



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년02월18일
 (11) 등록번호 10-0884487
 (24) 등록일자 2009년02월12일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/56 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2001-0044918
 (22) 출원일자 2001년07월25일
 심사청구일자 2006년07월25일
 (65) 공개번호 10-2002-0010512
 (43) 공개일자 2002년02월04일
 (30) 우선권주장
 10036641.4 2000년07월26일 독일(DE)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 DE19903693 A
 Molecular Plant Pathology, 1(3),
 169-178(2000.05.)

(73) 특허권자
체에스엘 베링 게엠베하
 독일 데-35041 마르부르크/란 에밀-폰-베링-슈트
 라체 76
 (72) 발명자
뢰미슈위르겐
 독일데-35041마르부르크쉴하이젠베르크8
스퇴어한스-아르놀트
 독일데-35083벳터슐슈트라세66
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
이병호, 장훈

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 허주형

(54) 인자 VII-활성화 프로테아제의 돌연변이체 및 특이적 항체를 포함하는 진단학적 조성물

(57) 요약

본원에는 혈액 응고인자 VII과 단쇄 플라스미노젠 활성화 인자를 활성화시키는 프로테아제(FSAP)를 암호화하는 DNA 서열의 돌연변이체로서, 뉴클레오타이드 위치 1177에서의 G/C 염기 치환 및/또는 뉴클레오타이드 위치 1601에서의 G/A 염기 치환을 포함하는 돌연변이체가 기재되어 있다. 상응하는 프로테아제는 아미노산 위치 393에서의 Glu/Gln 치환 및/또는 아미노산 위치 534에서의 Gly/Glu 치환을 갖는다. 게다가, 체액 또는 조직 세포에서 FSAP를 검출하고 또한 유전자 이중접합 또는 동중접합 FSAP가 발현된 환자를 확인하는 데 사용되는 진단방법이 기재되어 있다. 또한, FSAP 및 이의 돌연변이체에 대한 항체가 기재되어 있으며, FSAP 및 이의 돌연변이체에 대한 항체를 검출하는 데 사용할 수 있는 진단방법이 명시되어 있다.

(72) 발명자

포이쓰너안네테

독일테-35043마르부르크랑게비젠백10

랑비간트

독일테-35091켈베아카친백2

바이머토마스

독일테-35075글라텐바흐리하르트-바그너-슈트라쎈8

벡커마르그레트

독일테-35043마르부르크임펠트헨13

네를리히클라우디아

독일테-35041마르부르크부헨백3

무트-나우만구드룬

독일테-35083벳터탈블릭2

(30) 우선권주장

10050040.4 2000년10월10일 독일(DE)

10052319.6 2000년10월21일 독일(DE)

10118706.8 2001년04월12일 독일(DE)

특허청구의 범위

청구항 1

인자 VII 활성화 프로테아제(FSAP)를 암호화하는 서열목록의 서열번호 1의 DNA 서열 중에서 위치 1601에서의 G/A 염기 치환에 의해 변형된, FSAP를 암호화하는 서열목록의 서열번호 1의 DNA 서열의 돌연변이된 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 위치 1177에서의 G/C 염기 치환을 추가로 포함하는 돌연변이된 유전자.

청구항 3

서열목록의 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열 중에서 아미노산 위치 534에서의 Gly/Glu 치환에 의해 변형된, 서열목록의 서열번호 3의 폴리펩타이드 서열의 돌연변이된 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 아미노산 위치 393에서의 Glu/Gln 치환을 추가로 포함하는 돌연변이된 단백질.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 따르는 FSAP의 돌연변이된 단백질에 대한 항체를 포함하는, 당해 FSAP의 돌연변이된 단백질이 유전자 이종접합 또는 동종접합적으로 발현되는 환자를 확인하기 위한 진단학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제3항 또는 제4항에 따르는 FSAP의 돌연변이된 단백질에 대해 특이적으로 유도되는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체.

청구항 8

제7항에서 청구한 항체를 포함하는, FSAP의 돌연변이된 단백질을 검출하기 위한 진단학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제8항에 있어서, 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역조직학 또는 형광 표지 세포 분류(FACS)로 돌연변이된 단백질을 검출하기 위한 진단학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

(a) 제3항 또는 제4항에 따르는 FSAP의 돌연변이된 단백질에 대해 특이적으로 유도되는 하나 이상의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 지지체에 고정시키는 단계,

(b) 면역흡착제를 제3항 또는 제4항에서 청구한 프로테아제의 돌연변이된 단백질을 함유하는 샘플과 함께 항온 처리하는 단계, 및

(c) 세척 후에 용출시켜 상기 돌연변이된 단백질을 수득하는 단계

를 포함하여, 제3항 또는 제4항에서 청구한 프로테아제의 돌연변이된 단백질을 분리하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 프로테아제의 돌연변이된 단백질이 재조합, 유전자전이(transgenic) 발현, 또는 이들 둘 다에 의해 발현됨을 특징으로 하는 프로테아제의 돌연변이된 단백질을 분리하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 프로테아제의 돌연변이된 단백질이 체액, 세포 배양 상등액 및 유전자전이(transgenic)된 동물의 체액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 공급원으로부터 수득됨을 특징으로 하는 프로테아제의 돌연변이된 단백질을 분리하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

하이브리도마 세포주 DSM ACC2453 또는 하이브리도마 세포주 DSM ACC2454에 의해 생성된, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제에 대한 모노클로날 항체.

청구항 18

제17항에서 청구한 모노클로날 항체, 이의 Fab 또는 이의 F(ab')₂ 단편을 사용하여, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 정제하는 방법.

청구항 19

고체 지지체 상에 고정된 인자 VII-활성화 프로테아제(FSAP), 제3항 또는 제4항에 따른 FSAP의 돌연변이된 단백질 또는 상기 FSAP 및 FSAP의 돌연변이된 단백질 둘 다를 포함하는, 상기 FSAP, FSAP의 돌연변이된 단백질 또는 이들 둘 다에 대한 항체를 검출하기 위한 진단학적 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제8항에 있어서, 내분비 기관으로부터 채취되는 조직 샘플을 시험하기 위해 사용되는 진단학적 조성물.

청구항 27

제8항에 있어서, 항체가 하이브리도마 세포주 DSM ACC2453 또는 DSM ACC2454의 표지된 모노클로날 항체인 진단학적 조성물.

청구항 28

제17항에서 청구한 모노클로날 항체, 이의 Fab 또는 이의 F(ab')₂ 단편을 사용하여, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 검출하는 방법.

청구항 29

제17항에서 청구한 모노클로날 항체, 이의 Fab 또는 이의 F(ab')₂ 단편을 사용하여, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 효소 전구체의 활성을 측정하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <1> 본 발명은 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제(FSAP)의 돌연변이체, 단백질 수준 및 RNA/DNA 수준에서 또는 조직 샘플 중에서 FSAP 및 이의 돌연변이체를 검출하는 방법, 및 당해 검출방법을 위한 특이적 항체에 관한 것이다.
- <2> 독일 특허원 제199 03 693.4호에는 혈장으로부터 분리된, 응고인자 VII를 활성화시킬 수 있는 프로테아제가 이미 기재되어 있다. 이러한 최초의 발견 때문에 당해 프로테아제는 인자 VII-활성화 프로테아제(FSAP)로서 나타난다. 상세한 연구에서 FSAP는 또한 단쇄 플라스미노겐 활성화 인자, 예를 들면, 프로우로키나제 또는 단쇄 조직 플라스미노겐 활성화 인자(sct-PA)의 강력한 활성화 인자인 것으로 나타났다. 이들 특성 때문에 FSAP의 가능한 용도, 예를 들면, FVII 활성화 보조 응고 촉진을 근거로 한 응집 증진제로서의 용도가 기재되어 있다. 또한, FSAP는 예를 들면, 혈전 합병증의 경우, 섬유소용해(fibrinolysis)를 위해 단독으로 또는 플라스미노겐 활성화 인자와 혼합되어 사용할 수 있다.
- <3> 독일 특허원 제199 03 693.4호 및 제199 26 531.3호에 기재된 바와 같이, 프로테아제 검출 검정이 개발되어, 예를 들면, 혈장 중의 FSAP 항원 함량 및 이의 활성 둘다를 정량할 수 있다. 이와 관련하여, 항원 측정은 바람직하게는 ELISA 검정으로 수행한다. 독일 특허원 제199 26 531.3호에 기재된 바와 같이, FSAP 활성은 프로우로키나제의 우로키나제로의 활성화 및 우로키나제와 발색성 기질과의 반응 후 흡광 차이 측정을 정량화하여 측정할 수 있다. 놀랍게도, 당해 활성 검정 동안, 예를 들면, 혈장으로부터 분리된 FSAP 효소 전구체는 선택된 항온처리 조건하에 활성화되어 프로우로키나제의 활성화를 가능하게 한다는 사실이 밝혀졌다. 보다 최근의 연구에 의하면, FSAP는 자기 활성화에 의해 활성 형태로 전환되어, 예를 들면, 프로우로키나제 또는 FVII를 활성화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이것은 상기 항온처리 조건, 즉 중성 내지 알칼리성 pH, 칼슘 이온 및 헤파린에 의해 추가로 지원된다. 게다가, 가장 최근의 결과에 의하면 프로우로키나제/우로키나제(또는 단쇄 및 이중 쇠 tPA) 자체가 단쇄 FSAP의 활성화를 유도하거나 이를 보조함이 시사되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <4> 본 발명에서는 FSAP의 돌연변이체, 단백질 수준 및 RNA/DNA 수준에서 또는 조직 샘플 중에서 FSAP 및 이의 돌연변이체를 검출하는 방법 및 이를 위한 특이적 항체를 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

- <5> 상기 두 가지 검정 시스템, 즉 ELISA 및 프로우로키나제 활성화 검정을 사용하여, 180명 이상의 건강한 혈액 제공자의 혈장을 연구하였다. 모든 샘플의 5 내지 10%가 (100명 이상의 건강한 혈액 제공자의) 혈장 풀(pool) 또

는 전체 시험 그룹의 평균에 비해, FSAP-영향받는 프로우로키나제 활성화 가능성이 현저하게 감소되는 것으로 밝혀졌다.

- <6> 대조적으로, (감소된 활성을 갖는) 대부분의 상기 제공자에게서 평균 FSAP 항원 값이 측정되었다. 따라서, 연구한 혈액 샘플에서, 활성을 감소시키거나 없애는 한 가지 이상의 FSAP 변형이 존재할 수 있는 것으로 추측된다. 그 이유는 독일 특허원 제199 26 531.3호에서 이미 추측된 바와 같이, FSAP 구조의 집단의 다형성 (polymorphism), 즉 하나 이상의 돌연변이체(이는 FSAP 아미노산 서열의 변형으로 나타난다)일 수 있다. 연구한 모든 혈액 제공자의 평균 값보다 일반적으로 50 내지 70% 낮은 활성은 이종접합 돌연변이체를 나타낸다. 수득된 표현형은 혈장 중에 두 가지 FSAP, 즉 야생형 FSAP 및 돌연변이 변이체가 아마도 동일하게 존재할 수 있다. 돌연변이된 변이체가 프로우로키나제를 활성화시키는 특성을 (거의) 완전히 잃었다고 가정하면, 평균 약 절반의 활성이 측정될 것이다. 그러나, 또한 다른 단백질의 이종접합 돌연변이체의 가동종접합 (pseudohomozygous) 징후도 기재되어 있으며, 여기서 그 자체는 적합하게 검출된 생물학적 특성의 일부가 단지 소실된 돌연변이된 단백질만이 검출가능하였다.
- <7> 알려지지 않은 잠재적 보조인자(cofactor)의 결핍 또는 감소가 검출된 FSAP 활성 감소의 원인이라는 사실을 배제하기 위해, 제공된 샘플이 반복적으로 유의하게 감소된 활성을 나타내는 3명의 제공자의 FSAP 샘플을 정제한다. 고도로 정제된 단백질도 마찬가지로 혈장 풀로부터 정제된 FSAP에 비해 현저하게 감소된 활성을 나타낸다. 이것은 보조인자 영향의 가능성을 감소시키고 상기 의미의 단백질 변형의 가능성을 증가시킨다. 인자 VII 활성화에 대한 잠재력이 명백히 감소되지 않는다는 것은 놀라운 결과이다. 이 때문에, 독일 특허원 제199 03 693.4 호에 기재된 바와 같이, 이러한 유형의 돌연변이체는 이들의 섬유소용해 가능성이 명백히 제한되어 있기 때문에 응고 증진제로서 상기 용도에 특히 적합하다. 상기 돌연변이체는 하기 뉴클레오타이드 서열 변형의 발견을 근거로 재조합에 의해 또는 유전자전이(transgenic)에 의해 제조할 수 있다. 그러나, 이들은 상응하는 FSAP 단백질(단체 또는 이종체 FSAP)과 같이 또한 혈장과 같은 천연 공급원으로부터 직접 분리할 수 있다. 독일 특허원 제199 03 693.4호, 제199 37 219.5호 및 제199 37 218.7호에는, 독일 특허원 제100 36 641.4호에 상세하게 설명된 바와 같이, 바람직하게는 면역흡착을 이용하여 FSAP를 재조합을 포함하는 방법이 이미 기재되어 있다. 그러나, 공지되어 있기로는 이제까지 사용된 모노클로날 항체는 FSAP 야생형과 FSAP 돌연변이체를 구별하지 않는다. 따라서, 돌연변이체와 특이적으로 반응하는 모노클로날 항체만이 돌연변이체 제조에 사용될 수 있다. 돌연변이체로 면역화하여 항체를 수득할 수 있다. 또한, 공지된 방법에 따라 면역화하고 상응하는 항체를 생성시키기 위해 서열 목록의 서열번호 3의 아미노산 389 내지 397(...SFRVQKIFK...) 및/또는 534 내지 539(...EKRPVG...)에 상응하는 단백질 영역을 갖는 펩타이드를 사용할 수 있다. 게다가, 당해 항체는, 예를 들면, ELISA 웨스턴 블롯과 같은 검출방법, 면역조직학 또는 형광 표지 세포 분류(=FACS)에서의 시약으로서, 당해 돌연변이체를 특이적으로 검출하는 데에도 사용된다.
- <8> 또 한편, FSAP 야생형에 특이적이거나 야생형의 상응하는 아미노산 서열에 대해 유도되는, 예를 들면, 아미노산 서열 389 내지 397(...SFRVEKIFK...) 및/또는 아미노산 서열 534 내지 539(...GKRPGV...)에 대해 유도되는 항체를, FSAP 활성의 예방학적 또는 치료학적 억제를 위한 약제로서 특히 인체적용 형태로 사용하여, 예를 들면, 출혈을 일으키는 과섬유소용해(hyperfibrinolysis)를 방해할 수 있다. 또한, 상기 방식으로 야생형 FSAP의 정제, 검출 및 구별을 위해 당해 항체를 사용할 수도 있다.
- <9> 유전자 FSAP 서열은 공지된 cDNA 서열(Choi-Miura, 수탁번호 제S 83182호)과 비교하여 수탁번호 제AC 006097호 하에 유전자 은행에서 확인되었고 인트론 및 엑손 서열이 당해 방법에서 유도되었다. 총 12개의 프라이머 쌍을 디자인하여 각각의 측면 인트론 서열의 작은 부분과 함께 특이적 PCR 반응에서 암호화 서열을 증폭시킬 수 있다.
- <10> 먼저, 활성이 감소된 2명의 피험자의 혈액 및 정상 프로우로키나제 활성을 갖는 4명의 피험자로부터의 게놈성 DNA를 분리하고 모든 프라이머 쌍을 사용하여 증폭시킨 후, DNA 서열을 PCR 프라이머를 사용하여 측정한다. 결과는 표 1에 나타내었다. 암호화 영역의 총 4개의 뉴클레오타이드 위치는 다형성이다. 즉 이들 위치에서 2개의 염기가 동시에 검출된다. 따라서, 이들 경우는 이종접합으로 하나의 야생형 및 하나의 돌연변이체 대립유전자를 갖는다고 추측할 수 있다. 이들 중 2개(위치 183 및 957)는 아미노산 치환이 일어나지 않는 제3 염기 치환이다. 프로우로키나제 활성이 감소된 피험자의 DNA에서만 발견되는 나머지 2개는 표 1에 나타낸 바와 같은 아미노산 치환을 유도한다.

표 1a

뉴클레오타이드 위치*에서의 DNA 서열					
피험자 번호	ProUK 활성	183	957	1177	1601
S83182		T	G	G	G
9689	정상	T/C	G	G	G
9690	정상	T/C	G	G	G
9704	정상	T	G/A	G	G
9706	정상	T	G/A	G	G
9714	감소	T	G	G/C	G/A
9715	감소	T	G	G/C	G/A

* 여기서 1은 출발 코돈의 A이다

<11>

표 1b

위치*에서의 아미노산					
피험자 번호	ProUK 활성	NT*183	NT:957	NT:1177	NT: 1601
		AA* 61	AA: 319	AA:393	AA:534
S83182		His	Lys	Glu	Gly
9689	정상	His	Lys	Glu	Gly
9690	정상	His	Lys	Glu	Gly
9704	정상	His	Lys	Glu	Gly
9706	정상	His	Lys	Glu	Gly
9714	감소	His	Lys	Glu/Gln	Gly/Glu
9715	감소	His	Lys	Glu/Gln	Gly/Glu

*NT - 뉴클레오타이드 위치; AA - 아미노산 위치

<12>

<13>

감소된 프로우로키나제 활성을 갖는 2개의 돌연변이체의 상호연관성을 연구하기 위해 또 다른 개체의 DNA를 이들 위치에서 서열화한다. 결과는 표 2에 요약되어 있다. 감소된 프로우로키나제 활성을 갖는 총 6명의 피험자는 뉴클레오타이드 위치 1601(Gly-Glu 치환)에서 이중접합이고 4명은 위치 1177(Glu-Gln 치환)에서 추가로 이중접합이다. 정상 프로우로키나제 활성 또는 아래쪽 정상 범위의 프로우로키나제 활성을 갖는 총 11명의 피험자 중 아무도 상기 이중접합성을 갖지 않는다. 이 결과는 적어도 아미노산 위치 534에서의 치환이 감소된 프로우로키나제 활성과 원인상 연관되어 있음을 제시한다. 위치 393에서의 아미노산 치환만이 프로우로키나제 활성 감소를 유도할 수 있는지의 여부는 현재 아직 불확실하다.

표 2

뉴클레오타이드 위치에서의 DNA 서열			
피험자 번호	ProUK 활성	1177	1601
9714	낮음	C/G	A/G
9715	낮음	C/G	A/G
9802	낮음	C/G	A/G
10032	낮음	G	A/G
10039	낮음	C/G	A/G
10047	낮음	G	A/G
9698	아래쪽 정상범위	G	G
9702	아래쪽 정상범위	G	G
9711	아래쪽 정상범위	G	G
9712	아래쪽 정상범위	G	G
10038	아래쪽 정상범위	G	G
9689	정상	G	G
9690	정상	G	G
9704	정상	G	G
9706	정상	G	G
9803	정상	G	G
10043	정상	G	G

- <14>
- <15> 따라서, 본 발명은 혈액 응고인자 VII과 단쇄 플라스미노겐 활성화 인자를 활성화시키는 프로테아제(FSAP)를 암호화하는 DNA 서열의 돌연변이체로서, 뉴클레오타이드 위치 1177에서의 G/C 염기 치환 및/또는 뉴클레오타이드 위치 1601에서의 G/A 염기 치환을 포함하는 돌연변이체에 관한 것이다.
- <16> 첨부된 서열 목록의 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열은 야생형 서열을 나타낸다. 뉴클레오타이드 위치 1177 및 1601에서의 2개의 치환을 갖는 돌연변이체의 DNA 서열이 서열 목록의 서열번호 2에 의해 기재되어 있다. 상응하는 야생형 아미노산 서열은 서열 목록의 서열번호 3에서 기재되어 있다. 서열번호 4은 2개의 아미노산 치환(Glu-Gln 393 및 Gly-Glu 534)을 갖는 돌연변이체 아미노산 서열을 나타낸다.
- <17> 서열 목록에 언급된 DNA 및 아미노산 서열의 검출은 유전자 이종접합 또는 동종접합 FSAP 발현을 갖는 환자를 확인하는 진단방법을 개발하기 위한 조건을 형성한다. 게놈성 DNA 또는 이로부터 유도된 mRNA 중 어느 하나에서 돌연변이체를 검출할 수 있다. 그러나, 또한 변형된 아미노산 서열을 갖는 돌연변이체 또는 야생형에 대해 유도된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 사용하여 이들을 이들의 단백질 수준에서 성공적으로 검출할 수 있다.
- <18> 이에 의해, 이러한 목적에 적합한 항체를 제조하여 신뢰적인 진단방법 및 검정 시스템을 개발하는 것이 필요하다.
- <19> 따라서, 또한 본 발명은 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 및 이의 돌연변이체에 대한 모노클로날 항체에 관한 것이고, 또한 FSAP 및 이의 돌연변이체의 검출 및 활성 측정을 위한 이의 용도에 관한 것이다.
- <20> FSAP 항원 함량의 정량화 및 FSAP 활성의 측정 모두 가능한 검정 시스템, 예를 들면, 웨스턴 블롯 또는 효소 면역 검정(ELISA)은 본래 독일 특허원 제199 03 693.4호 및 제199 26 531.3호로부터 이미 공지되어 있다.
- <21> 상기 검정 시스템은 특이적 모노클로날 항체에 의한 FSAP의 결합 및/또는 검출을 기본으로 한다. 예를 들면 마우스의 면역화에 의해 특이적 모노클로날 항체의 발현과 관련하여 다수의 포지티브 클론을 동정할지라도, 종종 당해 클론 중 일부만이 상기 작업에 적합하다. 따라서, 이의 정제, 이의 정성 및 정량적 검출 및 이의 활성 측정 모두에 효과적으로 사용할 수 있는 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제에 대한 특이적 모노클로날 항체를 검출하는 것이 목적이다.
- <22> 본 발명자들은 이들 요건이 하이브리도마 세포주 DSM ACC2453 및 하이브리도마 세포주 DSM ACC2454에 의해 생성된, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제에 대한 모노클로날 항체에 의해 상당히 충족됨을 밝혔다.
- <23> 최근까지, FSAP는 이의 활성화 형태로 주로 정제되었다. 컬럼 크로마토그래피 기술과 같은 통상적인 제조방법

은 프로테아제의 신속한 활성화 및 이후의 불활성화를 유리하게 한다. 본 발명에 따르면, 본원에 이르러, 지지체에 상기 항체 중 하나를 커플링시키는 단계, 당해 항체를 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 함유하는 액체와 평형화시키는 단계 및 이어서, 세척 후 용출시켜 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 수득하는 단계에 의해, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 및 특히 이의 효소 전구체를 고수율로 정제할 수 있다.

- <24> 게다가, 상기 항체는
- <25> (a) 당해 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 함유하는 샘플을 본 발명의 제1 항체와 함께 항온처리하고, 고체 지지체에 고정시킨 다음, 세척 한 후, 표지된 본 발명의 제2 항체를 가하고, 다시 세척한 후, 제2 항체 또는 기타 모노클로날 또는 폴리클로날 항체에 의해 발생하는 시그널을 측정하거나,
- <26> (b) 시험할 샘플에 함유된 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를, 예를 들면, 프로테아제 또는 이의 효소 전구체에 대한 폴리클로날 항체에 의해 지지체에 고정시키고, 표지된 본 발명의 항체를 단독으로 또는 비표지된 본 발명의 항체와의 혼합물로서 사용하여 검출한 후, 모노클로날 항체를 검출하거나,
- <27> (c) 프로테아제 또는 이의 효소 전구체의 존재 여부를 시험하고자 하는 샘플을, 표지된 프로테아제 또는 이의 효소 전구체의 존재하에, 지지체에 고정된 본 발명의 항체에 가하고 표지에 의해 발생하는 시그널을 측정하는 면역 검정을 사용하여, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 검출하는 데 적합하다.
- <28> 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 효소 전구체를 검출하기 위한 또 다른 방법은 단독으로서의 또는 비표지된 본 발명의 항체와의 혼합물로서의 표지된 본 발명의 항체와 면역학적으로 반응시킨 후, 예를 들면, 표지된 단백질 A 또는 G에 의해 모노클로날 항체, 또는 모노클로날 항체에 대해 유도된 표지된 모노클로날 또는 폴리클로날을 검출함으로써 웨스턴 블롯 방법을 사용하여 검출하는 것이다.
- <29> 마지막으로, 본 발명의 항-프로테아제 모노클로날 항체가 미리 커플링된 고체 지지체에 프로테아제 및/또는 이의 효소 전구체를 함유하는 단백질 용액을 항온처리하고, 고체 지지체를 세척한 후, 이들의 활성을 측정할 수 있는 시약과 함께 당해 고체 지지체에 결합된 프로테아제 및 이의 효소 전구체를 항온처리하여, 단백질 용액 중의 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제 또는 이의 효소 전구체의 활성을 측정할 수도 있다. 이어서, 발색성 기질에 대한 작용으로 인해 나타나는 흡광을 측광법으로 측정함으로써 프로테아제 또는 이의 효소 전구체의 활성을 측정할 수 있다.
- <30> 프로테아제 또는 이의 효소 전구체의 활성을 측정하는 다른 방법은
- <31> - 혈액 응고인자 VIII/VIIIa 또는 V/Va를 불활성화시키는 작용,
- <32> - 글로벌 응고 검정(global clotting assay)에서의 혈액 응고 시간을 단축시키는 작용,
- <33> - 플라스미노겐 활성화 인자를 활성화시키는 작용 또는
- <34> - 혈액 응고인자 VII을 활성화시키는 작용을 측정하는 것이다.
- <35> 완전한 모노클로날 항체 및 이들의 단편(예를 들면, F(ab')₂ 또는 Fab) 모두 상기 방법에서 사용하기에 적합하다. 방사성 또는 형광 또는 효소 활성 물질로 표지한 후, 항체 또는 이들의 단편을 면역 검정 또는 웨스턴 블롯 검출방법에서 검출 보조제로서 사용한다. 마찬가지로 비표지된 모노클로날 항체 또는 단편을 사용할 수 있지만, 이 경우 예를 들면, 마우스 항체에 대해 유도된 표지된 항체 또는 이의 단편을 사용하여 검출 또는 고정화를 수행한다[샌드위치방법(sandwich method)]. 본 발명의 모노클로날 항체 또는 이들의 단편은 단독으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 이는 SDS 겔 전기영동이 샘플의 환원 조건하에 종종 수행되기 때문에 특히 웨스턴 블롯의 경우에 권장된다. 2개의 FSAP 폴리펩타이드 쇠가 단지 디설파이드 브릿지를 통해 서로 결합되어 있기 때문에, 환원되는 동안 분자가 2개의 쇠, 즉 중쇄와 경쇄로 분리되며, 전자는 DSM ACC2454의 모노클로날 항체에 의해 인식되고 후자는 DSM ACC2453에 의해 인식된다. 따라서, 두가지 쇠를 검출하기 위해 본 발명의 두가지 모노클로날 항체 또는 이들의 단편이 필요하다.
- <36> 본 발명에 따르는 모노클로날 항체는 다음과 같이 제조하며 다음과 같은 특징을 갖는다:
- <37> 면역화
- <38> 3마리 암컷 balb/c 마우스(생후 약 6주)를 FVII 활성화 인자로 면역화시킨다. 제1 주사액은 완전한 프루인트 애쥬반트(Freund's adjuvant) 0.2ml와 혼합된 항원(10 μ g) 0.2ml로 이루어진다. 이후 3회의 부스트 주사시(각각 2주일 간격으로) 항원(0.2ml 중의 20 μ g)을 애쥬반트없이 투여한다(모든 주사는 i.p.). 면역원을 PBS에 희석시

킨다. 마지막 주사 후, FVII 활성화 인자로 미세역가 플레이트를 도포하여 간접 ELISA에 의해 혈청 역가를 측정한다. 가장 높은 혈청 역가를 갖는 마우스를 선택하여 융합시킨다.

- <39> 융합(Fusion)
- <40> 최종 사용한지 약 3주 후에 항원을 3일 연속하여 투여한다(정맥내, 0.1ml 중의 10 μ g). 다음날(4일째), 마우스를 혈액 채취 후 희생시킨다. 비장을 제거하고 비장 세포를 분리한다. 이어서 비장 세포를 쥐 골수종 세포주 SP2/0-Ag 14와 융합시킨다. 융합 시약은 폴리에틸렌 글리콜 4000(Merck)이다. 본래의 코흘러/밀슈타인법(Kohler/Milstein method)의 변형을 사용하여 융합을 수행한다. 세포를 24웰 배양 플레이트 상에 분포시킨다. 사용한 배지는 선택을 위해 10% 태아소 혈청과 HAT를 포함하는 돌베코 변형 이글(Dulbecco mod. Eagle) 배지이다. 약 2주일 후, 성장한 세포 클론을 48웰 플레이트의 웰에 이동시키고 코드화한다.
- <41> 하이브리도마 스크리닝
- <42> 1728개의 성장한 클론으로부터 배양 상등액을 취하고 ELISA에 의해 마우스 IgG가 존재하는지 검정한다. 고정화 FVII 활성화 인자를 사용하여 마우스 IgG-포지티브 상등액의 특이성을 시험한다(ELISA). 검정한 세포주 중, 108개의 세포주를 FVII 활성화 인자에 대해 특이성을 갖는지 확인하고 동결 상태로 저장한다.
- <43> DSM ACC2453 및 DSM ACC2454로 나타낸 2개의 하이브리도마 세포주를 선택하여 추가로 연구한다. 당해 세포주에 의해 생성된 항체의 특이성을 BIACORE에 의해 확인하고 결합 동력학을 측정한다. 두 가지 모노클로날 항체는 IgG1형이다.
- <44> FSAP 야생형 및 이의 돌연변이체에 대한 상기 항체를 사용하여,
- <45> a) 고체 지지체에 고정된 제7항에서 청구한 제1 항체와 함께 돌연변이체를 함유할 수 있는 샘플을 항온처리한 후, 세척한 다음 표지된 제7항에서 청구한 제2 항체 또는 야생형에 대해 반응하는 표지된 항체를 가하고 다시 세척한 후, 제2 항체에 의해 발생하는 시그널을 측정하거나,
- <46> b) 고체 지지체에 고정되고 야생형에 대해 반응하는 제1 항체와 함께 돌연변이체를 함유할 수 있는 샘플을 항온처리한 후, 세척한 다음 표지된 제7항에서 청구한 제2 항체를 가하고 다시 세척한 후, 제2 항체에 의해 발생하는 시그널을 측정하거나,
- <47> c) 돌연변이체의 존재 여부를 시험하고자 하는 샘플을 지지체에 고정시키고 표지된 제7항에서 청구한 항체를 단독으로 또는 비표지된 항체와의 혼합물로서 사용하여 샘플을 검출한 후, 표지된 항체를 검출하거나,
- <48> d) 표지된 돌연변이체의 존재하에, 지지체에 고정된 제7항에서 청구한 항체에 돌연변이체의 존재 여부를 시험하고자 하는 샘플을 가한 후, 표지에 의해 발생하는 시그널을 측정하여 돌연변이체를 검출하기 위한 진단방법을 수행할 수 있다.
- <49> 제7항에서 청구한 항-프로테아제 항체가 미리 결합된 고체 지지체에 FSAP 함유 샘플을 항온처리하는 단계 및
- <50> 지지체를 세척한 후, 당해 지지체에 고정된 당해 프로테아제를 이의 활성을 측정할 수 있는 시약과 함께 항온처리하는 단계에 의해 FSAP 활성을 측정하는 진단방법이 바람직하다.
- <51> 이와 관련하여, 프로테아제 활성은 발색성 기질에 대한 작용 후에 나타나는 흡광을 측광법으로 측정할 수 있다.
- <52> 또한,
- <53> - 혈액 응고인자 VIII/VIIIa 또는 V/Va를 불활성화시키는 작용,
- <54> - 글로벌 응고 검정에서의 혈액 응고 시간을 단축시키는 작용,
- <55> - 플라스미노겐 활성화 인자를 활성화시키는 작용 또는
- <56> - 혈액 응고인자 VII을 활성화시키는 작용을 측정하여 프로테아제 활성을 측정할 수 있다.
- <57> 마지막으로,
- <58> - 단쇄 우로키나제(scuPA, 단쇄 우로키나제 플라스미노겐 활성화 인자) 또는
- <59> - 단쇄-tPA(sctPA, 단쇄 조직 플라스미노겐 활성화 인자)를 활성화시킴으로써, 플라스미노겐 활성화 인자를 활성화시키는 작용을 측정하는 방법도 사용할 수 있다.

- <60> 프로우로키나제 활성 감소의 원인인 돌연변이체는, 예를 들면,
- <61> - RNA의 cDNA 증폭 또는 게놈성 DNA의 증폭 및 이어서 서열 분석;
- <62> - 효소, 알칼린 포스파타제, HRP 및 이들의 기질, 형광염료, 또한 리포터-퀀처(reporter-quencher)쌍(예를 들면, 전갈, 분자 비콘(beacon), TaqMan 프로브), 방사성 등위원소, 발색체, 화학적 발광 표지 및 전기화학적 발광 표지와 같은, 검출용 표지를 갖는 서열-특이적 프로브를 사용하는 하이브리드화 또는 - 선택적 2'-아민 아실화, "마이너 그루브 결합제(minor groove binder)" 올리고뉴클레오타이드 접합체에 의한 핵산의 전기화학적 산화와 같은 방법 또는 HPLC에 의한, cDNA 수준 또는 게놈성 DNA 수준에서의 돌연변이체의 검출 또는 이들의 증폭과 같은 방법들이 단일 뉴클레오타이드 다형성을 검출하는 데 사용되므로, 이들 방법을 사용하여 DNA 및 RNA 수준에서 검출할 수 있다.
- <63> 상기 항원 검정 및 활성 검정에 의해 취득된 시험결과를 근거로 하여, 유전자 수준에서의 잠재적 돌연변이체와 관련하여 3가지 그룹의 건강한 제공자를 연구할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 제공자로부터 채혈하고 원심분리에 의해 혈장으로부터 혈액 세포를 분리한다. 이어서 혈장을 사용하여 FSAP 항원 및 활성 수준을 정량하고 활성 수준에 따라 3개 그룹, 즉 "높음/평균", "평균/감소" 및 "상당히 감소"로 분리한다. 이어서 취득된 혈액 세포를 사용하여 DNA/RNA를 추출하고 이로부터 식별번호 <11> 및 <12>의 표 1에 나타낸 결과가 측정된다.
- <64> 이 결과를 근거로, 상응하는 FSAP 뉴클레오타이드 서열 수준에서, 상기 돌연변이체 하나 또는 둘다를 신속하게 검출할 수 있으며, 이들의 유전자형이 동종접합 또는 이종접합인가는 중요하지 않다. 상기 항원 및 활성 검정이 건강한 제공자의 유전자형을 매우 양호하게 반영하는 반면, FSAP 혈장 수준이 영향을 받는 경우에는 이것이 어렵거나 불가능해질 수 있다. 따라서, 호르몬 변화, 생활 유형 등의 파라미터, 특히 병리상태는 항원 및/또는 활성 수준에 다소 상당히 영향을 미친다. 독일 특허원 제199 26 531.3호에 기재된 바와 같이, 심장마비 동안 측정가능한 FSAP 활성은, 항원 함량을 거의 증가시키지 않고, 정상치보다 상당히 증가될 수 있으며, 결과적으로 건강할 때 FSAP 활성이 감소된 제공자는 "평균"인 것으로 나타났다.
- <65> 예를 들면, FSAP 돌연변이체를 갖는 환자가 심장마비와 같은 혈전 합병증에 걸릴 위험성이 증가하는지의 여부에 관한 연구는 상기 제한성 때문에 수행하기가 어렵다. 또 한편, 예를 들면, 간 부전은 혈장 수준을 감소시키고 이는 또한 "진정한" 유전적 소인의 잘못된 해석을 유도할 수 있다. 대조적으로, DNA/RNA 수준에서의 FSAP 돌연변이 검정은 임시적 현상(event)과 독립적이다. 상기 모든 검정을 조합하여 제공자/환자의 완전한 묘사, 즉 항원-활성 비에 대한 영향과 관련된 잠재적 돌연변이 및 급성 상태의 평가가 가능하다. 이로써 예방학적 및 치료학적 측정이 가능하다.
- <66> 상기와 같이, 혈장이 정상 FSAP를 약 50% 함유하고 FSAP 돌연변이체를 약 50% 함유하는, 오로지 이종접합인 혈액 제공자가 이체까지 발견되었다. 이 경우 두 가지 유형의 FSAP 분자가 존재하는 혈장의 활성 수준이 약 50% 감소한다. 따라서, 100명 이상의 제공자로부터 얻은 혈장 풀도 집단에 따라서 5 내지 10%의 FSAP 돌연변이체를 함유한다. 이에 상응하여, FSAP 돌연변이체를 함유하는 제공자 혈장을 수혈 받을 가능성이 있다. 이러한 돌연변이체를 함유하는 혈액이 이러한 돌연변이체를 생산할 수 없는 수혈자에게 투여되는 경우, 이 돌연변이체는 외래 물질로서 인식되어 적합한 항체가 생성될 수 있다. 이어서, 다음 단계에서 FSAP 돌연변이체를 투여하면 수혈자에게 면역학적 반응을 유도할 수 있고, 이의 부작용은 숙련된 작업자들에게 잘 알려져 있다.
- <67> 반대로, 단지 FSAP 돌연변이체만을 생산하고 정상 FSAP는 생산하지 않는 동종접합 혈액 수혈자에서, 정상 FSAP는 "외래 물질"로서 인식되고 이에 대하여 적합한 항체가 생산된다.
- <68> FSAP는 지혈 및 이와 관련된 세포 과정(cellular process)에 영향을 미친다. 이는 또한 혈액 응고 및/또는 섬유소 용해와 관련되어 상처 치유 반응에 영향을 미친다. 게다가, FSAP는 글리코사미노글리칸에 대한 친화도가 높다는 특성으로 인해 세포 및 기타 매트릭스에 결합할 수 있어서 아마도 세포 이동 및 세포-단백질 분해 단계와 생리학적 및 병리생리학적으로 관련되어 있다.
- <69> 따라서 항-FSAP 항체는 모든 FSAP-매개된 활성에 영향을 미칠 수 있다. 생리학적 작용에 대한 손상 뿐만 아니라, FSAP에 대한 자가항체가 발생하는 경우, 면역복합체(FSAP+항체)가 공지된 자가면역 질환의 부작용의 원인이 될 수 있다. 이것은 예를 들면 내피에 국소적으로 맥관염을 일으킬 수 있다. 섬유소용해 촉진제(profibrinolytic agent)로서의 FSAP 활성의 증화는 또한 혈전증 촉진 상태의 원인이 될 수 있다.
- <70> 따라서, 상기 항체를 검출하기 위한 진단방법이 요구된다.
- <71> 따라서, 또한 본 발명은 항체를 함유할 수 있는 샘플을 고체 지지체에 고정된 FSAP 및/또는 FSAP 돌연변이체와

반응시키는 단계, 세척 후, 표지된 사람 항-면역 글로불린 또는 표지된 단백질 A와 함께 프로테아제(들)에 결합된 항체를 항온처리하는 단계 및 결합된 표지된 물질에 의해 발생하는 시그널을 검출하는 단계를 포함하여, 인자 VII-활성화 프로테아제(=FSAP) 및/또는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 형성된 FSAP 돌연변이체에 대한 항체를 검출하기 위한 진단방법에 관한 것이다.

<72> 본 발명의 진단방법은 편의상 FSAP 및/또는 FSAP 돌연변이체가 매트릭스, 예를 들면, 미세역가 플레이트에 결합되는 ELISA 기술을 사용하여 수행된다. FSAP 및/또는 FSAP 돌연변이체를 최적으로 제공하기 위해 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 이들의 F(ab')₂ 또는 Fab 단편으로 플레이트를 미리 도포한 후 FSAP 및/또는 FSAP 돌연변이체를 당해 플레이트에 적재할 수 있다. FSAP 및 이의 돌연변이체는 텍스트란 설페이트, 헤파린 및 유사 물질에 매우 잘 결합하기 때문에, FSAP 결합을 위해 상기 제제로 미리 도포할 수도 있다. 세척 후, 경우에 따라, 차단 및 세척의 목적을 위해 공지된 제제, 예를 들면, 세제 또는 알부민을 사용하여 지지체 또는 미세역가 플레이트를 추가로 차단 및 세척한 후, 검정할 용액과 함께 항온처리한다. FSAP 항체 함유 용액은 혈청, 혈장 및 기타 체액, 예를 들면, 활액, CSF, 객담, 누액 또는 정장 또는 세포 용해물일 수 있다.

<73> 항온처리하고 지지체를 세척한 후, 이어서 적합한 검출제를 사용한다. 각종 항체 부류, 예를 들면, IgG, IgM, IgA, IgE 및 이에 속하는 서브-부류를 검출하는 데 필요한 검정 물질은 표지된 시약으로서 시판중이다. 항체 역가는 항-사람 항체에 결합된 효소에 의해 발색성 기질의 분해에 의해 발생하는 흡광을 측광법으로 측정하여 검출 및 정량화할 수 있다. 그러나, 검출에 사용된 항체에 결합된 형광 그룹에 의해 방출되는 형광을 측정할 수도 있다. 마지막으로, 검출에 사용된 물질이 방사성 그룹으로 표지된 경우, 방사성 측정을 사용하여 검출할 수도 있다.

<74> FSAP 및/또는 특히 FSAP 돌연변이체에 대한 항체를 측정함으로써, 수혈하기 전에 수혈과 관련된 위험을 확인하고 적합한 수단에 의해 위험한 합병증을 방지할 수 있다.

<75> 추가로, 본 발명은 항-프로테아제인, 표지된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 이들의 단편 중의 하나를 조직 샘플과 반응시키는 단계, 비결합된 항체 또는 이의 단편을 세척하는 단계 및 결합된 항체 또는 이들의 단편 중의 하나로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함하여, 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제, 이의 효소 전구체, 이의 단편 또는 이의 돌연변이체를 면역조직화학적으로 검출하기 위한 진단방법에 관한 것이다.

<76> 또한, 당해 방법은 프로테아제, 이의 효소 전구체, 이의 돌연변이체 또는 이의 단편에 대해 유도된 비표지된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 이들의 단편중의 하나를 조직 샘플과 반응시키는 단계, 비결합된 항체 또는 이의 단편을 세척하는 단계, 이어서 표지된 항-항체를 조직과 반응시키는 단계 및 비결합된 표지된 항-항체를 세척한 후, 결합된 항-항체 또는 이의 단편으로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계에 의해 수행할 수 있다.

<77> 또한, FSAP에 대해 반응하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체는 발색성 또는 발광성 그룹으로 표지되는 경우, 사람 기원의 조직 영역에서 FSAP를 검출하는 데 매우 적합한 것으로 알려져 있다. 래빗, 양, 염소 또는 기타 포유동물의 면역화에 의해 수득된 항-FSAP 폴리클로날 항체 뿐만 아니라, 모노클로날 항체는 당해 검출에 적합하다. 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2453 및 DSM ACC 2454의 모노클로날 항체는 활성 형태 및 효소 전구체 형태 또는 단편 모두로서 존재할 수 있는 FSAP의 조직 특이적 검출에 특히 적합하다. 활성화된 FSAP와 안티플라스민과 같은 억제제와의 복합체 또한 이러한 방식으로 검출할 수 있다. 모든 통상적인 조직 검출방법, 예를 들면, 광학 현미경법, 형광 현미경법 및 전자 현미경법이 이러한 목적에 적합하다.

<78> 완전한 폴리클로날 및 모노클로날 항체 및 이들의 단편, 예를 들면, F(ab')₂ 또는 Fab 모두, 검출가능한 그룹으로 표지되지만 하면, 상기 방법에서 FSAP를 검출하는 데 적합하다. 상기 항체 또는 이들의 단편은 단독으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있다. 이는 인식된 에피토프 중 하나가 불확실한 경우에 특히 권장된다. 예를 들면, 단백질 도메인은 세포 결합(cellular association) 때문에 항체에 접근할 수 없지만, 상이한 FSAP 영역에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항체가 결합된다. 독일 특허된 제100 52 319.6호에 상세하게 기재되어 있는, 야생형의 사람 FSAP 및/또는 이의 돌연변이체에 대해 유도된 항체도 사람 기원의 조직 영역에서 FSAP를 검출하는 데 사용할 수 있다.

<79> FSAP의 면역조직화학적 검출에 대해 이제까지 얻어진 발견은 다음과 같이 요약할 수 있다:

<80> - FSAP는 이제까지 연구된 거의 모든 사람 조직에서 검출된다;

<81> - 내분비학적으로 활성인 세포, 예를 들면, 레이디히 세포(Leydig cell) 또는 췌장의 랑게르한스 섬(islet of

Langerhans)의 내분비학적으로 활성인 세포는 발색성 그룹을 갖는 항체를 사용하여 세포질내에서 매우 강하게 염색될 수 있다;

- <82> - 상피 및 내피가 이들의 위치에 따라 FSAP에 대한 항체와 다소 강한 세포질내 면역반응을 나타낸다;
- <83> - 피질의 신경절세포 및 수상돌기가 높은 농도의 FSAP를 나타내고, 이는 발색성 항체와의 강한 면역조직학적 착색반응에 의해 검출된다;
- <84> - 혈장 세포는 발색성 항체와의 강력한 세포질내 착색을 나타낸다;
- <85> - 간엽성 간질 세포는 복합 조직에서 FSAP에 대해 단지 약한 착색반응을 나타내거나 전혀 착색반응을 나타내지 않는다.
- <86> 따라서, FSAP는 정상 세포 성분으로서 간주될 수 있는 단백질이다. 지금까지 FSAP는 세포내 및 세포외에 모두 위치하며 세포내 분리막이 훨씬 더 염색이 잘 되는 것으로 알려져 왔다. 본 발명의 상기 항체 또는 이의 단편에 의한 FSAP의 검출에 의해 다음의 병리학적 과정을 확인할 수 있다:
- <87> - 내분비학적 활성 종양 및 신경-내분비성 종양;
- <88> - 맥관 내피 및 모세관 내피의 내피; 및
- <89> - 맥관 활성 종양, 예를 들면, 교종 및 교모세포종 뿐만 아니라, 예를 들면, 맥관 종양, 예를 들면, 혈관내피종 또는 혈관외피세포종 및 혈관육종;
- <90> - 상처 치유 반응, 과립화 조직 및 교원질증;
- <91> - 동맥경화성, (미세)혈전성 및 괴사성 영역;
- <92> - 신경분해 질환, 예를 들면, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환 또는, 예를 들면, 프리온 단백질에 의해 발생하는 해면상 뇌염균;
- <93> - 감마글로불린장애 및 골수종.
- <94> FSAP는 바람직하게는 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2453 또는 DSM ACC 2454의 모노클로날 항체를 사용하여 검출한다.
- <95> 본 발명의 진단방법은 아래의 실시예에 의해 보다 상세하게 설명된다:
- <96> 하이브리도마 세포주 DSM ACC 2453 또는 DSM ACC 2454의 FSAP-특이적 모노클로날 항체의 면역조직화학적 반응성을, 성인 사람 조직 및 악성 비뇨기 종양으로부터 10 μ m 두께의 파라핀 영역을 제조한 후, 5분 동안 3회 전자파 중에서 시트르산염 완충액 중에서 처리된 당해 영역을 탈랍(dewax)시킴으로써 연구한다. 먼저 상기 하이브리도마 세포주의 비표지된 항체를 상기 영역과 30분 동안 반응시킨다. 조직 영역을 세척한 후, 표지된 항-마우스 검출 항체를 마찬가지로 30분 동안 조직과 반응시킨 후, APAAP 복합체(알칼린 포스파타제/항-알칼린 포스파타제 복합체; Alkaline Phosphatase/Anti-Alkaline Phosphatase complex)를 형성시키고 크로모겐으로 염색하고 헬말룸(helmalum)으로 대비염색(counterstaining)하여 결합된 FSAP 항체를 가시화한다.
- <97> 네가티브 대조군으로서, 각각의 조직을 검출 항체와 함께 개별적으로 항온처리하여 - FSAP 항체와의 예비항온처리를 수행하지 않음 - 잠재적인 비특이적 검출반응을 가시화한다. 추가로, α -케라틴에 대한 항체를 포지티브 대조군으로서 포함시킨다.
- <98> 정상 사람 조직의 면역조직화학적 연구 결과가 표 3에 요약되어 있다:

표 3a

<99> FSAP, 클론 DSMZ ACC2454 및 DSMZ ACC 2453에 대한 항체 / 사람 정상 조직

	DSMZ ACC2454	DSMZ ACC2453		2454	2453
식도			충수돌기		
평균 상피	2+	2+	상피	1+	3+
분비 단위	0	0	근조직	1+	1+
선방관	2+	2+	림프 소절	1+	2+

근조직	1+	1+	혈장 세포	2+	3+
간질	1+	1+-2+	혈관 내피	1+	1+
혈관 내피	2+	2+	췌장		
분문 (위)			상피	1+	2+
소와 상피	0	0	랑게르한스 섬	3+	1+
심장선(glandulae cardiacae)	1+	2+	도관 상피	2+	2+
점액 분비 단위	0	0	혈관 내피	1+	1+
산 분비선	3+	3+	침샘		
근조직	1+	1+	점액 말단 단위	0	0
혈관 내피	1+	1+	장액 말단 단위	1+	1+-2+
체부 (위)			선방관	1+	1+
소와 상피	0	0-1+	선조관	1+	1+
체부 선체(corpus gland body)	2+	2+	혈관 내피	0-1+	0-1+
근조직	0	1+	간		
혈관 내피	1+	1+	간세포	2+	2+
십이지장			담즙관	0	0
상피	0-1+	1+	혈관 내피	1+	(1+)
브루너 샘	0	0	쓸개 담낭		
근조직	0	0-1+	상피	1+	1+
림프 소절	1+	2+	근조직	2+	1+
신경절 세포	2+	3+	혈관 내피	2+	1+
혈관 내피	1+	1+	쓸개관		
소장			상피	3+	3+
상피	2+	3+	근조직	2+	1+
근조직	1+	1+	신경절 세포	3+	3+
간질	1+	2+	혈관 내피	2+	2+
신경절 세포	3+	3+	고환		
혈관 내피	1+	1+	레이디히 세포	3+	1+
결장/직장			세르톨리 세포	1+-2+	1+
상피	1+	1+	생식 세포	1+-2+	1+
림프 소절	1+	1+	혈관 내피	1+	1+
혈장 세포	1+	1+	고환낭		
혈관 내피	1+	0	상피	2+	2+

표 3b

<100>

	2454	2453		2454	2453
부고환			태반		
부고환관	2+	2+	융모막 상피	3+	2+
고환 날세관	2+	2+	양막 상피	2+	2+
간질	1+	1+	탈락막 세포	2+-3+	2+
혈관 내피	1+	1+	간질 세포	0	+/-
정액샘			혈관 내피	1+	1+
상피	2+	3+	태아막		
근조직	1+	1+	양막 상피	3+	2+
혈관 내피	2+	2+	탈락막 세포	3+	1+
정관			섬유아세포	3+	1+-2+

상피	2+	3+	자궁목		
세로 근육층	0	+/-	선상피	0	0
환상 근육층	2+	3+	혈관 내피	1+	0-1
혈관 내피	2+	3+	간질	1+	0-1
전립선			난관		
선상피	2+	2+	상피	2+	3+
근조직	1+	1+	근조직	0	1+
혈관 내피	1+-2+	1+-2+	혈관 내피	1+	2+
신장			유방		
세관	2+	1+	상피 유선 소엽	2+	2+
사구체	0	0	관 상피 분비관	2+	2+
수질 상피	1+	1+	섬유아세포	0	1+
혈관 내피	0-1+	0-1+	혈장 세포	2+	2+
방광			혈관 내피	1+	0
요로상피	2+	1+-2+	갑상선		
근조직	2+	1+	여포 상피	2+	1+-2+
혈장 세포	2+	2+	간질	1+	1+
섬유아세포	1+-2+	1+-2+	혈관 내피	1+	0
말초신경		0	흉선		
부신			해설체	2+-3+	2+
사구체 영역	2+	1+	소절	1+	2+
근다발성 영역	1+-2+	(1+)	외투층	(1+)	(1+)
망상 영역	3+	(1+)	성상 스카이 대식세포(starry sky macrophage)	1+	1+
수질	0	0	비장	+	+
혈관 내피	1+	(1+)	편도	+/-	+/-
자궁내막			립프절	+/-	+/-
선상피	3+	2+	상악동		
간질 세포	0	1+	호흡 상피	2+	2+
자궁 근육층	1+	1+	혈장 세포	3+	3+
혈관 내피	1+	2+	혈관 내피	1+	1+

표 3c

<101>

	2454	2453		2454	2453
폐			지방조직	2+	2+
기관지 상피	2+	1+	혈관 내피	2+	2+
폐포 상피	1+-2+	1+	피부		
기관지선	1+	1+	표피	2+	1+-2+
연골	3+	1+	진피	(1+)	0
근조직	1+	1+	피하조직	(1+)	0
폐포 대식세포	2+	2+	땀샘	1+	0
탄성섬유	2+-3+	2+-3+	혈관 내피	1+	0
혈관 내피	1+	1+	심내막	0	0
골격근	2+	1+	섬유아세포	2+-3+	2+-3+
0 = 네가티브 1+ = 약한 포지티브 2+ = 적당히 강한 포지티브 3+ = 강한 포지티브					

- <102> 내분비 세포, 예를 들면, 췌장의 랑게르한스 섬, 고환 간질의 레이다히 세포, 태반의 탈락막 세포, 위 분문의 산 분비선체 및 담낭관의 매우 원주형인 상피는 부분적으로 미세 과립을 나타내는 강한 반응을 보여준다. 조직 구조 내에 위치하는 혈장 세포 및 피질의 신경절 세포 및 신경 세포에서 강한 포지티브 반응이 관찰된다. 정액 샘플 내층 상피 및 소장외 장세포와 같이 태아막의 탈락막 세포, 양막 상피 및 섬유아세포는 매우 강한 면역조직학적 염색성을 나타낸다.
- <103> 비뇨기 종양의 포르말린-고정되고, 파라핀-봉입된 종양 물질의 연구에 의하면, 전립선의 상이하게 분화된 선암 종의 세포질내 반응은 약한 반응부터 적합하게 강한 반응이다. 정상피종성 고환 종양의 종양 세포는 단지 약한 세포질내 반응만을 나타내는 반면, 비정상피종 종양(태생암 및 융모막암)의 종양 세포는 광범위하게 증가된 염색성을 가지며, 이는 FSAP의 농도가 증가됨을 나타낸다.
- <104> 따라서, 본 발명의 진단방법은 광범위한 범위의 기관에서 병리학적 프로세스의 면역조직화학적 검출을 가능하게 한다.

발명의 효과

- <105> 본 발명은 혈액 응고인자 VII-활성화 프로테아제(FSAP)의 돌연변이체, 단백질 수준 및 RNA/DNA 수준에서 또는 조직 샘플 중에서 FSAP 및 이의 돌연변이체를 검출하는 방법, 및 당해 검출방법을 위한 특이적 항체를 제공한다.

서열 목록

- <110> Aventis Behring GmbH
 - <120> Mutants of the factor VII-activating protease and detection methods using specific antibodies
 - <130> 2000/A008 - A7
 - <150> 100 36 641.4
 - <151> 2000-07-26
 - <150> 100 50 040.4
 - <151> 2000-10-10
 - <150> 100 52 319.6
 - <151> 2000-10-21
 - <150> 101 18 706.8
 - <151> 2001-04-12
 - <160> 4
 - <170> KopatentIn 1.71
 - <210> 1
 - <211> 1683
 - <212> DNA
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1
- ```

atgtttgcca ggatgtctga tctccatgtt ctgctgttaa
tggtctggt gggaaagaca 60
gcctgtgggt tctccctgat gtctttattg gaaagcctgg acccagactg gaccctgac 120
cagtatgatt acagctacga ggattataat caggaagaga acaccagtag cacacttacc 180
catgctgaga atcctgactg gtaactaact gaggaccaag ctgatccatg ccageccaac 240
ccctgtgaac acggtgggga ctgectctgc catgggagca ccttcacatg cagctgctg 300
gtctctttct ctgggaataa gtgtcagaaa gtcaaaaata cgtgcaagga caacctatgt 360
ggccggggcc aatgtctcat tacccagagt cctccctact accgctgtgt ctgtaaacac 420
ccttacacag gtcccagctg ctccaagtgt gttcctgtat gcaggccaaa

ccctgccag 480
aatggggcta cctgctcccg gcataagcgg agatccaagt tcacctgtgc ctgtcccagc 540
cagttcaagg ggaattctgt tgaatatggt tctgatgact gctatgttgg cgatggctac 600

```



tcttaccgag ggaaaatgaa taggacagtc aaccagcatg cgtgccttta ctggaactcc 660  
cacctcctct tgcaggagaa ttacaacatg tttatggagg atgctgaaac ccatgggatt 720  
ggggaacaca atttctgcag aaaccagat gcggacgaaa agccctgggt ctttattaaa 780  
gttaccaatg acaaggatgaa atgggaatac tgtgatgtct cagcctgctc agcccaggac 840  
gttgctacc cagaggaag cccactgag ccatcaacca agcttccggg gtttgactcc  
900  
tgtgaaaga ctgagatagc agagaggaag atcaagagaa tctatggagg cttaagagc 960  
acggcgggca agcaccatg gcagcgtcc ctccagtcct cgctgcctct gaccatctcc 1020  
atgccccagg gccacttctg tgggtggggcg ctgatccacc cctgctgggt gctcactgct 1080  
gcccactgca ccgacataaa aaccagacat ctaaaggtgg tgctagggga ccaggacctg 1140  
aagaaagaag aatttcatga gcagagcttt aggggtggaga agatattcaa gtacagccac 1200  
tacaatgaaa gagatgagat tccccacaat gatattgcat tgctcaagtt aaagccagtg 1260  
gatggtcact gtgctctaga atccaatac gtgaagactg tgtgcttgcc tgatgggtcc  
1320  
tttccctctg ggagtgagtg ccacatctct ggctggggtg ttacagaaac aggaaaaggg 1380  
tcccgccagc tctggatgc caaagtcaag ctgattgcca acactttgtg caactcccgc 1440  
caactctatg accacatgat tgatgacagt atgatctgtg caggaaatct tcagaaacct 1500  
gggcaagaca cctgccaggg tgactctgga ggccccctga cctgtgagaa ggacggcacc 1560  
tactactct atgggatagt gagctggggc ctggagtgtg ggaagaggcc aggggtctac 1620  
acccaagtta ccaattctct gaattggatc aaagccacca tcaaaagtga aagtggcttc 1680  
taa 1683

- <210> 2
- <211> 1683
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

atgtttgcca ggatgtctga tctccatgtt ctgctgttaa tggctctggt gggaaagaca 60  
gcctgtgggt tctccctgat gtctttatg gaaagcctgg acccagactg gaccctgac 120  
cagtatgatt acagctacga ggattataat caggaagaga acaccagtag cacacttacc 180  
catgctgaga atcctgactg gtaactacct gaggaccaag ctgatccatg ccagcccaac 240  
ccctgtgaac acggtgggga ctgcctcgtc catgggagca ccttcacatg cagctgctg 300  
gctcctttct ctgggaataa gtgtcagaaa gtgcaaaaata cgtgcaagga caacctatgt 360  
  
ggccggggcc aatgtctcat taccagagt cctccctact accgctgtgt ctgtaaacac 420  
ccttacacag gtcccagctg ctcccagtg gttcctgtat gcaggccaaa ccctgccag 480  
aatggggcta cctgctcccg gcataagcgg agatccaagt tcacctgtgc ctgtcccagc 540  
cagttcaagg ggaattctg tgaataggt tctgatgact gctatgttgg cgatggctac 600  
tcttaccgag ggaaaatgaa taggacagtc aaccagcatg cgtgccttta ctggaactcc 660  
cacctcctct tgcaggagaa ttacaacatg tttatggagg atgctgaaac ccatgggatt 720  
ggggaacaca atttctgcag aaaccagat gcggacgaaa agccctgggt ctttattaaa 780  
gttaccaatg  
acaaggatgaa atgggaatac tgtgatgtct cagcctgctc agcccaggac 840  
gttgctacc cagaggaag cccactgag ccatcaacca agcttccggg gtttgactcc 900  
tgtgaaaga ctgagatagc agagaggaag atcaagagaa tctatggagg cttaagagc 960  
acggcgggca agcaccatg gcagcgtcc ctccagtcct cgctgcctct gaccatctcc 1020  
atgccccagg gccacttctg tgggtggggcg ctgatccacc cctgctgggt gctcactgct 1080  
gcccactgca ccgacataaa aaccagacat ctaaaggtgg tgctagggga ccaggacctg 1140  
aagaaagaag aatttcatga gcagagcttt aggggtgcaga agatattcaa gtacagccac 1200  
tacaatgaaa  
gagatgagat tccccacaat gatattgcat tgctcaagtt aaagccagtg 1260  
gatggtcact gtgctctaga atccaatac gtgaagactg tgtgcttgcc tgatgggtcc 1320  
tttccctctg ggagtgagtg ccacatctct ggctggggtg ttacagaaac aggaaaaggg 1380  
tcccgccagc tctggatgc caaagtcaag ctgattgcca acactttgtg caactcccgc 1440  
caactctatg accacatgat tgatgacagt atgatctgtg caggaaatct tcagaaacct 1500  
gggcaagaca cctgccaggg tgactctgga ggccccctga cctgtgagaa ggacggcacc 1560  
tactactct atgggatagt gagctggggc ctggagtgtg agaagaggcc aggggtctac 1620

acccaagtta

ccaaattcct gaattggatc aaagccacca tcaaaagtga aagtggcttc 1680

taa

1683

<210> 3

<211> 560

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Phe Ala Arg Met Ser Asp Leu His Val Leu Leu Leu Met Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Gly Lys Thr Ala Cys Gly Phe Ser Leu Met Ser Leu Leu Glu Ser  
 20 25 30  
 Leu Asp Pro Asp Trp Thr Pro Asp Gln Tyr Asp Tyr  
 Ser Tyr Glu Asp  
 35 40 45  
 Tyr Asn Gln Glu Glu Asn Thr Ser Ser Thr Leu Thr His Ala Glu Asn  
 50 55 60  
 Pro Asp Trp Tyr Tyr Thr Glu Asp Gln Ala Asp Pro Cys Gln Pro Asn  
 65 70 75 80  
 Pro Cys Glu His Gly Gly Asp Cys Leu Val His Gly Ser Thr Phe Thr  
 85 90 95  
 Cys Ser Cys Leu Ala Pro Phe Ser Gly Asn Lys Cys Gln Lys Val Gln  
 100  
 105 110  
 Asn Thr Cys Lys Asp Asn Pro Cys Gly Arg Gly Gln Cys Leu Ile Thr  
 115 120 125  
 Gln Ser Pro Pro Tyr Tyr Arg Cys Val Cys Lys His Pro Tyr Thr Gly  
 130 135 140  
 Pro Ser Cys Ser Gln Val Val Pro Val Cys Arg Pro Asn Pro Cys Gln  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Ala Thr Cys Ser Arg His Lys Arg Arg Ser Lys Phe Thr Cys  
 165 170  
 175  
 Ala Cys Pro Asp Gln Phe Lys Gly Lys Phe Cys Glu Ile Gly Ser Asp  
 180 185 190  
 Asp Cys Tyr Val Gly Asp Gly Tyr Ser Tyr Arg Gly Lys Met Asn Arg  
 195 200 205  
 Thr Val Asn Gln His Ala Cys Leu Tyr Trp Asn Ser His Leu Leu Leu  
 210 215 220  
 Gln Glu Asn Tyr Asn Met Phe Met Glu Asp Ala Glu Thr His Gly Ile  
 225 230 235 240  
 Gly Glu His Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Glu Lys Pro Trp  
 245 250 255  
 Cys Phe Ile Lys Val Thr Asn Asp Lys Val Lys Trp Glu Tyr Cys Asp  
 260 265 270  
 Val Ser Ala Cys Ser Ala Gln Asp Val Ala Tyr Pro Glu Glu Ser Pro  
 275 280 285  
 Thr Glu Pro Ser Thr Lys Leu Pro Gly Phe Asp Ser Cys Gly Lys Thr  
 290 295 300  
 Glu Ile Ala Glu Arg Lys Ile  
 Lys Arg Ile Tyr Gly Gly Phe Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Gly Lys His Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Ser Ser Leu Pro  
 325 330 335  
 Leu Thr Ile Ser Met Pro Gln Gly His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile  
 340 345 350

His Pro Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Thr Asp Ile Lys Thr  
 355 360 365  
 Arg His Leu Lys Val Val Leu Gly Asp Gln  
 Asp Leu Lys Lys Glu Glu  
 370 375 380  
 Phe His Glu Gln Ser Phe Arg Val Glu Lys Ile Phe Lys Tyr Ser His  
 385 390 395 400  
 Tyr Asn Glu Arg Asp Glu Ile Pro His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys  
 405 410 415  
 Leu Lys Pro Val Asp Gly His Cys Ala Leu Glu Ser Lys Tyr Val Lys  
 420 425 430  
 Thr Val Cys Leu Pro Asp Gly Ser Phe Pro Ser Gly Ser Glu  
 Cys His  
 435 440 445  
 Ile Ser Gly Trp Gly Val Thr Glu Thr Gly Lys Gly Ser Arg Gln Leu  
 450 455 460  
 Leu Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Ala Asn Thr Leu Cys Asn Ser Arg  
 465 470 475 480  
 Gln Leu Tyr Asp His Met Ile Asp Asp Ser Met Ile Cys Ala Gly Asn  
 485 490 495  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 500  
 505 510  
 Leu Thr Cys Glu Lys Asp Gly Thr Tyr Val Tyr Gly Ile Val Ser  
 515 520 525  
 Trp Gly Leu Glu Cys Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Thr  
 530 535 540  
 Lys Phe Leu Asn Trp Ile Lys Ala Thr Ile Lys Ser Glu Ser Gly Phe  
 545 550 555 560  
 <210> 4  
 <211> 560  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 Met Phe Ala Arg Met Ser  
 Asp Leu His Val Leu Leu Leu Met Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Gly Lys Thr Ala Cys Gly Phe Ser Leu Met Ser Leu Leu Glu Ser  
 20 25 30  
 Leu Asp Pro Asp Trp Thr Pro Asp Gln Tyr Asp Tyr Ser Tyr Glu Asp  
 35 40 45  
 Tyr Asn Gln Glu Glu Asn Thr Ser Ser Thr Leu Thr His Ala Glu Asn  
 50 55 60  
 Pro Asp Trp Tyr Tyr Thr Glu Asp Gln Ala Asp Pro Cys Gln  
 Pro Asn  
 65 70 75 80  
 Pro Cys Glu His Gly Gly Asp Cys Leu Val His Gly Ser Thr Phe Thr  
 85 90 95  
 Cys Ser Cys Leu Ala Pro Phe Ser Gly Asn Lys Cys Gln Lys Val Gln  
 100 105 110  
 Asn Thr Cys Lys Asp Asn Pro Cys Gly Arg Gly Gln Cys Leu Ile Thr  
 115 120 125  
 Gln Ser Pro Pro Tyr Tyr Arg Cys Val Cys Lys His Pro Tyr Thr Gly  
 130  
 135 140  
 Pro Ser Cys Ser Gln Val Val Pro Val Cys Arg Pro Asn Pro Cys Gln  
 145 150 155 160

Asn Gly Ala Thr Cys Ser Arg His Lys Arg Arg Ser Lys Phe Thr Cys  
 165 170 175  
 Ala Cys Pro Asp Gln Phe Lys Gly Lys Phe Cys Glu Ile Gly Ser Asp  
 180 185 190  
 Asp Cys Tyr Val Gly Asp Gly Tyr Ser Tyr Arg Gly Lys Met Asn Arg  
 195 200  
 205  
 Thr Val Asn Gln His Ala Cys Leu Tyr Trp Asn Ser His Leu Leu Leu  
 210 215 220  
 Gln Glu Asn Tyr Asn Met Phe Met Glu Asp Ala Glu Thr His Gly Ile  
 225 230 235 240  
 Gly Glu His Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Glu Lys Pro Trp  
 245 250 255  
 Cys Phe Ile Lys Val Thr Asn Asp Lys Val Lys Trp Glu Tyr Cys Asp  
 260 265 270  
 Val Ser Ala Cys Ser Ala Gln Asp Val Ala Tyr Pro Glu Glu Ser Pro  
 275 280 285  
 Thr Glu Pro Ser Thr Lys Leu Pro Gly Phe Asp Ser Cys Gly Lys Thr  
 290 295 300  
 Glu Ile Ala Glu Arg Lys Ile Lys Arg Ile Tyr Gly Gly Phe Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Gly Lys His Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Ser Ser Leu Pro  
 325 330 335  
 Leu Thr Ile Ser Met  
 Pro Gln Gly His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile  
 340 345 350  
 His Pro Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Thr Asp Ile Lys Thr  
 355 360 365  
 Arg His Leu Lys Val Val Leu Gly Asp Gln Asp Leu Lys Lys Glu Glu  
 370 375 380  
 Phe His Glu Gln Ser Phe Arg Val Gln Lys Ile Phe Lys Tyr Ser His  
 385 390 395 400  
 Tyr Asn Glu Arg Asp Glu Ile Pro His Asn Asp  
 Ile Ala Leu Leu Lys  
 405 410 415  
 Leu Lys Pro Val Asp Gly His Cys Ala Leu Glu Ser Lys Tyr Val Lys  
 420 425 430  
 Thr Val Cys Leu Pro Asp Gly Ser Phe Pro Ser Gly Ser Glu Cys His  
 435 440 445  
 Ile Ser Gly Trp Gly Val Thr Glu Thr Gly Lys Gly Ser Arg Gln Leu  
 450 455 460  
 Leu Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Ala Asn Thr Leu Cys Asn Ser Arg  
 465  
 470 475 480  
 Gln Leu Tyr Asp His Met Ile Asp Asp Ser Met Ile Cys Ala Gly Asn  
 485 490 495  
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 500 505 510  
 Leu Thr Cys Glu Lys Asp Gly Thr Tyr Tyr Val Tyr Gly Ile Val Ser  
 515 520 525  
 Trp Gly Leu Glu Cys Glu Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Thr  
 530 535  
 540  
 Lys Phe Leu Asn Trp Ile Lys Ala Thr Ile Lys Ser Glu Ser Gly Phe  
 545 550 555 560