

(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 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 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)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月14日 (2002.6.14)
 (65) 公表番号 特表2005-500831 (P2005-500831A)
 (43) 公表日 平成17年1月13日 (2005.1.13)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/019017
 (87) 國際公開番号 WO2002/103024
 (87) 國際公開日 平成14年12月27日 (2002.12.27)
 審査請求日 平成17年6月13日 (2005.6.13)
 (31) 優先権主張番号 60/298,578
 (32) 優先日 平成13年6月14日 (2001.6.14)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 399038620
 ザ スクリプス リサーチ インスティチ
 ュート
 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^D
 10550
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (72) 発明者 グリフィン ジョン エイチ.
 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
 (72) 発明者 ゲイル アンドリュー ジェイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
 デイエゴ #159 サマーデイル ロ
 ード 8582

最終頁に続く

(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強化するための、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】**

10

20

30

40

50

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產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。

【0010】

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。凝固力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斷して、メイゾトロンビンを產生する、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) を產生し、これは、Arg271およびArg284での切斷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シン脂質小胞 (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

【0011】

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斷されて、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、これは陰性荷電リシ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での切斷は、Arg306での切斷より速く、これはFVaをごく部分的に不活化するに過ぎないが、Arg306での切斷は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

【0012】

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ネクチンII型ドメイン、EGFドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、EGFドメイン、クリングルドメイン、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の後での結合の切斷によって形成され、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。さらなる切斷によってFXIIa (FXIIa断片) が起こる。これは、Arg334およびArg343での切斷の結果であり、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。 30

【0013】

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斷、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回の切斷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斷によってもN-末端重鎖の放出が起り、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

【0014】

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）。PHBP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る。

【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ニ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。

【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单一の核酸配列(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、配列が連續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。

【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。

【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。

10

20

30

40

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、中性子回折等であつてもよい。

【 0 0 2 7 】

30

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、Sowdha mini (19) のアルゴリズムを用いるコンピュータープログラム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ー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。

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、コンピューター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除外してもよい。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コンピュータープログラム、例えばCharm22全原子力場を用いるX-PLORコンピューター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سفエ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プ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ついては、F. Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、グリーンバブリッシングアソシエーツ＆ウィリーインターライエンス（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を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を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を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うる。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ー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。10

【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。20

【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、インビオまたはインビトロ遺伝子置換のために用いてよい。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产生する核酸を、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产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。30

【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。4050

【 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／または治療的有効量を含む。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、化合物の治療的有効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効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効量は、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。

【0046】

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

【0047】

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。

【0048】

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チュート) ; 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) ; Boedecker, B.G. 、Semin. Thromb. Hemost. 27(4) : 385～94 (2001年8月) を参考されたい。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

【0049】

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。

【0050】

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

【0051】

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号を開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、例えは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蛋白質不活性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。

【0052】

ヒト第VIII因子cDNAス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。

【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。

【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

10

20

30

40

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ピ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、Boeder（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 CaCl₂、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

30

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。

【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

そ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. USA 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, H.R. および Hoffman, M. 「Hemophilia A and Hemophilia B.」、Williams Hematology、第6版、E. Beutler, MA, Lichtman, BS Coller, 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。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、リポソームと共に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產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、5750

)。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応できず、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】

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(BD) 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سفェクトさせる。トランسف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10⁸~10⁹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個のそれぞれについて

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行った。

【0086】

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、 $r_{ss} = 2.02$ 、 $\theta_{ss} = 80.9^\circ$ 、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。次によい部位は、Leu238 - Gln590であり、 $r_{ss} = 2.03$ 、 $\theta_{ss} = -111.6^\circ$ 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。

【0087】

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'-CACGGATCCTACAGATTACATTGAGATCA-3'

3'-プライマー(5975位除去、6014保持)

5'-GTCTGGATCCCTGTGATTATGACTTCCTTGCATGTCCACCTGAATCCAAG-3'

【0088】

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。

【0089】

このFV-B遺伝子構築物を、インビトロジエン社（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。

【0090】

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：

10

20

30

40

Ser2183 – Ala

フォワードプライマー
5'-CATGGAATCAAAGCTATTACACTTCGCC-3'

リバースプライマー
5'-GGCGAAGTGTAATAGCTTGATTCCATG-3'

Leu238 – Cys

フォワード
5'-GGCCAGAATGCTTCTCCATTC-3'

10

リバース
5'-GAATGGAGAAGCATTCTGGCC-3'

Gln590 – Cys

フォワード
5'-GTGGGGACCTGTAAATGAAATT-3'

リバース
5'-AATTCATTACAGGTCCCCAC-3'

20

His609 – Cys

フォワード
5'-CTATGGAAAGAGGTGAGGGACACC-3'

リバース
5'-GGTGTCCTCACCTCTTTCCATAG-3'

Glu1691-Cys

フォワード
5'-GATCAGGGCCATGTAGTCCTGGC-3'

30

リバース
5'-GCCAGGACTACATGGCCCTGATC-3'

Arg306 – Gln

フォワード
5'-CCAAAGAAAACCCAGAATCTTAAG-3'

リバース
5'-CTTAAGATTCTGGTTTCTTTGG-3'

Arg506 – Gln

40

フォワード
5'-CTGGACAGGCAAGGAATACAG-3'

リバース
5'-CTGTATTCCTTGCCTGTCCAG-3'

Arg679 – Gln

フォワード
5'-CATGGCTACACACAGAAAATGCATG-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ピング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トランスクレクション試薬を用いてCOS-1細胞にトランスクレクションした。より詳しく述べると、DNA 1 μgを、Superfect試薬5 μlと共にDMEM/F12培地60 μl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 μl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ジエネティシン（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 CaCl₂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 CaCl₂、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。

【0092】

FVaを、トロンビ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 μg/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）はトロンビン（0.5 nM）の0.1%BSAおよび5 mM CaCl₂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不活性アッセイは、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の不活性は以下のように測定した。1 nM FVaと25 μM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 CaCl₂、0.1 mM MnCl₂（Ptase緩衝液と呼ばれる）において作製した。不活性は、APCの付加によって開始した。1 μl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 μlを25 μMリン脂質小胞と共に加えた後、3 μMプロトロンビン10 μlを加えた（最終濃度：1 nM FXa、20 pM FVa、25 μMリン脂質小胞および0.6 μMプロトロンビン）。2.5分後、10 mM EDTA、0.5%BSA、pH 8.2を含むTBS 55 μlを加えて、この混合物15 μl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ビンの形成量を評価した。

【0093】

いくつかの試験において、FXaまたはプロトロンビンを変化させた。Xa力値を測定する場合、3.34 pM FVa/FVaiおよび41.7 μM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 μlずつ分注した。Xa 10 μl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 μMプロトロンビン（FII）10 μlを全てのウェルに加えた（最終濃度 = 2 pM FVa、25 μM PL小胞、5 ~ 600 pM Xa、0.3 μM FII）。12分において、0.5%BSA、10 mM EDTA、pH 8.2を含むTBS 55 μlを含む96ウェルプレートに、15 μlを移すことによってPtase反応を停止させた。次に、形成されたトロンビンの量を色素発生基質CBS 34-47によって測定した。プロトロンビンに関しては、125 pM Xa、1.25 nM FVa/FVai、および31.25 μM PL小胞のPtase緩衝液溶液を含む混合物20 μl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 μlを加えた（最終濃度100 pM Xa、1 nM FVa、25 μl PL、25 ~ 1500 nM FII）。2分30秒目に、上記のように15 μlをEDTA緩衝液55 μlに移すことによって反応を停止させた。トロンビンは上記のように測定した。

【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

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プロットを展開した(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 CaCl₂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。產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)。イムノプロットにより、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。さらにイムノプロットによって、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)のイムノプロットを行った。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プロットにより、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のイムノプロットにおいて、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Arg506、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プロットにおいて(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」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關したが、Arg679で切断された場合には相關せず、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プ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プロットにおいて、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プロットと共に、Q506 - A2 - SS - A3 - FVaおよびQ506 - A2 - SS - A3 - FVaiは、図2Bの抗FV軽鎖抗体を用いて展開したイムノプ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時移動する、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時移動した(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)。

10

【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。

20

【0103】

Q506 - A2 - SS - A3 FVaおよびQ506/Q679 - A2 - SS - A3 - FVaのイムノプロット分析は、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プ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。

30

【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FV Bの一次配列の略図である。図1Bの図は、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)の不活化によって產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。

40

【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斷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。

50

【 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つていない。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ープログラム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)

10

20

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)

30

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、コンピューター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、

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 10
、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'-CCTTCAACACAAATGCGTCTATGAAGACACACTCACC-3'

リバース
5'-GGTGAGTGTGTCTTCATAGACGCATTTGTGTTGAAGG-3'

Asp1828 - Cys

フォワード
5'-GGCACCCAACTAAATGTGAGTTGACTGCAAAGC-3'

リバース
5'-GCTTTGCAGTCAACTCACATTAGTGGGTGCC-3'

Tyr664 - Cys

フォワード
5'-CACAAAATGGTCTGTGAAGACACACTCACCC-3'

リバース
5'-GGGTGAGTGTGTCTTCAAGAGGATTG TG-3'

Thr1826 - Cys

フォワード
5'-CATATGGCACCCCTGTAAAGATGAGTTGACTGC-3'

リバース
3'-GCAGTCAAACTCATTACAGGGTGCCATATG-3'

【 0 1 1 2 】

上記のTyr664 - Cysリバースプライマーは、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、選択されたクローンのDNAシークエンシングによって、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に対する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 CaCl₂/0.1 mM MnCl₂、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(FVIIIdP、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°で3分間インキュベートした。FVIII試料5 μlを加えて、その後に、0.5%BSAおよび25 mM CaCl₂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ら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、トロンビ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に関する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。

10

【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ついて、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。

20

【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。

30

【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：

40

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】

50

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ンピン (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も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FVII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.
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., Pabringier, 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.

10

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. J* **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.
31. Hockin, M. F., Cawthern, 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.
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.
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., Kemball-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.
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.

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, patjin 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-associates 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, Higgh 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-associates viral serotype vectorss. *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, Propert 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 produce biologically active protein. *Proc Natl 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, Fileds 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, Beaudet 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.* 10 1998; 18: 180-183.
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-Signh 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.
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* 20 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, Prokopenko 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, Grahma FL, Lochanek S, Beaudet AL. High doses of a helper-dependent adenoviral vectors yield supraphysiological levels of a-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 hemophiliac mice. *Mol Ther.* 2000; 2:223-232.
101. Reddy PS, Yan L, Pattison S, Sakhuja K, Kayda D, Golightly D, Indamakanti 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, Gallay 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.
 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.
 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 VIIa. *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)

10

20

30

【0134】

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、その全体が参考として本明細書に組み入れられる。

【0135】

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】

【0136】

【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) に產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) 、または形成が起らなかった (Leu238 - Glu590) システイン変異部位を示す。

50

【図2】様々なFVaおよびFVai変異体のイムノプロット。(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プロット。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プロット。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。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、ノベックスシープルー標準物質)を左側に示す。

