

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4361786号
(P4361786)

(45) 発行日 平成21年11月11日 (2009.11.11)

(24) 登録日 平成21年8月21日 (2009.8.21)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
請求項の数 13 (全 46 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-505346 (P2003-505346)	(73) 特許権者	399038620
(86) (22) 出願日	平成14年6月14日 (2002.6.14)		ザ スクリプス リサーチ インスティチ ュート
(65) 公表番号	特表2005-500831 (P2005-500831A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ジョラ ノース トリー パインズ ロー ド 10550
(43) 公表日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/019017	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02002/103024		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002.12.27)	(72) 発明者	グリフィン ジョン エイチ.
審査請求日	平成17年6月13日 (2005.6.13)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 デル マー ボキータ ドライブ 13924
(31) 優先権主張番号	60/298,578	(72) 発明者	ゲイル アンドリュー ジェイ.
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ディエゴ #159 サマーデイル ロ ード 8582
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く
前置審査			

(54) 【発明の名称】 操作されたジスルフィド結合を有する安定化蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Met662 - Asp1828、およびTyr664 - Thr1826からなる群より選択される残基に存在する、少なくとも一つのシステイン対を含む変異体第VIII因子。

【請求項 2】

請求項1記載の変異体第VIII因子を含む組成物。

【請求項 3】

請求項1記載の変異体第VIII因子および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物。

【請求項 4】

請求項1記載の変異体第VIII因子をコードする核酸。

10

【請求項 5】

請求項4記載の核酸を含むベクター。

【請求項 6】

請求項4記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 7】

被験者における出血の危険性の増加を処置するための、請求項1記載の第VIII因子変異体の有効量を含む薬学的組成物。

【請求項 8】

被験者における血液凝固を増強するための、請求項1記載の第VIII因子変異体の有効量を含む薬学的組成物。

20

【請求項 9】

被験者における血友病を処置するための、請求項1記載の第VIII因子変異体の有効量を含む薬学的組成物。

【請求項 10】

哺乳類における第VIII因子欠乏症を処置するための薬学的組成物であって、該組成物は、発現制御要素に機能的に結合した、請求項1記載の第VIII因子変異体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸、ベクター、またはビリオンを含み、該哺乳類において、治療効果を提供するレベルで第VIII因子変異体の発現が起こる条件下で、哺乳類に該核酸、ベクター、またはビリオンを投与するための、前記組成物。

【請求項 11】

哺乳類における第VIII因子欠乏症を処置するための薬学的組成物であって、前記組成物は、
(a) 発現制御要素に機能的に結合した、請求項1記載の第VIII因子変異体の軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、第一の核酸、ベクター、またはビリオン、及び、
(b) 発現制御要素に機能的に結合した、請求項1記載の第VIII因子変異体の重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、第二の核酸、ベクター、またはビリオン、を含み、
該哺乳類において、治療効果を提供するレベルで第VIII因子変異体の発現が起こる条件下で、哺乳類に該第一および第二の核酸、ベクター、またはビリオンを投与するための、前記組成物。

【請求項 12】

哺乳類における第VIII因子欠乏症を処置するための薬学的組成物であって、前記組成物は、発現制御要素に機能的に結合した請求項1記載の第VIII因子変異体をコードするヌクレオチド配列を含む、宿主細胞を含み、
該哺乳類において治療効果を提供するレベルで第VIII因子変異体蛋白質の発現が起こる条件下で、哺乳類に該宿主細胞を投与するための、前記組成物。

【請求項 13】

哺乳類における第VIII因子欠乏症を処置するための、薬学的組成物であって、前記組成物は、(i) 発現制御要素に機能的に結合した、請求項1記載の第VIII因子変異体の軽鎖をコードする、第一のヌクレオチド配列；および(ii) 発現制御要素に機能的に結合した請求項1記載の第VIII因子変異体の重鎖をコードする、第二のヌクレオチド配列を含む、宿主細胞を含み、
該哺乳類において、治療効果を提供するレベルで第VIII因子変異体蛋白質の発現が起こる条件下で、該宿主細胞を哺乳類に投与するための前記組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国政府によって提供された資金援助を受けて行われた。政府は米国国立衛生研究所の助成金第R01HL21544号、第R37HL52246号、第T32HL07695号、および第P01GM48495号の助成金に拠って、本発明に一定の権利を保有する可能性がある。

【0002】

発明の分野

本発明は、ポリペプチドの異なるドメイン間に少なくとも一つの結合、好ましくはジスルフィド結合を形成することによって、ポリペプチドの安定化を可能にする一つまたは複数のシステイン残基を、ポリペプチドに導入する方法に関する。本発明はまた、そのような導入されたシステイン残基（複数）を含むポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、およびそのようなポリペプチドまたは核酸を含む薬学的組成物にも関する。本発明はまた、そのような核酸を含むベクター、ウイルス粒子、および宿主細胞、ならびに本発明のポリペプチドを産生するためにそれらを用いる方法にも関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

単一の遺伝子の発現産物である多くのポリペプチドが知られている。これらのポリペプチドの多くは、当初単一のポリペプチド鎖として合成されるが、独立して折りたたまれる多数のドメインを含み、これらはインビボで切断産物の解離によりドメインの分離が起こる可能性がある、蛋白質分解（または蛋白質分解による切断（複数））を受けやすい。ドメインの分離に至る蛋白質分解は、これらの多様な蛋白質の安定性および／または酵素的もしくは機能的活性を変化させることが知られている。これらの蛋白質の例には、血液凝固に関係する蛋白質のような血漿蛋白質が含まれる。

【0004】

当技術分野で既知であるように、血液凝固は、病変部位での損傷血管壁に血小板が付着した場合に始まる。その後、酵素的に調節された反応のカスケードにおいて、可溶性のフィブリノーゲン分子が、酵素トロンビンによって不溶性のフィブリン鎖に変換され、これは血栓において共に血小板を保持する。カスケードにおけるそれぞれの段階において、プロテアーゼ前駆体は、そのシリーズの次の蛋白質前駆体を切断するプロテアーゼに変換される。ほとんどの段階において共因子が必要である。その活性型において、蛋白質第VIII因子は、プロテアーゼ（活性化第IX因子）による第X因子の活性化にとって必要である共因子である。

【0005】

第VIII因子は、トロンビンまたは第Xa因子によって蛋白質分解的に第VIIIa因子に活性化されうる（「a」は活性化を示す）。カルシウムおよびリン脂質と組み合わせると、第VIIIa因子は、まだ完全にわかっていない機構によって、第IXa因子をより効率的な第X因子活性化剤にする。

【0006】

第VIII因子による処置を受けていない第VIII因子を欠損する人々または第VIII因子に対する抗体を有する人々は、制御されない内出血を有し、これは関節の炎症反応から早期死亡までの多様な重篤な症状を引き起こす可能性がある。米国においてその数が約10,000人に上る重度の血友病患者は、第VIII因子の注入によって処置することができ、これは、十分な回数および濃度で投与すれば、血液の正常な凝固能を回復するであろう。

【0007】

様々な程度の純度のヒト血漿由来第VIII因子または組み換え型第VIII因子のいくつかの調製物が、血友病Aの処置のために販売されている。これらには、ウイルスのために熱および洗浄剤処理されているものの、有意なレベルの抗原性蛋白質を含む、多くのドナーのプールされた血液に由来する部分精製第VIII因子；抗原性不純物レベルおよびウイルス混入レベルがより低い、モノクローナル抗体精製第VIII因子；および組み換え型ヒト第VIII因子が含まれる。

【0008】

血友病患者は、関節への再発性の出血が起こった何年も後に起こる変形性血友病関節障害を予防するために、第VIII因子を毎日補充する必要がある。しかし、第VIII因子濃縮物の補充は、商業的製造および治療的使用に問題があることから、血友病患者を適切に処置するために十分に豊富ではない。例えば、一般的に用いられる血漿由来第VIII因子は、単離および精製が難しく、免疫原性があり、AIDSおよび肝炎ウイルスの感染の危険性を除去するための処置を必要とする。ブタ第VIII因子も同様に代用品となる可能性があるが、ブタ第VIII因子の限界は、1回または複数回注入した後に、これに対する阻害抗体が産生されることである。

【0009】

活性化第VIII因子（FVIIIa）は、A2ドメインが複合体の残りから解離する傾向があるために、生理的条件では熱力学的に不安定である。言い換えれば、活性化FVIIIは、自然と不活性になる。FVIIIまたはFVIIIaの薬理的調製物においてこの解離を防止することができれば、より回数が少なくかつ／またはより濃度の低い投与が実現できるであろう。これによって費用の節減、使用医療人員の減少、および血友病患者のライフスタイルの改善の

10

20

30

40

50

ような多くの利益が得られうる。

【 0 0 1 0 】

第VIII因子以外のもう一つの血漿蛋白質は、プロトロンビンである。凝固カスケードの一部として、プロトロンビンは、プロトロンビナーゼ複合体 (FXa、FVa、およびCa²⁺) の作用によってトロンビンに変換される。ヒトのプロトロンビンにおいて、この変換は、F2ドメインとトロンビンA鎖のあいだのArg271およびArg284、ならびにA鎖とB鎖のあいだのArg320 (ヒトの番号付け) での切断を含む。インビボで、プロトロンビナーゼは最初にArg320でプロトロンビンを切断して、メイゾトロンビンを産生する、遊離のメイゾトロンビンは不安定な中間体であり、Arg155 - Ser156結合での自己分解によって迅速にF1ドメインが除去され、メイゾトロンビン (des F1) を産生し、これは、Arg271およびArg284での切断によって徐々にトロンビンに変換する。トロンボモジュリンおよびホスファチジルセリン / ホスファチジルコリンリン脂質小胞 (PCPS) の存在下では、メイゾトロンビンおよびメイゾトロンビン (des F1) は、トロンビンよりC蛋白質のよい活性化物質である (41、42)。

10

【 0 0 1 1 】

さらなる血漿蛋白質は第V因子である。ヒト血液凝固第V因子 (FV) は、分子量330,000の蛋白質であり、これはA1 - A2 - B - A3 - C1 - C2 (4) の順に三つのタイプのドメイン6個からなる。FVはトロンビンによって切断されて、Bドメインのほとんどが除去され、活性化FV (FVa) を生じる。ヒトFVaは、重鎖 (A1 - A2、残基1 ~ 709位) および軽鎖 (A3 - C1 - C2、残基1546 ~ 2196位) からなり、これらは非共有結合複合体 (5) を形成する。FVaは、プロトロンビナーゼ複合体における第Xa因子 (FXa) の非酵素的共因子であり、これは陰性荷電リン脂質の存在下でプロトロンビンをトロンビンに変換する (6)。FVaの不活化は、Arg506、Arg306、およびArg679でFVaのAPC (活性化C蛋白質) 切断を伴う複雑なプロセスである。Arg506での切断は、Arg306での切断より速く、これはFVaをごく部分的に不活化するに過ぎないが、Arg306での切断はFVaを完全に不活化して、A2ドメイン断片の解離を引き起こす (7 ~ 10)。完全に不活性なFVaは、FXaとの結合能を喪失している (11)。

20

【 0 0 1 2 】

なおもう一つの血漿蛋白質は第XII因子である。ヒトFXIIは、分子量76,000およびアミノ酸596個を有する一本鎖蛋白質である。これは、N-末端からC-末端の順にフィブロンクチンII型ドメイン、EGFドメイン、フィブロンクチンI型ドメイン、EGFドメイン、クリン

30

グルドメイン、トリプシン様セリンプロテアーゼドメインを含む。活性化第XII因子 (FXIIa) には少なくとも二つの型が存在する。FXIIaは、Arg353の後での結合の切断によって形成され、ジスルフィド結合によって互いに結合した重鎖 (353残基) および軽鎖 (243残基) からなる二本鎖分子を生成する。さらなる切断によってFXIIa (FXIIa断片) が起こる。これは、Arg334およびArg343での切断の結果であり、互いにジスルフィド結合によって結合した二つのポリペプチド鎖 (9残基および243残基) が得られる (43、44)。N-末端重鎖断片の大部分はこれ以上会合しない。陰性表面 / 膜結合は、この重鎖によって媒介され、そのため得られたFXIIa断片はもはや表面に結合しないがなおも触媒的に活性である。

。

【 0 0 1 3 】

蛋白質HGFA (肝細胞増殖因子活性化剤) は、FXIIと同じドメイン構造を有し (45)、同様に蛋白質分解による切断、この場合はFXIIにおけるArg353と相同なArg407でのトロンビンによる1回の切断によっても活性化される (46)。しかし、Arg372でのカリクレインによるさらなる切断によってもN-末端重鎖の放出が起こり、これはFXIIと同様に表面結合に関係する (47)。当技術分野で既知であるように、HGFAは、損傷組織内で肝細胞増殖因子 (HGF) を活性化し、損傷組織においてHGFは、多様な細胞タイプへの分裂活性によって組織修復において何らかの役割を有する。

40

【 0 0 1 4 】

もう一つのFXII様ポリペプチドは、二つの名称で知られる: PHBP (血漿ヒアルロニン結合蛋白質) (48) およびFVII活性化プロテアーゼ (49)。PHBPIは、セリンプロテアーゼで

50

あり、HGFAと相同であるが、ドメイン構造は正確には同じではない(49、50)。この蛋白質は、実験系においてFVII、uPA、およびtPAを活性化するが、生理的役割は確立されていない(49、50)。

【発明の開示】

【0015】

発明の概要

本発明の態様に従って、二つまたはそれ以上のポリペプチドドメイン間に、ジスルフィド結合のような結合が形成されるように、一つまたは複数のセリン残基をポリペプチドに操作してもよい。そのようなジスルフィド結合(複数)によって、ポリペプチド安定化のような結果を得ることができる。そのような安定化によって、解離されないポリペプチドの所望の活性の持続的な保持、または解離したポリペプチドの望ましくない活性の回避が得られうる。

10

【0016】

本発明において有用な好ましいポリペプチドは、一般的に一つの遺伝子の発現産物として、本質的に一本鎖ポリペプチド鎖として合成され、そして解離によりドメインの分離が起こる可能性がある限定的な蛋白質分解を受けやすい独立して折りたたまれる多数のドメインを含むポリペプチドである。そのようなポリペプチドの例には、肝細胞増殖因子活性化剤および血漿ヒアルロン結合蛋白質を含む血漿蛋白質のみならず、第VIII因子、第V因子、第XII因子、およびプロトロンビンのような血液凝固因子が含まれる。

20

【0017】

本発明の変異体ポリペプチド(すなわち、一つまたは複数のシステインが導入されているポリペプチド)には、連結しているドメインが単一の核酸配列(例えば、単一の遺伝子、cDNA、または合成もしくは半合成コード配列)から合成されているポリペプチドのみならず、連結するドメインが異なる(または別の)核酸配列から(例えば、配列が連続した核酸分子上に存在しても存在しなくてもよい、結合したドメインのそれぞれを含むポリペプチドをコードする配列から)合成されるポリペプチドが含まれる。後者の場合、ドメインは、インビボまたはインビトロのいずれかで合成後に結合してもよい。

【0018】

本発明の好ましい変異体ポリペプチドは、対応する非変異ポリペプチドと比較してより長期間、安定性が増加し、かつ/または所望の酵素的もしくは機能的活性を保持するポリペプチドである。

30

【0019】

本発明の一つの局面は、以下の段階を含む、一つまたは複数のシステインを導入することによって、本質的に単一の遺伝子の産物であるポリペプチドを安定化させる方法に関する：(a)ポリペプチドの三次元構造を得るまたは作製する段階；(b)三次元構造に基づいて一つまたは複数のシステインを導入するための一つまたは複数の部位を予測する段階；および(c)予測された一つまたは複数の部位に、一つまたは複数のシステインを導入することによって、ポリペプチドの一つまたは複数の変種を作製する段階であって；一つまたは複数のシステインの導入によって、該導入された一つまたは複数のシステインを含まないポリペプチドの安定性と比較して、変異体ポリペプチドの安定性を増加させる、少なくとも一つの分子内ドメイン間ジスルフィド架橋が形成される段階。

40

【0020】

本発明のもう一つの局面は、少なくとも一つのシステインを導入することによって変異している、本質的に単一の遺伝子の産物であるポリペプチドであって、システインの導入により、該導入されたシステインを含まないポリペプチドの安定性と比較して、変異体ポリペプチドの安定性を増加させる、もう一つのシステインと少なくとも一つの分子内ドメイン間ジスルフィド架橋が形成されるポリペプチドに関する。

【0021】

本発明のもう一つの局面は、本発明のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を含む、本発明のポリペプチドを含む組成物に関する。

50

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸を含むベクターを含む、本発明のポリペプチドをコードする核酸にも関する。本発明はまた、そのような核酸および／またはベクターを含むウイルス粒子にも関する。本発明はまた、そのような核酸、ベクター、およびウイルス粒子を含む宿主細胞にも関する。本発明はまた、本発明の核酸、ベクター、ウイルス粒子、および／または宿主細胞を含む組成物（薬学的組成物を含む）にも関する。

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、個体を、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、ウイルス粒子、または宿主細胞、および／またはその薬学的組成物によって処置する方法にも関する。

10

【 0 0 2 4 】

発明の詳細な説明

上記の一般的な説明および以下の詳細な説明は、いずれも例を示して説明する目的に限られ、主張される本発明を制限すると理解されない。本明細書に組み入れられ、明細書の一部を構成する添付の図面は、本発明の態様を説明し、説明と共に、本発明の原理を説明するために役立つ。

【 0 0 2 5 】

一般的技法

本発明の態様に従って、二つまたはそれ以上のポリペプチドドメインのあいだにジスルフィド結合を形成させる一つまたは複数のシステイン残基を、単一の遺伝子のポリペプチド産物のようなポリペプチドに操作してもよい。そのようなシステイン（複数）を配置すると、結果的にジスルフィド結合が配置され、ポリペプチド安定化のような結果を得ることができる。いくつかの態様において、本発明はまた、二つの異なるポリペプチド間のポリペプチドの単一のドメイン内にジスルフィド結合を留置するために用いてもよいことが認められる。

20

【 0 0 2 6 】

第一段階として、関係するポリペプチドの構造を得るか、または作製する。これは、x-線結晶構造、NMR-由来構造、相同性モデリングに基づく三次元構造、中性子回折等であってもよい。

【 0 0 2 7 】

次に、システインの配置によってジスルフィド架橋を導入するための部位を予測するアルゴリズムを、関係するポリペプチドの構造に適用してもよい。これは、例えば、Sowdhamini (19) のアルゴリズムを用いるコンピュータプログラムMODIPを用いることによって行ってもよい。MODIPは、ジスルフィド架橋の導入部位を予測して、それぞれの予測に関する等級（A、B、C）を提供する。等級Aの部位は、ジスルフィド結合架橋を確立するために最適であると予想される部位であり、等級Bおよび等級C部位は、次第に理想から離れる。言い方を変えると、等級Aのジスルフィド架橋は、規定の立体化学的基準を満足するが、等級Cのジスルフィド結合が満たす立体化学的基準はより少ない。Pabo (18) または Hazes (56) のような他のアルゴリズムおよび／またはコンピュータプログラムを用いてもよいことが特に示される。他の態様において、ジスルフィド架橋を確立するために、システインの導入に関する予測は目視検査によるような他の方法によって行ってもよい。

30

40

【 0 0 2 8 】

予想される部位のうち、さらなる試験にとって最も理想的な多くの部位を選択してもよい。

【 0 0 2 9 】

選択した部位の目視検査は、コンピュータグラフィックス分析を用いて行ってもよい。この目視検査に基づいて、特定の部位をさらなる検討から排除してもよい。目視検査の後に検討に残っている選択部位のそれぞれに関して、選択部位でのジスルフィド結合を含む改変された構造モデルを作製してもよい。これは、Xfitコンピュータプログラム、例えばCharm22全原子力場を用いるX-PLORコンピュータプログラムのようなコンピュータ

50

ープログラムを用いて行ってもよい。

【0030】

精製後、モデルとしたジスルフィド結合を最適なジスルフィド幾何学に関して分析してもよい。ジスルフィド結合の形成に関して最適な幾何学を有する、そして最低のファンデルワールス気相エネルギーを有する部位を、一つまたは複数のジスルフィド結合を形成させる一つまたは複数のシステイン残基を導入する試みのために選択してもよい。システイン残基は、当技術分野で周知の技術、例えば関係するポリペプチドをコードする核酸の定方向変異誘発のような組み換え技法を用いて、ポリペプチドに導入してもよい。本発明のポリペプチドをコードする核酸はまた、合成または半合成法によって作製してもよい。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、重なり合う合成デオキシオリゴヌクレオチド（例えば、Edgeら、Nature 292 : 756 (1981) ; Nambairら、Science 223 : 1299 (1984) ; Jayら、J. Biol. Chem. 259 : 6311 (1984) を参照されたい）、またはポリメラーゼ連鎖反応生成DNAまたはcDNAと合成オリゴヌクレオチドとの組み合わせを用いて合成することができる。本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする配列に機能的に結合した適当なプロモーター領域と、適当なターミネーターシグナルとを含む発現ベクターに存在しうる、または挿入することができる。その後、当技術分野で既知のベクターの精製、およびトランスフェクション技法を行ってもよい。次に、当技術分野で既知の方法を用いて、安定なクローンを選択して回収してもよい。次に、関係するポリペプチドにおけるジスルフィド結合（複数）の適切な配置およびその収率を確認するために、産生されたポリペプチドを活性およびイムノブロットによって定量してもよい。

【0031】

本発明のポリペプチドをコードする核酸は、本来の宿主細胞もしくは生物または異なる細胞もしくは生物において発現されうる。核酸は、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、またはミニ染色体のようなベクターに導入することができ、当技術分野で周知の方法によって宿主細胞または生物に挿入することができる。一般的に、核酸またはこれらの核酸を含むベクターは、哺乳類細胞（例えば、ヒト（例えば、K293、HeLa）、サル（例えば、COS）、ウサギ（例えば、ウサギ網状赤血球）、ラット、ハムスター（例えば、CHO およびベビーハムスター腎細胞）、またはマウス細胞（例えば、L細胞））、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または細菌細胞（例えば、大腸菌）を含む任意の細胞、真核細胞または原核細胞において利用することができる。ポリペプチドをコードするこれらの核酸をクローニングおよび/または発現するために利用することができるベクターは、核酸が複製および/または発現されることが望ましい宿主細胞において核酸を複製および/または発現することができるベクターである。例えば、様々なタイプの宿主細胞に関する適当なベクターの例に関しては、F. Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、グリーンパブリッシングアソシエーツ&ウィリーインターサイエンス（1992）および Sambrookら、（1989）を参照されたい。そのような遺伝子の本来のプロモーターは、本発明のポリペプチドをコードする核酸が挿入される宿主に適合する、強いプロモーターに置換することができる。これらのプロモーターは誘導型であってもよい。これらの核酸を含む宿主細胞を用いて、酵素調製物、薬剤、診断試薬、および治療物質において有用な本発明のポリペプチドの大量を発現させることができる。本発明のポリペプチドはまた、当技術分野で既知の方法を用いてトランスジェニック植物または動物において作製してもよい。

【0032】

本発明のポリペプチドを本来コードする遺伝子が阻害/不安定領域を含む場合（例えば、国際公開公報第93/20212号を参照されたい）、あまり好ましくないコドンにより好ましいコドンに変更してもよい。しかし、望ましければ（例えば、ATに富む領域をよりGCに富む領域にするために）、より好ましいコドンにより好ましくないコドンに変更することができる。選択的に、最もまれに用いられるコドン（T. Maruyamaら、Nucl. Acids. Res. 14（補則）：r151~197（1986））のみを好ましいコドンに置換してもよく、またはまれなコドンのほとんどもしくは全てを好ましいコドンに置換することができる。一般的に、用いるために好ましいコドンの選択は、変化した遺伝子が発現される宿主細胞のコドンの

10

20

30

40

50

使用に依存するであろう。しかし、より好ましいコドンより好ましくないコドンに置換しても機能的であることに注意すること。

【0033】

先に記述したように、コード配列は、遺伝子コードに基づいて選択し、好ましくは、本発明のポリペプチドをコードする核酸を発現すべき宿主細胞または生物における好ましいコード使用に基づいて選択される。多くの場合において、特定の宿主または発現系の好ましいコード使用は、利用可能な参考文献から確認することができ（例えば、コドン1000個あたり遺伝子にコドンが出現する回数がコドンの次の括弧内に記載されているT. Maruyamaら、Nucl. Acids. Res. 14（補則）：r151~197（1986）を参照されたい）、または他の方法によって確認することができる（例えば、1992年1月21日にG.W. Hatfieldに公布された「Codon Pair Utilization」と題する米国特許第5,082,767号を参照されたい）。好ましくは、配列は、産生されるポリペプチドの量を最終的に増加させるために、mRNAの安定性と共に、転写および翻訳を最適にするように選択されるであろう。コドンの選択はこのように、例えば、宿主細胞によるコドンの好ましい使用および/または所望の制限エンドヌクレアーゼ部位を提供する必要性によって誘導され、同様に、コードされるmRNA転写物における潜在的な二次構造の拘束を回避する要求によって誘導される。潜在的な二次構造の拘束は、Zuckerら、Nucl. Acids. Res. 9：133（1981）に記述されるようなコンピュータプログラムを用いることによって同定することができる。選択された宿主細胞もしくは生物におけるコドン選択性が不明であるか、または最適なコドン使用が曖昧な場合は、一つより多いコード配列を選択してもよい。しかし、最適より低い効率で翻訳されても、任意の正しい組のコドンは、所望の蛋白質をコードするであろう。Seedらの米国特許第6,114,148号の実施例IIIは、合成第VIII遺伝子（B-ドメイン欠失第VIII因子をコードする）について記述しているが、これはコードされる第VIII因子ポリペプチドの発現を増加させるようにコード使用が変化している。

【0034】

同様に、阻害/不安定配列は、コードされるアミノ酸が一つまたは複数の保存的または非保存的アミノ酸を含むように変化しているが、なおも機能的に同等の蛋白質を提供するように変異させることができると予想される。例えば、配列内の一つまたは複数のアミノ酸残基を、機能的同等物として作用する類似の極性のもう一つのアミノ酸に置換することができ、それによってアミノ酸配列の中性置換が得られる。配列内のアミノ酸置換は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択してもよい。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。陽性荷電（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれる。陰性荷電（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。

