



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0036057

(43) 공개일자 2007년04월02일

(21) 출원번호 10-2006-7025253

(22) 출원일자 2006년11월30일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년11월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/015119

(87) 국제공개번호 WO 2005/107785

국제출원일자 2005년04월29일

국제공개일자 2005년11월17일

(30) 우선권주장 60/567,069 2004년04월30일 미국(US)
60/653,247 2005년02월14일 미국(US)
60/667,352 2005년03월31일 미국(US)

(71) 출원인 유니버시티 오브 하와이
미국 하와이 96822 호놀룰루 슈트 280 우드라운 드라이브 2800

(72) 발명자 보켈 칼-빌헬름
미국 하와이 96821 호놀룰루 라우카이 스트리트 1594
프리징거 데이비드 씨.
미국 하와이 96825 호놀룰루 밀로이키 스트리트 1470

(74) 대리인 박종혁
김정옥
정삼영

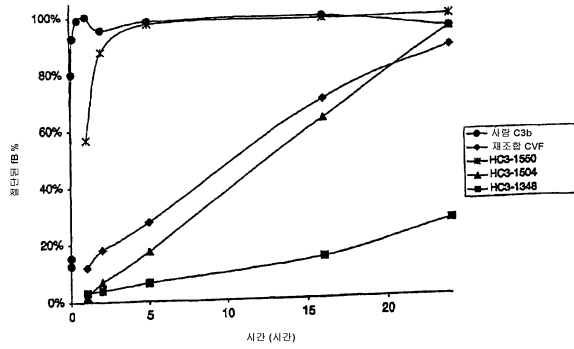
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 코브라 베놈 인자-유사 기능을 갖는 사람 보체 C3 유도체

(57) 요약

코브라 베놈 인자(CVF) 단백질의 상응하는 부분으로 치환된 사람 C3 단백질의 부분을 포함하는 변형 사람 보체 C3 단백질(C3)이 개시되며, 이것은 CVF 기능을 갖지만 면역원성은 실질적으로 감소된 사람 C3 단백질을 생성한다. 유리하게, C3 단백질은 다음의 CVF 특성 중 적어도 한 가지를 함유하도록 조작될 수 있다: C3 전환효소의 증가된 안정성 및 인자 H 및/또는 I의 작용에 대한 증가된 저항성. C3의 알파 사슬의 C-말단 부분에 치환을 함유하는 다수의 하이브리드 C3 단백질이 제시되며 상기 기능에 대해 시험된다. 재관류 손상, 자가면역질환, 및 증가된 보체 활성화를 갖는 다른 질환들과 같은 질환들의 치료 방법이 제시되며, 유전자 치료 및 다른 치료법의 효능을 증가시키는 방법이 제시된다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1.

사람 C3 단백질의 일부분이, 실질적으로 그것에 관련된 서열의 코브라 베놈 인자 단백질의 상응하는 부분으로 치환된 것을 포함하는, 변형 사람 보체 C3 단백질.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, CVF의 치환된 부분이 C3의 알파 사슬 내에 있는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, CVF의 치환된 부분이 C3의 알파 사슬의 C-말단 부분인 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 치환된 C-말단 부분이 사람 C3 단백질의 아미노산 1663을 포함하는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 5.

제 3 항에 있어서, 치환된 C-말단 부분이 사람 C3 단백질의 전체 C-말단까지는 연장되지 않은 내부 부분인 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 변형 단백질이 미변형 사람 C3 단백질과 실질적으로 동일한 수의 아미노산 잔기를 가지는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 치환이 사람 C3 단백질의 아미노산 위치 700-1663 내의 어떤 위치를 포함하는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 치환이 제 1 위치 및 마지막 위치를 포함하며, 여기서 제 1 위치는 749, 874, 936, 1264, 1348, 1496, 1504 및 1550으로 구성된 군에서 선택되고, 마지막 위치는 784, 921, 970, 1324, 1550, 1617 및 1663으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 치환이 아미노산 1550-1663, 1504-1663, 1348-1663, 1550-1617, 1504-1617, 1496-1663, 1348-1617, 1496-1617, 1264-1324, 749-784, 874-921, 994-1663, 994-1550 및 936-970으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 변형 C3 단백질이 인자 B에 대한 친화성을 가지고, 활성 전환효소의 형성을 지원하는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 전환효소는 37°C에서 적어도 약 15분의 고유 반감기를 가지는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 변형 단백질이 C3 또는 C5에 의해 암호화되지 않는 N-말단에 1 내지 19개 아미노산을 추가로 가지는 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 13.

제 1 항에 있어서, 변형 단백질이 실질적으로 비-면역원성인 것을 특징으로 하는 변형 C3 단백질.

청구항 14.

제 1 항의 변형 C3 단백질을 보체의 고갈을 위한 유효량으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 보체를 고갈시키는 방법.

청구항 15.

제 1 항의 변형 C3 단백질을 보체를 고갈시키기에 충분한 양으로 송달하는 단계, 유전자 치료요법을 제공하는 단계; 및 증진된 결과를 관찰하는 단계를 포함하는, 유전자 치료요법의 효능 및/또는 유효성을 증가시키는 방법.

청구항 16.

제 1 항의 변형 C3 단백질을 혈류를 증가시키기에 충분한 양으로 송달하는 단계, 및 치료제 또는 진단제를 제공하는 단계를 포함하는, 치료제 또는 진단제의 송달을 증진시키는 방법.

청구항 17.

제 14 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 송달 단계 전에, 변형 C3 단백질과 특정 조직에 대해 친화성을 갖는 항체를 화학적으로 연결하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

변형 C3 단백질을 보체를 고갈시키기에 충분한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 바람직하지 않은 보체 활성화와 관련된 상태 또는 질환의 치료 방법.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상태 또는 질환은 천식, 전신홍반성 루푸스, 사구체신염, 류마티스 관절염, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 심근허혈, 재관류, 패혈증, 과민급성 거부반응, 이식거부반응, 심장폐우회로, 심근경색증, 혈관성형술, 신장염, 피부근육염, 유사천포창, 척수손상, 및 파킨슨병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

변형 C3 단백질의 적어도 한 가지 특성을 특성화하여 변형 단백질의 기능 프로파일을 형성하는 단계, 및 기능 프로파일과 치료될 질환 또는 상태를 매칭시키는 단계를 포함하는, 변형 C3 단백질을 선택하는 방법.

청구항 21.

제 1 항의 변형 C3 단백질을 암호화하는 핵산 서열.

청구항 22.

제 1 항의 변형 사람 보체 C3 단백질과 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 23.

제 1 항의 변형 C3 단백질을 발현하는 발현 시스템.

명세서

기술분야

관련 출원

본 국제출원은 2004년 4월 30일자 출원된 미국 가 출원 60/567,069, 2005년 2월 14일자 출원된 60/653,247, 및 2005년 3월 30일자 출원된 60/667,352의 우선권을 주장하며, 이들은 각각 그 전체가 본원에 참고자료로 포함된다.

기술분야

일반적으로, 본 발명은 사람 C3 단백질의 일부분이 코브라 베놈 인자(Cobra Venom Factor: CVF) 단백질의 상응하는 부분으로 치환된 사람 보체 C3의 키메라 유도체에 관한 것이다. 바람직하게는, C3의 알파 사슬의 부분이 CVF의 상응하는 부분으로 치환된다.

배경기술

보체의 세 번째 구성요소인 C3는 보체 활성화의 전형적인 경로와 대체 경로 모두에서 중추적인 역할을 하고, 생리학적 C3 활성화 산물의 대부분은 면역반응 및 숙주방어에서 중요한 기능을 가진다. 대체 경로에서는, C3의 활성화 형태인 C3b가 C3 전환효소의 구조 서브유닛이다. 이 생체분자 효소는 C3b와 인자 B의 활성화 형태인 Bb로 구성된다. 이 효소는, C3b와 인자 B가 결합된 다음 인자 D에 의해 절단되어, C3 전환효소 C3b,Bb를 형성하고 활성화 펩티드 Ba를 방출함으로써 형성된다. C3 전환효소는 C3 분자를 C3b와 아나필락시스독소인 C3a로 절단함으로써 C3를 활성화한다. C3b 분자는 C3 전환효소에 매우 근접하여 세포 또는 입자와 결합할 것이다. 결국, 결합된 C3b는 C5가 C5b 및 아나필락시스독소 C5a로 활성화되는 것을 허용할 것이다. C5 활성화는 동일한 C3b,Bb 효소에 의해 일어나는데, 이 효소는 그것이 추가의 C3b 분자와 결합하여 (C3b)₂,Bb로 이루어진 3분자 복합체를 생산할 때 C5를 절단할 수 있다. 이 C5-절단 3분자 효소를 C5 전환효소라고 부른다. C3 및 C5 활성화가 모두 Bb 서브유닛의 동일한 활성 부위에서 일어나므로, 이 효소는 또한 C3/C5 전환효소라고도 불리며, 하나의 EC 번호만이 배정되었다(EC 3.4.21.47).

코브라 독액은 코브라 베놈 인자(CVF)라고 하는 C3의 구조적 및 기능적 유사체를 함유한다. 이 분자는 사람 및 포유류 혈청에 있는 인자 B와 결합하여 CVF,B 복합체를 형성하고, 이 복합체는 또 인자 D에 의해 2분자 효소 CVF,Bb와 Ba로 절단된다. 2분자 복합체인 CVF,Bb는 C3b와 함께 형성된 C3/C5 전환효소와 유사하게 C3 및 C5를 활성화하는 C3/C5 전환효소이다. C3b,Bb와 CVF,Bb의 두 C3/C5 전환효소는 동일한 분자 구조, 활성 부위를 지닌 Bb 서브유닛, 및 기질 특이성을 공유하지만, 두 효소는 상당한 기능적 차이를 나타낸다. CVF,Bb 효소는 C3b,Bb보다 생리화학적으로 훨씬 더 안정하고, 조절 단백질 인자 H 및 I에 의한 불활성화에 저항성이고, 상이한 반응속도학적 특성을 나타내며, C5 절단을 위해 추가의 C3b를 필요로 하지 않는다.

CVF와 포유류 C3는 면역학적 교차-반응성, 아미노산 조성, 원평광 이색성 스펙트럼, 2차 구조, 전자현미경 미세구조, 및 아미노산 서열을 포함하는 몇몇 구조적 유사성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 그럼에도, 두 분자 사이에는 상당한 구조적 차이가 존재한다. C3는 종에 따라서 170 내지 190kDa의 겔보기 분자 질량을 갖는 2-사슬 분자이고, 한편 CVF는 C3의 생리학적 활성화 산물 중 하나인 C3c와 비슷한 149kDa의 겔보기 분자 질량을 갖는 3-사슬 분자이다. C3와 CVF의 다른 현저한 구조적 차이는 이들의 글리코실화에 있다: CVF는 비-환원 말단에 α-갈락토실 잔기를 갖는 N-연결 복합체-형 사슬로 주로 구성된 7.4%(w/w) 탄수화물 함량을 가진다. 반대로, 사람 및 래트 C3는 다당 사슬의 상이한 구조로 인해 더 낮은 정도의 글리코실화를 나타낸다.

CVF,Bb와 C3b,Bb는 모두 C3/C5 전환효소이지만, 이들은 중요한 차이를 나타낸다. CVF-함유 효소는 C3-함유 효소보다 훨씬 더 안정하다. 두 전환효소는 이들의 각 서브유닛으로 자발적으로 붕괴할 것이다. 그러나, CVF-함유 전환효소의 고유 반감기(안정성)는 37°C에서 약 7시간이며, 이것은 약 1.5분의 고유 반감기를 갖는 C3-함유 효소의 수백 배 이상이다. 더욱이, CVF-함유 효소 및 유리 CVF는 보체 조절 단백질 인자 H 및 I에 의한 조절을 겪지 않는다. CVF-함유 효소의 긴 고유 반감기와 조절에 대한 저항성의 조합은 CVF가 C3와 C5(그리고 이어서 다른 보체 성분)를 계속해서 활성화하도록 하여, 궁극적으로는 혈청 보체 활성화의 고갈을 가져온다.

주된 유병률의 질환들을 포함하여 많은 질환에서 보체 시스템이 연루된다는 것을 토대로 하여, 지난 십 년간 이들 질환 상태에서 원치 않는 보체 활성화 과정을 방해하기 위한 많은 항-보체 제제의 개발이 있었다. 모든 보체-관련 약물 개발 시도는 보체의 활성화를 억제하는 것에 기초하는 반면, CVF는 혈청 중의 보체를 고갈시킴으로써 작용한다. 보체 활성화를 갖는 질환의 치료에 대한 것 중에서도, C3의 비-면역원성 또는 낮은-면역원성과 CVF의 보체-고갈 기능을 조합한 C-형 분자에 관심이 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

다음에 기재된 구체예는 본 발명의 다양한 양태를 비제한적으로 서술하는 것이다. 다른 양태 및 변형들도 전체 명세서에 비추어 명백할 것이다.

어떤 구체예는 하나 이상의 변형된 사람 보체 C3 단백질을 포함하며, 이것은 사람 C3 단백질의 일부분이 실질적으로 관련된 서열의 코브라 베놈 인자 단백질의 상응하는 부분으로 치환된 것일 수 있다. 어떤 구체예에서, CVF의 치환된 부분은 C3의 알파 사슬 내에 있을 수 있다. 다른 구체예에서, CVF의 치환된 부분은 C3의 알파 사슬의 C-말단 부분일 수 있다. 어떤 구체예에서, 치환된 C-말단 부분은 사람 C3 단백질의 아미노산 1663을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 치환된 C-말단 부분은 사람 C3 단백질의 전체 C-말단까지 연장되지 않은 내부 부분일 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 변형 단백질은 미변형 사람 C3 단백질과 실질적으로 동일한 수의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 어떤 구체예에서, 치환은 사람 C3 단백질의 아미노산 위치 700-1663 내의 어떤 위치를 포함할 수 있다. 다른 구체예는, 사람 C3 단백질의 일부분이 실질적으로 관련된 서열의 코브라 베놈 인자 단백질의 상응하는 부분으로 치환된 것일 수 있고, 적어도 2개의 치환을 가질 수 있는, 사람 보체 C3 단백질이다. 어떤 구체예에서, 치환은 선택된 시작 위치 및 선택된 마지막 위치를 가질 수 있다; 어떤 그러한 구체예에서, 시작 위치는, 예를 들어 749, 874, 936, 994, 1264, 1348, 1496, 1504, 1550 등일 수 있고; 마지막 위치는, 예를 들어 784, 921, 970, 1324, 1550, 1617, 1663 등일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 하나 이상의 치환은 아미노산 1550-1663, 1504-1663, 1348-1663, 1550-1617, 1504-1617, 1496-1663, 1348-1617, 1496-1617, 1264-1324, 749-784, 874-921, 994-1663, 994-1550 및 936-970 중 어느 것을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, CVF의 치환된 부분은 C3의 베타 사슬 내에 있을 수 있다.

어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질은 인자 B에 대한 친화성을 가질 수 있고, 전환효소의 형성을 지원할 수 있다. 어떤 구체예에서, 생성된 전환효소는 C5가 아니라 C3을 절단할 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 전환효소는 37°C에서 약 1.5분 내지 약 7시간의 고유 반감기를 가질 수 있다. 어떤 구체예에서, 형성된 전환효소는 37°C에서 약 7시간 이상의 고유 반감기를 가질 수 있다.

어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질은 단쇄 단백질로서 발현될 수 있다. 어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질은 C3를 닮은 형태의 2개 이상의 사슬로 절단될 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 변형 C3 단백질은 절단되어 그것으로부터 C3a 부분을 유리시킨다. 어떤 구체예에서, 이 변형 단백질은 N-말단에 추가된 1 내지 약 19개의 아미노산을 가질 수 있고, 이것은 C3 또는 CVF에 의해 암호화되지 않는다. 어떤 구체예에서, 이 변형 단백질은 초파리(*Drosophila*) Bip 신호 서열과 같은 비-C3 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질은 인자 B 및/또는 인자 D에 대한 변형된 친화성을 가질 수 있다. 어떤 구체예에서, 이 변형 단백질은 인자 H 및/또는 인자 I에 대하여 부분적 또는 완전한 저항성을 나타낼 수 있다. 어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질은 실질적으로 비-면역원성일 수 있다.

다른 구체예는, 보체의 고갈을 위한 유효량으로 환자에게 변형 C3 단백질을 투여하는 것에 의해서 보체를 고갈시키는 방법을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서 투여는 국소적일 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 국소 투여는 기관, 피하, 공동, 또는 조직에 할 수 있다. 다른 구체예에서, 국소 투여는 원하는 장소에 변형 C3 단백질을 집중시킬 수 있는 표적화 기능을 사용할 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 표적화 기능은 변형 C3 단백질에 콘จู게이트된 항체의 사용을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 투여는 정맥내 또는 복강내 투여와 같은 전신 투여일 수 있다.

더 이상의 구체예는, 환자에게 보체를 고갈시키기에 충분한 변형 C3 단백질을 송달하는 단계; 및 환자에서 재관류를 허용하는 단계에 의해서 환자에서 재관류 손상을 피하거나 개선하는 방법일 수 있다. 어떤 구체예에서 송달 단계는 변형 C3 단백질을 동맥에 주사하는 것을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서 송달 단계는 변형 C3 단백질의 국소 송달을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서 송달 단계는 변형 C3 단백질의 전신 송달을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 재관류는 차단된 동맥의 개방을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 재관류는 기관의 이식과 관련하여 일어날 수 있다.

어떤 구체예는, 보체를 고갈시키기에 충분한 양으로 변형 C3 단백질을 송달하는 단계; 유전자 치료법을 제공하는 단계; 및 이로부터 증진된 결과를 관찰하는 단계에 의해서 유전자 치료법의 효능 및/또는 유효성을 증가시키는 방법을 포함할 수 있다.

어떤 구체예는, 혈류를 증가시키기에 충분한 변형 C3 단백질을 송달하는 단계; 및 치료제 또는 진단제를 제공하는 단계에 의해서 치료제 또는 진단제의 송달을 증가시키는 방법을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서, 이 방법은 송달 단계 전에 특정 조직에 대해 친화성을 갖는 항체와 변형 C3 단백질을 화학결합시키는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구체예에서 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 변형 C3에 부착될 수 있다. 어떤 구체예에서 항체는 단클론성 항체일 수 있다.

어떤 구체에는 보체를 고갈시키기에 충분한 변형 C3 단백질을 투여하는 것을 포함하는 자가면역질환의 치료 방법을 포함한다. 어떤 구체에에서, 투여는 일시적일 수 있으며, 적어도 한 가지 질환 증상의 상승이 있었던 기간에 상응할 수 있다. 어떤 구체에에서, 자가면역질환은 천식, 전신홍반성 루푸스, 사구체신염, 류마티스 관절염, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 심근허혈, 재관류, 패혈증, 과민급성 거부반응, 이식거부반응, 심장폐우회로, 심근경색증, 혈관성형술, 신장염, 피부근육염, 유사천포창, 척수손상 및 파킨슨병 중 어느 것일 수 있다.

어떤 구체에는, 예를 들어 사람 보체 C3 단백질의 일부분을 코브라 베놈 인자(CVF) 단백질의 상응하는 부분으로 치환하는 것에 의해서 사람 단백질에서 CVF의 특성을 의태하는 방법을 포함한다. 어떤 구체에에서, 이 부분은 C3의 알파 사슬에 있다. 다른 구체에에서, 이 부분은 C3의 알파 사슬의 C-말단 부분일 수 있다. 어떤 구체에에서, C-말단 부분은 사람 C3 단백질의 1663번 아미노산을 포함할 수 있다. 어떤 구체에에서, 치환된 C-말단 부분은 사람 C3 단백질의 전체 C-말단까지는 연장되지 않은 내부 부분일 수 있다.

다른 구체에는, 변형 C3 단백질의 한 가지 이상의 특성을 특성화하여 이 변형 단백질의 기능 프로파일을 형성하는 단계; 및 기능 프로파일을 치료될 질환 또는 상태와 매칭시키는 단계에 의해서 변형 C3 단백질을 선택하는 방법을 포함한다. 어떤 구체에에서, 한 가지 이상의 특성은 전환효소 활성, 전환효소 형성, 전환효소 안정성, 인자 H에 대한 감수성, 인자 I에 대한 감수성, C3를 절단하는 능력, 및 C5를 절단하는 능력으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 어떤 구체에에서, 선택된 C3 단백질은 만성적 상태의 치료에 적합하게 된 전환효소의 형성에 참여한다. 어떤 구체에에서 적합화는, 예를 들어 긴 혈장 반감기, 높은 안정성, 인자 H에 대한 저항성, 인자 I에 대한 저항성 등의 어느 것을 포함할 수 있다. 어떤 구체에에서, 전환효소는 재관류 손상의 치료에 적합하게 될 수 있다. 다른 구체에에서 적합화는, 예를 들어 높은 전환효소 활성, 인자 H에 대한 저항성, 인자 I에 대한 저항성 등의 어느 것일 수 있다.

어떤 구체에는, 변형 C3 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및/또는 이 핵산 서열을 포함하는 벡터 및/또는 이 벡터를 함유하는 숙주세포를 포함한다. 어떤 구체에에서, 숙주세포는 *Drosophila* S2 세포, Sf9 세포, CHO 세포, COS-7 세포, HiFive 세포, 효모세포, BHK 세포, HEK293 세포 및 대장균(*E. coli*) 세포 중 어느 것일 수 있다.

어떤 구체에는 변형된 사람 보체 C3 단백질 및 제약학적으로 허용되는 담체 및/또는 핵산을 포함할 수 있는 조성물을 포함한다.

어떤 구체에는 변형 C3 단백질을 발현하는 발현 시스템을 포함한다. 어떤 구체에에서, 발현 시스템은 효모세포, *Drosophila* S2 세포, Sf9 세포, CHO 세포, COS-7 세포, HiFive 세포, BHK 세포, HEK293 세포 및 *E. coli* 세포로 구성되는 군으로부터 선택된 세포를 포함한다.

실시예

CVF 서열의 큰 부분이 코브라 C3의 상동성 부분에 의해 치환된 5개의 CVF/코브라 C3 기능손실 하이브리드 단백질을 생산했다. 이들 하이브리드 단백질의 예비 특성화는 CVF의 α -사슬(C3의 β -사슬)에서 코브라 C3 서열로의 치환이 혈청 보체 활성을 고갈시키는 기능적 특성을 변화시키지 않는 것으로 나타난 반면, β - 및 γ -사슬의 부분을 치환하는 것은 주요한 영향을 미쳤다는 것을 나타냈다. CVF 잔기 978에서 1642가 코브라 C3 서열에 의해 치환된 하이브리드 단백질 H4 및 H5는, 혈청 보체를 고갈시키는 능력의 손상에 더하여, 방관자적 세포용해(C5 절단에 대해서 측정) 활성에서도 상당한 감소를 나타냈다. 이것은 C3의 알파 사슬(CVF의 β - 및 γ -사슬에 상응함)이 CVF와 C3의 활성 차이에 대한 중요한 부위일 수 있음을 암시한다. 또 다른 방면의 실험적 뒷받침은 CVF β -사슬의 C-말단 부분이 CVF 기능에 중요하다는 것을 강하게 암시하며, 이것은 키모트립신을 사용한 CVF의 제한적 단백질 가수분해 실험으로부터 나타난다(Grunwald, 등 (1993) Mol. Immunol. 30, Supp. 1, 30, 전체가 본원에 참고자료로서 포함됨). 이와 같이, 사람 C3 단백질의 일부분이 코브라 베놈 인자(CVF) 단백질의 상응하는 부분으로 치환된 많은 변형된 사람 보체 C3 단백질(C3)을 생산하였거나 또는 확인하였다. 이들 치환의 결과, 사람 C3 단백질은 CVF-형 기능을 가지게 되고, CVF보다 실질적으로 더 적은 면역원성을 가지게 된다. 이들 단백질의 제조 및 시험에 대해서 하기 실시예 1-3에서 서술한다. 이들 단백질의 다양한 용도 및 분석은 실시예 4-10에서 제공한다.

실시예 1

사람 보체 C3/CVF 하이브리드 단백질의 제조

CVF-특이적 기능을 위한 중요한 구조적 특징을 나타내는 CVF 서열로 사람 C3 서열을 치환하는 것은 CVF-유사 기능을 갖는 C3 유도체를 만드는 것을 허용한다. 따라서, 본 발명의 구체예는, 보체 활성화가 병인의 일부인 임상 상황에서 보체를 고갈시키는 신규한 치료제로서 사용하기 위한, 안정한 전환효소를 형성함으로써 보체를 고갈시키는 CVF-특이적 기능을 나타내는 사람 C3 유도체의 생성에 관한 것이다. CVF-특이적 서열에 의해 야기되는 사람 C3에서의 구조적 변화는 최소이기 때문에, 변형된 C3 분자는 상당히 감소된 면역원성을 나타내거나, 심지어는 면역원성이 없을 수도 있음이 명백하다.

표 1의 사람 C3 분자를 특이적 CVF 서열을 함유하도록 조작하여 CVF 기능을 갖는 사람 C3 유도체를 만든다. 본 발명의 어떤 구체예는 이들 영역 내의 더 작은 치환을 제공하며, 이로써 더 작은 영역을 한정하여, 상대적으로 안정한 전환효소를 형성하고, 면역원성을 거의 나타내지 않거나 전혀 나타내지 않을 수 있는 변형 C3 단백질을 생성한다.

[표 1]

전형적인 사람 C3/CVF 클론들

HC3-1550	HC3-1504	HC3-1348
HC3-1550/1617	HC3-1504/1617	HC3-1470
HC3-1348/1617	HC3-1470/1617	HC3-1264/1324
HC3-1348/1386	HC3-749/784	HC3-874/921
HC3-936/970	HC3-1496	HC3-1496/1617
HC3-994	HC3-994/1617	HC3-1617

어떤 변형 C3 단백질(또는 하이브리드 단백질 또는 키메라라고도 한다)은 하기 설명된 부위-지정 돌연변이에 의해 제조하였다. 간단히 말해서, 사람 C3 서열의 작은 부분을 CVF로 치환하는 부위-지정 돌연변이를 위해 Ho 등의 과정을 사용했다 (Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. 및 Pease, L. R.(1989) "Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction" Gene, 77:51-59, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨). 이 방법에서는, 2번의 PCR 반응이 수행되었는데, 한번은 원하는 돌연변이가 부위의 상류에 있는 포워드 프라이머를 사용했다. 두 번째 리버스 프라이머가 돌연변이를 함유했다. 이번 라운드의 2차 PCR이 원하는 돌연변이를 함유하는 포워드 프라이머를 가졌고, 리버스 프라이머가 돌연변이가 부위의 하류에 있었다. 마지막 하나의 특이적 제한 부위는 바람직하게는 이 단계에서의 각 PCR 산물에 존재하며, 이로써 변형된 DNA를 원래 클론으로 반대로 이동시키는 것이 가능하다. 다량의 주형 DNA를 사용하여 증폭을 행했고, PCR 과정에 의해 도입되는 돌연변이를 최소화하기 위해 사이클의 수는 적게 했다. 더 구체적으로, 최초 라운드의 PCR인 5' 산물을 위한 반응은 주형으로서 사람 C3 플라스미드를 사용했고, 나머지 PCR은 CVF 플라스미드를 사용했다. 이 사례에서, 중앙의 "돌연변이유발" 프라이머는 부분적으로 C3 서열로 구성되고, 부분적으로 CVF 서열로 구성되며, 두 서열 사이에 "다리"가 제공된다.

증폭 후, 2개의 산물을 겔 전기영동으로 정제하고 Qiagen의 Qiaquick 겔 추출 키트를 사용하여 겔로부터 분리했다. 다음에, 단편들을 합치고, 2개 단편을 주형으로, 아웃사이드 프라이머를 증폭 프라이머로 사용하여 또 다른 PCR 반응을 했었다. 다시, 고농도의 주형 DNA와 PCR 반응을 수행했으며, 이 반응도 PCR-유발 돌연변이를 최소화하기 위해 몇 회의 사이클만 돌렸다. 생성된 PCR 산물을 2개의 특이적 제한 효소로 절단했고, 아가로스 겔 상에서 크기별 정제했고, Qiaquick 칼럼을 사용하여 관심의 단편을 분리했다. 그 다음, 단편을 적합한 효소로 절단했고, 동일한 효소로 절단한 pBS-HuC3 또는 pH3-1550(-sig)로 클로닝했다.

첫 번째 하이브리드 플라스미드 pH3-1550은 단백질의 위치 1550에서 C-말단까지 상동성 C3 서열을 대신하여 CVF 서열을 함유했다. 두 번째 하이브리드 플라스미드 pH3-1504는 단백질의 위치 1504에서 C-말단까지 사람 C3 서열을 대신하여 CVF 서열을 함유하는 하이브리드 단백질을 암호화한다. 세 번째 하이브리드 플라스미드 pH3-1348은 단백질의 위치 1348에서 C-말단까지 상동성 C3 서열을 대신하여 CVF 서열을 함유했다. 첫 번째 플라스미드를 제조하기 위해서 2번의 초기 PCR 반응을 수행했다. 두 하이브리드 모두 다음의 RSPWPGVPTSPVWWSADA(SEQ ID NO:5)의 일부 또는 전부를 갖는 약 19개 아미노산 벡터-암호화 서열을 가졌다. C3 유전자의 클로닝 방법 때문에, 클로닝 벡터에 의해 암호화된 이들 아미노산은 사람 C3의 N-말단에 대응해 N-말단이었다. 이들 별도의 아미노산은 단백질의 활성화에 영향을 미치지 않았으며, 따라서 이들은 나쁜 영향 없이 제거될 수 있다. 첫 번째 플라스미드를 pBS-HC3-2를 주형으로 사용하고, 다음의 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 제조했다:

HC3H5-1 (GGATGCCACTATGTCTATATTGGACATATCC - SEQ ID NO:6), 및

HC3H5-2 (TCTTCTATTTCGAACCAGTCGGGTCTTGAC - SEQ ID NO:7).

2차 PCR은 pCVF-FL3Δ를 주형으로 사용했고, 다음의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용했다:

HuC3H5-3 (GTACAAGACCCGACTGGTTCGAATAGAAGAACAAG - SEQ ID NO:8), 및

HuC3H5-4 (TATCATGTAAGCGGCCGCGTATAAACAATTTAAGGG - SEQ ID NO:9).

두 반응 모두 에펜드로프 열순환기에서 수행했고, 다음의 프로그램을 사용했다: 95℃ 5분, 다음 95℃ 30초, 58℃ 30초 (50℃에서 65℃까지 증감), 및 72℃ 1분 5 사이클, 다음 95℃ 30초, 57.5℃ 30초(55℃에서 60℃까지 증감), 72℃ 1분 20 사이클, 다음 72℃ 10분. Qiagen PCR 클린업 키트를 사용하여 2개 단편을 정제했고, HC3H5-1와 HC3H5-2를 프라이머로 사용하고, 이 2개 1차 PCR 산물을 주형으로 사용하여 2차 PCR 반응에서 이들을 맞붙였다. 이 반응에서 사용한 사이클링 조건은 95℃ 5분, 다음 95℃ 30초, 51℃ 30초(46℃에서 56℃까지 증감), 72℃ 1.5분 5 사이클, 다음 95℃ 30초, 57℃ 30초(52℃에서 62℃까지 증감), 및 72℃ 1.5분 20 사이클. 상기 설명된 대로 PCR 단편을 정제하여 BsrGI와 NotI로 절단하고 겔 정제한 다음, Qiagen 겔 분리 키트를 사용하여 분리했다. 이 단편을 동일한 효소로 절단한 pBS-HuC3-2에 클로닝했고, 생성된 클론을 EcoRI로 분해에 의해 정확한 단편의 삽입에 대해 스크리닝했다. 정확한 EcoRI 분해 패턴을 갖는 모든 클론을 서열화하여 PCR-유도 돌연변이가 삽입되지 않은 것을 확인했다. 예상 서열을 갖는 1개 클론(pHC3-1550)의 대규모 제조를 수행했고, HindIII(및 T4 DNA 중합효소로 말단 수선된) 및 NotI로 분해에 의해 삽입체를 절제했다. 겔 전기영동으로 단편을 정제하고, 상기 설명된 대로 겔로부터 단편을 분리하여, EcoRV 및 NotI로 절단한 초파리 발현벡터 pMT/V5-HisA에 클로닝했다. 이 구성물로부터 하이브리드 단백질의 발현을 얻기 위한 시도는 단백질을 매우 낮은 수율로 생성했다. 이 때문에, pHC3-1550으로부터 사람 C3 신호 서열을 제거하고 새로운 특이적 AfeI 부위를 삽입한 구성물을 만들었다. 이것을 하기 위해서, pHC3-1550를 다음의 2개 프라이머로 증폭시켰다:

HC3SigRemF; AGATCTCCATGGAAGCTTAGCGCTGGGAGTCCCATGTACTCTATCATC

(SEQ ID NO:10), 및

HC3SigRemR; GCGTCCCGCCTTCAACAGCC (SEQ ID NO:11).

증폭 후에, 상기 설명된 대로 단편을 정제하고, HindIII와 SpeI로 절단했다. 150bp의 띠가 겔 분리되었고, 이것을 동일한 효소로 절단한 pHC3-1550에 클로닝했다. 형질전환체로부터의 DNA를 AfeI로 절단하여 스크리닝했고, DNA 서열화에 의해 모든 양성 클론들을 확인했다. 이 플라스미드를 pHC3-1550(-sig)라고 했다.

AfeI, DraI(플라스미드를 단편화하기 위한), 및 NotI로 분해함으로써 플라스미드로부터 삽입체를 절제했다. 분해물을 겔 상에서 전개시켰고, 상기 설명된 대로 5kb 단편을 분리했다. 다음에, EcoRV 및 NotI로 분해한 pMT-Bip/V5-HisA에 리게이트했다. 생성된 플라스미드를 pMB/HC3-1550이라고 했다.

두 번째 하이브리드 단백질 HC3-1504의 제조를 위한 플라스미드를 다음과 같이 유사한 방식으로 제조했다. 2번의 PCR 반응을 수행하여 암호화 서열을 갖는 사람 C3 및 CVF 부분을 얻었다. 먼저, pBS-HuC3-2를 주형으로 사용했고, 다음의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용했다:

HC3H5-3-F1 (TCTGTGTGGCAGACCCCTTCGAGG - SEQ ID NO:12), 및

HC3H5-3-R1 (CGTTACCAATACATATCTTGTTTCAGCTTTCCATCC - SEQ ID NO:13).

2차 PCR에는 pCVF-FL3Δ를 주형으로 사용했고, 다음의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용했다:

HuCC3H5-3-F2 (GGATGGAAAGCTGAACAAGATATGTATTGGTAACG - SEQ ID NO:14), 및

HuC3H5-3-R2 (CATCCATGACATAGATATCATTACCATCTTG - SEQ ID NO:15).

생성된 2개의 PCR 산물을, HuC3H5-3-F1 및 HuC3H5-3-R2를 프라이머로 사용하고, 이 2개 PCR 단편을 주형으로 사용하는 PCR 반응에서 맞붙였다. 2차 PCR 반응 후에, Qiagen PCR 클린업 키트를 사용하여 반응 산물을 정제하고 NspV로 절단한 다음, 동일한 효소로 절단하고 또 Calf 장 알칼리성 포스페이트로 처리한 pH3-1550 (-sig)에 클로닝했다. 생성된 클론을 EcoRI로 절단하여 삽입체의 방향을 결정하고 서열화하여 PCR-유도 변형이 존재하지 않는 것을 확인했다. 생성된 플라스미드를 pH3-1504라고 했다. 다음에, 상기 설명된 대로 이 플라스미드로부터 삽입체를 분리했고, 상기 설명된 대로 pMT-Bip/V5-HisA에 클로닝했다. 이 플라스미드는 pMB/HC3-1504라고 했다.

세 번째 구성물의 제조를 위한 플라스미드 HC3-1348를 HC3-1504에 대해 사용된 것과 유사한 방식으로 구성했다. 유일한 차이는 2개의 돌연변이 프라이머가

HuC3H5-5-1R (GCAACTGTGCGTTATACATTGTCACCACCGAC - SEQ ID NO:16), 및

HuC3H5-5-2F (GTCGGTGGTGACAATGTATAACGCACAGTTGC - SEQ ID NO:17)

였다는 것이다. 1차 PCR 반응에서는 프라이머로 HuC3H5-3-1F와 HuC3H5-5-1R를 사용했고, 주형은 pBS-HuC3-2였으며, 2차 PCR 반응에서는 프라이머로 HuC3H5-5-2F와 HuC3H5-3-2R를 사용했고, 주형으로 pCVF-FL3Δ를 사용했다. 1차 PCR 반응 후에 2개의 단편을 정제했고, pH3-1504의 구성에 대해 설명된 대로, 이것을 2차 PCR 반응의 주형으로 사용했다. 상기 설명된 대로, 2차 PCR 반응의 산물을 정제하고, NspV로 절단하여 pH3-1550에 클로닝했고, 서열을 확인하고, 삽입체를 pMT-Bip/V5-HisA에 클로닝했다.

네 번째 하이브리드 단백질의 제조를 위한 플라스미드를 다음과 같이 유사한 방식으로 제조했다. 2번의 PCR 반응을 수행하여 암호화 서열을 갖는 사람 C3 및 CVF 부분을 얻었다. 처음에, pBS-HuC3-2를 주형으로 사용했고, 다음의 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용했다:

HC3H5-3-F1 (TCTGTGTGGCAGACCCCTTCGAGG - SEQ ID NO:12), 및

HC3H5-4-R1, GAGAAGGCCTGTTTCCTTTATCCGGATGGTAGAACCGGGTAC (SEQ ID NO:18)

2차 PCR에는, pCVF-FL3Δ를 주형으로 사용했고, 다음의 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용했다:

HuCC3H5-4-F2, CCGGTTCTACCATCCGGATAAAGGAACAGGCCTTC (SEQ ID NO:19), 및

HuC3H5-3-R2, (CATCCATGACATAGATATCATTACCATCTTG - SEQ ID NO:20).

생성된 2개의 PCR 산물을, HuC3H5-3-F1와 HuC3H5-3-R2를 프라이머로 사용하고, 이 2개의 PCR 단편을 주형으로 사용하는 PCR 반응에서 맞붙였다. 2차 PCR 반응 후에, Qiagen PCR 클린업 키트를 사용하여 반응 산물을 정제했다. 다음, 그것을 NspV로 절단하고, 동일한 효소로 절단하고 Calf 장 알칼리성 포스페이트로 처리한 pH3-1550(-sig)에 클로닝했다. 생성된 플라스미드를 pH3-1496라고 했다. 다음에, 상기 설명된 대로 이 플라스미드로부터 삽입체를 분리하고, 상기 설명된 대로 pMT-Bip/V5-HisA에 클로닝했다. 이 플라스미드는 pMB/HC3-1496라고 했다.

다섯 번째 하이브리드 단백질의 제조를 위한 플라스미드 HC3-1550/1617가 하기 설명되며, 이 플라스미드는 HC3-1550의 C-말단 46 아미노산 잔기가 사람 C3 서열로 치환된 것이다. 다시, 2번의 PCR 반응을 행하여 암호화 서열을 갖는 CVF 및 사람 C3 부분을 얻었다. 처음에, 다음의 2개 프라이머를 사용하여 pH3-1550을 증폭시켰다:

HuC3H5-F1, GGATGCCACTATGTCTATATTGGACATATCC (SEQ ID NO:21), 및

HuC3H5-2R1, CCCGATGATGTAGCTGAGTTTATCTTTTCGTGGG (SEQ ID NO:22).

2차 PCR은 주형으로 pCVF-FL3Δ를 사용하고, 프라이머로

HuC3H5-2F2 (CCCACGAAAGATAAACTCAGCTACATCATCGGG - SEQ ID NO:23), 및

HuC3H5-2-R2 (AATTGGAGCTCCACCGCGGTGG - SEQ ID NO:24)

를 사용하여 수행했다. 1차 PCR 후에, 프라이머로 HuC3H5-F1 및 HuC3H5-2-R2를 사용하고, 2개의 PCR 단편을 주형으로 사용하는 2차 PCR 반응에서 단편을 맞붙였다. 이 PCR 후에, 증폭된 단편을 Qiagen PCR 정제 칼럼을 사용하여 정제하고, BsrGI 및 NotI로 절단하고, 동일한 효소로 절단한 pH3C-1550(-sig)에 클로닝했다. 생성된 플라스미드를 서열화하여 정확한 서열을 확인했다. 이것을 pH3C-1550/1617라고 했다. 상기 설명된 대로 삽입체를 분리하여, 상기 설명된 대로 pMT-Bip/V5-HisA에 클로닝했다. 이 플라스미드를 pMB/HC3-1550/1617라고 했다.

어떤 경우, 본원에 제시된 목적 중 하나 이상에 유용한 변형 C3를 생성하기 위해서, 사람 C3의 일부분이 한 부위 이상에서 CVF 서열로 추가로 교체된다. 이에 따라, CVF-특이적 서열이 한 영역 이상에 삽입되거나, 또는 기지의 영역이 다양한 수단에 의해서 돌연변이된 변형 C3 단백질이 생성된다. 예를 들어, 인자 B를 갖는 물리화적으로 안정한 전환효소의 형성에 필요한 부위 또는 부위들에 더하여, 사람 C3의 인자 I 절단 부위를 변화시키는 것이 또 바람직할 수 있다. 사람 C3의 인자 I-저항성 돌연변이는 1998년 Fecke 등에 의해 이미 성공적으로 설명되었다(Fecke, W., Farries, T. C., D'Cruz, L. G., Napper, C. M., 및 Harrison, R. A. (1998) *Xenotransplantation* 5:29-34, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨). 예를 들어, 특이적 CVF 기능에 필요한 선택 서열의 치환은, 그것이 CVF 기능의 특이적 서브셋이 각각 존재하거나 제거되는 신규한 C3 유도체를 조작하도록 허용한다(예를 들어, 안정한 C3 전환효소를 형성하지만 C5를 절단하지 않는 C3 유도체 또는 CVF 유도체). C5를 활성화시키지 않는 변형 C3 분자는 그것이 전-염증성 C5a 아나필락시스독소의 생성을 방지하기 때문에 치료요법에서 특별한 이점을 가질 수 있다.

실시예 2

변형된 사람 C3 단백질의 발현

단백질의 분비를 위한 초파리 Bip 신호 서열을 사용하여 초파리 S2 세포 시스템에서 단백질을 생산했다. 간단히 말해서, 플라스미드 pMB/HC3-1550, pMB/HC3-1504, pMB/HC3-1496, pMB/HC3-1550/1617, 및 pMB/HC3-1348을 Chen과 Okayama의 인산칼슘법을 사용하여 초파리 S2 세포에 트랜스펙트했다(Chen, C., 및 Okayama, H. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7(8), 본원에 전체가 참고자료로 포함됨). S2 세포를 발현 플라스미드와 pCoBlast를 19:1(w/w)의 비로 사용한 혼합물을 사용하여 트랜스펙트했다. 트랜스펙션 후, 블라스티시딘(25 μ g/ml)을 사용하여 두 플라스미드를 모두 함유하는 세포를 선택했다. 발현을 위해서, 트랜스펙트된 세포의 1-리터 배양물을 혈청 무함유 배지(Hi-Five 플러스 L-글루타민)에서 블라스티시딘 없이 성장시켰다. 세포가 5 x 10⁶ 세포/ml 밀도에 도달했을 때, CuSO₄를 25 μ M의 최종 농도로 첨가하여 재조합 단백질의 생산을 유도했다. 배양물이 4-5일 동안 재조합 단백질을 발현하도록 했다. 다음에, ANX, Sephacryl H-300, 및 CM-FF 크로마토그래피의 조합에 의해 배지로부터 하이브리드 단백질을 정제했다.

C3 유전자의 클로닝 방법 때문에, 클로닝 벡터에 의해 암호화된 수개 아미노산(약 19개)은 사람 C3의 N-말단에 대응해 N-말단이다. 이들 별도의 아미노산은 단백질의 활성화에 영향을 미치지 않기 때문에 나쁜 영향 없이 제거될 수 있다. 어떤 경우, 적어도 2개의 아미노산이 발현벡터에서 최종 구성물을 클로닝하는데 필요한 제한 부위의 인공산물인 것이 바람직할 수 있다. 다양한 구체예에서, 사람 C3의 천연 신호 서열, 뿐만 아니라 발생기의 폴리펩티드가 세포질 세망으로 진입하는 것을 관장하는데 효과적인 어떤 다른 신호 서열을 포함하여, 다양한 신호 서열들이 사용될 수 있다.

사용될 수 있는 다른 발현 시스템은, Sf9 또는 Hi-Five 세포(다른 곤충 발현 시스템)의 바콜로바이러스 감염체, CHO 세포, COS-7 세포(포유류 발현 시스템), E. coli, BHK, HEK293 세포, 및 Hanselula 효모 발현 시스템을 포함하는 다양한 효모 발현 시스템을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

실시예 3

변형된 사람 보체 C3 단백질의 활성 측정 결과

정제된 변형 사람 C3 단백질 하이브리드에 대해 다음과 같이 여러 기능적 분석을 행했다.

보체 고갈:

이 분석은 사람(또는 다른 것의) 혈청에서 보체를 고갈시키는 단백질의 능력을 측정하는 것이다. 이 분석은 2 단계로 행했다. 제 1 단계에서, 관심의 단백질을 버퍼 중에서 통상 연속 희석에 의해 원하는 농도로 희석했다(전형적으로, 나노그램/마이크로리터 미만에서 약 320ng/마이크로리터 또는 분석에 사용되는 10마이크로리터 중에 3.2 μ g까지). 다음에, 희석 단백

질 10 μ l 알리퀴트를 희석하지 않은 혈청과 혼합했다. 혼합물을 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션했고, 이것은 단백질이 C3 전환효소를 형성함으로써 보체를 활성화하도록 한다. 그 다음, 형성된 전환효소는 혈청에서 C3를 활성화할 수 있었다. 다음에, 남은 보체 활성 양을 측정하기 위해서, 혈청을 희석하여 항체-민감 양 적혈구와 혼합했는데, 이 적혈구는 그것이 혈청에 존재할 때 보체에 의해 쉽게 용해된다. 이 반응을 30분간 진행시킨 후, 혼합물을 차가운 버퍼 중에서 희석하여 중단시켰다. 세포를 원심분리하고, 유리된 헤모글로빈을 측정하여 용해된 세포를 정량했다. 결과를 도 4 및 9에 나타낸다.

예상된 대로, 매우 소량의 CVF가 사람 혈청에서 보체를 완전히 고갈시킬 수 있었다. HC3-1348 및 HC3-1496 단백질 800ng이 사람 혈청 10 μ l를 완전히 고갈시킬 수 있었다. 다른 하이브리드 단백질은 활성이 좀 낮았는데, 사람 혈청 10 μ l의 보체를 부분적으로 고갈시키는데 약 3-4 μ g의 단백질이 필요했다. 한 하이브리드 단백질 HC3-1550/1617은 겔으로 보기 에 시험된 농도에서 보체를 고갈시킬 수 없었다.

예상치 못하게, 단백질 중 2개(HC3-1550 및 HC3-1348)가 기니피그 혈청에서 실제로 보체를 고갈시킬 수 있었다는 것이 관찰되었지만, 이 활성은 CVF의 활성보다는 분명히 낮았다. 특히, 바람직한 구체예들인 HC3-1550, HC3-1504, HC3-1496 및 HC3-1348는 모두 사람 혈청에서 보체를 고갈시킬 수 있었다.

인자 B 활성화 분석

이것은 인자 B를 활성화하고 C3/C5 전환효소를 형성하는 하이브리드 단백질의 능력을 측정하기 위한 분석이었다. 전환효소 형성은 인자 B를 Bb와 Ba로 절단하는 능력으로서 측정되었다. 이 분석에서, 정제된 하이브리드 단백질을 3-배 과량의 인자 B 및 인자 D(모두 고도로 정제된 것)와 함께 마그네슘의 존재하에 37℃에서 인큐베이션했다. 다양한 시간에서, 반응물의 알리퀴트를 인출하였고, 마그네슘을 킬레이트로 만드는 EDTA를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 반응 산물을 비-환원 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 전개시켰고, 이것은 단백질에 따라 코마씨 블루로 염색되었다. 전문적인 컴퓨터 프로그램으로 겔을 스캐닝하고 인자 B와 인자 Bb 띠에서 단백질의 양을 측정하여 전환된 인자 B의 양을 정량했다.

도 5 및 10의 결과는 사람 C3의 존재하에 인자 B가 매우 빠르게 활성화되었음을 나타내는데, 이것은 두 가지 이유 때문이다. 사람 C3는 인자 B와 매우 빠르게 결합할 수 있었는데, 이것은 그것을 인자 D에 의한 절단에 유용하도록 만든다. 그러나, 생성된 전환효소는 매우 불안정했으며, 빠르게 분리되어, C3b를 인자 B와 더 잘 결합하도록 만든다. CVF의 존재하에서 이 반응은 훨씬 느렸는데, 이것은 인자 B에 대한 친화성이 더 낮고 CVF 함유 전환효소의 안정성은 더 크기 때문이었다. HC3-1504 또는 HC3-1496의 존재하에서 인자 B의 전환은 CVF의 전환과 아주 유사했다. HC3-1550 및 HC3-1550/1617은 CVF보다 훨씬 더 빨리 인자 B를 전환할 수 있었지만 C3b보다는 느렸다. 이것은 아마 전환효소가, CVF 함유 효소보다는 안정성이 낮지만, C3b 함유 전환효소보다는 더 안정한 것의 결과인 것 같다. 게다가, HC3-1550에 의한 인자 B의 초기 결합은 CVF에 의한 것보다 훨씬 더 빠른 것 같다. 마지막으로, HC3-1348은 논의된 나머지 단백질보다 훨씬 적은 인자 B의 절단을 지원한다. 이것은 아마 생성된 전환효소의 조합이 C3b 함유 효소보다 더 안정하고, 인자 B의 초기 결합은 덜 빠르기 때문인 것 같다.

C3 전환효소 활성 분석

이 분석은 C3a 펩티드를 절단해 없앴으로써 사람 C3를 활성화하는 하이브리드 단백질을 함유하는 C3/C5 전환효소의 능력을 측정하는 것이다. 이 분석을 수행하기 위해서, 상기 설명된 대로 전환효소를 형성하고, EDTA를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 다음에, 전환효소를 사람 C3와 혼합하고, 반응물을 37℃에서 인큐베이션했다. 인큐베이션 도중, 알리퀴트들을 제거하고, SDS와 β -메르캅토에탄올을 함유하는 겔 로딩 완충액과 혼합하여 반응을 중단시켰다. SDS는 단백질을 변성시키고, β -메르캅토에탄올은 단백질에 있는 시스테인들 사이의 이황화 결합을 감소시킨다. 환원 조건하에서의 전기영동 후에, 겔을 코마씨 블루 염료로 염색했고, C3 α -사슬 및 C3 α' -사슬의 상대적인 양을 상기 설명된 대로 정량했다. 각 반응에서 동일한 양의 전환효소를 사용하는 것에 주의한다.

도 6 및 도 11은 이 분석에서 CVF와 HC3-1550이 모두 대략 동일한 속도로 사람 C3를 전환할 수 있었다는 것을 나타낸다. HC3-1504는 CVF에 비해 상당히 느렸지만, 그래도 1시간 내에 존재하는 C3의 양을 완전히 전환할 수 있었다. HC3-1348와 HC3-1496은 CVF보다 빠른 속도로 C3를 전환하는 것으로 나타났고, HC3-1550/617은 처음에는 높은 속도로 C3를 전환하다가 약 10분 후에는 더 느려지는 것으로 나타났다. 이 현상을 더 조사하기 위해서, HC3-1504를 제외한 전 단백질을 사용하여 C3 전환 분석을 반복했다. 반응 속도를 감소시키기 위한 노력으로, 존재하는 전환효소의 양을 5-배까지 줄였다. 이들 결과를 도 7 및 도 11에 삽입된 그림에 나타낸다. 이 분석으로, HC3-1348와 HC3-1496가 CVF보다 상당히 효과적인 전환효소를 형성했다는 것이 분명해졌다. HC3-1550/1617는 초기에는 활성이지만 약 10분 후에는 대부분 불활성으로 되는 것으로 나타난 전환효소를 형성했다.

C5 전환 분석

C5 전환 활성에 대한 분석은 본질적으로 Petrella 등에 의해 설명된 대로 행했다(1987, J. Immunol. Methods 104(1-2), 159-172, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨). 이 분석에서, 총 3 μ g의 단백질을 사용하여 상기 설명된 대로 C5 전환효소를 형성했다. 전환효소 형성 후, EDTA를 5mM의 최종 농도로 첨가하여 반응을 중단시켰다. 다음에, 이 반응물 5 μ l를 PBS 중에 C5 7 μ g을 함유하는 25 μ l 반응물에 가했다. 이 반응물을 37°C에서 24시간 인큐베이션했고, 7 μ l Laemmli 겔 로딩 버퍼를 첨가하여 반응을 중단시킨 다음 5분간 끓였다. 반응 산물을 환원 SDS-PAGE에 의해 분리했고, 겔을 코마씨 블루 염료로 염색했고, 상기 설명된 대로 C5 α -사슬 및 C5 α' -사슬의 상대적인 양을 정량했다. 현재 단백질 중 어느 것도 활성 C5 전환효소를 형성할 수 없다.

본질적으로 Oran 및 Isenman의 방법에 따라서 인자 H 및 I의한 단백질의 변성에 대한 분석을 수행했다(1999, J. Biol. Chem. 274(8), 5120-5130, 전체가 참고자료로 본원에 포함됨). 이 방법에서, 각 단백질을 12 μ g씩 인자 H 4.3 μ g 및 인자 I 0.3 μ g과 함께 37°C에서 총 부피 60 μ l로 인큐베이션했다. 인큐베이션 도중, 10 μ l 알리퀴트를 인출했고, 5 μ l의 5x Laemmli 겔 로딩 완충액을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 환원 조건하에 4-20% 구배 겔 상에서 SDS-PAGE에 의해 반응 산물을 분리했다. 이들 데이터는 모든 단백질이 인자 H의 존재하에서 인자 I에 의한 분해에 부분적으로 저항성임을 나타낸다. 유사한 분석에서 C3b는 0시간 지점에서 완전히 거의 분해되었다.

실시예 4

국소적으로 또는 전신적으로 보체를 고갈시키는 방법

본원에 개시된 방법에 의해 생산된 변형 사람 보체 C3 단백질을 사용하여 다음과 같이 보체를 국소적으로 또는 전신적으로 고갈시킨다.

국소 고갈은 변형 C3 단백질이 기관, 조직, 공동 또는 피내 경로로 국소 투여될 때 행해진다. 이것은 그 영역에서 보체의 일시적이고 완전한 고갈을 가져온다. 또는 달리, 국소 고갈은, 변형 C3에 화학적으로 부착되었을 때, 그것을 특정 조직, 질환 부위, 또는 감염된 세포에 집중시켜, 그 영역에서 보체의 연속 고갈을 일으키는 특이적 단클론성 항체를 사용할 수 있다.

전신 고갈은 변형 C3 단백질이 전신적으로, 예를 들어 정맥내 경로 또는 복강내 경로로 투여될 때 행해진다. 이것은 보체의 일시적이고 완전한 고갈을 전신적으로 가져온다. 이 방법은 재관류 손상, 관상동맥 심장수술, 이식 및/또는 전신 질환, 특히 급격한 증상 또는 일시적인 활동 중에 사용될 수 있다.

이들 각 사례와 특정한 질환 상태에서 사용되는 변형 사람 C3 단백질의 가장 유리한 특성의 일부는 상당히 다양할 수 있다. 예를 들어, 보체의 즉각적이고 일시적인 고갈이 바람직한 사례에서는, 짧은 혈장 반감기 및/또는 낮은 안정성과 높은 보체 활성화 활성을 갖는 변형 단백질이 바람직하다. 만성 질환을 치료하는 데는, 긴 혈장 반감기 및/또는 높은 안정성이, 비록 낮거나 둔한 활성이 수반된다 하더라도 바람직하다. 더 이상으로, C5를 활성화하지 않는 변형 C3 분자는 그것이 전-염증성 C5a 아나필락시스독소의 생성을 방지하기 때문에 어떤 치료요법에서 특히 유리하다.

실시예 5

재관류 손상의 치료 방법

재관류 손상의 예는, 차단된 혈관의 재개통 후의 조직 손상(예를 들어, 심장마비 및 뇌졸중 후), 및 수용자의 혈액으로 이식된 기관의 재관류이다. 막힌 관상동맥이나 기관 이식 후의 재관류를 위해서는, 많은 경우, 이식물이 재관류되기 전이나 차단된 혈관이 개방되기 전에 보체를 고갈시키는 것이 바람직할 수 있다. 보체 활성화를 피하는 능력은 그것이 야기하는 조직 손상을 피할 수 있게 하므로, 남은 조직 손상의 유일한 주 원인은 산소 결핍이다. 전형적으로, 재관류 동안 보체 활성화로 인한 조직 손상은 산소 결핍으로 인한 조직 손상의 2배 정도이다: 즉, 조직 손상의 대략 2/3은 보체 활성화 때문이고, 1/3은 산소 결핍 때문이다. 따라서, 본 발명의 구체예에 따라 가능한 것처럼, 재관류 전에 보체를 고갈시킴으로써 재관류 손상이 대단히 감소될 수 있다. 이런 경우에는, 가장 높은 활성의 전환효소를 높은 용량으로 사용하는 것이 바람직하다. 전환효소의 안정성은 만성 질환에 대해서보다 덜 중요하다.

일반적인 관점에서, 본 발명의 이들 구체예의 방법은 유효량의 변형 C3 단백질을 전신 투여하여 보체의 고갈을 위한 충분한 시간을 허용하고, 그 후 수술하는 것을 포함한다.

실시예 6유전자 치료요법의 유효성 및/또는 효능을 증가시키는 방법

이 방법은 보체의 고갈에 의존하며, 체내에서 유용한 바이러스의 생존 연장을 돕기 위한 것이다. 보체가 신체로부터 유전자 치료요법에 사용된 어떤 바이러스 벡터의 제거를 돕는다는 것이 밝혀졌기 때문에, 유전자 치료제 벡터를 투여하기 전에 혈중 보체의 양을 감소시키는 것이 바람직하다. 이것은 사용될 유전자 치료요법의 종류에 따라서 국소적으로 또는 전신적으로 행해질 수 있다.

이 방법은 유효량의 변형 C3 단백질을 전신적으로 또는 유전자 치료제가 투여될 국소 영역에 투여하여 보체의 고갈을 위한 시간을 허용하고, 그 후 유전자 치료제를 투여하는 것을 포함한다.

실시예 7치료제(예를 들어, 화학요법제) 또는 진단제의 송달을 증가시키는 방법

치료제가 투여될 영역으로의 혈액 흐름을 증가시키기 위하여, 변형된 C3 단백질을 선택된 조직에 대해 친화성을 갖는 단클론성 항체에 화학적으로 연결한다. 이 실시예에서 변형된 C3는 고도로 활성인 C3/C5 전환효소를 형성하는 것이다. 변형 C3/항체는 조직에 표적화되고, 그 결과 그 영역에서 국소적으로 보체를 활성화하고, 보체 활성화로 인해 혈관이 투과성으로 된다. 새로운 활성화되지 않은 보체가 표적에 도착하는 혈액에 의해서 계속해서 공급되기 때문에, 혈관 투과성은 활성 전환효소/항체 복합체가 표적에 결합되어 있는 한 계속된다.

폐암의 치료 중에 이 방법을 사용하기 위해서, 변형 C3 단백질-단클론성 항체 하이브리드를 폐-특이적 항원을 인식하는 단클론성 항체를 사용하여 폐암 환자에게 투여한다. 항체는 폐 조직에 결합되어 보체를 국소적으로 활성화한다. 이것은 폐에서 혈관 투과성을 증가시켜, 화학요법제가 더 유효하게 더 효과적으로 폐암에 대해 작용하도록 한다. 상기 설명된 대로, 이 방법은 보체의 연속 국소 활성화를 허용하며, 이것은 혈관 투과성의 영속적인 국소적 상승을 허용한다.

실시예 8류마티스 관절염, 루푸스 및 다른 자가면역 또는 면역 복합체 질환을 치료하는 방법

이 방법은 통증 및 염증이 국소 영역에서의 보체 활성화로 인해 발생하는 몇몇 상태 중 하나로서 류마티스 관절염의 예를 사용한다. 치료를 위해 변형 C3 단백질을 전신 또는 국소 투여하여 보체를 고갈시켜 보체 반응/활성화를 감소시킨다. 이것은 질환의 증상 및 질환의 진행을 감소시킬 수 있다. 또한, 특히 질환의 증상이 악화되거나 할 때는, 보체 시스템의 활성을 장기적으로 저하시키는 것과 일시적으로 고갈시키는 것을 조합하는 것이 유리할 수 있다. 더 이상으로, 이 방법은 루푸스 및 다른 자가면역질환과 같은, 혈중 면역 복합체를 갖는 다른 질환에서도 사용될 수 있다.

예를 들어, 보체-활성화 자가항체가 생산되어 신체 자신의 단백질에 관련될 때, 질환 효과는 주로 항체와 표적이 결합하여 보체 활성화 및 조직 손상을 일으키고 정상 기능마저도 방해하기 때문에 생긴다. 중증 근무력증이 이런 종류의 질환의 예이다. 자가항체는 신경과 근육이 접촉하고 있는 신경근육 종판에 결합한다. 보체가 활성화되고 신경전달물질을 차단하여 마비가 일어난다. 본 발명의 이 구체예의 방법을 이용하면, 연속적으로 또는 질환의 악화 중에, 보체의 전신적 고갈이 질환의 증상 및 진행을 현저히 줄일 수 있다.

실시예 9변형 C3 단백질의 선택 방법

다양한 변형 C3 단백질이 상이한 질환들 및 치료 방법에 유용하다. 따라서, 본 발명의 구체예의 변형 C3 단백질들의 기능적 특성을 분석하여 거기에 따라 이들을 사용하는 것이 유용하다. 다음의 방법을 이용하여 실시예 2에서처럼 제조된 정제된 변형 C3 단백질들의 기능적 특성을 분석한다. 여기 설명된 방법뿐만 아니라 당업자에게 알려진 다른 방법들도 사용될 수 있다.

전환효소 활성을 측정하기 위한 분석. 아래 언급된 특정한 분석에 더하여, 혈청 보체 활성의 고갈 및 방관자적 세포용해의 유도에 대한 2가지 용혈 분석을 스크리닝에 이용할 수 있다.

보체 고갈 분석. 변형 C3 단백질의 항-보체성(보체 소모) 활성을 측정하기 위해서, 적은 부피의 사람 혈청을 CVF 또는 하이브리드 단백질과 함께 3시간 또는 더 짧은 시간 동안 37°C에서 5 μ g/ml 단백질 농도로 인큐베이션하여 단백질이 보체를 고갈시키도록 한다. 그 다음으로, Cochrane 등의 방법(1970, Cochrane 등, J. Immunol 117:630-4, 본원에 전체가 본원에 참고자료로 포함됨)을 포함하는 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 민감화된 양 적혈구를 사용하여 남아 있는 보체 용혈 활성을 측정한다.

방관자적 세포용해 활성. 방관자적 세포용해 분석은 정상 기니어피그 혈청 20 μ l를 37°C에서, 5 μ g/ml 농도의 CVF 또는 하이브리드 단백질 20 μ l 및 기니어피그 적혈구 20 μ l(5 x 10⁸/ml)와 함께 인큐베이션하는 것에 의해서 수행한다. CVF 또는 하이브리드 단백질은 C5의 유체-상 활성화에 참여하며, 이것은 적혈구를 용해한다. 따라서, 상청액에 존재하는 헤모글로빈은 C5 활성화의 징표이다. 반응물을 37°C에서 30분간 인큐베이션하고, 차가운 완충액을 1ml 첨가하여 중단시킨다. 원심분리 후 유리된 헤모글로빈을 분광광도법으로 측정한다(Vogel C.W. 및 Muller-Eberhard, H. J. (1984) J. Immunol. Methods 73(1), 203-220, 전체가 본원에 추가참고자료로 포함됨).

C3 전환효소 형성/인자 B 활성화. 인자 B의 Ba 및 Bb로의 절단을 검출하기 위해서, 37°C에서 MgCl₂의 존재하에, 3-배 물과량의 인자 B와 0.5 μ M 인자 D의 존재하에서 하이브리드 단백질(1 μ M)을 24시간까지 인큐베이션한다. 반응 혼합물을 비-환원 조건하에 7.5%(w/v) SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동에 의해 분석하여, 인자 B의 소실과 절단 산물 Ba 및 Bb의 출현을 모니터한다. 필요하다면, 그 다음 웨스턴 블롯을 수행하여 Ba 및 Bb 절단 단편을 검출할 수 있다. 대조군은 천연 CVF, 프로-CVF, 코브라 C3, iC3, 사람 C3, iC3, C3b, 및 EDTA를 포함할 수 있다(Vogel 및 Muller-Eberhard, 1982 J. Biol. Chem. 257:8292-9, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨).

C3 절단 활성. C3 절단 활성을 시험하기 위해서, 하이브리드 단백질과 사람 인자 B 및 인자 D를 사용하여, "C3 전환효소 형성/인자 B 활성화"를 참고하여 본원에 설명된 대로 C3 전환효소를 미리 형성한다. EDTA를 첨가하여 전환효소 형성을 중단시키고, 정제된 사람 C3를 첨가한다. 반응 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 또는 어떤 다른 적합한 시간 기간 동안 인큐베이션한다. 알리쿼트를 취하여 즉시 얼음물 통으로 옮겨 더 이상의 C3 활성화를 중단시킨다. 환원 조건하에서 7.5%(w/v) SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 반응 산물을 전개시켜, C3 α -사슬의 소실 및 C3 α' -사슬의 출현에 의해 C3 절단을 모니터한다. 필요하다면, 그 다음 항-C3 항혈청을 이용한 웨스턴 블롯을 수행한다. 대조군은 천연 CVF, 프로-CVF, 및 사람 및 코브라 iC3 또는 C3b를 포함한다(Vogel 및 Muller-Eberhard, 1982, J. Biol. Chem. 257:8292-9, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨).

C5 절단 분석. C5 절단 분석을 정제된 사람 C5를 기질로 사용하여 C3 절단 분석에 대해 상기 설명된 대로 수행한다(Petrella 등, 1987 J. Immunol. 164:4742-4751, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨). 예를 들어, 도 12 참조.

전환효소 안정성 분석. 상기 설명된 대로 하이브리드 단백질과 정제된 사람 인자 B 및 인자 D를 사용하여 2분자 전환효소를 미리 형성한다. EDTA를 첨가한 다음, 24시간에 걸쳐 또는 적합하다면 더 짧은 기간 동안 혼합물을 37°C에서 인큐베이션하고 알리쿼트를 제거하며, 각 알리쿼트는 즉시 얼음물 통에 넣는다. 이어서, 상기 설명된 C3 절단 분석에 의해 C3 전환효소 활성을 측정한다. 시간에 따른 C3 절단 활성의 감소로부터, 다양한 전환효소의 자발적 붕괴-해리의 반감기를 계산한다. 이 분석을 위해 충분한 양의 하이브리드 단백질을 이용할 수 없는 경우, 형광 트리펩티드인 t-부틸옥시-카르보닐-로이실-글리실-아르기닐-아미노메틸쿠마린을 이용하여 효소 활성을 측정한다(Caporale, L.H., Gabaer, S. S., Kell, W. 및 Gotze, O. 1981 J. Immunol. 126(5), 1963-1965, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨).

인자 H 결합 분석. ELISA 분석을 이용하여 하이브리드 단백질에 대한 인자 H 결합을 측정한다. 하이브리드 단백질을 마이크로타이터 플레이트 위에 흡착시킨다. 오브알부민과 BSA로 차단한 후, 정제된 사람 인자 H를 10 μ g/ml로 첨가하고 실온에서 30분간 인큐베이션한다. 세척 후, 항-인자 H 항체와 적합한 인산분해효소-연결 2차 항체를 차례로 사용하여 결합된 인자 H를 검출한다. 만일 인자 H가 단백질에 결합될 수 있다면, 적합한 색 변화가 관찰될 것이다. 대조군은 천연 CVF, 프로-CVF, 코브라 및 사람 C3, 그리고 코브라 및 사람 iC3를 포함할 수 있다(Alsenz 등, 1992, Dev. Comp. Immunol. 16:63-76, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨).

인자 I 절단 분석. 하이브리드 단백질을 37°C에서 수 시간 동안 정제된 사람 인자 H 및 인자 I와 함께 인큐베이션한다. 이어서, 환원 조건하에 4-20%(w/v) SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 반응을 분석한다. 105kDa α' -사슬 띠의 강도

의 감소와 37kDa 및 40kDa 분자량을 갖는 띠의 출현에 의해 인자 I 활성을 측정한다. 필요하다면, 그 다음 항-CVF 및/또는 항-C3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한다. 또는 달리, 요오드화 방법을 이용하여 하이브리드 단백질을 ¹²⁵I로 표지한다(Fraker 및 Speck, 1978). SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 후 자가방사선술에 의해 절단 산물을 검출한다(Lambris 등, 1996, J. Immunol. 156:4821-32, 전체가 본원에 참고자료로 포함됨). 예를 들어, 도 12 참조.

면역원성 분석. 다양한 방법을 사용하여 면역원성을 분석할 수 있으며, 이것은 피부 테스트, 사람의 면역 시스템을 갖도록 유전조작된 트랜스젠 동물에서 변형 C3 단백질을 시험하는 것, 그러한 트랜스젠 동물에서 생성된 혈청을 이용한 RIA 시험을 포함하는 시험관내 방법, 방사면역침전 분석법, ELISA 분석, 전기적 화학발광법, 및 표면 플라스몬 공명을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 게다가, 마우스, 래트 또는 기니어피그 C3 및 CVF 서열을 사용하여 어떤 단백질의 마우스, 래트 또는 기니어피그 유사체가 구성될 수 있다. 이들을 적합한 동물에 주입하고, 혈청을 수집하여 하이브리드 단백질에 대한 항체의 생산을 분석한다.

실시예 10

혈장 반감기를 측정하는 방법

변형 C3 단백질의 혈장 반감기에 영향을 미칠 수 있는 많은 요인이 있으며, 이것은 면역 시스템에 의해 생산된 특이적 항체, 혈청 내를 순환하는 프로테아제, 비-특이적 면역반응, 및 인자 H 및 I와 같은 특이적 조절 인자를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 변형 C3 단백질이 보체를 활성화하고 그 다음 고갈시킬 수 있도록 하기 위해서, 바람직한 C3 단백질은 적어도 최소한의 시간 동안 사람 혈장 안에 존속될 것이다. 따라서, 변형 C3 단백질의 혈장 반감기를 확인하여 이들이 어떤 질환의 치료에 얼마나 유용할 것인지 측정하는 것에 관심이 있다.

이 방법은 혈장에서 변형 C3 단백질의 안정성을 3가지 방식으로 측정하는 것이다. 그러나, 이 방법들 중 하나 또는 전부가 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 당업자에게 공지된 어떤 다른 방법들도 사용될 수 있음이 이해되어야 한다.

제 1 방법은 시험관내에서 혈청 내 안정성을 측정하는 것이다. 환자의 전혈로부터 사람 혈청을 분리한다. 변형 C3 단백질의 상이한 농도의 알리쿼트들을 혈청에 첨가하고 인큐베이션한다. 혈청의 알리쿼트를 다양한 시간 간격에서 제거하고, C3에 특이적인 단클론성 항체를 이용한 ELISA 분석으로 존속한 변형 C3의 양을 확인한다.

제 2 방법은 사람화된 동물의 혈청에서 안정성을 확인하는 것이다. 변형 C3 단백질을 동물에 투여하고, 시간에 따라 혈액 샘플을 취한다. 이 단백질에 특이적인 항체를 이용한 ELISA 분석으로 변형 C3 단백질의 양을 확인한다.

제 3 방법은 사람 환자에서 안정성을 확인하는 것이다. 변형 C3 단백질을 환자에 투여하고, 시간에 따라 혈액 샘플을 취한다. ELISA 분석을 이용하여 변형 C3 단백질의 양을 확인한다. 이것은 변형 C3 단백질이 환자의 혈장 내에서 얼마나 오래 순환하는지에 대한 분명한 징표를 제공할 것이다.

어떤 구체예에서, 사용된 항체는 변형 C3에 대해 반드시 특이적일 필요는 없다. 예를 들어, 정상 C3를 인식하는 항체가 시험될 수 있으며, ELISA 과정에서 변형 C3를 확인하는데 사용될 수 있다.

실시예 11

표면 플라스몬 공명을 사용하여 측정된 변형 사람 보체 C3 단백질의 C3 전환효소 형성

표 2는 보체 단백질과 C3, CVF 및 재조합 사람 C3/CVF 단백질의 상대적인 결합을 나타낸다. 모든 경우에서 더 큰 수는 단백질 상호작용이 더 강한 것을 나타낸다. 단백질(C3b 등)을 BIACORE CHIPTM에 결합시킨 다음 보체 인자와 접촉시켰다. 칩에 결합된(따라서 변형 C3 단백질에 결합된) 각 보체 인자의 양을 표면 플라스몬 공명에 의해 측정했다. 결과는 다음과 같이 나타났다: 1) 재조합 단백질 중 어느 것도 C5와 결합하지 않았고, 이것은 C5를 절단할 수 있는 전환효소를 형성하는 능력이 없는 것과 일치한다. 2) 두 단백질은 인자 H와 결합했고, CVF는 결합하지 않았다. 인자 H는 C3b, Bb 전환효소 복합체를 해리하고 절단을 통해 C3b를 불활성화하도록 두 번째 보체 단백질, 인자 I를 관장할 수 있는 조절 단백질 중 하나이다. 3) 인자 D 및 마그네슘의 존재하에 인자 B에 대한 단백질의 친화성은 단백질이 C3 전환효소를 형성할 수 있었던 속도에 대략 비례했다(인자 B 절단을 매개하는 능력에 의해 측정됨, 도 10 참조). HC3-1550 및 HC3-1348은 모두 절단되

있지만 C3b보다는 느렸다. CVF는 H나 I에 의해 전혀 절단되지 않는데, 이것은 자연적 CVF가 H 또는 I 부위를 가지지 않기 때문이다. 2-사슬 분자인 재조합 CVF는 2 또는 3개의 I 부위를 가지지만 그래도 인자 I에 의해 절단되지 않는다는 것에 주목한다.

[표 2]

보체 단백질과 C3, CVF, 및 재조합 사람 C3/CVF 단백질의 상대적인 결합

결합된 단백질의 양 (RU) - 두 번째 칼럼은 MW에 대해 보정됨					
침 상의 단백질	C5	인자 H	인자 B (EDTA 중)	인자 B (Mg 존재)	인자 B (fD 및 Mg 존재)
C3b	607	646	243	285	625
HC3-1550	66	550	9	264	340
HC3-1348	18	219	5	276	162
CVF	617	-14	99	298	370

표 3은 25℃에서 BIACORE 기계에서 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 변형 사람 보체 C3 단백질에 의해 형성된 C3 전환효소의 안정성을 나타낸다. 이 결과는 두 단백질이 모두 C3b-함유 전환효소보다 실질적으로 더 안정한 C3 전환효소를 형성할 수 있었다는 것을 나타낸다. 또한, 표 3은 HC3-1348-함유 전환효소가 CVF-함유 효소보다 실제로 더 안정했음을 나타낸다. 이들 결과는, CVF가 37℃에서 7시간의 반감기를 가졌고 C3b는 37℃에서 1.5분의 반감기를 가졌던 것으로 나타난 고온에서의 반감기에 대한 다른 측정결과와 일치한다.

[표 3]

C3 전환효소 형성

침 상의 단백질	C3 전환효소의 T1/2 (분)
C3b	4.3
HC3-1550	119.3
HC3-1348	1720.0
CVF	1100.0

실시예 12

변형 사람 보체 C3 단백질의 인자 B 절단

도 10의 인자 B 절단에 대한 그래프는 마그네슘 이온 및 인자 D의 존재하에 인자 B의 절단을 매개하는 변형된 사람 보체 C3b 단백질의 능력을 시간 과정에 따라 나타낸다. 이것을 사용하여 C3/C5 전환효소를 형성하는 단백질을 능력을 측정할 수 있다. 이 분석에서 주목할 것 중 하나는 C3b가 매우 효과적으로 전환효소를 형성했다는 것인데, 이것은 C3b가 인자 D 및 마그네슘의 존재하에서 인자 B와 매우 효과적으로 결합되기 때문이며(실시예 11의 데이터 참조), 또 생성된 복합체가 매우 불안정하기 때문이다.

CVF, HC3-1496 및 HC3-1504는 모두 대략 동일한 속도로 전환효소를 형성했으며, HC3-1550 및 HC3-1550/1617은 전환효소를 형성하는 능력이 C3b와 CVF의 중간이었다. HC3-1348은 인자 B와 결합하는 것이 매우 느렸다. 이것은 아마 일단 형성된 전환효소의 긴 반감기와 이 하이브리드 단백질의 인자 B에 대한 낮은 친화성의 조합에 의해 가장 잘 설명되는 것 같다.

실시예 13

변형 사람 보체 C3 단백질의 C3 절단

도 11은 C3를 절단하는 전환효소의 능력을 나타내고, 절단 반응의 시간 과정을 나타낸다. 삽입 부분은 주 그래프에서 사용된 전환효소의 20%를 가지고 수행된 시간 과정이다. 이 결과는 CVF 및 HC3-1550이 C3 절단에 있어 대략 동일하게 효과

적인 전환효소를 형성했고, HC3-1348 및 HC3-1496은 모두 C3를 절단하는데 CVF보다 약 5배 더 효과적인 전환효소를 형성했다는 것을 나타낸다. HC3-1550/1617-함유 전환효소는 아주 불안정한 것으로 나타났고, 10분 후에는 C3 절단을 지원하지 않았다는 점에 주목한다.

실시예 14

변형 사람 보체 C3 단백질의 보체 고갈

도 9의 차트에 나타난 보체 고갈 데이터는 효능에 있어서는 매우 차이가 있지만 HC3-1550/1617을 제외한 모든 단백질이 보체를 고갈시킬 수 있었다는 것을 나타낸다. HC3-1550 및 HC3-1504는 모두 보체 고갈에 있어 아주 비효과적이었던 반면, HC3-1496 및 HC3-1348은 자연적 또는 재조합 CVF만큼 아주 효과적이지는 않지만, 매우 효과적으로 보체를 고갈시킬 수 있었다. HC3-1348은 선행 출원에서 HC3-1325라고 먼저 언급되었지만, 그 후의 치환 지도작성은 치환이 1325보다는 오히려 1348에 있었다는 것을 밝혀냈다.

결론적으로, HC3-1496은, 그것이 HC3-1504보다 8개 아미노산 더 긴 삽입체를 가졌을 뿐이지만, 보체 고갈 및 C3 절단에 관하여 HC3-1348처럼 훨씬 잘 작용하고, 인자 B 절단에 관하여 HC3-1504처럼 잘 작용하기 때문에 흥미로운 단백질이다.

HC3-1550/1617은 C3의 1550에서 말단까지의 영역을 CVF 영역으로 치환한 후, 마지막 46개 아미노산을 제거하고 이들을 C3로 치환함으로써 만들어졌다. 이 키메라 분자는 보체 고갈을 나타내지 않았고, C3 전환효소 및 HC3-1550를 형성했고, 형성된 C3 전환효소는 HC3-1550과 거의 활성이 동일했지만, 겔으로 보기에 반감기는 더 짧았다.

실시예 15

변형 C3 단백질에서 변이체를 제조하는 방법

유리한 특성을 갖는 변형 C3 단백질의 변이체를 제조한다. 유리하다는 것은 변이체가 제한되는 것은 아니지만 C3 전환효소 활성, 혈청 보체제거, 인자 B 결합, C3의 절단, Bb의 결합 및 C3의 결합을 포함하는 단백질의 1가지 이상의 활성을 증진시킨다는 의미이다. 변이체는 각 영역에 1개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있으며, 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 어떤 특정한 변이체들을 아래 기재한다.

C3 전환효소의 안정화에 C-말단이 연루되기 때문에, 어떤 변형 C3 단백질의 C-말단(aa 1617 이후)에서 돌연변이를 만든다. 돌연변이는 삽입, 결실, 및 치환일 수 있다. 그러나 바람직한 돌연변이는 치환이다. 돌연변이는 C3 전환효소를 안정화한다. C-말단에서 돌연변이의 예는, 위치 1633, 1654 및 1658에서의 돌연변이를 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 입체구조에 영향을 미치는 아미노산 변화에 더하여, 비-보존성 뿐만 아니라 보존성 돌연변이가 구체에 중에 포함된다. 그러나, 바람직하게 돌연변이는 비-보존성 아미노산 변화를 가져온다.

전환효소의 활성화에 큰 변화를 일으키는 것으로 나타난 1496과 1504(8개 아미노산 잔기)에 걸쳐 있는 CVF와 사람 C3 사이에 3개의 변화가 있다. 따라서, 변형 C3 단백질 중 어떤 것의 위치 1496과 1504 사이에 돌연변이가 포함되며, 이것은 C3의 절단 및/또는 혈청 보체제거에서 전환효소의 활성을 증가시키는 결과를 가져온다. 돌연변이는 그 영역 내에서 1개 이상의 아미노산의 변화일 수 있다. 바람직하게, 돌연변이는 그 영역 내에서 1개 이상의 아미노산의 치환이며, 특히 비-보존성 아미노산 변화를 가져오는 돌연변이이다.

어떤 변형된 C3 단백질에서는 위치 1348과 1496 사이에서 돌연변이가 만들어지며, 이것은 인자 B와 결합하는 단백질의 능력(구체적으로는 C3b와 인자 B가 결합하는 능력)을 변형시키는데, 바람직하게 이 변형은 인자 B와 결합하는 능력을 증가시키는 결과를 가져온다. CVF로부터의 전 영역을 C3로 전환시키고 그 반대로도 행한다. 또 아미노산 치환을 가져오는 변형이 포함된다. 더 구체적으로, 1367-1379 영역이 CVF 및 C3에 대해 전환되고, 이 영역 내의 특정 아미노산이 치환된다.

CVF에서 1550 근처 그리고 C3에서 1570-1584의 영역 내의 서열 변화는, Bb와의 결합 또는 표적 C3 분자와의 결합으로부터, C3의 절단에 있어 C3 전환효소 활성의 원인일 수 있다. CVF/코브라 C3 치환을 이용하여, C3의 절단에서 훨씬 더 낮은 활성을 갖는 단백질을 생성하는, 연속하는 4개 아미노산 잔기를 확인했다(Q1550G, E1554R, P1556A 및 R1557Q-

위치는 CVF 서열 넘버링에 따라서 번호 매김). 따라서, 위치 1570-1584의 아미노산에서 변이체가 만들어지고, 이것은 변형 C3 단백질에 대해 C3 절단에서의 C3 전환효소 활성을 증가시키는 결과를 가져온다. 바람직하게, 변이체는 이 영역에 있는 1개 이상의 아미노산의 아미노산 치환이다.

상기 설명된 다양한 방법 및 기술은 본 발명을 실시하는 많은 방식을 제공한다. 물론, 설명된 목적이나 이점이 전부 본원에 설명된 어떤 특정한 구체예에 따라서 반드시 달성될 필요는 없다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어, 당업자는 본원에 교시되거나 암시될 수 있는 다른 목적이나 이점들을 반드시 달성하지 않고도 본원에 교시된 한 가지 이점 또는 이점들을 달성하거나 최적화하는 방식으로 방법들이 수행될 수 있다는 것을 인정할 것이다.

더 이상으로, 당업자는 상이한 구체예로부터의 다양한 특징들이 교환가능하다는 것을 인정할 것이다. 유사하게, 본원에 설명된 원리에 따라 방법을 수행하기 위해서, 상기 논의된 다양한 특징들 및 단계들, 뿐만 아니라 각 그러한 특징 또는 단계에 대한 다른 공지된 등가물이 당업자에 의해서 조합 및/또는 교환될 수 있다. 본원에서 인용된 각 특허, 저널 참고문헌 등은 그 전체가 참고자료로 포함된다.

본 발명은 어떤 구체예 및 실시예에 관하여 개시되었지만, 본 발명이 구체적으로 개시된 구체예를 넘어서, 다른 대안의 구체예 및/또는 용도 그리고 그것의 명백한 변형 및 등가물까지 확장된다는 것을 당업자는 이해한다. 따라서, 본 발명은 본원의 바람직한 구체예의 특정한 개시에 제한되지 않는다.

도면의 간단한 설명

도 1은 성숙 단백질에 존재하는 음영 부분을 갖는 C3 및 CVF의 사슬 구조를 나타낸다.

도 2는 5개의 하이브리드 단백질 각각에서 코브라 C3 서열로 치환된 CVF 영역을 나타내고 있는, 원 CVF/코브라 C3 하이브리드 단백질의 지도를 나타낸다.

도 3A - 3G는 CVF1의 cDNA와 유도된 아미노산 서열을 나타낸다(SEQ ID NO:3 및 4). 기능적으로 중요한 영역인 α -, γ -, 및 β -사슬의 NH_2 - 및 C-말단, 그리고 공지된 리간드 결합 부위가 표시되어 있다. 아미노산 잔기 번호부여는 프로-CVF1 분자의 NH_2 -말단에서 시작한다.

도 4는 사람 혈청에서 3개의 변형된 사람 C3 단백질(HC3-1348, HC3-1504 및 HC3-1550)의 보체 고갈 분석 결과를 CVF와 비교하여 나타낸다.

도 5는 인자 B를 활성화하고 C3/C5 전환효소를 형성하는 변형된 사람 C3 단백질(HC3-1348, HC3-1504 및 HC3-1550)의 능력을 측정 한 분석 결과를 CVF 및 C3b와 비교하여 나타낸다.

도 6은 3개의 변형된 사람 C3 단백질(HC3-1348, HC3-1504 및 HC3-1550)에 대한 C3를 활성화시키는 C3/C5 전환효소의 활성을 측정 한 분석 결과를 CVF와 비교하여 나타낸다.

도 7은 변형된 사람 C3 단백질 HC3-1348의 C3 절단(도 6에서 실험에서 사용한 전환효소량의 20%를 사용함)을 측정 한 분석 결과를 CVF와 비교하여 나타낸다.

도 8은 CVF 및 사람 C3b와 비교하여 3개의 변형된 사람 C3 단백질 HC3-1348, HC3-1504 및 HC3-1550의 활성을 측정 한 결과를 요약한 것이다.

도 9는 천연 CVF 및 다양한 사람 C3 단백질의 보체 고갈 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 C3b, 재조합 CVF 및 다양한 변형된 사람 C3 단백질에 의한 인자 B의 절단 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 천연 CVF 및 다양한 변형된 사람 C3 단백질의 C3 절단 결과를 나타내는 그래프이다. 삽입된 그래프는 주 그래프에서 사용된 전환효소의 20%를 사용하여 수행한 동일한 반응에 대한 것이다.

도 12는 인자 H 및 I에 의한 선택된 하이브리드 단백질의 절단 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 사람 C3/CVF 하이브리드 단백질에 의한 C5 전환 결과를 나타내는 겔 그림이다.

바람직한 구체예의 상세한 설명

CVF 특이적 기능을 위한 중요한 구조적 요건을 나타내는 CVF 서열로 사람 보체 C3 서열을 치환하는 것은 CVF-유사 기능을 갖는 C3 유도체를 만든다. 본 발명의 바람직한 구체예는, 안정한 전환효소를 형성함으로써 보체를 고갈시키는 CVF-특이적 기능을 나타내는 사람 C3 유도체를 제공하는데, 이것은 보체 활성화가 병인의 일부인 임상 상황에서 보체를 고갈시키는 신규한 치료제로서 사용된다. CVF-특이적 서열로 인한 사람 C3의 구조적 변화는 최소이기 때문에, 변형된 C3 분자는 면역원성의 유의한 감소를 나타내거나 심지어 면역원성을 아예 나타내지 않을 것이다.

사람 C3 단백질의 일부분이 코브라 베놈 인자(CVF) 단백질의 상응하는 부분으로 치환되고, 그 결과 사람 C3 단백질이 CVF 기능을 가지며, 실질적으로 감소된 면역원성을 가지게 된 변형된 사람 보체 C3 단백질(C3)이 많이 개시되어 있다. C3 단백질은 단백질 전구체(단쇄 단백질) 또는 4개의 아르기닌 잔기의 제거에 의해 절단된 단백질일 수 있다. 추가의 2개 사슬 형태가 C3a 부분의 제거에 의해 형성될 수 있다. 유리하게는, C3 단백질은 다음의 CVF 기능 중 한 가지 이상을 함유하도록 조작될 수 있다: C3 전환효소를 형성하는 능력의 증가, C3 전환효소의 안정성의 증가, 인자 H 및/또는 I의 작용에 대한 저항성 증가, C3 및 C5를 절단하는 활성의 증가, 그리고 혈장 반감기의 증가. 한 구체예에서, C3의 알파 사슬의 C-말단 부분이 CVF 단백질의 상응하는 부분으로 치환된다. 매우 다양한 특정 영역 및 특정 키메라가 본원에 개시된다. 더 이상으로, 변형 C3 단백질을 확인 및/또는 선택하는 방법이 개시되며, 이 방법은 변형 C3 단백질의 특성을 특성화하여 이 변형 단백질의 기능 프로파일을 형성하는 단계; 및 기능 프로파일을 치료될 질환 또는 상태와 매칭시키는 단계를 포함한다. 기능 프로파일은 다음의 기능 중 한 가지 이상을 포함할 수 있다: 전환효소를 형성하는 능력, H 및/또는 I에 대한 감수성, C3를 절단하는 능력, C5를 절단하는 능력, 전환효소의 상대적 활성, 전환효소의 안정성, 및 혈장 반감기. 변형 C3 단백질은 키메라 C3 단백질, C3/CVF 키메라 또는 C3/CVF 하이브리드 단백질이라고도 하며, 국소적 또는 전신적 보체 활성화로 인한 다양한 질환 및/또는 상태를 치료하는데 사용될 수 있다. 이들 질환은 재관류 손상, 류마티스 관절염 및 루푸스 같은 자가면역질환, 및 중증 근무력증, 그리고 인체의 단백질 또는 구조물들에 대한 면역반응을 인식하고 지휘하는 항체로부터 야기되는 다른 질환들을 포함하며, 이들에 제한되는 것은 아니다.

보체 시스템 및 질환

보체 시스템은 숙주방어 및 면역반응에서의 역할을 통해 건강을 유지하는데 연관되는 척추동물 면역 시스템의 구성요소이다. 그러나, 보체 활성화는 또한 수많은 질환의 병인에 연관된다. 이들 질환의 예는 자가면역용혈빈혈, 류마티스 관절염 및 다른 면역 복합체 질환들, 그리고 혈류가 일시적으로 중단된 후 조직 손상이 일어나는 재관류 손상을 포함한다. 재관류 손상의 예는, 차단된 혈관의 재개통 후의 조직 손상(예를 들어, 심장마비 및 뇌졸중) 및 기관 이식 후 수용자의 혈액으로의 재관류이다. 유병율이 높은 질환을 포함한 많은 질환에서 보체 시스템이 연관된 것에 기초하여, 지난 십 년간 이들 질환 상태에서 원치 않는 보체 활성화 과정을 방해할 수 있는 많은 항-보체성 제제의 개발이 있었다. 이들 약물 개발 시도는 모두 보체의 활성화를 억제하는데 기초한다.

보체 단백질 C3, 코브라 베놈 인자 CVF, 유사성 및 차이점

보체의 세 번째 구성요소인 C3는 보체 활성화의 전형적인 경로와 대체 경로 모두에서 중추적인 역할을 하고, 생리학적 C3 활성화 산물의 대부분은 면역반응 및 숙주방어에서 중요한 기능을 가진다(본원에 참고자료로 포함되는 Muller-Eberhard, H. J. (1988) "Molecular Organization and Function of the Complement System," Ann. Rev. Biochem., 57:321-347 참조). 사람 C3는 2-사슬 당단백질로서 분자량은 약 185,000이다. 이것은 단일-사슬 프레-프로-C3로서 합성되며, 이것이 β -사슬과 α -사슬 사이에 있는 4개의 아르기닌 잔기의 제거에 의한 후속 프로세싱을 겪는다. 사람 C3의 주요 서열은 분자 클로닝으로부터 알 수 있다. 마우스, 래트, 기니어피그, 닭, 코브라, 제노푸스(*Xenopus*), 및 램프리(lamprey: 칠성장어)를 포함하는 다른 포유류 종뿐만 아니라 비-포유류 종에서 유래한 C3의 전체 또는 부분적 서열 정보가 이용가능하다. 사람 C3 유전자는 42kb 길이며, 52에서 213bp 크기 범위의 41개 엑손을 포함한다.

C3의 주된 활성화 산물은 C3b이다. C3b는 대체 경로에서의 C3/C5 전환효소의 형성에서 중추적인 역할을 한다. 이 효소의 형성은 C3b와 인자 B의 초기 결합을 필요로 한다. 약한 복합체인 C3b,B는 이어서 Mg^{2+} 의 존재하에 인자 D에 의해 절단되어, 효소적으로 활성인 C3/C5 전환효소 C3b,Bb를 생성하고, 활성화 펩티드 Ba를 방출한다. C3b,Bb 효소는 매우 불안정하며, 37°C에서 1.5분의 고유 반감기로 2개의 서브유닛 C3b와 Bb로 자발적으로 붕괴-해리한다. C3/C5 전환효소는 이 두 기질의 α -사슬에 있는 단일 펩티드 결합을 가수분해함으로써 C3 및 C5를 절단한다. 효소가 C5를 절단하기 위해서

는 C5가 전환효소에 결합된 또 다른 C3b 분자에 결합되어야 한다. 빠른 자발적 붕괴-해리에 더하여, C3b,Bb 효소는 엄격히 제어된다. 이 효소는 인자 H에 의해 해체되고, C3b는 인자 H와 인자 I의 합동 작용에 의해 불활성화된다. 인자 H의 존재하에 인자 I는 2개 절단 부위에서 C3b의 α' -사슬을 절단한다. 생성된 C3b 유도체는 iC3b라고 불리며, 이것은 인자 B와 함께 전환효소를 더 이상 형성할 수 없다. 인자 I는 세 번째 부위에서 α' -사슬을 절단할 수 있으며, 이로써 2개의 C3 단편 C3c와 C3dg이 생성된다. 인자 I에 의한 세 번째 절단에서, C3b 리셉터인 CR1이 보조-인자로 작용한다.

C3의 특이한 구조적인 특성은 α -사슬에 있는 분자내 티오에스테르의 존재이다. C3의 C3b로의 활성화시에, 이 티오에스테르는 고도로 반응성이 되어, 세포 및 다른 특정한 표적에 대한 C3b의 공유 부착을 초래한다. 티오에스테르의 절단을 수반하는 구조적 변화는 이어진 인자 B의 결합 및 그것의 활성화를 허용한다.

C3에 있는 티오에스테르는 느린 자발적 가수분해를 겪으며, 그 결과 iC3 또는 C3(H₂O)라고 하는 C3 형태가 형성된다.

iC3는 C3b-유사 기능을 나타내며, 혈청에서 인자 B 및 D와 함께 유체-상 전환효소를 형성한다. 생성된 전환효소 iC3,Bb는 C3b,Bb 전환효소와 유사하게 불안정하며, 인자 H 및 I에 의해 제어된다. 그러나, 티오에스테르의 자발적 가수분해와 뒤이은 iC3,Bb에 의한 C3의 저 등급 활성화는 표적 세포 또는 입자 위에 C3b의 초기 침착을 초래함으로써, 소위 활성인자 표면 위에서 다른 경로의 활성화를 가져오는 것으로 여겨진다.

C3는 매우 특이한 다-기능 단백질이다. 이 단백질은, 그것의 다양한 활성화 산물을 포함하여, 약 20가지의 상이한 혈장 단백질 또는 세포 표면 수용체와 특이적으로 상호작용한다. 이런 다-기능성은 분자의 상세한 구조/기능 분석에서 상당한 흥미를 끌고 있다. 인자 H, 프로페르딘, 인자 B를 포함하는 C3의 어떤 리간드에 대하여, 보체 리셉터 CR1, CR2, CR3, 및 C3a 리셉터 결합 부위가 규정된 C3 폴리펩티드 영역 일부에 제안 또는 배정되었다.

코브라 독액은 코브라 베놈 인자(CVF)라고 하는 C3의 구조적 및 기능적 유사체를 함유한다. 기능적으로, CVF는, 그것이 사람 혈청 및 사실상 모든 척추동물의 혈청에서 인자 B와 결합하여 CVF,B의 약한 복합체를 형성하고, 이것이 이어서 Mg²⁺의 존재하에 인자 D에 의해 생체분자 효소 CVF,Bb 및 Ba로 절단될 수 있다는 점에서 C3b와 비슷하다. 생체분자 복합체 CVF,Bb는 C3b와 함께 형성된 C3/C5 전환효소와 유사하게 C3 및 C5를 활성화하는 C3/C5 전환효소이다.

CVF는 약 150,000Da의 분자 질량을 갖는 3-사슬 당단백질이다. CVF 및 포유류 C3는 면역학적 교차-반응성, 아미노산 조성, 원편광 이색성 스펙트럼 및 2차 구조, 및 전자현미경 미세구조를 포함하는 몇몇 구조적 유사성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 초기의 N-말단 아미노산 서열 비교에 의해 C3과의 서열 상동성이 증명되었고, CVF가 C3c와 구조적으로 비슷하다는 제안을 이끌어 내었다. CVF와 C3 사이의 구조적 상동성 및 사슬 관계가 CVF의 분자 클로닝에 의해 확인되었으며, 이것에 의해 단백질 수준에서의 전체적 유사성이 포유류 C3들과는 약 70%, 그리고 코브라 C3와 비교했을 때는 90% 이상이라는 것이 드러났다.

CVF와 C3의 이들 기능적 및 구조적 유사성에도 불구하고, 이 두 분자 및 결과의 전환효소는 중요한 기능적 차이를 나타낸다:

1. 두 효소는 효소 활성을 사라지게 하는 각 서브유닛으로의 자발적 붕괴-해리를 나타낸다. C3b,Bb 효소는 매우 짧게 지속되며, 37°C에서 1.5분의 고유 반감기에 따라 붕괴하는 반면, CVF,Bb 효소는 몇 배 더 안정하며, 약 7시간의 고유 반감기에 따라 붕괴한다.
2. C3b, Bb 효소는 인자 H 및 I에 의해 조절된다. 반대로, CVF,Bb 및 CVF는 이들 두 단백질의 조절 작용에 대해 완전히 저항성이 있다.
3. 보체 활성화 중에 생성된 C3b,Bb 효소는 표면 결합된다. 반대로, CVF,Bb 효소는 유체-상 효소(iC3,Bb와 마찬가지로)이다.
4. C3b,Bb와 CVF,Bb의 또 다른 기능적 차이는 C5 전환효소 활성화에 있다. C5 전환효소에 의해 C5가 절단되기 위해서는 C3b 또는 CVF와 결합될 필요가 있다. 그러나, C3b,Bb 효소에 의해 일어나는 C5 절단에 있어서, C5는 C3b,Bb 효소의 일부인 C3b 분자와는 다른 C3b 분자와 결합되어야 한다. 반대로, C5는 Bb 측쇄 서브유닛을 지니는 동일한 CVF 분자에 의해 결합된다. C5와 결합하는 CVF,Bb 효소의 이런 특성은 아마도 그것의 유체-상 C5 전환효소 활성을 나타내는 능력 때문이라고 생각되며, 한편 C3b,Bb 효소의 C5 전환효소 활성화는 입자의 표면에 한정된다.

5. 두 효소는 C3 가수분해에 대한 반응속도학에 있어 다소 차이를 나타낸다. k_{cat}/K_m 를 기준으로 하여, 촉매 효능은 CVF,Bb와 비교했을 때 C3b,Bb에서 약 8배 이상이다.

기능적 결과에 관해서, CVF,Bb와 C3b,Bb 사이의 두 가지 가장 현저한 차이는 CVF,Bb 효소의 고유한 안정성과 조절 단백질 인자 H 및 I에 대한 저항성이다. 일단 CVF,Bb 효소가 형성되면, 그것은 계속하여 C3 및 C5를 활성화할 것이고, 이로써 보체가 소비될 것이다. 30여 년 이상 전에 CVF가 혈장 보체를 고갈시키기 위해 실험실 동물에게 안전하게 투여될 수 있다는 것이 증명된 이래로 항상, CVF는 정상(보체가 충분한) 동물과 CVF-치료(보체가 고갈된) 동물을 비교함으로써 면역 반응, 숙주방어, 및 질환의 병인에서 보체의 다양한 생물학적 기능을 연구하기 위한 중요한 연구 도구가 되었다.

C3/CVF 유도체

CVF는 소모 활성화의 메커니즘을 통해 작용하여 이어서 고갈을 가져오는 보체 억제제이다. 사실, CVF는 다른 약물들의 항-보체 활성을 평가하기 위한 표준물질로서 빈번히 사용된다. CVF는 이런 강력한 항-보체 활성을 나타내지만, 그것의 면역원성 때문에 사람에게 적용하는 데는 적합하지 않다. 이 때문에, CVF와 C3의 광범한 구조적 유사성을 이용함으로써 실질적으로 비-면역원성인 CVF를 제조하고, 재조합 수단에 의해 CVF 분자의 기능적으로 중요한 영역을 사람 C3로 치환함으로써 CVF의 원하는 보체-고갈 기능을 갖는 사람 C3 유도체를 생성하는 것이 바람직하다.

C3 서열의 일부가 상동성 CVF 서열, 주로 CVF 베타 사슬에 있는 서열로 치환된 많은 사람 C3 유도체가 생산 및/또는 디자인되었다. CVF 및 C3는 진핵세포 발현 시스템에서 재조합 수단에 의해 성공적으로 발현되었다. 전체적으로 전체 CVF 서열에 걸쳐, CVF와 코브라 C3(사람 C3보다 CVF와의 유사성이 더 크기 때문에) 사이에 5개의 하이브리드 단백질을 구성한 선행 연구에 기초하여, C3의 알파 사슬 영역, 바람직하게 이 사슬의 C-말단 부분이 선택되었다(Mol. Immunol. 40:199 (2003), 이 전체가 참고자료로 본원에 포함된다). 다른 노선의 연구는 CVF 단백질의 제한적인 단백질 가수분해를 포함했다(Mol. Immunol. 30, Suppl. 1, 113 (1993) 미국특허 No. 5,174,344, 이 전체가 참고자료로 본원에 포함된다). 이 선행 연구의 결과를 사용하여, 아미노산 잔기 1550-1663, 1504-1663, 및 1348-1663을 각각 CVF로부터의 상동성 서열로 치환하여 바람직한 3개의 사람 C3 유도체를 만들었다. C3 유도체는 첫 번째 아미노산 잔기에 의해 명명되며, 만일 마지막 아미노산 잔기를 나타내지 않는다면, 그것은 1663인 것으로 이해된다. C3 삽입의 중점이 단백질의 C-말단 앞인 경우, 그것은 그 장소를 사용하여 명명된다(예를 들어, HC3-1550/1617). 아미노산 잔기 1348-1663을 치환함으로써 만들어진 C3 유도체는 앞서 1325-1663라고 했지만, 그 후 치환 지도는 이 치환이 1325보다는 오히려 1348에서 있었다는 것을 나타냈다. 이 3개의 사람 C3 유도체는 HC3-1550, HC3-1504 및 HC3-1348라고 한다. 3개 사람 C3 유도체는 원하는 CVF 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다: 3개 단백질은 모두 활성 C3/C5 전환효소를 형성할 수 있다. 이것은 이 3개 단백질의 인자 B의 활성화를 지원하는 능력, 및 생성된 3개 전환효소의 C3를 절단하는 능력에 의해서 증명된다. 3개 단백질은 모두 안정한 전환효소를 형성하지만, 적어도 하나(HC3-1550)는 CVF에 비하여 더 낮은 고유 안정성을 나타낸다. 예상외로, 처음 시험된 3개 단백질 중 2개(HC3-1550 및 HC3-1348)가 기니피그 혈청에서 실제로 보체를 제거할 수 있었다는 것이 관찰되었지만, 이 활성은 분명히 CVF의 활성보다 적었고, 5개 단백질 중 4개는 사람 혈청에서 보체를 고갈시킬 수 있었으며, CVF 뿐만 아니라 HC3-1348와 HC3-1496도 사람 혈청에서 보체를 거의 제거할 수 있었다. HC3-1550/1617은 사람 혈청에서 보체를 제거할 수 없었다. 적어도 부분적으로 보체를 고갈시키는 능력은, C3 유도체가 안정한 전환효소를 형성할 뿐만 아니라, 조절 단백질 인자 H 및/또는 인자 I에 대해 적어도 부분적으로 저항성이며, 따라서 CVF-유사 활성을 나타낸다는 것을 시사한다. 사람 C3 유도체 HC3-1550은 아미노산 잔기의 4% 미만이 사람 C3와 상이한데, 이것은 CVF와 비교하여 그것의 예상되는 면역원성을 대단히 감소시키거나 제거한다. 치료될 질환에 따라서 다양한 C3 하이브리드가 그들의 다양한 특성에 기초하여 바람직할 수 있다. 예를 들어, 만성 질환의 치료에서는, 면역원성이 극도로 낮거나 전혀 없고 전환효소 안정성이 높아서, 만성 질환으로 고통받는 환자에서의 지속이 용이한 C3 하이브리드를 제공하는 것이 목적이다. 그러한 상황에서 전환효소 활성과 같은 나머지 특성들은 상대적으로 덜 중요하다. 반대로, 보체-관련 재판류 손상을 피하기 위한 치료에서는 전환효소 안정성보다 높은 전환효소 활성이 더 중요하다. 이와 같이, 특정하게 배열된 특성들을 각각 갖는 상이한 하이브리드의 다원성은, 보체 활성화 및/또는 보체 고갈에 의해 치료될 수 있는 주어진 상태의 치료를 위한 바람직한 하이브리드의 선택을 허용한다.

한 구체예에서, 본 발명은, 1.5분 이상의 고유 반감기로 붕괴, 인자 H 및/또는 I의 조절 작용에 대한 증가된 저항성, 유체-상 C3 전환효소 및 유체-상 C5 전환효소 활성이라는 CVF 또는 CVF,Bb 특성 중 적어도 하나를 나타내는 변형된 보체 C3 단백질에 관한 것이다. 이들 인자에 더하여, 어떤 구체예에서, C3b,Bb에 비해 촉매 효능이 감소될 수 있는데, 이것은 촉매 효능이 CVF,Bb와 비교했을 때 C3b,Bb에 대해 약 8-배 이상이기 때문이다. 다른 구체예에서는, 촉매 효능이 감소되지 않거나, 또는 C3b,Bb와 비교하여 상승될 수 있다. 많은 바람직한 C3 하이브리드가 면역원성을 거의 갖지 않거나 전혀 갖지 않음에도, 역시 많은 용도에서 적합한 다른 구체예는, 어떤 경우에 검출가능한 어느 정도의 면역원성을 나타낼 수 있다.

어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질로 형성된 전환효소의 고유 반감기는 1.5분 이상, 바람직하게는 10분 이상이다. 더 이상의 구체예에서, 고유 반감기는 일반적으로 CVF-함유 전환효소의 고유 반감기(7시간 이상)와 C3의 고유 반감기(1.5분) 사이에 들어갈 수 있고, 이것은 약 2분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 90분, 2시간, 2.5시간, 3시간, 3.5시간, 4시간, 4.5시간, 5시간, 5.5시간, 6시간, 6.5시간 및 7시간, 또는 그 이상을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 짧은 전환효소 고유 반감기 및/또는 짧은 혈장 반감기를 갖는 변형 C3 단백질은 어떤 용도에서 유용할 것이며, 긴 전환효소 고유 반감기 및/또는 긴 혈장 고유 반감기를 갖는 C3 단백질은 다른 용도에서 유용할 것이다.

더 이상의 구체예에서, 인자 H 및/또는 I에 대한 C3 하이브리드의 저항성은 미변형 C3의 저항성 이상이며, 어떤 구체예에서는 CVF의 저항성만큼이나 좋다. 그러나, 어떤 구체예에서는, 인자 H 및/또는 I에 대한 저항성을 달성하기 위해서 분자의 다른 부분에 더 이상의 변형이 필요할 수 있다.

본원에 설명된 많은 구체예는, C3의 하나 이상의 분리된 영역이 CVF의 상응하는 CVF 영역으로 특이적 치환된 것에 관한 것이고, 다른 구체예들은 CVF 서열과 동일하지는 않지만 실질적으로 관련된 서열을 이용한 치환을 포함한다. 즉, 치환을 위해 선택된 CVF 영역 내에, 선택된 CVF 영역의 어떤 바람직한 특징이나 기능의 손실 없이 하나 이상의 아미노산이 변화될 수 있는 위치들이 있으며, 어떤 경우에 그러한 변화는 증진된 특징이나 기능을 부여할 수 있다. 모든 그러한 변화들은 본 발명의 구체예로 간주된다.

더 이상의 구체예에서, 변형 C3 단백질을 함유하는 전환효소의 촉매 활성은 어떤 구체예에서 CVF를 함유하는 전환효소 활성의 적어도 50%이고, 미변형 C3를 함유하는 전환효소의 활성 이상일 수 있다. 더 이상의 구체예에서, 촉매 활성은 CVF 전환효소 활성의 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%이다. 두 효소는 C3 가수분해에 대한 반응속도학에 있어 다소 차이를 나타낸다. 따라서, 많은 구체예에서, 변형 C3를 함유하는 전환효소는, 이 둘 사이에 들어가거나, 미변형 C3를 함유하는 전환효소의 활성을 초과하는 촉매 활성을 가질 수 있다. 따라서, 어떤 구체예에서, 변형 C3를 함유하는 전환효소의 그러한 활성은 CVF를 함유하는 전환효소 활성의 10% 내지 1000%, 또는 그 이상일 수 있으며, 이것은 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 110%, 135%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 750%, 1000% 및 그 이상을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

k_{cat}/K_m 를 기초로 하면, C3를 절단할 때의 촉매 효능은 CVF, Bb와 비교했을 때 C3b, Bb에 대해 약 8-배 이상이다. 따라서, 어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질을 함유하는 전환효소의 촉매 효능은 어떤 구체예에서 CVF를 함유하는 전환효소 효능의 적어도 50%이고, 미변형 C3를 함유하는 전환효소의 효능 이상일 수 있다. 두 효소는 C3 가수분해에 대한 반응속도학에 있어 다소 차이를 나타낸다. 그러므로, 많은 구체예에서, 변형 C3를 함유하는 전환효소는, 이 둘 사이에 들어가거나, 미변형 C3를 함유하는 전환효소의 효능을 초과하는 촉매 효능을 가질 수 있다. 따라서, 어떤 구체예에서, 변형 C3를 함유하는 전환효소의 그러한 효능은 CVF를 함유하는 전환효소 효능의 10% 내지 1000%, 또는 그 이상일 수 있으며, 이것은 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 및 110%, 135%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 750%, 1000% 및 그 이상을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

더 이상의 구체예에서, 변형 C3 단백질의 C5 절단 활성이 증가된다. C5 절단 활성은 CVF 또는 C3의 활성의 약 10% 내지 400%일 수 있으며, 이것은 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 및 375%를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

더 이상의 구체예에서, 변형 C3 단백질과 인자 B의 결합 및/또는 이어진 인자 D에 의한 그것의 절단이 감소될 수 있다. 그러나, 적어도 기능적 양의 촉매 활성 및 보체 고갈 활성을 보유하는 한, 변형 C3 단백질은 유용하다.

더 이상의 구체예에서, 변형 C3 단백질을 갖는 전환효소는 천연 CVF를 함유하는 것들과 실질적으로 동일한 보체-활성화 활성을 나타낸다. "천연 CVF와 실질적으로 동일한 보체-활성화 활성을 나타낸다"라는 말은, Cochran 등의 방법((1970) J. Immunol. 105(1), 55-69, 본원에 전체가 참고자료로서 포함됨)에 의해 측정했을 때, 본 발명의 C3 유도체가 천연 CVF의 보체-활성화 활성 수준의 0.1 내지 97%, 바람직하게는 50 내지 97%, 바람직하게는 80 내지 97%를 가진다는 의미이다.

어떤 구체예에서, 변형된 보체 C3 단백질은, C-말단 영역의 일부 또는 전부가 CVF의 상응하는 영역으로 치환된 C3 분자이다. 어떤 구체예에서, C3의 알파 사슬의 C-말단 부분만이 CVF의 상응하는 영역으로 치환된다. 어떤 구체예에서, 아미노산 700-1663의 일부 또는 전부가 치환되며, 이것은 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 150, 175, 180, 190, 200, 250, 275, 300, 350, 375, 400, 450, 475, 500, 550, 575, 600, 650, 675, 700, 750, 775, 800, 850, 875,

900, 950, 975, 1000을 포함하여, 20에서 약 1000 아미노산 영역이 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 어떤 구체예에서, C3의 베타 사슬은 손상되지 않는데, 즉 천연 C3에 있는 것과 동일하다. 그러나, 어떤 구체예에서는, C3의 알파 사슬에서의 치환에 더하여, 안정성 증가 같은 기능을 제공하기 위해서 다른 치환이 있을 수 있다(예를 들어, 인자 H 결합 및 인자 I 절단에 관련된 부위가 돌연변이되거나 치환될 수 있다). 특이적 치환은 아미노산 1550-1663, 1504-1663, 1348-1663, 1550-1617, 1504-1617, 1470-1663, 1348-1617, 1470-1617, 1264-1324, 1348-1386, 749-784, 874-921, 1496-1663, 1496-1617 및 936-970를 포함하며, 이들에 제한되는 것은 아니다. 어떤 구체예에서, 이들 영역에서의 좀 더 작은 치환은 원하는 CVF 기능이나 특성을 갖는 C3를 생성하는 더 작은 영역에 상응할 수 있다.

바람직한 구체예에서 면역원성은 C3의 면역원성에 비해 낮게 유지되거나 아예 없다. 어떤 구체예에서, 변형 C3 단백질은 실질적으로 비-면역원성이다. 실질적으로 비-면역원성은, 단백질이 사람 환자에게 주입되었을 때 여전히 보체-활성화 기능을 나타낼 수 있다는 의미이다. 더 나아가, 변형 C3 단백질은 C3 만큼 비-면역원성일 수 있거나, 또는 약 75% 비-면역원성 내지 약 100% 비-면역원성일 수 있고, 이것은 80%, 85%, 90%, 95% 및 99%를 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다.

전신적 또는 국소적 치료 방법

본원에 개시된 방법에 의해 생산된 변형된 사람 보체 C3 단백질은 보체를 고갈시키기 위해 다음과 같이 국소적 또는 전신적으로 사용될 수 있다:

국소 치료는 원하는 효과에 따라서 보체 고갈 또는 보체 활성화라는 결과를 야기하는 많은 방식으로 행해질 수 있다. 한 구체예에서, 변형 C3 단백질이 기관, 조직, 공동, 또는 피내 경로로 국소적으로 투여될 때 국소 고갈이 행해진다. 이것은 그 영역에서 보체의 일시적이고 완전한 고갈을 가져온다. 또한, 국소 고갈 또는 활성화는 선택된 부위로 변형 C3 단백질을 간헐적으로 또는 연속적으로 흐르게 하는 인슐린-형 펌프를 사용하여 행해질 수 있다. 또는 달리, 보체의 국소 활성화는, 변형 C3에 화학적으로 부착되었을 때, 그것을 특정 조직, 질환 또는 감염된 세포에 집중시켜, 그 영역에서의 보체의 연속적 활성화를 일으킬 수 있는 특이적 단클론성 항체를 이용할 수 있다. 다른 구체예에서, 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 변형 C3 단백질에 부착될 수 있다.

변형 C3 단백질이, 예를 들어 정맥내 또는 복강내 경로로 전신적으로 투여될 때 전신 고갈이 행해진다. 이것은 전신에서 보체의 일시적이고 완전한 고갈을 가져온다. 이 방법은 재관류 손상, 관상동맥 심장수술, 이식 및/또는 전신 질환, 특히 급격한 또는 일시적인 활동 중에 사용될 수 있다. 이것은 본원에 제공되는 실시예에서 더 논의된다.

이들 각 사례와 특정한 질환 상태에서 사용되는 변형된 사람 C3 단백질의 가장 유리한 특성들은 대부분 상당히 다양할 수 있다. 예를 들어, 보체의 즉각적이고 일시적인 제거가 바람직한 사례에서는, 혈장 반감기 및/또는 안정성은 짧고 보체 활성화 활성(높은 C3/C5 전환효소 활성)은 높은 변형 단백질이 가장 적합하다. 만성 질환을 치료하는 사례에서는, 혈장 반감기 및/또는 안정성은 길고 활성은 낮거나 둔한 단백질이 가장 적합하다.

전환효소 활성/기능

본원에서 변형 C3 단백질을 위한 최상의 용도를 만들어 내고 분석할 때, 제한은 없으나 하기한 많은 기능 및 활성은 그러한 분석을 위해 사용될 수 있다:

인자 B에 대한 친화성 - 변형 C3 단백질이 인자 B의 활성화(Ba 및 Bb로의 절단)를 얼마나 효과적으로 지원하는지의 차이가 검출되어 이용될 수 있다. 인자 B 활성화를 지원하는 데 관여하는 인자 B에 대한 친화성을 조금 증가하는 많은 요인들이 있지만, 일단 전환효소가 형성되면, 그 다음 일반적으로 가장 중요한 중요 특성은 안정성, H 및 I에 의한 조절, 및 C3 및 C5를 절단하는 활성이다.

안정성 - C3b, Bb 및 CVF, Bb 효소는 모두 효소 활성을 사라지게 하는 각 서브유닛으로의 자발적 붕괴-해리를 나타낸다. C3b, Bb 효소는 매우 짧게 지속되며, 37°C에서 1.5분의 고유 반감기에 따라 붕괴하는 반면, CVF, Bb 효소는 몇 배 더 안정하며, 약 7시간의 고유 반감기에 따라 붕괴한다.

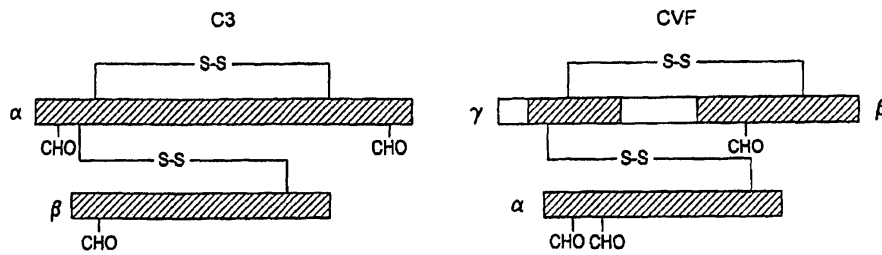
인자 H 및/또는 I에 의한 조절 - C3b, Bb 효소는 인자 H 및 I에 의해 조절된다. 반대로, CVF, Bb 및 CVF는 이들 두 단백질의 조절 작용에 대해 완전히 저항성이다.

C3를 절단하는 활성 - 두 효소는 C3 가수분해에 대한 반응속도학에 있어 다소 차이를 나타낸다. k_{cat}/K_m 를 기준으로 하여, 촉매 효능은 CVF,Bb와 비교했을 때 C3b,Bb에 대해 약 8배 이상이다.

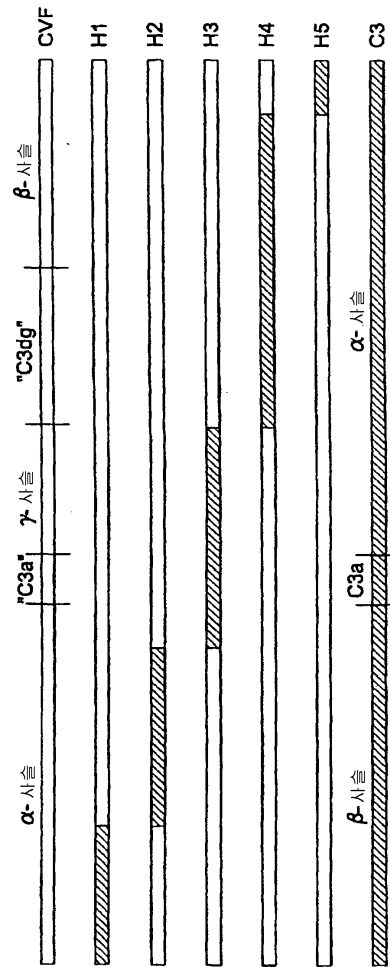
면역원성 - CVF-특이적 서열에 의해 야기되는 사람 C3에서의 구조적 변화가 최소화되기 때문에, CVF와 비교했을 때, 변형 C3는 면역원성이 상당히 감소되거나 또는 심지어 면역원성이 없을 수도 있다. 게다가, 사람과 전혀 다른 종들에서 전형적인 대로, 코브라에서는 알파-결합 갈락토스를 CVF 다당 사슬의 말단으로 이동시키는 전이효소가 생산된다. 사람은 이런 전이효소를 생산하지 않기 때문에, 알파-결합 갈락토스 잔기는 비-자체적인 것으로 보이고, 고도로 면역원성이다. 따라서, CVF 상에 생긴 특이적 CHO 부분을 인식하는 항-알파-gal 항체가 생산된다. 사람 C3와 CVF는 그들의 위치 중 52%에서 동일성을 나타내지 않으며, 탄수화물 차이는 심지어 더욱 분명하다. 이와 같이, 바람직한 변형 C3 단백질은 C3 아미노산의 10% 미만, 어떤 구체예에서는 약 4%가 CVF의 아미노산으로 치환되고, 또 코브라-유래 탄수화물 구조(구체적으로 글리칸 상의 알파-결합 갈락토스)를 가지지 않기 때문에, 본 발명의 C3 하이브리드는 상당히 덜 면역원성이다. 어떤 구체예에서, 바람직한 구체예의 C3 하이브리드는 CVF에 비해 상당히 덜 면역원성이다. 다른 구체예에서, 바람직한 구체예의 C3 하이브리드는 CVF에 비해 적어도 50% 덜 면역원성이다. 어떤 구체예에서, 재조합 단백질은 곤충 또는 포유류 셀라인 중 어느 것에서 생산되며, 이것은 사람에서 발견되는 것과 매우 유사하거나 간단한 탄수화물 부분을 생성할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3A

신호 서열		-141 알파 시슬의 N-말단	
-22	M E R H A L Y L Y A A L L I G F P G S S H C A L Y T L I T	7	
1	O C C A T G C A G A G S A T G C T C T A T C T G T G C T C T A T T C A T T G T T T T C C A G G G C T T C T C A T G G G G C T C T C A C A C C T C A T C A C C	90	
8	P A V L R T D T E E Q I L V E A H G D S T P K Q L D I F V H	37	
91	C C T G C T G T T T T C C A A C A C A C A G A G C A A T T T G C T G A G G C C A T G C A C A G T A C T C A A A C A G E T T C A C A T C T T G T T C A T	180	
38	D F P R K Q X T L F Q T R V D M N P A C G M L Y T P T I E I	67	
181	G A T T T C C A G G A G C A G A A A C C T T G T T C A A A C C A G A T A T A T G A A T C C A C C A G G C A T G C T T G T A C T C A C T A T A G A G A T T	270	
68	P A K E Y S T D S R Q N Q Y V V Y Q Y T G P Q V R L E K V V	97	
271	C C A C A A A A G A G T C A G T A C C A C T C A G G C A A A T C A A T A T G T G T T G T C A G T A C T G T C T C A G T A G A T T G A A A A G S T G G T T	360	
98	L L S Y O S S F L F I Q T D K G I Y T P G S P Y L Y R V F S	127	
361	C T C T T T C T A C A G A G T A G C T T T C T G T T T A T C A G A C A G A T A A G G C A T C T A T A C C A G G S T C T C A G T A C T A T A T G T T T T T C T	450	
	C H D C H D		
128	M D H N T S K M N K T Y I V E F Q T P E G I L V S S N S V D	157	
451	A T G A T C A C A A C A G A C A T A G A C A A A C T G A T T G T G A G T T T C A C T C A G A G C A T T C T T G T A T T C A A T T C A G T T G A C	540	
	C H D		
158	I N F F W P Y N L P D L Y S L G T W R I V A K Y E H S P E H	187	
541	C T A A A C T T C T T G C C T T A C A A T T A C C A G A C C T T G T C A G T T T G G G A C T T G A G A T T G T G C C A A T A T G A C A T T C C C A G A G A T	630	
188	Y T A Y F D V R K Y V L P S F E V R L Q P S E K F F Y I D G	217	
631	T A T A C T C A T A T T T G A T G T C A G A A A T A T G T T G C A A G C T T T G A G T G C T G C A C C A T C A G A G T T T T T T C A T T G A C C C	720	
218	N E N F H V S I T A R Y L Y G E E V E G V A F V L F G V K I	287	
721	A A T G A A A A T T C C A C T G C T C A T C A C T C A A G C T A C T T G T A T G A G A G A G T G A A G T G T G G C C T T T G T C T T T G A G T G A A A T A	810	

도면3B

248 DDAKKSIPODSLTRPIIDCGDKATLKRDIF 277
 811 GATGATGCTAAAAGAGTATTCAGACTCACTACGAGATTCGATTTATGATGAGATGGAAAGCAACCTAAAAGAGATACATTC 900
 278 RSRFPHLNMLVGHITLYASVYVMTESGSDNY 307
 901 GGTCTCGATTTCAAAATCTCAATGAGCTTGTGGGCATACCTGTATGCATCTGTAAACATCATGACAGATCAGGCAGTATATGGTA 990
 308 VIEQSGIHIYASPYQIHFTKTPKYFKPGNP 337
 991 GTGACTAGCAAGCGGCATTTCATTTGTGGCATCTCCCTATCAGATCCACTTCACAAAACCCCAATAITTCAGGCAGGAATGCCA 1080
 338 YELTYYYVTN*DGSPA AHVPYVSEAFHSNGT 367
 1081 TATGAAGTGAAGTGTATGTTACCAACCTTGATGGCTCAACAGCTGCCCATGTGCCAGTGTATTCAGAGGCTTTCTATCTATGGGAGC 1170
 368 TLSOGTAKLLILNIPLHAOSLPITVYRTHHG D 397
 1171 ACTTGGAGTCAAGGCTGCTAAGCTCATCTGACATACCAITGAAATGCTCAAGGCTACCAATCAGCTGTTAGAACTAACCATGGAGC 1260
 398 LPRERQATKSMNTAIAAYQTQCGSGHYLHVAI 427
 1261 CTCCAGAGAGACCCAGGCAACAAAGTCCATGACAGGCAATAGGCTACCAACCCAGGAGGATCTGGAATCTATCTCATGTAGCCATT 1350
 428 TSTEIKPGDNLFPVNFHVKGNANSLKQIKYF 457
 1351 ACATCTACAGAGATTAAAGCCGAGATACCTACCTGCAATTCATGTCGAGGCAATGCAATTCAGTGAAGCAATCAATATTC 1440
 458 TYLILNKCKIFXVGRQPRRDGQNLVTHNLH 487
 1441 ACATACCTCATATTGAATAAGGCAAGATTTTCAGGTTCGACGCCAACCCAGAGAGATGGCAGAACTGGTGAAGCATGAATTCGCA 1530
 488 ITPDLIPSFRRFYAYYOYGNNEIVADSVWVD 517
 1531 ATCACTCCAGATCTCATGCTTCCCTTCCGTTTGTGGCTTACTACCAAGTGGGAACAGAAATTTGGCTGATTCGTCTGAGTGGAT 1620

도면3C

518 VKDTCMGTLVVKGDNLIQMPGAANKIKLEG 547
 1621 GTGAAGGATACCTGCAATGGGAAGTTGGTTGTGAAGGAGACATCTAATACAAATGCCAGGAGTGCATGAATGAATCAATTTGAAGGG 1710
 548 DPGARVGLVAVDKAYVYVNDNYKISQAKIW 577
 1711 GATCCAGTGCTCGGTTGGTCTGTGGCTGTGGACAAAGCAGTATATGTTCTCAATGATAAATAAGATTACCCAGCTAAGATATGC 1800
 578 DTIEKSDFGCTACSGQNNLCVFBDAAGLALT 607
 1801 GACACAATAGAAAGAGTGACTTTGGCTGTACAGCTGGCAGTGGCCAGAAATCTGGGTGTGTTTGAAGAAGCTGGAGCTGGCTGACAC 1890
 알파 사슬의 C-말단 | "C3a"의 N-말단
 608 TSTHLNTRKORSAAKCPQPAHRRRRSSVLLL 637
 1891 ACCAGCACTAATCTCAACACCAACAGAGATCAGCTGCAAGTGTCTGAGCTGCAATCCGAGGCTGBCAGTTCTGTTTTCCTGCTT 1980
 CHO
 638 DSHASKAAEFQDQDLRKCCEDVMHENPMGY 667
 1981 GACAGCAAGCAAGCAAGGCGAGAAATTCAGGATCAAGACCTGGCTAAATGCTGTGAAGATGTCATGCAAGAGACCCCATGAGGTAC 2070
 668 TCEKRAKYIOEGDACKAAAFLECCRYJXGV R 697
 2071 ACTTGTGAAAGCGTCAAAATACATCCAGGAGGAGAGCTGTGAGGCTGGCTTCCCTTGAATGCTGTGGCTACATCAAGCGGCTCCGA 2160
 "C3a"의 C-말단 | 감마 사슬의 N-말단
 698 DENQRESEFLFLARDNEDGFIA DSDIISR S 727
 2161 GATGAACCAACCGGAGAGGAGTGTGTTCTTCTGGCAAGAGATGATANTGAGATGTTTCTATAGCAATAGTATATCATCTCAAGGCTCT 2250
 728 DFPKSWLWLTLDLTEEPMNSGISSKTYMSFY 757
 2251 GATTTCCCAAGAGTTGTTGTGCTAACAAAGGACTTGACCGAGGAGCTTACATCAGGATTTCAAGCAAGCAATGCTTTTAT 2340
 758 LRDSITTWVVLAVSFPTPKGICVAEPTYEIR 787
 2341 CTGAGGATTCATCAACACCTGGTGGTGGCTGTAGCTTTACACCCACCAAGGAGTCTGTGTGGTGAACCTTATGAATAGA 2430

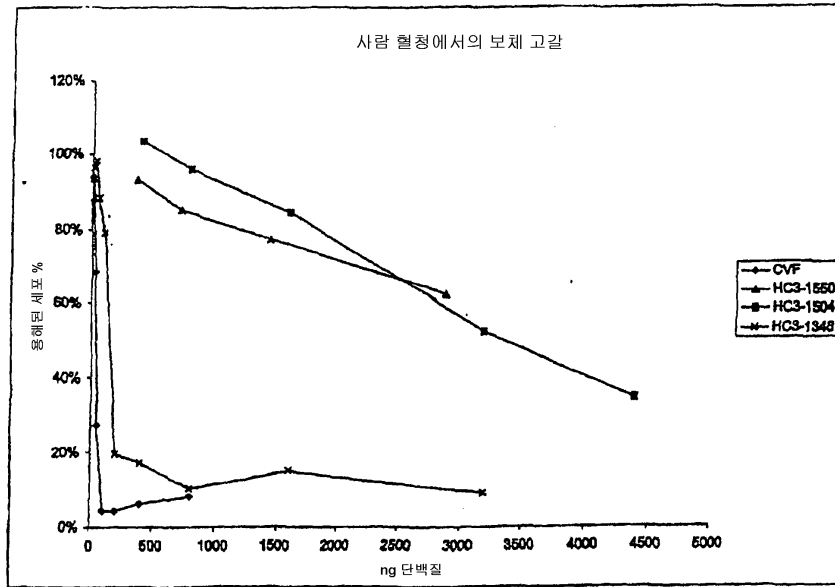
도면3D

788	V M K V F F I D L Q M P Y S Y V K N E O V E I R A I L H N Y	817
2431	G T C A T G A A G T C T T C T T C A T T G A T C T T C A A T G C C A T A T T C A G T A G T G A G A A T G A G C A G G T G G A G A T T C A G C T A T T C T G C A C A C T A C	2520
818	V H E D I Y V R V E L L Y N P A F C S A S T K G Q R Y R Q Q	847
2521	G T T A G G A G A T A T T A T G T G G A G T G G A C T G T T A T A C A C C C A G C C T T C T G A G T G C T T C C A A A A G G A A A G A T A C C G A C A G C A G	2610
848	F P I K A L S S R A V P F V I V P L E Q G L H D V E I K A S	877
2611	T T C C A A T T A A A G C C T G T C C C C A G A G A G T A C C G T T T G T G A T G C C A T T A G A G C A G G A T T G C A T G A T T T G A G A T T A A G C A G T	2700
878	V O E A L W S D G V R K K L K Y V P E G V Q K S I V T I V K	907
2701	G T C C A G A G C C T T G T G T C A G A C C G T G T G A G A A A C T G A A G T T G T A C T G A G G G T A C A G A A T C C A T T G T G A C T A T T G T T A A A	2790
908	L D P R A K G V C G T Q L E V I K A R K L D D R V P D T E I	937
2791	C T G A C C C A A G G C A A A G G A G T T G T G G A C A C A G C T A G A G T G A T C A A A G C C C A A T T A G A T A C A G A G T G C C T G A C A G A A A T	2880
	감마 사슬의 C-말단 (?)	
938	E T K I I I Q G D P V A Q I I E N S I O G S K L N H I T I T	967
2881	G A A C C A G A T T A T C A T C A A G G T G A C C C T G T G G C T C A G A T T A T T A A A C T C A A T T G A T G A A C T C A A C C A T C A T A T C A T	2970
	티오에스테르 부위	
968	P S C G G E O N H I R M A A P Y I A T Y Y L D T T E Q W E T	997
2971	C T T C T G C T G T G G G A G C A A A T A T G A T C G G A T G C C G A C C A T T A T T G C C A C T A C T A C C T G G A C A C A C A G A G A T T G G A C A C T	3060
998	L G I N R R T E A Y N Q I V T G Y A Q Q M V Y K K A D H S Y	1027
3061	C T C G C A T A A T C C A G A C T G A C C T G C A A T C A G A T C T G A C T G T T A T G C C A G C A G A T G T T A C A G A A A G C A G A T T C T A T	3150
1028	A A F T N R A S S S W L T A Y V V K V F A M A A K W V A C I	1057
3151	G C A G A T T T A C A A C C G T C A R C T A G T T C T T G C T A A C A C A T A T G T G T A A A G T C T T T C C A T G C C T G C A A A T G T T A G C A G C A T T	3240

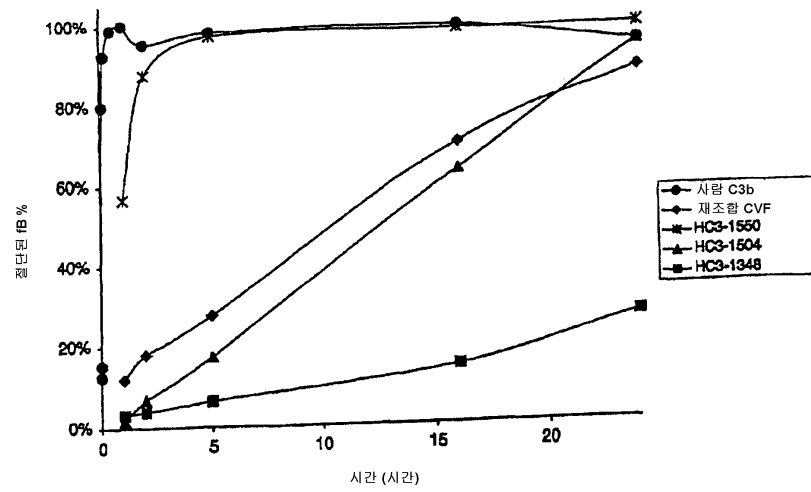
도면3E

1058	S H E I I C C G V R W L I L N R Q Q P D G A F K E N A P V L	1087
3241	A C T C A T G A A T C A T T T G G A G C T G T G A G C T G C T G A T T C T G A C A G C C A A C A C A G A T G A G G C T T C A A G A A A T G C C C T G T A C T T	3330
1088	S G T W O G G I O G A E E E V Y L T A F I L Y A L L E S K Y	1117
3331	T C T G A C A A T G C A G G A G A A T T C A G G T C C T G A G A G A G A T A T T T A C A C C T T T C A T T C T G T T G C T T G T T G A A T C C A A A C A	3420
1118	I C N D Y V N S L D S S I K K A T N Y L L K K Y E K L Q R P	1147
3421	A T C T G C A A T G A C T A T C T C A A T A G T C T A G A C A G C A C A G A G G C A C A A T T A T T A C T A A A A G T A T G A A A C T G C A A A G G C C T	3510
1148	Y T T A L T A Y A L A A A D Q L N D D R Y L M A A S T G R O	1177
3511	T A C A C T A C A G C C C A C A G C C A T G C T T T G C C T C T G C A G A C C A C T C A A T G A T G A C A G G T A C T C A T G C A G C A T C A A C A G G A G G A T	3600
1178	H W E E Y N A H T H N I E G T S Y A L L A L L K M K K F D O	1207
3601	C A T T G G A G A A T A C A T C C T C A C A C C A C A C A T T G A A G C A C T T C C T A T G C C T T G T T G C C C T C T G A A A T G A A A T T T G A T C A A	3690
1208	T G P I Y R W L T D O N F Y G E T Y G G O T Q A T Y N A F Q A	1237
3691	A C T G C T C C A T A G T C A G A T G C T G A C A G A T C A G A A T T T T A T G G G A A C A T A T G A C A A C C A G C A A C G T T A T G C A T T T C A A G C T	3780
	베타 사슬의 N-말단	
1238	L A E Y I E I Q W P T H K D L N L D J T I E L P D R E V P I R	1267
3781	C T T G C T G A A T A T G A G A T T C A G A T G C C T A C C C A T A A G A C T T A A C T T A G A T A T T A C T A T T G A C T G C C A G A T G A G A G T A C C T A T A G G	3870
1268	Y R I N Y E N A L L A R T V E T K L N Q D I T V T A S G D G	1297
3871	T A C A G A A T T A A T A T C A A A T G C T C T C C T G C C T G G A C A G T A G A G C A A A C T C A C C A G A C A T C A C T G T G A C A G C A T C A G G T A T G A	3966
	C-H	
1298	K A T W T I L T F Y N A Q L Q E K A N V C N K F H L N V S Y	1327
3961	A A G C A C A A T C A C C A T T T G A C A T T C T A T A A G C A C A G T T G A G G A G A G C A A A T G T T G C A T A A A T T C A T C T A A T T T C T G T T	4050

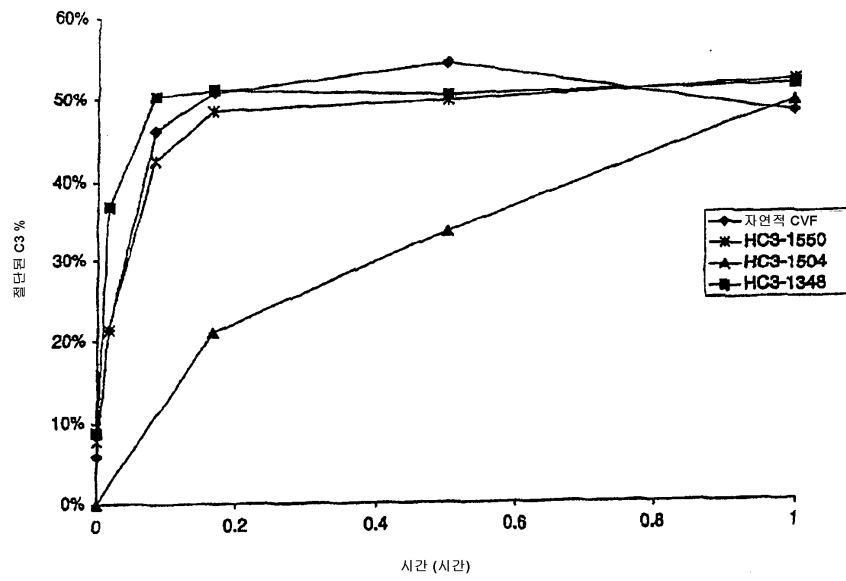
도면4



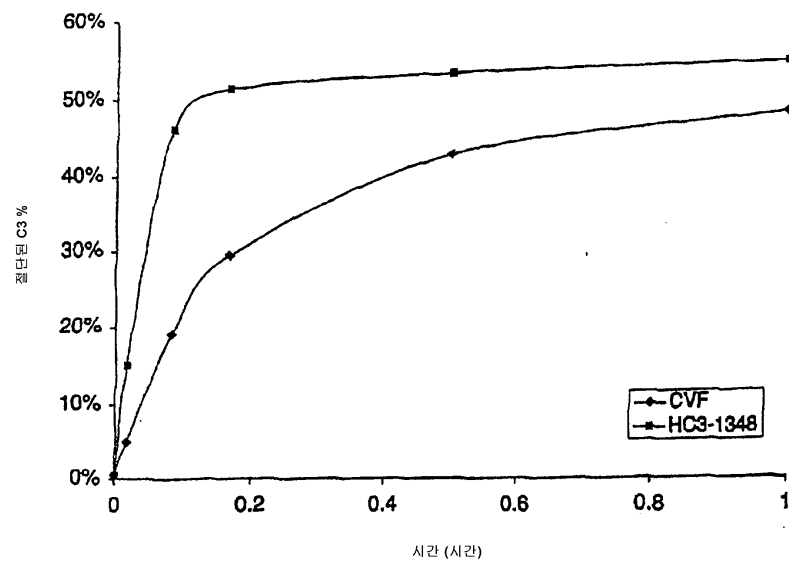
도면5



도면6



도면7

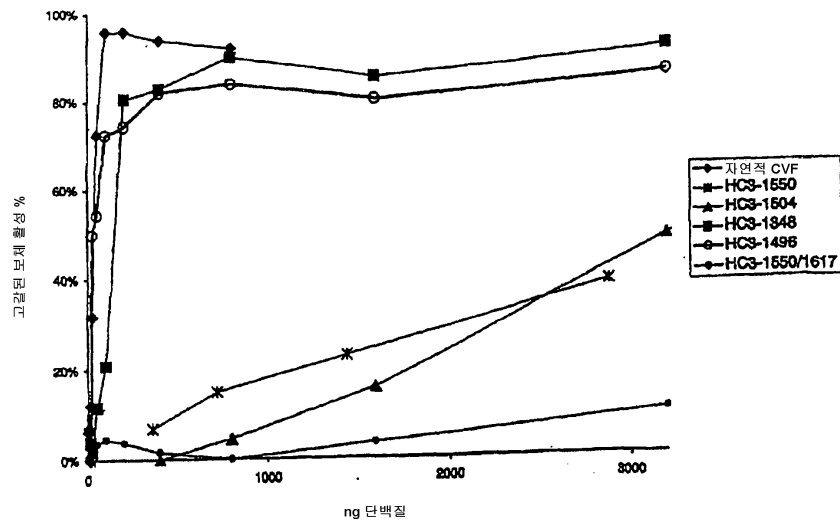


도면8

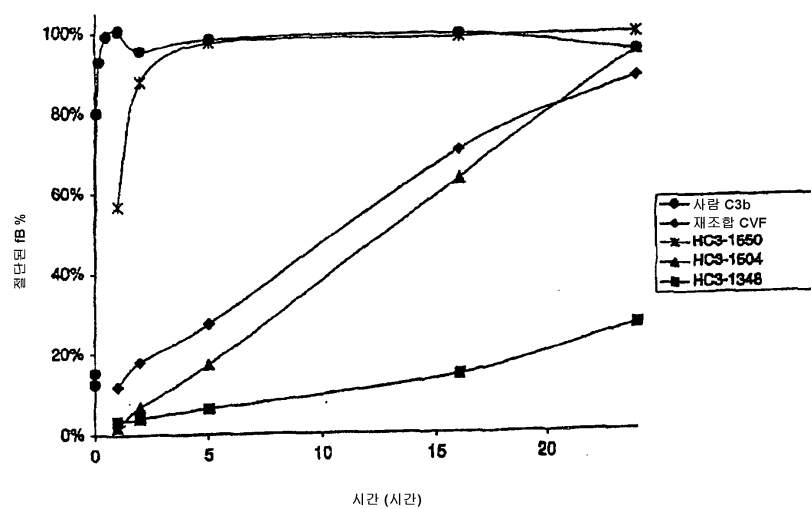
하이브리드 단백질	CVF로 치환된 C3 영역	사람 C3에 대한 상동성 %	NHS에서의 보체 고갈 *	전환효소 형성 (FB 절단) *	C3 절단 *	인자 H 및 I 절단
HC3-1550	1550-1663	96% 동일, 97% 유사	+	++++	+++	C3 보다 느림
HC3-1504	1504-1663	95% 동일, 98% 유사	+	+++	++	C3 보다 느림
HC3-1348	1348-1663	90% 동일, 94% 유사	++	+	++++	C3 보다 느림
HC3-1498	1498-1663	94% 동일, 96% 유사	++	+++	++++	C3 보다 느림
HC3-1550/1617	1550-1617	97% 동일, 98% 유사	-	++++	+++/\$?
CVF	NA	49% 동일, 68% 유사	+++	+++	+++	아니오
사람 C3b	NA	100%	-	++++	-	예

*+++는 CVF와 동등한 활성으로 정의된다
\$ 15분 후 반응 중단

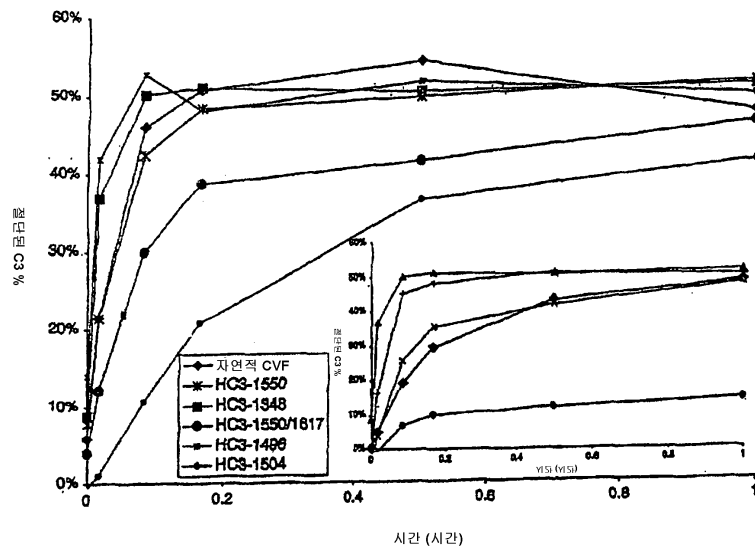
도면9



도면10

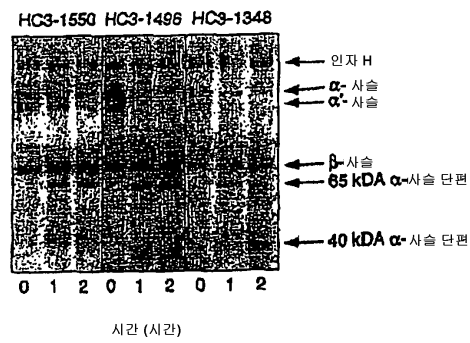


도면11



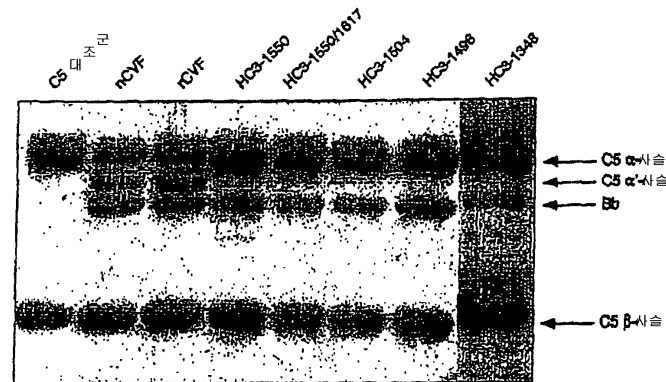
도면12

선택된 하이브리드 단백질의 인자 H 및 I에 의한 절단



도면13

사람 C3/CVF 하이브리드 단백질에 의한 C5 전환



서열목록

- <110> UNIVERSITY OF HAWAII
Vogel, Carl-Wilhelm
Fritzinger, David C.
- <120> HUMAN COMPLEMENT C3 DERIVATIVES WITH COBRA VENOM FACTOR-LIKE
FUNCTION
- <130> 606842000140
- <140> PCT/US2005/015119
- <141> 2005-04-29
- <150> US 60/567,069
- <151> 2004-04-30
- <150> US 60/653,247
- <151> 2005-02-14
- <150> US 60/667,352
- <151> 2005-03-31
- <160> 24
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 5064
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS

<222> (61) .. (5049)

<400> 1

```

ctcctcccca tcctctccct ctgtccctct gtcctctctga ccttgactg tcccagcacc      60

atg gga ccc acc tca ggt ccc agc ctg ctg ctc ctg cta cta acc cac      108
Met Gly Pro Thr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Thr His
  1           5           10           15

ctc ccc ctg gct ctg ggg agt ccc atg tac tct atc atc acc ccc aac      156
Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn
          20           25           30

atc ttg cgg ctg gag agc gag gag acc atg gtg ctg gag gcc cac gac      204
Ile Leu Arg Leu Glu Ser Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp
        35           40           45

gcg caa ggg gat gtt cca gtc act gtt act gtc cac gac ttc cca ggc      252
Ala Gln Gly Asp Val Pro Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly
        50           55           60

aaa aaa cta gtg ctg tcc agt gag aag act gtg ctg acc cct gcc acc      300
Lys Lys Leu Val Leu Ser Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr
        65           70           75           80

aac cac atg ggc aac gtc acc ttc acg atc cca gcc aac agg gag ttc      348
Asn His Met Gly Asn Val Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe
          85           90           95

aag tca gaa aag ggg cgc aac aag ttc gtg acc gtg cag gcc acc ttc      396
Lys Ser Glu Lys Gly Arg Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe
        100           105           110

ggg acc caa gtg gtg gag aag gtg gtg ctg gtc agc ctg cag agc ggc      444
Gly Thr Gln Val Val Glu Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly
        115           120           125

tac ctc ttc atc cag aca gac aag acc atc tac acc cct gcc tcc aca      492
Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr
        130           135           140

gtt ctc tat cgg atc ttc acc gtc aac cac aag ctg cta ccc gtg ggc      540
Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly
        145           150           155           160

cgg acg gtc atg gtc aac att gag aac ccg gaa ggc atc ccg gtc aag      588
Arg Thr Val Met Val Asn Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys
          165           170           175

cag gac tcc ttg tct tct cag aac cag ctt ggc gtc ttg ccc ttg tct      636
Gln Asp Ser Leu Ser Ser Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser
          180           185           190

```

tgg gac att ccg gaa ctc gtc aac atg ggc cag tgg aag atc cga gcc	684
Trp Asp Ile Pro Glu Leu Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala	
195 200 205	
tac tat gaa aac tca cca cag cag gtc ttc tcc act gag ttt gag gtg	732
Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val	
210 215 220	
aag gag tac gtg ctg ccc agt ttc gag gtc ata gtg gag cct aca gag	780
Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu	
225 230 235 240	
aaa ttc tac tac atc tat aac gag aag ggc ctg gag gtc acc atc acc	828
Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr	
245 250 255	
gcc agg ttc ctc tac ggg aag aaa gtg gag gga act gcc ttt gtc atc	876
Ala Arg Phe Leu Tyr Gly Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile	
260 265 270	
ttc ggg atc cag gat ggc gaa cag agg att tcc ctg cct gaa tcc ctc	924
Phe Gly Ile Gln Asp Gly Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu	
275 280 285	
aag cgc att ccg att gag gat ggc tcg ggg gag gtt gtg ctg agc cgg	972
Lys Arg Ile Pro Ile Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg	
290 295 300	
aag gta ctg ctg gac ggg gtg cag aac ctc cga gca gaa gac ctg gtg	1020
Lys Val Leu Leu Asp Gly Val Gln Asn Leu Arg Ala Glu Asp Leu Val	
305 310 315 320	
ggg aag tct ttg tac gtg tct gcc acc gtc atc ttg cac tca ggc agt	1068
Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser	
325 330 335	
gac atg gtg cag gca gag cgc agc ggg atc ccc atc gtg acc tct ccc	1116
Asp Met Val Gln Ala Glu Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro	
340 345 350	
tac cag atc cac ttc acc aag aca ccc aag tac ttc aaa cca gga atg	1164
Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met	
355 360 365	
ccc ttt gac ctc atg gtg ttc gtg acg aac cct gat ggc tct cca gcc	1212
Pro Phe Asp Leu Met Val Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala	
370 375 380	
tac cga gtc ccc gtg gca gtc cag ggc gag gac act gtg cag tct cta	1260
Tyr Arg Val Pro Val Ala Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu	
385 390 395 400	

acc cag gga gat ggc gtg gcc aaa ctc agc atc aac aca cac ccc agc	1308
Thr Gln Gly Asp Gly Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser	
405 410 415	
cag aag ccc ttg agc atc acg gtg cgc acg aag aag cag gag ctc tcg	1356
Gln Lys Pro Leu Ser Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser	
420 425 430	
gag gca gag cag gct acc agg acc atg cag gct ctg ccc tac agc acc	1404
Glu Ala Glu Gln Ala Thr Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr	
435 440 445	
gtg ggc aac tcc aac aat tac ctg cat ctc tca gtg cta cgt aca gag	1452
Val Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu	
450 455 460	
ctc aga ccc ggg gag acc ctc aac gtc aac ttc ctc ctg cga atg gac	1500
Leu Arg Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp	
465 470 475 480	
cgc gcc cac gag gcc aag atc cgc tac tac acc tac ctg atc atg aac	1548
Arg Ala His Glu Ala Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn	
485 490 495	
aag ggc agg ctg ttg aag gcg gga cgc cag gtg cga gag ccc ggc cag	1596
Lys Gly Arg Leu Leu Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln	
500 505 510	
gac ctg gtg gtg ctg ccc ctg tcc atc acc acc gac ttc atc cct tcc	1644
Asp Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser	
515 520 525	
ttc cgc ctg gtg gcg tac tac acg ctg atc ggt gcc agc ggc cag agg	1692
Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg	
530 535 540	
gag gtg gtg gcc gac tcc gtg tgg gtg gac gtc aag gac tcc tgc gtg	1740
Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val	
545 550 555 560	
ggc tcg ctg gtg gta aaa agc ggc cag tca gaa gac cgg cag cct gta	1788
Gly Ser Leu Val Val Lys Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val	
565 570 575	
cct ggg cag cag atg acc ctg aag ata gag ggt gac cac ggg gcc cgg	1836
Pro Gly Gln Gln Met Thr Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg	
580 585 590	
gtg gta ctg gtg gcc gtg gac aag ggc gtg ttc gtg ctg aat aag aag	1884
Val Val Leu Val Ala Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys	
595 600 605	

aac aaa ctg acg cag agt aag atc tgg gac gtg gtg gag aag gca gac Asn Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp 610 615 620	1932
atc ggc tgc acc ccg ggc agt ggg aag gat tac gcc ggt gtc ttc tcc Ile Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Gly Val Phe Ser 625 630 635 640	1980
gac gca ggg ctg acc ttc acg agc agc agt ggc cag cag acc gcc cag Asp Ala Gly Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ser Gly Gln Gln Thr Ala Gln 645 650 655	2028
agg gca gaa ctt cag tgc ccg cag cca gcc gcc cgc cga cgc cgt tcc Arg Ala Glu Leu Gln Cys Pro Gln Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser 660 665 670	2076
gtg cag ctc acg gag aag cga atg gac aaa gtc ggc aag tac ccc aag Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys 675 680 685	2124
gag ctg cgc aag tgc tgc gag gac ggc atg cgg gag aac ccc atg agg Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg 690 695 700	2172
ttc tcg tgc cag cgc cgg acc cgt ttc atc tcc ctg ggc gag gcg tgc Phe Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala Cys 705 710 715 720	2220
aag aag gtc ttc ctg gac tgc tgc aac tac atc aca gag ctg cgg cgg Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg 725 730 735	2268
cag cac gcg cgg gcc agc cac ctg ggc ctg gcc agg agt aac ctg gat Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg Ser Asn Leu Asp 740 745 750	2316
gag gac atc att gca gaa gag aac atc gtt tcc cga agt gag ttc cca Glu Asp Ile Ile Ala Glu Glu Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu Phe Pro 755 760 765	2364
gag agc tgg ctg tgg aac gtt gag gac ttg aaa gag cca ccg aaa aat Glu Ser Trp Leu Trp Asn Val Glu Asp Leu Lys Glu Pro Pro Lys Asn 770 775 780	2412
gga atc tct acg aag ctc atg aat ata ttt ttg aaa gac tcc atc acc Gly Ile Ser Thr Lys Leu Met Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr 785 790 795 800	2460
acg tgg gag att ctg gct gtc agc atg tcg gac aag aaa ggg atc tgt Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser Met Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys 805 810 815	2508

gtg gca gac ccc ttc gag gtc aca gta atg cag gac ttc ttc atc gac Val Ala Asp Pro Phe Glu Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp 820 825 830	2556
ctg cgg cta ccc tac tct gtt gtt cga aac gag cag gtg gaa atc cga Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg 835 840 845	2604
gcc gtt ctc tac aat tac cgg cag aac caa gag ctc aag gtg agg gtg Ala Val Leu Tyr Asn Tyr Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val 850 855 860	2652
gaa cta ctc cac aat cca gcc ttc tgc agc ctg gcc acc acc aag agg Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg 865 870 875 880	2700
cgt cac cag cag acc gta acc atc ccc ccc aag tcc tcg ttg tcc gtt Arg His Gln Gln Thr Val Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val 885 890 895	2748
cca tat gtc atc gtg ccg cta aag acc ggc ctg cag gaa gtg gaa gtc Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val 900 905 910	2796
aag gct gcc gtc tac cat cat ttc atc agt gac ggt gtc agg aag tcc Lys Ala Ala Val Tyr His His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser 915 920 925	2844
ctg aag gtc gtg ccg gaa gga atc aga atg aac aaa act gtg gct gtt Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val 930 935 940	2892
cgc acc ctg gat cca gaa cgc ctg ggc cgt gaa gga gtg cag aaa gag Arg Thr Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu 945 950 955 960	2940
gac atc cca cct gca gac ctc agt gac caa gtc ccg gac acc gag tct Asp Ile Pro Pro Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser 965 970 975	2988
gag acc aga att ctc ctg caa ggg acc cca gtg gcc cag atg aca gag Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu 980 985 990	3036
gat gcc gtc gac gcg gaa cgg ctg aag cac ctc att gtg acc ccc tcg Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser 995 1000 1005	3084
ggc tgc ggg gaa cag aac atg atc ggc atg acg ccc acg gtc atc gct Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala 1010 1015 1020	3132

gtg cat tac ctg gat gaa acg gag cag tgg gag aag ttc ggc cta gag Val His Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu 1025 1030 1035 1040	3180
aag cgg cag ggg gcc ttg gag ctc atc aag aag ggg tac acc cag cag Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln 1045 1050 1055	3228
ctg gcc ttc aga caa ccc agc tct gcc ttt gcg gcc ttc gtg aaa cgg Leu Ala Phe Arg Gln Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala Phe Val Lys Arg 1060 1065 1070	3276
gca ccc agc acc tgg ctg acc gcc tac gtg gtc aag gtc ttc tct ctg Ala Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu 1075 1080 1085	3324
gct gtc aac ctc atc gcc atc gac tcc caa gtc ctc tgc ggg gct gtt Ala Val Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala Val 1090 1095 1100	3372
aaa tgg ctg atc ctg gag aag cag aag ccc gac ggg gtc ttc cag gag Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu 1105 1110 1115 1120	3420
gat gcg ccc gtg ata cac caa gaa atg att ggt gga tta cgg aac aac Asp Ala Pro Val Ile His Gln Glu Met Ile Gly Gly Leu Arg Asn Asn 1125 1130 1135	3468
aac gag aaa gac atg gcc ctc acg gcc ttt gtt ctc atc tcg ctg cag Asn Glu Lys Asp Met Ala Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ser Leu Gln 1140 1145 1150	3516
gag gct aaa gat att tgc gag gag cag gtc aac agc ctg cca ggc agc Glu Ala Lys Asp Ile Cys Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser 1155 1160 1165	3564
atc act aaa gca gga gac ttc ctt gaa gcc aac tac atg aac cta cag Ile Thr Lys Ala Gly Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn Leu Gln 1170 1175 1180	3612
aga tcc tac act gtg gcc att gct ggc tat gct ctg gcc cag atg ggc Arg Ser Tyr Thr Val Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Gln Met Gly 1185 1190 1195 1200	3660
agg ctg aag ggg cct ctt ctt aac aaa ttt ctg acc aca gcc aaa gat Arg Leu Lys Gly Pro Leu Leu Asn Lys Phe Leu Thr Thr Ala Lys Asp 1205 1210 1215	3708
aag aac cgc tgg gag gac cct ggt aag cag ctc tac aac gtg gag gcc Lys Asn Arg Trp Glu Asp Pro Gly Lys Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala 1220 1225 1230	3756

aca tcc tat gcc ctc ttg gcc cta ctg cag cta aaa gac ttt gac ttt Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu Leu Gln Leu Lys Asp Phe Asp Phe 1235 1240 1245	3804
gtg cct ccc gtc gtg cgt tgg ctc aat gaa cag aga tac tac ggt ggt Val Pro Pro Val Val Arg Trp Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly 1250 1255 1260	3852
ggc tat ggc tct acc cag gcc acc ttc atg gtg ttc caa gcc ttg gct Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala 1265 1270 1275 1280	3900
caa tac caa aag gac gcc cct gac cac cag gaa ctg aac ctt gat gtg Gln Tyr Gln Lys Asp Ala Pro Asp His Gln Glu Leu Asn Leu Asp Val 1285 1290 1295	3948
tcc ctc caa ctg ccc agc cgc agc tcc aag atc acc cac cgt atc cac Ser Leu Gln Leu Pro Ser Arg Ser Ser Lys Ile Thr His Arg Ile His 1300 1305 1310	3996
tgg gaa tct gcc agc ctc ctg cga tca gaa gag acc aag gaa aat gag Trp Glu Ser Ala Ser Leu Leu Arg Ser Glu Glu Thr Lys Glu Asn Glu 1315 1320 1325	4044
ggc ttc aca gtc aca gct gaa gga aaa ggc caa ggc acc ttg tcg gtg Gly Phe Thr Val Thr Ala Glu Gly Lys Gly Gln Gly Thr Leu Ser Val 1330 1335 1340	4092
gtg aca atg tac cat gct aag gcc aaa gat caa ctc acc tgt aat aaa Val Thr Met Tyr His Ala Lys Ala Lys Asp Gln Leu Thr Cys Asn Lys 1345 1350 1355 1360	4140
ttc gac ctc aag gtc acc ata aaa cca gca ccg gaa aca gaa aag agg Phe Asp Leu Lys Val Thr Ile Lys Pro Ala Pro Glu Thr Glu Lys Arg 1365 1370 1375	4188
cct cag gat gcc aag aac act atg atc ctt gag atc tgt acc agg tac Pro Gln Asp Ala Lys Asn Thr Met Ile Leu Glu Ile Cys Thr Arg Tyr 1380 1385 1390	4236
cgg gga gac cag gat gcc act atg tct ata ttg gac ata tcc atg atg Arg Gly Asp Gln Asp Ala Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met 1395 1400 1405	4284
act ggc ttt gct cca gac aca gat gac ctg aag cag ctg gcc aat ggt Thr Gly Phe Ala Pro Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln Leu Ala Asn Gly 1410 1415 1420	4332
gtt gac aga tac atc tcc aag tat gag ctg gac aaa gcc ttc tcc gat Val Asp Arg Tyr Ile Ser Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Ala Phe Ser Asp 1425 1430 1435 1440	4380

agg aac acc ctc atc atc tac ctg gac aag gtc tca cac tct gag gat Arg Asn Thr Leu Ile Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser His Ser Glu Asp 1445 1450 1455	4428
gac tgt cta gct ttc aaa gtt cac caa tac ttt aat gta gag ctt atc Asp Cys Leu Ala Phe Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile 1460 1465 1470	4476
cag cct gga gca gtc aag gtc tac gcc tat tac aac ctg gag gaa agc Gln Pro Gly Ala Val Lys Val Tyr Ala Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser 1475 1480 1485	4524
tgt acc cgg ttc tac cat ccg gaa aag gag gat gga aag ctg aac aag Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu Lys Glu Asp Gly Lys Leu Asn Lys 1490 1495 1500	4572
ctc tgc cgt gat gaa ctg tgc cgc tgt gct gag gag aat tgc ttc ata Leu Cys Arg Asp Glu Leu Cys Arg Cys Ala Glu Glu Asn Cys Phe Ile 1505 1510 1515 1520	4620
caa aag tcg gat gac aag gtc acc ctg gaa gaa cgg ctg gac aag gcc Gln Lys Ser Asp Asp Lys Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys Ala 1525 1530 1535	4668
tgt gag cca gga gtg gac tat gtg tac aag acc cga ctg gtc aag gtt Cys Glu Pro Gly Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Arg Leu Val Lys Val 1540 1545 1550	4716
cag ctg tcc aat gac ttt gac gag tac atc atg gcc att gag cag acc Gln Leu Ser Asn Asp Phe Asp Glu Tyr Ile Met Ala Ile Glu Gln Thr 1555 1560 1565	4764
atc aag tca ggc tcg gat gag gtg cag gtt gga cag cag cgc acg ttc Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val Gln Val Gly Gln Gln Arg Thr Phe 1570 1575 1580	4812
atc agc ccc atc aag tgc aga gaa gcc ctg aag ctg gag gag aag aaa Ile Ser Pro Ile Lys Cys Arg Glu Ala Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys 1585 1590 1595 1600	4860
cac tac ctc atg tgg ggt ctc tcc tcc gat ttc tgg gga gag aag ccc His Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys Pro 1605 1610 1615	4908
aac ctc agc tac atc atc ggg aag gac act tgg gtg gag cac tgg cct Asn Leu Ser Tyr Ile Ile Gly Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro 1620 1625 1630	4956
gag gag gac gaa tgc caa gac gaa gag aac cag aaa caa tgc cag gac Glu Glu Asp Glu Cys Gln Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln Cys Gln Asp 1635 1640 1645	5004

ctc ggc gcc ttc acc gag agc atg gtt gtc ttt ggg tgc ccc aac c 5050
 Leu Gly Ala Phe Thr Glu Ser Met Val Val Phe Gly Cys Pro Asn
 1650 1655 1660

cacaccccca ttcc 5064

<210> 2
 <211> 1663
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gly Pro Thr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Thr His
 1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn
 20 25 30

Ile Leu Arg Leu Glu Ser Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp
 35 40 45

Ala Gln Gly Asp Val Pro Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly
 50 55 60

Lys Lys Leu Val Leu Ser Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr
 65 70 75 80

Asn His Met Gly Asn Val Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe
 85 90 95

Lys Ser Glu Lys Gly Arg Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Val Glu Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly
 115 120 125

Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr
 130 135 140

Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly
 145 150 155 160

Arg Thr Val Met Val Asn Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys
 165 170 175

Gln Asp Ser Leu Ser Ser Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser
 180 185 190

Trp Asp Ile Pro Glu Leu Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala
 195 200 205

Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val
 210 215 220
 Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr
 245 250 255
 Ala Arg Phe Leu Tyr Gly Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile
 260 265 270
 Phe Gly Ile Gln Asp Gly Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu
 275 280 285
 Lys Arg Ile Pro Ile Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg
 290 295 300
 Lys Val Leu Leu Asp Gly Val Gln Asn Leu Arg Ala Glu Asp Leu Val
 305 310 315 320
 Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser
 325 330 335
 Asp Met Val Gln Ala Glu Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met
 355 360 365
 Pro Phe Asp Leu Met Val Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala
 370 375 380
 Tyr Arg Val Pro Val Ala Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu
 385 390 395 400
 Thr Gln Gly Asp Gly Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser
 405 410 415
 Gln Lys Pro Leu Ser Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser
 420 425 430
 Glu Ala Glu Gln Ala Thr Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr
 435 440 445
 Val Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu
 450 455 460
 Leu Arg Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Arg Ala His Glu Ala Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn

485	490	495
Lys Gly Arg Leu Leu Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln		
500	505	510
Asp Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser		
515	520	525
Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg		
530	535	540
Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val		
545	550	555
Gly Ser Leu Val Val Lys Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val		
565	570	575
Pro Gly Gln Gln Met Thr Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg		
580	585	590
Val Val Leu Val Ala Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys		
595	600	605
Asn Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp		
610	615	620
Ile Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Gly Val Phe Ser		
625	630	635
Asp Ala Gly Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ser Gly Gln Gln Thr Ala Gln		
645	650	655
Arg Ala Glu Leu Gln Cys Pro Gln Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser		
660	665	670
Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys		
675	680	685
Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg		
690	695	700
Phe Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala Cys		
705	710	715
Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg		
725	730	735
Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg Ser Asn Leu Asp		
740	745	750
Glu Asp Ile Ile Ala Glu Glu Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu Phe Pro		
755	760	765

Glu Ser Trp Leu Trp Asn Val Glu Asp Leu Lys Glu Pro Pro Lys Asn
 770 775 780
 Gly Ile Ser Thr Lys Leu Met Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr
 785 790 795 800
 Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser Met Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys
 805 810 815
 Val Ala Asp Pro Phe Glu Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp
 820 825 830
 Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg
 835 840 845
 Ala Val Leu Tyr Asn Tyr Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val
 850 855 860
 Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg
 865 870 875 880
 Arg His Gln Gln Thr Val Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val
 885 890 895
 Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val
 900 905 910
 Lys Ala Ala Val Tyr His His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser
 915 920 925
 Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val
 930 935 940
 Arg Thr Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu
 945 950 955 960
 Asp Ile Pro Pro Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser
 965 970 975
 Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu
 980 985 990
 Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser
 995 1000 1005
 Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala
 1010 1015 1020
 Val His Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu
 1025 1030 1035 1040
 Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln

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

Gly Phe Thr Val Thr Ala Glu Gly Lys Gly Gln Gly Thr Leu Ser Val
1330 1335 1340

Val Thr Met Tyr His Ala Lys Ala Lys Asp Gln Leu Thr Cys Asn Lys
1345 1350 1355 1360

Phe Asp Leu Lys Val Thr Ile Lys Pro Ala Pro Glu Thr Glu Lys Arg
1365 1370 1375

Pro Gln Asp Ala Lys Asn Thr Met Ile Leu Glu Ile Cys Thr Arg Tyr
1380 1385 1390

Arg Gly Asp Gln Asp Ala Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met
1395 1400 1405

Thr Gly Phe Ala Pro Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln Leu Ala Asn Gly
1410 1415 1420

Val Asp Arg Tyr Ile Ser Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Ala Phe Ser Asp
1425 1430 1435 1440

Arg Asn Thr Leu Ile Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser His Ser Glu Asp
1445 1450 1455

Asp Cys Leu Ala Phe Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile
1460 1465 1470

Gln Pro Gly Ala Val Lys Val Tyr Ala Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser
1475 1480 1485

Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu Lys Glu Asp Gly Lys Leu Asn Lys
1490 1495 1500

Leu Cys Arg Asp Glu Leu Cys Arg Cys Ala Glu Glu Asn Cys Phe Ile
1505 1510 1515 1520

Gln Lys Ser Asp Asp Lys Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys Ala
1525 1530 1535

Cys Glu Pro Gly Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Arg Leu Val Lys Val
1540 1545 1550

Gln Leu Ser Asn Asp Phe Asp Glu Tyr Ile Met Ala Ile Glu Gln Thr
1555 1560 1565

Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val Gln Val Gly Gln Gln Arg Thr Phe
1570 1575 1580

Ile Ser Pro Ile Lys Cys Arg Glu Ala Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys
1585 1590 1595 1600

His Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys Pro

1605	1610	1615
Asn Leu Ser Tyr Ile Ile Gly Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro		
1620	1625	1630
Glu Glu Asp Glu Cys Gln Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln Cys Gln Asp		
1635	1640	1645
Leu Gly Ala Phe Thr Glu Ser Met Val Val Phe Gly Cys Pro Asn		
1650	1655	1660

<210> 3
 <211> 5927
 <212> DNA
 <213> Naja kaouthia

<220>
 <221> CDS
 <222> (4) .. (4929)

<400> 3	
ccc atg gag agg atg gct ctc tat ctg gtg gct gct cta ttg att	45
Met Glu Arg Met Ala Leu Tyr Leu Val Ala Ala Leu Leu Ile	
1 5 10	
ggt ttt cca ggg tct tct cat ggg gct ctc tac acc ctc atc acc cct	93
Gly Phe Pro Gly Ser Ser His Gly Ala Leu Tyr Thr Leu Ile Thr Pro	
15 20 25 30	
gct gtt ttg cga aca gac aca gaa gag caa att ttg gtg gag gcc cat	141
Ala Val Leu Arg Thr Asp Thr Glu Glu Gln Ile Leu Val Glu Ala His	
35 40 45	
gga gac agt act cca aaa cag ctt gac atc ttt gtt cat gat ttt cca	189
Gly Asp Ser Thr Pro Lys Gln Leu Asp Ile Phe Val His Asp Phe Pro	
50 55 60	
cgg aag cag aaa acc ttg ttc caa acc aga gta gat atg aat cca gca	237
Arg Lys Gln Lys Thr Leu Phe Gln Thr Arg Val Asp Met Asn Pro Ala	
65 70 75	
gga ggc atg ctt gtc act cca act ata gag att cca gca aaa gaa gtg	285
Gly Gly Met Leu Val Thr Pro Thr Ile Glu Ile Pro Ala Lys Glu Val	
80 85 90	
agt acg gac tcc agg caa aat caa tat gtg gtt gtg caa gta act ggt	333
Ser Thr Asp Ser Arg Gln Asn Gln Tyr Val Val Val Gln Val Thr Gly	
95 100 105 110	

cct caa gtg aga ttg gaa aag gtg gtt ctc ctt tct tac cag agt agc Pro Gln Val Arg Leu Glu Lys Val Val Leu Leu Ser Tyr Gln Ser Ser 115 120 125	381
ttt ctg ttt atc cag aca gat aaa ggc atc tat aca cca ggg tct cca Phe Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys Gly Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Pro 130 135 140	429
gta ctc tat cgt gtt ttt tct atg gat cac aac aca agc aag atg aac Val Leu Tyr Arg Val Phe Ser Met Asp His Asn Thr Ser Lys Met Asn 145 150 155	477
aaa act gtg att gtt gag ttt cag act cca gaa ggc att ctt gtc agt Lys Thr Val Ile Val Glu Phe Gln Thr Pro Glu Gly Ile Leu Val Ser 160 165 170	525
tct aat tca gtt gac cta aac ttc ttc tgg cct tac aat tta cca gac Ser Asn Ser Val Asp Leu Asn Phe Phe Trp Pro Tyr Asn Leu Pro Asp 175 180 185 190	573
ctt gtc agt ttg ggg act tgg agg att gtg gcc aaa tat gaa cat tcc Leu Val Ser Leu Gly Thr Trp Arg Ile Val Ala Lys Tyr Glu His Ser 195 200 205	621
cca gag aat tat act gca tat ttt gat gtc agg aaa tat gtg ttg cca Pro Glu Asn Tyr Thr Ala Tyr Phe Asp Val Arg Lys Tyr Val Leu Pro 210 215 220	669
agc ttt gaa gtc cgt ctg caa cca tca gag aag ttt ttt tac att gac Ser Phe Glu Val Arg Leu Gln Pro Ser Glu Lys Phe Phe Tyr Ile Asp 225 230 235	717
ggc aat gaa aat ttc cac gtg tct atc act gca agg tac ttg tat gga Gly Asn Glu Asn Phe His Val Ser Ile Thr Ala Arg Tyr Leu Tyr Gly 240 245 250	765
gag gaa gtg gaa ggt gtg gcc ttt gtc ctc ttt gga gtg aaa ata gat Glu Glu Val Glu Gly Val Ala Phe Val Leu Phe Gly Val Lys Ile Asp 255 260 265 270	813
gat gct aaa aag agt att cca gac tca ctc acg aga att ccg att att Asp Ala Lys Lys Ser Ile Pro Asp Ser Leu Thr Arg Ile Pro Ile Ile 275 280 285	861
gat gga gat ggg aaa gca aca cta aaa aga gat aca ttc cgt tct cga Asp Gly Asp Gly Lys Ala Thr Leu Lys Arg Asp Thr Phe Arg Ser Arg 290 295 300	909
ttt cca aat ctc aat gag ctt gtt ggg cat act ctg tat gca tct gta Phe Pro Asn Leu Asn Glu Leu Val Gly His Thr Leu Tyr Ala Ser Val 305 310 315	957

aca gtc atg aca gaa tca ggc agt gat atg gta gtg act gag caa agc Thr Val Met Thr Glu Ser Gly Ser Asp Met Val Val Thr Glu Gln Ser 320 325 330	1005
ggc att cat att gtg gca tct ccc tat cag atc cac ttc aca aaa acc Gly Ile His Ile Val Ala Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr 335 340 345 350	1053
ccc aaa tat ttc aag cca gga atg cca tat gaa ctg acg gtg tat gtt Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met Pro Tyr Glu Leu Thr Val Tyr Val 355 360 365	1101
acc aac cct gat ggc tca cca gct gcc cat gtg cca gtg gta tca gag Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala Ala His Val Pro Val Val Ser Glu 370 375 380	1149
gcc ttt cat tct atg gga acc act ttg agt gat ggg act gct aag ctc Ala Phe His Ser Met Gly Thr Thr Leu Ser Asp Gly Thr Ala Lys Leu 385 390 395	1197
atc ctg aac ata cca ttg aat gct caa agc cta cca atc act gtt aga Ile Leu Asn Ile Pro Leu Asn Ala Gln Ser Leu Pro Ile Thr Val Arg 400 405 410	1245
act aac cat gga gac ctc cca aga gaa cgc cag gca aca aag tcc atg Thr Asn His Gly Asp Leu Pro Arg Glu Arg Gln Ala Thr Lys Ser Met 415 420 425 430	1293
aca gcc ata gcc tac caa acc cag gga gga tct gga aac tat ctt cat Thr Ala Ile Ala Tyr Gln Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Leu His 435 440 445	1341
gta gcc att aca tct aca gag att aag ccc gga gat aac tta cct gtc Val Ala Ile Thr Ser Thr Glu Ile Lys Pro Gly Asp Asn Leu Pro Val 450 455 460	1389
aat ttc aat gtg aag ggc aat gca aat tca ctg aag cag atc aaa tat Asn Phe Asn Val Lys Gly Asn Ala Asn Ser Leu Lys Gln Ile Lys Tyr 465 470 475	1437
ttc aca tac ctc ata ttg aat aaa ggg aag att ttc aag gtt ggc agg Phe Thr Tyr Leu Ile Leu Asn Lys Gly Lys Ile Phe Lys Val Gly Arg 480 485 490	1485
caa ccc agg aga gat ggg cag aat ctg gtg acc atg aat ctg cat atc Gln Pro Arg Arg Asp Gly Gln Asn Leu Val Thr Met Asn Leu His Ile 495 500 505 510	1533
act cca gat ctc atc cct tcc ttc cgg ttt gtg gct tac tac caa gtg Thr Pro Asp Leu Ile Pro Ser Phe Arg Phe Val Ala Tyr Tyr Gln Val 515 520 525	1581

gga aac aac gaa att gtg gct gat tct gtc tgg gtg gat gtg aag gat Gly Asn Asn Glu Ile Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp 530 535 540	1629
acc tgc atg gga acg ttg gtt gtg aaa gga gac aat cta ata caa atg Thr Cys Met Gly Thr Leu Val Val Lys Gly Asp Asn Leu Ile Gln Met 545 550 555	1677
cca gga gct gca atg aaa atc aaa ttg gaa ggg gat cca ggt gct cgg Pro Gly Ala Ala Met Lys Ile Lys Leu Glu Gly Asp Pro Gly Ala Arg 560 565 570	1725
gtt ggt ctt gtg gct gtg gac aaa gca gta tat gtt ctc aat gat aaa Val Gly Leu Val Ala Val Asp Lys Ala Val Tyr Val Leu Asn Asp Lys 575 580 585 590	1773
tat aag att agc caa gct aag ata tgg gac aca ata gaa aag agt gac Tyr Lys Ile Ser Gln Ala Lys Ile Trp Asp Thr Ile Glu Lys Ser Asp 595 600 605	1821
ttt ggc tgt aca gct ggc agt ggc cag aat aat ctg ggt gtg ttt gaa Phe Gly Cys Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn Asn Leu Gly Val Phe Glu 610 615 620	1869
gat gct gga ctg gct ctg aca acc agc act aat ctc aac acc aaa cag Asp Ala Gly Leu Ala Leu Thr Thr Ser Thr Asn Leu Asn Thr Lys Gln 625 630 635	1917
aga tca gct gca aag tgt cct cag cct gca aat cgg agg cgt cgc agt Arg Ser Ala Ala Lys Cys Pro Gln Pro Ala Asn Arg Arg Arg Arg Ser 640 645 650	1965
tct gtt ttg ctg ctt gac agc aac gca agc aaa gcg gca gaa ttt cag Ser Val Leu Leu Leu Asp Ser Asn Ala Ser Lys Ala Ala Glu Phe Gln 655 660 665 670	2013
gat caa gac ctg cgt aaa tgc tgt gaa gat gtc atg cat gag aac ccc Asp Gln Asp Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Val Met His Glu Asn Pro 675 680 685	2061
atg ggg tac act tgt gaa aag cgt gca aaa tac atc cag gag gga gat Met Gly Tyr Thr Cys Glu Lys Arg Ala Lys Tyr Ile Gln Glu Gly Asp 690 695 700	2109
gct tgt aag gct gcc ttc ctt gaa tgc tgt cgc tac atc aag ggg gtc Ala Cys Lys Ala Ala Phe Leu Glu Cys Cys Arg Tyr Ile Lys Gly Val 705 710 715	2157
cga gat gaa aac caa cgg gag agc gag ttg ttt ctg gca aga gat gat Arg Asp Glu Asn Gln Arg Glu Ser Glu Leu Phe Leu Ala Arg Asp Asp 720 725 730	2205

aat gaa gat ggt ttc ata gca gat agt gat atc atc tca agg tct gat Asn Glu Asp Gly Phe Ile Ala Asp Ser Asp Ile Ile Ser Arg Ser Asp 735 740 745 750	2253
ttc ccc aag agt tgg ttg tgg cta aca aag gac ttg acc gag gag cct Phe Pro Lys Ser Trp Leu Trp Leu Thr Lys Asp Leu Thr Glu Glu Pro 755 760 765	2301
aac agt caa ggg att tca agc aag aca atg tct ttt tat ctg agg gat Asn Ser Gln Gly Ile Ser Ser Lys Thr Met Ser Phe Tyr Leu Arg Asp 770 775 780	2349
tcc atc aca acc tgg gtg gtg ctg gct gta agc ttt aca ccc acc aaa Ser Ile Thr Thr Trp Val Val Leu Ala Val Ser Phe Thr Pro Thr Lys 785 790 795	2397
ggg atc tgt gtg gct gaa cct tat gaa ata aga gtc atg aaa gtc ttc Gly Ile Cys Val Ala Glu Pro Tyr Glu Ile Arg Val Met Lys Val Phe 800 805 810	2445
ttc att gat ctt caa atg cca tat tca gta gtg aag aat gag cag gtg Phe Ile Asp Leu Gln Met Pro Tyr Ser Val Val Lys Asn Glu Gln Val 815 820 825 830	2493
gag att cga gct att ctg cac aac tac gtt aac gag gat att tat gtg Glu Ile Arg Ala Ile Leu His Asn Tyr Val Asn Glu Asp Ile Tyr Val 835 840 845	2541
cga gtg gaa ctg tta tac aac cca gcc ttc tgc agt gct tcc aca aaa Arg Val Glu Leu Leu Tyr Asn Pro Ala Phe Cys Ser Ala Ser Thr Lys 850 855 860	2589
gga caa aga tac cga cag cag ttc cca att aaa gcc ctg tcc tcc aga Gly Gln Arg Tyr Arg Gln Gln Phe Pro Ile Lys Ala Leu Ser Ser Arg 865 870 875	2637
gca gta ccg ttt gtg ata gtc cca tta gag caa gga ttg cat gat gtt Ala Val Pro Phe Val Ile Val Pro Leu Glu Gln Gly Leu His Asp Val 880 885 890	2685
gag att aaa gca agt gtc cag gaa gcg ttg tgg tca gac ggt gtg agg Glu Ile Lys Ala Ser Val Gln Glu Ala Leu Trp Ser Asp Gly Val Arg 895 900 905 910	2733
aag aaa ctg aaa gtt gta cct gaa ggg gta cag aaa tcc att gtg act Lys Lys Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Val Gln Lys Ser Ile Val Thr 915 920 925	2781
att gtt aaa ctg gac cca agg gca aaa gga gtt ggt gga aca cag cta Ile Val Lys Leu Asp Pro Arg Ala Lys Gly Val Gly Gly Thr Gln Leu 930 935 940	2829

gaa gtg atc aaa gcc cgc aaa tta gat gac aga gtg cct gac aca gaa Glu Val Ile Lys Ala Arg Lys Leu Asp Asp Arg Val Pro Asp Thr Glu 945 950 955	2877
att gaa acc aag att atc atc caa ggt gac cct gtg gct cag att att Ile Glu Thr Lys Ile Ile Ile Gln Gly Asp Pro Val Ala Gln Ile Ile 960 965 970	2925
gaa aac tca att gat gga agt aaa ctc aac cat ctc att atc act cct Glu Asn Ser Ile Asp Gly Ser Lys Leu Asn His Leu Ile Ile Thr Pro 975 980 985 990	2973
tct ggc tgt ggg gag caa aat atg atc cgc atg gcc gca cca gtt att Ser Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Arg Met Ala Ala Pro Val Ile 995 1000 1005	3021
gcc acc tac tac ctg gac acc aca gag cag tgg gag act ctc ggc ata Ala Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Thr Glu Gln Trp Glu Thr Leu Gly Ile 1010 1015 1020	3069
aat cgc agg act gaa gct gtc aat cag atc gtg act ggt tat gcc cag Asn Arg Arg Thr Glu Ala Val Asn Gln Ile Val Thr Gly Tyr Ala Gln 1025 1030 1035	3117
cag atg gtg tac aag aaa gca gat cat tcc tat gca gca ttt aca aac Gln Met Val Tyr Lys Lys Ala Asp His Ser Tyr Ala Ala Phe Thr Asn 1040 1045 1050	3165
cgt gca tct agt tct tgg cta aca gca tat gtc gta aaa gtc ttt gcc Arg Ala Ser Ser Ser Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ala 1055 1060 1065 1070	3213
atg gct gcc aaa atg gta gca ggc att agt cat gaa atc att tgt gga Met Ala Ala Lys Met Val Ala Gly Ile Ser His Glu Ile Ile Cys Gly 1075 1080 1085	3261
ggt gtg agg tgg ctg att ctg aac agg caa caa cca gat gga gcg ttc Gly Val Arg Trp Leu Ile Leu Asn Arg Gln Gln Pro Asp Gly Ala Phe 1090 1095 1100	3309
aaa gaa aat gcc cct gta ctt tct gga aca atg cag gga gga att caa Lys Glu Asn Ala Pro Val Leu Ser Gly Thr Met Gln Gly Gly Ile Gln 1105 1110 1115	3357
ggt gct gaa gaa gaa gta tat tta aca gct ttc att ctg gtt gcg ttg Gly Ala Glu Glu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Phe Ile Leu Val Ala Leu 1120 1125 1130	3405
ttg gaa tcc aaa aca atc tgc aat gac tat gtc aat agt cta gac agc Leu Glu Ser Lys Thr Ile Cys Asn Asp Tyr Val Asn Ser Leu Asp Ser 1135 1140 1145 1150	3453

agc atc aag aag gcc aca aat tat tta ctc aaa aag tat gag aaa ctg Ser Ile Lys Lys Ala Thr Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Tyr Glu Lys Leu 1155 1160 1165	3501
caa agg cct tac act aca gcc ctc aca gcc tat gct ttg gct gct gca Gln Arg Pro Tyr Thr Thr Ala Leu Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Ala Ala 1170 1175 1180	3549
gac caa ctc aat gat gac agg gta ctc atg gca gca tca aca gga agg Asp Gln Leu Asn Asp Asp Arg Val Leu Met Ala Ala Ser Thr Gly Arg 1185 1190 1195	3597
gat cat tgg gaa gaa tac aat gct cac acc cac aac att gaa ggc act Asp His Trp Glu Glu Tyr Asn Ala His Thr His Asn Ile Glu Gly Thr 1200 1205 1210	3645
tcc tat gcc ttg ttg gcc ctg ctg aaa atg aag aaa ttt gat caa act Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu Leu Lys Met Lys Lys Phe Asp Gln Thr 1215 1220 1225 1230	3693
ggt ccc ata gtc aga tgg ctg aca gat cag aat ttt tat ggg gaa aca Gly Pro Ile Val Arg Trp Leu Thr Asp Gln Asn Phe Tyr Gly Glu Thr 1235 1240 1245	3741
tat gga caa acc caa gca aca gtt atg gca ttt caa gct ctt gct gaa Tyr Gly Gln Thr Gln Ala Thr Val Met Ala Phe Gln Ala Leu Ala Glu 1250 1255 1260	3789
tat gag att cag atg cct acc cat aag gac tta aac tta gat att act Tyr Glu Ile Gln Met Pro Thr His Lys Asp Leu Asn Leu Asp Ile Thr 1265 1270 1275	3837
att gaa ctg cca gat cga gaa gta cct ata agg tac aga att aat tat Ile Glu Leu Pro Asp Arg Glu Val Pro Ile Arg Tyr Arg Ile Asn Tyr 1280 1285 1290	3885
gaa aat gct ctc ctg gct cgg aca gta gag acc aaa ctc aac caa gac Glu Asn Ala Leu Leu Ala Arg Thr Val Glu Thr Lys Leu Asn Gln Asp 1295 1300 1305 1310	3933
atc act gtg aca gca tca ggt gat gga aaa gca aca atg acc att ttg Ile Thr Val Thr Ala Ser Gly Asp Gly Lys Ala Thr Met Thr Ile Leu 1315 1320 1325	3981
aca ttc tat aac gca cag ttg cag gag aag gca aat gtt tgc aat aaa Thr Phe Tyr Asn Ala Gln Leu Gln Glu Lys Ala Asn Val Cys Asn Lys 1330 1335 1340	4029
ttt cat ctt aat gtt tct gtt gaa aac atc cac ttg aat gca atg gga Phe His Leu Asn Val Ser Val Glu Asn Ile His Leu Asn Ala Met Gly 1345 1350 1355	4077

gcc aag gga gcc ctc atg ctc aag atc tgc aca agg tat ctg gga gaa Ala Lys Gly Ala Leu Met Leu Lys Ile Cys Thr Arg Tyr Leu Gly Glu 1360 1365 1370	4125
gtt gat tct aca atg aca ata att gat att tct atg ctg act ggt ttt Val Asp Ser Thr Met Thr Ile Ile Asp Ile Ser Met Leu Thr Gly Phe 1375 1380 1385 1390	4173
ctc cct gat gct gaa gac ctt aca agg ctt tct aaa gga gtg gac aga Leu Pro Asp Ala Glu Asp Leu Thr Arg Leu Ser Lys Gly Val Asp Arg 1395 1400 1405	4221
tac atc tcc aga tat gaa gtt gac aat aat atg gct cag aaa gta gct Tyr Ile Ser Arg Tyr Glu Val Asp Asn Asn Met Ala Gln Lys Val Ala 1410 1415 1420	4269
gtt atc att tac tta aac aag gtc tcc cac tct gaa gat gaa tgc ctg Val Ile Ile Tyr Leu Asn Lys Val Ser His Ser Glu Asp Glu Cys Leu 1425 1430 1435	4317
cac ttt aag att ctc aag cat ttt gaa gtt ggc ttc att cag cca gga His Phe Lys Ile Leu Lys His Phe Glu Val Gly Phe Ile Gln Pro Gly 1440 1445 1450	4365
tca gtc aag gtg tac agc tac tac aat cta gat gaa aaa tgt acc aag Ser Val Lys Val Tyr Ser Tyr Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Cys Thr Lys 1455 1460 1465 1470	4413
ttc tac cat cca gat aaa gga aca ggc ctt ctc aat aag ata tgt att Phe Tyr His Pro Asp Lys Gly Thr Gly Leu Leu Asn Lys Ile Cys Ile 1475 1480 1485	4461
ggt aac gtt tgc cga tgt gca gga gaa acc tgt tcc tcg ctc aac cat Gly Asn Val Cys Arg Cys Ala Gly Glu Thr Cys Ser Ser Leu Asn His 1490 1495 1500	4509
cag gaa agg att gat gtt cca tta caa att gaa aaa gcc tgc gag acg Gln Glu Arg Ile Asp Val Pro Leu Gln Ile Glu Lys Ala Cys Glu Thr 1505 1510 1515	4557
aat gtg gat tat gtc tac aaa acc aag ctg ctt cga ata gaa gaa caa Asn Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Lys Leu Leu Arg Ile Glu Glu Gln 1520 1525 1530	4605
gat ggt aat gat atc tat gtc atg gat gtt tta gaa gtt att aaa caa Asp Gly Asn Asp Ile Tyr Val Met Asp Val Leu Glu Val Ile Lys Gln 1535 1540 1545 1550	4653
ggt act gac gaa aat cca cga gca aag acc cac cag tac ata agt caa Gly Thr Asp Glu Asn Pro Arg Ala Lys Thr His Gln Tyr Ile Ser Gln 1555 1560 1565	4701

agg aaa tgc cag gag gct ctg aat ctg aag gtg aat gat gat tat ctg Arg Lys Cys Gln Glu Ala Leu Asn Leu Lys Val Asn Asp Asp Tyr Leu 1570 1575 1580	4749
atc tgg ggt tcc agg agt gac ctg ttg ccc acg aaa gat aaa att tcc Ile Trp Gly Ser Arg Ser Asp Leu Leu Pro Thr Lys Asp Lys Ile Ser 1585 1590 1595	4797
tac atc att aca aag aac aca tgg att gag aga tgg cca cat gaa gac Tyr Ile Ile Thr Lys Asn Thr Trp Ile Glu Arg Trp Pro His Glu Asp 1600 1605 1610	4845
gaa tgt cag gaa gaa gaa ttc caa aag ttg tgt gat gac ttt gct cag Glu Cys Gln Glu Glu Glu Phe Gln Lys Leu Cys Asp Asp Phe Ala Gln 1615 1620 1625 1630	4893
ttt agc tac aca ttg act gag ttt ggc tgc cct act a agttcagaag Phe Ser Tyr Thr Leu Thr Glu Phe Gly Cys Pro Thr 1635 1640	4940
aatcaatgat aggaaggaaa ttctcagaag acagatTTTT gagccaatgc atatatgtta	5000
ctttgcctct tgatctttta gttttatgtc aatttgctct gttatTTTcc cttaaattgt	5060
ttatacataa aataaataat cgatttctta ctttgatatg ttcttgattt ttaataaaca	5120
atggtgattc atgattatTT ttttcttctt ctgatccgtc caatatttga agtgctctga	5180
acagagcact tatggagtaa tgTTTTagtg atggatgaat aagttggtga gtcaatatta	5240
tcaggcccta tatactctta tggaagatcg atttgtaccc aaagaaacat agattgaaat	5300
gtgttacttt gaaaacagag gtttcagttg tatatgttta cacttgata caatcttaac	5360
tcttaataaaa cactgatctc agaacattta acagctgcta ttaataatg acaaaatatt	5420
ctttgactgc acccacagaa aacattgcat tacattagaa tgggttttat cagatgacta	5480
agtctgctag acttgccatc tgtcaaaatg tgctcttcc ccagctcaa ctttaaggat	5540
agtaactaat agatgttctc tcattggctc ctgacagagg tgtggtagcc actgagtttc	5600
cctggatgac actagaagct ggcagcacac tgcagcctgg tggagggggc ctcttttgct	5660
atcccatgag cttctattca tcctcttata tgttgggatg gggatgggac gtctctgatt	5720
ttccaggat acaggtgatc tcatttacta acatcaccac taacttcaag gattggttga	5780
ggggttatgc caatgtgatt gaagggtttc acccatgtga atctattctc caatcccaat	5840
gctgtatcta tgctgctcat ttctgcttgt aaaaatggta taaaagaat aaacactgcc	5900
caggcagtca gacatctttg gacactg	5927

<210> 4
 <211> 1642
 <212> PRT
 <213> Naja kaouthia

 <400> 4
 Met Glu Arg Met Ala Leu Tyr Leu Val Ala Ala Leu Leu Ile Gly Phe
 1 5 10 15

 Pro Gly Ser Ser His Gly Ala Leu Tyr Thr Leu Ile Thr Pro Ala Val
 20 25 30

 Leu Arg Thr Asp Thr Glu Glu Gln Ile Leu Val Glu Ala His Gly Asp
 35 40 45

 Ser Thr Pro Lys Gln Leu Asp Ile Phe Val His Asp Phe Pro Arg Lys
 50 55 60

 Gln Lys Thr Leu Phe Gln Thr Arg Val Asp Met Asn Pro Ala Gly Gly
 65 70 75 80

 Met Leu Val Thr Pro Thr Ile Glu Ile Pro Ala Lys Glu Val Ser Thr
 85 90 95

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

 Val Arg Leu Glu Lys Val Val Leu Leu Ser Tyr Gln Ser Ser Phe Leu
 115 120 125

 Phe Ile Gln Thr Asp Lys Gly Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Pro Val Leu
 130 135 140

 Tyr Arg Val Phe Ser Met Asp His Asn Thr Ser Lys Met Asn Lys Thr
 145 150 155 160

 Val Ile Val Glu Phe Gln Thr Pro Glu Gly Ile Leu Val Ser Ser Asn
 165 170 175

 Ser Val Asp Leu Asn Phe Phe Trp Pro Tyr Asn Leu Pro Asp Leu Val
 180 185 190

 Ser Leu Gly Thr Trp Arg Ile Val Ala Lys Tyr Glu His Ser Pro Glu
 195 200 205

 Asn Tyr Thr Ala Tyr Phe Asp Val Arg Lys Tyr Val Leu Pro Ser Phe
 210 215 220

 Glu Val Arg Leu Gln Pro Ser Glu Lys Phe Phe Tyr Ile Asp Gly Asn
 225 230 235 240

Glu Asn Phe His Val Ser Ile Thr Ala Arg Tyr Leu Tyr Gly Glu Glu
 245 250 255
 Val Glu Gly Val Ala Phe Val Leu Phe Gly Val Lys Ile Asp Asp Ala
 260 265 270
 Lys Lys Ser Ile Pro Asp Ser Leu Thr Arg Ile Pro Ile Ile Asp Gly
 275 280 285
 Asp Gly Lys Ala Thr Leu Lys Arg Asp Thr Phe Arg Ser Arg Phe Pro
 290 295 300
 Asn Leu Asn Glu Leu Val Gly His Thr Leu Tyr Ala Ser Val Thr Val
 305 310 315 320
 Met Thr Glu Ser Gly Ser Asp Met Val Val Thr Glu Gln Ser Gly Ile
 325 330 335
 His Ile Val Ala Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys
 340 345 350
 Tyr Phe Lys Pro Gly Met Pro Tyr Glu Leu Thr Val Tyr Val Thr Asn
 355 360 365
 Pro Asp Gly Ser Pro Ala Ala His Val Pro Val Val Ser Glu Ala Phe
 370 375 380
 His Ser Met Gly Thr Thr Leu Ser Asp Gly Thr Ala Lys Leu Ile Leu
 385 390 395 400
 Asn Ile Pro Leu Asn Ala Gln Ser Leu Pro Ile Thr Val Arg Thr Asn
 405 410 415
 His Gly Asp Leu Pro Arg Glu Arg Gln Ala Thr Lys Ser Met Thr Ala
 420 425 430
 Ile Ala Tyr Gln Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Leu His Val Ala
 435 440 445
 Ile Thr Ser Thr Glu Ile Lys Pro Gly Asp Asn Leu Pro Val Asn Phe
 450 455 460
 Asn Val Lys Gly Asn Ala Asn Ser Leu Lys Gln Ile Lys Tyr Phe Thr
 465 470 475 480
 Tyr Leu Ile Leu Asn Lys Gly Lys Ile Phe Lys Val Gly Arg Gln Pro
 485 490 495
 Arg Arg Asp Gly Gln Asn Leu Val Thr Met Asn Leu His Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asp Leu Ile Pro Ser Phe Arg Phe Val Ala Tyr Tyr Gln Val Gly Asn

515	520	525
Asn Glu Ile Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Thr Cys		
530	535	540
Met Gly Thr Leu Val Val Lys Gly Asp Asn Leu Ile Gln Met Pro Gly		
545	550	555 560
Ala Ala Met Lys Ile Lys Leu Glu Gly Asp Pro Gly Ala Arg Val Gly		
	565	570 575
Leu Val Ala Val Asp Lys Ala Val Tyr Val Leu Asn Asp Lys Tyr Lys		
	580	585 590
Ile Ser Gln Ala Lys Ile Trp Asp Thr Ile Glu Lys Ser Asp Phe Gly		
	595	600 605
Cys Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn Asn Leu Gly Val Phe Glu Asp Ala		
	610	615 620
Gly Leu Ala Leu Thr Thr Ser Thr Asn Leu Asn Thr Lys Gln Arg Ser		
	625	630 635 640
Ala Ala Lys Cys Pro Gln Pro Ala Asn Arg Arg Arg Arg Ser Ser Val		
	645	650 655
Leu Leu Leu Asp Ser Asn Ala Ser Lys Ala Ala Glu Phe Gln Asp Gln		
	660	665 670
Asp Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Val Met His Glu Asn Pro Met Gly		
	675	680 685
Tyr Thr Cys Glu Lys Arg Ala Lys Tyr Ile Gln Glu Gly Asp Ala Cys		
	690	695 700
Lys Ala Ala Phe Leu Glu Cys Cys Arg Tyr Ile Lys Gly Val Arg Asp		
	705	710 715 720
Glu Asn Gln Arg Glu Ser Glu Leu Phe Leu Ala Arg Asp Asp Asn Glu		
	725	730 735
Asp Gly Phe Ile Ala Asp Ser Asp Ile Ile Ser Arg Ser Asp Phe Pro		
	740	745 750
Lys Ser Trp Leu Trp Leu Thr Lys Asp Leu Thr Glu Glu Pro Asn Ser		
	755	760 765
Gln Gly Ile Ser Ser Lys Thr Met Ser Phe Tyr Leu Arg Asp Ser Ile		
	770	775 780
Thr Thr Trp Val Val Leu Ala Val Ser Phe Thr Pro Thr Lys Gly Ile		
	785	790 795 800

Cys Val Ala Glu Pro Tyr Glu Ile Arg Val Met Lys Val Phe Phe Ile
 805 810 815
 Asp Leu Gln Met Pro Tyr Ser Val Val Lys Asn Glu Gln Val Glu Ile
 820 825 830
 Arg Ala Ile Leu His Asn Tyr Val Asn Glu Asp Ile Tyr Val Arg Val
 835 840 845
 Glu Leu Leu Tyr Asn Pro Ala Phe Cys Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gln
 850 855 860
 Arg Tyr Arg Gln Gln Phe Pro Ile Lys Ala Leu Ser Ser Arg Ala Val
 865 870 875 880
 Pro Phe Val Ile Val Pro Leu Glu Gln Gly Leu His Asp Val Glu Ile
 885 890 895
 Lys Ala Ser Val Gln Glu Ala Leu Trp Ser Asp Gly Val Arg Lys Lys
 900 905 910
 Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Val Gln Lys Ser Ile Val Thr Ile Val
 915 920 925
 Lys Leu Asp Pro Arg Ala Lys Gly Val Gly Gly Thr Gln Leu Glu Val
 930 935 940
 Ile Lys Ala Arg Lys Leu Asp Asp Arg Val Pro Asp Thr Glu Ile Glu
 945 950 955 960
 Thr Lys Ile Ile Ile Gln Gly Asp Pro Val Ala Gln Ile Ile Glu Asn
 965 970 975
 Ser Ile Asp Gly Ser Lys Leu Asn His Leu Ile Ile Thr Pro Ser Gly
 980 985 990
 Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Arg Met Ala Ala Pro Val Ile Ala Thr
 995 1000 1005
 Tyr Tyr Leu Asp Thr Thr Glu Gln Trp Glu Thr Leu Gly Ile Asn Arg
 1010 1015 1020
 Arg Thr Glu Ala Val Asn Gln Ile Val Thr Gly Tyr Ala Gln Gln Met
 1025 1030 1035 1040
 Val Tyr Lys Lys Ala Asp His Ser Tyr Ala Ala Phe Thr Asn Arg Ala
 1045 1050 1055
 Ser Ser Ser Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ala Met Ala
 1060 1065 1070
 Ala Lys Met Val Ala Gly Ile Ser His Glu Ile Ile Cys Gly Gly Val

1075	1080	1085
Arg Trp Leu Ile Leu Asn Arg Gln Gln Pro Asp Gly Ala Phe Lys Glu		
1090	1095	1100
Asn Ala Pro Val Leu Ser Gly Thr Met Gln Gly Gly Ile Gln Gly Ala		
1105	1110	1115 1120
Glu Glu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Phe Ile Leu Val Ala Leu Leu Glu		
1125	1130	1135
Ser Lys Thr Ile Cys Asn Asp Tyr Val Asn Ser Leu Asp Ser Ser Ile		
1140	1145	1150
Lys Lys Ala Thr Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Tyr Glu Lys Leu Gln Arg		
1155	1160	1165
Pro Tyr Thr Thr Ala Leu Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Ala Ala Asp Gln		
1170	1175	1180
Leu Asn Asp Asp Arg Val Leu Met Ala Ala Ser Thr Gly Arg Asp His		
1185	1190	1195 1200
Trp Glu Glu Tyr Asn Ala His Thr His Asn Ile Glu Gly Thr Ser Tyr		
1205	1210	1215
Ala Leu Leu Ala Leu Leu Lys Met Lys Lys Phe Asp Gln Thr Gly Pro		
1220	1225	1230
Ile Val Arg Trp Leu Thr Asp Gln Asn Phe Tyr Gly Glu Thr Tyr Gly		
1235	1240	1245
Gln Thr Gln Ala Thr Val Met Ala Phe Gln Ala Leu Ala Glu Tyr Glu		
1250	1255	1260
Ile Gln Met Pro Thr His Lys Asp Leu Asn Leu Asp Ile Thr Ile Glu		
1265	1270	1275 1280
Leu Pro Asp Arg Glu Val Pro Ile Arg Tyr Arg Ile Asn Tyr Glu Asn		
1285	1290	1295
Ala Leu Leu Ala Arg Thr Val Glu Thr Lys Leu Asn Gln Asp Ile Thr		
1300	1305	1310
Val Thr Ala Ser Gly Asp Gly Lys Ala Thr Met Thr Ile Leu Thr Phe		
1315	1320	1325
Tyr Asn Ala Gln Leu Gln Glu Lys Ala Asn Val Cys Asn Lys Phe His		
1330	1335	1340
Leu Asn Val Ser Val Glu Asn Ile His Leu Asn Ala Met Gly Ala Lys		
1345	1350	1355 1360

Gly Ala Leu Met Leu Lys Ile Cys Thr Arg Tyr Leu Gly Glu Val Asp
1365 1370 1375

Ser Thr Met Thr Ile Ile Asp Ile Ser Met Leu Thr Gly Phe Leu Pro
1380 1385 1390

Asp Ala Glu Asp Leu Thr Arg Leu Ser Lys Gly Val Asp Arg Tyr Ile
1395 1400 1405

Ser Arg Tyr Glu Val Asp Asn Asn Met Ala Gln Lys Val Ala Val Ile
1410 1415 1420

Ile Tyr Leu Asn Lys Val Ser His Ser Glu Asp Glu Cys Leu His Phe
1425 1430 1435 1440

Lys Ile Leu Lys His Phe Glu Val Gly Phe Ile Gln Pro Gly Ser Val
1445 1450 1455

Lys Val Tyr Ser Tyr Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Cys Thr Lys Phe Tyr
1460 1465 1470

His Pro Asp Lys Gly Thr Gly Leu Leu Asn Lys Ile Cys Ile Gly Asn
1475 1480 1485

Val Cys Arg Cys Ala Gly Glu Thr Cys Ser Ser Leu Asn His Gln Glu
1490 1495 1500

Arg Ile Asp Val Pro Leu Gln Ile Glu Lys Ala Cys Glu Thr Asn Val
1505 1510 1515 1520

Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Lys Leu Leu Arg Ile Glu Glu Gln Asp Gly
1525 1530 1535

Asn Asp Ile Tyr Val Met Asp Val Leu Glu Val Ile Lys Gln Gly Thr
1540 1545 1550

Asp Glu Asn Pro Arg Ala Lys Thr His Gln Tyr Ile Ser Gln Arg Lys
1555 1560 1565

Cys Gln Glu Ala Leu Asn Leu Lys Val Asn Asp Asp Tyr Leu Ile Trp
1570 1575 1580

Gly Ser Arg Ser Asp Leu Leu Pro Thr Lys Asp Lys Ile Ser Tyr Ile
1585 1590 1595 1600

Ile Thr Lys Asn Thr Trp Ile Glu Arg Trp Pro His Glu Asp Glu Cys
1605 1610 1615

Gln Glu Glu Glu Phe Gln Lys Leu Cys Asp Asp Phe Ala Gln Phe Ser
1620 1625 1630

Tyr Thr Leu Thr Glu Phe Gly Cys Pro Thr
1635 1640

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Vector coded sequence.

<400> 5
 Arg Ser Pro Trp Pro Gly Val Pro Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser
 1 5 10 15

Ala Asp Ala

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer HC3H5-1.

<400> 6
 ggatgccact atgtctatat tggacatata c 31

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer HC3H5-2.

<400> 7
 tcttctattc gaaccagtcg ggtcttgtac 30

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer HuC3H5-3.

<400> 8
gtacaagacc cgactgggtc gaatagaaga acaag 35

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HuC3H5-4.

<400> 9
tatcatgtaa gcggccgcgt ataaacaatt taaggg 36

<210> 10
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HC3SigRemF.

<400> 10
agatctccat ggaagcttag cgctgggagt cccatgtact ctatcatc 48

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HC3SigRemR.

<400> 11
gcgtcccgcc ttcaacagcc 20

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HC3H5-3-F1.

<400> 12
tctgtgtggc agaccccttc gagg 24

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HC3H5-5-R1.

<400> 13
cgttaccaat acatatcttg ttcagctttc catcc 35

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HuCC3H5-3-F2.

<400> 14
ggatggaaag ctgaacaaga tatgtattgg taacg 35

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer HuC3H5-3-R2.

<400> 15
catccatgac atagatatca ttaccatctt g 31

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HuC3H5-5-1R.

<400> 16
gcaactgtgc gttatacatt gtcaccaccg ac 32

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HuC3H5-5-2F.

<400> 17
gtcgggtggtg acaatgtata acgcacagtt gc 32

<210> 18
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC3H5-4-R1.

<400> 18
gagaaggcct gttcctttat ccggatggta gaaccgggta c 41

<210> 19
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HCC3H5-4-F2.

<400> 19
ccggttctac catccggata aaggaacagg ccttc 35

<210> 20
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HC3H5-3-R2.

<400> 20
catccatgac atagatatca ttaccatctt g 31

<210> 21
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HuC3H5-F1.

<400> 21
ggatgccact atgtctatat tggacatata c 31

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HuC3H5-2R1.

<400> 22
cccgatgatg tagctgagtt tatctttcgt ggg 33

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HuC3H5-2F2.

<400> 23
cccacgaaag ataaactcag ctacatcatc ggg 33

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HuC3H5-2-R2.

<400> 24

aattggagct ccaccgcggt gg

22