【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。

【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。

【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。

【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。

10

20

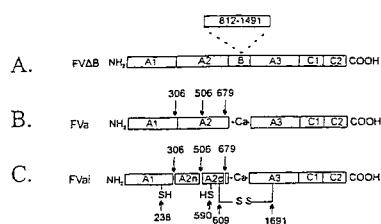
30

40

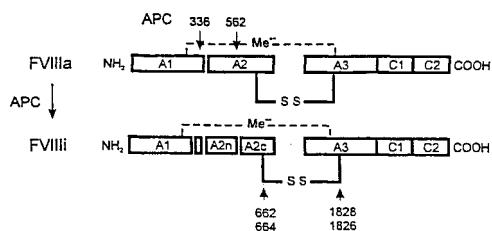
50

【図1】ヒトPHBPのアミノ酸配列を含むPIRアクセッション番号JC4795からのウェブ頁および関連情報。

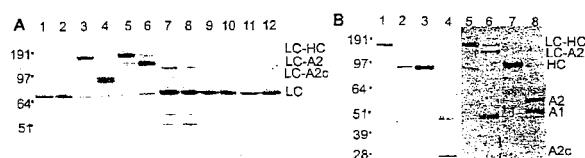
【図1】



【図4】

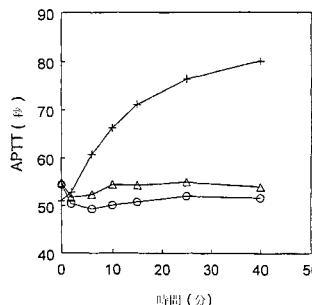


【図2】

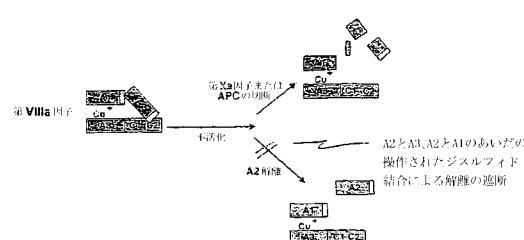


【図5】

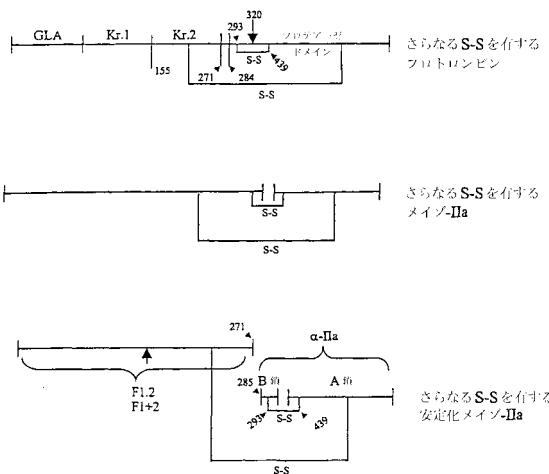
FVIIIaの安定性



【図3】



【図6】



【図7-1】

第VIII因子
スイスプロットアクセッション番号 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 補体活性型DNAクローンからの活性化ヒト第VIII因子の発現
雑誌 Nature 312 (5992), 330-337 (1984)
メドライン 85061548
注記 N.A.からの配列
参考文献3 (残基1~2351位)
著者 Toolet,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., Coo,M.L., Knutson,G.J., Fass,D.N. and Hewick,R.M.
タイトル ヒト血液凝固因子をコードする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の長さが19アミノ酸である。ソリヤシングされた蛋白質の標準的な番号は、ソリヤ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、スイスプロットのファイルおよび参考文献では、全ての残基はソリヤシングされた蛋白質において番号を付ける場合よりも19大きい番号がついている。

第V因子
スイスプロットアクセッション番号 P12259
参考文献

参考文献2 (残基1~2224位)
著者 Jenny,R.J., Pittman,D.D., Toolet,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。シグナルペプチドの長さが28アミノ酸である。

プロトロンビン

スイスプロットアクセッション番号 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 ヒトトロンビ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。シグナルおよびソルベプチドのいずれも長さがアミノ酸43個であり、ソリヤシングされたホリペプチドの番号から差し引かれている。

第XII因子

スイスプロットアクセッション番号 P00748
参考文献

参考文献3 (残基1~615位)
著者 Cool,D.E., Edgell,C.J., Louis,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因子の一次構造と第XIIa因子の二次構造の予測
雑誌 J. Biol. Chem. 260 (25), 13666-13676 (1985)

HGF-A

スイスプロットアクセッション番号 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するヒトセリン/ロイジアーゼのcDNAの分子クローニング
および配列分析 血液凝固第XII因子に対するプロゲ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 アクセッション番号 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ヒアルロナン結合蛋白質(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、クリングル、およびセリン/プロラバ-/イードメインを有する

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

[FIG 8 - 1]

NiceProt View of SWISS-PROT: 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; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominoidea; Homo.

References

- [1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
 MEDLINE=8601164; PubMed=3935400;
 Truet M.A., Blacher R., Burke R.L., Caput D., Chu C., Dina D., Hartog K., Kuo C.H., Masiarz R.F., Merryweather J.P., Najarian R., Pachl C., Potter S.J., Puma J., Quiroga M., Rall L.B., Randolph A., Unde M.S., Valenzuela P., Dahl H.-M., Favaro J., Hansen J., Nordfang O., Eszan 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=8506148; PubMed=4438526;
 Wood W.L., Caput D., Simmer C.C., Eaton D.L., Gitschier J., Key B., Seeburg P.H., Smith D.H., Halligan S., Van K.L., Delwart E., Tuddenham E.G.D., Vehar G.A., Lawn R.M.;
 "Expression of the entire human factor VIII from recombinant DNA clones.",
Nature 312:330-337 (1984).
- [3] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
 MEDLINE=8506150; PubMed=4438528;
 Toole J.J., Knopf J.L., Woozney J.M., Sulzman 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=1030178;
 Gitschier J., Wood W.L.;
 "Sequence of the exon-containing regions of the human factor VIII gene.",
Hum. Mol. Gen. 1:199-200 (1992).
- [5] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
 de Water N.S., Williams R., Brockett P.J.;
 Submitted (1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- [6] SULFATION OF 1699.
 MEDLINE=91093266; PubMed=189735;
 Leyte A., van Schijndel H.B., Nieboer C., Hutter 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).

[FIG 8 - 2]

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

[7] SULFATION.
 MEDLINE=92207952; PubMed=1554716;
 Pieman D.D., Wang J.H., Kauvina 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=95200924; PubMed=7893714;
 Gilbert G.E., Balleja 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=9121499; 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=90038350; PubMed=2491949;

Wyllie G.C. II, Shattock C.B.;
 "Factor VIII gene and hemophilia A.",
Blood 73:1-12 (1989).

[11] REVIEW ON MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A.
 MEDLINE=9524532; 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 hemophiliac.",
Science 232:1415-1416 (1986).

[13] VARIANT PRO-2135.
 MEDLINE=88096539; PubMed=3122181;

Levinson B., Janzen 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-2238.
 MEDLINE=94191889; PubMed=2833855;

Youssoufian H., Wong C., Aronis S., Platokoukis 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=2833854;

Youssoufian H., Wong C., Aronis S., Platokoukis 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 73:21-23 (1989).

[17] VARIANT CYS-391.
 MEDLINE=90001543; PubMed=2506948;

Shima M., Ware J., Yoshikawa 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., Dodd D.;

[FIG 8 - 3]

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?printable&ac=P00451

"A novel missense mutation in exon 4 of the factor VIII:C gene resulting in moderately severe hemophilia A.",
Blood 74:2682-2691 (1989).
 [19] VARIANT LEU-326.
 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. 81:535-538 (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] VARIANT GLN-2228 AND LEU-2326.
 MEDLINE=90123183; PubMed=2105106;

Casulo L., Murru S., Pecorari M., Ristaldi M.S., Restagno G., Mancuso G., Morfini M., de Biasi R., Baudo 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;

Pattinson J.K., McVey J.H., Boon M., Ajani A., Tuddenham E.G.;

"CRM+ haemophilia A due to a missense mutation (372->Cys) at the internal heavy chain thrombin cleavage site.",
Br. J. Haematol. 75:73-77 (1990).

[24] VARIANT S-PHE-1699 AND CYS-1708.
 MEDLINE=9012691; PubMed=2105906;

Higuchi M., Wong C., Kochan L., Olek K., Aronis S., Kazazian H.H. Jr., Antonarakis S.E.;

"Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA.",
Genomics 6:65-71 (1990).

[25] VARIANT CYS-1728 AND ASP-1941.
 MEDLINE=90169988; PubMed=2106480;

Tayssir M.D., Hipushi M., Kasper C.S., Antonarakis S.E., Kazazian H.H. Jr.;

"Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect point mutations in the factor VIII gene.",
Genomics 6:293-301 (1990).

[26] VARIANT LEU-345 AND ARG-348.
 MEDLINE=90197233; 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] VARIANT LYS-1723 AND SER-2319.
 MEDLINE=91348684; PubMed=1908817;

Paynter C., Sarkar G., Sommer S.S.;

"Identification of mutations in two families with sporadic hemophilia A.",
Hum. Genet. 87:397-400 (1991).

[28] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[30] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[31] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[32] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[33] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[34] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[35] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[36] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[37] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[38] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[39] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Freson K., Peirlinck K., Aguirre T., Arnout J., Vermeyen J., Cassiman I.-J., Matthijs G.;

"Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene.",
Hum. Mutat. 11:470-479 (1998).

[40] VARIANT.

MEDLINE=91334474; PubMed=1908096;

Higuchi M., Kazazian H.H., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. III, Kasper C., Janco 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).

[FIG 8 - 4]

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?printable&ac=P00451

MEDLINE=9200842; PubMed=1924291;
 Higuchi M., Antonarakis S.E., Kasch L., Oldenburg J., Economou-Petersen E., Olek K., Arai M., Inaba H., Kazazian H.H. Jr.;

"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] VARIANT CYS-1708 AND HIS-1708.
 MEDLINE=91228147; PubMed=1851341;

Schwab R., Ludwig M., Kochan L., Oldenburg J., McVey J.H., Egli H., Brackmann H.H., Olek K.;

"Detection and characterisation of two missense mutations at a cleavage site in the factor VIII light chain.",
Thromb. Res. 61:225-230 (1991).

[31] VARIANT GLY-1715.
 MEDLINE=92250024; PubMed=1349567;

Reiner A.P., Thompson A.R.;

"Screening for missense mutations in patients with severe hemophilia A can provide rapid, direct carrier detection.",
Hum. Mutat. 8:95-94 (1992).

[32] VARIANT LEU-160.

MEDLINE=93244637; PubMed=1301194;

Nafri M., Baudin M., Debengrave N., Bardin J.M., Sultan Y., Kaplan J.C., Delpech M.;

"A novel mutation (Arg->Leu in exon 18) in factor VIII gene responsible for moderate hemophilia A.",
Hum. Mutat. 1:77-82 (1992).

[33] VARIANT CYS-1800 AND V-164; MET-181; W-717; F-1808 AND R-2065.
 MEDLINE=93250816; PubMed=1301932;

Diamond C., Hogan S., Levinson B., Magnusson S., Jansson O., 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] VARIANT CYS-1800 AND ILE-2173.
 MEDLINE=93250855; PubMed=1301936;

Jonsdottir S., Diamond C., Levinson B., Magnusson S., Jansson O., Gitschier J.;

"Missense mutation causing mild hemophilia A in Iceland detected by denaturing gradient gel electrophoresis.",
Hum. Mutat. 1:506-508 (1992).

[35] VARIANT LEU-305, PHE-577, ALA-653; MET-653 AND PHE-671 DEL.
 MEDLINE=93244637; PubMed=1349505;

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] VARIANT ILE-299 AND ASN-450.
 MEDLINE=93110754; PubMed=8

【图 8 - 5】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

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

- MEDLINE=98112483; PubMed=945104;
Tavassoli K., Engel A., Dworamiczak B., Valiseva E., Horst J.;
"Identification of four novel mutations in the factor VIII gene: three missense mutations (E1875G, G2088S, I2185T) and a 2-bp deletion (1780deITC).";
Hum. Mutat. Suppl. 1:S260-S262(1998).
- [41] VARIANTS.
MEDLINE=9006891; PubMed=9792405;
Tavassoli K., Engel A., Wutzler A., Pollmann H., Horst J.;
"Molecular diagnosis of hemophilia A patients: characterization of eight novel mutations in the factor VIII gene, two of which result in exon skipping.>";
Hum. Mutat. 12:301-302(1998).
- [42] VARIANTS VAL-439-CYS-1800; HIS-2169; HIS-2182 AND SER-2319.
MEDLINE=99045372; PubMed=9829908;
Laprise S.L., Mak E.K., Killorn K.A., Layman L.C., Gray M.R.;
"Use of denaturing gradient gel electrophoresis to screen for point mutations in the factor VIII gene.>";
Hum. Mutat. 13:504-504(1999).
- [43] VARIANTS ARG-202 AND HIS-301.
MEDLINE=99335269; PubMed=10408784;
Moeller-Morlitz K., Tavassoli K., Engel A., Pollmann H., Horst J.;
"Mutational-screening in the factor VIII gene resulting in the identification of three novel mutations, one of which is a donor splice mutation.>";
Hum. Mutat. 15:117-118(2000).