【0035】

本発明の方法によって変化した遺伝子の核酸または該核酸を含む構築物も同様に、インビボまたはインビトロ遺伝子置換のために用いてもよい。例えば、導入システイン残基（複数）を有しないポリペプチドを産生する核酸を、インサイチューで本発明の方法によって改変されている核酸に、インサイチューで置換して、当初コードされるポリペプチドと比較して最終的に安定性が増加したポリペプチドを産生することができる。そのような遺伝子置換は、例えば、遺伝子治療を開発するために有用となる可能性がある。

【0036】

ベクターには、レトロウイルスベクターが含まれ、同様に、例えばWolffら、Science 247：1465~1468（1990）、Wolffら、Human Molecular Genetics 1（6）：363~369（1992）およびUlmerら、Science 259：1745~1749（1993）に記載される技術を用いて、本発明のポリペプチドの効率的な発現が得られる、筋細胞または他の受容細胞へのDNAの直接注射が含まれる。同様に、例えば、国際公開公報96/36366号および国際公開公報第98/34640号も参照されたい。

【 0 0 3 7 】

本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、ベクター粒子、および／または宿主細胞は、当技術分野で既知の方法によって単離および精製することができ、下記にさらに記述するように薬学的組成物および／または治療において用いることができる。

【 0 0 3 8 】

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本発明の少なくとも一つのポリペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸の薬学的および／または治療の有効量を含む。本発明の一つの態様において、単位用量あたりのポリペプチドの有効量は、対応する天然のポリペプチドにおける欠損、または予想される欠損の作用を予防、処置、またはその作用から保護するために十分な量である。単位用量あたりのポリペプチドの有効量は、とりわけ、当技術分野で周知であるように、処置すべき哺乳類の種、哺乳類の体重、および選択される接種レジメに依存する。

10

【 0 0 3 9 】

好ましくは、ペプチドの接種経路は、皮下または静脈内であると考えられる。用量は少なくとも1回投与される。

【 0 0 4 0 】

「単位用量」という用語は、それぞれの単位が、任意の添付の希釈剤と関連して所望の作用を生じるように計算された活性材料（例えば、ポリペプチドまたは核酸）の規定量を含む、哺乳類の単位用量として適した物理的に個別の単位を意味する。

20

【 0 0 4 1 】

本発明のポリペプチドまたは核酸は、一般的に、生理的に許容される担体またはその溶媒と共に投与される。生理的に許容される担体は、投与の際に有害な身体反応を引き起こさない担体であり、その中でポリペプチドまたは核酸が十分に可溶性であって、化合物の治療的有效量の輸送能を保持する担体である。本発明のポリペプチドまたは核酸の治療的有效量および投与方法は、個々の患者、処置される適応（indication）、および当業者に明らかな他の基準に基づいて変更してもよい。本発明のポリペプチドまたは核酸の治療的有效量は、有意な有害な副作用を引き起こすことなく、機能障害を減弱させるために十分である量である。特定の適応において有用な投与経路（複数）は、当業者に明らかである。

30

【 0 0 4 2 】

本発明のポリペプチドまたは核酸の投与経路には、罹患部位への非経口、または直接注射が含まれるがこれらに限定されない。非経口投与経路には、静脈内、筋肉内、腹腔内、および皮下が含まれるがこれらに限定されない。本発明のポリペプチドの投与経路は典型的に非経口である。

【 0 0 4 3 】

本発明には、薬学的に許容される滅菌等張溶液を含むがこれらに限定されない非経口投与のために適した上記のポリペプチドおよび核酸の組成物が含まれる。そのような溶液には、関節または他の領域への鼻腔内、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、または直接注射のための生理食塩液およびリン酸緩衝生理食塩液が含まれるがこれらに限定されない。

40

【 0 0 4 4 】

本発明のポリペプチドまたは核酸の持続的な輸送系も同様に用いてもよい。例えば、生体分解性のミクロスフェアのポリマーマトリクス中にポリペプチドを含むことに基づく輸送系も同様に用いてもよい（57）。そのようなポリマーマトリクスの一つには、ポリ（ラクチド-コグリコリド）ポリマー（PLG）が含まれる。PLGは生体適合性であり、静脈内または経口内投与することができる。ミクロスフェアを体内に注射すると、封入されたポリペプチドが、粒子の水和および薬物溶解を含む複雑なプロセスによって放出される。放出期間は、用いられるPLGポリマーのタイプおよび改変賦形剤の放出によって主に支配される（44）。

【 0 0 4 5 】

50

本発明のポリペプチドおよび核酸は、対応する天然のポリペプチドにおける欠損または予想される欠損の有害な影響の重症度、程度、または期間を予防、または減弱するために十分な量でレシピエント被験者に提供されることが意図される。

【 0 0 4 6 】

本発明のポリペプチドおよび核酸組成物を含む物質の投与は、「予防」または「治療」目的のいずれかであってもよい。予防的に提供する場合、物質は、何らかの症状が起こる前に提供される。物質の予防的投与は、対応する天然のポリペプチドにおける欠損または予想される欠損の、任意のその後の有害な作用を予防または改善するために役立つ。治療的に提供される場合、物質は、欠損または予想される欠損の症状の発現時に（または発現後まもなく）提供される。本発明の物質は、このように、予想される欠損の前（疾患症状の予想される重症度、期間、または程度を減弱するため）、または欠損の後で、その結果としての症状が出現した後のいずれかに提供してもよい。

10

【 0 0 4 7 】

同様に、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含むウイルスベクターおよびウイルス粒子のようなベクターおよびウイルス粒子に基づく治療も企図される。それらが病的な作用を誘発しないように開発されたこれらの分子は、本発明のコードされたポリペプチドを産生すると考えられる。

【 0 0 4 8 】

第VIII因子調製物

ブタおよびヒト血漿由来第VIII因子およびヒト組み換え型第VIII因子の単離および精製は、文献に記述されている。例えば、Fulcher, C.A.およびT.S. Zimmerman、79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1648~1652 (1982) ; Toole, J.J.ら、312 Nature 342~347 (1984) (ジェネティクスインスティテュート) ; Gitschier, J.ら、312 Nature 326~330 (1984) (ジェネンテック) ; Wood, W.I.ら、312 Nature 330~337 (1984) (ジェネンテック) ; Vehar, G.A.ら、312 Nature 337~342 (1984) (ジェネンテック) ; Fass, D.N.ら、59 Blood 594 (1982) ; Toole, J.J.ら、83 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 5939~5942 (1986) ; Boedeker, B.G.、Semin. Thromb. Hemost. 27(4) : 385~94 (2001年8月) を参照されたい。1990年代初期にヒトでの使用が認可された、完全長の組み換え型第VIII因子の二つの調製物は、例えばSchwartz RSら、N. Engl. J. Med 323 : 1800~5 (1990) ; Lusher JMら、N. Engl. J. Med. 328 : 453~9 (1993) ; Bray GLら、Blood 83 : 2428~35 (1994) ; およびWhite GC IIら、Thromb. Haemost. 77 : 660~7 (1997) に記述されている。

20

30

【 0 0 4 9 】

完全長の蛋白質のBドメインを欠損するが凝固活性を保持し、ヒトでの使用が認可されているB-ドメイン欠失第VIII因子は、例えば、Osterbert T.ら、Pharm Res. 14 : 892~8 (1997) ; Lusher JMら、Blood 96 : 266a (2000) (抄録) ; およびAlmstedtら、米国特許第5,661,008号に記述されている。

【 0 0 5 0 】

ハイブリッドヒト/ブタ第VIII因子も同様に、文献に記載されている。例えば、米国特許第6,180,371号を参照されたい。

40

【 0 0 5 1 】

第VIII因子の古典的な定義は、血友病Aを有する個体に由来する血漿中の凝固欠損を修正する正常な血漿に存在する物質である。本明細書において用いられるように、第VIII因子は、血漿由来第VIII因子または活性化因子VIIIの前凝固特性を有する分子を意味する。このように、本明細書において用いられるように第VIII因子という用語には、非切断型前駆体第VIII分子と共に、当業者に既知の様々な蛋白質分解によって処理された型またはそれ以外の切断型が含まれ、ここで第VIII因子の様々な型は前凝固活性を有する。第VIII因子ポリペプチドの例は、その全てが参照として本明細書に組み入れられる、Anderssonらの米国特許第4,749,780号 ; Anderssonら、米国特許第4,877,614号 ; Tooleら、米国特許第4,757,006号 ; Toole、米国特許第4,868,112号 ; Almstedtら、米国特許第5,661,008号に開

50

示されている、活性な第VIII因子断片および第VIII因子誘導体である。Almstedtらに記述される第VIII因子は、ヒト第VIII因子のアミノ酸1～743位および1649～2332位までで構成される。このポリペプチド配列は、rFVIII-SQまたはREFACTO[r]として市販されている。同様に、Lindら、Euro. J. Biochem. 232: 19～27 (1995)も参照されたい。B-ドメインが一般的に欠失している他の型の切断型FVIIIも同様に構築することができる。Almstedtらの第VIII因子では、ヒト第VIII因子のアミノ酸1～740位を含み、分子量約90 kDaである重鎖のアミノ酸を、ヒト第VIII因子のアミノ酸1649～2332位を含み、分子量約80 kDaである軽鎖のアミノ酸に結合させる。重鎖と軽鎖とは、アミノ酸2～15個のリンカーペプチド、例えばリジンもしくはアルギニン残基を含むリンカーによって接続するか、または金属イオン結合によって結合される。これらの他のリンカーおよび異なる大きさのリンカーを用いることができる。同様に、A2ドメインが軽鎖に共有結合するように、残基794～1689位の欠失によって遺伝子操作されたもう一つの第VIII因子変種に関しては、PipeおよびKaufmann (109)を参照されたい。トロンビンおよび活性化C蛋白質不活化切断部位でのミスセンス変異は、蛋白質分解に対する抵抗性を与え、それによってアルギニン372位での1回切断後に最大活性を有する一本鎖蛋白質が得られる。

10

【0052】

ヒト第VIII因子cDNAヌクレオチドおよび予想アミノ酸配列は、米国特許第6,180,371号に示されている。第VIII因子は、「ドメイン」配列NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOHを定義する、内部配列相同性を有する約300 kDaの一本鎖蛋白質として合成される。米国特許第6,180,371号において、配列をその特許に示されるヒトアミノ酸配列と並置した場合、第VIII因子ドメインには、以下のアミノ酸残基が含まれる：A1、残基Ala1-Arg372；A2、残基Ser373-Arg740；B、残基Ser741-Arg1648；A3、残基Ser1690-Ile2032；C1、残基Arg2033-Asn2171；C2、残基Ser2173-Tyr2332。A3-C1-C2配列には、残基Ser1690-Tyr2332が含まれる。残りの配列、残基Glu1649-Arg1689は通常、第VIII因子軽鎖活性化ペプチドと呼ばれる。第VIII因子は、第VIII因子をフォン・ウィルブランド因子から解離させる、トロンビンまたは第Xa因子によって蛋白質分解的に活性化され、前凝固機能を有する第VIIIa因子を形成する。第VIIIa因子の生物機能は、第IXa因子の第X因子活性化に向けての触媒効率を数桁増加させることである。トロンビン活性化第VIIIa因子は、血小板もしくは単球の表面上または他の表面において、第IXa因子および第X因子と複合体を形成する、160 kDaのA1/A2/A3-C1-C2ヘテロ三量体である。

20

30

【0053】

第VIII因子の重鎖は、A1およびA2ドメインを含み、同様にB-ドメインの一部または全てを含んでもよい。(B-ドメイン欠失第VIII因子の重鎖は二つのドメイン、A1およびA2からなり、B-ドメインの小さい一部を含んでもよい)。第VIII因子の軽鎖は三つのドメイン、A3、C1、およびC2を含む。

【0054】

第VIII因子の薬学的組成物

ジスルフィド結合安定化第VIII因子を単独で、または適当な薬学的安定化化合物、輸送媒体、および/または担体媒体と共に含む薬学的組成物は、参照として本明細書に組み入れられる、E.W. Martinの「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される方法のような既知の方法に従って調製してもよい。薬学的組成物は、第VIII因子ポリペプチド、第VIII因子をコードする核酸等を含んでもよい。

40

【0055】

一つの好ましい態様において、静脈内注入にとって好ましい担体または輸送媒体は、糖を含んでもよい生理食塩液またはリン酸緩衝生理食塩液である。

【0056】

もう一つの好ましい態様において、適した滅菌化合物、輸送媒体、および担体媒体には、アルブミンのような他のヒトまたは動物蛋白質が含まれるが、これらに限定されない。

【0057】

リン脂質小胞またはリポソーム浮遊液も同様に、薬学的に許容される担体または輸送媒

50

体として好ましい。これらは、当業者に既知の方法に従って調製することができ、例えば、第VIII因子は陰性荷電ホスホリッド膜に結合することから、ホスファチジルセリン/ホスファチジルコリン、または界面に対して陰性荷電を共に付与する他のリン脂質組成物もしくは洗浄剤を含みうる。リポソームは、適当な脂質（複数）（ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイルホスファチジルコリン、アラキドイルホスファチジルコリン、およびコレステロール）を無機溶媒に溶解して、これを蒸発させて、容器表面に乾燥した脂質の薄膜を残すことによって調製してもよい。次に、第VIII因子の水溶液を容器に導入する。溶液を容器の側面から遊離の脂質材料と混合して、脂質凝集物を分散させ、それによってリポソーム浮遊液を形成する。

【0058】

10

第VIII因子は、ビタミンK-依存的凝固因子、組織因子、フォン・ウィルブランド因子（vWf）または第VIII因子結合部位を含むvWFの断片、および蔗糖のような多糖類を含む他の適した滅菌化合物、輸送媒体、および/または担体媒体と混合することができる。

【0059】

第VIII因子は、分子の半減期および保存性を増加させるために、vWfに結合させて保存することができる。さらに、第VIII因子を凍結乾燥すると、vWfの存在下で活性物質の収率を改善させることができる。第VIII因子の保存法には：部分精製状態での第VIII因子の凍結（さらに精製せずに注入される第VIII因子「濃縮物」として）、第VIII因子の免疫アフィニティ精製、および第VIII因子を安定化させるアルブミンの存在下での凍結乾燥が含まれる。第VIII因子はまた、最終容器において安定化剤としてアルブミンの代わりに蔗糖を用いるプロセスによって調製することも可能である。第VIII因子は、如何なる血漿または血漿蛋白質も含まないプロセスによって調製されることが好ましい。（例えば、Boedeker（111）およびChoら、米国特許第6,358,703 B1号を参照されたい）。

20

【0060】

さらに、第VIII因子は、0.6 M NaCl、20 mM MES、および5 mM CaCl_2 、pH 6.0において40で無限に安定であり、同様にこれらの緩衝液において凍結保存することができ、融解しても活性の喪失は最小限である。

【0061】

処置法

第VIII因子は、阻害抗体を有するかまたは有しない血友病患者、および阻害抗体の発症による後天性の第VIII因子欠乏患者のような被験者において、第VIII因子欠乏による制御されない出血を予防、処置、または改善するために用いられる（51）。好ましい被験者は哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。活性材料は好ましくは静脈内投与される。

30

【0062】

本明細書において用いられるように「第VIII因子欠乏」には、欠損している第VIII因子の産生によって、第VIII因子の産生が不適当であること、もしくは産生がないことによって、または阻害剤によって第VIII因子が部分的もしくは完全に阻害されることによって引き起こされる、凝固活性の欠乏が含まれる。血友病Aは、X-連鎖遺伝子の欠損およびそれがコードする第VIII因子蛋白質が存在しないか、または欠乏することに起因するタイプの第VIII因子欠乏である。

40

【0063】

さらに、第VIII因子は、第VIII因子を産生するように遺伝子操作された細胞の移植によって、または上記のようにそのような細胞を含む装置の埋め込みによって投与することができる。

【0064】

好ましい態様において、第VIII因子単独の、または安定化剤、輸送媒体、および/または担体と組み合わせた薬学的組成物を患者に静脈内注入する。

【0065】

そのような処置を必要とする患者に投与しなければならない第VIII因子組成物の処置用量は、第VIII因子欠乏の重症度に応じて変化するであろう。一般的に、用量レベルは、そ

50

れぞれの患者の出血事例の重症度および期間に合わせて回数、期間、および単位を調節する。したがって、第VIII因子は、標準的な凝固アッセイによって測定される、止血するための第VIII因子の治療的有効量を患者に輸送するために十分な量が、薬学的に許容される担体、輸送媒体、または安定化剤の中に含まれる。

【0066】

第VIII因子は、従来、血友病A患者に由来する血漿において凝固欠損を補正する、正常血中に存在する物質として定義される。第VIII因子の精製型および部分精製型のインビトロでの凝固活性は、ヒト患者に注入するための第VIII因子の用量を計算するために用いられ、患者の血漿から回復した活性の、およびインビボ出血欠損の補正の信頼できる指標である。例えば、Lusher, J.M.ら、New Engl. J. Med. 328: 453~459 (1993); Pittman, D.D.ら、Blood 79: 389~397 (1992); およびBrinkhousら、Proc. Natl. Acad. Sci. US A 82: 8752~8755 (1985)を参照されたい。

10

【0067】

通常、ハイブリッドまたはハイブリッドと同等の第VIII因子の投与によって患者において得られる、所望の血漿中第VIII因子レベルは、正常な血漿レベルの30%~100%の範囲である。血友病Aによる出血を処置するための典型的な用量は、25~50 単位/kg体重である。1単位 = 正常ヒトクエン酸血漿1 ml中の第VIII因子の通常量。例えば、Roberts, HRおよびHoffman, M.「Hemophilia A and Hemophilia B.」、Williams Hematology、第6版、E. Beutler, MA, Lichtman, BS Collier, TJ Kipps,およびU Seligson編、マグローヒル、ニューヨーク、2001を参照されたい。一つまたは複数のシステイン残基の導入により安定性が増加すると予想される、本発明の第VIII因子の好ましい投与様式において、組成物は、約0.1~80単位/kg体重の範囲、より好ましくは0.5~50単位/kg体重、より好ましくは1.0~50単位/kg体重、および最も好ましくは2.0~40単位/kg体重の好ましい用量で; 約8~24時間範囲の投与間隔で(重度血友病患者); かつ1~10日の範囲の処置期間、または出血事例が寛解するまで、静脈内投与される。例えば、Roberts, H.R.およびM.R. Jones、「Hemophilia and Related Conditions-Congenital Deficiencies of Prothrombin (Factor II, Factor V, and Factors VII to XII)」、第153章、1453~1474、1459~1460頁、「Hematology」、Williams, W.L.ら編(1990)を参照されたい。阻害剤を有する患者は、本発明の第VIII因子をより多く必要とする可能性があるか、または患者は、ヒト第VIII因子より大きい安定性のために、必要な本発明の第VIII因子はより少ない可能性がある。第VIII因子による処置において、注入される第VIII因子の量は、一段階第VIII因子凝固アッセイによって定義され、選択された例において、インビボでの回復は、注入後の患者の血漿中の第VIII因子を測定することによって決定される。如何なる特定の被験者に関しても、個人の必要性、および組成物を投与するかまたは投与を監視する人の専門的判断に応じて、特定の用量レジメを経時的に調節しなければならないこと、そして本明細書において述べた濃度および他の範囲は例示目的に限られ、請求される本発明の範囲または実践を制限すると解釈されないと理解すべきである。

20

30

【0068】

処置は、必要に応じて、組成物の1回静脈内投与、または長期間にわたる定期的もしくは持続的な投与の形となりうる。または、第VIII因子は、リボソームと共に1回用量または様々な間隔で複数回用量を皮下または経口投与することができる。

40

【0069】

本発明のハイブリッド動物/ヒト第VIII因子を用いて、ヒト第VIII因子に対する抗体を産生した血友病患者における、第VIII因子欠乏による制御されない出血を処置することができる。この場合、天然のヒトまたは動物の第VIII因子単独の凝固活性より優れた凝固活性は、必要ではない。活性が患者の血漿中の抗体によって中和されなければ、天然のヒト第VIII因子より低い凝固活性(すなわち、3,000単位/mg未満)が有用であろう。

【0070】

第VIII因子はまた遺伝子治療によって輸送することも可能である。このタイプの治療の全般的原理は、当業者に既知であり、文献において論評されている(例えば、52、53、57

50

）。遺伝子治療によって第VIII因子および第IX因子を輸送するために様々な戦略が利用されており、これらの多くは、操作されたジスルフィド結合を付加することによって改変した、第VIII因子の輸送にとって適当である可能性がある。以下は、利用できる様々なアプローチの要約である。

【0071】

これまで、レトロウイルスベクターに関して大量の経験が得られている。血友病を処置するためにレトロウイルスベクターを用いた、既存の厳しく審査され公表された前臨床データの例は、Kayら（58）から得られ、彼らは、イヌFIXを発現するレトロウイルスベクターを調製して、部分的肝切除を受けた血友病のイヌの門脈にこれを注入した。彼らは、イヌFIXの長期発現（>2年）を証明することができたが、そのレベルはヒトにおいて治療的となるにはかなり低すぎた。

10

【0072】

同様に血友病Bに関するもう一つのアプローチは、AAVベクターを利用している。ここで用いられているAAVベクターは、小さい（4.7 kb）一本鎖DNAゲノムを有するパルボウイルス、AAV血清2型から操作されている。多くの個体が、小児期に野生型ウイルスに感染するが、感染は、如何なる既知の疾患にも関連しない。ウイルスは、本来複製欠損であり、操作されたベクターは、ウイルスコード配列を完全に欠損している。いくつかの研究グループによる前臨床研究から、AAVベクターが、骨格筋、肝臓、または中枢神経系に導入されたトランスジーンの持続的な発現を指示できることが示された（62～64）。FIXの場合、マウスでの実験では、250～350 ng/mLの発現レベル（正常な循環レベルの5%～7%）が得られたが、血友病のイヌにおける類似の実験では、発現レベルは70～80 ng/mLであった（正常レベルの約1.5%（65、66））。

20

【0073】

FVIIIに対する肝臓に向けたAAVアプローチの使用を拡大する努力も行われているが、この場合、AAVベクターが5 kbを超えるインサートに適應できず、かつBドメイン欠失FVIII cDNA（プロモーター、イントロン、またはウイルス逆向き末端反復配列なし）が4.4 kbであることから、トランスジーンの大きさが問題となる。これらの大きさの制限のために、AAVベクターからFVIIIを発現させるためにいくつかの新規戦略が考案されている（76、77、78）。

【0074】

30

現在血友病Aを処置するために評価されている異なるアプローチは、Bドメイン欠失（BDD）FVIIIを発現するプラスミドを自己線維芽細胞にエクスピボで導入した後に、網に再度移植することである。この戦略において、患者からの皮膚生検を自己線維芽細胞源として用い、これにBDD FVIIIと選択マーカーとを発現するプラスミドを電気穿孔によってトランスフェクトさせる。トランスフェクションの後、FVIII発現細胞を選択、増殖させて、および腹腔鏡技法によって網に再移植する（細胞 $10^8 \sim 10^9$ 個の桁数において用いて）（107）。

【0075】

アデノウイルスベクターは、調製の容易さ、および末梢循環血中にベクターを導入後の肝臓の効率的な形質導入を含む、遺伝子輸送媒体としていくつかの魅力的な特徴を有する。これらの特徴は、このアプローチの原理の初期証明として血友病のイヌにおけるイヌFIXの高レベル発現を得るために、Kayら（80）によって利用された。Connellyと共同研究者（83～87）の研究によって、アデノウイルスベクターに関するいくつかの重要な洞察が得られており、彼らは、血友病Aを処置するためのアプローチとして、初期世代のアデノウイルスベクターを用いることを開発した。Bドメイン欠失FVIIIを発現するアデノウイルスベクターを用いて、これらの研究者らは、血友病Aのマウスにおける出血素質の表現型修正を証明することができた（87）。発現レベルは、当初>2000 mU/mLであったが、予想されるように、9ヶ月間で徐々に約100 mU/mLまで低下した。

40

【0076】

HIVに基づく新規遺伝子輸送媒体であるレンチウイルスベクター（101）も同様に、肝臓

50

、筋肉、および造血細胞に形質導入することが知られており、このように、血友病の遺伝子治療のために用いられうる可能性がある。Kafriら（102）によって公表された研究から、レンチウイルスベクターを肝実質内に直接注射した後にヒト化GFPが安定に発現されること（22週）が証明された。

【0077】

Okoliら（106）は、キトサンDNAナノスフェアの中に含まれるFIXプラスミドDNAをゼラチン立方体の中に包埋して、これを1回処置として25 gプラスミドの用量でマウスに与えた予備的な報告を紹介した。処置したマウスは、45 ng/mL（正常血漿レベルの約1%）のレベルを示したが、レベルは14日間のあいだに検出できないレベルまで徐々に低下した。

【0078】

レトロウイルスベクター、AAVベクター、トランスフェクトしたプラスミド、およびアデノウイルスに関して、ヒトにおけるフェーズI臨床試験が現在進行中であるか、最終計画段階である。

【0079】

当業者に明白であるように、第V因子、プロトロンビン、第XII因子、HGFA（肝細胞増殖因子活性化剤）、およびPHBP（血漿ヒアルロニン結合蛋白質）のような、第VIII因子以外の物質を投与するために、類似の方法を用いてもよい。

【0080】

以下の実施例は、本発明の特定の態様を説明するが、本発明の範囲を如何なるようにも制限すると解釈してはならない。上述の開示の教示および以下の実施例から、特定の改変および変更が当業者に明らかであるが、これらも本発明の趣旨および範囲に含まれると解釈される。

【0081】

実施例1 - 第V因子

本発明の一つの態様において、A2ドメインの解離が防止されるように、組み換え型FV変異体のA2とA1またはA3ドメインのあいだにジスルフィド結合を操作してもよい。FVaに関してはX線結晶構造もNMR構造もわかっていない。しかし、上記のように、本発明は、そのような構造を用いることに限定されず、相同性モデルに適用してもよい。

