et al.*, 1993, J. Clin. Invest. 92 (2), 686-694

Documento no de patente 7: Evangelista C., Capasso G. *et al.*, 2006, G. Ital. Nefrol. 34, S16-20

Documento no de patente 8: Pollock C. A., Poronnik P., 2007, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 16 (4), 359-364

Documento no de patente 9: Rippe C., Rippe B. *et al.*, 2007, Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 293 (5), F1533-1538

Documento no de patente 10: Blanz R. C., Thomson S. C. *et al.*, 2007, Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 118, 23-43

Documento no de patente 11: Hosojima M., Saito A. *et al.*, 2008, Endocrinology, 16

Documento no de patente 12: Baines R. J., Brunskill N. J., 2008, Nephron. Exp. Nephrol. 110 (2), e67-71

Documento no de patente 13: Motoyoshi Y., Ichikawa I. *et al.*, 2008, Kidney. Int. 74 (10), 1262-1269

Documento no de patente 14: Vegt E., Boerman O. C. *et al.*, 2008, J. Nucl. Med. 49 (9), 1506-1511

Documento no de patente 15: Haraldsson B., Deen W. M. *et al.*, 2008, 88 (2), 451-487

Documento no de patente 16: Odera K., Takahashi R. *et al.*, 2007, 8 (5), 505-515

Documento no de patente 17: Brunskill N., 2001, Am. J. Kidney. Dis. 37, S17-20

Documento no de patente 18: Cui S., Christensen E. I. *et al.*, 1996, Am. J. Physiol. 271, F900-7

Documento no de patente 19: Saito A., Gejyo F. *et al.*, 2005, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1043, 637-643

Documento no de patente 20: Perkins B. A., Krolewski A. S. *et al.*, 2007, J. Am. Soc. Nephrol. 18 (4), 1353-1361

Documento no de patente 21: de Boer I. H., Steffes M. W., 2007, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (4), 1036-1037
 Documento no de patente 22: Araki S., Sugimoto T. *et al.*, 2005, *Diabetes*, 54, 2983-2987
 Documento no de patente 23: Tojo A., Fujita T. *et al.*, 2003, *Hypertens. Res.* 26 (5), 4 J3-419

5 DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona el uso de megalina urinaria humana como marcador para detectar nefropatía por IgA.

10 Como se describe anteriormente, se esperaba el desarrollo de un marcador de detección novedoso usado para la predicción del pronóstico de un trastorno renal y para el dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas) y de un procedimiento para detectar un trastorno renal usando dicho marcador en una etapa temprana. Sin embargo, no había dichos marcadores ni procedimientos de detección en el pasado. Dicho marcador posibilita la predicción del pronóstico de un trastorno renal y un dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas), y dicho marcador posibilita también atenciones preventivas dirigidas a la inhibición del desarrollo y progresión del trastorno renal progresivo.

20 Los presentes inventores han realizaron estudios concentrados para desarrollar un marcador novedoso usado para la predicción del pronóstico de un trastorno renal y un dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas). Como resultado, descubrieron un biomarcador al que se hace referencia como "megalina", que aparece en la orina cuando la condiciones patológicas empeoran en nefropatía diabética, que exhibe una alta incidencia con mal pronóstico y, en particular, en trastornos renales progresivos tales como nefropatía por IgA. Específicamente, descubrieron que la cantidad de megalina excretada en la orina de un paciente con un trastorno renal progresivo, tal como nefropatía por IgA, era mayor que la de un individuo sano, y por tanto era útil como marcador para predicción del pronóstico de un trastorno renal o diagnóstico de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas). Además, los presentes inventores han desarrollado un kit de detección (no reivindicado) para detectar trastornos renales y, en particular nefropatía por IgA, con el uso de megalina como marcador. Cuando se usa dicho kit, se recoge una muestra de orina, se mide cuantitativamente el nivel de megalina humana en la orina con el uso de un reactivo de detección y se usa el nivel de excreción urinaria determinado como indicador de la predicción del pronóstico de un trastorno renal o diagnóstico de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas). Con el uso de este kit de diagnóstico, pueden reconocerse las condiciones patológicas de un trastorno renal. La predicción del pronóstico de un trastorno renal y, en particular nefropatía por IgA, o diagnóstico de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas) era difícil en el pasado. Sin embargo, el kit de diagnóstico de la divulgación posibilita la predicción o monitorización de los efectos terapéuticos y la provisión de procedimientos terapéuticos más eficaces.

Específicamente, la presente invención se define en las reivindicaciones.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra los resultados de la medida de la cantidad de megalina humana excretada en la orina (valor de corrección de creatinina) en casos de nefropatía diabética de tipo II (71 casos), nefropatía por IgA (81 casos) y síndrome nefrótico (18 casos).

La Fig. 2 muestra los resultados de la medida de la cantidad de megalina humana excretada en la orina (valor de corrección de creatinina) en otros varios casos de nefropatía.

La Fig. 3 muestra los resultados de la medida de la cantidad de megalina humana excretada en la orina (valor de corrección de creatinina) en casos de nefropatía por IgA (59 casos) basándose en la clasificación por pronóstico histológico (pronóstico conseguido mediante la clasificación histológica de biopsias renales).

La Fig. 4 muestra los resultados de la medida de la cantidad de megalina humana excretada en la orina (valor de corrección de creatinina) en casos de nefropatía diabética de tipo II (71 casos) clasificados de acuerdo con la clasificación de albuminuria (clasificación basada en la gravedad del trastorno) de acuerdo con la estadificación de la nefropatía diabética.

La Fig. 5 muestra la correlación entre la concentración de albúmina en orina (valor de corrección de creatinina) y la concentración de megalina humana en orina (valor de corrección de creatinina) en casos de individuos sanos (66 casos) y en casos de nefropatía diabética de tipo II (71 casos) de acuerdo con la estadificación de la nefropatía diabética.

La Fig. 6 muestra la compatibilidad de la concentración de megalina humana en orina (valor de corrección de creatinina) con la tasa de filtración glomerular aparente de acuerdo con la estadificación de la nefropatía diabética en casos de nefropatía diabética de etapas I a III (68 casos).

La Fig. 7 muestra la compatibilidad de la concentración de albúmina en orina (valor de corrección de creatinina) con la tasa de filtración glomerular aparente de acuerdo con la estadificación de la nefropatía diabética en casos de nefropatía diabética de etapas I a III (68 casos).

La Fig. 8 muestra los resultados de la medida de la cantidad de megalina humana excretada en la orina (valor de corrección de creatinina) en casos de pacientes con insuficiencia renal aguda. Las enfermedades subyacentes del grupo de trastornos renales agudos (5 casos) son: 1: infarto cerebral, 2: choque séptico causado por necrosis intestinal, 3: trasplante de hígado, 4: neumonía aguda e insuficiencia respiratoria y 5: choque cardiogénico.

REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

De aquí en adelante, se describe la presente invención con detalle.

La presente invención implica el uso de megalina humana en una muestra de orina como marcador para un trastorno renal. El trastorno renal es nefropatía por IgA.

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia nucleotídica de la megalina humana y la SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia aminoácídica de la megalina humana. La megalina humana en orina puede medirse mediante cualquier técnica. Por ejemplo, puede usarse un ligando capaz de unirse a megalina humana.

Según una realización, se usan dos ligandos capaces de unirse a megalina humana, el primer ligando se une a un soporte sólido y el segundo ligando se marca y se usa.

Puede usarse cualquier soporte sólido que se use en técnicas inmunoanalíticas convencionales. Por ejemplo, pueden usarse preferiblemente pocillos de una placa de microvaloración de plástico o partículas magnéticas. Es un ejemplo de ligando capaz de unirse a megalina humana un anticuerpo anti-megalina humana, y puede usarse un anticuerpo monoclonal o policlonal. La lectina, que es específica de una cadena de azúcar de la megalina humana, puede usarse como ligando capaz de unirse a megalina humana. Los ejemplos de lectina incluyen, pero sin limitación, concanavalina A, aglutinina de germen de trigo (WGA), lectina de *Ricinus communis* (RCA) y lectina de *Lens culinaris* (LCA). Los ejemplos adicionales de ligandos capaces de unirse a megalina humana incluyen sustancias seleccionadas del siguiente grupo de sustancias o fragmentos capaces de unirse a la misma: proteínas de unión a vitamina tales como transcobalamina-vitamina B12, proteína de unión a vitamina D y proteína de unión a retinol; lipoproteínas tales como apolipoproteína B, apolipoproteína E, apolipoproteína J/clusterina y apolipoproteína H; hormonas y receptores de hormonas, tales como hormona paratiroidea (PTH), insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), prolactina, leptina y tiroglobulina, y receptores de las mismas; proteínas asociadas a la respuesta inmunitaria y al estrés tales como cadena ligera de inmunoglobulina y PAP-1 o β_2 -microglobulina; enzimas e inhibidores enzimáticos tales como PAI-I, PAI-I-urocinasa, PAI-I-tPA, prourocinasa, lipoproteína lipasa, plasminógeno, α -amilasa, β -amilasa, α_1 -microglobulina y lisozima, e inhibidores de los mismos; fármacos y venenos tales como aminoglucósido, polimixina B, aprotinina y tricosantina; proteínas portadoras tales como albúmina, lactoferrina, hemoglobina, proteína de unión sustancias odoríferas, transtiretina y L-FABP; y proteínas asociadas a receptor (RAP) tales como citocromo c, calcio (Ca^{2+}), productos finales de glicación avanzada (AGE), cubilina e isoforma 3 intercambiadora de $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE3). El término "fragmento capaz de unirse a" hace referencia a un fragmento de una sustancia anteriormente mencionada que contiene un sitio de unión a megalina humana.

Un anticuerpo anti-megalina humana o similar puede unirse a un soporte sólido de un ligando capaz de unirse a megalina humana mediante un procedimiento bien conocido en la técnica hasta ahora. Cuando un anticuerpo anti-megalina humana se une a un pocillo de una placa de microvaloración, puede aplicarse, por ejemplo una solución que comprende aproximadamente 3 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo (y preferiblemente aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$) respecto a un ligando capaz de unirse a megalina humana, a un soporte sólido y dejarse reposar entonces el resultado a 4 °C durante una noche (y preferiblemente 12 horas o más). El intervalo de concentración recomendado de soporte sólido descrito anteriormente se determinó teóricamente al inmovilizar un anticuerpo completo en un soporte sólido. La fórmula teórica es como sigue, y se emplea cuando se inmoviliza un anticuerpo mediante adsorción física:

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

Q: densidad del peso molecular (ng/cm²)

MW: peso molecular (dalton: Da)

N: número de Avogadro = $6 \cdot 10^{23}$ (mol⁻¹)

r: radio de Stokes de la molécula = $(R \cdot T_{20}) / (6 \cdot \pi \cdot \eta_{20} \cdot D_{20} \cdot N)$ (cm)

R: constante de los gases = $8,3 \cdot 10^7$ (g·cm²·s⁻²·°K⁻¹·mol⁻¹)

T₂₀: temperatura ambiente (20 °C) = 293 °K

η_{20} : viscosidad del agua a 20 °C = $1 \cdot 10^{-2}$ (g·cm⁻¹·s⁻¹)

D₂₀: coeficiente de difusión de la referencia molecular en agua a 20 °C (cm²·s⁻¹)

Cuando se inmoviliza un ligando capaz de unirse a megalina humana, se determinan en consecuencia las concentraciones teóricas de soportes sólidos influidas por factores variables tales como el peso molecular individual, y las concentraciones varían dependiendo de la especie molecular del soporte sólido individual y de las configuraciones de la superficie del soporte sólido. Por tanto, la concentración del soporte sólido no está limitada al intervalo descrito anteriormente. Cuando la adsorción al soporte sólido es el resultado de unión covalente, es aplicable la presente invención. Sin embargo, en dicho caso se tienen en consideración el número de grupos funcionales existentes sobre la superficie de adsorción y usados para unión covalente y otras condiciones. Por tanto, la concentración de soporte sólido no está limitada. Para bloquear la adsorción no específica de proteína después de la unión, se lleva a cabo el bloqueo con el uso de seroalbúmina bovina (abreviada de aquí en adelante como "BSA"), caseína o similar de acuerdo con una técnica convencional. Cuando el soporte sólido es una partícula magnética, se lleva a cabo el mismo procedimiento que el usado con el caso de placa de microvaloración.

Se deja reaccionar un ligando capaz de unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana unido a un soporte sólido como se describe anteriormente, con una muestra de orina, y se une la megalina humana en la muestra de orina con un soporte sólido a través del ligando capaz de unirse a megalina humana unido a un soporte sólido mediante reacción de unión ligando-receptor, tal como una reacción antígeno-anticuerpo. Específicamente, se forma un combinado del primer ligando capaz de unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana unido a un soporte sólido, con megalina humana. Esta reacción antígeno-anticuerpo puede llevarse a cabo preferiblemente a 4 a 45 °C, más preferiblemente a 20 a 40 °C y más preferiblemente a 25 a 38 °C. La duración de la reacción es preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a 18 horas, más preferiblemente de 10 minutos a 1 hora, y preferiblemente además de 30 minutos a 1 hora.

Después de lavar, se deja reaccionar entonces el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana con megalina humana en la muestra unido a un soporte sólido. Específicamente, se forma un combinado del primer ligando capaz de unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana unido a un soporte sólido, megalina humana y el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana. Puede usarse un anticuerpo anti-megalina humana u otra sustancia como segundo ligando capaz de unirse a megalina humana, como con el caso del primer ligando capaz de unirse a megalina humana. Cuando tanto el primer ligando capaz de unirse a megalina humana como el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana son anticuerpos monoclonales anti-megalina humana, sin embargo, el epítipo reconocido y unido por el primer anticuerpo anti-megalina humana debería ser diferente del reconocido y unido por el segundo anticuerpo anti-megalina humana. Las combinaciones de primer anticuerpo anti-megalina humana y segundo anticuerpo anti-megalina humana pueden ser cualquiera de las siguientes: 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 preferiblemente a 4 a 45 °C, más preferiblemente a 20 a 40 °C y además preferiblemente a 25 a 30 °C. La duración de la reacción es preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a 18 horas, más preferiblemente de 10 minutos a 1 hora, y además preferiblemente de 30 minutos a 1 hora. Por tanto, el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana puede unirse a un soporte sólido a través de megalina humana y el primer ligando capaz de unirse a megalina humana.

Después de lavar, se mide entonces el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana, tal como el segundo anticuerpo anti-megalina humana, unido a un soporte sólido mediante diversas técnicas que se usan comúnmente en el campo del inmunoanálisis. Por ejemplo, el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana se marca con una enzima, marcador fluorescente, biotina o marcador radiactivo para preparar una sustancia marcada enzimáticamente, y se mide el marcador. Por tanto, puede medirse el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana unido a un soporte sólido. El marcaje con una enzima o marcador fluorescente es particularmente preferible. Los ejemplos de enzimas incluyen, pero sin limitación, peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y glucosa oxidasa. Es un ejemplo de marcador fluorescente el isotiocianato de fluoresceína (FITC), aunque los marcadores fluorescentes no están limitados al mismo. El marcaje puede detectarse dejando reaccionar el correspondiente sustrato con una sustancia marcada enzimáticamente y midiendo un pigmento, marcador fluorescente, luminiscente o similar resultante de la reacción. Cuando el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana no está marcado, como alternativa, se deja reaccionar un tercer anticuerpo marcado que reacciona con el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana, y se mide el tercer anticuerpo basándose en dicho marcaje. Por tanto, puede medirse el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana.

El anticuerpo anti-megalina humana usado para inmovilización o marcaje puede ser un fragmento de inmunoglobulina específico de megalina humana, tal como Fab o $F(ab')_2$, o un anticuerpo recombinante tal como scFv, dsFv, diacuerpo o minicuerpo, que se ha expresado en una sustancia recombinante. El término "anticuerpo" usado en la presente invención hace referencia también a dicho fragmento específico de megalina humana. Es bien conocido en la técnica un procedimiento para preparar dicho fragmento.

El procedimiento anterior comprende dos etapas: dejar reaccionar el primer ligando capaz de unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana unido a un soporte sólido, con una muestra seguida de lavado, y dejar reaccionar entonces el segundo ligando capaz de unirse a megalina humana con el mismo. Como alternativa, puede llevarse a cabo simultáneamente como etapa individual una etapa de dejar reaccionar el primer ligando capaz de unirse a megalina humana, tal como un anticuerpo anti-megalina humana unido a un soporte

sólido, con una muestra, y una etapa de dejar reaccionar el segundo ligando capaz de unirse a una muestra y megalina humana.

La presente divulgación incluye también un procedimiento para medir megalina humana en una muestra usando megalina humana unida a un soporte sólido o un fragmento parcial de la misma y un ligando capaz de unirse a megalina humana, en el que se deja reaccionar una muestra con un ligando capaz de unirse a megalina humana, se deja reaccionar el producto de reacción con la megalina humana unida a un soporte sólido, se mide el ligando capaz de unirse a megalina humana unido a un soporte sólido y se cuantifica competitivamente la megalina humana en una muestra basándose en la reducción del ligando capaz de unirse a megalina humana unida a un soporte sólido. Para implantar este procedimiento, es necesario unir megalina humana a un soporte sólido, y esto puede llevarse a cabo mediante el procedimiento de unión de una sustancia a un soporte sólido como se describe anteriormente. El fragmento parcial de megalina humana no está limitado, y puede usarse un fragmento parcial de megalina humana al que pueda unirse un ligando capaz de unirse a megalina humana. Puede prepararse un fragmento parcial de megalina humana a partir de una secuencia parcial de la secuencia aminoácida de megalina humana como se muestra en la SEQ ID NO: 2 mediante síntesis química o ingeniería genética. Pueden usarse ligandos capaces de unirse a megalina humana descritos anteriormente, siendo particularmente preferible un anticuerpo anti-megalina humana. En la técnica competitiva, es importante la cantidad de megalina humana unida a un soporte sólido para usar o de fragmento parcial de megalina humana y ligando capaz de unirse a megalina humana. Puesto que es conocida la técnica competitiva, puede determinarse adecuadamente un procedimiento basándose en una técnica convencional.

Adicionalmente, la presente divulgación incluye un procedimiento para medir megalina humana en una muestra usando un ligando capaz de unirse a megalina humana, que comprende dejar reaccionar una muestra con un ligando capaz de unirse a megalina humana unido a una partícula, causando una reacción de aglutinación, y medir la megalina humana basándose en el grado de aglutinación resultante.

Los ejemplos de partículas usadas en dicho procedimiento incluyen partículas de látex que tienen cada una un diámetro de 0,05 a 10 μm y preferiblemente de 0,1 a 0,4 μm y partículas de gelatina y eritrocitos sanguíneos animales que tienen cada uno un diámetro de 0,5 a 10 μm . Los procedimientos de unión de un anticuerpo a una partícula son bien conocidos en la materia, y puede usarse adsorción física o unión covalente.

En el procedimiento anteriormente descrito, se mezclan las partículas con las que se ha unido anticuerpo anti-megalina humana con la muestra, por ejemplo sobre un portaobjetos de vidrio negro, y se observan las partículas precipitadas tras aglutinación. Por tanto, puede detectarse la megalina humana en la muestra. Midiendo la absorbancia de dicha aglutinación, puede cuantificarse la megalina humana. Adicionalmente, la detección puede llevarse a cabo mediante inmunoensayo por pulsos.

Según el procedimiento de medida de megalina humana de la presente divulgación, pueden medirse fragmentos de megalina humana además de megalina humana intacta.

Puede detectarse un trastorno renal usando megalina humana en orina recogida de un sujeto que es un paciente con nefropatía por IgA como marcador. Se observa una cantidad aumentada de megalina excretada en la orina en una etapa temprana de la nefropatía, y por tanto puede detectarse un trastorno renal en una etapa más temprana que la posible con el uso de los marcadores de diagnóstico existentes para trastornos renales. Puesto que la cantidad de megalina humana excretada en la orina aumenta debido a trastornos tubulares renales proximales y fallo de la capacidad de resorción en la lesión, la medida de la megalina humana en orina puede utilizarse para determinar el sitio de un trastorno renal. Además, la medida de megalina humana en orina puede utilizarse para la evaluación de la actividad de trastornos renales progresivos (por ejemplo, el grado de progresión o pronóstico). Adicionalmente, la medida de megalina humana en orina puede utilizarse para predicción del pronóstico de un trastorno renal y dictamen de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas), lo que posibilita la prevención de un trastorno renal en una etapa más temprana. En la presente invención, el término "detección de un trastorno renal" hace referencia también a la inspección de un trastorno renal, y dicha detección posibilita la predicción del pronóstico de un trastorno renal que es nefropatía por IgA. También puede evaluarse el grado de nefropatía por IgA. La megalina humana se excreta en la orina en una etapa temprana de un trastorno renal, aumentando la cantidad de la misma excretada a medida que aumenta la gravedad del trastorno renal y aumenta la concentración de megalina humana en orina. Cuando la concentración de megalina humana en orina es alta en un sujeto que es un paciente de trastorno renal, puede predecirse que el sujeto tiene un mal pronóstico. También puede detectarse disfunción tubular con el uso de megalina humana en orina como marcador para evaluar el grado de disfunción tubular. Específicamente, se realiza la predicción del pronóstico de trastorno renal descrita anteriormente para evaluar la disfunción tubular, y se realiza la evaluación de la graduación del trastorno renal para evaluar el grado de disfunción tubular. De nuevo, el trastorno renal de la presente invención es siempre nefropatía por IgA.

Ejemplos

La presente invención se describe con detalle con referencia a los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-megalina humana

Se inmunizó por vía intraperitoneal un ratón con 50 µg de megalina y un coadyuvante varias veces, y se confirmó el título sérico elevado de la misma. Se extrajo el bazo 3 días después de la inmunización de recuerdo (en la vena), obteniendo células esplénicas. Se fusionaron las células esplénicas obtenidas con células de mieloma de ratón (10:1) en presencia de polietilenglicol 3500, preparando células de hibridoma. Se cultivaron las células resultantes en CO₂ a 37 °C durante 1 semana y se inspeccionó la presencia de anticuerpos anti-megalina humana en el sobrenadante de cultivo. Se diluyeron mediante dilución limitante las células en pocillos positivos en que se observó producción de anticuerpo, se cultivó el resultado durante 2 semanas y se inspeccionó la presencia de anticuerpos anti-megalina humana en el sobrenadante de cultivo de la misma manera. Adicionalmente, se sometieron de nuevo a dilución limitante las células en pocillos positivos en que se observó producción de anticuerpo y se realizó el cultivo de la misma manera. Se cultivaron en un matraz células en que se habían producido ya anticuerpos anti-megalina humana en esta fase, se suspendieron algunas de las resultantes en suero fetal bovino (FCS) que contenía 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (5 x 10⁶ células/ml) y se almacenaron el resultado en nitrógeno líquido.

Posteriormente, se usaron los sobrenadantes de los pocillos para inspeccionar la reactividad de los anticuerpos producidos en el sobrenadante de cultivo contra megalina humana. Se disolvió megalina humana en NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM (pH 7,3) (abreviado de aquí en adelante como "PBS (pH 7,3)"). Se aplicó la solución de megalina humana/PBS (pH 7,3) a pocillos de una placa de microvaloración de plástico (Nunc-Immune™ Module F8 Maxisorp™ Surface plate, fabricada por Nalge Nunc International) a 100 µl/pocillo y se inmovilizó la megalina humana sobre la placa de microvaloración a 3 pmol/pocillo a 4 °C durante 12 horas. Se retiró por decantación 12 horas después la solución de megalina humana/PBS (pH 7,3) que se había aplicado a los pocillos, se aplicó una solución de lavado a los pocillos de la placa de microvaloración a 200 µl/pocillo, se retiró la solución de lavado por decantación y se lavó la megalina humana adsorbida en exceso en los pocillos. Se llevó a cabo este proceso de lavado dos veces en total. Después de ello, se aplicó una solución de bloqueo a la placa con antígeno inmovilizado a 200 µl/pocillo para bloquear los pocillos de la placa de microvaloración con megalina humana inmovilizada a 4 °C durante 12 horas. Después de pasar 12 horas, se almacenó la placa a 4 °C. Para confirmar la reactividad de los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo, se usó la placa de microvaloración con megalina humana inmovilizada resultante después del bloqueo. Se aplicó sobrenadante de cultivo de hibridoma a pocillos de la placa de microvaloración con megalina humana inmovilizada a 100 µl/pocillo y se calentó la placa a 37 °C durante 1 hora. Después de ello, se retiró por decantación el sobrenadante de cultivo que se había aplicado a los pocillos, se aplicó una solución de lavado a las células de la placa de microvaloración a 200 µl/pocillo, se retiró la solución de lavado por decantación y se lavaron los interiores de los pocillos. Se llevó a cabo este proceso de lavado tres veces en total. Después de ello, se aplicó inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (fabricada por DAKO) a los pocillos a 100 µl/pocillo (diluida 2.000 veces, 0,55 µg/ml) y se calentó la placa a 37 °C durante 1 hora. Se diluyeron los anticuerpos marcados con enzima con un diluyente para anticuerpos marcados enzimáticamente. Después de ello, se retiraron por decantación los anticuerpos marcados con enzima que se habían aplicado a los pocillos, se aplicó una solución de lavado a los pocillos de la placa de microvaloración a 200 µl/pocillo, se retiró la solución de lavado por decantación y se lavaron los interiores de los pocillos. Se llevó a cabo este proceso de lavado tres veces en total. Después de ello, se aplicó una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (abreviada de aquí en adelante como "TMB") (TMB One-Step Substrate System, fabricada por DAKO) a los pocillos a 100 µl/pocillo como solución de sustrato para la reacción de enzima peroxidasa, y se dejó reposar el resultado a 25 °C durante 30 minutos. Inmediatamente después de ello, se añadió una solución de detención de la reacción a la solución de sustrato en los pocillos a 100 µl/pocillo para terminar la reacción enzimática en los pocillos. Después de ello, se midió la absorbancia de los pocillos, se restó la absorbancia a 630 nm de la de 450 nm y se designó el valor resultante como indicador de la evaluación de la reactividad.

Como resultado, se seleccionaron las células de hibridoma monoclonadas en que el anticuerpo anti-megalina humana exhibiera una potente reactividad ante megalina humana inmovilizada, y se inspeccionó la clase y subclase de inmunoglobulina en el sobrenadante de cultivo para cada clon a partir de 100 µl de solución madre de sobrenadante de cultivo usando el kit de tipado de inmunoglobulina de ratón (Wako Pure Chemical Industries, Inc.). Basándose en los resultados, se seleccionaron células de clase IgG a partir de la colección de células monoclonales resultante y se transfirieron al proceso de producción de ascitis descrito a continuación.

Posteriormente, se cultivaron estas células en un matraz de 25 ml y se cultivaron adicionalmente en un matraz de 75 ml. Se inyectaron por vía intraperitoneal las células resultantes en un ratón tratado con pristano para recoger ascitis.

Ejemplo 2: Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón (IgG) anti-megalina humana

Se mezcló la ascitis obtenida (10 ml) con un agente de tratamiento de suero sanguíneo opacificado (FRIGENT™ II: fabricado por Kyowa Pure Chemical Co., Ltd.) a una relación de 1,5:1 en volumen, y se sacudió y agitó el resultado durante 1 a 2 minutos para deslipidar la ascitis. Se centrifugó la ascitis usando una centrífuga a 3.000 rpm (1.930 x g) durante 10 minutos y se fraccionó el sobrenadante centrifugado de ascitis clarificada (10 ml). Se sometió el sobrenadante centrifugado 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 y disolvió en PBS la fracción de inmunoglobulina precipitada. Se llevó a cabo este proceso de fraccionamiento con sulfato de amonio dos veces en total, obteniendo una fracción de inmunoglobulina bruta de ascitis. Se mezcló la fracción de inmunoglobulina bruta resultante (10 ml) con una cantidad equivalente de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0; designado de aquí en adelante como "NaPB 20 mM (pH 7,0)") y se sometió entonces a purificación por afinidad usando una columna de proteína G (HiTrap Protein G HP, 5 ml; fabricada por GE Healthcare). Se adsorbió la muestra en una columna de proteína G, se hicieron circular 50 ml de NaPB 20 mM (pH 7,0) a través de la columna de proteína G y se retiraron los contaminantes distintos de IgG de la columna por lavado. Después de ello, se eluyó la IgG adsorbida por afinidad sobre la columna de proteína G con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7) y se neutralizó la fracción de elución inmediatamente después de la elución de la columna con tris(hidroximetil)aminometano-HCl 1 M (pH 9,0) (de aquí en adelante, "tris(hidroximetil)aminometano" se abrevia como "Tris") y entonces se recuperó. Después de la neutralización, se dializó el producto purificado por afinidad frente a PBS en una cantidad 500 veces mayor que la del producto purificado en volumen a 4 °C durante 6 horas, y se llevó a cabo este proceso de diálisis dos veces en total. La membrana de diálisis usada para diálisis era un tubo de celulosa para diálisis (fabricado por Viskase Companies). Se designó la fracción de elución de IgG resultante como anticuerpo monoclonal anti-megalina humana y se sometió a almacenamiento a 4 °C y los procedimientos descritos a continuación. Se efectuó el proceso de purificación conectando la columna de proteína G anteriormente mencionada a un sistema BioLogic LP (fabricado por Bio Rad Laboratories) a un caudal constante de 1 ml/min.

Ejemplo 3: Medida de megalina humana en orina

Se usaron dos tipos de anticuerpos monoclonales anti-megalina humana que reconocen epítopos diferentes para medir la cantidad de megalina humana excretada en la orina. Se usaron una placa de microvaloración sobre la que se habían inmovilizado anticuerpos monoclonales anti-megalina humana y anticuerpos monoclonales anti-megalina humana marcados con fosfatasa alcalina (abreviada de aquí en adelante como "ALP") para medir la concentración de megalina humana en orina. Al inicio, se mezclaron 90 µl de orina original con 10 µl de una solución que comprendía Tris-HCl 2 M, ácido etilendiamino-*N,N,N',N'*-tetraacético 0,2 M (abreviado de aquí en adelante como "EDTA") y polietilenglicolmono-*p*-isooctilfeniléter al 10 % (vol/vol) (abreviado de aquí en adelante como "Triton X-100") (pH 8,0), y se aplicaron 100 µl de la mezcla resultante a pocillos de la placa de microvaloración sobre la que se habían inmovilizado anticuerpos monoclonales anti-megalina humana (placa FluoroNunc™ Module F16 Black-Maxisorp™ Surface, fabricada por Nalge Nunc International). Se dejó reposar el resultado a 37° C durante 1 hora, se retiró por decantación la solución de muestra de orina que se había aplicado a los pocillos, se aplicó NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Tris-HCl 25 mM y Tween 20 al 0,05 % (v/v) (abreviado de aquí en adelante como "TBS-T") a los pocillos de la placa de microvaloración a 200 µl/pocillo y se retiró el TBS-T por decantación, seguido de lavado. Se llevó a cabo el proceso de lavado tres veces en total. Después de ello, se aplicó la solución de anticuerpos monoclonales anti-megalina humana marcados con ALP (0,5 ng/ml) a 100 µl/pocillo. Se prepararon los anticuerpos monoclonales anti-megalina humana marcados con ALP en TBS-T que contenía 0,2 % (p/v) de caseína (designado de aquí en adelante como diluyente para anticuerpos marcados). Se dejó reposar el resultado a 37 °C durante 1 hora, se retiró por decantación la solución de anticuerpos marcados con ALP que se había aplicado a los pocillos, se aplicó TBS-T a los pocillos de la placa de microvaloración a 200 µl/pocillo y se retiró el TBS-T por decantación, seguido de lavado. Se llevó a cabo el proceso de lavado cuatro veces en total. Posteriormente, se aplicó Tris-HCl 20 mM y MgCl₂ 1 mM (pH 9,8) (designado de aquí en adelante como "tampón de ensayo") a los pocillos de la placa de microvaloración a 200 µl/pocillo y se retiró el tampón de ensayo por decantación, seguido de lavado. Se llevó a cabo el proceso de lavado dos veces en total. Posteriormente, se aplicó sustrato quimioluminiscente CDP-Star™ para fosfatasa alcalina listo para usar (0,4 mM) con potenciador Emerald-II™ (sistema ELISA-Light™, fabricado por Applied Biosystems) a los pocillos como solución de sustrato para la reacción de enzima ALP a 100 µl/pocillo, y se dejó reposar el resultado a 37° C durante 30 minutos protegido de la luz. Inmediatamente después de ello, se midió la intensidad de emisión acumulada de los pocillos durante 1 s, y se designó el valor resultante como indicador de la medida y evaluación de megalina humana entera en orina. Se midió la intensidad de quimioluminiscencia usando el luminómetro Centro LB960 de Microplate y el software MicroWin2000 (fabricado por Berthold). Se usó como muestra de referencia para la curva de calibración megalina humana nativa extraída de riñón. Se muestran en las Fig. 1 y Fig. 2 los resultados de medidas clínicas reales de megalina humana en orina. Se muestran en la Tabla 1 los antecedentes de los pacientes sometidos a medida, pacientes con nefropatía diabética de tipo II (71 casos), pacientes con nefropatía por IgA (81 casos) y pacientes con síndrome nefrótico (18 casos).

Tabla 1

Parámetros	1: Individuo sano	2: Nefropatía diabética de tipo II	3: Nefropatía por IgA	4. Síndrome nefrótico
Número (n)	66	71	81	18
Sexo (F/M)	20/46	26/45	57/24	6/12
Edad	31,5 ± 10,3	65,5 ± 11,8	32,2 ± 10,5	52,9 ± 15,3
IMP (kg/m ²)	20,5 ± 1,8	25,0 ± 5,5	21,0 ± 2,9	24,5 ± 2,9
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	108,5 ± 9,8	129,3 ± 14,7	112,3 ± 13,9	117,7 ± 13,1
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	64,5 ± 7,4	77,1 ± 9,8	64,9 ± 10,4	69,4 ± 8,6
Albúmina excretada en la orina (mg/g de creatinina en orina)	4,5 ± 2,5	2398,2 ± 8459,5	1204,5 ± 3136,5	12683,8 ± 17513,4
HbA1c (%)	-	6,8 ± 1,6	-	-
Nivel de azúcar en sangre en ayunas (mg/dl)	75,2 ± 7,7	148,4 ± 55,7	-	-
eGFR (ml/min/1,73m ²)	90,2 ± 15,2	67,5 ± 18,7	84,0 ± 22,6	71,1 ± 23,1

La Fig. 1 y la Tabla 2 muestran los resultados de medidas clínicas reales respecto a nefropatía diabética de tipo II, nefropatía por IgA y síndromes nefróticos.

5

Tabla 2

	Individuo sano	Nefropatía diabética de tipo II	Nefropatía por IgA	Síndrome nefrótico
Valor de referencia respecto al (número de casos)	2/66 casos	43/71 casos	56/81 casos	17/18 casos
Valor de referencia respecto al (%)	3,0 %	60,6 %	69,1 %	94,4 %

Como se muestra en la Fig. 1 y la Tabla 2, se encontró que la cantidad de megalina excretada en la orina aumentaba significativamente en los grupos de enfermedad, en comparación con los individuos sanos. Se evaluó la cantidad de megalina excretada en la orina dividiendo la concentración de megalina en orina entre la concentración de creatinina en orina para corregir la concentración y evaluar el valor de corrección de creatinina obtenido. Esto se usa comúnmente en los biomarcadores en orina para confirmar que los resultados no se han influido por la relación de concentración en el momento de excreción de orina. Como valor de referencia para la cantidad de megalina excretada en la orina determinado para 66 individuos sanos (intervalo normal), se emplearon 448 fmol de megalina en orina / g de creatinina en orina. Es decir, se calculó un intervalo de confianza del 95 % basado en la distribución normal de las concentraciones de megalina en la orina de 66 individuos sanos (concretamente, el valor de corrección de creatinina), el límite superior del intervalo de confianza del 95 % era de 448 fmol de megalina en orina / g de creatinina en orina y se usó el valor determinado como valor de referencia para las concentraciones de megalina en orina. Debería observarse que el valor de referencia obtenido puede variar dependiendo de la modificación de los procedimientos para ajustar los estándares a la plataforma de medida o material de referencia, y el valor obtenido no se usaría permanentemente como valor de corte absoluto. Específicamente, el valor de corte no está particularmente limitado a 448 fmol de megalina en orina / g de creatinina en orina. Sin embargo, los resultados logrados en este ejemplo pueden suponerse representativos de un valor de referencia con validez consistente. Como se muestra en la Fig. 2, la cantidad de megalina excretada en la orina es mayor en pacientes con glomerulonefritis crónica, nefropatía membranosa, glomerulonefritis asociada a ANCA, glomerulonefritis por lupus, nefritis por púrpura de Henoch-Schönlein, glomerulonefritis crescética, glomeruloesclerosis focal, nefroesclerosis, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, lesión glomerular menor; escleriosis, trastorno renal postransplante, infiltración celular intersticial, mieloma múltiple y nefropatía relacionada con la obesidad, en comparación con individuos sanos, aunque el número de dichos casos es pequeño. La mayoría de casos exhibe altos niveles de megalina en orina superiores al nivel de referencia para el nivel de megalina en orina descrito anteriormente. Por tanto, se encontró que el nivel de megalina en orina era útil como marcador de diagnóstico para trastornos renales en diversas enfermedades mencionadas anteriormente.

El ejemplo 3 demuestra que la megalina humana en orina puede medirse y evaluarse específicamente y que la cantidad de megalina humana excretada en la orina aumentaba con nefropatía diabética de tipo II, nefropatía por IgA, síndrome nefrótico y otros casos de nefropatía. Se consideró por tanto que la megalina humana en orina es eficaz para el reconocimiento de condiciones patológicas y el diagnóstico de nefropatía.

Ejemplo 4: Comparación de la utilidad del nivel de megalina en orina y otros marcadores de trastorno renal para predicción del pronóstico y diagnóstico cuando se usa como indicador el pronóstico determinado mediante la clasificación histológica de nefropatía por IgA (59 casos) por biopsia renal (prueba de la diferencia significativa)

Respecto a los datos sobre la concentración de megalina humana excretada en la orina a partir de los 81 casos de nefropatía por IgA obtenidos en el ejemplo 3, se sometieron adicionalmente 59 muestras sometidas a biopsia renal a subanálisis usando el pronóstico determinado mediante la clasificación histológica lograda por biopsia renal como indicador. Se pretendía que este análisis examinara si la cantidad de megalina excretada en la orina podía servir o no como indicador para la predicción del pronóstico, ya que el pronóstico empeora basándose en la clasificación de pronóstico histológico de nefropatía por IgA. Se muestran en la Tabla 3 los antecedentes de los pacientes con nefropatía por IgA (59 casos) de acuerdo con el pronóstico determinado mediante la clasificación histológica conseguida por biopsia renal.

Tabla 3

Parámetros	1: Individuo sano	2: Nefropatía por IgA (grupos de buen pronóstico y pronóstico relativamente bueno)	3: Nefropatía por IgA (grupo de pronóstico relativamente malo)	4: Nefropatía por IgA (grupo de mal pronóstico)
Número (n)	66	8	29	22
Sexo (F/M)	20/46	6/2	25/4	17/5
Edad	31,5 ± 10,3	28,3 ± 8,1	29,8 ± 6,1	34,2 ± 8,6
IMP (kg/m ²)	20,5 ± 1,8	20,5 ± 2,6	19,5 ± 2,8	21,6 ± 2,8
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	108,5 ± 9,8	104,0 ± 16,1	107,3 ± 8,2	118,0 ± 16,6
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	64,5 ± 7,4	57,6 ± 3,6	63,1 ± 10,5	64,6 ± 12,8
Albúmina excretada en la orina (mg/g de creatinina en orina)	4,5 ± 2,5	1474,0 ± 2929,6	1113,8 ± 3026,9	493,4 ± 413,5
HbA1c (%)	-	-	-	-
Nivel de azúcar en sangre en ayunas (mg/dl)	75,2 ± 7,7	-	-	-
eGFR (ml/min/1,73m ²)	90,2 ± 15,2	105,6 ± 18,0	88,6 ± 20,5	67,6 ± 19,6

La Fig. 3 y la Tabla 4 muestran los resultados del subanálisis de la cantidad de megalina excretada en la orina basándose en el pronóstico determinado mediante la clasificación histológica de nefropatía por IgA lograda por biopsia renal.

Tabla 4

	Individuo sano	Nefropatía por IgA		
		Buen pronóstico y pronóstico relativamente bueno	Diagnóstico relativamente malo	Mal pronóstico
Valor de referencia respecto al (número de casos)	2/66 casos	4/8 casos	19/29 casos	17/22 casos
Valor de referencia respecto a (%)	3,0 %	50,0 %	65,5 %	77,3 %

Como se muestra en la Fig. 3 y la Tabla 4, se encontró que la cantidad de megalina excretada en la orina aumenta y se encontró que el porcentaje de casos con niveles anormalmente altos de megalina en la orina aumenta a medida que el pronóstico empeora. Se sometieron a un análisis similar otros marcadores de diagnóstico de enfermedades renales y el nivel de megalina en orina, y se compararon los resultados. Se muestran los resultados en la Tabla 5.

Tabla 5

		Nefropatía por IgA			
		Buen pronóstico y pronóstico relativamente bueno	Diagnóstico relativamente malo	Mal pronóstico	Total
Megalina en orina	Valor de referencia respecto al (número de casos)	4/8 casos	19/29 casos	17/22 casos	40/59 casos
	Valor de referencia respecto a (%)	50,0 %	65,5 %	77,3 %	67,8 %
Proteína en orina	Valor de referencia respecto al (número de casos)	1/8 casos	12/29 casos	15/22 casos	28/59 casos
	Valor de referencia respecto a (%)	12,5 %	41,4 %	68,2 %	47,5 %
β_2 -MG en orina	Valor de referencia respecto al (número de casos)	0/8 casos	1/29 casos	3/22 casos	4/59 casos
	Valor de referencia respecto a (%)	0,0 %	3,4 %	13,6 %	6,8 %
α_1 -MG en orina	Valor de referencia respecto al (número de casos)	0/8 casos	0/29 casos	2/22 casos	2/59 casos
	Valor de referencia respecto a (%)	0,0 %	0,0 %	9,1 %	3,4 %
NAG en orina	Valor de referencia frente al (número de casos)	2/8 casos	11/29 casos	14/22 casos	27/59 casos
	Valor de referencia respecto a (%)	25,0 %	37,9 %	63,6 %	45,8 %

Como se muestra en la Tabla 5, los niveles de megalina en orina para 40 casos superaban los valores de referencia para los 59 casos de nefropatía por IgA. Los resultados indican que el nivel de megalina en orina es el

Además, se comparó la utilidad del nivel de megalina en orina con la de otros marcadores de diagnóstico en orina para enfermedades renales en términos de predicción del pronóstico y diagnóstico. Específicamente, se clasificó el desenlace de nefropatía por IgA basándose en el pronóstico determinado por la clasificación histológica lograda por biopsia renal como sigue: los grupos de buen pronóstico y pronóstico relativamente bueno (puntuación 1); el grupo de pronóstico relativamente malo (puntuación 2) y el grupo de mal pronóstico (puntuación 3). En este caso, los desenlaces se indicaron por la cuota de aparición de desenlaces que exhibían valores mayores o iguales a los valores de referencia (concretamente, valores de corte) para cada marcador. Se determinó una reducción significativa mediante la prueba U de Mann-Whitney y se evaluó. Se usaron como marcadores de diagnóstico en orina para trastornos renales: β_2 -microglobulina en orina (corte: 300 μ g/g de creatinina en orina), α_1 -microglobulina en orina (corte: 12 mg/g de creatinina en orina), *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina (corte: 6 UI/g de creatinina en orina) y proteína en orina (corte: 0,5 g/g de creatinina en orina), y se emplearon como valores de corte para los marcadores de control los valores de referencia usados comúnmente en atención médica rutinaria. Se muestran los resultados en la Tabla 6.

Tabla 6

	Frente a proteína urinaria (dominancia/recesividad)	Frente a proteína urinaria (diferencia significativa)	Valor de P exacto
Megalina en orina	Dominante	$P < 0,001$	0,0003
β_2 -MG en orina	Inferior	$P < 0,05$	0,0383
α_1 -MG en orina	Inferior	$P < 0,05$	0,0102
NAG en orina	Inferior	NS	0,1241

Como se muestra en la Tabla 6, se encontró que el nivel de megalina en orina solo era un marcador más útil en la predicción del pronóstico y diagnóstico, en comparación con proteína urinaria que es el marcador de diagnóstico en orina más común para nefropatía por IgA. La complicación de trastornos tubulares renales se considera que es un factor de tendencia en datos clínicos de mal diagnóstico de nefropatía por IgA. Actualmente, se usan β_2 -microglobulina en orina, α_1 -microglobulina y *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina como indicadores del diagnóstico de dichas complicaciones. Como se muestra en la Tabla 5 y la Tabla 6, sin embargo, se encontró que

el nivel de megalina en orina era el marcador más eficaz como indicador del diagnóstico de dichas complicaciones tubulares renales.

El ejemplo 4 demuestra que la megalina humana en orina puede medirse específicamente y evaluarse, y la cantidad de megalina humana excretada en la orina aumenta de acuerdo con la graduación de predicción del pronóstico de nefropatía por IgA. Los resultados demuestran que la megalina humana en orina es eficaz para el reconocimiento de condiciones patológicas y el diagnóstico de nefropatía por IgA.

Ejemplo de referencia 5: Comparación de la compatibilidad de megalina humana en orina y otros marcadores de trastorno renal con la tasa de filtración glomerular aparente en los etapas I a III de nefropatía diabética (68 casos) (prueba de la diferencia significativa)

Se sometieron a subanálisis los datos respecto a la concentración de megalina humana excretada en la orina de 71 casos de nefropatía diabética de tipo II obtenidos en el ejemplo 3 usando la clasificación de la estadificación diabética como indicador. Este análisis pretende examinar si la cantidad de megalina excretada en la orina podría servir o no como indicador del reconocimiento de la graduación del trastorno a medida que empeoran las condiciones patológicas cuando el análisis se lleva a cabo basado en la estadificación de la nefropatía diabética. Se muestran en la Tabla 7 los antecedentes de los pacientes con nefropatía diabética de tipo II (71 casos) de acuerdo con la estadificación de nefropatía diabética.

Tabla 7

Parámetros	1: Individuo sano	2: Nefropatía diabética de tipo II (etapa I: etapa precedente a la nefropatía)	3: Nefropatía diabética de tipo II (etapa II: etapa temprana de la nefropatía)	4: Nefropatía diabética de tipo II (etapa III: nefropatía manifiesta)
Número (n)	66	39	17	15
Sexo (F/M)	20/46	16/23	5/12	5/10
Edad	31,5 ± 10,3	65,1 ± 12,0	63,8 ± 11,7	68,7 ± 11,6
IMP (kg/m ²)	20,5 ± 1,8	24,4 ± 5,1	25,4 ± 6,4	26,1 ± 5,7
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	108,5 ± 9,8	124,9 ± 10,8	134,4 ± 17,4	135,5 ± 17,4
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	64,5 ± 7,4	77,8 ± 8,8	75,6 ± 12,6	76,9 ± 9,4
Albúmina excretada en la orina (mg/g de creatinina en orina)	4,5 ± 2,5	10,2 ± 6,3	87,4 ± 56,4	11226,0 ± 15872,8
HbA1c (%)	-	7,0 ± 1,6	6,6 ± 0,9	6,7 ± 2,2
Nivel de azúcar en sangre en ayunas (mg/dl)	75,2 ± 7,7	74,0 ± 13,8	70,3 ± 14,9	44,8 ± 19,4
eGFR (ml/min/1,73m ²)	90,2 ± 15,2	74,0	70,1	44,8

Se muestran en la Fig. 4 y la Tabla 8 los resultados del subanálisis de la cantidad de megalina excretada en la orina basándose en la estadificación de la nefropatía diabética.

Tabla 8

	Individuo sano	Nefropatía diabética de tipo II		
		Etapa I (etapa precedente a la nefropatía)	Etapa II (etapa temprana de la nefropatía)	Etapa III (nefropatía manifiesta)
Valor de referencia respecto al (número de casos)	2/66 casos	19/39 casos	10/17 casos	14/15 casos
Valor de referencia respecto a (%)	3,0 %	48,7 %	58,8 %	93,3 %

Como se muestra en la Fig. 4 y la Tabla 8, se encontró que la cantidad de megalina excretada en la orina aumentaba y se encontró que el porcentaje de casos que exhiben niveles anormalmente altos de orina se elevaba a medida que empeoraban las condiciones patológicas.

La Fig. 5 muestra la correlación entre la cantidad de albúmina excretada en la orina (valor de corrección de creatinina) y la cantidad de megalina excretada en la orina (valor de corrección de creatinina). Como se muestra en la Fig. 5, se encontró que los casos que exhiben una cantidad anormalmente alta de megalina excretada en la orina que supera el intervalo normal (valor de referencia) daban cuenta de un 48,7 % de todos los casos en el etapa de albuminuria normal antes del desarrollo de microalbuminuria. Esto indica que la cantidad de megalina

excretada en la orina refleja sensiblemente el desarrollo y progresión de la nefropatía y aumenta en un etapa más temprana que el indicador actual de diagnóstico de nefropatía diabética (concretamente, la cantidad de albúmina excretada en la orina). Se demostró por tanto que el uso del nivel de megalina en orina como marcador de diagnóstico para nefropatía diabética posibilita la predicción del pronóstico de nefropatía diabética de tipo II y un dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas), y dicho uso sería útil desde el punto de vista de la atención preventiva en un etapa más temprana. Se usan como valores de referencia de la cantidad de albúmina excretada en la orina microalbuminuria (corte: 30 a 300 mg/g de creatinina en orina) y albuminuria manifiesta (corte: 300 mg/g o más de creatinina en orina), y dichos valores se usan comúnmente para atención médica rutinaria.

La Fig. 6 muestra la correlación entre la tasa de filtración glomerular aparente y la cantidad de megalina excretada en la orina. El término "tasa de filtración glomerular" hace referencia a la cantidad de plasma sanguíneo filtrado a través de todos los glomérulos del riñón por unidad de tiempo. La tasa de filtración glomerular aparente (eGFR) puede determinarse mediante la ecuación mostrada a continuación usando la concentración de creatinina en suero, edad y sexo como factores:

$$\text{eGFR (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 194 \times \text{Cr}^{-1,094} \times \text{edad}^{-0,287} \times 0,739 \text{ (si es mujer)}$$

La tasa de filtración glomerular aparente es un indicador de la evaluación de las funciones renales empleado para una prueba de cribado primaria para muchas enfermedades renales crónicas, tales como nefropatía diabética o nefropatía por IgA. Según la estadificación de las enfermedades renales crónicas, se evalúa una eGFR de 60 a 89 (ml/min/1,73 m²) como indicativa de una leve reducción de las funciones renales, se evalúa una de 30 a 59 (ml/min/1,73 m²) como indicativa de una reducción moderada de las funciones renales, se evalúa una de 15 a 29 (ml/min/1,73 m²) como indicativa de una reducción grave de las funciones renales y se evalúa una menor de (ml/min/1,73 m²) como indicativa de insuficiencia renal. Como se muestra en la Fig. 6, la cantidad de megalina excretada en la orina tiende a aumentar con la reducción de eGFR (concretamente, la reducción de las funciones renales), y se ha encontrado que una cantidad aumentada de megalina excretada en la orina es eficaz para un dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas) de nefropatía diabética de tipo II.

La Fig. 7 muestra la correlación entre la tasa de filtración glomerular aparente y la cantidad de albúmina excretada en la orina. Como se muestra en la Fig. 7, el nivel de albúmina en orina tiende a aumentar con la reducción de eGFR (concretamente, la reducción de las funciones renales), como con el caso de la cantidad de megalina excretada en la orina (Fig. 6). Sin embargo, se observaron casos de albuminuria normal que exhibían una eGFR menor de 60 (ml/min/1,73 m²) (concretamente, disfunción renal) y casos de microalbuminuria que exhibían una eGFR de 90 o más (ml/min/1,73 m²) (concretamente, funciones renales normales). Esto indica que la importancia clínica (concretamente respecto a la exactitud del diagnóstico) de la albuminuria como marcador de diagnóstico para nefropatía diabética es insuficiente. Los resultados demuestran que el uso del nivel de megalina en orina como indicador del diagnóstico de nefropatía diabética de tipo II posibilita un diagnóstico más exacto que el posible con el uso de albuminuria.

Se comparó la utilidad del nivel de megalina en orina como marcador de diagnóstico para nefropatía diabética de tipo II como puede observarse en las Fig. 6 y Fig. 7 con la de otros marcadores de diagnóstico para enfermedades renales, para ensayar la compatibilidad del mismo con la tasa de filtración glomerular aparente. Específicamente, los resultados respecto a nefropatía diabética de tipo II se clasificaron como: eGFR de 90 o más (ml/min/1,73 m²) (puntuación 1); 60 a 89 (ml/min/1,73 m²) (puntuación 2); 30 a 59 (ml/min/1,73 m²) (puntuación 3) y 15 a 29 (ml/min/1,73 m²) (puntuación 4). Esto se basó en la estadificación de las enfermedades renales crónicas en términos de la tasa de filtración glomerular aparente. Los desenlaces se indicaron por la cuota de aparición de un desenlace que exhibía valores mayores o iguales a los valores de referencia (concretamente, valores de corte) para cada marcador. En dicha prueba, se determinó la diferencia significativa mediante la prueba U de Mann-Whitney y se evaluaron los resultados. Se emplearon como marcadores de diagnóstico en orina de control para trastornos renales β_2 -microglobulina en orina (corte: 300 $\mu\text{g/g}$ de creatinina en orina), α_1 -microglobulina en orina (corte: 12 mg/g de creatinina en orina), *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina (corte: 6 UI/g de creatinina en orina), proteína en orina (corte: 0,5 g/g de creatinina en orina) y albúmina urinaria (corte: 30 mg/g de creatinina en orina), y se emplearon para los marcadores de control valores de corte estándares empleados comúnmente en atención médica rutinaria. Se muestran los resultados en la Tabla 9.

Tabla 9

	Frente a proteína urinaria (dominancia/recesividad)	Frente a proteína urinaria (diferencia significativa)	Valor de P exacto
Megalina en orina	Dominante	P < 0,01	0,0073
β_2 -MG en orina	Codominante	NS	0,8733
α_1 -MG en orina	Codominante	NS	0,5288
NAG en orina	Dominante	P < 0,05	0,0106
Proteína en orina	Dominante	P < 0,001	$1,1 \times 10^{-11}$

Como se muestra en la Tabla 9, se encontró que el nivel de megalina en orina, *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa y proteína urinaria eran más eficaces, en términos de compatibilidad con la tasa de filtración glomerular aparente, en comparación con la cantidad de albúmina en orina, que es el marcador de diagnóstico en orina más común para nefropatía diabética. Los resultados de análisis demostrados en este ejemplo (mostrado en la Tabla 9) reflejan nefropatía diabética de etapas I a III (concretamente, desde la etapa precedente a nefropatía hasta nefropatía manifiesta). Desde el punto de vista del diagnóstico temprano, debería prestarse atención a la nefropatía de etapas I y II (concretamente, desde la etapa precedente a nefropatía hasta la etapa temprana de nefropatía). Esto se describió en el ejemplo 4.

Ejemplo de referencia 6: Comparación de la compatibilidad de megalina humana en orina y otros marcadores de enfermedades renales con la tasa de filtración glomerular aparente en los etapas I y II de nefropatía diabética (56 casos), teniendo en consideración el diagnóstico temprano de enfermedad renal (prueba de la diferencia significativa)

Al prestar atención a los etapas I y II de nefropatía diabética (concretamente, desde la etapa precedente a nefropatía hasta la etapa temprana de nefropatía), se comparó la utilidad del nivel de megalina en orina como marcador de diagnóstico de nefropatía diabética de tipo II como puede observarse en las Fig. 6 y Fig. 7 con la de otros marcadores de diagnóstico de enfermedades renales en términos de compatibilidad con la tasa de filtración glomerular aparente. Específicamente, los resultados respecto a la nefropatía diabética de tipo II se clasificaron como: eGFR de 90 o más (ml/min/1,73 m²) (puntuación 1), 60 a 89 (ml/min/1,73 m²) (puntuación 2), 30 a 59 (ml/min/1,73 m²) (puntuación 3) y 15 a 29 (ml/min/1,73 m²) (puntuación 4), basándose en la estadificación de enfermedades renales crónicas en términos de la tasa de filtración glomerular aparente. Se indicaron los desenlaces mediante la cuota de aparición de un desenlace que exhibía valores mayores o iguales a los valores de referencia (concretamente, valores de corte) para cada marcador. Se determinó la diferencia significativa mediante la prueba U de Mann-Whitney y se evaluaron los resultados. Como marcadores de diagnóstico en orina de control para trastornos renales se emplearon β_2 -microglobulina en orina (corte: 300 μ g/g de creatinina en orina), α_1 -microglobulina en orina (corte: 12 mg/g de creatinina en orina) *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina (corte: 6 UI/g de creatinina en orina), proteína urinaria (corte: 0,5 g/g de creatinina en orina) y albúmina en orina (corte: 30 mg/g de creatinina en orina), y se emplearon como valores de corte para marcadores de control los valores de referencia usados comúnmente en la atención médica rutinaria. Se muestran los resultados en la Tabla 10.

Tabla 10

	Frente a proteína urinaria (dominancia/recesividad)	Frente a proteína urinaria (diferencia significativa)	Valor de P exacto
Megalina en orina	Dominante	P < 0,01	0,0060
β_2 -MG en orina	Codominante	NS	0,0810
α_1 -MG en orina	Codominante	NS	0,1245
NAG en orina	Codominante	NS	0,0649
Proteína en orina	Codominante	NS	0,1273

Como se muestra en la Tabla 10, se encontró que el nivel de megalina en orina solo era más eficaz en términos de compatibilidad con la tasa de filtración glomerular aparente, en comparación con el nivel de albúmina urinaria, que es el marcador de diagnóstico en orina más común para nefropatía diabética actualmente. El uso del nivel de megalina en orina como marcador de diagnóstico para nefropatía diabética de tipo II posibilita una predicción del pronóstico de nefropatía diabética de tipo II y un dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas) y dicho uso se considera por tanto útil desde el punto de vista de la atención médica preventiva en un etapa más temprana.

Ejemplo de referencia 7: Medida de la cantidad de megalina humana excretada en la orina de un paciente con insuficiencia renal aguda

Como se muestra en la Fig. 8, se encontró que la cantidad de megalina excretada en la orina aumentaba significativamente en el grupo de insuficiencia renal aguda, en comparación con individuos sanos. La insuficiencia renal aguda se diagnosticó de acuerdo con estándares internacionales relevantes (concretamente, la clasificación RIFLE). Se evaluó la cantidad de megalina excretada en la orina con el uso del valor de corrección de creatinina determinado dividiendo la concentración de megalina en orina entre la concentración de creatinina en orina y corrigiendo la concentración. Se usa comúnmente lo anteriormente mencionado como biomarcador urinario para verificar que los resultados no están influidos por la tasa de concentración en el momento de la excreción urinaria. Como valor de referencia para la cantidad de megalina excretada en la orina obtenido a partir de 66 individuos sanos (concretamente, el intervalo normal), se empleó 448 fmol de megalina en orina / g de creatinina en orina. Es decir, se calculó un intervalo de confianza del 95 % basándose en la distribución normal de las concentraciones de megalina en orina de 66 individuos sanos (concretamente, el valor de corrección de creatinina), el límite superior del intervalo de confianza del 95 % era de 448 fmol de megalina en orina / g de creatinina en orina, y se usó el valor determinado como valor de referencia para las concentraciones de megalina en orina. Debería observarse

que el valor de referencia obtenido puede variar dependiendo de la modificación de los procedimientos para ajustar los estándares a la plataforma de medida o material de referencia, y el valor obtenido no se usaría permanentemente como valor de corte absoluto. Específicamente, el valor de corte no está particularmente limitado a 448 fmol de megalina en orina / g de creatinina en orina. Sin embargo, los resultados logrados en este ejemplo

5 pueden considerarse como un valor de referencia de validez consistente. En este ejemplo, se midió y evaluó específicamente la megalina humana en orina, y se observó una cantidad aumentada de megalina humana excretada en la orina en pacientes con insuficiencia renal aguda. Por tanto, se consideró que la megalina humana en orina era eficaz para el reconocimiento de condiciones patológicas y el diagnóstico de nefropatía.

10 **Aplicabilidad industrial**

Al medir la cantidad de megalina excretada en la orina de un paciente con un trastorno renal, y en particular nefropatía por IgA, puede evaluarse la actividad del trastorno renal progresivo (por ejemplo, la graduación de la progresión o pronóstico). Para inhibir el desarrollo y progresión de la nefropatía, se evalúan las lesiones y la graduación del trastorno renal, y es necesario un tratamiento activo basado en evidencias. Puede usarse una

15 cantidad aumentada de megalina excretada en la orina para la evaluación de las graduaciones de trastornos tubulares renales proximales y fallo de la capacidad de resorción en una lesión. Los marcadores de diagnóstico existentes para trastornos renales no posibilitan la determinación respecto a lesiones de trastornos renales o la evaluación de las funciones en dichas lesiones.

La cantidad aumentada de megalina excretada en la orina se observa en una etapa temprana de la nefropatía, y por tanto es más eficaz para el diagnóstico de un trastorno renal en una etapa más temprana que los marcadores de diagnóstico existentes para trastornos renales. Basándose en la cantidad de megalina en orina, en consecuencia, pueden determinarse la lesión y la graduación del trastorno con mayor exactitud en una etapa más

20 temprana, en comparación con el uso de los marcadores de diagnóstico existentes para trastornos renales. En consecuencia, la cantidad de megalina en orina es eficaz para la predicción del pronóstico de un trastorno renal y un dictamen exacto y temprano de la graduación del trastorno (concretamente, la progresión de las condiciones patológicas), y es útil desde el punto de vista del tratamiento preventivo en una etapa más temprana.

30 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> NIIGATA UNIVERSITY
JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION
DENKA SEIKEN CO., LTD.

35 <120> Uso de megalina en muestras de orina como marcador para detectar trastorno renal

<130> 152 402 n2
<140> 10769753.4
<141> 27-04-2010
<150> JP 2009-108493

40 <151> 27-04-2009
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 13968

45 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 1

atggatcgcg	ggccggcagc	agtggcgctg	acgctgctcc	tggtctctcg	cgccctgccta	60
gcgcgcggcca	gtggccaaga	atgtgacagt	gcgcattttc	gctgtggaag	tgggcattgc	120
atccctgcag	actggagggtg	tgatgggacc	aaagactggt	cagatgacgc	ggatgaaatt	180
ggctgcgctg	ttgtgacctg	ccagcagggc	tatttcaagt	gccagagtga	gggacaatgc	240
atccccagct	cctgggtgtg	tgaccaagat	caagactgtg	atgatggctc	agatgaacgt	300
caagattgct	cacaaagtac	atgctcaagt	catcagataa	catgctccaa	tggtcagtgt	360
atcccaagtg	aatacaggtg	cgaccacgtc	agagactgcc	ccgatggagc	tgatgagaat	420
gactgccagt	acccaacatg	tgagcagctt	acttgtgaca	atggggcctg	ctataacacc	480
agtcagaagt	gtgattggaa	agttgattgc	aggactcct	cagatgaaat	caactgcact	540
gagatatgct	tgacacaatga	gttttcatgt	ggcaatggag	agtgtatccc	tcgtgcttat	600
gtctgtgacc	atgacaatga	ttgccaaagc	ggcagtgtat	aacatgcttg	caactatccg	660
acctgcgggtg	gttaccagtt	cacttgcccc	agtggccgat	gcatttatca	aaactgggtt	720
tgtgatggag	aagatgactg	taaagataat	ggagatgaag	atggatgtga	aagcggctct	780
catgatgttc	ataaatgttc	cccaagagaa	tggtcttgcc	cagagtcggg	acgatgcac	840
tccatttata	aagtttgtga	tgggatttta	gattgccag	gaagagaaga	tgaaaacaac	900
actagtaccg	gaaaataactg	tagtatgact	ctgtgctctg	ccttgaactg	ccagtaccag	960
tgccatgaga	cgccgtatgg	aggagcgtgt	ttttgtcccc	caggttatat	catcaaccac	1020
aatgacagcc	gtacctgtgt	tgagtttgat	gattgccaga	tatggggaat	ttgtgaccag	1080
aagtgtgaaa	gcccacctgg	ccgtcacctg	tgccactgtg	aagaagggtta	tatcttgagg	1140
cgtggacagt	attgcaaagc	taatgattcc	tttggcgagg	cctccattat	cttctccaat	1200
ggtcgggatt	tgttaattgg	tgatattcat	ggaaggagct	tccggatcct	agtggagtct	1260
cagaatcgtg	gagtgccgtg	gggtgtggct	ttccactatc	acctgcaaag	agttttttgg	1320
acagacaccg	tgcaaaaataa	ggttttttca	gttgacatta	atggttttaa	tatccaagag	1380
gttctcaatg	tttctgttga	aacccagag	aacctggctg	tggaactgggt	taataataaa	1440
atctatctag	tggaaaccaa	ggtcaaccgc	atagatatgg	taaatttgga	tggaagctat	1500
cgggttacc	ttataactga	aaacttgggg	catcctagag	gaattgccgt	ggaccaact	1560
gttggttatt	tatttttctc	agattgggag	agcctttctg	gggaacctaa	gctggaaagg	1620
gcattcatgg	atggcagcaa	ccgtaaagac	ttggtgaaaa	caaagctggg	atggcctgct	1680
ggggtaactc	tggtatgat	atcgaagcgt	gtttactggg	ttgactctcg	gtttgattac	1740
attgaaactg	taacttatga	tggaaattcaa	aggaagactg	tagttcatgg	aggctccctc	1800
attcctcatc	cctttggagt	aagcttattt	gaaggctcag	tgttctttac	agattggaca	1860
aagatggccg	tgctgaaggc	aaacaagttc	acagagacca	acccacaagt	gtactaccag	1920
gcttccctga	ggccctatgg	agtgaactgt	taccattccc	tcagacagcc	ctatgctacc	1980
aatccgtgta	aagataacaa	tgggggctgt	gagcaggtct	gtgttctcag	ccacagaaca	2040
gataatgatg	gtttgggttt	ccgttgcaag	tgcacattcg	gcttccaact	ggatacagat	2100
gagcgcact	gcattgctgt	tcagaatttc	ctcatttttt	catcccaagt	tgctattcgt	2160
gggatcccg	tcaccttgct	taccagga	gatgtcatgg	ttccagtttc	ggggaatcct	2220
tctttctttg	tcgggattga	ttttgacgcc	caggacagca	ctatcttttt	ttcagatatg	2280

tcaaaacaca	tgatttttta	gcaaaagatt	gatggcacag	gaagagaaat	tctcgcagct	2340
aacagggtgg	aaaatggtga	aagtttggct	tttgattgga	tttcaaagaa	tctctattgg	2400
acagactctc	attacaagag	tatcagtgct	atgaggctag	ctgataaaac	gagacgcaca	2460
gtagttcagt	atttaaataa	cccacggctg	gtggtagttc	atccttttgc	cggttatcta	2520
ttcttctactg	attggttccg	tcttgctaaa	attatgagag	catggagtga	cggatctcac	2580
ctcttgccctg	taataaacac	tactcttgga	tggcccaatg	gcttggccat	cgtattgggt	2640
gcttcacgat	tgtactgggt	agatgcctat	tttgataaaa	ttgagcacag	cacctttgat	2700
ggtttagaca	gaagaagact	gggccatata	gagcagatga	cacatccgtt	tggacttgcc	2760
atctttggag	agcatttatt	ttttactgac	tggagactgg	gtgccattat	tcgagtccagg	2820
aaagcagatg	gtggagaaat	gacagttatc	cgaagtggca	ttgcttacat	actgcatttg	2880
aaatcgtatg	atgtcaacat	ccagactggg	tctaaccgct	gtaatcaacc	cacgcattct	2940
aacggtgact	gcagccactt	ctgcttcccg	gtgccaaatt	tccagcgagt	gtgtgggtgc	3000
ccttatggaa	tgaggctggc	ttccaatcac	ttgacatgcg	agggggaccc	aaccaatgaa	3060
ccaccacagg	agcagtgtgg	cttattttcc	ttcccctgta	aaaatggcag	atgtgtgccc	3120
aattactatc	tctgtgatgg	agtcgatgat	tgtcatgata	acagtgatga	gcaactatgt	3180
ggcacactta	ataatacctg	ttcatcttcg	gcgttcacct	gtggccatgg	ggagtgcatt	3240
cctgcacact	ggcgtgtga	caaacgcaac	gactgtgtgg	atggcagtga	tgagcacaac	3300
tgccccaccc	acgcacctgc	ttcctgcctt	gacacccaat	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	tattaaactg	tactgcttct	caattcaagt	gtgccagtgg	ggataaatgt	3600
attggcgctca	caaactcgtt	tgatgggtgt	tttgattgca	gtgacaactc	ggatgaagcg	3660
ggctgtccaa	ccaggcctcc	tggatgtgct	cactcagatg	aatttcagtg	ccaagaagat	3720
ggtatctgca	tcccgaactt	ctgggaatgt	gatgggcatc	cagactgcct	ctatggatct	3780
gatgagcaca	atgcctgtgt	ccccaaagact	tgcccctcat	catatttcca	ctgtgacaac	3840
ggaaactgca	tccacagggc	atggctctgt	gatcgggaca	atgactgcgg	ggatatgagt	3900
gatgagaagg	actgccctac	tcagcccttt	cgtgtccta	gttggaatg	gcagtgtctt	3960
ggccataaca	tctgtgtgaa	tctgagtgtg	gtgtgtgatg	gcactcttga	ctgccccaat	4020
gggacagatg	agtccccact	ttgcaatggg	aacagctgct	cagatttcaa	tgggtggtgt	4080
actcacgagt	gtgttcaaga	gccttttggg	gctaaatgcc	tatgtccatt	gggattctta	4140
cttgccaatg	attctaagac	ctgtgaagac	atagatgaat	gtgatattct	aggctcttgt	4200
agccagcact	gttacaatat	gagaggttct	ttccggtgct	cgtgtgatac	aggctacatg	4260
ttagaaaagt	atgggaggac	ttgcaaaagt	acagcatctg	agagtctgct	gttacttgtg	4320
gcaagtccga	acaaaattat	tgccgacagt	gtcacctccc	aggtccacaa	tatctattca	4380
ttggctcgaga	atggttctta	cattgtagct	gttgattttg	attcaattag	tggtcgtatc	4440
ttttggctctg	atgcaactca	gggtaaaacc	tggagtgcgt	ttcaaaatgg	aacggacaga	4500
agagtgggtat	ttgacagtag	catcatcttg	actgaaacta	ttgcaataga	ttgggtaggt	4560
cgtaatcttt	actggacaga	ctatgctctg	gaaacaattg	aagtctccaa	aattgatggg	4620
agccacagga	ctgtgctgat	tagtaaaaac	ctaacaatc	caagaggact	agcattagat	4680
cccagaatga	atgagcatct	actgttctgg	tctgactggg	gccaccaccc	tcgcatcgag	4740
cgagccagca	tggacggcag	catgcgcact	gtcattgtcc	aggacaagat	cttctggccc	4800
tgcggcttaa	ctattgacta	ccccaacaga	ctgctctact	tcatggactc	ctatcttgat	4860
tacatgggact	tttgcgatta	taatggacac	catcggagac	aggtgatagc	cagtgatttg	4920
attatacggc	acccctatgc	cctaactctc	tttgaagact	ctgtgtactg	gactgaccgt	4980
gctactcgtc	gggttatgcg	agccaacaag	tggcatggag	ggaaccagtc	agttgtaatg	5040
tataatattc	aatggccctt	tgggattgtt	gcggttcac	cttcgaaaca	accaaattcc	5100
gtgaatccat	gtgccttttc	ccgctgcagc	catctctgcc	tgctttcctc	acaggggcct	5160
catttttact	cctgtgtttg	tccttcagga	tggagtctgt	ctcctgatct	cctgaattgc	5220
ttgagagatg	atcaaccctt	cttaataact	gtaaggcaac	atataatttt	tggaatctcc	5280
cttaatcctg	aggtgaagag	caatgatgct	atgttcccca	tagcagggat	acagaatggg	5340
ttagatgttg	aatttgatga	tgtgtgacaa	tacatctatt	gggttgaaaa	tccaggtgaa	5400
attcacagag	tgaagacaga	tggcaccaac	aggacagtat	ttgcttctat	atctatgggt	5460
gggccttcta	tgaacctggc	cttagattgg	atttcaagaa	acctttatto	taccaatcct	5520
agaactcagt	caatcgagg	tttgacactc	cacggagata	tcagatacag	aaaaacattg	5580
attgccaatg	atgggacagc	tcttggagtt	ggctttccaa	ttggcataac	tgttgatctt	5640
gctcgtggga	agctgtactg	gtcagaccaa	ggaactgaca	gtgggggttc	tgccaagatc	5700
gccagtgtca	acatggatgg	cacatctgtg	aaaactctct	ttactgggaa	cctcgaacac	5760
ctggagtgtg	tcactcttga	catcgaagag	cagaaactct	actgggcagt	cactggaaga	5820
ggagtgtatt	aaagaggaaa	cgtggatgga	acagatcgga	tgatcctggg	acaccagctt	5880
tcccacccct	ggggaattgc	agtccatgat	tctttccttt	attatactga	tgaacagtat	5940
gaggtcattg	aaagagttga	taaggccact	ggggccaaca	aaatagtctt	gagagataat	6000
gttccaaatc	tgaggggtct	tcaagtttat	cacagacgca	atgccgccga	atcctcaaat	6060
ggctgtagca	acaacatgaa	tgcctgtcag	cagatttgcc	tgccgtgtacc	aggaggattg	6120
tttctctgcg	cctgtgccac	tggatttaaa	ctcaatcctg	ataatcggtc	ctgctctcca	6180

tataactcctt	tcattgttgt	ttcaatgctg	tctgcaatca	gaggcttttag	cttgggaattg	6240
tcagatcatt	cagaaaccat	ggtgccggtg	gcaggccaag	gacgaaacgc	actgcatgtg	6300
gatgtggatg	tgtcctctgg	ctttatttat	tggtgtgatt	ttagcagctc	agtggcatct	6360
gataatgcga	tccgtagaat	taaaccagat	ggatcttctc	tgatgaacat	tgtgacacat	6420
ggaataggag	aaaatggagt	ccgggtatt	gcagtggatt	gggtagcagg	aaatctttat	6480
ttcaccaatg	cctttgtttc	tgaaacactg	atagaagtgc	tgcgatcaa	tactacttac	6540
cgccgtgttc	ttcttaaagt	cacagtggac	atgcctaggc	atattgttgt	agatcccaag	6600
aacagatacc	tcttctgggc	tgactatggg	cagagaccaa	agattgagcg	ttctttcctt	6660
gactgtacca	atcgaacagt	gcttgtgtca	gagggcattg	tcacaccacg	gggcttggca	6720
gtggaccgaa	gtgattggcta	cgtttattgg	gttgatgatt	ctttagatat	aattgcaagg	6780
atcgtatca	atggagagaa	ctctgaagtg	attcgttatg	gcagtcgtta	cccaactcct	6840
tatggcatca	ctgtttttga	aaattctatc	atatgggtag	ataggaattt	gaaaaagatc	6900
ttccaagcca	gcaaggaacc	agagaacaca	gagccaccca	cagtataag	agacaatatc	6960
aactggctaa	gagatgtgac	catctttgac	aagcaagtcc	agccccggtc	accagcagag	7020
gtcaacaaca	acccttgctt	ggaaaacaat	ggtgggtgct	ctcatctctg	ctttgctctg	7080
cctggattgc	acaccccaaa	atgtgactgt	gcctttggga	ccctgcaaag	tgatggcaag	7140
aattgtgcc	tttcaacaga	aaatttcctc	atctttgcct	tgtctaattc	cttgagaagc	7200
ttacacttgg	accctgaaaa	ccatagccca	cctttccaaa	caataaatgt	ggaaagaact	7260
gtcatgtctc	tagactatga	cagtgttaagt	gatagaatct	acttcacaca	aaatttagcc	7320
tctggagttg	gacagatttc	ctatgccacc	ctgtcttcag	ggatccatac	tccaactgtc	7380
attgcttcag	gtatagggac	tgctgatggc	attgcctttg	actggattac	tagaagaatt	7440
tattacagtg	actacctcaa	ccagatgatt	aattccatgg	ctgaagatgg	gtctaaccgc	7500
actgtgatag	cccgcgttcc	aaaaccaaga	gcaatttgtgt	tagatccctg	ccaagggtac	7560
ctgtactggg	ctgactggga	tacacatgcc	aaaatcgaga	gagccacatt	gggaggaaac	7620
ttccgggtac	ccattgtgaa	cagcagtctg	gtcatgccca	gtgggctgac	tctggactat	7680
gaagaggacc	ttctctactg	ggtggatgct	agtctgcaga	ggattgaacg	cagcactctg	7740
acgggcgtgg	atcgtgaagt	cattgtcaat	gcagccgttc	atgcttttgg	cttgactctc	7800
tatggccagt	atatttactg	gactgacttg	tacacacaaa	gaatttaccg	agctaacaaa	7860
tatgacgggt	caggtcagat	tgcaatgacc	acaaatttgc	tctcccagcc	caggggaatc	7920
aacactgttg	tgaagaacca	gaaacaacag	tgtaacaatc	cttgtgaaca	gtttaatggg	7980
ggctgcagcc	atatctgtgc	accaggtcca	aatggtgccg	agtgccagtg	tccacatgag	8040
ggcaactggt	atttggccaa	caacaggaag	cactgcattg	tggacaatgg	tgaacgatgt	8100
ggtgcatctt	ccttcacctg	ctccaatggg	cgctgcatct	cgggaagagtg	gaagtgtgat	8160
aatgacaacg	actgtgggga	tggcagtgat	gagatggaaa	gtgtctgtgc	acttcacacc	8220
tgctcaccga	cagccttoac	ctgtgccaat	ggcgatgtg	tccaatactc	ttaccgctgt	8280
gattactaca	atgactgtgg	tgtggcagt	gatgaggcag	ggtgcctgtt	cagggactgc	8340
aatgccacca	cggagtattt	gtgcaataac	agaaggtgca	tacctcgtga	gtttatctgc	8400
aatggtgtag	acaactgcca	tgataataac	acttcagatg	agaaaaattg	ccctgatcgc	8460
acttgccagt	ctggatacac	aaaatgtcat	aattcaaatc	tttgtattcc	tgcgctttat	8520
ttgtgtgacg	gagacaatga	ctgtggagat	aacagtgatg	aaaaccctac	ttattgcacc	8580
actcacacat	gcagcagcag	tgagttccaa	tgcgcactctg	ggcgtgtgat	tcctcaacat	8640
tggtattgtg	atcaagaaac	agattgtttt	gatgcctctg	atgaacctgc	ctcttggtgt	8700
cactctgagc	gaacatgcct	agctgatgag	ttcaagtgtg	atgggtgggag	gtgcatccca	8760
agcgaatgga	tctgtgacgg	tgataatgac	tgtggggata	tgagtgcaga	ggataaaaagg	8820
caccagtgtc	agaatcaaaa	ctgctcggat	tccgagtttc	tctgtgtaaa	tgacagacct	8880
ccggacagga	ggtgcattcc	ccagtcttgg	gtctgtgatg	gcgatgtgga	ttgtactgac	8940
ggctacgatg	agaatcagaa	ttgcaccagg	agaacttgct	ctgaaaatga	attcacctgt	9000
ggttacggac	tgtgtatccc	aaagatatct	aggtgtgacc	ggcacaatga	ctgtggtgac	9060
tatagcgacg	agaggggctg	cttataaccag	acttgccaac	agaatcagtt	tacctgtcag	9120
aacgggcgct	gcattagtaa	aaccttcctc	tgtgatgagg	ataatgactg	tggagacgga	9180
tctgatgagc	tgatgcacct	gtgccacacc	ccagaaccca	cgtgtccacc	tcacgagttc	9240
aagtgtgaca	atgggcgctg	catcgagatg	atgaaactct	gcaaccacct	agatgactgt	9300
ttggacaaca	gcgatgagaa	aggctgtggc	attaatgaat	gccatgaccc	ttcaatcagt	9360
ggctgcgatc	acaactgcac	agacacctta	accagtttct	attgttcctg	togtccgtgt	9420
tacaagctca	tgtctgacaa	gcggacttgt	gttgatattg	atgaatgcac	agagatgcct	9480
tttgtctgta	gccagaagtg	tgagaatgta	ataggctcct	acatctgtaa	gtgtgcccc	9540
ggctacctcc	gagaaccaga	tggaagacc	tgccggcaca	acagtaacat	cgaacctat	9600
ctcattttta	gcaaccgtta	ctatttgaga	aatttaacta	tagatggcta	tttttactcc	9660
ctcatcttgg	aaggactgga	caatgttgtg	gcattagatt	ttgaccgagt	agagaagaga	9720
ttgtatttga	ttgatacaga	gaggcaagt	attgagagaa	tgtttctgaa	taagacaaac	9780
aaggagacaa	tcataaacca	cagactacca	gctgcagaaa	gtctggctgt	agactgggtt	9840
tccagaaagc	tctactggtt	ggatgcccg	ctggatggcc	tctttgtctc	tgacctcaat	9900
ggtggacacc	gccgcagtgt	ggcccagcac	tgtgtggatg	ccaacaacac	cttctgcttt	9960
gataatccca	gaggacttgc	ccttcaccc	caatatgggt	acctctactg	ggcagactgg	10020
ggtcaccgcg	catacattgg	gagagtaggc	atggatggaa	ccaacaagtc	tgtgataatc	10080

tccaccaagt	tagagtggcc	taatggcatt	accattgatt	acaccaatga	tctactctac	10140
tgggcagatg	cccacctggg	ttacatagag	tactctgatt	tgaggggcca	ccatcgacac	10200
acgggtgatg	atggggcact	gcctcaccct	ttcgctatta	ccatttttga	agacactatt	10260
tattggacag	attggaatac	aaggacagtg	gaaaagggaa	acaaatatga	tgatcaaat	10320
agacagacac	tggtgaacac	aacacacaga	ccatttgaca	tccatgtgta	ccatccatat	10380
aggcagccca	ttgtgagcaa	tccctgtggt	accaacaatg	gtggctgttc	tcatctctgc	10440
ctcatcaagc	caggaggaaa	agggttcact	tgcgagtgtc	cagatgactt	ccgcaccctt	10500
caactgagtg	gcagcaccta	ctgcatgccc	atgtgctcca	gcaccagttt	cctgtgcgct	10560
aacaatgaaa	agtgcattcc	tatctggtgg	aaatgtgatg	gacagaaaga	ctgctcagat	10620
ggctctgatg	aactggccct	ttgcccgcag	cgcttctgcc	gactgggaca	gttccagtgc	10680
agtgcaggca	actgcaccag	cccgacagact	ttatgcaatg	ctcaccaaaa	ttgccctgat	10740
gggtctgatg	aagaccgtct	tctttgtgag	aatcaccact	gtgactccaa	tgaatggcag	10800
tgcgccaaaca	aacgttgcat	cccagaatcc	tggcagtgtg	acacatttaa	cgactgtgag	10860
gataactcag	atgaagacag	ttcccactgt	gccagcagga	cctgccggcc	gggccagttt	10920
cggtgtgcta	atggccgctg	catcccgcag	gcctggaagt	gtgatgtgga	taatgattgt	10980
ggagaccact	cggatgagcc	cattgaagaa	tgcattgagct	ctgcccactt	ctgtgacaac	11040
ttcacagaat	tcagctgcaa	aacaaattac	cgctgcatcc	caaagtgggc	cgtgtgcaat	11100
ggtgttagatg	actgcaggga	caacagtgtat	gagcaaggct	gtgaggagag	gacatgccat	11160
cctgtggggg	atttccgctg	taaaaatcac	cactgcaccc	ctcttcgttg	gcagtgtgat	11220
gggcaaaatg	actgtggaga	taactcagat	gaggaaaact	gtgctccccg	ggagtgcaca	11280
gagagcgagt	ttcgatgtgt	caatcagcag	tgcattccct	cgcgatggat	ctgtgaccat	11340
tacaacgact	gtggggacaa	ctcagatgaa	cgggactgtg	agatgaggac	ctgccatcct	11400
gaatattttc	agtgtacaag	tggacattgt	gtacacagtg	aactgaaatg	cgatggatcc	11460
gctgactgtt	tggatgcgtc	tgatgaagct	gattgtccca	cacgctttcc	tgatggtgca	11520
tactgccagg	ctactatggt	cgaatgcaaa	aaccatgttt	gtatcccgcc	atattggaaa	11580
tgtgatggcg	atgatcactg	tggcgatggt	tcagatgaag	aacttcacct	gtgcttggat	11640
gttccctgta	attcacaaaa	ccgtttccgg	tgtgacaaca	atcgctgcat	ttatagtcac	11700
gaggtgtgca	atgggtgtgga	tgactgtgga	gatggaactg	atgagacaga	ggagcactgt	11760
agaaaaccga	cccctaaacc	ttgtacagaa	tatgaatata	agtgtggcaa	tgggcattgc	11820
attccacatg	acaatgtgtg	tgatgatgcc	gatgactgtg	gtgactggtc	cgatgaactg	11880
ggtttgcaata	aaggaaaaga	aagaacatgt	gctgaaaata	tatgcgagca	aaattgtacc	11940
caattaaatg	aaggaggatt	tatctgctcc	tgtacagctg	ggttcgaaac	caatgttttt	12000
gacagaacct	cctgtctaga	tatcaatgaa	tgtgaacaat	ttgggacttg	tcccagcac	12060
tgcagaaata	ccaaaggaag	ttatgagtgt	gtctgtgctg	atggcttcac	gtctatgagt	12120
gaccgccttg	gaaaacgatg	tgcagctgag	ggtagctctc	ctttgttgct	actgcctgac	12180
aatgtccgaa	ttcgaaaata	taatctctca	tctgagaggt	tctcagagta	tcttcaagat	12240
gaggaatata	tccaagctgt	tgattatgat	tgggatccca	aggacatagg	cctcagtgtt	12300
gtgtattaca	ctgtgcgagg	ggagggctct	aggtttggtg	ctatcaaacg	tgcctacatc	12360
cccacttttg	aatccggccg	caataatctt	gtgcagggaag	ttgacctgaa	actgaaatac	12420
gtaatgcagc	cagatggaat	agcagtggac	tgggttgga	ggcatattta	ctggctcagat	12480
gtcaagaata	aacgcattga	ggtggctaaa	cttgatggaa	ggtacagaaa	gtggctgatt	12540
tccactgacc	tggaccaacc	agctgctatt	gctgtgaatc	ccaaactagg	gcttatgttc	12600
tggactgact	ggggaaagga	acctaaaatc	gagctgcctt	ggatgaatgg	agaggaccgc	12660
aacatcctgg	ttttcgagga	ccttggttgg	ccaactggcc	tttctatcga	ttatttgaac	12720
aatgaccgaa	tctactggag	tgacttcaag	gaggacgta	ttgaaaccat	aaaatatgat	12780
gggactgata	ggagagtcac	tgcaaaaggaa	gcaatgaacc	cttacagcct	ggacatcttt	12840
gaagaccagt	tatactggat	atctaaggaa	aagggagaag	tatggaaaca	aaataaattt	12900
gggcaaggaa	agaaagagaa	aacgctggta	gtgaaccctt	ggctcactca	agttcgaatc	12960
tttcatcaac	tcagatacaa	taagtcatgt	cccaaccctt	gcaaacagat	ctgcagccac	13020
ctctgccttc	tgagacctgg	aggatacagc	tgtgcctgtc	cccaaggctc	cagctttata	13080
gaggggagca	ccactgagtg	tgatgcagcc	atcgaaactgc	ctatcaacct	gcccccccca	13140
tgcagggtgca	tgcacggagg	aaattgctat	tttcatgaga	ctgacctccc	caaatgcaag	13200
tgtcctagcg	gctacaccgg	aaaatattgt	gaaatggcgt	tttcaaaagg	catctctcca	13260
ggaacaaccg	cagttagctgt	gctgttgaca	atcctcttga	tcgctcgtaat	tgagagctctg	13320
gcaattgcag	gattcttcca	ctatagaagg	accggtcccc	ttttgcctgc	tctgoccaaag	13380
ctgccaagct	taagcagctc	cgtcaagccc	tctgaaaatg	ggaatggggt	gaccttcaga	13440
tcagggggcag	atcttaacat	ggatatttga	gtgtctggtt	ttggacctga	gactgtattt	13500
gacaggtcaa	tggcaatgag	tgaagacttt	tgggggaaa	gtcattgaca	gcccataata	13560
tttgaaaacc	caatgtactc	agccagagac	agtgtgttca	aagtgttcca	gccaatccag	13620
gtgactgtat	ctgaaaatgt	ggataataag	aattatggaa	gtcccataaa	cccttctgag	13680
atagttccag	agacaaaccc	aacttcacca	gctgctgatg	gaaactcagg	gacaaaatgg	13740
aatctcttca	aacgaaaatc	taaacaaact	accaactttg	aaaatccaat	ctatgcacag	13800
atggagaacg	agcaaaaagg	aagtgttgct	gcgacaccac	ctccatcacc	ttcgctccct	13860
gctaagccta	agcctccttc	gagaagagac	ccaactccaa	cctattctgc	aacagaagac	13920
acttttaaaag	acaccgcaaa	tcttgttaaa	gaagactctg	aagtatag		13968

<210> 2
 <211> 4655
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 Met Asp Arg Gly Pro Ala Ala Val Ala Cys Thr Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Ala Cys Leu Ala Pro Ala Ser Gly Gln Glu Cys Asp Ser Ala His
 20 25 30
 Phe Arg Cys Gly Ser Gly His Cys Ile Pro Ala Asp Trp Arg Cys Asp
 35 40 45
 Gly Thr Lys Asp Cys Ser Asp Asp Ala Asp Glu Ile Gly Cys Ala Val
 50 55 60
 Val Thr Cys Gln Gln Gly Tyr Phe Lys Cys Gln Ser Glu Gly Gln Cys
 65 70 75 80
 Ile Pro Ser Ser Trp Val Cys Asp Gln Asp Gln Asp Cys Asp Asp Gly
 85 90 95
 Ser Asp Glu Arg Gln Asp Cys Ser Gln Ser Thr Cys Ser Ser His Gln
 100 105 110
 Ile Thr Cys Ser Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Glu Tyr Arg Cys Asp
 115 120 125
 His Val Arg Asp Cys Pro Asp Gly Ala Asp Glu Asn Asp Cys Gln Tyr
 130 135 140
 Pro Thr Cys Glu Gln Leu Thr Cys Asp Asn Gly Ala Cys Tyr Asn Thr
 145 150 155 160
 Ser Gln Lys Cys Asp Trp Lys Val Asp Cys Arg Asp Ser Ser Asp Glu
 165 170 175
 Ile Asn Cys Thr Glu Ile Cys Leu His Asn Glu Phe Ser Cys Gly Asn
 180 185 190
 Gly Glu Cys Ile Pro Arg Ala Tyr Val Cys Asp His Asp Asn Asp Cys
 195 200 205
 Gln Asp Gly Ser Asp Glu His Ala Cys Asn Tyr Pro Thr Cys Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Gln Phe Thr Cys Pro Ser Gly Arg Cys Ile Tyr Gln Asn Trp Val
 225 230 235 240
 Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Lys Asp Asn Gly Asp Glu Asp Gly Cys
 245 250 255
 Glu Ser Gly Pro His Asp Val His Lys Cys Ser Pro Arg Glu Trp Ser
 260 265 270
 Cys Pro Glu Ser Gly Arg Cys Ile Ser Ile Tyr Lys Val Cys Asp Gly
 275 280 285
 Ile Leu Asp Cys Pro Gly Arg Glu Asp Glu Asn Asn Thr Ser Thr Gly
 290 295 300

Lys Tyr Cys Ser Met Thr Leu Cys Ser Ala Leu Asn Cys Gln Tyr Gln
 305 310 315 320
 Cys His Glu Thr Pro Tyr Gly Gly Ala Cys Phe Cys Pro Pro Gly Tyr
 325 330 335
 Ile Ile Asn His Asn Asp Ser Arg Thr Cys Val Glu Phe Asp Asp Cys
 340 345 350
 Gln Ile Trp Gly Ile Cys Asp Gln Lys Cys Glu Ser Arg Pro Gly Arg
 355 360 365
 His Leu Cys His Cys Glu Glu Gly Tyr Ile Leu Glu Arg Gly Gln Tyr
 370 375 380
 Cys Lys Ala Asn Asp Ser Phe Gly Glu Ala Ser Ile Ile Phe Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Arg Asp Leu Leu Ile Gly Asp Ile His Gly Arg Ser Phe Arg Ile
 405 410 415
 Leu Val Glu Ser Gln Asn Arg Gly Val Ala Val Gly Val Ala Phe His
 420 425 430
 Tyr His Leu Gln Arg Val Phe Trp Thr Asp Thr Val Gln Asn Lys Val
 435 440 445
 Phe Ser Val Asp Ile Asn Gly Leu Asn Ile Gln Glu Val Leu Asn Val
 450 455 460
 Ser Val Glu Thr Pro Glu Asn Leu Ala Val Asp Trp Val Asn Asn Lys
 465 470 475 480
 Ile Tyr Leu Val Glu Thr Lys Val Asn Arg Ile Asp Met Val Asn Leu
 485 490 495
 Asp Gly Ser Tyr Arg Val Thr Leu Ile Thr Glu Asn Leu Gly His Pro
 500 505 510
 Arg Gly Ile Ala Val Asp Pro Thr Val Gly Tyr Leu Phe Phe Ser Asp
 515 520 525
 Trp Glu Ser Leu Ser Gly Glu Pro Lys Leu Glu Arg Ala Phe Met Asp
 530 535 540
 Gly Ser Asn Arg Lys Asp Leu Val Lys Thr Lys Leu Gly Trp Pro Ala
 545 550 555 560
 Gly Val Thr Leu Asp Met Ile Ser Lys Arg Val Tyr Trp Val Asp Ser
 565 570 575
 Arg Phe Asp Tyr Ile Glu Thr Val Thr Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Lys
 580 585 590
 Thr Val Val His Gly Gly Ser Leu Ile Pro His Pro Phe Gly Val Ser
 595 600 605
 Leu Phe Glu Gly Gln Val Phe Phe Thr Asp Trp Thr Lys Met Ala Val
 610 615 620
 Leu Lys Ala Asn Lys Phe Thr Glu Thr Asn Pro Gln Val Tyr Tyr Gln
 625 630 635 640
 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
 945 950 955 960
 Lys Ser Tyr Asp Val Asn Ile Gln Thr Gly Ser Asn Ala Cys Asn Gln
 965 970 975
 Pro Thr His Pro Asn Gly Asp Cys Ser His Phe Cys Phe Pro Val Pro
 980 985 990
 Asn Phe Gln Arg Val Cys Gly Cys Pro Tyr Gly Met Arg Leu Ala Ser

ES 2 532 333 T3

995	1000	1005
Asn His Leu Thr Cys Glu Gly Asp Pro Thr Asn Glu Pro Pro Thr Glu 1010 1015 1020		
Gln Cys Gly Leu Phe Ser Phe Pro Cys Lys Asn Gly Arg Cys Val Pro 1025 1030 1035 1040		
Asn Tyr Tyr Leu Cys Asp Gly Val Asp Asp Cys His Asp Asn Ser Asp 1045 1050 1055		
Glu Gln Leu Cys Gly Thr Leu Asn Asn Thr Cys Ser Ser Ser Ala Phe 1060 1065 1070		
Thr Cys Gly His Gly Glu Cys Ile Pro Ala His Trp Arg Cys Asp Lys 1075 1080 1085		
Arg Asn Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu His Asn Cys Pro Thr His 1090 1095 1100		
Ala Pro Ala Ser Cys Leu Asp Thr Gln Tyr Thr Cys Asp Asn His Gln 1105 1110 1115 1120		
Cys Ile Ser Lys Asn Trp Val Cys Asp Thr Asp Asn Asp Cys Gly Asp 1125 1130 1135		
Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys Asn Ser Thr Glu Thr Cys Gln Pro Ser 1140 1145 1150		
Gln Phe Asn Cys Pro Asn His Arg Cys Ile Asp Leu Ser Phe Val Cys 1155 1160 1165		
Asp Gly Asp Lys Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu Val Gly Cys Val 1170 1175 1180		
Leu Asn Cys Thr Ala Ser Gln Phe Lys Cys Ala Ser Gly Asp Lys Cys 1185 1190 1195 1200		
Ile Gly Val Thr Asn Arg Cys Asp Gly Val Phe Asp Cys Ser Asp Asn 1205 1210 1215		
Ser Asp Glu Ala Gly Cys Pro Thr Arg Pro Pro Gly Met Cys His Ser 1220 1225 1230		
Asp Glu Phe Gln Cys Gln Glu Asp Gly Ile Cys Ile Pro Asn Phe Trp 1235 1240 1245		
Glu Cys Asp Gly His Pro Asp Cys Leu Tyr Gly Ser Asp Glu His Asn 1250 1255 1260		
Ala Cys Val Pro Lys Thr Cys Pro Ser Ser Tyr Phe His Cys Asp Asn 1265 1270 1275 1280		
Gly Asn Cys Ile His Arg Ala Trp Leu Cys Asp Arg Asp Asn Asp Cys 1285 1290 1295		
Gly Asp Met Ser Asp Glu Lys Asp Cys Pro Thr Gln Pro Phe Arg Cys 1300 1305 1310		
Pro Ser Trp Gln Trp Gln Cys Leu Gly His Asn Ile Cys Val Asn Leu 1315 1320 1325		
Ser Val Val Cys Asp Gly Ile Phe Asp Cys Pro Asn Gly Thr Asp Glu 1330 1335 1340		

Ser Pro Leu Cys Asn Gly Asn Ser Cys Ser Asp Phe Asn Gly Gly Cys
1345 1350 1355 1360

Thr His Glu Cys Val Gln Glu Pro Phe Gly Ala Lys Cys Leu Cys Pro
1365 1370 1375

Leu Gly Phe Leu Leu Ala Asn Asp Ser Lys Thr Cys Glu Asp Ile Asp
1380 1385 1390

Glu Cys Asp Ile Leu Gly Ser Cys Ser Gln His Cys Tyr Asn Met Arg
1395 1400 1405

Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Met Leu Glu Ser Asp
1410 1415 1420

Gly Arg Thr Cys Lys Val Thr Ala Ser Glu Ser Leu Leu Leu Leu Val
1425 1430 1435 1440

Ala Ser Gln Asn Lys Ile Ile Ala Asp Ser Val Thr Ser Gln Val His
1445 1450 1455

Asn Ile Tyr Ser Leu Val Glu Asn Gly Ser Tyr Ile Val Ala Val Asp
1460 1465 1470

Phe Asp Ser Ile Ser Gly Arg Ile Phe Trp Ser Asp Ala Thr Gln Gly
1475 1480 1485

Lys Thr Trp Ser Ala Phe Gln Asn Gly Thr Asp Arg Arg Val Val Phe
1490 1495 1500

Asp Ser Ser Ile Ile Leu Thr Glu Thr Ile Ala Ile Asp Trp Val Gly
1505 1510 1515 1520

Arg Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Tyr Ala Leu Glu Thr Ile Glu Val Ser
1525 1530 1535

Lys Ile Asp Gly Ser His Arg Thr Val Leu Ile Ser Lys Asn Leu Thr
1540 1545 1550

Asn Pro Arg Gly Leu Ala Leu Asp Pro Arg Met Asn Glu His Leu Leu
1555 1560 1565

Phe Trp Ser Asp Trp Gly His His Pro Arg Ile Glu Arg Ala Ser Met
1570 1575 1580

Asp Gly Ser Met Arg Thr Val Ile Val Gln Asp Lys Ile Phe Trp Pro
1585 1590 1595 1600

Cys Gly Leu Thr Ile Asp Tyr Pro Asn Arg Leu Leu Tyr Phe Met Asp
1605 1610 1615

Ser Tyr Leu Asp Tyr Met Asp Phe Cys Asp Tyr Asn Gly His His Arg
1620 1625 1630

Arg Gln Val Ile Ala Ser Asp Leu Ile Ile Arg His Pro Tyr Ala Leu
1635 1640 1645

Thr Leu Phe Glu Asp Ser Val Tyr Trp Thr Asp Arg Ala Thr Arg Arg
1650 1655 1660

Val Met Arg Ala Asn Lys Trp His Gly Gly Asn Gln Ser Val Val Met
1665 1670 1675 1680

Tyr Asn Ile Gln Trp Pro Leu Gly Ile Val Ala Val His Pro Ser Lys
1685 1690 1695

Gln Pro Asn Ser Val Asn Pro Cys Ala Phe Ser Arg Cys Ser His Leu
1700 1705 1710

Cys Leu Leu Ser Ser Gln Gly Pro His Phe Tyr Ser Cys Val Cys Pro
1715 1720 1725

Ser Gly Trp Ser Leu Ser Pro Asp Leu Leu Asn Cys Leu Arg Asp Asp
1730 1735 1740

Gln Pro Phe Leu Ile Thr Val Arg Gln His Ile Ile Phe Gly Ile Ser
1745 1750 1755 1760

Leu Asn Pro Glu Val Lys Ser Asn Asp Ala Met Val Pro Ile Ala Gly
1765 1770 1775

Ile Gln Asn Gly Leu Asp Val Glu Phe Asp Asp Ala Glu Gln Tyr Ile
1780 1785 1790

Tyr Trp Val Glu Asn Pro Gly Glu Ile His Arg Val Lys Thr Asp Gly
1795 1800 1805

Thr Asn Arg Thr Val Phe Ala Ser Ile Ser Met Val Gly Pro Ser Met
1810 1815 1820

Asn Leu Ala Leu Asp Trp Ile Ser Arg Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Pro
1825 1830 1835 1840

Arg Thr Gln Ser Ile Glu Val Leu Thr Leu His Gly Asp Ile Arg Tyr
1845 1850 1855

Arg Lys Thr Leu Ile Ala Asn Asp Gly Thr Ala Leu Gly Val Gly Phe
1860 1865 1870

Pro Ile Gly Ile Thr Val Asp Pro Ala Arg Gly Lys Leu Tyr Trp Ser
1875 1880 1885

Asp Gln Gly Thr Asp Ser Gly Val Pro Ala Lys Ile Ala Ser Ala Asn
1890 1895 1900

Met Asp Gly Thr Ser Val Lys Thr Leu Phe Thr Gly Asn Leu Glu His
1905 1910 1915 1920

Leu Glu Cys Val Thr Leu Asp Ile Glu Glu Gln Lys Leu Tyr Trp Ala
1925 1930 1935

Val Thr Gly Arg Gly Val Ile Glu Arg Gly Asn Val Asp Gly Thr Asp
1940 1945 1950

Arg Met Ile Leu Val His Gln Leu Ser His Pro Trp Gly Ile Ala Val
1955 1960 1965

His Asp Ser Phe Leu Tyr Tyr Thr Asp Glu Gln Tyr Glu Val Ile Glu
1970 1975 1980

Arg Val Asp Lys Ala Thr Gly Ala Asn Lys Ile Val Leu Arg Asp Asn
1985 1990 1995 2000

Val Pro Asn Leu Arg Gly Leu Gln Val Tyr His Arg Arg Asn Ala Ala
2005 2010 2015

Glu Ser Ser Asn Gly Cys Ser Asn Asn Met Asn Ala Cys Gln Gln Ile
2020 2025 2030

Cys Leu Pro Val Pro Gly Gly Leu Phe Ser Cys Ala Cys Ala Thr Gly

ES 2 532 333 T3

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	2075 2080
Ser Asp His Ser Glu Thr Met Val Pro Val Ala Gly Gln Gly Arg Asn 2085	2090	2095
Ala Leu His Val Asp Val Asp Val Ser Ser Gly Phe Ile Tyr Trp Cys 2100	2105	2110
Asp Phe Ser Ser Ser Val Ala Ser Asp Asn Ala Ile Arg Arg Ile Lys 2115	2120	2125
Pro Asp Gly Ser Ser Leu Met Asn Ile Val Thr His Gly Ile Gly Glu 2130	2135	2140
Asn Gly Val Arg Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Ala Gly Asn Leu Tyr 2145	2150	2155 2160
Phe Thr Asn Ala Phe Val Ser Glu Thr Leu Ile Glu Val Leu Arg Ile 2165	2170	2175
Asn Thr Thr Tyr Arg Arg Val Leu Leu Lys Val Thr Val Asp Met Pro 2180	2185	2190
Arg His Ile Val Val Asp Pro Lys Asn Arg Tyr Leu Phe Trp Ala Asp 2195	2200	2205
Tyr Gly Gln Arg Pro Lys Ile Glu Arg Ser Phe Leu Asp Cys Thr Asn 2210	2215	2220
Arg Thr Val Leu Val Ser Glu Gly Ile Val Thr Pro Arg Gly Leu Ala 2225	2230	2235 2240
Val Asp Arg Ser Asp Gly Tyr Val Tyr Trp Val Asp Asp Ser Leu Asp 2245	2250	2255
Ile Ile Ala Arg Ile Arg Ile Asn Gly Glu Asn Ser Glu Val Ile Arg 2260	2265	2270
Tyr Gly Ser Arg Tyr Pro Thr Pro Tyr Gly Ile Thr Val Phe Glu Asn 2275	2280	2285
Ser Ile Ile Trp Val Asp Arg Asn Leu Lys Lys Ile Phe Gln Ala Ser 2290	2295	2300
Lys Glu Pro Glu Asn Thr Glu Pro Pro Thr Val Ile Arg Asp Asn Ile 2305	2310	2315 2320
Asn Trp Leu Arg Asp Val Thr Ile Phe Asp Lys Gln Val Gln Pro Arg 2325	2330	2335
Ser Pro Ala Glu Val Asn Asn Asn Pro Cys Leu Glu Asn Asn Gly Gly 2340	2345	2350
Cys Ser His Leu Cys Phe Ala Leu Pro Gly Leu His Thr Pro Lys Cys 2355	2360	2365
Asp Cys Ala Phe Gly Thr Leu Gln Ser Asp Gly Lys Asn Cys Ala Ile 2370	2375	2380

Ser Thr Glu Asn Phe Leu Ile Phe Ala Leu Ser Asn Ser Leu Arg Ser
2385 2390 2395 2400

Leu His Leu Asp Pro Glu Asn His Ser Pro Pro Phe Gln Thr Ile Asn
2405 2410 2415

Val Glu Arg Thr Val Met Ser Leu Asp Tyr Asp Ser Val Ser Asp Arg
2420 2425 2430

Ile Tyr Phe Thr Gln Asn Leu Ala Ser Gly Val Gly Gln Ile Ser Tyr
2435 2440 2445

Ala Thr Leu Ser Ser Gly Ile His Thr Pro Thr Val Ile Ala Ser Gly
2450 2455 2460

Ile Gly Thr Ala Asp Gly Ile Ala Phe Asp Trp Ile Thr Arg Arg Ile
2465 2470 2475 2480

Tyr Tyr Ser Asp Tyr Leu Asn Gln Met Ile Asn Ser Met Ala Glu Asp
2485 2490 2495

Gly Ser Asn Arg Thr Val Ile Ala Arg Val Pro Lys Pro Arg Ala Ile
2500 2505 2510

Val Leu Asp Pro Cys Gln Gly Tyr Leu Tyr Trp Ala Asp Trp Asp Thr
2515 2520 2525

His Ala Lys Ile Glu Arg Ala Thr Leu Gly Gly Asn Phe Arg Val Pro
2530 2535 2540

Ile Val Asn Ser Ser Leu Val Met Pro Ser Gly Leu Thr Leu Asp Tyr
2545 2550 2555 2560

Glu Glu Asp Leu Leu Tyr Trp Val Asp Ala Ser Leu Gln Arg Ile Glu
2565 2570 2575

Arg Ser Thr Leu Thr Gly Val Asp Arg Glu Val Ile Val Asn Ala Ala
2580 2585 2590

Val His Ala Phe Gly Leu Thr Leu Tyr Gly Gln Tyr Ile Tyr Trp Thr
2595 2600 2605

Asp Leu Tyr Thr Gln Arg Ile Tyr Arg Ala Asn Lys Tyr Asp Gly Ser
2610 2615 2620

Gly Gln Ile Ala Met Thr Thr Asn Leu Leu Ser Gln Pro Arg Gly Ile
2625 2630 2635 2640

Asn Thr Val Val Lys Asn Gln Lys Gln Gln Cys Asn Asn Pro Cys Glu
2645 2650 2655

Gln Phe Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Ala Pro Gly Pro Asn Gly
2660 2665 2670

Ala Glu Cys Gln Cys Pro His Glu Gly Asn Trp Tyr Leu Ala Asn Asn
2675 2680 2685

Arg Lys His Cys Ile Val Asp Asn Gly Glu Arg Cys Gly Ala Ser Ser
2690 2695 2700

Phe Thr Cys Ser Asn Gly Arg Cys Ile Ser Glu Glu Trp Lys Cys Asp
2705 2710 2715 2720

Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Met Glu Ser Val Cys
2725 2730 2735

Ala Leu His Thr Cys Ser Pro Thr Ala Phe Thr Cys Ala Asn Gly Arg
 2740 2745 2750
 Cys Val Gln Tyr Ser Tyr Arg Cys Asp Tyr Tyr Asn Asp Cys Gly Asp
 2755 2760 2765
 Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Phe Arg Asp Cys Asn Ala Thr Thr
 2770 2775 2780
 Glu Phe Met Cys Asn Asn Arg Arg Cys Ile Pro Arg Glu Phe Ile Cys
 2785 2790 2795 2800
 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 2880
 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 2960
 Pro Asp Arg Arg Cys Ile Pro Gln Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Val
 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

ES 2 532 333 T3

3075	3080	3085
Glu Met Met Lys Leu Cys Asn His Leu Asp Asp Cys Leu Asp Asn Ser 3090	3095	3100
Asp Glu Lys Gly Cys Gly Ile Asn Glu Cys His Asp Pro Ser Ile Ser 3105	3110	3115 3120
Gly Cys Asp His Asn Cys Thr Asp Thr Leu Thr Ser Phe Tyr Cys Ser 3125	3130	3135
Cys Arg Pro Gly Tyr Lys Leu Met Ser Asp Lys Arg Thr Cys Val Asp 3140	3145	3150
Ile Asp Glu Cys Thr Glu Met Pro Phe Val Cys Ser Gln Lys Cys Glu 3155	3160	3165
Asn Val Ile Gly Ser Tyr Ile Cys Lys Cys Ala Pro Gly Tyr Leu Arg 3170	3175	3180
Glu Pro Asp Gly Lys Thr Cys Arg Gln Asn Ser Asn Ile Glu Pro Tyr 3185	3190	3195 3200
Leu Ile Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr Leu Arg Asn Leu Thr Ile Asp Gly 3205	3210	3215
Tyr Phe Tyr Ser Leu Ile Leu Glu Gly Leu Asp Asn Val Val Ala Leu 3220	3225	3230
Asp Phe Asp Arg Val Glu Lys Arg Leu Tyr Trp Ile Asp Thr Gln Arg 3235	3240	3245
Gln Val Ile Glu Arg Met Phe Leu Asn Lys Thr Asn Lys Glu Thr Ile 3250	3255	3260
Ile Asn His Arg Leu Pro Ala Ala Glu Ser Leu Ala Val Asp Trp Val 3265	3270	3275 3280
Ser Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Asp Ala Arg Leu Asp Gly Leu Phe Val 3285	3290	3295
Ser Asp Leu Asn Gly Gly His Arg Arg Met Leu Ala Gln His Cys Val 3300	3305	3310
Asp Ala Asn Asn Thr Phe Cys Phe Asp Asn Pro Arg Gly Leu Ala Leu 3315	3320	3325
His Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Tyr Trp Ala Asp Trp Gly His Arg Ala 3330	3335	3340
Tyr Ile Gly Arg Val Gly Met Asp Gly Thr Asn Lys Ser Val Ile Ile 3345	3350	3355 3360
Ser Thr Lys Leu Glu Trp Pro Asn Gly Ile Thr Ile Asp Tyr Thr Asn 3365	3370	3375
Asp Leu Leu Tyr Trp Ala Asp Ala His Leu Gly Tyr Ile Glu Tyr Ser 3380	3385	3390
Asp Leu Glu Gly His His Arg His Thr Val Tyr Asp Gly Ala Leu Pro 3395	3400	3405
His Pro Phe Ala Ile Thr Ile Phe Glu Asp Thr Ile Tyr Trp Thr Asp 3410	3415	3420

Trp Asn Thr Arg Thr Val Glu Lys Gly Asn Lys Tyr Asp Gly Ser Asn
 3425 3430 3435 3440
 Arg Gln Thr Leu Val Asn Thr Thr His Arg Pro Phe Asp Ile His Val
 3445 3450 3455
 Tyr His Pro Tyr Arg Gln Pro Ile Val Ser Asn Pro Cys Gly Thr Asn
 3460 3465 3470
 Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Ile Lys Pro Gly Gly Lys Gly
 3475 3480 3485
 Phe Thr Cys Glu Cys Pro Asp Asp Phe Arg Thr Leu Gln Leu Ser Gly
 3490 3495 3500
 Ser Thr Tyr Cys Met Pro Met Cys Ser Ser Thr Gln Phe Leu Cys Ala
 3505 3510 3515 3520
 Asn Asn Glu Lys Cys Ile Pro Ile Trp Trp Lys Cys Asp Gly Gln Lys
 3525 3530 3535
 Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Leu Ala Leu Cys Pro Gln Arg Phe
 3540 3545 3550
 Cys Arg Leu Gly Gln Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Thr Ser Pro
 3555 3560 3565
 Gln Thr Leu Cys Asn Ala His Gln Asn Cys Pro Asp Gly Ser Asp Glu
 3570 3575 3580
 Asp Arg Leu Leu Cys Glu Asn His His Cys Asp Ser Asn Glu Trp Gln
 3585 3590 3595 3600
 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 3680
 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 3760
 Glu Ser Glu Phe Arg Cys Val Asn Gln Gln Cys Ile Pro Ser Arg Trp
 3765 3770 3775

Ile Cys Asp His Tyr Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Arg Asp
3780 3785 3790

Cys Glu Met Arg Thr Cys His Pro Glu Tyr Phe Gln Cys Thr Ser Gly
3795 3800 3805

His Cys Val His Ser Glu Leu Lys Cys Asp Gly Ser Ala Asp Cys Leu
3810 3815 3820

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Ile Lys Arg Ala Tyr Ile Pro Asn Phe Glu Ser Gly Arg Asn

4115	4120	4125
Asn Leu Val Gln Glu Val Asp Leu Lys Leu Lys Tyr Val Met Gln Pro		
4130	4135	4140
Asp Gly Ile Ala Val Asp Trp Val Gly Arg His Ile Tyr Trp Ser Asp		
4145	4150	4155 4160
Val Lys Asn Lys Arg Ile Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Arg Tyr Arg		
	4165	4170 4175
Lys Trp Leu Ile Ser Thr Asp Leu Asp Gln Pro Ala Ala Ile Ala Val		
	4180	4185 4190
Asn Pro Lys Leu Gly Leu Met Phe Trp Thr Asp Trp Gly Lys Glu Pro		
	4195	4200 4205
Lys Ile Glu Ser Ala Trp Met Asn Gly Glu Asp Arg Asn Ile Leu Val		
	4210	4215 4220
Phe Glu Asp Leu Gly Trp Pro Thr Gly Leu Ser Ile Asp Tyr Leu Asn		
	4225	4230 4235 4240
Asn Asp Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Phe Lys Glu Asp Val Ile Glu Thr		
	4245	4250 4255
Ile Lys Tyr Asp Gly Thr Asp Arg Arg Val Ile Ala Lys Glu Ala Met		
	4260	4265 4270
Asn Pro Tyr Ser Leu Asp Ile Phe Glu Asp Gln Leu Tyr Trp Ile Ser		
	4275	4280 4285
Lys Glu Lys Gly Glu Val Trp Lys Gln Asn Lys Phe Gly Gln Gly Lys		
	4290	4295 4300
Lys Glu Lys Thr Leu Val Val Asn Pro Trp Leu Thr Gln Val Arg Ile		
	4305	4310 4315 4320
Phe His Gln Leu Arg Tyr Asn Lys Ser Val Pro Asn Leu Cys Lys Gln		
	4325	4330 4335
Ile Cys Ser His Leu Cys Leu Leu Arg Pro Gly Gly Tyr Ser Cys Ala		
	4340	4345 4350
Cys Pro Gln Gly Ser Ser Phe Ile Glu Gly Ser Thr Thr Glu Cys Asp		
	4355	4360 4365
Ala Ala Ile Glu Leu Pro Ile Asn Leu Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met		
	4370	4375 4380
His Gly Gly Asn Cys Tyr Phe Asp Glu Thr Asp Leu Pro Lys Cys Lys		
	4385	4390 4395 4400
Cys Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Met Ala Phe Ser Lys		
	4405	4410 4415
Gly Ile Ser Pro Gly Thr Thr Ala Val Ala Val Leu Leu Thr Ile Leu		
	4420	4425 4430
Leu Ile Val Val Ile Gly Ala Leu Ala Ile Ala Gly Phe Phe His Tyr		
	4435	4440 4445
Arg Arg Thr Gly Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu Pro Ser Leu		
	4450	4455 4460

Ser	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Asn	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Phe	Arg	4465	4470	4475	4480
Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Asn	Met	Asp	Ile	Gly	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	4485	4490	4495	
Glu	Thr	Ala	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Ala	Met	Ser	Glu	Asp	Phe	Val	Met	4500	4505	4510	
Glu	Met	Gly	Lys	Gln	Pro	Ile	Ile	Phe	Glu	Asn	Pro	Met	Tyr	Ser	Ala	4515	4520	4525	
Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Lys	Val	Val	Gln	Pro	Ile	Gln	Val	Thr	Val	Ser	4530	4535	4540	
Glu	Asn	Val	Asp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Gly	Ser	Pro	Ile	Asn	Pro	Ser	Glu	4545	4550	4555	4560
Ile	Val	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Thr	Ser	Pro	Ala	Ala	Asp	Gly	Thr	Gln	4565	4570	4575	
Val	Thr	Lys	Trp	Asn	Leu	Phe	Lys	Arg	Lys	Ser	Lys	Gln	Thr	Thr	Asn	4580	4585	4590	
Phe	Glu	Asn	Pro	Ile	Tyr	Ala	Gln	Met	Glu	Asn	Glu	Gln	Lys	Glu	Ser	4595	4600	4605	
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

1. Uso de megalina humana en una muestra de orina obtenida a partir de un sujeto como marcador de diagnóstico para detectar un trastorno renal que es nefropatía por IgA, en el que se mide el nivel de megalina humana en una muestra de orina y un nivel aumentado de megalina humana indica el trastorno renal.
- 5 2. El uso de megalina humana en orina según la reivindicación 1, en el que el trastorno renal se detecta para predicción del pronóstico.
- 10 3. El uso de megalina humana en orina según la reivindicación, 2, en el que se efectúa la predicción del pronóstico de un trastorno renal para evaluar disfunciones tubulares.
4. El uso de megalina humana en orina según la reivindicación 1, en el que se detecta el trastorno renal para evaluar la graduación del trastorno.
- 15 5. El uso de megalina humana en orina según la reivindicación 4, en el que se evalúa la graduación del trastorno renal para evaluar disfunciones tubulares.

Fig. 1

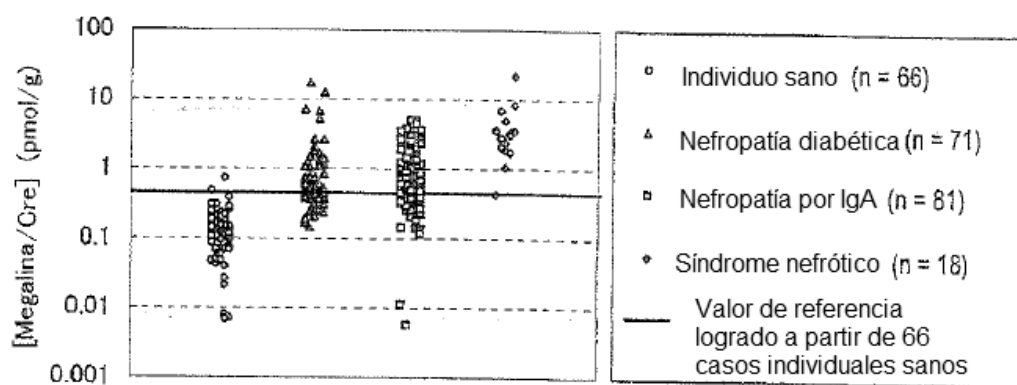


Fig. 2

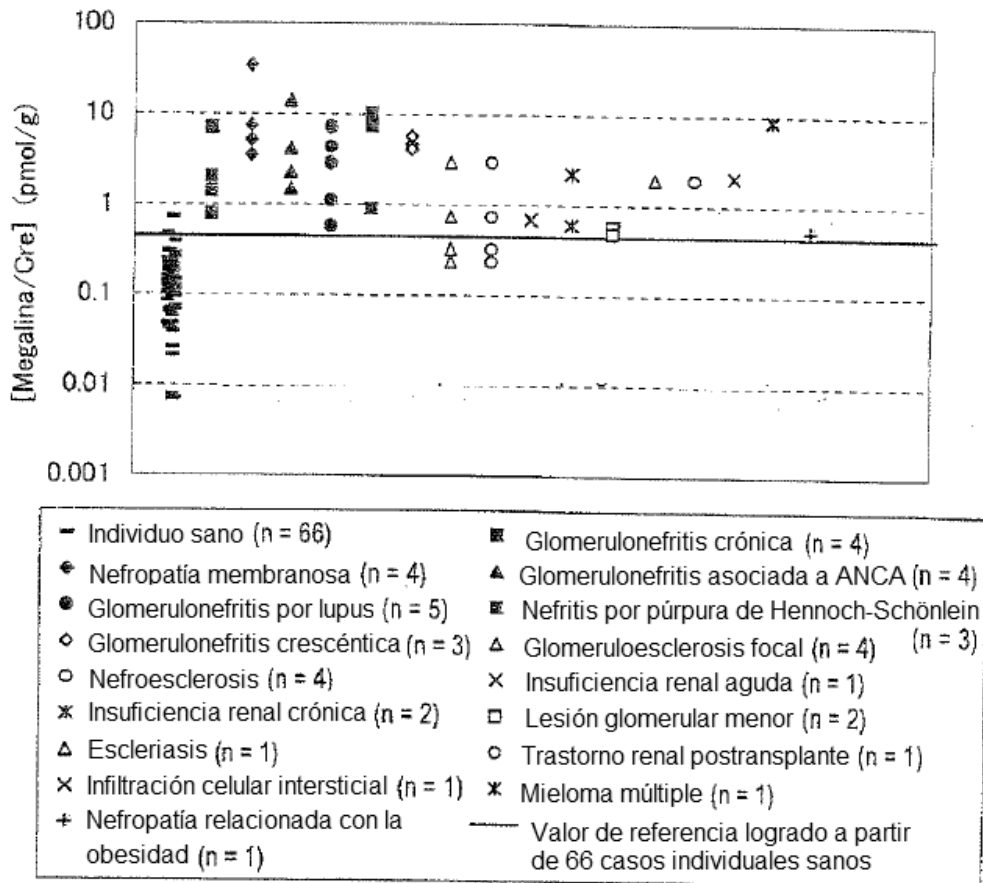


Fig. 3

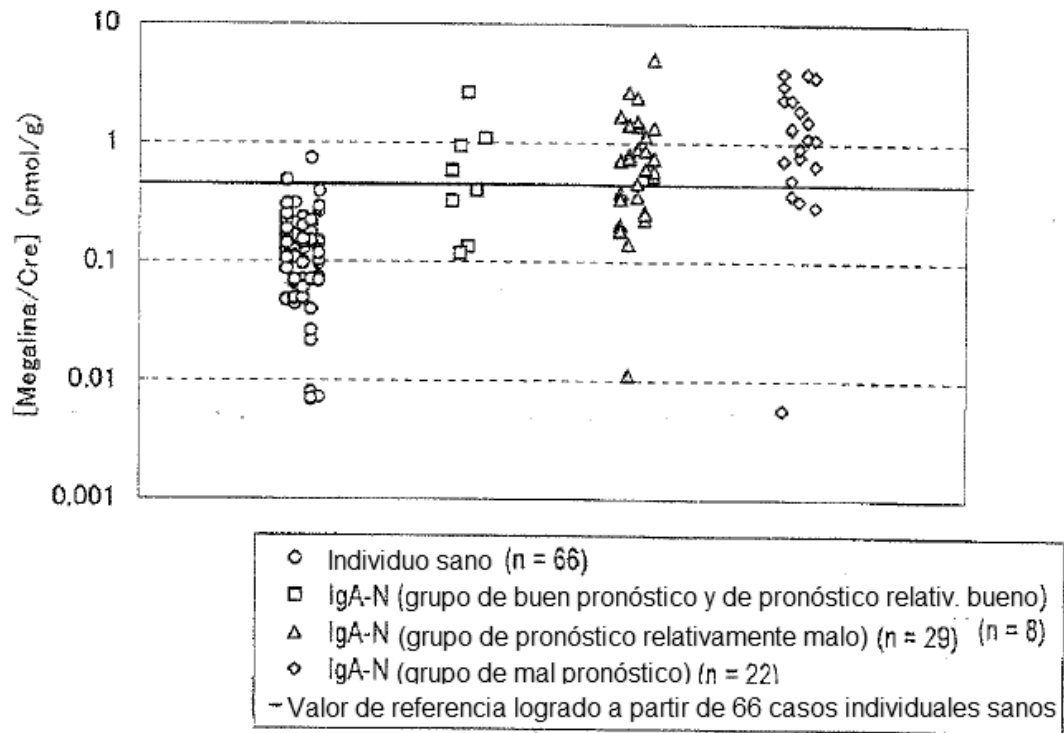


Fig. 4

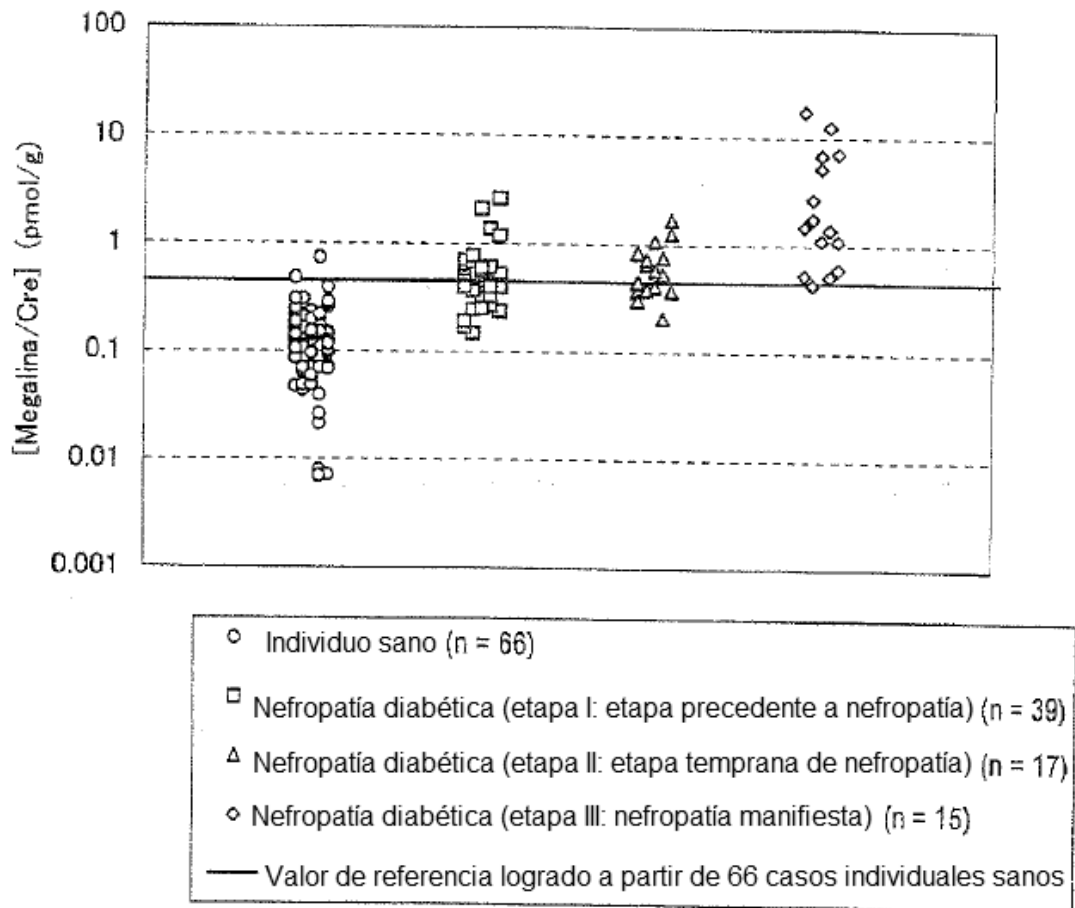


Fig. 5

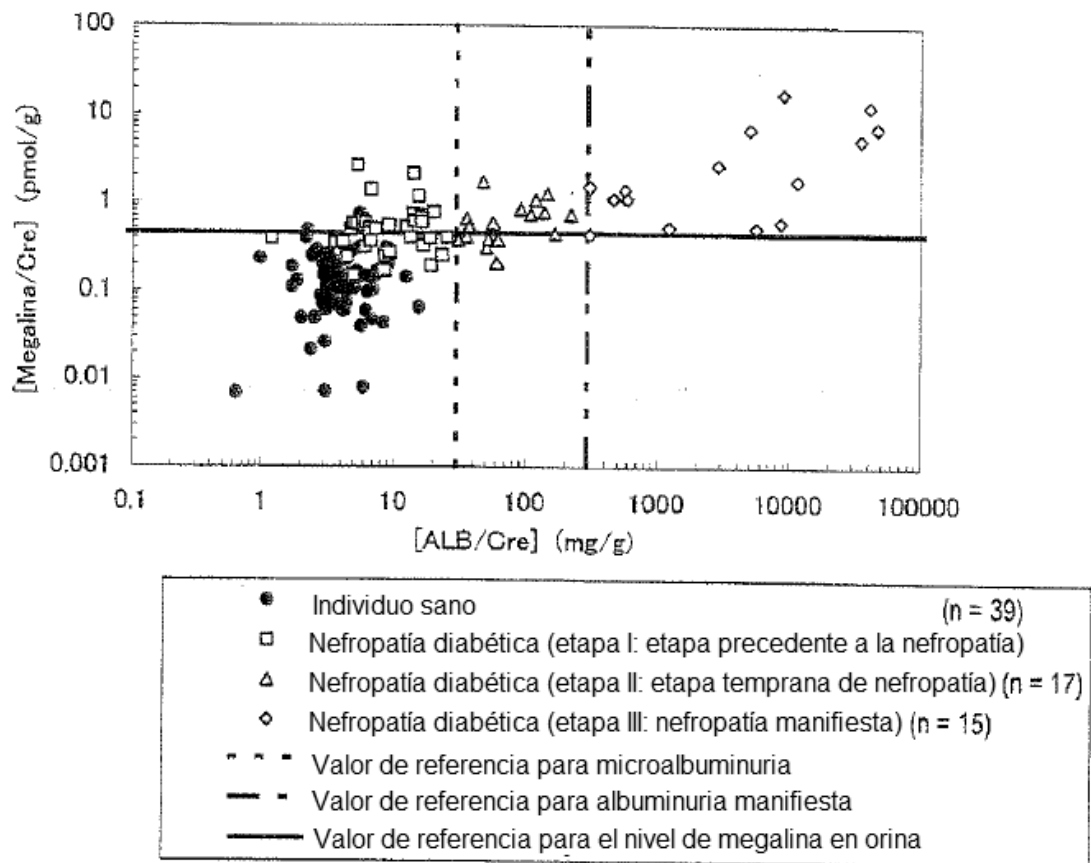


Fig. 6

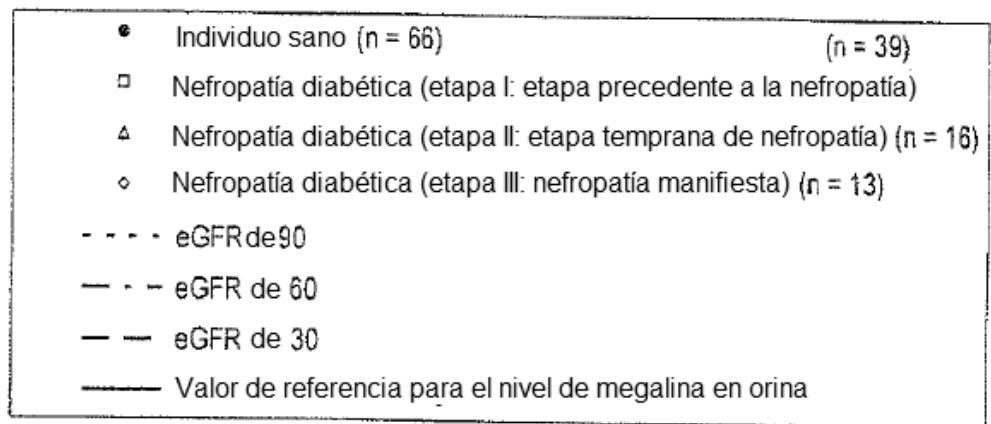
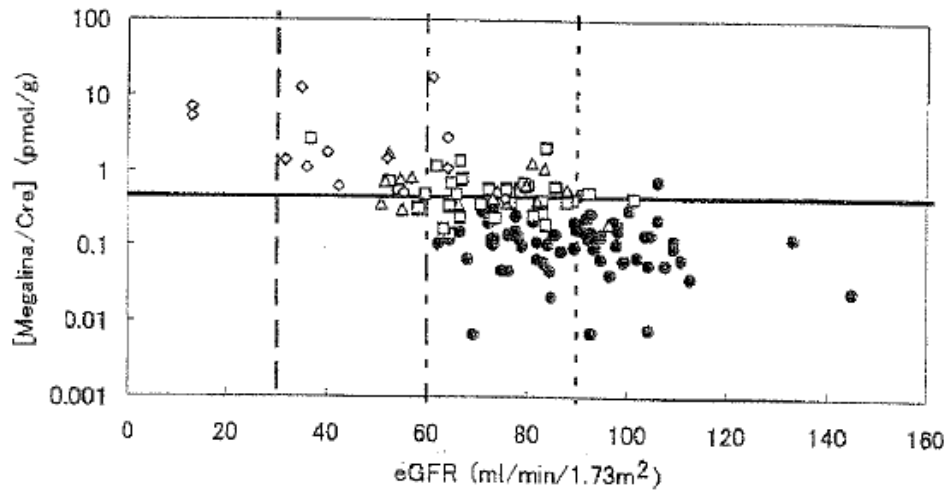


Fig. 7

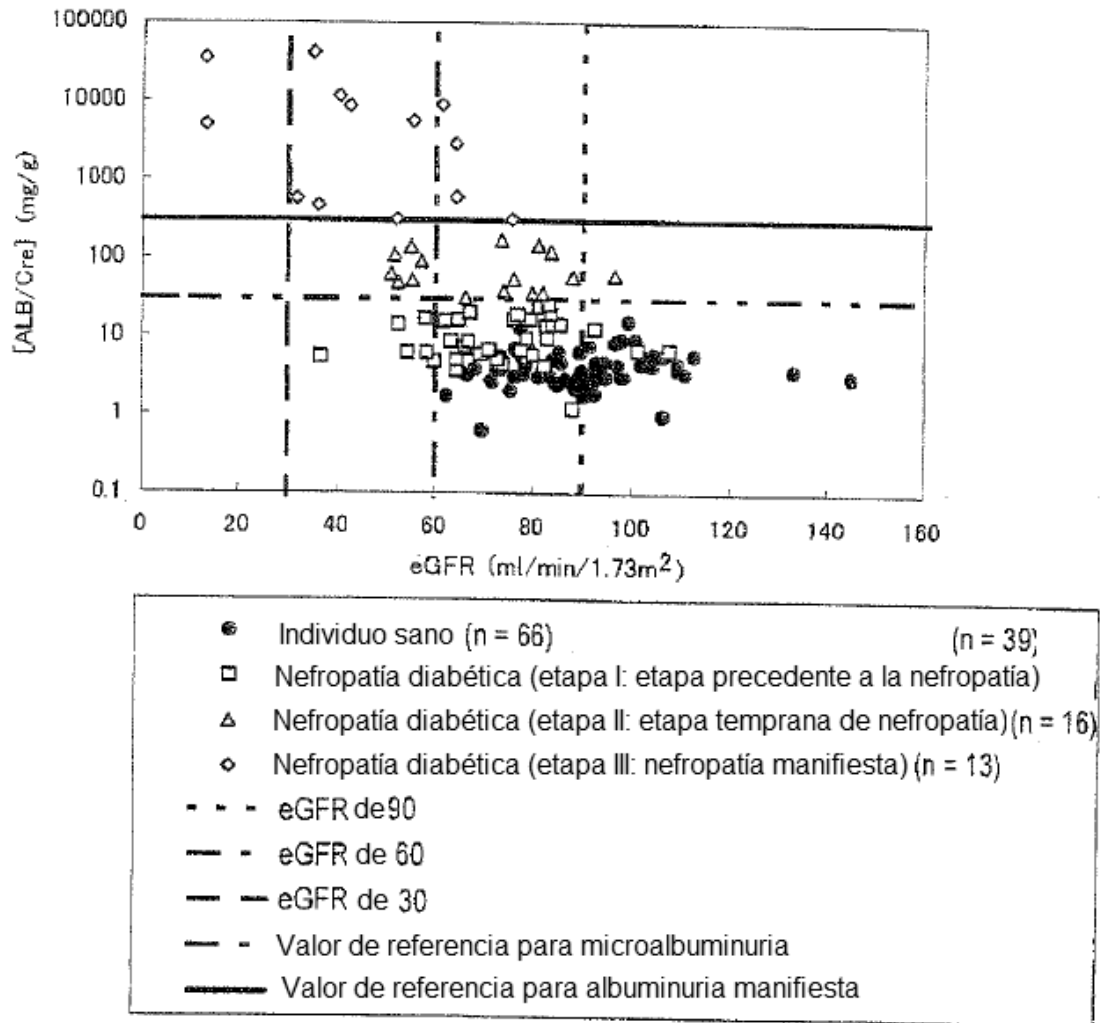
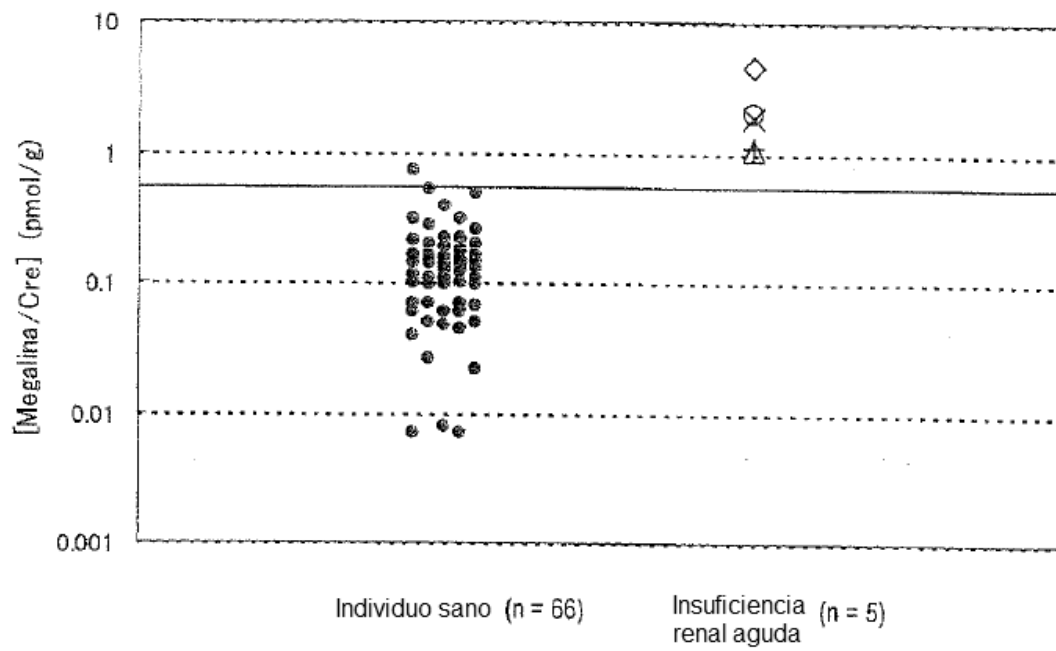


Fig. 8



- Individuo sano
- ① Insuficiencia renal aguda asociada a infarto cerebral
- △ ② Insuficiencia renal aguda causada por choque séptico asociado a necrosis tubular
- × ③ Insuficiencia renal aguda después de transplante de hígado
- ◇ ④ Insuficiencia renal aguda asociada a neumonía aguda o insuficiencia respiratoria
- + ⑤ Insuficiencia renal aguda asociada a choque cardiogénico
- Valor de referencia logrado a partir de 66 casos individuales sanos