Comments

- **FUNCTION:** FACTOR VIII, ALONG WITH CALCIUM AND PHOSPHOLIPID, ACTS AS A COFACTOR FOR FACTOR IXA WHEN IT CONVERTS FACTOR X TO THE ACTIVATED FORM (FACTOR XA).
- **SUBCELLULAR LOCATION:** EXTRACELLULAR.
- **DOMAIN:** DOMAIN F5/8 TYPE C 2 IS RESPONSIBLE FOR PHOSPHOLIPID-BINDING AND ESSENTIAL FOR FACTOR VIII ACTIVITY.
- **DISEASE:** HEMOPHILIA A IS A COMMON RECESSIVE X-LINKED COAGULATION DISORDER DUE TO DEFECTS IN FBC. THE FREQUENCY OF HEMOPHILIA A IS 1-2 IN 10,000 MALE BIRTHS IN ALL ETHNIC GROUPS. ABOUT 50% OF PATIENTS HAVE SEVERE HEMOPHILIA A WITH FBC ACTIVITY LESS THAN 1% OF NORMAL; THEY HAVE FREQUENT SPONTANEOUS BLEEDING INTO JOINTS, MUSCLES AND INTERNAL ORGANS. MODERATELY SEVERE HEMOPHILIA A OCCURS IN ABOUT 10% OF PATIENTS. FBC ACTIVITY IS 2-5% OF NORMAL, AND THERE IS BLEEDING AFTER MINOR TRAUMA. MILD HEMOPHILIA A, WHICH OCCURS IN 30-40% OF PATIENTS, IS ASSOCIATED WITH FBC ACTIVITY OF 5-30% AND BLEEDING OCCURS ONLY AFTER SIGNIFICANT TRAUMA OR SURGERY. OF PARTICULAR INTEREST FOR THE UNDERSTANDING OF THE FUNCTION OF FBC IS THE CATEGORY OF CRM (CROSS-REACTING MATERIAL) POSITIVE PATIENTS (APPROXIMATELY 5%) THAT HAVE CONSIDERABLE AMOUNT OF FBC IN THEIR PLASMA (AT LEAST 30% OF NORMAL), BUT THE PROTEIN IS NONFUNCTIONAL; I.E., THE FBC ACTIVITY IS MUCH LESS THAN THE PLASMA PROTEIN LEVEL. CRM-REDUCED CRM IS ANOTHER CATEGORY OF PATIENTS IN WHICH THE FBC ACTIVITY AND CRM LEVELS ARE REFERRED TO APPROXIMATELY THE SAME LEVEL. MOST MUTATIONS ARE CRM NEGATIVE, AND PROBABLY AFFECT THE FOLDING AND STABILITY OF THE PROTEIN.
- **PHARMACEUTICAL:** AVAILABLE UNDER THE NAMES KOGENATE (84 YER) AND RECOMBIXATE (BAXTER AND AMERICAN HOME PRODUCTS); USED TO TREAT HEMOPHILIA A.
- **SIMILARITY:** CONTAINS 3 F5/8 TYPE A DOMAINS; EACH IS COMPOSED OF 2 PLASTOCYANIN-LIKE REPEATS.
- **SIMILARITY:** CONTAINS 2 F5/8 TYPE C DOMAINS.
- **SIMILARITY:** STRONG, TO COAGULATION FACTOR V.
- **DATABASE:** NAME=HAMSters; NOTE=Factor VIII mutation db; WWW="<http://europium.mrc.rpms.ac.uk/>".

【图 8 - 7】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

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

Features

Key	From	To	Length	Description
SIGNAL	1	19	19	
CHAIN	20	2351	2332	COAGULATION FACTOR VIII.
CHAIN	20	1332	1313	FACTOR VIIIa HEAVY CHAIN (1200 kDa).
CHAIN	20	759	740	FACTOR VIIIa HEAVY CHAIN (92 kDa).
CHAIN	760	1332	573	B.
CHAIN	1668	2351	684	FACTOR VIIIa LIGHT CHAIN (80 kDa).
DOMAIN	20	348	359	F5/8 TYPE A 1.
DOMAIN	20	198	179	PLASTOCYANIN-LIKE 1.
DOMAIN	206	348	143	PLASTOCYANIN-LIKE 2.
DOMAIN	399	730	332	F5/8 TYPE A 2.
DOMAIN	399	573	175	PLASTOCYANIN-LIKE 3.
DOMAIN	583	730	148	PLASTOCYANIN-LIKE 4.
DOMAIN	760	1667	908	B.
DOMAIN	1713	2040	328	F5/8 TYPE A 3.
DOMAIN	1713	1877	165	PLASTOCYANIN-LIKE 5.
DOMAIN	1887	2040	154	PLASTOCYANIN-LIKE 6.
DOMAIN	2040	2188	149	F5/8 TYPE C 1.
DOMAIN	2193	2345	183	F5/8 TYPE C 2.
SITE	1332	1323	2	CLEAVAGE (ACTIVATION).
SITE	1667	1668	2	CLEAVAGE (ACTIVATION).
SITE	391	392	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
SITE	759	760	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
SITE	1708	1709	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
MOD_RES	365	365	1	SULFATION.
MOD_RES	737	737	1	SULFATION (PROBABLE).
MOD_RES	738	738	1	SULFATION (PROBABLE).
MOD_RES	742	742	1	SULFATION (PROBABLE).
MOD_RES	1683	1683	1	SULFATION.
MOD_RES	1698	1698	1	SULFATION.
DISOLFID	172	198	27	PROBABLE.
DISOLFID	547	573	26	PROBABLE.
DISOLFID	1851	1877	26	PROBABLE.
DISOLFID	2040	2186	146	BY SIMILARITY.
DISOLFID	2193	2345	152	BY SIMILARITY.
CARBONYD	60	60	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	258	258	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	601	601	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	776	776	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	803	803	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	847	847	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	919	919	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	962	962	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	982	982	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1020	1020	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1024	1024	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1074	1074	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1085	1085	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1204	1204	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1274	1274	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1278	1278	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1301	1301	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1319	1319	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1431	1431	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1461	1461	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	1828	1828	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).
CARBONYD	2137	2137	1	N-LINKED (GLCNAC...) (POTENTIAL).

【图 8 - 6】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

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

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.usb-sib.ch/announce/> or send an email to license@usb-sib.ch).

Cross-references

EMBL	M14113; AAA52485.;-
	X01179; CAA23619.;-
	K01740; AAA52484.;-
	M88648; AAA52420.;-
	M88628; AAA52420.; JOINED.
	M88629; AAA52420.; JOINED.
	M88630; AAA52420.; JOINED.
	M88631; AAA52420.; JOINED.
	M88632; AAA52420.; JOINED.
	M88633; AAA52420.; JOINED.
PIR	M88634; AAA52420.; JOINED.
	M88635; AAA52420.; JOINED.
	M88636; AAA52420.; JOINED.
	M88637; AAA52420.; JOINED.
	M88638; AAA52420.; JOINED.
	M88639; AAA52420.; JOINED.
	M88640; AAA52420.; JOINED.
	M88641; AAA52420.; JOINED.
	M88642; AAA52420.; JOINED.
	M88643; AAA52420.; JOINED.
PDB	M88644; AAA52420.; JOINED.
	M88645; AAA52420.; JOINED.
	M88646; AAA52420.; JOINED.
	M88647; AAA52420.; JOINED.
	U0223; AA61261.;-
	A00625; EZH2.
	A23584; A23584.
	ICFG: 02-NOV-95.
	IFAC: 11-JAN-97.
	P00451; -.
GlycoSuiteDB	I14430; -.
	I34500; -.
	I34510; -.
	227310; -.
	306700; -.
	GeneCards
	F8.
	InterPro
	IPR001117; Cu-oxidase.
	IPR0040421; FA8_C.
Pfam	PFF0394; Cu-oxidase; 3.
	PF00754; F5_F8_type_C; 2.
	SMART
	SM00231; FA8C; 2.
	PROSITE
	PS00079; MULTICOPPER_OXIDASE1; 3.
	PS01285; FA8C; 1; 2.
	PS01286; FA8C; 2; 2.
	Implicit links to
	ProDom: BLOCKS; DOMO; ProtoMap; PRESAGE; DIP: SWISS-2DPAGE.

Keywords

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

【图 8 - 8】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

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

VARIANT	26	26	L -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	30	30	/FTid=VAR_001045.
VARIANT	41	41	[MILD HEMOPHILIA].
VARIANT	48	48	/FTid=VAR_001047.
VARIANT	75	75	G -> C (SEVERE/MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	85	85	R -> V (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	89	89	D -> V.
VARIANT	99	99	/FTid=VAR_001049.
VARIANT	104	104	G -> D (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	108	108	V -> D (MILD HEMOPHILIA).
VARIANT	110	110	X -> T (MILD HEMOPHILIA).
VARIANT	117	117	/FTid=VAR_001050.
VARIANT	129	129	V -> D (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	130	130	/FTid=VAR_001052.
VARIANT	132	132	G -> X (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	133	133	E -> D (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	135	135	/FTid=VAR_001053.
VARIANT	137	137	Y -> C (MILD HEMOPHILIA).
VARIANT	164	164	/FTid=VAR_001054.
VARIANT	165	165	P -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	181	181	V -> M (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	185	185	R -> S (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	189	189	S -> L (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	202	202	G -> Q (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	222	222	D -> V (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	224	224	G -> D (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	253	253	V -> F (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	266	266	/FTid=VAR_001056.
VARIANT	278	278	G -> R (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	285	285	/FTid=VAR_001057.
VARIANT	291	291	E -> S (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	294	294	T -> I (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	299	299	/FTid=VAR_001058.
VARIANT	301	301	R -> B (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	301	301	/FTid=VAR_001059.
VARIANT	308	308	B -> L (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	312	312	/FTid=VAR_001060.
VARIANT	314	314	T -> A (MILD HEMOPHILIA).
VARIANT	314	314	/FTid=VAR_001061.
VARIANT	327	327	T -> I (MODERATE HEMOPHILIA).
VARIANT	327	327	/FTid=VAR_001062.
VARIANT	327	327	L -> S (SEVERE HEMOPHILIA).
VARIANT	327	327	/FTid=VAR_001063.