【0082】

したがって、Sowdhaminiのアルゴリズムを用いるコンピュータープログラムMODIP（19）を、FVaのPellequer相同性モデルに適用した（20）。上記のように、MODIPは、ジスルフィド架橋の導入部位を予測して、それぞれの予測に関して等級（A、B、C）を提供する。等級Aの部位は、ジスルフィド架橋を確立するために最適であると予想される部位であるが、等級Bおよび等級Cの部位は、この順に理想から離れる。

【0083】

Pellequer FVaモデルに関して、等級A部位は、A1 - A2またはA2 - A3界面のいずれかで予測されず、等級B部位が1個予測され、等級Cの部位は数個が予測された。予測された等級Cの部位の中で、MODIPは、5個の部位が最も理想的であることを示した：

His609 - Glu1691（A2 - A3）

Leu238 - Gln590（A1 - A2）

His253 - Asp469（A1 - A2）

Ala257 - Met618（A1 - A2）

Leu283 - Met618（A1 - A2）

【0084】

これらの中で、609位と1691位の対が、第VIII因子における残基Tyr664 - Thr1826と整列することに注目した。

【0085】

コンピューターグラフィックス分析を用いて予測された等級BおよびC部位の目視観察を行ったところ、等級Bの部位が利用できないことが示された。次に、さらにジスルフィド架橋を含むFVa相同性モデルのバージョンを、最善の等級C部位の5個のそれぞれに関して

10

20

30

40

50

構築した。これは、Charm22全原子力場を用いるX-POLRコンピュータプログラムによって改良が提供される、Xfitコンピュータプログラムを用いて行った。

【 0 0 8 6 】

改良後、モデルとしたジスルフィド結合を最適なジスルフィド幾何学に関して分析した。Cys609 - Cys1691は、FVにおけるジスルフィド結合にとって可能性がある最善の幾何学を提供し、 $r_{ss} = 2.02$ 、 $\angle_{ss} = 80.9^\circ$ 、および5個の部位のうち最低のファンデルワールス気相エネルギーを示した。次により部位は、Leu238 - Gln590であり、 $r_{ss} = 2.03$ 、 $\angle_{ss} = -111.6^\circ$ であった。このように、これら二つの部位を、部位特異的変異誘発を用いてジスルフィド結合を作製する最初の試みのために選択した。

【 0 0 8 7 】

次に、完全長のFV cDNAを含むプラスミドpED-FVを得た。次に、プラスミドpED-FVにおける完全長のFV cDNAを、SalIによる消化によって除去して、改変したpUC119プラスミドに挿入した。次に、FV cDNAの断片を、nt4641位でBamHI部位を作製する5'プライマー（FV cDNAの番号づけ；nt = ヌクレオチド）およびnt6014位でBamHI部位を保持するがnt5975位でBamHI部位を除去する3'プライマーを用いて、PCRによって作製した。用いたプライマーを下記に示し、下線は変異を示し、太字は関係するコドンまたは制限部位を示す：

5'-プライマー(4641部位)

5'-CACCGATCCTACAGATTACATTGAGATCA-3'

3'-プライマー(5975位除去、6014保持)

5'-GTCTGGATCCCTGTGATTATGACTTCCTTTTGCATGTCCACCTGAATCCAAG-3'

【 0 0 8 8 】

pUC119-FVをBamHI（FV cDNA番号づけにおいてnt2061位、5975位、および6014位で切断）によって消化した。新しいPCR断片を、ヌクレオチド2601～6014位のpUC119-FVのBamHI部位のあいだに挿入した。これらの段階によって、nt2602位～4641位（残基812～1491位のコード配列）が除去されて、FV Bと命名されるBドメインを含まないFVをコードする構築物が作製された。

【 0 0 8 9 】

このFV B遺伝子構築物を、インビトロジェン社（カールスバッド、カリフォルニア州）の発現ベクターpcDNA3.1+に挿入した。次に、ストラタジーンクイックチェンジPCR変異誘発キット（ラホヤ、カリフォルニア州）およびFV Bを用いて、Asn2181でのグリコシル化を防止するために、Ser2183をAla（コドンAGTをGCCに変化させる）に変異させ、変異体2183A - FV Bを得た。この変異は、特定の機能的特性が異なるFVの二つの種を生じる、Asn2181での不完全なグリコシル化によるFV不均一性を回避するために作製した（25、26）。その後の変異は全てこのB-ドメインを含まないSer2183A変異体を用いて作製した。いくつかの態様において、この段階を省略してもよい。

【 0 0 9 0 】

同時に、ストラタジーン社のクイックチェンジPCR変異誘発キットを用いて、四つの変異原性プライマーの付加によってシステイン残基をコードする場所を配置した。以下の対を作製した：Leu238Cys：Gln590Cys（Cys238 / Cys590）、およびHis690Cys：Glu1691Cys（A2 - SS - A3）。Arg506およびArg679のグルタミン（Gln506またはGln679）へのさらなる変異を有する変種（Q506/Cys238/Cys590、Q506 - A2 - SS - A3およびQ506/Q679 - A2 - SS - A3）も同様に作製した。用いた変異誘発プライマーを下記に示すが、下線は変異を示し、太字は関係するコドンまたは制限部位を示す：

Ser2183 – Ala

フォワードプライマー

5'-CATGGAATCAAGCTATTACACTTCGCC-3'

リバースプライマー

5'-GGCGAAGTGTAAATAGCTTGATTCCATG-3'

Leu238 – Cys

フォワード

5'-GGCCAGAATGCTTCTCCATTC-3'

10

リバース

5'-GAATGGAGAAGCATCTCTGGCC-3'

Gln590 – Cys

フォワード

5'-GTGGGGACCTGTAATGAAATT-3'

リバース

5'-AATTTCAATTACAGGTCCCCAC-3'

20

His609 – Cys

フォワード

5'-CTATGGAAAGAGGTGTGAGGACACC-3'

リバース

5'-GGTGTCTCTACAACCTCTTCCATAG-3'

Glu1691-Cys

フォワード

5'-GATCAGGGCCATGTAGTCCTGGC-3'

リバース

5'-GCCAGGACTACATGGCCCTGATC-3'

30

Arg306 – Gln

フォワード

5'-CCAAAGAAAACCCAGAATCTTAAG-3'

リバース

5'-CTTAAGATTCTGGGTTTTCTTTGG-3'

Arg506 – Gln

40

フォワード

5'-CTGGACAGGCAAGGAATACAG-3'

リバース

5'-CTGTATTCTTGCCTGTCCAG-3'

Arg679 – Gln

フォワード

5'-CATGGCTACACAGAAAATGCATG-3'

リバース

5'-CATGCATTTTCTGTGTAGCCATG-3'

50

【0091】

それぞれの変異体を含むプラスミドを、キアゲン社のキアフィルタープラスミドミディプレップキットによって精製して、直鎖状にし、製造元の説明書に従って、Superfectトランスフェクション試薬を用いてCOS-1細胞にトランスフェクトした。より詳しく述べると、DNA 1 μ gを、Superfect試薬5 μ lと共にDMEM/F12培地60 μ lにおいて10分間インキュベートした。DMEM/10%FBS/1 mMグルタミン350 μ lを加えて、この混合物を24ウェルプレートのウェル中のCOS-1細胞（約50%コンフルエント）に移して、3時間インキュベートしてから洗浄して新鮮な培地を補給した。0.8 mg/mlジェネティシン（Geneticin）（ギブコBRL社、ロックビル、メリーランド州）を用いて安定なクローンを選択した。0.05%BSAおよび5 mM CaCl_2 を含む血清不含条件培地を、それぞれのFV変異体を発現するCOS-1細胞から回収して、16%PEG 6000によって沈殿させた。次に、沈殿物を5 mM CaCl_2 、2 mMベンザミジン、5 nM PPACKおよび1 mM PMSFを含むHBS（50 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4）に再溶解して、同じ緩衝液に対して透析して、抗FV抗体カラムを用いて精製した（24）。FVを含む分画を採取して、濃縮し、0.1%BSAを含むHBSにおいて-80℃で保存した。

10

【0092】

FVaを、トロンピンによる活性化後に、活性およびELISAアッセイによって定量した。ELISAアッセイは、アフィニティバイオロジカル社（ハミルトン、オンタリオ、カリフォルニア州）の10 μ g/mlヒツジ抗FV抗体によってコーティングして、ピアス社（ロックフォード、イリノイ州）のSuperblockによってブロッキングしたヌンクマキシソルブ（Nunc Maxisorb）プレートを用い、抗原は、マウス抗FV軽鎖モノクローナル抗体（V59）によって検出した。FV（40 nM）はトロンピン（0.5 nM）の0.1%BSAおよび5 mM CaCl_2 を含むHBS溶液によって37℃で10分間活性化し、活性化は、ヒルジンの1.1モル等量を添加することによって停止した。FVa不活化アッセイは、FVa 4 nMおよびAPC 2.5 nMを用いて行い、記述のようにプロトロンビナーゼアッセイを用いて残留FVaを定量した（27）。FVaの不活化は以下のように測定した。1 nM FVaと25 μ Mリン脂質小胞との混合物を、50 mM HEPES、pH 7.4、100 mM NaCl、0.5%BSA、5 mM CaCl_2 、0.1 mM MnCl_2 （Ptase緩衝液と呼ばれる）において作製した。不活化は、APCの付加によって開始した。1 μ lのアリコートをそれぞれの時点で採取して、1.25 nMの第Xa因子40 μ lを25 μ Mリン脂質小胞と共に加えた後、3 μ Mプロトロンピン10 μ lを加えた（最終濃度：1 nM FXa、20 pM FVa、25 μ Mリン脂質小胞および0.6 μ Mプロトロンピン）。2.5分後、10 mM EDTA、0.5%BSA、pH 8.2を含むTBS 55 μ lを加えて、この混合物15 μ lのアリコートの反応を停止させた。色素発生基質CBS 34-47を加えて、吸光度405 nmでの変化を測定することによってトロンピンの形成量を評価した。

20

30

【0093】

いくつかの試験において、FXaまたはプロトロンピンを変化させた。Xa力価を測定する場合、3.34 pM FVa/FVaiおよび41.7 μ Mリン脂質小胞のPtase緩衝液溶液における混合物を、96ウェルプレート（ポリプロピレン、V-ウェル）のウェルに30 μ lずつ分注した。Xa 10 μ lを同じ緩衝液において、様々な濃度で各ウェルに加えた。0分に、1.5 μ Mプロトロンピン（FII）10 μ lを全てのウェルに加えた（最終濃度 = 2 pM FVa、25 μ M PL小胞、5~600 pM Xa、0.3 μ M FII）。12分において、0.5%BSA、10 mM EDTA、pH 8.2を含むTBS 55 μ lを含む96ウェルプレートに、15 μ lを移すことによってPtase反応を停止させた。次に、形成されたトロンピンの量を色素発生基質CBS 34-47によって測定した。プロトロンピンに関しては、125 pM Xa、1.25 nM FVa/FVai、および31.25 μ M PL小胞のPtase緩衝液溶液を含む混合物20 μ lを、96ウェルVウェルプレートのウェルに分注した。0分目に、様々な濃度のFII 5 μ lを加えた（最終濃度100 pM Xa、1 nM FVa、25 μ l PL、25~1500 nM FII）。2分30秒目に、上記のように15 μ lをEDTA緩衝液55 μ lに移すことによって反応を停止させた。トロンピンは上記のように測定した。

40

【0094】

次に、SDS-PAGEをMOPS緩衝液（インビトロジェン社、カールスバッド、カリフォルニア州）と共にNovex 4~12%ビストリス勾配ゲルを用いて行った。1レーンあたり蛋白質50 n

50

gをローディングした。次に、蛋白質をミリポアPVDFメンブレンに転写して、モノクローナル抗FV軽鎖抗体、AHV-5112、またはV59、およびウサギポリクローナル抗FV重鎖抗体によってイムノブロットを展開した(24)。より詳しく述べると、メンブレンをTBS、1%カゼイン、および2 mM CaCl_2 によってブロッキングした。抗体は同じ緩衝液において希釈した。一次抗体はそれぞれの抗FV抗体であり、二次抗体は、ピアス社のビオチニル化ヤギ抗マウスIgGまたはビオチニル化ロバ抗ウサギIgGであった。次に、ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼおよび1-段階NBT/BCIP基質(同様にピアス社)を用いて可視化した。産生されて精製されるFV種に関して、純粋なFVの収率は条件培地1 Lあたり5 μg ~ 25 μg の範囲であった。銀染色を施したSDS-PAGEに基づいて、本発明者らは変異体の純度が70% ~ 90%であると推定した。

10

【0095】

当技術分野で既知であるように、FVa軽鎖は通常、Asn2181での不完全なグリコシル化によって形成された不均一性のために、SDS-PAGEにおいて二重項を形成する。2183位のセリンをアラニンに変異させると、このグリコシル化部位が消失する(28)。イムノブロットにより、本発明者らの組み換え型FV分子は全て、見かけの分子量188 kDaを有し、残基812 ~ 1491位の欠失と一致することが確認された。さらにイムノブロットによって、野生型組み換え型FVaが軽鎖二重項を形成するのに対し、Z183A変異を有する他のFVa変異体は全て一本鎖軽鎖バンドのみを有することが確認された。

【0096】

操作された二つのシステイン残基を含む変異体FV蛋白質における、所望のドメイン間ジスルフィド結合を証明するために、FVaおよびAPC処理FVai(ここで、「i」は不活化を示す)のイムノブロットを行った。図1は、FV B、FVa(トロンビンの活性化に応じて形成される)、およびFVai(APC切断によって不活化)の一次配列を表すスキームを示す。

20

【0097】

ポリクローナル抗FV重鎖抗体を用いたイムノブロットにより、Cys238/Cys590変異をFVまたはQ506 - FVに導入しても、A1およびA2ドメインを検出可能に連結することが証明されなかったものの、これらの種は正常なFVa活性を有したことから、本発明者らは、これらのシステインのあいだにジスルフィド結合が形成されないという結論に達した。

【0098】

図1Cに示すように、Cys609およびCys1691を含むFV変異体が、A2とA3ドメインとのあいだに新しいジスルフィド結合を形成する場合、これはFVa重鎖と軽鎖とを連結するであろう。この場合、FVaのイムノブロットにおいて、ジスルフィド結合した分子種は、重鎖および軽鎖の相加的分子量に対応する分子量で現れ、完全なFVa不活化を通常引き起こすArg 506、Arg306、およびArg679でのAPC切断後においても、FVaiの軽鎖は、A2ドメインのC-末端断片にクロスリンクしたままである(A2c、残基507 ~ 679位)。

30

【0099】

実際に、そのような結果が得られた。抗FV軽鎖抗体によって展開したイムノブロットにおいて(図2A)、2183A - FVaおよび2183A - FVaiを含むレーン1および2はいずれも、予想される分子量(69 kDa)で正常な軽鎖を示したが、レーン3において、Cys609/Cys1691 - FVaを含む変異体は、クロスリンクした軽鎖および重鎖(158 kDa)に関して予想される主なバンドを示した。このように、これらの二つのシステイン残基を含むFV変異体は、「A2 - SS - A3」とであると正当に命名される。

40

【0100】

レーン4は、APC処置A2 - SS - A3 - FVaiが、A2c断片にクロスリンクした軽鎖(92 kDa)に関して予想される移動度に対応する、主なバンドを示すことを証明した。このバンドよりわずかに上のよりかすかなバンドは、Arg506で切断された重鎖に関して予想されるバンドに相関したが、Arg679で切断された場合には相関せず、断片507 ~ 709(101 kDa)が得られた。レーン5および6(図2A)は、Q506 - A2 - SS - A3 - FVaおよびQ506 - A2 - SS - A3 - FVaiを含んだ。これらの種において、Arg506切断は、Q506 - A2 - SS - A3 - FVai(レーン6)において、軽鎖がA2ドメイン全体(残基680 ~ 709位のその小さいC-末端テールを有するか

50

、または有しない)にクロスリンクしたままであるために、起こることができない。実際に、認められた高分子量バンド(レーン6)は、A2ドメインにクロスリンクした軽鎖に対応した(130 kDa)。図2Aのレーン7~12は、DTTを用いて還元したレーン1~6と平行な試料を含んだ。レーン7~12は、還元後、様々な高分子量クロスリンク種が消失して、正常な軽鎖バンドが出現することを示し、レーン3~6において認められた高分子量軽鎖含有種(図2A)が実際に、軽鎖と重鎖のあいだのジスルフィドクロスリンクの結果であったことを証明している。

【0101】

Cys609/Cys1691を含むA2-SS-A3変異体における、FVa重鎖と軽鎖のあいだの共有結合クロスリンクに関するさらなる証明は、抗FV重鎖抗体を用いたイムノブロット分析から得られ、これは非還元条件で抗FV軽鎖抗体を用いて展開されたイムノブロットにおいて、同じ新しいバンドが可視化されることを示した。例えば、図2Bにおいて、非還元条件において、A2-SS-A3-FVaおよびA2-SS-A3-FVaiのそのようなイムノブロットと共に、Q506-A2-SS-A3-FVaおよびQ506-A2-SS-A3-FVaは、図2Bの抗FV軽鎖抗体を用いて展開したイムノブロットにおいて可視化された、同じクロスリンク種を表すと予想されるバンドを生成した。レーン1および5(図2B)はいずれも、図2B、レーン3(157 kDa)において認められるものと同様移動する、重鎖にクロスリンクした軽鎖に対応するバンドを示した。図2Bにおけるレーン2は、A2c断片にクロスリンクした軽鎖に対応するバンドを示し、図2Aのレーン4において認められたバンドと同様移動した(102 kDa)。図2Bのレーン6は、図2Aのレーン6において認められたバンドと同等の、A2ドメインにクロスリンクした軽鎖に対応するバンドを示した(132 kDa)。

【0102】

最後に、遊離のA2-C末端断片(24 kDa)およびA2(63 kDa)断片はそれぞれ、非還元のレーン2および6において可視化されなかったが、還元したレーン4および8では肉眼で確認でき、これらの断片が還元によってジスルフィド結合種から放出されたことを示している。

【0103】

Q506-A2-SS-A3-FVaおよびQ506/Q679-A2-SS-A3-FVaのイムノブロット分析は、重鎖にクロスリンクしない遊離の軽鎖が少量存在することを示し(図2)、A2-SS-A3-FVa変異体におけるジスルフィドクロスリンクが100%完全ではないことを示している。これらの非還元イムノブロットの密度測定分析から、平均で、Q506-A2-SS-A3-FVa分子の約10%がジスルフィドクロスリンクを欠損することが示された。

【0104】

上記で暗に示しているように、図1Aは、異なるドメインの位置を示すFVBの一次配列の略図である。図1Bの図は、活性化FVB(FVa)、すなわちCa²⁺イオンの存在下で会合したN-末端重鎖とC-末端軽鎖とのヘテロ二量体を示す。矢印は、APCによるFVaにおける切断部位を示す。図1Cの図は、APCによるFVa(FVai)の不活化によって産生された切断断片を示し、さらに、ジスルフィド結合形成が起こった(His609-Glu1691)、および起こらなかった(Leu238-Gln590)システイン変異部位を示している。

【0105】

実施例2-第VIII因子

当技術分野で既知であるように、第V因子と第VIII因子のあいだに多くの類似性がある。より詳しく述べると、第V因子と第VIII因子は類似の遺伝子構造を有し、非常に相同なアミノ酸配列およびドメイン構造を有し、いずれもトロンビンによる非常に特異的な切断によって活性化され、そしていずれも活性化C蛋白質(APC)による限定的な蛋白質分解によって不活化された。したがって、FVに関して先に開示した方法と類似の方法を用いて、A2と、A1またはA3ドメインとのあいだのジスルフィド結合を組み換え型FVIIIに操作してもよい。当技術分野で既知であるように、FVIIIaは、A2ドメインが自然に解離しうるために、熱力学的に不安定である。図3に示すように、FVIIIaのA2と、A1またはA3ドメインとのあいだにジスルフィド結合を配置すれば、この解離を防止する長所を有する。

【 0 1 0 6 】

FVaと同様に、FVIIIaに関してx-線結晶構造またはNMR構造のいずれもわかっていない。しかし、上記のように、本発明は、そのような構造を用いることに限定されず、相同なモデルに適用してもよい。

【 0 1 0 7 】

FVIIIaのA2とA1またはA3ドメインのあいだにジスルフィド結合を操作する第一段階として、Sowdhaminiのアルゴリズムを用いるコンピュータプログラムMODIPを、FVIIIaのAドメインに関してPembertonら(54)の相同性モデルに適用した。上記のように、MODIPは、ジスルフィド架橋の導入部位を予測して、それぞれの予測に関して等級(A、B、C)を提供する。等級Aの部位は、ジスルフィド架橋を確立するために最も最適であると予想される部位であるが、等級Bおよび等級Cの部位は、この順に理想的ではなくなる。PembertonのFVIIIaのモデルに関して、部位15個が予測された：

等級 A:

Met 662 – Asp 1828 (A2-A3)

等級 B:

Ser 268 – Phe 673 (A1-A2)

Ile 312 – Pro 672 (A1-A2)

Ser 313 – Ala 644 (A1-A2)

Met 662 – Lys 1827 (A2-A3)

Tyr 664 – Thr 1826 (A2-A3)

等級 C:

Pro 264 – Gln 645 (A1-A2)

Arg 282 – Thr 522 (A1-A2)

Ser 285 – Phe 673 (A1-A2)

His 311 – Phe 673 (A1-A2)

Ser 314 – Ala 644 (A1-A2)

Ser 314 – Gln 645 (A1-A2)

Val 663 – Glu 1829 (A2-A3)

Asn 694 – Pro 1980 (A2-A3)

Ser 695 – Glu 1844 (A2-A3)

【 0 1 0 8 】

これらの中で、Tyr664 - Thr1826の対は、FVaにおいて対His609 - Glu1691と相同な位置に存在することが認められた。上記のように、ジスルフィド架橋を、609位と1691位にシステイン残基をコードする部位を配置することによって、FVに首尾よく操作してもよい。

【 0 1 0 9 】

FVに関して先に記述した方法と同様に、コンピュータグラフィクス分析を用いて、これらの対の目視観察を行った。この分析の結果として、提案された対の三つをさらなる試験のために選択した：Met662 - Asp1828、Tyr664 - Thr1826およびSer313 - Ala644。これらの三つの部位のそれぞれに関して、適当な位置でのジスルフィド架橋をさらに含むFVIIIaモデルのバージョンを、Charm 22全原子力場を用いるX-PLORコンピュータプログラムによって改良が提供される、Xfitコンピュータプログラムを用いて構築した。改良後、モデルとしたジスルフィド結合を先に示した順序で順位をつけると、Cys662 - Cys1828が、

10

20

30

40

50

ジスルフィド結合に関して潜在的な最善の幾何学を提供した。この変異体および組み換え型第VIII因子における変異体Cys664 - Cys1826を、FVに関連して先に記述した方法と類似の方法で作製することを選択した。

【 0 1 1 0 】

FVIII発現プラスミド (p25D) はバイエル社から得た。このプラスミドは、Bドメインの残基744～1637位が欠失しているB-ドメイン欠失FVIIIを発現する。

【 0 1 1 1 】

次に、ストラタジーン社のクイックチェンジPCR変異誘発および変異体FVIIIを用いて、二つのシステイン残基を挿入し、同時に四つの変異原性プライマーを付加することによってジスルフィド結合を形成させた。以下の二つの対を作製した：Met662Cys：Asp1828Cys、およびTyr664Cys：Thr1826Cys。用いた変異誘発プライマーを下記に示し、ここで下線は変異を示し、太字は関係するコドンまたは制限部位を示す：

Met662 - Cys

フォワード

5'-CCTTCAAACACAAATTGCGTCTATGAAGACACACTCACC-3'

リバーズ

5'-GGTGAGTGTGTCTTCATAGACGCATTTGTGTTTGAAGG-3'

Asp1828 - Cys

フォワード

5'-GGCACCCCACTAAATTGTGAGTTTGACTGCAAAGC-3'

リバーズ

5'-GCTTTGCAGTCAAACCTCACATTTAGTGGGTGCC-3'

Tyr664 - Cys

フォワード

5'-CACAAAATGGTCTTGTGAAGACACACTCACCC-3'

リバーズ

5'-GGGTGAGTGTGTCTTCACAGAGGATTTTGTG-3'

Thr1826 - Cys

フォワード

5'-CATATGGCACCCTGTAAAGATGAGTTTGACTGC-3'

リバーズ

3'-GCAGTCAAACCTCATCTTTACAGGGTGCCATATG-3'

【 0 1 1 2 】

上記のTyr664 - Cysリバーズプライマーは、用いた実際の配列であったが、ヌクレオチド22位および23位における実際のFVIII遺伝子配列はGGではなくてCCでなければならない。しかし、フォワードプライマーは正しい配列を有し、選択されたクロンのDNAシーケンシングによって、最終的なC664変異体に関して正しい配列を選択した。

【 0 1 1 3 】

図4は、Met662 - Asp1828またはTyr664 - Thr1826の部位のあいだにジスルフィド架橋を含む変異体FVIIIに基づいてAPCの予想される作用を示す図である。

【 0 1 1 4 】

いくつかの態様において、FVIIIのAPC切断部位Arg336および / またはArg562の変異および / または欠失をさらに含む変種を作製してもよい。そのようなさらなる変異は、KaufmanおよびPipe (109) ならびに米国特許第5,422,260号、第5,250,421号、第5,198,349号 (参照として本明細書に組み入れられる) に記述されるように、FVIIIを不活化に対してよ

10

20

30

40

50

り抵抗性にすることによって、FVIIIに対してさらなる安定性を付加する。

【0115】

第VIII因子変異体をコードする核酸も同様に、例えば、Seedらの米国特許第6,114,148号に記述されるように、ヒト遺伝子に関して好ましいコドンの数をさらに多くを含むように改変してもよい。

【0116】

野生型および変異体p25Dプラスミドの一過性の発現を、いずれもキアゲン社から購入したSuperfect試薬およびEffectene試薬を用いて、COS-1細胞、K293細胞、およびBHK-21細胞において調べた。K293細胞におけるEffectene試薬は、最善の結果を示した。組み換え型FVIIIの収率は、APTT活性アッセイおよびELISA (Immubind FVIII ELISA、アメリカンダイアグノスティカ社) によれば、条件培地1 mlあたり10~100 mUの範囲であった。100 mm皿における、2%FBSを含むDMEM/F12培地中での一過性のトランスフェクションから条件培地を回収して、培地を15倍濃縮して、HEPES緩衝生理食塩液 / 5 mM CaCl_2 / 0.1 mM MnCl_2 、pH 7.4に対して透析した。偽トランスフェクション培地を同じように処置して、陰性対照として用いた。

【0117】

アメリカンダイアグノスティカ社のImmubind FVIII ELISAキットを用いて、組み換え型FVIIIの抗原濃度を決定した。用いた標準曲線は、キットに提供された精製FVIII濃縮物であった (1単位 = 血漿1 mlに含まれるFVIII)。活性は、以下のように、FVIII欠乏血漿およびAPTT試薬Platelin LSを用いてAPTTアッセイによって決定した: FVIII欠乏血漿 (FVIII IdP、ジョージキングバイオメディカル社) 50 μl をPlatelin LS (オルガノンテクニカ社) 50 μl と混合して、37 °Cで3分間インキュベートした。FVIII試料5 μl を加えて、その直後に、0.5%BSAおよび25 mM CaCl_2 を含むHEPES緩衝生理食塩液 (0.15 M NaCl) 50 μl を加えた。ダイアグノスティカStago ST4凝固測定計において凝固時間を測定した。FVIII標準曲線は、FVIII 1.0単位/mlを含むと定義されるプールした正常ヒト血漿 (ジョージキングバイオメディカル社) を用いて作製した。APTTアッセイは、非常に低レベルのFVIII (<0.005 U/ml) に対して感度を示した。

【0118】

抗原および活性のこれらの測定を用いて、三つの蛋白質の相対的比活性を計算した (単位 (U) 活性 / 単位 (U) 抗原)。野生型FVIII (Bドメイン欠失) は、相対的比活性が0.83であった。C662 - C1828-FVIIIは、相対的比活性が3.53であり、C664 - C1828 - FVIIIは相対的比活性が3.40であった。

【0119】

トロンビン活性化FVIIIaの経時的な安定性を、Pipeら (110) によって記載されるプロトコールにいくつかの改変を加えて用いて追跡し、この場合トロンビンの添加によって濃度約500 mU/mlのFVIIIaが生成されたが、トロンピンはわずかに過剰量のヒルジンによって不活化した。その後、この混合物のアリコートを経時的に採取して、上記のようにAPTTアッセイにおいて、FVIIIa活性に関して直ちにアッセイした。図5は、組み換え型野生型FVIIIaおよび二つの組み換え型変異体によるこのアッセイの結果を示す。二つの二重システム変異体は、野生型FVIIIaよりはるかに経時的に安定である (より短い凝固時間に反映されるように)。偽トランスフェクション対照条件培地は、このアッセイにおいて本質的に凝固活性を示さず、経時的な活性の変化も示さなかった (データは示していない)。

【0120】

産生されたFVIII変異体は、細胞に安定にトランスフェクトしてもよい。細胞を増殖させて、FVIII変異体を発現させることができる。産生されたFVIII変異体は、単離および精製してもよい。FVに関連して先に記述したように、イムノプロットを行って、Bドメインの大部分を欠損すること (適当であれば)、そして操作されたジスルフィド結合が存在することを確認してもよい。

【0121】

実施例3 - ブタ-ヒトハイブリッド第VIII因子

10

20

30

40

50

アミノ酸配列がヒトとヒト以外の動物（「ヒト以外」）の第VIII因子コード配列の双方に由来するハイブリッド第VIII因子が当技術分野に存在する。そのような分子の例は、例えば、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,180,371号に認められるであろう。本発明に従って、ハイブリッドA2と、A1またはA3ドメインとのあいだにジスルフィド結合を含む、ヒト以外/ヒトのハイブリッド第VIII因子を作製してもよい。上記の例と同様に、そのようなジスルフィド結合は、A2ドメインの解離を防止する。

【0122】

そのようなハイブリッド分子の作製は、非ハイブリッドFVIIIに関して先に記述した技法とほぼ類似である。第一に、ハイブリッドFVIIIa、例えばヒト以外のA2ドメインとdes-A2ヒト第VIIIa因子のヘテロ二量体とを含む、ハイブリッドの相同性モデルを得てもよく、または作製してもよい。または、そのような構造が存在する、または作製することができる場合には、X-線結晶構造を得るかまたは作製してもよい。次に、ハイブリッドのA2と、A1またはA3ドメインとのあいだにジスルフィド架橋を形成するための部位の示唆をプログラムから得るために、MODIPコンピュータープログラムをモデルまたは構造上で実行させてもよい。または、上記のように予測的な方法を用いてもよい。

【0123】

次に、コンピューターグラフィクス分析を用いて、示唆される部位の一つまたは複数の目視観察を行ってもよい。この分析の結果として、提案される多くの部位をさらなる試験のために選択してもよい。これらの部位のそれぞれに関して、適当な位置でジスルフィド架橋をさらに含むハイブリッドFVIIIaモデルのバージョンを、Charm 22全原子力場を用いるX-PLORコンピュータープログラムによって改良が提供される、Xfitコンピュータープログラムを用いて構築してもよい。改良後、モデルとしたジスルフィド結合は、ジスルフィド結合に関して可能性がある幾何学の質に基づいて順位をつけてもよい。次に、示唆される多数の部位を、FVおよび上記の非ハイブリッドFVIIIに関する記述と類似のように変異体ハイブリッドFVIIIの作製を試みるために選択してもよい。

【0124】

実施例4 - プロトロンビン

先に記述したように、トロンボモジュリンとホスファチジルセリン/ホスファチジルコリンリン脂質小胞（PCPs）の存在下で、メイゾトロンビンと共にメイゾトロンビン（des F1）は、トロンビンよりC蛋白質の、より良い活性化物質である。

【0125】

本発明に従って、プロトロンビンのメイゾトロンビン（des F1）型を安定化させるため、およびメイゾトロンビン（des F1）のトロンビンへの変換を防止するためにジスルフィド結合を含む変異体プロトロンビンを作製してもよい。そのような安定なメイゾトロンビン（des F1）は、例えば、抗凝固剤として適用される可能性を有する。図5に示すように、プロトロンビンのクリングル2とプロテアーゼドメインとのあいだにジスルフィド結合を配置することによって、この安定化が得られることが判明した。

【0126】

第一に、コンピュータープログラムMODIPを、トロンビンと断片2（55）とのヒトトロンビン複合体のX-線結晶構造と、ウシメイゾトロンビン（des F1）（108）のX線結晶構造とに適用すると、ヒトプロトロンビンにおいて以下の予想される部位が得られる：

等級 B:

Asp261-Arg443 (KR2-プロテアーゼ)

His205-Lys572 (KR2-プロテアーゼ)

等級 C:

Asp261-Lys567 (KR2-プロテアーゼ)

【0127】

次に、コンピューターグラフィクス分析を用いて示唆される部位の一つまたは複数の目視観察を行ってもよい。この分析の結果、示唆される多くの部位をさらなる試験のために選択してもよい。これらの三つの部位のそれぞれに関して、Charm 22全原子力場を用いるX-PLORコンピュータープログラムによって改良が提供される、Xfitコンピュータープログラムを用いて、適当な位置でジスルフィド架橋を含むメイゾトロピン(des F1)相同性モデルを構築してもよい。改良後、モデルとしたジスルフィド結合は、ジスルフィド結合に関して潜在的幾何学の質に基づいて順位をつけてもよい。次に、示唆される多数の部位、またはまだ同定されていない部位を、FVおよび上記の非ハイブリッドFVIIIに関連する記述と類似のように、変異体プロトロンピンの作製を試みるために選択してもよい。

【0128】

10

実施例5 - 第XII因子、HGFA、およびPHBP

上記のように、活性化第XII因子(FXIIa)の少なくとも二つの型、すなわち FXIIaおよびFXIIa断片が存在する。上記のように、FXIIa断片は、もはや表面には結合しないがなお触媒的に活性であるように、そのN-末端重鎖断片の大部分がもはや会合していない。本発明に従って、このN-末端重鎖断片を分子の残りにクロスリンクさせて、それにその表面結合特徴を保持させるジスルフィド結合を配置することができる。そのような変異体安定化FXIIは凝固剤として薬学的に適用されうると予測される。

【0129】

第二のFXII様ポリペプチドはHGFAである。HGFAは、損傷組織内で肝細胞増殖因子(HGF)を活性化させ、HGFは組織修復において役割を有する。上記のように、カリクレインによるArg372でのHGFAの切断によって、FXIIの場合と同様に表面結合に関係しているN-末端重鎖が放出される。本発明に従って、ジスルフィド結合は、N-末端重鎖の放出を防止するために配置することができる。そのように安定化された変異体HGFAは、組織修復において役立てるために薬学的に用いられうると思われる。

20

【0130】

第三のFXII様ポリペプチドはPHBPである。上記のように、PHBPは、FVII、uPA、およびtPAを活性化させ、HGFAと相同な構造を有する。本発明に従って、PHBPにおけるN-末端重鎖の放出を防止するために、ジスルフィド結合を配置することができる。そのように安定化された変異体PHBPは、FVII、uPAおよび/またはtPAの活性化によって凝固を促進するために薬学的に用いられうると思われる。

30

【0131】

第XII因子、HGFA、またはPHBPに関しては、X-線結晶またはNMR構造は存在しない。しかし、ウロキナーゼのX-線結晶構造に基づくもののような、これらの分子の相同性モデルを作製するか、または得てもよい。そのような相同性モデルを用いて、例えばFVおよびFVIIIに関する先の記述と類似のように、変異体を作製してもよい。

【0132】

実施例6 - 他の凝固因子

当技術分野で既知であるように、第V因子および第VIII因子以外のいくつかの血漿因子は、単一のポリペプチド鎖として合成され、多数の独立した折り畳みドメインを含み、解離によりドメインの分離が起こる可能性がある限定的な蛋白質分解を受けやすい。上記のように、本明細書に記載の方法は、ポリペプチドの二つのドメインのあいだにジスルフィド結合を配置したいと望むあらゆる場合に用いてもよい。したがって、本明細書に記載の方法は、多くのヒトおよびヒト以外の凝固因子を含む多数のポリペプチドに適用してもよいことは当業者に明らかとなるはずである。

40

【0133】

参考文献

1. Pipe, S. W. and Kaufman, R. J. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 11851-11856
2. Davie, E. W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991) *Biochemistry* **30**, 10363-10370.
3. Esmon, C. T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 349-360.
4. Dahlback, B. (2000) *Lancet* **355**, 1627-1632.
5. Jenny, R. J., Pittman, D. D., Toole, J. J., Kriz, R. W., Aldape, R. A., Hewick, R. M., Kaufman, R. J. & Mann, K. G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4846-4850.
6. Esmon, C. T. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 964-973.
7. Nesheim, M. E., Taswell, J. B. & Mann, K. G. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10952-10962. 10
8. Kalafatis, M., Rand, M. D. & Mann, K. G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31869-31880.
9. Nicolaes, G. A. F., Tans, G., Thomassen, M. C. L. G. D., Hemker, H. C., Pabringer, I., Varadi, K., Schwarz, H. P. & Rosing, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21158-21166.
10. Heeb, M. J., Kojima, Y., Greengard, J. & Griffin, J. H. (1995) *Blood* **85**, 3405-3411.
11. Mann, K. G., Hockin, M. F., Begin, K. J. & Kalafatis, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20678-20683.
12. Guinto, E. R. & Esmon, C. T. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13986-13992.
13. Heeb, M. J., Kojima, Y., Hackeng, T. M. & Griffin, J. H. (1996) *Protein Sci.* **5**, 1883-1889. 20

14. Kojima, Y., Heeb, M. J., Gale, A. J., Hackeng, T. M. & Griffin, J. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14900-14905.
15. Perry, L. J. & Wetzel, R. (1984) *Science* **226**, 555-557.
16. Sauer, R. T., Hehir, K., Stearman, R. S., Weiss, M. A., Jeitler-Nilsson, A., Suchanek, E. G. & Pabo, C. O. (1986) *Biochemistry* **25**, 5992-5998.
17. Villafranca, J. E., Howell, E. E., Voet, D. H., Strobel, M. S., Ogden, R. C., Abelson, J. N. & Kraut, J. (1983) *Science* **222**, 782-788.
18. Wells, J. A. & Powers, D. B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6564-6570.
19. Pabo, C. O. & Suchanek, E. G. (1986) *Biochemistry* **25**, 5987-5991. 10
20. Sowdhamini, R., Srinivasan, N., Shoichet, B., Santi, D. V., Ramakrishnan, C. & Balaram, P. (1989) *Protein Engf.]* **3**, 95-103.
21. Pellequer, J. L., Gale, A. J., Getzoff, E. D. & Griffin, J. H. (2000) *Thromb. Haemost.* **84**, 849-857.
22. Mesters, R. M., Houghten, R. A. & Griffin, J. H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24514-24519.
23. McRee, D. E. (1992) *J. Mol. Graph.* **10**, 44-47.
24. Brunger, A. T. (1992) *X-PLOR Manual. Version 3.0* (Yale University, New Haven).
25. Heeb, M. J., Rehemtulla, A., Moussalli, M., Kojima, Y. & Kaufman, R. J. (1999) *Eur. J. Biochem.* **260**, 64-75. 20
26. Rosing, J., Bakker, H., Thomassen, M. C. L. G. D., Thomassen, L., Hemker, H. & Tans, G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21130-21136.
27. Hoekema, L., Nicolaes, G. A., Hemker, H. C., Tans, G. & Rosing, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 3331-3335.
28. Gale, A. J., Heeb, M. J. & Griffin, J. H. (2000) *Blood* **96**, 585-593.
29. Nicolaes, G. A., Villoutreix, B. O. & Dahlback, B. (1999) *Biochemistry* **38**, 13584-13591.
30. Krishnaswamy, S., Church, W. R., Nesheim, M. E. & Mann, K. G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3291-3299. 30
31. Hockin, M. F., Cawthorn, K. M., Kalafatis, M. & Mann, K. G. (1999) *Biochemistry* **38**, 6918-6934.
32. Bauer, K. A., Kass, B. L., ten Cate, H., Bednarek, M. A., Hawiger, J. J. & Rosenberg, R. D. (1989) *Blood* **74**, 2007-2015.
33. Walker, F. J., Sexton, P. W. & Esmon, C. T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 333-342.
34. Nesheim, M. E., Canfield, W. M., Kisiel, W. & Mann, K. G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1443-1447.
35. Suzuki, K., Stenflo, J. A., Dahlbäck, B. & Teodorsson, B. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1914-1920. 40
36. Rosing, J., Hoekema, L., Nicolaes, G. A. F., Thomassen, M. C. L. G. D., Hemker, H. C., Varadi, K., Schwarz, H. P. & Tans, G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27852-27858.

37. Lollar, P. & Parker, C. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1688-1692.
38. Fay, P. J., Haidaris, P. J. & Smudzin, T. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 8957-8962.
39. Lollar, P., Knutson, G. J. & Fass, D. N. (1984) *Blood* **63**, 1303-1308.
40. Fay, P. J., Beattie, T. L., Regan, L. M., O'Brien, L. M. & Kaufman, R. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6027-6032.
41. Lollar, J. S. U.S. Patent No. 6,180,371
42. Hackeng, T. M., Tans, G., Koppelman, S. J., De Groot, P. G., Rosing, J. & Bouma B. N. (1996) *Biochem. J.* **319**, 399-405.
43. Cote, H. C. F., Bajzar, L., Stevens, W. K., Samis, J. A., Morser, J., MacGillivray, R. T. A. & Nesheim, M. E. (1997) *J. Biological Chem* **272**, 6194-6200. 10
44. DeLa Cadena, R. A., Wachtfogel, Y. T. & Colman R. W. (1994)
45. Colman, R. W. (1999) *Thromb Haemost* **82**, 1568-1577.
46. Shimomura, T. et al (1993) *JBC* **268**:22927-32.
47. Miyazawa, K., et al (1993) *JBC* **268**, 10024-8.
48. Miyazawa K, Wang Y, Minoshima S, Shimizu N & Kitamura N. (1998) *Eur J Biochem* **258**, 355-361.
49. Choi-Miura, N-H et al (1996) *J. Biochem* **119**, 1157-1165. 20
50. Romisch, J et al (1999a) *Blood Coagul Fibrinolysis* **10**, 471-9.
51. Romisch, J et al (1999b) *Haemostasis* **29**, 292-9.
52. Lollar, J. S. U.S. Patent No. 5,859,204.
53. High KA. (2001). *Circ Res* **88**,137-144.
54. Walter J., High KA. (1997). *Adv Vet Med* **40**, 119-134.
55. Pemberton, S., Lindley, P., Zaitsev, V., Card, G., Tuddenham, E. G. D., Kembell-Cook, G. (1997) *Blood* **89**, 2413-2421
56. Arni R. K. et al (1993) *Biochemistry* **32**, 4727-4737.
57. Hazes, B. & Dijkstra, B. W. (1988) *Protein Engineering* **2**, 119-125. 30
58. Kohn, D. B., and P. W. Kantoff, (1989) **29** *Transfusion* 812-820.
59. KayMA, Rothenberg S, Laden CN, Bellinger DA, Leland F, Toman C, Finegold M, Thompson AR, Read MS, Brinkhous KM, Woo SLC. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science*. 1993; 262: 117-119.
60. Vanden Driessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I, Zwinnen H, Vanderhaeghen M-L, Colen D, Chuah MKL. Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:9973-9975.
61. Bosch A, McCray PB, Chang SM, Ulich TR, Simonet WS, Jolly DJ, Davidson BL. Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances in vivo retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes. *J Clin Invest*. 1996; 98:2683-2687. 40

62. Gao C, Jokerst R, Gondipalli P, Cai S-R, Kennedy S, Ponder KP. Intramuscular injection of an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor facilitates hepatic transduction with a retroviral vector in mice. *Hum Gene Ther.* 1999; 10:911-922.
63. Synder RO, Miao CH, patijin GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown AM, Winther B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, Kay MA. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet.* 1997; 16:270-276.
64. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol.* 1996; 70:8098-8108. 10
65. Kessler Pd, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Bryne BJ. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 14082-14087
66. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kutzman GJ, High KA. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med.* 1999;5:56-63.
67. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung Z-H, Tai SJ, Wilson JM, Fisher KJ, High KA. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 5804-5809. 20
68. Kay MX, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader N, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.* 2000; 24: 257-261.
69. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol.* 1999; 73: 3994-4003.
70. Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ, Walsh CE. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther.* 2000;2:619-623 30
71. Snyder Ro, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin H-F, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* 1999; 5:64-70.
72. Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol Ther.* 2000; 1:154-158.
73. Herzog RW, Mount MJ, Arruda VR, Tillson M, High KA. Sustained correction of canine hemophilia B by gene therapy in context of a null mutation. *Blood.* 2000; 96 (suppl.):798a. Abstract. 40
74. Nakai H, Ohashi K, Arruda V, McClelland A, Couto LB, Mause L, Storm rAA V-liver directed clinical trial for hemophilia B. *Blood.* 2000; 96(suppl.):798a. Abstract.

75. Lozier JN, Donahue RE, Donahue BA, Metzger ME, McGehee J, Snyder RO, Powell S, Winters P, Morgan RA. AAV-mediated expression of human factor IX in rhesus macaques. *Mol Ther.* 2000; 1:S289. Abstract.
76. Chirmule N, Probert KJ, Magosin SA, Qian Y, Qian R, Wilson JM. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus vectors in humans. *Gene Ther.* 1999; 6:1574-1583.
77. Burton M, Nakai H, Colosi P, Cunningham J, Mitchell R, Couto L. vectors produces biologically active protein. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 1999;95: 12725-12730.
78. Chao H, Mao L, Bruce AT, Walsh CE. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood.* 2000;95:1594-1599. 10
79. Duan D, Yue Y, Yan Z, Engelhardt JF. A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat Med.* 2000;6: 595-598.
80. Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Chu K, Fields PA, Herzog RW, Couto LB, Larson PJ, High KA. Post-translational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood.* 2001; 97:130-138.
81. Kay MA, Landen CN, Rothenberg SR, Taylor LA, Leland F, Wiehle S, Fang B, Bellinger D, Finegold M, Thompson AR. In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 2253-2357. 20
82. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4407-4411.
83. Kay MA, Meuse L, Gown AM, Linsley P, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ochs HD, Wilson CB. Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 4686-4691.
84. Connelly S, Smith TA, Dhir G, Gardner JM, Mehaffey MG, Zaret KS, McClelland A, Kaleko M. In vivo delivery and expression of physiological levels of functional human factor VIII in mice. *Hum Gene Ther.* 1995; 6:185-193.
85. Connelly S, Gardner JM, McClelland A, Kaleko M. Sustained expression of therapeutic levels of human factor VIII in mice. *Blood.* 1996;87: 4671-4677. 30
86. Connelly S, Gardner JM, McClelland A, Kaleko M. High-level tissue specific expression of functional human factor VIII in mice. *Hum Gene Ther.* 1996;7: 183-195.
87. Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood.* 1996; 88: 3846-3853.
88. Connelly S, Andrews JL, Gallo AM, Kayda DB, Qian J, Hoyer L, Kadan MJ, Gorziglia MI, Trapnell BC, McClelland A, Kaleko M. Sustained phenotypic correction of murine hemophilia A by vivo gene therapy. *Blood.* 1998; 91: 3273-3281.
89. Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Tinlin S, Webster S, Cameron C, Hough C, Notley C, Lillicrap D, Kaleko M, Connelly S. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor 40

- development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood*. 2001; 97: 107-113.
90. Morral N, O' Neal WK, Rice R, Leland M, Kaplan J, Piedra PA, Zhou H, Parks RJ, Velji R, Auilar-Cordova E, Wadsworth S, Graham FL, Kochanek S, Carey KD, Baudet AL. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 12816-12821.
 91. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 1998; 18: 180-183. 10
 92. Clemens PR, Kochanek S, Sunada Y, Chan S, Chen HH, Campbell KP, Caskey CT. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Ther.* 1996; 3:965-972.
 93. Haecker SE, Stedman HH, Balice-Gordon RJ, Smith DB, Greelish JP, full-length human dystrophin from adenoviral vectors deleted of all viral genes. *Hum Gene Ther.* 1996; 7:1907-1914.
 94. Kumar-Singh R, Chamberlain JS. Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:913-921. 20
 95. Chen HH, Mack LM, Kelly R, Ontell M, Kochanek S, Clemens PR. Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1645-1650
 96. Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franklin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:7866-7871.
 97. Balague C, Zhou J, Dai Y, Alemany R, Josephs SF, Andreason G, Harlharan M, Sethi E, Prokepenko E, Jan H-Y, Lou Y-C, Hubert-Leslie D, Ruiz L, Zhang WW. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood*. 2000; 95:820-828. 30
 98. Morral N, Parks RJ, Zhou H, Langston C, Schiedner G, Quinones J, Graham FL, Kochanek S, Beaudet AL. High doses of a helper-dependent adenoviral vectors yield supraphysiological levels of α -antitrypsin with negligible toxicity. *Hum Gene Ther.* 1998; 9:2709-2716.
 99. Wilson JM. Innate and acquired immunity to vectors. Paper presented at: Keystone Symposia on Gene Therapy: A Gene Odyssey; January 6-11, 2001; Snowbird, Utah.
 100. Bristol JA, Shirley P, Idamakanti N, Kaleko M, Connelly S. In vivo dose threshold effect of adenovirus-mediated factor VIII gene therapy in hemophilic mice. *Mol Ther.* 2000; 2:223-232.
 101. Reddy PS, Yan L, Pattison S, Sakhuja K, Kayda D, Golightly D, Idamakanti N, Oraefo M, Frann T, Lu P, Pinkstaff A, Kaloss M, Kaleko M, Connelly S. Generation and in vivo evaluation of a gutless adenoviral vector encoding human factor VIII. Paper 40

- presented at: Cold Spring Harbor Gene Therapy Meeting, September 25-29, 2000; Cold Spring Harbor, NY.
102. Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272: 263-267.
 103. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*. 1997; 17: 314-317.
 104. Park F, Ohashi K, Chiu W, M. N, Kay MA. Efficient lentiviral transduction of liver required cell cycling in vivo. *Nat Genet*. 2000; 24: 49-52. 10
 105. Naldini L. Pre-clinical studies of lentiviral vectors: viral vectors for the treatment of hemophilia corporate symposium. In: Program of the American Society of Gene Therapy third annual meeting; May 31-June 4, 2000; Denver, Colo.
 106. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998; 72: 8463-8471.
 107. Okoli G, Hortelano G, Leong K. Oral delivery of plasmid DNA encoding the factor IX gene. *Mol Ther*. 2000; 1:S28. Abstract.
 108. Roth DA, Tawa NE, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF. Nonviral Transfer of the Gene Encoding Coagulation Factor VIII in Patients With Severe Hemophilia A. *New England J. Med*. 334, 1735-1742. 20
 109. Martin PD, Malkowski MG, Box J, Esmon CT, Edwards BF. New insights into the regulation of the blood clotting cascade derived from the X-ray crystal structure of bovine meizothrombin des F1 in complex with PPACK. *Structure* 1997; 5:1681-1693.
 110. Pipe, SW and Kaufman, RJ. Characterization of a Genetically Engineered Inactivation Resistant Coagulation Factor VIIIa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 11851-11856 (1997).
 111. Boedeker, B.G. Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations. *Semin. Thromb. Hemost.* 27(4):385-94 (Aug. 2001) 30

【 0 1 3 4 】

本明細書において、および適用を通じて引用される、全ての参考文献は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【 0 1 3 5 】

支流と範囲

本明細書に記述の本質、組成物、操作、様々な要素の操作および配置、段階、ならびに技法に変更を行ってもよく、それらも特許請求の範囲に定義される本発明の趣旨および範囲に含まれる。本発明を実施するために上記の様式を改変することは、遺伝子操作、ウイルス学、血液学、医学、および関連分野の当業者に明らかであり、特許請求の範囲内であると解釈される。 40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 3 6 】

【 図 1 】 組み換え型Bドメイン欠失FV分子の略図である。図1Aは、表記の異なるドメインの位置を有するFV B (B-ドメイン欠失ヒト第V因子) の一次配列の略図である。図1Bは、活性化FV B (FVa)、すなわちCa²⁺イオンの存在下で会合したN-末端重鎖とC-末端軽鎖のヘテロ二量体を示す略図である。矢印は、APCによるFVaにおける切断部位を示す。図1Cは、APCによってFVaが不活化された場合 (FVai) に産生される切断断片を示す略図であり、さらに、ジスルフィド結合の形成が起こった (His609 - Glu1691)、または形成が起こらなかった (Leu238 - Gln590) システイン変異部位を示す。 50

【図2】様々なFVaおよびFVai変異体のイムノブロット。(A)抗FV軽鎖モノクローナル抗体によって展開したイムノブロット。レーン1~6の試料は、還元しておらず、レーン7~12の試料は還元した。レーン1および7、2183A - FVa；レーン2および8、2183A - FVai；レーン3および9、A2 - SS - A3 - FVa；レーン4および10、A2 - SS - A3 - FVai；レーン5および11、Q506 - A2 - SS - A3 - FVa；レーン6および12、Q506 - A2 - SS - A3 - FVai；(B)抗FV重鎖ポリクローナル抗体によって展開したイムノブロット。レーン1、非還元A2 - SS - A3 - FVa；レーン2、非還元A2 - SS - A3 - FVai；レーン3、還元A2 - SS - A3 - FVa；レーン4、還元A2 - SS - A3 - FVai；レーン5、非還元Q506 - A2 - SS - A3 - FVa；レーン6、非還元Q506 - A2 - SS - A3 - FVai；レーン7、還元Q506 - A2 - SS - A3 - FVa；レーン8、還元Q506 - A2 - SS - A3 - FVai。クロスリンクおよび非クロスリンク断片のバンドの位置は、それぞれのプロットの右側に示す。LC = 軽鎖、HC = 重鎖、A1 = A1ドメイン、A2 = A2ドメイン、A2c = A2ドメインのC-末端断片(残基507~679位)。分子量マーカーの位置(kDa、ノベックスシール標準物質)を左側に示す。

10

【図3】FVIIIaのA2ドメインとA3ドメインとのあいだ、またはA2ドメインとA1ドメインとのあいだにジスルフィド結合を導入することによって、ヘテロ三量体第VIIIa因子からのA2ドメインの解離の防止を説明する略図である。

【図4】一つの変異体におけるMet662 - Asp1828位、またはもう一つの変異体におけるTyr664 - Thr1826位に対応する位置で導入されたシステイン残基間のジスルフィド結合をいずれも含む変異体FVIIIaに基づいて予想されるAPCの作用を示し、残基Arg336およびArg562でのAPC切断部位を示す略図である。

20

【図5】第VIIIa因子の二重システイン変異体の安定性。FVIIIaの組み換え型野生型および二重システイン変異体を、APTTアッセイにおいて活性に関して経時的にアッセイした。FVIIIa種は表記の通りである：野生型(+)、C662 - C1828()、C664 - C1826()。開始時、約500 mU/ml FVIIIを5.4 nMトロンビンによって処置して、1分後にヒルジンを1 U/mlとなるように加えてトロンビンを不活化した。次に、試料を表記の時間に採取して、APTTアッセイにおいて残留FVIIIa活性に関してアッセイした。

【図6】ヒトプロトロンビンにジスルフィド結合を導入して、そのメイゾトロンビンまたはメイゾトロンビン(dea F1)型を安定化させ、メイゾトロンビンまたはメイゾトロンビン(des F1)のトロンビン(-IIa)への変換を防止することを説明する略図である。説明文：GLA、GLAドメイン；Kr.1、クリングル1ドメイン；Kr.2、クリングル2ドメイン；メイゾIIa、メイゾトロンビン。クリングル2ドメインにおける残基271位でのその切断部位に対して、N-末端の残基にシステインを導入すること、およびプロテアーゼドメインにおける残基320位での切断部位に対して、C-末端の残基にシステインを導入することによって形成された、クリングル2ドメインとプロテアーゼドメインのあいだにジスルフィド結合が導入されたプロトロンビンおよびメイゾIIaを示す。システイン残基293位と439位とのあいだのジスルフィド結合は、天然に存在する蛋白質に存在する。

30

【図7】本明細書に記載の実施例に記載される第VIII因子、第V因子、プロトロンビン、第XII因子、HGFAおよびPHBP変異体に関する番号付けシステムに関する注意書きと共に、アミノ酸配列の起源として用いるアクセッション番号および関連参考文献に関する記述である。

40

【図8】ヒト第VIII因子のアミノ酸配列を含むスイスプロットアクセッション番号P00451からのウェブページおよび関連情報。

【図9】ヒト第V因子のアミノ酸配列を含むスイスプロットアクセッション番号P12259からのウェブページおよび関連情報。

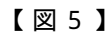
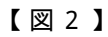
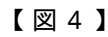
【図10】ヒトプロトロンビンのアミノ酸配列を含むスイスプロットアクセッション番号P00734号からのウェブページおよび関連情報。

【図11】ヒト第XII因子のアミノ酸配列を含むスイスプロットアクセッション番号P00748からのウェブページおよび関連情報。

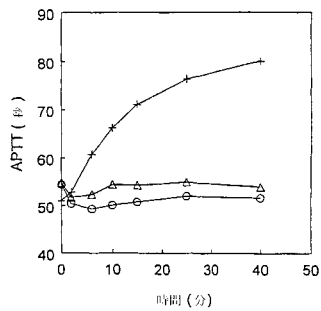
【図12】ヒトHGFAのアミノ酸配列を含むスイスプロットアクセッション番号Q04756からのウェブページおよび関連情報。

50

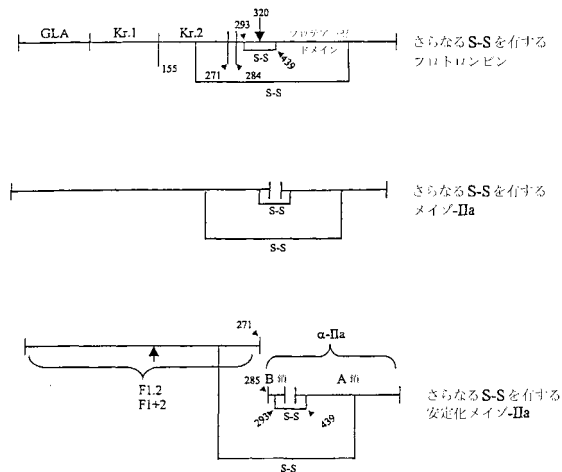
【 図 1 】



【圖 3】



【図 6】



【図 7 - 1】

第VIII因子

スイスプロトデータベース番号 P00451

参考文献

- 著者 Wood, W.I., Capon, D.J., Simonsen, C.C., Eaton, D.L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P.H., Smith, D.H., Hollingshead, P., Wion, K.L., Delwart, E., Tuddenham, E.G.D., Vehar, G.A. and Lawn, R.M.
- タイトル 組み換え型DNAクローンからの活性なヒト第VIII因子の発現
- 雑誌 Nature 312 (5992), 330-337 (1984)
- メドライン 85061548
- 注意 N.A. からの配列
- 参考文献 3 (残基 1 ~ 2351 位)
- 著者 Toole, J.J., Knopf, J.L., Wozney, J.M., Sultzman, L.A., Buecker, J.L., Pittman, D.D., Kaufman, R.J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E.C., Amphlett, G.W., Foster, W.B., Coc, M.L., Knutson, G.J., Fass, D.N. and Hewick, R.M.
- タイトル ヒト抗血友病因子をコードするDNAの分子クローニング
- 雑誌 Nature 312 (5992), 342-347 (1984)

注意: これらの全てにおいて番号は、シグナルペプチドの第一のアミノ酸をアミノ酸 1 位として始まるシグナルペプチドは長さが19アミノ酸である。プロセシングされた蛋白質の標準的な番号は、プロセシングされた蛋白質の最初のアミノ酸 1 位として始まる (全体で、アミノ酸 2351 ではなくて 2332 個)。このように、スイスプロトのファイルおよび参考文献では、全ての残基は、プロセシングされた蛋白質において番号をつける場合よりも、19 大きい番号がついている。

第V因子

スイスプロトデータベース番号 P12259

参考文献

- 参考文献 2 (残基 1 ~ 2224 位)
- 著者 Jenny, R.J., Pittman, D.D., Toole, J.J., Kriz, R.W., Aldape, R.A., Hewick, R.M., Kaufman, R.J. and Mann, K.G.
- タイトル ヒト第V因子の完全なcDNAおよび誘導アミノ酸配列
- 雑誌 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (14), 4846-4850 (1987)

同じことがFVIIIにおける番号付けにも当てはまる。シグナルペプチドは長さが28アミノ酸である。

プロトロンビン

スイスプロトデータベース番号 P00734

参考文献

【図 7 - 2】

- 参考文献 2 (残基 1 ~ 622 位)
- 著者 Degen, S.J., MacGillivray, R.T. and Davie, E.W.
- タイトル ヒトロニンヒンをコードする相補的デオキシリボ核酸および遺伝子の特徴付け
- 雑誌 Biochemistry 22 (9), 2087-2097 (1983)

同じことがFVIIIにおける番号付けにも当てはまる。シグナルおよびプロペプチドはいずれも長さがアミノ酸 43 個であり、プロセシングされたポリペプチドの番号から差し引かれている。

第XII因子

スイスプロトデータベース番号 P00748

参考文献

- 参考文献 3 (残基 1 ~ 615 位)
- 著者 Cool, D.E., Edgell, C.J., Louie, G.V., Zoller, M.J., Brayer, G.D. and MacGillivray, R.T.
- タイトル ヒト血液凝固第XII因子cDNAの特徴付け 第XII因子の一次構造および第XIIa因子の二次構造の予測
- 雑誌 J. Biol. Chem. 260 (25), 13666-13676 (1985)

HGFA

スイスプロトデータベース番号 Q04756

参考文献

- 参考文献 1 (残基 1 ~ 655 位)
- 著者 Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. and Kitamura, N.
- タイトル 肝細胞増殖因子の活性化に関係するヒトセリンプロテアーゼのcDNAの分子クローニングおよび配列分析 血液凝固第XII因子に対するプロテアーゼ前駆体の構造的類似性
- 雑誌 J. Biol. Chem. 268 (14), 10024-10028 (1993)

PHBP

PIR データベース番号 JC4795

参考文献

- 参考文献 1 (残基 1 ~ 560 位)
- 著者 Choi-Miura, N.H., Tobe, T., Sumiya, J., Nakano, Y., Sano, Y., Mazda, T. and Tomita, M.

【図 7 - 3】

- タイトル ヒト血漿からの新規にアルブミン結合蛋白質 (PHBP) の精製と特徴付け: これは、肝細胞増殖因子活性化剤と類似の3個のEGF、タリグリン、およびセリンプロテアーゼドメインを有する

雑誌 J. Biochem. 119 (6), 1157-1165 (1996)

【 8 - 1 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?accessible/ac=P00451>

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

General information about the entry

Entry name **F8_HUMAN**
Primary accession number **P00451**
Secondary accession numbers **None**
Entered in SWISS-PROT in **Release 01, July 1986**
Sequence was last modified in **Release 01, July 1986**
Annotations were last modified in **Release 40, October 2000**

Name and origin of the protein

Protein name **COAGULATION FACTOR VIII [Precursor]**
Synonyms **PROCOAGULANT COMPONENT
ANTHEMOPHILIC FACTOR
AHF**

Gene name **F8 or F8C**
From **Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]**
Taxonomy **Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.**

References

- [1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=86081164; PubMed=9325400;
Tsuett M.A., Blacher R., Burke R.L., Caput D., Chu C., Dina D., Hartog K., Kuo C.H., Musiarz F.R., Merryweather J.P., Najarian R., Pacht C., Potter S.J., Puma J., Quiroga M., Rall L.B., Randolph A., Urdea M.S., Valenzuela P., Dahl H.-H.M., Favaloro J., Hansen J., Nordfang O., Ezdan M.;
"Characterization of the polypeptide composition of human factor VIII:C and the nucleotide sequence and expression of the human kidney cDNA";
DNA 4:333-349(1985).
- [2] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=85061548; PubMed=6438526;
Wood W.J., Capon D.J., Simonsen C.C., Eaton D.L., Gitschier J., Key B., Seeburg P.H., Smith D.H., Hollingshead P., Wion K.L., Delwart E., Tuddenham E.G.D., Vehar G.A., Lawn R.M.;
"Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones";
Nature 312:330-337(1984).
- [3] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=85061550; PubMed=6438528;
Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., Seltzman L.A., Buecker J.L., Pittman D.D., Kaufman R.J., Brown E., Shoemaker C., Orr E.C., Amphlett G.W., Foster W.B., Coe M.L., Knutson G.J., Fass D.N., Hewick R.M.;
"Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor";
Nature 312:342-347(1984).
- [4] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=93265012; PubMed=1303178;
Gitschier J., Wood W.L.;
"Sequence of the exon-containing regions of the human factor VIII gene";
Hum. Mol. Genet. 1:199-200(1992).
- [5] SEQUENCE OF 2064-2070 FROM NUCLEIC ACID.
de Water N.S., Williams R., Browett P.J.;
Submitted (JUN-1997) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.
- [6] SULFATION OF 1699.
MEDLINE=91093266; PubMed=1898735;
Leyte A., van Schijndel H.B., Nishech C., Huttner W.B., Verbeet M.P., Mertens K., van Mourik J.A.;
"Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor";
J. Biol. Chem. 266:740-746(1991).

【 8 - 3 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?accessible/ac=P00451>

- "A novel missense mutation in exon 4 of the factor VIII:C gene resulting in moderately severe hemophilia A";
Blood 74:2688-2691(1989).
- [19] VARIANT LEU-2326.
MEDLINE=89197216; PubMed=2495245;
Inaba H., Fujimaki M., Kazazian H.H. Jr., Antonarakis S.E.;
"Mild hemophilia A resulting from Arg-to-Leu substitution in exon 26 of the factor VIII gene";
Hum. Genet. 81:335-338(1989).
- [20] VARIANT HIS-391.
MEDLINE=89264602; PubMed=2498882;
Arai M., Inaba H., Higuchi M., Antonarakis S.E., Kazazian H.H. Jr., Fujimaki M., Hoyer L.W.;
"Direct characterization of factor VIII in plasma: detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372->histidine)";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:4277-4281(1989).
- [21] VARIANT CYS-1708.
MEDLINE=90105723; PubMed=2104766;
Arai M., Higuchi M., Antonarakis S.E., Kazazian H.H. Jr., Phillips J.A. III, Janco R.L., Hoyer L.W.;
"Characterization of a thrombin cleavage site mutation (Arg 1689 to Cys) in the factor VIII gene of two unrelated patients with cross-reacting material-positive hemophilia A";
Blood 75:384-389(1990).
- [22] VARIANTS GLN-2228 AND LEU-2326.
MEDLINE=90123183; PubMed=2105106;
Casula L., Murru S., Pecorara M., Ristaldi M.S., Restagno G., Mancuso G., Morfini M., de Biasi R., Baudu F., Carbonara A.;
"Recurrent mutations and three novel rearrangements in the factor VIII gene of hemophilia A patients of Italian descent";
Blood 75:662-670(1990).
- [23] VARIANT CYS-391.
MEDLINE=90329422; PubMed=1973901;
Fennell J.K., McVey J.H., Boon M., Ajani A., Tuddenham E.G.;
"CRM+ hemophilia A due to a missense mutation (372->Cys) at the internal heavy chain thrombin cleavage site";
Br. J. Haematol. 75:73-77(1990).
- [24] VARIANTS PHE-1699 AND CYS-1708.
MEDLINE=90152691; PubMed=2103906;
Higuchi M., Wong C., Kochhan L., Olek K., Aronis S., Kasper C.K., Kazazian H.H., Antonarakis S.E.;
"Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA";
Genomics 6:65-71(1990).
- [25] VARIANTS CYS-1728 AND ASP-1941.
MEDLINE=90169988; PubMed=2106480;
Traystman M.D., Higuchi M., Kasper C.K., Antonarakis S.E., Kazazian H.H.;
"Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect point mutations in the factor VIII gene";
Genomics 6:293-301(1990).
- [26] VARIANTS LEU-345 AND ARG-348.
MEDLINE=90192753; PubMed=2107342;
Kogan S., Gitschier J.;
"Mutations and a polymorphism in the factor VIII gene discovered by denaturing gradient gel electrophoresis";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2092-2096(1990).
- [27] VARIANTS LYS-1723 AND SER-2319.
MEDLINE=91348684; PubMed=1908817;
Paynton C., Seisak G., Sommer S.S.;
"Identification of mutations in two families with sporadic hemophilia A";
Hum. Genet. 87:397-400(1991).
- [28] VARIANTS.
MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;
Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Jais R., Antonarakis S.E.;
"Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:7405-7409(1991).
- [29] VARIANTS.

【 8 - 2 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?accessible/ac=P00451>

- [7] SULFATION.
MEDLINE=92207952; PubMed=1554716;
Pittman D.D., Wang J.H., Kaufman R.J.;
"Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII";
Biochemistry 31:3315-3325(1992).
- [8] STRUCTURE BY NMR OF 2322-2343.
MEDLINE=95300924; PubMed=7893714;
Gilbert G.E., Baleja J.D.;
"Membrane-binding peptide from the C2 domain of factor VIII forms an amphipathic structure as determined by NMR spectroscopy";
Biochemistry 34:3022-3031(1995).
- [9] REVIEW ON MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A.
MEDLINE=91221499; PubMed=1902642;
Gitschier J.;
"The molecular basis of hemophilia A";
Ann. N.Y. Acad. Sci. 614:89-96(1991).
- [10] REVIEW ON MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A.
MEDLINE=8908506; PubMed=2491949;
White G.C. II, Shoemaker C.B.;
"Factor VIII gene and hemophilia A";
Blood 73:1-12(1989).
- [11] REVIEW ON MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A.
MEDLINE=95245332; PubMed=7728145;
Antonarakis S.E., Kazazian H.H., Tuddenham E.G.D.;
"Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A";
Hum. Mutat. 5:1-22(1995).
- [12] VARIANT GLN-2326.
MEDLINE=86235434; PubMed=3012775;
Gitschier J., Wood W.L., Shuman M.A., Lawn R.M.;
"Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophilic";
Science 232:1415-1416(1986).
- [13] VARIANT PRO-2135.
MEDLINE=88096539; PubMed=3122181;
Levisson B., Janco R.L., Phillips J.A. III, Gitschier J.;
"A novel missense mutation in the factor VIII gene identified by analysis of amplified hemophilia DNA sequences";
Nucleic Acids Res. 15:9797-9805(1987).
- [14] VARIANT GLN-2328.
MEDLINE=88191889; PubMed=2833855;
Youssefian H., Wong C., Aronis S., Placoukous H., Kazazian H.H. Jr., Antonarakis S.E.;
"Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides";
Am. J. Hum. Genet. 42:718-725(1988).
- [15] VARIANT GLY-291.
MEDLINE=88220354; PubMed=2833904;
Youssefian H., Wong C., Aronis S., Placoukous H., Kazazian H.H. Jr., Antonarakis S.E.;
"Moderately severe hemophilia A resulting from Glu->Gly substitution in exon 7 of the factor VIII gene";
Am. J. Hum. Genet. 42:867-871(1988).
- [16] VARIANT CYS-1708.
MEDLINE=89274393; PubMed=2499363;
O'Brien D.P., Tuddenham E.G.;
"Purification and characterization of factor VIII 1.689-Cys: a nonfunctional cofactor occurring in a patient with severe hemophilia A";
Blood 73:2117-2123(1989).
- [17] VARIANT CYS-391.
MEDLINE=90001543; PubMed=2506948;
Shima M., Ware J., Yoshioka A., Fukui H., Fulcher C.A.;
"An arginine to cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional factor VIII molecule";
Blood 74:1612-1617(1989).
- [18] VARIANT LEU-189.
MEDLINE=90057680; PubMed=2510835;
Chan V., Chan T.K., Tong T.M., Todd D.;
MEDLINE=92020842; PubMed=1924291;
Higuchi M., Antonarakis S.E., Kasch L., Oldenburg J., Economou-Petersen E., Olek K., Arai M., Inaba H., Kazazian H.H.;
"Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8307-8311(1991).
- [30] VARIANTS CYS-1708 AND HIS-1708.
MEDLINE=89123147; PubMed=1851341;
Schwab R., Ludwig M., Kochhan L., Oldenburg J., McVey J.H., Egli H., Brackmann H.H., Olek K.;
"Detection and characterization of two missense mutations at a cleavage site in the factor VIII light chain";
Thromb. Res. 61:225-234(1991).
- [31] VARIANT GLY-1715.
MEDLINE=92250024; PubMed=1349567;
Reiner A.P., Thompson A.R.;
"Screening for nonsense mutations in patients with severe hemophilia A can provide rapid, direct carrier detection";
Hum. Genet. 89:88-94(1992).
- [32] VARIANT LEU-1660.
MEDLINE=93244837; PubMed=1301194;
Nafa K., Baudis M., Debrugrave N., Bardin J.M., Sultian Y., Kapian J.C., Delpech M.;
"A novel mutation (Arg->Leu in exon 18) in factor VIII gene responsible for moderate hemophilia A";
Hum. Mutat. 1:77-78(1992).
- [33] VARIANTS V-49; D-104; V-164; M-181; W-717; F-1808 AND R-2065.
MEDLINE=93250816; PubMed=1301932;
Diamond C., Kogan S., Levinson B., Gitschier J.;
"Amino acid substitutions in conserved domains of factor VIII and related proteins: study of patients with mild and moderately severe hemophilia A";
Hum. Mutat. 1:248-257(1992).
- [34] VARIANTS CYS-1800 AND ILE-2173.
MEDLINE=93250855; PubMed=1301960;
Jonsdottir S., Diamond C., Levinson B., Magnusson S., Jenson O., Gitschier J.;
"Missense mutations causing mild hemophilia A in Iceland detected by denaturing gradient gel electrophoresis";
Hum. Mutat. 1:506-508(1992).
- [35] VARIANTS LEU-308; PHE-577; ALA-653; MET-653 AND PHE-671 DEL.
MEDLINE=93194188; PubMed=8449505;
McGinniss M.J., Kazazian H.H., Hoyer L.W., Bi L., Inaba H., Antonarakis S.E.;
"Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A";
Genomics 15:392-398(1993).
- [36] VARIANTS ILE-299 AND ASN-450.
MEDLINE=93310754; PubMed=8322269;
Pieneman W.C., Reitsma P.H., Briet E.;
"Double strand conformation polymorphism (DSCP) detects two point mutations at codon 280 (AAC->ATC) and at codon 431 (TAC->AAC) of the blood coagulation factor VIII gene";
Thromb. Haemost. 69:473-475(1993).
- [37] VARIANTS VAL-129; LYS-631 AND HIS-1800.
MEDLINE=98111374; PubMed=9450898;
Maugard C., Tuffery S., Aguilar-Martinez P., Schved J.-F., Gris J.-C., Demaille J., Claustres M.;
"Protein truncation test: detection of severe haemophilia A mutation and analysis of factor VIII transcripts";
Hum. Mutat. 11:18-22(1998).
- [38] VARIANT HIS-2182.
Throphilus B.D.M., Enayat M.S., Higuchi M., Kazazian H.H., Antonarakis S.E., Hill F.G.H.;
"Independent occurrence of the novel Arg2163 to His mutation in the factor VIII gene in three unrelated families with hemophilia A with different phenotypes";
Hum. Mutat. 11:334-334(1998).
- [39] VARIANTS.
MEDLINE=98264603; PubMed=9603440;
Freson K., Peerlinck K., Aguirre T., Arnout J., Vermeylen J., Cassiman J.-J., Matthijs G.;
"Fluorescent terminal cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene";
Hum. Mutat. 11:470-479(1998).
- [40] VARIANTS GLY-550; THR-723; GLY-1894; SER-2107 AND THR-2204.

【 8 - 4 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?accessible/ac=P00451>

【 図 8 - 6 】

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/mcpexprot.pl/printable?ac=P00451>

Blood coagulation; Repeat; Plasma; Acute phase; Calcium; Hemophilia; Signal; Glycoprotein; Sulfation; Disease mutation; Polymorphism; Pharmaceutical; 3D-structure.

【 図 8 - 8 】

<http://www.expaty.ch/cgi-bin/nicoexpress.pl/printable?ac=P00451>

VARIANT	26	26	L -> R [SEVERE HEMOPHILIA]. E -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001045.
VARIANT	30	30	E -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001046.
VARIANT	41	41	G -> C [SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001047.
VARIANT	48	48	C -> C [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001048.
VARIANT	75	75	D -> D [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001049.
VARIANT	89	89	G -> D [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001050.
VARIANT	89	89	C -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001051.
VARIANT	99	99	V -> D [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001052.
VARIANT	104	104	V -> D [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001053.
VARIANT	108	108	C -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001054.
VARIANT	110	110	R -> V [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001055.
VARIANT	117	117	L -> R [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001056.
VARIANT	129	129	C -> R [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001057.
VARIANT	130	130	G -> R [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001058.
VARIANT	132	132	E -> D [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001059.
VARIANT	133	133	C -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001060.
VARIANT	135	135	G -> C [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001061.
VARIANT	137	137	T -> T [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001062.
VARIANT	164	164	L -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001063.
VARIANT	165	165	F -> D [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001064.
VARIANT	181	181	V -> N [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001065.
VARIANT	185	185	C -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001066.
VARIANT	189	189	S -> L [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001067.
VARIANT	202	202	S -> R [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001068.
VARIANT	222	222	D -> D [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001069.
VARIANT	224	224	G -> G [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001070.
VARIANT	253	253	V -> F [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001070.
VARIANT	266	266	G -> G [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001071.
VARIANT	278	278	G -> R [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001072.
VARIANT	285	285	V -> G [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001073.
VARIANT	291	291	E -> D [MODERATE/MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001074.
VARIANT	294	294	T -> T [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001075.
VARIANT	299	299	N -> L [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001076.
VARIANT	301	301	R -> R [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001077.
VARIANT	301	301	R -> L [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001078.
VARIANT	308	308	S -> L [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001079.
VARIANT	312	312	C -> E [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001080.
VARIANT	314	314	T -> A [MILD HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001081.
VARIANT	314	314	T -> T [MODERATE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001082.
VARIANT	327	327	L -> F [SEVERE HEMOPHILIA]. /FTTGT=VAR_001083.

【 8 - 9 】

NicePrint View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/ncsp/prot/printable?ac=P00451>

VARIANT 331 331 I -> V (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001084.
VARIANT 345 345 V -> L (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001085.
VARIANT 348 348 C -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001086.
VARIANT 348 348 C -> S (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001087.
VARIANT 348 348 C -> Y (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001088.
VARIANT 391 391 R -> C (OKAYAMA; MODERATE HEMOPHILIA; ABOLISHES THE NORMAL CLEAVAGE BY THROMBIN).
/FTID=VAR_001089.
VARIANT 391 391 R -> H (KUNAMOTO; MODERATE/MILD HEMOPHILIA; ABOLISHES THE NORMAL CLEAVAGE BY THROMBIN).
/FTID=VAR_001090.
VARIANT 391 391 R -> F (SEVERE HEMOPHILIA; ABOLISHES THE NORMAL CLEAVAGE BY THROMBIN).
/FTID=VAR_001091.
VARIANT 392 392 S -> L (MILD HEMOPHILIA; ABOLISHES NORMAL CLEAVAGE BY THROMBIN).
/FTID=VAR_001092.
VARIANT 392 392 S -> P (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001093.
VARIANT 405 405 I -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001094.
VARIANT 405 405 E -> G (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001095.
VARIANT 431 431 L -> F (MODERATE/MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001096.
VARIANT 439 439 G -> V (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001097.
VARIANT 444 444 R -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001098.
VARIANT 450 450 Y -> N (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001099.
VARIANT 474 474 G -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001100.
VARIANT 488 488 A -> G (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001101.
VARIANT 492 492 Y -> H (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001102.
VARIANT 492 492 Y -> C (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001103.
VARIANT 494 494 I -> T (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001104.
VARIANT 498 498 G -> R (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001105.
VARIANT 544 544 D -> N (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001106.
VARIANT 546 546 R -> V (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001107.
VARIANT 550 550 R -> C (MODERATE/MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001108.
VARIANT 550 550 R -> G (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001109.
VARIANT 550 550 R -> H (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001110.
VARIANT 554 554 S -> G (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001111.
VARIANT 556 556 V -> D (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001112.
VARIANT 561 561 D -> Y (IN SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_008987.
VARIANT 577 577 S -> F (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001113.
VARIANT 584 584 Q -> R (MODERATE/MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001114.
VARIANT 585 585 I -> T (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001115.
VARIANT 596 596 S -> P (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001116.
VARIANT 603 603 S -> I (HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001117.
VARIANT 604 604 W -> C (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001118.
VARIANT 605 605 Y -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001119.
VARIANT 612 612 R -> C (MILD/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001120.

【 8 - 11 】

NicePrint View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/ncsp/prot/printable?ac=P00451>

VARIANT 1865 1865 D -> N (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001160.
VARIANT 1865 1865 D -> Y (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001161.
VARIANT 1867 1867 H -> R (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001162.
VARIANT 1869 1869 G -> V (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001163.
VARIANT 1873 1873 P -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001164.
VARIANT 1888 1888 R -> I (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001165.
VARIANT 1894 1894 E -> G (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001166.
VARIANT 1904 1904 E -> K (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001167.
VARIANT 1941 1941 N -> D (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001168.
VARIANT 1941 1941 N -> S (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001169.
VARIANT 1960 1960 R -> Q (MILD/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001170.
VARIANT 1960 1960 R -> L (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001171.
VARIANT 1967 1967 G -> D (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001172.
VARIANT 1979 1979 G -> V (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001173.
VARIANT 1980 1980 H -> Y (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001174.
VARIANT 2016 2016 R -> W (MODERATE/SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001175.
VARIANT 2038 2038 N -> S (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001176.
VARIANT 2065 2065 W -> R (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001177.
VARIANT 2088 2088 S -> F (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001178.
VARIANT 2093 2093 D -> G (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001179.
VARIANT 2105 2105 T -> N (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001180.
VARIANT 2107 2107 G -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001181.
VARIANT 2120 2120 F -> L (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001182.
VARIANT 2124 2124 Y -> C (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001183.
VARIANT 2135 2135 R -> P (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001184.
VARIANT 2138 2138 S -> Y (MILD/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001185.
VARIANT 2148 2148 N -> S (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001186.
VARIANT 2169 2169 R -> H (SEVERE/MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001187.
VARIANT 2172 2172 P -> Q (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001188.
VARIANT 2173 2173 T -> I (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001189.
VARIANT 2178 2178 R -> C (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001190.
VARIANT 2178 2178 R -> H (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001191.
VARIANT 2178 2178 R -> L (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001192.
VARIANT 2182 2182 R -> C (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001193.
VARIANT 2182 2182 R -> H (MODERATE/SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001194.
VARIANT 2183 2183 H -> V (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001195.
VARIANT 2185 2185 L -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001196.
VARIANT 2204 2204 I -> T (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001197.
VARIANT 2209 2209 I -> N (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001198.
VARIANT 2211 2211 A -> P (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001199.

【 8 - 10 】

NicePrint View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/ncsp/prot/printable?ac=P00451>

VARIANT 631 631 W -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001121.
VARIANT 631 631 N -> S (HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001122.
VARIANT 644 644 L -> V (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001123.
VARIANT 653 653 V -> A (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001124.
VARIANT 653 653 V -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001125.
VARIANT 663 663 A -> V (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001126.
VARIANT 671 671 MISSING (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001127.
VARIANT 677 677 F -> L (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001128.
VARIANT 699 699 M -> V (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001129.
VARIANT 717 717 R -> W (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001130.
VARIANT 720 720 G -> D (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001131.
VARIANT 723 723 A -> T (MILD/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001132.
VARIANT 727 727 D -> P (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001133.
VARIANT 739 739 E -> R (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001134.
VARIANT 1057 1057 E -> R (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001135.
VARIANT 1260 1260 D -> E (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001136.
VARIANT 1481 1481 L -> F.
/FTID=VAR_001137.
VARIANT 1699 1699 Y -> C (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001138.
VARIANT 1699 1699 Y -> P (MILD/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001139.
VARIANT 1708 1708 R -> C (EAST RANTFORD; SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA; ABOLISHES THROMBIN CLEAVAGE AT THE LIGHT CHAIN).
/FTID=VAR_001140.
VARIANT 1708 1708 R -> H (MILD HEMOPHILIA; ABOLISHES THROMBIN CLEAVAGE AT THE LIGHT CHAIN).
/FTID=VAR_001141.
VARIANT 1715 1715 R -> G (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001142.
VARIANT 1723 1723 E -> K (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001143.
VARIANT 1728 1728 Y -> G (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001144.
VARIANT 1769 1769 C -> R (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001145.
VARIANT 1775 1775 L -> V (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001146.
VARIANT 1775 1775 L -> F (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001147.
VARIANT 1779 1779 G -> E (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001148.
VARIANT 1791 1791 M -> W (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001149.
VARIANT 1800 1800 R -> H (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001150.
VARIANT 1800 1800 R -> C (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001151.
VARIANT 1800 1800 R -> G (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001152.
VARIANT 1803 1803 S -> P (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001153.
VARIANT 1808 1808 L -> F (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001154.
VARIANT 1842 1842 W -> P (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001155.
VARIANT 1844 1844 P -> S (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001156.
VARIANT 1845 1845 T -> F (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001157.
VARIANT 1853 1853 A -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001158.
VARIANT 1853 1853 A -> V (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001159.

【 8 - 12 】

NicePrint View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/ncsp/prot/printable?ac=P00451>

VARIANT 2123 2123 MISSING (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001200.
VARIANT 2128 2128 R -> G (SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001201.
VARIANT 2128 2128 R -> L (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001202.
VARIANT 2128 2128 R -> Q (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001203.
VARIANT 2242 2242 -> H.
/FTID=VAR_001204.
VARIANT 2248 2248 W -> C (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001205.
VARIANT 2265 2265 Q -> R (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001206.
VARIANT 2319 2319 R -> L (MILD/SEVERE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001207.
VARIANT 2319 2319 P -> S (MILD HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_001208.
VARIANT 2323 2323 R -> C (SEVERE HEMOPHILIA; MAY CAUSE REDUCED PHOSPHOLIPID BINDING).
/FTID=VAR_001209.
VARIANT 2323 2323 R -> H (MILD HEMOPHILIA; MAY CAUSE REDUCED PHOSPHOLIPID BINDING).
/FTID=VAR_001210.
VARIANT 2326 2326 R -> L (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA; MAY CAUSE REDUCED PHOSPHOLIPID BINDING).
/FTID=VAR_001211.
VARIANT 2326 2326 R -> Q (MILD/MODERATE HEMOPHILIA; MAY CAUSE REDUCED PHOSPHOLIPID BINDING).
/FTID=VAR_001212.
VARIANT 2344 2344 G -> C (MODERATE HEMOPHILIA).
/FTID=VAR_008968.
CONFLICT 768 768 P -> R (IN REF. 2).
CONFLICT 1922 1922 C -> S (IN REF. 4).

Sequence information

Length: 2351 AA [This is the length of the unprocessed precursor]
Molecular weight: 267007 Da [This is the MW of the unprocessed precursor]
CRC64: 75FB6A2955C74CB0 [This is a checksum on the sequence]

10	20	30	40	50	60
MQELSTCTFF	LCLLRFCFSA	TRRYLGAVE	LSMDYHSDG	GELPVDARFP	PRVPSFFPN
70	80	90	100	110	120
TSVYVKTFIF	VEITOMLNT	AKRPFPMMGL	LGPTIOADYF	DTVVILKNN	ASHPVSLH
130	140	150	160	170	180
GVSYVASEG	AEYDQTSQR	EKEDOVFC	GHYVQWL	KENGPMASDP	LCITYVLSH
190	200	210	220	230	240
VDLVKDLNG	LIGALLVCR	GLIAKERTV	LKHFTLLN	FDGKRSWSE	TNLSMDRG
250	260	270	280	290	300
AASARWFFN	HTVNGYVRS	LRGLTGCHRK	SVYKHVIMG	TPPEVHSIFL	EGLHTFLVNN
310	320	330	340	350	360
RQASLEISPI	TFETAQTLA	DILGQFLFCH	ISSQKHGHE	AVYKVDSCE	EPLQNRKNE
370	380	390	400	410	420
EADYDQDGL	DSMGVVRFD	DENSPSFIQ	RSVAKRFPET	WNYTAJEE	DWDYAPLVLA
430	440	450	460	470	480
FDORSYKSYQ	LNNGPQRIGR	KYKRVFMAT	TDITFTREA	IQHSGILGF	LLYGEVDTL
490	500	510	520	530	540
LIIFNKQASR	PYNYTPHGI	DVRLYSRRL	PRGVKHLKDF	FILSGEIKFY	KNTVTEGDP
550	560	570	580	590	600
TKSDPRLTRA	YYSFPMNHR	GLASGLGIP	LCTYRESVDG	AGQVMSDKR	NVLFSYFDE

【 9 - 3 】

NiceView of SWISS-PROT: P12259

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-4c>

EMBL	L32779; AAB59401.1; -	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32775; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32766; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32757; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32758; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32759; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32760; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32761; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32762; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32763; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32764; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32765; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32766; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32767; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32768; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32769; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32770; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32771; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32772; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32773; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32774; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32775; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32776; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32777; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	L32778; AAB59401.1; JOINED	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	M16967; AAB59401.1; -	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
	M14335; AAB59532.1; -	[EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
PIR	A25897; A25897.	
	A28028; A28028.	
HSSP	P00450; ICW [HSSP ENTRY / PDB]	
	134400 [NCBI / EBI]	
	188055 [NCBI / EBI]	
MIM	227310 [NCBI / EBI]	
	227400 [NCBI / EBI]	
GeneCards	F8	
InterPro	IPR001117; Cu-oxidase	
	[PROSITE:FA58.C	
	Graphical view of domain structure	
Pfam	PF00394; Cu-oxidase_3	
	PF00754; F8_F8 type C_2	
SMART	SM00231; FA58C_2	
PROSITE	PS00079; MULTICOPPER OXIDASE1_2	
	PS01285; FA58C_1_2	
	PS01286; FA58C_2_2	
ProDom	[Domain structure / List of seq. sharing at least 1 domain]	
BLOCKS	P12259	
DOMO	P12259	
ProMap	P12259	
PRESAGE	P12259	
DIP	P12259	
SWISS-2DPAGE	GET REGION ON 2D PAGE	

Keywords

Blood coagulation; Plasma; Glycoprotein; Calcium; Signal; Zymogen Repeat; Polymorphism; Disease mutation; Thrombophilia

Features

Key	From	To	Length	Description
SIGNAL	1	28	28	
CHAIN	29	2224	2196	COAGULATION FACTOR V.
CHAIN	29	737	709	HEAVY CHAIN.

【 9 - 5 】

NiceView of SWISS-PROT: P12259

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-4c>

DISULFID	500	526	PROBABLE.
DISULFID	1725	1751	PROBABLE.
DISULFID	1807	2061	BY SIMILARITY.
DISULFID	2056	2221	BY SIMILARITY.
CARBOHYD	51	51	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	55	55	(POTENTIAL).
CARBOHYD	239	239	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	257	257	(POTENTIAL).
CARBOHYD	382	382	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	460	460	(POTENTIAL).
CARBOHYD	468	468	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	554	554	(POTENTIAL).
CARBOHYD	741	741	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	752	752	(POTENTIAL).
CARBOHYD	760	760	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	776	776	(POTENTIAL).
CARBOHYD	782	782	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	821	821	(POTENTIAL).
CARBOHYD	838	838	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	877	877	(POTENTIAL).
CARBOHYD	1074	1074	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	1083	1083	(POTENTIAL).
CARBOHYD	1103	1103	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	1106	1106	(POTENTIAL).
CARBOHYD	1479	1479	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	1499	1499	(POTENTIAL).
CARBOHYD	1559	1559	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	1703	1703	(POTENTIAL).
CARBOHYD	2010	2010	N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD	2209	2209	(POTENTIAL).
VARIANT	534	534	R -> Q (IN APCR; LEIDEN).
VARIANT	858	858	R -> R.
VARIANT	865	865	/FT14=VAR_001213.
CONFLICT	923	923	R -> S (IN REF. 5 AND 3).
CONFLICT	1285	1285	L -> I (IN REF. 3).
CONFLICT	1764	1764	T -> M (IN REF. 1).
CONFLICT	2213	2213	T -> A (IN REF. 1).

Sequence information

Length: 2224 AA [This is the Molecular weight: 251699 Da
length of the unprocessed precursor] [This is the MW of the unprocessed precursor]
CR64: 470DD8CD00D2303B [This is a checksum on the sequence]

10 20 30 40 50 60
MFPGCPALMV LVVLQTSWVG WGSQTEAAQ LKQFTVAAGG ISWSYRFEPT NSSLNLSVTS

【 9 - 4 】

NiceView of SWISS-PROT: P12259

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-4c>

PEPTIDE	738	1573	836	ACTIVATION PEPTIDE (CONNECTING REGION).
CHAIN	2574	2224	451	LIGHT CHAIN.
DOMAIN	30	322	300	F5/8 TYPE A 2.
DOMAIN	30	193	164	PLASTOCYANIN-LIKE 1.
DOMAIN	203	328	127	PLASTOCYANIN-LIKE 2.
DOMAIN	348	684	337	F5/8 TYPE A 2.
DOMAIN	348	526	179	PLASTOCYANIN-LIKE 3.
DOMAIN	516	684	149	PLASTOCYANIN-LIKE 4.
DOMAIN	692	1573	882	B.
DOMAIN	895	928	34	2 X 17 AA TANDEN REPEATS.
REPEAT	895	911	17	1.
REPEAT	912	928	17	2.
SIMILAR	1135	1148	14	TO 14 AA REPEATS IN BOVINE FAS.
DOMAIN	1185	1463	279	35 X 9 AA TANDEN REPEATS OF (TNP)-L-S-P-C-L-S-Q-T (APPROXIMATE).
REPEAT	1185	1193	9	1.
REPEAT	1184	1202	9	2.
REPEAT	1203	1211	9	3.
REPEAT	1212	1220	9	4.
REPEAT	1221	1228	9	5.
REPEAT	1230	1238	9	6.
REPEAT	1239	1247	9	7.
REPEAT	1248	1256	9	8.
REPEAT	1257	1265	9	9.
REPEAT	1266	1274	9	10.
REPEAT	1275	1283	9	11.
REPEAT	1284	1292	9	12.
REPEAT	1293	1301	9	13.
REPEAT	1302	1310	9	14.
REPEAT	1311	1319	9	15.
REPEAT	1320	1328	9	16.
REPEAT	1329	1337	9	17.
REPEAT	1338	1346	9	18.
REPEAT	1347	1355	9	19.
REPEAT	1356	1364	9	20.
REPEAT	1365	1373	9	21.
REPEAT	1374	1382	9	22.
REPEAT	1383	1391	9	23.
REPEAT	1392	1400	9	24.
REPEAT	1401	1409	9	25.
REPEAT	1410	1418	9	26.
REPEAT	1419	1427	9	27.
REPEAT	1428	1436	9	28.
REPEAT	1437	1445	9	29.
REPEAT	1446	1454	9	30.
REPEAT	1455	1463	9	31.
REPEAT	1464	1472	9	32.
REPEAT	1473	1481	9	33.
REPEAT	1482	1490	9	34.
REPEAT	1493	1501	9	35.
DOMAIN	1578	1597	330	F5/8 TYPE A 3.
DOMAIN	1578	1751	174	PLASTOCYANIN-LIKE 5.
DOMAIN	1761	1807	147	PLASTOCYANIN-LIKE 6.
DOMAIN	1907	2061	155	F5/8 TYPE C 1.
DOMAIN	2066	2221	156	F5/8 TYPE C 2.
SITE	237	728	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
SITE	1046	1047	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
SITE	1573	1574	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
DISULFID	167	193		PROBABLE.



【 9 - 6 】

NiceView of SWISS-PROT: P12259

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-4c>






70	80	90	100	110	120
FKRIVREYE	PFYFRKEPOS	TISGLLOFTL	YAEVGDITRV	RFKNKADNPL	SHRPGGIRVS
130	140	150	160	170	180
KLSEGGAYLD	HTFAEKHOD	AVARGRETTY	EMSESDSGP	THDPPFLTH	IYSHENLEP
190	200	210	220	230	240
DNISGLIGPL	LICKKGLTLE	GOTQKTPQK	IVLFAVDEE	SNWSQSSSL	MYTVNGVNG
250	260	270	280	290	300
THPDITVCAR	DRISNHLGM	SSGPELFSIH	ENGWLEQNH	HKVSAITLVS	ATSTAMNMT
310	320	330	340	350	360
GFENKWLIS	LTFKRLQAGH	QAYDIKNC	KTNLENKIT	REQRUMKRN	EYFIAAEVI
370	380	390	400	410	420
WYAPVTPAN	MCKYVKSQHL	DNFSNQLGR	YEVNVTQVE	DESTERTATN	ENMKDGLIC
430	440	450	460	470	480
PIIRAGVROT	LRIVFERNAS	RFYSIYPRGV	TFSPYEDVN	SSFTSGRNT	MIRAVPGFET
490	500	510	520	530	540
YTKWNLLEF	DEPTENDAC	LTRPYSDDV	THDIAAGLI	GLLICKERS	LDNRGIGRAA
550	560	570	580	590	600
DIQQQAVFAN	EDENKSWILE	DNINKENCP	DEVKEDOFET	YESHIMSTIN	GVYVESITLL
610	620	630	640	650	660
GTGFGDTQVN	HFCSVGTQNE	ILTIHFTGHS	FYTKARKET	LTLFWAGLES	VYTVWNVGT
670	680	690	700	710	720
WMLTSHNSES	RSEKRLKFR	DVKCIPDODE	DSYELFEPPE	STVMAKRNH	DRLEVEDSES
730	740	750	760	770	780
DADYDQGNRL	AAALGIRFSR	NSSLWQEEEL	ENLALALEN	GTEFVSMTD	LIUVSNYSFP
790	800	810	820	830	840
SNISEFTVNN	LAEPQKAPSH	QOATGASPL	RELIGNSVL	NSTAEHSEF	YSDPDEDPL
850	860	870	880	890	900
QPVDTGIRLL	SIGAGEFSYQ	EAHAKNGPKV	ERDQAKHRF	SMWKLIAHV	GRWLSOUTGS
910	920	930	940	950	960
PSGNRPWED	PSQDTGSPSR	MRPKDPPSD	LLILKQSNSS	KILGWPHLA	SEKSGYEIQ
970	980	990	1000	1010	1020
DTQEDTVNN	WLISFONASR	ANGESTPLAN	KPKQSGHPR	FFPVHRSKSL	VROGSGKSL
1030	1040	1050	1060	1070	1080
KKSQFLIKR	KRKKENHNA	APLSRATPR	LRSEAYNTS	ERKLSLHLL	HKSHETSLPT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
DLNQTLPMD	FGWIASLPD	NONSKNUGO	ASCPFLGUT	VPEERQVTE	PIQDPQDMS
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TSDFSRSSSS	PELSEMLEYD	RSKSFPTDI	SQNSPSSSEH	VWQTVISPOL	SOVTLSPELS
1210	1220	1230	1240	1250	1260
QTNLSPOLSH	TTLSPELIQH	NLSFALGQHP	ISPOLSHTL	SPELSHTLL	LDSLSQNLSP
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ELSQTNLSPA	LQMPILSPOL	SHTTLSLOFS	QTNLSPELH	MTLSPELSOT	NLSFALGQHP
1330	1340	1350	1360	1370	1380

【 9 - 7 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P12359

http://www.ebi.ac.uk/epi/seq-prot-search-4r

ISPDLSHTLL SLDFSTQNLK ELSTQNLKSL ALGQNFLEPD PSHTTSLDQL SQTNLSPELS
1390 1400 1410 1420 1430 1440
QTNLSPELSE HFLFADLSQT FLTPDQDQNT LSPDLQZTOL SPWFQGHSLK FOLSQVTLSP
1450 1460 1470 1480 1490 1500
DISDTLLPDL LSQISPPFOL QQIFYPSESS QSLLOEFNE SPFYPLQGMH FSPSPSTIND
1510 1520 1530 1540 1550 1560
TFLSKFNPFL VIVGLSKDQT DYKELPKKE VQSSDDQVAF IDVVFYDQPY KTVQVATNIN
1570 1580 1590 1600 1610 1620
SDSPONTAAM YLNNNNNNR NYVIAAEIS WYSEYVQRE TOIEDSDGIF EDTTKRVVF
1630 1640 1650 1660 1670 1680
KAYLOSTFTK RDPGVEYEH LGILGPIINA EVDQVIOVTF KHLASRPVEL HANGLSVEKS
1690 1700 1710 1720 1730 1740
SGKTYEEDS DNFKEKNAY QNNSYTYVN HATERSGPES PGASCRAMAY YSAVNPEDI
1750 1760 1770 1780 1790 1800
HSLGIGLLI CQKGIKAKS NHPVDMRFV LPLMTFEKE SYTKESKAS SWALTSSEKH
1810 1820 1830 1840 1850 1860
KSHETHAING NYISLEGKLN YEQWVRLHL LNTIGSDQIA VVHEGQTLI ENGNKQWGLG
1870 1880 1890 1900 1910 1920
VWFLPGSTK TLEKAKSEKF WLLNTEVGE NQRAHQTFPF LHMOROCMP MGLSTGITSU
1930 1940 1950 1960 1970 1980
SQIKASEFLG WVEPLRLAN NGGSYNNASV ELKAATASE FWIQVDHOKL VIITGIGTQS
1990 2000 2010 2020 2030 2040
AKNYLSCVIT TETVAYSSN QINWQTEGN STRVWYTHFG NSGASTIREN QFDSPVIVAY
2050 2060 2070 2080 2090 2100
TRISPTRAYN RPTLRLLEGL CEVNGGSTFL QNKGHEIENK QITASSIKES WGVQWZEPFV
2110 2120 2130 2140 2150 2160
ARLNAGGRVN ANQAKANNK QWLEIDLLK KXITAITTGG CSLSLSSEMY KSTYTHYSEQ
2170 2180 2190 2200 2210 2220
GVWEVPEYKX SMDVKIFEG WNTYKGRVN FENPEIISLF IRVPEKWNQ SITLRLLEFG
CDTY P12359 in FASTA format

[View entry in original SWISS-PROT format](#)[View entry in raw text format \(no links\)](#)[Report form top entry updates in this SWISS-PROT entry](#) Direct BLAST submission at EMBL, NCBI and DDBJ ScanProsite, ProfileScan Feature table viewer (Java) Direct BLAST submission at NCBI (RefSeq, USA) Tools: Sequence analysis tools: ProtParam, ProtScale, Compute pI/Mw, PeptideMass, DotPlot (Java) Search the SWISS-MODEL Repository

【 10 - 2 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

http://www.ebi.ac.uk/epi/seq-prot-search-4r

- chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Trp insertion segment";
EMBO J. 8:3467-3474(1989).
- [7] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.3 ANGSTROMS).
MEDLINE=9327074; PubMed=2374926; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Rudel T.J., Ravichandran N.G., Tullinsky A., Bode W., Huber R., Roitisch C., Fenton J.W. II;
"The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin";
Science 249:277-280(1990).
- [8] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.5 ANGSTROMS).
MEDLINE=9435042; PubMed=8071236; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Rudel T.J., Yin M., Padmanabhan K.P., Blamstein D.T., Carlin A.D., Correa P.E., Fenton J.W. II, Tullinsky A.;
"Crystallographic structure of human gamma-thrombin";
J. Biol. Chem. 269:22000-22006(1994).
- [9] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.3 ANGSTROMS).
MEDLINE=92157286; PubMed=9214615; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
van de Loch A., Bode W., Huber R., Jeunissen B.F., Stone S.R., Emsen C.T., Stubbs M.T.;
"The thrombin E192Q-BPTI complex reveals gross structural rearrangements: implications for the interaction with antithrombin and thrombomodulin";
EMBO J. 16:2977-2984(1997).
- [10] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.1 ANGSTROMS) OF 328-601.
MEDLINE=9916521; PubMed=10051553; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Guitto E.R., Caccia S., Rose T., Fautsch G., Waksman G., di Cera E.;
"Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1852-1857(1999).
- [11] VARIANT BARCELONA.
MEDLINE=8703739; PubMed=3771562; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Rahet M.J., Blashill A., Furie B., Furie B.C.;
"Molecular defect of prothrombin Barcelona. Substitution of cysteine for arginine at residue 273";
J. Biol. Chem. 261:15045-15048(1986).
- [12] VARIANT FRANKFURT.
MEDLINE=95313001; PubMed=7792730; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Degen S.J.F., McDowell S.A., Sparks L.M., Scheraga H.A.;
"Prothrombin Frankfurt: a dysfunctional prothrombin characterized by substitution of Glu-466 by Ala";
Thromb. Haemost. 73:203-209(1995).
- [13] VARIANTS HIMI-1 AND HIMI-2.
MEDLINE=9204342; PubMed=1421398; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Moriyama E., Saito M., Kumagashira H., Asakura H., Matsuda T., Yamaguchi K.;
"Prothrombin Himi: A compound heterozygote for two dysfunctional prothrombin molecules (Met-337->Thr and Arg-388->His)";
Blood 80:2275-2280(1992).
- [14] VARIANT PADUA-1.
MEDLINE=95169898; PubMed=7865694; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
James H.L., Kim D.J., Zhang D.Q., Giannelli A.;
"Prothrombin Padua 1: incomplete activation due to an amino acid substitution at a factor Xa cleavage site";
Blood Coagul. Fibrinolysis 5:841-844(1994).
- [15] VARIANT QUICK-1.
MEDLINE=89207504; PubMed=3242519; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Henriksen R.A., Mann K.G.;
"Identification of the primary structural defect in the dysfibrinogen Quick 1: substitution of cysteine for arginine-382";
Biochemistry 27:9160-9165(1988).
- [16] VARIANT QUICK-2.
MEDLINE=89247398; PubMed=2719946; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Henriksen R.A., Mann K.G.;
"Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dysfibrinogen Quick 2 alters primary substrate specificity";
Biochemistry 28:2078-2082(1989).
- [17] VARIANT SALAKTA.
MEDLINE=92378973; PubMed=1354985; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Miyata T., Anura R., Uneyama H., Bozeman A., Guillouf M.C., Iwanaga S.;
"Prothrombin Salakta: substitution of glutamic acid-466 by alanine reduces the fibrinogen clotting activity and the esterase activity";
Biochemistry 31:7457-7462(1992).

【 10 - 1 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

http://www.ebi.ac.uk/epi/seq-prot-search-4r

ExPASy Home page	Site Map	Search ExPASy	Contact us	SWISS-PROT
Hosted by SIB Swiss Institute of Bioinformatics				
Mirror sites: Australia Canada China Korea Taiwan				

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

[Printer-friendly view](#) [Quick BLAST search](#)[\(General\)](#) [\(Name and origin\)](#) [\(References\)](#) [\(Comments\)](#) [\(Cross-references\)](#) [\(Keywords\)](#) [\(Features\)](#) [\(Sequence\)](#) [\(Tools\)](#)

General information about the entry

Entry name	THRB_HUMAN
Primary accession number	P00734
Secondary accession numbers	None
Entered in SWISS-PROT in	Release 01, July 1986
Sequence was last modified in	Release 13, January 1990
Annotations were last modified in	Release 40, October 2000

Name and origin of the protein

Protein name	PROTHROMBIN (Precursor)
Synonyms	EC 3.4.21.6 COAGULATION FACTOR II
Gene name	F2
From	Human sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy	Opisthokonta: Metazoa: Chordata: Craniata: Vertebrata: Euteleostomi: Mammalia: Eutheria: Primates: Catarrhini: Hominidae: Homo.

References

- [1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=8807877; PubMed=2825773; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Degen S.J.F., Davis E.W.;
"Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin";
Biochemistry 26:6165-6177(1987).
- [2] SEQUENCE OF 8-622 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=83231469; PubMed=6305407; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Degen S.J.F., McDowell S.A., Davis E.W.;
"Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin";
Biochemistry 22:2087-2097(1983).
- [3] SEQUENCE OF 44-314.
MEDLINE=77193964; PubMed=266717; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Witz D.A., Heston-Emmett D., Segers W.E.;
"Amino acid sequence of human prothrombin fragments 1 and 2";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:1969-1972(1977).
- [4] SEQUENCE OF 315-622.
MEDLINE=77207112; PubMed=873923; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Bukowski R.J., Elton L., Drenth M.R., Mann K.G.;
"Primary structure of human prothrombin 2 and alpha-thrombin";
J. Biol. Chem. 252:4942-4957(1977).
- [5] PROCESSING.
MEDLINE=87008532; PubMed=3759958; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Rahet M.J., Blashill A., Furie B., Furie B.C.;
"Prothrombin fragment 1 X 2 X 3, a major product of prothrombin activation in human plasma";
J. Biol. Chem. 261:13210-13215(1986).
- [6] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (1.9 ANGSTROMS).
MEDLINE=90059942; PubMed=2583108; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Bode W., Mayr I., Baumann L., Huber R., Stone S.R., Holtgrieve J.;
"The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg"

【 10 - 3 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

http://www.ebi.ac.uk/epi/seq-prot-search-4r

- [18] VARIANT TOKUSHIMA.
MEDLINE=8718407; PubMed=3567158; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Miyata T., Morita T., Inamoto T., Kawachi S., Shirakami A., Iwanaga S.;
"Prothrombin Tokushima, a replacement of arginine-118 by tryptophan that impairs the fibrinogen clotting activity of derived thrombin Tokushima";
Biochemistry 26:1117-1122(1987).
- [19] VARIANT TOKUSHIMA.
MEDLINE=87101511; PubMed=3801671; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Inamoto T., Shirakami A., Kawachi S., Shigekawa T., Saito S., Miyoshi K., Morita T., Iwanaga S.;
"Prothrombin Tokushima: characterization of dysfunctional thrombin derived from a variant of human prothrombin";
Blood 69:565-569(1987).
- [20] VARIANT TOKUSHIMA.
MEDLINE=92156695; PubMed=1149838; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Iwanaga H., Yoshimoto K., Shigekawa T., Shirakami A., Saito S., Iwakura N.;
"Detection of a single base substitution of the gene for prothrombin Tokushima. The application of PCR-SSCP for the genetic and molecular analysis of dysprothrombinemia";
Int. J. Hematol. 55:93-100(1992).
- [21] VARIANT TYPE-3.
MEDLINE=83204687; PubMed=6405779; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
Boyd P.G., Shaw D.C.;
"Determination of the amino acid substitution in human prothrombin type 3 (157 Glu leads to Lys) and the localization of a third thrombin cleavage site";
Br. J. Haematol. 54:245-254(1983).

Comments

- FUNCTION:** THROMBIN, WHICH CLEAVES BONDS AFTER ARG & LYS, CONVERTS FIBRINOGEN TO FIBRIN AND ACTIVATES FACTORS V, VII, VIII, XIII, AND, IN COMPLEX WITH THROMBOMODULIN, PROTEIN C.
- SUBCELLULAR LOCATION:** EXTRACELLULAR.
- TISSUE SPECIFICITY:** SYNTHESIZED IN THE LIVER; FOUND IN PLASMA.
- PTM:** THE GAMMA-CARBOXYGLUTAMYL RESIDUES, WHICH BIND CALCIUM IONS, RESULT FROM THE CARBOXYLATION OF GLUTAMYL RESIDUES BY A MICROSOMAL ENZYME, THE VITAMIN K-DEPENDENT CARBOXYLASE. THE MODIFIED RESIDUES ARE NECESSARY FOR THE CA-DEPENDENT INTERACTION WITH A NEGATIVELY CHARGED PHOSPHOLIPID SURFACE, WHICH IS ESSENTIAL FOR THE CONVERSION OF PROTHROMBIN TO THROMBIN.
- DISEASE DEFECTS IN F2 ARE THE CAUSE OF VARIOUS FORMS OF DYSPROTHROMBINEMIA.**
- MISCELLANEOUS:** PROTHROMBIN IS ACTIVATED ON THE SURFACE OF A PHOSPHOLIPID MEMBRANE THAT BINDS THE AMINO END OF PROTHROMBIN & FACTORS VA & XA IN CA-DEPENDENT INTERACTIONS. FACTOR XA REMOVES THE ACTIVATION PEPTIDE & CLEAVES THE REMAINING PART INTO LIGHT & HEAVY CHAINS. THE ACTIVATION PROCESS STARTS SLOWLY BECAUSE FACTOR V ITSELF HAS TO BE ACTIVATED BY THE INITIAL, SMALL AMOUNTS OF THROMBIN.
- MISCELLANEOUS:** IT IS NOT KNOWN WHETHER 1 OR 2 SMALLER ACTIVATION PEPTIDES, WITH ADDITIONAL CLEAVAGE AFTER 314-ARG, ARE RELEASED IN NATURAL BLOOD CLOTTING.
- MISCELLANEOUS:** THROMBIN CAN ITSELF CLEAVE THE AMINO TERMINAL FRAGMENT (FRAGMENT 1) OF THE PROTHROMBIN, PRIOR TO ITS ACTIVATION BY FACTOR XA.
- MISCELLANEOUS:** THE CLEAVAGE AFTER R-198, OBSERVED IN VITRO, DOES NOT OCCUR IN PLASMA.
- SIMILARITY:** CONTAINS 2 KRINGLE DOMAINS.
- SIMILARITY:** BELONGS TO PEPTIDASE FAMILY S1; ALSO KNOWN AS THE TRYPSIN FAMILY.

Copyright

This SWISS-PROT entry is copyright. It is produced through a collaboration between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL outstation - the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its use by non-profit institutions as long as its content is in no way modified and this statement is not removed. Usage by and for commercial entities requires a license agreement (see <http://www.ebi.ac.uk/epi/seq-prot-search-4r>) or send an email to license@ebi.ac.uk

Cross-references

EMBL	M17262; AAC63054.1; - [EMBL] / GenBank / DDBJ [CoDingSequence]
	V00595; CAA23842.1; - [EMBL] / GenBank / DDBJ [CoDingSequence]

【 10 - 4 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

PIR
A00914; TBHU.
A29351; A29351.
1DWB; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1DWC; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1DWD; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1DWE; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
3HAT; 27-FEB-95. [ExPASy / RCSB]
1HGT; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
2HGT; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1ABH; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1ABI; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1AD8; 12-NOV-97. [ExPASy / RCSB]
1AE8; 03-DEC-97. [ExPASy / RCSB]
1AFE; 03-DEC-97. [ExPASy / RCSB]
1AHT; 17-MAR-96. [ExPASy / RCSB]
1AIB; 15-OCT-97. [ExPASy / RCSB]
1ADX; 15-OCT-97. [ExPASy / RCSB]
1BMM; 07-DEC-96. [ExPASy / RCSB]
1BMN; 07-DEC-96. [ExPASy / RCSB]
1DIT; 10-JUN-96. [ExPASy / RCSB]
1FPC; 27-FEB-95. [ExPASy / RCSB]
1HAG; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB]
1HAH; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB]
1HAI; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB]
1HDT; 15-OCT-95. [ExPASy / RCSB]
1HAO; 03-APR-96. [ExPASy / RCSB]
1HAP; 03-APR-96. [ExPASy / RCSB]
1HBT; 10-JUL-95. [ExPASy / RCSB]
1HLT; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB]
2HNT; 30-NOV-94. [ExPASy / RCSB]
1HUT; 22-JUN-94. [ExPASy / RCSB]
3HTC; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
4HTC; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1HCE; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1HCF; 27-JAN-97. [ExPASy / RCSB]
1HHS; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1HHT; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1LHC; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1LHD; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1LHE; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1LHF; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1LHG; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1NRN; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB]
1NRO; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB]
1NRP; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB]
1NRQ; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB]
1NRR; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB]
1NRS; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB]
1PPB; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1THR; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1THS; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1TMB; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB]
1TMT; 30-SEP-94. [ExPASy / RCSB]
1TMU; 30-SEP-94. [ExPASy / RCSB]
1TOM; 12-MAR-97. [ExPASy / RCSB]
1UMA; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB]
1UVS; 19-NOV-97. [ExPASy / RCSB]
1UVT; 19-NOV-97. [ExPASy / RCSB]
1UVU; 19-NOV-97. [ExPASy / RCSB]
1BTH; 24-DEC-97. [ExPASy / RCSB]

PDB

【 10 - 6 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

CHAIN 44 622 579 PROTHROMBIN.
PEPTIDE 44 158 155 ACTIVATION PEPTIDE (FRAGMENT
PEPTIDE 189 327 129 ACTIVATION PEPTIDE (FRAGMENT
CHAIN 328 363 36 THROMBIN LIGHT CHAIN (A).
CHAIN 364 622 259 THROMBIN HEAVY CHAIN (B).
DOMAIN 108 186 79 KRINGLE 1.
DOMAIN 213 291 79 KRINGLE 2.
DOMAIN 364 622 259 SERINE PROTEASE.
SITE 188 192 2 CLEAVAGE (BY THROMBIN).
SITE 327 328 2 CLEAVAGE (BY FACTOR XA).
SITE 363 364 2 CLEAVAGE (BY FACTOR XA).
ACT_SITE 405 406 CHARGE RELAY SYSTEM.
ACT_SITE 452 452 CHARGE RELAY SYSTEM.
ACT_SITE 568 568 CHARGE RELAY SYSTEM.
MOD_RES 48 48 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 50 50 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 57 57 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 59 59 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 62 62 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 62 62 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 68 68 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 69 69 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 72 72 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES 75 75 GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
CARBOHYD 121 121 N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD 143 143 N-LINKED (GLCNAC...)
CARBOHYD 416 416 N-LINKED (GLCNAC...)
DISULFID 60 65
DISULFID 90 103
DISULFID 108 186
DISULFID 129 169
DISULFID 157 181
DISULFID 213 291
DISULFID 234 274
DISULFID 262 286
DISULFID 336 482
DISULFID 392 407
DISULFID 536 550
DISULFID 564 594
VARIANT 209 209
VARIANT 214 214
VARIANT 214 214
VARIANT 380 380
VARIANT 425 425
VARIANT 432 432
VARIANT 461 461
VARIANT 509 509
VARIANT 601 601
CONFLICT 119 119

【 10 - 5 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

1AY6; 18-MAR-98. [ExPASy / RCSB]
1AAW; 29-APR-98. [ExPASy / RCSB]
1BSG; 27-MAY-98. [ExPASy / RCSB]
1TBZ; 27-MAY-98. [ExPASy / RCSB]
1A46; 27-MAY-98. [ExPASy / RCSB]
1A61; 17-JUN-98. [ExPASy / RCSB]
1AC2; 01-JUL-98. [ExPASy / RCSB]
1A3B; 03-JUN-98. [ExPASy / RCSB]
1A3E; 03-JUN-98. [ExPASy / RCSB]
1ASG; 27-MAY-98. [ExPASy / RCSB]
1BHX; 06-JAN-99. [ExPASy / RCSB]
1B7X; 02-MAR-99. [ExPASy / RCSB]
1AWF; 18-NOV-98. [ExPASy / RCSB]
1AWH; 18-NOV-98. [ExPASy / RCSB]
1THP; 07-MAR-99. [ExPASy / RCSB]
2THP; 07-MAR-99. [ExPASy / RCSB]
1VR1; 16-DEC-98. [ExPASy / RCSB]
7KME; 25-MAR-99. [ExPASy / RCSB]
8KME; 24-MAR-99. [ExPASy / RCSB]
1BA8; 27-APR-99. [ExPASy / RCSB]
1BBO; 27-APR-99. [ExPASy / RCSB]
MEROPS S01.217-.
SWISS-2DPAGE P00734; HUMAN.
MM 176930 [NCBI / EBI].
GeneCards F2.
InterPro IPR001314; Chymotrypsin.
IPR002383; GLA head.
IPR000201; Kringle.
IPR001254; Trypsin.
IPR000204; VitK_dep_GLA.
Graphical view of domain structure.
Pfam PF00594; glt.L.
PF00511; kringle_2.
PF00089; trypsin_1.
PR00001; GLABLOOD.
PR00018; KRINGLE.
PR00722; CHYMOTRYPSIN.
SMART SM00069; GLA.L.
SM00130; KR_2.
SM00026; Tryp_Sp_1.
PS00011; GLU CARBOXYLATION; 1.
PS00021; KRINGLE_1; 2.
PS00070; KRINGLE_2; 2.
PS00740; TRYPSIN_DOM; 1.
PS00134; TRYPSIN_HIS_1.
PS00135; TRYPSIN_SER_1.
ProDom [Domain structure / List of seq. sharing at least 1 domain].
BLOCKS P00734.
DOMO P00734.
ProtaMap P00734.
PRESAGE P00734.
DIP P00734.

Keywords

Blood coagulating; Plasma; Calcium-binding; Glycoprotein; Duplication; Vitamin K; Zymogen;
Gamma-carboxyglutamic acid; Acute phase; Liver; Hydrolytic; Serine protease; Kringle; Signal;
3D-structure; Disease mutation.

Features

Key	From	To	Length	Description
SIGNAL	1	24	24	POTENTIAL.
PROPEP	25	43	19	

【 10 - 7 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

CONFLICT 121 121 N -> S (IN REF. 3).
CONFLICT 164 164 T -> N (IN REF. 2).
CONFLICT 164 164 T -> I (IN REF. 3).
CONFLICT 176 176 V -> A (IN REF. 3).
CONFLICT 183 182 I -> T (IN REF. 3).
CONFLICT 184 195 NM -> MV (IN REF. 2).
CONFLICT 308 308 D -> DEE (IN REF. 3).
CONFLICT 335 335 D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT 349 349 D -> N (IN REF. 2).
CONFLICT 369 369 D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT 398 398 D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT 414 414 D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT 485 485 D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT 494 494 Q -> G (IN REF. 4).
CONFLICT 504 504 W -> Y (IN REF. 4).
CONFLICT 509 509 E -> S (IN REF. 4).
CONFLICT 511 511 W -> V (IN REF. 4).
CONFLICT 514 514 N -> D (IN REF. 4).
CONFLICT 529 530 EF -> AL (IN REF. 4).
CONFLICT 532 532 E -> Q (IN REF. 4).
TURN 336 337 2
TURN 340 346 7
TURN 350 351 2
HELIX 352 356 5
TURN 357 358 2
STRAND 365 365 1
STRAND 369 369 2
TURN 372 373 2
TURN 376 377 2
STRAND 378 382 6
TURN 384 387 4
STRAND 388 395 8
STRAND 400 403 4
HELIX 405 407 3
TURN 408 408 1
STRAND 409 410 2
HELIX 411 413 3
TURN 414 414 1
STRAND 415 416 2
HELIX 419 421 3
STRAND 422 426 5
TURN 436 438 3
STRAND 440 443 10
TURN 451 452 2
STRAND 454 454 2
TURN 455 458 4
STRAND 460 462 1
STRAND 464 468 5
STRAND 475 475 1
TURN 476 477 2
STRAND 478 478 1
STRAND 482 482 1
HELIX 486 492 7
TURN 495 496 2
STRAND 498 503 6
TURN 510 511 2
STRAND 524 530 7
HELIX 532 538 6
TURN 539 539 1
TURN 546 547 2

Feature
alignerFeature
table
viewer

【 10 - 8 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de

STRAND 548 551 4
TURN 555 557 3
STRAND 562 562 1
TURN 565 566 2
TURN 568 569 2
STRAND 571 575 5
TURN 577 579 3
STRAND 582 590 9
TURN 587 598 2
STRAND 601 603 5
HELIX 606 617 12
TURN 618 618 1

Sequence information

Length: 622 AA [This is the length of the unprocessed precursor]
Molecular weight: 70036 Da [This is the MW of the unprocessed precursor]
CRC64: 8A25E1DA88208FCF [This is a checksum on the sequence]

10 20 30 40 50 60
HARVGLQILP GCLALAAALCS LVHSHVFLA PQQRSLQLR VRRAHTFLER VRKMLEREC
70 80 90 100 110 120
VEETCSYEEA FEALSSSTAT DVFKAYTAC ETARTPAKEL AACLEGKAC GLQNYRGRV
130 140 150 160 170 180
NITRSGIECO LWRBYRHKP EINSTTHFGA DLQENFCRNP DSSTTGFWCY TDFPTVAPR
190 200 210 220 230 240
CSIPVCGQGO VTVAMTFRSE GSWNLAPPL EQCVFDRSQ YQRLAVTTA GLPLCWLASA
250 260 270 280 290 300
QAKLSKQD FNSAQVLEH FCRWPDGEE GWCTVAGRP GQFVYGLNV CEHAEVETG
310 320 330 340 350 360
DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFNPRITG SGAECDLRP LFERKSLER KIERLLSEYI
370 380 390 400 410 420
DGRIVGSDA EIKGSPWQVH LFRUSQELL CGASLIDRM VLTARCLLY FPDWNTEDN
430 440 450 460 470 480
DLVIRGKHS KTRYRNIEK ISMLEKIYH PRYNWRKLD RDIALKLEK PVAFSDYINP
490 500 510 520 530 540
VCLPQRETA SLLQAGYKGR VTQGNLKET WTANVSGQG SVLQVNLPI VERPVCKDET
550 560 570 580 590 600
RRTITMNEC AGYRFDGKR GDACGDSGG PFVNRSPFN RVYQMGIVSW GEGCDRDKY
610 620
GPTTHVERLA RWIQEVLDQF GE

P00734 in FASTA format

View entry in original SWISS-PROT format

View entry in new text format (no links)

Report form for errors/updates in this SWISS-PROT entry

【 11 - 1 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de

ExPASy Home page	Site Map	Search ExPASy	Contact us	SWISS-PROT
Hosted by SIB Switzerland Mirror sites: Australia Canada China Korea Taiwan				

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

Printer-friendly view Quick BlastP search

[General] [Name and origin] [References] [Comments] [Cross-references] [Keywords] [Features] [Sequence] [Tools]

General information about the entry

Entry name FA12_HUMAN
Primary accession number P00748
Secondary accession number P78339
Entered in SWISS-PROT in Release 01, July 1986
Sequence was last modified in Release 12, October 1989
Annotations were last modified in Release 40, October 2000

Name and origin of the protein

Protein name COAGULATION FACTOR XII (Precursor)
EC 3.4.21.38
HAGEMAN FACTOR
HAF
Synonyms
Gene name F12
From Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy Eukaryota; Metazoa; Chordata; Carnivora; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Homnidae; Homo

References

- DISEASE: DEFECTS IN F12 DO NOT CAUSE ANY CLINICAL SYMPTOMS. THE SOLE EFFECT IS THAT WHOLE-BLOOD CLOTTING TIME IS PROLONGED.
- MISCELLANEOUS: FACTOR XII, PREKALLIKREIN, AND HMW KINNOGEN FORM A COMPLEX BOUND TO AN ANIONIC SURFACE. PREKALLIKREIN IS CLEAVED BY FACTOR XII TO FORM KALLIKREIN, WHICH THEN CLEAVES FACTOR XII FIRST TO ALPHA-FACTOR XIIA AND THEN TO BETA-FACTOR XIIA. ALPHA-FACTOR XIIA ACTIVATES FACTOR XI TO FACTOR XIA.
- SIMILARITY: CONTAINS 2 EGF-LIKE DOMAINS.
- SIMILARITY: CONTAINS 1 FIBRONECTIN TYPE I DOMAIN.
- SIMILARITY: CONTAINS 1 FIBRONECTIN TYPE II DOMAIN.
- SIMILARITY: CONTAINS 1 KRINGLE DOMAIN.
- SIMILARITY: BELONGS TO PEPTIDASE FAMILY S1; ALSO KNOWN AS THE TRYPSIN FAMILY.

Copyright

This SWISS-PROT entry is copyright. It is produced through a collaboration between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL outstation - the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its use by non-profit institutions as long as its content is in no way modified and this statement is not removed. Usage by and for commercial entities requires a license agreement (See <http://www.ebi.ac.uk/ebis/ehome/> or send an email to license@ebi.ac.uk).

Cross-references

EMBL	M11315: AAA7022.1; -	[EMBL] [GenBank] [DBJ] [CoDiNeSequence]
	M11723: AAAS1986.1; -	[EMBL] [GenBank] [DBJ] [CoDiNeSequence]
	M17466: AAB59490.1; -	[EMBL] [GenBank] [DBJ] [CoDiNeSequence]
	M17464: AAB59490.1; JOINED	[EMBL] [GenBank] [DBJ] [CoDiNeSequence]
PIR	A29411: KFHU12	
	HSSP	P00745: IDPO [HSSP ENTRY / DOB]
	MEROPS	S01.211; -
MIM	234000	[NCBI] [EBI]
	GeneCards	F12
InterPro	IPR001314: Chromatopsin	
	IPR000561: EGF-like	
	IPR000562: FN Type II	
	IPR000001: Kringle	
Pfam	PF000134: Torsin	
	PF000403: Fibronectin type I	
	PF000008: EGF_2	
	PF000209: fn1.1	
PRINTS	PR000134: Torsin	
	PR000403: Fibronectin type I	
	PR000008: EGF_2	
	PR000209: fn1.1	
ProDom	PD000095: -1	
	PD000095: -1	
	PD000095: -1	
	PD000095: -1	
SMART	SM00136: KR_1	
	SM000020: FN2_1	
	SM00136: KR_1	
	SM000020: FN2_1	
PROSITE	PS00022: EGF_1_2	
	PS00022: EGF_1_2	
	PS00022: FIBRONECTIN_1_1	
	PS00022: FIBRONECTIN_2_1	
BLOCKS	PS00022: KRINGLE_1_1	
	PS00022: KRINGLE_2_1	
	PS00022: TRYPsin_DOM_1	
	PS00022: TRYPsin_HIS_1	

【 11 - 2 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de

- SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=88007593; PubMed=288763; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Cool D.E., McGillivray R.T.A.
"Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. Intron/exon gene organization and analysis of the 5'-flanking region.";
J. Biol. Chem. 262:13662-13673(1987).
- SEQUENCE OF 4-613 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=86176794; PubMed=3754331; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Tajiri M., Giarrelis P., Gudo S., Gallelli P., Fantoni A., Goffe R.
"cDNA sequence coding for human coagulation factor XII (Hageman).";
Nucleic Acids Res. 14:3146-3146(1986).
- SEQUENCE OF 14-613 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=86033830; PubMed=3877053; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Cool D.E., Edgell C.J.S., Louis G.N., Zoller M.J., Boyce C.D., McGillivray R.T.A.
"Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa.";
J. Biol. Chem. 260:13666-13676(1985).
- SEQUENCE OF 146-613 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=86216049; PubMed=3011063; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Que B.G., Davis E.W.
"Characterization of a cDNA coding for human factor XII (Hageman factor).";
Biochemistry 25:1525-1528(1986).
- SEQUENCE OF 20-379.
MEDLINE=85182674; PubMed=3886643; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
McMullen B.A., Fujikawa K.
"Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor).";
J. Biol. Chem. 260:5328-5331(1985).
- SEQUENCE OF 154-362 AND 373-613.
MEDLINE=83291041; PubMed=6604055; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Fujikawa K., McMullen B.A.
"Amino acid sequence of human beta-factor XIIa.";
J. Biol. Chem. 258:10924-10932(1983).
- SEQUENCE OF 261-612 FROM NUCLEIC ACID.
TISSUE=Blood;
MEDLINE=96133302; PubMed=8428215; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Schlosser M., Hoffert H., Bantz U., Lutz G., Lammle H., Engel W.
"The novel acceptor splice site mutation 11396(C>A) in the factor XII gene causes a truncated transcript in cross-reacting material negative patients.";
Hum. Mol. Genet. 4:1235-1237(1995).
- VARIANT WASHINGTON DC.
MEDLINE=90046788; PubMed=2510163; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Miyata T., Kawabata S., Iwanaga S., Takahashi I., Aizawa R., Saito H.
"Coagulation factor XII (Hageman factor) Washington D.C.: inactive factor XIIa results from Cys-571->Ser substitution.";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:8319-8322(1989).
- VARIANT LOCARNO.
MEDLINE=94325559; PubMed=8049433; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Hovington J.K., Schaller J., Sinner H., Willemin W.A., Furlan M., Lammle H.
"Coagulation factor XII Locarno: the functional defect is caused by the amino acid substitution Arg-353->Pro leading to loss of a kallikrein cleavage site.";
Blood 84:1173-1181(1994).
- CARBOHYDRATE-LINKAGE SITE THR-109.
MEDLINE=92184750; PubMed=1544894; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
Harris R.J., Line V.T., Spelman M.W.
"O-linked fucose is present in the first epidermal growth factor domain of factor XII but not protein C.";
J. Biol. Chem. 267:5102-5107(1992).

Comments

- FUNCTION: FACTOR XII IS A SERUM GLYCOPROTEIN THAT PARTICIPATES IN THE INITIATION OF BLOOD COAGULATION, FIBRINOLYSIS, AND THE GENERATION OF BRADYKININ AND ANGIOTENSIN.
- CATALYTIC ACTIVITY: CLEAVES SELECTIVELY ARG-4-ILE BONDS AND ACTIVATES COAGULATION FACTORS VII AND XI.
- PTM: O- AND N-GLYCOSYLATED.

【 11 - 3 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de

【 11 - 4 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-de

LUUUMU P00748
 ProtoMap P00748
 PRESAGE P00748
 DIP P00748
 SWISS-2DPAGE GET REGION ON 2D PAGE

Keywords

Glycoprotein; Blood coagulation; Plasma; Kringle; Serine protease; Hydrolase; Fibrinolysis;
 Signal: EGF-like domain; Repeat; Zymogen; Disease mutation.

Features

Key	From	To	Length	Description
SIGNAL	1	19	19	
CHAIN	20	372	353	ALPHA-FACTOR XIIA HEAVY CHAIN.
CHAIN	373	615	243	ALPHA-FACTOR XIIA LIGHT CHAIN.
CHAIN	254	362	9	BETA-FACTOR XIIA PART 1.
CHAIN	373	615	243	BETA-FACTOR XIIA PART 2.
DOMAIN	47	88	42	FIBRONECTIN TYPE-II.
DOMAIN	94	131	38	EGF-LIKE 1.
DOMAIN	133	173	41	FIBRONECTIN TYPE-I.
DOMAIN	174	210	37	EGF-LIKE 2.
DOMAIN	217	255	39	KRINGLE.
DOMAIN	256	349	94	PRO-RICH.
DOMAIN	373	615	243	SERINE PROTEASE.
CARBOHYD	105	109	5	O-LINKED (POC).
CARBOHYD	249	249	1	N-LINKED (GLCNAc...).
CARBOHYD	259	259	1	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBOHYD	305	305	1	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBOHYD	308	308	1	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBOHYD	328	328	1	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBOHYD	329	329	1	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBOHYD	337	337	1	O-LINKED (POTENTIAL).
ACT_SITE	412	412	1	CHANGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	461	461	1	CHANGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	563	563	1	CHANGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
DISULFID	98	110	13	BY SIMILARITY.
DISULFID	104	119	16	BY SIMILARITY.
DISULFID	121	130	10	BY SIMILARITY.
DISULFID	135	163	29	BY SIMILARITY.
DISULFID	161	170	10	BY SIMILARITY.
DISULFID	178	189	12	BY SIMILARITY.
DISULFID	183	198	16	BY SIMILARITY.
DISULFID	200	209	10	BY SIMILARITY.
DISULFID	217	255	39	BY SIMILARITY.
DISULFID	238	277	40	BY SIMILARITY.
DISULFID	266	290	25	BY SIMILARITY.
DISULFID	335	486	151	BY SIMILARITY.
DISULFID	387	413	27	BY SIMILARITY.
DISULFID	405	475	71	BY SIMILARITY.
DISULFID	426	439	14	BY SIMILARITY.
DISULFID	500	569	70	BY SIMILARITY.
DISULFID	532	548	17	BY SIMILARITY.
DISULFID	558	590	33	BY SIMILARITY.
VARIANT	272	372	101	R -> P (IN LOCARNO; INACTIVE). /FTIG-VAR_006623.
VARIANT	560	590	31	C -> S (IN WASHINGTON DC; INACTIVE). /FTIG-VAR_006624.
CONFLICT	333	333	1	P -> S (IN REF. 2).



【 12 - 1 】

NiceProt View of SWISS-PROT: Q04756

http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-de

ExPASy Home page	Site Map	Search ExPASy	Contact us	SWISS-PROT
Hosted by SIB Switzerland Mirror sites: Australia Canada China Korea Taiwan				

NiceProt View of SWISS-PROT: Q04756

Printer-friendly view Quick BLAST search

[General] [Name and origin] [References] [Comments] [Cross-references] [Keywords] [Features]
 [Sequence] [Tools]

General information about the entry

Entry name	HGFA_HUMAN
Primary accession number	Q04756
Secondary accession number	Q14726
Entered in SWISS-PROT in	Release 29, June 1994
Sequence was last modified in	Release 29, June 1994
Annotations were last modified in	Release 40, October 2000

Name and origin of the protein

Protein name	HEPATOCTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR [Precursor]
Synonyms	EC 3.4.21. HGF ACTIVATOR HGFA
Gene name	HGFAC
From	Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominoidea; Homo

References

- [1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID, AND PARTIAL SEQUENCE.
 TISSUE=Liver, and Serum;
 MEDLINE=93252878; PubMed=7683665; [NCBI] [ExPASy] [EBI] [Israel, Japan]
 Miyazawa K, Shimomura J, Shimura A, Kondo J, Morimura Y, Kikuchi N.
 "Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII".
 J Biol Chem. 268:10024-10028 (1993).
- [2] SEQUENCE OF 40-655 FROM NUCLEIC ACID.
 Zhao S, Ohtsuki G.
 Submitted (FEB-1996) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.

Comments

- FUNCTION:** ACTIVATES HEPATOCTE GROWTH FACTOR (HGF) BY CONVERTING IT FROM A SINGLE CHAIN TO A HETERODIMERIC FORM.
- SUBUNIT:** DIMER OF A SHORT CHAIN AND A LONG CHAIN LINKED BY A DISULFIDE BOND.
- SUBCELLULAR LOCATION:** SECRETED AS AN INACTIVE SINGLE-CHAIN PRECURSOR AND IS THEN ACTIVATED AS A HETERODIMERIC FORM.
- TISSUE SPECIFICITY:** LIVER.
- SIMILARITY:** CONTAINS 2 EGF-LIKE DOMAINS.
- SIMILARITY:** CONTAINS 1 FIBRONECTIN TYPE I DOMAIN.
- SIMILARITY:** CONTAINS 1 FIBRONECTIN TYPE II DOMAIN.
- SIMILARITY:** CONTAINS 1 KRINGLE DOMAIN.
- SIMILARITY:** BELONGS TO PEPTIDASE FAMILY S1; ALSO KNOWN AS THE TRYPSIN FAMILY.
- CAUTION:** IT IS UNCERTAIN WHETHER MET-1 IS THE INITIATOR.

Copyright

【 11 - 5 】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-de

UNFLICT 1/1 1/1 A -> G (IN REF. 2).
 CONFLICT 388 388 G -> R (IN REF. 2).

Sequence information

Length: 615 AA [This is the Molecular weight: 67818 Da
 length of the unprocessed precursor] [This is the MW of the unprocessed precursor]
 CRC64: 1EB3D3EAA7BAAE9A [This is a checksum on the sequence]

10	20	30	40	50	60
MRALLLGLF LVSLESLSI	PFWEAPKRN	YKAEHTVVL	VTGPECFRP	FQYHRLTH	
70	80	90	100	110	120
CTKGRGPGFO	FWCATTNFO	QQRNGCYLC	FRFVEDHCR	HSPOKGGTC	VNPSGPHCL
130	140	150	160	170	180
CPQHLTGNHC	QKRCYEPOL	LAFFHKNEM	YRTEQAAYAR	CQKGFDAHC	QELASOACTP
190	200	210	220	230	240
NPCILNGSLC	EVGGRHLCN	PVGTYGFCD	VOTRASCYD	RGLSVFGLAR	TTLGAPCPQ
250	260	270	280	290	300
WASATYRNV	TAEQAUNWGL	GGHAFGRNP	NDIRPWFVL	NRDLRWYIC	DLAQCTPTO
310	320	330	340	350	360
AAPFTVPSFR	LHVPLMAPQ	APFKPQPTT	TFPQSTFGA	LPKARQFES	LTRNGPLSC
370	380	390	400	410	420
QRLKSLSH	TRVVGVLAL	RGHPTIAL	YNGHSCAGS	LIAPCVLTA	ANGLDQFAP
430	440	450	460	470	480
EDLVVLGGE	RNNHSCPCQ	TLAVRSYAL	DAFSPVSYQ	DIALRLGEL	ADGSCALSP
490	500	510	520	530	540
YVQVFLPSG	AARSETTLC	QVAGWGHQE	GAETASFLQ	EAQVFTLSL	KCSAPDVVGS
550	560	570	580	590	600
SILFGMLCAG	FLGGTDACQ	GDSGGPLICE	DGAERKRLT	GGIISWGGC	GDRNKPVTY
610					
DVAYTLAWIR	ENTVS				

P00748 in FASTA format

View entry in original SWISS-PROT format
 View entry in raw-text format (no links)
 Report form for errors updates in this SWISS-PROT entry

Direct BLAST submission at
 EMBL/CH and CSRS
 (Switzerland)

Direct BLAST submission at NCBI
 (Bethesda, USA)

ScanProsite, ProfileScan

Sequence analysis tools: ProtParam,
 ProSita, Compute pI/Mw, PostScript,
 Dotlet (Java)

Feature table viewer (Java)

Search the SWISS-MODEL Repository

ExPASy Home page	Site Map	Search ExPASy	Contact us	SWISS-PROT
Hosted by SIB Switzerland Mirror sites: Australia Canada China Korea Taiwan				

【 12 - 2 】

NiceProt View of SWISS-PROT: Q04756

http://www.expasy.ch/cgi-bin/spot-search-de

This SWISS-PROT entry is copyright. It is produced through a collaboration between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL, courtesy of the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its use by non-profit institutions as long as its contents is in no way modified and this statement is not removed. Usage by and for commercial entities requires a license agreement (See <http://www.ebi.ac.uk/ebis/home/>) or send an email to license@ebi.ac.uk

Cross-references

EMBL	D14012; BAA03113.1; - [EMBL] [GenBank] [DBJ] [CoDineSequence] Z69923; CAA93803.1; - [EMBL] [GenBank] [DBJ] [CoDineSequence]
PIR	A46688; A46688
MIM	604552 [NCBI] [EBI]
GeneCards	HGFAC
HSP	P08763; IDPO; [HSP ENTRY] [PDQ]
METOPS	S01228.2
InterPro	IPR001114: Chymotrypsin. IPR005611: EGF-like IPR000742: EGF_2 IPR005622: FN_Type_II IPR000001: Kringle IPR01234: Trypsin IPR000083: Fibronectin_Type_1 Graphical view of domain structure PF00008: EGF_2 PF00039: fn1_1 PF00040: fn2_1 PF00051: Kringle_1 PF00089: trypsin_1 PR00013: FN1YPEII PR00018: KRINGLE PR00772: CHYMOTRYPSIN PD000995: -1
PRINTS	PR00013: FN1YPEII PR00018: KRINGLE PR00772: CHYMOTRYPSIN PD000995: -1
ProDom	[Domain structure / List of seq. sharing at least 1 domain]. SM00181: EGF_2 SM00058: FN1_1 SM00059: FN2_1 SM00130: KR_1 SM00020: Trp_Sp_1 PS00022: EGF_1-2 PS01186: EGF_2-1 PS01233: FIBRONECTIN_1-1 PS00023: FIBRONECTIN_2-1 PS00021: KRINGLE_1-1 PS00070: KRINGLE_2-1 PS00240: TRYPSIN_DOM1 PS00134: TRYPSIN_HIS_1 PS00133: TRYPSIN_SER_1
SMART	SM00130: KR_1 SM00020: Trp_Sp_1 PS00022: EGF_1-2 PS01186: EGF_2-1 PS01233: FIBRONECTIN_1-1 PS00023: FIBRONECTIN_2-1 PS00021: KRINGLE_1-1 PS00070: KRINGLE_2-1 PS00240: TRYPSIN_DOM1 PS00134: TRYPSIN_HIS_1 PS00133: TRYPSIN_SER_1
BLOCKS	Q04756
DOMO	Q04756
ProMap	Q04756
PRESAGE	Q04756
DIP	Q04756
SWISS-2DPAGE	GET REGION ON 2D PAGE

Keywords

Hydrolase; Glycoprotein; Plasma; Serine protease; Kringle; Signal; EGF-like domain; Repeat; Zymogen

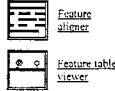
Features

【 1 2 - 3 】

Nucleotide View of SWISS-PROT: Q04756

http://www.expasy.ch/cgi-bin/seq-fetch-ec

Key	From	To	Length	Description
SIGNAL	1	30		
PROPEP	31	342		CLEAVED IN ACTIVE FORM.
CHAIN	373	407	35	HEPATOCTYTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR SHORT CHAIN.
CHAIN	408	655	248	HEPATOCTYTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR LONG CHAIN.
DOMAIN	108	148	41	FIBRONECTIN TYPE-1.
DOMAIN	160	198	39	EGF-LIKE 1.
DOMAIN	200	240	41	FIBRONECTIN TYPE-1.
DOMAIN	241	279	39	EGF-LIKE 2.
DOMAIN	280	367	88	KRINGLE.
DOMAIN	408	655	248	SERINE PROTEASE.
ACT_SITE	447	447		CHANGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	497	497		CHANGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	598	598		CHANGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
DISULFID	108	133		BY SIMILARITY.
DISULFID	134	134		BY SIMILARITY.
DISULFID	164	171		BY SIMILARITY.
DISULFID	189	186		BY SIMILARITY.
DISULFID	198	197		BY SIMILARITY.
DISULFID	202	230		BY SIMILARITY.
DISULFID	238	237		BY SIMILARITY.
DISULFID	245	256		BY SIMILARITY.
DISULFID	250	267		BY SIMILARITY.
DISULFID	268	278		BY SIMILARITY.
DISULFID	288	367		BY SIMILARITY.
DISULFID	307	362		BY SIMILARITY.
DISULFID	318	362		BY SIMILARITY.
DISULFID	384	521		INTRACHAIN (BY SIMILARITY).
DISULFID	432	448		BY SIMILARITY.
DISULFID	440	510		BY SIMILARITY.
DISULFID	535	604		BY SIMILARITY.
DISULFID	567	583		BY SIMILARITY.
DISULFID	594	622		BY SIMILARITY.
CARBOHYD	48	48		N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBOHYD	290	220		N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBOHYD	466	468		N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBOHYD	492	492		N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBOHYD	546	546		N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CONFLICT	644	644		R -> Q (IN REF. 2).



Sequence information

Length: 655 AA [This is the length of the unprocessed precursor]
 Molecular weight: 70681 Da [This is the MW of the unprocessed precursor]
 CRC64: 2CF72F1E1B862ED7 [This is a checksum on the sequence]

【 1 2 - 4 】

Nucleotide View of SWISS-PROT: Q04756

http://www.expasy.ch/cgi-bin/seq-fetch-ec

10	20	30	40	50	60
MGRMNVFSP	WFFPGIGPL	LLLLLLLLL	RGTFQPGGN	RTESEPNAT	ATPAITILV
70	80	90	100	110	120
TSVTSETPAT	SAPEAEQPO	GGLPFFPRV	PSSSPOQA	LTEGAPCRF	PFYGGKHL
130	140	150	160	170	180
ACTSESAHR	EWCATNNYD	RDRAWGVCE	ATPPPGFPA	LPCASGCL	NGGSCWTQD
190	200	210	220	230	240
POSTHSCSP	AFPGKDCGT	KCFOTAVEY	LEGGDRAWY	RQHVGQPCR	PSGRTWCST
250	260	270	280	290	300
RITACISSFC	LAGOTCHLV	ATGTVCACP	PGFAGRLNI	EPDRCFLGN	GTGVRGAST
310	320	330	340	350	360
SASGLCLAN	NSDLYQLM	VDSVGAALL	GLGPHACTN	PQNDERPWCY	VVKOSALSVE
370	380	390	400	410	420
YCRLECESL	TRVQLSPOL	ATLPEPASFC	PGACGRHKK	RTELRPRJG	GSSSLQSGH
430	440	450	460	470	480
WLAAYIGDS	FCAGSLVHTC	WVSAACFCS	HSPPDSVSV	VLSGHPFNR	TDVTCTGIC
490	500	510	520	530	540
KYIPTLYSV	NFSDRDVLV	IRLKKGDRC	ATRSQVQPI	CLPFGSTFP	AGNKGQIAG
550	560	570	580	590	600
GRIDENVSQ	SSSLREALVP	LVADHNCSP	EVYGDGSPH	MLCAGYDCK	SDACQCGSG
610	620	630	640	650	
PLACENKGA	YLYGIISWG	GGRLNRPV	TVRYNVYD	INDRIEPRR	LVAPS

Q04756 in FASTA format

View entry in original SWISS-PROT format
 View entry in raw text format (no links)
 Report form for error updates in this SWISS-PROT entry

Direct BLAST submission at
 EMBnet-CL and CSRS
 (Switzerland)

Direct BLAST submission at NCBI
 (Bethesda, USA)

ScanProsite, ProfileScan

Sequence analysis tools: ProParam,
 ProScale, Compute pI/Mw, PenideMass,
 Dillet (Java)

Feature table viewer (Java)

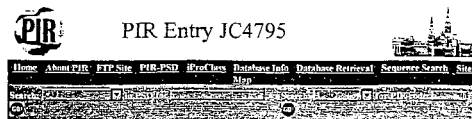
Search the SWISS-MODEL Repository

ExPASy Home page | Site Map | Search ExPASy | Contact us | SWISS-PROT
 Hosted by SIB Switzerland | Mirror sites: Australia Canada China Korea Taiwan

【 1 3 - 1 】

PIR Entry Request

http://pir.georgetown.edu/cgi-bin/pirsearch



in the PIR-I section of the Protein Sequence Database, release 68.03, 24-May-2001, assembled and annotated by the PIR-International.
 Copyright © 2000 PIR-International.

Submission Form create a BLAST (at PIR) submission form for JC4795

Annotation | Sequence | Composition Table | Download: (CODATA) | FASTA | XML

ENTRY JC4795 #type complete
 TITLE plasma hyaluronan-binding protein precursor - human
 ALTERNATE_NAMES hepatocyte growth factor activator-like protein: PHA
 CONTAINS serine proteinase (EC 3.4.21.-)
 ORIGIN #formal_name Homo sapiens #common_name man
 #cross-references EMBL:661606
 DATE 15-Oct-1995 #sequence_revision 16-Aug-1996 #text_change 16-Jul-1999
 ACCESSIONS JC4795
 REFERENCES JC4795
 #authors Chou-Ming, N.H.; Tobe, T.; Sumiya, J.; Nakano, Y.; Sano, Y.; Maeda, T.; Tomita, M.
 #journal J. Biochem. (1996) 119:1157-1165
 #title Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHA) from human plasma: It has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator.
 #cross-references PMID:661606
 #accession JC4795
 #molecule_type mRNA
 #residues 1-50 #label CDS
 #cross-references GB:883132; NID:816158; PDB:AAA6609.1; PDB:816158
 #experimental_source plasma
 #note parts of this sequence, including the amino ends of the mature chains, were determined by protein sequencing

GENETICS
 #gene GOR:HA822; HARP: PHA; HGAL

COMPLEX
 #cross-references GDB:152362
 a disulfide-bonded heterodimer of chains produced from the same precursor: the catalytic chain is degraded to a 27k chain lacking the active site serine residue

CLASSIFICATION
 #superfamily plasma hyaluronan-binding protein: EGF
 homology: kringle homology: trypsin homology
 chondroitin sulfate proteoglycan: glycoprotein: growth factor: hyaluronan acid: hydrolase: kringle: plasma: serine proteinase

KEYWORDS

FEATURE
 1-23 #domain signal sequence #status predicted #label SGL
 24-313 #product plasma hyaluronan-binding protein: 508 chain #status predicted #label SGL
 77-108 #domain EGF homology #label EGF1
 115-147 #domain EGF homology #label EGF2
 154-187 #domain EGF homology #label EGF3
 194-276 #domain kringle homology #label EGF4
 314-350 #domain trypsin homology #label TRY
 #product plasma hyaluronan-binding protein, catalytic chain #status predicted #label CAT
 #domain basic carboxylate (amino) #status predicted
 77-88, 97-99-108, 115-123, 120-136, 138-147, 154-165, 159-176, 178-187, 194-276, 215-257, 246-271, 301-335, 347-363, 325-424, #status predicted

【 1 3 - 2 】

PIR Entry Request

http://pir.georgetown.edu/cgi-bin/pirsearch

447-515, 477-493,
 505-513
 382, 405, 509
 SOMMART #length 560 #molecular_weight 62671

#disulfide_bonds #status predicted\
 #active_site His, Asp, Ser #status predicted

SEQUENCE

1 M F A R M S D L H V L L L M A L V G K T A C G F S L M S L L
 31 E S L D F M W T P P Q Y D V S Y E O Y N Q E N T S S T L T
 61 H A E A P D W Y T E D Q A D P C Q P R F C E H G D C L V
 91 M G S T F T C S C L A P F S G M K C Q R V O N T C X D M P C
 121 G R G Q C L I T O S P F Y V A C V K R R P T G P S C S Q V
 151 V P C R N F C Q M G A T C S R H K R S K F T C A C F O
 181 Q F E G E C E T C S D D C Y V G G Y S Y A G K M N R T V
 211 M Q A C Y W S H L Q E W M W M F E D A T H G I
 241 G E H N F C R N P A D E Z F W C T I K V N D R V K M D T
 271 C V S A C S A Q V V A Y F E E S T E P T K L G F G D S
 301 C K T E L A R T I K R T Y G C F S T A G K H P W Q A S
 331 L O S S L P L T I S M P Q G H F C G G A L H P C W V L T A
 361 A N C T O K R R L K V V L G D Q D L K E E F E E Q S F
 391 R V E K I T Y S A Y W E R D E I E N D A L L L L X R V
 421 D R H C A L E S K Y V K T V C L P D G S F P S G S E C H I S
 451 G V G V T T K G S R Q L D A K V K L A N T L C N S R
 481 Q Y D R H I D W I T C A G W L G P G Q T C G G S C
 511 G P L T C E R D G T Y Y V G I V S W G L E C G K R P G V Y
 541 T Q V T R L N W I R A T A S E S G F

Enzyme Links for JC4795:
 EC:UBMB: EC 3.4.21.
 KEGG: EC 3.4.21.
 BRENDA: EC 3.4.21.
 WIT: EC 3.4.21.
 MetaCyc: EC 3.4.21.

Associated Alignments:
 DA0704 EGF homology - Type A
 DA0704 EGF homology - Type B
 DA1082 kringle homology - selected coagulation factors
 DA1082 trypsin homology

Link to ProClass (Superfamily classification and Alignment):
 ProClass Report for JC4795 at PIR.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	9/64	(2006.01)	C 1 2 N	9/64	Z
C 1 2 N	9/74	(2006.01)	C 1 2 N	9/74	
C 0 7 K	14/755	(2006.01)	C 0 7 K	14/755	
A 6 1 K	35/76	(2006.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	38/48	(2006.01)	A 6 1 K	37/475	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	37/24	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	

(72)発明者 ゲットゾフ エリザベス ディー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ディエゴ ナイアガラ アベニュー 4 5 7 5

(72)発明者 ペレクエール ジーン - ルク

フランス国 バグノルズ サル チェッセ アベニュー デ ラ メイレ 1 3 サイト デス
シプレス

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 3 6 0 2 (J P , A)

Protein Science , 1 9 9 5 年 , vol.8, no.12 , p.1323-1331

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-90

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed