

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-534427

(P2013-534427A)

(43) 公表日 平成25年9月5日 (2013. 9. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/745 (2006. 01)	C O 7 K 14/745	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 185 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-518877 (P2013-518877)	(71) 出願人	512147244
(86) (22) 出願日	平成23年7月11日 (2011. 7. 11)		バイオジェン アイデック ヘモフィリア
(85) 翻訳文提出日	平成25年2月5日 (2013. 2. 5)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/043597		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02012/006633		4 5 1, ウォルサム, フォース アベ
(87) 国際公開日	平成24年1月12日 (2012. 1. 12)		ニュー 9
(31) 優先権主張番号	61/442, 055	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成23年2月11日 (2011. 2. 11)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	230113332
(31) 優先権主張番号	61/467, 880		弁理士 山本 健策
(32) 優先日	平成23年3月25日 (2011. 3. 25)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/363, 183	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成22年7月9日 (2010. 7. 9)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 キメラの凝固因子

(57) 【要約】

凝血の部位に対して治療剤を局在化させる（例えば、血小板に対して標的化されること、または凝血の部位で活性化され得ることによる）キメラの凝固因子であって、クリアランス速度が低下されるか、製造可能性が改善されるか、血栓形成性が低下されるか、活性が向上されるか、またはこれらの特徴の2つ以上を有している、キメラの凝固因子、同様にキメラの凝固因子を作製するための方法、およびこれらの凝固因子を用いて止血を改善するための方法も記載される。

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラの凝固因子であって、i) F V I I、F I XおよびF Xからなる群より選択される凝固因子と、i i) 血小板に結合する標的部分と、i i i) 前記凝固因子と前記標的部分との間のスペーサー部分と、を含む、キメラの凝固因子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のキメラの凝固因子であって、式 A B C によって示される構造を含み、ここで A は凝固因子であり；ここで B はスペーサー部分であり；かつここで C は、血小板に結合する、少なくとも 1 つの標的部分である、キメラの凝固因子。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のキメラの凝固因子であって：A B C；C B A からなる群より選択される式によって提示されるアミノ末端からカルボキシ末端の構造を含む、キメラの凝固因子。

【請求項 4】

前記キメラの凝固因子が、少なくとも 1 つの標的部分を欠いている適切なコントロールと比較した場合、血小板の存在下でトロンビンの生成の増大を示す、請求項 1 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 5】

さらに、足場部分および必要に応じて第二のスペーサー部分を含む、請求項 1 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のキメラの凝固因子であって、さらに D および E を含み、ここで D がスペーサー部分であり；かつ E が足場部分であり、かつここで前記キメラの凝固因子が：A B C D E；A D E B C；E D A B C；C B A D E；E D C B A；および C B E D A、からなる群より選択される式によって提示されるアミノ末端からカルボキシ末端の構造を含む、キメラの凝固因子。

【請求項 7】

E が、第一の F c 部分 F 1 および第二の F c 部分 F 2 を含んでいる二量体 F c 領域である、請求項 6 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のキメラの凝固因子であって、前記凝固因子が、2 つの F c 部分の間に差し込まれた切断性 s c F c (c s c F c) リンカーを含むポリペプチドとして発現され、ここで c s c F c リンカーが、c s c F c ポリペプチドリンカーの切断を生じる少なくとも 1 つの酵素的切断部位に隣接する、キメラの凝固因子。

【請求項 9】

前記 c s c F c リンカーが、c s c F c リンカーの切断を生じる少なくとも 1 つの酵素的切断部位に隣接する、請求項 8 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの酵素的切断部位が、細胞内プロセッシング部位である、請求項 9 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 11】

前記ポリペプチドリンカーが、同じ酵素によってまたは異なる酵素によって認識される、2 つの酵素的切断部位に隣接される、請求項 9 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 12】

前記ポリペプチドリンカーが、約 10 アミノ酸～約 50 アミノ酸の長さを有する、請求項 9 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 13】

前記ポリペプチドリンカーが、約 20 アミノ酸～約 30 アミノ酸の長さを有する、請求項 9 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチドリンカーが、g l y / s e r ペプチドを含む、請求項 9 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 1 5】

前記 g l y / s e r ペプチドが、式 (G l y₄ S e r)_n、または S e r (G l y₄ S e r)_n のペプチドであり、ここで n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9 および 10 からなる群より選択される、正の整数である請求項 1 4 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 1 6】

前記 (G l y₄ S e r)_n リンカーが、(G l y₄ S e r)₆、S e r (G l y₄ S e r)₆、(G l y₄ S e r)₄ および S e r (G l y₄ S e r)₄ からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載のキメラの凝固因子。

10

【請求項 1 7】

前記凝固因子が、2 つのポリペプチド鎖を含む、請求項 8 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 1 8】

請求項 7 に記載のキメラの凝固因子であって、ここで前記キメラの凝固因子が、スパーサー部分を介して F 1 に連結された A および F 2 に連結された C と；スパーサー部分を介して F 1 に連結された A およびスパーサー部分を介して F 2 に連結された C と；F 1 に連結された A およびスパーサー部分を介して F 2 に連結される C と；スパーサー部分を介して F 1 に連結される A およびスパーサー部分を介して F 2 に連結される C と、からなる群より選択される構造を有する、キメラの凝固因子。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載のキメラの凝固因子であって、2 つのポリペプチドを含み、ここで前記第一のポリペプチドが、部分 A B F 1；A B F 1；A B F 1、A B F 1 D C を含み、および前記第二のポリペプチドが部分 C F 2；C D F 2；F 2 D C、F 2 D C を含み、ここで前記 2 つのポリペプチド鎖が、F c 領域を形成する、キメラの凝固因子。

20

【請求項 2 0】

前記標的部分が、F c 領域のポリペプチド鎖の少なくとも 1 つに融合される、請求項 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 2 1】

前記標的部分が、F 1 および F 2 のうちの少なくとも 1 つに直接融合される、請求項 7 に記載のキメラの凝固因子。

30

【請求項 2 2】

前記標的部分が、スパーサー部分を介して F 1 および F 2 のうちの少なくとも 1 つに融合される、請求項 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 2 3】

前記標的部分が、切断リンカーを介して F 1 および F 2 のうちの少なくとも 1 つに融合される、請求項 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 2 4】

前記標的部分が：抗体分子、抗体分子の抗原結合フラグメント、s c F v 分子、レセプターのレセプター結合部分、ペプチド、からなる群より選択される、請求項 1 に記載のキメラの凝固因子。

40

【請求項 2 5】

前記標的部分が、休止血小板に結合する、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 2 6】

前記標的部分が、活性化血小板に選択的に結合する、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 2 7】

前記標的部分が：G P I b a、G P V I、および G P I I b / I I I a の不活性型からなる群より選択される標的に対して選択的に結合する、請求項 2 5 に記載のキメラの凝固

50

因子。

【請求項 28】

前記標的部分が：G P I I b / I I I a の活性型、Pセレクトイン、G M P - 33、L A M P - 1、L A M P - 2、C D 40 L、および L O X - 1 からなる群より選択される標的に対して選択的に結合する、請求項 26 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 29】

前記標的部分が、G P I b 複合体に結合する、請求項 25 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 30】

前記標的部分が：P S 4、O S 1、および O S 2 からなる群より選択されるペプチドである、請求項 25 に記載のキメラの凝固因子。

10

【請求項 31】

前記標的部分が：S C E 5、M B 9、および A P 3 からなる群より選択される抗体由来の抗体可変領域を含む、請求項 25 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 32】

前記凝固因子が、第 V I I 因子である、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 33】

前記凝固因子が、第 V I I 因子の高い比活性の改変体である、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 34】

前記凝固因子が、第 I X 因子である、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

20

【請求項 35】

前記凝固因子が、第 I X 因子の高い比活性の改変体である、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 36】

前記凝固因子が、第 X 因子である、請求項 1、2、5 または 7 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 37】

前記凝固因子が、第 X 因子の高い比活性の改変体である、請求項 1、3、4、または 5 に記載のキメラの凝固因子。

30

【請求項 38】

前記凝固因子が、ある細胞によって活性型で分泌される、請求項 8 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 39】

前記凝固因子が、インビボで活性化される、請求項 1 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 40】

前記キメラの凝固因子が、前記凝固因子中に天然には存在しない異種の酵素的切断部位を含む、請求項 39 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 41】

前記酵素的切断部位が、前記凝固因子の重鎖部分のアミノ末端に対して遺伝子的に融合されている、請求項 40 に記載のキメラの凝固因子。

40

【請求項 42】

前記足場部分が、前記キメラの凝固因子の流体力学半径を増大するタンパク質分子である、請求項 5 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 43】

前記足場部分が、もし存在する場合、アルブミンおよび X T E N（登録商標）からなる群より選択される、請求項 42 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 44】

F V I I を含んでいるポリペプチドであって、前記 F V I I が、凝固カスケードのある成

50

分によって活性化され得る異種の酵素的切断部位を含む、ポリペプチド。

【請求項 45】

前記ポリペプチドが、足場部分、および必要に応じてスペーサー部分を含む、請求項 44 に記載のポリペプチド。

【請求項 46】

前記足場部分が、第一の Fc 部分 F1 と第二の Fc 部分 F2 とを含む二量体 Fc 領域である、請求項 45 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 47】

前記凝固因子が、2つのポリペプチド鎖を含む、請求項 44 に記載のキメラの凝固因子。

10

【請求項 48】

請求項 44 に記載のキメラの凝固因子であって、ここで前記キメラの凝固因子は、スペーサー部分を介して第一の Fc 部分に連結された凝固因子と；スペーサー部分を介して第二の Fc 部分に連結された凝固因子と；F1 に直接連結される凝固因子と；F2 に直接連結される凝固因子と、からなる群より選択される構造を有する、凝固因子。

【請求項 49】

さらに標的部分 C を含む、請求項 47 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 50】

前記キメラの凝固因子が、cscFc リンカーを含んでいる単一のポリペプチド鎖として合成される、請求項 47 に記載のキメラの凝固因子。

20

【請求項 51】

前記 cscFc リンカーが、前記リンカーの切断を生じる少なくとも 1 つの酵素的切断部位に隣接する、請求項 49 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 52】

前記少なくとも 1 つの酵素的切断部位が細胞内プロセッシング部位である、請求項 50 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 53】

前記 cscFc リンカーが、同じ酵素によって、または異なる酵素によって認識される 2 つの酵素的切断部位に隣接される、請求項 50 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 54】

前記 cscFc リンカーが、約 10 ～ 約 50 アミノ酸の長さを有する、請求項 49 に記載のキメラの凝固因子。

30

【請求項 55】

前記 cscFc リンカーが、約 20 ～ 約 30 アミノ酸の長さを有する請求項 49 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 56】

前記 cscFc リンカーが、gly / ser ペプチドを含む、請求項 49 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 57】

前記 gly / ser ペプチドが、式 $(Gly_4Ser)_n$ または $Ser(Gly_4Ser)_n$ のペプチドであり、ここで n が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 および 10 からなる群より選択される正の整数である、請求項 56 に記載のキメラの凝固因子。

40

【請求項 58】

前記 $(Gly_4Ser)_n$ リンカーが、 $(Gly_4Ser)_6$ 、 $Ser(Gly_4Ser)_6$ 、 $(Gly_4Ser)_4$ および $Ser(Gly_4Ser)_4$ からなる群より選択される、請求項 56 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 59】

前記凝固因子が、第 VII 因子の高い比活性の改変体である、請求項 45 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 60】

50

前記凝固因子の天然には存在しない異種の酵素的切断部位が、血栓形成の部位で切断される、請求項 44 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 61】

前記切断部位が；第 XI a 因子切断部位、第 X a 因子切断部位、およびトロンビン切断部位からなる群より選択される、請求項 44 に記載のキメラ凝固因子。

【請求項 62】

酵素的切断部位が、前記凝固因子の重鎖部分のアミノ末端に対して遺伝子的に融合されている、請求項 59 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 63】

前記標的部分が休止血小板に結合する、請求項 48 に記載のキメラの凝固因子。

10

【請求項 64】

前記標的部分が、活性化された血小板に対して選択的に結合する、請求項 48 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 65】

前記標的部分が：GPIIb/IIIa、GPVI、および GPIIb/IIIa の不活性型、からなる群より選択される標的に対して選択的に結合する、請求項 63 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 66】

前記標的部分が：GPIIb/IIIa の活性型、Pセレクトリン、GMP-33、LAMP-1、LAMP-2、CD40L、および LOX-1、からなる群より選択される標的に対して選択的に結合する、請求項 64 に記載のキメラの凝固因子。

20

【請求項 67】

前記足場部分が、前記キメラの凝固因子の流体力学半径を増大するタンパク質分子である、請求項 64 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 68】

前記足場部分が、もし存在する場合、アルブミンおよび XTEN（登録商標）からなる群より選択される、請求項 67 に記載のキメラの凝固因子。

【請求項 69】

請求項 44 のキメラの凝固因子であって：A B C；C B A；A B C D E；A D E B C、E D A B C、C B A D E、E D C B A、C B E D A、からなる群より選択されるアミノ末端からカルボキシ末端の部分の直線配列を含み、ここで A は活性化可能な凝固因子、B は存在しないか、またはリンカーであり、C は標的部分であり、D は存在しないか、またはリンカーであり、および E は足場部分である、キメラの凝固因子。

30

【請求項 70】

請求項 44 に記載のキメラの凝固因子であって、ここで前記凝固因子が、凝固因子の軽鎖および重鎖を含み、かつ前記軽鎖および重鎖の各々が、別々のポリペプチド鎖として発現される、キメラの凝固因子。

【請求項 71】

請求項 1、2、5、7、44、45、45 および 58 のいずれか 1 項に記載のキメラの凝固因子をコードする核酸分子。

40

【請求項 72】

前記核酸分子が、ベクター中に存在する、請求項 71 に記載の核酸分子。

【請求項 73】

前記ベクターがさらに、前記酵素的切断部位のうちの少なくとも 1 つを切断する酵素をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 72 に記載のベクター。

【請求項 74】

請求項 72 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 75】

前記宿主細胞が、細胞内プロセッシングし得る酵素を発現する、請求項 72 に記載の発現

50

ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7 6】

前記酵素が、細胞に対して内因性である、請求項 7 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7 7】

前記酵素が、細胞に対して異種である、請求項 7 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7 8】

キメラの凝固因子を産生するための方法であって、請求項 7 6 または 7 7 に記載の宿主細胞を培養中で培養することと、この培地からキメラの凝固因子を回収することとを包含する、方法。

【請求項 7 9】

2 つのポリペプチド鎖を含む、プロセシングされたヘテロ二量体ポリペプチドであって、前記プロセシングされた、ヘテロ二量体ポリペプチドは、細胞培養培地中で培養される細胞中で請求項 7 8 に記載のベクターを発現すること、および前記培養培地から、成熟したヘテロ二量体ポリペプチドを単離することによって作製される、ヘテロ二量体ポリペプチド。

【請求項 8 0】

請求項 1、2、5、7、4 4、4 5、4 8 および 5 8 のいずれかに記載のキメラ凝固因子と、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

【請求項 8 1】

請求項 7 1 に記載の核酸分子と薬学的に許容される担体とを含む組成物。

【請求項 8 2】

請求項 8 0 または 8 1 に記載の組成物を投与することを包含する、被験体における止血を改善するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 1 0 年 7 月 9 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 3 6 3, 1 8 3 号; 2 0 1 0 年 7 月 9 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 3 6 3, 1 8 6 号; 2 0 1 1 年 2 月 1 1 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 4 2, 0 2 9 号; 2 0 1 1 年 2 月 1 1 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 4 2, 1 5 0 号; 2 0 1 1 年 2 月 1 1 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 4 2, 0 5 5 号; 2 0 1 1 年 3 月 2 5 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 6 7, 8 8 0 号; および 2 0 1 1 年 5 月 3 1 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 9 1, 7 6 2 号の恩典を請求する。上記で引用した仮特許出願の全内容は、参照によって本明細書に援用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

外因性の凝固経路の開始は、組織因子（血管壁に対する損傷の結果として露出される）と第 V I I a 因子との間の複合体の形成によって媒介される。次いでこの複合体は、第 I X 因子および第 X 因子をその活性型に変換する。第 X a 因子は、限られた量のプロトロンビン（トロンビンに対して組織因子保有細胞上で変換する。この得られたトロンビンは次に、組織因子保有細胞から離れて拡散し得、血小板、ならびに第 V 因子および第 V I I I 因子を活性化し、第 V a 因子および第 V I I I a 因子を作製する。凝固の拡大相の間、第 X a 因子は、第 I X a 因子によって（第 V I I I a 因子との複合体で）、活性化された血小板の表面上で生成される。第 X a 因子は、第 V a 因子と複合して、プロトロンビン（トロンビンに活性化し、これがトロンビンのバーストを生じる。このカスケードは、トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの変換で頂点に達し、これがフィブリン塊の形成を生じる。第 V I I 因子および組織因子は、血液凝固の開始において重要な役割を果たす。

【0 0 0 3】

第V I I因子は、単鎖のチモーゲンとして血中に循環する血漿の糖タンパク質である。このチモーゲンは、触媒として不活性である。単鎖の第V I I因子は、インビトロで種々の因子によって2本の鎖の第V I I a因子に変換され得るが、第X a因子は、第V I I因子の重要な生理学的な活性化因子である。チモーゲン第V I I因子の活性化された二本鎖の分子への変換は、アミノ酸位置152のアルギニン残基およびアミノ酸位置153のI l l e残基を連結するペプチド結合の切断によって生じる。組織因子、リン脂質およびカルシウムイオンの存在下では、二本鎖の第V I I a因子は、第X因子または第I X因子を活性化する。第V I I a因子は、T F保有細胞、典型的には損傷された内皮細胞の表面で作用すること、および開始量のトロンビンを生成する（これが次に、血小板を拡散させてそれらを活性化し、それらをトロンビン生成の増殖段階にプライムすることによって凝固カスケードの生理学的な開始因子であると考えられる。治療上は、組み換えの第V I I a因子は、活性化された血小板の表面上で第V因子を活性化することによって作用し、凝固の増殖段階の間にトロンビンのバーストを生成するのにF I X aまたはF V I I I aの必要性を迂回する。F V I I aは血小板について比較的低い親和性を有するので、組み換えF V I I aは、生理学的レベルを超えて投与される。このプロセスは、組織因子依存性であるとされる。

10

【0004】

ヒト第I X因子は、単鎖の糖タンパク質（分子量57,000）として循環する。これは、血漿中にチモーゲンとして存在し、セリンプロテアーゼ、第I X a β因子（さらに一般的には、F I X aと呼ばれる）に、第X I a因子（活性化された血漿トロンボプラスチン前駆体）によってカルシウムイオンの存在下で変換される。活性化反応では、2つの内部ペプチド結合を、第I X因子で加水分解する。これらの切断は、特定のアルギニルアラニンペプチド結合および特定のアルギニルバリンペプチド結合で生じる。これによって、前駆分子の内部領域からの活性化ペプチド（分子量はほぼ11,000に等しい）の遊離、および第I X a β因子（分子量はほぼ46,000に等しい）の生成が生じる。第I X a β因子は、軽鎖（分子量はほぼ18,000に等しい）および重鎖（分子量はほぼ28,000に等しい）から構成され、これらの鎖は、ジスルフィド結合によって一緒に保持される。

20

【0005】

第X因子はまた、A r g - L y s - A r gの3つのペプチドによって接続される軽鎖および重鎖を含む単鎖のポリペプチドとして合成される。次いで、この単鎖の分子は、2つ（またはそれ以上）の内部ペプチド結合の切断によって軽鎖および重鎖に変換される。血漿では、これらの2つの鎖は、ジスルフィド結合によって一緒に連結されて第X因子を形成する。活性化された第X因子、第X a因子は最終の共通の経路に関与し、それによってプロトロンビンはトロンビンに変換され、これが次にフィブリノーゲンをフィブリンに変換する。

30

【0006】

凝固因子は、しばらくの間、止血を改善するために患者に投与されていた。組み換えD N A技術の出現によって、凝固障害を有する患者の処置を有意に改善され、安全かつ着実なタンパク質治療の開発が可能になった。例えば、組み換え活性化された第V I I因子は、血友病AまたはB、凝固因子第X I因子またはV I I因子の欠損、血小板機能の欠損、血小板減少症、またはフォン・ヴィレブランド病を有する患者で生じるような、大出血の処置のために広く用いられてきた。組み換えの第I X因子が、同様に治療上有用である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

このような組み換え分子は有効であるが、治療剤を凝固の部位に局在化するか、薬物動態特性の改善を有するか、クリアランス速度の低下を有するか、改善された製造可能性を有するか、血栓形成性が低下しているか、活性が増強されているか、またはこれらの特徴のうちの2つ以上を有する改善版が必要である。

50

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、活性が増強されたキメラの凝固因子に関する。本発明は、とりわけ、キメラの凝固因子を作製するための方法の特徴づけるが、このキメラの凝固因子は、これらの方法を用いて作製され、かつ止血を改善するための方法は、これらの凝固因子を用いる。本発明のキメラの凝固因子は、増強された薬物動態特性を保有するか、クリアランス速度を低下するか、製造可能性が改善されているか、血栓形成性が低下しているか、活性が増強されているか、またはこれらの特徴のうちの2つ以上を有する。一実施形態では、本発明の改善された凝固因子は活性が増大しており、ここでは、例えば、血小板に対して凝固因子を標的すること、または血栓形成の部位で活性化される、活性化可能な形態（天然には存在しない活性化可能な形態）で被験体に存在することを必要とする。

10

【0009】

一態様では、本発明は、F V I I、F I XおよびF Xからなる群より選択される凝固因子と、血小板に結合する標的部分と、必要に応じて、この凝固因子と標的部分との間のスペーサー部分とを含むキメラの凝固因子に関する。

【0010】

一実施形態では、この凝固因子は、式 A B Cによって示される構造を含み、ここでAは凝固因子であり；ここでBはスペーサー部分であり；かつここでCは、血小板に結合する、少なくとも1つの標的部分である。

【0011】

一実施形態では、上記の凝固因子は：A B C；C B Aからなる群より選択される式によって提示されるアミノ末端からカルボキシ末端の構造を含む。

20

【0012】

一実施形態では、上記の凝固因子は、少なくとも1つの標的部分を欠いている適切なコントロールと比較した場合、血小板の存在下でトロンビンの生成の増大を示す。

【0013】

一実施形態では、上記の凝固因子は、足場部分および必要に応じて第二のスペーサー部分を含む。

【0014】

一実施形態では、上記の凝固因子はさらに、DおよびEを含み、ここでDがスペーサー部分であり；かつEが足場部分であり、かつここでこのキメラの凝固因子は：A B C D E；A D E B C；E D A B C；C B A D E；E D C B A；およびC B E D A、からなる群より選択される式によって提示されるアミノ末端からカルボキシ末端の構造を含む。

30

【0015】

一実施形態では、Eは、第一のFc部分F1および第二のFc部分F2を含んでいる二量体Fc領域である。

【0016】

一実施形態では、上記の凝固因子は、2つのFc部分の間に差し込まれた切断性scFc（cscFc）リンカーを含むポリペプチドとして発現され、ここでこのcscFcリンカーは、cscFcポリペプチドリンカーの切断を生じる少なくとも1つの酵素的切断部位に隣接する。

40

【0017】

一実施形態では、上記cscFcリンカーは、cscFcリンカーの切断を生じる少なくとも1つの酵素的切断部位に隣接する。

【0018】

一実施形態では、上記少なくとも1つの酵素的切断部位は、細胞内プロセッシング部位である、請求項9に記載のキメラの凝固因子。

【0019】

一実施形態では、上記ポリペプチドリンカーは、同じ酵素によってまたは異なる酵素に

50

よって認識される、2つの酵素的切断部位に隣接される。

【0020】

一実施形態では、上記ポリペプチドリinkerは、約10アミノ酸～約50アミノ酸の長さを有する。

【0021】

一実施形態では、上記ポリペプチドリinkerは、約20アミノ酸～約30アミノ酸の長さを有する。

【0022】

一実施形態では、上記ポリペプチドリinkerは、gly／serペプチドを含む。

【0023】

一実施形態では、上記gly／serペプチドは、式(Gly₄Ser)_n、またはSer(Gly₄Ser)_nのペプチドであり、ここでnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群より選択される正の整数である。一実施形態では、この(Gly₄Ser)_nリinkerは、(Gly₄Ser)₆、Ser(Gly₄Ser)₆、(Gly₄Ser)₄およびSer(Gly₄Ser)₄からなる群より選択される。

【0024】

一実施形態では、上記凝固因子は、2つのポリペプチド鎖を含む。

【0025】

一実施形態では、上記キメラの凝固因子は：スペーサー部分を介してF1に連結されたAおよびF2に連結されたCと；スペーサー部分を介してF1に連結されたAおよびスペーサー部分を介してF2に連結されたCと；F1に連結されたAおよびスペーサー部分を介してF2に連結されるCと；スペーサー部分を介してF1に連結されるAおよびスペーサー部分を介してF2に連結されるCと、からなる群より選択される構造を有する。

【0026】

一実施形態では、キメラの凝固因子は、2つのポリペプチドを含み、ここで第一のポリペプチドは、部分A B F1；A B F1；A B F1；またはA B F1 D Cを含み、および上記第二のポリペプチドが部分C F2；C D F2；F2 D C；またはF2 D Cを含み、ここでこの2つのポリペプチド鎖が、Fc領域を形成する。

【0027】

一実施形態では、上記標的部分は、Fc領域のポリペプチド鎖の少なくとも1つに融合される。一実施形態では、この標的部分は、F1およびF2のうちの少なくとも1つに対して直接融合される。一実施形態では、この標的部分は、スペーサー部分を介してF1およびF2のうちの少なくとも1つに融合される。一実施形態では、この標的部分は、切断リinkerを介してF1およびF2のうちの少なくとも1つに融合される。一実施形態では、この標的部分は、切断可能なリinkerを介してF1およびF2の少なくとも1つに融合される。一実施形態では、この標的部分は：抗体分子、抗体分子の抗原結合フラグメント、scFv分子、レセプターのレセプター結合部分、ペプチド、からなる群より選択される。一実施形態では、この標的部分は、休止血小板に対して選択的に結合する。一実施形態では、この標的部分は、活性化血小板に対して選択的に結合する。一実施形態では、この標的部分は：GP1ba、GPVI、およびGP1Ib／IIIIaの不活性型からなる群より選択される標的部分に対して選択的に結合する。一実施形態では、この標的部分は：GP1Ib／IIIIaの活性型、Pセレクトリン、GMP-33、LAMP-1、LAMP-2、CD40L、およびLOX-1からなる群より選択される標的部分に対して選択的に結合する。一実施形態では、この標的部分は、GP1b複合体に結合する。一実施形態では、この標的部分は：PS4、OS1、およびOS2からなる群より選択されるペプチドである。一実施形態では、この標的部分は：SCE5、MB9、およびAP3からなる群より選択される抗体由来の抗体可変領域を含む。

【0028】

一実施形態では、上記凝固因子は、第VII因子である。

【0029】

一実施形態では、上記凝固因子は、第V I I因子の高い比活性の改変体である。一実施形態では、この凝固因子は、第I X因子である。一実施形態では、この凝固因子は、第I X因子の高い比活性の改変体である。一実施形態では、この凝固因子は、第X因子である。一実施形態では、凝固因子は、第X因子の高い比活性の改変体である。

【0030】

一実施形態では、上記凝固因子は、ある細胞によって活性型で分泌される。一実施形態では、この凝固因子は、インビボで活性化される。

【0031】

一実施形態では、上記キメラの凝固因子は、上記凝固因子中の天然には存在しない異種の酵素的切断部位を含む。

10

【0032】

一実施形態では、上記酵素的切断部位は、上記凝固因子の重鎖部分のアミノ末端に対して遺伝子的に融合されている。

【0033】

一実施形態では、上記凝固因子は、足場部分を含み、この足場部分は、上記キメラの凝固因子の流体力学半径を増大するタンパク質分子である。一実施形態では、この足場部分は、もし存在する場合、アルブミンおよびX T E N（登録商標）からなる群より選択される。

【0034】

別の態様では、本発明は、F V I Iを含んでいるポリペプチドであって、このF V I Iが、凝固カスケードのある成分によって活性化され得る異種の酵素的切断部位を含む、ポリペプチドに関与する。

20

【0035】

一実施形態では、上記ポリペプチドは、足場部分、および必要に応じてスペーサー部分を含む。

【0036】

一実施形態では、上記足場部分は、第一のF c部分、F 1と第二のF c部分、F 2とを含む二量体F c領域である。

【0037】

一実施形態では、上記凝固因子は、2つのポリペプチド鎖を含む。

30

【0038】

一実施形態では、上記キメラの凝固因子は：スペーサー部分を介して第一のF c部分に連結された凝固因子と；スペーサー部分を介して第二のF c部分に連結された凝固因子と；F 1に直接連結される凝固因子と；F 2に直接連結される凝固因子と、からなる群より選択される構造を有する。

【0039】

一実施形態では、上記キメラ凝固因子はさらに標的部分を含む。

【0040】

一実施形態では、上記キメラの凝固因子は、c s c F cリンカーを含む単一のポリペプチド鎖として合成される。一実施形態では、このc s c F cリンカーは、このリンカーの切断を生じる少なくとも1つの酵素的切断部位に連結される（例えば、直接連結されるかまたは隣接する）。

40

【0041】

一実施形態では、上記少なくとも1つの酵素的切断部位は、細胞内プロセッシング部位である。一実施形態では、上記c s c F cリンカーは、同じ酵素によって、または異なる酵素によって認識される2つの酵素的切断部位に隣接される。一実施形態では、このc s c F cリンカーは、約10～約50アミノ酸の長さを有する。一実施形態では、このc s c F cリンカーは、約20～約30アミノ酸の長さを有する。

【0042】

50

一実施形態では、上記 c s c F c リンカーは、g l y / s e r ペプチドを含む。

【0043】

一実施形態では、上記 g l y / s e r ペプチドは、式 (G l y ₄ S e r) n または S e r (G l y ₄ S e r) n のペプチドであり、ここで n は 1、2、3、4、5、6、7、8、9 および 10 からなる群より選択される正の整数である。一実施形態では、この (G l y ₄ S e r) n リンカーは、(G l y ₄ S e r) 6、S e r (G l y ₄ S e r) 6、(G l y ₄ S e r) 4 および S e r (G l y ₄ S e r) 4 からなる群より選択される。

【0044】

一実施形態では、上記凝固因子は、第 V I I 因子の高い比活性の改変体である。一実施形態では、この凝固因子に存在する異種の酵素的切断部位は、血栓形成の部位で切断される。一実施形態では、この切断部位は；第 X I a 因子切断部位、第 X a 因子切断部位、およびトロンビン切断部位からなる群より選択される。一実施形態では、この酵素的切断部位は、凝固因子の重鎖部分のアミノ末端に対して遺伝子的に融合されている。

【0045】

一実施形態では、上記標的部分は休止血小板に結合する。一実施形態では、この標的部分は、活性化された血小板に対して選択的に結合する。

【0046】

一実施形態では、上記標的部分は：G P I b a、G P V I、および G P I I b / I I I a の不活性型、からなる群より選択される標的に対して選択的に結合する。一実施形態では、この標的部分は：G P I I b / I I I a の活性型、P セレクチン、G M P - 3 3、L A M P - 1、L A M P - 2、C D 4 0 L、および L O X - 1、からなる群より選択される標的に対して選択的に結合する。

【0047】

一実施形態では、上記足場部分は、上記キメラの凝固因子の流体力学半径を増大するタンパク質分子である。一実施形態では、上記足場部分は、もし存在する場合、アルブミンおよび X T E N（登録商標）からなる群より選択される。

【0048】

一態様では、本発明は：A B C；C B A；A B C D E；A D E B C、E D A B C、C B A D E、E D C B A、C B E D A、からなる群より選択されるアミノ末端からカルボキシ末端の部分の直線配列に関し、ここで A は活性化可能な凝固因子、B は存在しないか、またはリンカーであり、C は標的部分であり、D は存在しないか、またはリンカーであり、および E は足場部分である。

【0049】

一実施形態では、上記凝固因子は、凝固因子の軽鎖および重鎖を含み、かつ上記軽鎖および重鎖の各々が、別々のポリペプチド鎖として発現される。

【0050】

一実施形態では、本発明は、本発明のキメラの凝固因子をコードする核酸分子に関与する。一実施形態では、この核酸分子は、ベクター中に存在する。一実施形態では、このベクターはさらに、上記酵素的切断部位のうちの少なくとも 1 つを切断する酵素をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0051】

一実施形態では、本発明は、本発明の発現ベクターを含む、宿主細胞に関する。一実施形態では、この宿主細胞は、細胞内プロセッシングし得る酵素を発現する。一実施形態では、この酵素は、宿主に対して内因性である。一実施形態では、この酵素は、細胞に対して異種である。

【0052】

別の実施形態では、本発明は、キメラの凝固因子を産生するための方法であって、上記宿主細胞を培養中で培養することと、この培地からキメラの凝固因子を回収することとを包含する、方法に関する。

10

20

30

40

50

【0053】

別の実施形態では、本発明は、2つのポリペプチド鎖を含む、プロセッシングされたヘテロ二量体ポリペプチドであって、上記プロセッシングされた、ヘテロ二量体ポリペプチドが、細胞培養培地中で培養される細胞中で上記ペクターを発現すること、およびこの培養培地から、成熟したヘテロ二量体ポリペプチドを単離することによって作製される、ヘテロ二量体ポリペプチドに関する。

【0054】

一実施形態では、本発明は、キメラ凝固因子と、薬学的に許容される担体とを含む組成物に関する。

【0055】

別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子と薬学的に許容される担体とを含む組成物に関する。

【0056】

別の実施形態では、本発明は、本発明の組成物を投与することを包含する、被験体における止血を改善するための方法に関与する。

【0057】

一態様では、本発明は、凝固因子の軽鎖部分および重鎖部分、ならびに少なくとも1つの標的部分を含むキメラ凝固因子であって、ここでこの標的部分(i)は、血小板に対して特異的に結合し、(i i)この凝固因子の軽鎖と重鎖との間に差し込まれず、かつここでこのキメラの凝固因子は、少なくとも1つの標的部分を欠く適切なコントロールに比較して、血小板の存在下でトロンビンの生成の増大を示すキメラの凝固因子に関する。

【0058】

別の態様では、本発明は、キメラの凝固因子であって、部分A-B-C-D-Eを直鎖状配列で含む凝固因子に関し、ここでAは凝固因子、活性化可能な凝固因子、または活性化された凝固因子であり；Bは存在しないか、またはリンカーであり；Cは標的部分であり；Dは存在しないか、またはリンカーであり；かつEは存在しないかまたは足場部分である。

【0059】

さらに別の態様では、本発明は、キメラの凝固因子であって：A B C；A B C D E；A D E B C、E D A B C、C B A D E、E D C B A、C B E D Aからなる群より選択されるアミノ末端からカルボキシ末端の部分の直鎖状配列を含み、ここでAが凝固因子、活性化可能な凝固因子、または活性化された凝固因子であり、Bは存在しないか、またはリンカーであり、Cは標的部分であり、Dは存在しないか、またはリンカーであり、かつEは足場部分である、キメラ凝固因子に関する。

【0060】

さらに別の態様では、本発明は、キメラの凝固因子であって：A B F 1：F 2；A B F 1：C D F 2；A B F 1：F 2 D C、A B F 1 D C：F 2 D Cからなる群より選択されるアミノ末端からカルボキシ末端の部分の直鎖状配列を含み、ここでAは凝固因子、活性化可能な凝固因子または活性化された凝固因子であり、Bは存在しないか、またはリンカーであり、Cは標的部分であり、Dは存在しないか、またはリンカーであり、かつF 1およびF 2は各々、Fc部分であり、かつ：2つのポリペプチド鎖のF 1およびF 2鎖によって媒介される二量体化を示す、キメラの凝固因子に関する。

【0061】

さらに別の態様では、本発明は、凝固因子の軽鎖部分および重鎖部分、ならびに少なくとも1つの標的部分を含むキメラ凝固因子であって、ここでこの標的部分は、血小板に特異的に結合し、ここでキメラの凝固因子は、2つのポリペプチド鎖を含むジスルフィド連結したFc領域を含む、キメラの凝固因子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】図1は、標的ドメインを含む例示的なキメラの凝固因子を図示する。これらの例

10

20

30

40

50

示的な構築物は、Fc領域を含む。

【図2】図2は、標的ドメインを含む例示的なキメラの凝固因子構築物を図示する。これらの例示的な構築物は、切断性の単鎖(cleavable single chain)Fc(cscFc)を含み、ここではこのscFcリンカーは、細胞(scFcリンカーが発現されて2つの鎖Fc領域が形成される)によってプロセッシングされる。

【図3】図3は、標的ドメインを含む例示的なキメラの凝固因子構築物を図示しているが、ここではこの凝固因子部分は、Glaドメインを欠く。これらの例示的な構築物は、Fc領域を含む。

【図4】図4は、標的ドメインを含んでいる例示的なキメラの凝固因子構築物であって、ここで凝固因子部分がGlaドメインを欠いている、キメラの凝固因子構築物を例示している。これらの例示的な構築物は、切断性の単鎖のFc(cscFc)を含み、ここでこのscFcリンカーは、細胞(scFcリンカーが発現されて2つの鎖Fc領域が形成される)によってプロセッシングされる。

【図5】図5は、活性化される(例えば、インビトロでの活性化後、または凝固因子の軽鎖および重鎖の別の発現によって)か、または活性化可能である(すなわち、凝血の部位でインビボにおいて切断可能である部分を含む)、例示的なキメラの凝固因子構築物を例示している(パネルDおよびEを参照のこと)。これらの例示的な構築物は、Fc領域を含む。構築物A、B、およびCは、早期の実験では発現されなかった。

【図6】図6は、活性化される(例えば、インビトロでの活性化後、または凝固因子の軽鎖および重鎖の別の発現によって)か、または活性化可能である(すなわち、凝血の部位でインビボにおいて切断可能である部分を含む)、例示的なキメラの凝固因子構築物を例示している。これらの例示的な構築物は、切断可能な単鎖Fc(cscFc)を含み、ここでは、scFcリンカーは、細胞(scFcリンカーが発現されて2つの鎖Fc領域が形成される)によってプロセッシングされる。

【図7】図7は、標的ドメインを含む例示的なキメラの凝固因子構築物を図示する。

【図8】図8は、標的ドメインを含んでいる例示的なキメラの凝固因子構築物であって、ここでこの凝固因子部分がGlaドメインを欠く、キメラの凝固因子構築物を例示する。

【図9】図9は、活性化される(例えば、インビトロでの活性化後、または凝固因子の軽鎖および重鎖の別の発現によって)か、または活性化可能である(すなわち、凝血の部位でインビボにおいて切断可能である部分を含む)、例示的なキメラの凝固因子構築物を図示している。

【図10】図10は、FVII-011の精製および活性化のためのSDS PAGEを示す。

【図11】図11は、活性なFVII-053の精製のためのSDS PAGEを示す。

【図12A】図12は、FVII-011およびFVII-102の概略図を示しており、そしてFACSによって決定される、活性化された血小板に対するFVII-011およびFVII-027の結合を示す。

【図12B】図12は、FVII-011およびFVII-102の概略図を示しており、そしてFACSによって決定される、活性化された血小板に対するFVII-011およびFVII-027の結合を示す。

【図13A】図13は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-027、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図13B】図13は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-027、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図13C】図13は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-027、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図13D】図13は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-027、FVII

10

20

30

40

50

I-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図14A】図14によって、PAC-1が、血小板に対する結合の増大、およびFVII-027に関連するトロンビン生成の速度の増大を削減することが示される。

【図14B】図14によって、PAC-1が、血小板に対する結合の増大、およびFVII-027に関連するトロンビン生成の速度の増大を削減することが示される。

【図15】図15は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-037およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイで用いられる構築物を示す。

【図16A】図16は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-037およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。 10

【図16B】図16は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-037およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図16C】図16は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-037およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図17】図17は、図18に示される活性化された血小板の存在下におけるFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイで用いられる構築物を示す。

【図18A】図18は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。 20

【図18B】図18は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図18C】図18は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図18D】図18は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。 30

【図19】図19は、図20に示される活性化された血小板の存在下におけるFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイで用いられる構築物を示す。

【図20A】図20は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図20B】図20は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図20C】図20は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。 40

【図20D】図20は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図21】図21は、図22に示される活性化された血小板の存在下におけるFVII-053およびFVII-011の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイで用いられる構築物を示す。

【図22A】図22は、活性化された血小板の存在下におけるFVII-053およびFVII-011の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。 50

【図 2 2 B】図 2 2 は、活性化された血小板の存在下における F V I I - 0 5 3 および F V I I - 0 1 1 の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図 2 2 C】図 2 2 は、活性化された血小板の存在下における F V I I - 0 5 3 および F V I I - 0 1 1 の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図 2 2 D】図 2 2 は、活性化された血小板の存在下における F V I I - 0 5 3 および F V I I - 0 1 1 の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイを示す。

【図 2 3 A】図 2 3 は、P A C - 1 が F V I I - 0 5 3 に関連するトロンビン生成の速度の増大を削減することを示す。

【図 2 3 B】図 2 3 は、P A C - 1 が F V I I - 0 5 3 に関連するトロンビン生成の速度の増大を削減することを示す。

【図 2 4】図 2 4 は、図 2 5 に示される、H E K 2 9 3 細胞の一時的なトランスフェクションおよびプロテイン A プルダウン後の、F V I I F c 種のウエスタンブロット分析で用いられる構築物を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、H E K 2 9 3 細胞の一時的なトランスフェクションおよびプロテイン A プルダウン後の、F V I I F c 種のウエスタンブロット分析を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、p S Y N - P C 5 - 0 0 3 の有無における p S Y N - F V I I - 0 2 4 の一時的なトランスフェクション後のプロテイン A 免疫沈降のウエスタンブロットを示す。レーン 1、p S Y N - F V I I - 0 2 4、非還元；レーン 2、p S Y N - F V I I - 0 2 4、非還元；レーン 3、p S Y N - F V I I - 0 2 4、還元；レーン 4、p S Y N - F V I I - 0 2 4、還元。

【図 2 7】図 2 7 は、H E K 2 9 3 細胞の一時的なトランスフェクションおよびプロテイン A プルダウン後の、F V I I F c 種のウエスタンブロット分析（F c ウェスタン）を示す。

【図 2 8】図 2 8 は、F X I a による F V I I - 0 3 9 および F V I I - 0 4 0 処置を示す。

【図 2 9】図 2 9 によって、G P I I b I I I a の活性型に標的される F V I I a F c 改変体がトロンビン生成の速度増大を示すことが示される。

【図 3 0】図 3 0 は、血友病 A ヒト血液における F V I I - 0 8 8 および野性型組み換え F V I I a F c の活性を測定するための回転血栓弾性測定（R o t a t i o n T h r o m b o e l a s t o m e t r y）（R O T E M）アッセイを示す。凝固時間、血栓形成時間および α アングルパラメーターを示す。

【図 3 1】図 3 1 は、例示的な切断部位およびこのような切断部位の例示的な位置を活性化可能な凝固因子構築物において示す。この図では、F V I I を例として用いる。

【図 3 2】図 3 2 は、図 3 1 に図示される構築物の切断を示す。

【図 3 3】図 3 3 は、追加の活性化可能な構築物およびウエスタンブロットを示しており、それらの切断を図示する。

【図 3 4】図 3 4 は、F V I I - 0 6 2 および F V I I - 0 9 0 構築物を用いるトロンビン生成アッセイの結果を示す。F V I I - 0 6 2 は、トロンビン切断部位を欠く負のコントロールであり、そのため構築物は活性化できない。F V I I - 0 9 0 は、A L R P R 切断部位を含み、そのためトロンビンによって活性化可能である。

【図 3 5】図 3 5 は、高い比活性の F V I I 改変体の切断を図示する。F V I I 重鎖 - F c および軽鎖 F c は、1 バンド中で崩壊する。なぜならこの重鎖は、トリプシン 1 7 0 ループの挿入後にグリコシル化部位を欠き、小さくなるからである。

【図 3 6】図 3 6 は、F V I I - 0 9 0 および F V I I - 1 0 0 を用いるトロンビン生成アッセイの結果を図示する。

【図 3 7】図 3 7 は、F V I I - 0 9 0 および F V I I - 1 1 5 を用いるトロンビン生成アッセイの結果を図示する。

【図 3 8】図 3 8 は、トロンビンで活性化された活性化可能な F V I I F C のアミド分解活性を図示する。活性化可能な改変体のアミド分解活性は、トロンビン活性化後に測定され得、そして F V I I - 0 9 0 と比較して高い比活性の改変体についてのアミド分解活性

10

20

30

40

50

の増大がある。これらのアッセイでは、トロンビンによる活性化可能な分子の活性化後、ヒルジンを添加して、発色性基質のトロンビン切断を阻害する。この方式では、トロンビンは、F V I I a 活性を検出する能力を妨げない。

【図 3 9】図 3 9 は、F V I I a によって切断されない基質 S 2 7 6 5 を用いる、F V I I a による F X の活性化を測定するアッセイの結果を図示する。このアッセイでは、1 0 u M の F X を F V I I a F c とともに 1 5 分間 3 7 °C でインキュベートした。この反応を、E D T A でクエンチして、基質を添加した。図 3 9 は、F V I I a F c による F X 活性化が検出され得るということを示すコントロールの実験の結果を示す。

【図 4 0】図 4 0 は、「活性化可能な F V I I F c」による F X a 生成活性を示す。図 4 0 に示される実験によって、高い比活性の改変体に関する F X 活性化活性の増大があることが示される。この実験では、F V I I F c (1 0 0 n M) を、トロンビン (1 0 0 n M) で活性化した。ヒルジンを添加して、トロンビンを阻害した。F X (1 0 u M) を添加し、続いて E D T A を添加して、反応を阻害した。F X の活性を、F X a 基質を検出することによって測定した。

【図 4 1】図 4 1 は、F V I I - 1 1 8、F V I I - 1 1 9、および F V I I - 1 2 7 で用いた活性化可能なモノマー構築物を含む、例示的な活性化可能な構築物の形式を図示する。

【図 4 2】図 4 2 は、ヘテロ二量体 (F V I I - 0 9 0) に比較した、活性化可能な構築物、特に単量体の (F V I I - 1 1 8 および F V I I - 1 1 9) のトロンビン切断の有効性を図示する。

【図 4 3】図 4 3 は、高い比活性の改変体 (F V I I - 1 2 7) に対して野性型の活性化可能な F V I I F c (F V I I - 1 1 8) を比較するためのトロンビン生成アッセイの結果を図示する。

【図 4 4 A】図 4 4 A は、いくつかの標的化構築物を図示する。この場合、G P I I b I I I a の活性な高次構造に結合する S C E 5 s c F v は、この構築物中の種々の部位に含まれる。

【図 4 4 B】図 4 4 B は、これらの構築物を用いる、血小板豊富な F V I I I 欠乏血漿におけるトロンビン生成アッセイの結果を図示する。N 7 は、N o v o s e v e n のコントロールである。

【図 4 4 C】図 4 4 C は、血小板に対する組み換え F V I I a F c 改変体の結合を、F A C によって図示する。

【図 4 5 A】図 4 5 A は、A P 3 (休止血小板および活性化された血小板に存在する G P I I b I I I a に対する s c F v) を含むいくつかの標的化された F V I I a を図示する。

【図 4 5 B】図 4 5 B は、血小板豊富な F V I I I 欠損の血漿におけるトロンビン生成アッセイの結果を示す。

【図 4 5 C】図 4 5 C は、血小板に対する r F V I I a F c 改変体の結合の結果を F A C S によって示す。

【図 4 6 A】図 4 6 A は、いくつかの標的化 F V I I a 構築物であって、G P I b - α を、その分子、特に P S 4、O S 1、および O S 2 ペプチドに結合するペプチドを用いて標的化する構築物を示す。

【図 4 6 B】図 4 6 B は、図 4 6 A で示される C 末端ペプチド構築物を用いて、血小板豊富な F V I I I 欠損の血漿におけるトロンビン生成アッセイの結果を示す。

【図 4 7 A】図 4 7 A は、図 4 6 A に示される N 末端ペプチド構築物を用いる、血小板豊富な F V I I I 欠損の血漿における、トロンビン生成アッセイの結果を示す。

【図 4 7 B】図 4 7 B は、F V I I - 0 4 5 および F V I I - 0 4 8 の直接比較を示す。

【図 4 8】図 4 8 は、F A C S によって決定される、血小板に対する F V I I - 0 4 5 および F V I I - 0 4 8 ならびに野性型 F V I I a F c の結合を示す。この図はまた、B e r n a r d ら、B i o c h e m i s t r y 2 0 0 8, 4 7 : 4 6 7 4 - 4 6 8 2 に報告されるような標的ペプチドの親和性を示す。

【図 4 9 A】図 4 9 A は、例示的な標的化される F V I I I 構築物を示す。

10

20

30

40

50

【図 4 9 B】図 4 9 B は、F V I I I 欠損の血小板豊富な血漿におけるトロンビン生成アッセイの結果を示す。この実験では、アッセイは、組織因子（上のパネル）で活性化されるか、または血小板活性化（下のパネル）によって活性化された。

【図 5 0】図 5 0 は、g l a ドメインを含む標的化 F V I I 構築物（F V I I - 0 1 1）、および g l a ドメインを欠いている標的化 F V I I 構築物（F V I I - 0 2 8）の半減期を測定する実験の結果を示す。

【図 5 1 A】図 5 1 A は、標的部分を含むいくつかの F I X 構築物、この場合は、S C E 5 s c F v を示す。

【図 5 1 B】図 5 1 B は、図 5 1 A の構築物を用いる、血小板豊富な F I X 欠損の血漿における、トロンビン生成アッセイの結果を示す。

【図 5 1 C】図 5 1 C では、F I X - 0 6 8 および F I X - 0 8 8 の両方とも、トロンビン生成によって測定される場合、F I X - 0 4 2 よりも少なくとも 4 倍高い活性を有することが図示される。

【図 5 2 A】図 5 2 A は、F I X - 0 9 0 および B e n e f i x を比較するトロンビン生成アッセイの結果を示す。

【図 5 2 B】図 5 2 B では、F I X - 0 9 0 の活性が B e n e f i x の活性のほぼ 4 倍であることが示される。

【図 5 3 A】図 5 3 A は、休止血小板および活性化された血小板に存在する、G P I b に結合するペプチドを含んでいる標的化 F I X を示す。

【図 5 3 B】図 5 3 B は、血小板豊富な F I X 欠損の血漿における、トロンビン生成アッセイの結果を示す。

【図 5 3 C】図 5 3 C では、F I X - 0 8 9 が、トロンビン生成によって測定した場合、F I X - 0 4 2 よりもほぼ 4 倍強いが、比活性は低いことが示される。

【発明を実施するための形態】

【0063】

発明の詳細な説明

本発明は、キメラの凝固因子に関する。本発明は、凝固因子の有効性、薬物動態特性、および／または製造可能性を増強する新規な方法の開発に少なくとも一部は基づく。一実施形態では、本発明の改善された凝固因子は、活性が増大しており、ここでは、例えば、血小板に対して凝固因子を標的すること、または血栓形成の部位で活性化される、活性化可能な形態（天然には存在しない活性化可能な形態）で被験体に存在することを必要とする。これは、例えば、凝固因子を標的することによって、またはそれらを活性化可能な形態で作製することによって達成され得る。

【0064】

一実施形態では、本発明の凝固因子は、凝血の部位に標的される。凝固因子を休止血小板または活性化された血小板に標的する標的部分を組み込むことによって、凝固因子の活性は、増強され得る。例えば、第 V I I 因子の場合、活性化因子 X（F X a）を生成するために内皮細胞表面で組織因子（T F）によって活性化される可能性が高い内因性の F V I I とは異なり、外因性の F V I I a は、T F とは独立した方式で F X a / F I X a を生成する可能性が高い（他の凝固因子が局在化される活性化血小板の表面で最も有効である）。しかし、生理学的には、F V I I a は、内皮細胞のような T F 保有性の細胞の表面で作用して、血小板に低い親和性を有する。治療的な組み換え F V I I a は、活性化された血小板の表面上で第 X 因子を第 X a 因子に変換することによって作用するという仮説がなされた。低い血小板親和性を克服して、出血を処置するのに有効であるには、組み換え F V I I a は、生理学的なレベルを上回って投与される。従って、F V I I a の場合、血小板表面に対する標的化は、この分子の有効性を有意に増大し得る。他の凝固因子（例えば、F I X、F V I I I、F X）は、血小板に対して高い親和性を有するが、血小板標的化部位を組み込むことによって、これらは活性の増強を示し過ぎる場合がある。さらに、F V I I a はヒトでは比較的半減期が短い（約 2、3 時間）。この半減期の短さのせいで、出血を制御するために組み換え F V I I a は複数回投与する必要をもたらす可能性がある

10

20

30

40

50

。従って、血小板に対して凝固因子、詳細にはF V I I aを標的することは有効性を改善する。

【0065】

標的部分は、キメラの凝固因子の多数の位置に配置され得る。標的化されたキメラの凝固因子の例示的な構造は、例えば、図1-4、7、8、17、19、21、44、46、49、51、および53に示される。

【0066】

別の実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、凝血の部位で活性化可能な形態で作製される。バイパス療法における使用のためには、外因性の凝固因子は、活性化型で与えられる場合のみ有効である。しかし、このような活性化された凝固因子は、内因性の経路（例えば、アンチトロンビンI I I、TFPI）によって急速に不活性化されて、活性型のクリアランスおよび短い有効半減期がもたらされる。より高用量を考慮すれば、この問題は解決されない。なぜなら、これは、血栓形成効果を生じ得るからである。従って、一実施形態では、本発明は、「活性化可能な」キメラの凝固因子構築物であって、凝固因子に正常は存在しない異種の酵素的切断部位を含む、キメラの凝固因子構築物に関する。これらの分子は、増強されたチモーゲンとして循環し、投与の際に不活性化がないことで半減期が長い、酵素による切断によって凝固部位で容易に活性化され得る。一実施形態では、このような異種の酵素的切断部位は、凝固ケスケードの間に産生される酵素についての切断部位である。例えば、一実施形態では、活性化可能な構築物の異種切断部位は、第X I a因子、第X a因子、またはトロンビン切断部位を含む。例示的なFX I a切断部位としては、例えば、以下が挙げられる：T Q S F N D F T RおよびS V S Q T S K L T R。例示的なトロンビン切断部位としては、例えば、以下が挙げられる：D F L A E G G G V R、T T K I K P R、およびA L R P R。一実施形態では、異種の切断部位は、上記凝固因子の軽鎖と重鎖との間に差し込まれる。別の実施形態では、異種の切断部位は、この凝固因子の2つの鎖の間に差し込まれない。一実施形態では、この異種切断部位は、この凝固因子の重鎖に対してアミノ末端である。

【0067】

この異種切断部位は、切断性のリンカー中に存在し、キメラの凝固因子において多数の位置に位置し得る。活性化可能なキメラの凝固因子の例示的な構造は、例えば、図5、6、9、29、27、31、および41に示される。例示的なこのような構築物は、血栓形成の存在下で活性化されて、下にさらに詳細に記載される。

【0068】

一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、例えば、分子の流体力学半径を増大するための足場を備える。例えば、本発明のキメラの凝固因子は、融合タンパク質であってもよい。例示的な足場としては、例えば、Fc R n結合部分（例えば、完全Fc領域またはFc R nに結合するその部分）、単鎖のFc領域（Sc Fc領域、例えば、米国特許出願公開第2008/0260738号、WO2008/012543、またはWO2008/1439545に記載される）、切断可能sc Fc領域（本明細書に記載されるようなcsc Fc領域を含む）、複雑性の少ないタンパク質またはその一部、例えば、XTenポリペプチド（登録商標）、またはアルブミンが挙げられる。

【0069】

一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、Fc領域またはそのFc R n結合部分を足場部分として使用する。一実施形態では、キメラの凝固因子が融合されるFc部分は、天然に存在する（または野生型（WT）の）Fc部分である。別の実施形態では、Fc部分は、配列中に1つ以上の変動を含む。

【0070】

別の実施形態では、Fc部分は、sc Fc部分（例えば、非切断性のまたはcsc Fcリンカーを含む）である。csc Fcリンカーを含む構築物では、プロセッシングされていない分子は、切断性の単鎖のFc領域を含み、ここでは成分のFc部分は単一のポリペプチド鎖中に遺伝子的に融合されて、機能的な単鎖の二量体Fc領域を形成する。csc F

c リンカーは、ポリペプチドの二量体 F c 領域を縦列で含む F c 部分を連結してもよいし、または 1 つの F c 部分をこの構築物の非 F c 部分、例えば、凝固因子もしくはは標的部分に連結してもよく、これが次に第二の F c 部分に連結される。この c s c F c リンカーは、s c F c 領域を含み、少なくとも 1 つの酵素的切断部位、例えば、細胞内酵素プロセシング部位に隣接する F c 部分の間に差し込まれる。一実施形態では、s c F c リンカーは、核酸分子によってコードされるタンパク質が細胞中でプロセシングされる時、リンカー（例えば、そのリンカーの全てまたは実質的に全て）の切除を生じる 2 つの酵素的切断部位に隣接される。別の実施形態では、この s c F c リンカーは、ポリペプチドが細胞によって分泌された後に、インビトロでこのリンカーの切除を可能にする少なくとも 1 つの酵素的切断部位に隣接するか、またはこの構築物が被験体に投与された後に、インビボでリンカーの切除を可能にする少なくとも 1 つの酵素的切断部位を備える。従って、一実施形態では、このようなポリペプチドは、プロセシングされていない形態で 1 つの連続ヌクレオチド配列の一部として単一のオープンリーディングフレーム（ORF）中にコードされる s c F c 領域（単数または複数）を備えるが、c s c F c リンカーは酵素的に切断され（例えば、投与の前、または投与後インビボで）、単一アミノ酸鎖に融合されていない F c 領域を含むヘテロ二量体分子であるポリペプチドを生じ、すなわち、この得られたプロセシングされた構築物は、2 つのポリペプチド鎖を含む F c 領域を有する。このような実施形態では、全てのまたは実質的に全てのリンカーが切除されるが、いくつかの実施形態では、切断部位の一部、例えば、RRRR 切断部位という 4 つのアルギニンが残る場合がある。

10

20

【0071】

一実施形態では、s c F c リンカーは、切断のための 2 つのプロセシング部位に隣接する。この 2 つのプロセシング部位は、同じであってもまたは異なってもよい。一実施形態では、少なくとも 1 つのプロセシング部位は、アルギニン k e x 2 / フリン酵素によって認識されるような塩基性アミノ酸残基のクラスターである。このような酵素は、アルギニン残基のすぐ C 末端側で切断する。別の実施形態では、少なくとも 1 つの切断部位は、インビボで切断され得る部位、例えば、トロンビンによって認識される切断部位である。

【0072】

一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、c s F c リンカーを含む s c F c 分子の状況では、活性型で製造される。例えば、第 V I I 因子は一般には、チモージェンとして組み換え的に産生され、投与のための活性型を産生するには製造の間に活性が必要である。一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、製造可能性を改善するためにこれが活性型で発現される細胞から分泌される。下にさらに詳細に示すとおり、このような凝固因子は、分子中に単鎖の F c 領域を組み込むことによって産生され得る。単鎖 F c 領域は、単一のポリペプチド鎖中に存在する F c 部分の二量体化によって形成される。一実施形態では、このような構築物は、少なくとも 1 つの細胞内プロセシング部位に隣接する s c F c の 2 つの F c 部分を連結する s c F c ポリペプチドリンカーを備える。このような構築物の切断は、分泌経路において後期まで、例えば、タンパク質がトランスゴルジ装置中で活性プロセシング酵素と共存するときまで、遅れる。

30

【0073】

一実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする構築物を発現する細胞は、2 つのポリペプチド鎖を含む二量体分子を生じる 1 つ以上のプロセシング部位で s c F c リンカーを切断する酵素を内因性に発現する。別の実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする構築物を発現する細胞は、1 つ以上のプロセシング部位で s c F c リンカーを切断する酵素を外因性に発現する。

40

【0074】

一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、最適の構築物を創出するためにこれらの特徴のうちの 2 つ以上を組み合わせてもよい、例えば、休止血小板に対して活性化可能な融合タンパク質構築物を標的すること（その結果、効果的におよび活性な凝固の部位でより高い局所濃度で活性化される）。例示的なこのような組み合わせの構築物は、両方と

50

もが標的されるキメラの凝固因子を備え、かつプロセシングの増強のための s c F c リンカーを備える。別の実施形態では、本発明の構築物は、標的化されて、活性化可能である。

【0075】

例示的な本発明の構築物は、添付の図面および配列表に図示される。一実施形態では、本発明は、図に示される構造を有するポリペプチドに関する。別の実施形態では、本発明は、添付の配列表に示される配列を有するポリペプチドまたはこのようなポリペプチドをコードする核酸分子に関する。一実施形態では、本発明は、添付の配列表に示される配列を有するポリペプチドの成熟型に関する。これらの構築物およびそれらをコードする核酸分子は、被験体において止血を改善するために用いられ得ることが理解される。

10

【0076】

本明細書および特許請求の範囲の明確に理解するために、以下の定義を下に示す。

【0077】

1. 定義

本明細書において用いる場合、「タンパク質」または「ポリペプチド」という用語は、2つ以上の天然のアミノ酸または天然でないアミノ酸のポリマーを指す。

【0078】

「アミノ酸」という用語には、アラニン (A l a または A) ; アルギニン (A r g または R) ; アスパラギン (A s n または N) ; アスパラギン酸 (A s p または D) ; システイン (C y s または C) ; グルタミン (G l n または Q) ; グルタミン酸 (G l u または E) ; グリシン (G l y または G) ; ヒスチジン (H i s または H) ; イソロイシン (I l e または I) ; ロイシン (L e u または L) ; リジン (L y s または K) ; メチオニン (M e t または M) ; フェニルアラニン (P h e または F) ; プロリン (P r o または P) ; セリン (S e r または S) ; トレオニン (T h r または T) ; トリプトファン (T r p または W) ; チロシン (T y r または Y) ; およびバリン (V a l または V) を包含する。非伝統的なアミノ酸も、本発明の範囲内であり、ノルロイシン、オミチン、ノルバリン、ホモセリン、および E l l m a n ら、M e t h . E n z y m . 2 0 2 : 3 0 1 - 3 3 6 (1 9 9 1) に記載されるものなどの他のアミノ酸残基アナログを包含する。そのような非天然のアミノ酸残基を生成するために、N o r e n ら、S c i e n c e 2 4 4 : 1 8 2 (1 9 8 9) および上述の E l l m a n らの手順を用いてもよい。簡潔に述べると、これらの手順は、天然に存在しないアミノ酸残基を用いてサブプレッサー t R N A を化学的に活性化し、その後、R N A のインビトロの転写および翻訳を行うことを包含する。非伝統的なアミノ酸の導入は、当該分野で公知のペプチド化学を用いて達成することもできる。本明細書において用いられる「極性のアミノ酸」という用語は、正味ゼロ電荷を有するが、それらの側鎖 (例えば、M、F、W、S、Y、N、Q、C) の異なる部分にゼロでない部分電荷を有するアミノ酸を包含する。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に関与する場合がある。本明細書において用いられる「荷電アミノ酸」という用語は、それらの側鎖 (例えば、R、K、H、E、D) に非ゼロ正味荷電を有することができるアミノ酸を包含する。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に関与する場合がある。

20

30

40

【0079】

「アミノ酸置換」とは、第2の異なる「置換」アミノ酸残基による、所定のアミノ酸配列 (出発ポリペプチドのアミノ酸配列) における少なくとも1つの既存のアミノ酸残基の置換を指す。「アミノ酸挿入」とは、所定のアミノ酸配列への少なくとも1つの付加的アミノ酸の組み込みを指す。挿入は、通常、1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなるが、この大きな「ペプチド挿入」は、例えば、約3〜約5または最大約10、15、もしくは20のアミノ酸残基までにおよぶ挿入さえ行うことができる。挿入された残基 (単数または複数) は、上記において開示されるように、天然、または非天然であり得る。「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指す。

50

【0080】

ポリペプチドは、単量体（モノマー）または多量体（マルチマー）のいずれであってもよい。例えば、一実施形態では、本発明のタンパク質は、二量体である。本発明の二量体ポリペプチドは2つのポリペプチド鎖を含んでもよく、または1つのポリペプチド鎖からなってもよい（例えば、s c F c分子の場合）。一実施形態では、本発明の二量体はホモ二量体であり、2つの同一のモノマーサブユニットまたはポリペプチド（例えば、2つの同一のF c部分または2つの同一の生物学的に活性な部分）を含んでいる。別の実施形態では、本発明の二量体は、ヘテロ二量体であり、2つの同一でないモノマーのサブユニットまたはポリペプチドを含んでいる（例えば、2つの異なる凝固因子またはその部分または1つの凝固因子のみを含んでいる）。例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許第7404956号を参照のこと。

10

【0081】

本明細書において用いる場合、「ポリペプチドリンカー」という用語は、ポリペプチド鎖の直鎖状アミノ酸配列における2つのドメインを接続するペプチドまたはポリペプチド配列（例えば、合成ペプチドまたはポリペプチド配列）を指す。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、構築物を作製する2つのF c部分を直接または間接的に接続するポリペプチドリンカーをコードする核酸分子によってコードされる。これらのリンカーは、本明細書においては、「s c F cリンカー」と呼ばれ、このs c F cリンカーは、F c部分を含んでいるポリペプチドの2つのF c部分の間に差し込まれる。s c F cリンカーが2つのF c部分を連続して直鎖状のポリペプチド配列中で接続する場合、これは「直接」連結である。対照的に、s c F cリンカーが、第一のF c部分を結合部分に連結し得、これが次に第二のF c部分に連結されて、これによって間接的な連結が形成される。これらのs c F cリンカーによって、単鎖の遺伝子構築物の形成が可能になる。一実施形態では、このポリペプチドはまた、酵素的切断部位を備え、これが切断可能なs c F cリンカー（c s c F cリンカー）を生じ、一実施形態では、実質的に切除される（例えば、細胞によるプロセッシングの間）。従って、得られたプロセッシングされたポリペプチドは、二量体分子であり、これは、少なくとも2つのアミノ酸鎖を含み、かつ外来のリンカーのアミノ酸配列を実質的に欠く。いくつかの実施形態では、全てまたは実質的に全てのリンカーが切除されるが、いくつかの実施形態では、切断部位の一部、例えば、R R R R切断部位の4つのアルギニンが残る場合がある。

20

30

【0082】

別の実施形態では、本明細書においては「スペーサー」と呼ばれる別の種類のポリペプチドリンカーを用いて、異なる部分、例えば、凝固因子または標的部分をポリペプチド上のF c部分に接続してもよい。この種のリンカーは、ポリペプチド分子に対して可塑性を提供し得る。スペーサーは一般的には切断されない；しかし特定の実施形態では、このような切断は所望され得る。スペーサーの例示的な部分は、添付の図面に示される。スペーサーは、凝固因子、標的化部分、および／または足場の間に、例えば、これらの部分のN末端またはC末端に位置してもよい。一実施形態では、これらのリンカーは、プロセッシングの間に除去されない。

【0083】

本発明のキメラの凝固因子に存在し得る第三種のリンカーは、本明細書では、異種の切断部位を含む「切断性（切断可能）リンカー」と呼ばれ、これは異種の切断部位（例えば、第X I a因子、X a、またはトロンビン切断部位）を含み、追加のスペーサーリンカーを、切断部位のN末端もしくはC末端のいずれかまたは両側の上に含んでもよい。このような部位の例示的な位置は、添付の図面に示され、そして、例えば、標的化部分に隣接する位置を含む。別の実施形態では、このようなリンカーは、凝固因子またはその一部に隣接さしてもよい。例えば、一実施形態では、切断性のリンカーは、凝固因子の重鎖のN末端に融合されて、この凝固因子の活性化可能な形態を作製し得る。このような場合、この切断性のリンカーは、その切断部位のN末端で追加のスペーサーリンカーを含んでもよいが、その凝固因子の重鎖のアミノ末端に対する切断部位のC末端での直接融合を必要とす

40

50

る。

【0084】

本明細書において用いる場合、「gly-serポリペプチドリンカー」という用語は、グリシンおよびセリン残基からなるペプチドを指す。例示的なgly-serポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列 $(Gly_4Ser)_n$ （配列番号4）を含む。別の例示的なgly-serポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列 $S(Gly_4Ser)_n$ を含む。

【0085】

一実施形態では、 $n=1$ である。他の実施形態では、 $n=2$ である。別の実施形態では、 $n=3$ 、すなわち、 $(Gly_4Ser)_3$ である。別の実施形態では、 $n=4$ 、すなわち、 $(Gly_4Ser)_4$ （配列番号6）である。別の実施形態では、 $n=5$ である。さらに別の実施形態では、 $n=6$ である。別の実施形態では、 $n=7$ である。さらに別の実施形態では、 $n=8$ である。別の実施形態では、 $n=9$ である。さらに別の実施形態では、 $n=10$ である。別の例示的なgly-serポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列 $Ser(Gly_4Ser)_n$ （配列番号26）を含む。一実施形態では、 $n=1$ である。一実施形態では、 $n=2$ である。好ましい実施形態では、 $n=3$ である。別の実施形態では、 $n=4$ である。別の実施形態では、 $n=5$ である。さらに別の実施形態では、 $n=6$ である。

【0086】

指名されたポリペプチドまたはタンパク質「由来の」ポリペプチドまたはアミノ酸の配列とは、ポリペプチドの起源を指す。好ましくは、ポリペプチドまたはアミノ酸配列（特定の配列に由来する）は、その配列またはその一部に対して本質的に同一であるアミノ酸配列を有する（ここでこの一部は、少なくとも10～20アミノ酸、好ましくは少なくとも20～30アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも30～50アミノ酸からなる）か、そうでなければ、その配列の起源を有すると当業者に確認できる。

【0087】

別のペプチド由来のポリペプチドは、出発ポリペプチドに対して1つ以上の変異、例えば、別のアミノ酸残基で置換された1つ以上のアミノ酸残基、または1つ以上のアミノ酸残基の挿入もしくは欠失を有する1つ以上のアミノ酸残基を有する場合がある。好ましくは、このポリペプチドは、天然には存在しないアミノ酸配列を含む。このような改変体は、必然的に出発抗体と100%未満の配列同一性または類似性を有する。好ましい実施形態では、この改変体は、出発ポリペプチドのアミノ酸配列と約75%～100%未満、より好ましくは、約80%～100%未満、さらに好ましくは約85%～100%未満、さらに好ましくは約90%～100%未満（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）、そして最も好ましくは約95%～100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性のアミノ酸配列を、例えば、改変体分子の長さにわたって有する。一実施形態では、出発ポリペプチド配列とそれに由来する配列との間に1つのアミノ酸相違がある。この配列に関する同一性または類似性は、本明細書において、配列を整列させ、もし必要であれば、最大パーセント配列同一性を達成するために配列をアラインメントしてギャップを導入した後、出発アミノ酸残基と同一である（すなわち、同じ残基の）候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。

【0088】

本発明の好ましいポリペプチドは、ヒトタンパク質配列由来のアミノ酸配列（例えば、少なくとも1つの凝固因子またはFc部分またはドメイン）を含む。しかし、ポリペプチドは、別の哺乳動物種由来の1つ以上のアミノ酸を含んでもよい。例えば、凝固因子、Fcドメイン、または標的部分は、非ヒト種由来であって、本発明のポリペプチドに含まれてもよい。あるいは、1つ以上のアミノ酸が、非ヒト種由来のポリペプチドに存在してもよい。本発明の好ましいポリペプチドは、免疫原性ではない。

【0089】

本発明のポリペプチドは、それらが天然に存在するかまたは天然のポリペプチド（それ

10

20

30

40

50

が由来する)とは、天然のポリペプチドの所望の活性を保持したままで、アミノ酸配列において変化するように変更され得ることがまた当業者によって理解される。例えば、「非必須」アミノ酸残基で保存的置換または変化をもたらすヌクレオチドまたはアミノ酸置換が作製されてもよい。免疫グロブリン由来のポリペプチド(例えば、Fcドメイン、部分、または抗原結合部位)の非天然の改変体をコードする単離された核酸分子は、免疫グロブリンのヌクレオチド配列への1つ以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失(その結果1つ以上のアミノ酸の置換、付加または欠失がこのコードされたタンパク質に導入される)によって創出され得る。変異は、標準的な技術、例えば、部位指向性突然変異誘発、およびPCR媒介性の突然変異誘発によって導入され得る。

【0090】

本発明のポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸残基で、例えば、必須または非必須アミノ酸残基で、保存的アミノ酸置換を含んでもよい。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で定義されており、これには塩基性の側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性の側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、β分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。従って、ポリペプチド中の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換されてもよい。別の実施形態では、アミノ酸のストリングを、構造的に同様のストリング(順序および/または側鎖ファミリーメンバーの組成が異なる)で置換してもよい。あるいは、別の実施形態では、変異体は、飽和突然変異誘発などによってコード配列の全てまたは一部にそって無作為に導入されてもよいし、得られた変異体は、本発明のポリペプチドに導入されてもよいし、それらが所望の標的に結合する能力についてスクリーニングされてもよい。

【0091】

ポリペプチドの状況では、「直鎖状配列」または「配列」とは、アミノからカルボキシル末端方向における、ポリペプチド中のアミノ酸の順序であり、ここでは配列中でお互いと隣接する残基は、このポリペプチドの一次構造中で連続する。

【0092】

本明細書において用いる場合、「連結される」、「融合される」、または「融合」という用語は、ペプチド結合(例えば、遺伝子融合)、化学的結合または他の手段を介した連結を指す。例えば、分子または部分が連結され得る1つの方法は、ペプチド結合を介して分子または部分を連結するポリペプチドリinkerを使用する。「遺伝子的に融合される」、「遺伝子的に連結される」または「遺伝子的融合」は、交換可能に用いられ、2つ以上のタンパク質、ポリペプチド、またはそれらのフラグメントの、それらの個々のペプチド骨格を介した、これらのタンパク質、ポリペプチドまたはフラグメントをコードする単一のポリヌクレオチド分子の遺伝子発現を通じた、同一線上の、共有結合、または結合を指す。このような遺伝子的融合は、単一の連続の遺伝子的配列の発現を生じる。好ましい遺伝子的融合は、インフレームであり、すなわち、2つ以上のオープンリーディングフレーム(ORF)が融合されて、連続するより長いORFが、もとのORFの正確なオープンリーディングフレームを維持する方式で形成される。従って、得られた組み換え融合タンパク質は、もとのORFによってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のタンパク質セグメントを含む単一のポリペプチドである(このセグメントは、正常には、自然にはそのように連結されない)。この場合、この単一のポリペプチドは、プロセシングの間に切断されて、2つのポリペプチド鎖を含む二量体分子が生じる。

【0093】

本明細書において用いる場合、「Fc領域」という用語は、天然の免疫グロブリンのF

10

20

30

40

50

c 領域に対応するポリペプチドの一部（すなわち、その 2 つの重鎖のそれぞれの F c ドメインの二量体会合によって形成されるような）として定義される。天然の F c 領域は、ホモ二量体であり、2 つのポリペプチド鎖を含む。対照的に「遺伝子的に融合される F c 領域」または「単鎖 F c 領域」（s c F c 領域）という用語は、本明細書において用いる場合、単一ポリペプチド鎖内で遺伝子的に連結される（すなわち、単一の連続の遺伝子配列でコードされる）F c ドメインからなる合成の二量体 F c 領域を指す。

【0094】

本明細書において用いる場合、「F c ドメイン」という用語は、パパイン切断部位のすぐ上流のヒンジ領域で始まり（すなわち、重鎖定常領域の第一の残基を 114 として、IgG の残基 216）、抗体の C 末端で終わる、単一の免疫グロブリン重鎖の一部を指す。従って、完全 F c ドメインは、少なくともヒンジドメイン、CH2 ドメイン、および CH3 ドメインを含む。

【0095】

本明細書において用いる場合、「F c ドメイン部分」または「F c 部分」という用語は、F c ドメインのアミノ酸配列を含むか、または F c ドメイン由来である。特定の実施形態では、F c 部分は、以下の少なくとも 1 つを含む：ヒンジ（例えば、上、中および／または下のヒンジ領域）ドメイン、CH2 ドメイン、CH3 ドメイン、CH4 ドメイン、または改変体、一部、またはそのフラグメント。他の実施形態では、F c 部分は、完全 F c ドメイン（すなわち、ヒンジドメイン、CH2 ドメイン、および CH3 ドメイン）を含む。一実施形態では、F c 部分は、CH3 ドメイン（またはその一部）に融合されたヒンジドメイン（またはその一部）を含む。別の実施形態では、F c 部分は、CH3 ドメイン（またはその一部）に融合された CH2 ドメイン（またはその一部）を含む。別の実施形態では、F c 部分は、CH3 ドメインまたはその一部からなる。別の実施形態では、F c 部分は、ヒンジドメイン（またはその一部）および CH3 ドメイン（またはその一部）からなる。別の実施形態では、F c 部分は、CH2 ドメイン（またはその一部）および CH3 ドメインからなる。別の実施形態では、F c 部分は、ヒンジドメイン（またはその一部）および CH2 ドメイン（またはその一部）からなる。一実施形態では、F c 部分は、CH2 ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2 ドメインの全てまたは一部）を欠く。

【0096】

本明細書において用いる場合、「半減期」という用語は、インビボにおける特定のポリペプチドの生物学的半減期を指す。半減期は、被験体に投与された量の半分がその動物の循環および／または他の組織から除去されるのに必要な時間で示され得る。所定のポリペプチドのクリアランス曲線が、時間の関数として構築される場合、その曲線は通常は、急性の α 相とより長い β 相との二相性である。この α 相は典型的には、血管内腔と血管外腔との間の投与された F c ポリペプチドの平衡に相当し、そして部分的にはポリペプチドのサイズによって決定される。この β 相は典型的には、血管内腔のポリペプチドの代謝に相当する。従って、好ましい実施形態では、本明細書において用いられる半減期という用語は、 β 相のポリペプチドの半減期を指す。ヒトにおけるヒト抗体の代表的な β 相半減期は 21 日である。

【0097】

本明細書において用いる場合、「部分」という用語は、キメラポリペプチドの区画部分または構成要素を指す。

【0098】

本明細書において用いる場合、「標的化部分」という用語は、所望部位または細胞に対して本発明のポリペプチドを局在するかまたは指向する、分子、そのフラグメントまたはポリペプチドの成分を指す。一実施形態では、本発明の構築物は、例えば、所望の部位に対して分子を局在化することによって、ポリペプチドの活性を増強する「標的化部分」を含む。このような部分は、例えば、抗体またはその改変体（例えば、および s c F v）またはペプチドであってもよい。別の実施形態では、このような標的部分は、ポリペプチド、リガンドのレセプター結合部分、またはレセプターのリガンド結合部分（本発明のポリ

10

20

30

40

50

ペプチドに連結されて、例えば、細胞または組織の上で、所望の標的に結合する）であってもよい。この標的部分は、構築物に対して遺伝子的に融合されてもよく、構築物に対して結合体化されてもよく、またはスパーサーを介して構築物に連結されてもよい。例えば、標的化部分、標的部分と、構築物のFc部分との間の結合の形成によって本発明の構築物に結合されてもよく、ここでこの標的化部分、第一の官能基を含み、そしてFc部分は、第二の官能基を含み、ここでこの第一および第二の官能基は、お互いと反応して、化学結合を形成し得る（例えば、米国特許第7381408号を参照のこと）。一実施形態では、標的部分は、血小板に結合する。例示的な標的化部分、下にさらに詳細に記載される。

【0099】

一実施形態では、本発明の構築物における使用のための標的部分は、抗体改変体を含む。「抗体改変体」または「改変された抗体」という用語は、天然には存在せず、アミノ酸配列またはアミノ酸側鎖化学（本明細書に記載されるような、天然に由来する抗体のものとは少なくとも1つのアミノ酸またはアミノ酸改変で異なる）を有する抗体を包含する。本明細書において用いる場合、「抗体改変体」という用語は、それが天然には存在しないように変更されている抗体の合成型、例えば、少なくとも2つの重鎖部分を含むが、2つの完全な重鎖は含まない抗体（例えば、ドメイン欠失抗体またはミニボディ）；2つ以上の異なる抗原または単抗原上の異なるエпитープに結合するように変更された多特異性型の抗体（例えば、二重特異性、三重特異性など）；scFv分子に接合する重鎖分子；一本鎖抗体；ジアボディ；トリアボディ；ならびに変化したエフェクター機能を有する抗体などを包含する。

【0100】

本明細書において用いる場合「scFv分子」という用語は、1つの軽鎖可変ドメイン（VL）、またはその一部、および1つの重鎖可変ドメイン（VH）、またはその一部からなる結合分子を含み、ここで、各々の可変ドメイン（またはその一部）は、同じまたは異なる抗体に由来する。scFv分子は、好ましくは、VHドメインとVLドメインとの間に差し込まれるscFvリンカーを含む。ScFv分子は、当該分野で周知であり、例えば、米国特許第5,892,019号、Hörら、1989. Gene 77:51、Birdら、1988 Science 242:423、Pantolianoら、1991. Biochemistry 30:10117、Milenicら、1991. Cancer Research 51:6363、Takkinenら、1991. Protein Engineering 4:837において記載される。

【0101】

本明細書において用いられる「scFvリンカー」とは、scFvのVLとVHドメインとの間に差し込まれる部分を指す。scFvリンカーは、好ましくは、抗原結合の高次構造においてscFv分子を維持する。一実施形態においては、scFvリンカーは、scFvリンカーペプチドを含むか、またはそれからなる。特定の実施形態においては、scFvリンカーペプチドは、gly-serポリペプチドリリンカーを含むか、またはそれからなる。他の実施形態においては、scFvリンカーは、ジスルフィド結合を含む。

【0102】

「グリコシル化」という用語は、ポリペプチドに対する1つ以上の炭水化物の共有結合を指す。代表的には、グリコシル化は、細胞の細胞内環境またはそれからの抽出物内で生じ得る翻訳後事象である。グリコシル化という用語は、例えば、N-連結グリコシル化（ここでは1つ以上の糖がアスパラギン残基に連結される）および/またはO-連結グリコシル化（ここでは1つ以上の糖がヒドロキシル基を有するアミノ酸残基（例えば、セリンまたはトレオニン）に連結される）を包含する。一実施形態では、本発明の分子はグリコシル化される。別の実施形態では、本発明の分子は、非グリコシル化されている（aglycosylated）。さらに別の実施形態では、本発明の分子は、野性型Fc領域におけるグリコシル化と比較してグリコシル化が低下している。

【0103】

本明細書において用いられる「ジスルフィド結合」という用語は、2つの硫黄原子の間に形成される共有結合を包含する。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成し得るか、第2のチオール基と架橋し得るチオール基を含む。大半の天然に存在するIgG分子では、CH1およびCL領域は、天然ジスルフィド結合によって結合され、2つの重鎖は、Kabattのナンバリングシステムを用いて239および242（EUNanバリングシステムでは位置226または229）に対応する位置で2つの天然ジスルフィド結合によって結合される。

【0104】

「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、所望のポリヌクレオチドを細胞に導入して発現するためのビヒクルとして、本発明に従って用いられるベクターを意味する。当業者に公知のように、そのようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス、およびレトロウイルスからなる群から容易に選択することができる。一般的に、本発明に適合するベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングを容易にする適切な制限部位、ならびに真核または原核細胞に進入および／または複製する能力を含む。

【0105】

本発明のキメラの凝固因子を産生するために、多数の発現ベクター系を使用してもよい。例えば、ベクターの1つのクラスは、ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクチニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（RSV、MMTVまたはMOMLV）、またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNAエレメントを利用する。さらに、染色体内にDNAを組み込まれた細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択され得る。このマーカーは、栄養要求性宿主への原栄養性、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質）、または銅などの重金属に対する耐性を提供し得る。選択性のマーカー遺伝子は、発現されるべきDNA配列に直接結合されてもよいし、または同時形質転換によって同じ細胞に導入されてもよい。一実施形態においては、誘導性発現系を使用してもよい。付加的エレメントも、mRNAの最適な合成に必要となる場合がある。これらのエレメントは、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終止シグナルを含んでもよい。一実施形態においては、分泌シグナル、例えば、幾つかのよく特徴付けられた細菌性リーダーペプチド（例えば、pelB、phoA、またはompA）のいずれか1つが、ポリペプチドの最適な分泌を得るために、本発明のポリペプチドのN末端とインフレイムで融合されてもよい（Leiら、（1988）、Nature, 331:543、Betterら、（1988）Science, 240:1041、Mullinaxら、（1990）。PNAS, 87:8095）。

【0106】

「宿主細胞」という用語は、組み換えDNA技術を用いて構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードするベクターによって形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からのタンパク質の単離のためのプロセスの説明において、「細胞」および「細胞培養」という用語は、他に明確に特定されない限り、同義的に使用され、タンパク質源を意味する。言い換えれば、「細胞」からのタンパク質の回収は、スピンドウンした全細胞、または培地および懸濁された細胞の両方を含有する細胞培養からのいずれかを意味し得る。タンパク質発現のために用いられる宿主細胞株は、最も好ましくは、哺乳動物由来のものであり；当業者は、その中で発現される所望の遺伝子産物に対して最も適切な特定の宿主細胞株を優先的に判定する能力を有すると考えられる。例示的な宿主細胞株としては、限定するものではないが、DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣株、DHFRマイナス）、HELA（ヒト子宮頸癌）、CVI（サル腎臓株）、COS（SV40T抗原を有するCVIの誘導体）、R1610（チャイニーズハムスター線維芽細胞）BALBC/3T3（マウス線維芽細胞）、PerC6細胞）、HAK（ハムスター腎臓株）、SP2/O（マウス骨髓腫）、P3x63-Ag3.653（マウス骨髓腫）、BFA-1c1BPT（ウシ内皮細胞）、RAJI（ヒトリンパ球）、および293（ヒト腎臓）が挙げられる。宿主細胞株は、通常、商業サービスであるAmerican Tissue

e Culture Collection、または既刊の文献から入手可能である。本発明のポリペプチドは、細菌もしくは酵母などの非哺乳動物細胞、または植物細胞においても発現することができる。この点において、細菌のような様々な単細胞性非哺乳動物微生物；すなわち、培養または発酵において増殖できる微生物も形質転換することができることが理解される。形質転換を起こしやすい細菌としては、腸内細菌科のメンバー、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) またはサルモネラ属の株；*Bacillus subtilis* のようなバシラス科；肺炎球菌；連鎖球菌、およびインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) が挙げられる。細菌において発現される場合、ポリペプチドは、通常、封入体の一部となることがさらに認識される。ポリペプチドは、単離、精製され、その後、機能分子に組み立てられなければならない。

10

【0107】

原核生物に加えて、真核微生物を用いてもよい。*Saccharomyces cerevisiae*、すなわち一般的なパン酵母は、真核微生物の間で最も一般的に用いられるが、*Pichia pastoris* を含む、多数の他の株が、一般に入手可能である。サッカロミセス属における発現のために、例えば、プラスミド YRp7 (*Stinchcomb* ら、(1979), *Nature*, 282:39、*Kingsman* ら、(1979), *Gene*, 7:141、*Tschemper* ら、(1980), *Gene*, 10:157) が、一般的に用いられる。このプラスミドは、例えば、ATCC 番号 44076 または PEP4-1 (*Jones*, (1977), *Genetics*, 85:12) などの、トリプトファンにおいて成長する能力を欠いている酵母の変異株に対する選択マーカーを提供する TRP1 遺伝子を既に含んでいる。そのため、酵母宿主細胞ゲノムの特性としての *trp1* 損傷の存在は、トリプトファンの非存在下における増殖による形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。

20

【0108】

本明細書において用いる場合、「内因性(の)」という用語は、細胞中に天然に存在する分子(例えば、核酸および／またはタンパク質分子)を指す。対照的に、「外因性(の)」または「異種(の)」という用語は、所定の状況、例えば細胞中、またはポリペプチド中で通常には見出されない、このような分子を指す。例えば、外因性または異種の分子は、例えば、トランスフェクションもしくは他の形態の遺伝子操作によって、細胞内に導入されて、細胞の操作後にのみ存在してもよいし、または異種アミノ酸配列は、それが天然には見いだされないタンパク質中に存在ししてもよい。

30

【0109】

本明細書において用いる場合、「切断部位」または「酵素的切断部位」という用語は、酵素によって認識される部位を指す。特定の酵素的切断部位は、細胞内プロセッシング部位を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、凝固カスケードの間に活性化される酵素によって切断される酵素的切断部位を有し、その結果このような部位の切断が血栓形成の部位で生じる。例示的なこのような部位としては、例えば、トロンビン、第 XIa 因子または第 Xa 因子によって認識される部位が挙げられる。例示的な FXIa 切断部位としては、例えば、TQSFNDFTR および SVSQTSKLTTR が挙げられる。例示的なトロンビン切断部位としては、例えば、DFLAEGGGVR、TTKIKPR、LVPRG 配列番号 35) および ALRPR が挙げられる。他の酵素的切断部位は当該分野で公知である。

40

【0110】

本明細書において用いる場合、「プロセッシング部位」または「細胞内プロセッシング部位」という用語は、ポリペプチドの翻訳後に機能する酵素のための標的であるポリペプチド中のある種の酵素的切断部位を指す。一実施形態では、このような酵素は、ゴルジのルーメンからトランスゴルジ区画への輸送の間に機能する。細胞内プロセッシング酵素は、細胞からのタンパク質の分泌の前にポリペプチドを切断する。このようなプロセッシング部位の例としては、例えば、エンドペプチダーゼの PACE/フリン(ここで PACE は、対の

50

塩基性アミノ酸切断酵素 (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme) についての頭文字である) ファミリーによって標的される部位が挙げられる。これらの酵素は、ゴルジ膜に局在し、配列モチーフ Arg- [任意の残基] - (Lys または Arg) - Arg のカルボキシ末端側でタンパク質を切断する。本明細書において用いる場合、酵素の「フリン」ファミリーとしては、例えば、フリン、PC2、PC1/PC3、PC4、PACE4、PC5/PC6、および LPC/PC7/PC8/SPC7 が挙げられる。他のプロセッシング部位は当該分野で公知である。

【0111】

2つ以上のプロセッシング部位または切断部位を備える構築物では、このような部位は同じであっても異なってもよいことが理解される。

10

【0112】

インビトロの産生によって、本発明の所望の変更されたポリペプチドを大規模化して大量に生成することが可能になる。組織培養条件下での哺乳動物細胞培養のための技術は、当該分野で公知であり、かつ同種の懸濁培養物を、例えば、エアリフトリアクター中に、もしくは連続スターラーリアクター中に、または固定されるかもしくは取り込まれた細胞培養物を、例えば、中空ファイバー、マイクロカプセル中に、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上に包含する。必要および/または所望の場合、ポリペプチドの溶液は、慣習的なクロマトグラフィー方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、DEAE-セルロース上でのクロマトグラフィー、またはアフィニティークロマトグラフィーによって精製されてもよい。

20

【0113】

本明細書において用いる場合、「ポリペプチドの投与から利益を得る被験体」という句は、例えば、止血を改善するための、本発明のポリペプチドの投与から利益を得る、哺乳動物被験体のような被験体を包含する。

【0114】

「キメラのタンパク質」または「融合タンパク質」とは本明細書において用いる場合、第二の供給源由来の第二のアミノ酸配列に対して、共有結合的にまたは非共有結合的に結合された、第一の共有原由来の第一のアミノ酸配列から構成される任意のタンパク質であって、ここでこの第一および第二の供給源は同じではないタンパク質を指す。同じではない第一の供給源および第二の供給源は、2つの異なる生物学的実体、または同じ生物学的実体由来の2つの異なるタンパク質、または生物学的実体および非生物学的実体を包含し得る。キメラのタンパク質は、例えば、少なくとも2つの異なる生物学的供給源由来のタンパク質を含んでもよい。生物学的供給源としては、任意の非合成的に産生された核酸またはアミノ酸配列 (例えば、上記のいずれかの、本明細書にさらに記載されるような、ゲノムまたは cDNA の配列、プラスミドまたはウイルスベクター、天然のビリオンまたは変異体もしくはアナログ) を挙げることができる。合成の供給源としては、化学的に産生され、生物学的な系によるのではない (例えば、アミノ酸配列の固相合成)、タンパク質または核酸の配列を挙げることができる。キメラのタンパク質としてはまた、少なくとも2つの異なる合成の供給源由来のタンパク質、または少なくとも1つの生物学的供給源および少なくとも1つの合成の供給源由来のタンパク質を挙げることでもできる。キメラのタンパク質はまた、任意の供給源由来、または任意の供給源由来の低分子の有機もしくは無機の分子由来の、核酸に対して共有結合されるかまたは非共有結合された、第一の供給源由来の第一のアミノ酸配列を含んでもよい。このキメラのタンパク質は、第一と第二のアミノ酸配列の間、または第一のアミノ酸配列と核酸との間、または第一のアミノ酸配列と低分子の有機または無機の分子との間にリンカー分子を含んでもよい。

30

40

【0115】

本明細書において用いる場合、「凝固因子」という用語は、天然に存在するかまたは組み換え産生され、被験体における出血エピソードの期間を防止するかまたは減少する、分子またはそのアナログを指す。言い換えれば、これは、凝固促進活性を有する分子である

50

、すなわち、フィブリノーゲンの不溶性フィブリンのメッシュ（血液を凝固または凝血させる）への変換を担うことを意味する。

【0116】

凝固活性とは、本明細書において用いる場合、フィブリン塊の形成において頂点に達するか、および／または出血もしくは放血のエピソードの重篤度、期間もしくは頻度を低減する生化学的反応のカスケードに参与する能力を意味する。

【0117】

止血とは、本明細書において用いる場合、放血もしくは出血の停止もしくは緩徐化；または血管もしくは体部を通じた血流の停止もしくは緩徐化を意味する。

【0118】

止血障害とは、本明細書において用いる場合、フィブリン塊を形成する能力の障害または不全に起因して、自発性または外傷の結果として、出血傾向によって特徴づけられる遺伝子的に受け継がれるかまたは後天性の状態を意味する。このような障害の例としては、血友病が挙げられる。3つの主な形態とは、血友病A（第V I I I因子欠損）、血友病B（第I X因子欠損または「クリスマス病」）および血友病C（第X I因子欠損、中度の出血傾向）であり、フォン・ヴィレブランド病、第X i因子欠損（P T A欠損）、第X I I因子欠損、フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子、第V I I因子、第X因子または第X I I I因子における欠損または構造的な異常、ベルナルスリエ（Bernard-Soulier）症候群は、G P I bの血管または欠損である。G P I b（v W Fのレセプター）は、欠損性であって、一次的な血栓形成（一次止血）の欠失および出血傾向の増大）、ならびにグランツマン-ネーグリの血小板無力症（グランツマン血小板無力症）をもたらし得る。肝不全（急性型または慢性型）では、肝臓による凝固因子の産生が不十分であり；これは出血のリスクを増大し得る。

【0119】

本発明のキメラの分子は、予防的に用いられてもよい。本明細書において用いる場合、「予防的処置」という用語は、出血エピソードの前の分子の投与を指す。一実施形態では、一般的な止血剤の必要な被験体とは、手術を受けているか、または手術を受けるところである。本発明のキメラのタンパク質は、予防剤として術前に投与されてもまたは術後に投与されてもよい。本発明のキメラのタンパク質は、急性の出血エピソードを管理するために術中または術後に投与され得る。手術としては、限定するものではないが、肝移植、肝切除、または幹細胞移植を挙げることができる。

【0120】

オンデマンドの処置としては、出血エピソード、関節血症、筋出血、口腔出血（bleed）、出血（hemorrhage）、筋肉への出血、口腔出血（hemorrhage）、外傷、頭部の外傷（頭部外傷）、胃腸出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系出血、咽頭後隙出血、後腹膜腔出血、または腸腰筋鞘の出血のための処置が挙げられる。この被験体は、外科的な予防、周術期管理、または手術の処置の必要がある場合がある。このような手術としては、例えば、小手術、大手術、抜歯、扁桃摘出術、鼠径ヘルニア切除術、骨膜切除術、人工膝関節置換術、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が挙げられる。

【0121】

本明細書において用いる場合「急性出血」という用語は、背景にある原因にかかわらず出血エピソードを指す。例えば、被験体は、外傷、尿毒症、遺伝性出血障害（例えば、第V I I I因子欠損）血小板障害、または凝固因子に対する抗体の発達に起因する耐性を有し得る。

【0122】

本明細書に用いられる処置する、処置、処置することとは、例えば、ある疾患または状態の重篤度の軽減；ある疾患経過の期間の減少；ある疾患または状態に関連する1つ以上の症状の寛解；ある疾患または状態を有する被験体に対する有益な効果の提供（この疾患または状態を治癒する必要がない）、ある疾患または状態に関連する1つ以上の症状の予

10

20

30

40

50

防を指す。

【0123】

11. 凝固因子

詳細には、本発明は、第V I I因子、第I X因子、および第X因子の改善バージョンに関する。これらの因子は全てが、軽鎖のアミノ末端が各々、追加部分の組み込みを受け入れられないという点で構造的に関連している。同様に、これらの3つの凝固因子の重鎖のアミノ末端部分は、切断可能な部分（すなわち、切断部分を介して連結される部分または切断部位からなる部分）以外は、追加部分の組み込みを受け入れられない。本発明のキメラの凝固因子構築物は、これらの共有される特性に基づいて命名され、第V I I因子は、本発明の例示的な実施形態を例示するために示されることが多いが、本発明の構築物は、第V I I因子、第I X因子、または第X因子を用いて作製され得ることが理解される。例えば、当業者は、本発明の構築物のF V I I部分が、F V I I I、F I XまたはF X部分で置換されて、これらの凝固因子のうちの1つの増強バージョンを作製できることを理解する。

10

【0124】

本発明の例示的なキメラの凝固因子構築物は、添付の図面に示される。この図は一般に、凝固因子を単鎖として（そのチモーゲン型で）図示するが、この凝固因子はまた、本発明の構築物中でその活性型、例えば、二本鎖のジスルフィド結合型として存在してもよいことが理解される。

【0125】

一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、細胞によって活性型で発現される。別の実施形態では、キメラの凝固因子は不活性型で発現され、引き続き、インビトロで適切な条件下で活性化され、その結果この凝固因子の活性型が、この構築物中に存在する。別の実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、凝固因子を不活性型で含み、そしてこの凝固因子は、投与後にインビボで活性化される。

20

【0126】

一実施形態では、s c F c足場は、活性型の分子を産生するために用いられ得る。特定の凝固因子は、組み換え的にチモーゲンとして産生され、従って、製造の間に活性化を要する。活性型の第V I I因子、第I X因子、および第X因子は、重鎖および軽鎖がジスルフィド結合によってのみ連結されている二量体分子から構成される。

30

【0127】

一実施形態では、キメラの凝固因子は、止血を改善するために被験体への投与前に活性化される。凝固因子を活性化するための方法は当該分野で公知である。例えば、一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、約5 mMの濃度でC a C l₂を含有する培地と接触させられる。

【0128】

別の実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、それを発現する細胞によって活性型で分泌される。一実施形態では、活性なキメラの凝固因子は、凝固因子の重鎖および軽鎖を別々のポリペプチドとして発現することによって作製される。

【0129】

別の実施形態では、凝固因子の重鎖のN末端は、分泌経路で後期まで（すなわち、トランスゴルジネットワークにおける活性なプロセシング酵素とタンパク質が共局在化するまで）、合成の間の凝固因子の活性化を遅らせる細胞内プロセシング部位を含むように改変されて、より大きい生産性をもたらす。例示的なこのような細胞内プロセシング部位としては、フリリンによって認識される部位が挙げられる。このファミリーの酵素のための例示的な切断部位としては、モチーフA r g - X a a - L y s / A r g - A r gを含むアミノ酸配列が挙げられる。

40

【0130】

好ましい実施形態では、本発明の活性な構築物は、例えば、s c F cリンカー（例えば、c s c f cリンカー）を用いて、F c融合タンパク質の状況で作製される。

50

【0131】

例示的な構築物は、添付の図面に示される。

【0132】

一実施形態では、本発明は、プロセシングされた（例えば、成熟）ポリペプチドであって、s c F c ポリペプチドリンカーに隣接する少なくとも1つの切断部位が切断され、その結果、その分子がもはや単一のポリペプチド鎖ではなく、その結果、このポリペプチドが、少なくとも2つのポリペプチド鎖から構成される（酵素的切断部位（単数または複数）P1および／またはP2での切断に起因する）、ポリペプチドに関する。

【0133】

一実施形態では、このようなプロセシングされたポリペプチドは、ポリペプチドリンカーの切断後に遊離のアミノ末端を有する第二のF c 部分（すなわち、ポリペプチドリンカーの切断の前にアミノ末端からカルボキシ末端をカウントしたとき、第二のF c 部分）に連結された凝固因子またはその一部を含む。

【0134】

一実施形態では、第二のF c 部分のN末端に結合された凝固因子は、触媒的に活性であり、例えば、酵素活性を有する。別の実施形態では、第二のF c 部分のN末端に結合された凝固因子は、細胞によってチモーゲンとして分泌されて、この凝固因子が完全に活性化されるためのさらなる酵素的プロセシングを必要とする。

【0135】

一実施形態では、本発明は、プロセシングの間、さらなる活性化の必要のない、細胞から活性型または活性化型で分泌される凝固因子に関する。例えば、第V I I 因子は一般に、組み換え的にチモーゲンとして産生され、投与のための活性型を産生するために製造の間の活性化を必要とする。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、製造可能性を改善するためにそれが活性型で発現される細胞から分泌される。下にさらに詳細に示すとおり、このような凝固因子は、c s c F c リンカーを含んでいるs c F c 分子の状況では凝固因子の軽鎖およびこの凝固の重鎖を別々に発現することによって産生され得る。このような構築物の活性化は、トランスゴルジ装置において活性なプロセシング酵素とタンパク質が共存するとき例えば、プロセシングの間の分泌経路で後期まで遅らせられる。

【0136】

一実施形態では、本発明の凝固因子は、第V I I 因子の成熟型またはその改変体である。第V I I 因子（F V I I、F7；第7因子、凝血第V I I 因子、血清第V I I 因子、血清プロトロンビン変換加速因子、S P C A、プロコンバーチンおよびエプタコグアルファとも呼ばれる）は、凝血カスケードの一部であるセリンプロテアーゼである。F V I I は、G l a ドメイン、2つのE G F ドメイン（E G F - 1 およびE G F - 2）、およびセリンプロテアーゼドメイン（またはペプチダーゼS1ドメイン）（例えば、キモトリプシンのような、セリンプロテアーゼのペプチダーゼS1ファミリーの全てのメンバーの間で高度に保存されている）を含む。F V I I は、単鎖チモーゲン、活性化されたチモーゲン様の二本鎖のポリペプチドおよび完全に活性化された二本鎖型として存在する。本明細書において用いる場合、「チモーゲン様」タンパク質またはポリペプチドとは、タンパク質分解性切断によって活性化されたが、依然として、チモーゲンに関連する特性、例えば、低い活性もしくは不活性、またはタンパク質のチモーゲン型の高次構造を模倣する高次構造などを呈するタンパク質を指す。例えば、組織因子に結合されない場合、F V I I のこの二本鎖の活性化型は、チモーゲン様タンパク質である；これは、非切断のF V I I チモーゲンと類似の高次構造を保持し、従って、極めて低い活性を呈する。組織因子に対する結合の際、F V I I のこの二本鎖の活性化型は、高次構造の変化を受け、凝固因子としてその完全活性を獲得する。

【0137】

例示的なF V I I 改変体としては、比活性が増大した改変体、例えば、その酵素活性（K c a t またはK m）を増大することによってF V I I の活性を増大する変異体が挙げられる。このような改変体は、当該分野で記載されており、これには、例えば、P e r s s

10

20

30

40

50

onら、2001. PNAS 98:13583; Petrovan and Ruf, 2001. J. Biol. Chem. 276:6616; Perssonら、2001 J. Biol. Chem. 276:29195; Soejimaら、2001. J. Biol. Chem. 276:17229; Soejimaら、2002. J. Biol. Chem. 247:49027に記載されるような分子の変異体型が挙げられる。一実施形態では、FVIIの改変体は、変異体を含み、例示的な変異としては、V158D-E296V-M298Qが挙げられる。別の実施形態では、FVIIの改変体型としては、FVII成熟配列からのアミノ酸608-619 (LQQSRKVGDS PN, 170ループに対応する) のトリプシンの170ループ由来のアミノ酸EASYPGKでの置換が挙げられる。FIXの高い比活性の改変体も当該分野で公知である。例えば、Simionniら、(2009 N. E. Journal of Medicine 361:1671)は、R338L変異体を記載する。Changら、(1988 JBC 273:12089)およびPierriら、(2009 ヒトGene Therapy 20:479)は、R338A変異体を記載する。他の変異体は、当該分野で公知であり、そして例えば、ZoggおよびBrandstetter, 2009 Structure 17:1669; Sichlerら、2003. J. Biol. Chem. 278:4121; ならびにSturzebecherら、1997. FEBS Lett 412:295に記載されるものが挙げられる。これらの引用文献の内容は、参照によって本明細書に援用される。

10

【0138】

20

チモーゲン様形態からの高次構造変化の際に生じる完全活性は、その補因子に対する結合の際に組織因子を生じる。また、組織因子の非存在下における高次構造変化を生じる変異も導入され得る。従って、FVIIaという言葉及には、その二本鎖型、チモーゲン様型、および完全活性化された二本鎖型を包含する。

【0139】

一実施形態では、本発明の凝固因子は、第VII因子またはその改変体の成熟型である。FVIIは、血液凝固の内因性経路において、カルシウムイオンの存在下で、負に荷電されたリン脂質表面上に存在する反応である、第IXa因子による第X因子の活性化を加速する補因子として機能する。FVIIは、ドメイン構造A1-A2-B-A3-C1-C2を有する2351のアミノ酸単鎖ポリペプチドとして合成される。Wehar, G. A. ら、Nature 312:337-342 (1984)およびToole, J. J. ら、Nature 312:342-347 (1984)。FVIIのドメイン構造は、相同な凝固因子、第V因子(FV)のドメイン構造と同一である。Kane, W. H. ら、PNAS (USA) 83:6800-6804 (1986)およびJenny, R. J. ら、PNAS (USA) 84:4846-4850 (1987)。The FVII Aドメインは、330アミノ酸であり、かつお互いと、ならびにFVのAドメインおよび血漿銅結合タンパク質セルプラスミンに対して40%のアミノ酸同一性を有する。Takahashi, N. ら、PNAS (USA) 81:390-394 (1984)。各々のCドメインは、150アミノ酸であり、かつFVのCドメインに対して、ならびに複合糖質および負に荷電されたリン脂質に結合するタンパク質に対して40%の同一性を呈する。Stubbs, J. D. ら、PNAS (USA) 87:8417-8421 (1990)。FVII Bドメインは、単一のエキソンによってコードされて、FV Bドメインを含んでいる任意の公知のタンパク質に対してわずかな相同性を示す。Gitschier, J. ら、Nature 312:326-330 (1984) and Cripe, L. D. ら、Biochemistry 31:3777-3785 (1992)。

30

40

【0140】

FVIIは、A1ドメインとA3ドメインとの間の非共有結合の二価金属イオン結合を通じて会合される重鎖(ドメインA1-A2-B)および軽鎖(ドメインA3-C1-C2)のヘテロ二量体として血漿中に分泌される。血漿中では、FVIIは、フォン・

50

ヴィレブランド因子に対する結合によって安定化される。さらに詳細には、F V I I I 軽鎖は、フォン・ヴィレブランド因子のアミノ末端における一次結合部位に対して非共有結合的相互作用によって結合される。トロンビンによるタンパク質分解性活性の際、F V I I I は、2つの重鎖フラグメント（A 1、50 k D a フラグメント、および A 2、43 k D a フラグメント）および軽鎖（A 3-C 1-C 2、73 k D a 鎖）のヘテロ二量体へ活性化される。従って、F V I I I の活性型（F V I I I a）は、トロンビン切断された A 3-C 1-C 2 軽鎖に対する二価金属イオン連結を通じて会合された A 1 サブユニット、およびイオン会合を通じて A 1 ドメインと会合された遊離 A 2 サブユニットからなる。E a t o n, D. ら、B i o c h e m i s t r y 25:505 (1986); L o l l a r, P. ら、J. B i o l. C h e m. 266:12481 (1991); および F a y, P. J. ら、J. B i o l. C h e m. 266:8957 (1991)。この F V I I I a ヘテロ二量体は、不安定であり、かつ生理学的条件下で A 2 サブユニットの解離を通じて急速な不活性化を受ける。

【0141】

一実施形態では、凝固因子は、第 V I I I 因子の B ドメイン欠失バージョンを含む。第 V I I I 因子の「B ドメイン」とは、本明細書において用いる場合、内部のアミノ酸配列同一性およびタンパク質分解性切断の部位によって規定される当該分野で公知の B ドメインと同じである（例えば、全長ヒト第 V I I I 因子の残基 S e r 741-A r g 1648）。他のヒト第 V I I I 因子ドメインは、以下のアミノ酸残基によって定義される：A 1、残基 A l a 1-A r g 372；A 2、残基 S e r 373-A r g 740；A 3、残基 S e r 1690-A s n 2019；C 1、残基 L y s 2020-A s n 2172；C 2、残基 S e r 2173-T y r 2332。A 3-C 1-C 2 配列は、残基 S e r 1690-T y r 2332 を含む。残りの配列、残基 G l u 1649-A r g 1689 は、通常は、a 3 酸性領域と呼ばれる。全ドメイン（ブタ、マウスおよびイヌの第 V I I I 因子についての B ドメインを含む）に関する境界の位置もまた当該分野で公知である。一実施形態では、第 V I I I 因子の B ドメインは欠失される（「B ドメイン-欠失第 V I I I 因子」または「B D D F V I I I」）。B D D F V I I I の例は、当該分野で公知の R E F A C T O（登録商標）（S 743/Q 1638 融合を有する組み換え B D D F V I I I）である。

【0142】

「B ドメイン-欠失第 V I I I 因子」は、その各々がその全体として参照によって本明細書に援用される、米国特許第 6, 316, 226 号、同第 6, 346, 513 号、同第 7, 041, 635 号、同第 5, 789, 203 号、同第 6, 060, 447 号、同第 5, 595, 886 号、同第 6, 228, 620 号、同第 5, 972, 885 号、同第 6, 048, 720 号、同第 5, 543, 502 号、同第 5, 610, 278 号、同第 5, 171, 844 号、同第 5, 112, 950 号、同第 4, 868, 112 号、および同第 6, 458, 563 号に開示される全欠失または部分欠失を有する場合がある。いくつかの実施形態では、本発明の B ドメイン欠失の第 V I I I 因子配列は、米国特許第 6, 316, 226 号（また米国特許第 6, 346, 513 号にも）の第 4 欄、第 4 行～第 5 欄の 28 行および実施例 1～5 に開示される欠失のいずれか 1 つを含む。別の実施形態では、B ドメイン欠失の第 V I I I 因子は、S 743/Q 1638 B ドメイン欠失の第 V I I I 因子（S Q バージョンの第 V I I I 因子）（例えば、アミノ酸 744～アミノ酸 1637 の欠失の第 V I I I 因子、例えば、配列番号 6、すなわち配列番号 2 のアミノ酸 1-743 およびアミノ酸 1638-2332 を有する第 V I I I 因子）である。いくつかの実施形態では、本発明の B ドメイン欠失の第 V I I I 因子は、米国特許第 5, 789, 203 号（また米国特許第 6, 060, 447 号、米国特許第 5, 595, 886 号、および米国特許第 6, 228, 620 号も）の第 2 欄 26～51 行および実施例 5～8 に開示される欠失を有する。いくつかの実施形態では、B ドメイン欠失の第 V I I I 因子は、米国特許第 5, 972, 885 の第 1 欄の 25 行～第 2 欄の 40 行；米国特許第 6, 048, 720 号の第 6 欄、行 1-22 および実施例 1；米国特許第 5, 543, 502

号の第2欄、行17-46；米国特許第5, 171, 844号の第4欄、行22～第5欄、行36；米国特許第5, 112, 950号の第2欄、行55～68、図2、および実施例1；米国特許第4, 868, 112号の第2欄、行2～第19欄、行21および表2；米国特許第7, 041, 635号の第2欄、行1～第3欄、行19、第3欄、行40～第4欄、行67、第7欄、行43～第8欄、行26、および第11欄、行5～第13欄、行39；または米国特許第6, 458, 563号の第4欄、行25～53に記載の欠失を有する。いくつかの実施形態では、Bドメイン欠失の第V I I I因子は、ほとんどのBドメインが欠失しているが、その全体が参照によって本明細書に援用される、WO91/09122に開示されるように、2つのポリペプチド鎖中への一次翻訳産物のインビボでのタンパク質分解性プロセッシングに必須である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では、Bドメイン欠失の第V I I I因子は、アミノ酸747-1638の欠失、すなわち、事実上Bドメインの完全アミノ酸欠失で構築されている。Hoeben R. C., ら. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990) は、その全体が参照によって本明細書に援用される。A Bドメイン欠失の第V I I I因子はまた、第V I I I因子のアミノ酸771～1666またはアミノ酸868～1562の欠失を含んでもよい。Meulien P., ら. Protein Eng. 2 (4): 301-6 (1988) は、その全体が参照によって本明細書に援用される。本発明の一部である追加のBドメイン欠失としては以下が挙げられる：アミノ酸982～1562または760～1639の欠失 (Toole ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1986) 83, 5939-5942)、797-1562の欠失 (Eaton, ら、Biochemistry (1986) 25: 8343-8347)、741～1646の欠失 (Kaufman (国際公開WO87/04187))、747-1560の欠失 (Sarver, ら、DNA (1987) 6: 553-564)、741～1648の欠失 (Pasek (PCT application No. 88/00831))、または816～1598もしくは741～1648の欠失 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No. 82: 16-25, 欧州特許第295597号)) (その各々は、その全体が参照によって本明細書に援用される)。前述の欠失の各々は、任意の第V I I I因子配列で作製され得る。一実施形態では、本発明は、F V I I Iの標的化バージョンであって、ここで標的化は (i) 血小板に特異的に結合し、(i i) 凝固因子の軽鎖と重鎖との間に差し込まれず、かつここでこのキメラの凝固因子は、少なくとも1つの標的化部分を欠いている適切なコントロールと比較して血小板の存在下でトロンビンの生成の増大を示す、標的化バージョンに関する。

【0143】

一実施形態では、本発明の凝固因子は、第IX因子の成熟型またはその改変体である。第IX因子は、415個のアミノ酸の単鎖血漿チモーゲンとして循環する (A. Vysotschin ら、J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993))。FIXのチモーゲンは、FXIaによって、または組織因子/FVIIa複合体によって活性化される。アルギニン-アラニン145-146とアルギニン-バリン180-181との間の特定の切断によって、システイン132とシステイン289との間の単一のジスルフィド結合によって連結される軽鎖および重鎖が生じる (S. Bajaj ら、Biochemistry 22, 4047 (1983))。FIXの構造的な組織化は、ビタミンK依存性の血液凝固タンパク質FVII、FXおよびプロテインCのものと同様である (B. Furie および B. Furie, 前出)。アミノ末端のほぼ45アミノ酸は、γ-カルボキシグルタミン酸、または gla、ドメインを含む。この後ろに、2つの上皮細胞増殖因子相同性ドメイン (EGF)、活性化ペプチドおよび触媒性「重鎖」(セリンプロテアーゼファミリーのメンバーである) (A. Vysotschin ら、J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993); S. Spitzer ら、Biochemical Journal 265, 219 (1990); H. Brandstetter ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9796 (1995)) が続く。

【0144】

一実施形態では、本発明の凝固因子は、第X因子の成熟型である。第X因子は、58.5 kDaという分子量のビラミンK依存性糖タンパク質であり、肝細胞から血漿中にチモーゲンとして分泌される。最初に、第X因子は、全部で488個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを有するプレプロペプチドとして産生される。このシグナルペプチドは、小胞体中への移入の間にシグナルペプチドによって切断され、このプロペプチド配列は、成熟N末端鎖のN末端で最初の11のグルタミン酸残基でγカルボキシル化が生じた後に切断される。さらなるプロセッシング工程は、Arg182とSer183との間での切断によって生じる。このプロセッシング工程はまた、3つのペプチドArg180-Lys181-Arg182の欠失を同時に生じる。得られた分泌された第X因子チモーゲンは、Cys172とCys342との間のジスルフィド架橋を介して共有結合される139アミノ酸のN末端軽鎖(M, 16, 200)および306アミノ酸のC末端重鎖(M, 42, 000)からなる。さらなる翻訳後プロセッシング工程は、Asp103のβヒドロキシル化、ならびにN-型グリコシル化およびO-型グリコシル化を包含する。

10

【0145】

これらの凝固因子の野性型(WT)バージョンまたはその生物学的に活性な部分に加えて、本発明はまた、活性を有するその前駆体の短縮型、対立遺伝子改変体および種改変体、スプライス改変体によってコードされる改変体、およびこの凝固因子の成熟型に対して少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含んでおり、血栓形成を促進する能力を保持している他の改変体も使用する。例えば、TF結合、第X因子結合、リン脂質結合および/またはFVIIの凝固活性のようなFVIIの少なくとも1つの活性を保持する、改変されたFVIIポリペプチドおよびその改変体が使用されてもよい。活性を保持することによって、この活性は、保持される活性のレベルが検出可能な効果を生じるのに十分である限り、野性型凝固因子に比較して、減少されるかまたは増大されるなど、変更されてもよい。本発明の構築物で用いられ得る凝固因子の例示的な配列は、添付の配列表に見出される。

20

【0146】

例示的な改変されたポリペプチドとしては、限定するものではないが、組織特異的なアイソフォームおよびその対立遺伝子改変体、核酸の翻訳によって調製される合成の分子、組み換え方法を通じる、より短いポリペプチドの連結を含む合成のような、化学合成によって生成されるタンパク質、ヒトおよび非ヒト組織および細胞から単離されるタンパク質、キメラのポリペプチドおよびその修飾型が挙げられる。本発明の凝固因子はまた、十分な長さのWT分子のフラグメントもしくは一部からなってもよいし、または全長の成熟ポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する(必要に応じて活性化の際)ための適切な領域を含んでもよい。例示的な凝固因子改変体は、当該分野で公知である。

30

【0147】

本明細書において用いる場合、「Gladメイン」という用語は、プロトロンビン、凝固因子VII、IXおよびX、タンパク質C、S、およびZのような、ビタミンK依存性タンパク質に存在する保存された膜結合モチーフを指す。これらのタンパク質は、これらのタンパク質のN末端Gladメイン中でクラスター化されるアミノ酸である、γカルボキシグルタミン酸の翻訳後合成のためにビタミンKを必要とする。このドメインに存在する全てのグルタミン酸残基は、潜在的なカルボキシル化部位であり、従ってそれらの多くはカルボキシル化によって改変される。カルシウムイオンの存在下では、Gladメインは、ホスファチジルセリンを含むリン脂質膜と相互作用する。Gladメインはまた、組織因子(TF)であるFVIIa補因子に対する結合においてある役割を果たす。TFと複合体化され、FVIIaのGladメインは、7つのCa²⁺イオンをロードされ、細胞表面上のリン脂質との相互作用のために細胞膜の方向に3つの疎水性側鎖を突出させTFのC末端ドメインとの有意な接触を有する。

40

【0148】

50

第V I I因子のG l aドメインは、負に荷電されたリン脂質表面に対する凝固因子の結合で重要な役割を果たす、一般的でないアミノ酸（カルボキシグルタミン酸（G l a））を含む。

【0149】

G L Aドメインは、カルシウムイオンの高親和性の結合を担う。これは、成熟型のタンパク質のN末端の先端で開始して、保存された芳香族残基で終わる。保存されたG l a-x（3）-G l a-x-C y sモチーフは、カルボキシラーゼによる基質認識のために重要であると思われるドメインの中央で見出される。

【0150】

表面プラズモン共鳴分析と組み合わせたストップフロー蛍光動態測定を用いて、G l aドメインは、事象の順序に重要であり、それによってF V I I aのプロテアーゼドメインがs T Fと接触を開始することが見出された（B i o c h e m i c a l および B i o p h y s i c a l R e s e a r c h C o m m u n i c a t i o n s . 2 0 0 5 . 3 3 7 : 1 2 7 6）。さらに、凝固因子のクリアランスは、例えば、肝臓細胞およびクリアランスレセプター上で、例えば、E P C R上で。G l a相互作用を通じて有意に媒介され得る。

10

【0151】

一実施形態では、標的化凝固因子は、G l aドメインを欠くように改変される。G l aドメインは、肝細胞、E P C Rのようなクリアランスレセプターなどに対する結合のような、複数の経路を介して凝固因子のクリアランスの媒介を担う。従って、G l aドメインを排除することは、凝固因子の半減期に有益な効果を有する。G l aドメインはまた、凝固の部位に対して凝固因子を局在化することによって活性に一般的に必要なが、血小板標的化ドメイン部分を含むことによって、G l a欠失の凝固因子を血小板に標的する。一実施形態では、本発明の凝固因子は、標的部分を含み、かつG l aドメインを欠く。例えば、第V I I因子の場合には、G l aドメインは、軽鎖のアミノ末端に存在し、かつアミノ酸1-35からなる。例示的な凝固因子のG l aドメインは、添付の配列表に示される。このドメインは、標準的な分子生物学的技術を用いて除去されて、標的化ドメインで置き換えられ、そして改変された軽鎖が本発明の構築物に組み込まれてもよい。一実施形態では、切断部位は、この分子の活性化を容易にするためにG l aドメインを欠いている構築物中に導入されてもよい。例えば、一実施形態では、このような切断部位は、凝固因子が活性化されたときに切断されるアミノ酸の間に導入されてもよい（例えば、第V I I因子の場合にはアミノ酸152~153の間）。G l aドメインを欠いている例示的な凝固因子は、添付の図面に示される。

20

30

【0152】

一実施形態では、分子の活性化を容易にするためにG l aドメインを欠いている構築物中に切断部位が導入されてもよい。例えば、一実施形態では、このような切断部位は、凝固因子が活性化されたときに切断されるアミノ酸の間に導入されてもよい（例えば、第V I I因子の場合にはアミノ酸152~153の間）。G l aドメインを欠いている例示的な凝固因子は、添付の図面に示される。

【0153】

例示的な凝固因子は、哺乳動物、例えば、ヒト由来のものである。例示的な凝固因子の配列は、添付の配列表中に、例えば、単独で、またはキメラの凝固因子構築物と関連して示される。

40

【0154】

I I I . 標的部分

一実施形態では、本発明の凝固因子は、血小板上で発現される標的分子に結合する、「標的化部分」を用いて凝固の部位に対して凝固因子を局在化することによって、その有効性を増強するように血小板に標的される。好ましくは、この標的化分子は、血小板以外の細胞または組織上では発現されず、すなわち、この標的化部分は特異的に血小板に結合する。

50

【0155】

一実施形態では、休止血小板上で見出されるレセプター／高次構造が標的される。標的されることによって、凝固のための部位は、有効性の増強のためにプライムされ得る。このような分子を標的することはまた、凝固因子の半減期を延長するか、および／またはクリアランスを妨げ得る。このような標的の例としては、GpIb／V／IX複合体のGpIb、ならびにGPIIb／IIIaのGpVIおよび不活性型が挙げられる。

【0156】

一実施形態では、活性化された血小板上でのみ見出されるレセプター／高次構造は、活性な凝固の部位に対して凝固因子を標的化するために標的化される。このような標的の例としては、例えば、GpIb／IIIaの活性型およびCD62Pが挙げられる。

10

【0157】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、血小板に親和性を有しており、血小板に結合する「標的化部分」を含む。例えば、一実施形態では、標的部分は、GPIb複合体、例えば、GPIb- α に結合する。このような標的化部分の例としては、活性な血小板および不活性な血小板の両方に結合するペプチドPS4、OS1、およびOS2が挙げられる（Benardら、2008 Biochemistry 47:4674）；別の実施形態では、標的部分は、GPIIbIIIaの活性な高次構造に結合する。このような標的化部分の例としては、SCE5およびMB9可変領域（活性な血小板のみに結合する）が挙げられる（Schwarzら、2004 FASEB Journal express article 10.1096/fj.04-1513fje；Schwarzら、2006 Circulation Research. 99:25-33；米国特許出願公開第20070218067号）。別の実施形態では、標的部分は、GPIIbIIIaの活性な／不活性な高次構造の両方に結合する。このような標的部分の例は、AP3抗体の可変領域である（Petersonら、2003. Hemostasis, Thrombosis、およびVascular Biology 101:937；WO2010115866）。他の標的および標的化部分は当該分野で公知である。凝固活性が増強された第IX因子の別バージョン（3つ組の変異体V86A／E277A／R338A）は、Linら、2010. Journal of ThrombosisおよびHaemostasis 8:1773）によって記載されている。これらの引用文献の内容は、本引用文献によって本明細書に援用される。

20

30

【0158】

本発明のキメラの凝固因子は、1つ以上の標的部分を含んでもよい。例示的な立体配置は添付の図面に示される。さらに、2つ以上の標的化部分はお互いに対して（例えば、スパーサーを介して）連続して連結されて、直列の配列が本発明の構築物に対して作動可能に連結されてもよい。2つ以上の標的化部分が本発明のキメラの凝固因子に存在する場合、この部分は、同じであっても異なってもよい。

【0159】

一実施形態では、標的部分は、凝固の部位で標的部分を除去するために切断され得る切断可能なリンカーによって、本発明のキメラの凝固因子に融合される。別の実施形態では、標的部分は、切断可能なリンカーを介して結合されず、従って、凝固の部位では切断されない。

40

【0160】

一実施形態では、標的部分は、第VII因子のN末端またはC末端に配置される。別の実施形態では、標的部分は、FVII、FIX、FXのC末端、またはFVIIa、FIXaもしくはFXaのいずれかまたは両方の鎖のC末端上に配置される。Fc領域またはその一部が使用される実施形態では、標的部分は、第二のFc鎖のN末端もしくはC末端、またはFc鎖のいずれかもしくは両方のC末端に配置されてもよい。

【0161】

一実施形態では、標的部分は、ある構築物に対して直接遺伝子的に融合されないが、この構築物に対してスパーサーまたは化学結合を介して連結される。例えば、標的化部分は

50

、ある構築物の標的部分とFc部分との間の結合の形成によって本発明の構築物に結合され得、ここでこの標的化部分は、第一の官能基を含み、かつこのFc部分は、第二の官能基を含み、ここでこの第一のおよび第二の官能基は、お互いと反応して化学結合を形成し得る（例えば、米国特許第7381408号を参照のこと）。

【0162】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、抗原結合部位（例えば、抗体の抗原結合部位、抗体改変体、または抗体フラグメント）、ポリペプチド、リガンドのレセプター結合部分、またはレセプターのリガンド結合部分（血小板、例えば、休止血小板または活性化された血小板に対して特異的に結合する）のうちの少なくとも1つを含む。例示的な標的化部分としては、標的されるべき分子に結合するscFv分子またはペプチドが挙げられる。標的化部分の例は、本発明の実施例および図面に見出される。標的部分として有用な他の分子は、本明細書における教示に基づいて当業者によって容易に選択され得る。

【0163】

A. 血小板に結合する抗原結合部位

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、抗体の少なくとも1つの抗原結合部分（例えば、結合部位）を含む。一実施形態では、抗原結合部分は、ポリペプチドを血小板に対して標的する。

【0164】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、抗原結合部分を含んでもよい。「抗原結合部分」という用語は、抗原に結合するか、または抗原結合（すなわち、特異的な結合）についてインタクトな抗体と（すなわち、それらが由来するインタクトな抗体と）競合する、免疫グロブリン、抗体または抗体改変体のポリペプチドフラグメントを指す。例えば、この抗原結合部分は、上記の任意の抗体または抗体改変体由来し得る。抗原結合部分は、当該分野で周知の組み換え方法または生化学的方法によって産生され得る。例示的な抗原結合部分としては、Fv、Fab、Fab'、および(Fab')₂、ならびにscFv分子が挙げられる。

【0165】

他の実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、単鎖の結合分子由来の結合部分を含んでもよい（例えば、単鎖の可変領域またはscFv）。単鎖抗体の産生について記載された技術（米国特許第4,694,778号；Bird, Science 242:423-442 (1988)；Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)；およびWardら、Nature 334:544-554 (1989)）は、単鎖の結合分子を産生するように適合され得る。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖および軽鎖フラグメントを連結することによって形成され、結果として単鎖抗体が生じる。E. coliにおける機能的なFvフラグメントのアセンブリのための技術もまた用いられてもよい（Skerraら、Science 242:1038-1041 (1988)）。

【0166】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、単鎖の可変領域配列（scFv）を含むか、またはそれらからなる、1つ以上の結合部位または領域を含む。単鎖可変領域配列は、1つ以上の抗原結合部位を有する単独のポリペプチド、例えば、V_Hドメインに対して可塑性リンカーによって連結されるV_Lドメインを含む。このVLおよび／またはVHドメインは、上記の任意の抗体または抗体改変体由来であってもよい。scFv分子は、V_H—リンカー—V_L方向で構築されても、またはV_L—リンカー—V_H方向で構築されてもよい。抗原結合部位を作製するV_LおよびV_Hドメインを連結する可塑性リンカーは好ましくは、約10～約50アミノ酸の残基を含む。一実施形態では、ポリペプチドリリンカーは、gly-serポリペプチドリリンカーである。例示的なgly-serポリペプチドリリンカーは、式(Gly₄Ser)_nであって、ここでnが正の整数（例えば、1、2、3、4、5、または6）である、リンカーである。他のポリペプチドリリンカーは当該分野で公知である。単鎖の可変領域配列を有する抗体（例えば、単鎖のFv抗体）および

このような単鎖抗体を作製する方法は当該分野で周知である（例えば、H o ら、1989 . Gene 77:51; B i r d ら、1988 Science 242:423; P a n t o l i a n o ら、1991. Biochemistry 30:10117; M i l l e n i c ら、1991. Cancer Research 51:6363; T a k k i n e n ら、1991. Protein Engineering 4:837）。

【0167】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドで使用される s c F v 分子は、安定化された s c F v 分子である。一実施形態では、この安定化された c F v 分子は、V_HドメインとV_Lドメインとの間に差し込まれた s c F v リンカーを含んでもよく、ここでV_HおよびV_Lドメインは、V_Hドメインのアミノ酸とV_Lドメインのアミノ酸との間のジスルフィド結合によって連結される。他の実施形態では、安定化された s c F v 分子は、最適化された長さまたは組成を有する s c F v リンカーを含み得る。さらに他の実施形態では、この安定化された s c F v 分子は、少なくとも1つの安定化アミノ酸置換（単数または複数）を有するV_HドメインまたはV_Lドメインを含んでもよい。さらに別の実施形態では、安定化された s c F v 分子は、上記の安定化特徴のうち少なくとも2つを有してもよい。

【0168】

安定化された s c F v 分子は、改善されたタンパク質安定性を有するか、または改善されたタンパク質安定性をこの分子が作動可能に連結されるポリペプチドに対して付与する。本発明の好ましい s c F v リンカーは、従来のポリペプチドに比較して、本発明のポリペプチドの熱安定性を少なくとも約2℃または3℃まで改善する。比較は、例えば、本発明の s c F v 分子の間で行ってもよい。特定の好ましい実施形態では、この安定化された s c F v 分子は、(G l y₄ S e r)₄ s c F v リンカーおよびジスルフィド結合（V_Hアミノ酸44およびV_Lアミノ酸100を連結する）を含む。他の例示的な安定化された s c F v 分子（本発明のポリペプチド中で使用され得る）は、その各々が全体として参照によって本明細書に援用される、2006年12月8日出願の米国特許仮出願第60/873,996号、または2007年3月19日出願の米国特許出願第11/725,970号に記載される。

【0169】

本発明のポリペプチドは、当該分野で認識されるプロトコールを用いて、抗体に由来する可変領域またはその一部（例えば、V_Lおよび／またはV_Hドメイン）を含んでもよい。例えば、可変ドメインは、非ヒト哺乳動物、例えば、マウス、モルモット、霊長類、ウサギまたはラットにおいて、この哺乳動物を抗原またはそのフラグメントで免疫することによって、産生された抗体由来であってもよい。全ての目的のために参照によって援用される、H a r l o w & L a n e（前出）を参照のこと。免疫グロブリンは、関連の抗原（例えば、精製された腫瘍関連抗原または細胞またはこのような抗原を含む細胞抽出物）およびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって生成され得る。免疫は典型的には、活性化された脾臓細胞またはリンパ球由来の抗原反応性抗体の産生を含む免疫応答を惹起する。

【0170】

可変領域は、免疫された哺乳動物の血清から採取されるポリクローナル抗体由来であってもよいが、所望の可変領域が由来するモノクローナル抗体（M A b）の同種の調製物を提供するために、脾臓、リンパ節、または末梢血から個々のリンパ球を単離することが望ましい場合が多い。ウサギまたはモルモットが、通常、ポリクローナル抗体を作製するために用いられる。マウスが、通常、モノクローナル抗体を作製するために用いられる。モノクローナル抗体は、抗原フラグメントをマウスに注入し、「ハイブリドーマ」を調製し、抗原に特異的に結合する抗体に対してハイブリドーマをスクリーニングすることによって、フラグメントに対して調製することができる。この周知のプロセス（K o h l e r ら、(1975)、N a t u r e, 256:495）では、抗原を注入されたマウス由来の比較的短命か、または臨死のリンパ球は、不死の腫瘍細胞株（例えば、骨髓腫細胞株）と

融合されるため、したがって、不死であり、かつB細胞によって遺伝的にコードされる抗体を産生することが可能なハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」を産生する。得られたハイブリッドは、単一抗体の形成のための特定の遺伝子を含む各々の個々の株による選択、希釈、および再増殖によって、単一の遺伝株に分離される。それらは、所望の抗原に対して同種であり、それらの純粋な遺伝的血統に関して「モノクローナル」と称される抗体を産生する。

【0171】

このようにして調製されるハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する適切な培地において播種され、増殖する。当業者は、ハイブリドーマの形成、選択、および成長のための試薬、細胞株、および培地が、多数の供給源より市販され、標準的プロトコールが、十分に確立していることを認識している。概して、ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地は、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、またはラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着剤アッセイ(ELISA)のようなインビトロアッセイによって測定される。所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定された後、クローンは、限界希釈手順によってサブクロニングされ、標準方法によって成長されてもよい(Goding, Monoclonal Antibodies: PrinciplesおよびPractice, pp 59-103 (Academic Press, 1986))。サブクロンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、アフィニティークロマトグラフィー(例えば、プロテインA、プロテインG、またはタンパク質Lアフィニティークロマトグラフィー)、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、または透析等の従来の精製手順によって、培養培地、腹水、または血清から分離することができることはさらに認識されている。

【0172】

必要に応じて、抗体は、抗原の他の非重複フラグメントに結合することなく、特定の活性状態の血小板に対する結合について、または抗原の特定の領域または所望のフラグメントに対する結合についてスクリーニングされてもよい。後者のスクリーニングは、抗原の欠失変異体の集合への抗体の結合を判定すること、およびどの欠失変異体が抗体に結合するかを判定することによって達成することができる。結合は、例えば、ウエスタンブロット法またはELISAによって評価することができる。抗体への特定の結合を示す最小のフラグメントが、抗体のエピトープを定義する。あるいは、エピトープ特異性は、試験抗体および参照抗体が抗原への結合に関して競合する競合アッセイによって判定され得る。試験抗体および参照抗体が競合するならば、それらは、同じエピトープまたは十分近接するエピトープに結合し、その結果1つの抗体の結合が他の抗体の結合に干渉する。

【0173】

所望のモノクローナル抗体またはその結合部位をコードするDNAは、定常領域ドメイン配列の単離のための上述の任意の従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖または軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)、容易に単離および配列決定され得る。単離され、サブクロニングされたハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として作用する。より詳しくは、単離されたDNA(本明細書において記載されるように合成することができる)は、本発明のポリペプチドへの組み込みのための所望の可変領域配列をクローニングするために用いられ得る。

【0174】

他の実施形態においては、結合部位は、完全ヒト抗体に由来する。ヒトまたは実質的なヒト抗体は、内因性免疫グロブリン産生が不可能なトランスジェニック動物(例えば、マウス)において生成され得る(例えば、それぞれの内容は、参照によって、本明細書に援用される米国特許第6,075,181号、同第5,939,598号、同第5,591

10

20

30

40

50

、669号、および同第5、589、369号を参照のこと）。例えば、キメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域のホモ接合体欠失は、内因性抗体産生の完全阻害を生じることが記載されている。そのような生殖細胞系列変異体マウスへのヒト免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジの際にヒト抗体の産生を生じる。SCIDマウスを用いるヒト抗体を生成するための別の好ましい手段は、米国特許第5、811、524号において開示され、この内容は、参照によって、本明細書に援用される。これらのヒト抗体に関連する遺伝物質はまた、本明細書において記載されるように単離され、操作されてもよいことが認識される。

【0175】

他の態様においては、本発明のポリペプチドは、抗体の改変型に由来する抗原結合部位、またはその一部を含んでもよい。例示的なそのような型としては、例えば、ミニボディ、ジアボディ、トリアボディ、ナノボディ、カメリド、Dab、四価抗体、イントラジアボディ（例えば、Jendreykoら、2003. J. Biol. Chem. 278: 47813）、融合タンパク質（例えば、抗体サイトカイン融合タンパク質、Fcレセプターの少なくとも一部と融合されるタンパク質）、および二重特異性抗体が挙げられる。他の改変抗体は、例えば、米国特許第4、745、055号、欧州特許第256、654号、Faulknerら、Nature 298: 286 (1982)、欧州特許第120、694号、欧州特許第125、023号、Morrison, J. Immun. 123: 793 (1979)、Kohlerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1980)、Rasora、Cancer Res. 41: 2073 (1981)、Morrisonら、Ann. Rev. Immunol. 2: 239 (1984)、Morrison, Science 229: 1202 (1985)、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1984)、欧州特許第255、694号、欧州特許第266、663号、およびWO88/03559号において記載される。再分類された免疫グロブリン鎖も、公知である。例えば、米国特許第4、444、878号；WO88/03565号；ならびに欧州特許第68、763号、および本明細書において記載される参考文献を参照のこと。

【0176】

別の実施形態においては、本発明のキメラの凝固因子は、ジアボディである抗原結合部位もしくは領域、またはそれに由来する抗原結合部位を含む。ジアボディは、二量体の四価分子であり、それぞれ、scFv分子と同様のポリペプチドを有するが、同じポリペプチド鎖上のV_LおよびV_Hドメインが、相互作用することができないように、通常、可変ドメインの両方に接続する短い（例えば、10未満、好ましくは1～5）アミノ酸残基リンカーを有する。その代わりに、1つのポリペプチド鎖のV_LおよびV_Hドメインは、第2のポリペプチド鎖上のV_HおよびV_Lドメイン（それぞれ）と相互作用する（例えば、国際公開第WO02/02781号を参照）。一実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの遺伝子的に融合されたFc領域（すなわち、scFc領域）のN末端および／またはC末端に対して作動可能に連結されるジアボディを含む。

【0177】

特定の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、単一ドメイン結合分子（例えば、単一ドメイン抗体）を標的部分として含む。例示的な単一ドメイン分子は、軽鎖可変ドメインを有さない、抗体の単離された重鎖可変ドメイン（V_H）、すなわち、重鎖可変ドメイン、および重鎖可変ドメインを有さない、抗体の単離された軽鎖可変ドメイン（V_L）、すなわち、軽鎖可変ドメインを含む。本発明の結合分子において使用される例示的な単一ドメイン抗体としては、例えば、Hamers-Casterman, ら、Nature 363: 446-448 (1993)、およびDumoulin, ら、Protein Science 11: 500-515 (2002)に記載される、例えば、ラクダ科（Camelid）重鎖可変ドメイン（約118～136のアミノ酸残基）が挙げられる。他の例示的な単一ドメイン抗体としては、Dabs（登録商標）（Domantis Ltd., Cambridge, UK）としても周知の単一のV_HまたはV_Lドメイ

ンが挙げられる。さらに他の単ドメイン抗体としては、サメ抗体（例えば、サメIg-NAR）が挙げられる。サメIg-NARは、1つの可変ドメイン（V-NAR）および5つのC様定常ドメイン（C-NAR）のホモ二量体を含み、ここで多様性は、長さが5～23残基と異なる伸長CDR3領域に集中される。ラクダ科（例えば、ラマ）においては、VHHと称される重鎖可変領域は、全抗原-結合ドメインを形成する。カメリドVHH可変領域と従来の抗体（VH）に由来する領域との間の主な相違としては、（a）VHHにおける対応する領域と比較して、VHの軽鎖接触表面におけるよりも疎水性のアミノ酸、（b）VHHにおけるより長いCDR3、および（c）VHHにおけるCDR1とCDR3との間のジスルフィド結合の頻繁な出現、が挙げられる。単ドメイン結合分子を作製するための方法は、米国特許第6,005,079号および同第6,765,087号において記載され、その両方の内容とも、参照によって本明細書に援用される。VHHドメインを含む例示的な単ドメイン抗体としては、Nanobodies（登録商標）（Ablynx NV、Ghent、Belgium）が挙げられる。

10

【0178】

本発明の結合分子での使用のための、結合部位が由来し得る、例示的な抗体は、当該分野で公知である。このような標的化部分の例としては、活性な血小板のみを結合するSCE5およびMB9可変領域が挙げられる（Schwarzら、2004 FASEB Journal express article 10.1096/fj.04-1513fje; Schwarzら、2006 Circulation Research. 99:25-33; 米国特許出願公開第20070218067号）。別の実施形態では、標的部分は、GPIIb/IIIaの活性な／不活性な高次構造の両方に結合する。このような標的部分の例は、AP3抗体の可変領域である（Petersonら、2003. Hemostasis, Thrombosis、およびVascular Biology 101:937; WO2010115866）。

20

【0179】

B. 非免疫グロブリン血小板結合分子

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、非免疫グロブリン結合分子に由来する1つ以上の血小板結合部位を含む。本明細書において用いる場合、「非免疫グロブリン結合分子」という用語は、免疫グロブリン以外のポリペプチドに由来するが、血小板標的に対して所望の結合特異性を付与するために操作され得る（例えば、変異誘発され得る）部分（例えば、骨格またはフレームワーク）を、結合部位が含む結合分子である。抗体分子に由来しない結合部位を含む結合分子の他の例としては、レセプター結合部位およびリガンド結合部位（血小板に結合する）が挙げられる。

30

【0180】

非免疫グロブリン結合分子は、人工的に多様化された結合部位を有する結合分子のライブラリーからの標的結合改変体の選択または単離によって特定され得る。多様化されたライブラリーは、完全に無作為のアプローチ（例えば、エラープローン（error-prone）PCR、エキソンシャッフリング、または指向性進化）を用いて生成されてもよいし、または当該分野において承認されている設計ストラテジーによって補助されてもよい。例えば、結合部位は、その同族標的分子と相互作用する場合に、通常、関与するアミノ酸部分は、結合部位をコードする核酸内における対応する位置での縮重コドン、トリヌクレオチド、無作為ペプチド、またはループ全体の挿入によって無作為化され得る（例えば、米国特許出願公開第20040132028号を参照のこと）。アミノ酸位置の場所は、標的分子を有する複合体における結合部位の結晶構造の検討によって特定され得る。無作為化の候補位置としては、ループ、平面、らせん、および結合部位の結合腔が挙げられる。特定の実施形態においては、多様化の候補である可能性が高い結合部位内のアミノ酸は、当該分野で公知の技術を用いて特定できる。無作為化後、次に多様化されたライブラリーを選択またはスクリーニング手順に供して、当該分野で公知の方法を用いて、所望の結合特徴を有する結合分子、例えば、特定の結合血小板を得る。選択は、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはリボソームディスプレイのような当該分野において

40

50

承認されている方法によって達成することができる。一実施形態においては、血小板に結合することが当該分野で公知の分子を、本発明の構築物で使用してもよい。例えば、当該分野で記載される GPIIb/IIIa に結合するペプチド（例えば、PS4、OS1、または OS2）を用いてもよい（Bernard ら、2008. Biochemistry 47: 4674-4682）。

【0181】

IV. 活性化可能凝固因子

バイパス療法のために与えられる凝固因子は、活性型で与えられるときは有効である。なぜなら外因性の凝固因子は、十分な動態で有効であるように活性化されない場合が多いからである。しかし、それらはまた、内因性の経路によって（例えば、アンチトロンビン III または TFPI によって）急速に不活性化され、活性型のクリアランスおよび短い有効半減期がもたらされる。一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、「活性化可能」である。このような活性化可能な構築物は、より長い半減期を有する増強されたチモゲンとして循環するが、必要に応じて凝固部位で容易に切断され得る。

【0182】

一実施形態では、本発明の活性化可能な構築物は、切断性のリンカーを含み、このリンカーは、例えば、第 XIa 因子、第 Xa 因子、またはトロンビン切断部位（それぞれ、第 XIa 因子、Xa、またはトロンビンによって切断される）を含み、凝固の部位で活性型の凝固因子の形成をもたらす。例示的な第 FXIa 因子切断部位は、例えば、TQSFNDFTTR および SVSQTSKLTTR を含む。例示的なトロンビン切断部位は、例えば、DFLAEGGGVR、TTKIKPR、および ALRPR を含むかまたはそれからなる配列（例えば、ALRPRVVGGGA）を含む。

【0183】

一実施形態では、切断性のリンカーは、スペーサー部分によって 1 つ以上の側（上流、下流または両側）に隣接され得る。

【0184】

一実施形態では、切断性のリンカーは、凝固因子の軽鎖と重鎖との間に差し込まれる。別の実施形態では、切断性のリンカーは、凝固因子の軽鎖と重鎖との間に差し込まれない。一実施形態では、切断性のリンカーは、重鎖のアミノ末端に配置される。

【0185】

例示的な活性化可能な構築物は、添付の図面および以下の実施例に示される。

【0186】

V. 足場部分

本発明のいくつかの実施形態は、例えば、タンパク質部分、cscFc 領域、Fc 部分、アルブミン、XTEN などから選択され得る、足場部分を含む。

【0187】

A. タンパク質部分

一実施形態では、足場はタンパク質部分である。このような部分は、完全タンパク質もしくはその一部、または合成分子を含んでもよい。好ましいタンパク質部分は、構築物に組み込まれる場合、本発明のキメラの凝固因子の半減期を改善する十分な分子サイズのものである。例えば、一実施形態では、人工のタンパク質、XTEN が、足場として構築物中に含まれてもよい（Schellenger ら、2009. 27: 1186）。別の実施形態では、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）は、本発明の構築物中に含まれてもよい。例えば、当該分野で公知のように、血清アルブミン（例えば、HSA）をタンパク質足場として用いてもよい。特定の種々のドメインおよび HSA のサブドメインでは、血清アルブミン足場ベースのタンパク質ライブラリーの生成のための変異または無作為化に十分受け入れられる構造を有する。本発明で用いられ得る、アルブミン、例えば、そのフラグメントの例は、公知である。例えば、米国特許第 7,592,010；米国特許第 6,686,179；および Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2: S6-S8 (2009)（その各々が、その全体が参照によ

て本明細書に援用される)。

【0188】

B. s c F c 領域

一実施形態では、本発明は、c s c F cを含んでいる、一実施形態における単一ポリペプチド鎖内に少なくとも1つの遺伝子的に融合されたF c領域またはその一部を含むポリペプチド（すなわち、単鎖のF c (s c F c) 領域を含むポリペプチド）を提供する。

【0189】

一実施形態では、キメラの凝固因子は、F V I I、F I XおよびF Xからなる群より選択される凝固因子、および血小板に結合する標的部分、および必要に応じて凝固因子と標的部分との間のスペーサー部分を含む。別の実施形態では、ポリペプチドはF V I Iを含み、このF V I Iは、凝固カスケードの成分によって活性化可能な異種の酵素的切断部位を含む。

【0190】

一実施形態では、本発明は、プロセッシングされていないポリペプチドであって、ここで同じ直鎖状ポリペプチド鎖内の少なくとも2つのF c部分またはドメイン（例えば、2、3、4、5、6、またはそれ以上のF c部分またはドメイン）が、F cポリペプチドリンカーによって連結される1つの機能的なs c F c領域を形成するように折り畳まれ得る（例えば、分子内にまたは分子間に折り畳まれ得る）ポリペプチドを提供する。例えば、1つの好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、そのs c F c領域を介して、少なくとも1つのF cレセプター（例えば、F c R n、F c γ Rレセプター（例えば、F c γ R I I I）、または補体タンパク質（例えば、C 1 q））に対して結合して、半減期を改善するか、または免疫エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞毒性（A D C C）、食作用、または補体依存性細胞毒性（C D C C））を誘発するか、および／または製造可能性を改善し得る。

【0191】

別のデザインの種々のポリペプチドが、本発明の範囲内である。例えば、一実施形態では、ポリペプチドは以下の部分を含む：

A - F 1 - P 1 - L - P 2 - B - F 2 (I)

【0192】

アミノ末端からカルボキシル末端の直鎖状配列では、Aは存在する場合、凝固因子またはその一部であり、F 1は第一のF c部分またはドメインであり、P 1は酵素的切断部位であり、Lはs c F cリンカーであり、P 2は酵素的切断部位Bであり、存在するならば、凝固因子またはその一部であり、F 2は第二のF c部分またはドメインであり、かつ「-」は、ペプチド結合である。式 (I) は、少なくともAまたはBであり、必要に応じてその両方である。AおよびBは、両方が存在する場合、凝固因子の対応する重鎖および軽鎖であり得る。式 (I) は、少なくともP 1またはP 2、および必要に応じて両方を含む。P 1およびP 2は、両方が存在する場合、同じであっても異なってもよい。式 (I) は、少なくともF 1およびF 2を含む。F 1およびF 2は、両方とも存在する場合、同じであっても異なってもよい。

【0193】

式 I による例示的なポリペプチドとしては以下が挙げられる：A - F 1 - P 1 - L - P 2 - F 2；F 1 - P 1 - L - P 2 - B - F 2；A - F 1 - P 1 - L - F 2；F 1 - P 1 - L - B - F 2；A - F 1 - L - P 2 - F 2；およびF 1 - L - P 2 - B - F 2。

【0194】

一実施形態では、F 1およびF 2は各々が、C H 2およびC H 3部分を含む。

【0195】

一実施形態では、c s c F cリンカー (L) の切断および実質的な切除後、本発明のポリペプチドは、2つのポリペプチド鎖であって、第一のポリペプチド鎖が第一のF c部分に連結されたAを含み、第二のポリペプチド鎖が第二のF c部分に連結されたBを含み、ここでF 1およびF 2が二量体化してF c領域を形成する、ポリペプチド鎖を含む。一実

施形態では、AおよびBは必要に応じて存在し、かつ凝固因子またはその一部である。

【0196】

一実施形態では、Aは、凝固因子の軽鎖であり、かつBは凝固因子の重鎖である。一実施形態では、Bは凝固因子の軽鎖であり、かつAは凝固因子の重鎖である。一実施形態では、AおよびBがポリペプチド中で会合する場合、次にこのポリペプチドは、機能的な凝固因子、例えば、F V I I、F I XまたはF Xを形成する。一実施形態では、このようなポリペプチドは、細胞からの分泌の際に酵素的に活性である。

【0197】

i) F c 部分またはドメイン

本発明のポリペプチドを産生するためのF 1およびF 2として有用なF c部分は、多数の異なる供給源から得ることができる。好ましい実施形態においては、このポリペプチドのF c部分は、ヒト免疫グロブリンに由来する。しかしながら、F c部分は、例えば、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）または非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー、マカク）種を含む、別の哺乳動物種の免疫グロブリン由来であってもよい。さらに、ポリペプチドF cドメインまたはその一部は、I g M、I g G、I g D、I g A、およびI g Eを含む、任意の免疫グロブリンクラス、ならびにI g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4を含む、任意の免疫グロブリンイソタイプに由来してもよい。好ましい実施形態においては、ヒトイソタイプI g G 1が用いられる。

【0198】

様々なF c 部分遺伝子配列（例えば、ヒト定常領域遺伝子配列）は、公的にアクセス可能な寄託の形態で入手可能である。特定のエフェクター機能を有するか（または特定のエフェクター機能を欠いている）、または免疫原性を低下させる特定の修飾を有するF c 部分配列を含む定常領域ドメインを選択してもよい。抗体および抗体コード遺伝子の多くの配列は公開されており、適切なF c 部分配列（例えば、ヒンジ、C H 2、および／またはC H 3 配列、またはそれらの一部）は、当該分野において承認されている技術を用いてこれらの配列から導くことができる。前述の方法のいずれかを用いて得られた遺伝物質は、次いで、本発明のポリペプチドを得るために変化または合成されてもよい。本発明の範囲は、定常領域D N A 配列の対立遺伝子、改変体、および変異体を包含することがさらに認識される。

【0199】

F c 部分配列は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、および対象のドメインを増幅するよう選択されるプライマーを用いてクローニングされてもよい。抗体からF c 部分配列をクローニングするためには、m R N A は、ハイブリドーマ、脾臓、またはリンパ細胞から単離され、D N A へ逆転写され、抗体遺伝子がP C R によって増幅されてもよい。P C R 増幅方法は、米国特許第4, 683, 195号；同第4, 683, 202号；同第4, 800, 159号；同第4, 965, 188号、および例えば、「P C R P r o t o c o l s : A G u i d e t o M e t h o d s およびA p p l i c a t i o n s」I n n i s ら、編集、A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A (1 9 9 0) ; H o ら、1989. G e n e 77:51、H o r t o n ら、1993. M e t h o d s E n z y m o l . 217:270) において詳述される。P C R は、コンセンサス定常領域プライマー、または公表された重鎖または軽鎖D N A およびアミノ酸配列に基づくさらに特異的なプライマーによって開始され得る。上記のように、P C R を用いて、抗体軽鎖および重鎖をコードするD N A クローンを単離してもよい。この場合、ライブラリーは、コンセンサスプライマー、またはマウス定常領域プローブ等のより大きい同種プローブによってスクリーニングされてもよい。抗体遺伝子の増幅に適切な多数のプライマーセットが、当該分野で周知である（例えば、精製抗体のN末端配列に基づく5'プライマー（B e n h a r およびP a s t a n . 1994. P r o t e i n E n g i n e e r i n g 7:1509）、c D N A 端部の迅速増幅（R u b e r t i , F . ら、1994. J . I m m u n o l . M e t h o d s 173:33）、抗体リーダー配列（L a r r i c k ら、1989 B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 160:12

50)。抗体配列のクローニングは、1995年1月25日出願のNewmanらの米国特許第5,658,570号においてさらに記載され、この内容は、参照によって、本明細書に援用される。

【0200】

本発明のポリペプチドは、2つ以上のFc部分（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上のFc部分）を含んでもよい。これらの2つ以上のFc部分は、Fc領域を形成し得る。一実施形態においては、Fc部分は、異なる型のものであってもよい。一実施形態においては、このポリペプチドに存在する少なくとも1つのFc部分は、ヒンジドメイン、またはその一部を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのCH2ドメイン、またはその一部を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのCH3ドメイン、またはその一部を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのCH4ドメイン、またはその一部を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのヒンジドメイン、またはその一部、および少なくとも1つのCH2ドメイン、またはその一部（例えば、ヒンジ-CH2の方向における）を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのCH2ドメイン、またはその一部、および少なくとも1つのCH3ドメイン、またはその一部（例えば、CH2-CH3の方向における）を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、例えば、ヒンジ-CH2-CH3、ヒンジ-CH3-CH2、またはCH2-CH3-ヒンジの方向において、少なくとも1つのヒンジドメイン、またはその一部、少なくとも1つのCH2ドメイン、またはその一部、および少なくとも1つのCH3ドメイン、またはその一部を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。

【0201】

特定の実施形態においては、このポリペプチドは、1つ以上の免疫グロブリン重鎖に由来する少なくとも1つの完全Fc領域を含む（例えば、ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含む、Fc部分であるが、これらは同じ抗体に由来する必要はない）。他の実施形態においては、このポリペプチドは、1つ以上の免疫グロブリン重鎖に由来する少なくとも2つの完全Fc領域を含む。好ましい実施形態においては、完全Fc部分は、ヒトIgG免疫グロブリン重鎖（例えば、ヒトIgG1）に由来する。

【0202】

別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、完全CH3ドメイン（EUナンバリングによる抗体Fc領域のアミノ酸約341～438）を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、完全CH2ドメイン（EUナンバリングによる抗体Fc領域のアミノ酸約231～340）を含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、少なくともCH3ドメイン、および少なくとも1つのヒンジ領域（EUナンバリングによる抗体Fc領域のアミノ酸約216～230）、およびCH2ドメインを含む。少なくとも1つのFc部分を含む。一実施形態においては、本発明のポリペプチドは、ヒンジおよびCH3ドメインを含む。少なくとも1つのFc部分を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、ヒンジ、CH₂、およびCH₃ドメインを含む。少なくとも1つのFc部分を含む。好ましい実施形態においては、Fc部分は、ヒトIgG免疫グロブリン重鎖（例えば、ヒトIgG1）に由来する。一実施形態では、Fc部分は、EUナンバー221～447に相当するアミノ酸を含むか、またはそれからなる。

【0203】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、FcRn結合パートナーを含む。少なくとも1つのFc部分を含む。FcRn結合パートナーは、FcRn結合パートナーのFcRnレセプターによる必然的な能動的輸送を伴いFcRnレセプターによって特異的に結合され得る、分子またはその一部である。特異的に結合したとは、生理学的条件下で比較的

安定な複合体を形成する2つの分子を指す。特異的な結合は、通常は中～高度の能力で低い親和性を有する非特異的な結合とは識別される、高い親和性および低～中度の能力によって特徴づけられる。通常は、結合は、親和性定数 K_A が 10^6 M^{-1} より高く、またはさらに好ましくは 10^8 M^{-1} より高い場合に特異的とみなされる。必要に応じて、非特異的な結合は、結合条件を変化することによって特異的な結合に実質的に影響することなく減少され得る。分子の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合させる時間、ブロッキング剤（例えば、血清アルブミン、ミルクカゼイン）の濃度などのような適切な結合条件は、慣用的な技術を用いて当業者に最適化され得る。

【0204】

FcRnレセプターは、ヒトを含むいくつかの哺乳動物種から単離された。ヒトFcRn、サルFcRn、ラットFcRn、およびマウスFcRnの配列は公知である（Storyら、1994, J. Exp. Med. 180:2377）。FcRnレセプターは、IgG（ただしIgA、IgM、IgD、およびIgEのような他の免疫グロブリンクラスではない）に、比較的低いpHで結合し、IgGを管腔中で漿膜の方向に経細胞的に能動輸送し、次いで、間質液中で見られる比較的高いpHでIgGを遊離する。これは、成体の上皮組織（米国特許第6,485,726号、同第6,030,613号、同第6,086,875；WO03/077834；米国特許出願公開第2003-0235536号（A1））例としては、肺および腸管上皮（Israelら、1997, Immunology 92:69）腎近位尿細管上皮（Kobayashiら、2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358）ならびに鼻上皮、腔表面、および胆道系表面で発現される。

【0205】

本発明のFcRn結合パートナーは、FcRnレセプターによって特異的に結合され得る分子、例としては、IgG全体、IgGのFcフラグメント、およびFcRnレセプターの完全結合領域を含む他のフラグメントを包含する。FcRnレセプターに結合する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ら、1994, Nature 372:379）。FcRnとのFcの主な接触領域は、CH2およびCH3ドメインの接合部に近い。Fc-FcRn接触は全て、単一のIg重鎖内である。FcRn結合パートナーとしては、IgG全体、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対する言及は全て、Kabataら、1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda, Md. に基づく。

【0206】

IgGのFc領域は、十分認識された手順、例えば、部位指向性突然変異誘発などによって改変され得、FcRnに結合される改変されたIgGまたはFcフラグメントもしくはその一部を生成する可能性が高い。このような改変としては、FcRn接触部位とは離れた改変、およびFcRnに対する結合を予防または増強さえする接触部位内の改変が挙げられる。例えば、ヒトIgG1 Fc（Fcγ1）における以下の単一アミノ酸残基が、FcRnについてFc結合親和性の有意な損失なしに置換され得る：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、K3

17A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、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、238位置でアラニンによって置換される野性型プロリンである。一例として、1つの特定の実施形態では、N297A変異体を組み込み、高度に保存されたN-グリコシル化部位を除去する。アラニンに加えて、他のアミノ酸を上記の特定の位置で野性型アミノ酸に関して置換してもよい。変異を単独でFcに導入して、天然のFcとは別個の100を超えるFcRn結合パートナーを生じ得る。さらに、これらの個々の変異体のうち2つ、3つまたはそれ以上の組み合わせと一緒に導入して、100を超えるFcRn結合パートナーを生じてもよい。さらに、本発明の構築物のFcRn結合パートナーの1つを変異してもよく、他のFcRn結合パートナーは全く変異されなくてもよく、または両方とも変異されてもよく、ただし異なる変異はない。N297Aを含む、本明細書に記載の任意の変異体が、生理学的に活性な分子（例えば、EPO、IFN、第VII因子、第IX因子、T20）にかかわらず、Fcを改変するために用いられてもよい。

10

20

【0207】

特定の上記の変異体は、FcRn結合パートナーに対して新規な機能を付与し得る。例えば、一実施形態は、N297Aを組み込み、高度に保存されたN-グリコシル化部位を除去する。この変異の効果は、免疫原性を低下して、それによって、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についての親和性を損なうことなく、FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、およびFcγRIIIAに対して結合できないFcRn結合パートナーをもたらすことである（Routledgeら、1995, Transplantation 60:847; Friendら、1999, Transplantation 68:1632; Shieldsら、1995, J. Biol. Chem. 276:6591）。FcRnに対する上記の変異から生じる新規な機能のさらなる例としては、いくつかの場合には、野性型のものを上回って増大され得る。この増大された親和性は、「結合」速度定数の増大、「解離」速度定数の低下、または「結合」速度定数の増大および「解離」速度定数の低下の両方を反映し得る。FcRnに対する親和性の増大を付与すると思われる変異としては、T256A、T307A、E380A、およびN434Aが挙げられる（Shieldsら、2001, J. Biol. Chem. 276:6591）。

30

【0208】

さらに、少なくとも3つのヒトFcγレセプターは、下部のヒンジ領域内のIgG上の結合部位、一般にはアミノ酸234～237を認識すると思われる。従って、新規な機能および潜在的な免疫原性の減少の別の例は、例えば、IgG2「PVA」（1つのアミノ酸欠失を有する）由来の対応する配列に対してヒトIgG1「ELLG」のアミノ酸233～236を置き換えることによって、この領域の変異から生じ得る。種々のエフェクター機能を媒介するFcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIは、このような変異が導入されたとき、IgG1に結合しないことが示された。WardおよびGhetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77およびArmourら、1999, Eur. J. Immunol. 29:2613。

40

【0209】

一実施形態では、FcRn結合パートナーは、配列PKNSSMISNTTP（配列番号12）および必要に応じてさらにHQSLGTQ（配列番号13）、HQNLSDGK（

50

配列番号 14)、HQNISDGK (配列番号 24)、またはVISSHLGQ (配列番号 25) (米国特許第 5,739,277 号) から選択される配列を含むポリペプチドである。

【0210】

2つのFcRnレセプターは、単一のFc分子に結合し得る。結晶学的データによって、各々のFcRn分子がFcホモ二量体の単一のポリペプチドに結合することが示唆される。一実施形態では、FcRn結合パートナー、例えば、IgGのFcフラグメントを、生物学的に活性な分子に連結することは、生物学的に活性な分子を経口的に、口腔内に、舌下に、直腸に、膣に、経鼻的に投与されるエアロゾルとして、または肺経路を介して、または眼の経路を介して送達するという意味をもたらす。別の実施形態では、キメラのタンパク質は、侵襲的に、例えば、皮下に、静脈内に投与され得る。

10

【0211】

本発明のポリペプチドのFc部分を作製するための定常領域ドメインまたはその一部は、異なる免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、本発明のポリペプチドは、IgG1分子由来のCH2ドメインまたはその一部、およびIgG3分子由来のCH3領域またはその一部を含んでもよい。別の例では、ポリペプチドは、部分的には、IgG1分子由来、および部分的にはIgG3分子由来のヒンジドメインを含んでいるFc部分を含んでもよい。本明細書に示されるとおり、当業者には、Fc部分が天然に存在する抗体分子からアミノ酸配列を変化させるように変更されてもよいことが理解される。

【0212】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、1つ以上の短縮Fc部分を含んでいるscFc領域を、この部分がFc領域に対してFcレセプター(FcR)結合特性を付与するのに十分であるにもかかわらず、含む。例えば、FcRnに結合するFcドメインの一部(すなわち、FcRn結合部分)は、IgG1のおよそアミノ酸282~438(EUナンバリング)を含み、ここで主な接触部位は、CH2ドメインのアミノ酸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である。従って、本発明のポリペプチドのFc部分は、FcRn結合部分を含んでもよいし、またはそれからなってもよい。FcRn結合部分は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含んでいる任意のアイソタイプの重鎖に由来し得る。一実施形態では、ヒトアイソタイプIgG1の抗体由来のFcRn結合部分を用いる。別の実施形態では、ヒトアイソタイプIgG4の抗体由来のFcRn結合部分を用いる。

20

30

【0213】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、完全Fc領域の1つ以上の定常領域ドメインを欠き、すなわち、それらのドメインは部分的にまたは完全に欠失されている。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、完全CH2ドメインを欠く(Δ CH2構築物)。当業者は、このような構築物が、抗体の異化速度に対するCH2ドメインの調節特性に起因して好ましい場合があることを理解する。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、IgG₁ヒト定常領域ドメインをコードするベクター(例えば、IDEC Pharmaceuticals, San Diego由来)由来のCH2ドメイン欠失Fc領域を含む(例えば、WO02/060955A2およびWO02/096948A2を参照のこと)。この例示的なベクターは、CH2ドメインを欠失するように操作されて、ドメイン欠失のIgG₁定常領域を発現する合成ベクターを提供する。これらの例示的な構築物は好ましくは、結合CH3ドメインを直接それぞれのFcドメインのヒンジ領域に融合するように操作される。

40

【0214】

他の構築物では、2つ以上の構成要素Fc部分の間にスペーサー部分を提供することが所望され得る。例えば、スペーサー部分は、ヒンジ領域とCH2ドメインとの間、および/またはCH2とCH3ドメインとの間に配置されてもよい。例えば、適合する構築物が、発現されてもよく、ここではCH2ドメインが欠失されており、残りのCH3ドメイン

50

(合成または非合成の)が5～20アミノ酸のスペーサー部分を有するヒンジ領域に連結される。このようなスペーサー部分は、例えば、定常ドメイン領域の調節性エレメントが遊離のままであり、かつアクセス可能であること、またはヒンジ領域が可塑性のままであることを保証するために追加され得る。好ましくは、本発明と適合する任意のリンカーペプチドは、比較的非免疫原性であり、かつs c F c領域の適切な折り畳みを妨げることはない。

【0215】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、二量体のF c領域であって、同じかまたは実質的に同じ配列組成のF c部分を含んでいるF c領域を含んでもよい(本明細書においては、「ホモ二量体F c領域」と呼ばれる)。他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、二量体F c領域であって、配列組成が異なっている少なくとも2つのF c部分を含むF c領域を含んでもよい(すなわち、本明細書においては「ヘテロ二量体F c領域」と呼ばれる)。1つの例示的な実施形態では、ヘテロ二量体F c領域は、第一のF c部分にアミノ酸置換を含む(例えば、EUの位置297でのアスパラギンのアミノ酸置換)が、第二のF c部分には含まない。

【0216】

特定の実施形態では、F c領域は、半グリコシル化される。例えば、ヘテロマーのs c F c領域は、第一の、グリコシル化された、F c部分(例えば、グリコシル化されたCH2領域)および第二の、非グリコシル化された、F c部分(例えば、非グリコシル化されたCH2領域)を含んでもよく、ここでリンカーは、グリコシル化された部分と非グリコシル化されたF c部分との間に差し込まれる。他の実施形態では、F c領域は、完全にグリコシル化され、すなわち、全てのF c部分がグリコシル化されている。なおさらなる実施形態では、F c領域は、非グリコシル化されてもよく、すなわち、グリコシル化されているF c部分はない。

【0217】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドで使用されるF c部分は、例えば、アミノ酸変異体(例えば、付加、欠失、または置換)によって変更される。例えば、一実施形態では、F c部分は、そのF c部分が由来する野性型F cと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。例えば、ここで、このF c部分は、ヒトIgG1抗体由来であり、改変体は、ヒトIgG1のF c領域の対応する位置での野性型アミノ酸に比較して少なくとも1つのアミノ酸変異(例えば、置換)を含む。

【0218】

F c改変体のアミノ酸置換(単数または複数)は、その残基が抗体中のF c領域で与えられる位置の数(EUナンバリング習慣を用いて示されるような)に対応するとされるF c部分内の位置に位置してもよい。当業者は、F c部分における位置にどのEU番号が対応するかを決定するために容易にアラインメントを作製し得る。

【0219】

一実施形態では、F c改変体は、ヒンジドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置で置換を含む。別の実施形態では、F c改変体は、CH2ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置で置換を含む。別の実施形態では、F c改変体は、CH3ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置で置換を含む。別の実施形態では、F c改変体は、CH4ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸位置で置換を含む。

【0220】

特定の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、2つ以上のアミノ酸置換を含むF c改変体を含む。本発明のポリペプチドは、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上のアミノ酸置換を含んでもよい。好ましくは、アミノ酸置換は、少なくとも1アミノ酸部分、またはそれ以上、例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上というアミノ酸位置、またはそれ以上の間隔で互いに空間的に位置する。より好ましくは、操作されたアミノ酸は、少なくとも5、10、15、20、または25のアミノ酸位置、またはそれ以上

の間隔で互いに離れて空間的に位置する。

【0221】

特定の実施形態においては、Fc 改変体は、このような野生型 Fc ドメインを含む Fc 領域によって付与された少なくとも 1 つのエフェクター機能の変化（例えば、Fc レセプター（例えば、Fc γ RI、Fc γ RII、もしくは Fc γ RIII）、または補体タンパク質（例えば、C1q）に結合するか、または抗体依存性細胞毒性（ADCC）、食作用、もしくは補体依存性細胞毒性（CDC）を誘引する Fc 領域の能力の改善または低下）を付与する。他の実施形態では、Fc 改変体は、遺伝子操作されたシステイン残基を提供する。

【0222】

本発明のポリペプチドは、エフェクター機能および／または FcR もしくは FcRn 結合における変化（例えば、増強または減少）を付与することが公知である当該分野で認識される Fc 改変体を使用し得る。詳細には、本発明の結合分子は、例えば、国際公開 WO 88/07089 A1、WO 96/14339 A1、WO 98/05787 A1、WO 98/23289 A1、WO 99/51642 A1、WO 99/58572 A1、WO 00/09560 A2、WO 00/32767 A1、WO 00/42072 A2、WO 02/44215 A2、WO 02/060919 A2、WO 03/074569 A2、WO 04/016750 A2、WO 04/029207 A2、WO 04/035752 A2、WO 04/063351 A2、WO 04/074455 A2、WO 04/099249 A2、WO 05/040217 A2、WO 04/044859、WO 05/070963 A1、WO 05/077981 A2、WO 05/092925 A2、WO 05/123780 A2、WO 06/019447 A1、WO 06/047350 A2、および WO 06/085967 A2；米国特許出願公開第 2007/023132 号、米国特許出願公開第 2007/023132 号、米国特許出願公開第 2007/023776 号、米国特許出願公開第 2007/023776 号、米国特許出願公開第 2007/023776 号、米国特許出願公開第 2007/024318 号、米国特許出願公開第 2007/024860 号、米国特許出願公開第 2007/028685 号、米国特許出願公開第 2008/005705 号；または米国特許第 5,648,260 号；同第 5,739,277 号；同第 5,834,250 号；同第 5,869,046 号；同第 6,096,871 号；同第 6,121,022 号；同第 6,194,551 号；同第 6,242,195 号；同第 6,277,375 号；同第 6,528,624 号；同第 6,538,124 号；同第 6,737,056 号；同第 6,821,505 号；同第 6,998,253 号；同第 7,083,784 号；および同第 7,317,091（各々は、本明細書において参照によって援用される）に開示されるアミノ酸位置のうちの 1 つ以上で変化（例えば、置換）を含んでもよい。一実施形態では、特定の変化（例えば、当該分野で開示される 1 つ以上のアミノ酸の特定の置換）が、開示されるアミノ酸位置のうちの 1 つ以上で作製され得る。別の実施形態では、開示されるアミノ酸位置のうちの 1 つ以上での異なる変化（例えば、当該分野で開示される 1 つ以上のアミノ酸位置の異なる置換）がなされてもよい。

【0223】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、抗体の抗原-非依存性エフェクター機能、詳細には抗体の循環半減期を変化する Fc 部分に対するアミノ酸置換を含む。

【0224】

このようなポリペプチドは、これらの置換を欠くポリペプチドと比較した場合、FcRn への結合の増加または低下のいずれかを示し、従って、それぞれ、血清中の半減期が延長または短縮している。FcRn に対して親和性が改善されている Fc 改変体は、より長い血清半減期を有することが見込まれ、そのような分子は、例えば、慢性疾患または障害を治療するために、投与されたポリペプチドの長い半減期が望ましい場合の哺乳動物を治療するための方法において有用な用途を有する（例えば、米国特許第 7,348,004 号、同第 7,404,956 号および同第 7,862,820 号を参照のこと）。対照的

に、FcRn結合親和性が低下したFc改変体は、より短い半減期を有すると期待され、そのような分子も、例えば、インビボ画像診断、あるいは出発ポリペプチドが、長期に渡って循環に存在する場合に毒性副作用を有する状況など、短い循環時間が有利であり得る哺乳動物への投与において有用である。また、低下したFcRn結合親和性を有するFc改変体はまた、胎盤を通過する可能性もより低くなるため、妊婦における疾患または障害の治療においても有用である。さらに、低下したFcRn結合親和性が望ましい可能性がある他の用途としては、脳、腎臓および／または肝臓での局所化が望ましい場合の用途が挙げられる。1つの例示的な実施形態においては、本発明のポリペプチドは、血管系から腎臓糸球体の上皮を横切る運搬の低下を示す。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、脳から血液脳関門(BBB)を横切る脈管性間隙への運搬の低下を示す。一実施形態においては、変化したFcRn結合を有するポリペプチドは、Fc部分の「FcRn結合ループ」内に1つ以上のアミノ酸置換を有する少なくとも1つのFc部分(例えば、1つまたは2つのFc部分)を含む。FcRn結合ループは、野生型の完全長Fc部分のアミノ酸残基280~299(EUナンバリングによる)から構成される。他の実施形態においては、変化したFcRn結合親和性を有する本発明のポリペプチドは、15ÅのFcRn「接触ゾーン」内に1つ以上のアミノ酸置換を有する少なくとも1つのFc部分(例えば、1つまたは2つのFc部分)を含む。本明細書において用いられる場合、15ÅのFcRn「接触ゾーン」という用語は、以下の野生型完全長Fc部分の位置にある残基を含む: 243~261、275~280、282~293、302~319、336~348、367、369、372~389、391、393、408、424、425~440(EUナンバリング)。好ましい実施形態においては、変化したFcRn結合親和性を有する本発明のポリペプチドは、以下のEU位置のいずれか1つに対応するアミノ酸位置に1つ以上のアミノ酸置換を有する少なくとも1つのFc部分(例えば、1つまたは2つのFc部分)を含む: 256、277~281、283~288、303~309、313、338、342、376、381、384、385、387、434(例えば、N434AまたはN434K)、および438。FcRn結合活性を変化させた例示的なアミノ酸置換は、国際公開WO05/047327号に開示され、この内容は、参照によって、本明細書に援用される。

【0225】

本発明のポリペプチドはまた、ポリペプチドのグリコシル化を変更する当該分野で認識されるアミノ酸置換を含み得る。例えば、結合ポリペプチドのscFc領域は、グリコシル化の低下をもたらす変異を有するFc部分を含んでもよい(例えば、N-連結またはO-連結のグリコシル化)、または野性型Fc部分の変更された糖型(例えば、低フコースまたはフコースなしのグリカン)を含んでもよい。

【0226】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、溶媒露出表面に位置する、遺伝子操作されたシステイン残基またはそのアナログを有する少なくとも1つのFc部分を含む。好ましくは、遺伝子操作されたシステイン残基またはそのアナログは、scFc領域によって付与されるエフェクター機能を妨害しない。さらに好ましくは、この変更は、scFc領域がFcレセプター(例えば、FcγRI、FcγRII、またはFcγRIII)または補体タンパク質(例えば、C1q)に結合する能力、または免疫エフェクター機能(例えば、抗体依存性細胞毒性(ADCC)、食作用、または補体依存性細胞毒性(CDCC))を誘発する能力を妨害しない。

【0227】

一実施形態では、本発明のプロセッシングされていないポリペプチドは、遺伝子的に融合されたFc領域(すなわち、scFc領域)であって、本明細書に記載されるFc部分から独立して選択されるその構成要素Fc部分の2つ以上を有する領域を含み得る。一実施形態では、二量体Fc領域のFc部分は同じである。別の実施形態では、Fc部分の少なくとも2つは異なる。例えば、本発明のポリペプチドのFc部分は、同じ数のアミノ酸残基を含むか、またはそれらは、1つ以上のアミノ酸残基ずつ長さが異なり得る(例えば、

約 5 アミノ酸残基（例えば、1、2、3、4、または 5 アミノ酸残基）、約 10 残基、約 15 残基、約 20 残基、約 30 残基、約 40 残基、または約 50 残基ずつ）。さらに他の実施形態では、本発明のポリペプチドの Fc 部分は、1 つ以上のアミノ酸位置で配列が異なってもよい。例えば、少なくとも 2 つの Fc 部分が、およそ 5 アミノ酸位置（例えば、1、2、3、4、または 5 アミノ酸位置）、約 10 位置、約 15 位置、約 20 位置、約 30 位置、約 40 位置、または約 50 位置）で異なり得る。

【0228】

VI. ポリペプチドリinker

本明細書において用いる場合、「ポリペプチドリinker」という用語は、ポリペプチド鎖の直鎖状アミノ酸配列における 2 つのドメインを接続するペプチドまたはポリペプチド配列（例えば、合成のペプチドまたはポリペプチド配列）を指す。本発明のポリペプチドは、構築物を作製する 2 つの Fc 部分を直接または間接的に接続するポリペプチドリinkerをコードする核酸分子によってコードされる。これらのリンカーは、本明細書においては「scFcリンカー」と呼ばれる。scFcリンカーが 2 つの Fc 部分を連続して直鎖状ポリペプチド配列で接続する場合、これは、「直接」連結である。対照的に、scFcリンカーは、結合部分に対して第一の Fc 部分を連結し得、これが次に、第二の Fc 部分に連結され、それによって間接的な連結が形成される。これらの scFcリンカー（L）は、単鎖の遺伝子的構築物の形成を生じる。しかし、一実施形態では、scFcポリペプチドはまた、酵素的切断部位を含み、これによって scFcリンカーは切断性（cscFcリンカー）になり、一実施形態では、実質的には切除される（例えば、細胞によるプロセシングの間）。従って、プロセシングされた分子は、二量体分子であって、少なくとも 2 つのアミノ酸鎖を含み、かつ実質的に外因性のリンカーアミノ酸配列を欠いている二量体分子である。いくつかの実施形態では、全てのまたは実質的に全てのリンカーが切り出されるが、いくつかの実施形態では、切断部位の一部、例えば、RRRR切断部位の 4 つのアルギニンが残る場合がある。

【0229】

別の実施形態では、本明細書においては「スペーサー」と呼ばれる別の種類のポリペプチドリinkerを用いて、異なる部分、例えば、凝固因子または標的部分を Fc 部分に接続してもよい。この種のポリペプチドリinkerは、ポリペプチド分子に対して可塑性を提供し得る。スペーサーは一般的には切断されないが、このような切断は所望され得る。スペーサーの例示的な位置は、添付の図面に示される。スペーサーは、凝固因子、標的化部分、および／または足場の間に、例えば、これらの部分の N 末端または C 末端に位置してもよい。一実施形態では、これらのリンカーは、プロセシングの間に除去されない。

【0230】

本発明のキメラの凝固因子に存在し得る第三種のリンカーは、切断部位（例えば、第 XIa 因子、Xa、またはトロンビン切断部位）を含み、かつ追加のスペーサーリンカーを、切断部位の N 末端もしくは C 末端のいずれかまたは両側の上に含み得る切断性（切断可能）リンカーである。これらの切断性リンカーは、凝固因子に組み込まれた場合、異種切断部位を有するキメラ分子を生じる。このような部位の例示的な位置は、添付の図面に示されており、これには、例えば、標的部位に対する隣接が挙げられる。別の実施形態では、このようなリンカーは、凝固因子またはその一部に隣接してもよい。例えば、一実施形態では、切断性のリンカーは、凝固因子の重鎖の N 末端に融合されて、この凝固因子の活性化可能な形態を作製し得る。このような場合、この切断性のリンカーは、その切断部位の N 末端で追加のスペーサーリンカーを含んでもよいが、その凝固因子の重鎖のアミノ末端に対する切断部位の C 末端での直接融合を必要とする。

【0231】

一実施形態では、本発明のプロセシングされていないポリペプチドは、単一のポリペプチド鎖に含まれる Fc 領域を形成するように cscFcリンカーを介して連結される 2 つ以上の Fc ドメインまたは部分を含む。cscFcリンカーは、少なくとも 1 つの酵素的切断部位、例えば、細胞内酵素によるプロセシングのための部位に隣接する。少なくとも

1つの酵素的切断部位でのポリペプチドの切断は、少なくとも2つのポリペプチド鎖を含むポリペプチドを生じる。一実施形態では、c s c F c リンカーは、F 1 または F 2 を、例えば、凝固因子に、必要に応じて切断部位を介して連結する。

【0232】

上記で示されるとおり、他のポリペプチドリinkerは必要に応じて、例えば、凝固因子または標的部分をF c 部分に接続するために、本発明の構築物中で用いられ得る。ある種のポリペプチドリinkerは、本明細書においてはスペーサーと呼ばれる。本発明と関連して用いられ得るスペーサーのいくつかの例示的な位置としては、例えば、添付の図面に示され、下にさらに詳細に記載されるアミノ酸などのG l y S e r アミノ酸を含むポリペプチドが挙げられる。一実施形態では、スペーサーは、各々が独立して、凝固因子、足場部分、例えば、F c、切断部位、および標的部分から選択される1つ以上の部位に隣接してもよい。

【0233】

一実施形態では、ポリペプチドリinkerは合成であり、すなわち、天然には存在しない。一実施形態では、ポリペプチドリinkerとしては、ペプチド（またはポリペプチド）（これは天然に存在しても、または天然には存在しなくてもよい）が挙げられ、これはアミノ酸の第一の直鎖状配列を、これが天然には連結されていないし、または事実上遺伝子的に融合されてもいない、アミノ酸の第二の直鎖状配列に連結するかまたは遺伝子的に融合する、アミノ酸配列を含む。例えば、一実施形態ではこのポリペプチドリinkerは、天然に存在するポリペプチドの改変型である（例えば、付加、置換または欠失などの変異を含んでいる）、天然には存在しないポリペプチドを含んでもよい。別の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、天然には存在しないアミノ酸を含んでもよい。別の実施形態では、このポリペプチドリinkerは、天然には生じない直鎖状配列に存在する天然に存在するアミノ酸を含んでもよい。さらに別の実施形態では、このポリペプチドリinkerは、天然に存在するポリペプチド配列を含んでもよい。

【0234】

例えば、特定の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、同一のF c 部分を融合し、それによってホモマーのs c F c 領域を形成するために用いられ得る。他の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、異なるF c 部分（例えば、野性型F c 部分およびF c 部分改変体）を融合し、それによってヘテロマーのs c F c 領域を形成するために用いられ得る。

【0235】

別の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、g l y - s e r リンカーを含むか、またはそれらからなる。一実施形態では、s c F c または c s c F c リンカーは、免疫グロブリンヒンジの少なくとも一部およびg l y - s e r リンカーを含む。本明細書において用いる場合、「g l y - s e r リンカー」という用語は、グリシンおよびセリン残基からなるペプチドを指す。例示的なg l y / s e r リンカーは、式 (G l y₄ S e r)_n（配列番号4）のアミノ酸配列を含み、ここでnは正の整数である（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）。好ましいg l y / s e r リンカーは、(G l y₄ S e r)₂（配列番号29）、(G l y₄ S e r)₄（配列番号6）、または(G l y₄ S e r)₆（配列番号5）である。別の例示的なg l y - s e r リンカーは、G G G S S G G G S G（配列番号30）である。特定の実施形態では、このようなg l y - s e r リンカーは、ポリペプチドリinkerの2つの他の配列（例えば、本明細書に記載される任意のポリペプチドリinker配列）の間に挿入され得る。他の実施形態では、g l y - s e r リンカーは、ポリペプチドリinkerの別の配列（例えば、本明細書に記載される任意のポリペプチドリinker配列）の一方または両端に結合される。さらに他の実施形態では、2つ以上のg l y - s e r リンカーが、ポリペプチドリinkerに連続して差し込まれる。一実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、上部ヒンジ領域の少なくとも一部（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4分子由来）、中央ヒンジ領域の少なくとも一部（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4分子）および一連のg l y / s e r アミノ酸残基（例えば、(G l y₄ S e r)_n）（配列番号4）のよう

10

20

30

40

50

な g l y / s e r リンカー) を含む。

【0236】

本発明のポリペプチドリinkerは、少なくとも1アミノ酸長であり、かつ変化する長さのアミノ酸であってもよい。一実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、約1～約50アミノ酸長である。この文脈で用いる場合、「約」という用語は、+/-2つのアミノ酸残基を示す。リンカー長は、正の整数でなければならないので、約1～約50アミノ酸長という長さは、1-3～48-52アミノ酸長という長さを意味する。別の実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、約10-20アミノ酸長である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、約15～約50アミノ酸長である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、約20～約45アミノ酸長である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、約15～約35または約20～約30アミノ酸長である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドリinkerは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、または60アミノ酸長である。一実施形態では、本発明のペプチドリinkerは、20または30アミノ酸長である。

10

【0237】

ポリペプチドリinkerは、当該分野で公知の技術を用いてポリペプチド配列に導入され得る。改変は、DNA配列分析によって確認され得る。プラスミドDNAを用いて、産生されるポリペプチドの安定な産生のために宿主細胞を形質転換してもよい。

20

【0238】

V I I I . 酵素的切断部位

一実施形態では、1つ以上の酵素的切断部位(単数または複数)が、本発明のプロセシングされていないポリペプチドのc s c F c リンカー(L)に連結され、例えば、横にあるか、または隣接される。このような切断部位は、c s c F c リンカーの上流もしくは下流、またはその両方であってもよい。例えば、本発明のポリペプチドをコードする構築物の一実施形態では、切断部位は、c s c F c リンカー(L)の一端または両端に対して(例えば、直接または間接的に)連結される。

【0239】

例えば、一実施形態では、本発明の核酸分子は、以下の式によって示されるポリペプチドを規定する：

30



【0240】

アミノ末端からカルボキシル末端の直鎖状配列では、Aは存在する場合、凝固因子またはその一部であり、F1は第一のFc部分またはドメインであり、P1は酵素的切断部位であり、Lはc s c F c リンカーであり、P2は酵素的切断部位Bであり、存在するならば、凝固因子またはその一部であり、F2は第二のFc部分またはドメインであり、かつ「-」は、ペプチド結合である。式(I)は、少なくともAまたはB、必要に応じてその両方を含む。AおよびBは、両方が存在する場合、凝固因子の対応する重鎖および軽鎖であり得る。式(I)は、少なくともP1またはP2、および必要に応じて両方を含む。P1およびP2は、両方が存在する場合、同じであっても異なってもよい。式(I)は、少なくともF1およびF2を含む。F1およびF2は、両方とも存在する場合、同じであっても異なってもよい。

40

【0241】

別の実施形態では、第XIa因子または第Xa因子の切断部位は、本発明の構築物中に、例えば、切断性のリンカーに組み込まれてもよい。例示的なFXIa切断部位は、例えば、TQSFNDFTRおよびSVSQTSKLTTRを含む。例示的なトロンビン切断部位は、例えば、DFLAEGGGVR、TTKIKPR、LVPRG配列番号35)およびALRPRVVGAを含む。他の有用な切断部位が当該分野で公知である。

【0242】

50

一実施形態では、このリンカーのいくつかの部分は、少なくとも1つの酵素的切断部位で切断後に残る場合がある。外因性のアミノ酸配列の存在を最小化するために、2つの切断部位が、本発明のポリペプチド中に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、全てのまたは実質的に全てのリンカーが切除されるが、いくつかの実施形態では、切断部位の一部、例えば、RRRR切断部位の4つのアルギニンが残る場合がある。

【0243】

ポリペプチドの調製

本発明のキメラの凝固因子を組み換え的に産生するには種々の方法が利用可能である。一実施形態では、本発明は、本発明のキメラのタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸構築物に関する。コードの縮重性のおかげで、種々の核酸配列は、ポリペプチドのアミノ酸配列をコードすることが理解される。所望のポリヌクレオチドは、新規の固相DNA合成によって、または初期に調製したポリヌクレオチドのPCR突然変異誘発によって産生され得る。

【0244】

オリゴヌクレオチド媒介性の突然変異誘発は、アミノ酸置換をコードするコドン（例えば、Fc改変体部分へ）導入するための置換、インフレーム挿入または変更（例えば、変更されたコドン）を調製するための1方法である。例えば、出発ポリペプチドDNAは所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを一本鎖のDNAテンプレートにハイブリダイズすることによって変更される。ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼを用いて、オリゴヌクレオチドプライマーに組み込むテンプレートの全体的な第二の相補的な鎖を合成する。一実施形態では、遺伝子操作、例えば、プライマーベースのPCR突然変異誘発が、本明細書に記載されるように、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを産生するために、変更を組み込むために十分である。

【0245】

組み換え産生のために、キメラのタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を適切な発現ビヒクル、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳のために必須の要素を含むベクター、またはRNAウイルスベクターの場合は、複製および翻訳のために必須の要素を含むベクター中に挿入する。

【0246】

キメラのタンパク質をコードする核酸を、適切なリーディングフレーム中でベクターに挿入する。次いで、この発現ベクターを、ポリペプチドを発現する適切な標的細胞中にトランスフェクトする。当該分野で公知のトランスフェクション技術としては、限定するものではないが、リン酸カルシウム沈殿（Wiglerら、1978, Cell 14: 725）およびエレクトロポレーション（Neumannら、1982, EMBO, J. 1: 841）が挙げられる。種々の宿主発現ベクター系を利用して、真核生物細胞中で、本明細書に記載のキメラのタンパク質を発現してもよい。一実施形態では、真核生物細胞は、動物細胞であり、これには哺乳動物細胞（例えば、293細胞、PerC6、CHO、BHK、Cos、HeLa細胞）が挙げられる。キメラのタンパク質が、真核生物細胞で発現される場合、キメラのタンパク質をコードするDNAはまた、キメラのタンパク質が分泌されることを可能にするシグナル配列をコードしてもよい。当業者は、タンパク質は翻訳されるが、シグナル配列は細胞によって切断されて成熟キメラタンパク質が形成されることを理解する。種々のシグナル配列、例えば、天然の第VII因子シグナル配列、天然の第IX因子シグナル配列およびマウスIgK軽鎖シグナル配列が当該分野で公知である。あるいは、シグナル配列がキメラのタンパク質に含まれない場合、細胞を溶解することによって回収され得る。

【0247】

本発明のキメラのタンパク質は、げっ歯類、ヤギ、ヒツジ、ブタまたはウシのようなトランスジェニック動物で合成されてもよい。「トランスジェニック動物」という用語は、それらのゲノム中へ外来の遺伝子を組み込んでいる非ヒト動物を指す。この遺伝子は、生殖細胞系列の組織に存在するので、この遺伝子は親から子孫に受け継がれる。外因性の遺

伝子は、単一細胞の胚に導入される (Brinsterら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438)。免疫グロブリン分子を産生するトランスジェニックを含む、トランスジェニック動物を産生する方法は当該分野で公知である (Wagnerら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376; McKnightら、1983, Cell 34:335; Brinsterら、1983, Nature 306:332; Ritchieら、1984, Nature 312:517; Baldassarreら、2003, Theriogenology 59:831; Roblら、2003, Theriogenology 59:107; Malassagneら、2003, Xenotransplantation 10(3):267)。

10

【0248】

発現ベクターは、組み換え的に産生されたタンパク質の容易な精製または特定を可能にするタグをコードしてもよい。例としては、限定するものではないが、ベクター pUR278 (Rutherfordら、1983, EMBO J. 2:1791) が挙げられ、ここでは本明細書に記載されるキメラのタンパク質をコードする配列を、ハイブリッドタンパク質が産生されるように、lacZコード領域とともにインフレームでベクター中に連結してもよい; pGEXベクターを用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) タグを有するタンパク質を発現してもよい。これらのタンパク質は通常、可溶性であり、かつグルタチオン-アガロースビーズに対する吸着によって、続いて、遊離のグルタチオンの存在下での溶出によって細胞から容易に生成され得る。このベクターは、精製後のタグの容易な除去のための切断部位を含む (例えば、PreCission Protease (Pharmacia, Peapack, N. J.))。

20

【0249】

本発明の目的のために、多数の発現ベクター系を使用してもよい。これらの発現ベクターは典型的には、宿主生物体中で、エピソームとして、または染色体DNAの一体部分として、複製可能である。発現ベクターは、発現制御配列を含んでもよく、この配列には限定するものではないが、プロモーター (例えば、天然に会合するかまたは異種のプロモーター)、エンハンサー、シグナル配列、スプライスシグナル、エンハンサーエレメント、および転写末端配列を含む。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし得るベクター中の真核生物プロモーター系である。発現ベクターはまた、ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクチニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス (RSV、MMTVまたはMOMLV)、サイトメガロウイルス (CMV)、またはSV40ウイルスのような動物ウイルス由来のDNAエレメントを利用し得る。他には、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロン性の系の使用を包含する。

30

【0250】

通常は、発現ベクターは、選択マーカー (例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性またはネオマイシン耐性) を含んで、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にする (例えば、Itakuraら、米国特許第4,704,362号を参照のこと)。DNAをそれらの染色体に組み込んでいる細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択され得る。このマーカーは、栄養要求性宿主への原栄養性、殺生物剤耐性 (例えば、抗生物質)、または銅などの重金属に対する耐性を提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、発現されるべきDNA配列に直接結合されてもよいし、または同時形質転換によって同じ細胞に導入されてもよい。

40

【0251】

好ましい発現ベクターは、NEOSPLAである (米国特許第6,159,730号)。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー、マウスβグロビン主要プロモーター、SV40複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエキソン1およびエキソン2、ジヒドロ葉酸還元酵素遺

50

伝子およびリーダー配列を含む。このベクターは、可変および定常領域遺伝子の組み込み、細胞中のトランスフェクション、その後のG418含有培地中での選択およびメトトレキサート増幅の際に極めて高レベルの抗体発現を生じることが見出された。ベクター系はまた、米国特許第5,736,137号および同第5,658,570号（その各々がその全体が本明細書において参照によって援用される）に教示される。この系は、高い発現レベル、例えば、 $>30\text{ pg/細胞/日}$ を提供する。他の例示的なベクター系は、例えば、米国特許第6,413,777号に開示される。

【0252】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、ポリシストロン性の構築物を用いて発現され得る。これらの発現系では、本発明の複数の遺伝子産物、例えば、多量体結合タンパク質の複数のポリペプチドが、単一のポリシストロン性構築物から産生され得る。これらの系は有利には、内部リボソーム進入部位（IRES）を用いて、本発明の比較的高レベルのポリペプチドを真核生物宿主細胞に提供する。適合性のIRES配列は、本明細書にこれも援用される米国特許第6,193,980号に開示される。当業者は、このような発現系を用いて、本出願に開示されるポリペプチドの全範囲を効率的に生成し得ることを理解する。

【0253】

さらに一般的には、ポリペプチドをコードするベクターまたはDNA配列を一旦調製すれば、この発現ベクターを適切な宿主細胞中に導入してもよい。すなわち、宿主細胞を形質転換してもよい。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当業者に周知の種々の技術によって達成され得る。これらとしては限定するものではないが、トランスフェクション（電気泳動およびエレクトロポレーションを含む）、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープDNAによる細胞融合、マイクロインジェクションおよびインタクトなウイルスでの感染が挙げられる。Ridgway, A. A. G. 「Mammalian Expression Vectors」第24.2章, 470-472頁 Vectors, RodriguezおよびDenhardt, 編集. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)を参照のこと。最も好ましくは、宿主細胞へのプラスミド導入は、エレクトロポレーションを介する。この形質転換された細胞は、軽鎖および重鎖の産生に対して適切な条件下で増殖され、重鎖および／または軽鎖のタンパク質合成についてアッセイされる。例示的なアッセイ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、または蛍光活性化された細胞分取分析（FACS）、免疫組織化学などが挙げられる。

【0254】

本明細書において用いる場合、「形質転換」という用語は、遺伝子型を変化し、結果としてレシピエント細胞の変化を生じる、レシピエントの宿主細胞へのDNAの導入を指して広義に用いられるものである。

【0255】

これらの同じ表現によれば、「宿主細胞」とは、組み換えDNA技術を用いて構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードしているベクターで形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からのポリペプチドの単離のためのプロセスの説明では、「細胞」および「細胞培養物」という用語は、交換可能に用いられて、明らかに他を特定するのではない限り、ポリペプチドの供給源を指す。言い換えれば、「細胞」からのポリペプチドの回収とは、スピンドウンした細胞全体から、または培地および懸濁細胞の両方を含む細胞培養物からのいずれを意味してもよい。

【0256】

タンパク質発現のために用いられる宿主細胞は、哺乳動物由来の細胞が最も好ましい；当業者は、所望の遺伝子産物をその中で発現させるのに最適の特定の宿主細胞株を優先的に決定する能力を承知している。例示的な宿主細胞株としては、限定するものではないが、DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣株、DHFマイナス）、HELA（ヒト子宮頸癌）、CV1（サル腎臓株）、COS（SV40のT抗原を有する

CVIの誘導体)、R1610(チャイニーズハムスター線維芽細胞)BALBc/3T3(マウス線維芽細胞)、HAK(ハムスター腎臓株)、SP2/O(マウス骨髓腫)、P3.times.63-Ag3.653(マウス骨髓腫)、BFA-1c1BPT(ウシ内皮細胞)、RAJI(ヒトリンパ球)、PerC6、および293(ヒト腎臓)が挙げられる。宿主細胞株は通常は、商業的供給源、American Tissue Culture Collectionから、または公表文献から入手可能である。

【0257】

一実施形態では、宿主細胞は、成熟ポリペプチドを形成するためのプロセシングの間にscFリンカー(例えば、このようなリンカーが存在する場合、細胞内プロセシング部位(単数または複数)を含む)を切断するために必要な酵素(単数または複数)を内因性に発現する。このプロセシングの間、scFリンカーは、外因性のアミノ酸の存在を減少するために実質的に除去され得る。本発明の別の実施形態では、宿主細胞を形質転換して、細胞に対して外因性である1つ以上の酵素を発現し、その結果scFリンカーのプロセシングが生じるかまたは改善される。

【0258】

一実施形態では、細胞によって内因性にまたは外因性に発現され得る酵素は、酵素のフリファミリーのメンバーである。ヒトフリ(すなわち、PACE)の完全cDNAおよびアミノ酸配列は、1990.Van den Ouweland A Mら、(1990)Nucleic Acids Res.18:664;Erratum in:Nucleic Acids Res.18:1332(1990)に公表されている。

【0259】

Barrらに発行された米国特許第5,460,950号は、組み換えPACEおよびPACEと異種タンパク質の基質前駆体ポリペプチドとの同時発現(活性な成熟異種タンパク質の発現を改善する)を記載する。

【0260】

van de Venら、に発行された米国特許第5,935,815号は同様に、組み換えヒトフリ(すなわち、PACE)およびフリと異種タンパク質の基質前駆体ポリペプチドとの同時発現(活性な成熟異種タンパク質の発現を改善する)を記載する。この特許で開示される、潜在的な基質前駆体としては、第IX因子の前駆体が挙げられる。PACEに加えて、哺乳動物フリ/サブチリシン/Kex2p様プロタンパク質転換酵素(PC)ファミリーの他のメンバーは、PC1/PC3、PC2、PC4、PC5/6(本明細書において以降では単にPC5と呼ぶ)、PACE4、およびLPC/PC7/PC8/SPC7を包含すると報告されている。これらの種々のメンバーは、特定の保存された全体的な構造特徴を共有するが、それらは、組織分布、細胞内の局在、切断特性、および好ましい基質が異なる。概説については、Nakayama K(1997)Biochem J.327:625-35を参照のこと。PACEと同様に、これらのプロタンパク質転換酵素は一般には、アミノ末端から開始して、シグナルペプチド、プロペプチド(自己触媒的に切断され得る)、サブチリシン様触媒ドメイン(Asp、His、Ser、およびAsn/Asp残基によって特徴付けられる)、およびHomoBドメイン(これも本質的に触媒活性に必須であり、かつArg-Gly-Asp(RGD)配列によって特徴付けられる)を含む。PACE、PACE4、およびPC5はまた、Cysリッチなドメイン(機能は未知である)を含む。さらに、PC5は、膜貫通ドメインの有無のアイソフォームを有し;これらの異なるアイソフォームは、それぞれPC5BおよびPC5Aとして公知である。PACEの触媒性ドメインのアミノ酸配列とこのプロタンパク質転換酵素のファミリーの他のメンバーの触媒性ドメインのアミノ酸配列との間の比較によって以下の同一性程度が明らかになる:PC4について70パーセント;PACE4およびPC5について65パーセント;PC1/PC3について61パーセント;PC2について54パーセント;およびLPC/PC7/PC8/SPC7について51パーセント。Nakayama K(1997)Biochem J.327:625-35。

【0261】

P A C EおよびP A C E 4は、部分的に重複するが別個の基質を有することが報告された。具体的には、P A C E 4は、P A C Eとは著しく対照的に、F I Xの前駆体ポリペプチドを処理できないことが報告された。Wasley L Cら、(1993) J Biol Chem. 268:8458~65; Rehemtulla Aら、(1993) Biochemistry. 32:11586-90。

【0262】

Seidahらに発行された米国特許第5,840,529号は、ヒトPC7のヌクレオチドおよびアミノ酸配列、ならびに他のPCファミリーメンバーと比較してPC7がHIV gp160をgp120およびgp41に切断する顕著な能力を開示する。

【0263】

げっ歯類PC5のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、最初、Lusson Jら、(1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6691-5によってPC5として、およびNakagawa Tら、(1993) J Biochem (Tokyo) 113:132-5によってPC6として記載された。Dayらに発行された米国特許第6,380,171号は、膜貫通ドメインのないアイソフォームであるヒトPC5Aのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を開示する。これらの酵素の配列およびそのクローニング方法は当該分野で公知である。

【0264】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子はまた、細菌または酵母または植物の細胞などの非哺乳動物細胞中で発現され得る。この関連では、細菌のような種々の単細胞の非哺乳動物微生物がまた形質転換され得ることも理解される；すなわち、それらは、培養物またはファーマンテーション中で増殖可能である。形質転換し易い細菌としては、腸内細菌科のメンバー、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) またはサルモネラ属の株；*Bacillus subtilis*のようなバシラス科；肺炎球菌；連鎖球菌、およびインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) が挙げられる。細菌において発現される場合、ポリペプチドは、通常、封入体の一部となることがさらに認識される。このポリペプチドは、単離、精製され、その後、機能分子に組み立てられなければならない。

【0265】

原核生物に加えて、真核生物微生物もまた用いられてもよい。*Saccharomyces cerevisiae*、または一般的なパン酵母は真核生物微生物の中でも最も一般的に用いられるが、多数の他の株が共通して利用可能である。

サッカロミセス属での発現のためには、プラスミドYRp7が、例えば、(Stinchcombら、Nature, 282:39 (1979); Kingsmanら、Gene, 7:141 (1979); Tschemperら、Gene, 10:157 (1980)) 共通して用いられる。このプラスミドは既に、トリプトファン中で増殖する能力を欠いている酵母の変異体株の選択マーカーを提供するTRP1遺伝子、例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)) を含む。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてtrp1損傷の存在によって、トリプトファンの非存在下での増殖によって形質転換を検出するための有効な環境が得られる。

Pichiaのような他の酵母宿主もまた使用されてもよい。酵母発現ベクターは、発現制御配列 (例えば、プロモーター)、複製起点、終止配列などを必要に応じて有する。典型的なプロモーターとしては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の糖分解酵素が挙げられる。誘導性の酵母プロモーターとしては、とりわけ、アルコール脱水素酵素、イソチトクロムC、ならびにメタノール、マルトースおよびガラクトース利用を担う酵素が挙げられる。

【0266】

あるいは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、トランスジェニック動物のゲノムへの導入およびトランスジェニック動物の乳中へのその後の発現のために導入遺伝

10

20

30

40

50

子に組み込まれ得る（例えば、De boerら、米国特許第5,741,957号、Rosen, 米国特許第5,304,489号、およびMeadeら、米国特許第5,849,992号を参照のこと）。適切な導入遺伝子としては、カゼイン、またはβラクトグロブリンのような乳腺特異的遺伝子由来のプロモーターおよびエンハンサーと作動可能に連結しているポリペプチドのコード配列が挙げられる。

【0267】

インビトロの産生によって、大量の所望のポリペプチドを得るための大規模化が可能になる。組織培養条件下での哺乳動物細胞培養のための技術は、当該分野で公知であり、かつ同種の懸濁培養物を、例えば、エアリフトリアクター中に、もしくは連続スターラーリアクター中に、または固定されるかもしくは取り込まれた細胞培養物を、例えば、中空ファイバー、マイクロカプセル中に、アガロースマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ上に包含する。必要および／または所望の場合、ポリペプチドの溶液は、慣習的なクロマトグラフィー方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAEセルロースまたは（イムノー）アフィニティークロマトグラフィー上でのクロマトグラフィーによって、例えば、合成のヒンジ領域ポリペプチドの優先的な生合成後、または本明細書に記載されるHICクロマトグラフィーの前にもしくは後に精製されてもよい。アフィニータグ配列（例えば、His（6）タグ）は必要に応じて、下流の精製を容易にするためにポリペプチド配列に結合されてもまたはその中に含まれてもよい。

【0268】

一実施形態では、本発明の宿主細胞は、scFcリンカー足場を含むポリペプチドをコードする遺伝子構築物、およびcscFcリンカーをプロセシングし得る1つ以上の酵素を含む。この構築物および酵素（単数または複数）は、単一のベクターまたは2つのベクターを用いて発現され得る。

【0269】

一実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関与する。一実施形態では、この核酸分子は、FVII、FIXおよびFXからなる群より選択されるキメラの凝固因子をコードし、この凝固因子は、血小板に結合する標的部分と、必要に応じて凝固因子と標的部分との間のスペーサー部分とを含む。別の実施形態では、本発明は、FVIIを含む、ポリペプチドをコードする核酸分子に関与し、このFVIIは、凝固カスケードの成分によって活性化可能な異種の酵素的切断部位を含む。

【0270】

一旦発現されれば、このキメラの凝固因子は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラムクロマトグラフィー、HPLC精製、ゲル電気泳動などを含む、当該分野の標準的手順に従って精製されてもよく（一般にハイブリダイズ、Scopes、Protein Purification（Springer-Verlag, N.Y.,（1982）を参照のこと）、本発明の実施例で用いられる方法を特に参照のこと。薬学的用途に対しては、少なくとも約90～95%という均質性の実質上純粋なタンパク質が好ましく、そして98～99%またはそれ以上の均質性が、最も好ましい。

【0271】

IX. 本発明のポリペプチドを投与する方法

別の実施形態では、本発明は、本発明の増強された凝固因子の治療上有効な量を投与することを包含する、止血障害を有する被験体を処置する方法に関する。

【0272】

被験体に対する投与のための組成物は、本発明のキメラの凝固因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子（遺伝子治療の適用のため）およびポリペプチド分子を含む。

【0273】

一実施形態では、本発明の増強された凝固因子組成物は、止血を促進する少なくとも1つの他の薬剤と組み合わせて投与される。止血を促進するこのような他の剤は、凝固活性を示す治療剤である。例であって、限定するものではないが、止血剤としては、第V因子、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、

10

20

30

40

50

第XIII因子、プロトロンビンもしくはフィブリノーゲン、または任意の前述の活性化型を挙げることができる。止血剤の凝固因子はまた、抗線維素溶解薬、例えば、 ϵ -アミノカプロン酸、トラネキサム酸を含んでもよい。

【0274】

本発明の一実施形態では、組成物（例えば、ポリペプチドまたはそのポリペプチドをコードする核酸分子）とは、被験体に投与された場合、凝固因子が活性型で存在する組成物である。このような活性分子は細胞によって活性型で発現されてもよいし、または被験体に対する投与の前にインビトロで活性化されてもよい。別の実施形態では、この組成物は、凝固因子が活性化可能な形態で存在し、かつ凝固因子が被験体への投与後に凝固の部位においてインビボで活性化される、組成物である。

10

【0275】

本発明のキメラの凝固因子は、静脈内に、皮下に、筋肉内にまたは、任意の粘膜表面を介して、例えば、経口的に、舌下に、口腔内に、舌下に、経鼻的に、直腸内に、腔内にまたは肺経路を介して投与され得る。キメラのタンパク質は、キメラのタンパク質の所望の部位への緩徐な放出を可能にするバイオポリマー固体支持体内に移植されるか、またはそれに連結され得る。

【0276】

経口投与のために、薬学的組成物は、従来手段によって調製される錠剤またはカプセルの形態をとってもよい。この組成物はまた、液体、例えば、シロップまたは懸濁液として調製されてもよい。この液体は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用油脂）、乳化剤（レシチンまたはアカシア）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステル類、エチルアルコールまたは分画植物油）、および防腐剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾアートまたはソルビン酸）を含んでもよい。この調製物はまた、香味剤、着色剤および甘味剤を含んでもよい。あるいは、この組成物は、水または別の適切なビヒクルでの構成のための乾燥製品として調製されてもよい。

20

【0277】

口腔内および舌下投与のためには、この組成物は、従来のプロトコールによる錠剤、トロチ剤、または急速溶解フィルム形態をとってもよい。

【0278】

吸入による投与のために、本発明による使用のための化合物は、加圧バックまたはネブライザーからのエアロゾル噴霧の形態で（例えば、PBS中で）、適切な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロメタン、二酸化炭素または他の適切なガスとともに都合よく送達される。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、一定量を送達するためのバルブを設けることによって決定され得る。例えば、インヘイラーまたは吸入器での使用のためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、ラクトースまたはデンプンのような化合物および適切な粉末基剤の粉末混合物を含んで処方され得る。

30

【0279】

一実施形態では、本発明のポリペプチドの投与経路は、非経口である。非経口という用語は本明細書において用いる場合、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸または腔の投与を包含する。静脈内型の非経口投与が好ましい。これらの投与形態の全てが明確に本発明の範囲内であるとみなされるが、投与の形態は、注射用の溶液、特に静脈内または動脈内の注射または点滴である。通常、注射用の適切な薬学的組成物は、緩衝液（例えば、酢酸塩、リン酸塩またはクエン酸塩の緩衝液）、サーファクタント（例えば、ポリソルベート）、必要に応じて安定化剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含んでもよい。しかし、本明細書の教示と適合する他の方法では、このポリペプチドは、有害な細胞集団の部位に直接送達されて、それによって、治療剤に対する疾患の組織の暴露を増大し得る。

40

【0280】

非経口投与のための調製物としては、無菌の水溶液または非水性溶液、懸濁液およびエ

50

マルジョンが挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えば、オリーブ油、および注射用有機エステル、例えば、オレイン酸エチルである。水性の担体としては、水、アルコール溶液／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液、例としては、生理食塩水および緩衝化媒体が挙げられる。本発明では、薬学的に許容される担体としては、限定するものではないが、0.01～0.1M、好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液、または0.8%の生理食塩水が挙げられる。他の共通の非経口ビヒクルとしては、リン酸ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、または固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、液体および栄養補充因子、電解質補充因子、例えば、リンゲルデキストロースに基づくもの、などが挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどのような防腐剤および他の添加物もまた存在してもよい。

10

【0281】

さらに詳細には、注射用途に適した薬学的組成物としては、滅菌注射用溶液または懸濁液の即時的な調製のための、滅菌水溶液（ここでは水溶性）または分散剤および無菌粉末が挙げられる。このような場合、この組成物は、滅菌しなければならない、かつ容易にシリンジから出る程度まで液体でなければならない。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない、好ましくは、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保存される。この担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール、など）およびその安定な混合物を含んでいる、溶媒または分散媒体であってもよい。この適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合には必要な粒子サイズの維持によって、およびサーファクタントの使用によって維持され得る。

20

【0282】

微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを組成物中に含ませるのが望ましい。注射可能組成物の長期にわたる吸収は、組成物中に吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含有させることによってもたらされ得る。

30

【0283】

任意の場合に、滅菌注射溶液は、本明細書に挙げた成分の1つ以上の組み合わせと共に適切な溶媒中に必要な量の活性化化合物（例えば、ポリペプチドをそれ自体で、または他の活性剤と組み合わせて）組み込み、必要に応じて、その後に濾過殺菌することによって調製してもよい。一般には、分散は、活性化化合物を滅菌ビヒクル中（塩基性分散媒体および上記で列挙されたものから必要な他の成分を含む）に組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製用のための滅菌粉末の場合には、好適な調製方法は真空乾燥および凍結乾燥法であり、これは活性成分に加え、その事前に滅菌濾過された溶液中に任意の付加的な所望成分の粉末を生じる。注射用の調製物は、処理され、アンプル、バッグ、ボトル、シリンジまたはバイアルのような容器中に充填され、当該分野で公知の方法による無菌状態のもとで密閉される。さらにこの調製物は、充填されて、キットの形態で販売されてもよい。このような製品は好ましくは、関連の組成物が凝固障害に罹患しているか、またはその素因がある被験体を処置するために有用であることを示している、ラベルまたは添付文書を有する。

40

【0284】

薬学的組成物はまた、例えば、ココアバターまたは他のグリセリド類などの従来の坐剤の基剤を含む、坐剤または停留浣腸として直腸投与用に処方されてもよい。

【0285】

状態の処置のための、本発明の組成物の有効量は、多くの異なる要因、例としては投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトか動物か、他の併用薬、および処置が

50

予防的か治療的かに依存して変化する。通常は、患者は、ヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物も処置され得る。処置投薬量は、安全性および有効性を最適化するために当業者に公知の慣用的方法を用いて滴定されてもよい。

【0286】

一実施形態では、生物学的に活性な部分（例えば、FIXを含む）の用量は、約25～100 IU/kg、例えば、0.417 mg/kg～1.67 mg/kgにおよんでもよい。別の実施形態では、生物学的に活性な部分（例えば、FVIIを含む）の用量は、約25～65 IU/kg、例えば、0.003125 mg/kg～0.008125 mg/kgにおよんでもよい。別の実施形態では、生物学的に活性な部分の用量（例えば、FVIIを含んでいる）は、約90～270 ug/kgまたは0.090～0.270 mg/kgにおよんでもよい。

10

【0287】

投薬量は、1000 ug/kg～0.1 ng/kg体重におよんでもよい。一実施形態では、投薬範囲は、1 ug/kg～100 ug/kgである。このタンパク質は、連続して投与されても、または特定の時間間隔で投与されてもよい。インビトロアッセイを使用して、最適の投与量範囲および/または投与スケジュールを決定してもよい。凝固因子活性を測定するインビトロアッセイは、当該分野で公知、例えば、STACLOT VITa-rTF凝固アッセイである。さらに、有効用量は、動物モデル、例えば、血友病イヌ（Mountら、2002, Blood 99（8）：2670）から得られる用量応答曲線から外挿され得る。

20

【0288】

上記の範囲の用量の中間もまた、本発明の範囲内であるものとする。被験体は、その用量を毎日、一日おきに、毎週、または経験的な分析によって決定される任意の他のスケジュールによって投与されてもよい。例示的な処置は、例えば、少なくとも6か月という長期間にわたって複数用量の投与を必要とする。いくつかの方法では、2つ以上のポリペプチドを同時に投与してもよく、その場合、投与される各々のポリペプチドの投薬量は、示した範囲内におさまる。

【0289】

本発明のポリペプチドは、複数回投与されてもよい。単回投薬の間の間隔は、毎日であっても、毎週であっても、毎月であってもまたは毎年であってもよい。間隔はまた、患者の改変されたポリペプチドまたは抗原の血液レベルを測定することによって示されるとおり不規則であってもよい。あるいは、ポリペプチドは、必要な投与頻度が少なくてもよい、徐放性処方物として投与されてもよい。投薬量および頻度は、患者におけるこのポリペプチドの半減期に応じて変化する。

30

【0290】

投与の用量および頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて変化する。予防的な適用では、本発明のポリペプチドまたはそのカクテルを含んでいる組成物を、まだ疾患状態ではない患者に投与して、患者の耐性を向上するか、または疾患の影響を最小限にする。このような量は、「予防上有効な用量」とであると定義される。比較的低用量を、長期間にわたって比較的低頻度の間隔で投与する。数例の患者は、死ぬまで処置を受け続ける。

40

【0291】

本発明のポリペプチドは必要に応じて、処置（例えば、予防的または治療的）の必要な障害または状態を処置するのに有効な他の剤と組み合わせて投与されてもよい。

【0292】

本明細書において用いる場合、補助療法と組み合わせるかまたは併用した本発明のポリペプチドの投与は、治療および開示されたポリペプチドの連続的、同時、同延、同時発生、併用または同時期の投与または適用を意味する。当業者は、併用療法の投与計画の種々の成分の投与または適用が、処置の全体的な有効性を増強するために調節され得ることを理解する。当業者（例えば、医師）は、選択された補助療法および本明細書の教示に基づ

50

いて過度の実験しに、有効な併用療法の投与計画を容易に判別できる。

【0293】

本発明のポリペプチドが、薬剤（例えば、併用療法の投与計画を提供するため）と組み合わせ、または併用して用いられ得ることがさらに理解される。本発明のポリペプチドが組み合され得る例示的な剤としては、処置されている特定の障害について現在の標準的な治療に相当する剤が挙げられる。このような剤は、事実上、化学的であっても、生物学的であってもよい。「生物学的」または「生物製剤」という用語は、治療剤としても使用を意図する、生きている生物体および／またはそれらの産物から作製された任意の薬学的に活性な剤を指す。

【0294】

本発明のポリペプチドと組み合わせ用いられるべき剤の量は、被験体によって変化してもよいし、または当該分野で公知であるものに依りて投与されてもよい。例えば、Bruce A Chabnerら、Antineoplastic Agents, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1233-1287 ((Joel G. Hardman ら、第9版、1996)を参照のこと。別の実施形態では、標準的な治療と一致するこのような剤の量が投与される。

【0295】

前に考察したとおり、本発明のポリペプチドは、凝固障害のインビボ処置のために薬学的に有効な量で投与されてもよい。この点において、本発明のポリペプチドは、活性剤の投与を容易にし、安定性を促進するように処方され得ることが理解される。好ましくは、本発明による薬学的組成物は、生理食塩水、非毒性の緩衝液、防腐剤などのような薬学的に許容される、非毒性の、無菌の担体を含む。当然ながら、本発明の薬学的組成物は、このポリペプチドの薬学的に有効な量を提供するために、単一用量で投与されても、または複数用量で投与されてもよい。

【0296】

一実施形態では、本発明のキメラの凝固因子は、核酸分子として投与され得る。核酸分子は、当該分野で公知の技術を用いて投与され得、この技術としては、ベクター、プラスミド、リポソーム、DNA注入、エレクトロポレーション、遺伝子銃、静脈内注射または肝動脈注入が挙げられる。遺伝子治療の実施形態における使用のためのベクターは当該分野で公知である。

【0297】

本開示の範囲と一致して、本発明のキメラの凝固因子は、治療効果または予防効果を生じるのに十分な量で処置の前述の方法に従って、ヒトまたは他の動物に投与され得る。

【0298】

本発明のキメラのタンパク質は、当業者に理解されたとおり、ある疾患または状態を有する被験体を処置する方法を含むがこれには限定されない、多くの用途を有する。この疾患または状態としては、限定するものではないが、止血の障害が挙げられる。

【0299】

一実施形態では、本発明は、本発明の少なくとも1つのキメラの凝固因子の治療上有効な量を投与することを包含する、止血障害を有する被験体の処置方法に関する。

【0300】

本発明のキメラの凝固因子は、フィブリン塊の形成を促進することによって、止血障害を処置または予防する。本発明のキメラの凝固因子は、凝血カスケードの任意のメンバーを活性化し得る。凝固因子は、外因経路、内因経路、またはその両方に関与し得る。

【0301】

本発明のキメラの凝固因子は、止血障害、例えば、キメラの凝固因子に存在する特定の凝固因子で処置可能であることが公知の障害を処置するために用いられ得る。本発明のキメラのタンパク質の投与によって処置され得る止血障害としては、限定するものではないが、血友病A、血友病B、フォン・ヴィレブラント病、第XI因子欠損（PTA欠損）、

10

20

30

40

50

第X I I 因子欠損、同様にフィブリノーゲン、プロトロンビン、第V 因子、第V I I 因子、第X 因子、または第X I I I 因子の欠損または構造異常が挙げられる。

【0302】

一実施形態では、止血障害は、遺伝性の障害である。一実施形態では、被験体は、血友病Aを有し、キメラのタンパク質は、第V I I 因子または第V I I I a 因子を含む。別の実施形態では、被験体は、血友病Aを有し、キメラの凝固因子は、第V I I 因子または第V I I a 因子を含む。別の実施形態では、被験体は、血友病Bを有し、キメラの凝固因子は、第I X 因子または第I X a 因子を含む。別の実施形態では、被験体は、血友病Bを有し、キメラのタンパク質は第V I I 因子または第V I I a 因子を含む。別の実施形態では、被験体は、第V I I 因子または第V I I I a 因子に対する阻害性抗体を有し、キメラの凝固因子は、第V I I 因子または第V I I a 因子を含む。さらに別の実施形態では、被験体は、第I X 因子または第I X a 因子に対する阻害性抗体を有し、キメラのタンパク質は、第V I I 因子または第V I I a 因子を含む。

10

【0303】

本発明のキメラの凝固因子は、止血障害を有する被験体を予防的に処置するために用いられ得る。本発明のキメラの凝固因子は、止血障害を有する被験体において急性の出血エピソードを処置するために用いられ得る。

【0304】

一実施形態では、止血障害は、凝固因子、例えば、第I X 因子、第V I I I 因子の欠損の結果である。別の実施形態では、止血障害は、不完全な凝固因子の結果であり得る。

20

【0305】

別の実施形態では、止血障害は、後天性の障害であり得る。後天性の障害は、背景にある二次疾患または状態から生じ得る。無関係の状態は、例えば、限定するものではないが、癌、自己免疫疾患、または妊娠であってもよい。後天性の障害は、高齢から、または背景にある二次障害を処置するための薬物療法（例えば、癌化学療法）から生じ得る。

【0306】

本発明はまた、止血障害、または止血障害を生じる二次的な疾患もしくは障害を有さない被験体を処置する方法に関する。従って、本発明は、本発明の少なくとも1つのキメラ凝固因子の治療上有効な量を投与することを包含する、一般的な止血剤の必要な被験体を処置する方法に関する。例えば、一実施形態では、一般的な止血剤の必要な被験体は、手術を受けているか、または手術に臨んでいる。本発明のキメラの凝固因子は、術前または術後に予防剤として投与されてもよい。本発明のキメラの凝固因子は、急性の出血エピソードを管理するために術中または術後に投与され得る。手術としては、限定するものではないが、肝移植、肝切除または幹細胞移植を挙げることができる。

30

【0307】

別の実施形態では、本発明のキメラの凝固因子を用いて、止血障害を受けていない急性の出血エピソードを有する被験体を処置してもよい。急性の出血エピソードは、重度の外傷、例えば、手術、自動車事故、創傷、銃による裂創、または制御されない出血を生じる任意の他の外傷性事象から生じ得る。

【0308】

本発明はさらに、以下の実施例で例示されるが、これは限定と解釈されるべきではない。本出願全体にわたって引用される全ての引用文献、特許および公開特許出願の内容は、参照によって本明細書に援用される。

40

【実施例】

【0309】

本実施例を通じて、別段言及しない限り、以下の材料および方法を用いた。

【0310】

一般的な材料および方法

一般には、本発明の実施は、別段示さない限り、化学、生物物理学、分子生物学、組み換えDNA技術、免疫学（特に、例えば、抗体技術）の従来技術、および電気泳動の標

50

準的な技術を使用する。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)、510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)、McCafferty, 編集, Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlowら、CS. H. L. Press, Pub. (1999); ならびに Current Protocols in Molecular Biology, 編集 Ausubelら、John Wiley & Sons (1992)を参照のこと。
(実施例1)

10

【0311】

第二のFc鎖のアミノ末端でFV II-FcおよびMB9-Fcを含んでいるヘテロ二量体構築物。

pSYN-FV II-027のクローニング

FV II-027構築物は、細胞中の製造の間にプロセッシングされるとき、切断のためのcscFcを含む。この構築物は、標的部分、scFv部分(GPIIbIIIAに結合する)、MB9を含む。

【0312】

プラスミド(pSYN-FV II-027)を、FV II-FcおよびMB9-Fcヘテロ二量体発現のために生成し、ここでMB9は、活性化された血小板上のレセプターGPIIb/IIIAに結合することが以前に示されたscFvである。pSYN-FV II-027由来のタンパク質は、細胞中で単一のポリペプチドとして発現され、ここでFV II-FcサブユニットのC末端は、(GGGGS)₆ポリペプチドリンカーによってMB9-FcサブユニットのN末端に連結される。さらに、RRRRSおよびRKRRKR配列を、各々の配列での最後のArg後のプロタンパク質転換酵素による細胞内切断のために、それぞれ、ポリペプチドリンカーの5'末端および3'末端に挿入した。引き続き、細胞は、2つの鎖FV II-Fc/MB9-Fcヘテロ二量体を発現し、ここでFV II-Fc鎖は、RRRRS配列をC末端で有するが、このリンカーの残りおよびRKRRKR配列は、そうでなければ除去された。

20

30

【0313】

第一の工程として、一連の中間体プラスミドを以下のプライマーを用いて生成した：

HindIII-SalI-BpsEI-Fc-F

AGTCAAGCTTGTCTGACTCCGGAACTCCTGGGCGGACC

BamHI-リンカー-Fc-R

CATCGGATCCCCCGCCACCGGAACCTCCACCGCCTGATCC

ACCCCCACCTGATCCGCGCGCCACCTTTACCCGGAGACAGG

GAGAGG

BclI-Fc-F

CAGTCTTGTATCAGACAAAACCTCACACATGCCCACCC

scFc-EcoRI-R

ACTGACGAATTCTCATTTTACCCGGAGACAGGGAG

HindIII-Kozak-FV II-F：

CGACAAGCTTGTCTGCGCCACCATGGTCTCCAGGCCCTCAGG

FV II-HC-BspEI-R：

AGGAGTTTCCGGAGCTGGGGCACGGGTGGGGCATGTGTGTGAGTTT

TGTCTGGATCCCCCGCCACCGGAACCTCCACCGCCTGATCC

ACCCCCACCTGATCCGCGCGCCACCGGACCCACCTCCGCGCG

GAGCCACCGCGCCACCGGGAAATGGGGCTCGCAGGAGG

40

50

50 μ l の PCR 反応を、以下のサイクルを用いて、25 pmol の HindIII-SalI-BpEI-Fc-F および BamHI-リンカー-Fc-R およびテンプレート pSYN-Fc-001 で行った：95℃ 2 分間；30 サイクルの（95℃ 30 秒間、54℃ 30 秒間、72℃ 1 分間）。予想される大きさのバンド（約 700 bp）を、Gel Extraction キット（Qiagen, Valencia, Calif.）を用いてゲル精製して、pBUDCE4（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）の HindIII および BamHI 制限部位にクローニングして中間体 pSYN-FVII-007 を生成した。プライマー HindIII-SalI-BpEI-Fc-F および BamHI-リンカー-Fc-R は、アミノ酸 221（EU ナンバリング）で開始する Fc 領域を増幅して、HindIII および SalI 制限酵素部位を、Fc 領域部位のすぐ上流に付加し、同様に、（GGGGS）_{4x} リンカーをコードする DNA フラグメント、続いて BamHI 部位を Fc コード領域のすぐ下流に付加した。次に、50 μ l の反応を、25 pmol の BclI-Fc-F および scFc-EcoRI-R、およびテンプレート pSYN-Fc-011 を用い、上記と同じサイクルを用いて行った。予想される大きさのバンド（約 700 bp）を上記のようにゲル精製して、制限酵素 BamHI および EcoRI で切断し、pSYN-FVII-007 の BclI/EcoRI 制限部位にクローニングして中間体プラスミド pSYN-FVII-008 を生成した。プライマー対 BclI-Fc-F および scFc-EcoRI-R は、Fc 領域を増幅したが、一方で、BclI および EcoRI 制限部位を、それぞれ Fc コード領域のすぐ上流および下流に付加した。最後の中間体プラスミドを生成するために、50 μ l の PCR 反応を、25 pmol の HindIII-Kozak-FVII-F および FVII-HC-BspEI-R およびテンプレート pSYN-FVII-001 を用い、以下のサイクルを用いて行った：95℃ 2 分間；30 サイクルの（95℃ 30 秒間、55℃ 30 秒間、72℃ 90 秒間）。このプライマー対は、FVII コード領域を増幅するが一方で、（GGGGS）_{6x} ポリペプチドリンカーをコードする分子の 3' 末端で DNA フラグメントを、続いてアミノ酸 221（EU ナンバリング）をコードする Fc 領域のフラグメントを付加した。プライマー HindIII-Kozak-FVII-F は、この分子の 5' 末端で HindIII 制限部位を、続いて、FVII コード領域のすぐ上流で Kozak 配列を生成する。この FVII-HC-BspEI-R プライマーは、ポリペプチドリンカーをコードする DNA および Fc 部分を導入する。予想される大きさのバンド（約 1500 bp）を上記のようにゲル精製して、pSYN-FVII-008 の HindIII/BspEI 部位にクローニングして pSYN-FVII-011 を生成した。

【0314】

次に、2 つの DNA フラグメントを合成した：Genescript-FVII-027-1 および Genscript-FVII-026-2。Genescript-FVII-027-1 は、Fc 領域の一部をコードする DNA フラグメント（ヌクレオチド 1306 で開始する（EU ナンバリング））、続いて配列 RRRRS-（GGGGS）_{6x}-RKRRKR、続いて MB9 scFv の一部（残基 1-142）からなる。EcoRI 部位を、遺伝子コードの縮重性を用いて MB9 のコード配列に導入して、適切なアミノ酸配列を保存して、Genescript-FVII-027-1 の最後の 6 塩基を重複させる。さらに、5' の最初の塩基は、Fc 領域中に見出される SpAI 部位を含む。Genscript-FVII-026-2 は、MB9（残基 143-273）の一部をコードする DNA フラグメント、続いて（GGGGS）_{6x} ポリペプチドリンカー、続いて Fc 領域および EcoRI 部位からなる。EcoRI 部位を、遺伝子コードの縮重性を用いて MB9 のコード配列に導入して、適切なアミノ酸配列を保存して、Genescript-FVII-026-2 の最後の 6 塩基を重複させる。

【0315】

Genescript-FVII-027-1 を、pSYN-FVII-011 の SapI および EcoRI 部位にクローニングして、pSYN-FVII-036 を生成した。次に、Genscript-FVII-026-2 を、pSYN-FVII-036 の

E c o R I 部位にクローニングして、p S Y N - F V I I - 0 2 7 を生成した。最後のクローニング部位の正確な方向は、制限酵素分析およびDNA配列決定によって確認した。

(実施例2)

【0316】

第二のFc鎖のカルボキシ末端でF V I I - F c およびM B 9 - F c を含んでいるヘテロ二量体構築物、M B 9。

F V I I - 0 3 7 のクローニング

F V I I - 0 3 7 構築物は、プロセシングの間に切断されないs c F c 足場を用いて作製される。この構築物では、標的部分、やはりM B 9 s c F v (G P I I b I I I a に結合する)は、第二のFc部分のC末端に結合される。

10

【0317】

DNAフラグメントG e n s c r i p t - F V I I - 0 3 7 の合成は、外注した(G e n s c r i p t)。このフラグメントは、Fc領域の一部(残基434~447、EUナンバリング)続いて(G G G G S) 4 x ポリペプチドリンカーおよびM B 9 s c F v を含む。G e n s c r i p t - F V I I - 0 3 7 のS a p I / E c o R I フラグメントを、p S Y N - F V I I - 0 1 1 (P 0 8 3 0 と呼ぶ)のS a p I / E c o R I にサブクローニングして、中間構築物を生成した。p S Y N - F V I I - 0 1 1 由来のS a p I フラグメントを、この中間構築物のS a p I 部位にサブクローニングして、p S Y N F V I I - 0 3 7 を生成した。

(実施例3)

20

【0318】

第二のFc鎖のカルボキシ末端でF V I I - F c およびG P I b に対するペプチドを含んでいるヘテロ二量体構築物

p S Y N - F V I I - 0 4 1 中間体構築物のクローニング。

この構築物を作製するために、F V I I - 0 4 1 構築物を最初は、ある中間体として作製した。DNA分子G e n s c r i p t - F V I I - 0 4 1 の合成は、外注した(G e n s c r i p t)。このフラグメントを、S a p I で消化して、p S Y N - F V I I - 0 1 1 のS a p I 部位にクローニングして、p S Y N - F V I I - 0 4 1 を生成した。このプロセスによって、第二のFc中にS a l I 部位(残基412-413 EUナンバリング, G T G G A C ~ G T C G A C)を導入する。

30

【0319】

p S Y N - F V I I - 0 4 4 -, - 0 4 5 および - 0 4 6 のクローニング。

F V I I - 0 4 1 構築物を、出発材料として用いて、G P I b に結合するペプチドである標的部分を含むいくつかの構築物を生成した。P S 4 ペプチドは-044構築物中で、O S 1 ペプチドは、-045構築物中で、O S 2 ペプチドは、-046構築物中で用いる。これらの構築物中では、s c F c 足場を用いて、そのペプチドを、リンカーを介して第二のFc部分のC末端に結合する。

【0320】

G e n s c r i p t - F V I I - 0 4 4 -, - 0 4 5 および - 0 4 6 の合成は、外注した(G e n s c r i p t)。これらのDNAフラグメントを、S a l I / E c o R I で切断して、p S Y N - F V I I - 0 4 1 のS a l I / E c o R I 部位中にサブクローニングして、p S Y N - F V I I - 0 4 4 -, - 0 4 5 および - 0 4 6 を生成した。

40

(実施例4)

【0321】

第二のFc鎖のアミノ末端でF V I I - F c およびG P I b に対するペプチドを含んでいるヘテロ二量体構築物

p S Y N - F V I I - 0 4 3 中間体のクローニング

この構築物を作製するために、F V I I - 0 4 3 構築物を、最初に中間体として作製した。DNAフラグメントG e n s c r i p t - F V I I - 0 4 3 の合成は、外注した(G e n s c r i p t)。このフラグメントは、Fc領域の一部をコードするDNA分子(残

50

基 2 3 2 ~ 4 4 7、E U ナンバリング) 続いて (G G G G S) 4 x ポリペプチドリンカー
 および別の F c 領域の一部 (残基 2 2 1 ~ 2 3 8、E U ナンバリング) を含む。この D N
 A フラグメントは、B s p E I および R s r I I で消化して、p S Y N - F V I I - 0 4
 2 の B s p E I / R s r I I 部位中にサブクローニングして、p S Y N - F V I I - 0 5
 0 を生成した。このプロセスは、固有の S a l I 部位 (残基 4 1 2 - 4 1 3 (E U ナンバ
 リング)、G T G G A C ~ G T C G A C) を第一の F c 中に導入する。p S Y N F V
 I I - 0 5 0 の H i n d I I I / E c o R I フラグメントを、p S Y N - F V I I - 0 1
 1 の H i n d I I I / E c o R I 部位中にサブクローニングして、p S Y N - F V I I -
 0 4 3 を生成した。

【0322】

10

p S Y N - F V I I - 0 4 7、- 0 4 8 および - 0 4 9 のクローニング。

F V I I - 0 4 3 構築物を、出発材料として用いて、G P I b に結合するペプチドであ
 る標的化部分を含むいくつかの構築物を生成した。P S 4 ペプチドを、- 0 4 7 構築物中
 で、O S 1 ペプチドを - 0 4 8 構築物中で、および O S 2 ペプチドを - 0 4 9 構築物中で
 用いる。これらの構築物では、s c F c 足場を用いて、ペプチドを、s c F c リンカーと
 第二の F c 部分の N 末端に連結されるリンカーとの間に差し込む。

【0323】

D N A 分子 G e n s c r i p t - F V I I - 0 4 7、- 0 4 8 および - 0 4 9 の合成は
 、外注した (G e n s c r i p t)。G e n s c r i p t - F V I I - 0 4 7、- 0 4 8
 および - 0 4 9 由来の S a l / R s r I I フラグメントを、p S Y N - F V I I - 0 4 3
 の S a l I / R s r I I 部位にサブクローニングして、それぞれ、p S Y N - F V I I -
 0 4 7、- 0 4 8 および 0 4 9 を生成した。

20

(実施例 5)

【0324】

G l a 欠失の F V I I - F c および標的化分子を含んでいるヘテロ二量体構築物
F V I I - 0 2 8 中間体のクローニング

この構築物を作製するために、F V I I - 0 2 8 構築物を第一の中間体として作製した
 。D N A フラグメント G e n s c r i p t - F V I I - 0 2 8 の合成は、外注した (G e
 n s c r i p t)。このフラグメントは、H i n d I I I / X b a I で切断して、p S Y
 N - F V I I - 0 1 1 中にサブクローニングして、p S Y N - F V I I - 0 2 8 を生成し
 た。

30

【0325】

F V I I - 0 5 3 のクローニング

F V I I - 0 2 8 構築物を、出発材料として用いて、標的部分を含む構築物を生成し、
 G l a ドメインを欠く凝固因子を使用する。この構築物について、アミノ酸 1 - 3 5 を、
 F V I I から除去して、R K R R K R 挿入を、残基 R 1 5 2 (W T F V I I ナンバリング
) の後ろに添加して、細胞内活性化を容易にした。M B 9 s c F v は、標的部分として
 役立った。

【0326】

D N A 分子 G e n s c r i p t - F V I I - 0 2 5 は、外注し、この分子由来の X b a
 I / B s i W I フラグメントを、p S Y N - F V I I - 0 2 8 の X b a I / B s i W I 部
 位にサブクローニングして、p S Y N - F V I I - 0 5 3 を生成した。

40

(実施例 6)

【0327】

2 つの別々のポリペプチドとして第 V I I 因子重鎖および軽鎖を含んでいるヘテロ二量
 体構築物

p S Y N - F V I I - 0 2 4 中間体構築物のクローニング

F V I I - 0 2 4 構築物は、第 F V I I の重鎖および軽鎖が単鎖分子で連続しない構築
 物である。この構築物は、c s c F c リンカーが、トランスーゴルジ網目状構造における
 プロテアーゼによって切断されるように、c s c F c を使用する。この切断によって、リ

50

ンカーの除去、およびFV I Iの活性化が生じ、これは活性化されたFV I I F cの発現を生じる。

【0328】

FV I Iのコード配列は、以下のプライマーを用いて、ヒト肝臓mRNAライブラリー(Ambion, Austin, Texas)からポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写によって得た：

FV I I-F1

G G G A A T G T C A A C A G G C A G G G

FV I I-R1

C T T G G C T T T C T C T C C A C A G G C

10

【0329】

50 μlの反応を、製造業者の標準的なプロトコールに従って、MJサーモサイクラー中でPlatinum Taq system (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)を備えるSuperscript One-step RT-PCRを用いて各々の10 pmolのプライマーで行った。用いたサイクルは、逆転写について50℃で30分間、続いて94℃で2分間の変性および30サイクルの(94℃30秒間、53℃30秒間、72℃90秒間)続いて、10分間、72℃であった。予想される大きさのバンド(約1400bp)を、Gel Extractionキット(Qiagen, Valencia, Calif.)を用いてゲル精製して、TOPO TA Cloningキット(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)を用いてp

20

CR2.1 TOPO中にクローニングして、中間体プラスミドpSYN-FV I I-001を生成した。二本の鎖のFV I I-FcおよびFcヘテロ二量体の発現のためのプラスミドを構築するために、FV I Iコード配列を、以下のプライマーを用いてPCR増幅した：

Hind I I I-Kozak-FV I I-F

C G A C A A G C T T G C C G C C A C C A T G G T C T C C C A G G C C C T C A G G

Bsp E I-Fc-FV I I-R

C G A C T C C G G A G C T G G G C A C G G T G G G C A T G T G T G A G T T T T G

T C G G G A A A T G G G G C T C G C A G G

30

【0330】

フォワードプライマーHind I I I-Kozak-FV I I-Fは、Hind I I I制限部位、続いてKozak配列を、FV I Iコード領域のすぐ上流に付加する。リバープライマーBsp E I-Fc-FV I I-Rは、アミノ酸221~223(EUナンバリング)を含んでいるIgG1の定常領域(Fc領域)のフラグメントを付加する。このプロセスはまた、遺伝子コードの縮重性を用いてアミノ酸231~233にBsp E I制限部位を組み込み、正確なアミノ酸配列(EUナンバリング)を保存する。50 μlの反応を、15 pmolの各々のプライマーおよびテンプレートpSYN-FV I I-001を用い、Platinum Pfx DNA Polymeraseシステムを製造業者のプロトコールに従って、MJサーモサイクラー中で用いて、以下のサイクルを用いて行った：95℃2分間；30サイクルの(95℃15秒間、49℃30秒間、68℃90秒間)；68℃10分間。プラスミドpSYN-FIX-027(pBUDFIXFc/Fc)を、Hind I I IおよびBsp E Iで消化して、ベクターについて予想される大きさのバンド(約5800bp)を、FIX挿入物(予想される大きさのバンド約1480bp)から離れて、Gel Extractionキット(Qiagen, Valencia, Calif.)を用いて精製した。次にPCR増幅したFV I I配列を、FIX挿入物を除去した後、pSYN-FIX-027由来のベクターのHind I I IおよびEco R I部位中にサブクローニングした。これによって、pSYN-FV I I-002(pBUDFV I I Fc/Fc)を生成した。次に、A(GGGGS)₆ポリペプチドリンカーをFV I IとpSYN-FV I I-002中のFc領域コード配列との間に以下のプライマーを用いて付加した：

40

50

F V I IーリンカーーF：

C A T C C C C A G C A C G T A C G T C C

F V I IーL i n k e rーR：

G G G C A T G T G T G A G T T T T G T C T G A T C C C C C G C C A C C G G A A C
C T C C A C C G C C T G A T C C A C C C C C A C C T G A T C C G C C G C C A C C
G G A C C C A C C T C C G C C G G A G C C A C C G C C A C C G G G A A A T G G G
G C T C G C A G G A G G

F cーリンカーーF：

G A C A A A A C T C A C A C A T G C C C A C C

F cーリンカーーR：

G C A G A A T T C T C A T T T A C C C G G A G

【0331】

2つの12 μ lのPCR反応を、12 pmolのF V I IーリンカーーFおよびF V I IーリンカーーR（反応1）またはF cーリンカーーFおよびF cーリンカーーR（反応2）のいずれかを用いて、Expand High Fidelity System（Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.）を用いて、製造業者の標準的なプロトコールによってMJサーモサイクラー中で行った。第一のおよび第二の反応を、1 μ gのpSYN-F V I Iー002をテンプレートとして用い、以下のサイクルを用いて行った：94℃、2分間；14サイクルの（94℃、30秒間、55℃、30秒間、72℃、2分間）；72℃、10分間。予想される大きさのバンド（反応1については532 bpおよび反応2については670 bp）を、Gel Extractionキット（Qiagen, Valencia, Calif.）を用いてゲル精製し、次いでPCR反応中で、25 pmolのF V I IーリンカーーFおよびF cーリンカーーRと前のおり組み合わせて、ただし増幅は30サイクルとした。予想される大きさのバンド（1200 bp）を、Gel Extractionキット（Qiagen, Valencia, Calif.）で精製して、制限酵素Kpn IおよびEco R Iで消化した。予想される大きさのバンド（920 bp）は、前のおりゲル精製して、pSYN-F V I Iー002のKpn I/Eco R I部位にクローニングして、pSYN-F V I Iー003（pBUDF V I I F c/6x（GGGGS）/F c）を生成した。

【0332】

二本鎖のヘテロ二量体を発現するためのpSYN-F V I Iー024のクローニング

プラスミド（pSYN-F V I Iー024）を、二本鎖のヘテロ二量体（ここで、1つの鎖は、F V I I軽鎖（残基1-152）続いて（GGGGS）_{6x}リンカー続いてF c領域からなり、一方他方の鎖は、F V I I重鎖（残基153-406）続いて（GGGGS）_{6x}リンカー続いてF c領域を含む）の発現のために生成した。このプラスミドを、ヘテロ二量体を、単一のポリペプチド（ここでF V I I重鎖ーリンカーーF c鎖のC末端は、重鎖ーリンカーーF c鎖のN末端に接続される）として発現するように、以下のポリペプチド配列によって設計する：RRRRS-（GGGGS）_{6x}-RKRRKR、ここでRRRRSおよびRKRRKR配列は、プロタンパク質転換酵素的切断部位である）。各々の切断部位での最後のArgの後のプロタンパク質転換酵素による細胞内切断は、ポリペプチドリンカーの除去を生じ得る。結果として、細胞は、2つの鎖のヘテロ二量体（ここでF V I I軽鎖ーリンカーーF c鎖は、C末端でRRRRS配列を有するが、このリンカーの残りおよびRKRRKR配列は、そうでなければ除去された）を発現する。pSYN-F V I Iー024およびいくつかの中間体プラスミドの構築には、以下のプライマーの使用を必要とした：

H i n d I I IーS a l IーB p E IーF cーF

A G T C A A G C T T G T C G A C T C C G G A A C T C C T G G G C G G A C C

B a m H Iーリンカー（P A C E 1）ーF cーR

C A T C G G A T C C C C C G C C A C C G G A A C C T C C A C C G C C T G A T C C

A C C C C C A C C T G A T C C G C C G C C A C C G C T C C G G C G G C G C C G T

T T A C C C G G A G A C A G G G A G A G G
 H i n d I I I - K o z a k - F V I I - F
 C G A C A A G C T T T G C C G C C A C C A T G G T C T C C C A G G C C C T C A G G
 B s p E I - F c - リンカー - F V I I L C - R
 G A G T T C C G G A G C T G G G C A C G G T G G G C A T G T G T G A G T T T T G
 T C T G A T C C C C C G C C A C C G G A A C C T C C A C C G C C T G A T C C A C
 C C C C A C C T G A T C C G C C G C C A C C G G A C C C A C C T C C G C C G G A
 G C C A C C G C C A C C T C G G C C T T G G G G T T T G C T G G
 B a m H I - 2 x l i n k - p a c e - H C - F
 C A G T C T G G A T C C G G C G G T G G A G G T T C C G G T G G G G G T G G A T
 C A A G G A A G A G G A G G A A G A G G A T T G T G G G G G G C A A G G T G T G
 C C
 F c - E c o R I - R
 A T G T C T G A A T T C T C A T T T A C C C G G A G A C A G G G A G A G G

【0333】

第一の中間体プラスミドを生成するために、PCR反応は、25 pmolのプライマー
 H i n d I I I - S a l I - B p E I - F c - FおよびB a m H I - リンカー (P A C E
 1) - F c - Rおよびテンプレート p S Y N - F c - 001を用いて、Expand H
 i g h F i d e l i t y S y s t e m (B o e h r i n g e r M a n n h e i m, I
 n d i a n a p o l i s, I n d.)を用い、製造業者の標準的なプロトコールによって
 M Jサーモサイクラー中で行った。以下のサイクルを用いた：95℃2分間；30サイ
 クルの（95℃30秒間、58℃30秒間、および72℃1分間）；72℃10分間。正確
 な大きさのバンド（約730bp）を上記のようにゲル精製して、pBUDCE4ベクタ
 ー（I n v i t r o g e n, C a r l s b a d, C a l i f.）のH i n d I I I / B a
 m H I 部位にクローニングして、p S Y N - F V I I - 014を生成した。プライマーH
 i n d I I I - S a l I - B p E I - F c - FおよびB a m H I - リンカー (P A C E 1
) - F c - Rを用いるPCR増幅によって、Fc領域の一部（アミノA X-Y）続いて
 R R R R S 配列および（G G G G S）_{2x}ポリペプチドリンカーをコードするDNAフラ
 グメントを生成した。プライマーH i n d I I I - S a l I - B p E I - F c - Fは、こ
 の分子の5'末端でH i n d I I IおよびS a l I制限部位を導入し、一方で、プライ
 マーB a m H I - リンカー (P A C E 1) - F c - Rは、B a m H Iを、G G G G S リンカ
 ーの最後の2つの残基をコードするコドンと重複する3'末端に導入する（コドンG G A
 T C Cを有する残基G S）。次に、別のPCR反応を、上記のとおり、プライマーH i
 n d I I I - K o z a k - F V I I - FおよびB s p E I - F c - リンカー - F V I I L
 C - Rおよびテンプレート p S Y N - F V I I - 002を用い、p S Y N - F V I I - 0
 14のクローニングについて記載される同じ条件を用い、ただしアニリング温度は57
 °Cで行った。予想される大きさのバンド（約700bp）は、ゲル精製して、p S Y
 N - F V I I - 014のH i n d I I IおよびB s p E I 部位中にクローニングして、p S Y
 N - F V I I - 023を生成した。プライマーH i n d I I I - K o z a k - F V I I -
 FおよびB s p E I - F c - リンカー - F V I I L C - Rは、F V I I 軽鎖、続いて（G
 G G G S）_{6x}ポリペプチドリンカーおよびFc領域の一部を最大アミノ酸232（E U
 ナンバリング）までをコードするDNAフラグメントを増幅した。プライマーH i n d I
 I I - K o z a k - F V I I - Fは、この分子の5'末端にH i n d I I I制限部位を続
 いてK o z a k 配列を導入し、一方で、プライマーB s p E I - F c - リンカー - F V I
 I L C - Rは、この分子の3'末端にB s p e I 部位を付加する。

【0334】

最終工程では、PCR反応は、上記のように、プライマーB a m H I - 2 x リンク (l
 i n k) - ペース (p a c e) - H C - FおよびF c - E c o R I - Rおよびテンプレ
 ート p S Y N - F V I I - 003を用い、以下のサイクルを用いて行った：95℃2分間；
 30サイクルの（95℃30秒間、55℃30秒間、および72℃2分間）；72℃7分

間。このPCR反応によって、(GGGGS)₂ x ポリペプチドリンカー続いてRKR RKR配列続いてFV I I重鎖をコードするDNA分子を生成した。プライマーBamH I-2 x リンク(link)-ペース(pace)-HC-FおよびFc-EcoR I-Rは、それぞれ、分子の5'末端および3'末端にBamH I部位およびEcoR I部位を導入する。予想される大きさのバンド(約1600bp)を、pSYN-FV I I-023のBamH IおよびEcoR I部位にクローニングして、pSYN-FV I I-024を生成した。

【0335】

中間体pSYN-FV I I-073のクローニング

サイレント変異体を、FV I I-024の第一のFc部分に、PCRベースの部位指向性突然変異誘発方法によって導入して、位置412および413(EUナンバリング)のアミノ酸をコードするDNA領域でSal I部位を生成した。これによって、中間体構築物FV I I-073を生成した。

【0336】

pSYN-FV I I-057のクローニング

pSYN-FV I I-057のSal I~BsiW I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、pSYN-FV I I-073のSal I/BsiW I部位にサブクローニングして、pSYN-FV I I-057を生成した。

【0337】

pSYN-FV I I-058、pSYN-FV I I-059、pSYN-FV I I-060、pSYN-FV I I-061およびpSYN-FV I I-062のクローニング
これらの構築物を、pSYN-FV I I-057(Sal I~BsiW IのDNA合成は外注して、pSYN-FV I I-073の中にサブクローニングした)について記載のとおりクローニングした。

【0338】

pSYN-FV I I-066のクローニング

SYN-FV I I-066のSal I~Rsr I I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、pSYN-FV I I-043のSal I/Rsr I I部位にサブクローニングして、pSYN-FV I I-066を生成した。

【0339】

pSYN-FV I I-067のクローニング

pSYN-FV I I-067のSal I~EcoR I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、pSYN-FV I I-041のSal I/EcoR I部位にサブクローニングして、pSYN-FV I I-067を生成した。

【0340】

pSYN-FV I I-090のクローニング

pSYN-FV I I-090のBamH I~BsiW I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、3ウェイライゲーションによってpSYN-FV I I-061(ここでは、外注したDNAを、BamH I/BsiW IおよびpSYN-FV I I-061を用い、BamH I/BsiW I/Not Iを用いて切断した)中にサブクローニングして、pSYN-FV I I-090を生成した。

【0341】

pSYN-FV I I-100のクローニング

FV I Iの170ループの一部(FV I I成熟配列のアミノ酸311~322)を、トリプシンの170ループ(アミノ酸EASYPGK)で置き換えた。この変異を、標準的な重複PCR方法によって、pSYN-FV I I-090をテンプレートとして、および骨格構造を用いて、導入してpSYN-FV I I-100を生成した。

【0342】

pSYN-FV I I-115のクローニング

3ポイントの変異(V158D、E296VおよびM298Q;成熟FV I I配列ナンバ

10

20

30

40

50

リング) を、pSYN-FV I I-090のFV I Iコード領域中に、PCRベースの部位指向性突然変異誘発によって導入して、pSYN-FV I I-115を生成した。

【0343】

pSYN-FV I I-118のクローニング

pSYN-FV I I-118のXba I～BsiW I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、pSYN-FV I I-011のXba I/BsiW I部位にサブクローニングして、pSYN-FV I I-118を生成した。

【0344】

pSYN-FV I I-119のクローニング

pSYN-FV I I-119のXba I～BsiW I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、pSYN-FV I I-011のXba I/BsiW I部位中にサブクローニングして、pSYN-FV I I-119を生成した。

【0345】

pSYN-FV I I-127のクローニング

トリプシンの170ループを含むDNAフラグメントを、PCRによって、pSYN-FV I I-100をテンプレートとして用いて生成した。このPCR反応によって、それぞれ5'および3'でBsiW IおよびBspE I制限部位を生成した。このDNAフラグメントを、pSYN-FV I I-118のBsiW I/BspE I部位中にサブクローニングして、pSYN-FV I I-127を生成した。

【0346】

pSYN-FIX-042のクローニング

pSYN-FIX-030 (米国特許第7566565に記載)のHindI I I/BspE Iフラグメントを、pSYN-FV I I-011のHindI I I/BspE I部位にサブクローニングして、pSYN-FIX-042を生成した。

【0347】

pSYN-FIX-068のクローニング

pSYN-FIX-030 (米国特許第7566565号に詳細に記載されるプラスミド)のHindI I I/BspE Iフラグメントを、pSYN-FV I I-066のHindI I I/BspE I部位中にサブクローニングして、pSYN-FIX-068を生成する。

【0348】

pSYN-FIX-088のクローニング

pSYN-FIX-067由来のBspE I-EcoR Iフラグメントを、pSYN-FIX-053のBspE I-EcoR I部位にサブクローニングして、pSYN-FIX-088を生成する。

【0349】

pSYN-FIX-089のクローニング

pSYN-FIX-048由来のBspE I-EcoR Iフラグメントを、pSYN-FIX-053のBspE I-EcoR I部位にサブクローニングして、pSYN-FIX-089を生成する。

【0350】

pSYN-FIX-090のクローニング

タンパク質のXba I部位～C末端に由来するFIXコード領域、続いて6x (GGGGGS) リンカー、SCE5コード配列およびEcoR I部位を含むDNAフラグメントは、合成について外注し、pSYN-FIX-053のXba I/EcoR I部位中にサブクローニングして、pSYN-FIX-090を生成した。SCE5配列は以下に示す：
A Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F M F S R Y A M S W V R Q
A P G K G P E W V S G I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T V S R D N S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G A T Y T S R S D V P D Q T S F D Y W G Q
G T L V T V S S G S A S A P K L E E G E F S E A R V S E L T Q D P A V S V A L G

10

20

30

40

50

Q T V R I T C Q G D S L R N F Y A S W Y Q Q K P G Q A P T L V I Y G L S K R P S
G I P D R F S A S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C L L Y Y G G G Q
Q G V F G G G T K L T V L R Q P K A A P S V T L F P P S S A A

【0351】

pSYN-FV I I-094のクローニング

6x (GGGGS) リンカーをコードする配列、続いてSCE5コード配列を含んでいるDNAフラグメントを、合成(外注)して、pSYN-FV I I-011改変体(FV I Iコード領域のC末端でEcoRV部位を生成するように事前に改変された)のEcoRV/EcoRI部位にクローニングした。

【0352】

pSYN-FV I I-088のクローニング

pSYN-FV I I-088のSal I~Rsr I I部位由来のヌクレオチドを含むDNA配列の合成は、外注した。このDNAを、pSYN-FV I I-066のSal I/Rsr I I部位にサブクローニングして、pSYN-FV I I-088を生成した。

【0353】

pSYN-FV I I-125のクローニング

DNAフラグメントは、AP3領域およびリンカーの一部を含んでいる、pSYN-FV I I-088からPCR増幅した。このPCR反応によって、それぞれ、5'および3'でBamH IおよびEcoRI部位を生成した。このDNAフラグメントを、pSYN-FV I I-011のBamH I/EcoRI部位中にサブクローニングしてpSYN-FV I I-125を生成した。

【0354】

pSYN-FV I I I-041のクローニング

ヒト組み換えBードメイン欠失FV I I Iのコード配列を、FV I I I特異的なプライマーを用いてヒト肝臓ポリA RNA (Clontech) から逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって得た。このFV I I I配列は、FV I I Iの天然のシグナル配列を含む。Bードメイン欠失は、セリン743 (S743; 2287bp) の後で開始して、グルタミン1638 (Q1638; 4969bp) の前で終わり、2682bpという総欠失である(SQバージョン)。

【0355】

ヒト組み換えFcのコード配列は、Fc特異的なプライマーを用いてヒト白血球cDNAライブラリー(Clontech) からRT-PCRによって得た。プライマーは、Bードメイン欠失のFV I I I配列が、介在するリンカーなしでFc配列のN末端に直接融合されるように、設計した。FV I I I FcのDNA配列を、哺乳動物の二重発現ベクターpBUDCE4.1 (Invitrogen) の中に、CMVプロモーターの制御下でクローニングした。

【0356】

マウスIgkシグナル配列を含んでいる第二の同一のFc配列は、RT-PCRによって得て、発現ベクターpBUDCE4.1中で、第二のプロモーターEF1αの下流にクローニングした。この最終の構築物を、pSYN-FV I I I-013と命名した。

【0357】

第二のプラスミドを、PCRおよび標準的な分子生物学的技術を用いて同様の構築物から創出し、rFV I I I BDD-Fc-Fc (rFV I I I BDDFcコード配列を、第二のFc配列に対して(GGGGS) 4リンカーとともに融合した) を発現して、rFV I I I BDD-Fcモノマー-二量体ハイブリッドのみの産生を、一過性トランスフェクションで可能にした。この構築物は、pSYN-FV I I I-041と命名した。

【0358】

pSYN-FV I I I-049のクローニング

中間体pSYN-FV I I I-048は、pBUD-CE4.1由来のNhe I/Xho IフラグメントをpSYN-FV I I I-013中にクローニングすることによって生

10

20

30

40

50

成した。pSYN-FV I I I-049のRs r I I ~X b a I 部位由来の領域を含むDNAフラグメントの合成を、外注した。このフラグメントを、pSYN-FV I I I-048のRs r I I /X b a I 部位中にサブクローニングして、pSYN-FV I I I-049を生成した。

【0359】

pSYN-FV I I I-108のクローニング

pSYN-FV I I I-066由来のS a l I /Rs r I I フラグメントを、pSYN-FV I I I-049中にサブクローニングして、pSYN-FV I I I-108を生成したことが示された。

(実施例7)

10

【0360】

活性化された構築物の発現での追加の試み

いくつかの他の構築物を、活性化されたFV I I Iを発現するという目標で作製した。しかし、これらの構築物は、活性化された分子を首尾よく発現することはなかった。ウエスタンブロットによって、FV I I I重鎖は、異種のシグナルペプチドを重鎖のN末端に融合するという一般的方法を用いると遊離のN末端では発現できなかった。

【0361】

pSYN-FV I I I-010のクローニング

FV I I I-010構築物とは、第V I I I因子の重鎖がs c F c足場の状況で発現され、軽鎖が別々に発現された構築物である。

20

【0362】

プライマー対FV I I I-HC-H i n d 3-I g g K s s -F /FV I I I-HC-B s p E I -Rを用い、pSYN-FV I I I-001(上記を参照のこと)を用いてPCR増幅する。pSYN-FV I I I-008(上記を参照のこと)のB s p E I /H i n d I I I 部位におけるクローンで、pSYN-FV I I I-009を生成する。

【0363】

PCRでは、pSYN-FV I I I-003(P0830を参照のこと)由来のFV I I I軽鎖をプライマーFV I I I-LC-N o t I -F /FV I I I-LC-X h o I -Rを用いて増幅して、pSYN-FV I I I-009中にクローニングし、pSYN-FV I I I-010を生成する。

30

【0364】

プライマー

FV I I I-HC-B s p E I -R

A G G A G T T C C G G A G C T G G G C A C G G T G G G C A T G T G T G A G T T T
T G T C G G A T C C C C C G C C A C C G G A A C C T C C A C C G C C T G A T C C
A C C C C C A C C T G A T C C G C C G C C A C C G G A C C C A C C T C C G C C G
G A G C C A C C G C C A C C G G G A A A T G G G G C T C G C A G G A G G

FV I I I-HC-H i n d 3-I g g K s s -f

A C T G A C A A G C T T T G C C G C C A C C A T G G A G A C A G A C A C A C T C C
T G C T A T G G G T A C T G C T G C T C T G G G T T C C A G G T T C C A C T G G
T A T T G T G G G G G G C A A G G T G T G C

40

FV I I I-LC-N o t I -F

A C T G A C G C G G C C G C G C C G C C A C C A T G G T C T C C C A G G

FV I I I-LC-X h o I -R

A C T G A C C T C G A G T T A T C G G C C T T G G G G T T T G C T G G

【0365】

pSYN-FV I I I-013のクローニング

FV I I I-013構築物とは、軽鎖がs c F c足場の状況で発現され、重鎖が別々に発現された構築物である。

【0366】

50

pSYN-FV I I-001 (P0830を参照のこと)由来のプライマー対FV I I-LC-リンカー-BamH I-R/Hind I I I-Kozak-FV I I-Fandを用いてPCR増幅して、pSYN-FV I I-011のBamH I/Hind I I I部位にクローニングして、pSYN-FV I I-012を生成する。プライマー対FV I I-HC-Not I-F/FV I I-HC-Xho I-Rを用いてpSYN-FV I I-009由来のFV I I-HCをPCR増幅して、pSYN-FV I I-012中にサブクローニングしてpSYN-FV I I-013を生成する。

【0367】

プライマー

FV I I-LC-6xリンカー-BamH I-R A C T G A C G G A T C C C C C G C
C A C C G G A A C C T C C A C C G C C T G A T C C A C C C C C A C C T G A T C C
G C C G C C A C C G G A C C C A C C T C C G C C G G A G C C A C C G C C A C C T
C G G C C T T G G G G T T T G C T G G C
Hind I I I-Kozak-FV I I-F
C G A C A A G C T T G C C G C C A C C A T G G T C T C C C A G G C C C T C A G G
FV I I-HC-Not I-F
A C T G A C G C G G C C G C C G C C A C C A T G G A G A C A G A C
FV I I-HC-Xho I-R
A C T G A C C T C G A G T T A G G G A A A T G G G G C T C G C A G G A G

10

【0368】

pSYN-FV I I-018のクローニング

FV I I-018構築物のために、FV I Iの重鎖をFc融合タンパク質として発現して、FV I Iの軽鎖を、別々のFc融合タンパク質として別々に発現した。

20

【0369】

プライマーFV I I-HC-Hind3-IggKss-F/scFc-EcoR I-Rを用いて、HCFV I I-リンカー-Fcを、pSYN-FV I I-010をテンプレートとして用いてPCR増幅した。pBUDCE4のHind I I I/EcoR I部位中にサブクローニングする。これによってpSYN-FV I I-017を作製する。次に、pSYN-FV I I-013から、プライマーsFV I I-LC-Not I-F/FC-XHO I-Rを用いてPCR増幅して、FV I I-017のXho I/Not I部位中にサブクローニングする。これによってPSYN-FV I I-018を作製する。

30

【0370】

プライマー

s c F c-E c o R I-R
A C T G A C G A A T T C T C A T T T T A C C C G G A G A C A G G G A G
F c-X h o I-R
A G C T C T C G A G T C A T T T T A C C C G G A G A C A G G G

(実施例8)

【0371】

活性化可能な構築物の発現の試み

40

FV I I-039、-040のクローニング

DFT R第X I a因子切断部位の場合は、適切な切断部位を用いて、第V I I因子が凝固の部位で、インビボで活性化され得るいくつかの構築物を、構築物を生成する試みで作製した。

【0372】

039構築物は、s c F c足場の状況で作製した。この構築物は、FV I I軽鎖、FX I a切断部位、およびI153V変異体を有するrFV I I重鎖を、第一のFc部分のN末端に結合された直鎖状配列に含んだ。

040構築物はまた、s c F c足場の状況でも作製した。この構築物は、R152欠失を有するFV I I軽鎖、X I a切断部位、およびI153V変異体を有するFV I I重鎖を

50

、第一のFc部分のN末端に連結された直鎖状配列中に含んだ。DFTR切断配列は、FIXに見出される天然のFXIa配列である。FIXでは、DFTR配列にはバリンが続き、そのためI152V変異体を、pSYN-FVII-039、-040に導入してFXIa切断有効性を増大した。

【0373】

DNA分子Genscript-FVII-039および-040の合成は、外注した(Genscript)。Genscript-FVII-039および-040由来のXbaI/BsiWIフラグメントを、pSYN-FVII-011のXbaI/BsiWI部位にサブクローニングして、それぞれpSYN-FVII-039および-040を生成した。

(実施例9)

【0374】

構築物の一過性トランスフェクション

構築物の発現のために、HEK-293-F細胞を、ビタミンK3(FVIIおよびFIXトランスフェクションのみのため)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を補充したFreestyle培地(Invitrogen)中の懸濁物中で $2\mu\text{g}/\text{リットル}$ (増殖培地)まで、懸濁細胞として $37^{\circ}\text{C}/10\%\text{CO}_2$ で増殖させた。細胞は、3日ごとに4日まで、 5×10^5 細胞/mlの細胞密度で播種することによって継代培養した。

【0375】

トランスフェクションの24時間前、細胞を、LONG(商標)R3IGF-1(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を補充した増殖培地中で、 $20\mu\text{g}/\text{リットル}$ (トランスフェクション培地)に 7×10^5 細胞/mlで播種した。トランスフェクションの日、トランスフェクション溶液を、トランスフェクトされるべき細胞培養物の総容積の5%に等しい溶液で作製した。トランスフェクション溶液中で、DNAを、トランスフェクション培地中のPEI($60\text{mg}/\text{L}$)の新鮮に作製された溶液に添加した(最終濃度 $20\text{mg}/\text{L}$)。この溶液を、30秒間旋回させて、室温で5分間インキュベートした後に細胞培養物に直接添加した。4時間後、ビタミンK3、LONG(商標)R3IGF-1および 200mM のL-グルタミンを補充したOptiCHO(Invitrogen)の細胞培養容積に等しい容積を、細胞に添加した。その細胞培養物を、上記で示されたように増殖させて、毎日の培地のサンプルを採取して、タンパク質発現を評価した。回収の日に、細胞をスピンドウンして、培地をタンパク質生成、またはプロテインAプルダウン/ウエスタンブロットによるタンパク質分析のために調製物中に濾過した。

(実施例10)

【0376】

FVIIIFc分子(FVII-028およびFVII-053を除く)およびFIXFc分子のタンパク質精製

FVIIIFc分子は、以下のカラム：1)シュードーアフィニティー溶出による陰イオン交換クロマトグラフィー(例えば、Qセファロース4FF(GE Healthcare)続いて、最も活性な種を選択的に溶出する種々のレベルの CaCl_2 での溶出)、続いて2)shFcRn(可溶性ヒトFcRn)アフィニティー(セファロース4FFビーズとのNH₂-カップリングshFcRn)クロマトグラフィー、を用いて馴化培地から精製して、Fc含有タンパク質を低いpH(例えば、pH6.2)で結合し、中性のpH(例えば、pH8.0)を溶出する。いくつかの場合には、NaCl溶出による陰イオン交換クロマトグラフィーを利用している追加の工程を含んだ。これらの精製工程は、当業者に公知の標準的な方法を利用して、SEC分析およびSDS-PAGEによって95%を超える純度の精製タンパク質を生成した。FIXFcタンパク質は、米国特許第7,566,565号に以前に記載されるとおりに精製した。

(実施例11)

【0377】

F V I I - 0 2 8 および F V I I - 0 5 3 のタンパク質精製

F V I I - 0 2 8 および - 0 5 3 を、以下のカラムを用いて馴化培地から精製した：1) 疎水性相互作用クロマトグラフィー（例えば、Phenyl FF (high sub) (GE Health care)）、続いて2) 塩溶液を用いる陰イオン／陽イオン交換クロマトグラフィー。これらの精製工程は、当業者に公知の標準的な方法を利用して、SEC 分析および SDS-PAGE によって 95% を超える純度の精製タンパク質を生成した。

(実施例 12)

【0378】

F I X - 0 9 0 のタンパク質精製

F I X - 0 9 0 を、2-工程のクロマトグラフィープロセス、最初は、抗 GLA ドメイン抗体によるイムノアフィニティークロマトグラフィー、つづいて上記の F I X F c タンパク質と同様のシュードアフィニティー溶出を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーを通じて精製した。これらの精製工程は、当業者に公知の標準的な方法を利用して、SEC 分析および SDS-PAGE によって 95% を超える純度の精製タンパク質を生成した。

(実施例 13)

【0379】

F V I I I F c タンパク質の精製

F V I I I F c タンパク質を、F V I I I 特異的アフィニティー精製工程 (McCu e 2009) 続いて陰イオン交換と標準 NaCl 溶出との組み合わせおよび／または s h F c R n (可溶性ヒト F c R n) アフィニティー (セファロース 4 F F ビーズとの NHS カップリング s h F c R n) クロマトグラフィーを含む、2 または 3 つのカラム精製プロセスを用いて、浄化されかつ化学的に定義された回収培地から精製して、F c - 含有タンパク質を低 pH (例えば、pH 6.2) で結合して、中性の pH (例えば、pH 8.0) で溶出する。これらの精製工程は、当業者に公知の標準的な方法を利用して、SEC 分析および SDS-PAGE によって 95% を超える純度の精製タンパク質を生成した。

(実施例 14)

【0380】

F V I I 構築物の活性化

F V I I F c を含んでいる F c R n カラムから溶出した画分を、プールして、総タンパク質を、4 mg/ml まで濃縮した。CaCl₂ 濃度を、5 mM まで上げて、そのサンプルを、4℃で 24～48 時間、少なくとも 80% の F V I I F c が活性化されるまでインキュベートした。活性化の程度は、SDS PAGE によって評価した (図 10)。

(実施例 15)

【0381】

F V I I a 活性アッセイ、可溶性組織因子方法

F V I I a F c 変体の不活性を、可溶性組織因子方法によって決定した。脂質化された全長組織因子とは異なり、可溶性組織因子 (組織因子の細胞外部分) は、F V I I を F V I I a に活性化できないが、これは、F V I I a による第 X 因子の第 X a 因子への変換の活性化因子として機能する。F V I I a F c 変体の比活性を決定するために、A S T A C L O T (登録商標) F V I I - r T F キット (D i a g n o s t i c a S t a g o, A s n i e r e s, F r a n c e) を、以下の製造業者の推奨に従って用いた。表 1 は、データをまとめており、全ての変体について匹敵する比活性を示す。

【0382】

10

20

30

40

【表 1】

表 1. 可溶性組織因子方法に基づく FV I I a F c 改変体の比活性

F V I I a F c	I U / n M
F V I I - 0 1 1	9 9 1
F V I I - 0 2 4	9 2 9
F V I I - 0 2 7	7 9 0
F V I I - 0 3 7	1 1 3 1
F V I I - 0 4 4	1 3 0 0
F V I I - 0 4 5	9 0 6
F V I I - 0 4 6	1 1 4 5
F V I I - 0 4 7	9 2 4
F V I I - 0 4 8	9 7 3
F V I I - 0 4 9	1 1 3 0
F V I I - 0 5 3	9 2 9

(実施例 18)

【0383】

F V I I a F c および血小板の結合を研究するための F A C アッセイ

本実施例では、以下の試薬および方法を用いた：

試薬

A D P : S i g m a A l d r i c h , カタログ番号 A 2 7 5 4 , ストック 1 m M 、作業濃度 1 0 u M

S F L L R N ペプチド：社内合成、ストック濃度 5 m g / m l (6 . 7 m M) 、作業濃度 5 0 u g / m l (6 7 u M)

F V I I 抗体 - F I T C - 標識 : A f f i n i t y B i o l o g i c a l s S A F V I I - A P F T C

血小板緩衝液：1 5 m M の H E P E S 、 1 3 8 m M の N a C l 、 2 . 7 m M の K C l 、 1 m M の M g C l 2 、 5 m M の C a C l 2 、 5 . 5 m M のデキストロースおよび m g / m l の B S A 、 p H 7 . 4

【0384】

方法

●血小板をカウントする

●2 0 u l の約 $2 \sim 4 \times 10^8$ 細胞 / m l のゲル精製血小板を 1 m l の血小板緩衝液に添加する。

●各々のサンプルについて 1 0 0 u l のアリコートを作製する

●必要に応じてアゴニストおよび F V I I F c を (所望の濃度まで) 添加して、3 7 ° C で 1 5 分間インキュベートする

●等容積の H B S / 5 m M の C a C l 2 / 1 . 5 % ホルムアミドを添加して、2 0 分間、R T でインキュベートする

●3 0 0 0 g で 1 5 分間スピニングする

●H B S / 5 m M の C a C l 2 / 1 m g / 1 m l の B S A 中で洗浄し、再度スピニングして、1 0 0 u l の血小板緩衝液中に再懸濁した。

●2 . 5 u l の F V I I 抗体 - F I T C 標識を添加し、3 0 分間室温でインキュベートする。

●F A C で分析する

(実施例 17)

【0385】

トロンビン生成アッセイ

本実施例では、以下の試薬および方法を用いた：

【0386】

試薬

FV: HTI, カタログ番号 HCV-0100, ロット番号 Z0413, 5.1 mg/ml

プロトロンビン: HTI, カタログ番号 HCP-0010, ロット番号 Z0128, 4.8 mg/ml

FX: HTI, カタログ番号 HCX-0050, ロット番号 X0401, 5.4 mg/ml

ATIII: HTI, カタログ番号 HCATIII-0120, ロット番号 Y0401, 8.2 mg/ml

TFPI: American Diagnostica, カタログ番号 4900PC, ロット番号 081031, 100 ug/ml

リーダー: Fluorskan, Thermo Electron Fluorometer

トロンビン標準物質: トロンビンスコープ (Thrombinoscope), カタログ番号 TS20.00

フルカ (Fluca): トロンビンスコープ (Thrombinoscope), カタログ番号 TS50.00

血小板緩衝液: 15 mM の HEPES (pH 7.4)、138 mM の NaCl、2.7 mM の KCl、1 mM の MgCl₂、5.5 mM の デキストロース、1 mg/ml の BSA を補充 (使用前に)

ADP: Sigma Aldrich, カタログ番号 A2754, ストック 1 mM, 作業濃度 10 uM

SFLLRN ペプチド: 社内合成、ストック濃度 5 mg/ml (6.7 mM)、作業濃度 50 ug/ml (67 uM)

【0387】

【表2】

	一次的ストック (mg/ml)	作業溶液 (ug/ml)	[最終の] ug/ml
FV	5.1	105.6	4.4
FII	4.8	1200	54
FX	5.4	120	5
ATIII	8.2	1800	75
TFPI	0.1	1.44	0.06
血小板	2-10E8	1.74E8	0.6E8
FVIIFc	1 mg/ml (10 uM)	1200 nM	200 nM
FVIIFc	1 mg/ml (10 uM)	200 nM	62.5 nM
FVIIFc	1 mg/ml (10 uM)	62.5 nM	12.5 nM

【0388】

方法

— 製造業者の推奨に従ってソフトウェアを設定する。

【0389】

— 水および Fluca 緩衝液を事前に温める。

【0390】

— 凝固因子ミックス (混合物) を作製する。FV、FII、FX、ATIII および TFPI のストック濃縮物を希釈して、作業溶液を作製する。5 ul/ウェルが必要であり、そのため 30 ウェルのアッセイのために、単一のバルク溶液中に全ての凝固因子溶液の 180 ul の各々のミックスを調製する。

【0391】

－F V I I a F c 希釈物を予備調製する。1200 nMの溶液（12 u lを88 u lの緩衝液中に）を100 u l中に作製して、4倍（25 u lを75 u lの緩衝液に）に希釈して、200 nMおよび62.5 nMの溶液を得る。

【0392】

－標準物質溶液を作製する（1 m lの温水を標準物質バイアルに）

【0393】

－20 u lの緩衝液または標準物質をウェルに添加する

【0394】

－25 u lの凝固因子ミックスをウェルに添加する（または25 u lの緩衝液を標準物質ウェルに）

【0395】

－20 u lのF V I I a F c ウェルに添加する（または緩衝液を標準物質ウェルに）

【0396】

－35 u lの血小板を添加する（事前にA D PおよびS F L L R Nを添加する）。血小板を標準物質ウェルに添加する。

【0397】

－装置にプレートを置き、F l u c a緩衝液を調製し、プレートを装置に置いた5分後、反応を開始する（20 u l F l u c a／ウェルを添加する）。

（実施例18）

【0398】

－過性トランスフェクションから生成されるタンパク質の分析

－過性トランスフェクションからのタンパク質の分析のために、p S Y N－F V I I－010、011、－013、－018、－003、－019、－020および－024のトランスフェクション由来の馴化培地を、プロテインA免疫沈降に供した。要するに、細胞培養上清を、ほぼ50 u lのプロテインA－セファロース50%スラリーと混合して、4℃で1時間振盪しながらインキュベートし、次いで遠心分離してプロテインAビーズをベレットにした。ビーズを、1 m lのP B S中に再懸濁することによって2回洗浄し、スピンして、吸引する。そのビーズを、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S－P A G E）で、減圧条件または非還元条件下で再懸濁して、100℃で5分間加熱し、スピンドウンして、S D S－P A G Eゲル上にロードして、標準的なプロトコールに従って泳動した。ゲルを、ニトロセルロース膜に移して、ウェスタンブロットを行い、F c領域またはF V I I軽鎖を検出した。F c検出のために、用いた抗体は、ヤギ抗ヒトI g G（F c特定の）－西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体（P i e r c e I m m u n o P u r e抗体、カタログ番号31413）であった。F V I I軽鎖検出のために、抗軽鎖モノクローナル抗体を用いた（G r e e n M o u n t a i n, c l o n e 6 M A－219）。この抗体を、5%の脱脂粉乳を含むP B S T（P B Sに加えて0.1%のT w e e n－20）中で、1：15,000（F c検出のため）または1：200（軽鎖検出のため）に希釈し、膜とともに室温で1時間インキュベートした。次いで、膜をP B S T中で3回10分間洗浄し、シグナルをF c検出のための化学発光法によって検出した。F V I I軽鎖検出のためには、膜をさらに、P B S T中で1：5000希釈した、H R P－標識ヤギ抗－マウス抗体（S o u t h e r n B i o t e c h, # 1010－05）を含有する溶液中で1時間インキュベートした。この膜をまた、P B S T中で3回10分間洗浄して、シグナルを、化学発光法によって検出した。化学発光検出は、E C L P l u s W e s t e r n B l o t t i n g D e t e c t i o n S y s t e m（A m e r s h a m B i o s c i e n c e s カタログ番号R P N 2132）を用いて、製造業者のプロトコールに従って行った。シグナルは、S t o r m 840 P h o s p h o r i m a g e r（M o l e c u l a r D e v i c e s）で可視化した。

【0399】

F V I I－024リンカー中のプロタンパク質転換酵素的切断部位のプロセッシングに対

するPC5の効果、図26に示すように試験した。非還元条件下では、切断部位プロセシングに対するPC5の効果は、検出できない。なぜなら、FVII軽鎖-FcおよびFVII重鎖-Fcサブユニットは、Fc領域中で2つのジスルフィド結合を介して連結されたままであるからである(レーン2および3)。還元条件下で、本発明者らは、PC5と同時にトランスフェクトされていない細胞から生成されたFVII-024の部分的プロセシング(レーン4)、ただし細胞がPC5で同時にトランスフェクトされた場合は、完全プロセシング(レーン5)を観察した。このリンカーの完全プロセシングによって、活性化されたFVII(FVIIa)の分泌が生じる。なぜなら、重鎖の遊離のN末端が必要であり、タンパク質を活性化するのに十分であるからである。

(実施例19)

【0400】

FXIaによるFVII-039およびFVII-040の切断

FXIaによる活性化FVII-039およびFVII-040(これらのタンパク質におけるFVII軽鎖のすぐ上流に挿入されたFXIa切断部位の結果として)をインビトロで特徴づけた。50mMのTris-HCl、100mMのNaCl、10mMのCaCl₂、pH7.4中に15nMのFXIaを含有する、FVII-039、FVII-040またはFVII-011(不活性化された)の1.5μM溶液を、5分または20分間インキュベートして、FVIIFcの切断を、還元条件下でSDS PAGEによって、続いてSYPRO Ruby染色(Invitrogen)によって決定した。FXIaは、図28に示されるように、FVII-039、FVII-040および不活性化されたFVII-011を切断できなかった。

(実施例20)

【0401】

別の活性化可能なFVIIFc構築物

FXIaがFVII-039およびFVII-040を切断できないことは、立体障害によって切断部位に対してプロテアーゼが接近できないことで生じた場合がある。FXIaまたはトロンビン切断部位の接近性を改善するためには、この部位は、重鎖に軽鎖が先行しない構造では重鎖の上流に位置する(軽鎖-リンカー-Fc-sscFcリンカー-FXIa/トロンビン切断部位-重鎖-リンカー-Fc)。いくつかの実施形態では、重鎖は、I152V変異体を含む、一旦、最高の切断部位が決定されれば、sscFcが導入され、その結果細胞は、以下の構造を有するヘテロ二量体タンパク質を分泌する：軽鎖-リンカー-Fc(第二の鎖に結合されるジスルフィドである)：FXIa/トロンビン切断部位-重鎖-リンカー-Fc。

【0402】

図28に示される構築物で観察される活性化のレベルを改善するために、図31で図示される活性化可能な変体の第二の生成(図6Eに示されるものと構造が同様)を用いて、切断部位の接近可能性を増大した。この例では、FXIaおよびトロンビン切断部位をこれらの構築物のために用いた(図31を参照のこと)。構築物は、前に記載のように一過性にトランスフェクトされた。FVIIFcは、プロテインAを用いて培地から捕獲した。ビーズに結合したFVIIFcを、緩衝液中に入れ、FXIaまたはトロンビンを添加して、インキュベートした。FVIIFcを、ビーズからSDS PAGEローディング緩衝液を用いて100℃で5分間溶出した。そのゲルを、ロードして、ウェスタンブロットを行い、前に記載のようにFcを検出し、その結果を図32に示す。図32に示されるとおり、トロンビンおよび第XIa因子切断部位の両方とも、切断されて、適切な酵素の存在下でFVII重鎖および軽鎖分子を生じ得る。最高の切断が、構築物FVII-060およびFVII-061について観察されたが、トロンビンの存在下で、負のコントロール(FVII-062)については、切断は観察されなかった。

(実施例21)

【0403】

第VII因子活性化可能な構築物

図33に示される構築物は、(FV I I-090、FV I I-089およびFV I I-062)であって、以前に記載のとおり、クローニングされ、発現され、精製された(これらのタンパク質は、活性化の必要がない)。クローニングのエラーに起因して「V V G G A」配列を、FV I I-060およびFV I I-061のA L R P R トロンビン切断配列の後ろに挿入したが、一方でこの挿入は、活性に影響すると予想されるが、S D S-P A G E ベースのアッセイにおいてトロンビンによる切断の評価に影響するとは予測されない。この配列を、FV I I-089およびFV I I-090中で除去した。125 nMのFV I I-090、FV I I-089、FV I I-062、または血漿由来FV I I (F V I I)に、漸増濃度のトロンビンを添加して、10分間37℃でインキュベートした。この混合物を、S D S-P A G E ゲル上で泳動して、トロンビンによる切断を決定した(図33)。FV I I 軽鎖-FcおよびFV I I 重鎖-Fcの生成は、トロンビンとのインキュベーション後にFV I I-089およびFV I I-090について観察された。血漿由来FV I I またはFV I I-062 陰性コントロールのトロンビンによる切断がなかったという事実によって特異性が示される。FV I I-089およびFV I I-090について切断有効性の有意な相違は観察されなかった。

10

【0404】

トロンビン生成アッセイを用いて、活性化可能な改変体FV I I-090の活性を測定した。FV I I I 欠損の血小板豊富な血漿におけるトロンビン生成アッセイは、前に記載のとおり行い、ただし凝固因子および血小板は、FV I I I 欠損の血小板豊富な血漿で置き換えている。図34に示される結果は、トロンビン生成が、50 nMのFV I I Fcで活性化されたアッセイからである。図34に示すとおり、トロンビンは、50 nMのFV I I a Fcによって生成する。200 nM FV I I-090(陰性コントロールFV I I-062ではない)を50 nMのFV I I Fcに添加することによって、トロンビン生成の有意な増大が生じ、このことは、FV I I-090が、FV I I Fcによって生成されるトロンビンによって活性化されることを示唆する。なんらFV I I Fc 活性化のないFV I I-090は、活性化の存在しないFV I I-062に対してトロンビン生成の増大を示す。これは、組織因子または接触経路活性化の残留レベルによって生成される少量のトロンビンからのFV I I-090の活性化によって生じ得る。

20

(実施例22)

【0405】

高い比活性の第V I I 因子活性化可能構築物

高い比活性のバージョンの第V I I 因子、FV I I-100を作製するために、FV I I-090由来のFV I I 成熟配列のアミノ酸311~322(L Q Q S R K V G D S P N, 170-ループに相当する)を、トリプシンの170-ループ由来のアミノ酸E A S Y P G Kで置き換えた。この置換は、高い比活性を付与することが示された。

30

【0406】

さらなる高い比活性のバージョンの第V I I 因子、FV I I-115を構築した。このバージョンでは、170ループは野性型であるが、FV I Iの重鎖には3つのポイントミューテーション、V158D、E296VおよびM298Qがある。FV I I-100およびFV I I-115を、図41に図示する。

40

【0407】

可溶性組織因子アッセイでは、FV I I-011(野性型FV I I a Fc)の比活性は、10,000 IU/mgである。FV I I-090は、0.32 IU/mgという比活性を、FV I I-100は、0.25 IU/mgという比活性、およびFV I I-115は、14 IU/mgという比活性を有する。従って、各々の活性化可能な形態(適切な酵素による活性化の前)は、このアッセイでは本質的に不活性である。

【0408】

活性化されたFV I Iの状況では、このような高い比活性の改変体は、より有効であるという可能性を有するが、またアンチトロンビンのようなタンパク質による阻害をさらに受けやすい可能性もある。この阻害は、FV I I aが活性であることに依存し;従って、

50

活性化可能な高い比活性の改変体（不活性タンパク質として投与される）は、アンチトロンビン阻害に対してより耐性でなければならないが、損傷部位で一旦活性化されれば、高い比活性を有する可能性がある。

【0409】

トロンビンによる、精製されたF V I I - 0 9 0およびF V I I - 1 0 0および1 1 5（高い比活性の改変体）の切断は、前に記載のとおり試験した。結果を図35に示す。S D S P A G E分析では、3つのタンパク質が、トロンビンによって、匹敵する効率で切断されたことが示された。F V I I - 1 0 0について、F V I I 重鎖-F cおよび軽鎖F cは、1バンド中で崩壊する。なぜなら、グリコシル化部位は、トリプシン170ループの挿入後に重鎖から除去され、F V I I H C - F cバンドの質量を減らし、従ってこれは、ゲル上でより高速に移動し、F V I I L C - F cバンドと共遊走するからである。トロンビン生成アッセイを用いて、活性化可能な改変体F V I I - 0 9 0および高い比活性の改変体F V I I - 1 0 0の活性を測定した。前に本明細書で記載したとおり、トロンビン生成は、ヒト血小板、第X因子、第V因子、プロトロンビン、アンチトロンビンおよび組織因子経路インヒビターを用いて、再構成した系で試験した。活性は、5 n Mトロンビン活性化の有無で測定した。

【0410】

図36に示すとおり、F V I I - 0 9 0の活性は、トロンビンの存在下で増強され、このことは、トロンビンによるF V I I - 0 9 0の活性化を示唆する。しかし、活性は、トロンビン活性化で高い比活性の改変体F V I I - 1 0 0の状況で有意に増大される。トロンビンの非存在下におけるr F V I I - 1 0 0について長い開始時間の高い活性によって、組織因子の残留レベル、トロンビンまたは接触経路活性化は、トロンビンを外因性に付加することなくF V I I - 1 0 0を活性化するのに十分なトロンビンを生成し得る。図37は、他の高い比活性の改変体、F V I I - 1 1 5に関して同様の結果が得られたことを示す。

（実施例23）

【0411】

種々のアッセイを用いる活性化可能な改変体の活性の確認

本実施例では、色素生産性アッセイを用いて、F V I I 活性を測定した。用いたアッセイの1つは、F V I I aによって色素生産性基質の切断を測定することによってF V I I a F cのアミド分解活性を測定する。これらのうち別のアッセイは、F V I I aがF Xを活性化する能力を測定することによってF X活性化の活性を測定するが、これは活性化されるF X（F X a）によって切断される色素生産性基質のレベルを測定することによって決定される。

【0412】

アミド分解アッセイにおいて、色素生産性基質C h r o m o z y m e t - P Aを用いた。F V I I aは、この基質を用量依存性の方式で切断する。この基質はまた、トロンビンによって切断されるが、このトロンビンによる切断は、ヒルジンによって阻害され得る（データ示さず）。

【0413】

図38に示されるとおり、活性化可能な改変体のアミド分解活性は、トロンビン活性化後に測定し得、F V I I - 0 9 0に比較して高い比活性の改変体について大きいアミド分解活性がある。これらのアッセイでは、トロンビンによる活性化可能な分子の活性化後、ヒルジンを添加して、色素生産性基質のトロンビン切断を阻害する。この方式では、トロンビンは、F V I I a活性を検出する能力を妨害しない。

【0414】

F V I I aによるF Xの活性化はまた、高い比活性のF V I I 活性化可能な改変体でも増強される。F V I I aによるF Xの活性を測定するために、基質S 2 7 6 5を用いた。この色素生産性基質はまた、F Xによっても認識される。このアッセイでは、1 0 u MのF Xを、F V I I a F cとともに1 5分間インキュベートして、反応をE D T Aでクエン

チした。図 39 は、F V I I a F c による F X 活性化が検出され得ることを示すコントロール実験の結果を示す。

【0415】

図 40 に示される実験によって、高い比活性の活性化可能な変異体 F V I I - 100 についての F X 活性化活性の増大があることが示される。この実験では、F V I I F c (100 nM) をトロンビン (100 nM) で 20 分間、37 °C で活性化した。ヒルジンを添加してトロンビンを阻害した。F X (10 uM) を添加して、15 分間 37 °C でインキュベートし、続いて E D T A によって反応を阻害した。S 2765 基質を添加して、F X a 生成を、基質切断をモニタリングすることによって検出した。

(実施例 24)

10

【0416】

単量体 F c 分子はまた、活性化可能な形態で合成され得る。

3 つの単量体の構築物を、図 41 に示されるように作製した。F V I I - 118 では、A L R P R 切断部位を、軽鎖と重鎖との間に挿入した。F V I I - 119 では、配列 G G G S - A L R P R を、軽鎖と重鎖との間に挿入した。F V I I - 127 については、構築物を、F V I I - 118 のように、ただし、F V I I - 100 で用いられる同じ高い比活性の変異体を用いて作製した。これらの構築物の不活性化精製の比活性を、可溶性の組織因子アッセイで試験して、F V I I - 011 (10, 000 I U / m g という活性を有した野生型 F V I I a F c) と比較した。F V I I - 118 は、4.5 I U / m g という活性を有し、F V I I - 127 は、1.8 I U / m g という活性を有し、これによって、これらの分子が、それらの活性化可能な形態で本質的に活性がなかったことが示された。

20

【0417】

F V I I - 118、F V I I - 119 および F V I I - 090 のトロンビン切断反応、続いて S D S P A G E 分析を、以前に記載のとおり行った。図 42 で示されるように、活性化可能な構築物中の切断部位は、モノマーおよびヘテロ二量体 F c 分子の両方の状況で切断可能であり得る。この図では、トロンビン濃度が増大している不活性化された F V I I F c バンドの強度の低下は、F V I I - 118、F V I I - 119、および F V I I - 090 構築物について同様である。

【0418】

30

別の活性化可能な単量体の構築物、F V I I - 127 を作製して、試験した。F V I I - 127 は、F V I I - 118 の骨格を有し、ただし、高い比活性を付与するために F V I I - 100 において用いたのと同じ 170 ループ置換を有する。図 43 に示すとおり、F V I I - 127 の活性は、高い比活性のアミノ酸置換を欠いている F V I I - 118 と比較して有意に増大される。トロンビンの非存在下における F V I I - 127 について長い開始時間の高い活性によって、組織因子の残留レベル、トロンビンまたは接触経路活性化は、トロンビンを外因性に付加することなく F V I I - 127 を活性化するのに十分なトロンビンを生成し得ることが示唆される。F V I I - 127 活性は、トロンビンによって加速される。

(実施例 25)

40

【0419】

活性型の G P I I b I I I a に対して標的された F V I I a F c 変異体
本実施例では、図 44 A に図示される構築物を、以前に記載のとおり、クローニングして、一過性に発現して、精製して、活性化した。F V I I - 066 を、P C 5 を用いて同時トランスフェクトして、タンパク質配列が記載された c s c F c リンカーを完全にプロセシングして、第一の F c 部分を血小板標的部分に接続した。これらの構築物は、標的部分 S C E 5 (G P I I b I I I a の活性な高次構造に対する s c F v) を使用した。S C E 5 は、マウスおよびヒトのレセプターと交差反応することが示された。S C E 5 標的部分を、F V I I F c の第二の F c 部分の N 末端 (F V I I - 066) または C 末端 (F V I I - 067) で置き換えた。さらに、S C E 5 を、F V I I a (F V I I - 094) の C

50

末端で置き換えた。F V I I a F c (F V I I - 0 1 1) および N o v o s e v e n を、コントロールとして用いた。図 4 4 B に示されるとおり、これらのタンパク質を、以前に記載のとおり F V I I I 欠損のヒト血漿においてトロンビン生成アッセイによって試験した。これらの実験によって、コントロールに対して S C E 5 標的部分を含んでいる全てのタンパク質についてトロンビン生成の速度の増大が明らかになった。最高速度のトロンビン生成が、F V I I - 0 6 6 で、続いて F V I I - 0 9 4 および F V I I - 0 6 7 で観察され、このことで S C E 5 標的部分の配置は、タンパク質の活性に対して有意な影響を有し得ることが示唆された。活性化されたヒト血小板に対するこれらのタンパク質の結合は、前に記載のとおり F A C S アッセイで測定した (図 4 4 C)。S C E 5 標的部分を含んでいる全ての F V I I a タンパク質は、F V I I a F c コントロールに対する血小板の結合の増大を示した。これによって、F V I I a に対する S C E 5 標的部分の結合は、血小板からその親和性を増大し得ることが示される。S C E 5 標的部分は、マウス G P I I b I I I a レセプターとの相互作用を示したので、F V I I - 0 6 6 を、トロンビン生成アッセイで、マウス F V I I I 欠損の血小板豊富な血漿を用いて、ならびに再構成システムでは、ヒトの精製された成分および血小板を、以前に記載のとおり用いて試験した。(図 2 9)。本発明者らは、両方のシステムにおいてコントロールに対して F V I I - 0 6 6 についてトロンビン生成の速度の増大を観察した。

(実施例 2 6)

【0 4 2 0】

活性型の G P I I b I I I a に対して標的化された追加の F V I I a F c 改変体

本実施例では、図 1 2 A に図示される構築物 F V I I - 0 2 7 をクローニングし、発現し (P C 5 を用いて同時トランスフェクションして、タンパク質配列が記載された c s c F c リンカーを完全にプロセッシングして、第一の F c 部分を血小板標的部分に接続する)、精製して、活性化した (以前に記載のとおり)。この構築物は、標的部分 M B 9 (G P I I b I I I a の活性な高次構造に結合することが示された s c F v) を使用する。F A C S アッセイは、以前に記載のとおり行って、活性化された血小板に対する結合を評価し、F V I I - 0 2 7 が、F V I I - 0 1 1 コントロールよりも高い親和性を有する活性化された血小板に対して結合することが示された (図 1 2 B)。トロンビン生成アッセイを、再構成された精製されたヒトタンパク質および血小板を用いて、以前に記載のとおり行った (図 1 3 A、1 3 B および 1 3 C)。F V I I - 0 2 7 は、コントロールに対してトロンビン生成の速度の増大を示した。図 1 3 D では、トロンビン生成アッセイに基づいて、F V I I - 0 2 7 は、F V I I - 0 1 1 または N o v o s e v e n よりも 4 倍大きい活性を有することが図示される。図 1 4 では、F V I I - 0 2 7 の血小板結合およびトロンビン生成活性の増強が、P A C 1 (G P I I b I I I a の活性化型に対する結合について M B 9 と競合する抗体) によって廃されることを図示しており、このことは、この効果が M B 9 と活性化型の G P I I b I I I a との相互作用によって媒介されることを示している。M B 9 標的部分はまた、図 1 5 に図示される F V I I - 0 3 7 を生成するために F V I I F c の第二の F c 部分の C 末端に配置された。血小板を用いる F V I I I 欠損の再構成された系でのトロンビン生成アッセイによって、N o v o s e v e n コントロールに対して F V I I - 0 3 7 についてトロンビン生成の速度増大が明らかになった (図 1 6)。

(実施例 2 7)

【0 4 2 1】

活性化された血小板および不活性化された血小板の両方に対して標的化された第 V I I 因子構築物

本実施例では、図 4 5 A に図示される構築物を、以前に記載のとおり、クローニングし、発現し、精製して、活性化した。F V I I - 0 8 8 を、P C 5 と同時トランスフェクトして、タンパク質配列が記載された c s c F c リンカーを完全にプロセッシングして、第一の F c 部分を血小板標的部分に接続した。F V I I - 0 8 8 および F V I I - 1 2 5 は、A P 3 標的部分 (ヒト G P I I b I I I a に活性なおよび不活性な高次構造の両方に結合

する s c F v) を使用した。図 4 5 B の結果によって、F V I I I 欠損の血小板豊富な血漿におけるトロンビン生成アッセイが示され、そして F V I I - 0 8 8 および F V I I - 1 2 5 の両方とも、コントロールに対してトロンビン生成の速度増大を示し、このことは、G P I I b I I I a の活性なおよび不活性な高次構造に対する F V I I a F c または F V I I a の標的が、活性の増大を生じることを示している。活性化されたヒト血小板に対する F V I I - 0 8 8 および F V I I a F c の結合を、F A C S (図 4 5 C) によって試験した。これらのデータによって、F V I I - 0 8 8 が血小板に対して、F V I I F c (F V I I - 0 1 1) よりも高い親和性で結合することが明らかになり、これによって、A P 3 標的部分が、血小板について F V I I a F c の親和性を増大し得ることが示される。

【 0 4 2 2 】

R o t a t i o n T h r o m b o e l a s t o m e t r y (R O T E M (登録商標) 、 P e n t a p h a r m G m b H , M u n i c h , G e r m a n y) は、血小板一標的化 F V I I a 構築物を評価するための別の方法である。なぜなら、これによって全血中での (血小板の存在下での) いくつかの凝固パラメーターの特徴付けが可能になるからである。F V I I - 0 8 8 および野性型組み換え F V I I a F c (r F V I I a F c) が強固でかつ安定な凝固を形成する能力を、R O T E M によって、塩化カルシウムを活性化因子 (N A T E M) として用いて、製造業者の推奨に従って評価した。ヒトドナー由来の血小板 A 血液を、F V I I F c を用いて 1 0 0 、 3 0 または 1 0 n M という最終濃度までスパイクした。N A T E M 反応は、C a C l ₂ の添加によって開始した。凝固パラメーター、例としては、凝固時間 (凝血開始時間に関する) 、血栓形成時間 (凝血速度に関する) およびアルファ角 (凝血速度に関する) を、図 3 0 に示すとおり評価した。F V I I - 0 8 8 は、F V I I - 0 8 8 の凝固反応速度の増強と一致して、凝固時間および血栓形成時間の有意な低下、ならびに野性型 r F V I I F c に対するアルファ角の増大を示した。これらのデータによって、F V I I - 0 8 8 は、トロンビン生成アッセイと一致して野性型 F V I I F c に対して活性の増強があることが示される。

(実施例 2 8)

【 0 4 2 3 】

血小板に対して F V I I a を標的するためのペプチドの使用

図 4 6 A に図示される構築物を、以前に記載のとおり、クローニングし、発現し、精製して、活性化した。これらのタンパク質を、血小板レセプター G P I b - α (活性化されたおよび不活性化された血小板で見出される) に結合するペプチド、特異的には P S 4 、 O S 1 、および O S 2 を血小板標的化部分として用いて作製した。これらの分子の作製において、ペプチドを、この構築物の第二の F c 部分の N 末端または C 末端のいずれかに結合した。F V I I - 0 4 4 構築物は、この構築物の第二の F c 部分の C 末端に結合された P S 4 ペプチドを使用し ; F V I I - 0 4 5 は、この構築物の第二の F c 部分の C 末端に結合された O S 1 ペプチドを使用し ; そして F V I I - 0 4 6 構築物は、この構築物の第二の F c 部分の C 末端に結合された O S 2 分子を使用した。対照的に、F V I I - 0 4 7 構築物は、この構築物の第二の F c 部分の N 末端に結合された P S 4 ペプチドを使用し ; F V I I - 0 4 8 分子は、この構築物の第二の F c 部分の N 末端に結合された O S 1 ペプチドを使用し ; そして F V I I - 0 4 9 分子は、この構築物の第二の F c 部分の N 末端に結合された O S 2 ペプチドを使用した。トロンビン生成アッセイは、以前に記載のとおり F V I I I 欠損の血小板豊富な血漿を用いて行った。図 4 6 B に示すとおり、このアッセイを、限界濃度の F V I I a で行った場合、F V I I - 0 4 4 、 F V I I - 0 4 5 、および F V I I - 0 4 6 の C - 末端融合構築物の各々が、N o v o s e v e n コントロールに比較して増強されたトロンビン生成を示した。同様の結果を、N 末端融合構築物について図 4 7 A に示す。図 4 7 B では、F V I I - 0 4 5 構築物が、このアッセイにおいて F V I I - 0 4 8 構築物よりもわずかに優れている場合があること、ただし、やはり N 末端および C 末端融合の両方とも N o v o s e v e n コントロールよりも優れていることが示される。さらに、各々のペプチドについて公開された G P I b - α 親和性 (図 4 8) と F V I I F c に対して組み換え的に融合された場合そのペプチドと関連する活性の増大との間に

10

20

30

40

50

相関がある。図48は、FACSで決定した、活性化血小板に対するFV I I - 0 4 9、FV I I - 0 4 8および野性型FV I I F c (FV I I - 0 1 1コントロール)の結合、ならびにBernardら、Biochemistry 2008. 47: 4674-4682に報告される標的ポリペプチドについての親和性を示す。FACSデータによって、FV I I - 0 1 1コントロールに対する血小板についてのFV I I - 0 4 5およびFV I I - 0 4 8の活性の増大が明らかになった。

(実施例29)

【0424】

活性型のG P I I b I I I aに対して標的されるA n F V I I I F c 改変体

図49Aに図示される構築物は、以前に記載のとおり作製された。FV I I I - 0 4 1は、野性型FV I I I F cであるが、FV I I I - 1 0 8は、第二のFc部分のN末端でSCE5血小板標的化部分を有する。発現のために、FV I I I - 1 0 8を、PC5を用いて同時トランスフェクトして、タンパク質配列が記載されたc s c F c リンカーを完全にプロセシングして、第一のFc部分を血小板標的部分に接続する。これらのタンパク質を、以前に記載のとおりFV I I I 欠損の血小板豊富な血漿を用いてトロンビン生成アッセイで試験し、ただし、さらに、トロンビン生成アッセイはまた、組織因子でも活性化した。図49Bに示すとおり、FV I I I F cの標的化バージョンを用いて有意な改善は示されなかった。本明細書に記載されるトロンビン生成アッセイは、血小板の表面上でのトロンビン生成を測定し、従って活性の正確な指標であることが注目に値する。

(実施例30)

【0425】

G l aドメインを欠く血小板に対して標的されたFV I I のバージョンの作製および試験

本実施例では、図21に図示されるバージョンのFV I I a F cを生成した。このタンパク質は、N末端でMB9 s c F vおよびG l aドメイン除去する欠失を有する。FV I I - 0 5 3は、細胞内活性化のために軽鎖と重鎖との間に挿入されたR K R R K R配列を含む。FV I I - 0 5 3を、一過性に発現して(タンパク質の活性化を生じるR K R R K R配列のプロセシングのためにPC5で同時トランスフェクトした)、以前に記載のとおり精製した。精製した成分および血小板を用いるトロンビン生成アッセイによって、FV I I - 0 5 3がいくつかの活性を有する(図22)(この活性がFV I I - 0 1 1コントロールに対して損なわれるにもかかわらず(図22D))ことが明らかになる。図23のデータは、G P I I b I I I a結合についてMB9と競合するP A C 1抗体がいかに、FV I I - 0 5 3と関連するトロンビン生成活性を阻害するかを示しており、これによって血小板標的化は、活性に重要であることが示唆される。FV I I - 0 5 3と同一(ただしR K R R K R挿入物を欠いている)別の構築物を生成し(FV I I - 0 2 8)不活性化されたFV I I - 0 1 1と一緒に不活性化するのにおいてP k研究で試験した。図50に示されるとおり、標的化されたG l aなしのFV I I - 0 2 8分子の終末半減期は、FV I I - 0 1 1コントロールの半減期(7.1時間)よりもほぼ3倍長く(20.3時間)、このことは、G l aドメインを除去すれば、FV I I F cの終末半減期が増大することを示唆している。

(実施例31)

【0426】

血小板標的したF I X分子

本実施例では、図51Aに図示されるF I X構築物を作製して、試験した。F I X - 0 6 8を、PC5で同時トランスフェクトして、タンパク質配列が記載されるc s c F c リンカーを完全にプロセシングし、第一のFc部分を標的部分に接続した。F I X - 0 6 8は、第二のFc部分のN末端にSCE5血小板標的部分を有するが、F I X - 0 8 8は、第二のFc部分のC末端にSCE5を有する。F I X - 0 9 0は、FcドメインなしのF I X構築物であり、F I Xタンパク質のC末端に結合されたSCE5部分を有する。F I X - 0 4 2は、標的部分のない単鎖のFcとしてのF I X F cであり、コントロールとし

て作製された。BeneFIX (Pfizer) もまた、コントロールとしても用いられた。トロンビン生成アッセイで誤った結果を生じる BeneFIX サンプル由来の微量の活性化された FIX (FIXa) を除去するため、BeneFIX サンプルを、不可逆的な活性部位インヒビターであるグルタミルグリニルアルギニルクロロメチルケトン (Hematologic Technologies) で処理した。BeneFIX を、過剰量のインヒビターとともに室温で 180 分間インキュベートした。次いでそのサンプルを透析して、未結合のインヒビターを除去した。この処理した BeneFIX は以降、BeneFIX と呼ぶ。作製された分子の比活性は、FIX-042、6 IU/nmol; FIX-068、5.1 IU/nmol; FIX-088、3.5 IU/nmol; FIX-090、13.8 IU/nmol、および BeneFIX、12 IU/nmol であった。これらの構築物 (FIX-068、FIX-088 および FIX-042) を、図 51B に示されるように、血小板豊富な FIX 欠損の血漿において、トロンビン生成アッセイで試験した場合、各々の標的された分子は、FIX-042 コントロールよりも高い活性を有した。図 51C は、FIX-068 および FIX-088 の両方とも、トロンビン生成で測定した場合、FIX-042 よりも少なくとも 4 倍大きい活性を有することを図示する。FIX-042 の 1 つ以上の活性は、FIX-068 および FIX-088 よりも高いので、トロンビン生成アッセイで観察される活性の増大は、過小評価され得、従って、血小板標的による活性の増大は、4 倍より大きい場合がある。

10

【0427】

図 52A に示されるとおり、FIX-090 (Fc を欠く) も、BeneFIX に対して活性の増大を示し、このことは、Fc の非存在下で血小板に対して FIX を標的化することはまた活性も増大することを示唆している。図 52B は、FIX-090 の活性が BeneFIX の少なくとも 4 倍であることを示す。FIX-090 および BeneFIX の両方とも同様の比活性を有するので、トロンビン生成アッセイでの活性の 4 倍の増大は、血小板標的化効果によって生じたに違いない。

20

(実施例 32)

【0428】

血小板に対して FIX を標的化するためのペプチドの使用

本実施例では、図 53A に図示される FIX-089 構築物を、以前に記載のとおり、クローニングして、一過性に発現して、精製した。この分子は、この構築物の第二の Fc 部分の N 末端に結合された、GP1b- α レセプターに結合する OS1 ペプチドを含む。FIX-089 構築物の比活性は、コントロールの FIX-042 分子のコントロールについての 6 IU/nmol に比べて、2.4 IU/nmol であった。

30

【0429】

図 53B に示されるとおり、FIX-089 分子は、FIX-血小板豊富な血漿を用いるトロンビン生成アッセイにおいて FIX-042 コントロールよりも活性であり；これは、FIX の限界濃度では特に明白である。図 53C によって、FIX-089 が、トロンビン生成で測定した場合、FIX-042 よりもほぼ 4 倍強いが、一方で有する不活性は低いことが示される。これによってさらに、GP1b に対する標的化は、FIXFc の活性を増大することが示唆される。

40

【0430】

ドラフトの配列表

FVII-027 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、Fc 領域に FVII または MB9 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そしてプロタンパク質転換酵素プロセッシング部位を有するリンカーは、太字で示している

【0431】

【化 1】

MVSOALRLLC LLLGLOGCIA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
 KRNASKPQGR IVGGKVCPCG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAVVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLDGRA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSPN
 ITEYMFAGY SDGSKDSCG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG **KRRRRSGGGG** **SGGGSGGGG**
SGGGSGGGG **SGGGSRKRR** **KRAEVQLVQS** GAEVNKPGAS VKVSKASGY TFTGYMHWV
 RQAPGGLEW MGWINPNSGG TNYAQKFQGW VTMTRDTSIS TAYMELSRLR SDDTAVYYCA
 RGRALYNRND RSPNWFDPWG QGTLVTVSSG SASAPTLKLE EGEFSEARVQ AVLTQPPSVS
 VAPGQTARIT CGGNIGSKS VQWYQQKPGQ APVLVYDDS DRPSGIPERF SGSNSGNMAT
 LTISRVEAGD EADYYCQVWD SSSDHVVFEGG GTKLTVLGQP KAAPSVTLFP PSAAAGGGGS
GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
 YTQKSLSLSP GK

10

F V I I - 0 2 7 の D N A 配列
 【 0 4 3 2 】

【化 2】

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcttggt
 gcagtcttcg taaccagga ggaagccac ggcttcctgc accggcgccg gcgcgccaac
 ggttctctgg aggagctgag gccgggtcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtg
 tccttcgagg aggcctggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
 tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattgggg ctctgcaag
 gaccagctcc agtctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgaggcccg gaactgtgag
 acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
 agtgaccaca cgggcaccaa gcgtctctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca
 gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
 aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtgggg gcaagggtgtg ccccaaaggg
 gagtgtccat ggcaggtcct gttgttgggt aatggagctc agttgtgtgg ggggacctg
 atcaacacca tctgggtggt ctccggggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
 aacctgatcg cgtgtctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacggga tgacagagc
 cggcggtggt cgcaggtcat ctccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
 atcgctctgc tccgctgca ccagccctg gtctcactg accatgtggt gccctctgc
 ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgctctc attgtcagc
 ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
 ccccggtcga tgaccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctcccaaat
 atcacggagt acatgttctg tgcggctac tccgatggca gcaaggactc ctgcaaggg
 gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
 agctggggcc aggtctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag
 tacatcgagt ggtcgaataa gctcatgcgc tcagagccac gccagaggt cctctgcga
 gccccatttc cgggtggcgg tggtccggc ggaggtgggt ccggtggcgg cggatcaggt
 gggggtggat caggcgtggt aggttccggt ggcggggat ccgacaaaac tcacacatgc
 ccaccgtgcc cagctccgga actcctgggc ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
 cccaaggaca cctcatgat ctccggacc cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc
 accgtctgc accagactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcagcc ccgagaacca
 caggtgtaca ccttgccccc atccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
 tgctgtgca aaggttctc tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact ccgacggctc cttcttctc
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtct ctcatgctcc
 gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
 aaacggcgcc gccggagcgg tgccggcgga tcaggtgggg gtggatcagg cgtggagggt
 tccggtggcg ggggatccgg cgttgaggtt ggagctgagg tgaataagcc tggggcctca
 aagagggcgg aagtgcagct ggtgcagttc accttcaccg gctactatat gcactgggtg
 gtgaaggtct cctgcaaggt ttctggatac atgggatgga tcaaccctaa cagtgggtg
 cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg gtcacatga ccaggacac gtccatcagc
 aaaaactatg cacagaagtt cagggctgga cgtgacgaca cggcgtgta ttactgtgcg
 accgcttaca tggagctgag caggttgaga cgggtcccca actggttoga cccctggggc
 agagggcgtg ctttgtataa ctcctcaggg agtgcacccg ccccaacct taagcttgaa
 cagggaaacc tctcagaagc acgcgtacag gctgtgctga ctacgcgcc ctcggtgtca
 gtggcccag gacagcggc caggattacc tgtgggggaa acaacattgg aagtaaaagt
 gtgcatggt accagcagaa gccaggccag gcccctgtgc tggctgtcta tgatgatagc
 gaccggccct caggatccc tgagcgattc tctggctcca actctgggaa catggccacc
 ctgaccatca cagggtcga agccgggat gaggccgact attactgtca ggtgtgggt
 agtagtagtg atcatgtgtt attcggcgga gggaccaagc tgaccgtcct aggtcagccc
 aaggctgcc cctcggtcac tctgttccc cgtcccgcg ccgctggtgg cgtggctcc
 ggcggaggtg ggtccggtg cggcggtatca ggtgggggtg gatcaggcgg tggaggttcc
 ggtggcgggg gatcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg
 ggaggaccgt cagtcttct ctccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg
 accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg ggaggagcag
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc
 atctccaaa ccaaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgc
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaagctt ctatccagc
 gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct
 cccgtgttg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctaccgt ggacaagagc
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtct gcacaaccac
 tacacgcaga agagcctct cctgtctccg ggtaaatga

10

20

30

40

G e n s c r i p t - F V I I - 0 2 7 - 1 D N A 配列

【 0 4 3 3 】

【化 3】

```

gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaacc gcgcccgcgg agcgggtggc gccgatcagg
tggggggtgga tcaggcggtg gaggttccgg tggcggggga tccggcggtg gaggttccgg
tggggggtgga tcaaggaaga ggaggaagag ggcggaagtg cagctggtgc agtctggagc
tgagggtgaat aagcctgggg cctcagtgaa ggtctcctgc aaggcttctg gatacacctt
caccggctac tatatgactt ggtgacgaca ggccccctga caagggttg agtggatggg
atggatcaac ctaaacagtg gtggcacaaa ctatgcacag aagtttcagg gctgggtcac
catgaccagg gacacgtcca tcagcaccgc ctacatggag ctgagcaggc tgagatctga
cgacacggcc gtgtattact gtgcgagagg ccgtgctttg tataaccgga acgaccggtc
ccccaactgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct cagggagtgc
atccgccccca acccttaagc ttgaagaagg tgaattc

```

G e n s c r i p t - F V I I - 0 2 6 - 2 D N A 配列

10

【0 4 3 4】

【化 4】

```

gaattctcag aagcacgcgt acaggtctgt ctgactcagc cgccctcggt gtcagtggcc
ccaggacaga agccaggat tacctgtggg ggaacaaca ttggaagtaa aagtgtgcag
tggtaccagc agaagccagg ccaggccctt gtgctggtcg tctatgatga tagcgaccgg
ccctcaggga tccctgagcg attctctggc tccaactctg ggaacatggc caccctgacc
atcagcaggg tgaagccgg ggatgaggcc gactattact gtcagggtgt ggatagtagt
agtgatcatg tggatttcgg cggagggacc aagctgaccg tcttaggtca gcccaaggct
gccccctcgg tcaactctgt cccgcccgtc gcggccgctg gtggcggttg ctccggcgga
ggtgggtccg gtggcgcgcg atcaggtggg ggtggatcag gcggtggagg ttccgggtggc
gggggatcac acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cactgaact cctgggagga
ccgtcagttc tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccctt
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgcatgag
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
ttggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagaattc

```

20

F V I I - 0 3 7 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に F V I I または M B 9 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そして両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示している

30

【0 4 3 5】

【化 5】

```

MYSOALRLIC LILGLOGCIA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
HKDDQLICV NENGCEQYC SDHTGTRSC RHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPLE
KRNASKPQGR IVGGKVC PKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
NLI AVLGEHD LSEHDGEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVP LC
LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLD RGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDS PN
ITEYMF CAGY SDGSKDSC KG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
YIEWLQKL MR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGS DKTHTC
PPCPAPELLG GPSVFLFPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDS DGSFFL
YSKLTVDKSR WQQGNVFS CS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGGGGSGGGG SGGGGSGGGG
SDKTHTCP PC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHN AKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
KGQPREPQVY TLPPSRDEL T KNQVSLTCLV KGFYPSDI AV EWESNGQPEN NYKTPPVLD
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GSGGGGSGG
GGSGGGGSGG GSGGGGSGAE VQLVQSGAEV NKP GASVKVS CKASGYTF TG YMHWWVQAP
GQGLEWMGWI NPNSGGTNYA QKFQGWV TMT RDT SISTAYM ELSRLRSDDT AVYYCARGRA
LYNRNDRSPN WFDWPGQGT L VTVSSGSASA PTLKLEEGEF SEARVQAVLT QPPSVSVAPG
QTARITCGGN NIGSKSVQWY QQKPGQAPVL VVYDDSDRPS GIPERFSGSN SGNMATLTIS
RVEAGDEADY YCQVWDSSSD HVVFGGGTKL TVLGQPKAAP SVTLFPSSAA A

```

40

F I X - 0 3 7 D N A 配列

【0 4 3 6】

【化 6】

```

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcttggct
gcagtcttcg taaccaggga ggaagccac ggctgctgc accggcgccg gcgcgccaac
gcgttctctg aggaagctgc gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc
tccttcgagg agggccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattgggg ctctgcaag
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctcctgcct tcgagggccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtaccaca cgggcaccaa gcgtcctgt cgggtgccac aggggtactc tctgctggca
gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtgggg gcaaggtgtg ccccaaaggg
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttgggt aatggagctc agttgtgtgg ggggacctg
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc
cggcggtggt cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccggt gtcctcactg accatgtggt gccctctctg
ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
ccccggctga tgaccagga ctgctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat
atcacggagt acatgttctg tgcgggtac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
agctggggcc aggtctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga
gccccatttc ccggtggcgg aggttccggg ggacgtcag tcttctctt cccccaaaa
gggggtggat caggcgttgg aggttccggg ggacgtcag tcttctctt cccccaaaa
ccaccgtgcc cagctccgga actcctgggc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc
accgtcctgc accagagctg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
gccctccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact ccgacggtc cttcttctc
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtct ctcatgctc
gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt
aaaggtggcg gcggatcagg ttgggggtgga tcaggcggtg gaggttccgg tggcggggga
tcagacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactctggg aggaccgtca
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggte
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcag
tacgtgtgg tcagctctc caccgtctc caccaggact ggctgaatgg caaggagtag
aagtgcgaag tctccaacca agcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgca tgagctgacc
aagaaccagg tcagcctgac ctgcttggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctc cgtgttgga
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctacaccgtc acaagagcag gtggcagcag
gggaacgtct cctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag
agcctctccc tgtctccggg taaagggtgc ggtggctccg gcggaggtgg gtccggtggc
ggcggtcag gtgggggtgg atcaggcggt ggaggttccg gtggcggggg atcagcgga
gtgcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aataagcctg gggcctcagt gaaggtctc
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccc
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctaaca gtggtggcac aaactatgca
cagaagtttc aggtctgggt caccatgacc agggcacgt ccatcgac cgcctacatg
gagctgagca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggcctgct
ttgtataacc ggaacgaccg gtcccccaac tggttcgacc cctggggcca gggaaacctg
gtcaccgtct cctcagggag tgcacccgcc ccaaccctta agcttgaaga aggtgaattt
tcagaagcac gcgtacaggc tgtgtgact cagecgccct cgggtgtcagt ggccccagga
cagacggcca ggattacctg tgggggaaac aacattggaa gtaaaagtgt gcagtggtag
cagcagaagc caggccaggc cctgtgctg gtcgtctatg atgatatgga ccggccctca
gggatccctg agcgttctc tggctccaac tctgggaaca tggccacct gaccatcagc
agggctgaag ccggggatga ggcgactat tactgtcagg tgtgggtag tagtagtag
catgtggtat tcggcgagg gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc
tcggtcactc tgttccgcgc gtcggcgccc gcttga

```

10

20

30

40

F V I I - 0 5 3 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、F c 領域に対して F V I I を接続するリンカー領域は、下線を付しており、両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示している、そして M B 9 は、イタリック体になっている。

【0 4 3 7】

【化 7】

MVSQALRLLC LLLGLOGCIA AEVQLVQSGA EVNKPASVK VSCKASGYTF TGYMHWVRQ
APGQGLEWMG WINPNSGGTN YAQKFQGWVT MTRDTSISTA YMELSRRLSD DTAVYYCARG
RALYNRNDRS PNWFDPWGQG TLVTVSSGSA SAPTLKLEEG EFSEARVQAV LTQPPSVSVA
PGQTARITCG GNNIGSKSVQ WYQQKPGQAP VLVYDDSDR PSGIPERFSG SNSGNMATLT
ISRVEAGDEA DYYCQVWDSS SDHVVFGGGT KLTVLGQPKA APSVTLFPSP AAARTKLFWI
SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGGCEQYC
SDHTGTRKSC RCHEGYSLA DGVSTPTVE YPCGKIPIE KRNASKPQGR RKRRKRIVGG
KVCPKGECPW QVLLLVNGAQ LCGGTLINTI WVVSAAHCFD KIKNWRNLIA VLGEHDLSEH
DGDEQSRRVA QVIIPSTYVP GTTNHDIALI RLHQPVVLT HVVPLCLPER TFSERTLAEV
RFSLVSGWGQ LLDRGATALE LMVLNVPRLM TQDCLQQSRK VGDSFNITEY MFCAGYSDGS
KDSCKGDSGG PHATHYRGTW YLTGIVSWGQ GCATVGHFGV YTRVSQYIEW LQKLMRSEPR
PGVLLRAPFP GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS DKHTCPCPC APELLGGPSV
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
NQVSLTCLVK GFYPSTIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGDKT HTCPCCPAPE
LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
KSRWQQGNVF SCSVMEALH NHYTQKSLSL SPGK

10

F V I I - 0 5 3 D N A 配列

【 0 4 3 8 】

【化 8】

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
 gcggaagtgc agctggtgca gtctggagct gaggtgaata agcctggggc ctcagtgaag
 gtctcctgca aggcctctgg atacaccttc accggtactc atatgactg ggtgcgacag
 gcccctggac aagggtctga gtggtatgga tggatcaacc ctaacagtgg tggcacaac
 tatgcacaga agtttcagggt ctgggtcacc atgaccaggg acacgtccat cagcaccgcc
 tacatggagc ttagcaggtc gagatctgac gacacggccg tgtattactg tgcgagaggc
 cgtgctttgt ataaccggaa cgaccgggtcc cccaactggg tcgaccctcg gggccaggga
 accctgggtca cgtctcctc agggagtgc tccgccccaa cccttaaact tgaagaagg
 gaattttcag aagcacgcgt acaggctgtg ctgactcagc cgcctcggg gtcagtggcc
 ccaggacaga cggccaggat tacctgtggg ggaacaaca ttggaagtaa aagtgtgcag
 tgggtaccagc agaagccagg ccaggccctc gtgctgggtc tctatgatga tagcgaccgg
 ccctcaggga tccctgagcg attctctggc tccaactctg ggaacatggc caccctgacc
 atcagcaggg tcgaagccgg ggtgaggcc gactattact gtcagggtgt ggatagtagt
 agtgatcatg tgggtattcg cggagggacc aagctgaccg tccataggtc gcccaaggct
 gcccctcgg tctactctgt ccgcccgtcc gcggccgcta ggacgaagct gttctggatt
 tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattgggg ctcctgcaag
 gaccagctcc agtctatat ctgctctctc ctccctgcct tcgaggggcg gaactgtgag
 acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
 agtgaccaca cgggcaccaa cgtctcctgt cgggtccacg aggggtactc tctgctggca
 gacgggggtg cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
 aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga aggaagagga ggaagaggat tgtggggggc
 aagggtgtgc ccaaggggga gtgtccatgg caggctcctg tggtgggtgaa tggagctcag
 ttgtgtgggg ggacctgat caacaccatc tgggtgggtc ccgcgccca ctgtttcgac
 aaaatcaaga actggaggaa cctgatcgcg gtgctggggc agcacgacct cagcgagcac
 gacggggatg agcagagccg gcgggtggcg cagggtcatc tccccagcac gtactcccg
 ggcaccacca accacgacat cgcgtgctc cgcctgcacc agcccggtgt cctactgac
 catgtggtgc cctctgcct gccgaacgg acgttctctg agaggacgct ggccttcgtg
 cgcttctcat tggtcagcgg ctggggccag ctgctggacc gtggcgccac ggccctggag
 ctcatggtcc tcaactgtcc ccggtgatg acccaggact gcctgcagca gtcacggaag
 gtgggagact ccccaatat cagcgagtac atgttctgtg ccgctactc ggatggcagc
 aaggactcct gcaaggggga cagtggaggc ccacatgcc cccactaccg gggcacgtgg
 tacctgacgg gcatcgtcag ctggggccag ggctgcgcaa ccgtgggcca ctttgggggtg
 tacaccaggg tctccagta catcgagtgg ctgcaaaagc tcatgcgctc agagccacgc
 ccaggagtcc tctcgagc cccatttccc ggtggcggtg gctccggcgg aggtgggtcc
 ggtggcgcg ccataggtgg ggtggatca ggcggtggag gttccgggtg cgggggatcc
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gctccggaac tctgggcg accgtcagtc
 tctctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtactggac
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaaca cagcacgtac
 cgtgtggtca cgtctctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
 tgcaagggtc ccaacaaagc cctccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat ccggggatga gctgaccaag
 aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctcccgt
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc
 gacggctcct tcttctctc cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc
 ctctccctgt ctccgggtaa aggtggcggc ggtatcagggt ggggtggatc aggcgtgga
 ggttccgggt gcgggggatc cgacaaaact caccgtgcc caccgtgccc agcacctgaa
 ctctggggag gaccgtcagt cttctcttcc ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc
 tcccggaccc ctgaggtcac atgctgtgtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcccggggag
 gagcagtaca agcagcagta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg
 ctgaatggca aggaactcaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc cccatcgag
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca
 tcccgcgatg agctgaccaa gaaccagggt cgcctgggtc gcttgggtcaa aggttctat
 cccagcgaca tcgcccgtga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc
 acgctcccg tgttgactc cgacggctcc tcttctctc acagcaagct caccgtggac
 aagagcagggt ggcagcagg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga

10

20

30

40

F V I I - 0 4 4 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I または P S 4 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示しており、そして P S 4 ペプチドは、イタリック体になっている。

【0 4 3 9】

【化 9】

MVSOALRLLC LILGLOGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
 KRNASKPQGR IVGGKVCPKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLT DHVVPLC
 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSFN
 ITEYMFACGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG **KGGGGSGGGG SGGGGSGGGG**
SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
 KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GGSGGGGSGG
GGSGGGGSAC TERWALHNLC GG

10

F V I I - 0 4 4 D N A 配列

【0 4 4 0】

【化 1 0】

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
 gcagtcctcg taaccagga ggaagccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
 gcgttctcgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtg
 tccttcgagg agggccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
 tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctctgcaag
 gaccagctcc agtctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag
 acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
 agtgaccaca cgggcacca gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca
 gacgggggtg cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
 aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaagggtgtg ccccaaaggg
 gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggacctg
 atcaacacca tctgggtggt ctccgcgcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
 aacctgatcg cggctctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc
 cggcggtggg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
 atcgcgctgc tccgctgca ccagcccggt gtccctactg accatgtggt gcccctctgc
 ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgttctc attggtcagc
 ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
 ccccggtcga tgaccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctcccaa
 atcacggagt acatgttctg tgccggtac tcggtatgga gcaaggactc ctgcaagggg
 gacagtgag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
 agctggggcc aggtgctgcg aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag
 tacatcgagt ggtgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccagaggt cctcctgcga
 gccccatttc cgggtggcgg tggtccggc ggaggtgggt cgggtggcgg cggatcaggt
 ggggtggat caggcgtgg aggttccggg ggcgggggat ccgacaaaac tcacacatgc
 ccaccgtgcc cagctccgga actcctgggc ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
 cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat
 gccaaagaca agcccgggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
 gccctccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
 caggtgtaca cctgtcccc atcccggtat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
 tgctgtgca aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact ccgacggctc cttcttctc
 tacagcaagc tcacgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtct ctcatgctcc
 gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gctctccct gtctccgggt
 aaagtgggc gcggtcggg taagggtgga tcaggcggtg gaggttccg tggcggggga
 tcagacaaaa ctacacatg ccacccgtgc ccagcacctg aactcctggg aggaccgtca
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc
 acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcag
 taccgtgtgg tcagctcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc
 aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccgcga tgagctgacc
 aagaaccagg tcagcctgac ctgctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg
 gactgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgac
 tccgacggct cttcttctc ctacagcaag ctacacgtcg acaagagcag gtggcagcag
 ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag
 agcctctccc tgtctccggg taaagggtgg ggcggatcag gtgggggtgg atcaggcgg
 ggaggttccg gtggcggggg atcagcctgc accgagcggg gggcctgca caacctgtgc
 ggcgggtga

10

20

30

40

F V I I - 0 4 5 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I または O S 1 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示しており、そして O S 1 ペプチドは、イタリック体になっている。

【0 4 4 1】

【化 1 1】

MVSOALRLLC LILGLOGCIA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
 KRNASKPQGR IVGGKVCPKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSPN
 ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGGGSGGGG SGGGSGGGG
 SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
 KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GGSGGGGSGG
GGSGGGGSAC *TERMALHNLC* GG

10

F V I I - 0 4 5 D N A 配列

【0 4 4 2】

【化 1 2】

```

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
gcagtcttcg taaccagga ggaagccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
gcgttctctg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc
tccttcgagg aggcccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattgggg ctctgcaag
gaccagctcc agtccatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgaggccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtgaccaca cgggcaccaa gcgtccctgt cgggtgccacg aggggtactc tctgctggca
gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtgggg gcaagggtgt ccccaaaggg
gagtgccat ggaggctcct gttgttgggt aatggagctc agttgtgtgg ggggacctg
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacggga tgagcagagc
cggcgggtgg cgaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gccctctgc
ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
cccggctga tgaccagga gtcctgcag cagtacgga aggtgggaga ctcccaaat
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
agctggggcc agggctgcgc aaccgtggg cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccaggagt cctcctgcga
gccccatttc ccggtggcgg tggtccggc ggaggtgggt ccggtggcgg cggatcagg
gggggtggat caggcggtcg aggttccggt ggccggggat ccgacaaaac tcacacatgc
ccaccgtgcc cagctccgga actcctggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaagg ctccaacaaa
gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccagg cagcctgacc
tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact ccgacgctc cttcttctc
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtct ctcatgctcc
gtgatgcag aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt
aaaggtggcg cgggatcagg tgggggtgga tcaggcggtg gaggttccgg tggcggggga
tcagacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg aggaccgtca
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc
acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagtcaa ctggtacgtg
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg
taccgtgtgg tcagctcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
aagtcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc
aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgca tgagctgacc
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgac
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgctcg acaagagcag gtggcagcag
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag
agcctctccc tgtctccgg taaaggtggc ggcgatcag gtgggggtgg atcaggcgg
ggaggttccg gtggcggggg atcagcctgc accgagcgga tggccctgca caacctgtgc
ggcggtga

```

10

20

30

40

F V I I - 0 4 6 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I または O S 2 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示しており、そして O S 2 ペプチドは、イタリック体になっている。

【0 4 4 3】

【化 1 3】

MVSOALRLIC LLLGLOGCIA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
 KRNASKPQGR IVGGKVCCKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLT DHV VPLC
 LPERTFSERT LAFVRFSLVG GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVG DSPN
 ITEYMF CAGY SDGSKDSCCK DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDS DGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG **KGGGSGGGG** **SGGGSGGGG**
SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
 KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GGSGGGGSGG
GGSGGGGSAC TERDALHNLC GG

10

F V I I - 0 4 6 の D N A 配列

【 0 4 4 4 】

【化 1 4】

```

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
gcagtcttcg taaccagga ggaagccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
ggttctctgg aggagctgcg gccgggtccc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc
tccttcgagg aggcccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattgggg ctctgcaag
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgaggcccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtaccaca cgggcaccaa gcgtcctgt cgggtgccac aggggtactc tctgctggca
gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtgggg gcaagggtgt ccccaaaggg
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttgggt aatggagctc agttgtgtgg ggggacctg
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacggga tgagcagagc
cggcggtgg cgaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gccctctgc
ctgccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
ccccggctga tcaccagga ctgctgcag cagtacgga aggtgggaga ctccccaaat
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
agctggggcc aggtctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtaccaccag ggtctcccag
tacatcgagt ggtgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccaggagt cctcctgca
gccccatttc ccggtggcgg tggtctccgc ggaggtgggt ccggtggcgg cggtacaggt
gggggtggat caggcgtgg aggttccggt gcgggggat ccgacaaaac tcacacatgc
ccacgtgcc cagctccgga actcctgggc ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctg acggcgtgga ggtgcataat
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaagg ctccaacaaa
gccctccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca cctgcccc atccccggat gagctgacca agaaccagg cagcctgacc
tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact ccgacggctc cttcttctc
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtct ctcatgctcc
gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
aaaggtggcg gcggatcagg tgggggtgga tcaggcggtg gaggttccgg tggcggggga
tcagacaaaa tctcacatg cccacgtgc ccagcacctg aactcctggg aggaccgtca
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagtcaa ctggtacgtg
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
aagtgcagg tctccaacaa agccctcca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc
aaagggcagc ccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgca tgagctgacc
aagaaccagg tcagcctgac ctgctggtc aaaggcttct atcccagca catcgccgtg
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgga
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctacacgtcg acaagagcag gtggcagcag
gggaacgtct tctcatgct cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag
agcctctccc tgtctccgg taaaggtggc ggcggatcag gtgggggtgg atcaggcggg
ggaggttccg gtggcgggg atcagcctgc accgagcggg acgcctgca caacctgtgc
ggcggtga

```

10

20

30

40

F V I I - 0 4 7 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I または P S 4 を接続するリンカー領域は下線を付しており、そして P S 4 ペプチドは、イタリック体になっている。

【0 4 4 5】

【化 1 5】

MVSQALRLIC LLLGLOGCIA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
 KRNASKPQGR IVGGKVCCKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 NLIAVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
 LPERTFSERT LAFVRFSLVG GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSPN
 ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGGGGSGGGG SGGGGSGGGG
 SGGGGSGGGG SACTERWALH NLCGGGSGG GGSGGGSGG GGSGGGSGG GGSDKTHTCP
 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRT EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLT LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

F V I I - 0 4 7 の D N A 配列

【 0 4 4 6 】

【化 1 6】

```

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
gcagtcttcg taaccacagga ggaagccac gccgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
gcgttccttg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc
tccttcgagg aggcccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctctgcaag
gaccagctcc agtctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtgaccaca cgggcaccaa gcgtcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca
gacgggggtg cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga atgtggggg gcaagggtgtg ccccaaaggg
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtgtggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc
cggcgggtgg cgcaggtcat catcccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccggtg gtcctcactg accatgtggt gccctctgc
ctgccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
ccccggctga tgaccacagga ctgctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctcccaaat
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtaaccag ggtctccag
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccagaggt cctctgcga
gccccatttc ccggtggcgg tggctccggc ggaggtgggt ccggtggcgg cgatcaggt
gggggtggat caggcggtgg aggttccggt ggccggggat ccgacaaaac tcacacatgc
ccaccgtgcc cagctccgga actcctggga ggaccgtcag tcttctctt ccccaaaa
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catcgctggt ggtggacgtg
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcggtga ggtgcataat
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca cagtgcccc atccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
tgctgggtca aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttggaact ccgacggctc cttcttctc
tacagcaagc tcaccgtcga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
aaaggcggtg gcggttcagg tggagggagg tcaggcggtg gtggatccgg cgggggcgga
tccggtggcg cgggttcagg cgggtggcga tcagcctgca ccgagcggtg ggccctgcac
aacctgtgcg gtggcggtgg ctccggcgga ggtgggtccg gtggcgcgcg atcaggtggg
ggtggatcag gcggtggagg ttccggtggc gggggatccg acaaaactca cacatgccc
ccgtgcccag caccggaact cctggcgga ccgtcagctc tectcttccc cccaaaaccc
aaggacaccc tcatgatctc ccggaacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc
aagacaaaag cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctctc caacaaagcc
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt cttcctctac
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa
tga

```

10

20

30

40

F V I I - 0 4 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対してF V I I またはO S 1 を接続するリンカー領域は下線を付しており、そしてO S 1 ペプチドは、イタリック体になっている。

【0 4 4 7】

【化 1 7】

<u>MVSOALRLLC</u>	<u>LLLGLQGCLA</u>	<u>AVFVTOEEAH</u>	<u>GVLHRRRRAN</u>	AFLEELRPGS	LERECKEEQC
SFEEAREIFK	DAERTKLFWI	SYSDGDQCAS	SPCQNGGSCK	DQLQSYICFC	LPAFEGRNCE
THKDDQLICV	NENGGCEQYC	SDHTGTRKSC	RCHEGYSLLA	DGVSTPTVE	YPCGKIPILE
KRNASKPQGR	IVGGKVCCKG	ECPWQVLLLV	NGAQLCGGTL	INTIWVVSAA	HCFDKIKNWR
NLIAVLGEHD	LSEHDGDEQS	RRVAQVIIPS	TYVPGTTNHD	IALLRLHQPV	VLTDHVPLC
LPERTFSERT	LAFVRFSLV	GWGQLLDLGA	TALELMVLNV	PRLMTQDCLQ	QSRKVGDSNP
ITEYMFCAGY	SDGSKDSCCK	DSGGPHATHY	RGTWYLTGIV	SWGQGCATVG	HFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMR	SEPRPGVLLR	APFPGGGGSG	GGGSGGGGSG	GGGSGGGGSG	GGGSDKTHTC
PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN
AKTKPREEQY	NSTYRVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP
QVYTLPPSRD	ELTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTPP	VLDSGGSFFL
YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	KGGGSGGGG	SGGGSGGGG
<u>SGGGSGGGG</u>	<u>SACTERMALH</u>	<u>NLCGGGSGG</u>	<u>GGSGGGSGG</u>	<u>GGSGGGSGG</u>	<u>GGSDKTHTCP</u>
PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN	STYRVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGGSFFLY
SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK		

10

F V I I - 0 4 8 の D N A 配列

【 0 4 4 8 】

【化 18】

```

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcttggt
gcagtcttcg taaccagga ggaagccac ggctcctgc accggcgccg gcgcgccaac
gcgttccttg aggagctcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc
tccttcgagg aggcgggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattgggg ctctgcaag
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggtgtgta gcagtactgc
agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca
gacggggtgt cctgcacacc cacagttaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaac ccaaggccga attgtgggg gcaagggtgtg ccccaaaggg
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg
atcaacacca tctgggtgtg ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtgctgg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc
cggcggtgtg cgcaggtcat catcccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgcgctgc tccgcctgca cagcccggtg gtccctcactg accatgttgt gccctctgc
ctgcccgaac ggagcttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
ccccggctga tgaccagga ctgctgcag cagtacgga aggtgggaga ctccccaaat
atcacggagt acatgttctg tgccggtac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc
agctggggcc agggctgcg aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctccag
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccaggagt cctcctgcga
gccccatttc ccggtggcg tggtccggc ggagtggtt ccggtggcg cggatcaggt
gggggtggat caggcggtgg aggttccggt ggcggggat ccgacaaaac tcacacatgc
ccaccgtgcc cagctccgga actcctggga ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgttgt ggtggacgtg
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcggtga ggtgcataat
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgttgt cagcgtcctc
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca ccctgcccc atcccggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
tgctgtgtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtg agtgggagag caatgggcag
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgttgact ccgacggctc cttcttctc
tacagcaagc tcaccgtcga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc
gtgatgcatg aggtcttca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
aaaggcggtg gcggttcagg tggagagggg tcaggcggtg gtggatccg cggggcgga
tccggtggcg gaggtcagg cgggtggcga tcagcctgca ccgagcggat ggccctgcac
aacctgtgcg gtggcggtg ctccggcga ggtgggtccg gtggcgcg gtcaggtggg
ggtggatcag gcggtggagg ttccggtggc gggggatccg acaaaactca cacatgcca
ccgtgcccag caccggaact cctggcgga ccgtcagct tctcttccc cccaaaaccc
aaggacaccc tcatgatctc ccgaccctc gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg cgtggaggt gcataatgcc
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc
gtcctgcacc aggtgtggt gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc
ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc aaagccaaag ggcagcccc agaaccacag
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
gagaacaact acaagaccac gctcccgtg ttggaactcc acggtcctt cttcctctac
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
tga

```

10

20

30

40

F V I I - 0 4 9 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、Fc領域に対してF V I IまたはO S 2を接続するリンカー領域は下線を付しており、そしてO S 2ペプチドは、イタリック体になっている。

【0 4 4 9】

【化 1 9】

<u>MVSOALRLLC</u>	<u>LLLGLOGCIA</u>	<u>AVFVTQEEAH</u>	<u>GVLHRRRRAN</u>	AFLEELRPGS	LERECKEEQC
SFEEAREIFK	DAERTKLEWI	SYSDGDQCAS	SPCQNGGSCK	DQLQSYICFC	LPAFEGRNCE
THKDDQLICV	NENGGCEQYC	SDHTGTRKSC	RCHEGYSLA	DGVSTPTVE	YPCGKIPILE
KRNASKPQGR	IVGGKVCCKG	ECFQVQLLV	NGAQLCGGTL	INTIWWVSAA	HCFDKIKNWR
NLIAVLGEHD	LSEHDGDEQS	RRVAQVIIPS	TYVPGTTNHD	IALRLHQPV	VLTDHVVPIC
LPERTFSERT	LAFVRFSLVS	GWGQLLDGRA	TALELMVLNV	PRLMTQDCLQ	QSRKVGDSPN
ITEYMFAGY	SDGSKDSCCK	DSGGPHATHY	RGTWYLTGIV	SWGQGCATVG	HFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMR	SEPRPGVLLR	APFPGGGGSG	GGGSGGGGSG	GGGSGGGGSG	GGGSDKTHTC
PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN
AKTKPREEQY	NSTYRVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAIEKTI	SKAKGQPREP
QVYTLPPSRD	ELTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTPP	VLDSDGSFFL
YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	KGGGSGGGG	SGGGSGGGG
SGGGSGGGG	<u>SACTERDALH</u>	<u>NLCGGGSGG</u>	<u>GGSGGGSGG</u>	<u>GGSGGGSGG</u>	<u>GGSDKTHTCP</u>
PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTF	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN	STYRVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY
SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK		

10

F V I I - 0 4 9 の D N A 配 列

【 0 4 5 0 】

【化 2 0】

```

atggtctccc aggcacctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct
gcagtccttcg taaccacagga ggaagccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac
gcgttctctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc
tccttcgagg aggcgccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt
tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaattggggg ctcttgcaag
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgaggggccg gaactgtgag
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc
agtgaccaca cgggcaccaa cgctcctgt cgggtgccacg aggggtactc tctgctggca
gacgggtgtg cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa
aaaagaaatg ccagcaaac ccaaggccga attgtggggg gcaagggtgtg ccccaaaggg
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg
atcaacacca tctgggtgtg ctccgcggcc cactgttctg acaaaatcaa gaactggagg
aacctgatcg cgggtgctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc
cggcggttgg cgcaggtcat catcccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac
atcgctctgc tccgctgca ccagccctg gtcctcactg accatgtggt gccctctgc
ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggcctctg tgcgcttctc attggtcagc
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg
ccccgctga tgaccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctcccaaat
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgct
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccagaggt cctcctgcga
gccccatttc ccggtggcgg tggtccggc ggaggtgggt ccggtggcgg cggatcaggt
gggggtggat caggcggtgg aggttccggt ggcggggat ccgacaaaac tcacacatgc
ccaccgtgcc cagctccgga actcctggga ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc
accgtctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
gcctccacg ccccatcgaa gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc
tgctgtgta aagcttcta tccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
ccgagaaca actcaagac cagcctccc gtgttggaat ccgacggctc cttcttctc
tacagcaagc tcaccgtcga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc
gtgatcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
aaaggcggtg gcggttcagg tggaggaggg tcaggcggtg gtggatccgg cggggcgga
tccggtggcg gaggtcagg cggtggcgga tcagcctgca ccgagcgga cgcctgcac
aacctgtcg gtgcggtgg ctccggcgga ggtgggtccg gtggcgcggt atcaggtggg
ggtggatcag gcggtggagg ttccggtggc gggggatccg acaaaactca cacatgccc
ccgtgcccag caccggaact cctgggcgga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc
aaggacccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
gtgtacacc tgcctccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
ctggtcaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
gagaacaact acaagaccac gctcccggt ttggactccg acggctcctt cttcctctac
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
tga

```

10

20

30

40

F V I I - 0 1 1 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、G l a ドメインは、イタリック体にしており、F c 領域に対して F V I I を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そして両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示している。

【0 4 5 1】

【化 2 1】

MVSOALRLLC	LLLGLOGCIA	AVFVTQEEAH	GVLHRRRRAN	AFLEELRPGS	LERECKEEQC
SFEEAREIFK	DAERTKLEWI	SYSDGDQCAS	SPCQNGGSCK	DQLQSYICFC	LPAFEGRNCE
THKDDQLICV	NENGGCEQYC	SDHTGTRKSC	RCHEGYSLLA	DGVSTPTTVE	YPCGKIPILE
KRNASKPQGR	IVGGKVCCKG	ECPPQVLLLV	NGAQLCGGTL	INTIWWVSAA	HCFDKIKNWR
NLIAVLGEHD	LSEHDGDEQS	RRVAQVIIPS	TYVPGTTNHD	IALLRLHQPV	VLTDHVVPIC
LPERTFSERT	LAFVRFSLVS	GWGQLLDRA	TALELMVLNV	PRLMTQDCLQ	QSRKVGDSFN
ITEYMFCAQY	SDGSKDSCKG	DSGGPHATHY	RGTWYLTGIV	SWGQGCATVG	HFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMR	SEPRPGVLLR	APFPGGGSG	GGSGGGGSG	GGSGGGGSG	GGGSDKTHTC
PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN
AKTKPREEQY	NSTYRVSVL	TVLHQDWLNG	KEYCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP
QVYTLPPSRD	ELTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPP	VLDSDGSFFL
YSKLTVDKSR	WQGNVFSCS	VMHEALHNYH	TQKSLSLSPG	GGGGSGGGG	GGGGSGGGG
SDKTHTCPPC	PAPPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMSRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
DGVEVHNNAK	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA
KGQPREPQVY	TLPPSRDEL	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTPPVL
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK	

10

F V I I - 0 1 1 D N A 配列

【0 4 5 2】

【化 2 2】

atggtctccc	aggccctcag	gctcctctgc	cttctgcttg	ggcttcagg	ctgcctggct
gcagtcctcg	taaccaggga	ggaagccac	ggcgctctgc	accggcgccg	gcgcgccaac
gcgttctctg	aggagctgcg	gccgggctcc	ctggagagg	agtgaaggga	ggagcagtcg
tccttcagag	aggcccgagg	gatcttcaag	gacgcggaga	ggacgaagct	gttctggatt
tcttacagtg	atggggacca	gtgtgcctca	agtccatgcc	agaatggggg	ctcctgcaag
gaccagctcc	agtcctatat	ctgcttctgc	ctccctgcct	tcgagggccg	gaactgtgag
acgcacaagg	atgaccagct	gatctgtgtg	aacgagaacg	gcggctgtga	gcagactctg
agtgaccaca	cgggcaccaa	gcgctcctgt	cggtgccacg	aggggctactc	tctgctggca
gacgggtgtg	ctgcacaccc	cacagttgaa	tatccatgtg	gaaaaatacc	tattctagaa
aaaagaaatg	ccagcaaac	ccaaggccga	attgtggggg	gcaagggtgtg	cccaaaagg
gagtgctccat	ggcaggtcct	gttgttggtg	aatggagctc	agttgtgtgg	ggggaccctg
atcaacacca	tctgggtggt	ctccgcggcc	caactgttctg	acaaaatcaa	gaactggagg
aacctgatcg	cgggtgctggg	cgagcacgac	ctcagcgagc	acgacgggga	tgagcagagc
cggcggtgtg	cgcaggtcat	catccccagc	acgtacgtcc	cgggcaccac	caaccacgac
atcgcgctgc	tccgcctgca	ccagcccggtg	gtcctcactg	accatgttgt	gcccctctgc
ctgcccgaac	ggacgttctc	tgagaggacg	ctggccttcg	tgcgcttctc	attggtcagc
ggctggggcc	agctgctgga	ccgtggcgcc	acggccctgg	agctcatggt	cctcaacgtg
ccccggctga	tgaccaggga	ctgcctgcag	cagtcacgga	agggtgggaga	ctccccaaat
atcacggagt	acatgttctg	tgccggctac	tcggatggca	gcaaggactc	ctgcaagggg
gacagtggag	gcccacatgc	caccactac	cggggcacgt	ggtacctgac	gggcatcgtc
agctggggcc	agggctgcgc	aaccgtgggc	cactttgggg	tgtagaccag	ggtctcccag
tacatcgagt	ggctgcaaaa	gctcatgcgc	tcagagccac	gccaggagt	cctcctgcga
gccccatttc	ccggtggcgg	tggtccggc	ggaggtgggt	ccggtggcgg	cggtacaggt
gggggtggat	caggcggtgg	aggttccggt	ggcgggggat	ccgacaaaac	tcacacatgc
ccaccgtgcc	cagctccgga	actcctgggc	ggaccgtcag	tcttctctct	ccccccaaa
cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgagc	cctgaggtca	catgctgtgt	ggtggacgtg
agccacgaag	accttaggtg	caagttcaac	tggtacgtgg	acggcggtga	ggtgcataat
gccaagacaa	agccgcggga	ggagcagtac	aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc
accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	aaggagtaca	agtgaagggt	ctccaacaaa
gcccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca
caggtgtaca	ccctgcccc	atcccggtat	gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc
tgctgtgtca	aaggcttcta	tcccagcgac	atcgccgtgg	agtgaggagag	caatgggcag
ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	gtgttggtact	ccgacggctc	cttcttctc
tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc
gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt
aaaggtggcg	gcggatcagg	tggggtggga	tcaggcggtg	gaggttccgg	tgccggggga
tcagacaaaa	ctcacacatg	cccacgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	aggaccgtca
gtcttctctc	tcccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgagc	ccttgaggtc
acatcgctgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gacctgaggt	tcaagttcaa	ctggtacgtg
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac
aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccgcca	tgagctgacc
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctgggc	aaaggcttct	atccagcgga	catcgccgtg
gagtgaggga	gcaatgggca	gccggagaa	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgttgagc
tccgacggct	ccttcttctc	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggtctctg	acaaccacta	cacgcagaag
agcctctccc	tgtctccggg	taaatga			

20

30

40

50

Bドメイン欠失のF V I I I アミノ酸配列：シグナルペプチドは下線であり；H C 配列とL C 配列との間の14アミノ酸リンカー（残りのBドメインを含んでいる）は、二重の下線であり、太字で示されるS 7 4 3 / Q 1 6 3 8 融合部位を備える。

【0453】

【化23】

1	<u>MQIELSTCFE</u>	<u>LCLLRFCFSA</u>	TRRYYLGAVE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
51	PRVPKSEPFN	TSVVYKKTLE	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY
101	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG
151	GSHTYVWQVL	KENGPMASDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE
201	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM
251	HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCPE
351	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVREF	DDNSPSFTQI	RSVAKKHPKT
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY
451	TDETFTKREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDTL	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT
501	DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR
551	YYSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE
601	NRSWYL TENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL
651	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS
701	MENPGLWLIG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYIED	SYEDISAYLL
751	SKNNAIEPRS	<u>FSQ</u> NPPVLKR	<u>HQ</u> REITRTTL	QSDQEEIDYD	DTISVEMKKE
801	DFDIYDEDEN	QSPRSFQKKT	RHYFIAAVER	LWDYGMSSSP	HVLRNRAQSG
851	SVPQFKKVVF	QEFTDGSFTQ	PLYRGELNEH	LGLLGPYIRA	EVEDNIMVTF
901	RNQASRPYSF	YSSLISYEED	QRQGAEPKRN	FVKPNETKTY	FWKVQHMAP
951	TKDEFDCKAW	AYFSDVDLEK	DVHSGLIGPL	LVCHTNTLNP	AHGRQVTVQE
1001	FALFFTIFDE	TKSWYFTENM	ERNCRAPCNI	QMEDPTFKEN	YRFHAINGYI
1051	MDTLPGLVMA	QDQIRRWYLL	SMGSNENIHS	IHFSGHVFTV	RKKEEYKMAL
1101	YNLYPGVFET	VEMLPSKAGI	WRVECLIGEH	LHAGMSTLFL	VYSNKCQTPL
1151	GMASGHIRDF	QITASGQYGQ	WAPKLARLHY	SGSINAWSTK	EPFSWIKVDL
1201	LAPMIIHGKI	TQGARQKFSS	LYISQFIIMY	SLDGKKWQTY	RGNSTGTLMV
1251	FFGNVDSSGI	KHNIFNPPII	ARYIRLHPTH	YSIRSTLRME	LMGCDLNSCS
1301	MPLGMESKAI	SDAQITASSY	FTNMFATWSP	SKARLHLQGR	SNAWRPQVNN
1351	PKEWLQVDFQ	KTMKVTGVTT	QGVKSLLTSM	YVKEFLISSS	QDGHQWTLFF
1401	QNGKVKVFQG	NQDSFTPVVN	SLDPPLLTRY	LRIHPQSWVH	QIALRMEVLG
1451	CEAQDLY				

10

20

全長F V I I I アミノ酸配列：シグナルペプチドは下線

【0454】

【化 2 4】

```

1      MQIELSTCCF LCLLRFCSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51     PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101    DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151    GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201    GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGTFLVRNH
301    RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDMGME AYVKVDSCPE
351    EPQLRMKNEE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401    WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451    TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
501    DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551    YYSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601    NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDEPFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651    HEVAYWILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
701    MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNITGDYYED SYEDISAYLL
751    SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI PENDIEKTDP WFAHRTMPMK
801    IQNVSSDDL MLLRQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDDPS PGAIDSNNSL
851    SEMTHFRPQL HHSQDMVFTP ESGLQLRLNE KLGTAAATEL KKLDFKVSST
901    SNNLISTIPS DNLAAGTNT SSLGPPSMPV HYDSQLDTTL FGKSSPLTE
951    SGGPLSLSEE NNDSKLLESG LMNSQESSWG KNVSTESGR LFKGKRAHGP
1001   ALLTKDNALF KVSISLLKTN KTSNNSATNR KTHIDGPSLL IENSPSVWQN
1051   ILESDETFKK VTPLIHDRML MDKNATALRL NHMSNKTSS KNMEMVQKK
1101   EGPIPPDAQN PDMSFFKMLF LPESARWIQR THGKNSLNSG QGPSKQLVS
1151   LGPEKSVEGQ NFLSEKNKV VVGKEFTKDV GLKEMVFPSS RNLFLTNLND
1201   LHENNTHNQE KKIQEEIEKK ETLIQENVVL PQIHTVTGK NFMKNLFLS
1251   TRQNVEGSYD GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSKK GEEENLEGLG
1301   NQTKQIVEKY ACTTRISPNT SQQNFTQRS KRALKQFRLP LEETELEKRI
1351   IVDDTSTQWS KNMKHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS DCLTRSHSIP
1401   QANRSPLPIA KVSSFPSIRP IYLTRVLQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES
1451   SHFLQGAKKN NLSLAITLLE MTGDQREVGS LGTSATNSVT YKKVENTVLP
1501   KPDLPKTSKG VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLLQGTG
1551   AIKWNEANRP GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK
1601   SQEKSPEKTA FKKKDTILSL NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR
1651   TERLCSQNP VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1701   EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQFK
1751   KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1801   PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1851   CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFAFFFT
1901   IFDETKSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1951   LVMAQDQRR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
2001   VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
2051   IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
2101   HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
2151   SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEMLMGCDL NSCSMPLGME
2201   SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
2251   VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
2301   VFQGNQDSFT PVVNSLDPL LTRYLRHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
2351   Y

```

10

20

30

F I X アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは二重の下線である。

【0 4 5 5】

【化 2 5】

```

MORVNMIMAE SPGLITICLL GYLISAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
ERECMECKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGCKD DINSYECWCP
FGFEGKNCEL DVTCKIKNGR CEQFCKNSAD NKVVCSTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR
VSVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW
QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRI
PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIAKKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
GTSFLTGIIS WGEECAMKKG YGIYTKVSRY VNWIKETKL T

```

40

F I X D N A 配列

【0 4 5 6】

【化 2 6】

```

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta
ggatatctac tcagtgtctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc acaaaatt
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaatcta
gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac
actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat
ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc
tttgatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga
tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtg tttgctcctg tactgagggg
tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga
gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac
tatgtaaatt ctactgaagc tgaaccatt ttggataaca tcaactcaaag cacccaatca
tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg
caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa
tggtattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgctgcaggt
gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt
cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa
ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa
tacacgaaca tcttcctcaa atttgatct ggctatgtaa gtggctggg aagagtcttc
cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc
acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat
gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa
gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa
tatggaatat ataccaaggt atcccgtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc
acttga

```

10

F X アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは二重の下線である。

20

【0 4 5 7】

【化 2 7】

```

MGRPLHLVLL SASLAGLLL GESLFIRREQ ANNILARVTR ANSFLEEMKK GHLERECMEE
TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGQDC ETSPCQNQ GK DGLGEYTC TCLEGFEGKN
CELFTRKLC S LDNGDCDQFC HEEQNSVCS CARGYTLADN GKACIPTGPY PCGKQTLERR
KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLLDF NQTQPERGDN NLTRIVGGQE
CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE
AVHEVEVVIK HNRFTKET YD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP ACLPERDWAE STLMTQKTGI
VSGFGRTHEK GRQSTR LKML E V P Y V D R N S C KLSSSFII TQ NMF CAGYDTK QEDACQGD SG
GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE
VITSSPLK

```

30

F X D N A 配列

【0 4 5 8】

【化 2 8】

```

atggggcgcc cactgcacct cgtcctgctc agtgcctccc tggttgccct cctgctgctc
ggggaaagtc tgttcatccg cagggagcag gccacaaca tcctggcgag ggtcacgagg
gccaattcct ttcttgaaga gatgaagaaa ggacacctcg aaagagagtg catggaagag
acctgctcat acgaagaggc ccgcgaggtc tttagggaca gcgacaagac gaatgaattc
tggaataaat acaaagatgg cgaccagtgt gagaccagtc cttgccagaa ccagggcaaa
tgtaaagacg gcctcgggga atacacctgc acctgttttag aaggattcga aggcaaaaac
tgtgaattat tcacacggaa gctctgcagc ctggacaacg gggactgtga ccagttctgc
cacgaggaac agaactctgt ggtgtgctcc tgcgcccgcg ggtacaccct ggctgacaac
ggcaaggcct gcattcccac agggccctac ccctgtggga aacagaccct ggaacgcagg
aagaggtcag tggcccaggc caccagcagc agcggggagg cccctgacag catcacatgg
aagccatatg atgcagccga cctggacccc accgagaacc ccttcgacct gcttgacttc
aaccagacgc agcctgagag gggcgacaac aacctcacca ggatcgtggg aggccaggaa
tgcaaggacg gggagtgctc ctggcaggcc ctgctcatca atgaggaaaa cgagggtttc
tgtggtggaa ccattctgag cgagttctac atcctaacgg cagccactg tctctaccaa
gccaagagat tcaagtgag ggtaggggac cggaacacgg agcaggagga gggcgtgag
gcggtgcacg aggtggaggt ggtcatcaag cacaaccggt tcacaaagga gacctatgac
ttcgacatcg ccgtgctccg gctcaagacc cccatcacct tccgcatgaa cgtggcgccct
gctgcctcc ccgagcgtga ctgggccgag tccacgctga tgacgcagaa gacggggatt
gtgagcggct tcgggcgcac ccacgagaag ggccggcagt ccaccaggct caagatgctg
gaggtgccct acgtggaccg caacagctgc aagctgtcca gcagcttcat catcaccag
aacatgttct gtgccggcta cgacaccaag caggaggatg cctgccaggg ggacagcggg
ggccgcacg tcaccgctt caaggacacc tacttcgtga caggcatcgt cagctgggga
gagggctgtg ccgtaaggg gaagtacggg atctacacca aggtcaccgc cttcctcaag
tggtatcgaca ggtccatgaa aaccaggggc ttgcccaagg ccaagagcca tgccccggag
gtcataacgt cctctccatt aaagtga

```

10

F V I I - 0 6 6 の D N A 配列

20

【化 2 9】

```

1      ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61    GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGCTCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121   GCGTTCCTGG AGGAGCTCGG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181   TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241   TCTTACGATG ATGGGACCA GTGTGCCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301   GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361   ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421   AGTGACCACA CGGGCACCAG GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481   GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATCTAGAA
541   AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTGTGGGGG GCAAGGTGTG CCCCCAAGGG
601   GAGTGTCCAT GGCAGGTCCT GTTGTGTGTG AATGGAGCTC AGTTGTGTGG GGGGACCCTG
661   ATCAACACCA TCTGGGTGGT CTCCGCGGCC CACTGTTTCG ACAAATCAA GAACTGGAGG
721   AACCTGATCG CCGTGCTGGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACGACGGGGA TGAGCAGAGC
781   CGGCGGGTGG CGCAGGTCAT CATCCCCAGC ACGTACGTCC CGGGCACCAC CAACCACGAC
841   ATCGCGCTGC TCGCCTGCA CCAGCCCGTG GTCCCTCACTG ACCATGTGGT GCCCCTCTGC
901   TGTCCCGAAC GGACGTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TCGCCTTCTC ATTGGTCAGC
961   GGCTGGGGCC AGCTGCTGGA CCGTGCGGCC ACGGCCCTGG AGCTCATGTT CCTCAACGTG
1021  CCCC GGCTGA TGACCCAGGA CTGCTGCAG CAGTCACGGA AGGTGGGAGA CTCCCCAAAT
1081  ATCAGCGGAGT ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
1141  GACAGTGGAG GCCCACATGC CACCCACTAC CGGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGTC
1201  AACTGGGGCC AGGGCTGGG AACCTGGGG CACTTGGGG TGTACACCAG GGTCTCCAG
1261  TACATCGAGT GGCTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAC GCCCAGGAGT CCTCCTGCGA
1321  GCCCATTTC CCGGTGGCGG TGGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CGGATCAGGT
1381  GGGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCCGGT GCGGGGGGAT CCGACAAAAC TCACACATGC
1441  CCACCGTGCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA
1501  CCCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC CCGTGGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG
1561  AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
1621  GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC
1681  ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1741  GCGCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
1801  CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC
1861  TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
1921  CCGGAGAACA ACTACAAGC CACGCTCCC GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCTCTC
1981  TACAGCAAGC TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
2041  GTGATGCAATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
2101  AAACGGCGCC GCCGAGCGG TGGCGGCGGA TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT
2161  TCCGGTGGCG GGGGATCCGG CCGTGGAGGT TCCGGTGGGG GTGGATCAAG GAAGAGGAGG
2221  AAGAGGGCGC AGGTGCAGCT GCAGGAGTCT GGGGGAGGCT TGGTACAGCC TGGGGGGTCC
2281  CTGAGACTCT CTGTGTCAGC CTCTGGATTC ATGTTTAGCA GGTATGCCAT GAGCTGGGTC
2341  CGCCAGGCTC CAGGGAAGGG GCCAGAGTGG GTCTCAGGTA TTAGTGGTAG TGGTGGTAGT
2401  ACATACTGGG CAGACTCCGT GAAGGCGCGG TTCACCGTCT CCAGAGACAA TTCCAAGAAC
2461  ACGCTGTATC TGCAAAATGAA CAGCCTGAGA GCCGAGGACA CCGCTGTATA TTACTGCGCC
2521  CCGGGCGCCA CTACACAGC CCGGAGCGAC GTGCCCGACC AGACCAGCTT CGACTACTGG
2581  GGCCAGGGAA CCTGCTCAC CGTCTCCTCA GGGAGTGCAT CCGCCCCAAA GCTTGAAGAA
2641  GGTGAATTTT CAGAAGCACG CGTATCTGAA CTGACTCAGG ACCCTGCTGT GTCTGTGGCC
2701  TTGGGACAGA CAGTCAGGAT CACATGCCAA GGAGACAGCC TCAGAAACTT TTATGCAAGC
2761  TGGTACCAGC AGAAGCCAGG ACAGGCCCTT ACTCTGTGCA TCTATGGTTT AAGTAAAAGG
2821  CCCTCAGGGA TCCCAGACCG ATTCTCTGCC TCCAGCTCAG GAAACACAGC TTCCTTGACC
2881  ATCACTGGGG CTGAGGCGGA AGATGAGGCT GACTATTACT GCCTGCTGTA CTACGGCGGC
2941  GGCCAGCAGG GCGTGTTCGG CGGCGGCACC AAGCTGACCG TCCTACGTCA GCCCAAGGCT
3001  GCCCCTCCG TCACTCTGTT CCCGCCCTCT TCTGCGGCCG GTGGCGGTGG CTCCGGCGGA
3061  GGTGGGTCCG GTGGCGCGG ATCAGGTGGG GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC
3121  GGGGGATCAG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCGGAAC CTGGGCGGA
3181  CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
3241  GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
3301  TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC
3361  AGCAGCTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGGT GAATGGCAAG
3421  GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
3481  AAAGCCAAAG GGCAGCCCGG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG
3541  CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
3601  GCGGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGTG
3661  TTGGAATCCG ACGGCTCCTT CTCTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
3721  CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
3781  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGA

```

10

20

30

40

F V I I - 0 6 6 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I または S C E 5 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そしてプロタンパク質転換酵素プロセッシング部位を有するリンカーは、太字で示している

【0 4 5 9】

【化 3 0】

```

1  MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVEVTOEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61  SFEAREIEFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR IVGGKVCCKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
241 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPIC
301 LPERTFSERT LAFVRFSLVG GWGQLLDLGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSFN
361 ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
421 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
481 PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
541 AKTKPREEQY NSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAGQPREP
601 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL
661 YSKLTVDKSR WQGNVFSKS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KRRRRSGGGG SGGGGSGGGG
721 SGGGGSGGGG SGGGSRKRR KRAQVQLQES GGGLVQPGS LRLSCAASGF MFSRYAMSWV
781 RQAPGKGEW VSGISGSGGS TYYADSVKGR FTVSRDNSKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYCA
841 RGATYTSRSD VPDQTSFDYW GQGTLVTVSS GSASAPKLEE GEFSEARVSE LTQDPAVSVA
901 LGQTVRITCQ GDSLRFYAS WYQKPGQAP TLVIYGLSKR PSGIPDRFSA SSSGNTASLT
961 ITGAQAEDEA DYYCLLYGG GQGVFGGGT KLTVLQPKA APSVTLFPPS SAAGGGGSGG
1021 GSGGGGSGG GSGGGGSGG GSGDKTHTCP PCPAPELLG PSVFLFPPK KDTLMISRT
1081 EVTCVVVDV HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK
1141 EYKCKVSNKA LPAPIEKTI KAGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLT LVKGFYPSDI
1201 AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDDSGSFFLY SKLTVDKSRW QGNVFSCSV MHEALHNHYT
1261 QKSLSLSPGK *

```

10

F V I I - 0 5 7 の D N A 配列

【 0 4 6 0】

【化 3 1】

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTCTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
 121 GCCTTCTCTG AGGAGCTTCG GCGCGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCCAGG AGGCGCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
 301 GACCAGCTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCACCAG GCGTCTCTGT CGGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
 541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCCG AGGTGGGTCC
 601 GGTGGCGCGG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCC
 661 GACAAAAGCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTCACTC
 721 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCG TGAGGTACAC
 781 TGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
 841 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
 901 CTGTGTGCTCA CGTCTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
 961 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
 1021 GGGCAGCCCC GAGAACACCA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGGATGA GCTGACCAAG
 1081 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
 1141 TGGGAGAGCT GCGGGGATC CGCGGGTGA GGTTCGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
 1201 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
 1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
 1321 CTCTCCCTGT CTCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
 1381 TGGTCCGGTG CCGGGGATC CGCGGGTGA GGTTCGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
 1441 GGTTCAGCG TGAGCCAGAC CAGCAAGCTG ACCCGGATTG TGGGGGGCAA GGTGTGCCCC
 1501 AAAGGGGAGT GTCCATGCA GGTCTGTG TTGGTGAATG GAGCTCAGTT GTGTGGGGGG
 1561 ACCCTGATCA ACACCATCTG GGTGGTCTCC GCGGCCCACT GTTTCGACAA AATCAAGAAC
 1621 TGGAGGAACC TGATCGCGGT GCTGGGCGAG CACGACCTCA GCGAGCACGA CCGGGATGAG
 1681 CAGAGCCGGC GGGTGGCGCA GGTCTATCATC CCCAGCACGT ACGTCCCGGG CACCACCAAC
 1741 CACGACATCG CGTGTCTCG CCTGCACCAG CCCGTGGTCC TCACTGACCA TGTGGTGGCC
 1801 CTCTGCTGC CCGAACGGAC GTTCTCTGAG AGGACGCTGG CCTTCGTGCG CTTCTCATTT
 1861 GTCAGCGGCT GGGGCCAGCT GCTGGACCGT GCGGCCACGG CCTGGAGCT CATGGTCTC
 1921 AACGTGCCCC GGCTGATGAC CCAGGACTGC CTGCAGCAGT CACGGAAGGT GGGAGACTCC
 1981 CCAATATATCA CCGAGTACAT GTTCTGTGCC GGCTACTCGG ATGGCAGCAA GGAATCCTGC
 2041 AAGGGGGACA GTGGAGGCC ACATGCCACC CACTACCGGG GCACGTGGTA CCTGACGGGC
 2101 ATCGTGACCT CGTGCCAGG CTGCGCAACC GTGGGCCACT TTGGGGTGA CACAGGGTC
 2161 TCCCAGTACA TCGAGTGGCT GCAAAAGCTC ATGCGCTCAG AGCCACGCCC AGGAGTCTCT
 2221 CTGCGAGCCC CATTTCCCGG TGGCGGTGGC TCCGGCGGAG GTGGGTCCGG TGGCGCGGGA
 2281 TCAGTGGGG GTGATCAGG CGGTGGAGGT TCCGGTGGCG GGGGATCAGA CAAAACCTAC
 2341 ACATGCCACC CGTGCCAGG ACCTGAATC CTGGGAGGAC CGTCACTCTT CCTCTTCCCC
 2401 CCAAAACCCA AGGACACCTT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG CGTGGTGGTG
 2461 GACGTGAGCC ACGAAGACCC TAGAGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
 2521 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACC GGTGGTCAGC
 2581 GTCCTTACCG TCTGCAACA GGAATGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGT CAAGGTCTCC
 2641 AACAAAGCCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAG GCAGCCCCGA
 2701 GAACACAGG TGATACACCT GCGCCATCC CCGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTACAG
 2761 GTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGT GGAGAGCAAT
 2821 GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCAG CCTCCCGTGT TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
 2881 TTCTCTTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
 2941 TGCTCCGTGA TGCATGAGG TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT
 3001 CCGGTAAAT GA

10

20

30

F V I I - 0 5 7 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、F c および第 X I a 因子切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、そして第 X I a 因子切断部位は、破線の下線で示す。

【0 4 6 1】

【化 3 2】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSC DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTCPCPP APELLGGPSV
 241 FLFPKPKPDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 301 RVVSVLTVLH QDWLNKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
 361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQGG
 421 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG **GSGGGGSGGG** **GSGGGGSGGG** **GSGGGGSGGG**
 481 **GSSVSQTSL** TRIVGKVP KGCEPWVLL LVNGAQLCGG TLINTIWWVS AAHCFDKIKN
 541 WRNLIIVLGE HDLSEHDGDE QSRRVAQVII PSTYVPGTN HDIALLRLHQ PVVLTDHVVP
 601 LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRMTQDC LQQSRKVGDS
 661 PNITEYMFCA GYSDGSKDSC KGDGSGPHAT HYRGTYWLTG IVSWGQGCAT VGHFGVYTRV
 721 SQYIEWLQKL MRSEPRGVL LRAPFPGGG SGGGSGGGG SGGGSGGGG SGGGSGDKTH
 781 TCPPCPAPEL LGGPVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV
 841 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 901 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF
 961 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HTYQKSLSL PGK*

40

50

F V I I - 0 5 8 の D N A 配列

【 0 4 6 2 】

【 化 3 3 】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61  GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121  GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181  TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241  TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301  GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCGCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361  AGGCACAAGG GATCAGGTGG GGGTGGATCA GGCGGTGGAG GTTCCGGTGG CGGGGGATCC
421  AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CGGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481  GACGGGGTGT CTTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTTCTAGAA
541  AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCCG AGGTGGGTCC
601  GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGGTGGATCA GGCGGTGGAG GTTCCGGTGG CGGGGGATCC
661  GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTGAGTC
721  TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCG TGAGGTGACA
781  TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841  GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
901  CGTGTGGTCA GCGTCTTCAC CGTCTTCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
961  TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021  GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGATGA GCTGACCAAG
1081  AACCAGGTCA GCGTACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1141  TGGGAGAGCA ATGGGAGGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
1201  GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTCGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261  AACGTCTTCT CAGTCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321  CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381  GGTTCGCGTG GCGGGGATC CGGCGGTGGA GGTTCGCGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441  GGTTCAGACT TCCTGGCCGA GGGCGGCGGC GTGCGGATTG TGGGGGGCAA GGTGTGCCCC
1501  AAAGGGGAGT GTCCATGGCA GGTCTGTGTG TTGGTGAATG GAGCTCAGTT GTGTGGGGGG
1561  ACCCTGATCA ACACCATCTG GGTGGTCTCC GCGGCCCACT GTTTCGACAA AATCAAGAAC
1621  TGGAGGAACC TGATCGCGGT GCTGGGCGAG CACGACCTCA GCGAGCACGA CGGGGATGAG
1681  CAGAGCCGGC GGGTGGCGCA GGTCAATCAT CCCAGCACGT ACGTCCCGGG CACCACCAAC
1741  CACGAGATCG CCGTCTCCG CCTGCACCAG CCGTGGTCC TCACTGACCA TGTGGTGGCC
1801  CTCTGCCTGC CCGAACGGAT GTTCTCTGAG AGGACGCTGG CCTTCGTGCG CTTCTCATTG
1861  GTCAGCGGCT GGGGCCAGCT GCTGGACCGT GGCGCCACGG CCCTGGAGCT CATGGTCTTC
1921  AACGTGCCCC GGCTGATGAC CCAGGACTGC CTGCAGCAGT CACGGAAGGT GGGAGACTCC
1981  CCAAATATCA CGGAGTACAT GTTCTGTGCC GGCTACTCGG ATGGCAGCAA GGACTCCTGC
2041  AAGGGGGACA GTGGAGGCC ACATGCCACC CACTACCGGG GCACGTGGTA CCTGACGGGC
2101  ATCGTCAGCT GGGGCCAGGG CTGCGCAACC GTGGGCCACT TTGGGGTGTA CACCAGGTC
2161  TCCAGTACA TCGAGTGGCT GCAAAAGCTC ATGCGCTCAG AGCCACGCC AGGAGTCTTC
2221  CTGCGAGCCC CATTTCCCG TGGCGGTGGC TCCGCGGAG GTGGGTCCG TGGCGCGGA
2281  TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CGGTGGAGGT TCCGTTGGCG GGGGATCAGA CAAAATCAC
2341  ACATGCCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
2401  CAAAACCCA AGGACACCTT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG
2461  GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
2521  CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
2581  GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGAAGTGGTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC
2641  AACAAAGCCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
2701  GAACCAAGG TGTACACCCT GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC
2761  CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
2821  GGGCAGCCGG AGAACAACCT CAAGACCACG CCTCCCGTGT TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
2881  TTCTCTTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
2941  TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT
3001  CCGGGTAAAT GA

```

10

20

30

F V I I - 0 5 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、F c および トロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、そして トロンビン切断部位は、破線の下線で示す

【 0 4 6 3 】

40

【化 3 4】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEEAREIFK DAERTKLEFI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQYQC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTHCPPTP APPELLGGPSV
241 FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDLWNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
361 NQVSLTCLVK GFYPDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG
481 GSDFLAEGGG VRIVGGKVCF KGECPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWVVS AAHCFDKIKN
541 WRNLIAVLGE HDLSEHDGDE QSRRAQVVI PSTYVPGTTN HDIALLRHLQ PVVLTDHVVP
601 LCLPERTFSE RTIAFVRFSL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQSRKVGDS
661 PNITEYMFCA GYSDGSKDSC KGDSGGPHAT HYRGTYWLTG IVSWGQGCAT VGHEGVYTRV
721 SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAPFPGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGDKTH
781 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV
841 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
901 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
961 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HTQKSLSLS PGK*

```

10

F V I I - 0 5 9 の D N A 配列

【0 4 6 4】

【化 3 5】

```

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCTTGGCT
61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCTTC TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CAGACAAACC CCAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCCG AGGTGGGTCC
601 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCC
661 GACAAAATCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTGAGTC
721 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
781 TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCGTGGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAGTAC
901 CGTGTGGTCA GCGTCTTAC CCGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAG
961 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATCA GCTGACCAAG
1081 AACCAAGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1141 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCTCCCCGT GTTGGACTCC
1201 GAGGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGACCA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261 AACGTCTTCT GATGCTCGT GATGCTGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321 CTCCTCCTGT CTCCGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC CGCGGGTGGG GGTTCGGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441 GTTCAACCA CCAAGATCAA GCCCGGATT GTGGGGGCA AGGTGTGCC CAAAGGGGAG
1501 TGTCCATGCG AGTCCCTGTT GTTGTGAAT GGAGTCAAG TGTGTGGGGG GACCTGTGAT
1561 AACACCATCT GGGTGGTCTC CGCGGCCAC TGTTCGACA AAATCAAGAA CTGGAGGAAC
1621 CTGATCGCGG TGCTGGGCGA GCACGACCTC AGCGAGCACG ACGGGGATGA GCAGAGCCGG
1681 CGGGTGGCTC AGGTATCAT CCCCAGCACG TACGTCCCGG GCACCACCAA CCACGACATC
1741 GCGCTGCTCC GCTGACACA GCCCGTGGTC CTCACTGACC ATGTGGTGCC CCTCTGCCTG
1801 CCCGAACGGA CGTCTCTGA GAGGACGCTG GCCTTCGTGC GCTTCTCATT GGTGAGCGGC
1861 TGGGGCCAGC TGCTGGACCG TGGCGCCACG GCCCTGGAGC TCATGGTCCT CAACGTGCCC
1921 CCGCTGATGA CCCAGGACTG CCGTGCAGC TACCGGAAGG TGGGAGACTC CCCAAATATC
1981 ACGGAGTACA TGTCTGTGC CGGCTACTCG GATGGCAGCA AGGACTCCTG CAAGGGGGAC
2041 AGTGGAGGCC CACATGCCAC CCACTACCGG GGCACGTGGT ACCTGACGGG CATCGTCAGC
2101 TGGGGCCAGG GTGCGCAAC CGTGGGCCAC TTTGGGGTGT ACACCAGGGT CTCCCAGTAC
2161 ATCAGGTGGC TGCAAAAGCT CATGCGCTCA GAGCCACGCC CAGGAGTCCT CTGCGAGGCC
2221 CCATTTCCTG GTGGCGGTGG CTCGGCGGGA GGTGGGTCCG GTGGCGGCGG ATCAGGTGGG
2281 GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC GGGGGATCAG ACAAACCTCA CACATGCCCA
2341 CCGTGCCAG CACCTGAAT CCGGGAGGA CCGTCACTCT TCCTCTTCCC CCAAAACCCC
2401 AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT CCGTGGTGGT GGACGTGAGC
2461 CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
2521 AAGACAAAGC CGCGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC
2581 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
2641 CTCCAGGCC CCATCGGAAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG
2701 GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC
2761 CTGCTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGGAGGCAA TGGGCGAGCG
2821 GAGAACAACCT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCTCTTAC
2881 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
2941 ATGCTATGAG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCTGTG TCCGGGTAAA
3001 TGA

```

20

30

40

ドは、二重の下線であり、F c 領域に対してF V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、F c およびトロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、そしてトロンビン切断部位は、破線の下線で示す

【0465】

【化36】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTCPCPCP APELLGGPSV
241 FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG
481 GSTTKIKPRI VGGKVCCKGE CPWQVLLLVN GAQLCGGTLI NTIWVVSAAH CFDKIKNWRN
541 LIAVLGEHDL SEHDGDEQSR RVAQVIIPST YVPGTTNHDI ALLRLHQPVV LTDHVVPCLC
601 PERTFSERTL AFVRFSLVSG WQQLLDRGAT ALELMVLNVP RLMTQDCLQQ SRKVGDSPNI
661 TEYMFCAQYS DGSKDSCKGD SGGPHATHYR GTWYLTGIVS WQGCATVGH FGVYTRVSQY
721 IEWLQKLMRS EPRPGVLLRA PFPGGGSGG GSGGGGSGG GSGGGGSGG GSGDKHTTCP
781 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
841 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
901 VYTLPPSRDE LTKNQVSLT LKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY
961 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *
```

10

F V I I - 0 6 0 の D N A 配列の D N A 配列

【0466】

【化 3 7】

```

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAG GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCGCACACCC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
601 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCC
661 GACAAAATC ACACATGCC ACCGTGCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTGAGTC
721 TTCTCTTCC ATCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGACCCC TGAGGTACA
781 TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841 GCGTGGGAGG TGATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAGTAC
901 CGTGTGGTCA GCGTCTTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
961 TGCAAGGTCT TCGCAAAAGC CTTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG
1081 AACCGAGTCA GCTGAGCTG CTTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CCGCGTGGAG
1141 TGGGAGAGCA ATGGGCGAGC GGAGAACAAAC TACAAGACCA CGCTCCCGT GTTGGACTCC
1201 GACGGTCTCT TCTTCTCTTA CAGCAAGCTC ACCGTGACCA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321 CTCCTCCCTGT CTCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC CGGCGGTGGA GGTTCGGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441 GGTTCAGCCG TCGGCGCCCG GGTGGTGGGC GCGCGCGTGG TGGGGGGCAA GGTGTGCCCC
1501 AAAGGGGAGT GTCCATGGCA GGTCTCTGTT TTGGTGAATG GAGCTCAGTT GTGTGGGGGG
1561 ACCCTGATCA ACACCATCTG GGTGGTCTCC GCGGCCCACT GTTTCGACAA AATCAAGAAC
1621 TGGAGGAACC TGATCGCGGT GCTGGGCGAG CACGACCTCA GCGAGCACGA CCGGGATGAG
1681 CAGAGCCGCG GGTGGCGCA GGTCTATCAT CCCAGCACGT ACGTCCCGG CACCACCAAC
1741 CACGACATCG CGTCTCTCCG CCTGCACCAG CCCGTGGTCC TCACTGACCA TGTGGTGGCC
1801 CTCTGCCTGC CCGAACGGAC GTTCTCTGAG AGGACGCTGG CCTTCGTGCG CTTCTCATTG
1861 GTCAGCGGCT GGGGCCAGCT GCTGGACCGT GCGGCCACGG CCCTGGAGCT CATGGTCTCT
1921 AACGTGCCCC TCGTATGATC CCAGGACTGC CTGCAGCAGT CACGGAAGGT GGGAGACTCC
1981 CCAAATATCA CGGAGTACAT GTTCTGTGCC GGCTACTCGG ATGGCAGCAA GGAATCCTGC
2041 AAGGGGGACA GTGGAGGCC ACATGCCACC CACTACCGGG GCACGTGGTA CCTGACGGGC
2101 ATCGTCAGCT GGGGCCAGGG CTGCGCAACC GTGGGCCACT TTGGGGTGTG CACCAGGGTC
2161 TCCAGTACA TCGAGTGGCT GCAAAAGCTC ATGCGCTCAG AGCCACGCC AGGAGTCTCT
2221 CTGCGAGCCC CATTTCCCGG TGGCGGTGGC TCCGGCGGAG GTGGGTCCGG TGGCGGCGGA
2281 TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CGGTGGAGGT TCCGGTGGCG GGGGATCAGA CAAAACCTAC
2341 ACATGCCCC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
2401 CCAAAACCCA AGGACACCTT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG CGTGGTGGTG
2461 GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
2521 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
2581 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGAATGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGT CAAGGTCTCC
2641 AACAAAGCCC TCCAGGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
2701 GAACCACAGG TGATACCCCT GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTGAGC
2761 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
2821 GGGCAGCCCG AGAACAACTA CAAGACCACG CTTCCGTGT TGGACTCCGA CCGCTCTCTC
2881 TTCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
2941 TGCTCCGTGA TGATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT
3001 CCGGGTAAAT GA

```

10

20

30

F V I I - 0 6 0 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、F c およびトロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、そしてトロンビン切断部位は、破線の下線で示す。

【0 4 6 7】

【化 3 8】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQYQC SDHTGTRKRC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGSGGGGGS GGGSGGGGGS GGGSGGGGGS DKHTCTPCPC APELLGGPSV
241 FLFPKPKKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
361 NQVSLTCLVK GFYPSPDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVMHE ALHNYHTQKS LSLSPGKGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG
481 GSALRPRVVG GAVVGGKVCV KGECPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWVVS AAHCFDKIKN
541 WRNLIAVLGE HDLSEHDGDE QSRRAQVVI PSTYVPGTTN HDIALRLHQ PVVLTDHVVP
601 LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRMTQDC LQQSRKVGDS
661 PNITEYMFCA GYSDGSKDSK KGSGGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT VGHFVYTRV
721 SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAPFPGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGSDKTH
781 TCPPCPAPEL LGGSPVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV
841 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
901 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF
961 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK*

```

40

50

F V I I - 0 6 1 の D N A 配列

【 0 4 6 8 】

【 化 3 9 】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61  GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GGGTCCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCTCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGGTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTTGCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAC GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAAGC CAAAGGCCGA GGTGGCGGTG CTCCGGCGG AGGTGGGTCC
601 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCC
661 GACAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTCAGTC
721 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTCACA
781 TTGCTGTGCT GAGAACCACA CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
901 CGTGTGTGTC GCGTCTCTAC CGTCTGTCAC CAGGACTGCG TGAATGGCAA GGAGTACAAG
961 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021 GGGCAGCGCT GAGAACCAAC GGTGTACACC CTGCCCCAT CCGGGATGA GCTGACCAAG
1081 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT GCCTGTGGAG
1141 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCTCCCGT GTTGGACTCC
1201 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTCGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381 GGTTCGCGTG GCGGGGGATC CCGCGGTGGA GGTTCGCGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441 GGTTCAGCCC TGCGGGCCCG GGTGGTGGGC GCGGCCATTG TGGGGGGCAA GGTGTGCCCC
1501 AAAGGGGAGT GTCCATGGCA GGTCTGTGTT TTGGTGAATG GAGCTCAGTT GTGTGGGGG
1561 ACCCTGATCA ACACCATCTG GGTGGTCTCC GCGGCCACT GTTTCGACAA AATCAAGAAC
1621 TGGAGGAACC TGATCGCGGT GCTGGGCGAG CACGACCTCA GCAGACAGA CCGGGATGAG
1681 CAGAGCCGGC GGGTGGCGCA GGTTCATCAT CCCAGCACGT ACGTCCCGG CACCACCAAC
1741 CACGACATCG CGCTGCTCCG CCTGCACCAG CCGGTGGTCC TCACTGACCA GTGTGGTCCC
1801 CTCTGCCTGC CCGAACGGAC GTTCTCTGAG AGGACGCTGG CCTTCGTGCG CTTCTCATTT
1861 GTCAGCGGCT GGGGCCAGCT GCTGGACCGT GCGGCCACGG CCTTGGAGCT CATGGTCTTC
1921 AACGTGCCCC GGCTGATGAC CCAGGACTGC CTGCAGCAGT CACGGAAGGT GGGAGACTCC
1981 CCAAAATATCA CGGAGTACAT GTTCTGTGCC GGCTACTCGG ATGGCAGCAA GGAATCTTGC
2041 AAGGGGGACA GTGGAGGCCC ACATGCCACC CACTACCGGG GCACGTGGTA CCTGACGGGC
2101 ATCGTCAGCT GGGGCCAGGG CTGCGCAACC GTGGGCCACT TTGGGGTGT CACCAGGGTC
2161 TCCAGTACA TCGAGTGGCT GCAAAAGCTC ATGCGCTCAG AGCCACGCCC AGGAGTCTTC
2221 CTGCGAGCCC CATTTCCTCG TGGCGGTGGC TCCGCGGAG GTGGGTCCGG TGGCGGCGGA
2281 TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT TCCGTTGGCG GGGGATCAGA CAAAACACAC
2341 ACATGCCACG CGTGCCAGC ACCTGAATCT CTGGGAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
2401 CCAAAACCCA AGGACACCTC CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG
2461 GACGTGAGCG ACGAAGACCT TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
2521 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
2581 GTCCTCACC GTCCTGCACCA GGAATGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC
2641 AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA
2701 GAACACAGG TGTACACCTT GCCCCATCC CCGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC
2761 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
2821 GGGCAGCCGG AGAACAACCT CAAGACCACG CCTCCCGTGT TGGACTCCGA CCGCTCTTTC
2881 TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA
2941 TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT
3001 CCGGGTAAAT GA

```

10

20

30

40

F V I I - 0 6 1 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、F c および トロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、そして トロンビン切断部位は、破線の下線で示す

【 0 4 6 9 】

【化 4 0】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGECEYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTCTPVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTTCPPCP APELLGGPSV
241 FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
481 GSALRPRVVG GAIVGGKVCV KGECPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWWVS AAHCFDKIKN
541 WRNLIAVLGE HDLSEHDGDE QSRRAQVII PSTYVPGTTN HDIALRLRHQ PVVLTDHVVP
601 LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQSRKVGDS
661 PNITEYMFCA GYSDGSKDSC KGDSSGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT VGHEGVYTRV
721 SQYIEWLQKL MRSEPRPGVL LRAFPGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSDKTH
781 TCPPCPAPEL LGGSPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV
841 HNAKTKPREE OYNSTYRVVS VLTVLHODWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGOPR
901 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF
961 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLG PKG*

```

10

F V I I - 0 6 2 の D N A 配列

【0 4 7 0】

【化 4 1】

```

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGCTCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCTCTG AGGAGCTGCG GCCCGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCTTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCTTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCTTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACGTGTAG
361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 ACTGAGACCA CGGGCACCAA CGCTCCTGT CGGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAAAC CCAAGGCCGA GTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
601 GGTGGCGCGG GATCAGGTGG GGGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CGGGGGATCA
661 GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGCGG ACCGTCAGTC
721 TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
781 TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CTTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
901 CGTGTGGTCA CGCTCCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
961 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021 GGGCAGCCCC GAGAACCAAC GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG
1081 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1141 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
1201 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381 GGTTCGGGTG CGCGGGGTGA GGTTCGGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441 GGTTCAGGTG GTGGAGGATC CATTGTGGGG GGCAAGGTGT GCGCCAAAGG GGAGTGTCCA
1501 TGGCAGGTCC TGTGTGTGGT GAATGGAGCT CAGTTGTGTG GGGGGACCCG GATCAACACC
1561 ATCTGGGTGG TCTCCGCGGC CCACTGTTTC GACAAAATCA AGAACTGGAG GAACCTGATC
1621 GCGGTGCTGG GCGAGCACGA CCTCAGCGAG CACGACGGGG ATGAGCAGAG CCGCGCGGTG
1681 GCGCAGGTCA TCATCCCCAG CACGTACGTC CCGGGCACCA CCAACCACGA CATCGCGCTG
1741 CTCGCGCTGC ACCAGCCCGT GGTCTCACT GACCATGTGG TGCCCCCTCT CCTGCCCGAA
1801 CGGACGTTCT CTGAGAGGAC GCTGGCCCTT GTGCGCTTCT CATTGGTCAG CGGCTGGGGC
1861 CAGCTGCTGG ACCTGGCGCG CACGGCCCTG GAGCTCATGG TCCTCAACGT GCCCGGCTG
1921 ATGACCCAGG ACTGCCTGCA GCAGTCACGG AAGGTGGGAG ACTCCCCAAA TATCACGGAG
1981 TACATGTTCT GTGCGGGCTA CTCGGATGGC AGCAAGGACT CCTGCAAGGG GGACAGTGGG
2041 GGGCCACATG CCACCCACTA CCGGGGCACG TGGTACCTGA CGGGCATCGT CAGCTGGGGC
2101 CAGGGCTGCG CAACCGTGGG CCACTTTGGG GTGTACACCA GGGTCTCCCA GTACATCGAG
2161 TGGCTGCAAA AGCTCATGCG CTCAGAGCCA CGCCAGGAG TCCTCTGCGG AGCCCCATTT
2221 CCCGGTGGCG GTGGCTCCGG CCGAGGTGGG TCCGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA
2281 TCAGGCGGTG GAGGTTCGGT TGGCGGGGGA TCAGACAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
2341 CCAGCACCTG AACTCCTGGG AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC
2401 ACCCTCATGA TCTCCGGGAC CCTGAGGTG ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
2461 GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGCGGTG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
2521 AAGCCCGGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAGC TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTCT
2581 CACGAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
2641 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
2701 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
2761 AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGAGAAC
2821 AACTACAAGA CCACGCTTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG
2881 CTCACGCTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGCTT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
2941 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGACAGAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

```

20

30

40

F V I I - 0 6 2 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I a 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そして F c および F V I I a 重鎖を接続するリンカー領域は、太字で示す

50

【0471】

【化42】

1 MVSQALRLLC LLGLGQCL AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEAREIEFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGEQYQC SDHTGTRKSC RCHEGYSLA DGVSCPTTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTCTPPCP APELLGGPSV
 241 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEOYNSTY
 301 RVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
 361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 421 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG **SGGGGSGGGG** **SGGGGSGGGG** **SGGGGSGGGG**
 481 **SGGGGSGIVG** GKVCPRGECF WQVLLLVNGA QLCGGTLINT IWVVSAAHCF DKIKNWRNLI
 541 AVLGEHDLSE HDGDEQSRVR AQVIIPSTYV PGTTHNDIAL LRLHQPVVLT DHVVPCLPE
 601 RTFSERTLAF VRFSLSVSGWG QLLDRGATAL ELMVLNVPRL MTQDCLQQSR KVGDSNPITE
 661 YMFCAQYSDG SKDSCKGDSG GPHATHYRGT WYLTGIVSWG QGCATVGHEG VYTRVSQYIE
 721 WLQKLMRSEP RPFVLLRAPF PGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SDKHTCTPPC
 781 PABELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHD DPEVKFNWYV DGEVHNAKT
 841 KPREEQYNST YRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 901 TLPPSRDELTK KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK
 961 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

10

20

30

40

F V I I - 0 9 0 の D N A 配列

【化43】

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
 121 GCGTCTCTCG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
 301 GACCAAGTCC AGTCTTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACGTGTAG
 361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGTGGCA
 481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
 541 AAAAGAAATG CACAGCAAAACC CAAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCCG AGGTGGGTCC
 601 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCA
 661 GACAAATCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGCGG ACCGTGAGTC
 721 TTCCTCTTCC CCCCACAAACC CAAGGACACC CTATGATCT CCGGACCCC TGAGTCCACA
 781 TCGGTGGTGG TGGACGTGAG CCGAGAGAC CCGTGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
 841 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAGTAC
 901 CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCTGAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
 961 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CTTCCAGGCC CCAATCGAGA AAACATCTC CAAAGCCAAA
 1021 GGGCAGCCCC GAGAACACCA GGTGTACACC CTGCCCCAT CCGGGGATGA GCTGACCAAG
 1081 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CTTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
 1141 TGGGAGAGCA ATGGGCGAGC GGAGAACAA TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
 1201 GACGGCTCCT TCTTCTCTCA CAGCAAGCTC ACCGTGACCA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
 1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
 1321 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
 1381 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC CCGCGGTGGA GGTTCGGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
 1441 GGTTCAGCCC TGCGGCCCCG GATTGTGGGG GGCAAGGTGT GCGCCAAAGG GGAGTGTCCA
 1501 TGGCAGGTCC TGTGTGTTGT GAATGGAGCT CAGTTGTGTG GGGGGACCCG GATCAACACC
 1561 ATCTGGGTGG TCTCCGCGGC CCACTGTTTC GACAAATCA AGAACTGGAG GAACCTGATC
 1621 GCGGTGTGCG GCGAGCACGA CCTCAGCGAG CACGACGGGG ATGAGCAGAG CCGGCGGGTG
 1681 GCGCAGGTCA TCACTCCGAG CAGTACGTC CCGGGCACCA CCAACACAGA CATCGCGCTG
 1741 CTCCGCTGCG ACCAGCCCGT GGTCTCACT GACCATGTGG TGCCCCCTCTG CCTGCCCCGAA
 1801 CGGACGTTCT CTGAGAGGAC GCTGGCCTTC GTGCGCTTCT CATTTGGTCAG CGGCTGGGGC
 1861 CAGCTGTCTG ACCGTGGGCG CACGGCCCTG GAGCTCATGG TCCTCAACGT GCGGCGGCTG
 1921 ATGACCCAGG ACTGCTGCA GCAGTACGG AAGGTGGGAG ACTCCCCAAA TATCACGGAG
 1981 TACATGTTCT GTGCCGGCTA CTCGGATGGC AGCAAGGACT CCTGCAAGGG GGACAGTGGA
 2041 GGCCACATG CCACCCACTA CCGGGGACG TGGTACCTGA CCGGCATCGT CAGCTGGGGC
 2101 CAGGGCTGCG CAACCGTGGG CCACTTTGGG GTGTACACCA GGGTCTCCCA GTACATCGAG
 2161 TGGCTGCAAA AGCTCATGCG CTCAGAGCCA CGCCAGGAG TCCTCTGCG AGCCCCATTT
 2221 CCGGTGGCG GTGGCTCCGG CCGAGGTGGG TCCGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA
 2281 TCAGCGGCTG GAGGTTCGGG TGGCGGGGGA TCAGACAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 2341 CCAGCACCTG AACTCTTGGG AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAAAA ACCCAAGGAC
 2401 ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTG ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGGACGAA
 2461 GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
 2521 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCTG
 2581 CACCAAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 2641 GCGCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAG CCGGAGAAC ACAGGTGTAC
 2701 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCTGAC CTGCTTGGTC
 2761 AAAGGCTTCT ATCCAGCGGA CATCGCGGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCGGAGAAC
 2821 AACTACAAGA CCACGCTTCC CGTGTGGAG TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG
 2881 CTCACCGTGA ACAAGAGCAG GTGGCAGCAT GGAACGCTC TCTATGCTC CGTGATGCAT
 2941 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGACAGG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

F V I I - 0 9 0 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー

50

領域は、下線を付しており、Fcおよびトロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、そしてトロンビン切断部位は、破線の下線で示す

【0472】

【化44】

```

1  MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61  SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQCYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCPTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTCPCPCP APELLGGPSV
241 FLFPKPKPDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG GSGGGSGGGG
481 GSALRPRIVG GKVCPRGECF WQVLLLVNGA QLCGGTLINT IWVVSAAHCF DRIKNWRNLI
541 AVLGEHDLSE HDGDEQSRRV AQVIIPSTYV PGTTHNDIAL LRLHQPVVLT DHVVPLCLPE
601 RTFSERTLAF VRFSLVSGWG QLLDRGATAL ELMVLNVPRL MTQDCLQQSR KVGDSNPITE
661 YMFCAGYSDG SKDSCKGDSG GPHATHYRGT WYLTGIVSWG QGCATVGHEG VYTRVSQYIE
721 WLQKLMRSEP RPGVLLRAPF PGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SDKHTCPCPC
781 PAPELLGGPS VFLFPKPKPD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
841 KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
901 TLPPSRDELTK KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLDS SDGSFFLYSK
961 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSPGK*

```

10

F V I I - 1 0 0 の D N A 配列

【0473】

【化 4 5】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCCTGG AGGAGCTCGG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCTTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGTGTT CCGCAAAACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
601 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGCTGG CCGGGGATCC
661 GACAAAATC ACACATGCC ACCGTGCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGAGG ACCGTCAGTC
721 TTCGTCTTCT CCGCAAAACC CAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCC TGAGTCAACA
781 TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841 GCGGTGGAGG TGATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
901 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
961 TGCAAGGTCT TCGGCAAGCC CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG
1081 AACCAGGTCA GCCTGACTTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCGTGGAG
1141 TGGGAGAGCA ATGGGACGCG GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
1201 GTCCGTCTCC TCTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321 CTCCTCCCTG CTCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381 GGTTCGCGTG GCGGGGATC CCGCGGTGGA GGTTCGCGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441 GGTTCAGGCG TCGGCCCCG GATTGTGGGG GGCAAGGTGT GCGGCAAGG GGAGTGTCCA
1501 TGGCAGGTCC TGTGTTGGT GAATGGAGCT CAGTTGTGTG GGGGGACCCT GATCAACACC
1561 ATCTGGGTGG TCCTCGCGGC CCACTGTTTC GACAAAATCA AGAAGTGGAG GAACCTGATC
1621 GCGGTGCTGG GCGAGCACGA CCTCAGCGAG CACGACGGG ATGAGCAGAG CCGGCGGGTG
1681 GCGCAGGTCA ACTGCCAGGC CAGCTACCCC CCGGGCACCA CCAACCACGA CATCGCGCTG
1741 CTCGCGCTGC ACCAGCCCGT GGTCTCACT GACCATGTGG TGCCCTCTG CCTGCCGAA
1801 CGGACGTTCT CTGAGAGGAC GCTGGCCTTC GTGCGCTTCT CATTGGTCAG CGGCTGGGGC
1861 CAGCTGCTGG ACCGTGGCGC CACGGCCCTG GAGCTCATGG TCCTCAACGT GCCCGGGCTG
1921 ATGACCCAGC AGCCACCCC CAGCTACCCC GGCAAGATCA CGGAGTACAT GTTCTGTGCC
1981 GGCTACTCGG ATGGCAGCAA GGAATCCTGC AAGGGGGACA GTGGAGGCC ACATGCCACC
2041 CACTACCGGG GCACGTGTA CCTGACGGG ATCGTCAGT GGGGCCAGG CTGCGCAACC
2101 GTGGGCCACT TTGGGTGTA CACCAGGGT TCCCAGTACA TCGAGTGGCT GCAAAAGCTC
2161 ATGCGCTCAG AGCCACCCC AGGAGTCTC CTGCGAGCCC CATTTCGCGG TGGCGGTGGC
2221 TCCGGCGGAG GTGGTCCGG TGGCGCGGA TCAGGTGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT
2281 TCCGTGGCG GGGATCAGA CAAAATCAC ACATGCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACCTC
2341 CTGGGAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAAACCA AGGACACCCT CATGATCTCC
2401 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG
2461 TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
2521 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTACCG TCCTGCACCA GGAATGGCTG
2581 AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAGCCC TCCAGCCCC CATCGAGAAA
2641 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGACACCCCT GCGGCTATCC
2701 CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTGAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC
2761 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACG
2821 CCTCCCGTGT TGGACTCCGA CCGCTCCTTC TTCCTTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG
2881 ACGAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGG TCTGCACAAC
2941 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGTAAAT GA

```

10

20

30

F V I I - 1 0 0 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対してF V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー領域は、下線を付しており、F c およびトロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示している、トロンビン切断部位は、破線の下線で示す、そしてトリプシン170 ループ領域は、波線の下線を付す。

【0 4 7 4】

【化 4 6】

```

1  MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61  SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQYQC SDHTGTRKSC RCHEGYSLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKTHTCPPCP APELLGGPSV
241 FLFPKPKDPT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNATK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVMEH ALHNYHTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
481 GSALRPRIVG GKVCCKGECF WQVLLLVNGA QLCGGTLINT IWVVSAAHCF DKIKNWRNLI
541 AVLGEHDLSE HDGDEQSRRV AQVIIPSTYV PGTNHDIAL LRLHQPVVLT DHVPLCLPE
601 RTFSERTLAF VRFSLSVSWG QLLDRGATAL ELMVLNVPRL MTQDCEASYP GKITEYMFCA
661 GYSDGSKDSC KGDGGGPHAT HYRGTWYLTG IVSWGQCAT VGHFGVYTRV SQYIEWLQKL
721 MRSEPRPGVL LRAPFPGGGG SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG SGGGSGDKTH TCPPCPAPEL
781 LGGPGVFLFP PKPKDTLMIS RTEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
841 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
901 RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK
961 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK*

```

10

F V I I - 1 1 5 の D N A 配列

【0 4 7 5】

【化 4 7】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61  GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTCTCTCG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAC GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA GGTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
601 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCA
661 GACAAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCGGAAC TCTGGGGCGG ACCGTAGTC
721 TTTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCG TGAGGTACAA
781 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
841 GGCCTGGAGG TGATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
901 CGTGTGGTCA GCGTCTTCC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAA
961 TGCAAGGTCT TCACAAAACC CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
1021 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGATGA GCTGACCAAG
1081 AACCAGGTCA GCTGACCTG CCTGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCGGTGGAG
1141 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAA TACAAGACCA CGCTCCCGT GTTGGACTCC
1201 GACGCTCCTC TCTCCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
1261 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
1321 CTCTCCCTGT CTCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
1381 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC CGGCGGTGGA GGTTCGGGTG GGGGTGGATC AGGAGGAGGT
1441 GGTTCAGCCC TCAGGCCCCG GATTGTGGGG GGCAAGGACT GCCCAAAGG GGAGTGTCCA
1501 TGGCAGGTCC TGTGTGTGGT GAATGGAGCT CAGTTGTGTG GGGGGACCCCT GATCAACACC
1561 ATCTGGGTGG TCTCCGCGGC CCACTGTTTC GACAAAATCA AGAAGTGGAG GAACCTGATC
1621 GCGGTGCTGG GCGAGACAGA CCTCAGCGAG CACGACGGGG ATGAGCAGAG CCGGCGGGTG
1681 GCGCAGGTCA TCATCCCCAG CACGTACGTC CCGGGCACCA CCAACCACGA CATCGCGCTG
1741 CTCCGCTTGC ACCAGCCCGT GGTCTTCACT GACCATGTGG TGCCCTCTG CCTGCCCCGAA
1801 CGGACGTTCT CTGAGAGGAC GCTGGCCTTC GTGCGCTTCT CATTGGTCAG CGGCTGGGGC
1861 CAGCTGCTGG ACCGTGGCGC CACGGCCCTG GTACTCCAAG TCCTCAACGT GCCCGGGCTG
1921 ATGACCCAGG ATCTCCCTGA CGAGTCACGG AAGGTGGGAG ACTCCCCAAA TATCACGGAG
1981 TACATGTTCT GTGCCGGCTA CTCGGATGGC AGCAAGGACT CCTGCAAGGG GGACAGTGGG
2041 GGGCCACATG CCACCCACTA CCGGGGCACG TGGTACCTGA CGGGCATCGT CAGCTGGGGC
2101 CAGGGCTGCG CAACCGTGGG CCACTTGGG GTGTACACCA GGGTCTCCCA GTACATCGAG
2161 TGGCTGCAAA AGCTCATCGC CTCAGAGCCA CGCCAGGAG TCCTCTGCG AGCCCCATT
2221 CCCGGTGGCG GTGGCTCCGG CGGAGGTGGG TCCGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA
2281 TCAGGCGGTG GAGGTTCGGG TGGCGGGGGA TCAGACAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
2341 CCAGCACCTG AACTCTGGG AGGACCGTCA GTCTTCTCTT TCCCCCAAAA ACCCAAGGAC
2401 ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGAGT GAGCCACGAA
2461 GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
2521 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG
2581 CACCAAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
2641 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGGCC AAAGGCGAGC CCGGAGAAC ACAGGTGTAC
2701 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGGTTC
2761 AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCGGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC
2821 AACTACAAGA CCACGCTCC CGTGTGGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG
2881 CTCACCGTGG AGAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCTT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
2941 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGCTCCGGG TAAATGA

```

20

30

40

F V I I - 1 1 5 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I 軽鎖または重鎖を接続するリンカー

50

領域は、下線を付しており、F c および トロンビン切断部位を接続するリンカー領域は、太字で示しており、トロンビン切断部位は、破線の下線で示す、そしてF V I I a における3つの点変異（V 1 5 8 D、E 2 9 6 V および M 2 9 8 Q）は太字でかつ下線を付している。

【0476】

【化48】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTKRSC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS DKHTCPCPCP APELLGGPSV
241 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKT PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEY CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELT
361 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
421 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
481 GSALRPRIVG GKDCPKGECF WQVLLLVNGA QLCGGTINT IWVVSAAHCF DKIKNWRNLI
541 AVLGEHDLSE HDGDEQSRV AQVIIPSTYV PGTTHNDIAL LRLHQPVVLT DHVVLCLPE
601 RTFSERTLAF VRFSLVSGWG QLLDRGATAL VLQVLNVPR MTQDCLQQSR KVGDSFNITE
661 YMFCAGYSDG SKDSCKGDSG GPHATHYRGT WYLTGIVSWG QGCATVGHFG VYTRVSQYIE
721 WLQKLMRSEP RPGVLLRAPF PGGGSGGGG SGGGSGGGG SGGGSGGGG SDKTHTCPPC
781 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
841 KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
901 TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
961 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVME EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

10

F V I I - 1 1 8 の D N A 配列

【0477】

20

【化 4 9】

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGCTCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
 121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGG CTCCTGCAAG
 301 GACCAGCTCC AGTCTTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 481 GACGGGGTGT CTTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
 541 AAAAGAAATG CCAGCAAAACC CCAAGGCGCC CTGCGGCCCC GGATTGTGGG GGGCAAGGTG
 601 TGCCCCAAAG GGGAGTGTCC ATGGCAGGTC CTGTTGTTGG TGAATGGAGC TCAGTTGTGT
 661 GGGGGGACCC TGATCAACAC CATCTGGGTG GTCTCCGCGG CCCACTGTTT CGACAAAATC
 721 AAGAACGTGA GGAACCTGAT CGCGGTGCTG GCGGAGCAGC ACCTCAGCGA GCACGACGGG
 781 GATGAGCAGA GCCGGCGGGT GGCGCAGGTC ATCATCCCCA GCACGTACGT CCCGGGCACC
 841 ACCAACCACG ACATCGCGCT GCTCCGCTG CACCAGCCCG TGGTCTCTAC TGACCATGTG
 901 GTGCCCTCTT GCCTGCCCGA ACGGACGTTT TCTGAGAGGA CGTGCGCTT CGTGCGCTTC
 961 TCATTGGTCA GCGGCTGGGG CCAGCTGCTG GACCGTGGCG CCACGGCCCT GGAGCTCATG
 1021 GTCTCTCAAG TGCCCCGGCT GATGACCCAG GACTGCCTGC AGCAGTCACG GAAGGTGGGA
 1081 GACTCCCCAA ATATCACGGA GTACATGTTT TGTGCCGGCT ACTCGGATGG CAGCAAGGAC
 1141 TCCTGCAAGG GGGACAGTGG AGGCCACACAT GCCACCCACT ACCGGGGCAC GTGGTACCTG
 1201 ACGGGCATCG TCAGCTGGGG CCAGGGCTGC GCAACCGTGG GCCACTTTGG GGTGTACACC
 1261 AGGGTCTCCC AGTACATCGA GTGGCTGCAA AAGCTCATGC GCTCAGAGCC ACGCCCAGGA
 1321 GTCCTCTCTG GAGCCCCATT TCCCGGTGGC GGTGGCTCCG GCGGAGGTGG GTCCGGTGGC
 1381 GCGGATCAG GTGGGGTGG ATCAGCGGCT GGAGGTTCCG GTGGCGGGG ATCCGACAAA
 1441 ACTCACACAT GCCCACGCTG CCCAGCTCCG GAATCCTGG GCGGACCGTC AGTCTTCTCT
 1501 TTCCCCCAA AACCCAGGA CACCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG
 1561 GTGGTGGACG TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
 1621 GAGGTGCATA ATGCCAAGC AAAGCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACCGTGTG
 1681 GTCAGCTGCC TCACCGTCTT GCACCAGGAC TGGCTGAATG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG
 1741 GTCTCCAACA AGCCCCATC AGCCCCATC GAGAAAAACA TCTCCAAAGC CAAAGGCGAG
 1801 CCCCAGAAAC CACAGGTGTA CACCTGCCC CCATCCCGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG
 1861 GTCAGCTGTA CTTGCTGCTT CAAAGGCTTC TATCCAGCG ACATCGCGT GGAGTGGGAG
 1921 AGCAATGGGG GATCAGACAA CAATACAAAG ACCACGCTC CCGTGTGGA CTCCGACGGC
 1981 TCTTCTTCTT TCTACACAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC
 2041 TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC
 2101 CTGTCTCCGG GTAAAGTGG CGGCGGATCA GGTGGGGGTG GATCAGCGG TGGAGGTTC
 2161 GGTGGCGGGG GATCAGACAA AACTCACACA TGCCCAACCGT GCCCAGCACC TGAATCCTG
 2221 GGAGGACCGT CAGTCTTCTT CTTCCCCCA AAACCAAGG ACACCTCAT GATCTCCCG
 2281 ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCTGA GGTCAAGTTC
 2341 AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG
 2401 TACAACAGCA GGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC TGCACAGGA CTGGCTGAAT
 2461 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCAT CGAGAAAACC
 2521 ATCTCCAAAG CCAAGGGGCA GCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGC
 2581 GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCAGC
 2641 GACATCGGCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGAGGA ACAACTACAA GACCACGCT
 2701 CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC
 2761 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC
 2821 TACACGCAGA AGAGCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGA

10

20

30

F V I I - 1 1 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、トロンビン切断部位は、破線の下線で示し、F c 領域に対して F V I I 重鎖を接続するリンカー領域は下線を付しており、そして F c 領域を接続するリンカー領域は、太字で示している

【0 4 7 8】

【化 5 0】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGQDCAS SPCQNGGSC DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKRC RCHEGYSLLA DGVSCPTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGA LRPRIVGGKV CPKGECPWQV LLLVNGAQLC GGTINTIIV VSAAHCFDKI
 241 KNRNRLIAVL GEHDLSEHD DEQSRRAQV IIPSTYVPGT TNHDIALRL HQPVVLTQHV
 301 VPLCLPERTF SERTLAFVRF SLVSGWGQLL DRGATALELM VLNVPRLMTQ DCLQQSRKVG
 361 DSPNITEYMF CAGYSDGSKD SCKGDSGGPH ATHYRGTWYL TGIVSWGQGC ATVGHFGVYT
 421 RVSQYIEWLQ KLMRSEPRPG VLLRAPFPFG GSGGGGGSGG GSGGGGGSGG GSGGGGGSDK
 481 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 541 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
 601 PREPQVYTLF PSDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
 661 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGGGS **GGGGSGGGGS**
 721 **GGGGSDKTH** CPKCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 781 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT
 841 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP
 901 PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK*

40

F V I I - 1 1 9 の D N A 配列

50

【0479】

【化51】

1 ATGGTCTCCG AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GGCGTCTGCG ACCGGCGCCG GCGGCGCAAC
 121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
 301 GACCACTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCGCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 481 GACGGGTGT CCGTGCACAC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
 541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCGGA GGAGGTGGTT CAGCCCTGCG GCCCGGATT
 601 GTGGGGGGCA AGGTGTGCCC CAAAGGGGAG TGTCCATGGC AGGTCTGTT GTTGGTGAAT
 661 GGAGCTCAGT TGTGTGGGGG GACCCTGATC AACACCATCT GGGTGGTCTC CGCGGCCAC
 721 TGTTTCGACA AAATCAAGAA CTGGAGGAAC CTGATCGCGG TGCTGGGCGA GCACGACCTC
 781 AGCGAGCAGC ACGGGATGA GCAGAGCCGG CCGGTGGCGC AGGTCATCAT CCCAGCAGC
 841 TACGTCCCGG GCACGACCAA CCACGACATC GCGCTGCTCC GCCTGCACCA GCCCGTGGTC
 901 CTCATGACC ATGTGGTGCC CCTCTGCCCTG CCCGAACGGA CGTTCTCTGA GAGGACGCTG
 961 GCCTTCGTGC GCTTCTCATT GGTACGCGGC TGGGGCCAGC TGCTGGACCG TGGCGCCACG
 1021 GCCCTGGAGT TCAAGTCTCT CAACGTGCCC CCGCTGATGA CCCAGGACTG CCTGCAGCAG
 1081 TCACGGAAGG TTGGAGACTC CCAAATATC ACGGAGTACA TGTTCGTGTC CCGCTACTCG
 1141 GATGGCAGCA AGGACTCCTG CAAAGGGGAC AGTGGAGGCC CACATGCCAC CCACTACCGG
 1201 GGCACGTGGT ACCTGACGGG CATCGTCAGC TGGGGCCAGG GCTGCGCAAC CGTGGGCCAC
 1261 TTTGGGGTGT ACACCGGCTT CTCCAGTAC ATCGAGTGGC TGCAAAAGCT CATGCGCTCA
 1321 GAGCCACGCC CAGGAGTCTT CCGCGAGCC CCATTTCCTG GTGGCGGTGG CTCGGCGGGA
 1381 GGTGGGTCCG GTGGCGGCGG ATCAGGTGGG GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC
 1441 GGGGGATCCG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CTCCGGAAT CCTGGCGGGA
 1501 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
 1561 GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGAGCTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 1621 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC
 1681 AGCAGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG
 1741 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCAGGCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 1801 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG
 1861 CTGACCAAGA ACCAGGTACG CCGTACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 1921 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGACGGG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG
 1981 TTGGAGTCCG ACGGCTCCTT CTCTCTTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
 2041 CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 2101 CAGAAAGACC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGGTGGATCA
 2161 GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCA GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA
 2221 GCACCTGAAC TCCTGGGAGG ACCGTGAGTC TTCTCTTCC CCCCCAACCC CAAGGACACC
 2281 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTACCA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
 2341 CCTGAGGTCA AGTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCAATAATGC CAAGACAAAG
 2401 CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC
 2461 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC
 2521 CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC
 2581 CTGCCCCCAT CCCGCGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA
 2641 GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGACGCC GGAGAACAAC
 2701 TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGTCT
 2761 ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
 2821 GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA

10

20

30

F V I I - 1 1 9 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、G G G S リンカーを有するトロンビン切断部位は下線で示し、F c 領域に対して F V I I 重鎖を接続するリンカー領域は下線を付しており、そして F c 領域を接続するリンカー領域は、太字で示している。

【0480】

【化52】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGQDCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKRC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGG GGGSALRPRI VGGKVC PKGE CPWQVLLLVN GAQLCGGTLI NTIWWVSAAH
 241 GFDKIKNWRN LIAVLGEHDL SEHDGDEQSR RVAQVLIPT YVPGTNNHDI ALLRLHQPVV
 301 LTDHVVPCLL PERTFSERTL AFVRFSLVSG WGQLLDRGAT ALELMVLNVP RLMTQDCLQQ
 361 SRKVGDSPNI TEYMFCAQYS DSGKDSCKGD SGGPHATHYR GTWYLTGIVS WGQGCATVGH
 421 FGVYTRVSQY IEWLQKLMRS EPRPGVLLRA PFPGGGGSGG GSGGGGGSGG GSGGGGGSGG
 481 GSGDKTHTCP PCPAPELLG PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 541 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
 601 KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 661 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK **GGGGSGGGGS**
 721 **GGGGSGGGGS** DKHTCTPPCP APPELLGSPV FLFPKP KDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 781 PEVKFNWYVD GVEVHNATK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 841 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPISRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
 901 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK*

40

50

F V I I - 1 2 7 の D N A 配列

【 0 4 8 1 】

【 化 5 3 】

```

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGCGCCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCTATATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCGT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA CGCTCCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAAAC CCAAGGCCCC CTGCGGCCCC GGATTGTGGG GGGCAAGGTG
601 TGCCCCAAAG GGGAGTGTCC ATGGCAGGTC CTGTTGTGTG TGAATGGAGC TCAGTTGTGT
661 GGGGGGACCC TGATCAACAC CATCTGGGTG GTCTCCGCGG CCCACTGTTT CGACAAAATC
721 AAGAACTGGA GGAACCTGAT CCGGTGCTG GCGAGACAG ACCTCAGCGA GCACGACGGG
781 GATGAGCAGA GCCGGCGGGT GCGCAGGTC ATCATCCCCA GCACGTACGT CCCGGGCACC
841 ACCAACCCAG GTGGCGGTGG CTCCGCGCTG CACGAGCCG TGGTCTCTAC TGACCATGTG
901 GTGCCCTCTT GCCTGCCCCG ACGGACGTTT TCTGAGAGGA CGCTGGCCTT CGTGCGCTTC
961 TCATTGGTCA GCGCTGGGGG CCAGCTGCTG GACCGTGGCG CCACGCGCCT GGAGCTCATG
1021 GTCCTCAACG TGCCCCGGCT GATGACCCAG GACTGCGAGG CCAGCTACCC CGGCAAGATC
1081 ACCGAGTACA GTTCTGTGCT GCTCCGCTCG GATGGCAGCA AGGACTCCTG CAAGGGGGAC
1141 AGTGGAGGCC CACATGCCAC CCACTACCGG GGCACGTGGT ACCTGACGGG CATCGTCAGC
1201 TGGGGGCCAG GCTGCGCAAC CGTGGGCCAC TTGGGGGTGT ACACAGGGT CTCCCAAGTAC
1261 ATCGAGTGCG TGCAAAAGCT CATGCGCTCA GAGCCACGCC CAGGAGTCCT CCTGCGAGCC
1321 CCATTTCGCC GTGCGGTGGT CTCCGCGCGA GGTGGGTCCG GTGGCGCGCG ATCAGGTGGG
1381 GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC GGGGGATCAG ACAAACCTCA CACATGCCCA
1441 CCGTGCCAG CTCCGGAAC TCTGGGCGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAACCC
1501 AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC
1561 CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC
1621 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC
1681 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
1741 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG
1801 GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC
1861 CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGAGCCCG
1921 GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCTCTCTAC
1981 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
2041 ATGCTATGAG CTCTGACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA
2101 GGTGGCGCGG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CGGGGATCA
2161 GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGAGG ACCGTGAGT
2221 TTCCTCTTCC CCCCCAAC CCAAGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTCA
2281 TCGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCGTGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
2341 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
2401 CGTGTGGTCA GCGCTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAA
2461 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CTTCCAGGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
2521 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGCGCATGA GCTGACCAA
2581 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CTTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCGTGGAG
2641 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCG GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCTCCCGT GTTGGACTCC
2701 GACGGCTCCT TCTCTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
2761 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
2821 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA

```

10

20

30

F V I I - 1 2 7 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、トロニン切断部位は、破線の下線で示し、トリプシン 170 ループ領域は、波線の下線を付す、F c 領域に対して F V I I 重鎖を接続するリンカー領域は下線を付しており、そして F c 領域を接続するリンカー領域は、太字で示している

【 0 4 8 2 】

【 化 5 4 】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGEQYQC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGA LRPRIVGKV CPKGECPWQV LLLVNGAQLC GGTINTIIV VSAAHCFDKI
241 KNWRNLIAVL GEHDLSEHDF DEQSRRAVQV IIPSTYVPGT TNHDIALRL HQPVVLTQHV
301 VPLCLPERTF SERTLAFVR SLVSGWGQLL DRGATALELM VLNVPRLMTQ DCEASYPGKI
361 TEYMFACAGS DSKDSCSKGD SGGPHATHYR GTWYLTGIVS WGQGCATVGH FGVYTRVSQY
421 IEWLQKLMRS EPRPGVLLRA PFPGGGSGG GSGGGGSGG GSGGGGSGG GSGDKTHTCP
481 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNV YVDGVEVHNA
541 KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
601 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY
661 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
721 DKHTCPCPPC APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
781 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
841 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
901 DGSFFLYSKL TVDKSRWQGG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

```

40

50

F V I I - 1 2 5 の D N A 配列

【 0 4 8 3 】

【 化 5 5 】

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGCTCCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
 121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCTTGCAAG
 301 GACCAGCTCC AGTCCATATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCTTC TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 361 ACGCACAAAG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAAGG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATCTTAGAA
 541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTTGTTGGG GCAAGGTGTG CCCCAGGGG
 601 GAGTGCCTAT GGCAGTGCTT GTTGTGTGGT AATGGAGCTC AGTTGTGTGG GGGGACCTTG
 661 ATCAACACCA TCTGGGTGGT CTCCGCGGCC CACTGTTTCG ACAAATCAA GAACTGGAGG
 721 AACCTGATCG CCGTGTCTGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACAGCGGGA TGAGCAGAGC
 781 CGGCGGGTGG CGCAGGTCAT CATCCCCAGC ACGTACGTCC CGGGCACCAC CAACACGAC
 841 ATCGCGCTAG GCGGCTGCA CCAGCCCTGC GTCTCACTG ACCATGTGGT GCCCTCTGCG
 901 CTGCCCCGAA GGACGTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TCGGCTTCTC ATTGGTCAGC
 961 GGCTGGGGCC AGCTGTCTGA CCGTGGCGCC ACGGCCCTGG AGCTCATGGT CCTCAACGTG
 1021 CCCCAGGCTGA TGACCCAGGA CTGCTGTCAG CAGTCACGGA AGGTGGGAGA CTCCCCAAAT
 1081 ATCACCGAGT ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
 1141 GACAGTGGAG GCCACATGC CACCCACTAC CGGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGTC
 1201 AGCTGGGGCC AGGGCTGCGC AACCGTGGGC CACTTTGGGG TGTACACCAG GGTCTCCAG
 1261 TACATCGAGT GGCTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAC GCCCAGGAGT CCTCTGCGA
 1321 GCCCATTTC CCGGTGGCGG TGGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CGGATCAGGT
 1381 GGGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTCCGGT GCGGGGGGAT CCGACATCGT GATGACCCAG
 1441 GCGGCCCCCA GCGTGCCCGT GACCCCGGCG GAGAGCGTGA GCATCAGCTG CCGGAGCAGC
 1501 CGGAGCCTCG TGCACAGCAA CGGCAACACC TACCTGTGCT GGTTCCTGCA GCGGCCCGGC
 1561 CAGAGCCCCC AGCTGTCTGAT CTACCGGATG AGCAACCTGG CCAGCGGCGT GCCGACCGG
 1621 TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGCCTTC ACCCTGCGGA TCAGCCGGGT GGAGGCCGAG
 1681 GACGTGGGCG TGTACTACTG CATGCAGCAC CTGGAGTACC CCTTCACCTT CGGCAGCGGC
 1741 ACCAAGCTGG AGATCAAGCG GGGCGGCGGC GGCAGCGGCG GCGGCGGCGG CGGCGGCGGC
 1801 GGCAGCCAGG TGCAGTGCA GCAGAGCGGC GCCGAGCTGG TCGGCGCCGG CACCAAGCTG
 1861 AAGATCAGCT GCAAGGCCAG CCGCTACACC TTCACCAACT ACTGGCTGGG CTGGGTGAAG
 1921 CAGCGGGCCG GCCACGGCCT GGAGTGGATC GGCAGCATCT ACCCGGCGG CGGCTACAAC
 1981 AAGTACAACG AGAATTCAA GGGCAAGGCC ACCCTGACCG CCGACACCAG CAGCAGCACC
 2041 GCCTACATGC AGCTGAGCAG CTTGACCCAG GAGGACAGCG CCGTGTACTT CTGCGCCCGG
 2101 GAGTACGGCA ACTACGACTA CGCCATGGAC AGCTGGGGCC AGGGCACCAG CGTGACCGTG
 2161 AGCAGCTGA

10

20

F V I I - 1 2 5 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチ
 ドは、二重の下線であり、そして A P 3 に対して F V I I を接続するリンカー領域は太字
 であり、そして A P 3 s c F v は、イタリック体になっている。

30

【 0 4 8 4 】

【 化 5 6 】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR IVGGKVC PKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 241 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLT DHVVPIC
 301 LPERTFSERT LAFVRFSLVG GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSNP
 361 ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 421 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFP**GGGGSG** **GGGSGGGGSG** **GGGSGGGGSG** **GGGSDIVMTQ**
 481 AAPSPVPVTPG ESVSISCRSS RSLHSGNNT YLCWFLQRPG QSPQLLIYRM SNLASGVPDR
 541 FSGSGSGTAF TLRISRVEAE DVGVIYCMQH LEYPTFTGSG TKLEIKRGGG SGGGGSGGGG
 601 GSQVQLQSSG AELVRPGTSV KISCKASGYT FTNYWLGWVK QRPGHGLEWI GDIYPGGGYN
 661 KYNENFKGKA TLTADTSSST AYMQLSSLTS EDSAVYFCAR EYGNIDYAMD SWGQGTSTVT
 721 SS*

40

F V I I - 0 6 7 の D N A 配列

【 0 4 8 5 】

【化 5 7】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61 GCGTCTCTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGGTCTTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTCTCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCGAGTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCTTC TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTGTGGGG GCAAGGTGTG CCCCAGGGG
601 GAGTGTCCAT GGCAGGTCCT GTTGTGGTG AATGGAGCTC AGTTGTGTGG GGGGACCCTG
661 ATCAACACCA TCTGGGTGGT CTCCGCGGCC CACTGTTTCG ACAAATCAA GAACTGGAGG
721 AACCTGATCG CCGTGCTGGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACACGGGGA TGAGCAGAGC
781 CGCGGGTGG CGTCAGTAT CATCCGAGC ACGTACGTCC CGGGCACCA CAACACGAC
841 ATCGCGCTGC TCCGCTGCA CCAGCCCGTG GTCTCACTG ACCATGTGGT GCCCTCTGC
901 CTGCCCCAAC GGACGTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TCGCTTCTC ATTGGTCAGC
961 GGTGCGGGCC AGCTGCTGGA CCGTGGCGCC ACGGCCCTGG AGCTCATGGT CCTCAACGTG
1021 CCCCCTGCTG GATCCAGGA CTGCTGCAAG CAGTACGCGA AGGTGGAGA CCCCCAAAT
1081 ATCACGGAGT ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
1141 GACAGTGGAG GCCCAGATGC CACCCACTAC CGGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGTC
1201 AGCTGGGGCC AGGGCTGCGC AACCCTGGGC CACTTTGGGG TGTAACACAG GGTCTCCCAG
1261 TCATATCGAG CGCTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAA GCCCAGGAGT CCTCTGCGA
1321 GCCCCATTTC CCGGTGGCGG TGGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CGGATCAGGT
1381 GGGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCCGGT GCGGGGGGAT CCGACAAAAC TCACACATGC
1441 CCACCGTGCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGC GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA
1501 CCCAAGGACA CGCTCATGAT CTCCCGGACC CCGTGGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG
1561 AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAAGTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT
1621 GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC
1681 ACCGTCTTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1741 GCCCTCCAG CCCCACGGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
1801 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC
1861 TGCTTGGTCA AAGGCTTCTA TCCACGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
1921 CCGGAGAAC ACTACAAGAC CACGCCCTCC GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC
1981 TACAGCAAGC TCACCGTGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTATGCTTCC
2041 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
2101 AAAGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGTGGG TCAGGCGGTG GAGGTTCGGG TGGCGGGGGA
2161 TCAGACAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG AGGACCGTCA
2221 GTCTTCTCTT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTG
2281 ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
2341 GACGGCGTGA AGGTGCTATA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAGC
2401 TACCGTGTGG TCACGCTCTT CACCGTCTCT CACAGGACTG GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
2461 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC
2521 AAAGGGCAGC CCGGAGAAC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCGCGGA TGAGCTGACC
2581 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
2641 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCGCGAGAAC AACTACAAGA CCACGCTCC CGTGTGGAC
2701 TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG CTCACCGTCG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
2761 GGGAAAGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGAGAAAG
2821 AGCCTCTCCC TGCTTCCGGG TAAAGGTGGC GGTGGCTCCG GCGGAGGTGG GTCCGGTGGC
2881 GCGGGATCAG GTGGGGTGG ATCAGGCGGT GGAGGTCCCG GTGGCGGGG ATCAGCGCAG
2941 GTGCAGCTGC AGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGTCCCT GAGACTCTCC
3001 TGTGACAGCT CTGGATTAT GTTTAGCAGG TATGCCATGA GCTGGGTCCG CCAGGCTCCA
3061 GGGAAAGGGC CAGAGTGGGT CTCAGGTATT AGTGGTAGTG GTGGTAGTAC ATACTACGCA
3121 GACTCCGTGA AGGGCCGTT CACCGTCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
3181 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGCGCCCG GGGCGCCACC
3241 TACACCAGCC GGAGCGACGT GCCCGACCAG ACCAGCTTCG ACTACTGGGG CCAGGGAACC
3301 CTGGTCACCG TCTCCTCAGG GAGTGCATCC GCCCCAAAGC TTGAAGAAGG TGAATTTTCA
3361 GAAGCACGCG TATCTGAAT GACTCAGGAC CCGTGTGTGT CTGTGGCTT GGGACAGACA
3421 GTCAGGATCA CATGCCAAGG AGACAGCCTC AGAACTTTT ATGCAAGCTG GTACCAGCAG
3481 AAGCCAGGAC AGGCCCTAC TCTTGTATC TATGGTTTAA GTAAAGGCC CTCAGGGATC
3541 CCAGACCGAT TCTCTGCCTC CAGCTCAGGA AACACAGCTT CCTTGACCAT CACTGGGGCT
3601 CAGGCGGAAG ATGAGGCTGA CTATTACTGC CTGCTGTACT ACGGCGGCG CCAGCAGGGC
3661 GTGTTGCGCG GCGGCACCAA GCTGACCGTC CTACGTCAGC CCAAGGCTGC CCCCTCGGTC
3721 ACTCTGTTCC CGCCCTCTT TCGGCGCTGA

```

10

20

30

40

F V I I - 0 6 7 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I a を接続するリンカー領域は、下線を付しており、両方の F c 領域を接続するリンカーは破線の下線を付しており、そして F c 領域を S C E 5 に対して接続するリンカーは太字である。

【0 4 8 6】

【化 5 8】

```

1 MVSQALRLLC LLLGLQGLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61 SFEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGCGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR IVGGKVC PKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
241 NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
301 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLDRLA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSFN
361 ITEYMFCAGY SDGSKDCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
421 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
481 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
541 AKTKPREEQY NSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
601 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL
661 YSKLTVDKSR WQGNVFSQS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGGGSGGGGG SGGGSGGGGG
721 SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH DPEVKFNWYV
781 DGVVEVHNKT KPREEQYNSG YRVVSVLTVL HQDWLNKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
841 KGQPREPQVY TLPPSRDEL TNQVSLTCLV KGFYPSDIIV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
901 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCVMH EALHNHYTQK SLSPGKGG GGSGGGSGGG
961 GGSGGGSGGG GGSGGGSGGG VQLQESGGGL VQPGSLRLS CAASGMFMR YAMSWVRQAP
1021 KKGFEWVSIG SGSGGSYYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL QMNSLRADT AVYICARGAT
1081 YTSRSDVPDQ TSFDYWGQGT LTVSSGSAS APKLEEGEFS EARVSELTQD PAVSVALGQT
1141 VRITCQGDLS RNFYASWYQQ KPGQAPTLVI YGLSKRPSGI PDRFSASSSG NTASLTITGA
1201 QAEDEADYYC LLYYGGGQQG VFGGGTKLTV LRQPKAAPSV TLFPSSAA*

```

10

F V I I - 0 9 4 の D N A 配列

【 0 4 8 7】

【化 5 9】

```

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61 GCAGTCTTCC TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGCTCCTGC ACCGCGCCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCTCTG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACACCAAGAG TGCCGCTGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTGTGGGGG GCAAGGTGTG CCCCAGAGG
601 GAGTGTCCAT GCGAGTCTCT GTTGTGTGTG AATGGAGCTC AGTTGTGTGT GGGGACCTGT
661 ATCAACACCA TCTGGGTGGT CTCCGCGGCC CACTGTTTCG ACAAATCAA GAACTGGAGG
721 AACCTGATCG CCGTGTCTGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACGACGGGGA TGAGCAGAGC
781 CGGCGGGTGG CGCAGGTCTC CATCCCCAGC ACGTACGTCC CGGGCACACC CAACCACGAC
841 ATCGCCCTGG TCCGCTGCTG CCAGCCCTGT GTCCCTACTG ACCATGTGGT GCCCTCTGCT
901 CTGCCCGAAC GGACGTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TCGCTTCTC ATTGGTTCAGC
961 GGCTGGGGCC AGCTGCTGGA CCGTGGCGCC ACGGCCCTGG AGCTCATGGT CCTCAACGTG
1021 CCCCAGGTGA TGACCCAGGA CTGCCTGCAG CAGTCACGGA AGGTGGGAGA CTCCCCAAAT
1081 ATCACGAGAG ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
1141 GACAGTGGAG GCCACATGC CACCCACTAC CGGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGTC
1201 AGCTGGGGCC AGGGCTGCGC AACCGTGGGC CACTTTGGGG TGTACACAGG GGTCTCCAG
1261 TACATCGAGT GGTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAC GCCCAGGAGT CCTCTGCGA
1321 GCCCATTTTC CCGATATCGG TGGCGGTGGC TCCGGCGGAG GTGGGTCCGG TGGCGGCGGA
1381 TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT TCCGGTGGCG GGGGATCAGC GCAGGTGCAG
1441 CTGACAGGAG CTGGGGGAGG CTTGGTACAG CTTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCA
1501 GCCTCTGGAT TCATGTTTAG CAGGTATGCC ATGAGCTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGGAAG
1561 GGGCCAGAGT GGGTCTCAGG TATTAGTGGT AGTGGTGGTA GTACATACTA CGCAGACTCC
1621 GTGAAGGGCC GGTTCACCGT CTCCAGAGAC AATTCCAAGA ACACGCTGTA TCTGCAAATG
1681 AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACGGCTGTA TATTACTGCG CCCGGGGCGC CACCTACACC
1741 AGCCGGAGCG ACGTGCCCGA CCAGACCAGC TTCGACTACT GGGGCCAGGG AACCTGGTC
1801 ACCGTCTCCT CAGGGAGTGC ATCCGCCCCA AAGCTTGAAG AAGGTGAATT TTCAGAAGCA
1861 CGCGTATCTG AACTGACTCA GGACCCTGCT GTGTCTGTGG CCTTGGGACA GACAGTCAGG
1921 ATCACATGCC AAGGAGACAG CCTCAGAAAC TTTATGCAA GCTGGTACCA GCAGAAGCCA
1981 GGACAGGCCC TACTCTTGT CATCTATGGT TTAAGTAAA GGCCCTCAGG GATCCCAGAC
2041 GAATTCTCTG CTCCAGCTC AGGAAACACA GCTTCTTGA CCATCACTGG GGCTCAGGCG
2101 GAAGATGAGG CTGACTATTA CTGCCTGCTG TACTACGGCG GCGGCCAGCA GGGCGTGTTC
2161 GCGGGCGGCA CCAAGCTGAC CGTCTACGT CAGCCCAAGG CTGCCCCCTC GGTCACTCTG
2221 TTCCCGCCCT CTCTGCGGC CTGA

```

20

30

40

F V I I - 0 9 4 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、そして F V I I を S C E 5 に接続するリンカー領域は下線を付している。

【 0 4 8 8】

【化 6 0】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTOEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKFLWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGEQYQC SDHTGTKRSC RCHEGYSLLA DGVSCPTTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR IVGGKVC PKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWWVSAA HCFDKIKNWR
 241 NLI AVLGEHD LSEHDGEQS RRV AQVII PS TYVPGTINH IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
 301 LPERTFSERT LAFVRFSLSV GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDS PN
 361 ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 421 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPDIGGGG SGGGSGGGG SGGGSGGGG SGGGSAQVQ
 481 LQESGGGLVQ PGSLRLSCA ASGFMSRYA MSWVRQAPGK GPEWVSGISG SGGSTYYADS
 541 VKGRFTVSRD NSKNITLYLQM NSLRAEDTAV YYCARGATYT SRSDVPDQTS FDYWGQGTIV
 601 TVSSGSASAP KLEEGEFSEA RVSELTQDPA VSVALGQTVR ITCQGD SLRN FYASWYQKQP
 661 GQAPTLVIYG LSKRPSGIPD RFSASSSGNT ASLTITGAQA EDEADYYCLL YYGGGQQGVF
 721 GGGTKLTVLR QPKAAPSVTL FPPSSAA*

10

F V I I - 0 2 8 の D N A 配列

【 0 4 8 9】

【化 6 1】

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTCTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCGGAAGTGC AGCTGGTGCA GTCTGGAGCT GAGGTGAATA AGCCTGGGGC CTCAGTGAAG
 121 GTCTCTTGCA AGGCTTCTGG ATACACCTTC ACCGGCTACT ATATGCACTG GGTGCGACAG
 181 GCGCTTGGAC AAGGGCTTGA GTGGATGGGA TGGATCAACC CTAACAGTGG TGGCACAAC
 241 TATGCACAGA AGTTTCAGGG CTGGGTCACC ATGACACGGG ACACGTCCAT CAGCACCGCC
 301 TACATGGAGC TGAGCAGGCT GAGATCTGAC GACACGGCCG TGTATTACTG TGCAGAGGC
 361 CTGTGCTTTGT ATAACCGGAA CGACCGGTCC CCAACTGGT TCGACCCCTG GGGCCAGGGA
 421 ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC AGGAGTGCA TCCGCCCAA CCCTTAAACT TGAAGAAGGT
 481 GAATTTTCAG AAGCACGCGT ACAGGCTGTG CTGACTCAGC CGCCCTCGGT GTCAGTGGCC
 541 CAGGACAGA CGGCCAGGAT TACCTGTGGG GGAACAACA TTGGAAGTAA AAGTGTGCAG
 601 TGGTACCAGC AGAAGCCAGG CCAGGCCCT GTGCTGGTCG TCTATGATGA TAGCGACCGG
 661 CCCTCAGGGA TCCCTGAGCG ATTCTCTGGC TCCAACCTG GGAACATGGC CACCTGACC
 721 ATCAGCAGGG TCGAAGCCGG GGTATGAGCC GACTATTACT GTCAGGTGTG GGATAGTAGT
 781 AGTGATCCAT TGGTATTCCG CGGAGGGACC AAGCTGACCG TCCTAGGTCA GCCCAAGGCT
 841 GCGCCCTCGG TCACTCTGTT CCGCCGCTCC GCGGCCGCTA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 901 TCTTAGAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCCTA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
 961 GACGAGTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 1021 ACGCACAAGG ATGACCAAGT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
 1081 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 1141 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
 1201 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTGTGGGGG GCAAGGTGTG CCCCCAAGGG
 1261 GAGTGTCCAT GGCAGGTCTG GTTGTGGTG AATGGAGCTC AGTTGTGTGG GGGGACCTG
 1321 ATCAACACCA TCTGGGTGGT CTCCGCGGCC CACTGTTTCG ACAAATCAA GAACTGGAGG
 1381 AACCTGATCG CGGTGCTGGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACGACGGGGA TGAGCAGAGC
 1441 CGGCGGGTGG CGCAGGTCAT CATCCCCAGC ACGTACGTCC CGGGCACCAC CAACCACGAC
 1501 ATCGCGCTGC TCCGCTGCA CCAGCCCGTG GTCCCTCACTG ACCATGTGGT GCCCTCTGC
 1561 CTGCCCGAAC GGACGTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TCGGCTTCTC ATTGGTCAGC
 1621 GGCTGGGGCC AGCTGCTGGA CCGTGGCGCC ACGGCCCTGG AGCTCATGGT CCTCAACGTG
 1681 CCGCGGCTGA TGACCCAGGA CTGCTGCAG CAGTCACGGA AGGTGGGAGA CTCCCCAAAT
 1741 ATCAGCGAGT ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
 1801 GACAGTGGAG GCCACATGC CACCCACTAC CGGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGTC
 1861 AGCTGGGGCC AGGCTGCGC AACCGTGGGC CACTTTGGGG TGTACACCAG GGTCTCCAG
 1921 TACATCGAGT GGCTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAC GCCCAGGAGT CCTCTGCGA
 1981 GCGCCATTTC CCGGTGGCGG TGGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CGGATCAGGT
 2041 GGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCCGGT GGCGGGGGAT CCGACAAAAC TCACACATGC
 2101 CCACCGTGCC CAGTCCCGGA ACTCCTGGGC GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA
 2161 CCAAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG
 2221 AGCCAGGAG AACCTGAGGT CAAGTTC AACGCTGAGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT
 2281 GCAAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC
 2341 ACCGTCTGCG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
 2401 GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 2461 CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGAT GAGCTGACCA AGAACAGGT CAGCCTGACC
 2521 TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 2581 CCGGAGAAC ACTACAAGC CACGCTCCC GTGTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC
 2641 TACAGCAAGC TCACCGTGGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
 2701 GTGATGCTAG AGGCTGTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 2761 AAAGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA TCAGGCGGTG GAGGTTCCGG TGGCGGGGGA
 2821 TCCGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG AGGACCGTCA
 2881 GTCTTCTCTT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
 2941 ATCATGCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCGTGAG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 3001 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG
 3061 TACCGTGTGG TCAGCGTCTC CACCGTCTG CACCGAGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
 3121 AAGTGAACAG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCGCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGGCC
 3181 AAAGGGCAGC CCGGAGAAC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGCGA TGAGCTGACC
 3241 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGGTTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
 3301 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGAGAAC AACTACAAGA CCACGCTTCC CGTGTGGAC
 3361 TCCGACGGCT CTTCTTCTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
 3421 GGGAACTGCT TCTCATGCTC GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGAGAAG
 3481 AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

20

30

40

50

F V I I - 0 2 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、F c 領域に対して F V I I を接続するリンカー領域は、下線を付しており、両方の F c s 部位を接続するリンカーは、太字で示しており、そして M B 9 は、イタリック体になっている。

【 0 4 9 0 】

【 化 6 2 】

```

1  MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AEVQLVQSGA EVNKPASVK VSCKASGYTF TGYMHWVRQ
61  APGQGLEWMG WINPNSGGTN YAQKFQGWVT MTRDTSISTA YMELSRLRSD DTAVYYCARG
121 RALYNRNDRS PNWFDPWGGG TLVTVSSGSA SAPTLKLEEG EFSEARVQAV LTQPPSVSVA
181 PGQTARITCG GNNIGSKSVQ WYQOKPGQAP VLVVYDDSDR PSGIPERFSG SNSGNMATLT
241 ISRVEAGDEA DYVCQVWDSG SDHVVFVGGGT KLTVLGQPKA APSVTLFPSS AAARTKLEWI
301 SYSDGDQCAS SPCQNGGSCCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGGEQYC
361 SDHTGTRKSC RCHEGYSLA DGVSCPTVE YPCGKIPILE KRNASKPQGR IVGGKVCPKG
421 ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR NLI AVLGEHD LSEHDGDEQS
481 RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLT DHVPLC LPERTFSERT LAFVRFSLSVS
541 GWGQLLDGRA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSPN ITEYMFCAQY SDGSKDSCKG
601 DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR
661 APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
721 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
781 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT
841 CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
901 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGGGGSGGGG SGGGSGGGG SDKTHTCPPC PAPELLGGPS
961 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGEVHNACT KPREEQYNST
1021 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
1081 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
1141 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

10

D N A 配列 F V I I - 0 3 9 の D N A 配列

【 0 4 9 1 】

20

【化 6 3】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61  GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GCGTCTCTGC ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGTCTCTGT CGGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA GCGGAGGAG ACTTCACTCG GGTGTGGGG
601 GGCAAGGTGT GCCCCAAAGG GGAGTGTCCA TGGCAGGTCC TGTGTGTGGT GAATGGAGCT
661 CAGTTGTGTG GGGGACCCCT GATCAACACC ATCTGGGTGG TCTCCGCGGC CCACTGTTTC
721 GACAAAATCA AGAAGTGGAG GAACCTGATC GCGGTGCTGG GCGAGCAGCA CCTCAGCGAG
781 CACGACGGGG ATGAGCAGAG CCGGCGGGTG GCGCAGGTCA TCATCCCCAG CACGTACGTC
841 CCGGGCACCA CCAACCACGA CATCGCGCTG CTCCGCTGCG ACCAGCCCGT GGTCTCACT
901 GACCATGTGG TGCCCTCTCG CCTGCCCGAA CGGACGTTCT CTGAGAGGAC GCTGGCCTTC
961 GTGCGCTTCT CATTTGCTAG CCGCTGGGGC CAGCTGCTGG ACCGTGGCGC CACGGCCCTG
1021 GAGCTCATGG TCCTCAACGT GCCCGGGCTG ATGACCCAGG ACTGCCTGCA GCAGTCACGG
1081 AAGGTGGGAG ACTCCCAAAA TATCACGGAG TACATGTTCT GTCCCGGCTA CTCGGATGGC
1141 AGCAAGGACT CTGCAAGGG GGACAGTGGG GGGCCACATG CCACCCACTA CCGGGGCACG
1201 TGGTACCTGA CCGGCATCGT CAGCTGGGGC CAGGCTGCGG CAACCGTGGG CCACTTTGGG
1261 GTGTACACCA GGGTCTCCCA GTACATCGAG TGGCTGCAAA AGCTCATGCG CTCAGAGCCA
1321 CGCCACAGGAG TCCTCTCTGG AGCCCATTTT CCGGTGGCG GTGGCTCCGG CGGAGGTGGG
1381 TCCGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA TCAGGCGGTG GAGGTTCGGG TGGCGGGGGA
1441 TCCGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCTCCGG AACTCCTGGG CGGACCGTCA
1501 GTCTTCTCTT TCCCCCAAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTC
1561 ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
1621 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG
1681 TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG CACCAAGACT GGTGAATGG CAAGGAGTAC
1741 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCGCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC
1801 AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC
1861 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGGTGC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
1921 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGAC
1981 TCCGACGGCT CCTTCTCTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
2041 GGGAACTGCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG
2101 AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAAGGTGGC GCGGATCAG GTGGGGGTGG ATCAGGCGGT
2161 GGAGGTTCGG GTGGCGGGGG ATCAGACAAA ACTCACACAT GCCCACCCTG CCCAGCACCT
2221 GAACTCTCTG GAGGACCGTC AGTCTTCTCT TCCCCCAA AACCCAAGGA CACCCTCATG
2281 ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGACG TGAGCCACGA AGACCTGAG
2341 GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG
2401 GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCTT GCACCAGGAC
2461 TGGCTGAATG GCAAGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCATC
2521 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCGGAGAAC CACAGGTGTA CACCCTGCC
2581 CCATCCCGCG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA CCGCCTGGT CAAAGGCTC
2641 TATCCAGCGG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG
2701 ACCACGGCTC CCGTGTGGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCCTG
2761 GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
2821 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCTCTCTC CTGTCTCCGG GTAAATGA

```

10

20

30

F V I I - 0 3 9 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F X I a 切断部位は、破線の下線で示す、F c 領域に対して F V I I 重鎖を接続するリンカー領域は下線を付しており、そして F c 領域を接続するリンカー領域は、太字で示している。

【0 4 9 2】

【化 6 4】

```

1  MVSQALRLLC LLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
61  SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKRC RCHEGYSLLA DGVSCPTTVE YPCGKIPILE
181 KRNASKPQGR GGGDFTRVVG GKVCPKGECF WQVLLLVNGA QLCGGTLINT IWVVSAAHCF
241 DKIKNWRNLI AVLGEHDLSE HDGDEQSRRV AQVIIPSTYV PGTTNHDIAL LRLHQPVVLT
301 DHVVPCLLPE RTFSERTLAF VRFSLVSGWG QLLDRGATAL ELMVLNVPRL MTQDCLQQSR
361 KVGDSPNITE YMFCAQYSDG SKDSCKGDGSG GPHATHYRGT WYLTGIVSWG QGCATVGHFG
421 VYTRVSQYIE WTKLMRSEF RNPVLLRAPF PGGGSGGGGG SGGGSGGGGG SGGGSGGGGG
481 SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
541 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
601 KGQPREPQVY TLPSPRDELK KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
661 SDGSFFLYSK LTVDKSRSEQ RNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GGSGGGSGGG
721 GGSGGGSGGSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
781 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
841 EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
901 TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK*

```

40

F V I I - 0 4 0 の D N A 配列

【0 4 9 3】

50

【化 6 5】

1 ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
 61 GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCCAC GCGGTCTGCG ACCGGCGCCG GCGCGCCAAC
 121 GCGTTCCTGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
 181 TCCTTCGAGG AGGCCCCGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
 241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
 301 GACCAGCTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCTTC TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
 361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGTGTGA GCAGTACTGC
 421 AGTGACCACA CGGGCACCAC GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
 481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
 541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCGGC GGAGGAGACT TCACTCGGGT TGTGGGGGGC
 601 AAGGTGTGCC CCAAAGGGGA GTGTCCATGG CAGGTCTGTG TGTGTGTGAA TGGAGCTCAG
 661 TTGTGTGGGG GGACCCCTGAT CAACACCATC TGGGTGGTCT CCGCGGCCCA CTGTTTCGAC
 721 AAAATCAAGA ACTGGAGGAA CCTGATCGCG GTGCTGGGCG AGCACGACCT CAGCGAGCAC
 781 GACGGGGATG AGCAGAGCCG GCGGGTGGCG CAGGTATCA TCCCCAGCAC GTACGTCCCG
 841 GGCACCAACA ACCACGACAT CGCGCTGCTC CGCTGCGACC AGCCCGTGGT CCTCACTGAC
 901 CATGTGGTGC CCTCTGCCT GCCCGAACGG ACGTCTCTG AGAGGACGCT GGCCTTCGTG
 961 CGCTTCTCAT TGGTCACGGG CTGGGGCCAG CTGCTGGACC GTGGCGCCAC GGCCCTGGAG
 1021 CTCATGGTCC TCAACGTGCC CCGGCTGATG ACCCAGGACT GCCTGCAGCA GTCACGGAAG
 1081 GTGGGAGACT CCCCAAATAT CACGGAGTAC ATGTTCTGTG CCGGCTACTC GGATGGCAGC
 1141 AAGGACTCCT GCAAGGGGGA CAGTGGAGGC CCACATGCCA CCCACTACCG GGGCACGTGG
 1201 TACCTGACGG GCATCGTCAG CTGGGGCCAG GGCTGCGCAA CCGTGGGCCA CTTTGGGGTG
 1261 TACACCAGGG TCTCCAGTA CATCGAGTGG CTGCAAAAGC TCATGCGCTC AGAGCCACGC
 1321 CCAGGAGTCC TCCTGCGAGC CCCATTTCCC GGTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
 1381 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGGTGGATCA GGCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCC
 1441 GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCCA GCTCCGGAAC TCCTGGGCGG ACCGTACGTC
 1501 TTCTCTTCC CCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
 1561 TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
 1621 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
 1681 CGTGTGGTCA GCGTCCCTCAC CGTCTGCGAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
 1741 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
 1801 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAG
 1861 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
 1921 TGGGAGACA ATGGGCGAGC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC
 1981 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
 2041 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
 2101 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA AGGTGGCGGC GGATCAGGTG GGGGTGGATC AGGCGGTGGA
 2161 GGTTCGGGTG GCGGGGGATC AGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
 2221 CTCTTGGGAG GACCGTCAGT CTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
 2281 TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
 2341 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
 2401 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
 2461 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCAGC CCCCATCGAG
 2521 AAAACCATCT CCAAGGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCA
 2581 TCCCGCGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
 2641 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
 2701 ACGCCTCCCG GTTGGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC
 2761 AAGAGCAGG TGGCAGAGG GAACGTCCTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
 2821 AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA AATGA

10

20

30

F V I I - 0 4 0 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F X I a 切断部位は、破線の下線で示し、F c 領域に対して F V I I 重鎖を接続するリンカー領域は下線を付しており、そして F c 領域を接続するリンカー領域は、太字で示している。

【0 4 9 4】

【化 6 6】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSC DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSTPTTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGG GGDEFIRVVG KVCPRGECPW QVLLLVNGAQ LCGGTINTI WVVSAAHCFD
 241 KIKNWRNLIA VLGEHDLSEH DGDEQSRRA QVIIPSTYVP GTTNHDIAL RLHQFPVVLTD
 301 HVVPLCLPER TFSERTLAFV RFSLVSGWQ LLDRGATALE LMVLNVPRLM TQDCLQSSRK
 361 VGDSFNITEY MFCAGYSYDS KDSCKGDSGG PHATHYRGTW YLTGIVSWGQ GCATVGHFV
 421 YTRVSQYIEW LQKLMRSEPR PGVLLRAPFP **GGGGSGGGGS** **GGGGSGGGGS** **GGGGSGGGGS**
 481 DKTHTCPPCP HTEPLLGGPSV FLEPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKENWYVD
 541 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 601 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 661 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGSGGGG
 721 GSGGGGSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
 781 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
 841 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 901 TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

40

50

F I X - 0 4 2 の D N A 配列

【 0 4 9 5 】

【 化 6 7 】

```

1  ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA
61  GGATATCTAC TCAGTGTGTA ATGTACAGGT TTGTTTCCTT TTTTAAAAATA CATTGAGTAT
121 GCTTGCCTTT TAGATATAGA AATATCTGAT GCTGTCTTCT TCACTAAATT TTGATTACAT
181 GATTTGACAG CAATATTGAA GAGTCTAACA GCCAGCACGC AGGTTGGTAA GTACTGTGGG
241 AACATCACAG ATTTTGGCTC CATGCCCTAA AGAGAAATTG GCTTTCAGAT TATTTGGATT
301 AAAAAACAAG ACTTCTTAA GAGATGTAAA ATTTTCATGA TGTTCCTTT TTTGCTAAAA
361 CTAAAGAATT ATCTTTTAC ATTTTCAGTT TTCTTGATCA TGAAAACGCC AACAAAATTC
421 TGAATCGGCC AAAGAGGTAT AATTCAGGTA AATTGGAAGA GTTTGTTCAA GGAATCTAG
481 AGAGAGAATG TATGGAAGAA AAGTGTAGTT TTGAAGAAGC ACGAGAAGTT TTTGAAAACA
541 CTGAAAGAAC AACTGAATTT TGAAGCAGT ATGTTGATGG AGATCAGTGT GAGTCCAATC
601 GATGTTTAAA TGGCGCCAGT TGCAGGATG ACATTAATTC CTATGAATGT TGGTGCCCT
661 TTGGATTTGA AGGAAAGAAC TGTGAATTAG ATGTAACATG TAACATTAAG AATGGCAGAT
721 GCGAGCAGTT TTGTAATAAT AGTGCCTGATA ACAAGGTGGT TTGCTCCTGT ACTGAGGGAT
781 ATCGACTTGC AGAAAACCAG AAGTCTCTGT AACACGAGT GCCATTTCCA TGTGGAAGAG
841 TTTCTGTTTC ACAAACTTCT AAGCTCACCC GTGCTGAGAC TGTTCCTTCT GATGTGGACT
901 ATGTAAATTC TACTGAAGCT GAAACCATTT TGGATAACAT CACTCAAAGC ACCCAATCAT
961 TTAATGACTT CACTCGGGTT GTTGGTGGAG AAGATGCCAA ACCAGGTCAA TTCCTTGGC
1021 AGGTTGTTTT GAATGGTAAA GTTGATGCAT TCTGTGGAG CTCTATCGTT AATGAAAAAT
1081 GAGTTGTTAA TGCTGCCAC TGTATTGAAA CTGGTGTTAA AATTACAGTT GTCGCAGGTG
1141 AACATAATAT TGAGGAGACA GAACATACAG AGCAAAAGCG AAATGTGATT CGAATTATTC
1201 CTCACCACAA CTACAATGCA GCTATTAAATA AGTACAACCA TGACATTGCC CTCTGGAAC
1261 TGGACGAACC CTTAGTGCTA AACAGCTACG TTACACCTAT TTGCATTGCT GACAAGGAAT
1321 ACACGAACAT CTTCCTCAA TTTGGATCTG GCTATGTAAG TGGCTGGGA AGAGTCTCC
1381 ACAAGGGGAG ATCAGCTTTA GTTCTTCAGT ACCTTAGAGT TCCACTTGT GACCGAGCCA
1441 CATGTCTTCG ATCTACAAAG TTCACCATCT ATAACAACAT GTTCTGTGCT GGCTTCCATG
1501 AAGGAGGTAG AGATTCAATG CAAGGAGATA GTGGGGGACC CCAATGTACT GAAGTGAAG
1561 GGACCAAGTT CTTAACGTGA ATTATTAGCT GGGGTGAAGA GTGTGCAATG AAAGGCAAAT
1621 ATGGAATATA TACCAAGGTG TCCCGGTATG TCAACTGGAT TAAGGAAAAA ACAAGCTCA
1681 CTGACAAAAA TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGC GGACCGTCAG
1741 TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
1801 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAC TGGTACGTGG
1861 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
1921 ACCGTGTGGT CAGCGTCTTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
1981 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
2041 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA
2101 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
2161 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC GTGTTGGACT
2221 CCGACGGCTC CTTCCTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
2281 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
2341 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAAGGTGGCG GCGGATCAGG TGGGGGTGGA TCAGGCGGTG
2401 GAGGTTCCGG TGGCGGGGGA TCAGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG
2461 AACTCCTGGG AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA
2521 TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCGTAGG
2581 TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG
2641 AGGAGCAGTA CAACAGCAGC TACCGTGTGG TCAGCGTCTC CACCGTCTCG CACCAGGACT
2701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG
2761 AGAAAACCAT CTCCAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
2821 CATCCGCGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT
2881 ATCCAGCGCA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA
2941 CCAGCCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG
3001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC
3061 ACAACCACTA CACGAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGG TAAATGA

```

10

20

30

F I X - 0 4 2 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、そして F c 領域を接続するリンカー領域は下線を付している。

【 0 4 9 6 】

【化 6 8】

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
61  ERECMEEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGQCESN PCLNGGCKD DINSYECWCP
121 FGFEGKNCEL DVTCKNIKGR CEQFCKNSAD NKVVCCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR
181 VSVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAEI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW
241 QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNIRII
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
361 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
421 GTSFLTGIIS WGEECAMK GK YGIYTKVSRY VNWIKEKTKL TDKTHTCPPC PAPELLGGPS
481 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
541 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDELT
601 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
661 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GSGGGGSGG GSGGGGSDK THTCPPCPAP
721 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
781 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL
841 PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
901 DKSRLWQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLPKGK*

```

10

F I X - 0 6 8 の D N A 配 列

【 0 4 9 7 】

【化 6 9】

```

1 ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCCTTTTA
61 GGATATCTAC TCAGTGCTGA ATGTACAGGT TTGTTTCCTT TTTTAAATA CATTGAGTAT
121 GCTTGCCCTT TAGATATAGA AATATCTGAT GCTGTCTCT TCACTAAATT TTGATTACAT
181 GATTTGACAG CAATATTGAA GAGTCTAACA GCCAGCACGC AGGTTGGTAA GTACTGTGGG
241 AACATCACAG ATTTTGGCTC CATGCCCTAA AGAGAAATTG GCTTTCAGAT TATTTGGATT
301 AAAAAACAAAG ACTTCTTAA GAGATGTAAA ATTTTCATGA TGTTCCTTT TTTGCTAAAA
361 CTAAGAATTT ATTCTTTTAC ATTTCAGTTT TTCTTGATCA TGAACACGCC AACAAAATTC
421 TGAATCGGCC AAAGAGGTAT AATTCAGGTA AATTGGAAGA GTTTGTCAA GGGATCTAG
481 AGAGAGAATT TATGGAAGAA AAGTGTAGTT TTGAAGAAGC ACGAGAAGTT TTTGAAAACA
541 CTGAAAGAAC AACTGAATTT TGAAGCAGT ATGTTGATGG AGATCAGTGT GAGTCCAATC
601 CATGTTTAAA TGGCGGCAGT TGCAAGGATG ACATTAATTC CTATGAATGT TGGTGTCCCT
661 TTGGATTTGA AGGAAGAAGC TGTGAATTAG ATGTAACATG TAACATTAAG AATGGCAGAT
721 GCGAGCAGTT TTGTAAAAAT AGTGTGATA ACAAGGTGGT TTGCTCCTGT ACTGAGGAT
781 ATCGACTTGC AGAAAAACAG AAGTCCTGTG AACCCAGCAGT GCCATTTCCA TGTGGAAGAG
841 TTTCTGTTTC ACAAACTTCT AAGCTCACCC GTGCTGAGAC TGTTCCTTCC TATGTGGACT
901 ATGTAATTC TACTGAAGCT GAAACCATTT TGGATAACAT CACTCAAAGC ACCCAATCAT
961 TTAATGACTT CACTCGGGTT GTTGGTGGAG AAGATGCCAA ACCAGGTCAA TTCCCTTGGC
1021 AGGTTGTTTT GAATGGTAAA GTTGATGCAT TCTGTGGAG CTCTATCGTT AATGAAAAAT
1081 GGATGTAAAC TGCTGCCCCAC TGTGTTGAAA CTGGTGTAA AATTACAGTT GTCGCAGGTG
1141 AACATAATAT TGAGGAGACA GAACATACAG AGCAAAAGCG AAATGTGATT CGAATTATTC
1201 CTCACCAACAA CTCACATGCA GCTATTAATA AGTACAACCA TGACATTGCC CTTCTGGAAC
1261 TGGACGAACC CTTAGTGCTA AACAGCTACG TTACACCTAT TTGCATTGCT GACAAGGAAT
1321 ACACGAACAT CTTCTCAA A TTTGGATCTG GCTATGTAAG TGGCTGGGGA AGAGTCTTCC
1381 ACAAGGGGAG ATCAGCTTTA GTTCTTCAGT ACCTTAGAGT TCCACTTGT T GACCGAGCCA
1441 CATGCTTTCG ACTTACAAAG TTCAACATCT ATAACAACAT GTTCTGTGCT GGCCTTCCATG
1501 AAGGAGGTAG AGATTCATGT CAAGGAGATA GTGGGGGACC CCATGTTACT GAAGTGAAG
1561 GGACCAAGTTT CTTAACTGGA ATTATTAGCT GGGGTGAAGA GTGTGCAATG AAAGGCAAAAT
1621 ATGGAATATA TACCAAGGTG TCCCGGTATG TCAACTGGAT TAAGGAAAAA ACAAGCTCA
1681 CTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGC GGACCGTCAG
1741 TCTTCTCTTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
1801 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTC AAC TGGTACGTGG
1861 ACCGCGTGGA GGTGCATATG GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
1921 ACCGTGTGGT CAGCGTCCCT ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
1981 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
2041 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA
2101 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTGTGTC AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
2161 AGTGGGAGAG CAATGGGTCAG TCGTGGGAC ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGTTGGACT
2221 CCGACGGCTC CTTCTTCTC TACAGCAAGC TCACCGTCGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
2281 GGAACGTCTT CTCTATGCTC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
2341 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAACGGCGCC GCCGGAGCGG TGGCGGCGGA TCAGGTGGGG
2401 GTGGATCAGG CCGTGGAGGT TCCGTGGCG GGGGATCCGG CGGTGGAGGT TCCGGTGGGG
2461 GTGGATCAAG GAAGAGGAGG AAGAGGGCGC AGGTGCAGCT GCAGGAGTCT GGGGGAGGCT
2521 TGGTACAGCC TGGGGGGTCC CTGAGACTCT CTTGTGCAGC CTCTGGATTG ATGTTTAGCA
2581 GGTATGCCAT GAGCTGGGTC CGCCAGGCTC CAGGGAAGGG GCCAGAGTGG GTCTCAGGTA
2641 TTAGTGGTAG TCGTGGTAGT ACATACTACG CAGACTCCGT GAAGGGCCGG TTCAACCTCT
2701 CCAGAGACAA TTCCAAGAAC ACGCTGTATC TGCAAAATGAA CAGCCTGAGA GCCGAGGACA
2761 CGGCTGTATA TTACTGCGCC CCGGGCGCCA CCTACACCAG CCGGAGCGAC GTGCCCGACC
2821 AGACCACTTT CCACTACTGG GGCAGGGGAA CCTGGTTCAC CGTCTCCTCA GGGAGTGCAT
2881 CCGCCCAAA GCTTGAATTT GGTGAATTT CAGAAGCACG CGTATCTGAA CTGACTCAGG
2941 ACCCTGCTGT GTCTGTGGCC TTGGGACAGA CAGTCAGGAT CACATGCCAA GGAGACAGCC
3001 TCAGAAACTT TTAGTCAAGC TGGTACCAGC AGAAGCCAGG ACAGGCCCCCT ACTCTGTCA
3061 TCTATGGTTT AAGTAAAGG CCCTCAGGGA TCCCAGACCG ATTCTCTGCC TCCAGCTCAG
3121 GAAACACAGC TTCTTTGACC ATCACTGGGG CTCAGGCGGA AGATGAGGCT GACTATTACT
3181 GCCTGCTGTA CTACGGCGGC GGCCAGCAGG GCGTGTTCGG CGGCGGCACC AAGCTGACCG
3241 TCCTACGTCA GCCCAAGGCT GCCCCTCGG TCACTCTGTT CCCGCCCTCT TCTGCGGCCG
3301 GTGGCGGTGG CTCCGGCGGA GGTGGGTCCG GTGGCGGCGG ATCAGGTGGG GGTGGATCAG
3361 GCGGTGGAGG TTCCGGTGGC GGGGATCAG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG
3421 CACCGGAACCT CTTGGGCGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAACCC AAGGACACCC
3481 TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
3541 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC
3601 CCGGGGAGGA GCAGTACAAG AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCCGTCACC
3661 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCAGCCC
3721 CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC
3781 TGCCCCCATC CCGCGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
3841 GCTTCTATCC CAGCGACATG GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCGCGCG GAGAACAAC
3901 ACAAGACCAC GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
3961 CCGTGACAAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG
4021 CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGA

```

10

20

30

40

F I X - 0 6 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して S C E 5 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そしてプロタンパク質転換酵素プロセッシング部位を有するリンカーは、太字で示している。

【0 4 9 8】

【化 7 0】

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
61  ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGSCCK DINSYECWCP
121 FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEQFCCKNSAD NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVFPFCGR
181 VSVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW
241 QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRI
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIAADKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
361 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
421 GTSFLTGIIS WGEECAMK GK YGIYTKVSR Y VNWIKETKL TDKHTCPPC PAPELLGGPS
481 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
541 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDELT
601 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
661 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKRR RRSGGGGSGG GGSGGGGSGG GGSGGGGSGG
721 GGSRKRRKRA QVQLQESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFMFS RYAMSWVRQA PGKGPEWVSG
781 ISGSGGSTYY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGA TYTSRSDVPD
841 QTSFDYWGQG TLVTVSSGSA SAPKLEEGEF SEARVSELTQ DPAVSVALGQ TVRITCQGDS
901 LRNFYASWYQ QKPGQAPTIV IYGLSKRPSG IPDRFSASSS GNTASLTITG AQAEDEADYY
961 CLLYYGGGQQ GVFGGGTKLT VLRQPKAAPS VTLFPPSSAA GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
1021 GGGSGGGGGS DKHTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
1081 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
1141 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
1201 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

```

10

F I X - 0 8 8 の D N A 配列

【 0 4 9 9 】

【化 7 1】

```

1  ATGCGACGCG  TGAACATGAT  CATGGCAGAA  TCACCAGGCC  TCATCACCAT  CTGCCTTTTA
61  GGATATCTAC  TCAGTGCTGA  ATGTACAGGT  TTGTTTCCTT  TTTTAAAAATA  CATTGAGTAT
121  GCTTGCCTTT  TAGATATAGA  AATATCTGAT  GCTGTCTTCT  TCACTAAAT  TTGATTACAT
181  GATTTGACAG  CAATATTGAA  GAGTCTAACA  GCCAGCACGC  AGGTTGGTAA  GTACTGTGGG
241  AACATCACAG  ATTTTGGCTC  CATGCCCTAA  AGAGAAATTG  GCTTTCAGAT  TATTGGGATT
301  AAAAACAAAG  ACTTCTTAA  GAGATGTAAA  ATTTTCATGA  TGTTCCTTT  TTTGCTAAAA
361  CTAAAGAATT  ATCTTTTAC  ATTTTCAGTT  TTCTTGATCA  TGAAACGCC  AACAAAATTC
421  TGAATCGGCC  AAAGAGGTAT  AATTTCAGGT  AATTGGAAGA  GTTTGTTCAA  GGGAACTAG
481  AGAGAGAATG  TATGGAAGAA  AAGTGTAGTT  TTGAAGAAGC  ACGAGAAGTT  TTTGAAACA
541  CTGAAAGAAC  AACTGAATTT  TGGAAGCAGT  ATGTTGATGG  AGATCAGTGT  GAGTCCAATC
601  CATGTTTAAA  TGGCGGCAGT  TGCAAGGATG  ACATTAATTC  CTATGAATGT  TGGTGTCCCT
661  TTGGATTTGA  AGGAAAGAAC  TGTGAATTAG  ATGTAACATG  TAACATTAAG  AATGGCAGAT
721  GCGAGCAGTT  TTGTAAAAAT  AGTGCTGATA  ACAAGGTGGT  TTGCTCCTGT  ACTGAGGAT
781  ATCGACTTGC  AGAAAACCAG  AAGTCCTGTG  AACCAGCAGT  GCCATTTCCA  TGTGGAAGAG
841  TTCTGTGTTT  ACAAACCTCT  AAGCTCACCC  GTGCTGAGAC  TGTTCCTCT  GATGTGGACT
901  ATGTAAATTC  TACTGAAGCT  GAAACCATT  TGGATAACAT  CACTCAAAGC  ACCCAATCAT
961  TTAATGACTT  TACTCGGTT  GTTGGTGGAG  AAGATGCCAA  ACCAGGTCAA  TTCCCTTGGC
1021  AGGTTGTTTT  GAATGGTAAA  GTTGATGCAT  TCTGTGGAGG  CTCTATCGTT  AATGAAAAAT
1081  GGATTGTAA  TGCTGCCAC  TGTGTTGAAA  CTGGTGTAA  AATTACAGTT  GTCGCAGGTG
1141  AACATAATAT  TGAGGAGACA  GAACATACAG  AGCAAAAGCG  AAATGTGATT  CGAATTATTC
1201  CTCCACCATA  TCAATATGCA  GCTATTAATA  AGTACAACCA  TGACATTGCC  CTTCTGGAAC
1261  TGGACGAACC  CTTAGTGCTA  AACAGCTACG  TTACACCTAT  TTGCATTGCT  GACAAGGAAT
1321  ACACGAACAT  CTTCCTCAA  TTTGGATCTG  GCTATGTAAG  TGGCTGGGGA  AGAGTCTTCC
1381  ACAAAGGGAG  ATCAGCTTTA  GTTCTTCAGT  ACCTTAGAGT  TCCACTTGT  GACCGAGCCA
1441  CATGCTTTG  TACACATG  TCCACCATCT  ATAACAACAT  GTTCTGTGCT  GGCTTCCATG
1501  AAGGAGGTAG  AGATTTCATG  CAAGGAGATA  GTGGGGGACC  CCATGTTACT  GAAGTGGGAG
1561  GGACCAAGTT  CTTAACTGGA  ATTATTAGCT  GGGGTGAAGA  GTGTGCAATG  AAAGGCAAAT
1621  ATGGAATATA  TACCAAGGTG  TCCCGGTATG  TCAACTGGAT  TAAGGAAAAA  ACAAAGCTCA
1681  CTGACAAAAC  TCACACATGC  CCACCGTGCC  CAGCTCCGGA  ACTCCTGGGC  GGACCGTCAG
1741  TCTTCCTCT  CCCCCAAAA  CCAAGGACA  CCCTCATGAT  CTCCCGGACC  CCTGAGGTCA
1801  CATGCGTGGT  GGTGGACGTG  AGCCACGAAG  ACCCTGAGGT  CAAGTTCAAC  TGGTACGTGG
1861  ACGGCGTGG  GGTGCATAAT  GCCAAGACAA  AGCCGCGGGA  GGAGCAGTAC  AACAGCACGT
1921  ACCGTGTGGT  CAGCGTCTCT  ACCGTCTGTC  ACCAGGACTG  GCTGAATGGC  AAGGAGTACA
1981  AGTGCAAGGT  CTCCAACAAA  GCCCTCCAG  CCCCATCGA  GAAAACCATC  TCCAAAGCCA
2041  AAGGGCAGCC  CCAGAAACCA  CAGGTGTACA  CCCTGCCCC  ATCCCGGGAT  GAGCTGACCA
2101  AGAACCAGGT  CAGCCTGACC  TGCCTGGTCA  AAGGCTTCTA  TCCAGCGAC  ATCGCCGTGG
2161  AGTGGGAGAG  CAATAGGCG  CCGGAGAACA  ACTACAAGAC  CACGCTCC  GTGTTGGACT
2221  CCGACGGCTC  CTTCTTCTCT  TACAGCAAGC  TCACCGTGG  CAAGAGCAGG  TGGCAGCAGG
2281  GGAACGTCTT  CTCTATGCTC  GTGATGCATG  AGGCTCTGCA  CAACCACTAC  ACGCAGAAGA
2341  GCCTCTCCCT  GTCTCCGGGT  AAAGGTGGCG  GCGGATCAGG  TGGGGGTGGA  TCAGGCGGTG
2401  GAGGTTCCCG  TGGCGGGGGA  TCAGACAAAA  CTCACACATG  CCCACCGTGC  CCAGCACCTG
2461  AACTCCTGGG  AGGACCGTCA  GTCTTCTCT  TCCCCCAA  ACCCAAGGAC  ACCCTCATGA
2521  TCTCCCGGAC  CCTGAGGTG  ACATGCGTGG  TGGTGGACGT  GAGCCACGAA  GACCCTGAGG
2581  TCAAGTTCAA  CTGGTACGTG  GACGGCGTGG  AGGTGCATAA  TGCCAAGACA  AAGCCGCGGG
2641  AGGAGCAGTA  CAATAGCAG  TACCGTGTGG  TCAGCGTCT  CACCGTCTG  CACCAAGGACT
2701  GGTGAATGG  CAAGGAGTAC  AAGTGCAAGG  TCTCCAACAA  AGCCCTCCCA  GCCCCATCG
2761  AGAAAACCAT  CTCCAAAGCC  AAAGGGCAGC  CCGGAGAACC  ACAGGTGTAC  ACCCTGCCCC
2821  CATCCCGCGA  TGAGCTGACC  AAGAACCAGG  TCAGCCTGAC  CTGCCTGGTC  AAAGGCTTCT
2881  ATCCGAGCGA  CATCGCGTG  GAGTGGGAGA  GCAATGGGCA  GCGGAGAAC  AACTACAAGA
2941  CCACGCCTCC  CGTGTGGAC  TCCGACGGCT  CCTTCTTCT  CTACAGCAAG  CTCACCGTCG
3001  ACAAGAGCAG  GTGGCAGCAG  GGGAACGTCT  TCTCATGCTC  CGTGATGCAT  GAGGCTCTGC
3061  ACAACCACTA  CACGCAAG  AGCCTCTCCC  TGTCTCCGG  TAAAGGTGGC  GGTGGCTCCG
3121  GCGGAGGTGG  GTCCGTTGGC  GCGGATCAG  GTGGGGGTGG  ATCAGGCGGT  GGAGGTTCCG
3181  GTGGCGGGGG  ATCAGCGCAG  GTGCAGCTGC  AGGAGTCTGG  GGGAGGCTTG  GTACAGCCTG
3241  GGGGGTCCCT  GAGACTCTCC  TGTGCAGCCT  CTGGATTCAT  GTTTAGCAGG  TATGCCATGA
3301  GCTGGGTCCG  CCAGGCTCCA  GGAAGGGGC  CAGAGTGGGT  CTCAGGTATT  AGTGGTAGTG
3361  GTGGTAGTAC  ATACTACGCA  GACTCCGTGA  AGGGCCGGTT  CACCGTCTCC  AGAGACAATT
3421  CCAAGAACAC  GCTGTATCTG  CAAATGAACA  GCCTGAGAGC  CGAGGACACG  GCTGTATATT
3481  ACTGCGCCCG  GGGCGCCACC  TACACCAGCC  GGAGCGACGT  GCGGACACG  ACCAGCTTCG
3541  ACTACTGGGG  CCAGGGAACC  CTGGTACCCG  TCTCTCAGG  GAGTGCATCC  GCGGAAAGC
3601  TTGAAGAAGG  TGAATTTTCA  GAAGCACGCG  TATCTGAAGT  GACTCAGGAC  CCTGCTGTGT
3661  CTGTGGCCTT  GGGACAGACA  GTCAGGATCA  CATGCCAAGG  AGACAGCCTC  AGAACTTTT
3721  ATGCAAGCTG  GTACCAGCAG  AAGCCAGGAC  AGGCCCTAC  TCTTGTCTATC  TATGGTTTAA
3781  GTAAAAGGCC  CTCAGGATC  CCAGACCGAT  TCTCTGCCTC  CAGCTCAGGA  AACACAGCTT
3841  CCTTGACCAT  CACTGGGGCT  CAGGCGGAAG  ATGAGGCTGA  CTATTACTGC  CTGCTGTACT
3901  ACGGCGGGCG  CCAGCAGGCG  GTGTTCCGGC  GCGGCACCAA  GCTGACCGTC  CTACGTCAGC
3961  CCAAGGCTGC  CCCCTCGGTC  ACTCTGTTCC  CGCCCTCTTC  TGCGGCCTGA

```

10

20

30

40

F I X - 0 8 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、両方の F c 領域を接続するリンカーは下線を付しており、そして F c 領域を S C E 5 に対して接続するリンカーは太字である。

【0 5 0 0】

【化 7 2】

```

1 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
61 ERECEMEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGCKD DINSYECWCP
121 FGFEGKNCCL DVTCNIKNGR CEQFCKNSAD NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR
181 VSVSQTSKLT RAETVFDPVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVG EDAKPGQFPW
241 QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRII
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
361 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
421 GTSFLTGIIS WGEECAMKKG YGIYTKVSRV VNWIKETKL TDKTHTCPFC PAPELLGGPS
481 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
541 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
601 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
661 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GSGGGGGSGG GSGGGGGSDK THTCPFCFAP
721 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
781 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
841 PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
901 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGGGS GGGGGGGGGS GGGGGGGGGS
961 GGGGSAQVQL QESGGGLVQF GGSRLRSCTA SGFMFSRYAM SWVRQAPGKG PEWVSGISGS
1021 GGSTYYADSV KGRFTVSRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCARGATYTS RSDVPDQTSF
1081 DYWGQGTIVT VSSGSASAPK LEEGEFSEAR VSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDLSLRF
1141 YASWYQQKPG QAPTLVIYGL SKRPSGIPDR FSASSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCLLY
1201 YGGGQQGVFG GGTKLTVLRQ PKAAPSVTLF PPSSAA*

```

10

F I X - 0 8 9 の D N A 配 列

【 0 5 0 1 】

【化 7 3】

```

1 ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA
61 GGATATCTAC TCAGTGCTGA ATGTACAGGT TTGTTTCCTT TTTTAAATA CATTGAGTAT
121 GCTTGCCCTT TAGATATAGA AATATCTGAT GCTGTCTTCT TCACTAAATT TTGATTACAT
181 GATTTGACAG CAATATTGAA GAGTCTAACA GCCAGCACGC AGGTTGGTAA GTACTGTGGG
241 AACATCACAG ATTTTGGCTC CATGCCCTAA AGAGAAATTG GCTTTCAGAT TATTTGGATT
301 AAAAACAAG ACCTTCTTAA GAGATGTAAA ATTTTCATGA TGTTTCTTT TTTGCTAAAA
361 CTAAAGAATT ATTCTTTTAC ATTTTCAGTTT TTCTTGATCA TGAAAACGCC AACAAAATTC
421 TGAATCGGCC AAAGAGGTAT AATTCAGGTA AATTGGAAGA GTTTGTCAA GGGAACTAG
481 AGAGAGAATG TATGGAAGAA AAGTGTAGTT TTGAAGAAGC ACGAGAAGTT TTTGAAAACA
541 CTGAAAGAAC AACTGAATTT TGGAAGCAGT ATGTTGATGG AGATCAGTGT GAGTCCAATC
601 CATGTTTAAA TGGCGGCAGT TGCAAGGATG ACATTAATTC CTATGAATGT TGGTGTCCTT
661 TTGGATTTGA AGGAAAGAAC TGTGAATTAG ATGTAACATG TAACATTAAG AATGGCAGAT
721 GCGAGCAGTT TTGTAATAAT AGTGTGATA ACAAGGTGGT TTGCTCCTGT ACTGAGGGAT
781 ATCGACTTGC AGAAAAACAG AAGTCCTGTG AACCAGCAGT GCCATTTCCA TGTGGAAGAG
841 TTTCTGTTTC ACAAACTTCT AAGCTCACCC GTGCTGAGAC TGTTTTTCCT GATGTGGACT
901 ATGTAAATTC TACTGAAGCT GAAACCATTT TGGATAACAT CACTCAAAGC ACCCAATCAT
961 TTAATGACAT CACTCGGTT GTTGGTGGAG AAGATGCCAA ACCAGGTCAA TTCCCTTGGC
1021 AGGTTGTTTT GAATGGTAAA GTTGATGCAT TCTGTGGAGG CTCTATCGTT AATGAAAAAT
1081 GGATTGTAAC TGTGCCCAC TGTGTTGAAA CTGGTGTTAA AATTACAGTT GTCGCAGGTG
1141 AACATAATAT TGAGGAGACA GAACATACAG AGCAAAAGCG AAATGTGATT CGAATTATTC
1201 CTCACCAACA ATCTACAAAG TTCACCATCT ATAACAACAT GTTCTGTGCT GGCTTCCATG
1261 TGGACGAACC CTTAGTGCTA AACAGCTACG TTACACCTAT TTGCATTGCT GACAAGGAAT
1321 ACACGAACAT CTCCTCAAA TTTGGATCTG GCTATGTAAG TGGCTGGGGA AGAGTCTTCC
1381 ACAAAGGGAG ATCAGCTTTA GTTCTTCAGT ACCTTAGAGT TCCACTTGT TACCGAGCCA
1441 CATGCTTTCG ATCTACAAAG TTCACCATCT ATAACAACAT GTTCTGTGCT GGCTTCCATG
1501 AAGGAGGTAG AGATTATGAT CAAGGAGATA GTGGGGGACC CCATGTTACT GAAGTGAAG
1561 GGACCAAGTT CTTAACTGGA ATTATTAGCT GGGGTGAAGA GTGTGCAATG AAAGGCAAAAT
1621 ATGGAATATA TACCAAGGTG TCCCGGTATG TCAACTGGAT TAAGGAAAAA ACAAAGCTCA
1681 CTGACAAAAC TCACACATG CACCGTGCC CAGCTCCGGA ACTCCTGGGA GGACCGTCAG
1741 TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
1801 CATGCGTGCT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTC AAC TGGTACGTGG
1861 ACCGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
1921 ACCGTGTGCT CAGCGTCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
1981 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCTCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
2041 AAGGCGAGCC CCAGAAACCA CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA
2101 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
2161 ATGTTGGAGG CAATGGGAGC CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC GTGTGGACT
2221 CCGACGGCTC CTTCTTCTC TACAGCAAGC TCACCGTCGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
2281 GGAACGTCTT CTCTGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
2341 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAAGGCGGTG GCGGTTGAGG TGGAGGAGGG TCAGGCGGTG
2401 GTGGATCCCG CGGGGGCGGA TCCGGTGGCG GAGGGTCAGG CGGTGGCGGA TCAGCCTGCA
2461 CCGAGCGGAT GGCCTGTCAC AACCTGTGCG GTGGCGGTGG CTCCGGCGGA GGTGGGTCCG
2521 GTGGCGGCGG ATCAGGTGGG GGTGGATCAG GCGGTGGAGG TTCCGTGGC GGGGGATCCG
2581 ACAAACACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCGGAAT CCTGGGCGGA CCGTCAGTCT
2641 TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT
2701 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG
2761 GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCAGTACC
2821 GTGTGGTCAG GTCTCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
2881 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCACAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG
2941 GGCAGCCCGG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGATGAG CTGACCAAGA
3001 ACCAGGTCAG CTTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT
3061 GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGTG TTGACTCCG
3121 ACGGCTCCTT CTTCTCTTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
3181 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC
3241 TCTCCCTGTC TCCGGTAAA TGA

```

10

20

30

F I X - 0 8 9 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対してO S 1を接続するリンカー領域は下線を付しており、そしてO S 1ペプチドは、イタリック体になっている。

【0502】

40

【化 7 4】

```

1 MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
61 ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGSKCD DINSYECWCP
121 FGFEKGKNCLE DVTCTNIKNR CEQFCKNSAD NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR
181 VSVSQTSKLT RAETVFDPVD YVNSTEAEI LDNIQTSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW
241 QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNIRII
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
361 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
421 GTSFLTGIIS WGEECAMKKG YGIYTKVSRY VNWIEKTKL TDKTHTCPPC PAPELLGGPS
481 VFLEPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKENWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
541 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDELTK
601 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
661 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG GSGSGGGSGG GSGSGGGSGG GSGSGGGSGG
721 TERMALHNLC GGGSGGGSGG GGGSGGGSGG GGGSGGGSGG DKTHTCPPCP APELLGGPSV
781 FLEPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKT PREEQYNSTY
841 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPVYT LPSPSRDELTK
901 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
961 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

```

10

F I X - 0 9 0 の D N A 配列

【0 5 0 3】

【化 7 5】

```

1 ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA
61 GGATATCTAC TCAGTGCTGA ATGTACAGGT TTGTTTCCTT TTTTAAATA CATTGAGTAT
121 GCTTGCCCTTT TAGATATAGA AATATCTGAT GCTGTCTTCT TCACTAAATT TTGATTACAT
181 GATTTGACAG CAATATTGAA GAGTCTAACA GCCAGCACGC AGGTGGGTAA GTACTGTGGG
241 AACATCACAG ATTTTGGCTC CATGCCCTAA AGAGAAATTG GCTTTCAGAT TATTTGGATT
301 AAAAACAAAG ACTTCTTAA GAGATGTAAA ATTTTCATGA TGTTCCTTTT TTTGCTAAAA
361 CTAAAGAATT ATTCCTTTAC ATTTTCAGTT TTCTTGATCA TGAAAACGCC AACAAAATTC
421 TGAATCGGCC AAAGAGGTAT AATTCAGGTA AATTGGAAGA GTTGTGTCAG GGAATCTAG
481 AGAGAGAATG TATGAAGAA AAGTGTAGTT TTGAAGAAGC ACGAGAAGTT TTTGAAAACA
541 CTGAAAAGAAC AACTGATTTT TGGGAAGCAGT ATGTTGATGG AGATCAGTGT GAGTCCAATC
601 CATGTTTAAA TGGCGGCAGT TGCAAGGATG ACATTAATTC CTATGAATGT TGGTGTCCCT
661 TTGGATTTGA AGGAAAGAAC TGTGAATTAG ATGTAACATG TAACATTAAG AATGGCAGAT
721 GCGAGCAGTT TTGTAAAAAT AGTGCTGATA ACAAGGTGGT TTGCTCCTGT ACTGAGGGAT
781 ATCGACTTGC AGAAAACCAAG AAGTCCTGTG AACCCAGCAGT GCCATTTCCTA TGTGGAAGAG
841 TTTCTGTTTC ACAAACTTCT AAGCTCACCC GTGCTGAGAC TGTTCCTTCT GATGTGGACT
901 ATGTAAATTC TACTGAAGCT GAAACCATTT TGGATAACAT CACTCAAAGC ACCCAATCAT
961 TTAATGACTT CACTCGGTT GTTGGTGGAG AAGATGCCAA ACCAGGTCAA TCCCTTGGC
1021 AAGTTGTTTT GAATGATGTT GTTGATGCAT TCTGTGGAGT CTTATCGTT AATGAAAAAT
1081 GGATTGTAAC TGCTGCCAC TGTGTTGAAA CTGGTGTAA AATTACAGTT GTCGCAGGTG
1141 AACATAATAT TGAGGAGACA GAACATACAG AGCAAAAGCG AATGTGATT CGAATATTTC
1201 CTCACCACAA CTACAATGCA GCTATTAATA AGTACAACCA TGACATTGCC CTTCTGGAAC
1261 TCGACGAACC CTTAGTGCTA AACAGCTACG TTACACCTAT TTGCAATTGCT GACAAGGAAT
1321 ACACGAACAT CTTCTCATAA TTTGGATCTG GCTATGTAAG TGGCTGGGGA AGAGTCTTCC
1381 ACAAGGGGAG ATCAGCTTTA GTTCTTCAGT ACCTTAGAGT TCCACTTGTT GACCGAGCCA
1441 CATGTCTTCG ATCTACAAAG TTCACCATCT ATAACAACAT GTTCTGTGCT GGCTTCCATG
1501 AAGGAGGTAG AGATTCAATG CAAGGAGATA GTGGGGGACC CCATGTTACT GAAGTGGAAG
1561 GGACCAAGTT CTTAACTGGA ATTATTAGCT GGGGTGAAGA GTGTGCAATG AAAGGCAAT
1621 ATGGAATATA TACCAGGTG TCCCGGTATG TCAACTGGAT TAAGGAAAAA ACAAGCTCA
1681 CTGGTGGCGG TGGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CGGATCAGGT GGGGTGGAT
1741 CAGGCGGTGG AGGTTCCGGT GCGGGGGGAT CAGCGCAGGT GCAGCTGCAG GAGTCTGGGG
1801 GAGGCTTGGT ACAGCTGGG GGGTCCCTGA GACTCTCCTG TGCAGCTCTT GGATTCTATG
1861 TTAGCAGGTA TGCCATGAGC TGGGTCCGCC AGGCTCCAGG GAAGGGGCCA GAGTGGGTCT
1921 CAGGTATTAG TGGTAGTGGT GGTAGTACAT ACTACGCAGA CTCCGTGAAG GGCCGGTTCA
1981 CCGTCTCCAG AGACAATTC AAGAACACGC TGTATCTGCA AATGAACAGC CTGAGAGCCG
2041 AGGACACGGC TGTATATTAC TGCGCCCGGG GCGCCACCTA CACCAGCCGG AGCGACGTGC
2101 CCGACACGAG CAGCTTCGAC TACTGGGGCC AGGGAACCTT GGTCACCGTC TCCTCAGGGA
2161 GTGCATCCGC CCCAAGCTT GAAGAAGGTG AATTTTCAGA AGCACGCGTA TCTGAACTGA
2221 CTCAGGACCC TGCTGTGTCT GTGGCCTTGG GACAGACAGT CAGGATCACA TGCCAAGGAG
2281 ACAGCTCAG AAACTTTTAT GCAAGCTGGT ACCAGCAGAA GCCAGGACAG GCCCTACTC
2341 TTGTCTCTTA TGGTTAAGT AAAAGGCCCT CAGGGATCCC AGACCGATTC TCTGCTCCA
2401 GCTCAGGAAA CACAGCTTCC TTGACCATCA CTGGGCTCA GCGGGAAGAT GAGGCTGACT
2461 ATTACTGCCT GCTGTACTAC GCGGCGGGC AGCAGGGCGT GTTCGGCGGC GGCACCAAGC
2521 TGACCGTCTT ACGTCAGCCC AAGGCTGCCC CCTCGGTAC TCTGTTCCCG CCCTCTTCTG
2581 CGGCTGTA

```

20

30

40

F I X - 9 0 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、そして F I X を S C E 5 に接続するリンカー領域は下線を付している。

【0 5 0 4】

【化 7 6】

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG KLEEFVQGNL
61  ERECMEEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN PCLNGGSCKD DINSYECWCP
121 FGFEGKNCEL DVTCTNIKNGR CEQFCKNSAD NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR
181 VSVSQTSKLT RAETVFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW
241 QVVLNGKVDA FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRII
301 PHHNYNAAIN KYNHDIALE LDEPLVLNSY VTPICIADE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF
361 HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
421 GTSFLTGIIS WGEECAMKRGK YGIYTKVSRV VNWIKKTKL TGGGGSGGGG SGGGGSGGGG
481 SGGGGSGGGG SAQVQLQESG GGLVQPGGSL RLSCAASGFM FSRYAMSWVR QAPKGPEWV
541 SGISGSGGST YYADSVKGRF TVSRDNSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAR GATYTSRSDV
601 PDQTSFDYWG QGTILVTVSSG SASAPKLEEG EFSEARVSEL TQDPAVSVAL GQTVRITCQG
661 DSLRNFYASW YQKPGQAPT LVIYGLSKRP SGIPDRFSAS SSGNTASLTI TGAQAEDEAD
721 YYCLLYYGGG QQGVFGGGK LTVLRQPKAA PSVTLEPPSS AA*

```

10

F V I I - 0 8 8 の D N A 配列

【 0 5 0 5 】

【化 7 7】

```

1  ATGGTCTCCC AGGCCCTCAG GCTCCTCTGC CTTCTGCTTG GGCTTCAGGG CTGCCTGGCT
61  GCAGTCTTCG TAACCCAGGA GGAAGCCAC GGCCTCCTGC ACCGGCGCGG GCGCGCCAAC
121 GCGTTCTCGG AGGAGCTGCG GCCGGGCTCC CTGGAGAGGG AGTGCAAGGA GGAGCAGTGC
181 TCCTTCGAGG AGGCCCGGGA GATCTTCAAG GACGCGGAGA GGACGAAGCT GTTCTGGATT
241 TCTTACAGTG ATGGGGACCA GTGTGCCTCA AGTCCATGCC AGAATGGGGG CTCCTGCAAG
301 GACCAGCTCC AGTCTATAT CTGCTTCTGC CTCCTGCCT TCGAGGGCCG GAACTGTGAG
361 ACGCACAAGG ATGACCAGCT GATCTGTGTG AACGAGAACG GCGGCTGTGA GCAGTACTGC
421 AGTGACCACA CGGGCACCAA GCGCTCCTGT CCGTGCCACG AGGGGTACTC TCTGCTGGCA
481 GACGGGGTGT CCTGCACACC CACAGTTGAA TATCCATGTG GAAAAATACC TATTCTAGAA
541 AAAAGAAATG CCAGCAAACC CCAAGGCCGA ATTGTGGGGG GCAAGGTGTG CCCCAGGGG
601 GAGTGTCCAT GGCAGGTCCT GTTGTGGTG AATGGAGCTC AGTTGTGTGG GGGGACCTG
661 ATCAACACCA TCTGGGTGGT CTCCGCGGCC CACTGTTTCG ACAAATCAA GAACTGGAGG
721 AACCTGATCC CGGTGCTGGG CGAGCACGAC CTCAGCGAGC ACGACGGGGA TGAGCAGAGC
781 CCGCGGGTGG CCGAGGTGTC CATCCCCAGC ACGTACGTCC CGGGCACCAC CAACCACGAC
841 ATCGCGCTGC TCCGCCGTCG CCAGCCCGTG GTCCCTCACTG ACCATGTGGT GCCCCTCTGC
901 CTGCCCGAAC GGACGTTCTC TGAGAGGACG CTGGCCTTCG TCGCCTTCTC ATTGGTCAGC
961 GGCTGGGGCC AGCTGCTGGA CCGTGCGGCC ACGGCCCTGG AGCTCATGGT CCTCAACGTG
1021 CCCCAGCTGA TGACCCAGGA CTGCCTGCAG CAGTCACGGA AGGTGGGAGA CTCCCCAAAT
1081 ATCAGCGAGT ACATGTTCTG TGCCGGCTAC TCGGATGGCA GCAAGGACTC CTGCAAGGGG
1141 GACAGTGGAG GCCCACATGC CACCCACTAC CGGGGCACGT GGTACCTGAC GGGCATCGTC
1201 ACGTGGGGCC AGGCTCGGCA AACCTGGGGC CACTTTGGGG TGTACACCAG GGTCTCCAG
1261 TACATCGAGT GGCTGCAAAA GCTCATGCGC TCAGAGCCAC GCCCAGGAGT COTCCTGCGA
1321 GCCCATTTTC CCGGTGCGGG TGGCTCCGGC GGAGGTGGGT CCGGTGGCGG CGGATCAGGT
1381 GGGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCGGGT GCGGGGGGAT CCGACAAAAC TCACACATGC
1441 ACCGTCGCC ACTACAAGAC CACGCTCCC GTGTGGACT TCTTCTCTT CCCCCAAAA
1501 CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG
1561 AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
1621 GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC
1681 ACGTCCCTGC CAGCAGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT TCCCAACAAA
1741 GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
1801 CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC
1861 TGCTGTGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
1921 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC GTGTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCTCTC
1981 TACAGCAAGC TCACCGTCGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
2041 GTGATGCTAG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGT
2101 AAACGGCGCC GCCGGAGCGG TGGCGGCGGA TCAGTTGGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT
2161 TCCGGTGGCG GGGATCCGG CGGTGGAGGT TCCGGTGGGG GTGGATCAAG GAAGAGGAGG
2221 AAGAGGGACA TCGTAGTAG CCAGGCCGCC CCCAGCGTGC CCGTGACCCC CGGCGAGAGC
2281 GTGAGCATCA GTCGCCGAG CAGCCGGAGC CTGCTGCACA GCAACGGCAA CACCTACCTG
2341 TGCTGGTTCC TGACGCGGCC CGGCCAGAGC CCCCAGCTGC TGATCTACCG GATGAGCAAC
2401 CTGGCCAGCG GCGTGCCCGA CCGTTTCAGC GGCAGCGGCA GCGGCACCGC CTTACCCCTG
2461 CGGATCAGCC GGTGAGAGC CGAGGACGTG GCGGTGTACT ACTGCATGCA GCACCTGGAG
2521 TACCCCTTCA CTTTCGGCAG CGGCACCAAG CTGGAGATCA AGCGGGGCGG CGGCGGCAGC
2581 GCGGGCGGCG GCAGCGCGCG CGGCGGCAGC CAGGTGCAGC TGACAGCAGG CCGCGCCGAG
2641 CTGGTGCGGC CCGCACCAAG CGTGAAGATC AGCTGCAAGG CCAGCGGCTA CACCTTACC
2701 AACTACTGGC TGGGCTGGGT GAAGCAGCGG CCGGCCACG GCCTGGAGTG GATCGGCGAC
2761 ATCTACCCCG GCGCGGCTA CAACAAGTAC AACGAGAACT TCAAGGGCAA GGCCACCTG
2821 ACCGCCGACA CCAGCAGCAG CACCGCTTAC ATGCAGCTGA GCAGCCTGAC CAGCGAGGAC
2881 AGCGCGGTGT TCTTCTGCG CCGGGAGTAC GGCAACTACG ACTACGCCAT GGACAGCTGG
2941 GGCCAGGGCA CCAGCGTGAC CGTGAGCAGC GGTGGCGGTG GCTCCGGCGG AGGTGGGTCC
3001 GGTGGCGGCG GATCAGGTGG GGTGGATCA GCGGTGGAG GTTCCGGTGG CCGGGGATCA
3061 GACAAAATC ACACATGCC ACCGTGCCCA GCACCGGAAC TCCTGGGCGG ACCGTACGTC
3121 TTCCTCTTCC CCCCCAAAC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTACA
3181 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC
3241 GCGGTGGAGG TGATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
3301 CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG
3361 TGCAAGGTCT CCAACAAGC CTTCCAGCC CCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA
3421 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCAT CCGGGATGA GCTGACCAAG
3481 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
3541 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAAC TACAAGACCA CGCTCCCGT GTTGGACTCC
3601 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG
3661 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC
3721 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA

```

10

20

30

40

F V I I - 0 8 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、プロペプチドは、二重の下線であり、F c 領域に対して F V I I または A P 3 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、A P 3 s c F v はイタリック体であり、そしてプロタンパク質転換酵素プロセッシング部位を有するリンカーは、太字で示している。

【0 5 0 6】

【化 7 8】

1 MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS LERECKEEQC
 61 SFEEAREIEFK DAERTKLEWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK DQLQSYICFC LPAFEGRNCE
 121 THKDDQLICV NENGGEQYC SDHTGTRKSC RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE
 181 KRNASKPQGR IVGGKVCCKG ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR
 241 NLIAVLGEHD LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPIC
 301 LPERTFSERT LAFVRFSLSV GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ QSRKVGDSNP
 361 ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ
 421 YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC
 481 PPCPAPELLG GPSVFLFPEK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 541 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 601 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL
 661 YSKLTVDKSR WQGNVFSKS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG **KRRRRSGGGG** **SGGGSGGGG**
 721 **SGGGSGGGG** **SGGGSRKRR** **KRDIVMTQAA** PSVPVTPGES VSISCRSSRS LLHSNGNTYL
 781 *CWFLQRPQGS* *PQLLIYRMSN* *LASGVPRFS* *GSSTGTAFTL* *RISRVEAEDV* *GVYCMQHLE*
 841 *YPFTFGSGTK* *LEIKRGGGGS* *GGGGSGGGGS* *QVQLQSGAE* *LVRPGTSVKI* *SCKASGYTFT*
 901 *NYWLGWVKQR* *PGHGLEWIGD* *IYPGGGYNKY* *NENFKGKATL* *TADTSSSTAY* *MQLSSTLSED*
 961 *SAVYFCAREY* *GNVDYAMDSW* *GQGTSTVTVSS* *GGGGSGGGGS* *GGGGSGGGGS* *GGGGSGGGGS*
 1021 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 1081 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 1141 GQPREPQVYT LPISRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 1201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQGG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK*

10

F V I I I - 0 4 1 の D N A 配列

【 0 5 0 7】

【化 7 9 - 1】

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGATTCTG CTTTAGTGCC
 61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
 121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCCT CCTAGAGTGC CAAATCTTT TCCATTCAAC
 181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
 241 GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT
 361 GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG

20

【化 7 9 - 2】

421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTCTG
 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 ACAAAGAAGT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
 721 GCTGCATCTG CTCGGGCGCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
 781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC
 841 ACCACTCCTG AAGTGCACCTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
 901 CGCCAGGCGT CCTTGAAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
 961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
 1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
 1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
 1141 GATCAGCAGT ATCCTTCGCTT TATCCAAAAT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCATAAACT
 1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCTGCC
 1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
 1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATA CACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
 1381 ATTACGATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG
 1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGATTC AAGGAGATTA CCAAAGGTG TAAACATTT GAAGGATTTT
 1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAAAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
 1621 ACTAAATCAG ATCCTTCGCTT CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
 1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
 1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC AGCTGGAGTG
 1861 CAGCTTGAGG ATCCGAGATT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
 1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
 1981 ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTCTGTGC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
 2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCATTTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTCTG
 2101 ATGGAAGAAC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTCG GAACAGAGGC
 2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
 2221 AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC
 2281 TTCTCTCAAA ACCCACCAGT CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
 2341 CAGTCAGATC AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
 2401 GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCCC GCAGCTTTCA AAAGAAAACA
 2461 CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT ATGGGATGAG TAGCTCCCCA
 2521 CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC AGTGTCCCTC AGTCAAGAA AGTTGTTTTT
 2581 CAGGAATTTA CTGATGGCTC CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT
 2641 TTGGGACTCC TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTC
 2701 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC TTAATTTCTTA TGAGGAAGAT
 2761 CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC CTAATGAAAC CAAAACCTAC
 2821 TTTTGGAAAG TGCAACATCA TATGGCACCC ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG
 2881 GCTTATTTCT CTGATGTTGA CCTGGAAGAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCTTT
 2941 CTGGTCTGCC ACACCTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 3001 TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC TGAAAATATG
 3061 GAAAGAAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG ATCCCACTTT TAAAGAGAAT
 3121 TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT
 3181 CAGGATCAAA GGATTCGATG GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAA CATCCATTCT
 3241 ATTCATTTC A GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT TACCATCCAA AGCTGGAATT
 3361 TGGCGGTGG AATGCCCTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG GGATGAGCAC ACTTTTCTG
 3421 GTGTACAGCA ATAAGTGTC GACTCCCTG GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT
 3481 CAGATTACAG CTTCAGGACA ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
 3541 TCCGGATCAA TCAATGCCTG GAGCACCAAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
 3601 TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTGAGAA GTTCTCCAGC
 3661 CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
 3721 CGAGGAAATT CCACTGGAAC CTTAATGGTC TTCTTTGGCA ATGTGGATT C ATCTGGGATA
 3781 AAACACAATA TTTTAAACCC TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCAACTCAT
 3841 TATAGCATTC GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
 3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC TTCATCTTAC
 3961 TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAAGCT GACTTCACCT CCAAGGGAGG
 4021 AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGAATTCAG
 4081 AAGACAATGA AAGTCACAGG AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
 4141 TATGTGAAGG AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT

10

20

30

40

【化 7 9 - 3】

4201 CAGAAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC TGTGGTGAAC
 4261 TCTCTAGACC CACCGTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC ACCCCAGAG TTGGGTGCAC
 4321 CAGATTGCC TGAGGATGGA GGTTCGGGC TCGGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC
 4381 CACACATGCC CACCGTCCC AGCTCCAGAA CTCCTGGGCG GACCGTCAGT CTTCTCTTC
 4441 CCCCCAAAG CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG
 4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
 4561 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC
 4621 AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC
 4681 TCCAAACAAAG CCTTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC
 4741 CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCA TCCCGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC
 4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
 4861 AATGGGACCG CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGTTGGACTC CGACGGCTCC
 4921 TTCTTCTCT ACAGCAAGGT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC
 4981 TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
 5041 TCTCCGGGTA AAGTGCGCG CGGATCAGGT GGGGGTGGAT CAGGCGGTGG AGGTTCGGGT
 5101 GGCGGGGGAT CAGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCTGGGA
 5161 GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAA CCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC
 5221 CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
 5281 TGGTACGTGG ACGCGGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGGGA GGAGCAGTAC
 5341 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
 5401 AAGGAGTACA AGTCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCTCGA GAAAACCATC
 5461 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCTGCCCC ATCCCGCGAT
 5521 GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCGAGCAG
 5581 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC
 5641 GTGTTGGACT CCGACGGTCT CTTCTCTCTC TACAGCAAGC TCACCGTGG CAAGAGCAGG
 5701 TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 5761 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

10

F V I I I - 0 4 1 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、そして F
c 領域を接続するリンカー領域は下線を付している。

20

【0 5 0 8】

【化 8 0】

1 MQIELSTCF LCLLRFCFSA TRRYLGAIVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP PRVPKSFPEF
 61 TSVVYKKTLE VETDHLFNI AKRPPWMLG LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHPVSLHAV
 121 GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFP GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH
 181 VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
 241 AASARAWPKM HTVNGYVNR LPLGLIGCHR SVYWHVIGMG TTPVHVSIFL EGHFTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP EPQLRMKNNE
 361 EAEDYDDDLT DSMMDVVRFD DNSSPSFIQI RSVAKKHPKT WVHYIAAEE DWYAPLVLA
 421 PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVREMA TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL
 481 LIIIFKNQASR PYNIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFY KWTVTVEDGP
 541 TKSDPRCLTR YSSFFVNMR DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYLTEI QRLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS
 661 IGAQTDFLSV FFSGYTFKH MVEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFERNRG
 721 MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNPVPLKR HQREITRTL
 781 QSDQEEIDYD DTISVEMKKE DFDIYEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LDWYGMSSSP
 841 HVLNRNQAQG SVQFVKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSF YSSLISYED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP TKDEFDCAW
 961 AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNLTNP AHGRQVTVQE FALFFTIFDE TKSIFYTENM
 1021 ERNCRAPCNI QMEDPTFEN YRFHANGYI MDTLPLGVMA QDQIRRWYLL SMGSNENIHS
 1081 IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
 1141 VYSNKCQTPL GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV FFGNVDSSGI
 1261 KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY
 1321 FTMNFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN PKEWLQVDFQ KTMKVTVGVT QGVKSLLTSM
 1381 YVKEFLISS QDGHQWTLFF QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
 1441 QIALRMEVLG CEAQDLYDKT HTPCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
 1561 SNKALPAPIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 1621 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQGNVF SCVMHEALH NHYTQKSLSL
 1681 SPKGKGGGSG GGGSGGGGSG GGGSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 1741 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG
 1801 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD
 1861 IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQGNVVFSCS VMHEALHNHY
 1921 TQKSLSLSPG K*

30

40

F V I I I - 1 0 8 の D N A 配列

【0 5 0 9】

【化 8 1 - 1】

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC
 61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
 121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
 181 ACCTCAGTCG TGTACAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
 241 GCTAAGCCAA GGCCACCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT
 361 GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
 421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTG
 481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTCTCAT
 541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
 601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
 661 TTTGATGAAG GGAAGTTG GCACCTCAGAA ACAAAGAAGT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
 721 GCTGCATCTG CTGGGGCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
 781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC
 841 ACCACTCCTG AAGTGCACCT AATATTCCCTC GAAGGTCACA CATTCTTTGT GAGGAACCAT
 901 CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
 961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
 1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
 1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
 1141 GATGACAACCT CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
 1201 TGGGTATCTG CTAGGCTGTC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCGGCC
 1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
 1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
 1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG
 1441 TTGATTATAT TTAAGAAATC AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
 1561 CCAATCTGTC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
 1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
 1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAGAAGATC TGTAGATCAA
 1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCTATC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC AGCTGGAGTG
 1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
 1921 TTTGATAGTT TGCAATTGTC AGTTTGTGTTG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTTCTAAGC
 1981 ATTTGAGCAC AGACTGACTT CCTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
 2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCATATC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTGCG
 2101 ATGGAAAACC CAGCTATATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTCG GAACAGAGGC
 2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
 2221 AGTTATGAAG ATATTTTAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC
 2281 TTCTCTCAAA ACCCACCAGT CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
 2341 CAGTCAGATC AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
 2401 GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCCC GCAGCTTTCA AAAGAAAACA
 2461 CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT ATGGGATGAG TAGCTCCCA
 2521 CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC AGTGTCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTTC
 2581 CAGGAATTTA CTGATGGCTC CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAAGT AAATGAACAT
 2641 TTGGGACTCC TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTC
 2701 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCTTTC TATTCTAGCC TTATTTCTTA TGAGGAAGAT
 2761 CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC CTAATGAAAC CAAAACCTTAC
 2821 TTTTGAAAG TGCAACATCA TATGGCACCC ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG
 2881 GCTTATTTCT CTGATGTTGA CCTGGAAGAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT
 2941 CTGGTCTGCC AACTAACAC ACTGAACCCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 3001 TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC TGAATAATG
 3061 GAAAGAAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG ATCCCACTTT TAAAGAGAAT
 3121 TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT
 3181 CAGGATCAAA GGATTCGATG GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAAA CATCCATTCT
 3241 ATTCATTTCA GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 3301 TACAATCTCT ATCCAGTGT TTTTGAGACA GTGGAATGT TACCATCCAA AGCTGGAATT
 3361 TGGCGGGTGG AATGCCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG GGATGAGCAC ACTTTTCTG
 3421 GTGTACAGCA ATAAGTGTCA GACTCCCTG GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT
 3481 CAGATTACAG CTTACAGGACA ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
 3541 TCCGATCAA TCAATGCCTG GAGACCAAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG

10

20

30

【化 8 1 - 2】

```

3601 TTGGCACCAC TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA GTTCTCCAGC
3661 CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
3721 CGAGGAAATT CCACCTGGAAC CTTAATGGTC TTCTTTGGCA ATGTGGATTG ATCTGGGATA
3781 AAACACAATA TTTTAAACCC TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCCAATCAT
3841 TATAGCATTC GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC TTCATCCTAC
3961 TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC GACTTCACCT CCAAGGGAGG
4021 AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGAATTCCAG
4081 AAGACAATGA AAGTCACAGG AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
4141 TATGTGAAGG AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
4201 CAGAAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC TGTGGTGAAC
4261 TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCAATTC ACCCCAGAG TTGGGTGCAC
4321 CAGATTGCCC TGAGGATGGA GGTTCCTGGG TGCAGGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC
4381 CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCTGGGAG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC
4441 CCCCCAAAC CCAAGGACCC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
4561 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC
4621 AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC
4681 TCCAACAAAG CCCTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC
4741 CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCA TCCCGCGATG AGCTGACCAA GAACCGGTC
4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
4861 AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCTCCCG TGTGGACTC CGACGGCTCC
4921 TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTCGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC
4981 TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
5041 TCTCCGGGTA AACGGCGCGG CCGGAGCGGT GCGGCGGGAT CAGGTGGGGG TGGATCAGGC
5101 GGTGGAGGTT CCGGTGGCGG GGGATCCGCG GGTGGAGGTT CCGGTGGGGG TGGATCAAGG
5161 AAGAGGAGGA AGAGGGCGCA GGTGCAGCTG CAGGAGTCTG GGGGAGGCTT GGTACAGCCT
5221 GGGGGGTCCT TGAGACTCTC CTGTGCAGCC TCTGGATTCA TGTTTAGCAG GTATGCCATG
5281 AGCTGGGTCC GCCAGGCTCC AGGGAAGGGG CCAGAGTGGG TCTCAGGTAT TAGTGGTAGT
5341 GGTGGTAGTA CATACTACCG AGACTCCGTG AAGGGCCGGT TCACCGTCTC CAGAGACAAT
5401 TCCAAGAACA CGCTGTATCT GCAAATGAAC AGCCTGAGAG CCGAGGACAC GGCTGTATAT
5461 TACTGCCGCC GGGGCCCCAC CTACACCAGC CGGAGCGACG TGCCCGACCA GACCAGCTTC
5521 GACTACTGGG GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG GGAGTGCATC CGCCCCAAAG
5581 CTTGAAGAAG GTGAATTTTC AGAAGCACCG GTATCTGAAC TGACTCAGGA CCTGCTGTG
5641 TCTGTGGCCT TGGGACAGAC AGTCAGGATC ACATGCCAAG GAGACAGCCT CAGAACTTTT
5701 TATGCAAGCT GGTACCAGCA GAAGCCAGGA CAGGCCCTA CTCTTGTCAT CTATGGTTTA
5761 AGTAAAGGCC CCTCAGGGAT CCCAGACCGA TTCTCTGCCT CCAGCTCAGG AAACACAGCT
5821 TCCCTTGACG TCACCTGGG TCGGCGGGA GATGAGGCTG ACTATTACTG CCTGCTGTAC
5881 TACGGCGGCG GCCAGCAGGG CGTGTTCGGC GCGGCGACCA AGCTGACCGT CCTACGTCAG
5941 CCAAGGCTG CCCCCCGGT CACTCTGTTT CCGCCCTCTT CTGCGGCGGG TGGCGGTGGC
6001 TCCGGCGGAG GTGGGTCCGG TGGCGGCGGA TCAGGTGGGG GTGGATCAGG CCGTGGAGGT
6061 TCCGGTGGCG GGGGATCAGA CAAAACCTAC ACATGCCAC CGTGCCGAGC ACCGGAACCT
6121 CTGGGCGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCTT CATGATCTCC
6181 CGGACCCTTG AGGTACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG
6241 TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
6301 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCTCACCG TCCTGCACCA GGAAGGCTG
6361 AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
6421 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACACAGG TGTACACCTT GCGCCCATCC
6481 CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC
6541 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCAAG
6601 CCTCCCGTGT TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG
6661 AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGG TCTGCACAA
6721 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGTAAT GA

```

10

20

30

F V I I I - 1 0 8 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、F c 領域に対して S C E 5 を接続するリンカー領域は、下線を付しており、そしてプロタンパク質転換酵素プロセッシング部位を有するリンカーは、太字で示している。

【0 5 1 0】

【化 8 2】

1 MQIELSTCEFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAIVE LSWDYMQSDI GELPVDARFP PRVPKSFPPN
 61 TSVVYKKTLEF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHPVSLHAV
 121 GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPQ GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH
 181 VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
 241 AASARAWPKM HTVNGYVNRN LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTEPVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLIM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP EPQLRMKNNE
 361 EAEYDDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA
 421 PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVREMAY TDETFTKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDITL
 481 LIIFKNQASR PYNIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
 541 TKSDPRCLTR YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVEDE
 601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSIQLSVCL HEVAYWYILS
 661 IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMN MENPGLWILG CHNSDFRNRG
 721 MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNPPLKR HQREITRITL
 781 QSDQEEIDYD DTISVEMKKE DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LDYGMSSSP
 841 HVLNRNAQSG SVPQFKKVVV QEFDTGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP TKDEFDCRAW
 961 AYFSDVDLEK DVHSGILGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE FALFFTIFDE TKSIFYTENM
 1021 ENRCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI MDTLPLGLVA QDQIRWYLL SMGSNENIHS
 1081 IHFSGHVFV RKKEEYKML YNLPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
 1141 VYSNKCQTPG GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIHGIK TQARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV FFGNVDSSGI
 1261 KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSLRME LMGCGLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY
 1321 FTMNFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT QGVKSLTSM
 1381 YVKEFLISS QDGHQWTLFF QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPLLLTRY LRHPQSWVH
 1441 QIALRMEVLG CAEQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYCKV
 1561 SNKALPAPIE KTISKAKQGP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 1621 NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 1681 SPGKRRRRSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSR KRRKRAQVQL QESGGGLVQP
 1741 GGSRLRLSCAA SGFMFSRYAM SWVRQAPGKG PEWVSGISGS GGSTYYADSV
 KGRFTVSRDN
 1801 SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCARGATYTS RSDVPDQTSF DYWGQGTIVT
 VSSGSASAPK
 1861 LEEGEFSEAR VSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDLSRNF YASWYQKPG
 QAPTIVLYGL
 1921 SKRPSGIPDR FSASSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCLLY YGGGQQGVFG
 GGTKLTVLRQ
 1981 PKAAPSVTLEF PPSSAAGGGG SGGGSGGGG SGGGSGGGG SGGGSGDKTH
 TCPPCPAPEL
 2041 LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV
 HNAKTKPREE
 2101 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVS NKALPAPIEK TISKAKQPR
 EPQVYTLPPS
 2161 RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF
 FLYSKLTVDK
 2221 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

10

20

30

p S Y N - F V I I I - 0 4 9 の D N A 配列

【0 5 1 1】

【化 8 3 - 1】

1 ATGCAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGGATTCTG CTTTAGTGCC
 61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCAATGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
 121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
 181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTCAACATC
 241 GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTT
 361 GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
 421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG
 481 AAAGAGAAAT GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTCTCAT
 541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
 601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
 661 TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAGAAGCT CCTGTATGCA GGATAGGGAT
 721 GCTGCATCTG CTCGGGCTG GCCTAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
 781 CTGCCAGTGG TCAATGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGAATGGGC
 841 ACCACTCTG AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGTCAACA CATTCTTGT GAGGAACCAT
 901 CGCCAGGCGT CTTTGGAAT CTCGCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
 961 GACCTTGAC AGTTTCTACT GTTTGTGTCAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA

40

【化 8 3 - 2】

1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
 1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
 1141 GATGACAACT CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACCT
 1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCGCC
 1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
 1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
 1381 ATTGAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG
 1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGATTTT AAGGAGATTA CCAAAGGTG TAAACATTT GAAGGATTTT
 1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGAAGTGAAG AGATGGGCCA
 1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTAA TATGGAGAGA
 1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAGAATC TGTAGATCAA
 1741 AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTCTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC AGCTGGAGTG
 1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
 1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTT CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTTAAGC
 1981 ATTTGGACAC AGACTTCTGC CTTTCTCTGT TTCTTCTCTG GATATACTTT CAAACACAAA
 2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCTTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTTATGTCG
 2101 ATGGAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAAC CAGACTTTCG GAACGAGGGC
 2161 ATGACCCGCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
 2221 AGTTATGAGG ATATTTCAGC ATACTTGTCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC
 2281 TTCTCTCAAA ACCCACCAGT CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
 2341 CAGTCAGATC AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAGGAA
 2401 GATTTTGACA TTTATGATGA GGTGAAAAT CAGAGCCCC GCAGCTTTCA AAAGAAAACA
 2461 CGACATGATT TATTGCTGTC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT ATGGGATGAG TAGCTCCCA
 2521 CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC AGTGTCCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTTT
 2581 CAGGAATTTA CTGATGGCTC CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT
 2641 TTGGGACTCC TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTT
 2701 AGAAATCAAG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC TTATTTCTTA TGAGGAAGAT
 2761 CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC CTAATGAAAC CAAAACCTTAC
 2821 TTTTGGAAAG TGCAACATCA TATGGCACC ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG
 2881 GCTTATTTCT CTGATGTTGA CCTGGAAAA GATGTGCACT CAGGCTGAT TGGACCCCTT
 2941 CTGGTCTGCC ACATTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 3001 TTTGCTCTGT TTTTACCATT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC TGAAAATATG
 3061 GAAAGAACT CGAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG ATCCCACTTT TAAAGAGAAT
 3121 TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT
 3181 CAGGATCAAA CTACGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
 3241 ATTCAATTCA GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAATGT TACCATCCAA AGCTGGAATT
 3361 TGGCGGGTGG AATGCCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG GGATGAGCAC ACTTTTCTG
 3421 GTGTACAGCA ATAAGTGTC GACTCCCTCG GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT
 3481 CAGATTACAG CTTTCAAGACA ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
 3541 TCCGGATCAA TCAATGCCTG GAGCACCAG GAGCCCTTTT CTGGATCAA GGTGGATCTG
 3601 TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA GTTCTCCAGC
 3661 CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG GGAAGAAGTG GCAGACTTAT
 3721 CGAGGAAATT CCACTGGAAC CTTAATGGTC TTCTTTGGCA ATGTGGATTG ATCTGGGATA
 3781 AAACACAATA TTTTAAACCC TCCAATTAT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCCAACTCAT
 3841 TATAGCATTC GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
 3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC TTCATCCTAC
 3961 TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC GACTTCACCT CCAAGGGAGG
 4021 AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGAATCCAG
 4081 AAGACAATGA AAGTACAGG AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
 4141 TATGTGAAGG AGTTCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
 4201 CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAAGGA AATCAAGACT CTTTACACAC TGTGGTGAAC
 4261 TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTTCAATTC ACCCCAGAG TTGGGTGCAC
 4321 CAGATTGCCC TGAGGATGGA GGTCTGGGC TGGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAACCT
 4381 CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCTGGGAG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC
 4441 CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
 4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCTTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
 4561 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCCGGGAG GAGCAGTACA ACAGACGTA CCGTGTGGTC
 4621 AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC
 4681 TCCAACAAG CCCTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAGGCCAA AGGGCAGCCC
 4741 CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGCATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC

10

20

30

40

【化 8 3 - 3】

4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
 4861 AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGTTGGACTC CGACGGCTCC
 4921 TTCTTCTCTT ACAGCAAGCT CACCGTCGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC
 4981 TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACAC CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
 5041 TCTCCGGGTA AACGGCGCCG CCGGAGCGGT GGCGGCGGAT CAGGTGGGGG TGGATCAGGC
 5101 GGTGGAGGTT CCGGTGGCGG GGGATCCGGC GGTGGAGGTT CCGGTGGGGG TGGATCAAGG
 5161 AAGAGGAGGA AGAGGGACAA AACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCTCC AGAACTCCTG
 5221 GCGGACCGT CAGTCTTCTT CTCCCCCA AAACCCAAGG ACACCTCAT GATCTCCCGG
 5281 ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCTGA GGTCAAGTTC
 5341 AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG
 5401 TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT
 5461 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC
 5521 ATCTCCAAAG CCAAGGGCAA GCGCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGG
 5581 GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTGAGCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC
 5641 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGAGGA ACAACTACAA GACCACGCGT
 5701 CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCTTCTTTC CTCTACAGCA AGCTCACCCT GGACAAGAGC
 5761 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTCTCATGTC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC
 5821 TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGA

10

F V I I I - 0 4 9 アミノ酸配列。シグナル配列は、破線の下線で示しており、そしてプロタンパク質転換酵素プロセッシング部位を有するリンカーは、太字で示している。

【化 8 4】

1 MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP PRVPKSFPPN
 61 TSVVYKTLF VFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVITLKNM ASHPVSLHAV
 121 GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPQ GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH
 181 VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
 241 AASARAWPKM HTVNGYVNRS LPGLIGCHRR SVYWHVIMGM TPEVHSLFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFLCH ISSHQHDGME AYVKVDSCE EPQLRMKNNE
 361 EAEYDQDDL TSEMDEVFRD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT WVHYIAAEE DWDYAPLVLA
 421 PDRSRYSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL
 481 LIIFKNQASR PYNIPYHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
 541 TKSDPRCLTR YSSSFVNMER DLASGLIGPL LICYESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFELPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS
 661 IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFNRG
 721 MTALLKVSSC DKNTGDYIED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNPPLKR HQREITRRTL
 781 QSDQEEIDYD DTISVEMKKE DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
 841 HVLNRNRAQSG SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSE YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP TKDEFDCKAW
 961 AYSFSDVLEK DVHSGILIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE FALFFTIFDE TKSIFYTENM
 1021 ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI MDTLPLGLVMA QDQIRIRWYLL SMGSNENIHS
 1081 IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
 1141 VYSNKCQTPL GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV FFGNVDSSGI
 1261 KHNIFFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY
 1321 FTMNFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM
 1381 YVKEFLISS QDGHQWTLFF QNGKVVFQNG NQDSFTPVVN SLDPLLLTRY LRIHPQSWVH
 1441 QIALRMEVLG CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
 1561 SNKALPAPIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 1621 NGQPNENYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQGNVFC SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 1681 SPGK**RRRRSG** **GGGSGGGGSG** **GGGSGGGGSG** **GGGSGGGGSR** **KRRKR**DKTHT CPFCPAPELL
 1741 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 1801 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
 1861 DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
 1921 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK*

20

30

【図 1】

増強された凝固因子Fc融合物の一般例：
効果増強のための血小板標的化

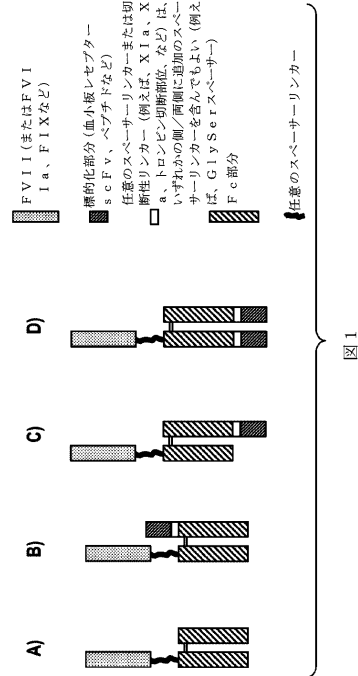


図 1

【図 2】

増強された凝固因子Fc融合物の一般例：
(プロテアーゼプロセッシング部位を有する)：効果増強のための血小板標的化

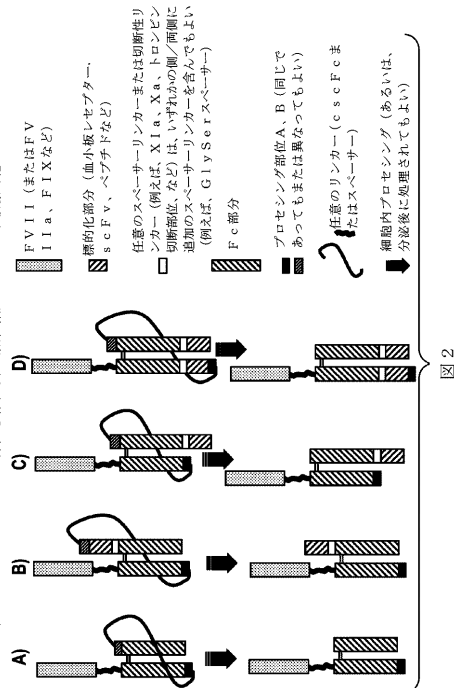


図 2

【図 3】

一般例：グリアラランスを低下するためのG1a置換/欠失での血小板標的化

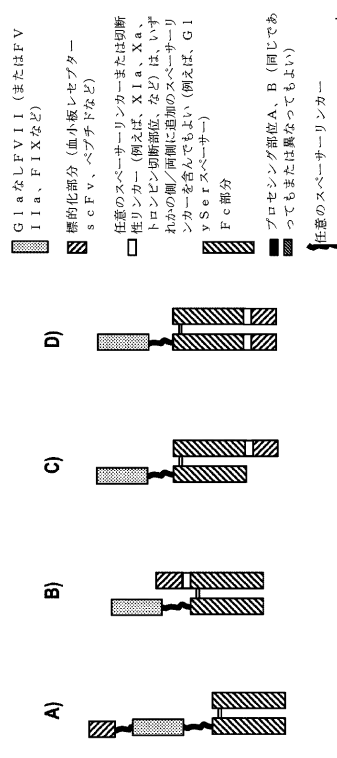


図 3

【図 4】

一般例：連鎖切断性リンカーを有する、グリアラランスを低下するためのG1a置換/欠失での血小板標的化

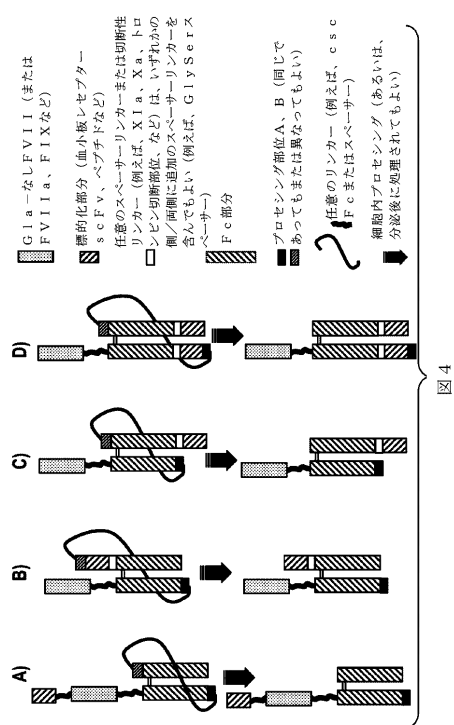


図 4

一般例：活性化FVIII構築物、活性化可能なFVIII構築物

【図5】

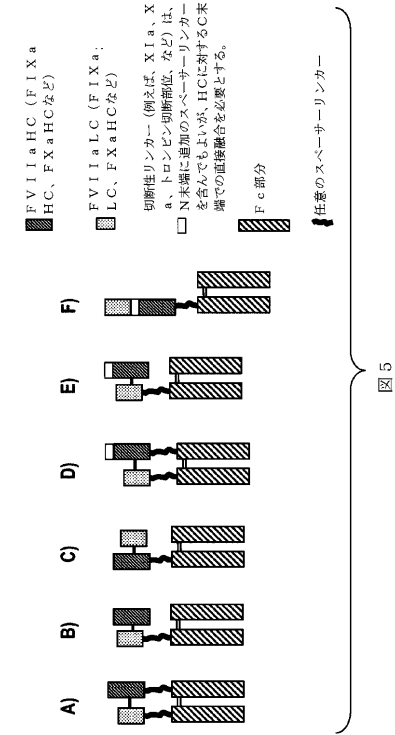


図5

【図6】

活性化FVIII構築物、単鎖切断性リンカーを有する活性化可能なFVIII構築物

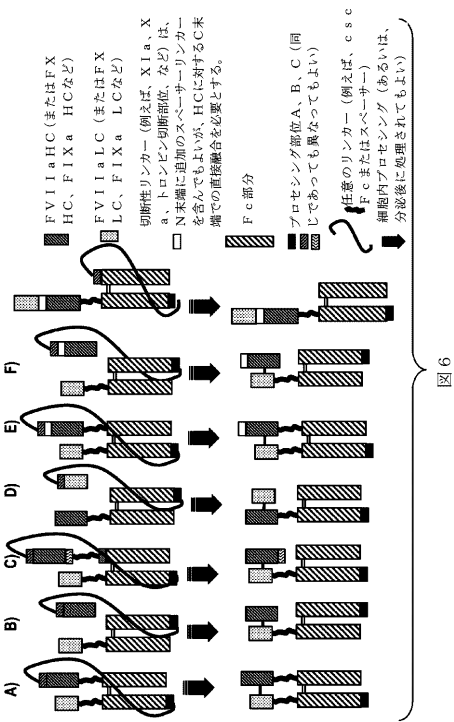


図6

増強された凝固因子（非Fc融合）の一般例：有効性増強のための血小板膜融合

【図7】

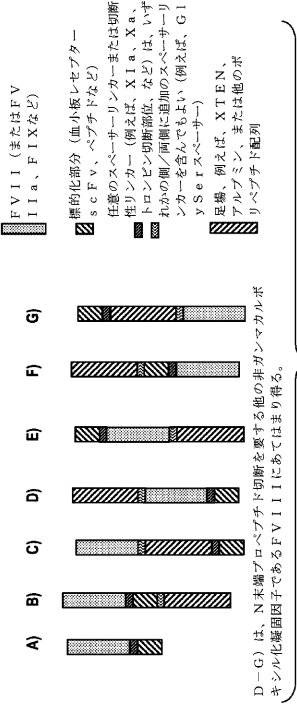


図7

【図8】

一般例：FVIII、FIX、FXに対する、クリアランスを低下するためのGla置換/欠失での血小板膜融合（非Fc融合）

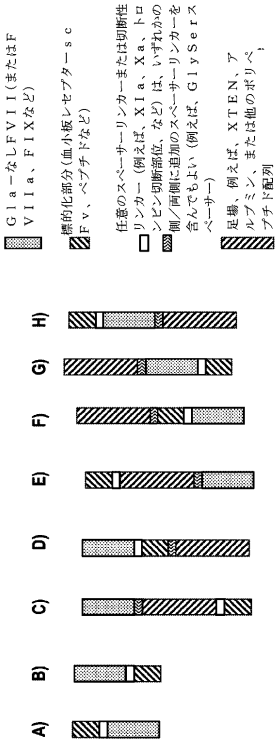
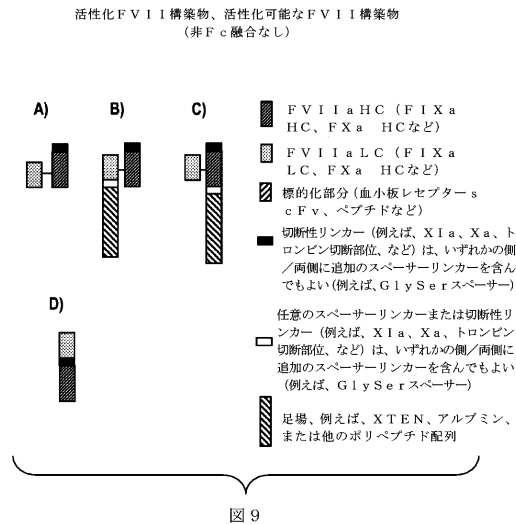


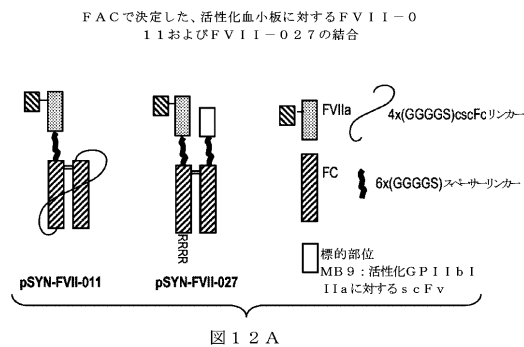
図8

A, D-F) は、N末端融合がGlaドメイン欠失ベクターでいまいや可能であるので、FVII, I, FIX, FXにあてはまり得る。

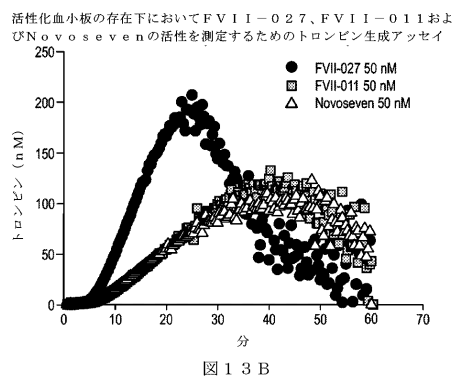
【図 9】



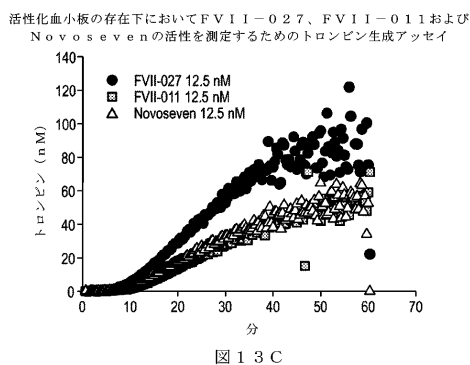
【図 12 A】



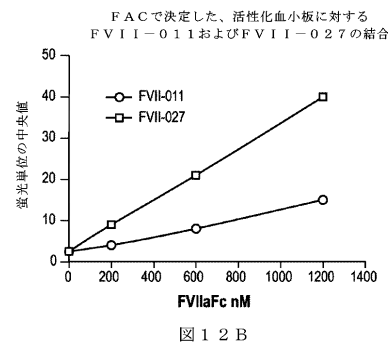
【図 13 B】



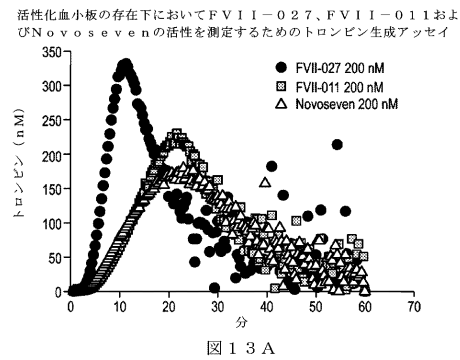
【図 13 C】



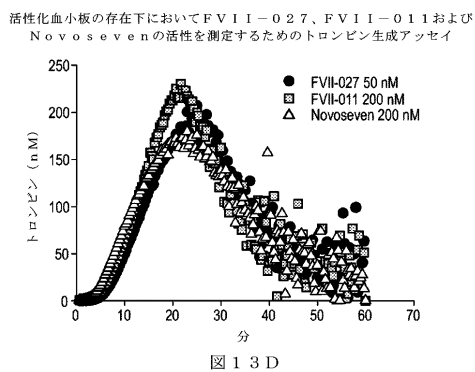
【図 12 B】



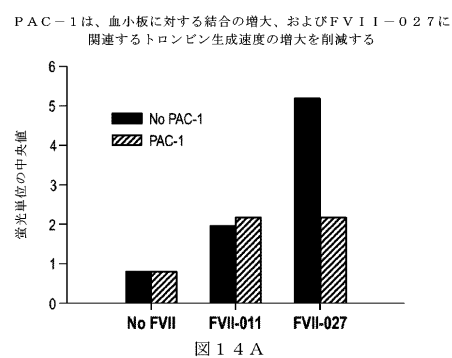
【図 13 A】



【図 13 D】



【図 14 A】



【図 14 B】

PAC-1 は、血小板に対する結合の増大、および FVII-027 に関連するトロンビン生成速度の増大を削減する

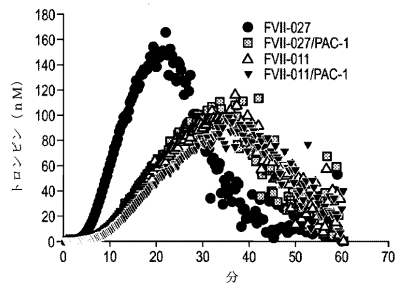


図 14 B

【図 15】

活性化血小板の存在下において FVII-037 および Novoseven の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

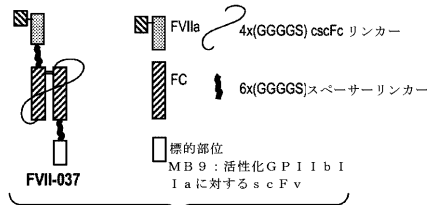


図 15

【図 16 A】

活性化血小板の存在下において FVII-037 および Novoseven の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

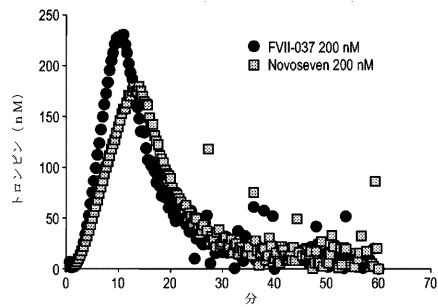


図 16 A

【図 16 B】

活性化血小板の存在下において FVII-037 および Novoseven の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

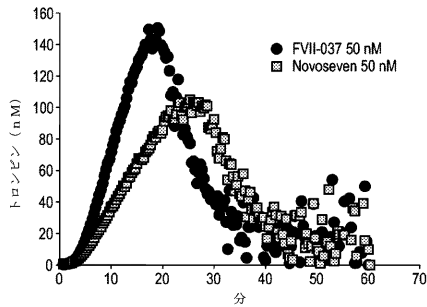


図 16 B

【図 16 C】

活性化血小板の存在下において FVII-037 および Novoseven の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

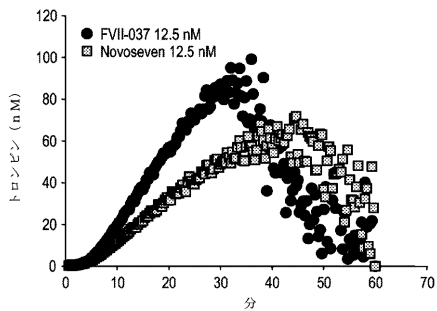
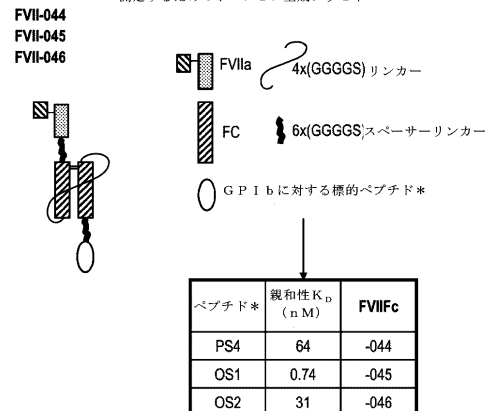


図 16 C

【図 17】

活性化血小板の存在下において FVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011 および Novoseven の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ



* Benardら、Biochemistry 2008、47: 4674~4682

図 17

【図 18 A】

活性化血小板の存在下においてFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

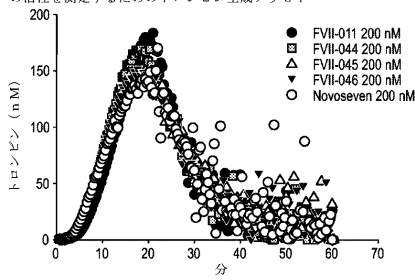


図 18 A

【図 18 B】

活性化血小板の存在下においてFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

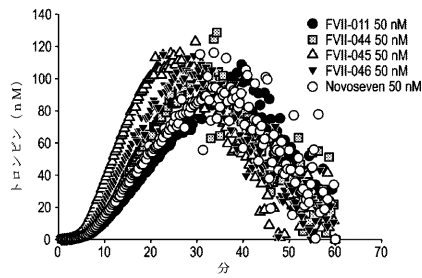


図 18 B

【図 18 C】

活性化血小板の存在下においてFVII-044、FVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

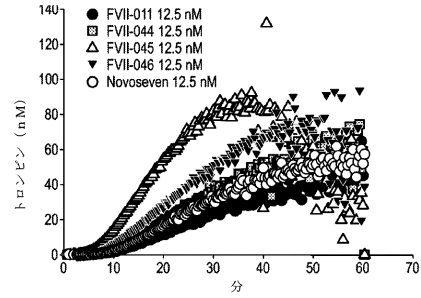


図 18 C

【図 18 D】

活性化血小板の存在下においてFVII-045、FVII-046、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

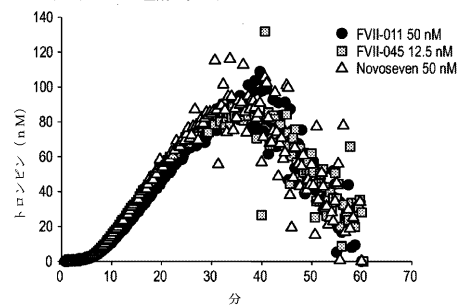
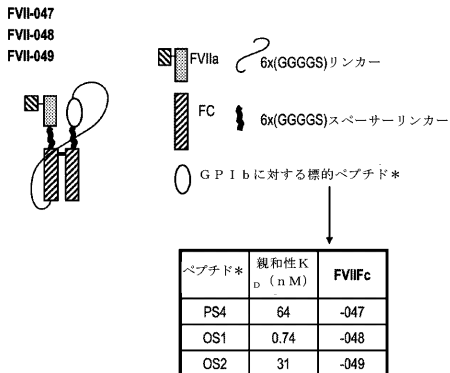


図 18 D

【図 19】

活性化血小板の存在下においてFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ



* Benardら、Biochemistry 2008、47:4674~4682

図 19

【図 20 A】

活性化血小板の存在下においてFVII-047、FVII-048、FVII-049、FVII-011およびNovosevenの活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

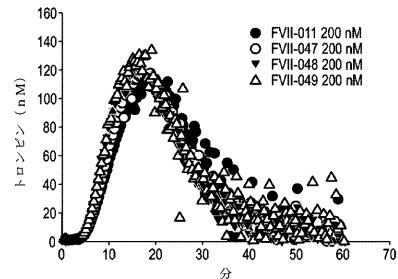


図 20 A

【図 20 B】

活性化血小板の存在下においてFVII-047、FVII-048、FVII-049、およびFVII-011の活性を測定するためのトロンビン生成アッセイ

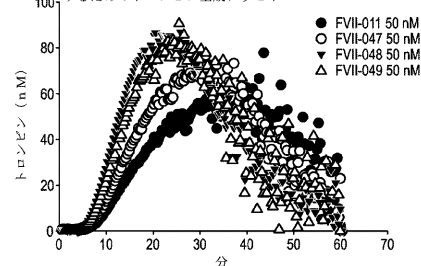


図 20 B

【図 20 C】

活性化血小板の存在下において FVII-047、FV-048、FVII-049、および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

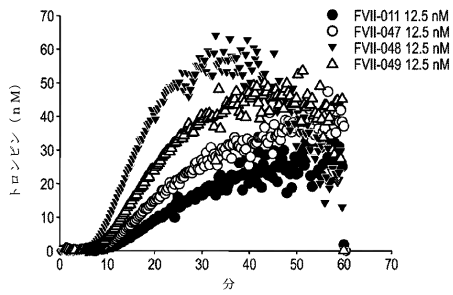


図 20 C

【図 20 D】

活性化血小板の存在下において FVII-047、FV-048、FVII-049、および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

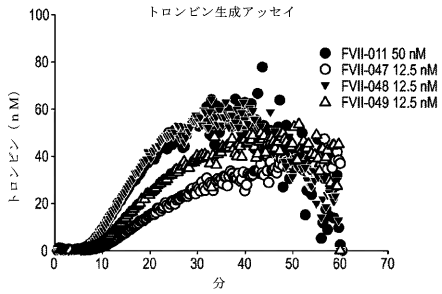


図 20 D

【図 22 B】

活性化血小板の存在下において FVII-053 および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

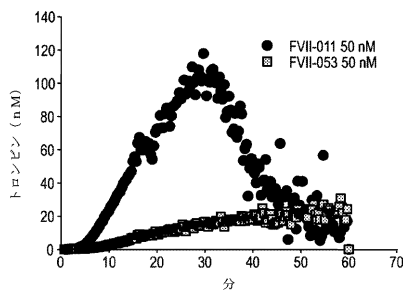


図 22 B

【図 22 C】

活性化血小板の存在下において FVII-053 および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

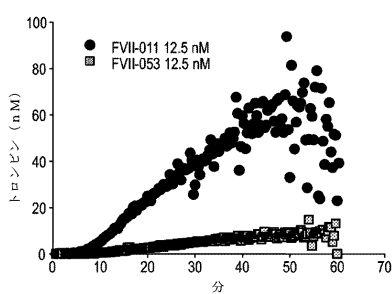


図 22 C

【図 21】

活性化血小板の存在下において FVII-053 および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

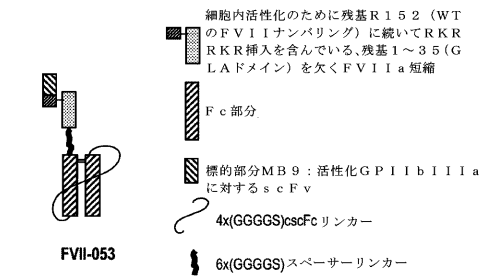


図 21

【図 22 A】

活性化血小板の存在下において FVII-053 および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

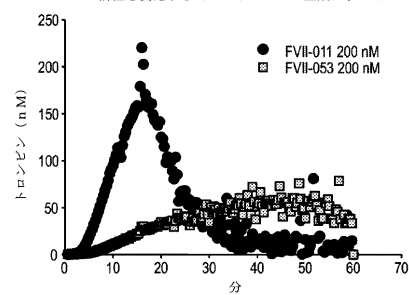


図 22 A

【図 22 D】

活性化血小板の存在下において FVII-053 および FVII-011 の活性を測定するための トロニン生成アッセイ

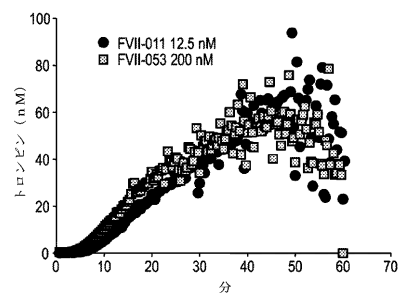


図 22 D

【図 23 A】

PAC-1 は、FVII-053 に関連する トロニン生成速度の増大を削減する

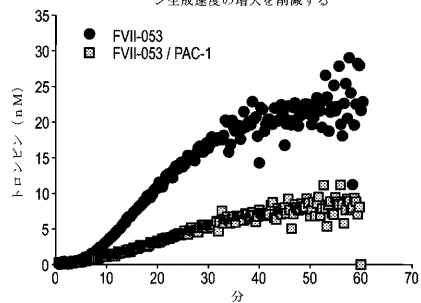


図 23 A

【图 23 B】

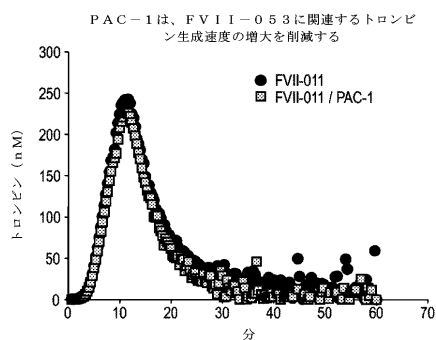


图 2-3-B

【图 24】

HEK293細胞の一時的なトランスフェクションおよびプロテインAプルダウン後の、FVIIIFc種のウエスタンブロット分析

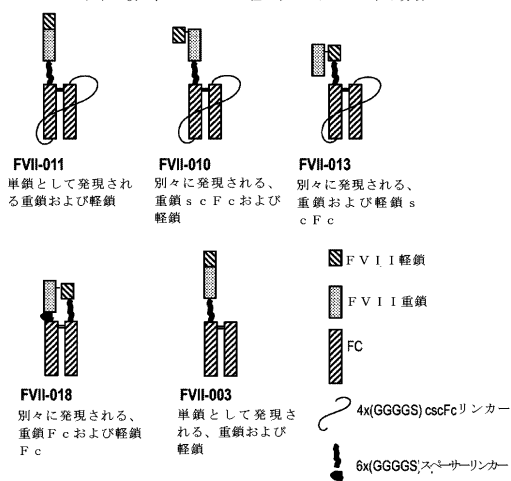


图 2-4

【图 29】

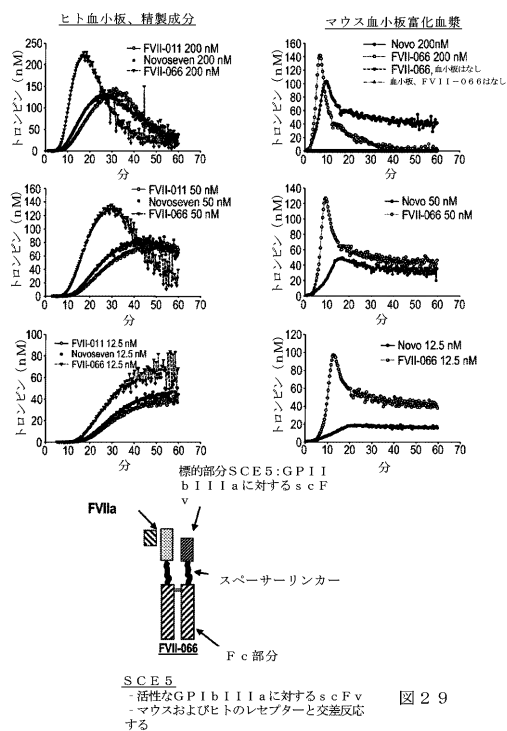
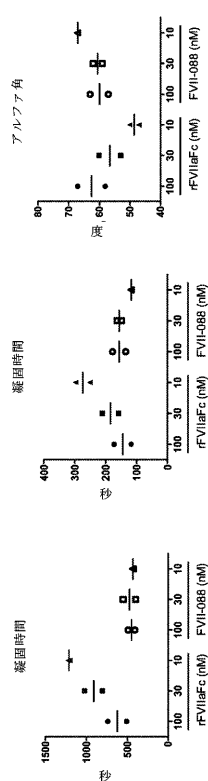


图 29

【図 30】



30

【図 3 1】

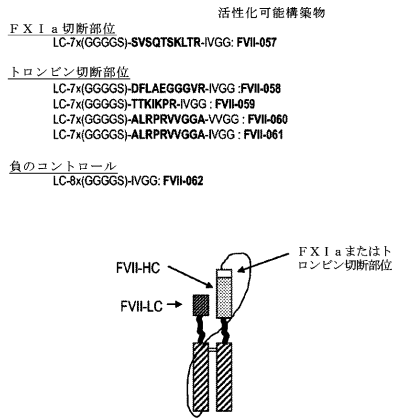


図 3 1

【図 3 4】

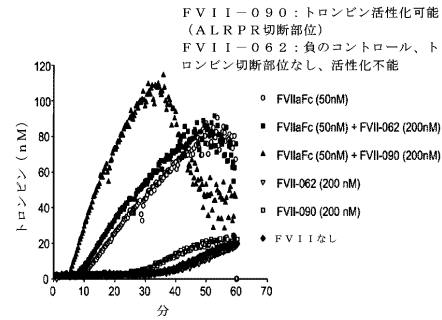


図 3 4

【図 3 6】

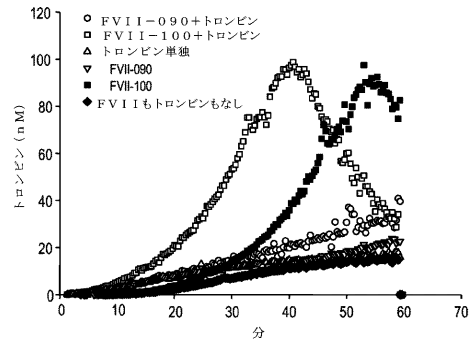


図 3 6

【図 3 7】

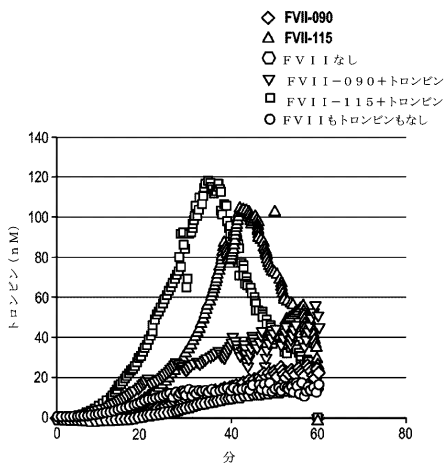


図 3 7

【図 3 8】

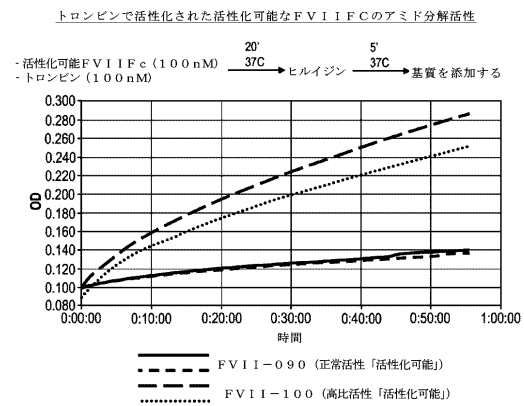


図 3 8

【図 3 9】

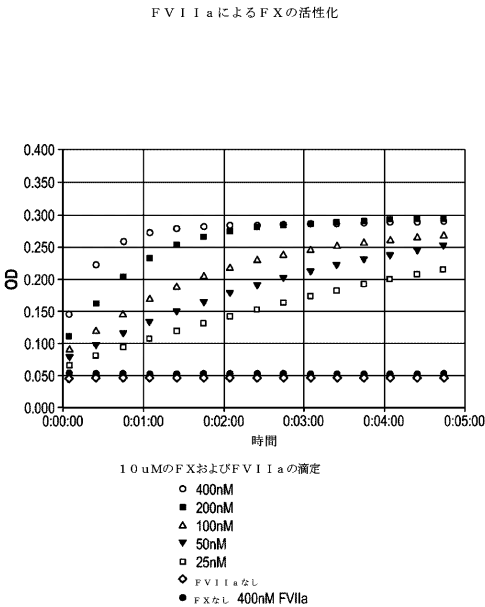


図 3 9

【図 4 0】

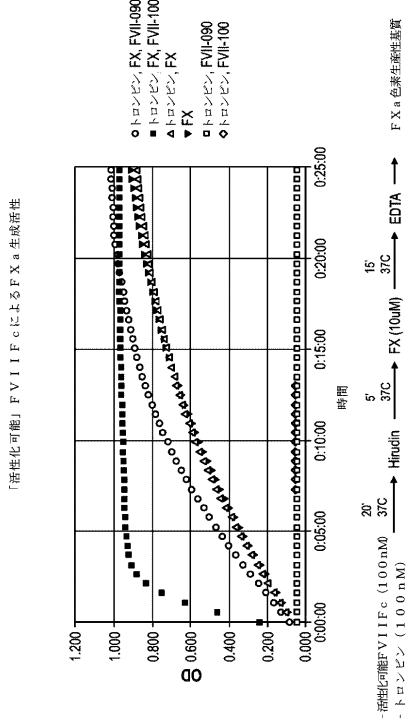


図 4 0

【図 4 1】

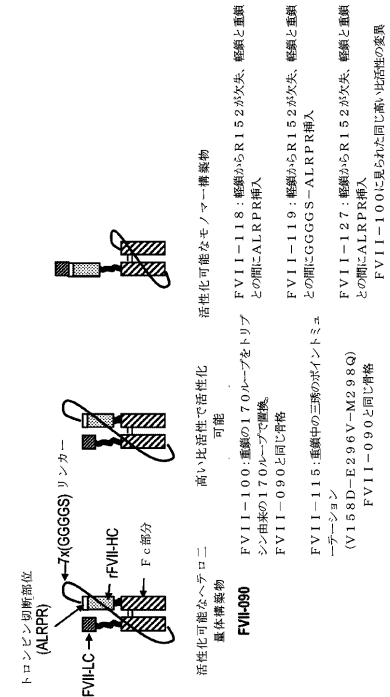


図 4 1

【図 4 3】

高い比活性の改変体 (F V I I - 1 2 7) に対して野性型の活性化可能な F V I I F c (F V I I - 1 1 8) を比較するための トロンビン 生成 アッセイ

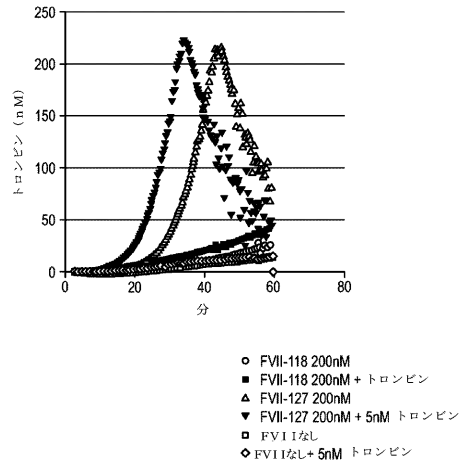
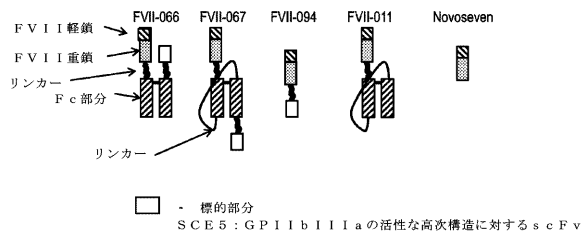


図 4 3

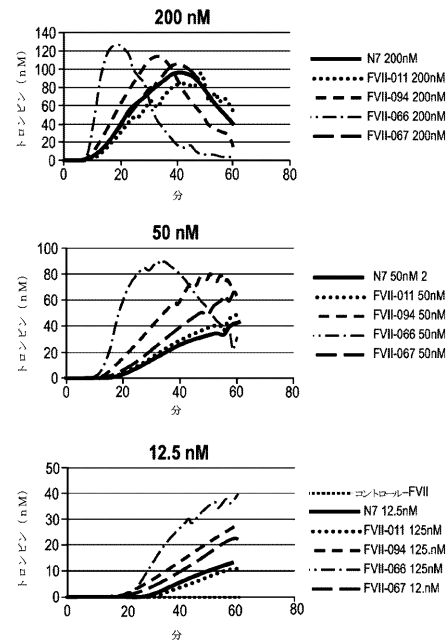
【図 4 4 A】

s c F v (SCE5) を介する G I I b I I I a の活性な高次構造に対して F V I I a を標的とする



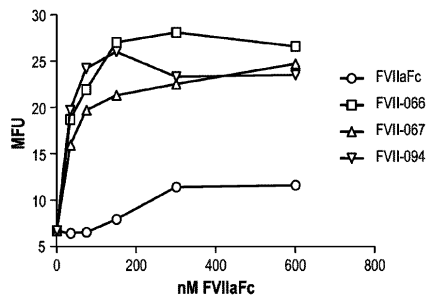
【図 4 4 B】

血小板豊富な F V I I I 欠損血漿における トロンビン生成アッセイ



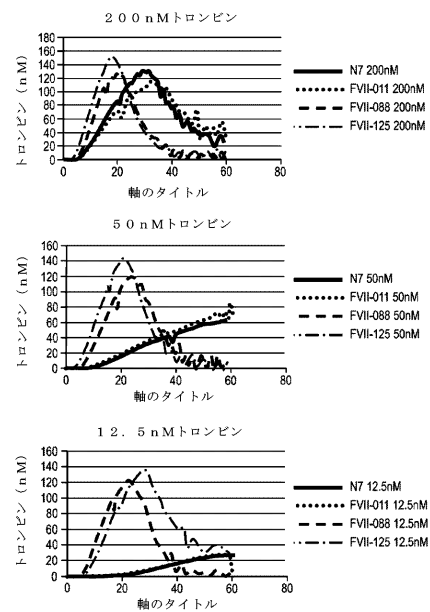
【図 4 4 C】

F A C による、血小板に対する組み換え F V I I a F c 改変体の結合



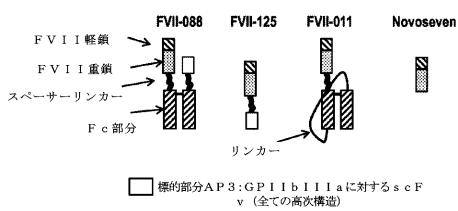
【図 4 5 B】

血小板豊富な F V I I I 欠損血漿における トロンビン生成アッセイ



【図 4 5 A】

s c F v (AP3) を介する G I I b I I I a の全ての高次構造に対して F V I I a を標的とする



【図 4 5 C】

FACによる、血小板に対する組み換えFVIIaFc変体の結合

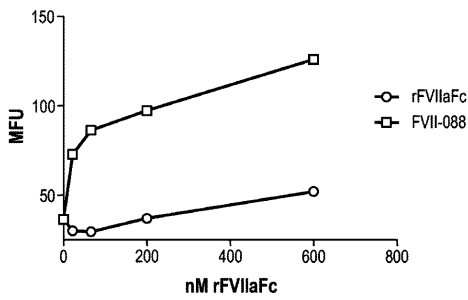


図 4 5 C

【図 4 6 A】

ペプチドでGPIIbに対してFVIIaFcを標的する

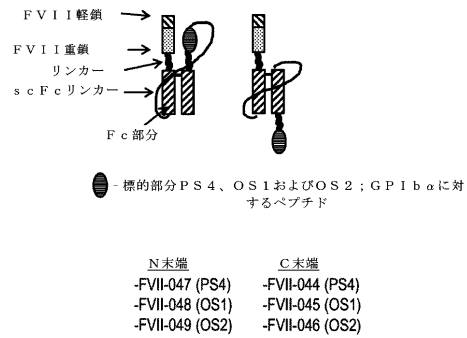


図 4 6 A

【図 4 6 B】

血小板豊富なFVII欠損血漿におけるトロンビン生成アッセイ

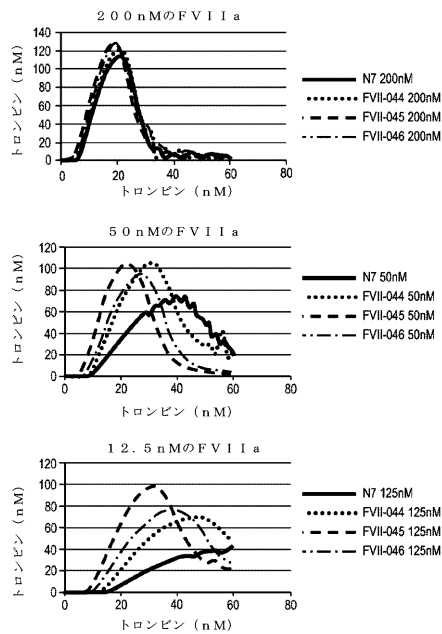


図 4 6 B

【図 4 7 A】

血小板豊富なFVII欠損血漿におけるトロンビン生成アッセイ

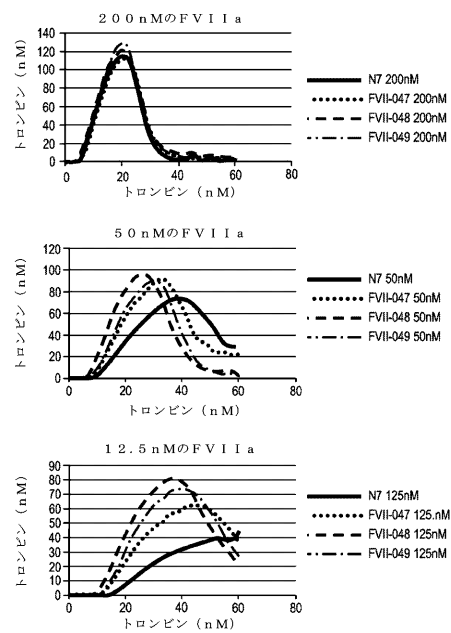


図 4 7 A

【图 4 7 B】

血小板豊富なFV I I I欠損血漿におけるトロンビン生成アッセイ
FV I I - 0 4 5およびFV I I - 0 4 8の比較

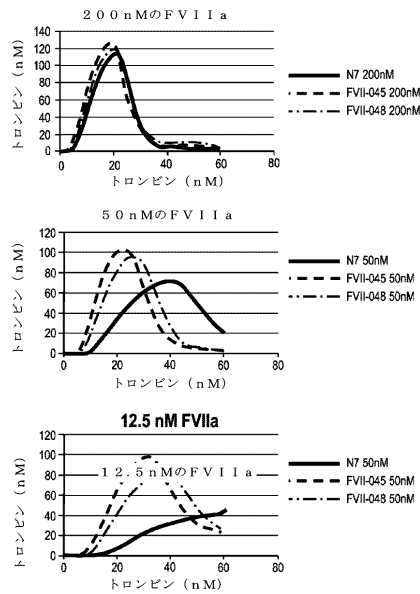
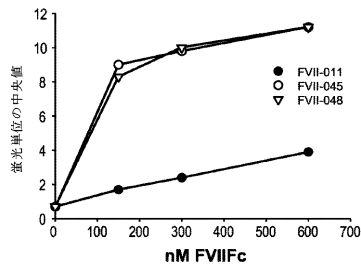


图 4 7 B

【図 48】

FACで確認した、血小板に対するFVⅡ-045、
FVⅡ-048および野性型FVⅡaFcの結合



Bernardら、Biochemistry
2008, 47:4674-4682に報告され
る標的ペプチドの親和性

ペプチド	親和性 K_D (nM)
PS4	64
OS1	0.74
OS2	31

图 4-8

【図 4 9 A】

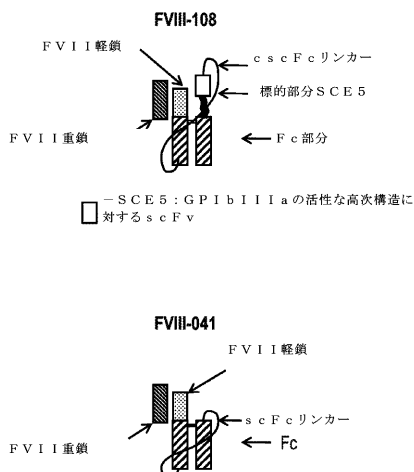
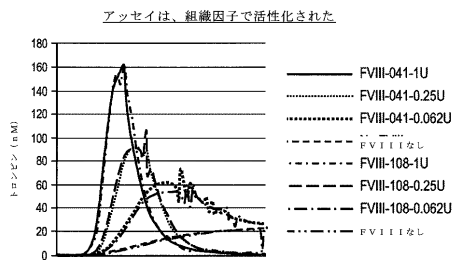


图 4-9 A

【図 4 9 B】

FV III 欠損の血小板豊富な血漿におけるトロンビン生成
アッセイ

アッセイは、血小板活性で活性化された

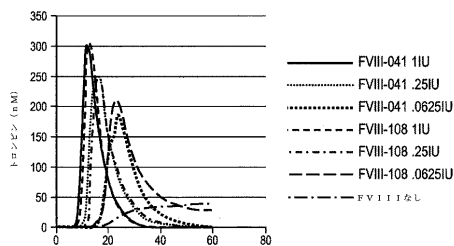


图 4 9 B

【図 5 0】

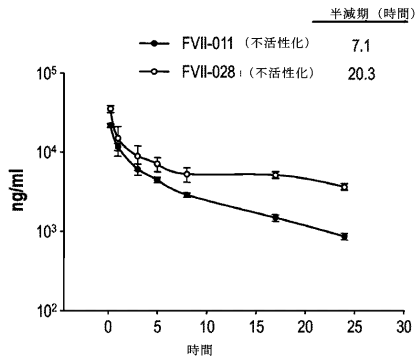


図 5 0

【図 5 1 A】

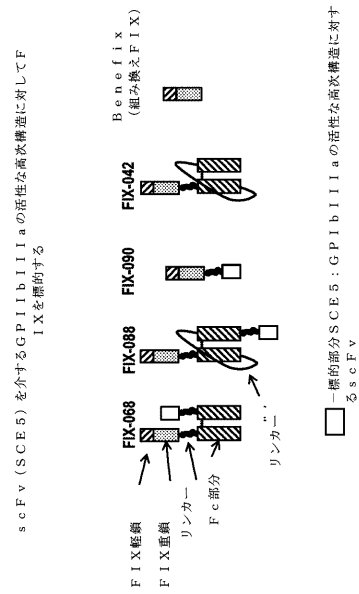


図 5 1 A

【図 5 1 B】

血小板豊富な F1X 欠損の血漿におけるトロンビン生成アッセイ

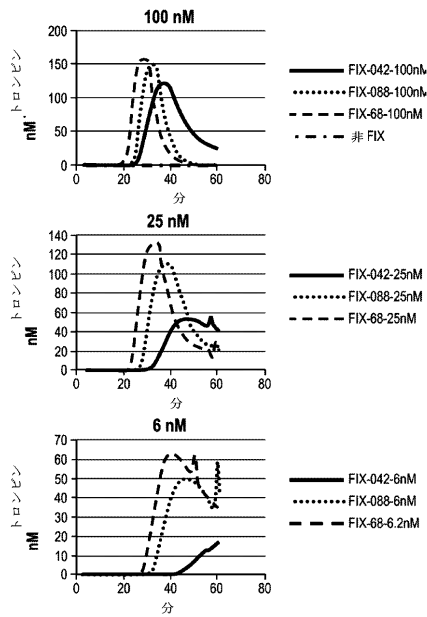


図 5 1 B

【図 5 1 C】

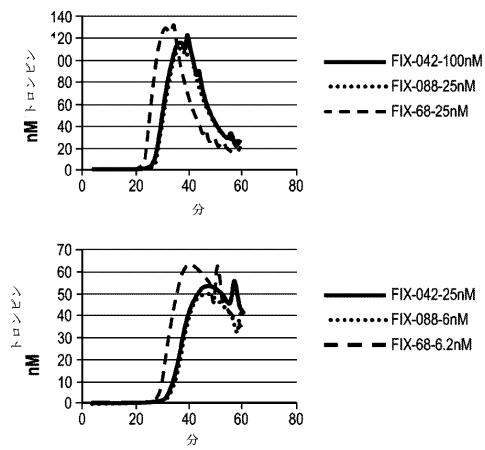


図 5 1 C

【図 5 2 A】

血小板豊富な F I X 欠損の血漿におけるトロンビン生成アッセイ

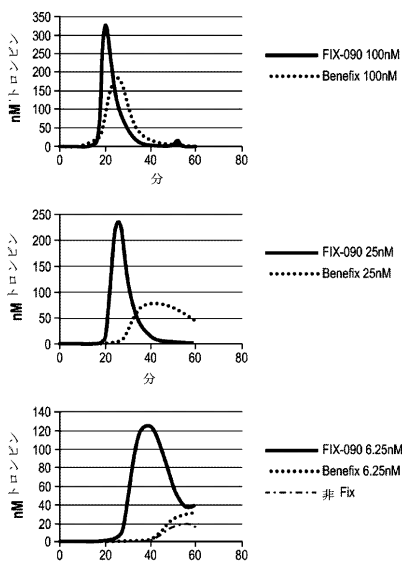


図 5 2 A

【図 5 2 B】

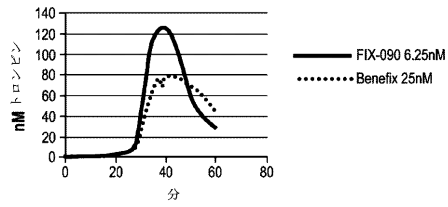


図 5 2 B

【図 5 3 A】

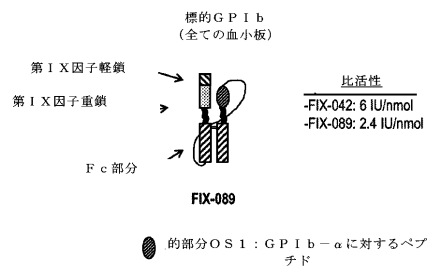


図 5 3 A

【図 5 3 B】

血小板豊富な F I X 欠損の血漿におけるトロンビン生成アッセイ

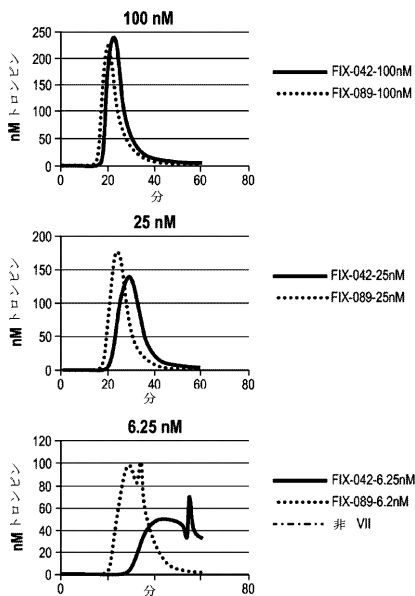


図 5 3 B

【図 5 3 C】

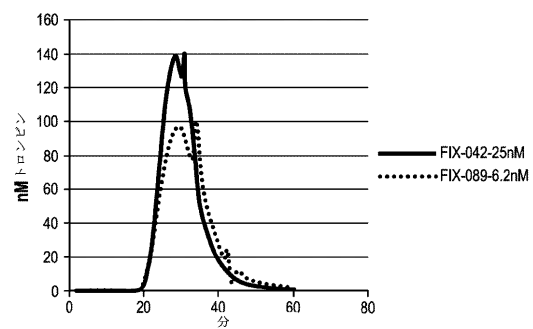


図 5 3 C

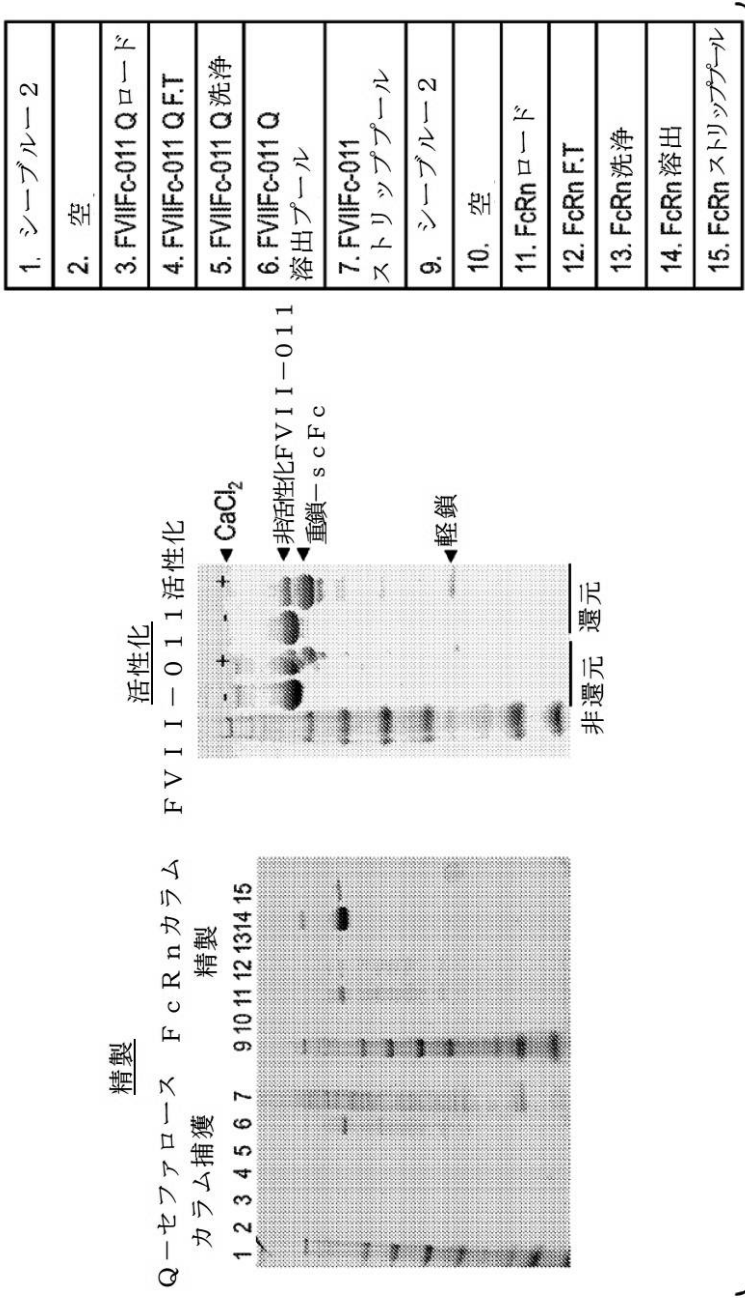


図 1 0

【図 1 1】

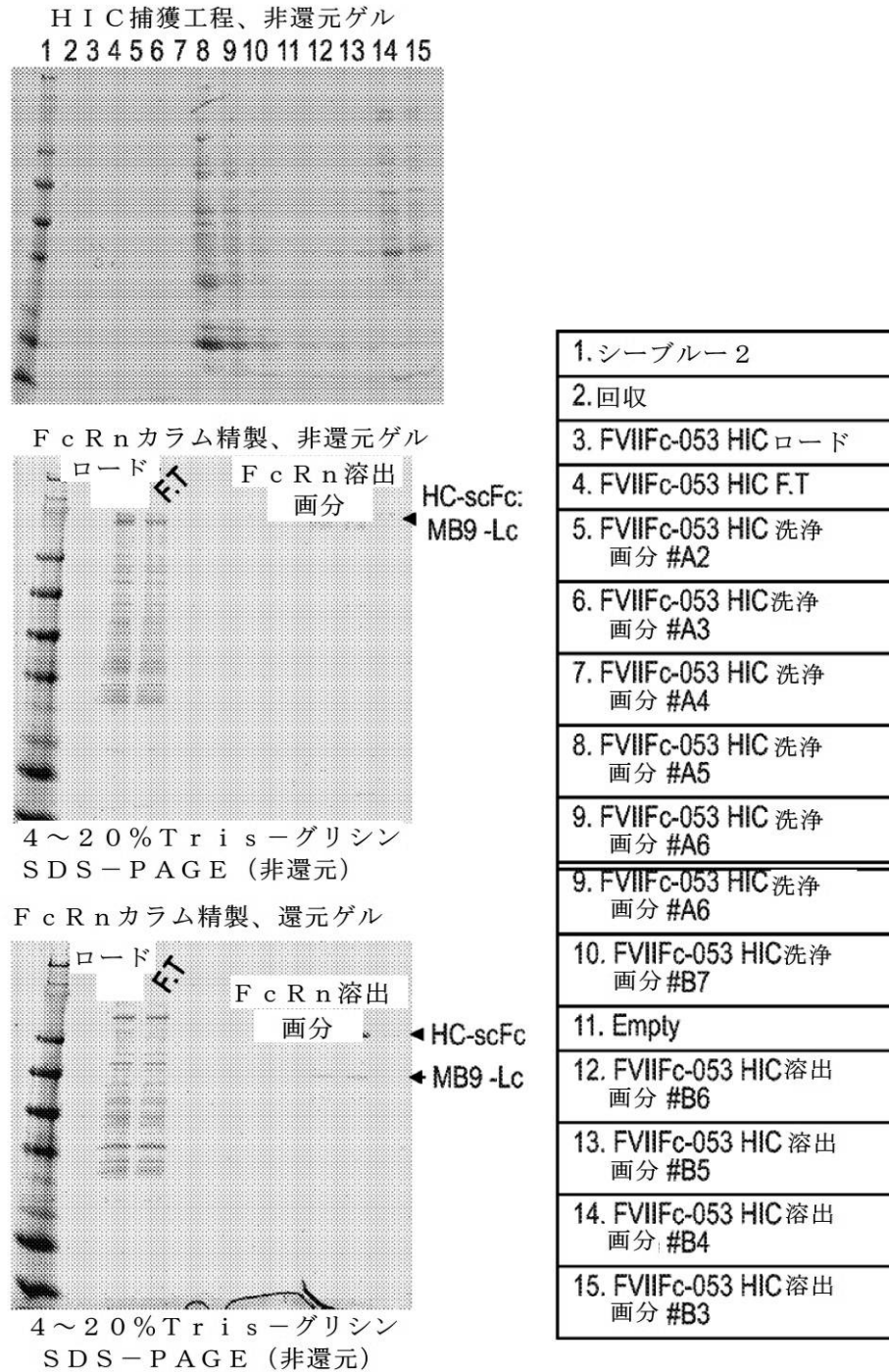


図 1 1

【図 2 5】

HEK 2 9 3 細胞の一時的なトランスフェクションおよびプロテインAプルダウン後の、F V I I F c 種のウエスタンブロット分析

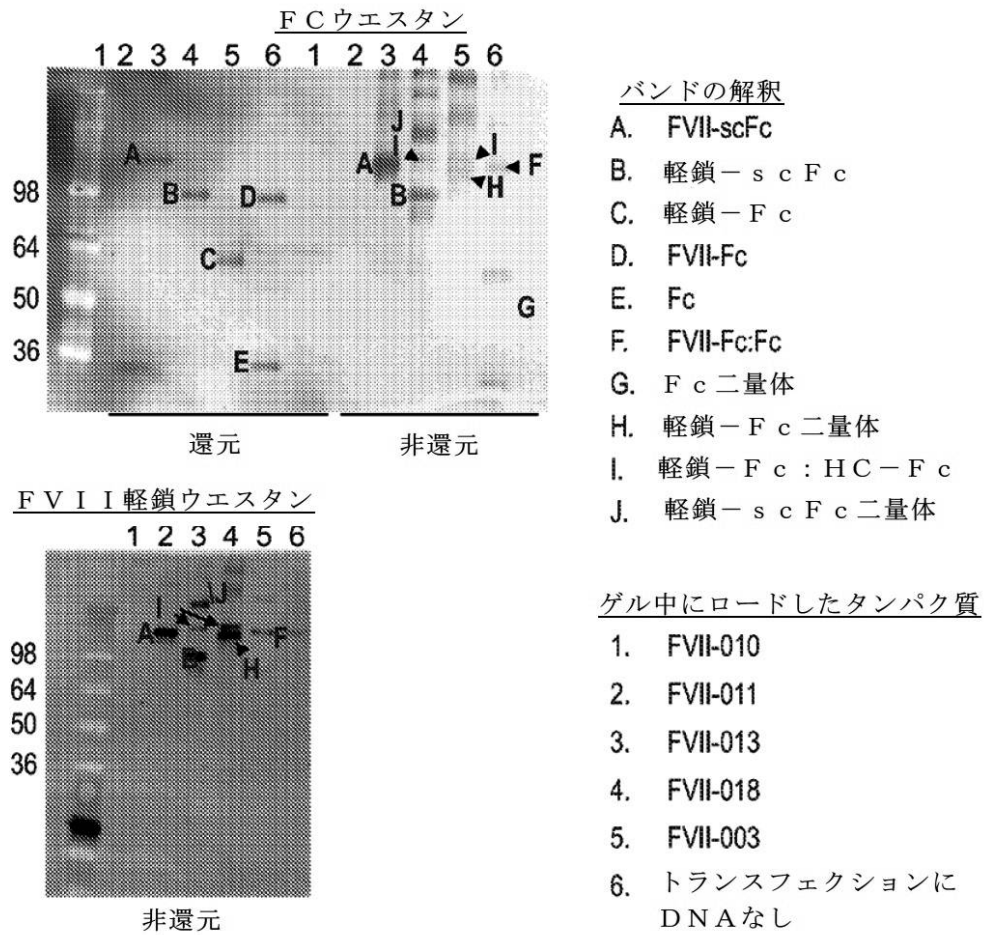


図 2 5

【図 2 6】

pSYN-PC5-003の有無におけるpSYN-FVII-024の一時的なトランスフェクション後のプロテインA免疫沈降のウエスタンブロット。レーン1、シ―ブループラス2マ―カー；レーン2、pSYN-FVII-024、非還元；レーン3、pSYN-FVII-024+pSYN-PC5-003、非還元；レーン4、pSYN-FVII-024、還元；レーン5、pSYN-FVII-024+pSYN-PC5-003、還元。

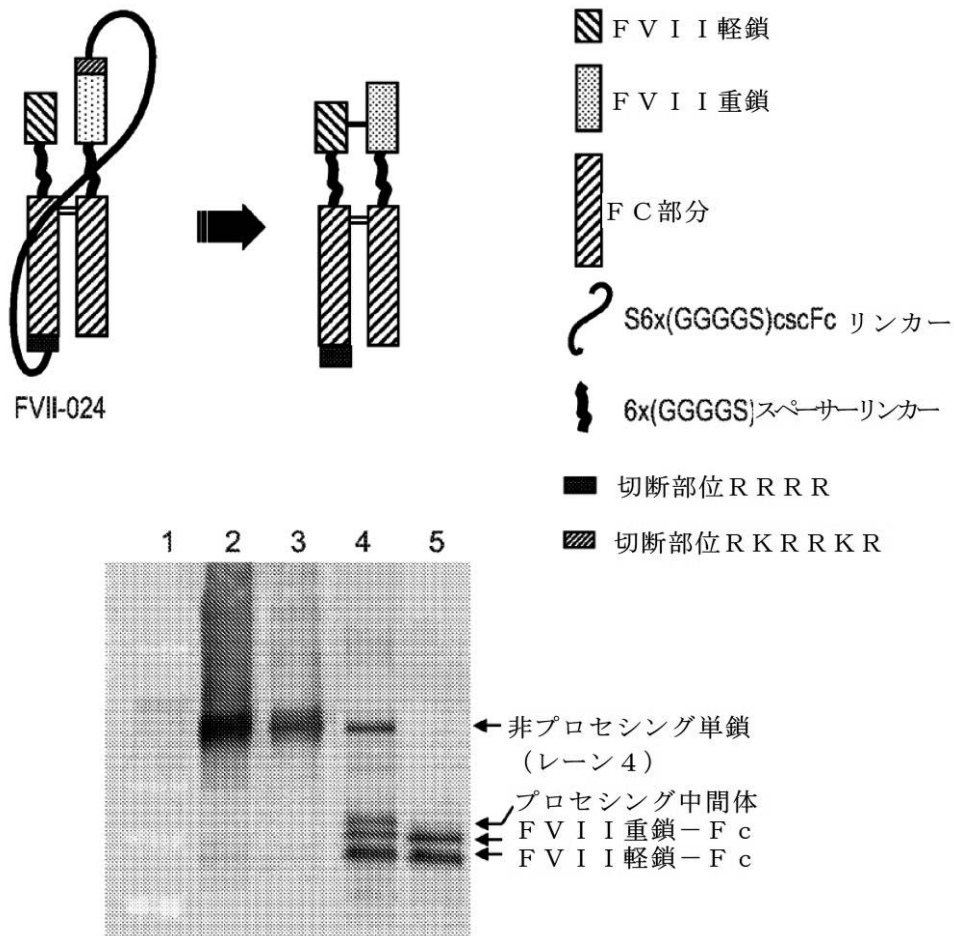


図 2 6

【図 2 7】

HEK 2 9 3 細胞の一時的なトランスフェクションおよびプロテインAプルダウン後の、F V I I F c 種のウエスタンブロット分析 (F c ウエスタン)

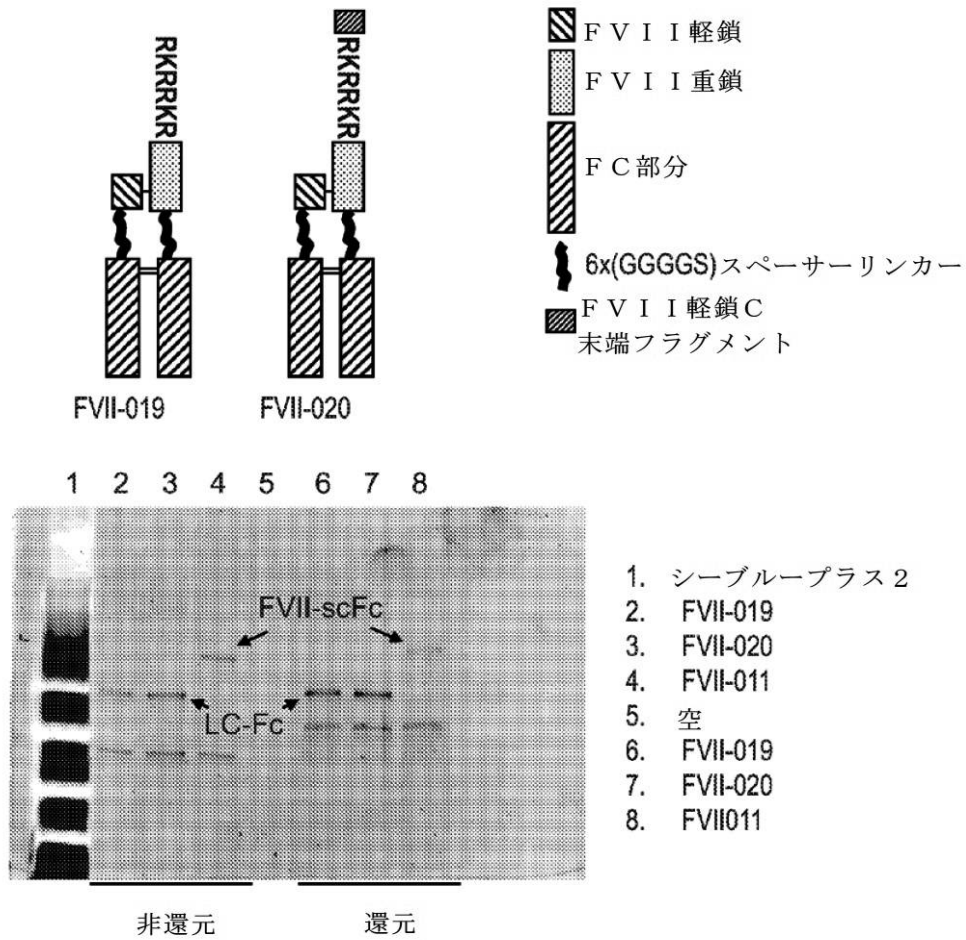


図 2 7

【図 28】

FXIa による FVII-039 および FVII-040 処理を示す。

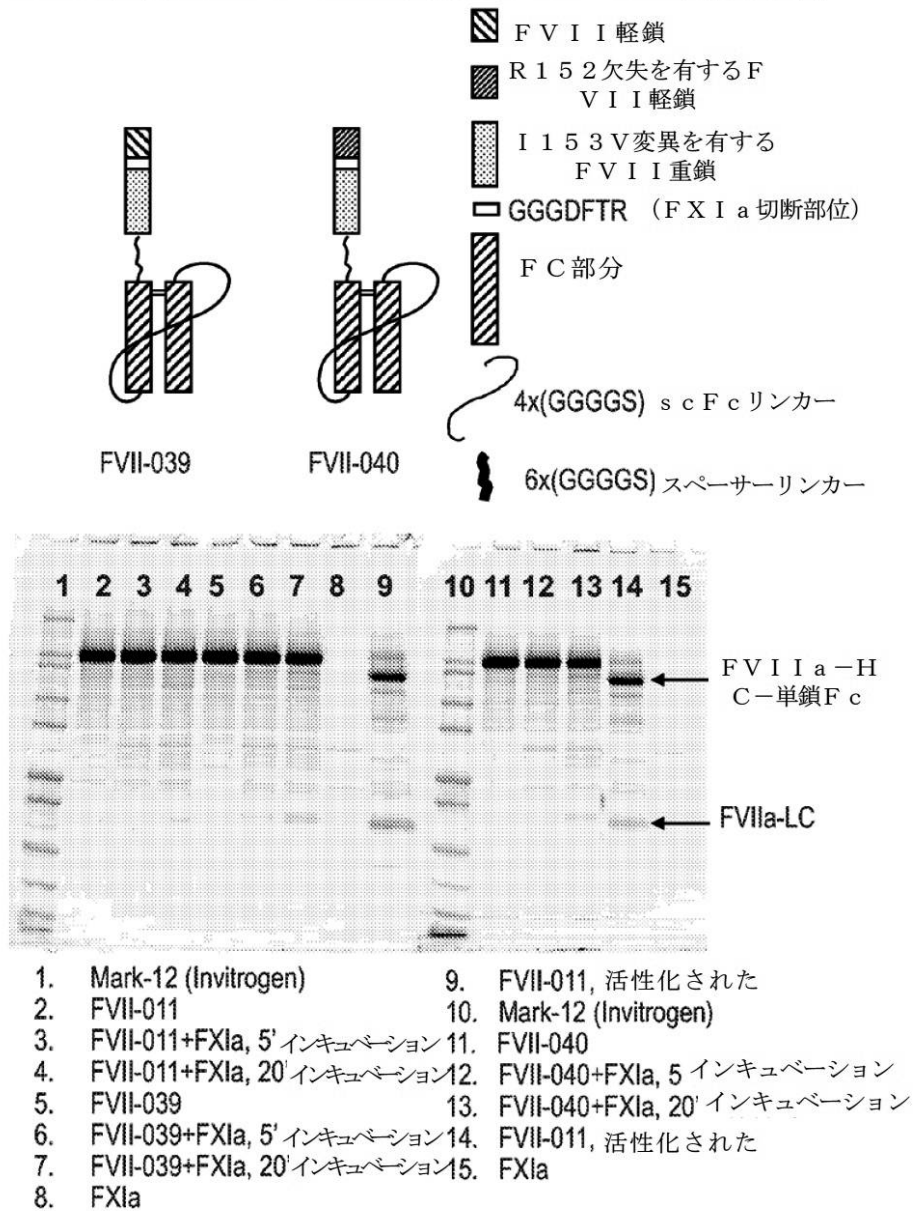
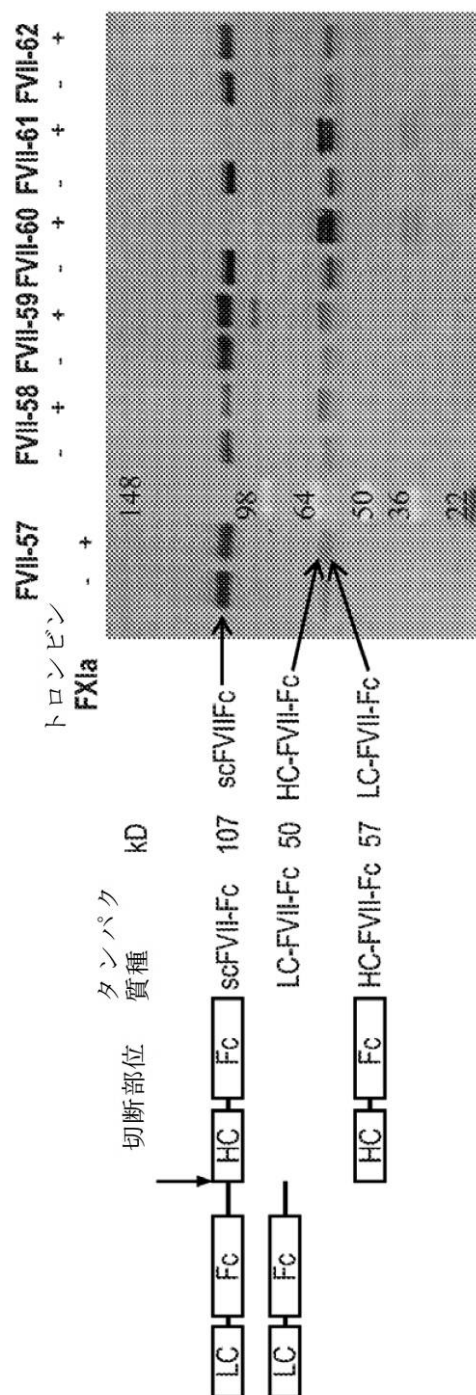


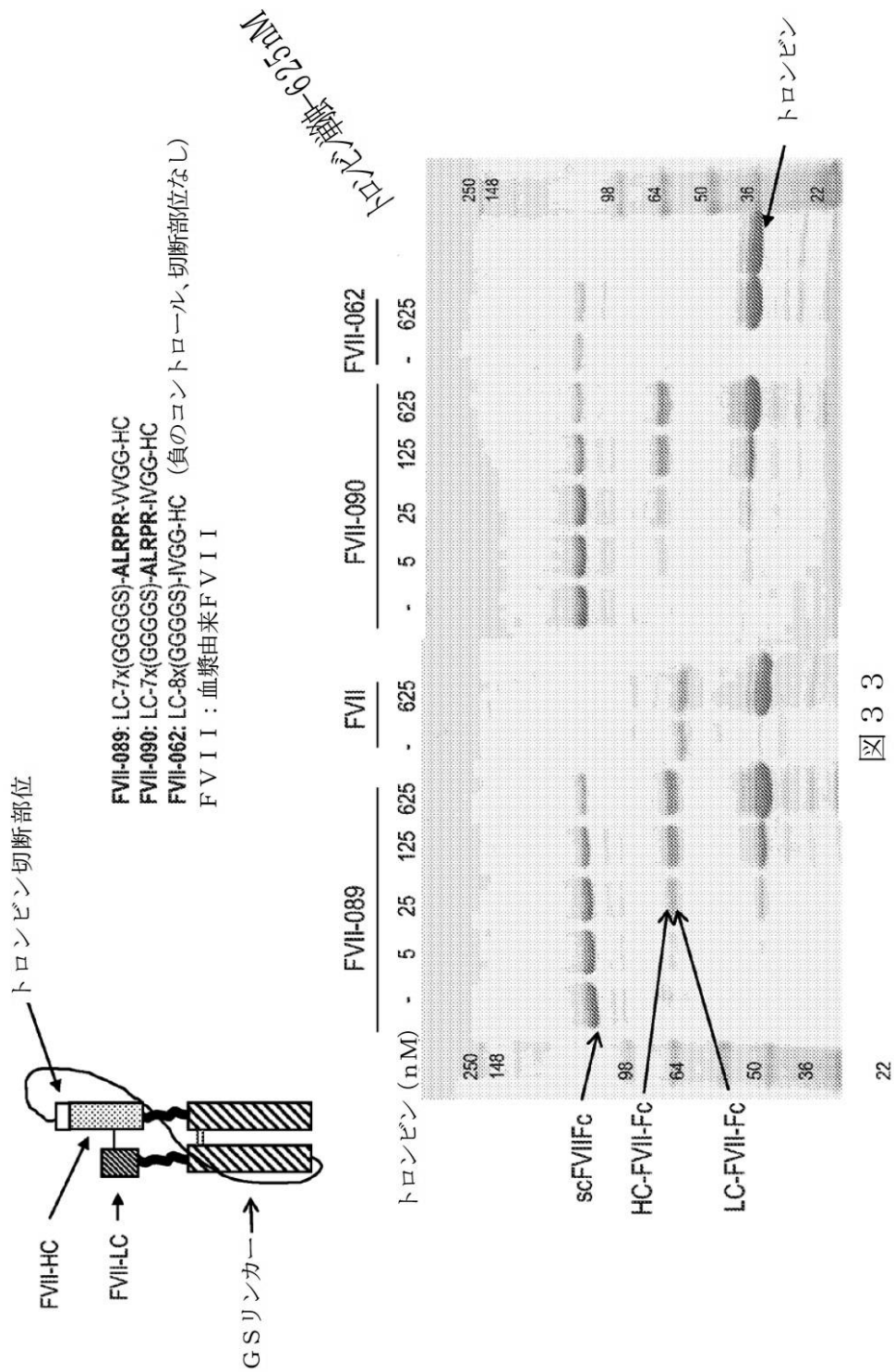
図 28

【図 3 2】



2
3
☒

【図 3 3】



【図 3 5】

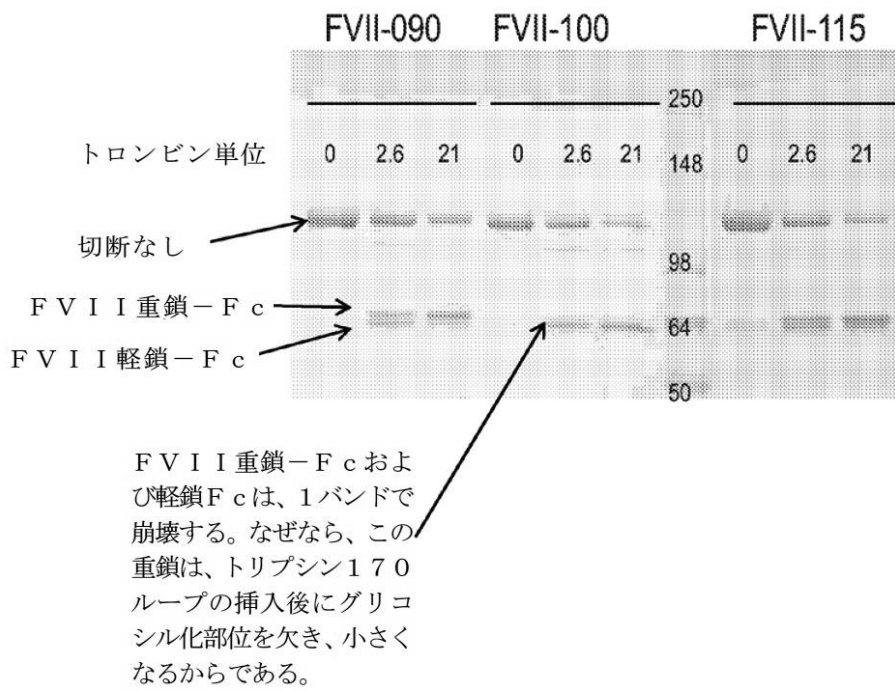


図 3 5

【図 4 2】

活性化可能なヘテロ二量体 (FVII-090) に対して、単量体 (FVII-118、FVII-119) のトロンビン切断の有効性を比較する。

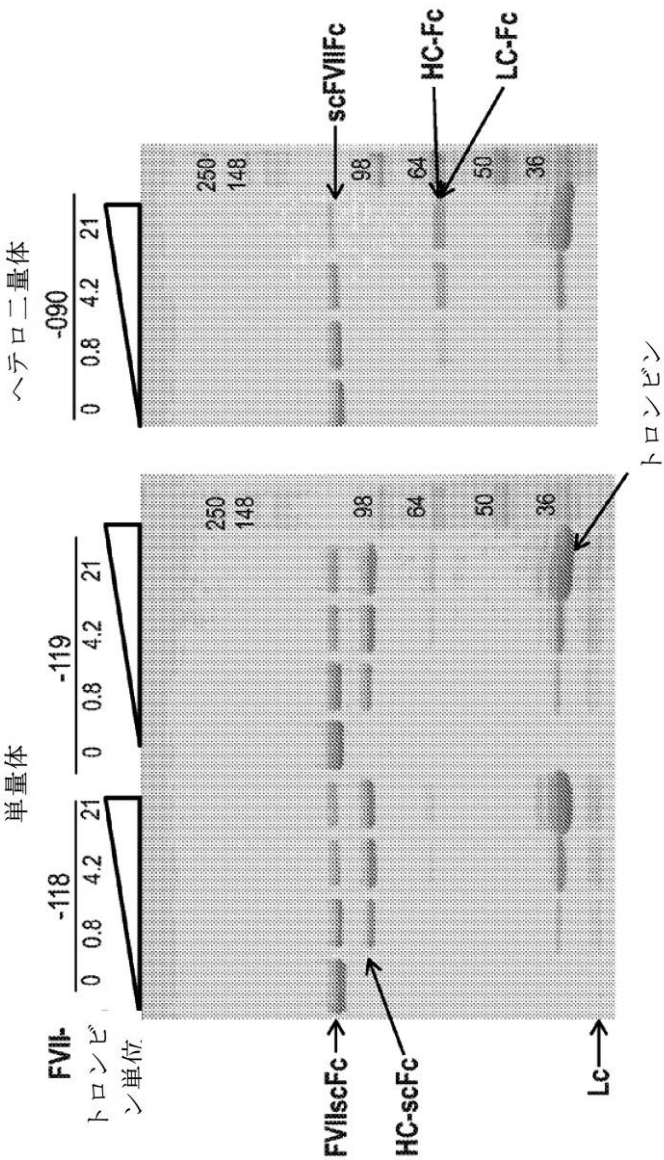


図 4 2

【配列表】

2013534427000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/043597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/96 A61K38/48 A61K38/36 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/140598 A1 (BAYER HEALTHCARE LLC [US]; FELDMAN RICHARD [US]; KIM JI-YUN [US]; JIAN) 19 November 2009 (2009-11-19) abstract paragraphs [0002], [0007], [0014], [0022], [0023], [0026] - [0043], [0045] examples 1-5,8 ----- -/--	1-82
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 November 2011		Date of mailing of the international search report 11/11/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/043597

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG X ET AL: "An ordered sequential mechanism for Factor IX and Factor IXa binding to platelet receptors in the assembly of the Factor X-activating complex", BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 390, no. 1, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 157-167, XP009118579, ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20050029 [retrieved on 2005-03-09] the whole document -----	1-82
X, P	US 2010/330059 A1 (STAFFORD DARREL W [US] ET AL) 30 December 2010 (2010-12-30) abstract paragraphs [0003], [0015] - [0022], [0058], [0072], [0074], [0079] examples I, IV, V -----	1-6, 24-29, 32, 33, 35, 37-45, 47, 49, 59-82
A, P	WO 2010/115866 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; OESTERGAARD HENRIK [DK]; PUSATERI TONY [US]; BAR) 14 October 2010 (2010-10-14) abstract page 1, line 10 - line 14 page 2, line 13 - line 24 page 8, line 23 - line 29 page 11, line 18 - page 19, line 19 page 21, line 4 examples 1-3, 5, 9, 10, 38, 40, 42-46 -----	1-82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/043597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009140598 A1	19-11-2009	CA 2724630 A1	19-11-2009
		CN 102112144 A	29-06-2011
		EP 2288365 A1	02-03-2011
		JP 2011520913 A	21-07-2011
		KR 20110022604 A	07-03-2011
		US 2011077202 A1	31-03-2011

US 2010330059 A1	30-12-2010	WO 2010151736 A1	29-12-2010

WO 2010115866 A1	14-10-2010	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/465	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	
	A 6 1 K 48/00	

- (31)優先権主張番号 61/491,762
 (32)優先日 平成23年5月31日(2011.5.31)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/442,150
 (32)優先日 平成23年2月11日(2011.2.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/363,186
 (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)
 (31)優先権主張番号 61/442,029
 (32)優先日 平成23年2月11日(2011.2.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (72)発明者 サラス, ジョー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 8, ウェイランド, ダンジェロ ロード 9
 (72)発明者 ピーターズ, ロバート
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 2, ウェスト ロックスベリー, ニューフィ
 ド ストリート 5 1
 (72)発明者 ビトンティ, アラン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 2 0, アクトン, カールトン ドライブ 3 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 GA11 HA01
 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA31 BA41 CA53 DC14 DC16
 DC17 NA05 NA13 ZA53 ZC19
 4C085 AA24 AA25 BB11 BB41 BB43 CC21 CC26 DD62 EE03 GG01
 4H045 AA10 BA10 CA40 DA65 EA24 FA74