【图 8 - 13】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/protein/aa=P00451>

```

 610      620      630      640      650      660
NRSHYITENI QRELPNPGVQ QLEQPEFQAS NHMSHSTGIVF FDSLQLSVC1 HEVAYWILS
 670      680      690      700      710      720
IGAQTOFLSV FFSGYTFRHKH MYVYEDTLTIFP FFSGETVFMN HENPGLWLG CHNSDFRNRC
 730      740      750      760      770      780
HYALLRVSSC DENTGDTYED SYEDISAYLL SKRNNAIZEPF FSQNSRHFST RQKQEVST
 790      800      810      820      830      840
PENCIKETD PWAHHTPHPK IONVSSCOLL MLLRQSPPPH GLSLSLQPA KYTEFTSDPS
 850      860      870      880      890      900
FGAIDSNNSL SENTHDFRPOI RNSGGDMVTTB ESGLQLARNE KLTSTTAEL KNLDFEVST
 910      920      930      940      950      960
SNNLSTIPS DNLAACTGNTT SSSLGPPNSMVF HYDQSQDITL FGKRSPLTE SGGFLSLSEE
 970      980      990      1000     1010     1020
NNDSKLESG LWMNSQESWQ ENVSSSTESGR LTKGKRAOPG ALLTRNDAL EKVSIKLKT
 1030     1040     1050     1060     1070     1080
KTSNNNSATR KTRIDGFSLL IENSFSVWN ILESZTDFKX VTFPLHDMI MDKNNATARL
 1090     1100     1110     1120     1130     1140
NHMSNETTS NNEMEVOORK EGQIIPDAGN PMSMFERMLF LPESARKNCH THGKNSINSC
 1150     1160     1170     1180     1190     1200
QGPSPKOLWS LGPENPSVSEGQ NFLSERKNVV VGGEETKRD GLKEMVFPSS RNLFNLDN
 1210     1220     1230     1240     1250     1260
LHENNTINNE KRIQEIEEKK ETLIIQENVYL POINTVYCTF WFMHNLLFLS TRQNEVEGSD
 1270     1280     1290     1300     1310     1320
GAYAPVLODF RSLNDSTNRT KRHTAMESRK GEEEMNLSEGLG WOTKOIVKRY ACTTRISNT
 1330     1340     1350     1360     1370     1380
SQCNFVQRS KRALQFLRFL LEETELEKRI IVDOTSTQW KNHHKHLFST LTQDYNHE
 1390     1400     1410     1420     1430     1440
KGAIQTQPSL DCLTRSSHSIP QANRSPRLTA KVSSSFPSRP IYLTBLVFOQ NSSHLPAASY
 1450     1460     1470     1480     1490     1500
RKKDSGVQES SHFLQGAKRN NLSLAITL MTGDQREVGSS LGTSATNSVT YKKVENTVLP
 1510     1520     1530     1540     1550     1560
KPDLPFTSGK VELLPKVHII QKDLFPTTS NSGSHLQLDQ EGSLLIQQTEQ AIIKNNAAHR
 1570     1580     1590     1600     1610     1620
GKVPFLRVAE ESSARTPSKL LDPLAWNDH GTQIPKEMM SQERSPEKTA FKNNKDTIISL
 1630     1640     1650     1660     1670     1680
NACESHNRAA AINEGQNKEP IEVTWAKRGR TERLICSONPF VLRRHQRCIT RTTLQSDOCE
 1690     1700     1710     1720     1730     1740
IDYDPIITSV EKKREDEDIYD EDENQSPRFQ PQTNRHYYFIA AVERIWMQGNM SSSPHVLRN
 1750     1760     1770     1780     1790     1800
AQSGSVPQFV KVVFQEFDDC SFTQPLYNG ENERLGLLGP YIRAEVEENNI MVTFRNQASR
 1810     1820     1830     1840     1850     1860
PYSFYSSLIS YEQDQRQAS PRNFENVKRNE TTYTFWKVQH NHAPTXKDEO CKAWAYFSDV

```

【图 8 - 14】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00451

<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/protein/aa=P00451>

```

 1870      1880      1890      1900      1910      1920
DLEKDWHSGL IGPILLWCHTN TINPNAGROV TVQETALIFTY IFDETWSKYY TENNERCRKA
 1930      1940      1950      1960      1970      1980
FCNICHEDPT FRENEYTHAI NGYIMOTLG LVMAQDORIA WYLLSNGSRE NHSHINPSGH
 1990      2000      2010      2020      2030      2040
VFTVPRKEE KMALYNYLPG VFTEVMEHL KAGINRVECL IGENHLAGMS TLFVLYSNK
 2050      2060      2070      2080      2090      2100
QTPLGHASGR IRDFQITASG QYQQWAKPLA RLHYSGINA WSTKEPFSW1 KVDLARHII
 2119      2120      2130      2140      2150      2160
HGIKTOQARQ KFSSLYISQF IIIMYSLOGK WOTYRGNSTG TIMVFTGNDV SSGIKHNNIN
 2170      2180      2190      2200      2210      2220
PPIIARYIRL HPHTHSIRST LAMELMCGDL NSCSMPLGNE SNAISDQAQT ASSYETMMFA
 2230      2240      2250      2260      2270      2280
TWSPSKARLM LOGRSSNAWRP QVNNPPEWLI VOFQRTMVNTV GVTTQGVFSL LTSMYVKEI
 2290      2300      2310      2320      2330      2340
ISSSGDGHOW TLFONGKVK VEGOGNOSTI PVVNSLDPFL LTRYLHNPQ SWYQJALM
 2350
EVLGCEAQD Y

```

【图 9 - 1】

NiceProt View of SWISS-PROT: P12259

<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/protein/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: P12259

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 **F5_HUMAN**
 Primary accession number **P12259**
 Secondary accession number **Q14285**
 Entered in SWISS-PROT in **Release 12, October 1989**
 Sequence was last modified in **Release 28, February 1994**
 Annotations were last modified in **Release 40, October 2000**

Name and origin of the protein
 Protein name **COAGULATION FACTOR V [Precursor]**
 Synonym **ACTIVATED PROTEIN C COFACTOR**
 Gene name **F5**
 From **Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]**
 Taxonomy **Eukaryota; Metazoa; Chordata; Gnathostomata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominoidea; Homo**
 References

【图 9 - 2】

NiceProt View of SWISS-PROT: P12259

<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/protein/de>

[1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.

MEDLINE-#2232648; PubMed-#567832; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 C-type, B, Mammal, K-D, Human, W.H.,
 "Structure of the gene for human coagulation factor V.",
Biochemistry 31:3777-3785(1992).

[2] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.

MEDLINE-#8726086; PubMed-#3110773; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Jerry R.J., Pittman D.D., Taek J.J., Kriz R.W., Alzane R.A., Hewick R.M., Kaufman R.J., Mann K.A.,
 "Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V.",
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:4846-4850(1987).

[3] SEQUENCE OF 1-600 FROM NUCLEIC ACID.

MEDLINE-#8631364; PubMed-#187731; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Kase W.H., Ichimura A., Hagen F.S., Davis E.W.,
 "Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats.",
Biochemistry 26:6503-6514(1987).

[4] SEQUENCE OF 1188-1215 AND 1215-2274 FROM NUCLEIC ACID.

MEDLINE-#8631364; PubMed-#3092220; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Kase W.H., Davis E.W.,
 "Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin.",
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:6803-6804(1986).

[5] PARTIAL SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.

TISSUE-Fibroblast
 MEDLINE-#92303619; PubMed-#6454869; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Shen N.L., Fan S.-J., Piatl J., GmfP.R., Lapolla R.J., Edgington T.S.,
 "The serine protease cofactor V is synthesized by lymphocytes.",
J. Immunol. 150:2992-3001(1993).

[6] VARIANT APCR GLN-534.

MEDLINE-#94217810; PubMed-#8164741; [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Berins P.M., Koedinger B.P.C., Koster T., Rosendal F.R., Dirven R.J., de Ronde H., van der Velde P.A., Reijnsma P.H.,
 "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.",
Nature 369:64-67(1994).

Comments

- **FUNCTION:** COAGULATION FACTOR V IS A COFACTOR THAT PARTICIPATES WITH FACTOR XA TO ACTIVATE PROTHROMBIN TO THROMBIN.
- **SUBUNIT:** FACTOR V IS COMPOSED OF AN HEAVY CHAIN AND OF A LIGHT CHAIN NONCOVALENTLY BOUND. THE INTERACTION BETWEEN THE TWO CHAINS IS CALCIUM-DEPENDENT.
- **DOMAIN:** DOMAIN V CONTAINS 35 X 9 AA TANDEM REPEATS, AND 2 X 17 AA REPEATS.
- **PTM:** THROMBIN ACTIVATES FACTOR V PROTEOLYTICALLY TO THE ACTIVE COFACTOR, FACTOR V (A).
- **DISEASE:** OWEN PARAHEMOPHILIA, AN HEMORRHAGIC DIABESIS, IS DUE TO A DEFICIENCY OF FACTOR V. OTHER DEFECTS IN F5 RESULTS IN A FORM OF THROMBOPHILIA KNOWN AS APC RESISTANCE (APCR). THE APCR MUTATION IS FOUND IN ABOUT 5% OF THE POPULATION WHICH SUGGEST THAT A SLIGHT THROMBOTIC TENDENCY MAY CONFER SOME ADVANTAGE IN FETAL IMPLANTATION.
- **SIMILARITY:** CONTAINS 3 F5&8 TYPE A DOMAINS; EACH IS COMPOSED OF 2 PLASTOCYANIN-LIKE REPEATS.
- **SIMILARITY:** CONTAINS 2 F5&8 TYPE C DOMAINS.
- **SIMILARITY:** STRONG, TO COAGULATION FACTOR VIII.

Copyright

This SWISS-PROT entry was developed at the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL Bioinformatics European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its use by non-profit institutions as long as it is not in a way modified and that statement is not removed. Usage by and/or commercial entities requires a license agreement (See <http://www.isb-sib.ch/announce/> or send an email to license@isb-sib.ch).

Cross-references

【図9-3】

NicePep View of SWISS-PROT: P12259

http://www.ebi.ac.uk/ebi-sparc-search-de

L32779; AAB59401.; - [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32755; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32756; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32757; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32758; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32759; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32760; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32761; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32762; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32763; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32764; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32765; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32766; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 EMBL
 L32767; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32768; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32769; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32770; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32771; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32772; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32773; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32774; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32775; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32776; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32777; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 L32778; AAB59401.; JOINED [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 M16967; AA-S52424.; - [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)
 M14335; AA-B59532.; - [EMBL / GenBank / DDBJ] (CoDingSequence)

A25997; A25997.

A28028; A28028.

HSSP P00450-1KCV, HSSP ENTRY / PDB

134400 [NCBI / EBI].

188055 [NCBI / EBI].

227210 [NCBI / EBI].

227400 [NCBI / EBI].

GeneCards ES

IPR001117: Cu-oxidase

IPR000421: FA58_C

Graphical view of domain structure.

Pfam PF00394: Cu-oxidase_3

PF00754: FS_FX_type_C_2

SMART SM00231: FA58C_2

P500070-MULTICOPPER_OXIDASE1_2

P501385: FA58C_1_2

P501286: FA58C_2_2

ProDom [Domain structure / List of seq. sharing at least 1 domain].

BLOCKS P12259

DOMO P12259

ProtoMap P12259

PRESAGE P12259

DIP P12259

SWISS-2DPAGE GET REGION ON 3D 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.

【図9-4】

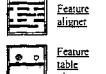
NicePep View of SWISS-PROT: P12259

http://www.ebi.ac.uk/ebi-sparc-search-de

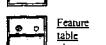
PEPTIDE 738 1573 836 ACTIVATION PEPTIDE.
 DOMAIN 1574 2224 651 CONNECTING REGION.
 DOMAIN 30 329 300 LIGHT CHAIN.
 DOMAIN 30 193 164 PLASTOCYANIN-LIKE 1.
 DOMAIN 203 328 127 PLASTOCYANIN-LIKE 2.
 DOMAIN 348 684 337 PLASTOCYANIN-LIKE 3.
 DOMAIN 348 526 179 PLASTOCYANIN-LIKE 4.
 DOMAIN 516 684 149 B.
 DOMAIN 692 1573 882 2 x 17 AA TANDEM REPEATS.
 REPEAT 895 928 34 1.
 REPEAT 912 928 17 2.
 SIMILAR 1135 1148 14 TO 14 AA REPEATS IN BOVINE FAS.
 DOMAIN 1185 1463 279 11 AA TANDEM REPEATS OF FAS.
 DOMAIN 1185 1463 279 [TYP 8-5-5-5-C-L-5-Q-T] (APPROXIMATE).

REPEAT 1185 1193 9 1.
 REPEAT 1194 1202 9 2.
 REPEAT 1203 1211 9 3.
 REPEAT 1212 1220 9 4.
 REPEAT 1221 1229 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 1328 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 1392 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 1897 330 F5/8 TYPE A 3.
 DOMAIN 1578 1751 174 PLASTOCYANIN-LIKE 5.
 DOMAIN 1761 1930 155 PLASTOCYANIN-LIKE 6.
 DOMAIN 1907 2061 155 F5/8 TYPE C 1.
 DOMAIN 2066 2221 156 F5/8 TYPE C 2.
 SITE 737 738 2 CLEAVAGE (BY THROMBIN).
 SITE 1046 1047 2 CLEAVAGE (BY THROMBIN).
 SITE 1573 1574 2 CLEAVAGE (BY THROMBIN).
 DISGOLPID 167 193 PROBABLE.



feature



table

viewer

【図9-5】

NicePep View of SWISS-PROT: P12259

http://www.ebi.ac.uk/ebi-sparc-search-de

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.

【図9-6】

NicePep View of SWISS-PROT: P12259

http://www.ebi.ac.uk/ebi-sparc-search-de

70 80 90 100 110 120
 FPKIVKVRPE PFPKRPKPSF TISCLQPLFI YAEVGDTIKV HFKNAQEL SISPOQIYS
 130 140 150 160 170 180
 KLSKEGASLT KTFPAEKMD AVAPGREGTY ENSISEDGP TMDDPPCLTH ITYSHENLIT
 190 200 210 220 230 240
 DFNSQLGPL LICKERGLTLL GGTQKTFPQK IVLLFAVFDIE SISWSQSSIEL MYTONGYNG
 250 260 270 280 290 300
 TMFDITVCAH CRISWHLGM SSGPFLSISI FNQVLEONH HFKSAITLVS ATSTTANMV
 310 320 330 340 350 360
 GPEGHNWLN LTFRKLQAG QAYIQNCPK KETRNLEKIT REQRHMHNKX EYIFIAAEVI
 370 380 390 400 410 420
 WDYAFVIPAN MKCKYKHSNL DNFNSQNIGER YKVKVYTOYE DESITKHTVN PNMKEDGIG
 430 440 450 460 470 480
 PIIRAQVRYL KLVIFVNNNAS RYPSLYPHOV TFSFVYEDVN SSFTSGRANN MIRAVQPGET
 490 500 510 520 530 540
 YYTKWNLLER DEPTENDAACQ LTRPYSVSDV IMDIASGLI GLLICKSRS LDRRGIGRAA
 550 560 570 580 590 600
 DSEQQVANF PDEENSYWHL UNINKCEPEN DEVERDDEDEF YEINSMINTN GYVFESITTL
 610 620 630 640 650 660
 GPCFDOTVNV HFCSVQTNM ILTINTHTGRY FITYGRKHEY LTLFFHNGRS VTVTMNDVGT
 670 680 690 700 710 720
 WMLTSNHS SRSKELALR DVKCTIPDDE DSYELIFPFPE STVMTRHHM DRLEPDEDES
 730 740 750 760 770 780
 DADYDYNKL AAAAGLCTRSFR NSISLGEDEE INITAALALN CTEFVSNISI IIIVGSNYSF
 790 800 810 820 830 840
 SNISKEFTVN LAEPKAQASH QOATTAGSYL RHLIGKNSVL NSSTAEMNSP YSEDFIEDPL
 850 860 870 880 890 900
 QPDVTGIRL SLGAGETFSQ ERAKHKGPKV ERDQAQAHRF SWMKLALLHV GRWLSQOTGS
 910 920 930 940 950 960
 PFGHRPWEQ PSQQTGSPSR MRPKDPPFSQ LLLLQNSNS KILVGNHHLA SEKGSEYLII
 970 980 990 1000 1010 1020
 TDGDDTAVNN WLSFQPNASR ANGSTEPPLAN KPGKOSGHPK FPRVWJHSQ VRQDGKRS
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 KESQFLIKTR KKEKWTNH APLSPRTFHP LASEAYNTFS ERLKASLVL HKSNETSLT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 DNLQTLPSHD FGWJASLPPH NONSSNCGC ASCCPGFLYGT VPPEMYGTT PIQQPDQMS
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TSQDSNHRSS PELSEMLEYD RSMSKFPTDI 5QMSPSSEN VNQTVISPL SQVTLSPFSL
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 QTNLSPDLH TTLSPLGSLP NLSRAGLQMP ISPDLSHTTL SPDLQHTLIS LQLSQTNLSP
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 ELSQTNLSPA LQOMPLSPLD SHTLSLQFS QTNLSPFLSH NLSPQELGT NLSPQLMQF
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

[FIG 9 - 7]

NiceProt View of SWISS-PROT: P12259

<http://www.ebi.ac.uk/swiss-prot-search/de>

```

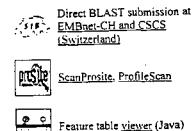
ISPDLSHTTL SLOFSQTNLS PELSQTNLSF ALGQMLPISD PSHTTISLSD SQTNLSPSLS
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
DISDTLLPQD LSQISPPOL DQIYPSSESS QSLLQEFNIE SFVYPSQGM PSPSPFTIND
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
TFLSKENPL VIVGSLKDG DYEILIPKEE VQSSEDYVAQ IDYVYVDPY KTVQWTHINS
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
SRDPDNTAAW YLNNSQNNR NYIIAAEETIS WDSSEVQWD TQIEDSDIF EDITYKKVVY
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
RAYLQSTTIX RDPPGEYED LGLLGPIRA EVDDVIGVRK KNLSARPVSL HANGLSYEKS
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
SEGKVEDOS PEWFRENAV QPNSSYTIVW HATERSGFES PGSCRAMM VSAYNPKECI
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
HSGLIGPELL CQKGILHKS NHMWDVRFIV LLNFPTDFERK SWYTYEKKRS SWRLTSSSENK
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
KSHFHAIAG MIYSLPGLEM YCQEWRVHL UNIGQSGQIN VVMMHGCTT ENGRKQHOLG
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
VWFLPLPGSKR TLEMMASKEF QWLNLNTVEGK NQAGMGTQPF LIIMDQCRHF MGLGTYGIIISD
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
SQKASEPLG YHPEPLAUN NGGSYNNASY ELKARFAKSF PWIQUYDQKVI VIITGJOTQG
 1980 2000 2010 2020 2030 2040
 1980 2000 2010 2020 2030 2040
AKHLYLASCY TCTYVQHNS QCNWQIYKHN STRNWYING NSUASITKQ QDFPPIVARY
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
TRISPRVTP RPTMLEROG CEVNCGCSTPL GMENGKIEKN QITASSKHSW WGGDWEPFR
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
ARLNAGQRN AMQAKANNNK QMLEIDLKKI KXITAIYIQG CKSLSSEMIVY KXYTINYEQ
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
GVEWPEYRKL SSMVUDKIFEG NTNTKGKVKN FFNNPEIISRF IRVIPKTWNQ SITLRLFEG

```

CDIY

P12259 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 NCBI (Bethesda USA)
 Tools Sequence analysis tools: ProtParam, ProtScale, Compute pI/Mw, PeptideMass, Dotel (Java)
 Feature table viewer (Java)
 Search the SWISS-MODEL Repository

[FIG 10 - 2]

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

<http://www.ebi.ac.uk/swiss-prot-search/de>

chloromethylketones and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment";
 EMBO J 7:467-473(1988).

[7] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.3 ANGSTROMS).
 MEDLINE=9030354; PubMed=374926; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Koval J., Blanckenhorn K.G., Talantov A., Boden W., Huber R., Reitsch C., Fenlon 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=943150942; PubMed=8071320; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Rydel T.J., Yin M., Padmanabhan K.P., Blanckenhorn D.T., Cardini A.D., Correa P.E., Fenlon J.W. II, Tulinsky A.;
 "Crystallographic structure of human gamma-thrombin";
J. Biol. Chem. 269:2200-2206(1994).

[9] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.3 ANGSTROMS).
 MEDLINE=9735726; PubMed=921465; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 van de Loeth A., Boden W., Huber R., le Bonnec B.E., Stone S.R., Eason C.L., Stubbs M.T.;
 "The thrombin E192-Q193-PTI 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 32B-601.
 MEDLINE=97162521; PubMed=1005158; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Guinot F.R., Caselli G., L'Fauze L., Fuentes K., Walker G., di Cesare E.;
 "Unusual differential role of residue 725 in serine proteases";
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1857-1857(1999).

[11] VARIANT BARCELONA.
 MEDLINE=87035739; PubMed=3771562; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Robert M.J., Euzé B.C., Euzé B.;
 "Molecular defect of prothrombin Barcelonina. 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]
 Deen S.J.E., McDowell S.A., Sparks M., Scharrer L.;
 "Prothrombin Frankfurt: a dysfunctional prothrombin characterized by substitution of Glu-466 by Ala";
Thromb. Haemost. 73:203-209(1995).

[13] VARIANT HIM-1 AND HIM-2.
 MEDLINE=93043342; PubMed=1421398; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Morishita I., Saito M., Kumagai H., Asakura H., Matsuda T., Yamaguchi K.;
 "Prothrombin Him-1: a compound hemizygote for two dysfunctional prothrombin molecules (Met-337--Ter and Arg-385-->His)";
Blood Coagul. Fibrinolysis 5:841-844(1994).

[14] VARIANT PADUA.
 MEDLINE=94169980; PubMed=7865694; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Janni L., Kim D.J., Zheng D.-Q., Grotzki A.;
 "Prothrombin Padua: incomplete activation due to an amino acid substitution at a factor Xa cleavage site";
Blood Coagul. Fibrinolysis 5:841-844(1994).

[15] VARIANT QUICK-I.
 MEDLINE=89207504; PubMed=3242619; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Henrikens R.A., Mann K.G.;
 "Identification of the primary structural defect in the dystrombin thrombin Quick I: substitution of cysteine for arginine-382";
Biochemistry 27:9160-9165(1988).

[16] VARIANT QUICK-II.
 MEDLINE=89247398; PubMed=2719946; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Henrikens R.A., Mann K.G.;
 "Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dystrombin thrombin Quick II alters primary substrate specificity";
Biochemistry 28:778-2802(1989).

[17] VARIANT SALAKTA.
 MEDLINE=94169985; PubMed=354985; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Mizuta I., Amagi R., Umezawa H., Pezzetta A., Guillen 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).

[FIG 10 - 1]

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

<http://www.ebi.ac.uk/swiss-prot-search/de>

[ExPASy Home page](#) | [Site Map](#) | [Search ExPASy](#) | [Contact us](#) | [SWISS-PROT](#)

Hosted by SIR Switzerland | Mirror sites: Australia Canada China Korea Taiwan

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

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 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 3.4.2.15 COAGULATION FACTOR II
 Gene name F2
 From Homo sapiens (Human) [TaxID: 9606]
 Taxonomy Eukaryota: Metazoa: Chondro: Craniota: Vertebrata: Euteleostomi: Mammalia: Eutheria: Primates: Catarrhini: Hominoidea: Homo.

References

- [1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID. MEDLINE=88077877; PubMed=2825773; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Degen S.J., David E.W.; "Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin"; *Biochemistry* 26:6165-6177(1987).
- [2] SEQUENCE OF E-622 FROM NUCLEIC ACID. MEDLINE=82231469; PubMed=6310407; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Degen S.J., McGillivray R.J.A., David E.W.; "Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin"; *Biochemistry* 22:2087-2097(1983).
- [3] SEQUENCE OF E-4114. MEDLINE=77193944; PubMed=266717; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Walz D.A., Heinzl-Emmert D., Serets W.H.; "Amino acid sequence of human prothrombin fragments I and II"; *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]
 Burkowski R.J., Elton J., Downing M.B., Mann K.C.; "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]
 Kashi M., Blanckenhorn D., Rydel T.J.; "Prothrombin fragment 1, 2 & 3, a major product of prothrombin activation in human plasma"; *J. Biol. Chem.* 261:1310-1315(1986).
- [6] X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (1.9 ANGSTROMS). MEDLINE=90059942; PubMed=2583108; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Bode W., Marx J., Baumann J., Huber R., Stane S.R., Holstene L.; "The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg".

[FIG 10 - 3]

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

<http://www.ebi.ac.uk/swiss-prot-search/de>

[18] VARIANT TOKUSHIMA. MEDLINE=87193944; PubMed=2667158; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Mizuta I., Morita T., Inamoto T., Kawachi S., Shikami A., Iwanaga S.; "Prothrombin Tokushima, a replacement of arginine-418 by tyrosin that impairs the fibrinogen clotting activity of derived thrombin Tokushima"; *Biochemistry* 26:1117-1122(1987).

[19] VARIANT TOKUSHIMA. MEDLINE=8710151; PubMed=3801671; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Inamoto T., Shikami A., Kawachi S., Shigekido T., Saito S., Miyoshi K., Morita T., Iwanaga S.; "Prothrombin Tokushima: characterization of dysfunctional thrombin derived from a variant of human prothrombin"; *Biochem* 69:565-569(1987).

