(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-24706
(P2018-24706A)
(43)公開日　平成30年2月15日(2018.2.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/37	***(2006.01)***	A61K	38/37		4B064
C07K 14/755	***(2006.01)***	C07K	14/755	ZNA	4B065
C07K 19/00	***(2006.01)***	C07K	19/00		4C084
C07K 16/00	***(2006.01)***	C07K	16/00		4H045
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	A	

審査請求 有　請求項の数 1　OL　外国語出願　（全 86 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-220060 (P2017-220060)
(22)出願日　平成29年11月15日 (2017.11.15)
(62)分割の表示　特願2016-209535 (P2016-209535)の分割
原出願日　平成22年12月6日 (2010.12.6)
(31)優先権主張番号　61/301,592
(32)優先日　平成22年2月4日 (2010.2.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/419,676
(32)優先日　平成22年12月3日 (2010.12.3)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/373,113
(32)優先日　平成22年8月12日 (2010.8.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　512147244
バイオベラティブ　セラピューティクス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４５１，　ウォルサム，　セカンド　アベニュー　２２５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ジェニファー　エー．　ドゥモント
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１４５０，　グロトン，　フォーン　テラス　レーン　３７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子キメラおよびハイブリッドポリペプチドならびにその使用法

(57)【要約】
【課題】第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子キメラおよびハイブリッドポリペプチドならびにその使用法の提供。
【解決手段】本発明は、第ＶＩＩＩ因子を投与する方法；第ＶＩＩＩ因子を含むキメラおよびハイブリッドポリペプチドを投与する方法；第ＶＩＩＩ因子を含むキメラおよびハイブリッドポリペプチド；このようなキメラおよびハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；このようなポリヌクレオチドを含む細胞；ならびにこのような細胞を用いてこのようなキメラおよびハイブリッドポリペプチドを産生する方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本願図面に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般に、止血障害の治療法の分野に関する。
【背景技術】
【０００２】
血友病Ａは、ＦＶＩＩＩ活性の欠損をもたらす第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）遺伝子における突然変異および／または欠失に起因するＸ関連出血障害である（Ｐｅｙｖａｎｄｉ　ｅｔ　ａｌ．　２００６）。この疾患は、特発性出血や外傷後の過剰な出血により特徴付けられる。長い期間にわたり、筋肉や関節中に繰り返し出血し（幼少期に始まることが多い）、その結果、血友病性関節症や不可逆的な関節損傷が起こる。この損傷は進行性であり、関節の可動性が非常に限定されたり、筋萎縮症や慢性痛が起こったりする可能性がある（非特許文献１（その全体として参照により本明細書中に組み込まれる））。
【０００３】
Ａ２ドメインは第ＶＩＩＩ因子分子の凝固促進活性に必要である。研究により、ブタ第ＶＩＩＩ因子はヒト第ＶＩＩＩ因子よりも６倍高い凝固促進活性を有することが示され（非特許文献２）、ヒト第ＶＩＩＩ因子とブタ第ＶＩＩＩ因子との間の凝固活性の差は、ヒトＡ２ドメインおよびブタＡ２ドメインにおける１以上の残基間のアミノ酸配列の差に基づくようである（非特許文献３）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。
【０００４】
血友病Ａの治療は、ＦＶＩＩＩ活性を正常レベルの１～５％まで回復させて、特発性出血を予防することを目標とする補充療法による（非特許文献４（その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）。出血症状をオンデマンドで治療するため、または予防的に治療することにより起こる出血症状を予防するために利用可能な血漿由来の組換えＦＶＩＩＩ製品がある。これらの製品の半減期に基づき、治療レジメンでは頻繁に静脈内投与することが必要とされる。そのような頻繁な投与は痛みを伴い、かつ不都合である。
【０００５】
死亡率の低下、関節損傷の予防、および生活の質の改善は、血漿由来の組換えＦＶＩＩＩの開発による重要な功績である。出血を長期間予防することが、血友病Ａ患者の治療における別の重要な進展となるであろう。しかし、現在まで、長期の保護を可能にする製品は開発されていない。したがって、現行の治療法よりも許容性かつ有効な、第ＶＩＩＩ因子欠乏に起因する血友病の改善された治療法が依然として必要とされる。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｍｅｒｃｈａｎ，　Ｅ．Ｃ．，　Ｓｅｍｉｎ．　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈｅｍｏｓｔ．　２９：８７－９６　（２００３）
【非特許文献２】Ｌｏｌｌａｒ，　Ｐ．，　ａｎｄ　Ｅ．Ｔ．　Ｐａｒｋｅｒ，　Ｊ．Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２６６：１２４８１－１２４８６　（１９９１）
【非特許文献３】Ｌｏｌｌａｒ，　Ｐ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２６７：２３６５２－２３６５７　（１９９２）
【非特許文献４】Ｍａｎｎｕｃｃｉ，　Ｐ．Ｍ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．　３４４：１７７３－１７７９　（２００１）
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明は、第ＶＩＩＩ因子を投与する方法；第ＶＩＩＩ因子を含むキメラポリペプチド

およびそのようなキメラポリペプチドのハイブリッドを投与する方法；第ＶＩＩＩ因子を含むキメラポリペプチドおよびそのようなキメラポリペプチドのハイブリッド；そのようなキメラおよびハイブリッドポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド；そのようなポリヌクレオチドを含む細胞；ならびにそのような細胞を用いてそのようなキメラおよびハイブリッドポリペプチドを産生する方法を提供する。

【０００８】

本発明は、第ＶＩＩＩ因子を、それを必要とする対象に投与する方法であって、この対象に、治療量のキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、たとえばキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチドを、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）、例えばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子に必要であるよりも少なくとも約１．５倍長い投与間隔で投与することを含む方法を提供する。

【０００９】

投与間隔は、当量の、Ｆｃ部分などの非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）に必要であるよりも、少なくとも約１．５～６倍長いか、１．５～５倍長いか、１．５～４倍長いか、１．５～３倍長いか、または１．５～２倍長くてもよい。投与間隔は、当量の、Ｆｃ部分などの非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）に必要であるよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５または６倍長くてもよい。投与間隔は、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４日ごとまたはそれ以上であってよい。

【００１０】

投与間隔は、少なくとも約１．５～５、１．５、２、３、４、もしくは５日またはそれ以上であってよい。

【００１１】

本発明はさらに、第ＶＩＩＩ因子を、それを必要とする対象に投与する方法であって、この対象に、治療量のキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、たとえばキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチドを投与して、当量の、Ｆｃ部分などの非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）により得られる血漿濃度対時間曲線下の面積（ＡＵＣ）よりも少なくとも約１．２５倍大きなＡＵＣを得ることを含む方法を提供する。

【００１２】

本発明はさらに、第ＶＩＩＩ因子を、それを必要とする対象に投与する方法であって、治療量の、第ＶＩＩＩ因子およびＦｃを含むポリペプチドを、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４日ごと、またはそれ以上の投与間隔で投与することを含む方法も提供する。

【００１３】

本発明の方法は、予防的治療またはオンデマンド治療を必要としている対象に対して実施することができる。

【００１４】

オンデマンド治療には、出血症状、関節血症、筋肉出血、口腔出血、大出血、筋肉中への大出血、口腔大出血、外傷、頭部外傷（ｔｒａｕｍａ　ｃａｐｉｔｉｓ、ｈｅａｄ　ｔｒａｕｍａ）、消化管出血、頭蓋内大出血、腹腔内大出血、胸腔内大出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙における出血、腹膜後隙における出血、または腸腰筋鞘における出血の治療が含まれる。対象は、外科的予防、術中管理、または外科手術のための治療を必要としている可能性がある。そのような外科手術としては、たとえば、小手術、大手術、抜歯、扁桃摘出、鼠径部ヘルニア切開、滑膜切除、人工膝関節全置換術、開頭、骨接合、外傷外科、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術または関節置換手術が挙げられる。

【００１５】

オンデマンド治療に関して、前記キメラポリペプチドの投与間隔は、およそ２４～３６

、２４～４８、２４～７２、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、もしくは７２時間ごとまたはそれ以上で１回である。

【００１６】

本発明の方法で使用できる治療量は、約１０～約１００ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、約１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、または９０～１００ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ＩＵ／ｋｇである。

【００１７】

本発明の方法で使用できる治療量は、約１０～約１５０ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、約１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、１４０～１５０ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、約１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、または１５０ＩＵ／ｋｇである。

【００１８】

本発明の方法における対象は、ヒト対象であってもよいし、または非ヒトほ乳類であってもよい。非ヒトほ乳類としては、たとえば、マウス、イヌ、霊長類、サル、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ならびに他の家畜および小動物が挙げられる。投与間隔およびＡＵＣの決定は、単一の対象で、または対象の集団で実施することができる。

【００１９】

第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、ヒト第ＶＩＩＩ因子、または非ヒト第ＶＩＩＩ因子、たとえばブタ、マウスまたはイヌ第ＶＩＩＩ因子であり得る。第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、Ｂドメインの完全または部分欠失を有し得る。

【００２０】

第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含まない表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一であり得る。第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含まない表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と同一であり得る。

【００２１】

第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含む表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一であり得る。第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含む表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と同一であり得る。

【００２２】

Ｆｃ部分（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）は、表２に示すＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番

号１２のアミノ酸６８５～９２４）と少なくとも９０％または９５％同一であり得る。Ｆｃ部分（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）は、表２に示すＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と同一であり得る。

【００２３】

キメラポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と少なくとも９０％もしくは９５％同一であるか、またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と少なくとも９０％もしくは９５％同一である配列を含む可能性がある。キメラポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と同一であるか、またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と同一である配列を含む可能性がある。

【００２４】

キメラポリペプチドは、前記キメラポリペプチドと結合した第２のポリペプチドを含むハイブリッドの形態であってよく、この場合、前記第２のポリペプチドは、Ｆｃを含む可能性があるか、または本質的にＦｃからなる可能性がある。

【００２５】

第２のポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一であるか、またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である配列を含む可能性があるか、または本質的にこの配列からなる可能性がある。第２のポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と同一であるか、またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と同一である配列を含む可能性があるか、または本質的にこの配列からなる可能性がある。

【００２６】

キメラポリペプチドまたはハイブリッドを、少なくとも１つの賦形剤を含む医薬組成物の一部として投与することができる。

【００２７】

本発明はさらに、前記キメラおよびハイブリッドポリペプチド自体、それらをコード化するポリヌクレオチド、当該ポリヌクレオチドを含む培養されたヒト胚細胞、ならびにそのようなキメラおよびハイブリッドポリペプチドを産生する方法、およびそのような方法により産生されるポリペプチドも提供する。

本実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

第ＶＩＩＩ因子の投与を必要とする被験体への第ＶＩＩＩ因子の投与方法であって、前記第ＶＩＩＩ因子部分からなる等価量のポリペプチドに必要とされる用量投与間隔より少なくとも約１．５倍長い用量投与間隔で、第ＶＩＩＩ因子部分および第二部分を含む治療的用量のキメラポリペプチドを前記被験体に投与することを包含する方法。

（項目２）

前記キメラポリペプチドがＦｃ部分を含む項目１記載の方法。

（項目３）

前記用量投与間隔が、前記第ＶＩＩＩ因子部分からなる等価量のポリペプチドに必要とされる用量投与間隔より、少なくとも約１．５～６倍、１．５～５倍、１．５～４倍、１．５～３倍または１．５～２倍長い項目１または２記載の方法。

（項目４）

前記用量投与間隔が、前記第ＶＩＩＩ因子部分からなる等価量のポリペプチドに必要とされる用量投与間隔より、少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５または６倍長い項目３記載の方法。

（項目５）

前記キメラポリペプチドの前記用量投与間隔が、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３または１４日毎またはそれ以上の間隔である項目１～４のいずれかに記載の方法。

（項目６）

前記被験体が予防的処置を必要としている項目１～５のいずれかに記載の方法。

（項目７）

前記被験体がオンデマンド処置を必要としている項目１～４のいずれかに記載の方法。

（項目８）

前記被験体が出血症状出現に対する処置を必要としている項目７記載の方法。

（項目９）

前記被験体が、関節出血症、筋肉出血、口腔出血（ｏｒａｌ　ｂｌｅｅｄ）、出血、筋肉への出血、口腔出血（ｏｒａｌ　ｈｅｍｏｒｒｈａｇｅ）、外傷、頭部外傷、消化器出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙における出血、腹膜後隙における出血、あるいは腸腰筋鞘における出血に関する処置を必要としている項目８記載の方法。

（項目１０）

前記被験体が、外科的予防、手術中管理または外科手術に関する処置を必要としている項目７記載の方法。

（項目１１）

前記外科手術が、小手術、大手術、抜歯術、扁桃摘出術、鼠径ヘルニア切除術、滑膜切除術、人工膝関節全置換術、開頭術、骨接合術、外傷手術、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術または関節置換術である項目１０記載の方法。

（項目１２）

前記キメラポリペプチドの前記用量投与間隔が、２４～３６、２４～４８、２４～７２、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１または７２時間あるいはそれより長い時間毎に約１回である項目７～１１のいずれかに記載の方法。

（項目１３）

前記治療的用量が１０～１００　ＩＵ／ｋｇである項目１～１２のいずれかに記載の方法。

（項目１４）

前記治療的用量が１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０または９０～１００　ＩＵ／ｋｇである項目１２記載の方法。

（項目１５）

前記治療的用量が１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００　ＩＵ／ｋｇである項目１３記載の方法。

（項目１６）

前記被験体がヒトである項目１～１５のいずれかに記載の方法。

（項目１７）

前記第ＶＩＩＩ因子がヒト第ＶＩＩＩ因子である項目１～１６のいずれかに記載の方法。

（項目１８）

前記第ＶＩＩＩ因子がＢドメインの完全または部分欠失を有する項目１～１７のいずれかに記載の方法。

（項目１９）

前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目１７記載の方法。

（項目２０）

前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と同一である項目１９記載の方法。

（項目２１）

前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目１７記載の方法。

（項目２２）

前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と同一である項目２１記載の方法。

（項目２３）

前記キメラポリペプチドの前記第二部分が、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目１７または１８記載の方法。

（項目２４）

前記キメラポリペプチドの前記第二部分が、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と同一である項目２３記載の方法。

（項目２５）

前記キメラポリペプチドが、前記キメラポリペプチドと結合した第二ポリペプチドを含むハイブリッドの形態であり、前記第二ポリペプチドが本質的にＦｃからなる項目１～２４のいずれかに記載の方法。

（項目２６）

前記キメラポリペプチドが、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である配列を含む項目２５記載の方法。

（項目２７）

前記キメラポリペプチドが、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸

配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と同一である配列を含む項目２６記載の方法。
（項目２８）
前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である配列からなる項目２５～２７のいずれかに記載の方法。
（項目２９）
前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と同一である配列からなる項目２８記載の方法。
（項目３０）
前記キメラポリペプチドが、少なくとも１つの賦形剤を含む薬学的組成物の一部として投与される項目１～２９のいずれかに記載の方法。
（項目３１）
第ＶＩＩＩ因子の投与を必要とする被験体に第ＶＩＩＩ因子を投与する方法であって、第ＶＩＩＩ因子部分および第二部分を含む治療的用量のキメラポリペプチドを前記被験体に投与して、前記第ＶＩＩＩ因子部分からなる等価量のポリペプチドにより得られるＡＵＣより少なくとも約１．２５倍大きい血漿濃度対時間曲線下面積（ＡＵＣ）を得ることを包含する方法。
（項目３２）
前記キメラポリペプチドが、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３または１４日毎またはそれ以上の用量投与間隔で投与される項目３１記載の方法。
（項目３３）
前記被験体が予防的処置を必要としている項目３１～３２のいずれかに記載の方法。
（項目３４）
前記被験体がオンデマンド処置を必要としている項目３１記載の方法。
（項目３５）
前記被験体が出血症状出現に対する処置を必要としている項目３２記載の方法。
（項目３６）
前記被験体が、関節出血症、筋肉出血、口腔出血（ｏｒａｌ　ｂｌｅｅｄ）、出血、筋肉への出血、口腔出血（ｏｒａｌ　ｈｅｍｏｒｒｈａｇｅ）、外傷、頭部外傷、消化器出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙における出血、腹膜後隙における出血、あるいは腸腰筋鞘における出血に対する処置を必要としている項目３３記載の方法。
（項目３７）
前記被験体が、外科的予防、手術中管理または外科手術に対する処置を必要としている項目３４記載の方法。
（項目３８）
前記外科手術が、小手術、大手術、抜歯術、扁桃摘出術、鼠径ヘルニア切除術、滑膜切除術、人工膝関節全置換術、開頭術、骨接合術、外傷手術、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術または関節置換術である項目３７記載の方法。
（項目３９）
前記キメラポリペプチドの前記用量投与間隔が、２４～３６、２４～４８、２４～７２、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１または７２時間あるいはそれより長

い時間毎に約１回である項目３４～３８のいずれかに記載の方法。
（項目４０）
前記治療的用量が１０～１００　ＩＵ／ｋｇである項目３１～３９のいずれかに記載の方法。
（項目４１）
前記治療的用量が１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０または９０～１００　ＩＵ／ｋｇである項目４０記載の方法。
（項目４２）
前記治療的用量が１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００　ＩＵ／ｋｇである項目４１記載の方法。
（項目４３）
前記被験体がヒトである項目３１～４２のいずれかに記載の方法。
（項目４４）
前記第ＶＩＩＩ因子がヒト第ＶＩＩＩ因子である項目３１～４３のいずれかに記載の方法。
（項目４５）
前記第ＶＩＩＩ因子がＢドメインの完全または部分欠失を有する項目３１～４４のいずれかに記載の方法。
（項目４６）
前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目４４記載の方法。
（項目４７）
前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と同一である項目４６記載の方法。
（項目４８）
前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目４４記載の方法。
（項目４９）
前記キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と同一である項目４８記載の方法。
（項目５０）
前記キメラポリペプチドの前記第二部分が、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目４３または４４記載の方法。
（項目５１）

前記キメラポリペプチドの前記第二部分が、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と同一である項目５０記載の方法。

（項目５２）

前記キメラポリペプチドが、前記キメラポリペプチドと結合した第二ポリペプチドを含むハイブリッドの形態であり、前記第二ポリペプチドが本質的にＦｃからなる項目３１～５１のいずれかに記載の方法。

（項目５３）

前記キメラポリペプチドが、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である配列を含む項目５２記載の方法。

（項目５４）

前記キメラポリペプチドが、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と同一である配列を含む項目５３記載の方法。

（項目５５）

前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である配列からなる項目５２～５４のいずれかに記載の方法。

（項目５６）

前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と同一である配列からなる項目５５記載の方法。

（項目５７）

前記キメラポリペプチドが、少なくとも１つの賦形剤を含む薬学的組成物の一部として投与される項目３１～５６のいずれかに記載の方法。

（項目５８）

第ＶＩＩＩ因子の投与を必要とする被験体に第ＶＩＩＩ因子を投与する方法であって、第ＶＩＩＩ因子およびＦｃを含む治療的用量のポリペプチドを、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３または１４日毎またはそれ以上の用量投与間隔で前記被験体に投与することを包含する方法。

（項目５９）

前記被験体が予防的処置を必要としている項目５８記載の方法。

（項目６０）

前記治療的用量が１０～１００　ＩＵ／ｋｇである項目５８～５９のいずれかに記載の方法。

（項目６１）

前記治療的用量が１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０または９０～１００　ＩＵ／ｋｇである項目６０記載の方法。

（項目６２）

前記治療的用量が１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６

０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００　ＩＵ／ｋｇである項目６１記載の方法。
（項目６３）
前記被験体がヒトである項目５８～６２のいずれかに記載の方法。
（項目６４）
前記第ＶＩＩＩ因子がヒト第ＶＩＩＩ因子である項目５８～６３のいずれかに記載の方法。
（項目６５）
前記第ＶＩＩＩ因子がＢドメインの完全または部分欠失を有する項目５８～６４のいずれかに記載の方法。
（項目６６）
前記第ＶＩＩＩ因子が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目６４記載の方法。
（項目６７）
前記第ＶＩＩＩ因子が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と同一である項目６６記載の方法。
（項目６８）
前記第ＶＩＩＩ因子が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目６４記載の方法。
（項目６９）
前記第ＶＩＩＩ因子が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と同一である項目６８記載の方法。
（項目７０）
前記第二部分が、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目６４または６５記載の方法。
（項目７１）
前記第二部分が、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と同一である項目７０記載の方法。
（項目７２）
前記キメラポリペプチドが、前記キメラポリペプチドと結合した第二ポリペプチドを含むハイブリッドの形態の第ＶＩＩＩ因子－Ｆｃキメラポリペプチドであり、前記第二ポリペプチドが本質的にＦｃからなる項目５８～７１のいずれかに記載の方法。
（項目７３）
前記キメラポリペプチドが、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第Ｖ

ＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である配列を含む項目７２記載の方法。
（項目７４）
前記キメラポリペプチドが、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と同一である配列を含む項目７３記載の方法。
（項目７５）
前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である配列からなる項目７２～７４のいずれかに記載の方法。
（項目７６）
前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と９０％または９５％同一である配列からなる項目７５記載の方法。
（項目７７）
前記ポリペプチドが、少なくとも１つの賦形剤を含む薬学的組成物の一部として投与される項目５８～７６のいずれかに記載の方法。
（項目７８）
シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である第ＶＩＩＩ因子およびＦｃを含むポリペプチド。
（項目７９）
前記第ＶＩＩＩ因子が、シグナル配列を有さない、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と同一である項目７８記載のポリペプチド。
（項目８０）
シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一である第ＶＩＩＩ因子およびＦｃを含むポリペプチド。
（項目８１）
前記第ＶＩＩＩ因子が、シグナル配列を有する、表２に示した第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と同一である項目８０記載のポリペプチド。
（項目８２）
前記Ｆｃが、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と少なくとも９０％または９５％同一である項目７８～８１記載のポリペプチド。
（項目８３）

前記Ｆｃが、表２に示したＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）と同一である項目８２記載のポリペプチド。

（項目８４）

シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一である配列を含む項目７８記載のポリペプチド。

（項目８５）

シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉ）に示した第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）少なくとも９０％または９５％同一である配列を含む項目８４記載のポリペプチド。

（項目８６）

第二ポリペプチドを含むハイブリッドの形態であり、前記第二ポリペプチドが本質的にＦｃからなる項目７８～８５のいずれかに記載のポリペプチド。

（項目８７）

前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と少なくとも９０％または９５％同一である配列からなる項目８５記載のポリペプチド。

（項目８８）

前記第二ポリペプチドが本質的に、シグナル配列を有さない、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）と同一である、あるいはシグナル配列を有する、表２Ａ（ｉｉ）に示したアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）と９０％または９５％同一である配列からなる項目８６記載のポリペプチド。

（項目８９）

前記第ＶＩＩＩ因子からなるポリペプチドに比して、少なくとも約１．５～６倍、１．５～５倍、１．５～４倍、１．５～３倍または１．５～２倍長い半減期を有する項目７８～８８のいずれかに記載のポリペプチド。

（項目９０）

項目７８～８５のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

（項目９１）

表１の第ＶＩＩＩ因子－Ｆｃヌクレオチド配列（配列番号１、５、７、９または１１）を含む項目９０記載のポリヌクレオチド。

（項目９２）

第ＶＩＩＩ因子－Ｆｃポリペプチドおよび項目８６～８９のいずれかに記載の第二ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

（項目９３）

ベクター、プラスミド、ファージまたはウイルスである項目９０～９２のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

（項目９４）

ＤＮＡまたはＲＮＡである項目９０～９３のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

（項目９５）

項目８９～９４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む培養ヒト胚性細胞。

（項目９６）

ＨＥＫ２９３細胞である項目９５記載の細胞。
（項目９７）
第ＶＩＩＩ因子－Ｆｃハイブリッドタンパク質の産生方法であって、以下の：
コード化第ＶＩＩＩ因子－Ｆｃキメラポリペプチドおよび本質的にＦｃからなるコード化ポリペプチドの発現を可能にする条件下で項目９５または９６記載の細胞を培養すること；そして
コード化第ＶＩＩＩ因子－Ｆｃハイブリッドタンパク質を回収すること
を包含する方法。
（項目９８）
項目９７記載の方法により産生されるタンパク質。
（項目９９）
前記キメラポリペプチドが以下の：
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵するリン脂質小胞と相互作用する能力；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成する能力；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する５分以内にαトロンビンにより活性化される能力；および
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する第ＩＸａ因子と相互作用する能力
からなる群から選択される１つ以上の特質を有する項目１～５７のいずれか一項に記載の方法。
（項目１００）
前記キメラポリペプチドが、以下の：
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＫｍの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＫｍで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｋｍは第Ｘ因子濃度の一関数として測定される）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＶｍａｘの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＶｍａｘで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｖｍａｘは第Ｘ因子濃度の一関数として測定される）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＫｄの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＫｄで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｋｄは第ＩＸａ因子濃度の一関数として測定される）；そして
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＶｍａｘの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＶｍａｘで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｖｍａｘは第ＩＸａ因子濃度の一関数として測定される）；
からなる群から選択される１つ以上の特質を有する項目９９記載の方法。
（項目１０１）
前記ポリペプチドが以下の：
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵するリン脂質小胞と相互作用する能力；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成する能力；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する５分以内にαトロンビンにより活性化される能力；および
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する第ＩＸａ因子と相互作用する能力からなる群から選択される１つ以上の特質を有する項目５８～７７のいずれか一項に記載の方法。
（項目１０２）
前記ポリペプチドが、以下の：

前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＫｍの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＫｍで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｋｍは第Ｘ因子濃度の一関数として測定される）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＶｍａｘの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＶｍａｘで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｖｍａｘは第Ｘ因子濃度の一関数として測定される）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＫｄの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＫｄで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｋｄは第ＩＸａ因子濃度の一関数として測定される）；そして
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＶｍａｘの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＶｍａｘで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｖｍａｘは第ＩＸａ因子濃度の一関数として測定される）；
からなる群から選択される１つ以上の特質を有する項目１０１記載の方法。
（項目１０３）
以下の：
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵するリン脂質小胞と相互作用する能力；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成する能力；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する５分以内にαトロンビンにより活性化される能力；および
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの能力に匹敵する第ＩＸａ因子と相互作用する能力
からなる群から選択される１、約１．５または約２またはそれ以上の特質を有する項目７８～８９および９８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
（項目１０４）
前記ポリペプチドが、以下の：
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＫｍの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＫｍで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｋｍは第Ｘ因子濃度の一関数として測定される）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＶｍａｘの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＶｍａｘで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｖｍａｘは第Ｘ因子濃度の一関数として測定される）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＫｄの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＫｄで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｋｄは第ＩＸａ因子濃度の一関数として測定される）；そして
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのＶｍａｘの約１、約１．５または約２標準偏差以内のＶｍａｘで第Ｘ因子を活性化するＸアーゼ複合体を形成すること（ここで、Ｖｍａｘは第ＩＸａ因子濃度の一関数として測定される）；
からなる群から選択される１つ以上の特質を有する項目１０１記載の方法。
（項目１０５）
前記用量がＩＵ／ｋｇ当たり１．３８　ＩＵ／ｄＬより大きい平均増分回収率（Ｋ値）（活性：観察値）を有する項目１～７７のいずれかに記載の方法。
（項目１０６）
前記用量がＩＵ／ｋｇ当たり少なくとも約１．５、少なくとも約１．８５または少なくとも約２．４６　ＩＵ／ｄＬの平均増分回収率（Ｋ値）（活性：観察値）を有する項目１～７７および１０４のいずれかに記載の方法。
（項目１０７）
前記キメラポリペプチドが、前記患者集団または前記被験体における、以下の：
約２．３３±１．０８　ｍＬ／時／ｋｇまたはそれ未満の前記患者集団における平均

クリアランス（ＣＬ）（活性）；
約１．８～２．６９　ｍＬ／時／ｋｇの前記患者集団における平均クリアランス（ＣＬ）（活性）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドのクリアランスの約６５％である前記患者集団における平均クリアランス（ＣＬ）（活性）；
約１．２２～５．１９　ｍＬ／時／ｋｇの前記被験体におけるクリアランス（ＣＬ）（活性）；
少なくとも約２６．３±８．３３時間の前記患者集団における平均滞留時間（ＭＲＴ）（活性）；
約２５．９～２６．５時間の前記患者集団における平均ＭＲＴ（活性）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの平均ＭＲＴより約１．５倍長い前期患者集団における平均ＭＲＴ（活性）；
約１４～４１．３時間の前記被験体における平均滞留時間（ＭＲＴ）（活性）；
約１８．３±５．７９時間の前記患者集団における平均ｔ１／２ベータ（活性）；
約１８～１８．４時間である前記患者集団における平均ｔ１／２ベータ（活性）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの平均ｔ１／２ベータより約１．５倍長い前記患者集団における平均ｔ１／２ベータ（活性）；
約１１～２６．４時間の前記被験体におけるｔ１／２ベータ（活性）；
ＩＵ／ｋｇ当たり約２．０１±０．４４　ＩＵ／ｄＬの前記患者集団における平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
ＩＵ／ｋｇ当たり約１．８５～２．４６　ＩＵ／ｄＬの前記患者集団における平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチドの平均増分回収率の約９０％である前記患者集団における平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
ＩＵ／ｋｇ当たり約１．３８～２．８８　ＩＵ／ｄＬの前記被験体における増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
約５５．１±１２．３　ｍＬ／ｋｇの前記患者集団における平均Ｖｓｓ（活性）；
約４５．３～５６．１　ｍＬ／ｋｇの前記患者集団における平均Ｖｓｓ（活性）；
約３７．７～７９．４　ｍＬ／ｋｇの前記被験体における平均Ｖｓｓ（活性）；
ＩＵ／ｋｇ当たり約４９．９±１８．２　ＩＵ＊ｈ／ｄＬの前記患者集団における平均ＡＵＣ／用量（活性）；
ＩＵ／ｋｇ当たり約４４．８～５７．６　ＩＵ＊ｈ／ｄＬの前記患者集団における平均ＡＵＣ／用量（活性）；そして
ＩＵ／ｋｇ当たり約１９．２～８１．７　ＩＵ＊ｈ／ｄＬの前記被験体におけるＡＵＣ／用量；
からなる群から選択される１つ以上の薬物動態パラメーターを示す項目１～７５および１０４～１０６のいずれかに記載の方法。
（項目１０８）
前記第二部分がＸＴＥＮまたはアルブミンである項目１～７７および１０４～１０６のいずれかに記載の方法。
（項目１０９）
前記治療的用量が約１０～約１５０、１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、１４０～１５０、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５または１５０　ＩＵ／ｋｇである項目１～７７および１０４～１０６のいずれかに記載の方法。
（項目１１０）
前記用量投与間隔が１．５～５、１．５、２、３、４または５日またはそれ以上である項目１～７７および１０４～１０６のいずれかに記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【００２８】

【図１】ｒＦＶＩＩＩＦｃモノマーの略図である。
【図２】５０ＩＵ／ｋｇの静脈内投与後の血友病ＡマウスにおけるｒｅＦａｃｔｏ（登録商標）と比較したｒＦＶＩＩＩＦｃのＷＢＣＴ（ｎ＝６マウス／群）。
【図３】５０ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃ、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）およびＡｄｖａｔｅ（登録商標）の１回のＩＶ投与後の血友病Ａマウス由来の血漿中の色素生成活性。
【図４Ａ】血友病Ａイヌにおけるｒ ＦＶＩＩＩＦｃおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）のＷＢＣＴ。（Ａ）ｒＦＶＩＩＩＦｃ。（Ｂ）交差研究において、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）と、それに続いてｒＦＶＩＩＩＦｃ。
【図４Ｂ】血友病Ａイヌにおけるｒ ＦＶＩＩＩＦｃおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）のＷＢＣＴ。（Ａ）ｒＦＶＩＩＩＦｃ。（Ｂ）交差研究において、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）と、それに続いてｒＦＶＩＩＩＦｃ。
【図５】血友病Ａイヌにおける静脈内ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の薬物動態学（ＥＬＩＳＡにより測定）。
【図６】血友病Ａイヌにおける単回静脈内投与後のｒＦＶＩＩＩおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の活性（ＦＶＩＩＩ特異的色素生成検定により測定）。
【図７】カニクイザルにおける単回静脈内投与（１２５ＩＵ／ｋｇ）後のｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａの経時的な群平均血漿濃度（ｎ＝６、平均±ＳＤ）。血漿濃度はＥＬＩＳＡにより測定した。
【図８】カニクイザルにおける単回静脈内投与（１２５ＩＵ／ｋｇ）後のｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａの個々の血漿濃度対時間曲線（ｎ＝６、平均±ＳＤ）。血漿濃度はＥＬＩＳＡにより測定した。（Ａ）ＥＬＩＳＡによるｒＦＶＩＩＩＦｃ。（Ｂ）ＥＬＩＳＡによるＸｙｎｔｈａ。
【図９】カニクイザルにおけるｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａの単回静脈内投与（１２５ＩＵ／ｋｇ）後の群平均血漿色素生成活性（ｎ＝６、平均±ＳＤ）。ＦＶＩＩＩ特異的色素生成検定を用いてＦＶＩＩＩ活性を測定した。
【図１０】カニクイザルにおけるｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａの単回静脈内投与（１２５ＩＵ／ｋｇ）後の個々の血漿色素生成活性対時間曲線（ｎ＝６、平均±ＳＤ）。ＦＶＩＩＩ特異的色素生成検定を用いてＦＶＩＩＩ活性を測定した。（Ａ）ｒＦＶＩＩＩＦｃ色素生成活性。（Ｂ）Ｘｙｎｔｈａ色素生成活性。
【図１１】ｒＦＶＩＩＩ－Ｆｃの生化学的特性化：第Ｘ因子濃度の関数としての第Ｘ因子の活性化。
【図１２】ｒＦＶＩＩＩ－Ｆｃの生化学的特性化：第ＩＸａ因子濃度の関数としての第Ｘ因子の活性化。
【図１３Ａ】時間に対する観察された群平均ＦＶＩＩＩ活性（±ＳＥ）（一段階検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ａ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｂ）；および色素生成検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ｃ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｄ））。
【図１３Ｂ】時間に対する観察された群平均ＦＶＩＩＩ活性（±ＳＥ）（一段階検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ａ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｂ）；および色素生成検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ｃ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｄ））。
【図１３Ｃ】時間に対する観察された群平均ＦＶＩＩＩ活性（±ＳＥ）（一段階検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ａ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｂ）；および色素生成検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ｃ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｄ））。
【図１３Ｄ】時間に対する観察された群平均ＦＶＩＩＩ活性（±ＳＥ）（一段階検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ａ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｂ）；および色素生成検定、２５ＩＵ／ｋｇ（Ｃ）または６５ＩＵ／ｋｇ（Ｄ））。
【図１４Ａ】時間に対する観察された群平均ＦＶＩＩＩ活性（±ＳＥ）（一段階検定（Ａ）または色素生成検定（Ｂ））。
【図１４Ｂ】時間に対する観察された群平均ＦＶＩＩＩ活性（±ＳＥ）（一段階検定（Ａ）または色素生成検定（Ｂ））。
【発明を実施するための形態】

【００２９】
本発明は、現在知られている第ＶＩＩＩ因子産物で可能であるよりも長い投与間隔および／または大きなＡＵＣを用いて第ＶＩＩＩ因子で血友病Ａを治療する方法を提供する。本発明はさらに、改善された第ＶＩＩＩ因子キメラポリペプチド、第ＶＩＩＩ因子キメラポリヌクレオチド、および産生方法も提供する。
【００３０】
血友病Ａの治療は、ＦＶＩＩＩ活性を正常レベルの１～５％まで回復させて、特発性出血を予防することを目標とする補充療法による（Ｍａｎｎｕｃｃｉ，　Ｐ．Ｍ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎ．　Ｅｎｇｌ．　Ｊ．　Ｍｅｄ．　３４４：１７７３－９　（２００１）（その全体が参照により本明細書中に組み込まれる））。出血症状をオンデマンドで治療するか、または予防的治療により出血症状が起こるのを防止するために利用可能な血漿由来の組換えＦＶＩＩＩ産物がある。これらの産物の半減期（１０～１２時間）に基づいて（Ｗｈｉｔｅ　Ｇ．Ｃ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈａｅｍｏｓｔ．　７７：６６０－７　（１９９７）；　Ｍｏｒｆｉｎｉ，　Ｍ．，　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　９　（ｓｕｐｐｌ　１）：９４－９９；　ｄｉｓｃｕｓｓｉｏｎ　１００　（２００３））、治療レジメンには、通常、予防のためには週２～３回、そしてオンデマンド治療のためには１日１～３回の頻繁な静脈内投与が必要である（Ｍａｎｃｏ－Ｊｏｈｎｓｏｎ，　Ｍ．Ｊ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎ．　Ｅｎｇｌ．　Ｊ．　Ｍｅｄ．　３５７：５３５－５４４　（２００７））（その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）。そのような頻繁な投与は、苦痛を伴い、かつ不便である。
【００３１】
本発明は、第ＶＩＩＩ因子を、それを必要とする対象に投与する方法であって、対象に、治療量のキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、たとえばキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチド、またはそのようなポリペプチドのハイブリッドを、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない、例えばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）に必要な投与間隔よりも少なくとも約１．５倍長い投与間隔で投与することを含む方法を提供する。
【００３２】
投与間隔は、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない、たとえばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）に必要である投与間隔よりも、少なくとも約１．５～６倍長い、１．５～５倍長い、１．５～４倍長い、１．５～３倍長い、または１．５～２倍長いものであってよい。投与間隔は、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない、たとえばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）に必要である投与間隔よりも、少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５または６倍長くてもよい。投与間隔は、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４日ごとまたはそれ以上であってよい。
【００３３】
投与間隔は、少なくとも約１．５～５、１．５、２、３、４、もしくは５日またはそれ以上であってよい。
【００３４】
本発明はさらに、第ＶＩＩＩ因子を、それを必要とする対象に投与する方法であって、対象に、治療量のキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、たとえばキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチド、またはそのようなポリペプチドのハイブリッドを投与して、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない、たとえばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子部分からなるポリペプチド）により得られる血漿濃度対時間曲線下の面積（ＡＵＣ）よりも少なくとも約１．２５倍大きなＡＵＣを得ることを含む方法も提供する。
【００３５】
本発明はさらに、第ＶＩＩＩ因子を、それを必要とする対象に投与する方法であって、

対象に、治療量の、第ＶＩＩＩ因子およびＦｃを含むポリペプチドまたはそのようなポリペプチドのハイブリッドを、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４日ごとまたはそれ以上の投与間隔で投与することを含む方法も提供する。

【００３６】

本発明の方法は、予防的治療またはオンデマンド治療を必要としている対象に関して実施することができる。

【００３７】

本明細書中で用いられる場合、「投与する」とは、薬剤的に許容される本発明の第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドを、薬剤的に許容される経路で対象に与えることを意味する。好ましい投与経路は、静脈内であり、例えば静脈内注射および静脈内注入である。さらなる投与経路としては、たとえば、皮下、筋肉内、経口、鼻、および肺投与が挙げられる。キメラポリペプチドおよびハイブリッドタンパク質を、少なくとも１つの賦形剤を含む医薬組成物の一部として投与することができる。

【００３８】

「血漿濃度対時間曲線下面積（ＡＵＣ）」とは、本明細書中で用いられる場合、薬理学における専門用語と同じであり、投与後の第ＶＩＩＩ因子の吸収の速度および程度に基づく。ＡＵＣは、特定の時間、たとえば１２、１８、２４、３６、４８、もしくは７２時間にわたって、または曲線の勾配に基づいた外挿を用いて無限大で決定される。本明細書中で他に特別の定めがない限り、ＡＵＣは無限大で決定される。ＡＵＣの決定は、単一の対象において、または平均を計算する対象の集団において実施することができる。

【００３９】

第ＶＩＩＩ因子の「Ｂドメイン」は、本明細書中で用いられる場合、内部アミノ酸配列同一性およびトロンビンによるタンパク質分解的切断部位、例えば完全長ヒト第ＶＩＩＩ因子の残基Ｓｅｒ７４１－Ａｒｇ１６４８によって定義される当該技術分野で公知のＢドメインと同じである。他のヒト第ＶＩＩＩ因子ドメインは、以下のアミノ酸残基：Ａ１、残基Ａｌａ１－Ａｒｇ３７２；Ａ２、残基Ｓｅｒ３７３－Ａｒｇ７４０；Ａ３、残基Ｓｅｒ１６９０－Ｉｌｅ２０３２；Ｃ１、残基Ａｒｇ２０３３－Ａｓｎ２１７２；Ｃ２、残基Ｓｅｒ２１７３－Ｔｙｒ２３３２によって定義される。Ａ３－Ｃ１－Ｃ２配列は残基Ｓｅｒ１６９０－Ｔｙｒ２３３２を含む。残りの配列、残基Ｇｌｕ１６４９－Ａｒｇ１６８９は、通常、第ＶＩＩＩ因子軽鎖活性化ペプチドと呼ばれる。ブタ、マウスおよびイヌ第ＶＩＩＩ因子について、Ｂドメインをはじめとするドメインの全てについての境界の位置も、当該技術分野で公知である。好ましくは、第ＶＩＩＩ因子のＢドメインは欠失している（Ｂドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子」または「ＢＤＤＦＶＩＩＩ」）。ＢＤＤＦＶＩＩＩの一例はＲＥＦＡＣＴＯ（組換えＢＤＤＦＶＩＩＩ）であり、これは、表２Ａ（ｉ）の配列の第ＶＩＩＩ因子部分（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８または１～１４３８）と同じ配列を有する。

【００４０】

「Ｂドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子」は、米国特許第６，３１６，２２６号、第６，３４６，５１３号、第７，０４１，６３５号、第５，７８９，２０３号、第６，０６０，４４７号、第５，５９５，８８６号、第６，２２８，６２０号、第５，９７２，８８５号、第６，０４８，７２０号、第５，５４３，５０２号、第５，６１０，２７８号、第５，１７１，８４４号、第５，１１２，９５０号、第４，８６８，１１２号、および第６，４５８，５６３号（そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で開示される完全または部分欠失を有し得る。いくつかの実施形態において、本発明のＢドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子配列は、米国特許第６，３１６，２２６号の第４カラム第４行から第５カラム第２８行および実施例１～５（またＵＳ６，３４６，５１３においても）で開示される欠失のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態において、本発明のＢドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子は、米国特許第５，７８９，２０３号の第２カラム第２６～５１行および実施例５～８（またＵＳ６，０６０，４４７、ＵＳ５，５９５，８８６、およびＵＳ６，２２８，６２０）で開示される欠失を有する。いくつかの実施形態において、Ｂ

ドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子は、米国特許第５，９７２，８８５号の第１カラム第２５行から第２カラム第４０行；米国特許第６，０４８，７２０号の第６カラム第１～２２行および実施例１；米国特許第５，５４３，５０２号の第２カラム第１７～４６行；米国特許第５，１７１，８４４の第４カラム第２２行から第５カラム第３６行；米国特許第５，１１２，９５０号の第２カラム第５５～６８行、図２、および実施例１；米国特許第４，８６８，１１２号の第２カラム第２行から第１９カラム第２１行および表２；米国特許第７，０４１，６３５号の第２カラム第１行から第３カラム第１９行、第３カラム第４０行から第４カラム第６７行、第７カラム第４３行から第８カラム第２６行、および第１１カラム第５行から第１３カラム第３９行；または米国特許第６，４５８，５６３号の第４カラム第２５～５３行で記載されている欠失を有する。いくつかの実施形態において、Ｂドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子は、Ｂドメインの大部分が欠失しているが、国際公開第９１／０９１２２号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で開示されるように、第１翻訳産物の２つのポリペプチド鎖へのインビボタンパク質分解処理に必須であるＢドメインのアミノ末端配列を依然として含む。いくつかの実施形態において、Ｂドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子は、アミノ酸７４７～１６３８が欠失している構造にされる。すなわち、Ｂドメインが実質的に完全に欠失している。Ｈｏｅｂｅｎ Ｒ．Ｃ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５（１３）：７３１８－７３２３（１９９０）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。Ｂドメイン欠失第ＶＩＩＩ因子はさらに、第ＶＩＩＩ因子のアミノ酸７７１～１６６６またはアミノ酸８６８～１５６２が欠失していてもよい。Ｍｅｕｌｉｅｎ Ｐ．，ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．２（４）：３０１－６（１９８８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。本発明の一部であるさらなるＢドメイン欠失としては、たとえば：アミノ酸９８２～１５６２または７６０～１６３９の欠失（Ｔｏｏｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８６）８３，５９３９－５９４２））、７９７～１５６２の欠失（Ｅａｔｏｎ，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９８６）２５：８３４３－８３４７））、７４１～１６４６の欠失（Ｋａｕｆｍａｎ（ＰＣＴ公開出願番号国際公開第８７／０４１８７号））、７４７～１５６０の欠失（Ｓａｒｖｅｒ，ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ（１９８７）６：５５３－５６４））、７４１～１６４８の欠失（Ｐａｓｅｋ（ＰＣＴ出願第８８／００８３１号））、８１６～１５９８または７４１～１６８９の欠失（Ｌａｇｎｅｒ（Ｂｅｈｒｉｎｇ Ｉｎｓｔ．Ｍｉｔｔ．（１９８８）Ｎｏ ８２：１６－２５，ＥＰ ２９５５９７））（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）が挙げられる。前記欠失のそれぞれは、任意の第ＶＩＩＩ因子配列でなされる可能性がある。

【００４１】

「キメラポリペプチド」とは、本明細書中で用いられる場合、その中に異なる起源由来の少なくとも２つのポリペプチド（またはサブ配列もしくはペプチド）を含むポリペプチドを意味する。キメラポリペプチドには、たとえば異なる遺伝子、異なるｃＤＮＡ、または異なる動物もしくは他の種などの異なる起源由来の２、３、４、５、６、７、またはそれ以上のポリペプチドが含まれ得る。キメラポリペプチドは、たとえば、異なるサブ配列を結合する１以上のリンカーを含み得る。したがって、１つのキメラポリペプチド内で、サブ配列を直接結合することができるか、もしくはリンカーを介して間接的に結合させることができるか、またはその両方である。キメラポリペプチドは、たとえば、シグナル配列などのさらなるペプチドおよびタンパク質精製または検出を支援する６ＨｉｓおよびＦＬＡＧなどの配列を含み得る。加えて、キメラポリペプチドは、Ｎ末端および／またはＣ末端へのアミノ酸またはペプチド付加を有し得る。

【００４２】

いくつかの実施形態において、キメラポリペプチドは、第ＶＩＩＩ因子部分と非第ＶＩＩＩ因子部分とを含む。例示的な非第ＶＩＩＩ因子部分としては、例えば、Ｆｃ、ＸＴＥＮ、およびアルブミンが挙げられる。本発明の例示的なキメラポリペプチドとしては、例えば、キメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチド、キメラ第ＶＩＩＩ因子－ＸＴＥＮポリ

ペプチド、およびキメラ第ＶＩＩＩ因子－アルブミンポリペプチドが挙げられる。

【００４３】

例示的なキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチドとしては、例えば、配列番号２、６、８、１０、および１２（表２）（それらの、シグナル配列および配列番号４のキメラＦｃポリペプチドの有無を問わない）が挙げられる（表２）。

【００４４】

キメラポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と少なくとも９０％もしくは９５％同一の配列またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と少なくとも９０％または９５％同一の配列を含み得る。キメラポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１６６５）と同一の配列またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉ）に示される第ＶＩＩＩ因子およびＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１６６５）と同一の配列を含み得る。

【００４５】

前述のように、例示的なキメラポリペプチドとしては、１以上のＸＴＥＮポリペプチドと融合した第ＶＩＩＩ因子を含む。Ｓｃｈｅｌｌｅｎｂｕｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２７：１１８６－９０（２００９）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。第ＶＩＩＩ因子は、ＸＴＥＮポリペプチドのＮ末端またはＸＴＥＮポリペプチドのＣ末端と融合する可能性がある。ただし、第ＶＩＩＩ因子－ＸＴＥＮ融合タンパク質の第ＶＩＩＩ因子成分をプロテアーゼにより処理して、処理された第ＶＩＩＩ因子含有ポリペプチドを得ることができるものとする。プロテアーゼ部位がＸＴＥＮ部分と第ＶＩＩＩ因子部分との間に含まれて、そのような処理が可能になる可能性がある。ＸＴＥＮポリペプチドとしては、例えば、国際公開第２００９／０２３２７０号、国際公開第２０１０／０９１１２２号、国際公開第２００７／１０３５１５号、ＵＳ２０１０／０１８９６８２、およびＵＳ２００９／００９２５８２（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）で開示されているものが挙げられる。

【００４６】

前述のように、例示的なキメラポリペプチドは、１以上のアルブミンポリペプチドと融合した第ＶＩＩＩ因子も含む。好ましくは、アルブミンはヒトアルブミンである。第ＶＩＩＩ因子は、アルブミンのＮ末端またはアルブミンのＣ末端のいずれかと融合し得る。ただし、第ＶＩＩＩ因子－アルブミン融合タンパク質の第ＶＩＩＩ因子成分を酵素的に活性なプロタンパク質コンベルターゼにより処理して、処理された第ＶＩＩＩ因子含有ポリペプチドを得ることができるものとする。本発明で使用できるアルブミンの例、たとえばそのフラグメントは公知である。たとえば、米国特許第７，５９２，０１０号；米国特許第６，６８６，１７９号；およびＳｃｈｕｌｔｅ，Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ Ｒｅｓ．１２４ Ｓｕｐｐｌ．２：Ｓ６－Ｓ８（２００９）（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）。

【００４７】

いくつかの実施形態において、第ＶＩＩＩ因子部分を含むキメラポリペプチドは、同じ第ＶＩＩＩ因子部分からなり、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まないポリペプチドよりも、増加した半減期（ｔ１／２）を有する。ｔ１／２が増加したキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドを、本明細書中では長時間作用性第ＶＩＩＩ因子と呼ぶ場合がある。長時間作用性キメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドとしては、例えば、Ｆｃに融合した第ＶＩＩＩ因子（例えば、ＦＶＩＩＩＦｃモノマーダイマーハイブリッドなどのハイブリッドの形態のキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドを含む；実施例１、図１、および表２Ａ；ならびに米国特許第７，４０４，９５６号および第７，３４８，００４号を参照）、ＸＴＥＮに融合した第ＶＩＩＩ因子、およびアルブミンに融合した第ＶＩＩＩ因子が挙げられる。

【００４８】

「培養」、「培養する」および「培養している」とは、本明細書中で用いられる場合、細胞増殖もしくは分裂を可能にするインビトロ条件下で細胞をインキュベートすること、または細胞を生きた状態で維持すること、を意味する。「培養された細胞」とは、本明細書中で用いられる場合、インビトロで繁殖する細胞を意味する。

【００４９】

「第ＶＩＩＩ因子」とは、本明細書中で用いられる場合、他に特別の定めがない限り、凝固においてその通常の役割の機能的第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドを意味する。したがって、第ＶＩＩＩ因子という用語は、機能的である変異体ポリペプチドを包含する。好ましい第ＶＩＩＩ因子タンパク質は、ヒト、ブタ、イヌ、およびネズミ第ＶＩＩＩ因子タンパク質である。背景技術のセクションで記載したように、多くの機能的フラグメント、突然変異体および修飾バージョンと同様に、完全長ポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列は知られている。ヒト第ＶＩＩＩ因子配列の例は、配列番号２、６、８、１０、および１２（表２）においてサブ配列として示される。第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドとしては、例えば、完全長第ＶＩＩＩ因子、Ｎ末端でＭｅｔがない完全長第ＶＩＩＩ因子、成熟第ＶＩＩＩ因子（シグナル配列がない）、Ｎ末端でさらなるＭｅｔを有する成熟第ＶＩＩＩ因子、および／またはＢドメインが完全または部分的に欠失した第ＶＩＩＩ因子が挙げられる。好ましい第ＶＩＩＩ因子変異体は、部分欠失または完全欠失にかかわらず、Ｂドメイン欠失を含む。

【００５０】

前述および後述のように、非常に多くの機能的第ＶＩＩＩ因子変異体が知られている。加えて、第ＶＩＩＩ因子における数百の非機能的突然変異が血友病患者で同定され、これらの突然変異の第ＶＩＩＩ因子機能に対する影響は、置換の性質よりも、第ＶＩＩＩ因子の３次元構造内のどこにそれらがあるかによるものであることが見出されている（Ｃｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｕｍ．　Ｍｕｔａｔ．　１９：２７４－８　（２００２））（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。加えて、ヒトおよび他の種由来の第ＶＩＩＩ因子の比較により、機能に必要である可能性がある保存された残基が特定された（Ｃａｍｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈａｅｍｏｓｔ．　７９：３１７－２２　（１９９８）；ＵＳ６，２５１，６３２）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【００５１】

ヒト第ＶＩＩＩ因子遺伝子がほ乳類細胞で単離され、発現され（Ｔｏｏｌｅ，　Ｊ．Ｊ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　３１２：３４２－３４７　（１９８４）；　Ｇｉｔｓｃｈｉｅｒ，　Ｊ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　３１２：３２６－３３０　（１９８４）；　Ｗｏｏｄ，　Ｗ．　Ｉ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　３１２：３３０－３３７　（１９８４）；　Ｖｅｈａｒ，　Ｇ．　Ａ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　３１２：３３７－３４２　（１９８４）；国際公開第８７／０４１８７号；国際公開第８８／０８０３５号；国際公開第８８／０３５５８号；米国特許第４，７５７，００６）（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）、そしてアミノ酸配列がｃＤＮＡから推定された。Ｃａｐｏｎら、米国特許第４，９６５，１９９（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、ほ乳類宿主細胞における第ＶＩＩＩ因子の産生およびヒト第ＶＩＩＩ因子の精製のための組換えＤＮＡ法を開示している。ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）細胞およびＢＨＫＣ（ベビーハムスター腎臓細胞）におけるヒト第ＶＩＩＩ因子発現が報告されている。Ｂドメインの一部または全部を欠失させるためにヒト第ＶＩＩＩ因子を修飾し（米国特許第４，９９４，３７１号および第４，８６８，１１２号（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる））、そしてヒト第ＶＩＩＩ因子Ｂドメインのヒト第Ｖ因子Ｂドメインでの置換が実施された（米国特許第５，００４，８０３号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。ヒト第ＶＩＩＩ因子をコード化するｃＤＮＡ配列および予想されるアミノ酸配列はそれぞれ、米国出願公開第２００５／０１００９９０号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号１および２で示される。

【００５２】
米国特許第５，８５９，２０４号、Ｌｏｌｌａｒ，　Ｊ．　Ｓ．（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、抗原性が減少し、かつ免疫反応性が減少した第ＶＩＩＩ因子の機能的突然変異体を報告している。米国特許第６，３７６，４６３号、Ｌｏｌｌａｒ，　Ｊ．　Ｓ．（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）も、免疫反応性が減少した第ＶＩＩＩ因子の突然変異体を報告している。米国出願公開第２００５／０１００９９０号（Ｓａｅｎｋｏら、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、第ＶＩＩＩ因子のＡ２ドメインにおける機能的突然変異を報告している。
【００５３】
Ｂドメイン欠失を含む多くの機能的第ＶＩＩＩ因子分子が以下の特許で開示されている：ＵＳ６，３１６，２２６およびＵＳ６，３４６，５１３（どちらもＢａｘｔｅｒに譲渡）；ＵＳ７，０４１，６３５（Ｉｎ２Ｇｅｎに譲渡）；ＵＳ５，７８９，２０３、ＵＳ６，０６０，４４７、ＵＳ５，５９５，８８６、およびＵＳ６，２２８，６２０（Ｃｈｉｒｏｎに譲渡）；ＵＳ５，９７２，８８５およびＵＳ６，０４８，７２０（Ｂｉｏｖｉｔｒｕｍに譲渡）、ＵＳ５，５４３，５０２およびＵＳ５，６１０，２７８（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋに譲渡）；ＵＳ５，１７１，８４４（Ｉｍｍｕｎｏ　Ａｇに譲渡）；ＵＳ５，１１２，９５０（Ｔｒａｎｓｇｅｎｅ　Ｓ．Ａ．に譲渡）；ＵＳ４，８６８，１１２（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅに譲渡）（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）。
【００５４】
ブタ第ＶＩＩＩ因子配列は公開され（Ｔｏｏｌｅ，　Ｊ．Ｊ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８３：５９３９－５９４２（１９８６））（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ブタ脾臓ｃＤＮＡライブラリーからの第ＶＩＩＩ因子配列のＰＣＲ増幅から得られる完全ブタｃＤＮＡ配列が報告されている（Ｈｅａｌｅｙ，　Ｊ．Ｆ．，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｌｏｏｄ　８８：４２０９－４２１４　（１９９６）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。全ドメイン、全サブユニット、および特異的アミノ酸配列の置換を有するハイブリッドヒト／ブタ第ＶＩＩＩ因子が、ＬｏｌｌａｒおよびＲｕｎｇｅによる米国特許第５，３６４，７７１号、ならびに国際公開第９３／２００９３号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で開示された。最近では、ブタ第ＶＩＩＩ因子のＡ１およびＡ２ドメインのヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列ならびにブタＡ１および／またはＡ２ドメインが対応するヒトドメインで置換されたキメラ第ＶＩＩＩ因子が国際公開第９４／１１５０３号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で報告された。米国特許第５，８５９，２０４号、Ｌｏｌｌａｒ，　Ｊ．Ｓ．も、ブタｃＤＮＡおよび推定されたアミノ酸配列を開示している。Ｅｍｏｒｙに譲渡された第６，４５８，５６３号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、Ｂドメイン欠失ブタ第ＶＩＩＩ因子を開示している。
【００５５】
第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含まない表２に示された第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一であり得る。第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含まない表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１～１４３８；配列番号６のアミノ酸１～２３３２；配列番号８のアミノ酸１～７４０；配列番号１０のアミノ酸１～７４５；または配列番号１２のアミノ酸１～６８４）と同一であり得る。
【００５６】
第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含む表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４

３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と少なくとも９０％または９５％同一であり得る。第ＶＩＩＩ因子（またはキメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分）は、シグナル配列を含む表２に示される第ＶＩＩＩ因子アミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸－１９～１４３８；配列番号６のアミノ酸－１９～２３３２；配列番号８のアミノ酸－１９～７４０；配列番号１０のアミノ酸－１９～７４５；または配列番号１２のアミノ酸－２０～６８４）と同一であり得る。

【００５７】

「当量」とは、本明細書中で用いられる場合、国際単位で表されるのと同じ量の第ＶＩＩＩ因子活性を意味し、これは問題のポリペプチドの分子量に無関係である。１国際単位（ＩＵ）の第ＶＩＩＩ因子活性は、１ミリリットルの正常ヒト血漿中の第ＶＩＩＩ因子の量にほぼ対応する。ヨーロッパ薬局方色素生成性基質検定および一段階凝固検定をはじめとするいくつかの検定が第ＶＩＩＩ因子活性を測定するために利用可能である。

【００５８】

「Ｆｃ」は、本明細書中で用いられる場合、他に特別の定めがない限り、機能的新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）結合パートナーを意味する。ＦｃＲｎ結合パートナーは、ＦｃＲｎ受容体により特異的に結合され得る任意の分子であり、その結果、ＦｃＲｎ結合パートナーのＦｃＲｎ受容体による活発な輸送が起こる。したがって、Ｆｃという用語には、機能的であるＩｇＧ　Ｆｃの任意の変異体が含まれる。ＦｃＲｎ受容体と結合するＩｇＧのＦｃ部分の領域は、Ｘ線結晶学に基づいて記載されている（Ｂｕｒｍｅｉｓｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．　１９９４，　Ｎａｔｕｒｅ　３７２：３７９（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。ＦｃのＦｃＲｎとの主な接触域は、ＣＨ２およびＣＨ３ドメインの接合点付近である。Ｆｃ－ＦｃＲｎ接触は、全て１つのＩｇ重鎖内である。ＦｃＲｎ結合パートナーとしては、例えば、全ＩｇＧ、ＩｇＧのＦｃフラグメント、およびＦｃＲｎの完全結合領域を含むＩｇＧの他のフラグメントが挙げられる。主な接触部位としては、ＣＨ２ドメインのアミノ酸残基２４８、２５０～２５７、２７２、２８５、２８８、２９０～２９１、３０８～３１１、および３１４ならびにＣＨ３ドメインのアミノ酸残基３８５～３８７、４２８、および４３３～４３６が挙げられる。免疫グロブリンもしくは免疫グロブリンフラグメント、または領域のアミノ酸ナンバリングについての言及は、すべて、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．　１９９１，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，　Ｕ．Ｓ．　Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ，　Ｂｅｔｈｅｓｄａ；　ＭＤ（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に基づく。（ＦｃＲｎ受容体はヒトをはじめとするいくつかのほ乳類種から単離されている。ヒトＦｃＲｎ、ラットＦｃＲｎ、およびマウスＦｃＲｎの配列は公知である（Ｓｔｏｒｙ　ｅｔ　ａｌ．　１９９４，　Ｊ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．　１８０：　２３７７）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。Ｆｃは、免疫グロブリンのヒンジ領域の有無にかかわらず免疫グロブリンのＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含み得る。例示的なＦｃ変異体は、国際公開第２００４／１０１７４０号および国際公開第２００６／０７４１９９号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で提供される。

【００５９】

Ｆｃ（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）は、１以上の突然変異、および突然変異の組み合わせを含み得る。

【００６０】

Ｆｃ（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）は、Ｏｇａｎｅｓｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　４６：１７５０　（２００９）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で開示されているようなＭ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、およびそれらの組み合わせなどの増加した半減期を付与する突然変異；Ｖａｃｃａｒｏ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　２３：１２８３　（２００５）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で開示されているようなＨ４３３Ｋ

、Ｎ４３４Ｆ、およびそれらの組み合わせ；ＵＳ２００９／０２６４６２７Ａ１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の１～２ページ、段落［００１２］、ならびに実施例９および１０で開示される突然変異体；ならびにＵＳ２００９０１６３６９９Ａ１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の２ページ、段落［００１４］～［００２１］で開示される突然変異体を含み得る。

【００６１】

Ｆｃ（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）としてはさらに、例えば、以下の突然変異を挙げることができる：ＩｇＧのＦｃ領域は、部位特異的突然変異誘発法などのよく認識された手順に従って修飾して、修飾ＩｇＧもしくはＦｃフラグメントまたはそれらの部分を得ることができ、これらはＦｃＲｎにより結合される。そのような修飾には、例えば、ＦｃＲｎ接触部位から遠い修飾ならびにＦｃＲｎに対する結合を保存するか、またはさらには増強する接触部位内の修飾が含まれる。例えば、ヒトＩｇＧ１Ｆｃ中の以下の１つのアミノ酸残基（Ｆｃｙ１）は、ＦｃＲｎに対するＦｃ結合親和性を著しく失うことなく置換され得る：Ｐ２３８Ａ、Ｓ２３９Ａ、Ｋ２４６Ａ、Ｋ２４８Ａ、Ｄ２４９Ａ、Ｍ２５２Ａ、Ｔ２５６Ａ、Ｅ２５８Ａ、Ｔ２６０Ａ、Ｄ２６５Ａ、Ｓ２６７Ａ、Ｈ２６８Ａ、Ｅ２６９Ａ、Ｄ２７０Ａ、Ｅ２７２Ａ、Ｌ２７４Ａ、Ｎ２７６Ａ、Ｙ２７８Ａ、Ｄ２８０Ａ、Ｖ２８２Ａ、Ｅ２８３Ａ、Ｈ２８５Ａ、Ｎ２８６Ａ、Ｔ２８９Ａ、Ｋ２９０Ａ、Ｒ２９２Ａ、Ｅ２９３Ａ、Ｅ２９４Ａ、Ｑ２９５Ａ、Ｙ２９６Ｆ、Ｎ２９７Ａ、Ｓ２９８Ａ、Ｙ３００Ｆ、Ｒ３０１Ａ、Ｖ３０３Ａ、Ｖ３０５Ａ、Ｔ３０７Ａ、Ｌ３０９Ａ、Ｑ３１１Ａ、Ｄ３１２Ａ、Ｎ３１５Ａ、Ｋ３１７Ａ、Ｅ３１８Ａ、Ｋ３２０Ａ、Ｋ３２２Ａ、Ｓ３２４Ａ、Ｋ３２６Ａ、Ａ３２７Ｑ、Ｐ３２９Ａ、Ａ３３０Ｑ、Ａ３３０Ｓ、Ｐ３３１Ａ、Ｐ３３１Ｓ、Ｅ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｔ３３５Ａ、Ｓ３３７Ａ、Ｋ３３８Ａ、Ｋ３４０Ａ、Ｑ３４２Ａ、Ｒ３４４Ａ、Ｅ３４５Ａ、Ｑ３４７Ａ、Ｒ３５５Ａ、Ｅ３５６Ａ、Ｍ３５８Ａ、Ｔ３５９Ａ、Ｋ３６０Ａ、Ｎ３６１Ａ、Ｑ３６２Ａ、Ｙ３７３Ａ、Ｓ３７５Ａ Ｄ３７６Ａ、Ａ３７８Ｑ、Ｅ３８０Ａ、Ｅ３８２Ａ、Ｓ３８３Ａ、Ｎ３８４Ａ、Ｑ３８６Ａ、Ｅ３８８Ａ、Ｎ３８９Ａ、Ｎ３９０Ａ、Ｙ３９１Ｆ、Ｋ３９２Ａ、Ｌ３９８Ａ、Ｓ４００Ａ、Ｄ４０１Ａ、Ｄ４１３Ａ、Ｋ４１４Ａ、Ｒ４１６Ａ、Ｑ４１８Ａ、Ｑ４１９Ａ、Ｎ４２１Ａ、Ｖ４２２Ａ、Ｓ４２４Ａ、Ｅ４３０Ａ、Ｎ４３４Ａ、Ｔ４３７Ａ、Ｑ４３８Ａ、Ｋ４３９Ａ、Ｓ４４０Ａ、Ｓ４４４Ａ、およびＫ４４７Ａ（ここで、例えばＰ２３８Ａは、位置番号２３８でアラニンにより置換された野生型プロリンを表す。アラニンに加えて、他のアミノ酸を前述の位置で野生型アミノ酸と置換することができる。突然変異を単独でＦｃ中に導入すると、天然のＦｃと異なる１００を越えるＦｃＲｎ結合パートナーを生じる可能性がある。さらに、２、３、またはそれ以上のこれらの個々の突然変異の組み合わせをあわせて導入すると、数百を超えるＦｃＲｎ結合パートナーを生じる可能性がある。これらの突然変異のうちのあるものは、ＦｃＲｎ結合パートナーに対して新しい機能を付与する可能性がある。例えば、一実施形態は、Ｎ２９７Ａを組み入れて、高度に保存されたＮ－グリコシル化部位を除去する。この突然変異の効果は、免疫原性を減少させ、それによりＦｃＲｎ結合パートナーの循環半減期を増強すること、ならびにＦｃＲｎに対する親和性を損なうことなく、ＦｃＲｎ結合パートナーがＦｃｙＲＩ、ＦｃｙＲＩＩＡ、ＦｃｙＲＩＩＢ、およびＦｃｙＲＩＩＩＡと結合することができなくなるようにすることである。（Ｒｏｕｔｌｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ．１９９５，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ６０：８４７（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）；Ｆｒｉｅｎｄ ｅｔ ａｌ．１９９９，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ６８：１６３２（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）；Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．１９９５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６５９１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。さらに、少なくとも３つのヒトＦｃガンマ受容体は、下部ヒンジ領域（一般的にアミノ酸２３４～２３７）内のＩｇＧ上の結合部位を認識するようである。したがって、新しい機能および可能性が減少した免疫原性の別の例は、例えば、ヒトＩｇＧ１「ＥＬＬＧ」のアミノ酸２３３～２３６をＩｇＧ２「ＰＶＡ」からの対応する配列（１つのアミノ酸欠失を有する）と置換することによるなど、この領域の突然変異から生

じる可能性がある。種々のエフェクター機能を媒介するＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩは、そのような突然変異が導入されない場合はＩｇＧ１と結合しないことが証明されている（Ｗａｒｄ ａｎｄ Ｇｈｅｔｉｅ １９９５，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：７７（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）；およびＡｒｍｏｕｒ ｅｔ ａｌ．１９９９，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：２６１３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。前記突然変異から生じる新規機能の更なる例として、ＦｃＲｎに対する親和性がいくつかの例では野生型の親和性よりも増加する可能性がある。この増加した親和性は、増加した「オン」速度、減少した「オフ」速度または増加した「オン」速度と減少した「オフ」速度の両方を反映する可能性がある。ＦｃＲｎに対する増加した親和性を付与すると考えられる突然変異としては、例えば、Ｔ２５６Ａ、Ｔ３０７Ａ、Ｅ３８０Ａ、およびＮ４３４Ａが挙げられる（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６５９１，その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【００６２】

Ｆｃ（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）は、表２に示すＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）に対して少なくとも９０％または９５％同一であり得る。Ｆｃ（またはキメラポリペプチドのＦｃ部分）は、表２に示すＦｃアミノ酸配列（配列番号２のアミノ酸１４３９～１６６５；配列番号６のアミノ酸２３３３～２５５９；配列番号８のアミノ酸７４１～９６７；配列番号１０のアミノ酸７４６～９７２；配列番号１２のアミノ酸６８５～９２４）に対して同一であり得る。

【００６３】

「ハイブリッド」ポリペプチドおよびタンパク質とは、本明細書中で用いられる場合、キメラポリペプチドの第２のポリペプチドとの組み合わせを意味する。ハイブリッド中のキメラポリペプチドおよび第２のポリペプチドは、タンパク質間相互作用、例えば電荷間相互作用または疎水性相互作用により互いに結合することができる。ハイブリッド中のキメラポリペプチドおよび第２のポリペプチドは、ジスルフィド結合または他の共有結合により互いに結合することができる。ハイブリッドは、国際公開第２００４／１０１７４０号および国際公開第２００６／０７４１９９号（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）に記載されている。米国特許第７，４０４，９５６および７，３４８，００４（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）も参照のこと。第２のポリペプチドは、同じキメラポリペプチドの第二のコピーであり得るか、または同一でないキメラポリペプチドであり得る。例えば、図１、実施例１、および表２を参照のこと。好ましい実施形態では、第２のポリペプチドは、Ｆｃを含むポリペプチドである。好ましい実施形態では、キメラポリペプチドはキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチドであり、第２のポリペプチドは、本質的にＦｃからなる。例えば、介在するリンカー配列のない、ヒトＩｇＧ１のダイマーＦｃドメインに融合した組換えＢドメイン欠失ヒトＦＶＩＩＩ（ＢＤＤ－ｒＦＶＩＩＩ）の１つの分子からなるｒＦＶＩＩＩＦｃ組換え融合タンパク質である実施例１のハイブリッドポリペプチドである。このハイブリッドポリペプチドは、本明細書中では、ＦＶＩＩＩＦｃモノマーＦｃ融合タンパク質、ＦＶＩＩＩＦｃモノマーハイブリッド、モノマーＦＶＩＩＩＦｃハイブリッド、およびＦＶＩＩＩＦｃモノマー－ダイマーと呼ばれる。実施例１、図１、および表２Ａを参照のこと。実施例は、このハイブリッドポリペプチドについての前臨床および臨床データを提供する。

【００６４】

ハイブリッド中の第２のポリペプチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）に対して少なくとも９０％もしくは９５％同一である配列またはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）に対して少なくとも９０％または９５％同一である配列を含み得るか、あるいは本質的にこの配列から構成され得る。第２のポリペ

プチドは、シグナル配列を含まない表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸１～２２７）に対して同一であるか、もしくはシグナル配列を含む表２Ａ（ｉｉ）に示されるアミノ酸配列（配列番号４のアミノ酸－２０～２２７）に対して同一である配列を含み得るか、または本質的にこの配列から構成され得る。

【００６５】

図１は、Ｂドメイン欠失第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子キメラポリペプチドの構造、およびＦｃポリペプチドである第２のポリペプチドとの関連を示す略図である。このハイブリッドを得るために、逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によりヒト肝臓ポリＡＲＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＦＶＩＩＩ特異的プライマーを用いて、ヒト組換えＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩのコーディング配列を得た。ＦＶＩＩＩ配列には、ＦＶＩＩＩの天然のシグナル配列が含まれる。２６８２ｂｐの全欠失について、Ｂドメイン欠失はセリン７４３（Ｓ７４３；２２８７ｂｐ）からグルタミン１６３８（Ｑ１６３８；４９６９ｂｐ）までであった。次に、ＲＴ－ＰＣＲにより、ヒト白血球ｃＤＮＡライブラリー（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からＦｃ特異的プライマーを用いて、ヒト組換えＦｃのコーディング配列を得た。Ｂドメイン欠失ＦＶＩＩＩ配列が介在するリンカーなしでＦｃ配列のＮ末端に直接融合するようにプライマーを設計した。ＦＶＩＩＩＦｃＤＮＡ配列をほ乳類二重発現ベクターｐＢＵＤＣＥ４．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にＣＭＶプロモーターの制御下でクローンした。マウスＩｇｋシグナル配列を含む第二の同じＦｃ配列をＲＴ－ＰＣＲにより得、発現ベクターｐＢＵＤＣＥ４．１中で第二のプロモーターであるＥＦ１αの下流にクローンした。

【００６６】

ｒＦＶＩＩＩＦｃ発現ベクターを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００トランスフェクション試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてヒト胚腎臓２９３細胞（ＨＥＫ２９３Ｈ；　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にトランスフェクトした。Ｚｅｏｃｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）での選択により安定なクローン細胞系を生成させた。１つのクローン細胞系である３Ｃ４－２２を用いてインビボでの特性化のためにＦＶＩＩＩＦｃを生成させた。組換えＦＶＩＩＩＦｃをＢｉｏｇｅｎ　Ｉｄｅｃ（マサチューセッツ州ケンブリッジ）で産生し、精製した（ＭｃＣｕｅ　ｅｔ　ａｌ．　２００９）。前記トランスフェクション法は、３つの産物、すなわち、モノマーｒＦＶＩＩＩＦｃハイブリッド、ダイマーｒＦＶＩＩＩＦｃハイブリッドおよびダイマーＦｃを生成することが予想される。しかし、これらの細胞から馴化培地ではダイマーｒＦＶＩＩＩＦｃは本質的に検出されなかった。むしろ、馴化培地はＦｃおよびモノマーｒＦＶＩＩＩＦｃを含んでいた。ダイマーｒＦＶＩＩＩＦｃのサイズは大きすぎて、細胞からの十分な分泌を阻止した可能性がある。この結果は、モノマーの精製を３つのタンパク質全てが存在する場合よりも簡単にするので、この結果は有益であった。この研究で使用した物質は、約９０００ＩＵ／ｍｇの比活性を有していた。

【００６７】

「投与間隔」は、本明細書中で用いられる場合、対象に投与される複数の投与間で経過する時間量を意味する。投与間隔の比較は、単一の対象において、または対象の集団において実施することができ、次いで集団中で得られる平均を計算することができる。

【００６８】

本発明のキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、たとえばキメラ第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子ポリペプチド（第ＶＩＩＩ因子を含むポリペプチドまたはハイブリッド）を投与する場合の投与間隔は、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない、たとえばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子からなるポリペプチド）に必要な投与間隔よりも少なくとも約１．５倍長くてもよい。投与間隔は、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない、たとえばＦｃ部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子からなるポリペプチド）に必要な投与間隔よりも少なくとも約１．５～６倍長い、１．５～５倍長い、１．５～４倍長い、１．５～３倍長い、または１．５～２倍長くてもよい。投与間隔は、当量の、非第ＶＩＩＩ因子部分を含まない前記第ＶＩＩＩ因子たとえば、Ｆｃ部分を含

まない前記第ＶＩＩＩ因子（前記第ＶＩＩＩ因子からなるポリペプチド）に必要な投与間隔よりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５または６倍長くてもよい。投与間隔は、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、もしくは１４日ごとまたはそれ以上である。投与間隔は、少なくとも約１．５～５、１．５、２、３、４、または５日またはそれ以上であってよい。オンデマンド治療に関して、前記キメラポリペプチドまたはハイブリッドの投与間隔は、およそ２４～３６、２４～４８、２４～７２、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、または７２時間ごとまたはそれ以上で１回である。

【００６９】

好ましくは、有効量は、２５～６５ＩＵ／ｋｇ（２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６２、６４、または６５ＩＵ／ｋｇ）であり、投与間隔は、３～５、３～６、３～７、３、４、５、６、７、もしくは８日またはそれ以上で１回、もしくは１週につき３回、または１週につき３回以下である。好ましくは、有効量は６５ＩＵ／ｋｇであり、投与間隔は１週間に１回、または６～７日ごとに１回である。

【００７０】

「長時間作用性第ＶＩＩＩ因子」は、基準の第ＶＩＩＩ因子よりも増加した半減期（本明細書中で、ｔ１／２、ｔ１／２ベータ、除去半減期およびＨＬとも称する）を有する第ＶＩＩＩ因子である。長時間作用性第ＶＩＩＩ因子の増加した半減期は、例えば、Ｆｃ、ＸＴＥＮまたはアルブミンなどの１以上の非第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドに対する融合によるものであり得る。増加した半減期は、例えばペグ化などの１以上の修飾によるものであり得る。例示的な長時間作用性第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドとしては、例えば、Ｆｃを含むキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチド、ＸＴＥＮを含むキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドおよびアルブミンを含むキメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドが挙げられる。さらなる例示的な長時間作用性第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドとしては、例えば、ペグ化第ＶＩＩＩ因子が挙げられる。

【００７１】

長時間作用性キメラ第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドの場合の「基準」ポリペプチドは、例えばＦｃ部分、ＸＴＥＮ部分、またはアルブミン部分のない同じ第ＶＩＩＩ因子部分などの、キメラポリペプチドの第ＶＩＩＩ因子部分から本質的になるポリペプチドである。同様に、修飾第ＶＩＩＩ因子の場合の基準ポリペプチドは、修飾されてない同じ第ＶＩＩＩ因子、例えばペグ化されてない第ＶＩＩＩ因子である。

【００７２】

いくつかの実施形態において、長時間作用性第ＶＩＩＩ因子は、対象に投与される場合、以下の特性の１以上を有する：

約１４～４１．３時間の前記対象中の平均滞留時間（ＭＲＴ）（活性）；

約１．２２～５．１９ｍＬ／時／ｋｇ以下の前記対象中のクリアランス（ＣＬ）（活性）；

約１１～２６．４時間の前記対象中のｔ１／２ベータ（活性）；

１ＩＵ／ｋｇあたり約１．３８～２．８８ＩＵ／ｄＬの前記対象中の増分回収率（ｉｎｃｒｅｍｅｎｔａｌ　ｒｅｃｏｖｅｒｙ）（Ｋ値）（活性；観察値）；

約３７．７～７９．４ｍＬ／ｋｇの前記対象中のＶｓｓ（活性）；および

１ＩＵ／ｋｇあたり約１９．２～８１．７ＩＵ＊ｈ／ｄＬの前記対象中のＡＵＣ／用量。

【００７３】

いくつかの実施形態において、長時間作用性第ＶＩＩＩ因子は患者集団に投与された場合に以下の特性の１以上を有する：

１ＩＵ／ｋｇあたり１．３８ＩＵ／ｄＬを越える平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
１ＩＵ／ｋｇあたり少なくとも約１．５、少なくとも約１．８５、または少なくとも約２．４６ＩＵ／ｄＬの平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）。
約２．３３±１．０８ｍＬ／時／ｋｇ以下の前記患者集団における平均クリアランス（ＣＬ）（活性）；
約１．８～２．６９ｍＬ／時／ｋｇの前記患者集団における平均クリアランス（ＣＬ）（活性）；
修飾がなく前記第ＶＩＩＩ因子を含むポリペプチドのクリアランスの約６５％である前記患者集団における平均クリアランス（ＣＬ）（活性）；
少なくとも約２６．３±８．３３時間の前記患者集団における平均滞留時間（ＭＲＴ）（活性）；
約２５．９～２６．５時間の前記患者集団における平均ＭＲＴ（活性）；
修飾がなく前記第ＶＩＩＩ因子を含むポリペプチドの平均ＭＲＴよりも約１．５倍長い前記患者集団における平均ＭＲＴ（活性）；
約１８．３±５．７９時間の前記患者集団における平均ｔ１／２ベータ（活性）；
約１８～１８．４時間である前記患者集団における平均ｔ１／２ベータ（活性）；
修飾がなく前記第ＶＩＩＩ因子を含むポリペプチドの平均ｔ１／２ベータよりも約１．５倍長い前記患者集団における平均ｔ１／２ベータ（活性）；
１ＩＵ／ｋｇあたり約２．０１±０．４４ＩＵ／ｄＬの前記患者集団における平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
１ＩＵ／ｋｇあたり約１．８５～２．４６ＩＵ／ｄＬの前記患者集団における平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
修飾がなく前記第ＶＩＩＩ因子を含むポリペプチドの平均増分回収率の約９０％である前記患者集団における平均増分回収率（Ｋ値）（活性；観察値）；
約５５．１±１２．３ｍＬ／ｋｇの前記患者集団における平均Ｖｓｓ（活性）；
約４５．３～５６．１ｍＬ／ｋｇの前記患者集団における平均Ｖｓｓ（活性）；
１ＩＵ／ｋｇあたり約４９．９±１８．２ＩＵ＊ｈ／ｄＬの前記患者集団における平均ＡＵＣ／用量（活性）；
１ＩＵ／ｋｇあたり約４４．８～５７．６ＩＵ＊ｈ／ｄＬの前記患者集団における平均ＡＵＣ／用量（活性）。

【００７４】

「オンデマンド治療」とは、本明細書中で用いられる場合、短期間にわたって行われることを目的とし、出血症状などの現状に反応して、または計画された手術などの認識された必要性に対する治療を意味する。オンデマンド治療を必要とし得る状態としては、例えば、出血症状、関節血症、筋肉出血、口腔出血、大出血、筋肉中への大出血、口腔大出血、外傷、頭部外傷、消化管出血、頭蓋内大出血、腹腔内大出血、胸腔内大出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙における出血、腹膜後隙における出血、または腸腰筋鞘における出血が挙げられる。対象は、外科的予防、術中管理、または外科手術のための治療を必要とする可能性がある。そのような外科手術としては、例えば、小手術、大手術、抜歯、扁桃摘出、鼠径部ヘルニア切開、滑膜切除、人工膝関節全置換術、開頭、骨接合、外傷外科学、頭蓋内手術、腹腔内手術、胸腔内手術、または関節置換手術が挙げられる。

【００７５】

好ましくは、オンデマンド治療は、単回投与で出血（たとえば、特発性出血）の８０％超（８０％超、８１％超、８２％超、８３％超、８４％超、８５％超、８６％超、８７％超、８８％超、８９％超、９０％超、９１％超、９２％超、９３％超、９４％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超、９９％超、もしくは１００％）または８０～１００％、８０～９０％、８５～９０％、９０～１００％、９０～９５％、もしくは９５～１００％を解消する。好ましくは、出血症状の８０％超（８１％超、８２％超、８３％超、８４％超、８５％超、８６％超、８７％超、８８％超、８９％超、９０％超、９１％超、９

２％超、９３％超、９４％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超、もしくは１００％）または８０～１００％、８０～９０％、８５～９０％、９０～１００％、９０～９５％、もしくは９５～１００％が、オンデマンド治療後に医師により優または良と評価される。好ましくは、出血症状の５％超、（６％超、７％超、８％超、９％超、１０％超、１１％超、１２％超、１３％超、１４％超、１５％超、１６％超、１７％超、１８％超、１９％超、２０％超）、または５～２０％、５～１５％、５～１０％、１０～２０％、もしくは１０～１５％がオンデマンド治療後に医師により可と評価される。

【００７６】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は交換可能に用いられ、共有結合したアミノ酸残基から構成されるポリマー化合物を指す。

【００７７】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は交換可能に用いられ、共有結合したヌクレオチド残基からなるポリマー化合物を指す。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡ、１本鎖、もしくは２本鎖、ベクター、プラスミド、ファージ、またはウイルスであり得る。ポリヌクレオチドとしては、例えば、表２のポリペプチドをコード化する表１中のものが挙げられる（表１を参照のこと）。ポリヌクレオチドとしてはさらに、例えば、表１のポリヌクレオチドのフラグメント、例えば、表２のポリペプチドのフラグメント、例えば、第ＶＩＩＩ因子、Ｆｃ、シグナル配列、６Ｈｉｓおよび表２のポリペプチドの他のフラグメントをコード化するものが挙げられる。

【００７８】

「予防的治療」とは、本明細書中で用いられる場合、対象に長期間にわたって複数回投与で第ＶＩＩＩ因子ポリペプチドを投与して、対象の血漿中の第ＶＩＩＩ因子活性のレベルを増大させることを意味する。好ましくは、増大したレベルは、特発性出血の発生率を低下させるか、または例えば、不測の損傷の場合に出血を予防するために十分である。好ましくは、予防的治療中に、対象中の血漿タンパク質レベルは、当該対象のベースラインレベルよりも低くならないか、または重篤な血友病を特徴付ける第ＶＩＩＩ因子のレベルよりも低くならない（＜１ＩＵ／ｄｌ［１％］）。

【００７９】

好ましくは、予防法は、各患者についてのＰＫデータを決定することにより、そして１～３％のＦＶＩＩＩ活性のトラフレベルを維持する投与間隔で本発明の第ＶＩＩＩ因子を投与することにより、個々の患者にあわせて「調整」される。２ヶ月の期間にわたって２以上の突発性出血症状と定義される許容できない出血症状を対象が経験する場合に、調節をおこなうことができる。この場合、調節は、３～５％のトラフレベルを目標とする。好ましくは、予防的治療の結果、出血の予防および制御、出血の持続的制御、出血からの持続的保護、および／または持続的利益が得られる。予防、例えば持続的保護は、最終測定時点までの増加したＡＵＣ（ＡＵＣ－ＬＡＳＴ）および減少したクリアランスにより示すことができ、その結果、短時間作用型ＦＶＩＩＩと比較して増加した終末相ｔ１／２となる。好ましくは、予防は、短時間作用型ＦＶＩＩＩに対して、より良好なＣｍａｘ、より良好なＴｍａｘ、および／またはより大きな平均滞留時間によって示される。好ましくは、予防の結果、注射（たとえば、最後の注射）後、約２４、３６、４８、７２、または９６時間以内（たとえば、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、９６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、または９６時間、好ましくは７２時間以内）に、突発性出欠症状が起こらない。好ましくは、予防の結果、週に一度の投薬（たとえば、６５ＩＵ／ｋｇ）で、３０％超（たとえば、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２

、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、９６、８７、８８、８９、または９０％超、好ましくは５０％超）の年間出血症状の平均的減少となる。

【００８０】

「対象」とは、本明細書中で用いられる場合、ヒトまたは非ヒトほ乳類を意味する。非ヒトほ乳類としては、例えば、マウス、イヌ、霊長類、サル、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ならびに他の家畜および小動物が挙げられる。

【００８１】

「治療量」とは、本明細書中で用いられる場合、本明細書中で記載されるように、治療目標を達成する用量を意味する。第ＶＩＩＩ因子の必要な用量の計算は、平均で、体重１ｋｇあたり１ＩＵの第ＶＩＩＩ因子が血漿第ＶＩＩＩ因子活性を約２ＩＵ／ｄＬ上昇させるという経験的知見に基づく。必要な用量は、次式：

必要な単位＝体重（ｋｇ）×所望の第ＶＩＩＩ因子増加（ＩＵ／ｄＬまたは正常値の％）×０．５（ＩＵ／ｄＬあたりのＩＵ／ｋｇ）

を用いて決定される。

【００８２】

本発明の方法で使用できる治療量は、約１０～１００ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、または９０～１００ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ＩＵ／ｋｇである。

【００８３】

本発明の方法において用いることができるさらなる治療量は、約１０～約１５０ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、約１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、１４０～１５０ＩＵ／ｋｇであり、さらに具体的には、約１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、または１５０ＩＵ／ｋｇである。

【００８４】

「変異体」とは、本明細書中で用いられる場合、もとのポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、その基本的な特性、例えば第ＶＩＩＩ因子凝固活性またはＦｃ（ＦｃＲｎ結合）活性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。一般的に、変異体は全体的に非常に類似し、多くの領域でもとのポリヌクレオチドまたはポリペプチドと同一である。変異体は、例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドフラグメント、もとのポリペプチドの欠失、挿入、および修飾バージョンを含む。

【００８５】

変異体ポリヌクレオチドは、例えば、配列番号１、３、５、７、９、または１１中のヌクレオチドコーディング配列（第ＶＩＩＩ因子部分、Ｆｃ部分（個々にもしくは一緒に））またはその相補鎖、本明細書中で言及される刊行物および特許で開示されるものなどの既知突然変異体および組換え第ＶＩＩＩ因子もしくはＦｃのヌクレオチドコーディング配列またはその相補鎖、配列番号２、４、６、８、１０、もしくは１２のポリペプチドをコート化するヌクレオチド配列（第ＶＩＩＩ因子部分、Ｆｃ部分（個々にもしくは一緒に））、および／またはこれらの核酸分子のうちいずれかのポリヌクレオチドフラグメント（たとえば、本明細書中で記載されるフラグメント）と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるヌクレオチド配列を含み得るか、またはこのヌクレオチド配列から構成され得る。これらの核酸分子とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも、これらのポリヌクレオチドが機能的である限り、これらのポリヌクレオチドによりコード化されるポリペプチドと同様に、変異体として含まれる。

【００８６】

変異体ポリペプチドは、例えば、配列番号２、４、６、８、１０、または１２で示され

るポリペプチド配列（第ＶＩＩＩ因子部分、Ｆｃ部分（個々にまたは一緒に））、および／またはこれらのポリペプチドのいずれかのポリペプチドフラグメント（たとえば、本明細書中に記載されるフラグメント）と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含み得るか、またはこのアミノ酸配列から構成され得る。

【００８７】

基準ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば９５％「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸により、当該核酸のヌクレオチド配列は、当該ヌクレオチド配列が、基準ヌクレオチド配列のそれぞれ１００のヌクレオチドあたり５ポイントまでの突然変異を含み得ること以外は、基準配列と同一であることを意味する。言い換えると、基準ヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を有する核酸を得るためには、基準配列中のヌクレオチドの５％までが欠失しているか、もしくは別のヌクレオチドで置換されていてもよいか、または基準配列中の全ヌクレオチドの５％までの複数のヌクレオチドが基準配列中に挿入されていてもよい。クエリー配列は、例えば、配列番号１または３に示される全配列、ＯＲＦ（オープンリーディングフレーム）、または本明細書中で特定される任意のフラグメントであってよい。

【００８８】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが本発明のヌクレオチド配列またはポリペプチドと少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるかどうかは、公知コンピュータープログラムを用いて通常どおり決定することができる。クエリー配列（基準もしくはもとの配列）および対象配列間の最良の全体的マッチを決定するための好ましい方法（グローバル配列アラインメントとも呼ばれる）は、Ｂｒｕｔｌａｇらのアルゴリズム（Ｃｏｍｐ．　Ａｐｐ．　Ｂｉｏｓｃｉ．（１９９０）　６：２３７－２４５）（その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）に基づいたＦＡＳＴＤＢコンピュータープログラムを用いて決定することができる。配列アラインメントにおいて、クエリー配列および対象配列はどちらもＤＮＡ配列である。ＵをＴに変換することによって、ＲＮＡ配列を比較することができる。前記グローバル配列アラインメントの結果は％同一性で表される。％同一性を計算するためにＤＮＡ配列のＦＡＳＴＤＢアラインメントで用いられる好ましいパラメーターは次のとおりである：マトリックス（Ｍａｔｒｉｘ）＝Ｕｎｉｔａｒｙ、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝４、ミスマッチペナルティー（Ｍｉｓｍａｔｃｈ　Ｐｅｎａｌｔｙ）＝１、ジョイニングペナルティー（Ｊｏｉｎｉｎｇ　Ｐｅｎａｌｔｙ）＝３０、ランダム化グループ長（Ｒａｎｄｏｍｉｚａｔｉｏｎ　Ｇｒｏｕｐ　Ｌｅｎｇｔｈ）＝０、カットオフスコア（Ｃｕｔｏｆｆ　Ｓｃｏｒｅ）＝１、ギャップペナルティー（Ｇａｐ　Ｐｅｎａｌｔｙ）＝５、ギャップサイズペナルティー（Ｇａｐ　Ｓｉｚｅ　Ｐｅｎａｌｔｙ）０．０５、ウインドウサイズ（Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ）＝５００または対象ヌクレオチド配列の長さ（いずれか短い方）。

【００８９】

対象配列が内部決質のためではなく５’または３’欠失のためにクエリー配列よりも短いならば、結果に対して手作業で補正を加えなければならない。これは、ＦＡＳＴＤＢプログラムが％同一性を計算する場合に対象配列の５’および３’トランケーションを計上しないからである。クエリー配列と比較して、５’または３’末端でトランケートされた対象配列について、％同一性は、クエリー配列の全塩基のパーセントとして、マッチ／整列しない対象配列の５’および３’であるクエリー配列の塩基の数を計算することにより補正する。ヌクレオチドがマッチ／整列するかどうかは、ＦＡＳＴＤＢ配列アラインメントの結果により決定される。このパーセンテージを次いで、特定のパラメーターを用いて前記ＦＡＳＴＤＢプログラムにより計算された％同一性から差し引いて、最終％同一性スコアを得る。この補正されたスコアは、本発明の目的のために用いられるものである。ＦＡＳＴＤＢアラインメントにより示されるように、クエリー配列とマッチ／整列しない対象配列の５’および３’塩基の外側の塩基のみを、％同一性スコアを手作業で調節する目的のために計算する。

【００９０】
例えば、９０塩基対象配列を１００塩基クエリー配列と整列させて、％同一性を決定する。欠失が対象配列の５’末端で起こり、したがって、ＦＡＳＴＤＢアラインメントは、５’末端の最初の１０塩基のマッチ／整列を示さない。１０の不対塩基は配列の１０％（一致しない５’および３’末端の塩基の数／クエリー配列中の塩基の総数）であり、したがって１０％をＦＡＳＴＤＢプログラムにより算出された％同一性スコアから差し引く。残りの９０塩基が完全にマッチするならば、最終％同一性は９０％である。別の例で、９０塩基対象配列を１００塩基クエリー配列と比較する。今度は、欠失は内部欠失であるので、クエリーとマッチ／整列しない塩基は対象配列の５’または３’にはない。この場合、ＦＡＳＴＤＢにより算出された％同一性を手作業で補正しない。再度、クエリー配列とマッチ／整列しない対象配列の５’および３’の塩基のみを手作業で補正する。本発明の目的に関しては、他の手作業の補正は行わない。

【００９１】
本発明のクエリーアミノ酸配列と少なくとも、例えば、９５％「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象ポリペプチドのアミノ酸配列は、対象ポリペプチド配列がクエリーアミノ酸配列のそれぞれ１００のアミノ酸につき５までのアミノ酸改変を含み得ること以外は、クエリー配列と同一であることを意味する。言い換えると、クエリーアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、対象配列中のアミノ酸残基の５％までを挿入、欠失、（インデル）または別のアミノ酸で置換することができる。基準配列のこれらの改変は、基準アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置またはそれらの末端位置間のどこで起こってもよく、基準配列中の残基間で個々に、または基準配列内の１以上の連続群中のいずれかで点在している。

【００９２】
実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、たとえば、配列番号２（第ＶＩＩＩ因子部分、Ｆｃ部分（それぞれもしくは一緒に））または４、あるいは既知第ＶＩＩＩ因子のアミノ酸配列またはＦｃポリペプチド配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるかどうかは、公知コンピュータープログラムを用いて通常どおり決定することができる。クエリー配列（基準またはもとの配列）と対象配列との間の最良の全体的なマッチを決定する好ましい方法（グローバル配列アラインメントとも呼ばれる）は、Ｂｒｕｔｌａｇらのアルゴリズム（Ｃｏｍｐ．　Ａｐｐ．　Ｂｉｏｓｃｉ．　６：２３７－２４５（１９９０）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に基づいたＦＡＳＴＤＢコンピュータープログラムを用いて決定することができる。配列アラインメントにおいて、クエリーおよび対象配列は、両ヌクレオチド配列または両アミノ酸配列のいずれかである。前記グローバル配列アラインメントの結果は％同一性で表される。ＦＡＳＴＤＢアミノ酸アラインメントで用いられる好ましいパラメーターは次のとおりである：マトリックス＝ＰＡＭ０、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝２、ミスマッチペナルティー＝１、ジョイニングペナルティー＝２０、ランダム化グループ長＝０、カットオフスコア＝１、ウインドウサイズ＝配列長、ギャップペナルティー＝５、ギャップサイズペナルティー＝０．０５、ウインドウサイズ＝５００または対象アミノ酸配列の長さ（どちらか短い方）。

【００９３】
対象配列が、内部欠失のためではなく、ＮまたはＣ末端欠失のためにクエリー配列よりも短い場合、結果に対して手作業で補正を行わなければならない。これは、ＦＡＳＴＤＢプログラムが、グローバル％同一性を算出する場合に対象配列のＮ末端およびＣ末端トランケーションを計上しないからである。クエリー配列と比べて、Ｎ末端およびＣ末端でトランケートされた対象配列について、％同一性は、クエリー配列の全塩基のパーセントとして、対応する対象残基とマッチ／整列しない対象配列のＮ末端およびＣ末端であるクエリー配列の残基の数を計算することにより補正される。残基がマッチ／整列するかどうかは、ＦＡＳＴＤＢ配列アラインメントの結果により決定される。このパーセンテージを次

いで特定のパラメーターを用いて前記ＦＡＳＴＤＢプログラムにより算出された％同一性から差し引いて、最終％同一性スコアを得る。この最終％同一性スコアは、本発明の目的に関して用いられるものである。クエリー配列とマッチ／整列しない対象配列のＮ末端およびＣ末端に対する残基のみを％同一性スコアを手作業で調節する目的に関して考慮する。すなわち、クエリー残基のみが対象配列の最も遠いＮ末端およびＣ末端残基の外側に位置する。

【００９４】

例えば、９０アミノ酸残基対象配列を１００残基のクエリー配列と整列させて、％同一性を決定する。欠失は対象配列のＮ末端で起こり、したがって、ＦＡＳＴＤＢアラインメントはＮ末端の最初の１０残基のマッチ／整列を示さない。１０の不対残基は配列の１０％（一致しないＮ末端およびＣ末端の残基の数／クエリー配列中の残基の総数）であり、したがって、１０％をＦＡＳＴＤＢプログラムにより算出された％同一性スコアから差し引く。残りの９０残基が完全にマッチする場合、最終％同一性は９０％となる。別の例では、９０残基対象配列を１００残基クエリー配列と比較する。今回は、欠失は内部欠失であるので、クエリーとマッチ／整列しない対象配列のＮ末端またはＣ末端の残基はない。この場合、ＦＡＳＴＤＢにより算出される％同一性は手作業で補正されない。再度、ＦＡＳＴＤＢアラインメントで示されるように、クエリー配列とマッチ／整列しない対象配列のＮ末端およびＣ末端の外側の残基位置のみを、手作業で補正する。本発明の目的に関しては他の手作業の補正は行わない。

【００９５】

ポリヌクレオチド変異体は、コーディング領域、非コーディング領域、または両方で改変を含み得る。特に好ましいのは、サイレント置換、付加、または欠失をもたらすが、コード化されたポリペプチドの特性もしくは活性を改変しない改変を含むポリヌクレオチド変異体である。遺伝コードの縮重によるサイレント置換によって産生されるヌクレオチド変異体が好ましい。さらに、５～１０、１～５、または１～２アミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失または付加されている変異体も好ましい。たとえば特定の宿主に関してコドン発現を最適化（ヒトｍＲＮＡにおけるコドンを、大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）などの細菌宿主により好まれるものへ変更）するためなど、様々な理由で、ポリヌクレオチド変異体を産生することができる。

【００９６】

天然に存在する変異体は、「対立遺伝子多型（ａｌｌｅｌｉｃ　ｖａｒｉａｎｔ）」と呼ばれ、生物の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの代替形態のうちの１つを指す（Ｇｅｎｅｓ　ＩＩ，　Ｌｅｗｉｎ，　Ｂ．，　ｅｄ．，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　（１９８５））。これらの対立遺伝子多型は、ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドレベルのいずれかで様々である可能性があり、本発明に含まれる。あるいは、天然に存在しない変異体は、突然変異誘発技術によるか、または直接合成により産生することができる。

【００９７】

タンパク質工学および組換えＤＮＡテクノロジーの公知方法を用いて、変異体を生成させて、ポリペプチドの特性を改善または改変することができる。たとえば、生物学的機能を実質的に失うことなく、１以上のアミノ酸を分泌されたタンパク質のＮ末端またはＣ末端から欠失させることができる。Ｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２６８：　２９８４－２９８８　（１９９３）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の著者らは、３、８、または２７のアミノ末端アミノ酸残基の欠失後でさえもヘパリン結合活性を有する変異体ＫＧＦタンパク質を報告した。同様に、インターフェロンガンマは、このタンパク質のカルボキシ末端からの８～１０アミノ酸残基の欠失後に、最高１０倍まで高い活性を示した（Ｄｏｂｅｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　７：１９９－２１６　（１９８８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【００９８】

さらに、十分な証拠により、変異体は多くの場合、天然に存在するタンパク質と類似した生物学的活性を保持することが示される。例えば、Ｇａｙｌｅおよび共同研究者（Ｊ．Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ　２６８：２２１０５－２２１１１　（１９９３）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、ヒトサイトカインＩＬ－１ａの詳細な突然変異分析を行った。彼らは、ランダム突然変異誘発を使用して、分子の全長にわたって変異体あたり平均して２．５アミノ酸変化である３，５００を越える個々のＩＬ－１ａ突然変異体を生成させた。複数の突然変異をあらゆる可能なアミノ酸位置で調査した。調査者らは、分子のほとんどは［結合または生物学的活性］のいずれかに対してほとんど影響を及ぼすことなく改変することができる」ことを見いだした。（要約を参照のこと）。実際、調査した３，５００を越えるヌクレオチド配列のうち、わずか２３の独自のアミノ酸配列だけが、野生型とは活性が有意に異なるタンパク質を産生した。

【００９９】

前述のように、ポリペプチド変異体としては、例えば、修飾ポリペプチドが挙げられる。修飾としては、例えば、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ－カルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化（Ｍｅｉ　ｅｔ　ａｌ．、Ｂｌｏｏｄ　１１６：２７０－７９（２０１０）、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アミノ酸のタンパク質に対するトランスファー－ＲＮＡ媒介性付加、例えばアルギニル化、およびユビキチン化が挙げられる。いくつかの実施形態において、第ＶＩＩＩ因子は、任意の都合のよい位置でペグ化など修飾される。いくつかの実施形態において、第ＶＩＩＩ因子は、第ＶＩＩＩ因子の表面に露出したアミノ酸で、好ましくは、操作されたシステインであり得る表面に露出したシステインでペグ化される。Ｍｅｉ　ｅｔ　ａｌ．　（２０１０）。いくつかの実施形態において、修飾された第ＶＩＩＩ因子、たとえばペグ化第ＶＩＩＩ因子は、長時間作用性第ＶＩＩＩ因子である。

【０１００】

「定常状態での分布容積（Ｖｓｓ）」は、本明細書中で用いられる場合、薬剤が分配される見かけの空間（容積）という、薬理学で用いられるこの用語と同じ意味を有する。Ｖｓｓ＝定常状態の血漿濃度で割った体内の薬剤の量。

【０１０１】

「約」とは、本明細書中で範囲について用いられる場合、その範囲の両端を修飾する。したがって、「約１０～２０」は、「約１０～約２０」を意味する。

【０１０２】

本発明を詳細に記載してきたが、本発明を限定することを意図するのではなく、説明のみの目的で含まれる以下の実施例を参照することにより、更に明らかに理解されるであろう。本明細書中で言及される全ての特許および刊行物は参照により明白に本明細書中に組み込まれる。

【実施例】

【０１０３】

実施例１

要約

組換えＢドメイン欠失第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子（ｒＦＶＩＩＩＦｃ）融合タンパク質を作製して、ＦＶＩＩＩの半減期を延長した。ｒＦＶＩＩＩＦｃを重症の血友病Ａのマウスおよびイヌモデルで研究し、ｒＦＶＩＩＩ（ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標））と比較した。血友病Ａマウスにおける全血凝固時間（ＷＢＣＴ）は２～３倍長く補正され、そして血漿中の除去半減期は、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）と比較すると、ｒＦＶＩＩＩＦｃについてほぼ２倍の長さであった。血友病Ａイヌでは、ｒＦＶＩＩＩＦｃの静脈内投与（１２５Ｉ

Ｕ／ｋｇ）はＷＢＣＴを正常値に修正した。ＷＢＣＴは、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）で治療されたイヌについては４８時間であるのに比べて、約９６時間にわたって２０分未満（この時間は、ＦＶＩＩＩ：Ｃ＞１％に一致する）にとどまった。イヌ血漿におけるｒＦＶＩＩＩＦｃの除去半減期は、ＥＬＩＳＡまたは色素生成検定を用いて測定した場合、それぞれ１５．７±１．７時間および１５．４±０．３時間であった。ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）は、ＷＢＣＴをｒＦＶＩＩＩＦｃの約１／２の長さに修正し、血漿半減期は７．０時間であった。したがって、ＦＶＩＩＩをＦｃに融合することにより、血漿半減期が増加し、出血から長時間保護する能力を有する分子が産生された。

【０１０４】

序論

死亡率の低下、関節損傷の予防および生活の質の改善は、血漿由来の組換えＦＶＩＩＩの開発による重大な功績である。出血からの長時間の保護は、血友病Ａ患者の治療における別の重要な進展である。本発明者等は、ＦＶＩＩＩの半減期を延長するための方法として組換え第ＶＩＩＩ－Ｆｃ因子（ｒＦＶＩＩＩＦｃ）キメラタンパク質およびハイブリッドを作製した。

【０１０５】

ｒＦＶＩＩＩＦｃは、ヒト免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）のＦｃドメインに組換えにより融合されたＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩから構成されるヘテロダイマーハイブリッドタンパク質である（図１、配列番号２；表２Ａ）（このタンパク質は、本明細書中ではＦＶＩＩＩＦｃモノマーＦｃ融合タンパク質、ＦＶＩＩＩＦｃモノマーハイブリッド、モノマーＦＶＩＩＩＩＦｃハイブリッド、およびＦＶＩＩＩＦｃモノマー－ダイマーとも呼ばれる）。Ｆｃは、ＩｇＧを分解から保護する原因となり、ＩｇＧに対してヒトにおいて観察される３週間の半減期を付与する、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）への結合を可能にする（Ｇｈｅｔｉｅ Ｖ，ａｎｄ Ｗａｒｄ ＥＳ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００；１８：７３９－７６６；Ｒｏｏｐｅｎｉａｎ ＤＣ，ａｎｄ Ａｋｉｌｅｓｈ Ｓ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００７；７：７１５－７２５（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる））。

【０１０６】

ＩｇＧ１のＦｃドメインを、成長因子、サイトカイン、酵素および受容体のリガンド結合領域と融合させた（Ａｓｈｋａｎａｚｉ Ａ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９３：１０：２１９－２７；Ｃｈａｍｏｗ ＳＭ，ａｎｄ Ａｓｈｋａｎａｚｉ Ａ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９６：１４：５２－６０；Ｆｉｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．１９９６：３３４（２６）：１６９７－７０２（それぞれは、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる））。これらのうちのいくつかは重要な治療分子となった（例えば、エタネルセプト、アレファセプト、アバタセプト）。これらの融合タンパク質において、２つのエフェクター分子が２つのＦｃ分子と結合する。この実施例では、ｒＦＶＩＩＩＦｃを、モノマーＦｃ融合タンパク質（表２Ａ（ｉ）中の配列（配列番号２）から構成される１コピーのポリペプチド（シグナル配列の有無を問わない）および表２Ａ（ｉｉ）中の配列（配列番号４）（シグナル配列の有無を問わない）からなる１コピーのポリペプチド）として、すなわち、１コピーのエフェクター分子のみを用いて構築し（図１を参照のこと）、本明細書中に提示した研究は、血友病Ａのマウスおよびイヌモデルにおいてこの新規タンパク質の薬力学および薬物動態学をｒＦＶＩＩＩと比較する。シグナル配列は、分泌中に切断される。このタンパク質構築物を、本明細書中では、ＦＶＩＩＩＦｃモノマーＦｃ融合タンパク質、ＦＶＩＩＩＦｃモノマーハイブリッド、モノマーＦＶＩＩＩＩＦｃハイブリッド、およびＦＶＩＩＩＦｃモノマー－ダイマーと称する。このタンパク質の構造および産生については、実施例１、図１、表２Ａ；ならびに米国特許第７，４０４，９５６号および第７，３４８，００４号（そのそれぞれはその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【０１０７】

方法および材料
ＦＶＩＩＩ調製物
組換えＦＶＩＩＩＦｃ
ＦＶＩＩＩ特異的プライマーを用いて、ヒト肝臓ポリＡ　ＲＮＡ（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）から、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により、ヒト組換えＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩのコード配列を得た。ＦＶＩＩＩ配列は、ＦＶＩＩＩに関するネイティブシグナル配列を含む。Ｂドメイン欠失は、２６８２ｂｐの全体的欠失に関してセリン７４３（Ｓ７４３；２２８７ｂｐ）からグルタミン１６３８（Ｑ１６３８；４９６９ｂｐ）までであった。このタンパク質の構造および製造に関しては、実施例１、図１、表２Ａ；ならびに米国特許第７，４０４，９５６号および第７，３４８，００４号（これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）を参照されたい。

【０１０８】
Ｆｃ特異的プライマーを用いて、ヒト白血球ｃＤＮＡライブラリー（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）から、ＲＴ－ＰＣＲにより、ヒト組換えＦｃに関するコード配列を得た。Ｂドメイン欠失ＦＶＩＩＩ配列が、介在リンカーを伴わずに、Ｆｃ配列のＮ末端と直接的に融合されるよう、プライマーを設計した。ＣＭＶプロモーターの制御下で、哺乳動物二重発現ベクターｐＢＵＤＣＥ４．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に、ＦＶＩＩＩＦｃ　ＤＮＡ配列をクローン化した。マウスＩｇｋシグナル配列を含む第二の同一Ｆｃ配列をＲＴ－ＰＣＲにより得て、発現ベクターｐＢＵＤＣＥ４．１中の第二プロモーター　ＥＦ１αの下流にクローン化した。

【０１０９】
リポフェクタミン　２０００トランスフェクション試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、ヒト胚性腎臓２９３細胞（ＨＥＫ２９３Ｈ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中にｒＦＶＩＩＩＦｃ発現ベクターをトランスフェクトした。ゼオシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）で選択することにより、安定クローン細胞株を生成した。一クローン細胞株　３Ｃ４－２２を用いて、ｉｎ　ｖｉｖｏで特性化のためのＦＶＩＩＩＦｃを生成した。組換えＦＶＩＩＩＦｃを産生し、精製した（ＭｃＣｕｅ　ＪＴ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ａ　２００９；７８２４－７８３０（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）、Ｂｉｏｇｅｎ　Ｉｄｅｃ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，　ＭＡ））。上記のトランスフェクション戦略は、３つの産物、すなわち、単量体ｒＦＶＩＩＩＦｃハイブリッド、二量体ｒＦＶＩＩＩＦｃハイブリッドおよび二量体Ｆｃを生じると予期された。しかしながら、これらの細胞から状態調節培地中で検出される二量体ｒＦＶＩＩＩＦｃは本質的に存在しなかった。むしろ、状態調節培地は、Ｆｃおよび単量体ｒＦＶＩＩＩＦｃを含有した。二量体ｒＦＶＩＩＩＦｃは大きすぎて細胞からの効率的分泌を妨げた、と考えられる。この結果は、３つのタンパク質すべてが存在した場合より単量体の精製を複雑にしないことから、有益であった。これらの試験に用いられる物質は、約９０００　ＩＵ／ｍｇという特異的活性を有した。さらに、これらのヒト細胞は、この実験で試みられた他の細胞より高いタンパク質レベルを生じた。

【０１１０】
組換えＦＶＩＩＩ
組換えＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩ（ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標））をＮｏｖｉｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓから購入し、メーカーの使用説明書に従って調製した。ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）（組換えＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩ）は、配列番号２のアミノ酸１～１４３８と同じアミノ酸配列を有する。

【０１１１】
血友病Ａ動物
血友病Ａマウスは、ペンシルバニア大学のＫａｚａｚｉａｎ博士から入手し（Ｂｉ　Ｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１９９５；１０（１）：１１９－１２１；この記載内容は参照により本明細書中で援用される）、Ｓｙｎｔｏｎｉｘで繁殖された１２９×Ｂ６バックグラウンドでのＦＶＩＩＩエキソン１６ノックアウトである。こ

れらのマウスは、全血凝固時間延長（＞６０分）を示し、したがって、重症血友病Ａの良好なモデルである。

【０１１２】

血友病Ａイヌは、ノースカロライナ大学（Ｃｈａｐｅｌ　Ｈｉｌｌ）のフランシス・オーエン血液研究室で保持された近交系コロニー（Ｇｒａｈａｍ，　ＪＢ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．　１９４９；　９０：　９７－１１１；この記載内容は参照により本明細書中で援用される）からであった。これらのイヌは、ヒト疾患の重症型に匹敵する重症血友病表現型を有する（Ｇｒａｈａｍ，　ＪＢ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．　１９４９；　９０：　９７－１１１；Ｌｏｚｉｅｒ，　ＪＮ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　２００２；　９９：　１２９９１－１２９９６；これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）。

【０１１３】

試験計画

血友病Ａマウス試験

全血凝固時間（ＷＢＣＴ）に及ぼすｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の作用を、ＦＶＩＩＩ欠損マウスで試験した。各タンパク質を５０　ＩＵ／ｋｇで静脈内投与して、各マウスの尾静脈から、用量投与前に、そして用量投与後の種々の時点で、血液を採取した。血液試料を３７℃で微細管中でインキュベートして、血餅の存在に関して１分間に１回、視覚的に検査した。血餅形成の時間を記録した。血餅が６０分までに生じなかった場合、凝固時間を＞６０分と記録した。正常マウスからの血液は、ＷＢＣＴ検定において約４分で凝固する（範囲　２～７分；ｎ＝マウス１０匹）。

【０１１４】

第２組の試験では、血友病Ａマウスに、５０　ＩＵ／ｋｇ　ｒＦＶＩＩＩＦｃ、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）またはＡｄｖａｔｅ（登録商標）の単一回静脈内用量投与を施した（マウス４匹／時点）。用量投与後０．２５、８、２４、４８および７２時間に、１０分の１容積の３．２％クエン酸ナトリウム中に心臓穿刺により血液を採取した。血漿を調製し、ＦＶＩＩＩ特異的色素生成活性検定を用いたＦＶＩＩＩ活性に関する分析まで、－８０℃で保存した。

【０１１５】

血友病Ａイヌ試験

ｒＦＶＩＩＩＦｃの単一回用量投与ＰＫ／ＰＤ試験において、Ｃｈａｐｅｌ　Ｈｉｌｌコロニーからの２匹の血友病Ａイヌに、１２５　ＩＵ／ｋｇの単一回静脈内用量投与を施して、ＷＢＣＴ、活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）、ＦＶＩＩＩＦｃ血漿濃度、血液学的および血清化学に関して、用量投与前、および用量投与後の選定時点に、血液試料を採取した。ＷＢＣＴに関する時点は、用量投与前、用量投与後５および３０分、ならびに１、２、４、８、２４、３２、４８、７２、９６、１４４および１６８時間を包含した。凝固活性（ａＰＴＴ）およびＦＶＩＩＩＦｃ血漿濃度に関する血液採取は、ＷＢＣＴに関する上記の時点、ならびに用量投与後１５分および３、６、１２時間を包含した。

【０１１６】

ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）（イヌＭ１２に関しては１１４　ＩＵ／ｋｇ、イヌＭ３８に関しては１２０　ＩＵ／ｋｇ）を静脈内投与する第二試験を実行した。凝固時間が≧２０分になるまで（ＦＶＩＩＩ：Ｃ＞１％と一致）ＷＢＣＴを測定し、次いで、１２５　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃを同一イヌに静脈内投与して、ＷＢＣＴ、ａＰＴＴ、ＦＶＩＩＩＦｃ、血漿濃度、血液学的および血清化学に関して血液試料を採取した。ＷＢＣＴに関する時点は、用量投与前、用量投与後５および３０分、ならびに１、２、４、８、２４、３２、４８、７２時間を包含した。ＦＶＩＩＩＦｃを用量投与後９６、１２０、１４４および１６８時間にも、血液を採取した。凝固活性（ａＰＴＴ）およびＦＶＩＩＩＦｃ血漿濃度に関する血液採取は、ＷＢＣＴに関する上記の時点、ならびに用量投与後１５分お

よび３、６、１２時間を包含した。

【０１１７】

血友病ＡイヌにおけるｗＢＣＴ手順は、血友病Ａマウスの場合とはわずかに異なった。ｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）を用量投与後に、種々の時点で１ｍＬの血液を採取し、０．５ｍＬを２つのシリコン処理ガラス管中に配分し、その後、これを２８℃水浴中に入れた。１分で開始して、一方の試験管を３０秒毎に上下に揺すり、第二試験管は静置したままであった。揺すった試験管中に血餅が生じたら、次に第二試験管を、血餅が形成するまで３０秒毎に上下に揺すった。第二試験管中の完全ゲル化血餅までの時間を、ＷＢＣＴとして記録した。

【０１１８】

血漿中ＦＶＩＩＩ活性

ＦＶＩＩＩ特異的色素生成検定による血漿中のＦＶＩＩＩ活性の測定

Ｓｙｓｍｅｘ　ＣＡ１５００計器およびＳｉｅｍａｎｓ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ（Ｄａｌｌａｓ，　ＴＸ；キット番号Ｂ４２３８－４０）からの試薬を用いて、自動発色法により、ＦＶＩＩＩ活性に関して血漿試料を試験した。１．５～０．０１６　ＩＵ／ｍＬの範囲の濃度でヒトＦＶＩＩＩ欠失血漿（Ｓｔａｇｏ　ＵＳＡ）中に加えた第７次国際標準因子ＦＶＩＩＩ濃縮物（ＮＩＢＳＣ　コード　９９／６７８）を用いて作成した標準曲線を用いて、ｒＦＶＩＩＩＦｃの活性を確定した。

【０１１９】

ＥＬＩＳＡによるｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＦＶＩＩＩの測定

ＥＬＩＳＡによるイヌ血漿中のＦＶＩＩＩＦｃ

Ａ１ドメインに特異的なＦＶＩＩＩ抗体（Ｇｒｅｅｎ　Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ＧＭＡ－８００２）を９６ウェルプレート上に被覆し、３７℃で１時間インキュベートした。被覆プレートを、室温で１時間、トゥイーン２０、$CaCl_2$およびウシ血清アルブミンを含有するトリス緩衝化生理食塩水で遮断して、次に、正常イヌ血漿中に調製された標準、対照および試料を、１：１０希釈し、次いで、プレートに付加して、３７℃で１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、次に、ロバ（Ｆ（ａｂ）’$_2$）抗ヒトＦｃ－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ：７０９－０３６－０９８）を付加して、３７℃で１時間インキュベートした。洗浄後、ＴＭＢ（ＢｉｏＦｘ超高感度基質：ＴＭＢＳ－０１００－０１）をプレートに付加し、酸で基質反応をクエンチして、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｐｌｕｓプレート読取機（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で４５０ｎｍで、吸光度を測定した。

【０１２０】

ＥＬＩＳＡによるイヌ血漿中ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）

重鎖上のＡ１ドメインに特異的な抗ＦＶＩＩＩ抗体（Ｇｒｅｅｎ　Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ＧＭＡ－８００２）を９６ウェルプレート上に被覆し、室温で２時間インキュベートした。被覆プレートを、３７℃で１時間遮断し、洗浄後、標準、対照および試料を正常イヌ血漿中で調製し、次いで１：１０希釈し、プレートに付加して、室温で２時間インキュベートした。プレートを洗浄し、次に、検出抗体、予備希釈抗ＦＶＩＩＩホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体（Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ：Ｆ８Ｃ－ＥＩＡ－Ｄ）で処理して、室温で１時間インキュベートした。洗浄後、ＴＭＢ（ＢｉｏＦｘ超高感度基質：ＴＭＢＳ－０１００－０１）をプレートに１０分間付加した。酸で基質反応をクエンチして、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｐｌｕｓプレート読取機（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で４５０ｎｍの波長で、シグナルを測定した。

【０１２１】

フィブリノーゲンの測定

メーカーの使用説明書に従って、ＨｅｍｏｓＩＬ（商標）ＰＴ－フィブリノーゲン－ＨＳ試薬（ＩＬＬ，　ＭＡ、カタログ番号０００８４６８２１０）およびＡＣＬ　７０００凝固分析器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を含有するキットを用いて、Ｅｓｏｔｅｒｉｘ（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｔｒｉａｎｇｌｅ　Ｐａｒｋ，　ＮＣ）で、血漿中のフィブ

リノーゲンの濃度を測定した。

【０１２２】

血小板の測定

種特異的スマートカードでプログラムされたＶｅｔ－ＡＢＣ－Ｄｉｆｆ血液学分析器（ＳＣＩＬ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ Ｃｏ．, Ｇｕｒｎｅｅ, ＩＬ）を用いて、自動化方法により、ＥＤＴＡ抗凝固化全血で血小板を計数した。

【０１２３】

薬物動態学的分析

ＰｈａｒｓｉｇｈｔからのＷｉｎＮｏｎｌｉｎソフトウェア、バージョン５．２（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ, Ｃａ）を用いて、非分画解析により、薬物動態パラメーターを算定した。ＰＫパラメーターは、血漿中最大濃度（C_{max}）、血漿濃度対時間曲線下面積（ＡＵＣ）、排出半減期（$t_{1/2}$）、配分の容積（Ｖｓｓ）およびクリアランス（Ｃｌ）を包含した。

【０１２４】

結果

組換えＦＶＩＩＩ－Ｆｃ

ｒＦＶＩＩＩＦｃは、介在リンカー配列を有さないヒトＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩとヒトＩｇＧ１からのＦｃとの組換え融合物である（ｒＦＶＩＩＩＦｃ：図１）。

【０１２５】

精製ｒＦＶＩＩＩＦｃは、色素生成活性検定を用いて測定した場合、約９０００　ＩＵ／ｍｇの特異的活性を有する。組換えＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩ（ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標））は、９１１０～１３７００　ＩＵ／ｍｇという報告された特異的活性を有する。ＦＶＩＩＩＦｃとＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）との間のサイズ差（それぞれ２１６　ｋＤａおよび１７０　ｋＤａ）を考慮するためのＩＵ／ｎｍｏｌへの特異的活性の変換は、２つのタンパク質がほぼ等価の特異的活性を有する（ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１９７０　ＩＵ／ｎｍｏｌおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）に関しては１５２１～２２８７　ＩＵ／ｎｍｏｌ）、ということを示す。したがって、ｒＦＶＩＩＩＦｃのＦＶＩＩＩ活性は、ヒトＦＶＩＩＩのＣ末端とヒトＦｃのＮ末端との融合による影響を受けない。

【０１２６】

血友病Ａマウスへの投与

単一回５０　ＩＵ／ｋｇ用量のｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）をＦＶＩＩＩ欠損マウス（ｎ＝６／群）に静脈内投与した。血液試料を用量投与前および１２０時間に亘る用量投与後に採取し、ＷＢＣＴを材料および方法に記載したように決定した。基線ＷＢＣＴは、６０分より大きかった。代表的実験からのデータを、図２および表３に示す。ｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の用量投与直後に、ＷＢＣＴを２～１７分に補正した。ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）で処置されたマウスからの血液は４２時間までに凝固する能力を失ったが、一方、ｒＦＶＩＩＩＦｃで処置された全マウスからの血液は９６時間で未だ凝固し、６匹のうちの１匹からの血液は、１１３時間で凝固していたが、しかし１２０時間までにはすべてが凝固する能力を失っていた。これらのデータは、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する作用の持続期間は、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）よりも約２～３時間長い、ということを示唆する。

【０１２７】

ｒＦＶＩＩＩＦｃ、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）またはＡｄｖａｔｅ（登録商標）（全長組換えＦＶＩＩＩ）の色素形成活性を、５０　ＩＵ／ｋｇの単一回静脈内用量投与後のＦＶＩＩＩ欠損マウスで試験した。用量投与前、ならびに投与後８、２４，４８および７２時間に、血液を採取した。ＦＶＩＩＩ特異的色素形成活性検定を用いて活性を測定した。それを図３に示す。薬物動態パラメーターを、表４に報告する。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する循環半減期は、Ａｄｖａｔｅ（登録商標）（７時間）およびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）（５時間）と比較して、約１．６～２倍長かった（１１．１時間）。Ｃｍａｘは、Ａｄｖａｔｅ（登録商標）の０．４７±０．３０　ＩＵ／ｍＬおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録

商標）の０．６７±０．４４　ＩＵ／ｍＬと比較して、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１．６±０．３６　ＩＵ／ｍＬであった。ｒＦＶＩＩＩＦｃの全身曝露は、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）（６．９４時間・ＩＵ／ｍＬ）およびＡｄｖａｔｅ（登録商標）（３．９０時間・ＩＵ／ｍＬ）と比較して、ｒＦＶＩＩＩＦｃ（２２．６時間・ＩＵ／ｍＬ）に関しては顕著に大きく、そして血友病Ａマウスにおいては、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）（７．２ｍＬ／時間／ｋｇ）およびＡｄｖａｔｅ（登録商標）（１２．８時間／ｍＬ／ｋｇ）の両方と比較して、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関するクリアランスは顕著に低かった（２．０９ｍＬ／時間／ｋｇ）。

【０１２８】

血友病Ａイヌへの投与

ｒＦＶＩＩＩＦｃの薬力学（ＰＤ）および薬物動態（ＰＫ）を、血友病ＡイヌのＣｈａｐｅｌ　Ｈｉｌｌコロニーで試験した。１２５　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃの単一回静脈内用量投与を、４匹の血友病Ａイヌの各々に施して、ＷＢＣＴは直ちに正常に補正された（図４）。正常イヌにおけるＷＢＣＴの範囲は、８～１２分である。約９６時間を通してＷＢＣＴは２０分より低いままであったが、この時間はＦＶＩＩＩ：Ｃ＞１％と一致する。但し、１匹は７２時間の間、＜２０分のＷＢＣＴを示した。さらに、ａＰＴＴも直ちに正常に補正された（表６）。分子のＦＶＩＩＩおよびＦｃ部分の両方を検出するよう意図された特異的ＥＬＩＳＡを用いて、血漿中のｒＦＶＩＩＩＦｃの濃度を測定した。血漿濃度対時間曲線を、図５に示す。データのＰＫ分析は、$t_{1/2}$が１５．７±１．７時間であることを示した（表５）。ＦＶＩＩＩ特異的色素生成活性検定を用いてｒＦＶＩＩＩＦｃを測定した場合に、同様の結果を得た（$t_{1/2}$＝１５．４±０．３時間、表５）。血漿濃度対時間曲線は、両方法を用いて、同様であった（図５および６）。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する特異的活性を用いて活性データをＩＵ／ｍＬからｎｇ／ｍＬに変換した場合、ＥＬＩＳＡデータとの良好な相関が認められ、それにより、ＥＬＩＳＡにより測定されたタンパク質が十分に活性であったことが実証された。

【０１２９】

ｒＦＶＩＩＩＦｃで処置したイヌのうち２匹は、ｒＦＶＩＩＩＦｃ投与の７２時間前に、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の単一回用量投与も受けた（イヌＭ１２は１１４　ＩＵ／ｋｇ、イヌＭ３８は１２０　ＩＵ／ｋｇ）。ＷＢＣＴおよびａＰＴＴは、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の投与直後に、正常に補正された。しかしながら、ｒＦＶＩＩＩＦｃの単一回用量投与後のＷＢＣＴ正規化は、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）と比較して約２倍長く続いた（図４）。さらに、血漿中のタンパク質濃度をＥＬＩＳＡにより測定した場合、ｒＦＶＩＩＩＦｃの血漿半減期（１５．７±１．７時間）は、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）（７．０および６．７時間）と比較して、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関して約２倍の長さであった（表５）。ＦＶＩＩＩ特異的色素生成活性により２つの分子を測定した場合、同様の結果を得た。

【０１３０】

血栓形成性の潜在的危険を査定するために、血小板およびフィブリノーゲンを測定した。ｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）を用量投与後、血小板数および血漿フィブリノーゲン濃度は用量投与前の値から変化しなかった（データは示されていない）。

【０１３１】

考察

組換えＦＶＩＩＩＦｃを、安定的トランスフェクト化細胞株からのヒト胚性腎臓２９３（ＨＥＫ２９３）細胞中で産生し、細胞培地から精製した。ヒト細胞株中での産生は、チャイニーズハムスター卵巣細胞またはハムスター乳仔腎臓細胞において産生される一般に市販されているｒＦＶＩＩＩ製品と比較して、製造に際して有意の変化を示す。この変化についての論理的根拠は、この分子のＦＶＩＩＩ部分に必要な翻訳後修飾を実施するよう、最良の備えをヒト細胞は有すると予測される、ということであった。

【０１３２】

ｒＦＶＩＩＩＦｃおよび組換えＢドメイン欠失ＦＶＩＩＩ（ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標））に関する分子量の差を考慮するためのＩＵ／ｎｍｏｌへの特異的活性の変換は、特異的活性が両タンパク質に関して同様である（ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１９７０　ＩＵ／ｎｍｏｌおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）に関しては１５２１～２２８７　ＩＵ／ｎｍｏｌ）ことを示した。ＦＶＩＩＩのＣ１およびＣ２ドメインは全ＦＶＩＩＩ活性に不可欠であるリン脂質結合に関与するため、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する特異的活性がＦＶＩＩＩのＣ末端とＦｃのＮ末端との融合による影響を受けない、ということはやや意外である（Ｆａｙ，　ＰＪ，　Ｊ．　Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ　８３：　１０３－８　（２００６）およびＲａｕｔ，　Ｓ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｒ．　Ｊ．　Ｈａｅｍａｔｏｌ．　１０７：　３２３　（１９９９）；これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）。

【０１３３】

血友病Ａの処置は、出血症状出現の時点で要求に応じるものであり、あるいは出血の防止のための予防による。オンデマンド治療は依然として高頻度で用いられているが、しかし、予防および関節損傷防止に向かう傾向が認められる（Ｂｌａｎｃｈｅｔｔｅ　Ｐ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈａｅｍａｔｏｐｈｉｌｉａ　２００４：　１０；　６７９－６８３；Ｍａｎｃｏ－Ｊｏｈｎｓｏｎ，　ＭＪ．　Ｅｔ　ａｌ．，　Ｎ．　Ｅｎｇｌ．　Ｊ．　Ｍｅｄ．　２００７；　３５７：　５３５－５４４；これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）。患者において１％を上回るＦＶＩＩＩ：Ｃを保持するために、１０～１２時間という相対的に短い半減期により、予防のために、一般ＦＶＩＩＩ製品を２～３日毎に投与する（Ｍｏｒｆｉｎｉ，　Ｍ，　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　２００３；　９　（ｓｕｐｐｌ　１）：　９４－９９；　ｄｉｓｃｕｓｓｉｏｎ　１００；Ｗｈｉｔｅ　ＧＣ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈａｅｍｏｓｔ．　１９９７：　７７：　６６０－７；Ｂｌａｎｃｈｅｔｔｅ，　Ｐ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈａｅｍｏｓｔ．　２００８　Ａｕｇ；　６（８）：　１３１９－２６；これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）。出血からの長期防御を提供する長期作用性ＦＶＩＩＩ療法は、血友病Ａ患者に関する生活の質の顕著な改善を示す。凝固因子の半減期を延長するための戦略は、他の分子に関して成功しているもの、例えばペギル化（Ｒｏｓｔｉｎ　Ｊ．　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｉｏｃｏｎｊ．　Ｃｈｅｍ．　２０００；　１１：　３８７－９６；この記載内容は参照により本明細書中で援用される）、糖ＰＥＧ化（Ｓｔｅｎｎｉｃｋｅ　ＨＲ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈａｅｍｏｓｔ．　２００８；　１００：　９２０－８；この記載内容は参照により本明細書中で援用される）、ペギル化リポソームを用いる処方（Ｓｐｉｒａ　Ｊ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｌｏｏｄ　；２００６；　１０８：　３６６８－３６７３；　Ｐａｎ　Ｊ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｌｏｏｄ　２００９；　１１４：　２８０２－２８１１；これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）ならびにアルブミンとの共役（Ｓｃｈｕｌｔｅ　Ｓ．，　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｒｅｓ．　２００８；　１２２　Ｓｕｐｐｌ　４：　Ｓ１４－９；この記載内容は参照により本明細書中で援用される）を包含する。ペギル化は、クリアランスを低減するためのアプローチを表わすが、しかしながら、ｉｎ　ｖｉｖｏでの修飾の作用は現在のところ知られていない。ｉｎ　ｖｉｖｏでのＦＶＩＩＩの直接ペギル化の結果は現在のところ未知であるが、一方、ペギル化リポソームを用いて処方されるＦＶＩＩＩは、臨床的に研究されてきており、出血期間に中等度の影響を及ぼすかまたは全く影響を及ぼさないことを示している（Ｓｐｉｒａ　Ｊ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｌｏｏｄ　；２００６；　１０８：　３６６８－３６７３；Ｓｐｉｒａ　Ｊ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｔｈｒｏｍｂ．　Ｈａｅｍｏｓｔ．　２００８　Ｓｅｐ；　１００（３）：　４２９－３４；これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）。

【０１３４】

ＦＶＩＩＩの半減期を延長するための本発明のアプローチは、ＦＶＩＩＩをＩｇＧ１のＦｃドメインと組換え的に融合することであった。Ｆｃは天然受容体ＦｃＲｎと結合し、その正常機能は分解からのＩｇＧの保護である。本明細書中に記載される結果は、血友病

Ａマウスおよび血友病ＡイヌにおけるｒＦＶＩＩＩ生成物と比較して、ｒＦＶＩＩＩＦｃの最初の薬物動態および効力特性化を表す。両方の種において、ＦＶＩＩＩ活性またはＥＬＩＳＡ（イヌのみ）により測定した場合、ｒＦＶＩＩＩＦｃの半減期はｒＦＶＩＩＩの約２倍であった。これらのデータは、両動物モデルからのＷＢＣＴ結果とも良好に相関し、すなわち、ＷＢＣＴに及ぼすｒＦＶＩＩＩＦｃの作用の持続期間は、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）に比して約２倍の長さであった。イヌにおいて、C_{max}およびクリアランスはｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）に関して同様であったが、しかしＡＵＣおよび定常状態での配分の容積は、それぞれ、ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）に比してｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては約１．５倍および２倍であった。この動物モデルにおけるＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）に関するＰＫパラメーターは、文献で報告された値と一致する（Ｂｒｉｎｋｈｏｕｓ Ｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．２００２；２８：２６９－２７２；この記載内容は参照により本明細書中で援用される）。

【０１３５】

これらの知見がヒトにおける同程度の半減期に言い換えるならば、これは、血友病Ａ患者の処置における有意の進歩を表す。

【０１３６】

付加的参考文献（これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される）

【０１３７】

【数１】

Berkner K., Methods Enzymol. 1993;222:450-477.

Bitonti AJ, and Dumont JA., Adv. Drug Del. Rev. 2006;58:1106-1118.

Dumont JA, et al., J. Aerosol Med. 2005;18:294-303.

Dumont JA, et al., BioDrugs 2006:20:151-160.

Ellis CN, and Krueger GG., N. Engl. J. Med. 2001;345:248-55.

Low SC, et al., Hum Reprod. 2005:7:1805-1813.

Manco-Johnson, M., Haemophilia 2007;13 Suppl;2: 4-9.

Mannucci, PM, and Tuddenham, EGD., N. Engl. J. Med. 2001;344:1773-1779.

Peyvandi F, et al., Haemophilia 2006;12(Suppl 3):82-89.

Rodriguez-Merchan, EC., Semin. Thromb. Hemost. 2003;29:87-96.

Srour MA, et al., Ann. Hematol. 2008; 87:107-12.

実施例２

本試験の目的は、単一回静脈内用量投与後のカニクイザルにおけるｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＢＤＤ－ｒＦＶＩＩＩ（Ｘｙｎｔｈａ（登録商標））の薬物動態および薬力学を確定することであった。

【０１３８】

材料および方法

ｒＦＶＩＩＩＦｃ（Ｂｉｏｇｅｎ Ｉｄｅｃ）：１．２ｍｇ／ｍＬおよび９８８２ ＩＵ／ｍＬの濃度で、凍結液として供給。特異的活性は８２３５ＩＵ／ｍｇ。－７０℃で保存。それを注射前に希釈。

【０１３９】

名称：Ｘｙｎｔｈａ（登録商標）（Ｎｏｖｉｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）；凍結乾燥粉末として供給。これを、メーカーの使用説明書に従って、５２５ ＩＵ／ｍＬの公称濃度を有する溶液を生じるよう再構成する。メーカーの推奨に従って保存。

【０１４０】

動物

ニュー・イベリア・リサーチセンター（ＮＩＲＣ）コロニーからのカニクイザルを用い、ＮＩＲＣ（Ｎｅｗ　Ｉｂｅｒｉａ，　ＬＡ）で、承認されたＮＩＲＣ　ＩＡＣＵＣプロトコール（ＡＰＳ　２００８－８７３３－０５８）下で、試験（ＮＩＲＣ試験番号８７３３－０９０３）を実行した。

【０１４１】

健康状態が良好であることが確定された６匹の実験未使用カニクイザル（雄３匹、雌３匹）を、試験に用いた。

【０１４２】

プロトコールおよびＵＬ　Ｌａｆａｙｅｔｔｅ－ＮＩＲＣ標準操作手順に従って、試験を実施した。

【０１４３】

試験計画

６匹のサル（雄３匹、雌３匹）の各々に、１２５　ＩＵ／ｋｇでｒＦＶＩＩＩＦｃを静脈内投与した。交差試験で、１２５　ＩＵ／ｋｇで、同一動物にＸｙｎｔｈａ（登録商標）（ＢＤＤ－ｒＦＶＩＩＩ）を静脈内投与した。群１動物（ｎ＝３）は、０日目にＸｙｎｔｈａを、３日目にｒＦＶＩＩＩＦｃを摂取したが、一方、群２動物（ｎ＝３）は、０日目にｒＦＶＩＩＩＦｃを、その後、４日目にＸｙｎｔｈａを摂取した。群２に関しては用量投与間の付加的な日は、計画基線レベルより低く低減するのに十分な時間をｒＦＶＩＩＩＦｃが有したことを保証するためであった。ＥＬＩＳＡならびにＦＶＩＩＩ特異的色素生成活性検定によるｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＸｙｎｔｈａの測定のために、用量投与前、用量投与後０．２５、４、１２、２４、３６、４８および７２時間目に、各動物から、１０分の１容積３．２％クエン酸ナトリウム中に血漿に関して血液を採取した。

【０１４４】

血漿中のｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＦＶＩＩＩを測定するためのＥＬＩＳＡ

サル血漿中のｒＦＶＩＩＩＦｃの測定方法

サル血漿中のｒＦＶＩＩＩＦｃを定量するために、この酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）を設計する。このＥＬＩＳＡ法では、Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓからのヤギ抗ヒトＩｇＧ－（Ｈ＋Ｌ）抗体（サル、吸着）（カタログ番号Ａ８０－３１９Ａ）を、被覆緩衝液中に希釈し、９６ウェル微量滴定試料プレート上に固定した。プレートを吸引し、３７℃で２時間、遮断緩衝液（３％ＢＳＡ／１×トリス）を付加することにより、すべての非吸着部位を遮断する。血漿試料を高カルシウム試料希釈緩衝液（３％無脂肪乾燥ミルク／ＴＢＳＴ、３０ｍＭの$CaCl_2$を含有）で１：２０に希釈し、試料プレート上に分配する。プレートを、３７℃で約２時間、インキュベートする。その後、プレートを洗浄し、Ｇｒｅｅｎ　Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓからのマウス抗Ｂドメイン欠失（α．ＢＤＤＡ１）因子ＶＩＩＩ（Ａ１ドメイン）抗体（カタログ番号ＧＭＡ－８００２）をプレートに付加し、３７℃で約１時間インキュベートする。プレートを洗浄後、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　ＢｉｏｔｅｃｈからのＨＲＰ共役ヤギ抗マウスＩｇＧ２ａ抗体（カタログ番号１０８０－０５）をプレートに付加し、室温で約３０分間インキュベートする。プレートを再び洗浄し、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）ペルオキシダーゼ基質溶液を付加し、室温で約３０分間インキュベートする。非酸性停止溶液の付加により、反応を停止する。試料中のｒＦＶＩＩＩＦｃの量に比例して、発色する。単一検出波長６５０ｎｍを用いて、吸光度プレート読取機でプレートを読取る。４－パラメーター・ロジスティック曲線当てはめプログラムを用いて、光学密度（ＯＤ）対濃度をプロットすることにより得られる標準曲線で、ｒＦＶＩＩＩＦｃ濃度を決定する。この方法の較正曲線範囲は、５％サル血漿中で０．４００ｎｇ／ｍＬ～５１．２ｎｇ／ｍＬ（１００％サル血漿中では８．００ｎｇ／ｍＬ～１０２４ｎｇ／ｍＬ）である。５％サル血漿中で０．２００ｎｇ／ｍＬでの検定の適格範囲外の一較正物質が含まれて、曲線当てはめを促すためのアンカーポイントとして役立ち得る。曲線の最適当てはめに基づいて、アンカーポイントが除去されるかまたは保持される（すなわち、最高数の標準が限定精度内で読取る、％ＲＥ）。

【０１４５】
サル血漿中のＦＶＩＩＩを測定する方法
サル血漿中のＦＶＩＩＩを定量するために、この酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）を設計する。このＥＬＩＳＡ法では、Ｇｒｅｅｎ Ｍｏｕｎｔａｉｎ ＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓからのマウスαＢＤＤＡ１ ＦＶＩＩＩ抗体（カタログ番号ＧＭＡ－８００２）を被覆緩衝液中に希釈し、９６ウェル微量滴定試料プレート上に固定した。プレートを吸引し、３７℃で１時間、遮断緩衝液（３％ＢＳＴ／１×トリス）を付加することにより、すべての非吸着部位を遮断する。血漿試料を高カルシウム試料希釈緩衝液（１００ｍＭの$CaCl_2$を含有する遮断緩衝液）で１：２０に希釈し、試料プレート上に分配する。プレートを、３７℃で約２時間、インキュベートする。プレートを洗浄後、Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ Ｋｉｔからの検出抗体、ＨＲＰ標識ポリクローナル抗体（カタログ番号Ｆ８Ｃ－ＥＩＡ－Ｄ）をＴＢＳ／０．０５％トゥイーン２０中でさらに希釈し、プレートに付加し、室温で約１時間インキュベートする。プレートを再び洗浄し、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）ペルオキシダーゼ基質溶液を付加し、室温で約３０分間インキュベートする。酸性停止溶液の付加により、反応を停止する。試料中のＦＶＩＩＩＦｃの量に比例して、発色する。単一検出波長４５０ｎｍを用いて、吸光度プレート読取機でプレートを読取る。４－パラメーター・ロジスティック曲線当てはめプログラムを用いて、光学密度（ＯＤ）対濃度をプロットすることにより得られる標準曲線で、ＦＶＩＩＩ濃度を決定する。この方法の較正曲線範囲は、５％サル血漿中で０．６２５ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ（１００％サル血漿中では１２．５ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ）である。５％サル血漿中で０．３１３および０．１５６ｎｇ／ｍＬでの検定の適格範囲外の２較正物質が含まれて、曲線当てはめを促すためのアンカーポイントとして役立ち得る。曲線の最適当てはめに基づいて、アンカーポイントが除去されるかまたは保持される（すなわち、最高数の標準が限定精度内で読取る、％ＲＥ）。
【０１４６】
ＦＶＩＩＩ特異的色素生成検定
カニクイザル血漿試料中のＦＶＩＩＩ活性を投与用量に基づいて概算し、次いで、ヒトＦＶＩＩＩ欠失血漿（Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ Ｓｔａｇｏ）中で約０．２５～１ ＩＵ／ｍｌに希釈した。ＦＶＩＩＩ色素生成キット（Ｓｉｅｍｅｎｓ）を用いて、Ｓｙｓｍｅｘ ＣＡ１５００（Ｓｉｅｍｅｎｓ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で試料を分析した。この色素生成検定では、血漿試料中のｒＦＶＩＩＩＦｃをトロンビンにより活性化する。次に、活性化因子ＶＩＩＩ（ＦＶＩＩＩａ）は、活性化因子ＩＸ（ＦＩＸａ）、リン脂質（ＰＬ）およびカルシウムイオンの存在下で、第Ｘ因子（ＦＸ）の第Ｘａ因子（ＦＸａ）への転換を促す。ＦＸａに特異的なｐ－ニトロアニリド基質の加水分解により、ＦＸａ活性を査定する。４０５ｎｍで測定されるｐ－ニトロアニリン（ｐＮＡ）の放出の初期速度はＦＸａ活性に比例し、したがって、試料中のＦＶＩＩＩ活性に比例する。この検定におけるｒＦＶＩＩＩＦｃによるＦＶＩＩＩ活性の定量限界は、～０．３ ＩＵ／ｍｌである。検定は、±２０％の精度で約０．０６ ＩＵ／ｍｌの下限より低い総ＦＶＩＩＩ活性を測定し得る。個々の動物に関する用量投与前試料の算定活性を各時点での値から差し引いて、ＰＤ曲線（ＦＶＩＩＩ活性対時間）を作成した。
【０１４７】
ヒトＦＶＩＩＩ欠損血漿中に１ ＩＵ／ｍｌに希釈されたＮＩＢＳＣ 第７次国際標準因子ＦＶＩＩＩ濃縮物から、標準曲線を作成した。６Ａ１９準曲線をＳｙｓｍｅｘ機器で順次希釈して、０．１５、０．１、０．０５、０．０２５、０．００５３および０．００２６ ＩＵ／ｍｌの濃度を得た。機器は内部にすべての試料を１：１０希釈するため、ＦＶＩＩＩ標準濃度は、１．５～０．０２６ ＩＵ／ｍｌの血漿濃度に対応し、これが測定され得るＦＶＩＩＩ活性の範囲である。
【０１４８】
ＰＫ解析
ＷｉｎＮｏｎｌｉｎソフトウェアプログラム（バージョン５．２；Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ

Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，　Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，　ＣＡ）で、非分画解析モジュールを用いて、濃度時間プロフィールを評価した。

【０１４９】

結果

分子のＦＶＩＩＩおよびＦｃ部分の両方を測定するサンドイッチＥＬＩＳＡフォーマットを用いて、サル血漿中のｒＦＶＩＩＩＦｃの濃度を測定した。データを表７に報告する。用量投与前試料はすべて、定量限界より低かった。図７は、長時間に亘る群平均ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａ血漿濃度を示す。個々の血漿濃度対時間曲線を、図８に示す。ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａに関するＰＫパラメーターの要約を、それぞれ表９および１０に示す。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する平均ｔ１／２は１１．９±１．７時間（９．３～１４．１時間の範囲）であり、そしてＸｙｎｔｈａに関しては、平均排出ｔ１／２は１２．７±４．４時間（９．２～１９．９時間の範囲）であった。

【０１５０】

ＦＶＩＩＩ特異的色素生成活性検定を用いて、ＦＶＩＩＩ活性を測定した。データを表８で報告する。内因性ＦＶＩＩＩによる用量投与前活性を、全試料から差し引いた。平均群データのグラフを、図９に示す。個々の血漿濃度対時間曲線を図１０に示す。ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａに関するＰＫパラメーターの要約を、それぞれ表９および１０に示す。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する平均ｔ１／２は１６．１±６．９時間（１１．６～２９．４時間の範囲）であり、そしてＸｙｎｔｈａに関しては１２．５±１．７時間（１０．４～１４．３時間の範囲）であった。

【０１５１】

考察および結論

排出半減期は、１２５　ＩＵ／ｋｇの単一回静脈内用量投与後のｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＸｙｎｔｈａでほぼ同じであった。

【０１５２】

実施例３

これは、重症（＜１　ＩＵ／ｄＬ　［１％］内因性因子ＶＩＩＩ［ＦＶＩＩＩ］）血友病Ａを有する被験体におけるｒＦＶＩＩＩＦｃの単一回用量投与の安全性、耐容性および薬物動態を評価するよう意図されたＩ／ＩＩａ相・非盲検・交差・用量増加・マルチセンターおよびヒト初回試験である。合計約１２名の治療歴のある患者を登録し、２５または６５　ＩＵ／ｋｇでｒＦＶＩＩＩＦｃを投与する。スクリーニング（参照比較物質であるＡｄｖａｔｅ（登録商標）［ｒＦＶＩＩＩ］の初回投与前２８日以内に計画予定）ならびに初回注射前に無ＦＶＩＩＩ処置で最低４日（９６時間）経過後、約６名の被験体がＡｄｖａｔｅ（登録商標）の単一回２５　ＩＵ／ｋｇ用量投与を受けて、その後、３日間（７２時間）薬物動態（ＰＫ）プロフィールを、次いで交差試験を受けて、７日間（１６８時間）ＰＫプロファイリングのためのｒＦＶＩＩＩＦｃの２５　ＩＵ／ｋｇ単一回、非盲検用量投与を受けた。最初の３名の被験体には、順次用量投与する。２５　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃを用量投与した最初の３名の被験体に関しては、各被験体はｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後１４日目（３３６時間）に阻害剤査定を受ける。次の被験体（最初の３名の被験体のみに関して）の用量投与は、一旦、阻害剤試験が完了したら、行なう。３番目の被験体が１４日阻害剤査定を完了した後、残りの３名の被験体（２５　ＩＵ／ｋｇ）および６名の被験体（６５　ＩＵ／ｋｇ）が、各用量群内で、少なくとも１日は離して逐次的に、加入し始める。

【０１５３】

最後の被験体が２５　ＩＵ／ｋｇ用量のｒＦＶＩＩＩＦｃを摂取した１週間後に、約６名の独自の被験体が６５　ＩＵ／ｋｇコホートのために動員される。６５　ＩＵ／ｋｇコホート中の各被験体は、６５　ＩＵ／ｋｇ用量のＡｄｖａｔｅ（登録商標）を、その後、４日（９６時間）ＰＫプロファイリングと次いで交差試験を受け、そして１０日間（２４０時間）プロファイリングのためのｒＦＶＩＩＩＦｃの６５　ＩＵ／ｋｇ単一回非盲検用量を摂取する。任意のコホートにおいてｒＦＶＩＩＩＦｃの初回注射前に出血症状出現が

起きた場合には、被験体の予備試験ＦＶＩＩＩ製品を処置のために用いて、少なくとも４日の間隔を置いた後にＰＫプロフィールのためのｒＦＶＩＩＩＦｃの最初の注射を施さなければならない。

【０１５４】

全被験体が、安全のために、ｒＦＶＩＩＩＦｃ　２５　ＩＵ／ｋｇまたは６５　ＩＵ／ｋｇの投与後、１４日（３３６時間）および２８日安全性評価期間の間、追跡調査される。全被験体が、意図された時点でのＦＶＩＩＩ活性の分析のための血液試料とともに、用量投与の前および後に、薬物動態用試料採取を受ける。

【０１５５】

実施例４

Ｘアーゼ複合体内の活性

ＦＶＩＩＩタンパク質（ｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ）とＦＩＸａとの結合を調べるために、そしてＦＸを活性化するこれらのタンパク質の能力を測定するために、動態試験を実施して、Ｘアーゼ複合体の状況でのこれらの相互作用を検査した。この検定は、カルシウムの存在下でのリン脂質表面での活性化ＦＩＸおよび活性化ｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩまたはｒＦＶＩＩＩＦｃタンパク質とのＸアーゼ複合体の形成を、ならびに色素生成または蛍光発生性基質の切断により測定した場合のＦＸのＦＸａへの転換をモニタリングすることを包含した。

【０１５６】

要するに、ＦＶＩＩＩを先ず、α－トロンビンで５分間活性化して、次に、Ｃａ２＋および合成リン脂質小胞（２５％ホスファチジルセリン（ＰＳ）／７５％ホスファチジルコリン（ＰＣ））または血小板の存在下で、ＦＩＸａと混合する。下記の条件下で、ＦＶＩＩａおよびＦＩＸａは、リン脂質表面およびカルシウムイオンの存在下で相互作用して、活性Ｘアーゼ複合体を形成し、これが、タンパク質分解性プロセシングによるＦＸのＦＸａへの転換を媒介する。ＦＸａがＦＸａ特異的な色素生成性または蛍光発生性の基質を切断する。切断基質は色素生成性であり、したがって、溶液中の切断基質の量は生成されたＦＸａの量を示す。これは、４０５ｎｍでの溶液の吸光度を測定することにより定量される。

【０１５７】

Ａ．第Ｘ因子の活性化

ＦＸを活性化するｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの能力を、上記のＸアーゼ複合体の状況で試験した。トロンビン活性化ＦＶＩＩＩタンパク質を、カルシウムの存在下でＦＩＸａおよびリン脂質とともにインキュベートし、次いで、ＦＸ特異的基質の存在下で異なる濃度のＦＸに付加して、ＦＸａ生成の速度を確定した（図１１）。

【０１５８】

これらのデータに基づいて、Ｘアーゼ複合体の状況での異なるＦＶＩＩＩタンパク質に関するＫｍおよびＶｍａｘを算定した（Ｃｈａｎｇ　１９９７）（表１１）。６つの分析物（二重反復実行を含有する３つの実験）の平均±対応する標準偏差、として、データを表す。これらのデータに基づいて、これらのタンパク質（ｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ）は、検定の変化量内で、匹敵するＫｍおよびＶｍａｘ値を有することが判明した。したがって、リン脂質との相互作用およびＦＸ活性化の能力に関して、ｒＦＶＩＩＩＦｃを用いて形成されるＸアーゼ複合体は、認可製品ｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩ（ＲｅＦａｃｔｏ）を用いて形成されるＸアーゼ複合体と同様に振舞う。これらの匹敵するデータは、ｒＦＶＩＩＩＦｃが、トロンビンとともに短時間インキュベートされた後にｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩと匹敵する程度に活性化されることも実証する、ということに留意されたい。

【０１５９】

Ｂ．ＦＩＸａとの相互作用

ｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩおよびｒＦＶＩＩＩＦｃとＦＩＸａとの相互作用も、Ｘアーゼ複合体の状況で調べた。Ｘアーゼ複合体は、一定量のＦＸおよび種々のＦＩＸａレベルを用

いて、上記のように集合され、そしてＦＸａ生成速度が決定される（図１２）。これらのデータから、ＦＩＸａに対するＦＶＩＩＩタンパク質の両方を用いて形成されるＸアーゼ複合体に関するＫｄ値を確定する（Ｃｈａｎｇ　１９９７）。６つの分析物（二重反復実行を含有する３つの実験）の平均±対応する標準偏差、として、データを表す（表１２）。両タンパク質は同様のＫｄおよびＶｍａｘ値を有することが判明したが、これは、ｒＦＶＩＩＩＦｃが認可ｒＢＤＤ　ＦＶＩＩＩ製品と同様のＦＩＸａとの匹敵する相互作用を有する、ということを示す。

【０１６０】

実施例５

実施例３で考察したＩ／ＩＩａ相臨床試験に関する暫定薬物動態データは、ＦＶＩＩＩＦｃに関する下記の結果を実証した。ＦＶＩＩＩＦｃは、ＡＤＶＡＴＥ（全長ｒＦＶＩＩＩ）と比較して、全身曝露（AUC_{INF}）の約５０％増、クリアランス（Ｃｌ）の約５０％減、ならびに排出半減期およびＭＲＴの約５０～７０％増を示した。さらに、ＦＶＩＩＩＦｃは、ＡＤＶＡＴＥと比較して、Ｃ１６８、ＴＢＬＰ１、ＴＢＬＰ３およびＴＢＬＰ５値の増大を示した。

【０１６１】

AUC_{INF}　：ゼロから無限までの濃度－時間曲線下面積

ベータＨＬ　：排出相半減期；$t_{1/2\beta}$としても言及される

Ｃ１６８　：用量投与後約１６８時間での基線を上回る概算ＦＶＩＩＩＦｃ活性

Ｃｌ　：クリアランス

ＭＲＴ　：平均滞留時間

ＴＢＬＰ１　：ＦＶＩＩＩＦｃ活性が基線を上回る約１　ＩＵ／ｄＬに減少した場合の用量投与後のモデル予測時間

ＴＢＬＰ３　：ＦＶＩＩＩＦｃ活性が基線を上回る約３　ＩＵ／ｄＬに減少した場合の用量投与後のモデル予測時間

ＴＢＬＰ５　：ＦＶＩＩＩＦｃ活性が基線を上回る約５　ＩＵ／ｄＬに減少した場合の用量投与後のモデル予測時間

実施例６

組換えＢドメイン欠失因子ＶＩＩＩ－Ｆｃ（ｒＦＶＩＩＩＦｃ）融合タンパク質は、ＦＶＩＩＩの半減期を延長するためのアプローチとして作製されてきた。ｒＦＶＩＩＩＦｃの薬物動態（ＰＫ）を、血友病ＡマウスにおいてｒＦＶＩＩＩと比較した。終末半減期は、ｒＦＶＩＩＩと比較してｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては２倍長い、ということが判明した。半減期の延長に関する根本的機序がＦｃＲｎによるｒＦＶＩＩＩＦｃの保護のためであることを確証するために、ＦｃＲｎノックアウトおよびヒトＦｃＲｎトランスジェニックマウスにおいて、ＰＫを評価した。単一回静脈内用量（１２５　ＩＵ／ｋｇ）を投与して、色素生成活性検定を用いて血漿濃度を測定した。Ｃｍａｘは、両マウス系統において、ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびｒＦＶＩＩＩ（ＸＹＮＴＨＡ（登録商標））間で同様であった。しかしながらｒＦＶＩＩＩＦｃに関する半減期はＦｃＲｎノックアウトマウスにおいてはｒＦＶＩＩＩのものに匹敵したが、一方、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関する半減期は、ｈＦｃＲｎトランスジェニックマウスにおいてはｒＦＶＩＩＩより約２倍長く延長された。これらの結果は、ＦｃＲｎが、ｒＦＶＩＩＩと比較した場合、ｒＦＶＩＩＩＦｃの半減期延長を媒介するかまたはそれに関与する、ということを確証する。回転血栓弾性測定法（ＲＯＴＥＭ）により測定される全血の血流遮断は、血友病マウスの出血モデルにおける、ならびに臨床的適用において、凝固因子の効力と相関することが示されているため、ＲＯＴＥＭを用いて血友病ＡマウスにおけるｒＦＶＩＩＩＦｃのｅｘ　ｖｉｖｏ効力を評価しようとした。血友病Ａマウスに、５０　ＩＵ／ｋｇ　ｒＦＶＩＩＩＦｃ、ＸＹＮＴＨＡ（登録商標）（ＦＶＩＩＩ）またはＡＤＶＡＴＥ（登録商標）（ＦＶＩＩＩ）の単一回静脈内用量投与を施した。用量投与の５分後、血餅形成は、凝固時間（ＣＴ）、血餅形成時間（ＣＦＴ）およびα角に関して同様であった。しかしながら、ｒＦＶＩＩＩＦｃは、用量投与後

７２および９６時間にＣＴの有意の改善を示し、そしてＣＦＴおよびα角も、ｒＦＶＩＩＩＦｃのＰＫ延長と一致して、ＸＹＮＴＨＡ（登録商標）（ＦＶＩＩＩ）およびＡＤＶＡＴＥ（登録商標）（ＦＶＩＩＩ）の両方に比して９６時間で改善された。したがって、ＦＶＩＩＩのＦｃ融合物の構築は、半減期増大と出血からの防御延長を提供する能力を有する作用の明示された機序を有する分子を産生する。

【０１６２】

実施例７

この実施例は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇのＦＶＩＩＩ製品で処置された患者１６名からのＦＶＩＩＩ活性に関する最終分析結果を示す。実施例３および５参照。

【０１６３】

この実施例において、ｒＦＶＩＩＩＦｃは、ヒトＩｇＧ１の二量体Ｆｃドメインと融合される組換えＢドメイン欠失ヒトＦＶＩＩＩ（ＢＤＤ－ｒＦＶＩＩＩ）の単一分子からなる組換え融合タンパク質であって、介在リンカー配列を有さない。このタンパク質構築物は、本明細書中では、ｒＦＶＩＩＩＦｃヘテロ二量体ハイブリッドタンパク質、ＦＶＩＩＩＦｃ単量体Ｆｃ融合タンパク質、ＦＶＩＩＩＦｃ単量体ハイブリッド、単量体ＦＶＩＩＩＦｃハイブリッドおよびＦＶＩＩＩＦｃ単量体－二量体とも呼ばれる。図１および表２Ａ参照。

【０１６４】

ｒＦＶＩＩＩＦｃを用いる前臨床試験は、市販のｒＦＶＩＩＩ製品と比較して、ｒＦＶＩＩＩ活性の半減期の約２倍の延長を示している。この試験の論理的根拠は、凍結液体処方物中のｒＦＶＩＩＩＦｃの単一回用量投与の安全性および耐容性を評価し、重症血友病Ａ被験体におけるＰＫに関するデータを提供することである。この試験に関して、１６名の評価可能被験体が、ＰＫ評価のために利用可能であった。２５（ｎ＝６）および６５　ＩＵ／体重１ｋｇ（ｎ＝１０）の公称用量でのｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＡｄｖａｔｅの両方の２つの用量の単一回投与を、約１０分間に亘って静脈内に注入した。血漿ＰＫ査定のための血液試料を、注入前に、ならびに用量投与後１０日までに入手した。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの両方に関するＦＶＩＩＩ活性のＰＫを、モデル依存的方法を用いて、この試験で特性化した。

【０１６５】

目的

この試験の第一の目的は、重症血友病Ａを有する年齢１２歳以上の治療歴のある患者（ＰＴＰ）における２つの用量のｒＦＶＩＩＩＦｃ（２５および６５　ＩＵ／ｋｇ）の単一回投与の安全性および耐容性を査定することであった。

【０１６６】

第二の目的は、一段階凝固および色素生成検定においてＡｄｖａｔｅ（登録商標）と比較した場合の２５または６５　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃの単一回投与後、長時間に亘るＦＶＩＩＩの薬力学（ＰＤ）的活性により確定される薬物動態（ＰＫ）パラメーターを決定することであった。

【０１６７】

試験計画（実施例３参照）

スクリーニング来院時（Ａｄｖａｔｅの用量投与前２８日以内）；注射前（Ａｄｖａｔｅの注射）０日目ならびに注射後１０および３０分ならびに１、３、６および９時間目に；Ａｄｖａｔｅの注射後２４時間での１日目に；Ａｄｖａｔｅの注射後４８時間での２日目に；Ａｄｖａｔｅの注射後７２時間での３日目に；高用量のＡｄｖａｔｅの投与後９６時間での４日目に（コホートＢのみ）、ＦＶＩＩＩ活性ＰＫ評価のために、血液試料を採取した。

【０１６８】

ｒＦＶＩＩＩＦｃの投与の直前、ｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後１０および３０分ならびに１、３、６および９時間目のｒＦＶＩＩＩＦｃ注射当日に；ｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後２４時間での１日目に；ｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後４８、７２、９６および１２０時間での

２～５日目に；ｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後１６８時間での７日目に；高用量のｒＦＶＩＩＩＦｃの投与後１９２、２１６および２４０時間での８、９および１０日目に（コホートＢのみ）、ＦＶＩＩＩ活性ＰＫ評価のために、血液試料を採取した。ｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後６７２時間での最終試験来院時（ｒＦＶＩＩＩＦｃの注射後２８日目）にも、ＦＶＩＩＩ活性を測定した。

【０１６９】

薬物動態モデリングおよび算定

略号

ＴＢＬＰ１＝ＦＶＩＩＩ活性が、基線を越えた約１　ＩＵ／ｄＬに減少した場合の用量投与後のモデル予測時間。

【０１７０】

ＴＢＬＰ３＝ＦＶＩＩＩ活性が、基線を越えた約３　ＩＵ／ｄＬに減少した場合の用量投与後のモデル予測時間。

【０１７１】

ＫＶ＿Ｍ＝Ｃｍａｘ＿Ｍ／実用量（ＩＵ／ｋｇ）

ＫＶ＿ＯＢ＝Ｃｍａｘ＿ＯＢ／実用量（ＩＵ／ｋｇ）

ＩＶＲ＿Ｍ＝１００×Ｃｍａｘ＿Ｍ×血漿容積（ｄＬ）／総用量（ＩＵ）；ここで、血漿溶積（ｍＬ）＝（２３．７×体長（ｃｍ））＋（９．０×体重（ｋｇ））－１７０９。

【０１７２】

ＩＶＲ＿ＯＢ＝１００×Ｃｍａｘ＿ＯＢ×血漿容積（ｄＬ）／総用量（ＩＵ）；ここで、血漿容積（ｍＬ）＝（２３．７×体長（ｃｍ））＋（９．０×体重（ｋｇ））－１７０９。

【０１７３】

結果

図１３．　観察群平均（＋ＳＥ）ＦＶＩＩＩ活性対時間プロフィール。用量レベルにより類別。化合物により群分け（１段階検定；２５　ＩＵ／ｋｇ（Ａ）および６５　ＩＵ／ｋｇ（Ｂ）ならびに色素生成検定；２５　ＩＵ／ｋｇ（Ｃ）および６５　ＩＵ／ｋｇ（Ｄ））。

【０１７４】

図１４．　観察群平均（＋ＳＥ）ＦＶＩＩＩ活性対時間プロフィール。用量レベルおよび化合物により群分け（１段階検定；Ａ）（色素生成検定；Ｂ）。

【０１７５】

単一回用量投与薬物動態（一段階検定）

観察ＦＶＩＩＩ活性は、ＡｄｖａｔｅまたはｒＦＶＩＩＩＦｃの短時間ＩＶ注入後に急に増大し、平均（±ＳＤ）モデル予測Ｃｍａｘ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては５６．６±４．７４および１２１±２８．２　ＩＵ／ｄＬであり、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては５５．６±８．１８および１０８±１６．９　ＩＵ／ｄＬであった。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ処置患者はすべて、ＦＶＩＩＩ活性の用量関連増大を示した。ＣｍａｘおよびＡＵＣＩＮＦの両方において観察された増大は、評価された用量範囲を上回る用量に比例するよりわずかに低かった。

【０１７６】

注入終了後、観察ＦＶＩＩＩ活性の減少は、基線レベルに到達するまで、単一指数関数型崩壊特性を示した。ＦＶＩＩＩ活性における減少速度は、Ａｄｖａｔｅに関するものよりｒＦＶＩＩＩＦｃに関する方が低く、平均（±ＳＤ）モデル予測排出半減期値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１１．９±２．９８および１０．４±３．０３時間、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１８．０±３．８８および１８．４±６．９９時間であった。排出半減期値は、両ＦＶＩＩＩ製品に関して評価された用量範囲全体で用量非依存性であると思われた。

【０１７７】

総全身ＦＶＩＩＩ曝露（ＡＵＣＩＮＦにより査定）は、それぞれ２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量レベルで、ＡｄｖａｔｅよりｒＦＶＩＩＩＦｃ投与後に～４８％および６１％大きかった。平均（±ＳＤ）モデル予測ＡＵＣＩＮＦ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては９７４±２５９および１８１０±６０６時間＊ＩＵ／ｄＬであり、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１４４０±３１６および２９１０±１３２０時間＊ＩＵ／ｄＬであった。

【０１７８】

排出半減期と同様に、ＭＲＴはＡｄｖａｔｅに比してｒＦＶＩＩＩＦｃに関して延長された。平均（±ＳＤ）モデル予測ＭＲＴ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１７．１±４．２９および１４．９±４．３８時間、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては２５．９±５．６０および２６．５±１０．１時間であった。ＭＲＴ値は、両ＦＶＩＩＩ製品に関して評価された用量範囲全体で用量非依存性であると思われた。

【０１７９】

さらに、ＣＬおよびＶに関する第一ＰＫパラメーター値を決定した。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関するＣＬ値は単に、等価用量でのＡｄｖａｔｅに関して観察された値の～６６％を占めるだけであった。平均（±ＳＤ）モデル予測ＣＬ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては２．７０±０．７２９および４．０８±１．６９　ｍＬ／時間／ｋｇ、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１．８０±０．４０９および２．６９±１．２５　ｍＬ／時間／ｋｇであった。Ｖ値は、ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ間で似ており、平均（±ＳＤ）モデル予測Ｖ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては４３．９±４．２７および５６．１±１３．４　ｍＬ／ｋｇ、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては４５．３±７．２３および６１．６±１０．６　ｍＬ／ｋｇであった。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って、平均ＣＬおよびＶ値のわずかな増大が認められた；しかしながら、用量レベル限定と結び付けて考えられる６５　ＩＵ／ｋｇ用量での標準偏差の増大は、これらのパラメーターの用量依存性の査定を混乱させた。例えばｒＦＶＩＩＩＦｃ処置群に関するＣＶ％幾何学平均ＣＬ値は、２３．０％（２５　ＩＵ／ｋｇ）から４８．６％（６５　ＩＵ／ｋｇ）に増大した。

【０１８０】

第一ＰＫパラメーターのほかに、第二ＰＫパラメーター（例えば、Ｋ値、ＩＶＲ等）を確定して、作用のＦＶＩＩＩ持続期間を評価した。ＰＫ差の証拠もｒＦＶＩＩＩＦｃで観察されたが、これは、等価用量でのＡｄｖａｔｅと比較した場合のＴＢＬＰ１およびＴＢＬＰ３値の増大を実証する。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃに関するＩＶＲおよびＫ値は、似ていると考えられた。ＴＢＬＰ１およびＴＢＬＰ３のわずかな増大が、ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って観察された。これに対して、平均ＩＶＲおよびＫ値のわずかな減少が、ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って認められた。前記のように、これらのパラメーターの用量依存性の査定は、限定用量レベルにより混乱させられる。

【０１８１】

平均（±ＳＤ）観察ＴＢＬＰ１は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては２．８８±０．７３３および２．９３±０．８４８　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては４．２８±０．８７３および５．１６±２．０２　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）であった。平均（±ＳＤ）観察ＴＢＬＰ３は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては２．０６±０．５２７および２．２６±０．６６６　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては３．０９±０．６２３および３．９３±１．５９　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）であった。

【０１８２】

観察Ｃｍａｘ値を用いて算定される平均ＩＶＲおよびＫ値（モデル内の基線および残留

薬剤を差し引く）は、一般的に、モデル予測Ｃｍａｘ値を用いて決定される値より大きかった；１分画モデルを用いて観察されるピーク活性よりわずかに低い概算値と一致する。平均（±ＳＤ）観察Ｋ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては２．５７±０．１９８および２．１３±０．５９８　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては２．４６±０．３３０および１．８５±０．３３２　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）であった。平均（±ＳＤ）観察ＩＶＲ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては９４．１±１５．６および８５．８±１６．５％、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては８９．５±１１．９および７４．８±６．７２％であった。

【０１８３】

単一回用量投与薬物動態（色素生成検定）

観察ＦＶＩＩＩ活性は、ＡｄｖａｔｅまたはｒＦＶＩＩＩＦｃの短時間ＩＶ注入後に急に増大し、平均（±ＳＤ）モデル予測Ｃｍａｘ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては７０．２±９．６０および１５７±３８．６　ＩＵ／ｄＬであり、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては７０．３±１０．０および１５８±３４．７　ＩＵ／ｄＬであった。

【０１８４】

ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ処置患者はすべて、ＦＶＩＩＩ活性の用量関連増大を示した。ＣｍａｘおよびＡＵＣＩＮＦの両方において観察された増大は、評価された用量範囲を上回る用量に比例するよりわずかに低かった。

【０１８５】

注入終了後、観察ＦＶＩＩＩ活性の減少は、基線レベルに到達するまで、単一指数関数型崩壊特性を示した。ＦＶＩＩＩにおける減少速度は、Ａｄｖａｔｅに関するものよりｒＦＶＩＩＩＦｃに関する方が低く、平均（±ＳＤ）モデル予測排出半減期値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１０．７±１．９８および１０．３±３．２７時間、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１６．２±２．９２および１９．０±７．９４時間であった。排出半減期値は、両ＦＶＩＩＩ製品に関して評価された用量範囲全体で用量非依存性であると思われた。

【０１８６】

総全身ＦＶＩＩＩ曝露（ＡＵＣＩＮＦにより査定）は、それぞれ２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量レベルで、ＡｄｖａｔｅよりｒＦＶＩＩＩＦｃ投与後に～５３％および８４％大きかった。平均（±ＳＤ）モデル予測ＡＵＣＩＮＦ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１０８０±２３６および２３２０±７８４時間＊ＩＵ／ｄＬであり、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１６５０±４０８および４２８０±１８６０時間＊ＩＵ／ｄＬであった。

【０１８７】

排出半減期と同様に、ＭＲＴはＡｄｖａｔｅに比してｒＦＶＩＩＩＦｃに関して延長された。平均（±ＳＤ）モデル予測ＭＲＴ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１５．３±２．８６および１４．８±４．７２時間、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては２３．４±４．２２および２７．３±１１．４時間であった。ＭＲＴ値は、両ＦＶＩＩＩ製品に関して評価された用量範囲全体で用量非依存性であると思われた。

【０１８８】

さらに、ＣＬおよびＶに関する第一ＰＫパラメーター値を決定した。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関するＣＬ値は単に、等価用量でのＡｄｖａｔｅに関して観察された値の～５８－６６％を占めるだけであった。平均（±ＳＤ）モデル予測ＣＬ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては２．３９±０．５２７および３．２１±１．４０　ｍＬ／時間／ｋｇ、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１．５７±０．３４９および１．８６±０．９７０　ｍＬ／時間／ｋｇであった。Ｖ値は、ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ間で似ており、平均（±ＳＤ）モデル予測Ｖ値は、２５および

６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては３５．８±５．５２および４３．６±１１．２　ｍＬ／ｋｇ、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては３５．９±６．６５および４２．７±８．９１　ｍＬ／ｋｇであった。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って、平均ＣＬおよびＶ値の増大が認められた；しかしながら、用量レベル限定と結び付けて考えられる６５　ＩＵ／ｋｇ用量での標準偏差の増大は、これらのパラメーターの用量依存性の査定を混乱させた。

【０１８９】

第一ＰＫパラメーターのほかに、第二ＰＫパラメーター（例えば、Ｋ値、ＩＶＲ等）を確定して、作用のＦＶＩＩＩ持続期間を評価した。ＰＫ差の証拠もｒＦＶＩＩＩＦｃで観察されたが、これは、等価用量でのＡｄｖａｔｅと比較した場合のＴＢＬＰ１およびＴＢＬＰ３値の増大を実証する。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃに関するＩＶＲおよびＫ値は、似ていると考えられた。

【０１９０】

ＴＢＬＰ１およびＴＢＬＰ３のわずかな増大が、ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って観察された。これに対して、平均ＩＶＲおよびＫ値のわずかな減少が、ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って認められた。前記のように、これらのパラメーターの用量依存性の査定は、限定用量レベルにより混乱させられる。

【０１９１】

平均（±ＳＤ）観察ＴＢＬＰ１は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては２．７０±０．５１１および３．０９±０．９７８　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては４．０６±０．７９８および５．６６±２．３８　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）であった。平均（±ＳＤ）観察ＴＢＬＰ３は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１．９８±０．３７７および２．３９±０．７１８　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては３．０４±０．５９８および４．４４±１．８４　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）であった。

【０１９２】

観察Ｃｍａｘ値を用いて算定される平均ＩＶＲおよびＫ値（モデル内の基線および残留薬剤を差し引く）は、一般的に、モデル予測Ｃｍａｘ値を用いて決定される値より大きかった；１分画モデルを用いて観察されるピーク活性よりわずかに低い概算値と一致する。平均（±ＳＤ）観察Ｋ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては３．０８±０．４２９および２．８５±０．７２１　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては３．１２±０．４５１および２．９２±０．９８５　ＩＵ／ｄＬ（ＩＵ／ｋｇ当たり）であった。平均（±ＳＤ）観察ＩＶＲ値は、２５および６５　ＩＵ／ｋｇ用量群に関してそれぞれ、Ａｄｖａｔｅに関しては１１２±１４．５および１１６±２６．９％、ならびにｒＦＶＩＩＩＦｃに関しては１１３±１６．３および１１７±３３．６％であった。

【０１９３】

結論

ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ処置患者はすべて、評価された用量範囲全体でＣｍａｘおよびＡＵＣＩＮＦの匹敵する用量関連性増大を示した。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃ活性のピーク血漿レベルは注入終了後１時間以内に一般的に観察され、用量投与後数日間、依然として検出可能であった。注入終了後、ベースライン補正ＦＶＩＩＩ活性の減少は、両製品に関して基線レベルに到達するまで、単一指数関数型崩壊特性を示した。排出半減期およびＭＲＴに関するパラメーター値は、両ＦＶＩＩＩ製品に関して評価された用量範囲全体で用量非依存性であると思われた。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃの用量増大に伴って、平均ＣＬおよびＶ値のわずかな増大が認められた；しかしながら、用量レベル限定と結び付けて考えられる６５　ＩＵ／ｋｇ用量での被験体間変動の増大は、これらのパラメーターの用量依存性の査定を混乱させた。

【０１９４】

ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＡｄｖａｔｅ活性ＰＫの比較は、匹敵する用量でのＡｄｖａｔｅと比較して、ｒＦＶＩＩＩＦｃに関して全身性曝露の約４８～６１％（一段階検定）または５３～８４％（色素生成検定）増大、クリアランスの約３０～４０％低減、排出半減期およびＭＲＴの両方の約５０～８０％増大を明示した。ＰＫ差の証拠もｒＦＶＩＩＩＦｃで観察されたが、これは、等価用量でのＡｄｖａｔｅと比較した場合のＴＢＬＰ１およびＴＢＬＰ３値の増大を実証する。ＡｄｖａｔｅおよびｒＦＶＩＩＩＦｃに関するＩＶＲおよびＫ値は、似ていると考えられた。

【０１９５】

色素生成検定結果から得られるＰＫパラメーターは、一般的に、一段階検定からのものと一致したが、但し、色素生成検定はより高い曝露パラメーター（例えばＣｍａｘ、ＡＵＣＩＮＦ等）概算値を生じた。

【０１９６】

ＰＫで観察された改善に伴って、ｒＦＶＩＩＩＦｃは出血からの防御延長を提供して、血友病Ａ個体に対する注射頻度を低くし得る。

【０１９７】

実施例８

ｒＦＶＩＩＩ：Ｆｃのヒトで最初の試験からの暫定ＰＫ分析（実施例３）に基づいて、Ａ－ＬＯＮＧ試験を計画した。Ａ－ＬＯＮＧは、重症血友病Ａ（＜１　ＩＵ／ｄＬ［＜１％］内因性ＦＶＩＩＩと定義される）を有する治療歴のある被験体における出血の防止および処置に際しての組換え因子ＶＩＩＩＦｃ融合物（ＦＶＩＩＩ－Ｆｃ）の安全性、薬物動態および効力の非盲検マルチセンター評価である。

【０１９８】

被験体約１０６名を、３つのレジメンのうちの１つに登録する：目的に合わせた予防レジメン（アーム１）、週投与レジメン（アーム２）および要求に応じたレジメン（アーム３）。

【０１９９】

アーム１：目的に合わせたレジメン

アーム１は、全群およびＰＫ亜群を包含する。約６６名の被験体が登録される。最初のレジメンは、週２回、初日に２５　ＩＵ／ｋｇ、その後、その週の第４日に５０　ＩＵ／ｋｇである。ｒＦＶＩＩＩＦｃに関するＰＫ結果が得られるまで、被験体はこの週予防レジメンでｒＦＶＩＩＩＦｃを投与する。この結果に基づいて、各個体に関して目的に合わせた予防レジメンが確立されるが、この場合、用量および間隔は、１～３％ＦＶＩＩＩ活性のトラフレベルを保持するよう決定される。次いで、各被験体は、その個々の目的に合わせた予防レジメンを試験中ずっと受ける。

【０２００】

被験体は試験全体を通してモニタリングされ、継続中の用量および間隔調整がなされる。調整は、一回り２ヶ月の期間に亘って≧２の特発性出血症状出現と定義される許容不可能な出血症状出現を被験体が経験した場合にのみなされる。この場合、調整は、３～５％のトラフレベルを目標とする。

【０２０１】

アーム２：週投与レジメン

約２０名の被験体が登録され／無作為化されて、以下のような簡易ｒＦＶＩＩＩＦｃ　ＰＫプロファイリングを受ける：少なくとも９６時間の洗い出し；ｒＦＶＩＩＩＦｃ　６５　ＩＵ／ｋｇの単一回用量投与；０日目にｒＦＶＩＩＩＦｃで開始して、注射前、ならびに注射開始から１０（±２）分、３時間（±１５分）、７２（±２）時間［第３日］、ならびに９６（±２）時間［第４日］を含めた簡易試料採取。簡易ＰＫプロファイリング後、次に被験体は７日毎に６５　ＩＵ／ｋｇの一定用量投与を受ける。

【０２０２】

アーム３：要求に応じたレジメン

少なくとも５名の被験体における最低１０の主要外科手術を、本試験で評価する。大手

術は、全身麻酔および／または呼吸補助を伴う任意の外科的手法（待機または緊急）と定義され、この場合、大きい体腔が貫通され、曝露されるか、あるいは身体的または生理学的機能の実質的減損が生じる（例えば、開腹術、開胸術、開頭術、関節置換術および四肢切断術）。

【０２０３】

外科手術中の予防のために、被験体は、１２～２４時間毎に、３５～５０　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃで処置される。手術前に、医者は被験体のｒＦＶＩＩＩＦｃ　ＰＫプロフィールを検討し、予定手術の種類ならびに被験体の臨床状態に一般的に必要とされる因子ＶＩＩＩ置換の用量投与レジメンを査定する。任意のリハビリ時間を含めた外科的処置期間におけるｒＦＶＩＩＩＦｃの適切な用量投与のための推奨は、これらの因子を考慮に入れる。

【０２０４】

この試験の第一の目的は、（ａ）予防、要求に応じた、および外科的処置レジメンとして施されるｒＦＶＩＩＩＦｃの安全性および耐容性を評価すること；ならびに（ｂ）予防、要求に応じた、および外科的処置レジメンとして施されるｒＦＶＩＩＩＦｃの効力を評価することである。この試験の第二の目的は、（ａ）ｒＦＶＩＩＩＦｃのＰＫプロフィールを特性化し、ＦＶＩＩＩＦｃのＰＫを現行の市販製品であるＡｄｖａｔｅと比較すること；（ｂ）ＦＶＩＩＩＦｃによる個体応答を評価すること；ならびに（ｃ）ＦＶＩＩＩＦｃ消費を評価することである。

【０２０５】

第一の目的

・予防、週、要求に応じた、および外科的処置レジメンとして施されるｒＦＶＩＩＩＦｃの安全性および耐容性を評価すること

・予防、要求に応じた、および外科的処置レジメンとして施されるｒＦＶＩＩＩＦｃの効力を評価すること

第二の目的

・ｒＦＶＩＩＩＦｃのＰＫプロフィールを特性化し、ＦＶＩＩＩＦｃのＰＫを現行の市販製品であるＡｄｖａｔｅ（登録商標）と比較すること

・ｒＦＶＩＩＩＦｃによる個体応答を評価すること

・予防レジメンにおける出血を適切に防止し；外科的設定における恒常性を保持し；あるいは要求に応じた、週処置または予防設定における出血症状発現を処置するために必要とされる用量およびスケジュールの範囲を特性化すること

・ｒＦＶＩＩＩＦｃ消費を評価すること（例えば総年間ｒＦＶＩＩＩＦｃ消費量／被験体）。

【０２０６】

実施例９

臨床的ＲＯＴＥＭ査定

実施例８における試験では、一段階活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）検定による血漿ＦＶＩＩＩ活性の測定のほかに、全血回転血栓弾性測定（ＲＯＴＥＭ）も調べられて、２名の被験体、具体的には、低用量コホート１名および高用量コホート１名におけるｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＡｄｖａｔｅによる全般的血流遮断の改善を査定した。

【０２０７】

ｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＡｄｖａｔｅは、ｒＦＶＩＩＩＦｃ処置前に被験体の血液中に加えた場合、血餅形成において類似的に活性であると思われる。凝固時間（ＣＴ）は、市場の約１％～１００％の範囲でｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＡｄｖａｔｅの用量に関して線状であり、用量応答は、同一被験体においてｒＦＶＩＩＩＦｃおよびＡｄｖａｔｅ間で似ていた。

【０２０８】

Ａｄｖａｔｅおよびその後のｒＦＶＩＩＩＦｃの用量投与後、種々の時点でクエン酸処理全血を試料採取し、カルシウム再添加後の血餅形成をＲＯＴＥＭによりモニタリングし

た。ＡｄｖａｔｅまたはｒＦＶＩＩＩＦｃ用量投与前の残留物ＦＶＩＩＩレベルによる可変性基線ＣＴにもかかわらず、両製品は、注射後３０分に、ＣＴを匹敵可能レベルに有効に補正した。さらに、ＣＴの改善は、２５　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃの注射時および注射後3時間目に、この低用量で用量投与された被験体において、Ａｄｖａｔｅに比してより良好に持続された。しかしながら、ｒＦＶＩＩＩＦｃ対Ａｄｖａｔｅの示差的改善は、６５　ＩＵ／ｋｇ用量では余り容易に感知できなかった。

【０２０９】

表

表１：ポリヌクレオチド配列

Ａ．　Ｂドメイン欠失ＦＶＩＩＩＦｃ

（ｉ）Ｂドメイン欠失ＦＶＩＩＩＦｃ鎖ＤＮＡ配列（下線：ＦＶＩＩＩシグナルペプチド；太字：Ｆｃ領域）（配列番号１：これは配列番号２をコードする）

【０２１０】

【化１】

```
 661                        A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC
 721 TGTGCCTTTT GCGATTCTGC TTTAGTGCCA CCAGAAGATA CTACCTGGGT GCAGTGGAAC
 781 TGTCATGGGA CTATATGCAA AGTGATCTCG GTGAGCTGCC TGTGGACGCA AGATTTCCTC
 841 CTAGAGTGCC AAAATCTTTT CCATTCAACA CCTCAGTCGT GTACAAAAAG ACTCTGTTTG
 901 TAGAATTCAC GGATCACCTT TTCAACATCG CTAAGCCAAG GCCACCCTGG ATGGGTCTGC
 961 TAGGTCCTAC CATCCAGGCT GAGGTTTATG ATACAGTGGT CATTACACTT AAGAACATGG
1021 CTTCCCATCC TGTCAGTCTT CATGCTGTTG GTGTATCCTA CTGGAAAGCT TCTGAGGGAG
1081 CTGAATATGA TGATCAGACC AGTCAAAGGG AGAAAGAAGA TGATAAAGTC TTCCCTGGTG
1141 GAAGCCATAC ATATGTCTGG CAGGTCCTGA AAGAGAATGG TCCAATGGCC TCTGACCCAC
1201 TGTGCCTTAC CTACTCATAT CTTTCTCATG TGGACCTGGT AAAAGACTTG AATTCAGGCC
1261 TCATTGGAGC CCTACTAGTA TGTAGAGAAG GGAGTCTGGC CAAGGAAAAG ACACAGACCT
1321 TGCACAAATT TATACTACTT TTTGCTGTAT TTGATGAAGG GAAAAGTTGG CACTCAGAAA
1381 CAAAGAACTC CTTGATGCAG GATAGGGATG CTGCATCTGC TCGGGCCTGG CCTAAAATGC
1441 ACACAGTCAA TGGTTATGTA AACAGGTCTC TGCCAGGTCT GATTGGATGC CACAGGAAAT
1501 CAGTCTATTG GCATGTGATT GGAATGGGCA CCACTCCTGA AGTGCACTCA ATATTCCTCG
1561 AAGGTCACAC ATTTCTTGTG AGGAACCATC GCCAGGCGTC CTTGGAAATC TCGCCAATAA
1621 CTTTCCTTAC TGCTCAAACA CTCTTGATGG ACCTTGGACA GTTTCTACTG TTTTGTCATA
1681 TCTCTTCCCA CCAACATGAT GGCATGGAAG CTTATGTCAA AGTAGACAGC TGTCCAGAGG
```

【０２１１】

【化２】

```
1741 AACCCCAACT ACGAATGAAA AATAATGAAG AAGCGGAAGA CTATGATGAT GATCTTACTG
1801 ATTCTGAAAT GGATGTGGTC AGGTTTGATG ATGACAACTC TCCTTCCTTT ATCCAAATTC
1861 GCTCAGTTGC CAAGAAGCAT CCTAAAACTT GGGTACATTA CATTGCTGCT GAAGAGGAGG
1921 ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCCTCGCCC CCGATGACAG AAGTTATAAA AGTCAATATT
1981 TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA AGTCCGATTT ATGGCATACA
2041 CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA ATCAGGAATC TTGGGACCTT
2101 TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT TAAGAATCAA GCAAGCAGAC
2161 CATATAACAT CTACCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC TTTGTATTCA AGGAGATTAC
2221 CAAAAGGTGT AAAACATTTG AAGGATTTTC CAATTCTGCC AGGAGAAATA TTCAAATATA
2281 AATGGACAGT GACTGTAGAA GATGGGCCAA CTAAATCAGA TCCTCGGTGC CTGACCCGCT
2341 ATTACTCTAG TTTCGTTAAT ATGGAGAGAG ATCTAGCTTC AGGACTCATT GGCCCTCTCC
2401 TCATCTGCTA CAAAGAATCT GTAGATCAAA GAGGAAACCA GATAATGTCA GACAAGAGGA
2461 ATGTCATCCT GTTTTCTGTA TTTGATGAGA ACCGAAGCTG GTACCTCACA GAGAATATAC
2521 AACGCTTTCT CCCCAATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA
2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTT GCAGTTGTCA GTTTGTTTGC
2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA GACTGACTTC CTTTCTGTCT
2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA AGACACACTC ACCCTATTCC
2761 CATTCTCAGG AGAAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC AGGTCTATGG ATTCTGGGGT
2821 GCCACAACTC AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG
2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTCAGCA TACTTGCTGA
2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC
3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT GACTATGATG
3061 ATACCATATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC
3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC
3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA
3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC
3301 CCTTATACCG TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG
3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA
3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCTG
3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA
3721 CCAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC
3781 AGATGGAAGA TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC
3961 GAAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGA ATGCCTTATT GGCGAGCATC
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
```

【０２１２】

【化３】

4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC **GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC**
5101 TCCTGGGCGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

（ｉｉ）Ｆｃ　ＤＮＡ配列（下線：マウスＩｇκシグナルペプチド）（配列番号３：これは配列番号４をコードする）

【０２１３】

【化４】

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA
8161 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
8341 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
8521 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
8641 CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTAAA

Ｂ．　全長ＦＶＩＩＩＦｃ

（ｉ）全長ＦＶＩＩＩＦｃ　ＤＮＡ配列（下線：ＦＶＩＩＩシグナルペプチド；太字：Ｆｃ領域）（配列番号５：これは配列番号６をコードする）

【０２１４】

【化５】

```
 661                                ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
 721 CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTGGGTGC
 781 AGTGGAACTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
 841 ATTTCCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
 901 TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
 961 GGGTCTGCTA GGTCCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021 GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT GTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
1141 CCCTGGTGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCCTGAAA GAGAATGGTC CAATGGCCTC
```

【０２１５】

【化６】

```
1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG GACCTGGTAA AAGACTTGAA
1261 TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441 TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCACTCAAT
1561 ATTCCTCGAA GGTCACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC CAGGCGTCCT TGGAAATCTC
1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACTCTC CTTCCTTTAT
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAG
1981 TCAATATTTG AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCCTT TGTATTCAAG
2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTGG
2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAAACCAGA TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCCT
2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC
2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAACTGTCTT CATGTCGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT
2821 TCTGGGGTGC CACAACTCAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC
2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA
2941 CTTGCTGAGT AAAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC
3061 TGACCCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT
3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTTGAAG AAACTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT
3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCCT
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT AATGATTCAA AGTTGTTAGA
3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG
3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC
3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTTAAA GACAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG
3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACACTGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTCATGACAG
3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAAACTAC
3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG GGCCCCATTC CACCAGATGC
4021 ACAAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCCAGTC CAAAGCAATT
4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAT TTCTTGTCTG AGAAAAACAA
```

【０２１６】

【化７】

4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTC TTACTAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA
4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT
4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT TTCATGAAGA ACCTTTTCTT
4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTC ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA
4501 AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG CTCATTTCTC
4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATTGTAGA
4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTCACGCA
4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCACTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801 GAGCACCCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAATAGAT CTCCATTACC
4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCCTATT
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGGTCCA
5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTCTAAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC
5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTTATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA
5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAAA CAGACCTGGA AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT
5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG GATCCTCTTG CTTGGGATAA
5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC CAAGAGAAGT CACCAGAAAA
5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC
5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA GAAGTCACCT GGGCAAAGCA
5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA
5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT GACTATGATG ATACCATATC
5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC AGAGCCCCCG
5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA
5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG
6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
6061 TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT TTGTCAAGCC
6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAAGATGA
6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG ATGTGCACTC
6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCTG CTCATGGGAG
6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG
6421 GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481 TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT
6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA GCATGGGCAG
6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC GAAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGA ATGCCTTATT GGCGAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901 GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG CTCGATACAT

【０２１７】

【化８】

7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC **GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC TCCTGGGCGG**
7801 ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC
7861 TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
7921 GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA
7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
8041 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC
8101 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA
8161 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
8401 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

（ｉｉ）Ｆｃ（Ａ（ｉｉ）（配列番号３）と同一配列）

Ｃ．　重鎖（ＨＣ）－Ｆｃ　ＤＮＡ配列（ＨＣおよびＦｃ間にリンカーなし）（下線：シグナルペプチド；太字：Ｆｃ領域）（配列番号７：これは配列番号８をコードする）

【０２１８】

【化９】

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
241 GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT
361 GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG
481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
661 TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC
841 ACCACTCCTG AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT

【０２１９】
【化１０】

```
1381   ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG
1441   TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501   GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561   CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
1621   ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
1681   GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741   AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801   AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861   CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921   TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
1981   ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041   ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTCATGTCG
2101   ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACT CAGACTTTCG GAACAGAGGC
2161   ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221   AGTTATGAAG ATATTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGAC
2281   AAAACTCACA CATGCCCACC GTGCCCAGCT CCAGAACTCC TGGGCGGACC GTCAGTCTTC
2341   CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC
2401   GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
2461   GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
2521   GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
2581   AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
2641   CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
2701   CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
2761   GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
2821   GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
2881   GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
2941   TCCCTGTCTC CGGGTAAA
```

C.

（ｉｉ）重鎖（ＨＣ）－Ｆｃ　ＤＮＡ配列（ＨＣおよびＦｃ間に５アミノ酸リンカー）（下線：シグナルペプチド；太字：Ｆｃ領域；二重下線：５アミノ酸リンカー）（配列番号９：これは配列番号１０をコードする）

【０２２０】

【化１１】

```
   1    ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC
  61    ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
 121    GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
 181    ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
 241    GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301    GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT
 361    GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
 421    GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG
 481    AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
 541    GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
 601    GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
 661    TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
 721    GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
 781    CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC
 841    ACCACTCCTG AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
 901    CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
 961    GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
```

【０２２１】

【化１２】

1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG
1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
1981 ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAAACTGT CTTCATGTCG
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACT CAGACTTTCG GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 AGTTATGAAG ATATTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGA**AGC**
2281 **TTCTCCCAGA ATGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC**
2341 GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2401 CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
2461 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2521 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2581 AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
2641 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2701 GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2761 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
2821 GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2881 TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2941 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

C．

（ｉｉｉ）軽鎖（ＬＣ）－Ｆｃ　ＤＮＡ配列（下線：シグナルペプチド；太字：Ｆｃ領域）（配列番号１１：これは配列番号１２をコードする）

【０２２２】

【化１３】

```
1     ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT
61    GAAATAACTC GTACTACTCT TCAGTCAGAT CAAGAGGAAA TTGACTATGA TGATACCATA
121   TCAGTTGAAA TGAAGAAGGA AGATTTTGAC ATTTATGATG AGGATGAAAA TCAGAGCCCC
181   CGCAGCTTTC AAAAGAAAAC ACGACACTAT TTTATTGCTG CAGTGGAGAG GCTCTGGGAT
241   TATGGGATGA GTAGCTCCCC ACATGTTCTA AGAAACAGGG CTCAGAGTGG CAGTGTCCCT
301   CAGTTCAAGA AAGTTGTTTT CCAGGAATTT ACTGATGGCT CCTTTACTCA GCCCTTATAC
361   CGTGGAGAAC TAAATGAACA TTTGGGACTC CTGGGGCCAT ATATAAGAGC AGAAGTTGAA
421   GATAATATCA TGGTAACTTT CAGAAATCAG GCCTCTCGTC CCTATTCCTT CTATTCTAGC
481   CTTATTTCTT ATGAGGAAGA TCAGAGGCAA GGAGCAGAAC CTAGAAAAAA CTTTGTCAAG
541   CCTAATGAAA CCAAAACTTA CTTTTGGAAA GTGCAACATC ATATGGCACC CACTAAAGAT
601   GAGTTTGACT GCAAAGCCTG GGCTTATTTC TCTGATGTTG ACCTGGAAAA AGATGTGCAC
661   TCAGGCCTGA TTGGACCCCT TCTGGTCTGC CACACTAACA CACTGAACCC TGCTCATGGG
```

【０２２３】

【化１４】

```
721   AGACAAGTGA CAGTACAGGA ATTTGCTCTG TTTTTCACCA TCTTTGATGA GACCAAAAGC
781   TGGTACTTCA CTGAAAATAT GGAAAGAAAC TGCAGGGCTC CCTGCAATAT CCAGATGGAA
841   GATCCCACTT TTAAAGAGAA TTATCGCTTC CATGCAATCA ATGGCTACAT AATGGATACA
901   CTACCTGGCT TAGTAATGGC TCAGGATCAA AGGATTCGAT GGTATCTGCT CAGCATGGGC
961   AGCAATGAAA ACATCCATTC TATTCATTTC AGTGGACATG TGTTCACTGT ACGAAAAAAA
1021  GAGGAGTATA AAATGGCACT GTACAATCTC TATCCAGGTG TTTTTGAGAC AGTGGAAATG
1081  TTACCATCCA AAGCTGGAAT TTGGCGGGTG GAATGCCTTA TTGGCGAGCA TCTACATGCT
1141  GGGATGAGCA CACTTTTTCT GGTGTACAGC AATAAGTGTC AGACTCCCCT GGGAATGGCT
1201  TCTGGACACA TTAGAGATTT TCAGATTACA GCTTCAGGAC AATATGGACA GTGGGCCCCA
1261  AAGCTGGCCA GACTTCATTA TTCCGGATCA ATCAATGCCT GGAGCACCAA GGAGCCCTTT
1321  TCTTGGATCA AGGTGGATCT GTTGGCACCA ATGATTATTC ACGGCATCAA GACCCAGGGT
1381  GCCCGTCAGA AGTTCTCCAG CCTCTACATC TCTCAGTTTA TCATCATGTA TAGTCTTGAT
1441  GGGAAGAAGT GGCAGACTTA TCGAGGAAAT TCCACTGGAA CCTTAATGGT CTTCTTTGGC
1501  AATGTGGATT CATCTGGGAT AAAACACAAT ATTTTTAACC CTCCAATTAT TGCTCGATAC
1561  ATCCGTTTGC ACCCAACTCA TTATAGCATT CGCAGCACTC TTCGCATGGA GTTGATGGGC
1621  TGTGATTTAA ATAGTTGCAG CATGCCATTG GGAATGGAGA GTAAAGCAAT ATCAGATGCA
1681  CAGATTACTG CTTCATCCTA CTTTACCAAT ATGTTTGCCA CCTGGTCTCC TTCAAAAGCT
1741  CGACTTCACC TCCAAGGGAG GAGTAATGCC TGGAGACCTC AGGTGAATAA TCCAAAAGAG
1801  TGGCTGCAAG TGGACTTCCA GAAGACAATG AAAGTCACAG GAGTAACTAC TCAGGGAGTA
1861  AAATCTCTGC TTACCAGCAT GTATGTGAAG GAGTTCCTCA TCTCCAGCAG TCAAGATGGC
1921  CATCAGTGGA CTCTCTTTTT TCAGAATGGC AAAGTAAAGG TTTTTCAGGG AAATCAAGAC
1981  TCCTTCACAC CTGTGGTGAA CTCTCTAGAC CCACCGTTAC TGACTCGCTA CCTTCGAATT
2041  CACCCCCAGA GTTGGGTGCA CCAGATTGCC CTGAGGATGG AGGTTCTGGG CTGCGAGGCA
2101  CAGGACCTCT ACGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2161  GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2221  CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
2281  TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2341  AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2401  AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
2461  TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2521  GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2581  ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
2641  GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2701  TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2761  ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA
```

表２：ポリペプチド配列

Ａ．　Ｂドメイン欠失ＦＶＩＩＩ－Ｆｃ単量体ハイブリッド（ＢＤＤ　ＦＶＩＩＩＦｃ単量体二量体）：ＢＤＤ　ＦＶＩＩＩＦｃおよびＦｃ鎖を同時発現することにより作製

構築物＝ＨＣ－ＬＣ－Ｆｃ融合物。Ｆｃ発現カセットをＢＤＤＦＶＩＩＩ－Ｆｃと同時トランスフェクトして、ＢＤＤ　ＦＶＩＩＩＦｃ単量体を生成する。ＢＤＤ　ＦＶＩＩＩＦｃ鎖に関しては、Ｆｃ配列を太字で示す；ＨＣ配列を二重下線で示す；残りのＢドメイン配列をイタリック体で示す。シグナルペプチドには下線を付す。

【０２２４】

ｉ）Ｂドメイン欠失ＦＶＩＩＩ－Ｆｃ鎖（下線：１９アミノ酸シグナル配列）（配列番号２）

【０２２５】

【化１５】

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP
WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH
TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV
FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS
IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL
RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP
DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA
SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF
VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL
FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI
EPR*SFSQNPPVLKRHQR*EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHY
FIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRA
EVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDC
KAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC
RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR
KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIR
DFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ
FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELM
GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDF
QKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL
LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT**
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ｉｉ）Ｆｃ鎖（下線：マウスＩｇκからの２０アミノ酸異種シグナルペプチド）（配列番号４）

【０２２６】

【化１６】

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ｂ．全長ＦＶＩＩＩＦｃ単量体ハイブリッド（全長ＦＶＩＩＩＦｃ単量体二量体）：

ＦＶＩＩＩＦｃおよびＦｃ鎖を同時発現することにより作製
構築物＝ＨＣ－Ｂ－ＬＣ－Ｆｃ融合物。Ｆｃ発現カセットを全長ＦＶＩＩＩ－Ｆｃと同時トランスフェクトして、全長ＦＶＩＩＩＦｃ単量体を生成する。ＦＶＩＩＩＦｃ鎖に関しては、Ｆｃ配列を太字で示す；ＨＣ配列を二重下線で示す；Ｂドメイン配列をイタリック体で示す。シグナルペプチドには下線を付す。

【０２２７】

ｉ）全長ＦＶＩＩＩＦｃ鎖（下線：ＦＶＩＩＩシグナルペプチド）（配列番号６）

【０２２８】

【化１７】

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP
WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH
TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV
FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS
IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL

【０２２９】

【化１８】

RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP
DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA
SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF
VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL
FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI
EPR*SFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLS*
LSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATEL
KKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSL
SEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSN
NSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSK
NMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVE
GQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQ
ENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGE
EENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQW
SKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRV
LFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKK
VENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRP
GKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNH
*AIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQR*EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKE
DFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS
FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP
NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEF
ALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWY
LLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGM
STLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLA
PMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLH
LQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNG
KVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY**DKTHTCPPCPAPE**
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

ｉｉ）Ｆｃ鎖（下線：Ｉｇκ鎖からの２０アミノ酸異種シグナルペプチド）（配列番号４）

【０２３０】

【化１９】

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ｃ．　ＦＶＩＩＩ－Ｆｃヘテロ二量体ハイブリッド

これは、ＨＣ－ＦｃおよびＬＣ－Ｆｃ構築物を同時トランスフェクトすることにより製造される。２つのＨＣ－Ｆｃ構築物が製造されている。一方はＨＣおよびＦｃ間にリンカーを有さず（ＨＣ－Ｆｃ）、他方は、ＨＣおよびＦｃ間に５アミノ酸リンカーを有する（ＨＣ＋５－Ｆｃ）。ＦＶＩＩＩシグナルペプチドをＨＣ－Ｆｃ構築物のために用いたが、一方で、マウスＩｇκシグナル配列をＬＣ－Ｆｃ構築物のために用いた。

【０２３１】

（ｉ）ＨＣ－Ｆｃ（太字：Ｆｃ配列；下線：シグナルペプチド）（配列番号８）

【０２３２】

【化２０】

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP
WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH
TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV
FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS
IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL
RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP
DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA
SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF
VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL
FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI
EPR**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV**
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

（ｉｉ）ＨＣ＋５－Ｆｃ（Ｆｃ配列を太字で示す；５アミノ酸リンカー配列（ＦＶＩＩＩのＢドメインから）をイタリック体で示す；シグナルペプチドに下線を付す）（配列番号１０）

【０２３３】

【化２１】

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPP
WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH
TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV
FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHS
IFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL
RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP
DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA
SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSF
VNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL
EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTL
FPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAI
EPR*SFSQN***DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV**
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

（ｉｉｉ）ＬＣ－Ｆｃ６Ｈｉｓ（Ｆｃ配列を太字で示す；シグナルペプチドに下線を付す）（配列番号１２）

【０２３４】

【化２２】

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSP
HVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP
YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHS
GLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENY
RFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVF
ETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKL
ARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG
NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKA
ISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSL
LTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA
LRMEVLGCEAQDLY**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV**
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

表３：５０　ＩＵ／ｋｇのｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）の単一回静脈内投与後の血友病Ａマウスにおける全血凝固時間（ＷＢＣＴ）確定

【０２３５】

【表３－Ａ】

A.

		血液採取時間(時間)							
処置	動物番号	投与前	0.25	24	36	42	96	113	120
		WBCT(分)							
50 IU/kg ReFacto®	1	>60	18	>60	ND	ND			
	2	>60	5	16	>60	ND			
	3	>60	4	7	>60	ND			
	4	>60	7	8	10	>60			
	5	>60	6	9	16	>60			
	6	>60	5	15	>60	ND			
50 IU/kg rFVIIIFc	7	>60	7				8	>60	ND
	8	>60	5				8	>60	ND
	9	>60	4				16	>60	ND
	10	>60	3				11	4	>60
	11	>60	3				9	>60	ND
	12	>60	4				6	>60	ND

ＮＤ＝前の処置時点が＞６０分であるため、確定せず。

【０２３６】

【表３－Ｂ】

Ｂ.

		血液採取時間(時間)					
処置	動物番号	投与前	0.25	24	48	96	120
		WBCT(分)					
50 IU/kg ReFacto®	1	>60	11	15	>60	>60	ND
	2	>60	3	3	>60	>60	>60
	3	>60	4	6	>60	>60	>60
50 IU/kg rFVIIIFc	4	>60	3	5	5	>60	>60
	5	>60	3	6	7	13	>60
	6	>60	5	8	9	9	>60

ＮＤ＝前の処置時点が＞６０分であるため、確定せず。

表４：血友病Ａマウスにおける単一回静脈内用量投与後のＰＫパラメーター（５０　ＩＵ／ｋｇ）

【０２３７】

【表４】

処置	C_{max} (IU/mL)	AUC (hr·IU/mL)	$T_{1/2}$ (hr)	CL (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)
rFVIIIFc	1.56	22.6	11.1	2.09	28.4
ReFacto®®	0.67	6.94	5.0	7.2	43.8
Advate®	0.47	3.90	7.1	12.8	103

表５：血友病Ａイヌにおける単一回静脈内用量投与後のＰＫパラメーター（１２５　ＩＵ／ｋｇ　ｒＦＶＩＩＩＦｃ、１１４および１２０　ＩＵ／ｋｇ　ＲｅＦａｃｔｏ（登録商標））

【０２３８】

【表５】

A. 色素生成活性データから決定されたPK

処置	C_{max} (IU/mL)	AUC (hr·IU/mL	$T_{1/2}$ (hr)	CL (mL/hr/kg)	Vz (mL/kg)
rFVIIIFc	2.0 ± 0.54	25.9 ± 6.47	15.4 ± 0.3	5.1 ± 1.4	113 ± 29
ReFacto®®*	2.0	18.2	7.4	6.5	68.7

B. ELISAデータから決定されたPK

処置	C_{max} (ng/mL)	AUC (hr·ng/mL	$T_{1/2}$ (hr)	CL (mL/hr/kg)	Vz (mL/kg)
rFVIIIFc	210 ± 33	2481 ± 970	15.7 ± 1.7	6.2 ± 3.0	144 ± 83
ReFacto®®*	211	1545	6.9	8.7	85

表６：ｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＲｅＦａｃｔｏ（登録商標）を単一回静脈内投与後の血友病ＡイヌにおいてａＰＴＴにより測定された凝固活性

【０２３９】

【表６】

イヌ番号	処置	aPTT(秒) 投与前	aPTT(秒) 投与後5分
M10	rFVIIIFc	86.5	53.6
M11	rFVIIIFc	99.8	56.4
M12	rFVIIIFc	119	68.7
	ReFacto®	108	60.7
M38	rFVIIIFc	115	76.6
	ReFacto®	118	68.0

表７： ＥＬＩＳＡにより測定した１２５ ＩＵ／ｋｇの単一回静脈内投与として投与されたサルにおけるｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＸｙｎｔｈａの血漿濃度

【０２４０】

【表７】

Ａ．　血漿中のrFVIIIFc濃度（μｇ／ｍＬ）

	群 1			群 2				
時間（時間）	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	平均	SD
Pre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0.25	0.400	0.334	0.374	0.348	0.383	0.323	0.360	0.030
4	0.266	0.259	0.236	0.233	0.259	0.217	0.245	0.019
12	0.165	0.152	0.12	0.15	0.161	0.149	0.150	0.016
24	0.079	0.074	0.047	0.08	0.088	0.076	0.074	0.014
36	0.035	0.04	0.022	0.04	0.041	0.046	0.037	0.008
48	0.019	0.021	BLQ	0.021	0.024	0.025	0.022	0.002

Ｂ．　血漿中のXyntha濃度（μｇ／ｍＬ）

	群 1			群 2				
時間（時間）	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	平均	SD
Pre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0.25	0.252	0.074	0.155	0.317	0.217	0.167	0.197	0.084
4	0.197	0.159	0.152	0.229	0.19	0.082	0.168	0.051
12	0.137	0.099	0.104	0.166	0.158	0.081	0.124	0.035
24	0.09	0.068	0.051	0.082	0.08	0.084	0.076	0.014
36	0.037	0.043	0.015	0.041	0.035	BLQ	0.034	0.011
48	0.022	BLQ	BLQ	0.017	0.013	BLQ	0.017	0.005

表８：　ＦＶＩＩＩ特異的色素生成活性検定により測定した１２５　ＩＵ／ｋｇの単一回静脈内投与を施されたサルにおけるｒＦＶＩＩＩＦｃまたはＸｙｎｔｈａの血漿濃度（ＩＵ／ｍＬで報告）

【０２４１】

【表８】

A. Xyntha

時間（時間）	群 1			群 2		
投与前	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0.25	5.62	4.55	5.01	4.5	5.15	3.77
4	3.9	4.05	3.2	3.19	3.46	2.36
12	2.51	2.82	1.69	2.17	2.5	2.01
24	1.67	1.66	1.18	0.95	1.57	1.5
36	0.7	0.85	0.48	0.44	0.85	0.82
48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.38	0.48

B. rFVIIIFc

時間(時間)	群 1			群 2		
投与前	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0.25	4.31	3.82	3.54	4.13	4.12	3.68
4	3	3.36	2.53	2.7	2.74	2.81
12	2	2.15	1.42	2.28	2.75	2.22
24	1.01	1.17	0.5	1.5	1.61	1.01
36	BLQ	0.52	0.48	0.88	0.72	0.64
48	0.31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.31	BLQ

BLQ＝定量限界より低い値

表９： 単一回１２５ ＩＵ／ｋｇ用量投与後のｒＦＶＩＩＩＦｃのＰＫパラメーター

【０２４２】

【表９】

PK パラメーター	rFVIIIFc ELISA データ							
		群 1			群 2			
	単位	604376	60659 5	C36195	C36066	C36174	604362	平均	SD
Tmax	時間	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00
Cmax	μg/mL	0.4	0.334	0.374	0.348	0.383	0.323	0.368	0.030
$T_{1/2}$	時間	11.4	13.3	9.3	12.7	12.7	14.1	11.9	1.7
AUC	μg*時間/mL	5.86	5.65	4.37	5.56	4.37	5.58	5.16	0.68
CL	mL/時間/kg	2.15	2.23	2.88	2.27	2.07	2.26	2.32	0.29
Vz	mL/kg	35.3	42.5	38.8	37.9	37.9	46.1	38.5	3.9
MRT	時間	15.3	17	12.1	17.1	17.3	19.2	15.8	2.4

PK パラメーター	rFVIIIFc 色素生成活性データ							
		群 1			群 2			
	単位	604376	60659 5	C36195	C36066	C36174	604362	平均	SD
Tmax	hr	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00
Cmax	IU/mL	4.31	3.82	3.54	4.13	4.12	3.68	3.93	0.30
$T_{1/2}$	時間	13.4	12.0	11.6	17.5	12.4	29.4	16.1	6.9
AUC	IU*時間/mL	74.7	75.5	53.5	92.9	88.9	92.7	79.7	15.2
CL	mL/時間/kg	1.67	1.65	2.34	1.35	1.41	1.35	1.63	0.38
Vz	mL/kg	32.3	28.7	39.2	33.9	25.2	57.2	36.1	11.4
MRT	時間	17.8	16.8	16.9	25	19.2	33.3	21.5	6.5

表１０： 単一回ＩＶ用量投与（１２５ ＩＵ／ｋｇ）後のＸｙｎｔｈａのＰＫパラメーター

【０２４３】

【表１０】

PK パラメーター	単位	Xyntha ELISA データ							
		群 1			群 2				
		604376	60659 5	C36195	C36066	C36174	604362	平均	SD
Tmax	時間	0.25	4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.88	1.53
Cmax	IU/mL	0.252	0.159	0.155	0.317	0.217	0.167	0.21	0.06
$T_{1/2}$	時間	13.6	19.9	9.7	11	9.2	nd	12.7	4.4
AUC	IU*時間/mL	5.15	4.39	3,17	5.53	4.79	6.32	5.24	0.74
CL	mL/時間/kg	2.21	2.6	3.59	2.06	2.38	nd	2.57	0.61
Vz	mL/kg	43.4	74.7	50.1	32.9	31.5	nd	46.5	17.5
MRT	時間	19	28.4	14	16.1	15.9	nd	18.7	5.7

PK パラメーター	単位	Xyntha 色素生成活性データ							
		群 1			群 2				
		604376	60659 5	C36195	C36066	C36174	604362	平均	SD
Tmax	時間	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0
Cmax	IU/mL	5.62	4.55	5.01	4.5	5.15	3.77	4.77	0.64
$T_{1/2}$	時間	12.8	14.3	11.4	10.4	11.7	14.6	12.5	1.7
AUC	IU*時間/mL	97.1	104.2	71.3	70.7	94.0	82.8	86.7	14.0
CL	mL/時間/kg	1.29	1.20	1.75	1.77	1.33	1.51	1.48	0.24
Vz	mL/kg	23.7	24.8	28.9	26.6	22.5	31.8	26.4	3.5
MRT	時間	17.8	20.1	16.0	14.8	18.4	23.2	18.4	3.0

表１１：第Ｘ因子の活性化

【０２４４】

【表１１】

	Km (nM)	Vmax (nM/分)
rFVIIIFc	55.0 ± 5.9	65.6 ± 8.6
BDD FVIII	51.0 ± 8.7	73.5 ± 10.1

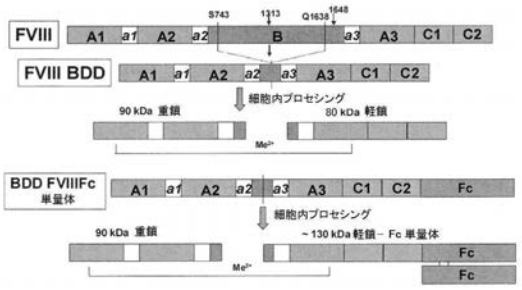
表１２：第ＩＸａ因子との相互作用

【０２４５】
【表１２】

	Kd (nM)	Vmax (nM/分)
rFVIIIFc	2.8 ± 0.4	4.5 ± 0.3
BDD FVIII	2.5 ± 0.3	4.0 ± 1.0

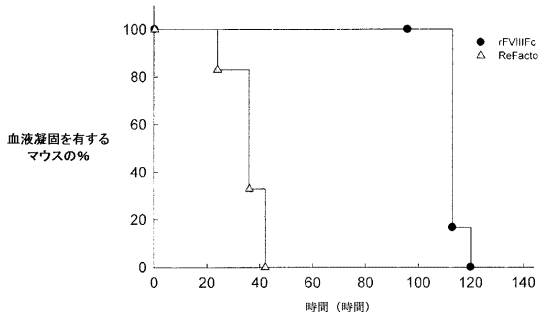
【図１】

図１



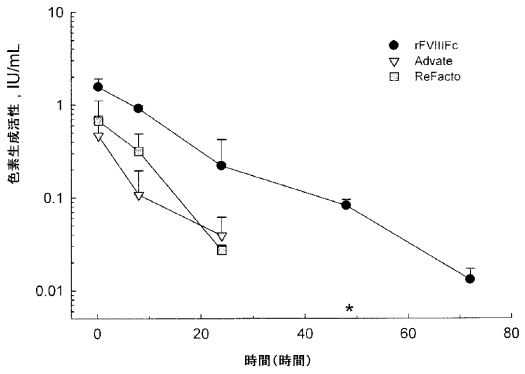
【図２】

図２



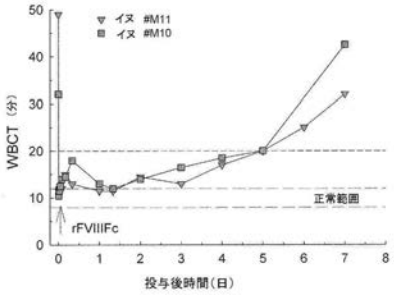
【図３】

図３



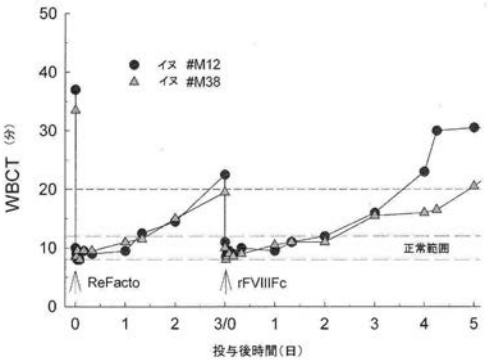
【図４Ａ】

図 4A



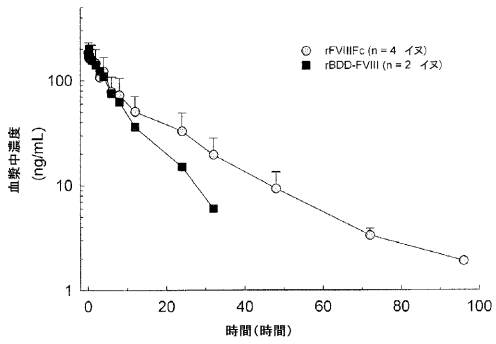
【図４Ｂ】

図 4B



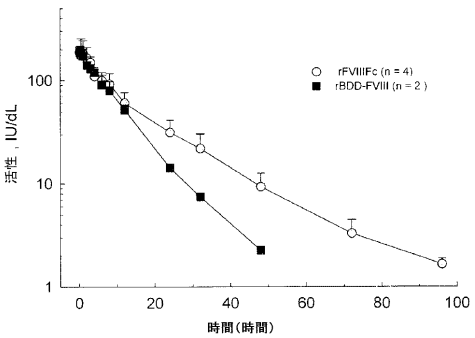
【図５】

図 5



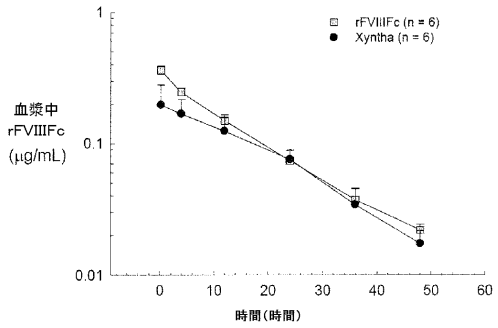
【図６】

図 6



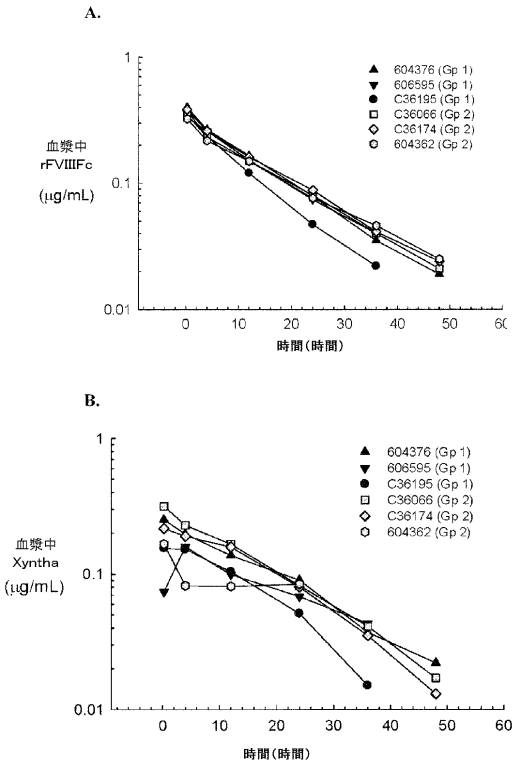
【図７】

図７



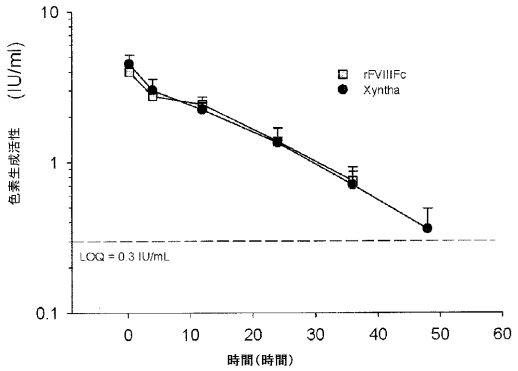
【図８】

図８



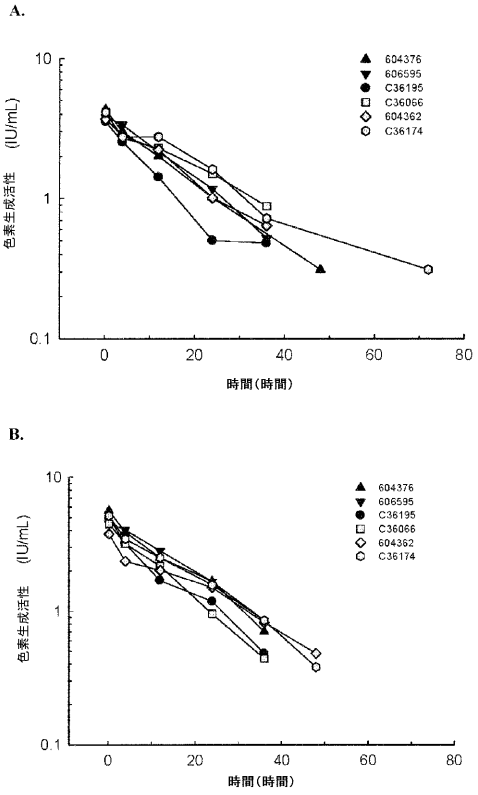
【図９】

図９



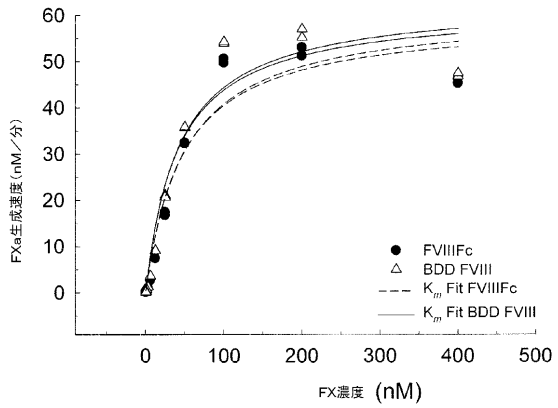
【図１０】

図１０



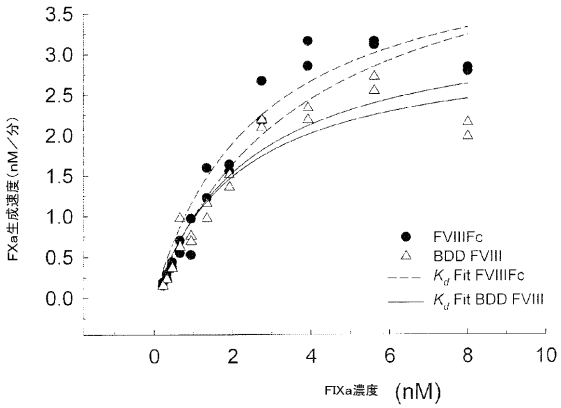
【図１１】

図１１

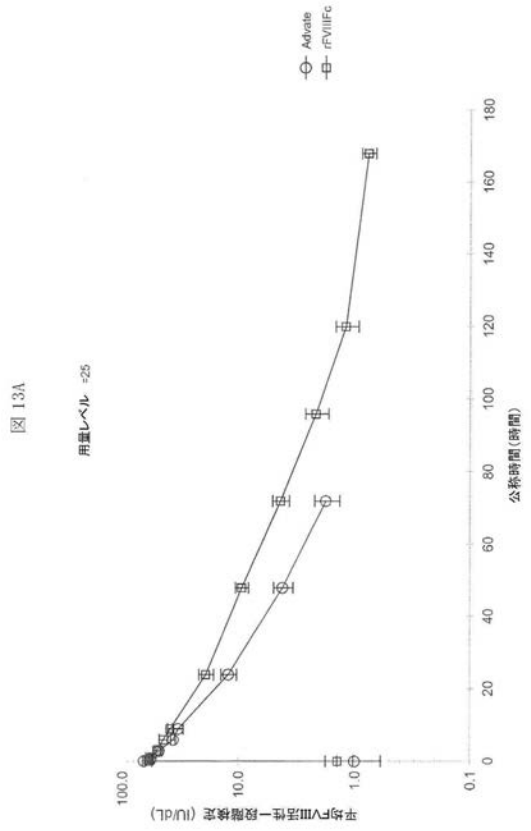


【図１２】

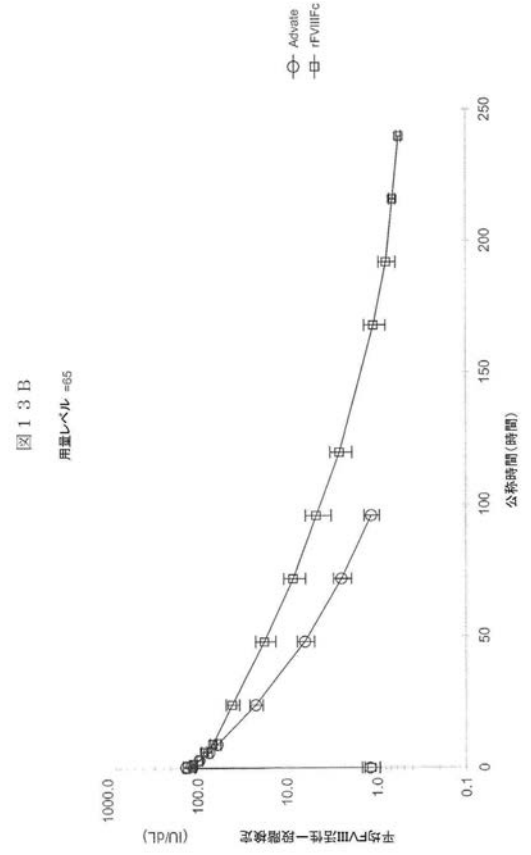
図１２



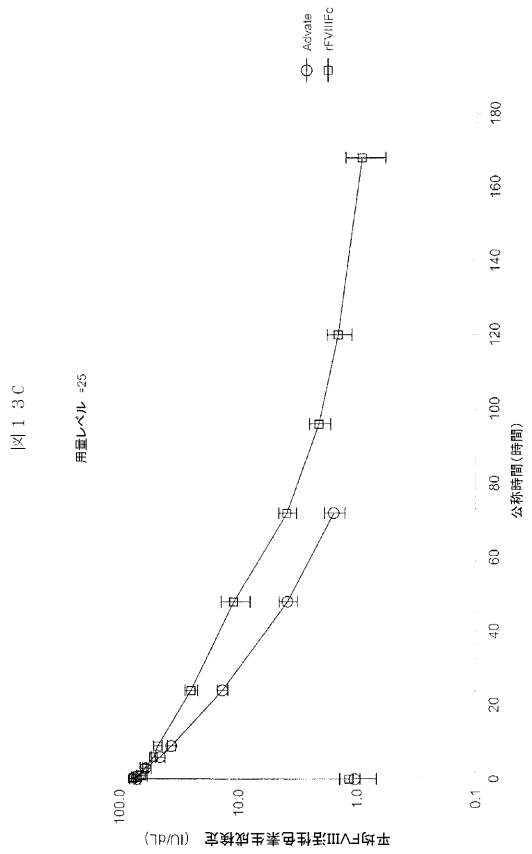
【図１３Ａ】



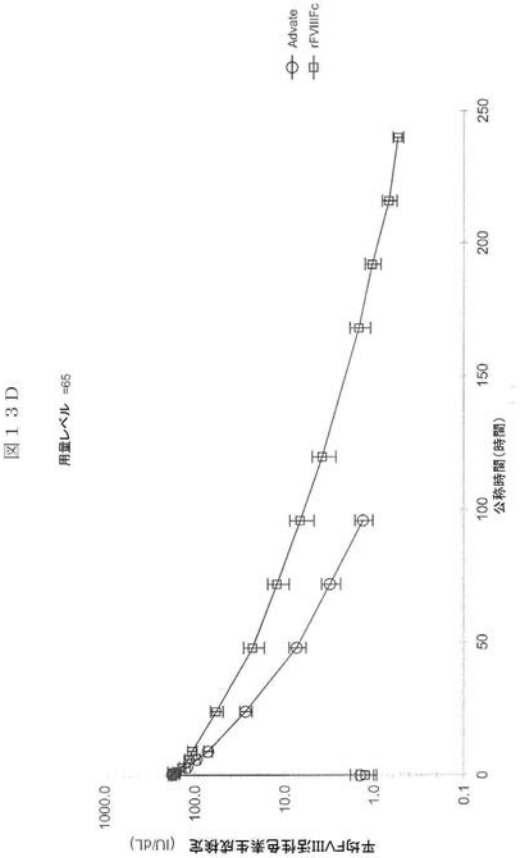
【図１３Ｂ】



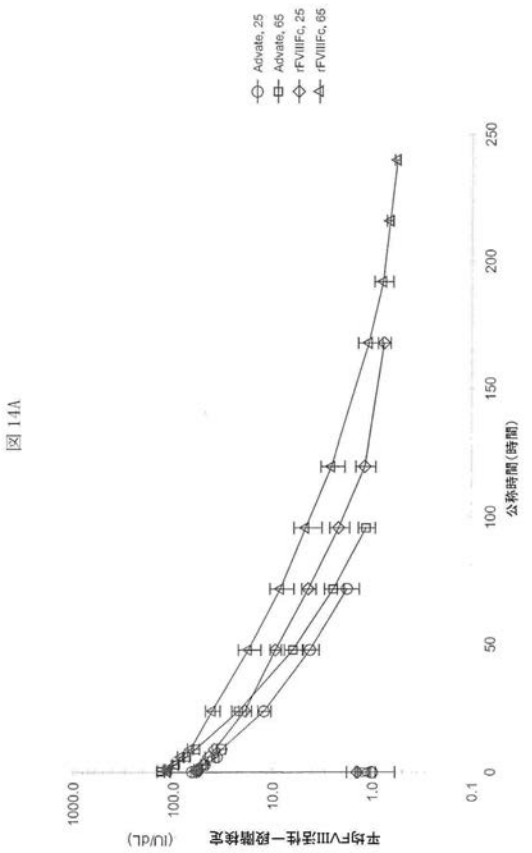
【図１３Ｃ】



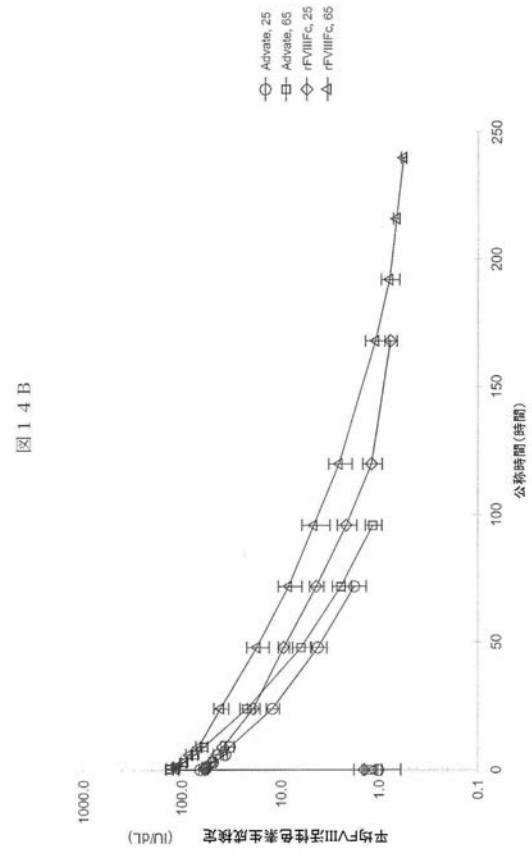
【図１３Ｄ】



【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【配列表】
2018024706000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N 5/10		
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12P 21/02	C	
A61P 7/04	*(2006.01)*	A61P 7/04		

(31)優先権主張番号 61/410,929
(32)優先日 平成22年11月7日(2010.11.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/267,070
(32)優先日 平成21年12月6日(2009.12.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/285,054
(32)優先日 平成21年12月9日(2009.12.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/363,065
(32)優先日 平成22年7月9日(2010.7.9)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 スーザン ロー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１４６３, ペッパーリル, ブルックライン ストリート ８６
(72)発明者 アラン ジェイ. ビトンティ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７２０, アクトン, カールトン ドライブ ３２
(72)発明者 グレン ピアース
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０６７, ランチョ サンタ フェ, ピーオー ボックス ６７５４８６
(72)発明者 アルビン ルック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１１４－１８９７, ボストン, カナル ストリート １０１ エヌ９０７
(72)発明者 ヘイヤン ジャン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４７８, ベルモント, ベイベリー レーン ３
(72)発明者 バイロン マッキンニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２２, サンディエゴ, ショアライン ドライブ ７２３４ ナンバー１５６
(72)発明者 マット オットマー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５９, ニュートン, ギブス ストリート １１２
(72)発明者 ジャーグ ソマー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７７８, ウェイランド, ハンプシャー ロード ３０
(72)発明者 カレン ニューゲント
イギリス国 エイチピー２７９アールエイチ バッキンガムシャー, プリンス リズボロー, オウルズウィック, オウルズウィック ファームハウス
(72)発明者 リアン リー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２０, レキシントン, キャロル レーン １０
(72)発明者 ロバート ピーターズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３２, ウェスト ロックスバリー, ニュー フィルド ストリート ５１

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 DA01

4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 CA44
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA41 CA53 DC20 NA05
NA12 ZA532
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA41 CA40 DA66 DA75
EA20 EA24 FA72 FA74

【外国語明細書】
2018024706000001.pdf