(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0059765
(43) 공개일자 2010년06월04일

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01) *C12N 15/867* (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0039199(분할)
(22) 출원일자 2010년04월27일
심사청구일자 2010년04월27일
(62) 원출원 특허 10-2008-0019392
원출원일자 2008년02월29일
심사청구일자 2008년02월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
최상윤
서울특별시 서초구 서초2동 1364-51 장미아파트 203호
박상원
경기도 성남시 분당구 금곡동 분당두산위브아파트 109-801
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 13 항

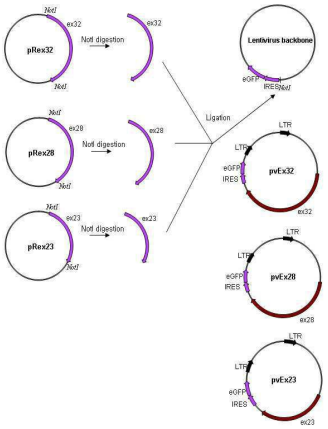
(54) 제8 혈액응고 인자와 폰 빌리 블란트 인자 변이체의 재조합 발현 벡터 시스템

(57) 요 약

본 발명은 제8혈액응고인자와 von Willebrand factor 변이체의 발현 시스템에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 그 엑손을 결실하여 사이즈를 크게 줄이고도 제8혈액응고인자의 안정화 및 활성화 효율을 현저히 높인 돌연변이 von Willebrand factor와 이를 혈우병 치료에 유용한 제8혈액응고인자와 동시에 발현시킬 수 있는 벡터 시스템에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 사이즈를 줄인 돌연변이 von Willebrand factor를 이용함으로써 바이러스 벡터에서 제8혈액응고인자와 함께 효율적으로 발현시키고 제8혈액응고인자의 활성을 현저히 높힐 수 있다. 또한, 상기 본 발명의 바이러스 벡터는 혈우병 치료를 위한 유전자 요법에 효율적으로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도12



특허청구의 범위

청구항 1

폰 빌리 브란트 인자(von Willebrand factor)내의 엑손 24-46이 결실된 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF23).

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF23) 유전자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF23) 유전자.

청구항 4

제 1항의 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 동물세포 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 6

제 4항에 있어서, B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자(Factor Ⅷ)를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자(Factor Ⅷ)는 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 8

제 6항에 있어서, 도 13의 개열지도를 갖는 pvBDD.FVIII.ires.vWex32 렌티바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 9

제 5항 또는 제 8항의 렌티바이러스 벡터를 패키징 세포에 트랜스펙션시켜 패키징된 렌티바이러스 입자.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 패키징 세포는 293T 세포인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 입자.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 pGag-pol, pRev, pTat 및 pVSV-G 와 코트랜스펙션시킨 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 입자.

청구항 12

제 4항 또는 제 6항의 동물세포 발현 벡터 또는 그로부터 발현된 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 및 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자를 유효성분으로 함유하는 혈우병 치료 및 예방용 약학적 조성물.

청구항 13

제 9항에 따른 렌티바이러스 입자를 유효성분으로 함유하는 혈우병 치료 및 예방용 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 제8혈액응고인자와 von Willebrand factor 변이체의 발현 시스템에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 그 엑손을 결실하여 사이즈를 크게 줄이고도 제8혈액응고인자의 안정화 및 활성화 효율을 현저히 높인 돌연변이 von Willebrand factor와 이를 혈우병 치료에 유용한 제8혈액응고인자와 동시에 발현시킬 수 있는 벡터 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈우병 A는 X-chromosome 관련 선천성 혈액 응고 질환으로 제8혈액응고인자의 결핍으로 출혈시 혈액 응고의 장애를 일으키는 질환이다. 증상으로는 근육내나 뼈속 혹은 위장이나 요로등에 있어서 빈번한 출혈과 이와 관련하여 붓거나 통증이 발생한다. 현재 치료는 외부에서 응고인자를 보충함으로써 이뤄지고 있으나, 이는 평생에 걸쳐 투여해야함으로써 일상생활의 번거로움에 더불어 경제적인 면에서 많은 어려움이 따르게 된다. 또한 투여시의 2차적 감염에 유의해야하는 문제점을 안고 있다.

[0003] 제8혈액응고인자는 X chromosome에 위치한 180Kb크기의 유전자로 A1-A2-B-A3-C1-C2의 여러 개 domain을 가진 당단백질이며, 이의 합성은 대부분 간에서 이루어진다. 현재까지 제8혈액응고인지를 전달하고자하는 연구는 많이 시도되어졌으나, 그 크기가 매우 커서 장애를 겪거나, 혹은 전달되어진 제8혈액응고인자 유전자의 발현이 되지 않거나, 분비가 되지 않아 많은 어려움이 따랐다. 제8혈액응고인자의 구조 중 B domain은 하나의 큰 exon으로 되어있으며, asparagin, serin 그리고 threonine residue에 매우 많이 glycosylated되어진 구조를 가진다. 최근 기능 연구에 의하면 이는 procoagulant 활성에 있어서 필수 domain이 아니며 따라서 이 부분의 제거는 제8혈액응고인자의 기능성 분자의 형성에 문제가 없음이 밝혀졌다. B-domain 제거된 제8혈액응고인자(BDD-FVIII)를 세포에 발현시켰을 때, 불안정한 제8혈액응고인자 mRNA 구조와 ER chaperones의 반응이 극복되어져, 많은 mRNA level의 확보가 가능하였다. BDD-FVIII중에서도 N-말단쪽으로 226개의아미노산을 남겨 N-linked glycosylaton의 consensus site를 6개 두었을 때, 제8혈액응고인자의 분비가 현저히 증가함이 증명되어졌다.

[0004] 혈우병A를 유전자 치료적으로 접근할 때, 목표 세포는 골수세포이며, 골수세포중에서도 줄기세포나 선조세포가 가장 적합하다. 유전자 전달 매개체로 lentivirus-based vector를 사용하는데, 이러한 벡터는 세포에 감염시 유전자 물질을 감염된 세포의 염색체에 끼어들어가 발현되어지기 때문에 안정적이고 지속적인 발현을 가능하게 한다. 기존의 Moloney murine leukemia virus와 같은 다른 종류의 바이러스의 경우, 분화하는 세포에만 감염되기 때문에 줄기 세포나 선조 세포와 같은 세포를 목표로 하여 감염하는 데에는 문제가 있었다. 또한, adenovirus와 같은 경우는 많은 양의 단백질의 발현은 가능하나 세포의 분화에 따라 계속 희석되어지기 때문에 지속적인 발현이 불가능하였다.

[0005] 따라서 제8혈액응고인자의 안전하고 지속적인 전달의 방법의 필요성이 강조되고 있으며, 이에 방법적 개발이 요구된다. Lentiviral vector는 분열하는 세포뿐만 아니라 분열하지 않는 거의 모든 세포의 감염이 가능하며, 감염후 세포의 염색체에 삽입됨으로써 오랜 시간동안 안정적인 발현이 가능하다. 따라서, 제8혈액응고인자를 lentivirus-based vector를 매개로 하여 개발하면 유전자 치료에 있어서 매우 유용하다.

[0006] 신체내 출혈시 혈액 응고 작용에서 원활한 제8혈액응고인자의 활성을 위해 중요하게 작용하는 요소가 von Willebrand factor (vWF)이다. vWF는 혈액 당단백질로 제8혈액응고인자에 결합하여 제8혈액응고인자가 혈액내에서 분해되는 것을 막아주는 역할을 한다. 이 외에도 혈액내피세포에 상처가 있을 때 콜라젠에 결합하거나 혈소판에 결합하여 혈액 응고 작용에 큰 역할을 담당한다. 이러한 vWF는 D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2의 domain으로 이뤄져 있는데, 이 중 D'-D3 부분이 제8혈액응고인자에 결합한다. vWF는 250 kDa 크기의 단백질로 유전자의 크기는 약 9kb이다. 따라서, 제8혈액응고인자의 역할을 돕고자 vWF를 lentiviral vector내에 삽입하는 것은 불가능하다. 이에 vWF의 domain구조에서 제8혈액응고인자와의 역할에 필요한 최소 부분을 연구하여 유전자의 exon 32까지의 vWF가 가장 효율적으로 기능을 함을 밝혔으며, 이에 본 발명자들은 상기와 같은 점을 감안하여lentivirus-based vector에 제8혈액응고인자와 뒤이어 internal ribosomal entry site (IRES)와 von Willebrand factor를 넣어 제작하였다. 이의 벡터와 lentivirus의 생성에 필수적으로 필요한 단백질인 gag-

pol, env, tat, rev를 각각 발현시켜 세포에 감염시 제8혈액응고인자와 von Willebrand factor를 각각 발현하는 viral vector의 발명을 완성하였으며, 이는 기존에 한번도 시도되어지지 않았으며, 추후 유전자 치료 및 혈우병 연구에 유용함에 가치가 매우 높게 평가된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 그 엑손을 결실하여 사이즈를 크게 줄이고도 제8혈액응고인자의 안정화 및 활성화 효율을 현저히 높인 돌연변이 von Willebrand factor를 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 세포내에서 제8혈액응고인자와 von Willebrand factor를 각각 지속적으로 안정적으로 발현하는 벡터를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 궁극적인 목적은 이러한 인자들의 발현으로 인해 혈우병 A에 있어서 유전자 치료를 성공시키기 위함에 있으며, 제8혈액응고인자뿐만 아니라, 이의 기능에 있어서 필수적으로 필요한 von Willebrand factor를 함께 발현 시켰다는 점에서 기존의 다른 발명과는 구분된다.

[0010] 본 발명의 상기 목적은 lentivirus-based vector를 이용하여 제8혈액응고인자와von Willebrand factor를 발현하는 VSV-G pseudotyped lentivirus를 생성한 뒤, 세포에 감염시킴으로써 여러 종류의 다양한 세포에서 제8혈액응고인자를 효과적으로 발현시키고 그 활성을 측정함에 있다. 이의 확인은 최종적으로 제8혈액응고인자가 활성화된 제9혈액응고인자와 더불어 제10혈액응고인자를 활성화시킨 정도를 정량화하여 측정함으로써 달성하였다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 폰 빌리 브란트 인자(von Willebrand factor)내의 엑손 24-46이 결실된 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF23)를 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF23) 유전자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 폰 빌리 브란트 인자(von Willebrand factor)내의 엑손 29-46이 결실된 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF28)를 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF28) 유전자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 유전자는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 폰 빌리 브란트 인자(von Willebrand factor)내의 엑손 33-46이 결실된 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF32)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 (vWF32) 유전자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 유전자는 서열번호 5의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자(vWF23, vWF28 또는 vWF32)를 코딩하는 유전자를 포함하는 동물세포 발현 벡터를 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 동물세포 발현벡터는 동물세포에서 상기 유전자를 전달하여 발현할 수 있는 어떤 비바이러스성 (플라스미드 또는 리포좀) 또는 바이러스성 벡터도 포함되지만, 바람직하게는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스와 같은 바이러스성 벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 렌티바이러스 벡터인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 도 12에서는 상기 vWF23, vWF28 또는 vWF32를 발현하는 렌티바이러스 벡터인 pvEx23, pvEx28 및 pvEx32를 개시하고 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 동물세포 발현벡터는 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자(vWF23, vWF28 또는 vWF32)를 코딩

하는 유전자외에 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자(Factor Ⅷ)를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 이 경우 하나의 벡터에서 혈우병 치료의 유효성분을 2가지 성분을 한꺼번에 발현시킬 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자(Factor Ⅷ)는 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하며, 그 유전자는 서열번호 7의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명에 있어서, 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자(vWF23, vWF28 또는 vWF32)와 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자(Factor Ⅷ)를 동시에 발현할 수 있는 동물세포 발현 벡터는 어떤 비바이러스성 (플라스미드 또는 리포좀) 또는 바이러스성 벡터도 포함되지만, 바람직하게는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스와 같은 바이러스성 벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 렌티바이러스 벡터인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 도 13에서는 상기 2가지 유전자가 IRES (internal ribosome entry site)에 의해 연결된 바이시스트론 (bicistronic) 발현 시스템인 pvBDD.FVIII.ires.vWex32 렌티바이러스 벡터를 개시하고 있다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 또는 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자를 발현할 수 있는렌티바이러스 벡터를 패키징 세포에 트랜스펙션시켜 패키징된 렌티바이러스 입자를 제공한다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 패키징 세포는 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 패키징하여 렌티바이러스 입자를 만들 수 있는 293T 세포 및 HT1080 세포와 같은 어떤 패키징 세포도 가능하나, 바람직하게는 293T 세포인 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 렌티바이러스 입자를 만들기 위해 패키징세포에 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 pGag-pol, pRev, pTat 및 pVSV-G 와 코트랜스펙션시킨 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는 보다 안전한 바이러스의 생산을 위하여 split gene expression system을 이용하였다. 즉, 바이러스의 생산에 필수적으로 필요한 인자인 gag-pol, tat, rev, VSV-G만을 발현하되, 이들을 모두 다른 벡터에 운반하여 recombination의 확률을 낮추어 주었다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 동물세포 발현 벡터 또는 그로부터 발현된 돌연변이 폰 빌리 브란트 인자 및 B 도메인이 결실된 인간 혈액응고 제 8인자를 유효성분으로 혈우병 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 렌티바이러스 입자를 유효성분으로 함유하는 혈우병 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명자들은 제8혈액응고인자와 돌연변이 von Willebrand factor를 lentiviral-based vector에 동시에 발현하는 시스템을 개발하였다. 구체적으로 본 발명은 제8혈액응고인자의 발현과 활성을 lentiviral-based system에서 확인하는 단계와 제8혈액응고인자의 활성을 위한 von Willebrand factor의 필수 domain을 규명하고 이들을 함께 발현시키는 단계로 구성된다.

[0029] 본 발명의 제8혈액응고인자는 이의 domain중에서 B domain이 제거되어 제8혈액응고인자의 분비를 더 증가시킨 형태(BDD-FVIII)이다. 제8혈액응고인자의 구조 중 B domain은 하나의 큰 exon으로 되어있으며, asparagin, serin 그리고 threonine residue에 매우 많이 glycosylated되어진 구조를 가진다. 최근 기능 연구에 의하면 이는 procoagulant 활성에 있어서 필수 domain이 아니며 따라서 이 부분의 제거는 제8혈액응고인자의 기능성 분자의 형성에 문제가 없음이 밝혀졌다. B-domain 제거된 제8혈액응고인자(BDD-FVIII)를 세포에 발현시켰을 때, 불안정한 제8혈액응고인자 mRNA 구조와 ER chaperones의 반응이 극복되어져, 많은 mRNA level의 확보가 가능하였다.

[0030] BDD-FVIII중에서도 N-말단쪽으로 226개의 아미노산을 남겨 N-linked glycosylaton의 consensus site를 6개 두었을 때, 제8혈액응고인자의 분비가 현저히 증가함이 증명되어졌다.Lentiviral vector는 분열하는 세포뿐만 아니라 분열하지 않는 거의 모든 세포의 감염이 가능하며, 감염후 세포의 염색체에 삽입됨으로써 오랜 시간동안 안정적인 발현이 가능하다. 따라서, 제8혈액응고인자를 lentivirus-based vector를 매개로 하여 개발하면 유전자 치료에 있어서 매우 유용하다.

[0031] 본 발명의 돌연변이 von Willebrand factor는 전체 엑손(exons)중 일부가 제거되어 D1-D2-D'-D3 domain까지만 (vWF23), D1-D2-D'-D3-A1 domain까지만 (vWF28), 또는 D1-D2-D'-D3-A1-A2 domain까지만 (vWF32)을 포함하는 형태이다. 이 domain은 제8혈액응고인자와의 결합부위, 제8혈액응고인자 및 혈소판의 GP1b와의 결합부위, 또는 제

8혈액응고인자, 혈소판의 GP1b 및 콜라젠과의 결합부위를 가지고 있다.

[0032] 본 발명에서 제8혈액응고인자의 활성을 극대화하기 위해서는 von Willebrand factor의 발현이 필요하다. 이는 생체내 thrombin등과 같은 제8혈액응고인자를 비활성화시키는 인자로부터 보호하며, 또한 제8혈액응고인자의 안정된 구조를 돕기 위함이다. 그러나, 제8혈액응고인자를full-lengh의 von Willebrand factor와 함께 외부에서 발현시켜주면 이들은 세포내에서 co-localize하여 오히려 von Willebrand factor가 제8혈액응고인자의 분비를 저해하는 결과를 초래한다. 따라서, 이들을 제8혈액응고인자의 기능은 최대화하며, 분비를 저해하지 않는 부분만을 남긴 형태의 돌연변이 von Willebrand factor가 바람직하다.

[0033] 본 발명의 제8혈액응고인자 및 von Willebrand factor의 발현을 위한 운반체로 다른 mammalian expression vector를 사용하여도 되나, 줄기세포 및 혈구선조세포등과 같이 유전자 전달이 쉽지 않은 세포들을 위하여 lentiviral-based vector를 사용하는 것이 더 유리하다. 그러나, lentiviral-based vector의 경우 발현 유전자의 크기에 대한 제한이 있다. B-domain deleted된 제8혈액응고인자 (BDD.FVIII)의 크기가 4.4 kb이며, A2 domain까지의 von Willebrand factor의 크기가 5.6kb이다. 따라서, 바이러스 titer의 큰 손실없이도 이들 유전자를 발현시킬 수 있으며, 또한 바이러스의 titer를 높이기 위해서는 lentivirus의 envelope protein을 VSV-G로 pseudotyping하여 생산한 뒤, 바이러스를 농축시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 동물세포 발현벡터는 동물세포내에서 외래 유전자의 전사를 유도할 수 있는 진핵 혹은 원핵 세포 유래의 프로모터를 포함할 수 있으며, 프로모터 부위는 또한 전사의 증가과 억제를 위한 조절 요소를 포함할 수 있다. 적합한 프로모터에는 사이토메갈로바이러스 급 초기 프로모터(pCMV), 마우스 육종 바이러스 긴 말단 반복 프로모터(pRSV)와 SP6, T3 혹은 T7 프로모터가 포함된다. 프로모터의 상류에 있는 인핸서 혹은 코딩 부위의 하류에 있는 종결자 서열은 발현을 용이하게 하기 위하여 본 발명의 벡터에 선택적으로 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 벡터는 세포가 효율적이고 효과적으로 벡터의 핵산에 의하여 발현된 단백질을 가공하기에 충분한 폴리아데닐레이트 서열, 국지화 서열 혹은 신호 서열과 같은 부가적인 핵산 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 폴리아데닐레이트 서열의 예는 SV40 초기 부위 폴리아데닐레이트 사이트(C.V. Hall et al., J. Molec. App. Genet. 2, 101(1983))와 SV40 후기 부위 폴리아데닐레이트 사이트(S. Carswell and J.C. Alwine, Mol. Cell Biol. 9, 4248(1989))이다. 그러한 부가적 서열은 벡터내로 삽입되어 전사가 요망되면 작동적으로 프로모터 서열과 연결되고, 혹은 부가적으로 해독과 프로세싱이 요망되면 개시 및 프로세싱 서열과 작동적으로 연결된다. 삽입 서열은 벡터의 어떠한 위치에도 놓여질 수 있다. "작동적으로 연결된다"는 용어는 유전자 서열과 프로모터 혹은 다른 조절 또는 프로세싱 서열 사이의 연결을 기술하는 데 사용된다. 그결과 유전자 서열의 전사는 프로모터 서열과 작동적으로 연결됨으로써 관련되고, 유전자 서열의 해독은 해독 조절 서열과 작동적으로 연결됨으로써 관련되고, 유전자 서열의 후-전사 프로세싱은 프로세싱 서열과 작동적으로 연결됨으로써 관련된다.

[0035] 본 발명의 벡터의 구축을 위한 표준 기술은 당업자에게 잘 알려져 있고 샘브룩의 논문(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed.(Cold Spring Harbor, NY, 1989))에서 찾을 수 있다. 다양한 전략이 DNA의 절편을 연결하는 데 유용하고, 그것의 선택은 DNA 절편의 말단의 성질에 달려있고 숙련된 기술자에 의하여 쉽게 이루어진다.

[0036] 본 발명에 사용가능한 렌티바이러스의 예는 HIV-1 및 HIV-2, SIV, FIV, BLV, EIAV, CEV 및 비스나(visna) 바이러스를 들 수 있다. 이중 HIV 및 SIV가 유전자 치료에 사용하기에 바람직하다. 인간 면역결핍 바이러스 타입 1(HIV-1)은 레트로바이러스내의 소 계통군, 렌티바이러스에 속하며, 이들 계통군의 다른 멤버와 같이 HIV는 휴지기 세포를 감염시킬 수 있다. 이는 렌티바이러스를 유전자 치료를 위한 매력있는 벡터로 만든다.

[0037] HIV-1-유래 벡터들은 그들의 세포질 및 핵 침입 단백질들(cytoplasmic and nuclear entry proteins)로 분열중인 세포와 비-분열 세포를 감염시키는 능력으로 인해 유전자 전달체로서 가장 많이 사용되고 있다(Kohn, 2001). 이러한 능력은 종종 벡터들의 다양한 특성에 기인한 것으로 생각되는데, 이는 다양한 비리온 단백질들(multiple virion proteins)에서 핵 위치 시그널 및 역-전사된 게놈에서 삼중나선(triple-stranded) 'DNA flap'을 생성하는 중심 폴리퓨린 지역(central polypurine tract)을 포함한다(Zennou et al., 2000). 이러한 특성들의 결과로서, 생물공학적으로 조작된 HIV-1은 조혈모세포(hematopoietic progenitor cells)를 꽤 낮은 MOI에서 매우 효과적으로 감염시킬 수 있다(Park and Choi, 2004). 유전자 치료용 도구로서 렌티바이러스 벡터들의 사용과 관련하여 첫 번째 고려사항은 전이벡터(transfer vector)가 HIV-1로부터 유래된다는 것이다. 그러나 바이러스 복제에 필요한 모든 바이러스 구성성분들은 종래 연구에서 이용된 바이러스 벡터에서 제거되었으며(Hofmann et al., 1999), 전이벡터는 최종적으로 5% 미만의 HIV-1 게놈을 포함하였다(Kohn, 2001). 렌티바이러스 벡터를 사용하면서 생긴 다른 문제(barrier)는 전이된 유전자의 크기에 제한된다는 것이다. vWF는 대략 9Kb의 cDNA 크기를 가지

는 52개의 엑손을 포함하는데, 이는 대개의 렌티바이러스 벡터의 크기 제한을 초과하는 것이다. 본 발명에서, 본 발명자들은 성공적으로 vWF cDNA를 렌티바이러스 벡터에 도입시켰다(도 1과 2). 렌티바이러스의 준비와 제조에서, 본 발명자들은 HIV-1의 *env*를 VSV-G 단백질로 치환하였다. VSV-G는 특이적 세포표면 수용체 단백질을 통한다기보다는 막 융합을 통하여 세포내로 바이러스 침입을 매개하는데, 이는 숙주범위(host range)를 현저히 넓히는 결과를 가져온다(Hofmann et al., 1999). 더욱 중요한 것은, VSV-G는 초원심분리시 구조적 안정성을 부여해서 감염성의 손실이 거의 없는 높은 역가(titers)로 바이러스의 농축을 가능하게 한다(Burns et al., 1993; Hofmann et al., 1999). VSV-G의 이러한 특성을 활용함으로써, 본 발명자들은 성공적으로 vEx52를 제조하고 농축하여, 렌티바이러스 상청액 용량의 1/100만으로 6배 이상 높은 형질도입 효율을 가져왔다(도 3). 이러한 결과는 FACS로 분석되었고 형광 하에서 명확하게 관찰되었다: 농축되지 않은 vEx52보다 농축된 vEx52로 형질도입한 세포에서 현저하게 많은 eGFP의 양이 관찰되었다(도 4). De Meyer 등에 의한 최근 연구는 렌티바이러스 벡터로 긴 vWF cDNA의 병합(incorporation), 및 폰 빌리 브란트 질환 유형 3(VWD 유형 3)으로 유전자 치료제를 개발하기 위하여 VWD 유형 3을 가진 개들로부터 얻은 혈액생성내피세포(blood-outgrowth endothelial cells, BOECs)의 형질도입을 포함하였다(De Meyer et al., 2006). 그러나 낮은 역가의 바이러스를 농축하는 것은 추가적인 시간소요와 어려운 공정을 필요로 하기 때문에, 혈우병 A의 치료에 있어서 실제적인 적용에 이상적임을 증명할 수 없다. 따라서 본 발명자들은 렌티바이러스 벡터에 삽입되는 vWF cDNA의 크기를 줄이기 위한 시도를 하였다. 본 발명자들은 vWF와 FVIII 사이의 상호작용을 위한 최소한의 부위만 남기고 vWF의 도메인들을 제거하였다. 성숙한 vWF는 D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 도메인들로 구성된다. FVIII는 D'-D3 도메인과 결합하고, A1 도메인은 혈소판 당단백질 Ib, 헤파린 및 콜라겐과 결합한다. 이것은 혈소판의 응집을 용이하게 하여 혈관손상 부위에 부착을 도와준다. 상기 vWF 유전자는 염색체 12에 위치하고 178,000개 염기를 가지는 52개의 엑손을 포함한다. 본 발명자들은 pRex23와 pvEx23을 제조하기 하기 위하여 엑손 24-46을 제거하여, FVIII와 결합하는 부위만을 남겨두었다. FVIII는 vWF의 아미노 말단(amino terminus)에 위치된 272개의 아미노산 잔기들 내에서 vWF와 결합한다(Sadler, 1998). 또한 본 발명자들은 pRex28와 pvEx28를 제조하였는데, 이는 엑손 29-46이 제거된 것이어서, FVIII 결합 부위 이외에 혈소판 결합 부위를 남긴 것이다. vWF상의 혈소판 결합 부위는 A1 도메인 내 위치한다(Sadler, 1998). pvEx23, pvEx28 및 pvEx52는 렌티바이러스에 팩킹될 때, pvEx23과 pvEx28로부터 얻은 바이러스 제조물이 pvEx52로부터 얻은 것보다 현저히 더 많았다. 일반적으로, 농축되지 않은 vEx52의 바이러스 역가는 2×10^4 내지 4×10^4 particles/ml(도 3 참조)인데 반해, vEx23와 vEx28의 역가는 1×10^5와 3×10^5 particles/ml 사이에 있었다(도 5). 도 3과 도 5에서, 3가지 바이러스들의 형질도입 효율은 그래프(histogram)로 비교할 수 있다. Jurkat 세포를 형질도입 시키기 위하여 vEx23, vEx28 및 vEx52 500 μl을 사용하였을 때, 35.02%, 26.30% 및 4.64%의 세포들이 각각 eGFP에 대하여 양성으로 나타났다. 따라서 본 발명자들은 FVIII와 상호작용에 거의 필요없는 vWF 내의 도메인들을 제거함으로써 바이러스 역가와 형질도입 효율을 개선할 수 있었으며, 따라서 팩킹 크기를 줄일 수 있었다. pRex23, pRex28 및 pRex52를 293T 세포로 트랜스펙션 하여 기능적인 FVIII를 상청액에서 측정하였을 때, pRex23와 pRex28는 전체-길이 vWF인 pRex52로 관찰된 것보다 더 낮은 FVIII 활성을 나타내었다. 그러나, 바이러스 시스템을 사용할 경우, vEx28로 형질도입된 세포로부터 얻은 상청액은 vEx52로부터 얻은 것보다 더 높은 분비된 BDD.FVIII 활성(secreted BDD.FVIII activity)을 나타냈다(도 6). 이것은 전체-길이 vWF의 큰 크기가 vWF의 팩킹 및 발현 효율을 제한하기 때문일 것이다. 그러나 본 발명자들은 FVIII의 발현이 vWF에 의해 변경되었는지, vEx28이 상청액에서 발현된 FVIII의 분비되는 수준을 증가시켰는지, 그리고 이러한 효과가 아마도 BDD.FVIII 구조의 보호 때문인지를 결정할 수 없었다. 이것은 vWF가 없을 경우 더 많은 FVIII 활성이 세포에서 검출되었다는 관찰결과와 일치된다(Kaufman et al., 1998). vWF가 FVIII를 안정화시킨다는 다른 지표는 FVIII가 vWF가 없을 경우에 빠르게 분해되었지만(Over et al., 1978), vWF가 있을 경우에는 FVIII가 더 느리게 제거되었다(Tuddenham et al., 1982)는 사실이다. vWF와 FVIII의 성질을 좀 더 들여다보면, 두 단백질들은 FVIII-결핍 세포들을 고치는 데 있어서 강력한 유전적 도구를 제공하기 위하여 설계된 것일지도 모른다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 비경구(예를 들어, 피부내, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내), 경구 혹은 흡입 투여에 적합한 것을 포함한다. 다른 방법으로, 본 발명의 약학적 제형은 대상의 점막내 투여(예를 들어, 비강투여)에 적합할 수 있다. 제형은 일회용량 형태로 간단하게 제조될 수 있고 당업계에 알려진 어떠한 방법으로도 제조될 수 있다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약제

학적 조성물은 1회 투여당 약 10^3 - 10^7 바이러스 입자, 또는 0.001-100 ㎎/㎏ 의 단백질의 양으로 투여되는 것이 적합하다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명의 일실시예로서 돌연변이 vWF 유전자를 포함하는 팩키징 구조체(packaging constructs)의 개략적인 도면이다.

도 2는 본 발명의 일실시예로서 형질도입된 COS-1 세포로부터 vWF의 통합(integration) 및 전사를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 일실시예로서 vWF-발현하는 HIV-1의 농축(concentration)을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일실시예로서 vWF를 발현하는 위형(pseudotyped) HIV-1에 의한 형질도입을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 일실시예로서 vWF의 결실 구조체의 개략적인 도면이다.

도 6은 본 발명의 일실시예로서 분비된 기능적 FVIII의 활성을 검출한 결과를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일실시예로서 제8혈액응고인자의 발현을 확인하기 위해 eGFP의 발현 시험 결과 사진이다.

도 8은 본 발명의 일실시예로서 각 돌연변이 vWF에 의한 제8혈액응고인자의 활성을 Chromogenic Assay로 측정한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일실시예로서 B-도메인이 결실된 제8혈액응고인자의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터의 제조과정을 도시한 것이다.

도 10은 본 발명의 일실시예로서 vWF (von Willebrand Factor)의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터의 제조과정을 도시한 것이다.

도 11은 본 발명의 일실시예로서 vWF variants를 포함하는 벡터인 pRex23, pRex28 및 pRex32의 제조과정을 도시한 것이다.

도 12는 본 발명의 일실시예로서 vWF variants의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터인 pvEx23, pvEx28 및 pvEx32의 제조과정을 도시한 것이다.

도 13은 본 발명의 일실시예로서 BDD.FVIII와 vWF variant의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터인 pvBDD.FVIII.vWEx32의 제조과정을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0042] 실시예 1: 벡터 제조

[0043] 전장 FVIII cDNA (ATCC Accession No. 40086)를 링커를 이용하여 변형된 pREP7 vector (Invitrogen, USA)의 *NotI* 부위에 클로닝하여 플라스미드 pRF8를 얻은 후, B-도메인의 대부분을 제거하기 위하여 B-도메인의 상향 5'-영역을 프라이머쌍 5 '-GAACCGAAGCTGGTACCT-3 ' 및 5 '-GACAGGAGGGGCATTAAATTGCTTTTGCCT-3 '를 이용하고, 하향 3 '-영역을 프라이머쌍 5 '-TTTAATGCCCCACCAGTCTTGAAACGCCAT-3 ' 및 5 '-ATGCTCGCCAATAAGGCATTCCA-3 '을 이용하여 PCR 증폭하였고, 다음 이들 산물을 열-변성(denaturation)과 재결합(renaturation)을 거쳐 원하는 결실을 얻었다. 그 산물을 *KpnI* 및 *BglI* 로 분해하고 원 pRF8 플라스미드의 *KpnI-BglI* 내로 서브클로닝하여 pREP7 (Invitrogen, USA)의 RSV 3 ' LTR 제어하에 B-도메인 결실된(BDD) FVIII cDNA가 삽입된 pREP7-BDD.FVIII를 제조하였다 (참조: The Journal of Gene Medicine, Volume 6, Issue 7 , Pages 760 - 768). 본 발명자는 상기 논문의 저자인 Subrata Banerjee에게서 pREP7-BDD.FVII를 제공받아 사용하였다. 또한, 전장 vWF cDNA (ATCC #59126)를 상기와 마찬가지로 링커를 이용하여 pREP7 vector (Invitrogen, USA)의 *NotI* 부위에 클로닝하여 pRex52 플라스미드를 얻었다.

[0044] 실험에 사용된 Lentivirus backbone (transfer vector)으로는 Journal of Virology, December 1999, p. 10020-10028, Vol. 73, No. 12의 저자인 Joseph Sodroski로 받은 HIV-1 vector인 pHIvec2.GFP를 사용하였다 (상기 논문 참조). 상기 pHIvec2.GFP는 v653 rtatpC 바이러스에서 env 및 vpu 서열을 제거하고 Rev-responsive element를 유지하고, eGFP gene (Clontech)을 IRFS 뒤에 삽입함으로써 제조되었다. 상기 pHIvec2.GFP의 벡터맵은 도 1에서 vWF 유전자가 제거된 형태와 동일하다.

[0045] B-도메인이 결실된 제8혈액응고인자의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터를 만들기 위하여, BDD.FVIII (B-Domain-Deleted Coagulation Factor VIII)의 cDNA를 상기 pREP7-BDD.FVIII에서 NotI을 이용하여 얻고, 이를 같은 효소를 이용하여 상기 lentivirus backbone에 넣어 주어 pvBDD.FVIII를 생성하였다. 그 제조과정을 도 9에 도시하였다. 구체적으로 pRep7-BDD.FVIII와 lentivirus backbone을 NotI으로 digest하고, pREP7-BDD.FVIII에서 나온 BDD.FVIII fragment를 lentivirus backbone의 NotI site로 ligate하였다.

[0046] vWF (von Willebrand Factor)의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터를 만들기 위하여, 상기 pRex52와 lentivirus backbone을 NotI으로 digest하고, pRex52에서 나온 vWF fragment를 lentivirus backbone의 NotI site로 ligate하여, pvEx52를 제조하였다. 그 제조과정을 도 10에 도시하였다. 도 10의 결과물인 pvEx52의 구체적인 맵은 도 1에 개시되어 있다. vWF 유전자는 긴 말단 반복부위(LTR) 사이에 위치하고 바이러스 벡터에서 IRES-eGFP에 융합되어 있다.

[0047] vWF variants는 상기 pRex52에서 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 만들었다. 각 PCR은 각 dNTP 25 mM, 각 phosphorlyated primers 10 μM, 2 mM Mg^{2+}, 그리고 DNA 주형으로 반응되었으며, PfuUltraTMII Fusion HS DNA Polymerase로 증폭시켰다. PCR의 전체 부피는50 ㎕로 다음과 같은 조건에서 행하였다. 95℃에서 5분, 95℃에서 30초, 52℃에서 30초, 그리고 72℃ 에서 1 Kb당 30초의 반응을 18번 반복, 72℃에서 10분. vWF variants를 만들기 위한 forward primer의 서열은 5-CGT GATGAGACGCTCCAG-3이였으며, reverse primers의 서열은 pRex23은 5-TTTTCTGGTGTCAGCACACTG-3, pRex28은 5-AGGTGCAGGGGAGAGGGT-3, 그리고 pRex32는 5-AGAGCACAGTTTGTGGAG-3이였다. PCR을 수행한 뒤, 증폭된 산물은 PCR removal kit (Qiagen)을 이용하여 분리하였으며, ligase (Takara)를 이용하여 15℃에서 약 24시간동안 반응시켜서 pRex23, pRex28 및 pRex32를 제조하였다. 그 제조과정은 도 11에 도시하였다. Ligated mixture는 TOP10에 transformation시켰다.

[0048] vWF variants의 유전자를 포함한 Lentivirus 벡터를 만들기 위하여, 상기 pRex23, pRex28 또는 pRex32와 lentivirus backbone을 NotI으로 digest하고, pRex23, pRex28 또는 pRex32에서 나온 vWF fragment를 lentivirus backbone의 NotI site로 ligate하여, pvEx23, pvEx28 및 pvEx32를 제조하였다. 그 제조과정을 도 12에 도시하였다.

[0049] pvBDD.FVIII는 BDD.FVIII뒤로 ires-eGFP가 붙어있는 형태인데, 여기서 eGFP부분만을 PCR을 이용하여 제거한 다음, 이 자리에 pRex32의 vWF variant를 넣어주어 pvBDD.FVIII.vWEx32를 생성하였다. 그 제조과정을 도 13에 도시하였다. Transformation은 TOP10을 사용하였다. BDD.FVIII에 이어 vWF32를 함께 발현시키기 위하여 IRES (internal ribosomal entry site) 서열을 BDD.FVIII뒤어 삽입시키고 이 뒤로 vWF32를 넣어주었다. 이로써 하나의 promoter하에 두개의 단백질이 동시에 발현 가능하며, 뒤에서 발현하는 vWF32는 BDD.FVIII의 활성과 기능에 도움을 주는 역할을 한다.

[0050] 실시예 2: 바이러스의 생성

[0051] Vesicular stomatitis G protein (VSV-G) pseudotyped HIV-1는 293T를 quinquepartite plasmid transient transfection의 방법(Park and Choi, 2004 Mol. Cells 17, 297-303 참조)으로 gag-pol, tat, rev, VSV-G 및 transfer vector로 transfection함으로서 만들었다. 293T를 transfection 24시간 전에 100 mm plates에 4.5×10^6로 split한 다음, transfection 4시간전에 supernatant를 10% FCS, 25 mM HEPES를 포함하는 culture medium으로 바꾸어주었다. Transfection은 Gag and Pol을 가지는 packaging plasmid를 10 ㎍, VSV-G 플라스미드를 2 ㎍, Tat 플라스미드를 1 ㎍, Rev 플라스미드를 1 ㎍, 그리고 transfer vector를 10 ㎍넣어주었다. 이들 DNA를 62 ㎕의 2.5 M $CaCl_2$에 넣어주고 부피를 물로 500 ㎕로 맞춰준 다음, vortex하고 이 mixture에 500 ㎕의 2x HBS (281 mM NaCl, 100 mM hepes, 1.5 mM Na_2HPO_4 pH 7.12)를 넣어주고 30 분동안 실온에서 둔 다음, 293T 세포 위로 뿌려주었다. Transfection 16시간 뒤, supernatant는 10 mM HEPES buffer의 RPMI로 바꾸어주었고, 48시간 뒤 생성되어 supernatant로 나온 바이러스를 0.45 μm filter를 이용하여 harvest하였다.

[0052] 실시예 3: 바이러스의 titration

[0053] NIH3T3 cells 3 x 10^5 cells 개를 60 cm^2 dishes에 넣고, 20 시간뒤에 여러 부피의 바이러스를 세포에 넣어주었다. 이 때, 전체 부피는 culture media로 2 ml로 하였으며, polybrene을2 μg/ml의 농도로 넣어주었다. 6시간 뒤에 바이러스를 제거하고 2% FCS를 포함하는 DMEM으로 세포를 씻어 바이러스를 완전히 제거한 다음, 세포를 incubator안에 넣었다. 2일 경과후, 세포를 0.25% trypsin을 이용하여 떼어낸 후, 1x PBS로 씻어주고, 3.7% formaldehyde로 fix하여주었다. 감염된 세포에서 발광하는 $eGFP^+$의 퍼센트를FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems)와 CellQuest program (Becton Dickinson)을 이용하여 읽은 다음 바이러스의 titier를 다음의 공식을 이용하여 계산하였다. (2 × 세포수 × $eGFP^+$ 세포수의 퍼센트) ÷ 바이러스의 양.

[0054] 실시예 4: 바이러스의 농축(Concentration)

[0055] 생성된 바이러스를 polyallomer tube에 넣고 SW28 로터에서 50,000 x g에서 1.5시간동안 4℃에서 원심분리하였다. Pellet을 작은 부피의 medium으로 녹인 다음, parafilm으로 tube를 덮고 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 오랫동안 보관하기 위해서는 농축된 바이러스를 -80℃에 넣어두었다. 도 3은 본 발명의 일실시예로서 vWF-발현하는 HIV-1의 농축(concentration)을 나타낸다. 농축되지 않은(중앙) 500 μl과 농축된(우측) 5 μl의 vWF-발현하는 렌티바이러스 상청액은 Jurkat 세포를 형질도입 하는데 사용되었다. 형질도입된 세포들에서 eGFP+ 세포의 분획은 유세포분석기(flow cytometry)에 의해 결정되었다.

[0056] 실시예 5: 세포의 트랜스덕션(Transduction)

[0057] 세포를 hemocytometer에서 센 다음, 24-well plate, 6-well plate에 원하는 수의 세포를 깔아주었다. 바이러스 상층액을 세포에 더해주고 원하는 MOI로 넣어주고 이때 전체 부피는 원하는 부피로 medium으로 조정하였고, 이때 polybrene을 2 *μg/ml*의 농도로 넣어주었다. 감염은 6시간동안 37℃에서 5% CO_2의 존재하에서 실행하였다. 감염이후, 세포를 medium으로 씻어주었다. 도 5는 본 발명의 일실시예로서 vWF의 결실 구조체의 개략적인 도면이다. A. pRex52와 렌티바이러스 벡터로부터 각각, pRex23과 pvEx23은 엑손 24-46을 제거함으로서 구성되었으며, pRex28과 pvEx28은 엑손 29-46을 제거함으로서 제조되었다. B. vEx23과 vEx28은 각각 pvEx23과 pvEx28로부터 생산되었고, 바이러스 상청액 500 μl은 Jurkat 세포를 형질도입하는데 사용되었다. 형질도입된 세포의 비율은 FACS로 분석되었다.

[0058] 실시예 6: DNA와 RNA 분리

[0059] Genomic DNA를 500 *μℓ* lysis buffer (0.1 M Tris HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 그리고 100 *μg/ml* protease K)로 분리하였다. 이를 isopropanol로 침전 시킨 다음, 70% Ethanol로 씻어주었다. RNA는 Trizol (Invitrogen)로 얻었으며, cDNA는 ImPromII (Promega)를 이용하여 합성하였다. PCR은 1x reaction buffer, 25 mM 각 dNTP, 10 μM 각 프라이머, 2 mM Mg^{2+}, 그리고 DNA 주형으로 전체부피를 50 *μℓ*로 하여 Pfu (Solgent)로 증폭하였다. 도 2는 본 발명의 일실시예로서 형질도입된 COS-1 세포로부터 vWF의 통합(integration) 및 전사를 나타낸다. COS-1 세포는 vWF를 발현하는 렌티바이러스로 형질도입 되었다. A. 형질도입된 vWF 유전자의 도입은 형질도입된 COS-1 세포의 게놈 DNA에서 421-bp vWF와 227-bp LTR에 대한 PCR에 의해 검출되었다. B. cDNA는 형질도입된 세포로부터 제조되었으며 각각 421-, 227- 및 187-bp를 갖는 vWF, LTR, 및 GAPDH에 특이적인 프라이머 쌍으로 증폭되었다. vEx52: vEx52로 형질도입, eGFP: eGFP-발현하는 렌티바이러스로 형질도입.

[0060] 실시예 7: 플라스미드 트랜스펙션(Transfection)

[0061] 12-well pate기준으로 50 *μℓ*의 150 mM NaCl에 transfection하고자하는 DNA (pRex23, pRex28 및 pRex32)를 넣어주고, vortex를 한 다음, spin down하였다. 이 mixture에 DNA양의 3배 부피의 PEI를 넣어준 다음, vortex하고

다시 spin down하였다. 실온에서 10분간 방치한 다음, 이를 세포 위로 조심스럽게 떨어뜨려주었다.

[0062] 실시예 8: 세포면역염색법(Immunocytochemistry)

[0063] Transduction된 세포를 6-well 조직배양플레이트에서 글리코겐-코팅된 커버슬립사아에 성장시켰다. 그 세포를 냉각된 100% 메탄올로 고정시키고, TBS [50mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl]로 세척하고, 신선한 TBS중 0.1% sodium borohydride에서 5분간 quenching하고, 5분간 TBS로 3회 세척하였다. 세포를 블로킹 버퍼 (10% 말혈청, 10% 소혈청알부민, 0.02% NaN_3 in 1x PBS)로 60분간 블로킹하고 TBS로 5분간 세척하였다. 1차 vWF 항체(Abcam)를 TBS중 1% BSA로 희석하고 4℃에서 세포와 함께 하룻밤 인큐베이팅했다. 세포를 TBS로 5분간 3회 세척한 후, 그들을 알루미늄 호일로 커버된실온에서 30분간 TBS중 1% BSA에서 2차 염소-항마우스 IgG TRITC 항체 (Santa Cruz)로 라벨링하였다. 다음 그들을 5분간 TBS로 3회 세척하고 ProLong antifade kit (Cell Signaling)을 사용하여 슬라이드에 마운트하였다.

[0064] 도 4는 본 발명의 일실시예로서 vWF를 발현하는 위형(pseudotyped) HIV-1에 의한 형질도입을 나타낸다. A. 293T 세포는 vWF-IRES-eGFP가 포함된 전이벡터를 포함하는 바이러스 생산을 위한 바이러스 구성성분들을 포함하는 플라스미드와 함께 트랜스펙션 되었다. 전이벡터로부터 얻은 eGFP는 10× 배율에서 형광형미경으로 가시화되었다. B. Jurkat 세포는 광학현미경과 형광현미경으로 가시화되었다. C. Jurkat 세포는 농축되지 않은 vWF-발현하는 위형 HIV-1 500 μl으로 형질도입 되었으며, 현미경으로 가시화되었다. D. Jurkat 세포는 160배 농축된 vWF-발현하는 위형 HIV-1 5 μl으로 형질도입 되었으며, 흰색 및 형광으로 가시화하였다. E. COS-1 세포는 vWF-위형 HIV-1로 0.5 MOI에서 형질도입 되었다. eGFP는 형광현미경으로 가시화되었다(좌측). vWF는 항체 및 TRITC로 VWF를 염색하여 가시화하였다(중앙). 검출된 vWF는 COS-1세포에서가 아닌 전이된 유전자에서 유래한 것이다(우측).

[0065] 제8혈액응고인자의 서열에서 B domain을 제외한 BDD.FVIII을 만들어 lentiviral vector에 삽입하였다. Lentivirus의 발현을 위해 gag, pol, VSV-G, tat, rev와 함께 BDD.FVIII를 293T cell에 발현시켜주어 BDD.FVIII을 발현하는 lenvirius를 생산하였다. 이를 이용하여 세포에 감염시켜주면 세포에 BDD.FVIII이 발현하게 되며, 이의 발현을 최종적으로 제8혈액응고인자의 활성 측정을 통하여 확인하였다. 바이러스의 생성과 감염여부는 벡터내의 eGFP의 발현으로 간접적으로 확인하였다 (도 7). 도 7은 본 발명의 일실시예로서 제8혈액응고인자의 발현을 확인하기 위해 eGFP의 발현 시험 결과 사진이다 (도 4의 A에 해당). 바이러스의 생성과 감염을 eGFP의 발현으로 간접확인하였다.

[0066] 실시예 9: Factor VIII의 활성 측정 실험

[0067] Activated FVIII activity (FVIII:C)는 Coatest VIII:C/4 kit (DiaPharm)로 정량하였다. Phospholipids와 100 mg/l ciprofloxacin와 이의 5배 부피의 factor IXa와 factor X를 섞어준 다음, 이를 50 ㎕를 96-well microtiter plates에 넣어주었다. 여기에 cell culture supernatant를 25 ㎕ 넣고, 37C에서 5분동안 incubate하였다. 25 ㎕의 0.025 mol/L CaCl2를 더해준 다음 37C에서 10분간 incubate한 뒤, S-2765와 I-2581를 50 ㎕ 넣고 다시 37C에서 10분간 반응시켰다. 반응은 20% acetic acid로 정지시키고 제8인자의 활성을 405 nm에서 측정하였다. Standard curve는 알고 있는 농도의 recombinant human FVIII를 이용하여 만들어 정량하였다.

[0068] 도 6은 본 발명의 일실시예로서 분비된 기능적 FVIII의 활성을 검출한 결과를 나타낸다. A. 293T 세포는 pREP7-BDD.FVIII로 pRex23, pRex28 또는 pRex52와 함께 트랜스펙션 되었다. 형질도입된 세포의 상청액은 수집되어 FVIII 활성에 대하여 정량분석 되었다. B. K562 세포는 1.5 MOI에서 HIV-1-BDD.FVIII로 vEx23, vEx28 또는 vEx52와 함께 형질도입 되었다. 형질도입된 세포의 상청액은 수집되어 FVIII 활성에 대하여 스크리닝 되었다. 데이터는 최소 3번의 독립된 실험의 평균± 표준오차(means± S.E.)로 표시된다. C. RT-PCR은 형질도입된 세포로부터 얻은 RNAs로 수행되었다. B-도메인-삭제된 FVIII는 1.1 Kb의 제조물을 보였다. vEx23: vEx23로 형질도입, vEx28: vEx28로 형질도입, vEx52: vEx52로 형질도입.

[0069] 실시예 10 : PMA 처리 유무에 따른 Factor VIII의 활성 측정 실험

[0070] von Willebrand factor의 domain을 exon 23, exon 28, exon 32되는 부분에서 C-말단쪽으로 제거하여 pRex23, pRex28, pRex32라 명하였고, full length의 vWF는 pRex52이다. 이를 BDD.FVIII를 운반하는 pREP7-BF와 함께 발

현시켰을 때 밖으로 분비되어진 제8혈액응고인자의 활성이 가장 큰 von Willebrand factor vector를 찾은 결과 pREP7-BF가 pRex32와 함께 transfect되어졌을 때 였다. (도 8). 도 8은 본 발명의 일실시예로서 각 돌연변이 vWF에 의한 제8혈액응고인자의 활성을 Chromogenic Assay로 측정한 결과이다. HeLa cell에 pREP7, pREP7-BF와 pRex23, pREP7-BF와 pRex28, pREP7-BF와 pRex32, 그리고 pREP7-BF와 pRex52를 transfect한 뒤, supernatant로 분비되어진 FVIII의 functional activity를 측정하였다. 도 8a는 정상상태(상처없는 상태)에서 제8혈액응고인자의 활성을 측정한 것으로서 모두 basal level에 비해 활성이 증가되었으며 32가 가장 크게 나타났다. 도 8b는 상처가 난 상태를 인위적으로 만들기 위해 PMA(phorbol ester)를 처리한 것인데 모두 최소 3배이상 FVIII분비가 유도되고 basal level에 비하여 크게 차이를 나타냈다. 이는 평상시에는 별로 과잉발현 안되지만 (평상시엔 항체 형성 등등의 이유로 low level이 바람직), 상처가 난 상태에서 FVIII 분비가 크게 유도되는 결과는 실제 혈우병의 임상에 있어서 매우 중요한 의미를 가진다.

[0071] **실험결과 1. 렌티바이러스 생성**

[0072] pvEx52(LTRs)를 제조하기 위하여 HIV-1-유래 렌티바이러스의 2개의 긴 말단 반복부위(long terminal repeats, LTRs) 사이에 8.8 Kb의 폰 빌리 브란트 인자(von Willebrand factor) cDNA를 클로닝하였다(도 1). vWF cDNA는 *Not*I을 사용하여 vW-8(ATCC #59126)로부터 분리한 후 렌티바이러스 벡터에 클로닝 하였다. vWF 유전자를 IRES-eGFP와 융합시킴으로써, 바이러스 입자를 팩킹(packaging)하는데 필요한 또 다른 바이러스 유전자들과 함께 293T 세포로 트랜스펙션(transfection) 후 바이러스 생성의 간접적인 지표로서 형광단백질(enhanced green fluorescence protein, eGFP)의 사용을 가능하게 하였다(Parolin et al., 1996; Yee et al., 1994). 팩킹 벡터는 CMV 프로모터의 조절하에서 *gag*와 *pol*을 포함하여, HIV-1의 *tat*와 *rev*를 CMV 프로모터의 조절하에서 개별적으로 발현하였다. 본 발명자들은 HIV-1 *env* 대신에 수포성구내염 바이러스 G 단백질(vesicular stomatitis virus G protein, VSV-G)을 사용하였다(Hofmann et al., 1999).

[0073] **실험결과 2. HIV-1 위형 VSV-G(VSV-G pseudotyped HIV-1)의 형질도입**

[0074] COS-1 세포를 완전한 vWF를 가진 vEx52, 또는 eGFP를 발현하는 HIV-1-eGFP 렌티바이러스로 형질도입시켰다. 형질도입시킨 COS-1로부터 게놈 DNA를 분리하고, 인간 vWF 유전자와 HIV-1 LTR에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. vWF는 vEx52-형질도입된 세포에서만 증폭할 수 있었던 반면, LTR은 vEx52와 HIV-1-eGFP-형질도입된 세포 둘 다에서 증폭할 수 있었다(도 2의 A). 그리고 RNA를 형질도입된 세포로부터 준비하여, 그 cDNA를 합성하였고 vWF와 LTR에 대한 PCR을 수행하였다(도 2의 B). RT-PCR의 결과는 게놈 DNA의 PCR 증폭결과와 일치하였다. vWF는 vEx52-형질도입된 세포에서만 증폭되었고, LTR은 vEx52와 HIV-1-eGFP 형질도입된 세포 둘 다에서 검출되었다.

[0075] **실험결과 3. 형질도입된 림프아세포로부터 vWF의 발현과 vEx52의 농축**

[0076] Jurkat 세포를 2×10^5로 배양하고 농축되지 않은 vEx52 바이러스 500 μl로 형질도입 시켰다. FACS 분석은 5.55%의 세포들이 GFP 발현에 대하여 양성임을 보여준다(도 3). 바이러스 현탁액을 50,000× g에서 원심분리로 160배까지 농축한 후, 농축된 바이러스 5 μl를 동수의 Jurkat 세포에 형질도입 하는데 사용하여, 29.51% eGFP+의 수율을 얻었다(도 3). vEx52 바이러스를 농축함으로써, 역가를 2.8×10^4 particles/ml에서 2.3×10^7 particles/ml까지 증가시켰다. 벡터의 트랜스펙션은 렌티바이러스 생산을 유도하는데, 이는 gGFP의 발현에 의해 간접적으로 확인하였다(도 4의 A). 그리고 농축되지 않거나 농축된 vEx52 둘 다의 형질도입과 발현을 eGFP 발현으로부터 형광으로 가시화하였다(도 4의 B-D). vEx52로부터 vWF 발현을 증명하기 위하여, COS-1 세포를 MOI 0.5에서 vEx52로 형질도입하고 인간 vWF 항체로 표지한 다음, TRITC 염색을 수행하였다(도 4의 E). 그리고 형질도입된 구성물(constructs)이 연장된 기간동안 유지되는지를 확인하기 위하여, 1×10^5 Jurkat 세포를 MOI 0.5에서 형질도입 시켰다. 4일 후, FACS 분석에 의해 38.27%의 세포가 eGFP에 대하여 양성으로 나타났다. 형질도입 후 9, 15, 35, 50 및 90일째에 분석에서, 각각 33.01%, 11.99%, 11.32%, 6.13%, 및 5.56%의 세포들이 eGFP+ 였다(데이터 미도시).

[0077] **실험결과 4. 도메인-제거된 vWF의 구성**

[0078] pRex23과 pRex28은 엑손 24-46 및 29-46을 제거함으로써 pREP7-vWF(Dr. Subrata Banerjee로부터 충분히 제공받음)으로부터 제조하였다. pvEx23과 pvEx28은 pvEx52로부터 동일한 방법으로 제조하였다(도 5의 A). 상기 서열들은 정방향 프라이머 5′ -CGTGATGAGACGCTCCAG-3′ 와, pRex23와 pvEx23에 대한 Ex23PR의 역방향 프라이머 5′ -TTTTCTGGTGTCAGCACACTG-3′ 및 pRex28와 pvEx28에 대한 Ex28PR의 역방향 프라이머 5′ -CAGGTGCAGGGGAGAGG- 3′를 이용하여 PCR에 의해 제거되었다. 그 후, pvEx23와 pvEx28은 팩킹 벡터와 함께 HIV-1 위형 VSV-G를 제조하기 위해 사용되었고, Jurkat 세포에서 적정되었다. vEx23와 vEx28의 바이러스 상청액(supernatants) 500 μl를 각각 형질도입에 사용할 때 35.02%와 26.30%의 세포들이 eGFP에 양성으로 분석되었다(도 5의 B).

[0079] **실험결과 5. 분비된 FVIII의 기능적 활성**

[0080] FVIII의 분비 시 도메인-제거된 vWF의 효과를 시험하기 위하여, 293T 세포를 하나의 pRex23, pRex28, 또는 pRex52와 함께 pREP7-BDD.FVIII로 트랜스펙션 시켰다. 트랜스펙션 48시간 후, 상청액을 수집하고 발색법(chromogenic assays)으로 FVIII의 기능적 활성을 스크리닝 하였다. pRex23, pRex28 및 pRex52로 형질도입으로부터 각각 28.89± 18.86, 107.22± 30.64 및 199.44 ± 58.93의 FVIII 활성 수준을 얻었다(도 6). 따라서 분비된 FVIII의 기능적 활성은 vWF의 domain의 일부가 제거됨에 따라 감소하였다. 다음으로, 본 발명자들은 vWF 렌티바이러스의 구성요소로서 도메인-제거된 vWF가 형질도입될 때 그 효과를 평가하였다. K562 세포를 vEx23, vEx28 또는 vEx52와 함께 HIV-1을 발현하는 BDD-FVIII인 vBDD.FVIII로 MOI 1.5에서 형질도입 시켰다. 형질도입된 세포로부터 얻은 RNA로 수행한 RT-PCR로부터 형질도입된 FVIII의 발현이 확인되었다(도 6). 형질도입된 세포의 상청액에서 FVIII 활성은 vEx52-형질도입된 세포에 대하여 28.33± 5.50이고, vEx23-와 vEx28-형질도입된 세포에 대해서는 각각 33.89± 3.93과 53.33± 9.43였다(도 6). These data suggest that the deleted form of vWF, vEx28, is the most efficient at promoting secretion of FVIII via interaction of its minimal essential domains with FVIII. 이러한 데이터는, FVIII와 vWF의 최소 필수 도메인(minimal essential domains)의 상호작용을 통해서 FVIII의 분비를 유도하는데에는 vWF의 삭제된 형태인 vEx28이 가장 효과적임을 나타낸다.

산업상 이용가능성

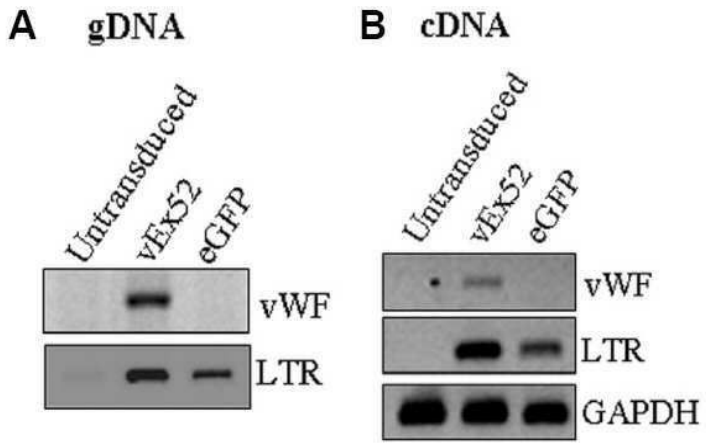
[0081] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 사이즈를 줄인 돌연변이 von Willebrand factor를 이용함으로써 바이러스 벡터에서 제8혈액응고인자와 함께 효율적으로 발현시키고 제8혈액응고인자의 활성을 현저히 높힐 수 있다. 또한, 상기 본 발명의 바이러스 벡터는 혈우병 치료를 위한 유전자 요법에 효율적으로 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 제8혈액응고인자 및 von Willebrand factor의 동시 발현은 혈우병A의 유전자 치료와 같은 임상적 응용에 있어서 매우 유용하다.

도면

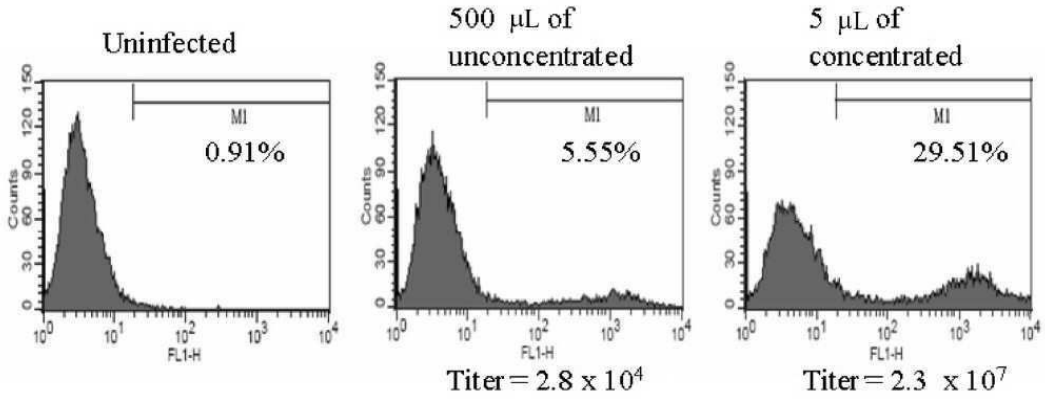
도면1



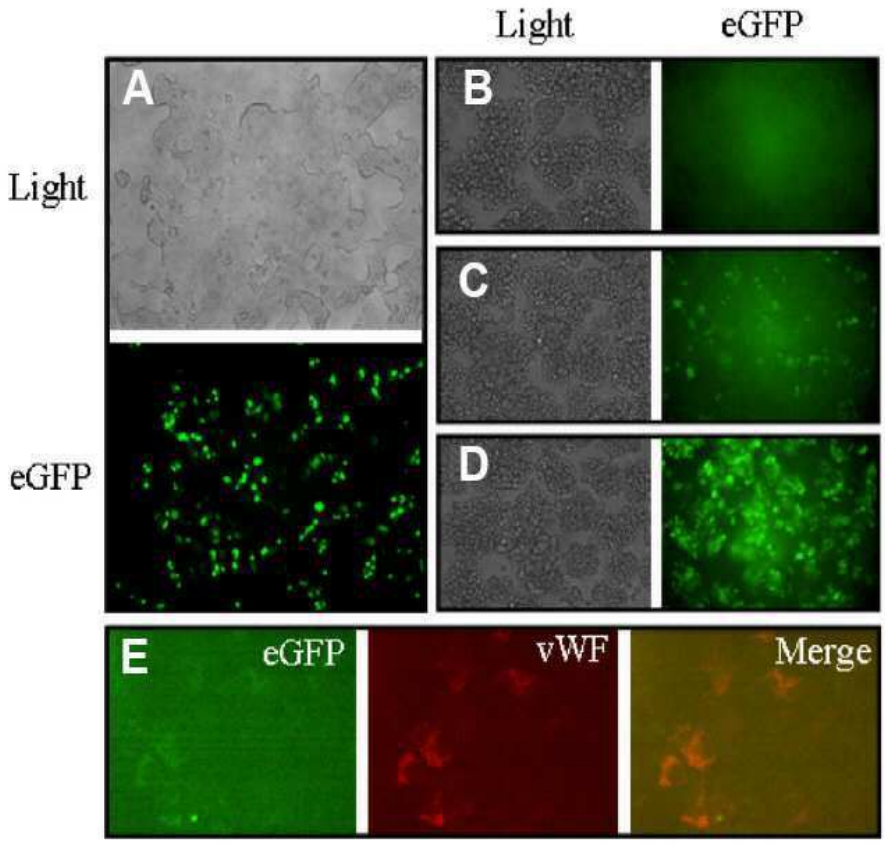
도면2


A gDNA
Untransduced
vEx52
eGFP
vWF
LTR
B cDNA
Untransduced
vEx52
eGFP
vWF
LTR
GAPDH

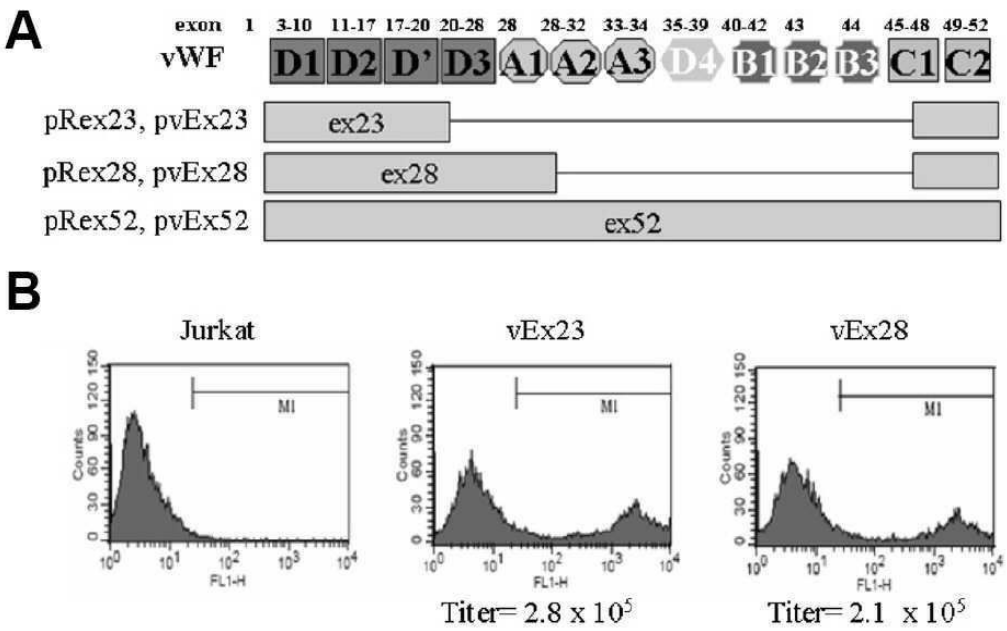
도면3


Uninfected
M1
0.91%
500 μL of unconcentrated
M1
5.55%
Titer = 2.8 x 10^4
5 μL of concentrated
M1
29.51%
Titer = 2.3 x 10^7
Counts
FL1-H

도면4

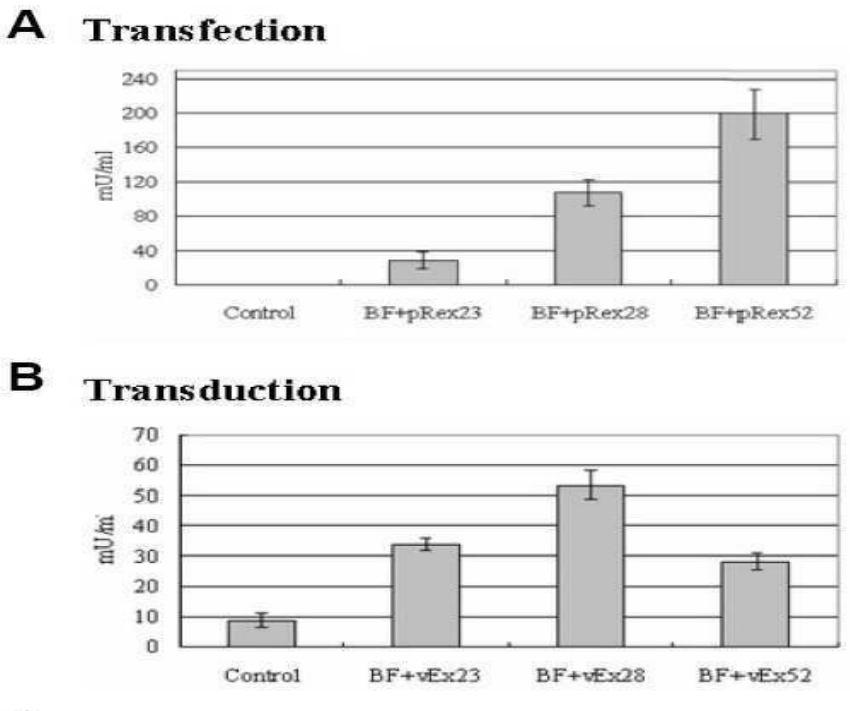

Light
eGFP
A
B
C
D
E
eGFP
vWF
Merge

도면5

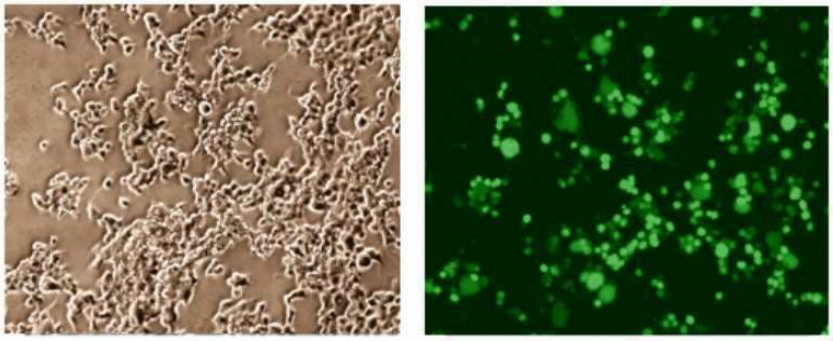

A
exon 1 3-10 11-17 17-20 20-28 28 28-32 33-34 35-39 40-42 43 44 45-48 49-52
vWF
D1 D2 D' D3 A1 A2 A3 D4 B1 B2 B3 C1 C2
pRex23, pvEx23
ex23
pRex28, pvEx28
ex28
pRex52, pvEx52
ex52

B
Jurkat
vEx23
vEx28
M1
Counts
FL1-H
Titer= 2.8 x 10^5
Titer= 2.1 x 10^5

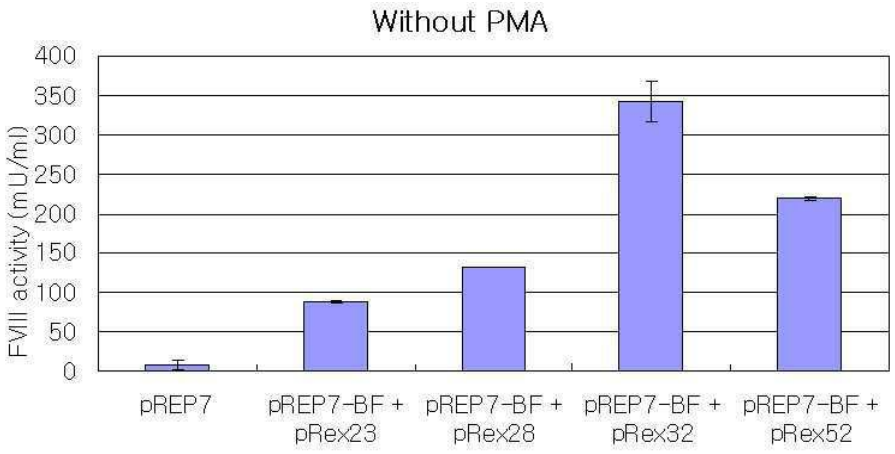
도면6


A
Transfection
240
200
160
120
80
40
0
mU/ml
Control
BF+pRex23
BF+pRex28
BF+pRex52
B
Transduction
70
60
50
40
30
20
10
0
mU/ml
Control
BF+vEx23
BF+vEx28
BF+vEx52
C
RT-PCR
Untransduced
vEx23
vEx28
vEx52
FVIII
FVIII

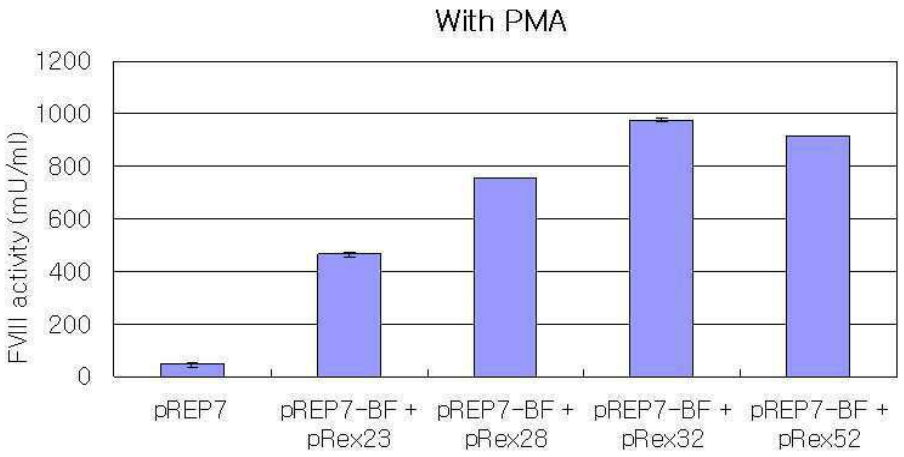
도면7



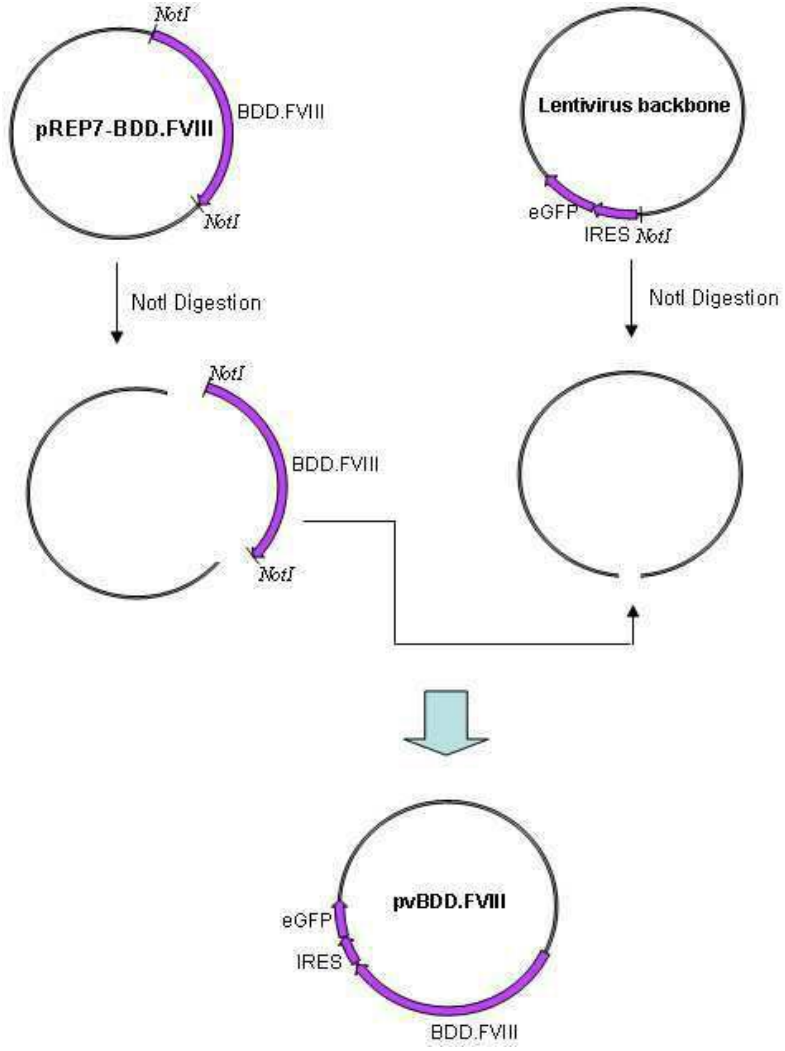
도면8a


Without PMA
FVIII activity (mU/ml)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pREP7
pREP7-BF + pRex23
pREP7-BF + pRex28
pREP7-BF + pRex32
pREP7-BF + pRex52

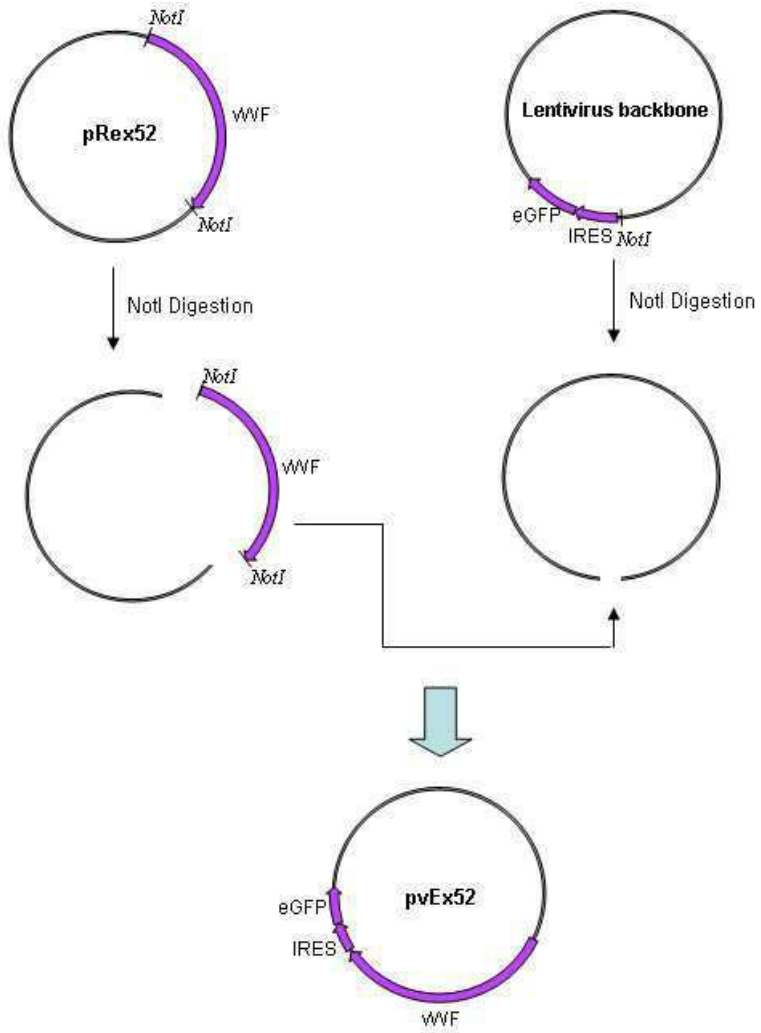
도면8b


With PMA
FVIII activity (mU/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
pREP7
pREP7-BF + pRex23
pREP7-BF + pRex28
pREP7-BF + pRex32
pREP7-BF + pRex52

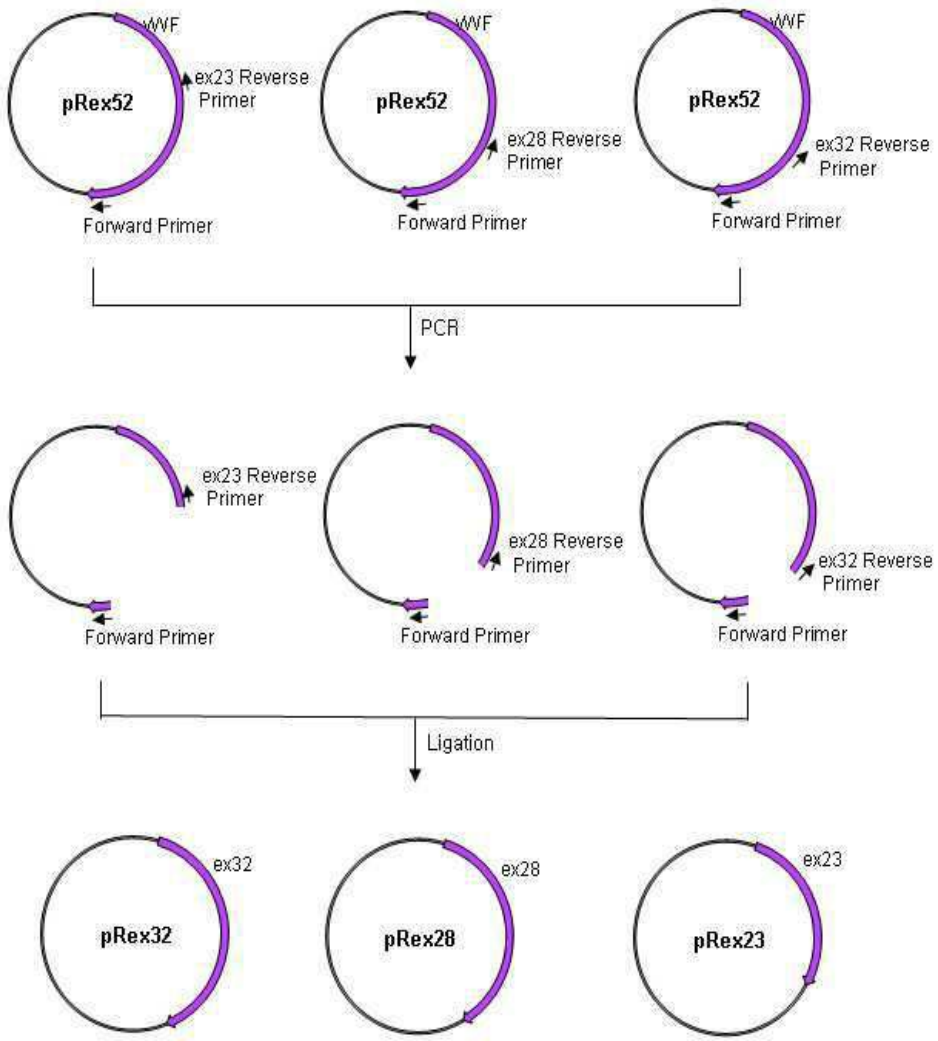
도면9


NotI
pREP7-BDD.FVIII
BDD.FVIII
NotI
NotI Digestion
NotI
BDD.FVIII
NotI
Lentivirus backbone
eGFP
IRES NotI
NotI Digestion
pvBDD.FVIII
eGFP
IRES
BDD.FVIII

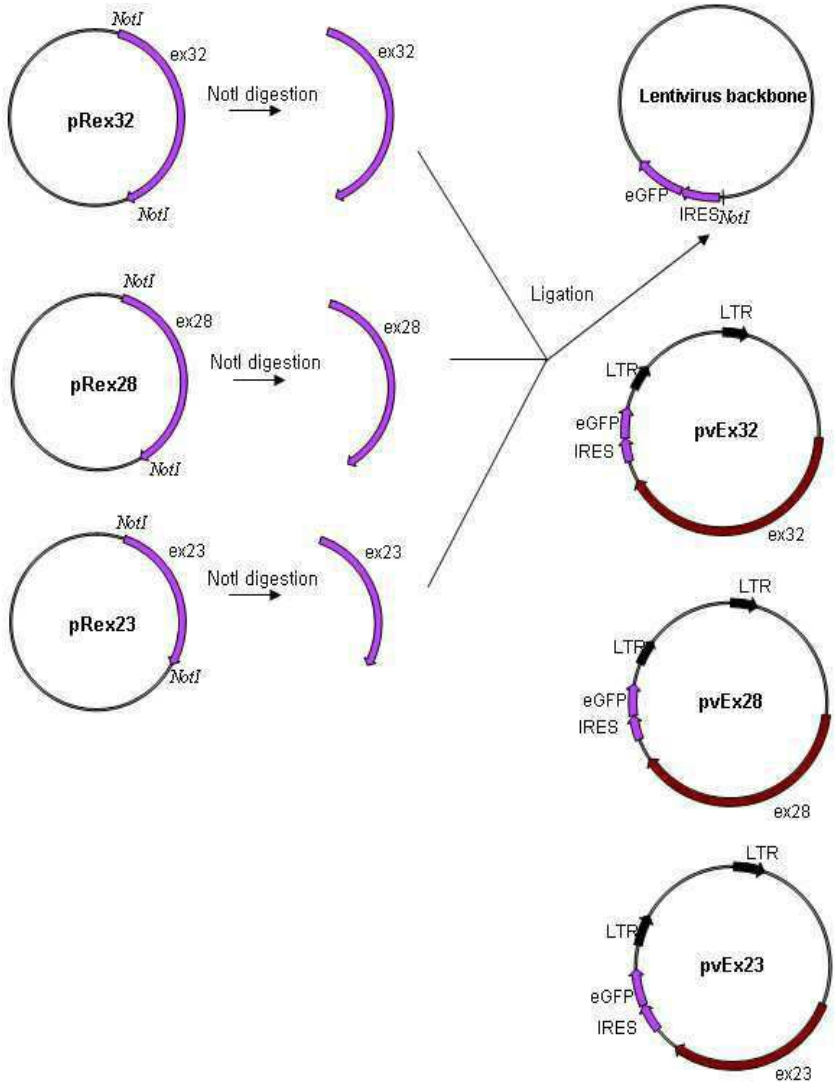
도면10


NotI
pRex52
vWF
NotI
Lentivirus backbone
eGFP
IRES
NotI
NotI Digestion
NotI Digestion
NotI
vWF
NotI
pvEx52
eGFP
IRES
vWF

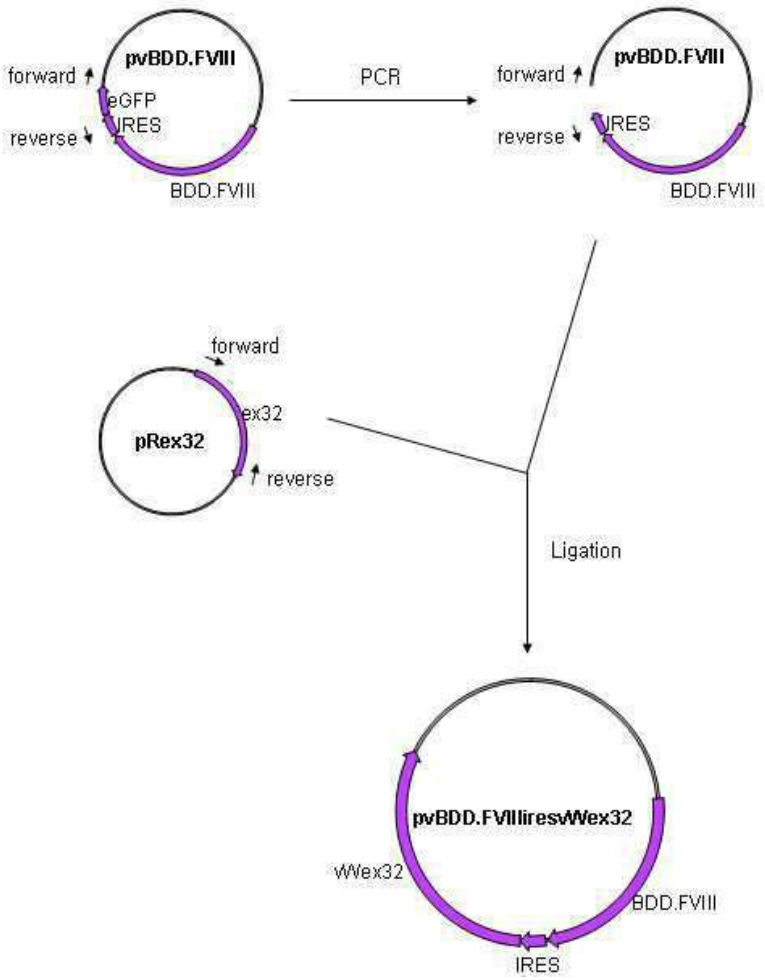
도면11


WF
pRex52
ex23 Reverse Primer
Forward Primer
WF
pRex52
ex28 Reverse Primer
Forward Primer
WF
pRex52
ex32 Reverse Primer
Forward Primer
PCR
ex23 Reverse Primer
Forward Primer
ex28 Reverse Primer
Forward Primer
ex32 Reverse Primer
Forward Primer
Ligation
ex32
pRex32
ex28
pRex28
ex23
pRex23

도면12


NotI
ex32
pRex32
NotI
NotI digestion
ex32
NotI
ex28
pRex28
NotI
NotI digestion
ex28
NotI
ex23
pRex23
NotI
NotI digestion
ex23
Ligation
Lentivirus backbone
eGFP
IRES
NotI
LTR
LTR
eGFP
IRES
pvEx32
ex32
LTR
LTR
eGFP
IRES
pvEx28
ex28
LTR
LTR
eGFP
IRES
pvEx23
ex23

도면13



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Recombinant expression vector system for variants of coagulation factor VIII and von Willebrand factor

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 3564

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60

ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcggaagt 120

gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180

ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240

agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt tgtcaatggt 300

accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360

gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420

gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480

ctgtgtggca actttaacat ctttgctgaa gatgacttta tgacccaaga agggaccttg 540

acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtggtgt 600

gaacgggcat ctcctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660

ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgctg ccaccctctg 720

gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780

ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgccca ggagggaatg 840

gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggtatggag 900

tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960

tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020

ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctcccggc 1080

acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140

aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa gagctttgac 1200

aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260

cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga cgctgtgtgc 1320

acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380

ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440

cgcatccagc atacagtgac ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500

gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc 1560

tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac cccctctggg 1620

ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680

gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740

gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800

ccgctgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgcgag 1860

tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc 1920

gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag 1980

tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggatga ggaatgcaat 2040

gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga gaggggggac 2100

tgcgtgccca aggcccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 2160

atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220

agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct gtctcatcgc 2280

agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tggtgtgtcc cgctgacaac 2340

ctgcgggctg aagggctcga gtgtaccaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcatg 2400

agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggtccggca tgagaacaga 2460

tgtgtggccc tggaaaggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc ccctggagaa 2520

acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcaggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580

catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac cttcgacggg 2640

ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt 2700

aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc ctcagtgaaa 2760

tgcaagaaac gggtcaccat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820

gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga gtctggccgg 2880

tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcatc 2940

tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000

ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060

tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaacg tgatgagacg 3120

ctccaggatg gctgtgatac tcacttctgc aaggtcaatg agagaggaga gtacttctgg 3180

gagaagaggg tcacaggctg cccacccttt gatgaacaca agtgtctggc tgagggaggt 3240

aaaattatga aaattccagg cacctgctgt gacacatgtg aggagcctga gtgcaacgac 3300

atcactgcca ggctgcagta tgtcaaggtg ggaagctgta agtctgaagt agaggtggat 3360

atccactact gccagggcaa atgtgccagc aaagccatgt actccattga catcaacgat 3420

gtgcaggacc agtgctcctg ctgctctccg acacggacgg agcccatgca ggtggccctg 3480

cactgcacca atggctctgt tgtgtaccat gaggttctca atgccatgga gtgcaaatgc 3540

tcccccagga agtgcagcaa gtga 3564

<210> 2

<211> 1187

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30
Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60
Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80
Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95
Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110
Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys

115 120 125
Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140
Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160
Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175
Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205
Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220
Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240
Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala

260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His

275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys

290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met

305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu

325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His

340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn

355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys

370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp

385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg

405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys

420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu

435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val

450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu

465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu

485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu

500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn

515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro

530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln

545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met

565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe

580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys

595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly

610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val

625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln

645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu

660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys

690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp

705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met

725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val

740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg

755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780
Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800
Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815
His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830
Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr

835 840 845
Cys Val Cys Gln Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860
Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880
Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895
Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925
Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940
Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960
Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975
His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val

980 985 990
Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser

1010 1015 1020

Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Arg Asp Glu Thr

1025 1030 1035 1040

Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly

1045 1050 1055

Glu Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu

1060 1065 1070

His Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr

1075 1080 1085

Cys Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg

1090 1095 1100

Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp

1105 1110 1115 1120

Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile

1125 1130 1135

Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg

1140 1145 1150

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val Val

1155 1160 1165

Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro Arg Lys

1170 1175 1180

Cys Ser Lys

1185

<210> 3

<211> 5508

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 3

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60

ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcggaagt 120

gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180

ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240

agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt tgtcaatggt 300

accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360

gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420

gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480

ctgtgtggca actttaacat ctttgctgaa gatgacttta tgacccaaga agggaccttg 540

acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtggtgt 600

gaacgggcat ctcctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660

ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgctg ccaccctctg 720

gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780

ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgccca ggagggaatg 840

gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggtatggag 900

tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960

tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020

ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctcccggc 1080

acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140

aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa gagctttgac 1200

aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260

cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga cgctgtgtgc 1320

acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380

ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440

cgcatccagc atacagtgac ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500

gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc 1560

tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac cccctctggg 1620

ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680

gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740

gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800

ccgctgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgcgag 1860

tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc 1920

gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag 1980

tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggatga ggaatgcaat 2040

gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga gaggggggac 2100

tgcgtgccca aggcccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 2160

atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220

agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct gtctcatcgc 2280

agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tggtgtgtcc cgctgacaac 2340

ctgcgggctg aagggctcga gtgtaccaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcatg 2400

agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggtccggca tgagaacaga 2460

tgtgtggccc tggaaaggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc ccctggagaa 2520

acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580

catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac cttcgacggg 2640

ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt 2700

aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc ctcagtgaaa 2760

tgcaagaaac gggtcaccat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820

gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga gtctggccgg 2880

tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcatc 2940

tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000

ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060

tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120

tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttcctcctgt 3180

agaatcctta ccagtgacgt cttccaggac tgcaacaagc tggtggaccc cgagccatat 3240

ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgcctgcttc 3300

tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360

aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420

gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagcaccct 3480

gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgcccactg ccctccaggg 3540

aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgaccctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600

gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgaccctgag 3660

cactgccaga tttgccactg tgatgttgtc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720

ggaggcctgg tggtgcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag 3780

gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga cctggtcttc 3840

ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgctgaa ggcctttgtg 3900

gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 3960

taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg 4020

cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggtc 4080

ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcatc 4140

accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac 4200

gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg gccccatgcc 4260

aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc cttcgtgctg 4320

agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt 4380

gcccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac tgtgggcccg 4440

gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct ggatgtggcg 4500

ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc 4560

atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt cacggtgctg 4620

cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc caaaggggac 4680

atcctgcagc gggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg 4740

gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg 4800

cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct 4860

ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatg ccaacgtgca ggagctggag 4920

aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag 4980

gctcctgacc tggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat ccccaccctc 5040

tcccctgcac ctcgtgatga gacgctccag gatggctgtg atactcactt ctgcaaggtc 5100

aatgagagag gagagtactt ctgggagaag agggtcacag gctgcccacc ctttgatgaa 5160

cacaagtgtc tggctgaggg aggtaaaatt atgaaaattc caggcacctg ctgtgacaca 5220

tgtgaggagc ctgagtgcaa cgacatcact gccaggctgc agtatgtcaa ggtgggaagc 5280

tgtaagtctg aagtagaggt ggatatccac tactgccagg gcaaatgtgc cagcaaagcc 5340

atgtactcca ttgacatcaa cgatgtgcag gaccagtgct cctgctgctc tccgacacgg 5400

acggagccca tgcaggtggc cctgcactgc accaatggct ctgttgtgta ccatgaggtt 5460

ctcaatgcca tggagtgcaa atgctccccc aggaagtgca gcaagtga 5508

<210> 4

<211> 1833

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu

225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu

245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala

260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His

275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys

290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met

305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu

325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His

340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn

355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys

370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp

385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg

405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys

420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu

435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val

450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu

465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495
Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510
Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525
Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540
Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln

545 550 555 560
Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575
Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590
Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605
Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640
Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655
Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670
Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685
Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys

690 695 700
Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720
Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr His Val Cys Asp Ala
850 855 860

Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly Leu
865 870 875 880

Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp Tyr
885 890 895

Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys Gly
900 905 910

Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val
915 920 925

Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg
930 935 940

Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr
945 950 955 960

Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg His
965 970 975

Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val Cys

980 985 990

Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr Ser

995 1000 1005

Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser Trp

1010 1015 1020

Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp Ser

1025 1030 1035 1040

Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val Asp

1045 1050 1055

Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn Lys

1060 1065 1070

Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr Cys

1075 1080 1085

Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala

1090 1095 1100

Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg

1105 1110 1115 1120

Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu

1125 1130 1135

Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys

1140 1145 1150

Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys

1155 1160 1165

Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu

1170 1175 1180

Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val

1185 1190 1195 1200

Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser

1205 1210 1215

Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr

1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp

1235 1240 1245

Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro

1250 1255 1260

Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu

1265 1270 1275 1280

Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys

1285 1290 1295

Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp

1300 1305 1310

Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile

1315 1320 1325

Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser

1330 1335 1340

Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu

1345 1350 1355 1360

Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala

1365 1370 1375

Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met

1380 1385 1390

Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile

1395 1400 1405

Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg

1410 1415 1420

Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser

1425 1430 1435 1440

Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys

1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala

1460 1465 1470

Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro

1475 1480 1485

Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser

1490 1495 1500

Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu

1505 1510 1515 1520

Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr

1525 1530 1535

Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu

1540 1545 1550

Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr

1555 1560 1565

Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser

1570 1575 1580

Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn

1585 1590 1595 1600

Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg

1605 1610 1615

Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala

1620 1625 1630

Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu

1635 1640 1645

Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu

1650 1655 1660

Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro

1665 1670 1675 1680

Ala Pro Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys

1685 1690 1695

Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly

1700 1705 1710

Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile

1715 1720 1725

Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys

1730 1735 1740

Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys
1745 1750 1755 1760

Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser
1765 1770 1775

Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser
1780 1785 1790

Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys
1795 1800 1805

Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys
1810 1815 1820

Lys Cys Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys
1825 1830

<210> 5

<211> 6075

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60

ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcggaagt 120

gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180

ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240

agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt tgtcaatggt 300

accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360

gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420

gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480

ctgtgtggca actttaacat ctttgctgaa gatgacttta tgacccaaga agggaccttg 540

acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtggtgt 600

gaacgggcat ctcctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660

ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgctg ccaccctctg 720

gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780

ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgccca ggagggaatg 840

gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggtatggag 900

tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960

tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020

ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta ccctcccggc 1080

acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140

aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa gagctttgac 1200

aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260

cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga cgctgtgtgc 1320

acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380

ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440

cgcatccagc atacagtgac ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500

gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc 1560

tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac cccctctggg 1620

ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680

gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740

gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800

ccgctgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgcgag 1860

tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc 1920

gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag 1980

tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggatga ggaatgcaat 2040

gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga gaggggggac 2100

tgcgtgccca aggcccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 2160

atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220

agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct gtctcatcgc 2280

agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tggtgtgtcc cgctgacaac 2340

ctgcgggctg aagggctcga gtgtaccaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcatg 2400

agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggtccggca tgagaacaga 2460

tgtgtggccc tggaaaggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc ccctggagaa 2520

acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcaggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580

catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac cttcgacggg 2640

ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt 2700

aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc ctcagtgaaa 2760

tgcaagaaac gggtcaccat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820

gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga gtctggccgg 2880

tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcatc 2940

tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000

ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060

tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120

tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttcctcctgt 3180

agaatcctta ccagtgacgt cttccaggac tgcaacaagc tggtggaccc cgagccatat 3240

ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgcctgcttc 3300

tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360

aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420

gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagcaccct 3480

gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgcccactg ccctccaggg 3540

aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgaccctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600

gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgaccctgag 3660

cactgccaga tttgccactg tgatgttgtc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720

ggaggcctgg tggtgcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag 3780

gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga cctggtcttc 3840

ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgctgaa ggcctttgtg 3900

gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 3960

taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg 4020

cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggtc 4080

ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcatc 4140

accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac 4200

gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg gccccatgcc 4260

aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc cttcgtgctg 4320

agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt 4380

gcccctgaag ccctcctctc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac tgtgggcccg 4440

gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct ggatgtggcg 4500

ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc 4560

atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt cacggtgctg 4620

cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc caaaggggac 4680
atcctgcagc gggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg 4740
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg 4800
cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct 4860
ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatg ccaacgtgca ggagctggag 4920
aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag 4980
gctcctgacc tggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat ccccaccctc 5040

tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga tggctcctcc 5100
agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt catttcaaaa 5160
gccaatatag ggcctcgtct cactcaggtg tcagtgctgc agtatggaag catcaccacc 5220
attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct tgtggacgtc 5280
atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc tgtgcgatac 5340
ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt catcctggtc 5400
acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc caacagagtg 5460

acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg gatcttggca 5520
ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct ccctaccatg 5580
gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctc gtgatgagac gctccaggat 5640
ggctgtgata ctcacttctg caaggtcaat gagagaggag agtacttctg ggagaagagg 5700
gtcacaggct gcccaccctt tgatgaacac aagtgtctgg ctgagggagg taaaattatg 5760
aaaattccag gcacctgctg tgacacatgt gaggagcctg agtgcaacga catcactgcc 5820
aggctgcagt atgtcaaggt gggaagctgt aagtctgaag tagaggtgga tatccactac 5880

tgccagggca aatgtgccag caaagccatg tactccattg acatcaacga tgtgcaggac 5940
cagtgctcct gctgctctcc gacacggacg gagcccatgc aggtggccct gcactgcacc 6000
aatggctctg ttgtgtacca tgaggttctc aatgccatgg agtgcaaatg ctcccccagg 6060
aagtgcagca agtga 6075

<210> 6

<211> 2023

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30
Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45
Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60
Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80
Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu

85 90 95
Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110
Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125
Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140
Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175
Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190
Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205
Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220
Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu

225 230 235 240
Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu

245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala

260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His

275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys

290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met

305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu

325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His

340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn

355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys

370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp

385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg

405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys

420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu

435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val

450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu

465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu

485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu

500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn

515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro

530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln

545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met

565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe

580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys

595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly

610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val

625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln

645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu

660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys

690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp

705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met

725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val

740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765
Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780
Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800
Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg

805 810 815
His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830
Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845
Cys Val Cys Gln Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860
Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895
Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910
Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925
Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940
Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg

945 950 955 960
Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975
His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
980 985 990
Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn Ser
1010 1015 1020

Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp
1025 1030 1035 1040
Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val
1045 1050 1055
Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn
1060 1065 1070
Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr
1075 1080 1085
Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile

1090 1095 1100
Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr Trp
1105 1110 1115 1120
Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg
1125 1130 1135
Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala
1140 1145 1150
Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln
1155 1160 1165

Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp
1170 1175 1180
Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu
1185 1190 1195 1200
Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro
1205 1210 1215
Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu
1220 1225 1230
Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr

1235 1240 1245
Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu

1250 1255 1260

Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe

1265 1270 1275 1280

Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu

1285 1290 1295

Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys

1300 1305 1310

Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr

1315 1320 1325

Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala

1330 1335 1340

Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val

1345 1350 1355 1360

Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu

1365 1370 1375

Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg

1380 1385 1390

Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys

1395 1400 1405

Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln

1410 1415 1420

Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu

1425 1430 1435 1440

Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr

1445 1450 1455

Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp

1460 1465 1470

Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu

1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu Glu

1490 1495 1500

Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe

1505 1510 1515 1520

Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His

1525 1530 1535

Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe

1540 1545 1550

Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile

1555 1560 1565

Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr

1570 1575 1580

Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala

1585 1590 1595 1600

Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile

1605 1610 1615

Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro

1620 1625 1630

Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro

1635 1640 1645

Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu

1650 1655 1660

Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu

1665 1670 1675 1680

Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu

1685 1690 1695

Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser

1700 1705 1710

Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr

1715 1720 1725

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro

1730 1735 1740

Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val

1745 1750 1755 1760

Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala
1765 1770 1775
Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser
1780 1785 1790
Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp
1795 1800 1805
Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile

1810 1815 1820
Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly
1825 1830 1835 1840
Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu
1845 1850 1855
Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser
1860 1865 1870
Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val
1875 1880 1885

Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro
1890 1895 1900
Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys
1905 1910 1915 1920
Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp
1925 1930 1935
Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu
1940 1945 1950
Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala

1955 1960 1965
Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys
1970 1975 1980
Ser Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn
1985 1990 1995 2000
Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys
2005 2010 2015

Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys

2020

<210> 7

<211> 4329

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300

gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420

gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480

aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgtagagaa 600

gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660

tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720

gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780

ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840

accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900

cgccaggcgt ccttggaaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960

gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080

gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140

gatgacaact ctccttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200

tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260

cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320

aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380

attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg 1440

ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500

gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt 1560

ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620

actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680

gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740

agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860

cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920

tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980

attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040

atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160

atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220

agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaata 2280

actcgtacta ctcttcagtc agatcaagag gaaattgact atgatgatac catatcagtt 2340

gaaatgaaga aggaagattt tgacatttat gatgaggatg aaaatcagag cccccgcagc 2400

tttcaaaaga aaacacgaca ctattttatt gctgcagtgg agaggctctg ggattatggg 2460

atgagtagct ccccacatgt tctaagaaac agggctcaga gtggcagtgt ccctcagttc 2520

aagaaagttg ttttccagga atttactgat ggctccttta ctcagccctt ataccgtgga 2580

gaactaaatg aacatttggg actcctgggg ccatatataa gagcagaagt tgaagataat 2640

atcatggtaa ctttcagaaa tcaggcctct cgtccctatt ccttctattc tagccttatt 2700

tcttatgagg aagatcagag gcaaggagca gaacctagaa aaaactttgt caagcctaat 2760

gaaaccaaaa cttacttttg gaaagtgcaa catcatatgg cacccactaa agatgagttt 2820

gactgcaaag cctgggctta tttctctgat gttgacctgg aaaaagatgt gcactcaggc 2880

ctgattggac cccttctggt ctgccacact aacacactga accctgctca tgggagacaa 2940

gtgacagtac aggaatttgc tctgtttttc accatctttg atgagaccaa aagctggtac 3000

ttcactgaaa atatggaaag aaactgcagg gctccctgca atatccagat ggaagatccc 3060

acttttaaag agaattatcg cttccatgca atcaatggct acataatgga tacactacct 3120

ggcttagtaa tggctcagga tcaaaggatt cgatggtatc tgctcagcat gggcagcaat 3180

gaaaacatcc attctattca tttcagtgga catgtgttca ctgtacgaaa aaaagaggag 3240

tataaaatgg cactgtacaa tctctatcca ggtgtttttg agacagtgga aatgttacca 3300

tccaaagctg gaatttggcg ggtggaatgc cttattggcg agcatctaca tgctgggatg 3360
agcacacttt ttctggtgta cagcaataag tgtcagactc ccctgggaat ggcttctgga 3420
cacattagag attttcagat tacagcttca ggacaatatg gacagtgggc cccaaagctg 3480
gccagacttc attattccgg atcaatcaat gcctggagca ccaaggagcc cttttcttgg 3540
atcaaggtgg atctgttggc accaatgatt attcacggca tcaagaccca gggtgcccgt 3600
cagaagttct ccagcctcta catctctcag tttatcatca tgtatagtct tgatgggaag 3660
aagtggcaga cttatcgagg aaattccact ggaaccttaa tggtcttctt tggcaatgtg 3720

gattcatctg ggataaaaca caatattttt aaccctccaa ttattgctcg atacatccgt 3780
ttgcacccaa ctcattatag cattcgcagc actcttcgca tggagtggat gggctgtgat 3840
ttaaatagtt gcagcatgcc attgggaatg gagagtaaag caatatcaga tgcacagatt 3900
actgcttcat cctactttac caatatgttt gccacctggt ctccttcaaa agctcgactt 3960
cacctccaag ggaggagtaa tgcctggaga cctcaggtga ataatccaaa agagtggctg 4020
caagtggact tccagaagac aatgaaagtc acaggagtaa ctactcaggg agtaaaatct 4080
ctgcttacca gcatgtatgt gaaggagttc ctcatctcca gcagtcaaga tggccatcag 4140

tggactctct tttttcagaa tggcaaagta aaggtttttc agggaaatca agactccttc 4200
acacctgtgg tgaactctct agacccaccg ttactgactc gctaccttcg aattcacccc 4260
cagagttggg tgcaccagat tgccctgagg atggaggttc tgggctgcga ggcacaggac 4320
ctctactga 4329

<210> 8
<211> 1442
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 8

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

```
     50                  55                  60
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65                  70                  75                  80
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

                 85                  90                  95
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
            100                 105                 110
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
        115                 120                 125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
    130                 135                 140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145                 150                 155                 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
                165                 170                 175
Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
            180                 185                 190
Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
        195                 200                 205
Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
    210                 215                 220
Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp

225                 230                 235                 240
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
                245                 250                 255
Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
            260                 265                 270
Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
        275                 280                 285
Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
    290                 295                 300
```

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350
Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365
Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser

370 375 380
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415
Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe

515 520 525
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575
Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605
Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620
Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655
Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670
Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685
Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700
Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720
Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750
Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp
755 760 765
Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys
770 775 780
Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser
785 790 795 800
Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu

805 810 815

Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala

820 825 830

Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe

835 840 845

Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu

850 855 860

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn

865 870 875 880

Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr

885 890 895

Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro

900 905 910

Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys

915 920 925

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala

930 935 940

Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly

945 950 955 960

Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala

965 970 975

His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile

980 985 990

Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn

995 1000 1005

Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu

1010 1015 1020

Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro

1025 1030 1035 1040

Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser

1045 1050 1055

Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val

1060 1065 1070

Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu

1075 1080 1085

Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly

1090 1095 1100

Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met

1105 1110 1115 1120

Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly

1125 1130 1135

Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln

1140 1145 1150

Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser

1155 1160 1165

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp

1170 1175 1180

Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg

1185 1190 1195 1200

Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser

1205 1210 1215

Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr

1220 1225 1230

Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn

1235 1240 1245

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr

1250 1255 1260

His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Trp Met Gly Cys Asp

1265 1270 1275 1280

Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser

1285 1290 1295

Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr

1300 1305 1310

Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala

1315 1320 1325

Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe

1330 1335 1340

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser

1345 1350 1355 1360

Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln

1365 1370 1375

Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val

1380 1385 1390

Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp

1395 1400 1405

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val

1410 1415 1420

His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp

1425 1430 1435 1440

Leu Tyr