[20] VARIANT TOKUSHIMA. MEDLINE=92156895; PubMed=1349838; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Iwahashi H., Yoshimura T., Shirakami A., Saito S., Iwakura M.; "Detection of a single base substitution of the gene for prothrombin Tokushima. The application of PCR for the genetic and molecular analysis of dysprothrombinemia"; *Int. J. Hematol.* 55:93-100(1992).

[21] VARIANT TYPE-3. MEDLINE=87004687; PubMed=6405779; [NCBI ExPASy, EBI, Israel, Japan]
 Board P.G., Shm' 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 DYSFIBRINOGENEMIA.
- **MISCELLANEOUS:** PROTHROMBIN IS ACTIVATED ON THE SURFACE OF A PHOSPHOLIPID MEMBRANE THAT BINDS THE AMINO END OF PROTHROMBIN & FACTORS V & 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 copyrighted. It is produced through a collaboration between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EBI, part of 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 and/or commercial entities requires a license agreement (see <http://www.ebi.ac.uk/licensing/>) or send an email to license@ebi.ac.uk.

Cross-references

EMBL M1726; AAC63045.; - [EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]
 V00595; CAA23842.; - [EMBL / GenBank / DDBJ] [CoDingSequence]

【図10-4】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

PIR	A00914; TBHU. A29351; A29351. IDWB; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] IDWC; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] IDWD; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] IDWE; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 3HAT; 27-FEB-95. [ExPASy / RCSB] 1HGT; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 2HGT; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 1AB1; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 1AB1; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 1AD8; 12-NOV-97. [ExPASy / RCSB] 1AE8; 03-DEC-97. [ExPASy / RCSB] 1AF6; 03-DEC-97. [ExPASy / RCSB] 1AH7; 17-MAR-96. [ExPASy / RCSB] 1AB8; 15-OCT-97. [ExPASy / RCSB] 1AX1; 15-OCT-97. [ExPASy / RCSB] 1BMM; 07-DEC-96. [ExPASy / RCSB] 1BMN; 07-DEC-96. [ExPASy / RCSB] 1DT1; 10-JUN-96. [ExPASy / RCSB] 1FPC; 27-FEB-95. [ExPASy / RCSB] 1HAG; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB] 1HAH; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB] 1HAL; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB] 1HDT; 15-OCT-95. [ExPASy / RCSB] 1HAO; 03-APR-96. [ExPASy / RCSB] 1HAP; 03-APR-96. [ExPASy / RCSB] 1HB7; 10-JUL-95. [ExPASy / RCSB] 1HL7; 20-DEC-94. [ExPASy / RCSB] 2HNT; 10-NOV-94. [ExPASy / RCSB] 1HUT; 22-JUN-94. [ExPASy / RCSB] 3HTC; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 4HTC; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 1HDX; 08-NOV-96. [ExPASy / RCSB] 1HXF; 27-JAN-97. [ExPASy / RCSB] 1HS; 31-JAN-94. [ExPASy / RCSB] 1HT1; 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; 05-MAY-94. [ExPASy / RCSB] INRN; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB] INRO; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB] INRP; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB] INRQ; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB] INRR; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB] INRS; 31-MAY-94. [ExPASy / RCSB] IPPB; 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]
-----	---

【図10-5】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

1AY6; 18-MAR-98. [ExPASy / RCSB] 1A4W; 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] 1AB3; 03-JUN-98. [ExPASy / RCSB] 1A3E; 03-JUN-98. [ExPASy / RCSB] 1ASG; 27-MAY-98. [ExPASy / RCSB] 1BHX; 02-JAN-99. [ExPASy / RCSB] 1BTX; 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] 1BB0; 27-APR-99. [ExPASy / RCSB]
--

MEROPS S01217-.

SWISS-2DPAGE P00734; HUMAN.

MIM 176930 [NCBI / EBI].

GeneCards E2.

InterPro IPR001314; Chymotrypsin.

IPR002383; GLA blood.

IPR000001; Kringle.

IPR001754; Trypsin.

IPR000724; VitK dependent GLA.

Graphical view of domain structure.

Pfam PF00594; gln_L.

PF00031; kringle_2.

PF00099; trypsin_1.

PR000091; GLA blood.

PR000118; KRINGLE.

PR00722; CHYMOTRYPSIN.

SM00699; GLA_1.

SMART SMART.

SM00029; TSPN_SPc_1.

PS00011; GLU CARBOXYLATION_1.

PS00021; KRINGLE_1_2.

PS00320; KRNGLE_2_2.

PS02420; TRYPSIN_DOM_1.

PS00144; TRYPSIN HIS_1.

PS00135; TRYPSIN SER_1.

ProDom [Domain structure / List of seq sharing at least 1 domain].

BLOCKS P00734.

DOMO P00734.

ProtoMap P00734.

PRESAGE P00734.

DIP P00734.

Features [Features]

Key From To Length Description

SIGNAL 1 24 24 POTENTIAL.

PROPEP 25 43 19

http://www.expasy.ch/cbcp-bis/spot-search-de

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

http://www.expasy.ch/cbcp-bis/spot-search-de

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	183	I -> T (IN REF. 3).
CONFLICT	184	195	AM -> MV (IN REF. 3).
CONFLICT	308	308	D -> DES (IN REF. 3).
CONFLICT	335	335	D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT	349	349	D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT	369	369	D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT	398	398	D -> N (IN REF. 4).
CONFLICT	414	414	D -> N (IN REF. 3).
CONFLICT	405	405	D -> N (IN REF. 3).
CONFLICT	454	454	O -> G (IN REF. 3).
CONFLICT	504	504	W -> Y (IN REF. 3).
CONFLICT	509	509	E -> S (IN REF. 4).
CONFLICT	511	511	W -> V (IN REF. 4).
CONFLICT	514	514	N -> D (IN REF. 3).
CONFLICT	529	530	PI -> AL (IN REF. 3).
CONFLICT	532	532	E -> Q (IN REF. 3).
TURN	376	377	2
TURN	376	376	2
TURN	376	376	2
TURN	376	376	2
STRAND	365	365	1
STRAND	368	369	2
TURN	372	373	2
TURN	376	377	2
STRAND	378	383	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	449	10
TURN	451	452	2
STRAND	454	454	1
TURN	455	458	4
STRAND	460	460	1
STRAND	464	468	5
STRAND	475	475	1
TURN	476	477	2
STRAND	478	478	1
STRAND	482	482	1
HELIX	486	482	7
TURN	495	496	2
STRAND	498	503	6
TURN	510	511	2
STRAND	524	520	7
HELIX	522	528	6
TURN	529	539	1
TURN	546	547	2

Feature aligner

Feature table viewer

【図10-6】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00734

CHAIN	44	622	579	PROTHROMBIN.
PEPTIDE	44	198	155	ACTIVATION PEPTIDE (FRAGMENT 1).
PEPTIDE	199	327	129	ACTIVATION PEPTIDE (FRAGMENT 2).
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	198	199	2	CLEAVAGE (BY THROMBIN).
SITE	327	328	2	CLEAVAGE (BY FACTOR Xa).
ACT_SITE	406	406	1	CHARGE RELAY SYSTEM.
ACT_SITE	462	462	1	CHARGE RELAY SYSTEM.
ACT_SITE	566	566	1	CHARGE RELAY SYSTEM.
MOD_RES	45	49	49	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	50	50	50	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	57	57	57	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	58	58	58	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	62	62	62	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	63	63	63	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	68	68	68	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	69	69	69	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	72	72	72	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
MOD_RES	75	75	75	GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID.
CARBONYL	121	121	121	N-LINKED (GLCNAC...).
CARBONYL	143	143	143	N-LINKED (GLCNAc...).
CARBONYL	416	416	274	N-LINKED (GLCNAc...).
DISULFID	60	65	65	INTERCHAIN.
DISULFID	90	103	103	DISULFIDE.
DISULFID	108	186	186	DISULFIDE.
DISULFID	129	169	169	DISULFIDE.
DISULFID	157	181	181	DISULFIDE.
DISULFID	213	291	291	DISULFIDE.
DISULFID	234	274	274	DISULFIDE.
DISULFID	262	286	286	DISULFIDE.
DISULFID	316	482	482	DISULFIDE.
DISULFID	391	407	407	DISULFIDE.
DISULFID	536	550	550	BY SIMILARITY.
DISULFID	564	594	594	BY SIMILARITY.
VARIANT	200	300	200	R -> K (IN TYPE 3). DYSRTHROMBIN/MIA.
VARIANT	214	314	214	/T1dVAR_006711. R -> C (IN BARCELONA/MADRID).
VARIANT	214	314	214	DYSRTHROMBIN/MIA.
VARIANT	214	314	214	/T1dVAR_006712. R -> H (IN PAUCA-1).
VARIANT	214	314	214	DYSRTHROMBIN/MIA.
VARIANT	280	380	280	/T1dVAR_006713. M -> T (IN KINI-1).
VARIANT	314	314	314	DYSRTHROMBIN/MIA.
VARIANT	425	425	425	/T1dVAR_006714. R -> C (IN C-1).
VARIANT	431	431	431	DYSRTHROMBIN/MIA.
VARIANT	431	431	431	/T1dVAR_006715. R -> H (IN KINI-2).
VARIANT	461	461	461	DYSRTHROMBIN/MIA.
VARIANT	461	461	461	/T1dVAR_006716. R -> W (IN TOKUSHIMA).
VARIANT	509	509	509	DYSRTHROMBIN/MIA.

【図10-8】

Nicprot View of SWISS-PROT: P00734
http://www.ebi.ac.uk/swissprot-search-de

Strand information

STRAND	548	551	4
TURN	525	532	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	597	599	2
STRAND	601	603	5
HELIX	605	632	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: 8A2SE1DA85208FCF [This is a checksum on the sequence]

```

  10   20   30   40   50   60
MANVRGILGF GCLALAAALCS LVPNSQHVLV PQQNSSLQV VRRANTFLLE VRKGNNLIERC
  70   80   90   100  110  120
VEETICSYEEA FEALESSSTAN DVFVWAKYTAC ESTARTPRDE AACLEGGNCAS GLGTNYNRGHV
  130  140  150  160  170  180
NITRSGQIICU LWRSPRYHNAK EINSTTHPQA DLQENFCRNP DSSTTGFWPP TTDPTVRCQE
  190  200  210  220  230  240
GSIPVPGQDG VVTAMIFPSE GSSWNLSPLF EQCVFDQRGQQ YKGRLLAVTRH GLPCLNAGA
  250  260  270  280  290  300
QKALKSHQD FMSAQJQVEN PCRNDDOES GWVYVHAGER GOTYGVCDNY CEEAVKETG
  310  320  330  340  350  360
DGLDESDSRA IEGTATSEY QTTFNPFRTG SGEADCGLRP LFEEKSLDKT TERELLESYI
  370  380  390  400  410  420
DGRIVEGGSDA EIGMSPNQWV LPIKSPQELL CGASLISDRW VLTAAACNLIN PWDRKNTEN
  430  440  450  460  470  480
DLIVRIGKNS RTRYRNIKER ISMLERKIN PYRWNKRLND RDIALHKLKK PVAFPSYHNF
  490  500  510  520  530  540
VCLPDKMETAA SLLQAGYKGR VTGWHNLKET WTANVGKGQF SVLQVNLPV VERPVCKST
  550  560  570  580  590  600
AIRITONHFC AGYKPDQEGR GDACEGDGGF PFWXNSPENN RWYQNGIVSW GEGCDRDKY
  610  620
GFTYTHVFLK KWIQKVIDQF GE

```

P00734 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](#)

【図11-1】

Nicprot View of SWISS-PROT: P00748
http://www.ebi.ac.uk/swissprot-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 Blast® search

[General] [Name and origin] [References] [Comments] [Cross-references] [Keywords] [Features] [Sequenced] [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 1989

Name and origin of the protein

Protein name COAGULATION FACTOR XII (Precursor)
EC 3.4.2.18
Synonyms HAGEMAN FACTOR
HAF
Gene name F12
From Homo sapiens (Human) (TaxID: 9606)
Taxonomy Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrates; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominoidea; Homo
References

【図11-2】

Nicprot View of SWISS-PROT: P00748
http://www.ebi.ac.uk/swissprot-search-de

[1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=8807593; PubMed=2888762; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Coel D.E., McGillicuddy R.T.A.: "Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. Intron/exon gene organization and analysis of 5'-flanking region.", J. Biol. Chem. 262(12662-12671)(1987).

[2] SEQUENCE OF 4-615 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=8616049; PubMed=375431; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Trinodi M., Cittadella E., Guida S., Gallez P., Fantoni A., Cortese R.: "cDNA sequence coding for human coagulation factor XII (Hageman).", Nucl. Acids Res. 15:146-3146(1986).

[3] SEQUENCE OF 14-615 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=8603380; PubMed=3877053; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Coel D.E., Edell C.-J.S., Louis C.V., Zoller M.J., Braver G.D., McGillicuddy R.T.A.: "Characterization of human blood coagulation factor XII DNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XII.", J. Biol. Chem. 260(13666-13676)(1985).

[4] SEQUENCE OF 14-615 FROM NUCLEIC ACID.
MEDLINE=8621063; PubMed=301063; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Que B.G., Davis E.W.: "Characterization of cDNA coding for human factor XII (Hageman factor).", Biochemistry 22:523-532(1983).

[5] SEQUENCE OF 7-615.
MEDLINE=825674; PubMed=3886554; [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(5126-5131)(1985).

[6] SEQUENCE OF 561-615.
MEDLINE=8329104; PubMed=6604055; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Fujikawa K., McMullen B.A.: "Amino acid sequence of human beta-factor XIIa.", J. Biol. Chem. 258:10934-10933(1983).

[7] SEQUENCE OF 561-615 FROM NUCLEIC ACID.
TISSUE="Blood".
MEDLINE=96113302; PubMed=8528215; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Schloesser M., Hofferber S., Bartz U., Lutze G., Lamme B., Engel W.: "The novel acceptor splice site mutation 1139G>A in factor XII gene causes a truncated transcript in cross-reacting material negative patients.", Hum. Mol. Genet. 4:1235-1239(1995).

[8] VARIANT WASHINGTON-109.
MEDLINE=9017878; PubMed=2510163; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Miyata T., Kawahara S.-I., Iwanaga S., Takashita I., Aihara B., 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).

[9] VARIANT LOCARNO.
MEDLINE=94125559; PubMed=8049413; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Hovinga J.K., Schaller J., Stricker H., Wuytewijn W.A., Furlan M., Laemmli B.: "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).

[10] CARBOHYDRATE-LINKAGE SITE THR-109.
MEDLINE=92184750; PubMed=1544894; [NCBI] ExPASy, EBI, Israel, Japan
Harris R.J., Line V.L., Spellman 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+Ile bonds and activates coagulation factors VII and XI.
- PTM: O- and N-glycosylated.

【図11-3】

Nicprot View of SWISS-PROT: P00748
http://www.ebi.ac.uk/swissprot-search-de

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 HMWK KININOGEN 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 © ExPASy 2009. All rights reserved. This SWISS-PROT entry is copyrighted. It is provided through a license agreement between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL. It is for internal distribution only. It may not be reproduced or released to others by any means, even if it is no longer in use, without the prior written permission of the copyright holder. Please do not remove this statement or send an email to license@lsib.ch

Cross-references

M31315: AAA70225; - [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]
M11723: AAA51986; - [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]
M17466: AAB59490; - [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]
M17464: AAB59490; JOINED. [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]
M17465: AAB59490; JOINED. [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]
M13147: AAA70224; - [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]
U17274: AAB1203; - [EMBL / GenBank / DDBJ / CdnaSequence]

PIR: A29411; KFHU12.
P07673; IDPO. [HSSP ENTRY / PDB]
S01_211; -
MEROPS: S01_211.
MIM: 234000 [NCBI / EBI].
GeneCards: F12.

InterPro: IPR00111; Chymotrypsin.
IPR000561; EGF-like.
IPR000567; FN1_Type_I.
IPR00001; Kringle.
IPR001354; Trypsin.
IPR000083; fibronectin_type_I.
Graphical view of domain structure.
PF00008; EGF_3.
PF00039; FN1.
PF00042; FN2.
PF00053; FN3.
PF00054; FN4.
PF00055; FN5.
PF00056; FN6.
PF00057; FN7.
PF00058; FN8.
PF00059; FN9.
PF00060; FN10.
PF00061; FN11.
PF00062; FN12.
PF00063; FN13.
PF00064; FN14.
PF00065; FN15.
PF00066; FN16.
PF00067; FN17.
PF00068; FN18.
PF00069; FN19.
PF00070; FN20.
PF00071; FN21.
PF00072; FN22.
PF00073; FN23.
PF00074; FN24.
PF00075; FN25.
PF00076; FN26.
PF00077; FN27.
PF00078; FN28.
PF00079; FN29.
PF00080; FN30.
PF00081; FN31.
PF00082; FN32.
PF00083; FN33.
PF00084; FN34.
PF00085; FN35.
PF00086; FN36.
PF00087; FN37.
PF00088; FN38.
PF00089; FN39.
PF00090; FN40.
PF00091; FN41.
PF00092; FN42.
PF00093; FN43.
PF00094; FN44.
PF00095; FN45.
PF00096; FN46.
PF00097; FN47.
PF00098; FN48.
PF00099; FN49.
PF00100; FN50.
PF00101; FN51.
PF00102; FN52.
PF00103; FN53.
PF00104; FN54.
PF00105; FN55.
PF00106; FN56.
PF00107; FN57.
PF00108; FN58.
PF00109; FN59.
PF00110; FN60.
PF00111; FN61.
PF00112; FN62.
PF00113; FN63.
PF00114; FN64.
PF00115; FN65.
PF00116; FN66.
PF00117; FN67.
PF00118; FN68.
PF00119; FN69.
PF00120; FN70.
PF00121; FN71.
PF00122; FN72.
PF00123; FN73.
PF00124; FN74.
PF00125; FN75.
PF00126; FN76.
PF00127; FN77.
PF00128; FN78.
PF00129; FN79.
PF00130; FN80.
PF00131; FN81.
PF00132; FN82.
PF00133; FN83.
PF00134; FN84.
PF00135; FN85.
PF00136; FN86.
PF00137; FN87.
PF00138; FN88.
PF00139; FN89.
PF00140; FN90.
PF00141; FN91.
PF00142; FN92.
PF00143; FN93.
PF00144; FN94.
PF00145; FN95.
PF00146; FN96.
PF00147; FN97.
PF00148; FN98.
PF00149; FN99.
PF00150; FN100.
PF00151; FN101.
PF00152; FN102.
PF00153; FN103.
PF00154; FN104.
PF00155; FN105.
PF00156; FN106.
PF00157; FN107.
PF00158; FN108.
PF00159; FN109.
PF00160; FN110.
PF00161; FN111.
PF00162; FN112.
PF00163; FN113.
PF00164; FN114.
PF00165; FN115.
PF00166; FN116.
PF00167; FN117.
PF00168; FN118.
PF00169; FN119.
PF00170; FN120.
PF00171; FN121.
PF00172; FN122.
PF00173; FN123.
PF00174; FN124.
PF00175; FN125.
PF00176; FN126.
PF00177; FN127.
PF00178; FN128.
PF00179; FN129.
PF00180; FN130.
PF00181; FN131.
PF00182; FN132.
PF00183; FN133.
PF00184; FN134.
PF00185; FN135.
PF00186; FN136.
PF00187; FN137.
PF00188; FN138.
PF00189; FN139.
PF00190; FN140.
PF00191; FN141.
PF00192; FN142.
PF00193; FN143.
PF00194; FN144.
PF00195; FN145.
PF00196; FN146.
PF00197; FN147.
PF00198; FN148.
PF00199; FN149.
PF00200; FN150.
PF00201; FN151.
PF00202; FN152.
PF00203; FN153.
PF00204; FN154.
PF00205; FN155.
PF00206; FN156.
PF00207; FN157.
PF00208; FN158.
PF00209; FN159.
PF00210; FN160.
PF00211; FN161.
PF00212; FN162.
PF00213; FN163.
PF00214; FN164.
PF00215; FN165.
PF00216; FN166.
PF00217; FN167.
PF00218; FN168.
PF00219; FN169.
PF00220; FN170.
PF00221; FN171.
PF00222; FN172.
PF00223; FN173.
PF00224; FN174.
PF00225; FN175.
PF00226; FN176.
PF00227; FN177.
PF00228; FN178.
PF00229; FN179.
PF00230; FN180.
PF00231; FN181.
PF00232; FN182.
PF00233; FN183.
PF00234; FN184.
PF00235; FN185.
PF00236; FN186.
PF00237; FN187.
PF00238; FN188.
PF00239; FN189.
PF00240; FN190.
PF00241; FN191.
PF00242; FN192.
PF00243; FN193.
PF00244; FN194.
PF00245; FN195.
PF00246; FN196.
PF00247; FN197.
PF00248; FN198.
PF00249; FN199.
PF00250; FN200.
PF00251; FN201.
PF00252; FN202.
PF00253; FN203.
PF00254; FN204.
PF00255; FN205.
PF00256; FN206.
PF00257; FN207.
PF00258; FN208.
PF00259; FN209.
PF00260; FN210.
PF00261; FN211.
PF00262; FN212.
PF00263; FN213.
PF00264; FN214.
PF00265; FN215.
PF00266; FN216.
PF00267; FN217.
PF00268; FN218.
PF00269; FN219.
PF00270; FN220.
PF00271; FN221.
PF00272; FN222.
PF00273; FN223.
PF00274; FN224.
PF00275; FN225.
PF00276; FN226.
PF00277; FN227.
PF00278; FN228.
PF00279; FN229.
PF00280; FN230.
PF00281; FN231.
PF00282; FN232.
PF00283; FN233.
PF00284; FN234.
PF00285; FN235.
PF00286; FN236.
PF00287; FN237.
PF00288; FN238.
PF00289; FN239.
PF00290; FN240.
PF00291; FN241.
PF00292; FN242.
PF00293; FN243.
PF00294; FN244.
PF00295; FN245.
PF00296; FN246.
PF00297; FN247.
PF00298; FN248.
PF00299; FN249.
PF00300; FN250.
PF00301; FN251.
PF00302; FN252.
PF00303; FN253.
PF00304; FN254.
PF00305; FN255.
PF00306; FN256.
PF00307; FN257.
PF00308; FN258.
PF00309; FN259.
PF00310; FN260.
PF00311; FN261.
PF00312; FN262.
PF00313; FN263.
PF00314; FN264.
PF00315; FN265.
PF00316; FN266.
PF00317; FN267.
PF00318; FN268.
PF00319; FN269.
PF00320; FN270.
PF00321; FN271.
PF00322; FN272.
PF00323; FN273.
PF00324; FN274.
PF00325; FN275.
PF00326; FN276.
PF00327; FN277.
PF00328; FN278.
PF00329; FN279.
PF00330; FN280.
PF00331; FN281.
PF00332; FN282.
PF00333; FN283.
PF00334; FN284.
PF00335; FN285.
PF00336; FN286.
PF00337; FN287.
PF00338; FN288.
PF00339; FN289.
PF00340; FN290.
PF00341; FN291.
PF00342; FN292.
PF00343; FN293.
PF00344; FN294.
PF00345; FN295.
PF00346; FN296.
PF00347; FN297.
PF00348; FN298.
PF00349; FN299.
PF00350; FN300.
PF00351; FN301.
PF00352; FN302.
PF00353; FN303.
PF00354; FN304.
PF00355; FN305.
PF00356; FN306.
PF00357; FN307.
PF00358; FN308.
PF00359; FN309.
PF00360; FN310.
PF00361; FN311.
PF00362; FN312.
PF00363; FN313.
PF00364; FN314.
PF00365; FN315.
PF00366; FN316.
PF00367; FN317.
PF00368; FN318.
PF00369; FN319.
PF00370; FN320.
PF00371; FN321.
PF00372; FN322.
PF00373; FN323.
PF00374; FN324.
PF00375; FN325.
PF00376; FN326.
PF00377; FN327.
PF00378; FN328.
PF00379; FN329.
PF00380; FN330.
PF00381; FN331.
PF00382; FN332.
PF00383; FN333.
PF00384; FN334.
PF00385; FN335.
PF00386; FN336.
PF00387; FN337.
PF00388; FN338.
PF00389; FN339.
PF00390; FN340.
PF00391; FN341.
PF00392; FN342.
PF00393; FN343.
PF00394; FN344.
PF00395; FN345.
PF00396; FN346.
PF00397; FN347.
PF00398; FN348.
PF00399; FN349.
PF00400; FN350.
PF00401; FN351.
PF00402; FN352.
PF00403; FN353.
PF00404; FN354.
PF00405; FN355.
PF00406; FN356.
PF00407; FN357.
PF00408; FN358.
PF00409; FN359.
PF00410; FN360.
PF00411; FN361.
PF00412; FN362.
PF00413; FN363.
PF00414; FN364.
PF00415; FN365.
PF00416; FN366.
PF00417; FN367.
PF00418; FN368.
PF00419; FN369.
PF00420; FN370.
PF00421; FN371.
PF00422; FN372.
PF00423; FN373.
PF00424; FN374.
PF00425; FN375.
PF00426; FN376.
PF00427; FN377.
PF00428; FN378.
PF00429; FN379.
PF00430; FN380.
PF00431; FN381.
PF00432; FN382.
PF00433; FN383.
PF00434; FN384.
PF00435; FN385.
PF00436; FN386.
PF00437; FN387.
PF00438; FN388.
PF00439; FN389.
PF00440; FN390.
PF00441; FN391.
PF00442; FN392.
PF00443; FN393.
PF00444; FN394.
PF00445; FN395.
PF00446; FN396.
PF00447; FN397.
PF00448; FN398.
PF00449; FN399.
PF00450; FN400.
PF00451; FN401.
PF00452; FN402.
PF00453; FN403.
PF00454; FN404.
PF00455; FN405.
PF00456; FN406.
PF00457; FN407.
PF00458; FN408.
PF00459; FN409.
PF00460; FN410.
PF00461; FN411.
PF00462; FN412.
PF00463; FN413.
PF00464; FN414.
PF00465; FN415.
PF00466; FN416.
PF00467; FN417.
PF00468; FN418.
PF00469; FN419.
PF00470; FN420.
PF00471; FN421.
PF00472; FN422.
PF00473; FN423.
PF00474; FN424.
PF00475; FN425.
PF00476; FN426.
PF00477; FN427.
PF00478; FN428.
PF00479; FN429.
PF00480; FN430.
PF00481; FN431.
PF00482; FN432.
PF00483; FN433.
PF00484; FN434.
PF00485; FN435.
PF00486; FN436.
PF00487; FN437.
PF00488; FN438.
PF00489; FN439.
PF00490; FN440.
PF00491; FN441.
PF00492; FN442.
PF00493; FN443.
PF00494; FN444.
PF00495; FN445.
PF00496; FN446.
PF00497; FN447.
PF00498; FN448.
PF00499; FN449.
PF00500; FN450.
PF00501; FN451.
PF00502; FN452.
PF00503; FN453.
PF00504; FN454.
PF00505; FN455.
PF00506; FN456.
PF00507; FN457.
PF00508; FN458.
PF00509; FN459.
PF00510; FN460.
PF00511; FN461.
PF00512; FN462.
PF00513; FN463.
PF00514; FN464.
PF00515; FN465.
PF00516; FN466.
PF00517; FN467.
PF00518; FN468.
PF00519; FN469.
PF00520; FN470.
PF00521; FN471.
PF00522; FN472.
PF00523; FN473.
PF00524; FN474.
PF00525; FN475.
PF00526; FN476.
PF00527; FN477.
PF00528; FN478.
PF00529; FN479.
PF00530; FN480.
PF00531; FN481.
PF00532; FN482.
PF00533; FN483.
PF00534; FN484.
PF00535; FN485.
PF00536; FN486.
PF00537; FN487.
PF00538; FN488.
PF00539; FN489.
PF00540; FN490.
PF00541; FN491.

【図11-4】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

DUMU 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; Zincogen; 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	354	362	9	BETA-FACTOR XIIA PART 1.
CHAIN	373	615	243	BETA-FACTOR XIIA PART 2.
DOMAIN	47	98	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	295	79	KRINGLE.
DOMAIN	296	349	54	PRO-RICH.
DOMAIN	373	615	243	SERINE PROTEASE.
CARBONYL	109	109	0	O-LINKED (FOC).
CARBONYL	243	249	6	N-LINKED (GlcNAc...).
CARBONYL	299	299	0	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBONYL	305	305	0	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBONYL	308	309	1	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBONYL	328	328	0	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBONYL	329	329	0	O-LINKED (POTENTIAL).
CARBONYL	337	337	0	O-LINKED (POTENTIAL).
ACT_SITE	412	412	0	CHARGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	461	461	0	CHARGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
ACT_SITE	563	563	0	CHARGE RELAY SYSTEM (BY SIMILARITY).
DISULFID	98	130	32	BY SIMILARITY.
DISULFID	104	139	35	BY SIMILARITY.
DISULFID	121	130	-9	BY SIMILARITY.
DISULFID	135	163	28	BY SIMILARITY.
DISULFID	161	170	9	BY SIMILARITY.
DISULFID	178	189	12	BY SIMILARITY.
DISULFID	183	198	16	BY SIMILARITY.
DISULFID	200	209	10	BY SIMILARITY.
DISULFID	217	295	78	BY SIMILARITY.
DISULFID	238	277	40	BY SIMILARITY.
DISULFID	266	290	24	BY SIMILARITY.
DISULFID	319	496	177	BY SIMILARITY.
DISULFID	397	413	17	BY SIMILARITY.
DISULFID	405	475	70	BY SIMILARITY.
DISULFID	426	439	14	BY SIMILARITY.
DISULFID	500	569	70	BY SIMILARITY.
DISULFID	532	548	17	BY SIMILARITY.
DISULFID	559	590	31	BY SIMILARITY.
VARIANT	272	372	0	R > P (IN LOCARNO; INACTIVE); /FT16-VAL_006623. C > S (IN WASHINGTON DC; INACTIVE); /FT16-VAL_006624. P > S (IN REF. 3).
CONFLICT	333	333	0	

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

【図11-5】

NiceProt View of SWISS-PROT: P00748

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

CONFLICT 479 579 A -> G (IN REF. 3).
 CONFLICT 588 589 G -> R (IN REF. 2).

Sequence information

Length: 615 AA [This is the Molecular weight: 67818 Da
 length of the unprocessed [This is the MW of the
 precursor] unprocessed precursor]

10 20 30 40 50 60
 MRALLLGLF LVSLESTLSI PPWEAKPERK YKAEHTTVV TVTGEPCMFY PQYHQLYHK

70 80 90 100 110 120
 CTNKRGPFGPFW PCATTCINPFD QDQRQCYCLE PRVKRDHCMS HSPFCQKGCGV VNNMPSGPML

130 140 150 160 170 180
 CPQEATGNCN QKRECTEPFL LAFTHKHEWV YTKDQAAVAR CCKCPCDHC QHLASQACRT

190 200 210 220 230 240
 NPCLHGGRCR EVEGRHLCHC PVGTYGPFCD VDTFRASCYDG RGLSYRGRL TLTLSGAPCP

250 260 270 280 290 300
 WASEATYKNT TAEQABUNWGLI GHGAFCRNPFD NDIFPWCVIL NADRLSWEYC DLACQCFPTO

310 320 330 340 350 360
 ARPPTFVSPR LMVPLMHPAQ APPRKPPPTA TFPQSQTFGA LPKARAEQFFS LTRNGPLSCG

370 380 390 400 410 420
 ORLRKSLISL TRVUGGLVL RGARYVIAAL YNGHSFCAGI LIAPCWVLT AMLCQLQRPAP

430 440 450 460 470 480
 EDLTVVLLQE RHNKSCPEPQ TLAVSFSYLK EAFFPVSYQD DLLLRLQED AGSCSALSF

490 500 510 520 530 540
 YVQFVCLSG AARPSETTCI QVAGWGHQFE GAEEYASFLG EAQVFVFLSE RCSAPDVGKS

550 560 570 580 590 600
 SILPGNCRAG FLEGGTDAQG GSUSGGPLVCE DGAAEERLTL OGIIISMGSGC GDRNPKPGVYT

610
 DVAYYLAWIR EKTVS

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 CSCS
 (Switzerland)

Direct BLAST submission at NCBI
 (Bethesda, USA)

ScanProsite, ProfileScan

Sequence analysis tools: ProParam,
 ProScales, Compute pI/Mw, PeptideMass,
 Dotter (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

【図12-1】

NiceProt View of SWISS-PROT: Q04756

http://www.expasy.ch/cp-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 BiACP search

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

General information about the entry

Entry name HGF_A_HUMAN
 Primary accession number Q04756
 Secondary accession number Q47266
 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 HEPATOCYTE 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; Vertebrates; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominoidea

References

[1] SEQUENCE FROM NUCLEIC ACID, AND PARTIAL SEQUENCE. TISSUE=Liver and Serum. MEDLINE=9325278; PubMed=7683665; [NCBI]; EBI; Israel; Japan; Miyazawa K, Shimomura T, Kisanuki A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura 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, Odell C; Submitted (FEB-1996) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

Comments

- FUNCTION: ACTIVATES HEPATOCYTE GROWTH FACTOR (HGF) BY CONVERTING IT FROM A SINGLE CHAIN TO A HETEROODIMERIC 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 TO A HETEROODIMERIC FORM.
- TISSUE SPECIFICITY: Liver.
- SIMILARITY: Contains 1 EGF-LIKE DOMAINS.
- SIMILARITY: CONTAINS 1 FIBRONECTIN TYPE I 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

【図12-2】

NiceProt View of SWISS-PROT: Q04756

http://www.expasy.ch/cp-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 overstatement - 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/licensing/ or send an email to license@ebi.ac.uk)

Cross-references

EMBL D14012; BA0A01131; [EMBL / GenBank / DDBJ] [CordingSequence]

269923; CA0A93031; - [EMBL / GenBank / DDBJ] [CordingSequence]

PIR A46688; A46688.

MIM 604552 [NCBI / EBI].

GeneCards HGFAC.

HSSP P00763; IDPO. [HSSP ENTRY / PDB]

MELOPS S01228:-

[PR001314; Chymotrypsin.

[PR000561; EGF-like.

[PR000742; EGF 2.

[PR000562; FN Type II.

[PR000001; Kringle.

[PR000238; Trypsin.

[PR000334; fibronectin type I.

[Graphical view of domain structure.

[PR000008; EGF 1.

[PR000329; fnl-1.

[PR000340; fm-1.

[PR00051; krnle-1.

[PR00089; trypsin-1.

[PR00013; ENTHPEH.

[PR00018; KRNGLE.

[PR00722; CHYMOTRYPSIN.

[PDN00995; -:-.

[Domain structure / List of seq sharing at least 1 domain].

SM00181; EGF 3.

SM00058; FN 1.

SM00059; FN 1.

SM00130; KR 1.

SM00020; Trp_SPe 1.

PS00022; EGF 1..2.

PS01186; EGF 2..1.

PS01251; FIBRONECTIN 1:-1.

PS00023; FIBRONECTIN 2:-1.

PS00031; KRNGLE 1:-1.

PS30007; KRNGLE 2:-1.

ES35440; TRYPSIN DOM 1.

PS00134; TRYPSIN HIS 1.

PS00135; TRYPSIN SER 1.

BLOCKS Q04756.

DOMO Q04756.

ProtoMap Q04756.

PRESAGE Q04756.

DIP Q04756.

SWISS-2DPAGE GET REGION ON 2D PAGE

Keywords

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

Features

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
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 デイエゴ ナイアガラ アベニュー 4575

(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 13 サイト デス
シプレス

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表平11-503602(JP,A)

Protein Science, 1995年, vol.8, no.12, p.1323-1331

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed