

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5813641号

(P5813641)

(45) 発行日 平成27年11月17日(2015.11.17)

(24) 登録日 平成27年10月2日(2015.10.2)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C O 7 K 14/745 (2006.01)

C O 7 K 14/745

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 32 (全 361 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-526709 (P2012-526709)
 (86) (22) 出願日 平成22年8月2日(2010.8.2)
 (65) 公表番号 特表2013-502459 (P2013-502459A)
 (43) 公表日 平成25年1月24日(2013.1.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/002148
 (87) 国際公開番号 W02011/028229
 (87) 国際公開日 平成23年3月10日(2011.3.10)
 審査請求日 平成25年3月18日(2013.3.18)
 (31) 優先権主張番号 61/236,836
 (32) 優先日 平成21年8月25日(2009.8.25)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/280,956
 (32) 優先日 平成21年11月10日(2009.11.10)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 511188819
 アムニクス オペレーティング インコー
 ポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 43, マウンテン ビュー, エリス
 ストリート 500
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝固第 I X 因子組成物ならびにそれを製造および使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 I X 因子ポリペプチドと伸長した組換えポリペプチド (X T E N) とを含む単離された第 I X 因子融合タンパク質であって、該 X T E N は、配列番号 35、36、37、38、43、44、45 および 46 からなる群より選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、該 X T E N は、

a. グリシン (G) 残基、アラニン (A) 残基、セリン (S) 残基、トレオニン (T) 残基、グルタミン酸 (E) 残基およびプロリン (P) 残基が、該 X T E N の全アミノ酸残基の 80% 超を構成し、

b. (i) 該 X T E N は、アミノ酸がセリンでない限り、3つの連続する同一のアミノ酸を含まないか、もしくは (i i) 該 X T E N の少なくとも 80% が、非重複配列モチーフを含み、該配列モチーフの各々は 9~14 アミノ酸残基を含み、任意の 2つの連続するアミノ酸残基が該配列モチーフの各々において 2回を超えては存在しないように、該 X T E N は非反復性であり、

c. 該 X T E N が少なくとも 36 アミノ酸残基を含む、
 該第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 2】

前記 X T E N が、配列番号 35、36、37、38、43、44、45 または 46 と同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 3】

10

20

前記 X T E N が、配列番号 3 6 に少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 4】

前記 X T E N が、配列番号 3 6 と同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 5】

前記 X T E N が、配列番号 3 7 に少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 6】

前記 X T E N が、配列番号 3 7 と同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

10

【請求項 7】

前記第 I X 因子ポリペプチドが、その C 末端で前記 X T E N に連結する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 8】

以下の式に従って構成された、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質：

$$(G l a) - (X T E N)_u - (E G F 1) - (X T E N)_v - (E G F 2) - (A P 1) - (X T E N)_w - (A P 2) - (X T E N)_x - (P r o) - (S)_y - (X T E N)_z$$

20

この場合、各要素について独立して、

- (a) G l a が、該第 I X 因子ポリペプチドの G l a ドメインであり；
- (b) E G F 1 が、該第 I X 因子ポリペプチドの E G F 1 ドメインであり；
- (c) E G F 2 が、該第 I X 因子ポリペプチドの E G F 2 ドメインであり；
- (d) A P 1 が、該第 I X 因子ポリペプチドの活性化因子ペプチドドメインの一部であり；
- (e) A P 2 が、少なくとも第一の開裂配列を含む該第 I X 因子ポリペプチドの活性化ペプチドドメインの一部であり；
- (f) P r o が、該第 I X 因子ポリペプチドのプロテアーゼドメインであり；
- (g) S が、開裂配列を任意に含むことのできる 1 ～ 5 0 のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；
- (h) X T E N が、前記伸長した組換えポリペプチドであり、
- (i) u が、0 または 1 のいずれかであり；
- (j) v が、0 または 1 のいずれかであり；
- (k) x が、0 または 1 のいずれかであり；
- (l) y が、0 または 1 のいずれかであり；かつ
- (m) z が、0 または 1 のいずれかであり、ただし、 $u + v + x + y + z \geq 1$ という条件付きである。

30

【請求項 9】

2 つ以上の X T E N を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

40

【請求項 1 0】

前記 X T E N が、前記第 I X 因子融合タンパク質に含まれる任意の 2 つの隣接したドメイン間に組み込まれ、この場合、該 2 つの隣接したドメインが G l a、E G F 1、E G F 2、A P、およびペプチダーゼ S 1 (P r o) からなる群から選択される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 1 1】

前記 X T E N が、配列番号 2 2 5、2 2 7、2 2 9、2 3 1、2 3 3、2 3 5、2 3 7、2 3 9、2 4 1、2 4 3、2 4 5、2 4 7、2 4 9、2 5 1、2 5 3、2 5 5、2 5 7、2 5 9、2 6 1、2 6 3、2 6 5、2 6 7、2 6 9、2 7 1、2 7 3、2 7 5、2 7 7

50

、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、341、403、405、407、409、411、413、415、417、419、421、423、425、427、429、431、433、435、437、439、441、443、445、447、449、451、453、455、457、459、461、463、465、467、469、471、473、475、477、479、481、483、485、487、および489からなる群より選択される配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

【請求項12】

前記X T E Nが、配列番号225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、341、403、405、407、409、411、413、415、417、419、421、423、425、427、429、431、433、435、437、439、441、443、445、447、449、451、453、455、457、459、461、463、465、467、469、471、473、475、477、479、481、483、485、487、および489からなる群より選択される配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

10

【請求項13】

前記X T E Nが、配列番号225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、251、253、255、257、259、261、263、265、267、269、271、273、275、277、279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、341、403、405、407、409、411、413、415、417、419、421、423、425、427、429、431、433、435、437、439、441、443、445、447、449、451、453、455、457、459、461、463、465、467、469、471、473、475、477、479、481、483、485、487、および489からなる群より選択される配列と同一のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

20

【請求項14】

前記X T E Nが、配列番号225、229、231、239、243、249、255、257、265、または283を含む、請求項11に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

【請求項15】

前記融合タンパク質が配列番号229を含む、請求項14に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

30

【請求項16】

前記X T E Nが、配列番号61、62、63、65、66、69、71、73、74、75、76、77、78、79、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538、540、542、544、546、548、550、552、554、および556からなる群より選択される配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

【請求項17】

前記X T E Nが、配列番号61、62、63、65、66、69、71、73、74、75、76、77、78、79、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538、540、542、544、546、548、550、552、554、および556からなる群より選択される配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項16に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

40

【請求項18】

前記X T E Nが、配列番号61、62、63、65、66、69、71、73、74、75、76、77、78、79、492、494、496、498、500、502、504、506、508、510、512、514、516、518、520、522、524、526、528、530、532、534、536、538、540、542、544、546、548、550、552、554、および556からなる群より選択される配列と同一のアミノ酸配列を含む、請求項16に記載の単離された第IX因子融合タンパク質。

【請求項19】

50

前記 X T E N が、配列番号 6 3 または 6 5 を含む、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 2 0】

前記融合タンパク質が、配列番号 602、604、606、608、612、614、616、または 618 と少なくとも 90% 同一の配列を含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 2 1】

前記融合タンパク質が、配列番号 602、604、606、608、612、614、616、または 618 と少なくとも 9 5 % 同一の配列を含む、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 2 2】

前記融合タンパク質が、配列番号 602、604、606、608、612、614、616、または 618 を含む、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質。

【請求項 2 3】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質をコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の 単離された ポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチドまたは請求項 2 4 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 2 6】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質、請求項 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド、請求項 2 4 に記載のベクター、または請求項 2 5 に記載の宿主細胞と、医薬として許容し得る担体とを含む医薬組成物。

【請求項 2 7】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質、請求項 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド、請求項 2 4 に記載のベクター、請求項 2 5 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 に記載の医薬組成物を含む、対象における凝固障害を治療するための組成物。

【請求項 2 8】

前記凝固障害が血友病 B である、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質、請求項 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド、請求項 2 4 に記載のベクター、請求項 2 5 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 に記載の医薬組成物を含む、対象における出血症状を治療するための組成物。

【請求項 3 0】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の第 I X 因子融合タンパク質、請求項 2 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド、請求項 2 4 に記載のベクター、請求項 2 5 に記載の宿主細胞、または請求項 2 6 に記載の医薬組成物を含む、凝固タンパク質を欠損する対象を治療するための組成物。

【請求項 3 1】

前記凝固タンパク質が、内在性の第 V I I 因子、第 I X 因子または第 X I 因子タンパク質である、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

請求項 2 5 に記載の宿主細胞を、前記第 I X 因子融合タンパク質が発現される条件下で培養する工程を包含する、第 I X 因子融合タンパク質の製造方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(連邦助成研究に関する供述)

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与されたS B I R助成金2 R 4 4 G M 0 7 9 8 7 3 - 0 2の下で政府の支援により実施された。政府は、本発明においてある権利を有する。

【0002】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2009年8月24日に提出された米国仮出願シリアル番号第61/236, 493号、2009年8月25日に提出された第61/236, 836号、2009年11月10日に提出された第61/280, 955号、2009年11月10日に提出された第61/280, 956号、および2010年2月3日に提出された米国出願シリアル番号第12/699, 761号の優先権の利益を主張するものであり、これらのすべて、および本明細書とともに提出される米国弁護士整理番号(docket number) 32808-719. 201の下での同時係属出願は、それらの内容が全体としてすべての目的のために引用により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

血友病において、血液の凝固は、ある血漿血液凝固因子の欠失によって妨害される。ヒト第IX因子(FIX)は、血液凝固カスケードの内在性の経路の重要な構成要素であるセリンプロテアーゼの酵素前駆体である。FIX欠乏症を有さない個体において、FIXの平均半減期は短く、およそ18~24時間である。機能的FIXの欠乏症は、30,000人の男性において約1人に生じるX連結型障害によるものであり、Stephen Christmasという名の若い少年がこの因子を欠失していることが発見された後で名付けられたクリスマス病としても公知の血友病Bを結果的に生じる。100を超える第IX因子の突然変異が説明されており、いくつかは症状を生じないが、多くは、有意な出血性障害をもたらす。治療されていない場合、血友病Bは、筋肉、関節、および損傷後の体腔への制御されていない出血と関係し、死に至り得る。すでに、該疾患のための治療は、ドナープール由来のヒト血漿から調製されたFIXの投与を包含しており、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)を含む血液由来のウイルスによる感染に関する付帯リスクを抱えていた。より最近では、組換えFIX製剤が市販されるようになった。

【0004】

外来性に供給される第IX因子のインビボでの活性は、タンパク質の半減期および抗トロンビンを含む凝固阻害薬の両方によって制限される。第IX因子組成物は典型的には、頻繁な注射を必要とする短い半減期を有する。また、現行のFIXベースの治療薬は、生物学的利用能が乏しいことにより静脈内投与を必要とする。したがって、血友病Bを含む血友病のための予防的および/または治療的投与計画の一部として投与される場合、延長した半減期および活性の保持を伴う改良された第IX因子組成物に対する需要がある。

【0005】

第VII因子は、肝臓において合成され血中に分子量およそ50kDaの一本鎖酵素前駆体として分泌される凝固因子タンパク質である。FVII酵素前駆体は、タンパク質分解性開裂によって活性型(FVIIa)に変換され、活性型は、組織因子(TF)と複合体形成する場合、第IX因子および第X因子の両方をそれらの活性型に変換して、迅速なトロンビン生成およびフィブリン形成をもたらすことができる。rFVIIaの循環半減期は約2.3時間である(「Summary Basis for Approval for NovoSeven著作権」米国食品医薬品局参照番号96-0597)ので、複数回のかつ頻繁な投与が、血友病および第VII欠乏症を有する対象における出血性障害の治療に必要とされる。

【0006】

治療用タンパク質に対する化学的修飾は、そのインビボでのクリアランスを低下させることができ、その後、血清半減期を延長することができる。一般的な修飾の一例は、アミン基と反応するポリエチレングリコール（PEG）上でアルデヒド基またはN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）基を介してタンパク質と共役したPEG部分の付加である（例えば、リシン側鎖またはN末端）。しかしながら、抱合工程は結果的に、分離される必要のある異種性生成物混合物の形成を生じて、有意な生成物の損失及び製造の複雑さをもたらす可能性があり、完全に化学的に均一な生成物を結果として生じない。また、治療用タンパク質の薬理学的機能は、その結合部位近くのアミノ酸側鎖がペグ化処理によって修飾される場合、阻止され得る。Fcドメインと治療用タンパク質との融合は、治療用タンパク質の大きさを増大させる別の手法であり、それゆえ、腎臓を通じてのクリアランス速度を低下させる。加えて、Fcドメインは、FcRn受容体に結合する能力、およびFcRnによってリソソームからリサイクルされる能力を与え、結果的に薬物動態半減期を延長させる。残念ながら、Fcドメインは、組換え発現の間に効率的に折りたたみせず、封入体として公知の不溶性粒子状物質を形成する傾向にある。これらの封入体は、可溶化されなければならない。機能タンパク質は、誤って折りたたまれた凝集体から再生されなければならない。このような処理は、時間がかかり、非効率的で、費用がかかる。したがって、あまり頻繁に投与することができないおよび／またはより安いコストでより単純な処理によって製造することのできる、半減期の延長した改良された凝固因子組成物についての需要が残っている。

10

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、容態の治療または改良あるいは凝固第IX因子および／または凝固第VIII因子の投与に関連したパラメータの亢進のための組成物ならびに方法に関する。特に、本発明は、1以上の伸長組換えポリペプチド（XTEN）を含む融合タンパク質の組成物を提供する。対象のXTENは典型的には、非反復性配列および構造化されていない立体配座である。XTENは、第IX因子（「FIX」）、第VIII因子（「FVIII」）、第VIII因子-第IX因子複合体、およびそれらの配列変異形から選択される凝固因子（「CF」）に連結され、結果的に凝固因子-XTEN融合タンパク質（「CFXTEN」）を生じる。一部、本開示は、該融合タンパク質を含む医薬組成物および凝固因子関連の疾患、障害、または容態を治療するためのその使用に関する。CFXTEN組成物は、XTENに連結されていないCFと比較して高い薬物動態特性を有し、そのことが、より簡便な投薬および改良された効能を可能にし得る。いくつかの実施態様において、本発明のCFXTEN組成物は、ポリエチレングリコール（PEG）、アルブミン、抗体、および抗体断片からなる群から選択される構成要素を有しない。

30

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

伸長した組換えポリペプチド（XTEN）を含む単離された第IX因子ポリペプチドであって、該XTENが少なくとも36のアミノ酸残基を含み、この場合、該第IX因子ポリペプチドは、対象に投与される場合に約12時間よりも長い終末半減期を呈する、該第IX因子ポリペプチド。

40

（項目2）

前記第IX因子ポリペプチドが、最適に整列した場合に、表1から選択される配列と比較して少なくとも90%の配列同一性を呈する、項目1に記載の単離された第IX因子ポリペプチド。

（項目3）

前記第VIII因子が、そのC末端で前記XTENに連結される、項目1または2に記載の単離された第IX因子ポリペプチド。

（項目4）

50

第X I a因子、第X I I a因子、カリクレイン、第V I I a因子、第I X a因子、第X a因子、第I I a因子（トロンビン）、エラスターゼ - 2、MMP - 12、MMP 13、MMP - 17、およびMMP - 20からなる群から選択される哺乳類プロテアーゼによって開裂可能な開裂配列を介して前記X T E Nに連結される、項目1に記載の単離された第I X因子ポリペプチド。

（項目5）

前記哺乳類プロテアーゼによる前記開裂配列における開裂が、前記第I X因子ポリペプチドから前記X T E Nを放出する、項目4に記載の単離された第I X因子ポリペプチド。

（項目6）

前記X T E Nが以下を特徴とする、項目1に記載の単離された第I X因子ポリペプチド

10

（a）X T E Nアミノ酸残基の累積合計が、200超～約3000アミノ酸残基であり

（b）アスパラギン残基およびグルタミン残基の合計が、該X T E Nの全アミノ酸配列の10%未満であり；

（c）メチオニン残基およびトリプトファン残基の合計が、該X T E Nの全アミノ酸配列の2%未満であり；

（d）該X T E N配列が、10未満のサブシーケンススコアを有し；

（e）該X T E N配列が、GORアルゴリズムによって決定される時、90%超のランダムコイル形成を有し；かつ

20

（f）該X T E N配列が、Chou - Fasmanアルゴリズムによって決定される時、2%未満のアルファヘリックスおよび2%未満のベータシートを有する。

（項目7）

少なくとも約4の見かけの分子量因子を呈する、項目1に記載の単離された第I X因子ポリペプチド。

（項目8）

前記X T E Nが、表4、表9、表10、表11、表12、または表13から選択されるアミノ酸配列の同等な長さで少なくとも90%の配列同一性を呈する、項目1に記載の単離された第I X因子ポリペプチド。

（項目9）

30

式V I Iに従って構成された、項目1に記載の単離された第I X因子ポリペプチド：

$(G1a) - (XTEN)_u - (EGF1) - (XTEN)_v - (EGF2) - (AP1) - (XTEN)_w - (AP2) - (XTEN)_x - (Pro) - (S)_y - (XTEN)_z$ V I I

この場合、各発生について独立して、

（a）G1aが、第I X因子のG1aドメインであり；

（b）EGF1が、第I X因子のEGF1ドメインであり；

（c）EGF2が、第I X I因子のEGF2ドメインであり；

（d）AP1が、第I X因子の活性化因子ペプチドドメインの一部であり；

（e）AP2が、少なくとも第一の開裂配列を含む第I X因子の活性化因子ペプチドドメインの一部であり；

40

（f）PROが、第I X因子のプロテアーゼドメインであり；

（g）Sが、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；

（h）X T E Nが、表4、表9、表10、表11、表12、または表13から選択されるアミノ酸の同等な長さで少なくとも90%の配列同一性を呈する伸長した組換えポリペプチドであり、

（i）uが、0または1のいずれかであり；

（j）vが、0または1のいずれかであり；

（k）xが、0または1のいずれかであり；

50

(1) y が、0 または 1 のいずれかであり；かつ

(m) z が、0 または 1 のいずれかであり、ただし、 $u + v + x + y + z \geq 1$ という条件付きである。

(項目 10)

$y = 1$ であり、かつ、 S が F X I a、F X I I a、カリクレイン、F V I I a、F I X a、F X a、F I I a (トロンビン)、エラスターゼ - 2、MMP - 12、MMP 13、MMP - 17、および MMP - 20 からなる群から選択される哺乳類プロテアーゼによって開裂可能である開裂配列を含む、項目 9 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

(項目 11)

2 つ以上の X T E N を含む、項目 1 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

10

(項目 12)

前記 X T E N が、前記 I X 因子に含まれる任意の 2 つの隣接したドメイン間に組み込まれ、この場合、該 2 つの隣接したドメインが G l a、E G F 1、E G F 2、A P、およびペプチダーゼ S 1 (P r o) からなる群から選択される、項目 1 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

(項目 13)

(i) 同等なモル用量で哺乳類に投与される場合、前記 X T E N を欠失する相応する第 I X 因子と比較して、哺乳類に投与する場合により長い終末半減期を有し；

(i i) 該 I X 因子ポリペプチドのより小さなモル量が、他は等価な用量処方計画の下で哺乳類に投与される X T E N を欠失する相応する第 I X 因子との比較において哺乳類に投与される場合、該第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な曲線下面積 (A U C) を達成し；

20

(i i i) 該第 I X 因子ポリペプチドのより小さなモル量が、他は等価な用量処方計画の下で哺乳類に投与される X T E N を欠失する相応の第 I X 因子との比較において哺乳類に投与される場合、該 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な治療効果を達成し；

(i v) 該第 I X 因子ポリペプチドが、他は等価なモル量を用いて哺乳類に投与された X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較してあまり頻繁に哺乳類に投与されない場合、第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な曲線下面積 (A U C) を達成し；

30

(v) 該第 I X 因子ポリペプチドが、他は等価なモル量を使用して哺乳類に投与された X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較してあまり頻繁に哺乳類に投与されない場合、第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な治療効果を達成し；

(v i) 他は等価な投薬期間の下で哺乳類に投与された X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較して、累積的により小さなモル量の第 I X 因子ポリペプチドが、哺乳類に投与される場合、該第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な曲線下面積 (A U C) を達成し；又は

(v i i) 他は等価な投薬期間の下で哺乳類に投与される X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較して、累積的により小さなモル量の第 I X 因子ポリペプチドが、哺乳類に投与される場合、該第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な治療効果を達成することを特徴とする、項目 1 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

40

(項目 14)

項目 1 の一項に記載の治療有効量の第 I X 因子ポリペプチドを含む組成物を対象に投与することを含む、該対象における凝固障害を治療する方法。

(項目 15)

前記凝固障害が血友病 B である、項目 14 に記載の方法。

(項目 16)

項目 1 に記載の治療有効量の第 I X 因子ポリペプチドを含む組成物を対象に投与するこ

50

とを含む、該対象における出血症状を治療する方法。

(項目 17)

項目 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の治療有効量の第 I X 因子を含む組成物を、凝固タンパク質を欠損する対象に投与することを含む、該対象を治療する方法。

(項目 18)

前記凝固タンパク質が、野生型の第 V I I 因子、第 I X 因子、または第 X I 因子と置き換わる、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記 X T E N が、少なくとも 100 のアミノ酸残基を含む、項目 1 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

10

(項目 20)

伸長した組換えポリペプチド (X T E N) が、以下を特徴とする、該 X T E N を含む単離された第 I X 因子ポリペプチド：

(a) 該 X T E N が、少なくとも 36 のアミノ酸残基を含み；

(b) 前記 U R P に含まれるグリシン (G)、アスパラギン酸 (D)、アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)、グルタミン酸 (E)、およびプロリン (P) の残基の合計が、該 X T E N の全アミノ酸の少なくとも 80 % を構成し；

前記配列モチーフの各々において 2 倍超を生じず；

(d) 該 X T E N 配列が、T E P I T O P E アルゴリズムによって分析される場合、推定 T 細胞エピトープを欠失し、この中で、該 X T E N 配列内のエピトープについての該 T E P I T O P E アルゴリズムの推定は、-9 のスコアに基づいており；

20

(e) 該 X T E N 配列が、G O R アルゴリズムによって決定される時、90 % 超のランダムコイル形成を有し；かつ

(f) 該 X T E N 配列が、C h o u - F a s m a n アルゴリズムによって決定される時、2 % 未満のアルファヘリックスおよび 2 % 未満のベータ - シートを有する。

【0008】

いくつかの実施態様において、本発明は、表 1 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 % 同一である第 I X 因子配列を含む、単離された第 I X 因子融合タンパク質を提供する。このような配列同一性を有する第 I X 因子はさらに、少なくとも約 100 ～ 約 3000 のアミノ酸残基を有する伸長組換えポリペプチド (X T E N) に連結される。一実施態様において、X T E N は、F I X C F または F V I I C F の C 末端に連結される。いくつかの実施態様において、本発明は、表 2 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 % 同一である第 V I I 因子を含む、単離された第 V I I 因子融合タンパク質を提供する。このような配列を有する第 V I I 因子は、伸長組換えポリペプチド (X T E N) に連結される。

30

【0009】

単一の X T E N に連結された単一の F I X または単一の F V I I を有する C F X T E N に関する非限定例を表 41 に呈する。一実施態様において、本発明は、表 41 由来の C F X T E N と比較して少なくとも約 80 % の配列同一性を、あるいは表 41 由来の C F X T E N と比較して少なくとも約 81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または約 100 % の配列同一性を有する C F X T E N 組成物を提供する。いくつかの実施態様において、融合タンパク質の C F および X T E N 構成要素は、内在性哺乳類プロテアーゼを含むプロテアーゼによって開裂可能な開裂配列を介して連結される。このようなプロテアーゼの例には、F X I a、F X I I a、カリクレイン、F V I I a、F I X a、F X a、トロンビン、エラスターゼ - 2、グランザイム B、M M P - 12、M M P - 13、M M P - 17、もしくは M M P - 20、T E V、エンテロキナーゼ、リノウイルス 3 C プロテアーゼ、およびソルターゼ A、または表 7 から選択される配列が

40

50

挙げられるが、これらに限定されない。一実施態様において、開裂配列を有するC F X T E N組成物組成物は、表4 2由来のC F X T E Nと比較して少なくとも約8 0 %の配列同一性を、あるいは、表4 2由来のC F X T E Nと比較して少なくとも約8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または約1 0 0 %の配列同一性を有する配列を有する。しかしながら、本発明はまた、表1もしくは表2の任意のC F配列と表4 2の配列におけるC Fとの置換、および表4の任意のX T E N配列と表4 2の配列におけるX T E Nとの置換、および表7の任意の開裂配列と表4 2の配列における開裂配列との置換を提供する。開裂配列を有するC F X T E N実施態様において、プロテアーゼによる開裂配列の開裂は、C FからX T E Nを放出する。先のいくつかの実施態様において、C F構成要素は、生物学的に活性となるかまたは、開裂配列の開裂によるX T E Nからのその放出の際に活性の増大を有し、この場合、前駆凝固因子活性は、X T E Nに連結されていない相応のF I XまたはF V I Iと比較して、少なくとも約3 0 %、または少なくとも約4 0 %、または少なくとも約5 0 %、または少なくとも約6 0 %、または少なくとも約7 0 %、または少なくとも約8 0 %、または少なくとも約9 0 %である。

【0 0 1 0】

本発明は、第一のX T E Nと同一であり得また異なり得る約3 6～約3 0 0 0のアミノ酸残基の第二のX T E Nを含む、単離されたC F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、第二のX T E Nは、C Fの任意の2つの隣接したドメイン間に、すなわち、G l a、E F G 1、E G F 2、活性化ペプチド、およびプロテアーゼドメイン間に組み込まれることができ、または、実施例においてより完全に説明されるように、C Fのドメイン配列の既存のループドメインの配列内に組み込まれる。一実施態様において、第一および第二のX T E Nは、表4もしくは表9～1 3の任意の1つから選択されるアミノ酸配列であり得、または表4および表9～1 3から選択される配列と比較して少なくとも約8 0 %、もしくは少なくとも約9 0 %、もしくは少なくとも約9 1 %、もしくは少なくとも約9 2 %、もしくは少なくとも約9 3 %、もしくは少なくとも約9 4 %、もしくは少なくとも約9 5 %、もしくは少なくとも約9 6 %、もしくは少なくとも約9 7 %、もしくは少なくとも約9 8 %、もしくは少なくとも約9 9 %配列同一性を呈することができる。別の実施態様において、単離された融合タンパク質は、約3 6～約3 0 0 0のアミノ酸残基の第二のX T E Nを含む。融合タンパク質は、表6の多重X T E N立体配置またはその変形を採用することができる。

【0 0 1 1】

本発明は、同じかまたは異なる前駆凝固因子プロテアーゼによって開裂可能な1以上の異種性開裂配列を含む第V I I因子に連結されたX T E Nを含むC F X T E N組成物を提供する。先のいくつかの実施態様において、第V I I因子は、F V I I配列の一部に組み込まれまたは該一部と置換された第X I因子の異種性配列を含み、結果的に、第V I I因子-第I X因子複合体配列変異形を生じる。いくつかの実施態様において、F I Xの活性化ペプチドドメイン由来の配列の一部または全部は、E F G 2とF V I I構成要素のプロテアーゼドメインとの間の領域を架橋するF V I I配列に組み込まれまたは該配列と置換され、結果的に、凝固カスケードの内在性の系の一部として活性化されることのできる組成物を生じる（例えば、活性化型第X I因子）。このような場合、第V I I因子-第I X因子C F X T E N組成物は、組織因子の不在下で前駆凝固因子プロテアーゼによって活性化されることができ、それにより、第V I I I因子および第I X因子が（例えば、血友病Aまたは血友病Bにおいて）欠失する場合、またはこれらの因子に対する阻害薬が存在する場合、C F X T E Nは、内在性の凝固経路におけるこのような因子の迂回路として機能することができる。一実施態様において、F V I I - F I X配列変異形は、全長のF I X A Pドメインに加え、F I X A PドメインのR 1 4 5 - A 1 4 6開裂部位およびR 1 8 0 - V 1 8 1開裂部位の片側または両側における隣接するアミノ酸残基と隣接する少なくとも約2の、または少なくとも約3の、または少なくとも約4の、または少なくとも約5の、または少なくとも約6の、または少なくとも約7の、または少なくとも約8の、ま

たは少なくとも約 9 の、または少なくとも約 10 の、または少なくとも約 11 の、または少なくとも約 12 の、またはそれより多くのアミノ酸を組み込む（例えば、N 末端側の 12 の隣接するアミノ酸および C 末端側の 5 の隣接するアミノ酸の場合の配列 R V S V S Q T S K L T R A E T V F P D V D Y V N S T E A E T I L D N I T Q S T Q S F N D F T R V V G G E（配列番号 1））。

【0012】

別の実施態様において、C F X T E N F V I I - F I X 配列変異形は、最適に整列した場合、配列 K L T R A E T V F P D V D Y V N S T E A E T I L D N I T Q S T Q S F N D F T R V（配列番号 2）と比較して少なくとも少なくとも約 80 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または 100 % の同一性を呈する異種性の F I X 配列を含む。

10

【0013】

他の実施態様において、C F X T E N は、R 1 4 5 - A 1 4 6 開裂部位の片側または両側と隣接する少なくとも約 2 の、または少なくとも約 3 の、または少なくとも約 4 の、または少なくとも約 5 の、またはより多くのアミノ酸の配列（例えば、開裂部位のいずれかの側の 6 の隣接するアミノ酸の場合の配列 T S K L T R A E T V F P（配列番号 3））を、あるいは R 1 8 0 - V 1 8 1 開裂部位の片側または両側と隣接する少なくとも約 2 の、または少なくとも約 3 の、または少なくとも約 4 の、または少なくとも約 5 の、またはそれより多くのアミノ酸の配列（例えば、該配列ならびに、N 末端の隣接部の 4 のアミノ酸および F I X 由来の開裂部位の C 末端としてのバリンの場合の D F T R V（配列番号 4））を含む F I X A P の一部を組み込む F V I I - F I X 配列変異形を含む。先の一実施態様において、C F X T E N F V I I - F I X 配列変異形は、最適に整列した場合、T S K L T R A E T V F P（配列番号 3）および F N D F T R V（配列番号 5）から選択される配列と比較して、少なくとも少なくとも約 80 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 91 %、または少なくとも約 92 %、または少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または 100 % の同一性を呈する異種性の F I X 配列を含む。

20

30

【0014】

別の実施態様において、C F X T E N は、融合タンパク質の F V I I 構成要素の C 末端と X T E N 構成要素との間のリンカーと同じ A P 開裂配列をさらに含む先に開示された F V I I - F I X 配列変異形、例えば F V I I 変異形 - A P 配列 - X T E N の N 末端から C 末端への立体配置を含み、それにより F V I I から F V I I a への移行の構成要素につき同じ前駆凝固因子プロテアーゼによって開裂される場合、C F X T E N 融合タンパク質からの F V I I 変異形構成要素の放出を可能にする。一実施態様において、任意の先の実施態様の F V I I - F I X C F X T E N には、F V I I - F I X 配列と X T E N との間のリンカーとしての第 X I 因子開裂配列 K L T R A E T（配列番号 6）を含み、それにより内在性の凝固カスケードの開始によって C F X T E N 融合タンパク質からの F V I I 変異形構成要素の放出を可能にする。一実施態様において、本発明は、C F X T E N に、表 4 3 由来の配列と比較して少なくとも約 80 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を呈する F V I I - F I X 複合体配列を提供する。他の実施態様において、本発明は、X T E N に連結されていない組み込まれた F I X に由来する A P 開裂配列を F V I I - F I X 配列に提供する。一実施態様において、X T E N を有さない F V I I - F I X 配列は、X T E N を有さない表 4 3 由来の配列と比較して、少なくとも約 80 %、または少なくとも約 85 %、または少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 %、または少なくとも約 96 %、または少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 %

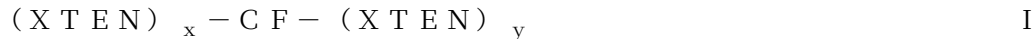
40

50

の配列同一性を呈する。

【0015】

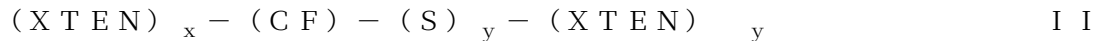
C F X T E N組成物の一実施態様において、本発明は、式 I :



の融合タンパク質を提供し、式中、各発生について独立して、C Fは凝固因子であり；xは0または1のいずれかであり、かつyは0または1のいずれかであり、式中、 $x + y \geq 1$ であり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチド(X T E N)である。

【0016】

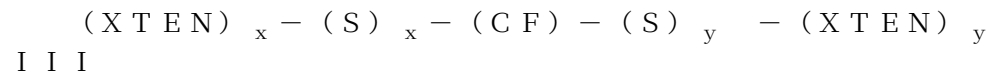
C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式 I I :



の融合タンパク質を提供し、式中、各発生について独立して、C Fは凝固因子であり；Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；xは0または1のいずれかであり、かつyは0または1のいずれかであり、式中、 $x + y \geq 1$ であり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチドである。

【0017】

C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、単離された融合タンパク質を提供し、この場合、融合タンパク質は、式 I I I :



に属し、式中、各発生について独立して、C Fは凝固因子であり；Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；xは0または1のいずれかであり、かつyは0または1のいずれかであり、式中、 $x + y \geq 1$ であり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチドである。

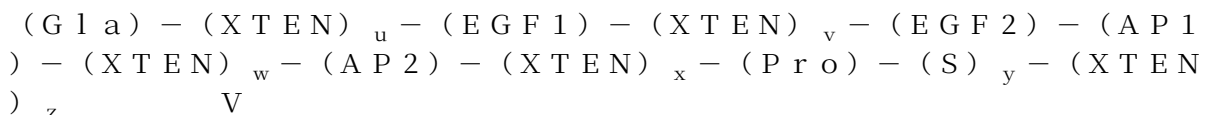
【0018】

C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式 I V :

$(G l a) - (X T E N)_u - (E G F 1) - (X T E N)_v - (E G F 2) - (X T E N)_w - (A P) - (X T E N)_x - (P r o) - (S)_y - (X T E N)_z \quad I V$ の単離された融合タンパク質を提供し、式中、各発生について独立して、G l aは、F I XのG l aドメインであり；E G F 1は、F I XのE G F 1ドメインであり；E G F 2は、F I XのE G F 2ドメインであり；A Pは、F I Xの活性化因子ペプチドであり；P R Oは、F I Xのプロテアーゼドメインであり；Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；uは0または1のいずれかであり；vは0または1のいずれかであり；xは0または1のいずれかであり；yは0または1のいずれかであり；zは0または1のいずれかであり、ただし、 $u + v + w + x + z \geq 1$ という条件付きであり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチドである。

【0019】

C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式 V :



の単離された融合タンパク質を提供し、式中、各発生について独立して、G l aは、F I XのG l aドメインであり；E G F 1は、F I XのE G F 1ドメインであり；E G F 2は、F I XのE G F 2ドメインであり；A Pは、A Pドメインの第一の天然開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのN末端配列部分であり；P R Oは、F I Xのプロテアーゼドメインであり；Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；uは0または1のいずれかであり；vは0または1のいずれかであり；xは0または1のいずれかであり；yは0または1のいずれかであり；zは0または1のいずれかであり、ただし、 $u + v + w + x + z \geq 1$ という条件付きであり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチドである。

【0020】

10

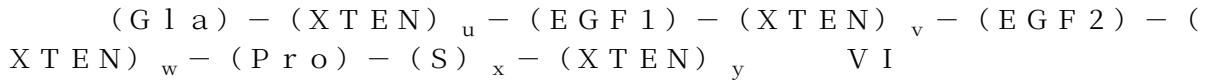
20

30

40

50

C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式V I :

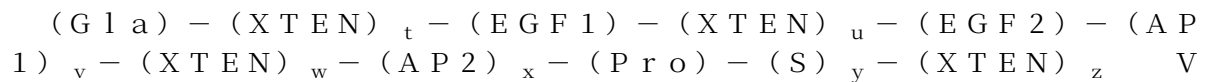


の単離された融合タンパク質を提供し、式中、各発生について独立して、G l aは、F V I IのG l aドメインであり；E G F 1は、F V I IのE G F 1ドメインであり；E G F 2は、F V I IのE F G 2ドメインであり；P R Oは、F V I Iのプロテアーゼドメインであり；Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；uは0または1のいずれかであり；vは0または1のいずれかであり；xは0または1のいずれかであり；yは0または1のいずれかであり、ただし、 $u + v + w + y \geq 1$ という条件付きであり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチドである。

10

【0021】

C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式V I I :



V I Iの単離された融合タンパク質を提供し、式中、各発生について独立して、G l aは、F V I IのG l aドメインであり；E G F 1は、F V I IのE G F 1ドメインであり；E G F 2は、F V I IのE F G 2ドメインであり；P R Oは、F V I Iのプロテアーゼドメインであり；A P 1は、天然の開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのN末端配列部分であり；A P 2は、天然開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのC末端配列部分であり；Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり；tは0または1のいずれかであり；uは0または1のいずれかであり；vは0または1のいずれかであり；xは0または1のいずれかであり；yは0または1のいずれかであり；zは0または1のいずれかであり、ただし、 $t + u + w + z \geq 1$ という条件付きであり；かつX T E Nは伸長組換えポリペプチドである。本実施態様において、C F X T E N組成物には、先により完全に説明した通り、F I X活性化因子ペプチドドメイン配列の全部または第I X因子の活性化因子ペプチドドメイン由来の片側のもしくは両方の開裂配列、例えば、R 1 4 5 - A 1 4 6開裂部位と隣接する少なくとも約3～約12のアミノ酸の配列、およびR 1 8 0 - V 1 8 1開裂部位と隣接する少なくとも約1～約5のアミノ酸の配列を含むことができる。また、本発明は、A P開裂配列について表7のその他の任意の開裂配列の置換を意図する。

20

30

【0022】

本明細書に説明される実施態様のC F X T E N組成物は、本明細書に開示された任意の適切なインビトロアッセイを用いて活性の保持について評価され、凝固因子関連の疾患、障害、または容態の治療における治療薬としての使用のための立体配座の好適性を判定することができる。一実施態様において、C F X T E Nは、X T E Nに連結されていない天然C Fと比較して、少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の活性を呈する。別の実施態様において、C F構成要素およびX T E N構成要素を連結する組み込まれた開裂配列の酵素開裂によってC F X T E Nから放出されたC F構成要素は、X T E Nに連結されていない天然C Fと比較して、少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または

40

【0023】

C F X T E N組成物のX T E Nは、少なくとも約200の、または少なくとも約400の、または少なくとも約800の、または少なくとも約900の、または少なくとも約1000の、または少なくとも約2000の、最大約3000のアミノ酸残基を有する。C F X T E N融合タンパク質組成物のX T E Nは、以下の特徴の1以上を有することを特徴とする：(a) 表4に示される配列から選択されるアミノ酸配列の同等な長さで少なくとも約90%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%の同一性を呈する少なくとも約200の連続的なアミノ酸を含み；(b) X T E N配列は、T E P I T O P Eアルゴリズムによって分析される場合、予測されるT細胞

50

エピトープを欠失し、この場合、X T E N配列内のエピトープについてのT E P I T O P Eアルゴリズム予測は、－5、または－6、または－7、または－8、または－9、またはそれより大きなスコアに基づいており；（c）X T E Nは、10未満、または9未満、または8未満、または7未満、または6未満、または5未満、またはさらにより少ないサブシーケンススコアを有し；（d）アスパラギン残基およびグルタミン残基の合計は、X T E Nの全アミノ酸配列の10％未満であり；（e）メチオニン残基およびトリプトファン残基の合計は、X T E Nの全アミノ酸配列の2％未満であり；（f）X T E Nは、G O Rアルゴリズムによって決定される時、90％超のランダムコイル形成、または約95％、または約96％、または約97％、または約98％、または約99％のランダムコイル形成を有し；（g）X T E N配列は、C h o u - F a s m a nアルゴリズムによって決定される時、2％未満のアルファヘリックスおよび2％未満のベータ-シートを有し；ならびに（h）グリシン（G）残基、アラニン（A）残基、セリン（S）残基、トレオニン（T）残基、グルタミン酸（E）残基、およびプロリン（P）残基の合計は、X T E Nの全アミノ酸残基の約90％超、または約95％、または約96％、または約97％、または約98％、または約99％を構成する。

10

【0024】

別の実施態様において、本発明は、C F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、X T E Nは、アスパラギン残基およびグルタミン残基の合計が、X T E Nの全アミノ酸配列の10％未満であり、メチオニン残基およびトリプトファン残基の合計が、X T E Nの全アミノ酸配列の2％未満であり、X T E N配列が、正の電荷を有する5％未満のアミノ酸残基を有し、X T E N配列が、G O Rアルゴリズムによって決定される時、90％超のランダムコイル形成、または約95％、または約96％、または約97％、または約98％、または約99％のランダムコイル形成を有し；ならびにX T E N配列が、C h o u - F a s m a nアルゴリズムによって決定される時、2％未満のアルファヘリックスおよび2％未満のベータ-シートを有することを特徴とする。いくつかの実施態様において、いずれの種類のアミノ酸も、C F X T E NのX T E N配列の30％超を構成しない。

20

【0025】

別の実施態様において、本発明は、C F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、X T E Nは、X T E N配列の少なくとも約80％、または少なくとも約90％、または少なくとも約91％、または少なくとも約92％、または少なくとも約93％、または少なくとも約94％、または少なくとも約95％、または少なくとも約96％、または少なくとも約97％、または少なくとも約98％、または少なくとも約99％が、非重複配列モチーフからなり、この場合、各配列モチーフが約9～約14のアミノ酸残基を有し、かつ、この場合、任意の2つの連続したアミノ酸残基の配列が、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択される4～6種類のアミノ酸からなることを特徴とする。一実施態様において、X T E Nは、X T E N配列の少なくとも約80％、または少なくとも約90％、または少なくとも約91％、または少なくとも約92％、または少なくとも約93％、または少なくとも約94％、または少なくとも約95％、または少なくとも約96％、または少なくとも約97％、または少なくとも約98％、または少なくとも約99％が、非重複配列モチーフからなり、この場合、モチーフが表3から選択されることを特徴とする。

30

40

【0026】

いくつかの実施態様において、X T E Nは、3つの連続したアミノ酸がセリンでない限り（該アミノ酸がセリンである場合、3以下の連続したアミノ酸がセリン残基である。）該アミノ酸が同一ではない配列を有する。他の実施態様において、C F X T E NのX T E N構成要素は、10未満、または9未満、または8未満、または7未満、または6未満、または5未満、またはそれより少ないサブシーケンススコアを有する。本段落の実施態様において、X T E Nは、「実質的に非反復性」として特徴づけられる。

【0027】

いくつかの実施態様において、本発明は、少なくとも1つの第二のX T E Nを含むC F

50

X T E Nを提供し、この場合、X T E N配列は、表4、表9、表10、表11、表12、または表13由来の配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を呈する。

【0028】

いくつかの実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、X T E Nに連結されていないC Fと比較して高い薬物動態特性を呈し、この場合、高い特性には、より長い終末半減期、より大きな曲線下面積、血中濃度が治療域 (t h e r a p e u t i c w i n d o w) 内に留まる時間の延長、治療域内の血中濃度を結果として生じる連続用量間の時間の延長、およびX T E Nに連結されていないC Fと比較して投与することができ、なおもまだ、該組成物についての治療域内の血中濃度を結果的に生じる経時的なモル用量の減少が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、対象に投与されたC F X T E N融合タンパク質の終末半減期は、X T E Nに連結されていないC Fと比較して少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約8倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約20倍、または少なくとも約40倍、または少なくとも約60倍、または少なくとも約100倍、またはさらにより長く延長し、対象に同等な用量で投与される。他の実施態様において、対象に投与されるC F X T E N融合タンパク質の終末半減期は、少なくとも約12時間、または少なくとも約24時間、または少なくとも約48時間、または少なくとも約72時間、または少なくとも約96時間、または少なくとも約120時間、または少なくとも約144時間、または少なくとも約21日間、またはそれより長い。他の実施態様において、高い薬物動態特性は、所与の期間についてC F X T E N融合タンパク質についての治療域内に留まる血中濃度が、X T E Nに連結されていないC Fと比較して少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約8倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約20倍、または少なくとも約40倍、または少なくとも約60倍、または少なくとも約100倍であるという事実によって反映され、同等な用量で対象に投与される。半減期および治療域内で経過する時間の延長は、X T E Nに連結されていない相応のC Fと比較して、対象に投与される融合タンパク質のあまり頻繁ではない投薬および少ない量 (モル当量) を可能にする。一実施態様において、治療有効量の投与計画を用いる対象へのC F X T E Nの投与は結果的に、X T E Mに連結されていない相応のC Fと比較して融合タンパク質の血中レベルについての少なくとも2つの連続した C_{max} ピークおよび/または C_{min} 谷部の間で少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも4倍、または少なくとも5倍、または少なくとも6倍、または少なくとも8倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも40倍、または少なくとも60倍、または少なくとも約100倍、またはそれより長い時間の延長を生じ、対象に同等な用量投与計画を用いて投与される。

【0029】

いくつかの実施態様において、X T E Nは、X T E Nに連結される場合にC Fの熱安定性を高め、この場合、熱安定性は、X T E Nに連結されていない生物活性のあるタンパク質と比較して生物活性のあるタンパク質の37℃の温度への少なくとも約7日間の曝露後に生物活性の保持を測定することによって確認される。先の一実施態様において、生物活性の保持は、X T E Nに連結されていないC Fと比較して少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、または約150%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、または約500%長く延長する。

【0030】

いくつかの実施態様において、単離されたC F X T E N融合タンパク質は、X T E Nに

連結されていない相応のC Fと比較してクリアランス受容体に対する低い結合親和性を有するよう形成される。一実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応のC Fの結合親和性の約0.01%~30%、または約0.1%~約20%、または約1%~約15%、または約2%~約10%の範囲で、C Fのクリアランス受容体に対する結合親和性を呈する。別の実施態様において、低い親和性を有するC F X T E N融合タンパク質は、活発なクリアランスの低下および、X T E Nに連結されていない相応のC Fと比較して少なくとも約3倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約7倍、または少なくとも約8倍、または少なくとも約9倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約12倍、または少なくとも約15倍、または少なくとも約17倍、または少なくとも約20倍、または少なくとも約30倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約100倍長い半減期の相応の延長を有することができる。

10

【0031】

いくつかの実施態様において、本発明は、C F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、C F X T E Nは、X T E Nに連結されていないC Fと比較して生理学的条件において少なくとも3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約7倍、または少なくとも約8倍、または少なくとも約9倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約15倍、または少なくとも20倍、または少なくとも40倍、または少なくとも60倍の高い溶解度を呈する。

20

【0032】

いくつかの実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、実際の分子量と比較して、分子ふるいクロマトグラフィーによって決定される時、大きな見かけの分子量を呈する。いくつかの実施態様において、F I Xおよび少なくとも1つの第一のX T E Nを含むC Fは、少なくとも約400kD、または少なくとも約500kD、または少なくとも約700kD、または少なくとも約1000kD、または少なくとも約1400kD、または少なくとも約1600kD、または少なくとも約1800kD、または少なくとも約2000kDの見かけの分子量を呈するのに対し、融合タンパク質の各F I X構成要素の実際の分子量は、約50kDであり、融合タンパク質の分子量は約70~約125kDaの範囲である。他の実施多様において、F V I Iと少なくとも1つの第一のX T E Nとを含むC Fは、少なくとも約400kD、または少なくとも約500kD、または少なくとも約700kD、または少なくとも約1000kD、または少なくとも約1400kD、または少なくとも約1600kD、または少なくとも約1800kD、または少なくとも約2000kDの見かけの分子量を呈するのに対し、融合タンパク質の各F I X構成要素の実際の分子量は、約50kDであり、融合タンパク質の分子量は、約70~約125kDの範囲である。したがって、C F X T E N融合タンパク質は、該融合タンパク質の実際の分子量よりも約6倍大きい、または約8倍大きい、または約10倍大きい、または約12倍大きい、または約15倍大きい見かけの分子量を有することができる。いくつかの場合、本明細書に開示される任意の実施態様の単離されたC F X T E N融合タンパク質は、約4よりも大きい、または約5、または約6、または約7、または約8、または約10、または約15よりも大きい生理学的条件下で見かけの分子量因子を呈する。

30

40

【0033】

いくつかの実施態様において、式I~V I Iのうちの1つの治療有効量の融合タンパク質の投与を必要とする対象への該投与は結果的に、X T E Nに連結されていない相応のC Fと比較されおよび対象に同等な用量で投与される融合タンパク質についての治療域内で経過する少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも4倍、または少なくとも5倍、またはそれより多くの時間の延長を生じることができる。他の場合、式I~V I Iの実施態様の治療有効量の融合タンパク質の投与を必要とする対象への該投与は結果的に、X T E Nに連結されていないC Fと比較されおよび同等な用量で投与される連続した用量間で少なくとも48時間、または少なくとも72時間、または少なくとも約96時間、または少なくとも約120時間、または少なくとも約7日間、または少なくとも約1

50

4日間、または少なくとも約21日間の治療有効量投与計画を維持するのに必要な連続した用量間の時間の延長を生じることができる。

【0034】

開示された組成物の融合タンパク質は、CFおよびXTENおよび任意のスペーサー配列のN末端からC末端への異なる立体配置を有するよう設計されることができ、該立体配置には、XTEN-CF、CF-XTEN、XTEN-S-CF、CF-S-XTEN、XTEN-CF-XTEN、CF-CF-XTEN、XTEN-CF-CF、CF-S-CF-XTEN、XTEN-CF-S-CF、およびこれらの多量体が挙げられるが、それらに限定されない。立体配置の選択は、本明細書に開示されるように、組み込まれた開裂配列の場合の活性の同時増大を伴うCFの放出を含む特定の薬物動態特性、物理／化学特性、または薬理学的特性を与えることができる。

10

【0035】

いくつかの実施態様において、CFXTEN融合タンパク質は、以下を特徴とする：(i) 他は等価な用量の下で対象に投与されるXTENに連結されていない相応の凝固因子と比較して、対象に投与される場合、より長い半減期を有し；(ii) より小さな分子量の融合タンパク質が、他は等価な用量投与計画の下で対象に投与されるXTENを欠失する相応の凝固因子と比較して対象に投与される場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応の凝固因子として同等な曲線下面積(AUC)に到達し；(iii) より小さなモル量の融合タンパク質が、他は等価な用量投与計画の下で対象に投与されるXTENを欠失する相応の凝固因子と比較して対象に投与される場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応の凝固因子として同等な治療効果を達成し；(iv) 融合タンパク質が、他は等価なモル量を用いて対象に投与されるXTENに連結されていない相応の凝固因子と比較して、あまり頻繁に対象に投与されない場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応の凝固因子として同等な曲線下面積(AUC)に到達し；(v) 融合タンパク質が、他は等価なモル量を用いて対象に投与されるXTENに連結されていない相応の凝固因子と比較してあまり頻繁に対象に投与されない場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応の凝固因子として同等な治療効果を達成し；(vi) 他は等価な投薬期間の下で対象に投与されるXTENに連結されていない相応の凝固因子と比較して、累積的により小さなモル量の融合タンパク質が対象に投与される場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応の凝固因子として同等な曲線下面積(AUC)に到達し；または(vii) 他は等価な投薬期間の下で対象に投与されるXTENに連結されていない相応の凝固因子と比較して、累積的により小さなモル量の融合タンパク質が対象に投与される場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応の凝固因子として同等な治療効果を達成する。

20

30

【0036】

本発明は、以下を含む、1つ以上の伸長組換えポリペプチド(XTEN)に融合した第VII因子または第IX因子または第VII因子-第IX因子複合体凝固因子を含む融合タンパク質を生成する方法を提供する：(a) 融合タンパク質をコードする組換えポリヌクレオチド分子を含む宿主細胞を提供すること(b) 該宿主細胞を、融合タンパク質の発現を可能にする条件下で培養すること；および(c) 融合タンパク質を培養物から回収すること。本方法の一実施態様において、融合タンパク質の凝固因子は、表1または表2から選択される配列と比較して少なくとも90%の配列同一性を有する。本方法の別の実施態様において、発現した融合タンパク質の1つ以上のXTENは、表4から選択された配列と比較して少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%～約100%の配列同一性を有する。本方法の別の実施態様において、宿主細胞は真核細胞である。本方法の別の実施態様において、宿主細胞はCHO細胞である。本方法の別の実施態様において、単離された融合タンパク質は、宿主細胞の実質的に可溶性形態の細胞質から回収される。

40

【0037】

50

本発明は、(a) 任意の先の実施態様の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、または(b) (a) のポリヌクレオチドの相補体から選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。一実施態様において、本発明は、(a) 表41および表42から選択される同等な長さのポリヌクレオチド配列と比較して；または(b) (a) のポリヌクレオチドの相補体と比較して、80%の配列同一性、または約85%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%～約100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。本発明は、本段落に説明される先の任意の実施態様の核酸を含む発現ベクターを提供する。一実施態様において、上述の発現ベクターはさらに、該ポリヌクレオチド配列に操作可能に連結された組換え調節配列を含む。別の実施態様において、上述の発現ベクターのポリヌクレオチド配列は、CF天然シグナル配列であり得る分泌シグナル配列をコードするポリヌクレオチドにフレーム内で融合する。本発明は、本段落において説明される先の任意の実施態様の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。一実施態様において、宿主細胞は真核細胞である。別の実施態様において、宿主細胞はCHO細胞である。別の実施態様において、宿主細胞はHEK細胞である。

【0038】

一実施態様において、本発明は、上述の任意の実施態様の融合タンパク質と医薬として許容し得る担体とを含む医薬組成物を提供する。別の実施態様において、本発明は、包装材料と、上述の実施態様の医薬組成物と医薬組成物ならびに保管条件および取り扱い条件を同定する標識とを含む少なくとも1つの第一の容器と、医薬組成物の再構成および／または医薬組成物の対象への投与についての説明のシートとを含むキットを提供する。

【0039】

本発明は、対象に、治療有効量の上述の任意の実施態様のCFXTEN融合タンパク質を投与することを含む、対象における凝固障害または凝固因子に関連した疾患、障害、もしくは容態を治療する方法を提供する。本方法の一実施態様において、凝固因子関連容態は、出血性障害（例えば、欠陥性血小板機能、血小板減少、またはフォンウィルブランド病）、凝固障害（凝固因子欠乏を含む血液凝固に関する任意の障害）、血友病B（別名クリスマス病）、第IX因子関連出血性障害、第VIII因子欠乏、血友病A、脈管損傷、血友病に苦しんでいない対象における制御されていない出血、外傷もしくは手術に由来する出血、抗凝固薬両方による出血、および肝疾患による出血から選択される。治療方法の一実施態様において、凝固障害は血友病Aである。治療方法の一実施態様において、凝固障害は血友病Bである。治療方法の別の実施態様において、凝固障害は第VIII因子欠乏である。治療方法の別の実施態様において、CFXTENは、出血症状を制御するために対象に投与される。治療方法の別の実施態様において、第VIII因子-第IX因子配列複合体を含むCFXTENは、出血症状を制御するために対象に投与され、この場合、CFXTENは、内在性の凝固カスケードの前駆凝固因子プロテアーゼ（例えば、活性化型第XI因子）によって活性化される。別の実施態様において、本発明は、以下を含む、対象における凝固因子欠乏を治療する方法を提供する：該対象に、本明細書に提供される治療有効量の第VIII因子を含む組成物を投与すること。

【0040】

いくつかの実施態様において、組成物は、皮下的に、筋肉内に、または静脈内に投与されることができる。一実施態様において、組成物は、治療有効量で投与され、この場合、投与は、XTENに連結されていない融合タンパク質の相応のCFと比較されおよび対象に同等な用量で投与される融合タンパク質についての治療域内で経過する時間の延長を結果的に生じる。治療域内で経過する時間の延長は、XTENに連結されていない相応のCFよりも少なくとも3倍長くあり得、またはそれに代わるものとして、XTENに連結されていない相応のCFよりも少なくとも4倍、または5倍、または6倍、または7倍、または8倍、または9倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも約30倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約100倍長くあり得る

。治療方法のいくつかの実施態様において、(i) 別の同一の用量投与計画の下で、X T E Nに連結されていない相応の凝固因子と比較して、より小さなモル量（例えば、約2倍未満、または約3倍未満、または約4倍未満、または約5倍未満、または約6倍未満、または約8倍未満、または約100倍未満、またはそれより大きい）の融合タンパク質が投与され、融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応の凝固因子として同等な曲線下面積および／または同等な治療効果を達成し；(i i) 融合タンパク質は、別の同一の用量の下で、X T E Nに連結されていない相応の凝固因子と比較してあまり頻繁に投与されず（例えば、2日ごと、約7日ごと、約14日ごと、約21日ごと、または約毎月）、融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応の凝固因子として同等な曲線下面積および／または同等な治療効果を達成し；あるいは(i i i) 別の同一の用量投与計画の下でX T E Nに連結されていない相応の凝固因子と比較して、累積的なより小さなモル量（例えば、約5%、または約10%、または約20%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%未満）の融合タンパク質が投与され、融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応の凝固因子として同等な曲線下面積および／または同等な治療効果を達成する。累積的なより小さなモル量は、少なくとも約1週間、または約14日間、または約21日間、または約1ヶ月間の期間に測定される。治療方法のいくつかの実施態様において、治療効果は、凝固因子の血中濃度、プロトロンビン(P T) アッセイ、活性化型部分プロトロンビン(a P T T) アッセイ、出血時間アッセイ、全血凝固時間(W B C T)、および血栓弾性描写法から選択される測定されたパラメータである。

【0041】

別の実施態様において、本発明は、先に説明した医薬組成物を対象に、治療有効量投与計画を用いて投与される複数回の連続した用量の医薬組成物を用いて投与することを含む、疾患、障害、または容態を治療する方法を提供する。上述の一実施態様において、治療有効量投与計画は結果的に、融合タンパク質に連結されていない融合タンパク質の相応のC Fと比較され、対象に同等な用量投与計画で投与される融合タンパク質の血中レベルについて少なくとも2つの連続したC_{m a x}ピークおよび／またはC_{m i n}谷部の間で少なくとも3倍、またはそれに代わるものとして、少なくとも4倍、または5倍、または6倍、または7倍、または8倍、または9倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも約30倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約100倍長い時間の延長を生じることができる。上述の別の実施態様において、融合タンパク質の投与は結果的に、融合タンパク質に連結されていない相応の生物活性のあるタンパク質構成要素（複数可）と比較され、対象dに治療有効量の投与計画を用いて対象に投与される医薬組成物の融合タンパク質のモルであり頻繁でない投薬またはより低い合計薬用量を用いて、凝固因子関連疾患の少なくとも1つの測定されるパラメータの改良を生じる。

【0042】

本発明はさらに、疾患、障害、または容態を治療することを必要とする対象における疾患、障害、または容態を治療するための薬剤の調製における上述の任意の実施態様の融合タンパク質を含む組成物の使用を提供する。上述の一実施態様において、該疾患、障害、または容態は、出血性障害、凝固障害、血友病B（別名クリスマス病）、第I X因子関連出血性障害、第V I I因子欠乏、脈管損傷、外傷もしくは手術に由来する出血、抗凝固薬療法による出血、および肝疾患からなる群から選択される。開示された任意の実施態様は、単独で、または関心出願に応じた組み合わせで実施されることができる。

【0043】

（引用による組み込み）

本明細書において記載されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、各個々の刊行物、特許、または特許出願が、引用により組み込まれるよう具体的かつ個々に示されたのと同じ程度まで、引用により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

本発明の特長および利点は、実例となる実施態様を示す以下の詳細な説明および添付の図によってさらに説明され得る。

【図1】図1は、例示的なCFXTEN (FIX-XTEN) 融合タンパク質の模式図を示す。図1のAは、ガンマーカルボキシグルタミン酸ドメイン、EGF1ドメインおよびEGF2ドメイン、活性化ペプチド、およびプロテアーゼドメインを有する天然FIXのドメイン構造を示し、連結されたXTENがC末端にある。矢印は、活性化ペプチドドメインのための開裂部位を示す。図1のBは、開裂配列を介してC末端に結合したXTENポリペプチドを有するFIX分子を示し、XTENを放出するためのタンパク質分解性開裂のための部位を示す（矢印は、活性化ペプチドドメインについての開裂部位およびXTENのための放出地点を示す）。

10

【図2】図2は、FIX-XTENのCXTEN立体配置および関連するプロテアーゼ開裂部位のいくつかの例を示す。図2のAは、FIXの活性化ペプチド内の2つのタンパク質分解性分解部位（矢印）と開裂部位連結を有さないC末端XTENとを有するFIX-XTENを示す。図2のBは、図2のAの立体配置と類似しているが、C末端XTENは、開裂配列を介して連結されており、矢印は、放出地点を示す。図2のCは、FIX-XTENの3つの立体配置を示し、XTENは、FIXの種々のドメイン間に組み込まれる。図2のDは、XTEN部分が、FIXのタンパク質分解性活性化の際にXTENを放出するであろう天然分解部位間の活性化ペプチドに挿入された、FIX-XTENを示す。図2のEは、C末端に放出可能なXTENの付加を有する異なるドメイン間に挿入された複数のXTEN配列を含むFIX-XTENを示す。図2のFは、XTENが、FIXのループドメイン内に挿入されたFIX-XTENを示す。

20

【図3】図3は、外来性経路及び内在性経路の両方を示す、凝固カスケードの模式図である。

【図4】図4は、FVII-XTENのCXTEN立体配置のいくつかの例を示す。図4のAは、活性化されなかったFVII-XTENを示す。図4のBは、ペプチドが開裂され、結果的に活性化型FVIIa-XTENを生じるFVII-XTENを示し；図4のCは、FVII構成要素が活性化されなかった放出可能なXTENについての開裂配列を有するFVII-XTEN組成を示し、活性化プロテアーゼ（AP）についての開裂部位および放出プロテアーゼ（RP）についての第二の開裂部位を含む。図4のDは、放出プロテアーゼについての開裂部位を含む活性化型FVIIa-XTENの組成を示す。

30

【図5】図5は、内部XTENを用いるFVII-XTEN設計アプローチについての戦略を示す。図5のA～Dは、左側に不活性化型FVIIを右側にFVIIの活性化型形態を有するFVIIドメインの境界間のXTENの挿入についての例示的な部位を示す（A：GlaとEGF1ドメインの間のXTENの挿入、B：EGF1とEGF2の間のXTENの挿入、C：活性化ペプチドのC末端におけるXTENの挿入、D：活性化ペプチドのN末端におけるXTENの挿入）。図5のEは、XTENが個々のドメイン融合タンパク質内の外部ループ内に配置されるFVII-XTENの例を示し、左側に不活性化型FVIIを、右側にFVIIaを有する。FVIIにおける活性化ペプチドは細い線として示されており、それに対して、XTENは太字として示されている。

40

【図6】図6は、図5と本質的に同じコンストラクトを示すが、XTENは、各コンストラクトのC末端に連結されている。

【図7】図7は、XTENが、凝固因子FVIIまたはFIXの配列に対して内部に挿入できる種々の位置のいくつかを示す模式図である。

【図8】図8は、凝固系の鍵となる構成要素の模式図である。図7のA：兄財政及び外来性のカスケード構成要素を有する通常の凝固系。図7のBは、不活性化型／低活性化型形態のFVII-XTEN (FVII*) が、投与後に内在性に活性化される場合に内在性の系のFIXおよびFVIIの構成要素を迂回するよう意図される変法を示す。

【図9】図9は、pBC0014 CHO-K1形質転換体の初代スクリーニング由来の細胞クラスターの大きさの分布（灰色棒）およびELISAによるFVII ELISA

50

力価 (ng/mL) (黒色棒) のグラフである (不十分な空間により棒の真下に全てのクローンが標識されているわけではなかった) (実験の詳細については実施例 25 参照)。クローンを ELISA の力価に従って、低いから高い (左から右) に分類した。

【図 10】図 10 は、上位の pBC0014 クローンの細胞計数 (白色棒) および FVII 力価 (ng/mL) (黒色棒) のグラフである (実験の詳細については実施例 25 参照)。クローンを ELISA の力価に従って、低いから高い (左から右) に分類した。

【図 11】図 11 は、上位の pBC0014 クローンの FVII 力価と細胞計数の比のグラフである (実験の詳細については実施例 25 参照)。クローンを比に従って、低いから高い (左から右) に分類した。

【図 12】図 12 は、ELISA に従った上位の pBC0014 クローンのウェスタンブロット、凝固、ELISA/細胞計数比、および凝固/細胞計数比である (実験の詳細については実施例 25 参照)。クローン 6G1 は、切りつめられた生成物を発現し、さらには評価されなかった。

10

【図 13】図 13 は、ELISA に従った上位の pBC0016 クローンのウェスタンブロット、凝固、ELISA/細胞計数比、および凝固/細胞計数比である (実験の詳細については実施例 25 参照)。

【図 14】図 14 は、ELISA に従った上位 pBC0018 クローンのウェスタンブロット、凝固、ELISA/細胞計数比、および凝固/細胞計数比である (実験の詳細については実施例 25 参照)。クローン 3B2 は、切りつめられた生成物を発現し、さらには評価されなかった。

20

【図 15】図 15 は、抗 GLA アフィニティークロマトグラフィーによる FVII-AE864 の精製を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。SDS-PAGE 分析は、濃縮された上清からの FVII-AE864 の精製および EDTA により溶出された 90% 超の純度の画分を示す。

【図 16】図 16 は、FXa 処理による FVII-XTEN 融合物から FVIIa-XTEN 融合物への活性化を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。SDS-PAGE 分析は、FXa 処理後の還元条件下での軽鎖バンドの出現を示すが、未処理の試料においては示されない。加えて、軽鎖の損失を示す上部のバンドの下方方向の移行がある。

【図 17】図 17 は、FVII-XTEN 融合物から FVIIa-XTEN 融合部への自己活性化を示す SDS-PAGE を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。SDS-PAGE 分析は、FXa 処理後の、および CaCl_2 による高濃縮での 4℃でのインキュベーション後の還元条件下での軽鎖バンドの出現を示す。加えて、軽鎖の損失を示す上部のバンドの下方方向の移行がある。

30

【図 18】図 18 は、FVII-AE864 および FVII-AE288 の SEC 分析を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。SEC は、最少の混入での単分散の集団、およびカラムの空隙容積 (〜22 mL) に凝集物がないことを示す。

【図 19】図 19 は、陰イオン交換クロマトグラフィーによる FVII-AE864 の精製を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。クロマトグラムは、混入タンパク質よりも遅くに活性のバルクが溶出し、正味 5 倍の精製をなす Macrocap Q カラム由来の全タンパク質含有量および FVII 活性の溶出特性を示す。

40

【図 20】図 20 は、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる FVII-AE864 の精製を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。クロマトグラムは、混入タンパク質よりも早くに活性のバルクが溶出し、正味 2 倍の精製をなすトヨパールフェニルカラム由来の全タンパク質含有量及び FVII 活性の溶出特性を示す。

【図 21】図 21 は、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた単量体 FVII-AE864 からの凝集タンパク質の除去を表す 2 つのクロマトグラフィー出力を示す (実験の詳細については実施例 26 参照)。図 21 の A は、初期のピークと関連した緩衝剤の後に 2 つのピークが溶出するマクロキャップ Q カラム由来の FVII-XTEN 溶出特性を図示するクロマトグラムである。図 21 の B は、初期のピークにおける凝集体の不在を表す初期および後期のマクロキャップ Q の SEC クロマトグラムを示す。

50

【図 2 2】図 2 2 は、F I X / c F X I / X T E N が F I X - X T E N と比較して活性の増大した E L I S A アッセイまたは a P T T アッセイの結果を示す（実験の詳細については実施例 2 9 参照）。一過性に発現した F I X コンストラクトを、E L I S A による抗原含有量について、および a P T T ベースのアッセイによる活性についてアッセイした。F I X - X T E N の抗原含有量は、F I X / c F X I / X T E N コンストラクトと類似していたが、活性は有意に増大した。この増大は、F I X / c T E V / X T E N が F I X - X T E N に対して有意に異なる活性を示さないもので、本アッセイにおける F X I プロテアーゼの特異的作用に起因する。F I X 試料の E L I S A 力価が 1 9 7 n g / m L であり、グラフの尺度を外れることに留意されたい。

【図 2 3】図 2 3 は、実施例 3 0 に説明されるとおり、示されている得られた等価の F V I I 濃度でラットに皮下投与した単回用量後の薬物動態特性を示す。

10

【図 2 4】図 2 4 は、実施例 3 1 に説明されるとおり、示されている得られた等価の F I X 濃度でラットに皮下投与した単回用量後の薬物動態特性を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、実施例 3 9 に説明されるとおり、皮下的または静脈内のいずれかで投与された変動する長さの構造化されていないポリペプチドに連結された G F P の異なる組成物の単回用量後のカニクイザルにおける薬物動態特性（血漿濃度）を示す。組成物は、G F P - L 2 8 8、G F P - L 5 7 6、G F P - X T E N _ A F 5 7 6、G F P - Y 5 7 6、および X T E N _ A D 8 3 6 - G F P であった。血液試料を注射後の種々の時点で分析し、血漿中の G F P の濃度を、捕捉のために G F P に対するポリクローナル抗体と、検出のために同じポリクローナル抗体のビオチン化調製物とを用いた E L I S A によって測定した。結果は、投与後の血漿濃度対時間（時）として呈され、特に、X T E N の最長の配列長を有する組成物である X T E N _ A D 8 3 6 - G F P についての半減期のかなりの延長を示す。最短の配列長を有するコンストラクト G F P - L 2 8 8 は、最短の半減期を有していた。

20

【図 2 6】図 2 6 は、G F P の N 末端に融合した X T E N _ A E 8 6 4 の融合タンパク質の安定性研究からの試料の S D S - P A G E ゲルを示す（実施例 4 0 参照）。G F P - X T E N をカニクイザル血漿およびラット腎臓可溶化液において 3 7 °C で最大 7 日間インキュベートした。加えて、カニクイザルに投与した G F P - X T E N も評価した。試料を 0、1、および 7 日目に引き抜き、S D S P A G E に次いで、G F P に対する抗体を用いるウェスタン分析を用いた検出によって分析した。

30

【図 2 7】図 2 7 は、L C W 5 4 6、L C W 5 4 7、および L C W 5 5 2 由来のクローンの N 末端配列における第三および第四のコドンについて用いられる 3 つの無作為化したライブラリーを示す（実験の詳細については実施例 1 4 参照）。示されるように、第三および第四の残基の位置において許容可能な X T E N コドンのすべての組み合わせが存在するよう修飾した第三および第四の残基を用いてライブラリーを設計した。各ライブラリーについて許容可能な X T E N コドンを含むために、第三および第四の残基のコドン多様性を有する 1 2 のアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドの 9 の対を設計し、アニーリングし、N d e I / B s a I 制限酵素で消化した詰め物ベクター（s f u f f e r v e c t o r）p C W 0 5 5 1 へと連結し（S t u f f e r - X T E N _ A M 8 7 5 - G F P）、大腸菌 B L 2 1 G o l d（D E 3）コンピテント細胞へと形質転換し、3 つのライブラリーのコロニー L C W 0 5 6 9（それぞれ配列番号 7 7 3 および 7 7 4）、L C W 0 5 7 0（それぞれ配列番号 7 7 5 および 7 7 6）、および L C W 0 5 7 1（それぞれ配列番号 7 7 7 および 7 7 8）を得た。

40

【図 2 8】図 2 8 は、基準 C B D _ A M 8 7 5 コンストラクトに対する G F P 蛍光シグナルについての実施例 1 5 において説明されるような最適化工程後の上位 7 5 のクローンの再試験のヒストグラムを示す。本結果は、いくつかのクローンが、基準クローンよりも今や優れていることを示した。

【図 2 9】図 2 9 は、N 末端の 4 8 のアミノ酸の 2 つの領域についてのコドン最適な選択の組み合わせを保証した組み合わせアプローチの模式図である（実験の詳細については実施例 1 6 参照）。本アプローチは、X T E N が C F に対して N 末端である X T E N タンパ

50

ク質の発現についての解決策であり得るリーダー配列を結果として生じる発現の最適化の評価のためのX T E Nタンパク質のN末端における新規の48マーを作製した。

【図30】図30は、実施例17において説明されるように、コンストラクト配列のN末端にC B Dリーダー配列を含む基準X T E Nクローンと比較した、X T E N N末端コドン最適化実験から得られた好ましいクローンの発現を確認するS D S - P A G Eゲルを示す。

【図31】図31は、X T E Nの構築、生成、および評価における代表的な工程の模式的流れ図である。

【図32】図32は、融合タンパク質をコードするC F X T E Nポリヌクレオチドコンストラクトの構築における代表的な工程の模式的流れ図である。個々のオリゴヌクレオチド501を12のアミノ酸モチーフ（「12マー」）などの配列モチーフ502へとアニーリングした後、B b s IおよびK p n I制限部位を含むオリゴと連結させる。ライブラリー由来の追加的な配列モチーフを、X T E N遺伝子504の所望の長さの到達するまで、12マーとアニーリングする。X T E N遺伝子を詰め物ベクターへとクローン化する。この場合、ベクターは、任意のF l a g配列506に続いて、B s a I、B b s I、およびK p n I部位507によって隣接されるストッパー配列をコードし、結果的にX T E N - F V I I融合タンパク質をコードする遺伝子500を生じる。

【図33】図33は、C FおよびX T E Nを含む融合タンパク質をコードする遺伝子の構築、ならびに融合タンパク質としてのその発現および回収、ならびに候補C F X T E N産物としてのその評価における代表的な工程の模式的流れ図である。

【図34】図34は、異なるプロセシング戦略を用いたC F X T E N発現ベクターの設計の模式図である。図34のAは、F V I Iをコードする配列の3'末端に融合したX T E Nをコードする発現ベクターを示す。追加的なリーダー配列がこのベクターに必要とされないことに留意されたい。図7のBは、C B Dリーダー配列およびT E Vプロテアーゼ部位を有するF V I Iをコードする配列の5'末端に融合したX T E Nをコードする発現ベクターを示す。図7のCは、C B DおよびT E Vプロセシング部位が最適化したN末端リーダー配列（N T S）と置き換えられた図7Bにあるような発現ベクターを図示する。図7のDは、N T S配列をコードする発現ベクター、V F I Iをコードする配列、およびX T E Nをコードする第二の配列を図示する。

【図35】図35は、公知の分子量のタンパク質標準物質に対して測定されたグルカゴン-X T E Nコンストラクト試料の分子ふるいクロマトグラフィー分析の結果を示し、グラフは、実施例37に説明されるように、吸光度対保持容積として出力される。グルカゴン-X T E Nコンストラクトは、1) グルカゴン-Y 288; 2) グルカゴン-Y 144; 3) グルカゴン-Y 72; および4) グルカゴン-Y 36である。本結果は、X T E N部分の長さの増大に伴う見かけの分子量の増大を示す。

【図36】図36は、天然F I Xの部分と、天然F V I Iの部分と、E G F 2ドメインおよびP r oドメインにわたる分子の部分に組み込まれたA Pドメインの異なる部分を有するF V I I - F I X配列複合体の部分（それぞれ表示の順に配列番号779~786）との間の配列アラインメントを示す。凡例は、コンストラクト名を提供する。個々の配列における間隙（ダッシュ）は、F I Xと相同的ではないがさもなくば連続した連結された配列のストレッチを表す。下線を付したアミノ酸は、F I X由来の配列である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明の実施態様を説明する前に、このような実施態様が例としてのみ提供され、および本明細書に説明される本発明の実施態様に対する種々の代替物が、本発明を実施する上で採用され得ることは理解されるべきである。数多くの変法、変更、および置き換えを今や、本発明から逸脱せずに当業者は想起するであろう。

【0046】

別段の定義がない限り、本明細書で用いられるすべての技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の当業者によって普遍的に理解されているのと同じ意味を有する。本明

10

20

30

40

50

細書に説明されているものと類似のまたは等価の方法および材料を、本発明の実施または試験において用いることができるが、好適な方法および材料を下記に説明する。矛盾する場合、定義を含む本特許明細書が統制する。加えて、材料、方法、および実施例は、説明に過ぎず、制限しているよう意図するものではない。数多くの変法、変更、および置き換えを今や、本発明から逸脱せずに当業者は想起するであろう。

【0047】

(定義)

本明細書で使用する場合、以下の用語は、別段の指定がない限り、該用語に帰する意味を有する。

【0048】

本明細書および特許請求の範囲において使用する場合、単数形「a」、「an」、および「the」には、文脈が別段に明確に記さない限り、複数の指示を含む。例えば、用語「1つの細胞」には、その混合物を含む複数の細胞を含む。

【0049】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために本明細書で互換可能に用いられる。ポリマーは、直鎖または分岐鎖であり得、修飾されたアミノ酸を含み得、非アミノ酸によって中断され得る。該用語はまた、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または標識成分との抱合などの任意の他の操作によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。

【0050】

本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」は、D型またはL型の光学異性体、およびアミノ酸類似体、およびペプチド模倣体のいずれをも含むがこれらに限定されない天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸もしくは合成アミノ酸のいずれかを指す。標準的な1文字表記または3文字表記を用いて、アミノ酸を明示する。

【0051】

用語「天然L-アミノ酸」は、グリシン(G)、プロリン(P)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、メチオニン(M)、システイン(C)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、ヒスチジン(H)、リシン(K)、アルギニン(R)、グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)、セリン(S)、およびトレオニン(T)のL型の光学異性体形態を意味する。

【0052】

用語配列に適用される場合および本命最初で使用される場合の用語「非天然の」は、哺乳類において見出される野生型配列または天然配列と対応する部分を有しない、該配列と相補的ではない、あるいは高い程度の相同性を有しない、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列を意味する。例えば、非天然のポリペプチドまたは断片は、好適に整列される場合、天然配列と比較して99%以下、98%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、またはそれよりさらに低いアミノ酸配列同一性を共有し得る。

【0053】

用語「親水性」および「疎水性」は、物質が有する水との親和性の程度を指す。親水性物質は、水に対して強い親和性を有し、水に溶解し、水と混合し、または水によって湿潤する傾向にあるのに対し、疎水性物質は、水に溶解し、水と混合し、または水によって湿潤しない傾向にある。アミノ酸は、その疎水性に基づいて特徴付けることができる。いくつかの尺度が開発されている。一例は、Levitt, M, et al., J Mol Biol (1976) 104:59によって開発された尺度であり、Hopp, TP, et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1981) 78:3824に列挙されている。「親水性アミノ酸」の例は、アルギニン、リシン、トレオニン、アラニン、アスパラギン、およびグルタミンである。特に関心対象なのは、親水性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸、およびセリン、およ

10

20

30

40

50

びグリシンである。「疎水性アミノ酸」の例は、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、およびバリンである。

【0054】

「断片」は、治療活性および／または生物活性の少なくとも一部を保有する天然の生物活性のあるタンパク質の切り詰められた形態である。「変異体」は、生物活性のあるタンパク質の治療活性および／または生物活性の少なくとも一部を保有する天然の生物活性のあるタンパク質との配列相同性を有するタンパク質である。例えば、変異体タンパク質は、生物活性のある基準タンパク質と比較して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性を共有し得る。本明細書で使用する場合、用語「生物活性のあるタンパク質部分」には、例えば、位置指定突然変異誘発、挿入によって故意に、または突然変異によって偶発的に修飾されたタンパク質を含む。

10

【0055】

本明細書で使用する場合、「内部XTEN」は、凝固因子の配列に挿入されたXTEN配列を指す。内部XTENは、凝固因子の2つの隣接するアミノ酸もしくはドメインによって、またはこの場合XTENが凝固因子の部分的な内部配列を置き換えることによってのいずれかによるFIXもしくはFVIIなどの凝固因子の配列へのXTEN配列の挿入によって構築されることができる。

【0056】

本明細書で使用する場合、「末端XTEN」は、凝固因子のN末端もしくはC末端に融合したもしくは該末端において融合した、または凝固因子のN末端もしくはC末端におけるタンパク質分解性開裂配列と融合したXTEN配列を指す。末端XTENは、凝固因子の天然末端に融合することができる。あるいは、末端XTENは、凝固因子の末端配列を置き換えることができる。

20

【0057】

用語「XTEN放出部位」は、哺乳類プロテアーゼによって認識および開裂することができるCFXTEN融合タンパク質における配列を指し、CFXTEN融合タンパク質からのXTENまたはXTENの一部の放出を有効にする。本明細書で使用する場合、「哺乳類プロテアーゼ」は、哺乳類の体液、細胞、または組織に通常存在するプロテアーゼを意味する。XTEN放出部位は、FXIa、FXIIa、カリクレイン、FVIIa、FIXa、FXa、FIIa（トロンビン）、エラスターゼ-2、MMP-12、MMP13、MMP-17、MMP-20、または凝固事象の間に存在する任意のプロテアーゼなどの種々の哺乳類プロテアーゼ（別名「XTEN放出プロテアーゼ」）によって開裂されるよう操作されることができる。

30

【0058】

本明細書で提供されるCFXTENポリペプチドの形態（複数可）に適用される場合の「活性」は、天然凝固因子の生物活性の保有を指し、この場合、「生物活性」は、インビトロもしくはインビボでの生物学的な機能もしくは効果を指し、これには、受容体もしくはリガンドのいずれかの結合、酵素活性、または凝固因子について当該技術分野で一般的に公知の凝固に及ぼす効果を含む、

40

本明細書で提供されるCFXTENポリペプチドの形態（複数可）に適用される場合の「治療効果」は、ヒトもしくは他の動物における疾患もしくは容態の治療、緩和、逆転、寛解、もしくは予防を含むがこれらに限定されない生理学的效果、またはさもないとヒトもしくは動物の身体的もしくは精神的健康を指す。「治療有効量」は、疾患もしくは容態（例えば、出血症状）の症状を予防、軽減、逆転、もしくは寛解させるのに、または治療途中の対象の生存を長期化させるのに有効な化合物の量を指す。治療有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示に照らして、当業者の能力内に十分にある。

【0059】

「宿主細胞」には、対象ベクターについての受け手であり得るまたは受け手であった個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞には、単一宿主細胞の子孫を含む。子孫は、

50

天然の、偶発的な、または故意の突然変異により、元の親細胞と（全DNA相補体の形態においてまたはゲノムにおいて）必ずしも完全に同一でなくてよい。宿主細胞には、本発明のベクターをインビボで形質移入された細胞を含む。

【0060】

「単離された」は、本明細書で開示された種々のポリペプチドを説明するのに使用する場合、その天然環境の成分から同定ならびに分離および／または回収されたポリペプチドを意味する。その天然環境の混入物質成分は、ポリペプチドについての診断用途または治療用途に典型的に干渉するであろう材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質を含み得る。当業者に明らかなように、非天然のポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、その天然の対応物と区別するために「単離」を必要としない。加えて、「濃縮され」、「分離され」、または「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはそれらの断片は、容積あたりの分子の濃度または数とその天然の対応物のものよりも一般的に大きいという点で、その天然の対応物と区別することができる。一般に、組換え手段によって作製され、宿主細胞において発現したポリペプチドは、「単離され」といって考えられる。

10

【0061】

「単離された」ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをコードする核酸または他のポリペプチドをコードする核酸は、ポリペプチドをコードする核酸の天然源において、同定され、通常会合している少なくとも1つの混入物質核酸分子から分離された核酸分子である。ポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、天然に見出される形態または設定以外である。ポリペプチドをコードする単離された核酸分子はそれゆえ、天然の細胞に存在する場合、ポリペプチドをコードする具体的な核酸分子とは区別される。しかしながら、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子には、例えば核酸分子が天然の細胞のものとは異なる染色体位置もしくは染色体外位置にあるポリペプチドを普通発現する細胞に含まれる、ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

20

【0062】

「キメラ」タンパク質は、配列において天然に生じるものとは異なる位置における領域を含む少なくとも1つの融合ポリペプチドを含む。領域は通常、別個のタンパク質に存在し得、融合ポリペプチドにおいて互いにもたらされ；または同じタンパク質に通常存在し得るが、融合ポリペプチドにおいて新たな配置に配置される。キメラタンパク質は例えば、化学合成によって、またはペプチド領域が所望の関連性においてコードされるポリヌクレオチドを作製および翻訳することによって作製され得る。

30

【0063】

「抱合した」、「連結された」、「融合した」、および「融合」は、本明細書で互換可能に用いられる。これらの用語は、化学的抱合または組換え手段を含むどんな手段によっても、2つ以上の化学元素または化学的成分の互いに接合を指す。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響する場合、コード配列に作用可能に連結される。一般的に、「作用可能に連結された」とは、連結されているDNA配列が連続しており、読み取り相またはフレーム内にあることを意味する。「フレーム内融合」は、2つ以上のオープンリーディングフレーム（ORF）を接合して、元のORFの正確なリーディングフレームを維持する様式で連続したより長いORFを形成することを指す。したがって、結果として生じる組換え融合タンパク質は、元のORFによってコードされるポリペプチドに相応する2つ以上のセグメント（該セグメントは天然では通常そのように接合していない）を含む単一のタンパク質である。

40

【0064】

ポリペプチドの文脈において、「直鎖配列」または「配列」は、配列において互いに隣接する残基がポリペプチドの一次構造において連続しているアミノ末端からカルボキシル末端への方向におけるポリペプチドのアミノ酸の順序である。「部分配列」は、一方向または両方向において追加的な残基を含むことが公知であるポリペプチドの一部の直鎖配列

50

である。

【0065】

「異種性の」とは、比較されている実体の残りとは遺伝子型として異なる実体に由来することを意味する。例えば、グリシンの豊富な配列の天然のコード配列から取り出され、天然の配列以外のコード配列に作用可能に連結されたグリシンの豊富な配列は、異種性のグリシンの豊富な配列である。用語「異種性の」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチドに適用される場合、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、比較されている実体の残りのものとは遺伝子型として異なる実体に由来することを意味する。

【0066】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」は互換可能に用いられる。該用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの類似体のいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有し得、公知のまたは公知ではない任意の機能を実施し得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定例である：遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、連結分析から定義された座（複数可）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体など、修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの重合の前または後に与えられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識成分との抱合などによって、重合後にさらに修飾され得る。

【0067】

用語「ポリヌクレオチドの相補体」は、完全な忠実度を有する基準配列とハイブリッド形成し得るよう、基準配列と比較して相補的な塩基配列および逆方向を有するポリヌクレオチド分子を示す。

【0068】

「組換え」は、ポリヌクレオチドに適用される場合、該ポリヌクレオチドの絵落ち度が、インビトロでのクローン化工程、制限工程および／または連結工程、ならびに宿主細胞において潜在的に発現できるコンストラクトを結果的に生じる他の手順の種々の組み合わせの産物である。

【0069】

用語「遺伝子」および「遺伝子断片」は、本明細書で互換可能に用いられる。該用語は、転写および翻訳後に特定のタンパク質をコードすることのできる少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指す。遺伝子または遺伝子断片は、該ポリヌクレオチドが、全コード領域またはその断片に及び得る少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含む限り、ゲノムまたはcDNAであり得る。「融合遺伝子」は、互いに連結される少なくとも2つの異種性ポリヌクレオチドから構成される遺伝子である。

【0070】

「相同性」または「相同の」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の間の配列類似性または互換性を指す。BestFitなどのプログラムを用いて、2つの異なるアミノ酸配列間の配列の同一性、類似性、または相同性を決定する場合、デフォルト設定が用いられ得、またはblosom45もしくはblosom80などの適切なスコア化マトリックスを選択して、同一性、類似性、または相同性のスコアを最適化し得る。好ましくは、相同であるポリヌクレオチドは、本明細書に定義されるようなストリンジェントな条件下でハイブリッド形成し、かつ該ポリヌクレオチドの配列と比較して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、および

さらにより好ましくは99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドである。

【0071】

「連結」は、互いに連結している2つの核酸断片または遺伝子の間のホスホジエステル結合を形成する過程を指す。DNA断片または遺伝子を互いに連結するために、DNAの末端は、互いに適合していなければならない。いくつかの場合、末端はエンドヌクレアーゼ消化の後に直接適合するであろう。しかしながら、末端を連結に適合させるために、エンドヌクレアーゼ消化の後に通常生成されるねじれ型末端を平滑断端にまず変換することは必要であり得る。

【0072】

用語「ストリンジェントな条件」または「ストリンジェントなハイブリッド形成条件」には、ポリヌクレオチドがその標的配列と、他の配列よりも検出可能により大きな程度まで（例えば、背景を上回る少なくとも2倍）ハイブリッド形成するであろう条件に対する引用を含む。一般的に、ハイブリッド形成のストリンジェンシーは、一部、洗浄工程が実施される温度および塩濃度に関して表わされる。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度がpH7.0において約1.5M未満のNaイオン、典型的には約0.01~1.0MのNaイオン濃度（または他の塩）であるものであり、温度は、短いポリヌクレオチド（例えば、10~50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃、長いポリヌクレオチド（例えば、50超のヌクレオチド）については少なくとも約60℃であり、例えば、「ストリンジェントな条件」には、37℃で50%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDSにおけるハイブリッド形成、および60℃~65℃で0.1×SSC/1% SDSにおける各15分間の3回の洗浄を含むことができる。あるいは、約65℃、60℃、55℃、または42℃の温度を用いてもよい。SSC濃度は、約0.1~2×SSCで変動し得、それとともにSDSは、約0.1%で存在する。このような洗浄温度は典型的には、規定されたイオン強度およびpHにおいて特異的な配列についての融点温度よりも低い約5℃~20℃であるよう選択される。T_mは、標的配列の50%が完全に合致したプローブとハイブリッド形成する（規定されたイオン強度およびpH下での）温度である。核酸ハイブリッド形成についてのT_mおよび条件を算出するための等式は周知であり、Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N. Y. において見出されることができ、具体的には、第2巻の第9章を参照されたい。典型的には、遮断試薬を用いて、非特異的ハイブリッド形成を遮断する。このような遮断試薬には、例えば、約100~200 μg/mLで剪断および変性したサケ精子DNAを含む。約35~50% (v/v) の濃度のホルムアミドなどの有機溶媒も、RNA:DNAハイブリッド形成などのための特定の状況下で用いてよい。これらの洗浄条件に関する有用な変法は、当業者に容易に明らかである。

【0073】

用語「パーセント同一性」および「%同一性」は、ポリヌクレオチド配列に適用する場合、標準化されたアルゴリズムを用いて整列した少なくとも2つのポリヌクレオチド配列間の残基合致の百分率を指す。このようなアルゴリズムは、標準化され再生可能な方法で、2つの配列間の整列を最適化し、それゆえ2つの配列のより有意義な比較を達成するために比較される配列において間隙を挿入し得る。パーセント同一性は、規定された全ポリヌクレオチド配列の長さにならって測定され得、またはより短い長さにならって、例えば、より長い規定されたポリヌクレオチド配列から採取された断片、例えば、少なくとも45、少なくとも60、少なくとも90、少なくとも120、少なくとも150、少なくとも210、または少なくとも450の連続した残基の断片の長さにならって測定され得る。このような長さは例示的にすぎず、本明細書、表、図、または配列リストに示される配列によって支持される任意の断片長を用いて、パーセンテージ同一性が測定され得る長さを説明し得る。

【0074】

「パーセント (%) 配列同一性」は、本明細書で同定されるポリペプチド配列に関して、必要な場合、配列および導入間隙を整列して、最大パーセント配列同一性に達した後に、第二の基準ポリペプチド配列またはその部分のアミノ酸残基と同一である問題の配列のアミノ酸残基のパーセンテージとして規定されており、配列同一性の一部としての何らかの保存的置換を考慮しない。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的についての整列は、当該技術分野内の種々の方法において、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegaalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公共的に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成することができる。当業者は、比較されている配列の全長にわたって最大の整列を達成するのに必要な何らかのアルゴリズムを含む、整列を測定するための適切なパラメータを決定することができる。パーセント同一性は、規定された全長のポリペプチド配列の長さによって測定され得、またはより短い長さにわたって、例えばより長い規定されたポリペプチド配列から採取された断片、例えば、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも70、または少なくとも150の連続した残基の断片の長さによって測定され得る。このような長さは例示的にすぎず、本明細書に、表、図、または配列リストに示される配列によって支持される任意の断片長を用いて、パーセンテージ同一性が測定され得る長さを説明し得ることは理解される。

10

【0075】

用語「非反復性」は、ポリペプチドの文脈において本明細書で用いられる場合、ペプチドまたはポリペプチドの配列における内部相溶性の欠失または限定された程度を指す。用語「実質的に非反復性の」は例えば、同一のアミノ酸種類であるか、または（後掲に定義される）10以下のサブシーケンススコアを有するか、またはポリペプチド配列を構成する配列モチーフのN末端からC末端への順序にパターンが存在しない、配列における4つの連続したアミノ酸のうちの数個あるかまたはまったくないことを意味することができる。用語「反復性」は、ポリペプチドの文脈で本明細書において用いられる場合、ペプチドまたはポリペプチドの配列における内部相溶性の程度を指す。対照的に、「反復性の」配列は、短いアミノ酸配列の複数の同一コピーを含み得る。例えば、関心対象のポリペプチド配列は、nマアの配列に分割され得、同一の配列の数が計数できる。高度に反復性の配列は、同一の配列の大きな画分を含むのに対し、非反復性配列は、数個の同一の配列を含む。ポリペプチドの文脈において、配列は、規定されたまたは可変の長さのより短い配列の複数のコピー、あるいはモチーフ自体が非反復性配列を有し、全長のポリペプチドを実質的に非反復性にするモチーフを含むことができる。非反復性が測定されるポリペプチドの長さは、3アミノ酸～約200アミノ酸、約6～約50アミノ酸、または約9～約14アミノ酸で変動することができる。ポリヌクレオチド配列の文脈で用いられる「反復性」は、例えば、所与の長さの同一のヌクレオチド配列の頻度など、配列における内部相溶性の程度を指す。反復性は例えば、同一の配列の頻度を分析することによって測定することができる。

20

30

【0076】

「ベクター」は好ましくは、挿入された核酸分子を宿主細胞へとおよび／または宿主細胞間で転移させる適切な宿主において自己複製する核酸分子である。この用語には、DNAもしくはRNAの細胞への挿入のために主として機能するベクター、DNAもしくはRNAの複製のために種として機能するベクターの複製、DNAもしくはRNAの転写および／または翻訳のために機能する発現ベクターを含む。また、上記の機能のうちの2つ以上を提供するベクターも含まれる。「発現ベクター」は、適切な宿主細胞に導入される場合、ポリペプチド（複数可）へと転写および翻訳することのできるポリヌクレオチドである。「発現系」は通常、所望の発現産物を生じるよう機能することのできる発現ベクターから構成される好適な宿主細胞を意味する。

40

【0077】

「血清分解耐性」は、ポリペプチドに適用される場合、血液またはその構成要素における、血清または血漿中のプロテアーゼを典型的に包含する分解に耐えるポリペプチドの能

50

力を指す。血清分解耐性は、タンパク質をヒト（または適宜、マウス、ラット、サル）血清または血漿と、ある範囲の日数の間（例えば、0.25、0.5、1、2、4、8、16日間）、典型的には約37℃で組み合わせることによって測定することができる。これらの時点についての試料をウェスタンブロットアッセイに供することができ、タンパク質を抗体で検出する。抗体は、タンパク質におけるタグとなり得る。タンパク質がウェスタンにおいて単一のバンドを示し、タンパク質のサイズが、注射されたタンパク質のものと同一である場合、分解は生じていない。この例示的な方法において、タンパク質の50%が分解される時点は、ウェスタンブロットまたは等価の技術によって判断される場合、該タンパク質の血清分解半減期または「血清半減期」である。

【0078】

用語「 $t_{1/2}$ 」は、 $\ln(2)/K_{el}$ として算出される終末半減期を意味する。 K_{el} は、対数濃度の末端直線部分と時間曲線との線形回帰によって算出される末端除去速度定数である。半減期は典型的には、生体に沈積した投与された物質の量の半分が、正常な生物学的プロセスによって代謝または除去されるのに必要な時間を指す。用語「 $t_{1/2}$ 」、「終末半減期」、「除去半減期」、および「循環半減期」は、本明細書で互換可能に用いられる。

【0079】

「能動的クリアランス」は、CFが濾過または凝固以外によって循環から除去され、かつ細胞、受容体、代謝、またはCFの分解によって仲介される循環からの除去を含む機序を意味する。

【0080】

「見かけの分子量因子」および「見かけの分子量」は、特定のアミノ酸配列によって呈される見かけの分子量の相対的な増加または減少の測定単位を指す関連用語である。見かけの分子量は、分子ふるいクロマトグラフィー（SEC）および類似の方法を用いて、球状タンパク質標準物質と比較して決定され、「見かけのkD」単位で測定される。見かけの分子量因子は、見かけの分子量と実際の分子量の間の比であり；後者は、アミノ酸組成に基づいて、組成物中のアミノ酸の各種類に関して算出された分子量を加算することによって、またはSDS電気泳動ゲルにおける分子量標準物質との比較からの概算によって推定される。

【0081】

用語「水力学的半径」または「Stokes半径」は、溶液を通じて移動する本体であるという仮説を立てることによって測定され、かつ溶液の粘度によって抵抗される溶液中の分子の有効半径（nmにおける R_h ）である。本発明の実施態様において、XTEN融合タンパク質の水力学的半径の測定基準は、より直観的な測定基準である「見かけの分子量因子」と相関する。タンパク質の「水力学的半径」は、その水溶液中での拡散速度およびマクロ分子のゲルでの移動能力に影響を及ぼす。タンパク質の水力学的半径は、その分子量によって、ならびに形状およびコンパクトさを含めたその構造によって決定される。水力学的半径を決定するための方法は、米国特許第6,406,632号および第7,294,513号において説明されるような分子ふるいクロマトグラフィー（SEC）の使用によるなど、当該技術分野において周知である。たいていのタンパク質は、タンパク質が最小の水力学的半径を有することのできる最もコンパクトな三次元構造である球状構造を有する。いくつかのタンパク質は、不揃いで開いた、構造化されていない、または「直鎖状の」立体配座を採用し、結果として、類似の分子量の典型的な球状タンパク質と比較して非常により大きな水力学的半径を有する。

【0082】

「生理学的条件」は、生体の条件を模倣する、温度、塩濃度、pHを含めた生体宿主における1セットの条件およびインビトロでの条件を指す。インビトロでのアッセイにおける使用についての生理学的に関連性のある条件の宿主が確立されている。一般的に、生理学的緩衝液は、生理学的な塩濃度を含んでおり、約6.5～約7.8、好ましくは約7.0～約7.5に及ぶ中性pHに調整される。種々の生理学的緩衝液は、Sambrook

10

20

30

40

50

et al. (1989) に列挙されている。生理学的に関連性のある温度は、約 25℃～約 38℃、好ましくは約 35℃～約 37℃に及ぶ。

【0083】

「反応基」は、第二の反応基に共役することのできる化学構造である。反応基の例は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、アジド基である。いくつかの反応基を活性化して、第二の反応基との共役を促進することができる。活性化についての非限定例は、カルボキシル基のカルボジイミドとの反応、カルボキシル基から活性化型エステルへの変換、またはカルボキシル基からアジド機能への変換である。

【0084】

「徐放薬」、「遅延放出薬」、「デポー製剤」、および「持続放出薬」は、本発明のポリペプチドが薬剤の不在下で投与される場合、放出の持続時間に対して該ポリペプチドの放出の持続時間を延長させることのできる薬剤を指すために互換可能に用いられる。本発明の異なる実施態様は、異なる治療量を結果として生じる異なる放出速度を有してよい。

【0085】

用語「抗原」、「標的抗原」、および「免疫原」は、抗体断片または抗体断片ベースの治療薬が結合しまたは特異性を有する構造または結合決定因子を指すために本明細書で互換可能に用いられる。

【0086】

用語「負荷量」は、本明細書で使用する場合、生物活性または治療活性を有するタンパク質またはペプチドの配列；小分子のファルマコフォアに対する対応物を指す。負荷量の例には、サイトカイン、酵素、ホルモンおよび血液、ならびに増殖因子が挙げられるが、これらに限定されない。負荷量はさらに、化学治療薬、抗ウイルス化合物、毒素、または造影剤などの遺伝子融合したまたは化学的に抱合した部分を含むことができる。これらの抱合した部分は、開裂可能または開裂不可能であり得るリンカーを介して、ポリペプチドの残りに接合することができる。

【0087】

用語「アンタゴニスト」は、本明細書で使用する場合、本明細書に開示される天然ポリペプチドの生物活性を部分的にもしくは完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子を含む。ポリペプチドのアンタゴニストを同定するための方法は、天然ポリペプチドを候補アンタゴニスト分子と接触させることと、該天然ポリペプチドと通常関連した 1 つ以上の生物活性の検出可能な変化を測定することとを含み得る。本発明の文脈において、アンタゴニストには、生物活性のあるタンパク質の効果を低下させるタンパク質、核酸、炭水化物、抗体、または任意の他の分子を含み得る。

【0088】

用語「アゴニスト」は、最も広範な意味で用いられ、本明細書に開示される天然ポリペプチドの生物活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト分子は、天然のポリペプチド、ペプチド、小有機分子当のアゴニスト抗体または抗体断片、断片、もしくはアミノ酸配列バリエーションを特異的に含む。天然ポリペプチドのアゴニストを同定するための方法は、天然ポリペプチドを候補アゴニスト分子と接触させることと、天然ポリペプチドと通常関連した 1 つ以上の生物活性の検出可能な変化を測定することとを含み得る。

【0089】

本明細書における目的のための「活性」は、相応する天然の生物活性のあるタンパク質のものと一致する融合タンパク質の構成要素の作用または効果を指し、この場合、「生物活性」は、受容体結合、アンタゴニスト活性、アゴニスト活性、または細胞レベルの応答もしくは生理学的応答を含むがこれらに限定されないインビトロまたはインビボでの生物学的機能または効果を指す。

【0090】

本明細書で使用する場合、「治療」もしくは「治療すること」、または「緩和すること」または「寛解させること」は、本明細書で互換可能に用いられる。これらの用語は治療

10

20

30

40

50

上の有益性および／または予防上の有益性を含むがこれらに限定されない有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療上の有益性によって意味されるのは、治療途中の潜在的な障害の根絶または寛解である。また、治療上の有益性は、対象がなお潜在的な障害に苦しめられ得るにもかかわらず、改善が対象において観察されるよう、潜在的な障害と関連した1つ以上の生理学的症状の根絶または寛解にともない達成される。予防的な有益性のために、組成物は、特定の疾患を発症させる危険にある対象に、または疾患（この疾患の診断はなされていなくてもよい）の1つ以上の生理学的症状を報告している対象に投与され得る。

【0091】

「治療効果」は、本明細書で使用する場合、生物活性のあるタンパク質によって所有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力以外の、本発明の融合ポリペプチドによって生じる、ヒトまたは他の動物における疾患の治癒、緩和、寛解、または予防、あるいはさもなければ、ヒトまたは動物の身体的または精神的健康を高めることを含むがこれらに限定されない生理学的効果を指す。治療有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示の観点で、当業者の能力内に十分にある。

10

【0092】

用語「治療有効量」および「治療有効用量」は、本明細書で使用する場合、対象に単回用量または反復用量で投与されると、任意の症状、局面、測定されるパラメータ、または疾患状態もしくは容態の特徴に及ぼす何らかの検出可能な有益な効果を有することのできる、単独でのまたは融合タンパク質組成物の一部としてのいずれかの生物活性のあるタンパク質の量を指す。このような効果は、有益であることが絶対的である必要はない。

20

【0093】

用語「治療有効用量投与計画」は、本明細書で使用する場合、単独でまたは融合タンパク質組成物の一部としてのいずれかで、生物活性のあるタンパク質の連続的に投与される複数回用量（すなわち、少なくとも2回以上）についてのスケジュールを指し、この場合、用量は、任意の症状、局面、測定されるパラメータ、または疾患状態もしくは容態の特徴に及ぼす持続された有益な効果を結果的に生じるために治療有効量で与えられる。

【0094】

(I). 一般的な技術)

本発明の実施は、別段の記載がない限り、当該技術分野の技術内である免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノム科学、および組換えDNAに関する従来技術を採用する。それらの内容がすべて引用により本明細書に組み込まれている Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; "Current protocols in molecular biology", F. M. Ausubel, et al. eds., 1987; the series "Methods in Enzymology," Academic Press, San Diego, CA.; "PCR 2: a practical approach", M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds., Oxford University Press, 1995; "Antibodies, a laboratory manual" Harlow, E. and Lane, D. eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," 11th Edition, McGraw-Hill, 2005; and Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique," 4th edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000を参照されたい。

30

40

50

【0095】

(I I) . 凝固因子)

本発明は、凝固因子 (C F) を含む融合タンパク質組成物に一部関する。本明細書で使用する場合、「凝固因子」または「C F」は、第 I X 因子 (F I X)、第 V I I 因子 (F V I I)、F V I I および F I X の配列組み合わせ、またはそれらの模倣体、配列バリエーション、および切り詰められたバージョンを指す。

【0096】

((a) 第 I X 因子)

「第 I X 因子」または「F I X」は、凝固因子タンパク質ならびにそれらの種および配列バリエーションを意味し、ヒト F I X 前駆体ポリペプチド (「プレプロ」) の 4 6 1 の一本鎖アミノ酸配列および成熟ヒト F I X の 4 1 5 の一本鎖アミノ酸配列を含むがこれらに限定されない。F I X には、血液凝固因子 I X の典型的な特徴を有する第 I X 分子の任意の形態を含む。本明細書で使用する場合、「第 I X 因子」および「F I X」は、G l a ドメイン (γ-カルボキシグルタミン酸残基を含む領域)、E G F 1 ドメインおよび E G F 2 ドメイン (ヒト表皮増殖因子に相同の配列を含む領域)、活性化ペプチドドメイン (成熟 F I X の残基 R 1 3 6 ~ R 1 8 0 によって形成)、ならびに C 末端プロテアーゼドメイン (「P r o」)、または当該技術分野で公知のこれらのドメインの同義語を含む、あるいはこの天然タンパク質の生物活性の少なくとも一部を保有する切り詰められた断片または配列バリエーションであり得る、ポリペプチドを包含するよう意図される。F I X または配列バリエーションは、米国特許第 4, 7 7 0, 9 9 9 号、第 7, 7 0 0, 7 3 4 号に説明されるようにクローン化されており、ヒト第 I X 因子をコードする c D N A は単離され、特徴づけられ、発現ベクターへとクローン化されている (例えば、C h o o e t a l . , N a t u r e 2 9 9 : 1 7 8 - 1 8 0 (1982); F a i r e t a l . , B l o o d 6 4 : 1 9 4 - 2 0 4 (1984); and K u r a c h i e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U . S . A . 7 9 : 6 4 6 1 - 6 4 6 4 (1982) 参照)。

【0097】

ヒト第 I X 因子 (F I X) は、q 2 7 . 1 において X 染色体に存在する単一コピー遺伝子によってコードされる。ヒト F I X の m R N A は、5' 非翻訳領域のための 2 0 5 塩基、プレプロ第 I X 因子のための 1 3 8 3 塩基、終止コドン、および 3' 非翻訳領域のための 1 3 9 2 塩基から構成される。F I X ポリペプチドは、5 5 k D a であり、3 つの領域 : 2 8 アミノ酸からなるシグナルペプチド、1 8 アミノ酸からなり、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化に必要とされるプロペプチド、および 4 1 5 アミノ酸からなる成熟第 I X 因子から構成されるプレプロポリペプチドとして合成される。プロペプチドは、ガンマ-カルボキシグルタミン酸ドメインに対して N 末端の 1 8 アミノ酸残基配列である。プロペプチドは、ビタミン K 依存性ガンマカルボキシラーゼを結合し、次に内在性プロテアーゼ、最も有望な、フリニンもしくは P C S K 3 としても公知の P A C E (対形成した塩基性アミノ酸の開裂酵素) によって F I X の前駆体ポリペプチドから開裂する。ガンマカルボキシル化がないと、G l a ドメインは、負に帯電したリン脂質表面にタンパク質をつなぎとめるのに必要な正確な立体配座を想定するためにカルシウムを結合することができず、それにより第 I X 因子は無機能性となる。カルボキシル化された場合でさえ、G l a ドメインはまた、適切な機能のためのプロペプチドの開裂に依存しており、その理由として、保有されたプロペプチドが、カルシウムおよびリン脂質に対する最適な結合に必要な G l a ドメインの立体配座変化に干渉するからである。ヒトにおいて、結果として生じる成熟第 I X 因子は、肝細胞によって血流へと、およそ 1 7 重量%の炭水化物を含む 4 1 5 アミノ酸残基の一本鎖タンパク質である不活性化型酵素前駆体として分泌される (S c h m i d t , A . E . , e t a l . (2003) T r e n d s C a r d i o v a s c M e d , 1 3 : 3 9)。成熟第 I X 因子は、N 末端から C 末端への構造において、G l a ドメイン、E G F 1 ドメイン、E G F 2 ドメイン、活性化ペプチド (A P) ドメイン、およびプロテアーゼ (または触媒) ドメインであるいくつかのドメインか

ら構成される。F I Xは、R 1 4 5 - A 1 4 6およびR 1 8 0 - V 1 8 1によってそれぞれ形成される2つの活性化ペプチドを含む。活性化後、一本鎖F I Xは二本鎖分子となり、その中で、2つの鎖が該酵素をG l aドメインに付着させるジスルフィド結合によって連関される。C Fは、変化した活性化特異性を結果的に生じることによって、これらの活性化ペプチドを置き換えることによって操作することができる。哺乳類において、成熟F I Xは、活性化された第X I因子によって活性化されて、第I X a因子を生じなければならない。プロテアーゼドメインは、F I XからF I X aへの活性化の際に、F I Xの触媒活性を提供する。活性化された第V I I I因子（F V I I I a）は、F I X a活性の完全な発現に特異的な補助因子である。

【0098】

凝固に関与するタンパク質には、第I因子、第I I因子、第I I I因子、第I V因子、第V因子、第V I因子、第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X因子、第X I因子、第X I I因子、第X I I I因子、プロテインC、および組織因子（「凝固タンパク質」）が挙げられる。凝固タンパク質の大部分は、活性化されると凝固前駆体プロテアーゼ活性を呈して、他の凝固タンパク質を活性化する酵素前駆体形態に存在し、内在性または外来性の凝固経路および凝固形成に貢献する。凝固カスケードの内在性経路において、F I Xは、活性化された第V I I I因子、第X因子、カルシウム、およびリン脂質の複合体と会合する。該複合体において、F I Xは、第X i a因子によって活性化される。第I X因子の活性化は、該分子からの活性化ペプチド（A l a 1 4 6～A r g 1 8 0）の2工程除去によって達成される（B a j a j e t a l . , H u m a n f a c t o r I X a n d f a c t o r I X a , i n M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y . 1 9 9 3）。第一の開裂は、第X i a因子又は第V I I a因子／組織因子のいずれかによって、A r g 1 4 5 - A l a 1 4 6においてなされる。第二のおよび側開裂は、A r g 1 8 0 - V a l 1 8 1においてなされる。活性化は35残基を除去する。活性化されたヒト第I X因子は、C末端重鎖（28kDa）およびN末端軽鎖（18kDa）のヘテロ二量体として存在し、該鎖は、酵素をG l aドメインに付着させる1つのジスルフィド架橋によって互いに保持される。第I X a因子は順に、活性化された第V I I I因子と協調して第X因子を活性化させる。あるいは、第I X因子および第X因子は両方とも、外来性経路を介して生じた脂質付加された組織因子と複合体形成した第V I I a因子によって活性化されることができる。次に、第X a因子は、最終的な共通経路に参加し、それによりプロトロンビンはトロンビンに変換され、トロンビンは順にフィブリノーゲンをフィブリンに変換して、凝固を形成する。

【0099】

凝固プロセスにおける欠陥は、凝固形成にかかる時間が延長する出血障害をもたらすことができる。このような欠陥は、先天性または後天性であり得る。例えば、血友病Aおよび血友病Bはそれぞれ、第V I I I因子（F V I I I）およびF I Xの欠乏を特徴とする遺伝性疾患である。組換えタンパク質として一般的に調製されたこれらのタンパク質との置き換え療法は、血友病B（クリスマス病）および第I X因子関連出血障害の治療介入において用いてよい。第I X因子は、両容態の治療において用いることができる。しかしながら、いくつかの場合、患者は、治療の有効性を低下または無効にする、投与されたタンパク質に対する抗体を発生させる。

【0100】

本発明は、F I X配列と同一性を有するC F X T E N組成物におけるF I X配列、ヒト、非ヒト霊長類、哺乳類（家畜動物を含む）などに由来する天然の配列断片、ならびにF I Xの生物活性または生物学的機能の一部を保有しおよび／または凝固因子に関連した疾患、欠乏症、障害、または容態（例えば、外傷、手術に関連した、凝固因子の欠乏症に関する出血症状）を予防、治療、仲介、または寛解させるのに有用な非天然配列バリエーションの包含を熟慮する。ヒトF I Xと同一性を有する配列は、N C B IのB L A S Tなど、標準的な同一性検索技術によって見出すことができる。

【0101】

一実施態様において、対象の組成物に組み込まれた F I X は、天然に見出されるタンパク質に相応する配列を有する組換えポリペプチドである。別の実施態様において、F I X は、相応の天然 F I X の生物活性の少なくとも一部を保有する天然配列の配列バリエーション、断片、ホモログ、または模倣体である。表 1 は、本発明の C F X T E N 融合タンパク質によって包含される F I X のアミノ酸配列に関する非限定的なリストを提供する。融合タンパク質組成物に組み込まれるべき任意の F I X 配列または相同的な誘導体は、表 1 のアミノ酸配列間の個々の突然変異をシャッフリングすることによって構築され、かつ活性について評価されることができる。天然 F I X の生物活性の少なくとも一部を保有するモノは、本発明の融合タンパク質組成物に有用である。C F X T E N 融合タンパク質に組み込む F I X には、表 1 から選択されるアミノ酸配列と比較して、少なくとも約 80 % の配列同一性またはそれに代わるものとして、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の配列同一性を有するタンパク質が挙げられる。

【表 1 - 1】

表 1 : FIX のアミノ酸配列および核酸配列

名称	配列番号	アミノ酸配列
F I X 前駆体ポリペプチド	7	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT
ヒト F I X	8	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT
特許 US 20080214462 由来の配列 4	9	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNFNAINTYNHDIALLELDEPLVLSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRS TKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT
特許 US 20080214462 由来の配列 6	10	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNFNAINTYNHDIALLELDEPLVLSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRS TKFTIFNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT
特許 US 20080214462 由来の配列 8	11	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNFNAINTYNHDIALLELDEPLVLSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIFNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT
特許 US 7125841 由来の配列 2	12	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEPREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNFNAINTYNHDIALLELDEPLVLSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列	13	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVT

10

20

30

40

【表 1 - 2】

名称	配列番号	アミノ酸配列
1		AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列 2	14	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESN PCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVV CSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVT AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDAPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列 3	15	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESN PCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDATCNKNGRCEQFCCKNSADNKVV CSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVT AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDAPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列 4	16	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESN PCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDATCNKNGRCEQFCCKNSADNKVV CSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVT AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLASTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列 5	17	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESN PCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVV CSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVT AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDAPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLASTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列 6	18	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESN PCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDATCNKNGRCEQFCCKNSADNKVV CSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVT AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDAPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLASTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT
特許 US 20080167219 由来の配列 8	19	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESN PCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVV CSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEI LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVT AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVRIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVP LVDRATCLASTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT

10

20

30

40

((b) 第 V I I 因子)

「第 V I I 因子」または「F V I I」は、凝固因子のタンパク質および種ならびにその配列バリエーションを意味し、ヒト F V I I の 406 の一本鎖アミノ酸配列ならびに前駆体タンパク質の 444 のアミノ酸配列の不活性型および活性化型（相反する性質に対して別段の記載がない限り）の両方を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用する場合、第 V I I 因子および F V I I は、G l a ドメイン（ γ -カルボキシグルタミン酸残基を含む領域）、E G F 1 ドメインおよび E G F 2 ドメイン（ヒト表皮増殖因子と相同の配列を含

50

む領域)、EGF2ドメインとProdメインの間の配列にわたる活性化ペプチドドメイン、ならびに触媒ドメインまたはペプチダーゼS1ドメイン(セリンプロテアーゼ触媒三連構造)、あるいは当該技術分野で公知のこれらのドメインの同義語を含むポリペプチドを包含するか、あるいは天然タンパク質の生物活性の少なくとも一部を保有する切りつめられた断片または配列バリエーションであり得る。肝臓によって産生されるビタミンK依存性血漿タンパク質である第VII因子(FVII)はまず、酵素前駆体として血中で循環する。第VII因子の主要な役割は、組織因子(TF)とともに凝固の過程を開始することである。血管の損傷の際に、組織因子は血液に曝露され、第VII因子を循環させる。一旦、TFに結合すると、FVIIは、異なるプロテアーゼによって第VII因子(FVIIa)の活性化型となるよう活性化され、これには、トロンビン(第IIa因子)、第IXa因子、第IXa因子、第XIa因子、およびFVIIa-TF複合体自体がある。FVII酵素前駆体は、単一の部位であるArg¹⁵²-Ile¹⁵³におけるタンパク質分解性開裂によって活性化され、単一のジスルフィド結合によって連結される二本鎖プロテアーゼを結果的に生じる。FVIIaは、その補助因子である組織因子(TF)を結合して、第IX因子(IX)をIXaに活性化することのできる複合体を形成し、それにより、フィブリン形成および止血を結果として生じる凝固カスケードを惹起する。ヒト第VII因子についての完全なヌクレオチドおよびアミノ酸の配列は公知であり、ヒトFVIIまたは配列バリエーションは米国特許第4,784,950号、第5,833,982号、第6,911,323号、および第7,026,524号に説明される通りクローン化されている。

10

20

【0102】

第VII因子の現行の治療的使用は存在するが、第VII因子、第VII因子、または第IX因子の欠乏を呈する個体およびフォンヴィレブランド病を有する個体のFVIIa製剤による治療において問題となり得る。より具体的には、補充療法における第VII因子および第IX因子を受容する個体は、これらのタンパク質に対する抗体を発生させる。持続的な治療は、これらの抗体の存在のために、非常に困難である。この問題を経験している患者は通常、第VIIa因子を含む活発なおよび活発でない凝固酵素の混合物からなることが公知の活性化型プロトロンビン複合体により治療される。また、FVIIは、外傷など、制御されていない出血の治療に関連して利用され、この活性化反応は、活性化型血小板に関して主として生じると考えられている(Hedner et al., Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2000; 11; 107-111)。

30

【0103】

第VII因子の配列バリエーションは、野生型第VII因子と実質的に同じ生物活性を呈しようとしてより良好な生物活性を呈しようとして、またはそれに代わるものとして、野生型第VII因子に対して実質的に修飾された生物活性を呈しようとして低下した生物活性を呈しようとして、1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、または置換によって野生型第VII因子の配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このようなFVIIバリエーションは、当該技術分野で公知であり、引用により本明細書に組み込まれている米国特許および出願第6,960,657号、第7,176,288号、第7,414,022号、第7,700,733号、第2,006,020,503,6A1号、第2,008,031,827,6A1号、および第2,009,001,199,2A1号に説明されるものを含む。

40

【0104】

組換えFVIIaは、FVIIまたはFIXに対する阻害剤を有する血友病Aまたは血友病Bの患者の治療のために認可されており、また、外傷および／または手術に関連した、出血症状を停止するために、または出血を予防するために用いられる。また、組換えFVIIaは、後天的FVII欠乏を有する患者の治療のために認可されており、血友病患者および非血友病患者における他の後天的または後天的な出血性の障害、外傷、および手術に関連した出血の治療など、適用外使用においてますます利用されている。

【0105】

50

本発明は、C F 関連の疾患、欠乏症、障害、または容態を予防、治療、仲介、または寛解させるのに有用な F V I I a の生物活性または生物学的機能の少なくとも一部を保有する F V I I 配列、配列断片、模倣体、および非天然配列バリエーションに対する相同性を有する配列を C F X T E N 組成物に包含することを熟慮する。加えて、F V I I を含む C F X T E N の比較的長い半減期のため、哺乳類内在性プロテアーゼ（下記でより完全に説明）によって活性化することのできる、または自己活性化を経験することのできる F V I I の不活性型を含む組成物は、本質的に F V I I の「プロドラッグ」形態であるものを用いた、ある形態の慢性凝固障害を有する対象を治療する手段を表す。表 2 は、本発明の C F X T E N 融合タンパク質によって包含される F V I I の配列のリストを提供する。天然の C F の生物活性の少なくとも一部を保有する種間またはファミリー間の個々の突然変異をシャッフリングすることによって構築される F V I I 配列または相同の誘導体は、本発明の融合タンパク質に有用である。C F X T E N 融合タンパク質に組み込める F V I I には、表 2 から選択される配列と比較して少なくとも約 80% の配列同一性を、またはそれに代わるものとして 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の配列同一性を呈するタンパク質を含む。

【表 2-1】

表 2：第 VII 因子アミノ酸配列

名称	配列番号	アミノ酸配列
FVII 前駆体ポリペプチド	20	MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRSCRCHEGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG DSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
ヒト FVII (成熟)	21	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRSCRCHEGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG DSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	22	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRSCRCHEGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKSLTRNGPLKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG DSPNITEYMFC

10

20

30

【表 2 - 2】

名称	配列番号	アミノ酸配列
		AGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVS QYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	23	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKSMTRVVGKVC PKGEC P WQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDG DEQSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYM FCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	24	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKCGQLRKS KVC PKGEC P WQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDG DEQSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYM FCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	25	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKIKPRIVGGKVC PKGEC PW QVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDE QSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FV RFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFC AGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVS QYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	26	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKKLTRAETVKVC PKGEC P WQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDG DEQSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYM FCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	27	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKDFTRVVGKVC PKGEC P WQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDG DEQSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYM FCAGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	28	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKIQIRSVAKKVC PKGEC PW QVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDE QSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FV RFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFC AGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVS QYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
FVII バリエーション	29	NAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGQDCASSPCQN GGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHGTGKRS CRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PW QVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDE QSRRAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTFSERTLA FV RFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFC AGYSDGSKDSCCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVS QYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

10

20

30

40

【表 2 - 3】

名称	配列番号	アミノ酸配列
FVII バリエーション	30	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQ NGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTGR SCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKIEPRSPSQKVCPCGECPW QVLLLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDE QSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHVVPCLCLPERTFSERTLAFV RFSLVSGWGLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCA AGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVS QYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

10

(I I I) 凝固因子融合タンパク質組成物)

本発明は、凝固因子 (C F) を含む融合タンパク質組成物を提供する。治療用タンパク質の循環半減期を延長させる 1 つの方法は、タンパク質の腎クリアランスを低下させることである。このことは、増大した分子サイズ (または水力学的半径) をタンパク質に与えることのできる、それゆえ腎クリアランスを低下させるポリマーに対してタンパク質を包合することによって達成され得る。したがって、本発明の 1 つの目的は、より長い循環または終末半減期を有し、天然凝固因子の活性の少なくとも一部を保有する改良した F I X または F V I I (または F V I I a) 分子を提供することであり (それにより、必要な投与回数を低下させる)、そのことが、それにより凝固欠乏および制御されていない出血をより効率的に治療することである。一態様において、本発明は、伸長した組換えポリペプチド (「X T E N」または「X T E N 類」) に共有結合した F I X または F V I I などの C F の全長の配列または配列バリエーションを含む C F の単離された単量体融合タンパク質を提供する。下記でより完全に説明されるように、融合タンパク質には任意に、プロテアーゼによって作用される場合、融合タンパク質から C F を放出する開裂配列をさらに含むスペーサー配列を含む。

20

【0 1 0 6】

一態様において、本発明は、1 つ以上の伸長した組換えポリペプチド (「X T E N」) に共有結合した少なくとも 1 つの第一の生物活性のある凝固因子タンパク質を含む単離された融合タンパク質を提供し、それにより、融合タンパク質組成物 (以後、「C F X T E N」) を結果的に生じる。用語「C F X T E N」は、本明細書で使用する場合、凝固因子と関連する 1 つ以上の生物活性または治療活性を仲介する生物活性のある C F を各々含む 1 つ以上の負荷量領域と、担体として機能する少なくとも 1 つの第一の X T E N ポリペプチドを含む少なくとも 1 つの他の領域とを含む、融合ポリペプチドを包含するよう意味される。一実施態様において、凝固因子は、先に開示されるように、F I X または F I X の配列バリエーションである (表 1 の配列と同一性のある配列を含む)。別の実施態様において、凝固因子は F V I I であり、これには、先に開示されるように、F V I I の活性化型、または F V I I の配列バリエーションを含むことができる (表 2 の配列と同一性のある配列を含む)。F V I I を含む本発明の C F X T E N 組成物の場合、F V I I 成分の活性化は、自己活性化によって、または Osterud, et al., Biochemistry 11: 2853-2857 (1972); Thomas, U. S. Pat. No. 4,456,591; Hedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841 (1983); もしくは Kisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73: 29-42 (1983) によって開示されるものなど、当該技術分野で公知の手順に従って、活性化型第 X 因子への曝露によって実施され得る。あるいは、第 V I I 因子は、Mono Q (Pharmacia fine Chemicals) または類似のクロマトグラフィー樹脂など、イオン交換クロマトグラフィーカラム (例えば、Bjoern et al. Research Disclosure (1986) 269: 564-565 参照) に通過させることによって活性化することができる。

30

40

【0 1 0 7】

50

対象の組成物のC F、特に表1および表2に開示されているものは、それらの相応する核酸およびアミノ酸配列とともに当該技術分野で周知であり、説明および配列は、Chemical Abstracts Services Databases（例えば、C A S Registry）、GenBank、The Universal Protein Resource（UniProt）、およびGenSeq（例えば、Derwent）等の署名の提供されるデータベースなどの公共のデータベースにおいて入手可能である。ポリヌクレオチド配列は、所与のC F（例えば、全長または成熟のいずれか）をコードする野生型ポリヌクレオチド配列であり得、またはいくつかの場合、配列は、野生型ポリヌクレオチド配列のバリエーション（例えば、野生型の生物活性のあるタンパク質をコードするポリヌクレオチド）（この場合、ポリヌクレオチドのDNA配列は、例えば特定の週における発現のために最適化されている）；または位置指定突然変異体もしくは対立遺伝子バリエーションなど、野生型タンパク質のバリエーションをコードするポリヌクレオチドであり得る。C Fの野生型配列もしくは共通cDNA配列またはコドンの最適化されたバリエーションを用いて、本発明によって熟慮されるC F X T E Nコンストラクトを、当該技術分野で公知の方法を用いておよび／または本明細書に提供されるガイダンスおよび方法と関連して作製することは、当業者の能力内に十分あり、実施例においてより完全に説明される。

10

【0108】

本発明のC F X T E Nに含まれるためのC Fには、対象に投与する場合、出血障害、凝固因子における凝固因子欠乏、または凝固因子における欠損と関連した疾患、障害、もしくは容態を仲介または予防または寛解させるのに有用な凝固因子または配列バリエーションを含む。特に関心対象なのは、天然C Fと比較しての薬物動態パラメータの増大、増大した溶解度、増大した安定性、または増大したいくつかの他の医薬特性が選択され、あるいは終末半減期を延長することが有効性、安全性を改良し、または低下した投薬頻度を結果として生じ、および／もしくは患者の服薬順守を改良する、C F X T E N融合タンパク質組成物である。したがって、C F X T E N融合タンパク質組成物は、対象に投与した場合、X T E Nに連結されていないC Fと比較すると、例えば、インビボでの曝露、または治療ウィンドウ内にC F X T E Nがとどまる長さを増大させることによって、生理活性のあるC Fの治療有効性を改良することを含む、種々の目的を考慮して調製される。

20

【0109】

一実施態様において、対象の組成物に組み込まれたC Fは、天然に見出されるタンパク質に相応する配列を有する組換えポリペプチドであり得る。別の実施態様において、C Fは、天然のC Fの生物活性の少なくとも一部を保有する天然の配列の配列バリエーション、断片、ホモログ、または模倣体である。非限定例において、C Fは、表1からまたは表2から選択されたタンパク質配列と少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは少なくとも約99%、もしくは100%の配列同一性を呈する配列である。一実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、単一のX T E N（例えば、下記により完全に説明されるようなX T E N）に連結された単一のC F分子を含む。別の実施態様において、C F X T E Nは、第一のC Fと同じC Fの第二の分子とを含み、結果的に、表6から選択されたN末端からC末端への立体配置における1つ以上のX T E Nに連結された2つのC Fを含む融合タンパク質を生じる。別の実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、第一のおよび第二のX T E Nに連結された単一のC F分子を含み、該X T E Nにおいて、C Fは、表1からまたは表2から選択されたタンパク質配列と少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは少なくとも約99%、もしくは100%の配列同一性を呈する配列であり、第一のおよび／または第二のX T E Nは、表4から選択された配列と比較して少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして

30

40

50

、 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは少なくとも約99%、もしくは100%の配列同一性を呈する配列である。

【0110】

本発明の対象のCFXTENは、天然のCFと比較して、1つ以上の薬物動態パラメータの亢進を呈する。薬物動態パラメータの亢進したCFXTENは、ほとんど頻繁ではない投薬、あるいはXTENに連結されていないCFと比較してより長い時間、最少有効用量または血中濃度 (C_{min}) と最大許容用量または血中濃度 (C_{max}) の間の治療ウィンドウ内に生物活性のあるCFXTENを維持することを含むがこれに限定されない亢進した薬理学的効果を可能にする。このような場合、選択したXTEN配列（複数可）を含む融合タンパク質へのCFの連結は結果的に、該配列の特性における改良を生じることができ、該配列を、XTENに連結されていないCFと比較して治療薬または予防薬としてより有用にする。いくつかの実施態様において、本発明の対象のCFXTENは、CFとXTENの間に組み込まれた開裂配列を有し、CF成分の生物活性は、下記に説明されるように、内在性プロテアーゼによる開裂配列の開裂による融合タンパク質からのCFの放出によって亢進される。

10

【0111】

(IV). XTENM付加した組換えポリペプチド)

一態様において、本発明は、CFの連結された融合タンパク質パートナーとして有用なXTENポリペプチド組成物を提供し、結果的にCFXTEN融合タンパク質を生じる。XTENは一般的に、小さな親水性アミノ酸から主として構成される非天然の実質的に非反復性の配列を有する一般的に伸長した長さのポリペプチドであり、該配列は、生理学的条件下で低い程度の構造も、二次構造も三次構造も有さない。

20

【0112】

XTENは、「担体」として機能する融合タンパク質パートナーとしての有用性を有し、CFタンパク質に連結された場合に融合タンパク質を作製するよう、ある所望の薬物動態特性、物理化学的特性、および医薬特性を与える。このような所望の特性には、本明細書に説明される数ある特性のうち、組成物の増大した薬物動態パラメータ特徴および溶解度特徴が挙げられるが、これらに限定されない。このような融合タンパク質組成物は、本明細書に説明されるように、ある凝固因子関連性の疾患、障害、または容態を治療するための有用性を有する。本明細書で使用する場合、「XTEN」は具体的には、全抗体または抗体断片（例えば、一本鎖抗体およびFC断片）を除外する。

30

【0113】

いくつかの実施態様において、XTENは、担体として使用する場合に約100～約3000超のアミノ酸残基を、または2つ以上のXTEN単位を単一融合タンパク質において使用する場合に、400～約3000超の残基を累積的に有する長いポリペプチドである。他の実施態様において、XTENを融合タンパク質成分間のリンカーとして使用する場合、あるいは融合タンパク質の半減期の延長が必要ではないが、溶解度またはCF融合パートナー成分についてのいくつかの他の物理／化学特性の増大が所望である場合、約96、または約84、または約72、または約60、または約48、または約36のアミノ酸残基など、100アミノ酸残基よりも短いXTEN配列が、該特性を有効にするためにCFを有する融合タンパク質組成物へと組み込まれる。

40

【0114】

本発明の融合タンパク質組成物を作製するために用いられる生物活性のあるタンパク質に連結されるべきXTENについての選択基準は一般的に、順に融合タンパク質組成物に亢進した医薬特性及び薬物動態特性を与えるために用いられるXTENの物理／化学特性および立体配座構造の特質に関する。本発明のXTENは、以下の有利な特性の1つ以上を呈する：立体配座の柔軟性、増大した水性溶解度、高い程度のプロテアーゼ耐性、低い免疫原性、哺乳類受容体に対する低い結合、および増大した水力学的半径（またはStokes半径）；融合タンパク質パートナーとして特に有用にする特性。XTENによって

50

亢進される、C Fを含む融合タンパク質の特性に関する非限定例には、全体的な溶解度および／または代謝安定性の増大、タンパク質分解に対する低下した感受性、低下した免疫原性、皮下または筋肉内に投与した場合の低下した吸収速度、ならびに、亢進した薬物動態特性、例えばより高い終末半減期および増大した曲線下面積、Cmaxがより低く、そのことが結果的に、対象に投与されるC F X T E N組成物の融合タンパク質が治療活性を保有する延長した時間を結果的に集約的に生じるC Fの有害な効果の低下を生じるような、（X T E Nに連結されていないC Fと比較して、かつ類似の経路によって投与される）皮下または筋肉内注射後のより遅い吸収。

【0115】

本発明のX T E N Mを含む組成物などのタンパク質の物理／化学特性を決定するための種々の方法およびアッセイは、当該技術分野で公知である。このような特性には、二次構造もしくは三次構造、溶解度、タンパク質凝集、有開特性、混入、および水分含有量が挙げられるが、これらに限定されない。このような方法には、分析的遠心分離、E P R、H P L C - イオン交換、H P L C - 分子ふるい、H P L C - 逆相、光散乱、毛細管電気泳動、円二色性、示差走査熱量測定、蛍光、H P L C - イオン交換、H P L C - 分子ふるい、I R、NMR、ラマン分光法、屈折分析、およびU V／可視光分光法が挙げられる。追加的な方法は、Arnaud, et al., Prot Expr and Purif (2006) 48, 1-13に開示されている。

【0116】

一実施態様において、X T E Nは、ポリマーの伸長した長さにもかかわらず、生理学的条件下で変性したペプチド配列のように挙動するよう設計される。「変性した」は、ペプチド主鎖の大きな立体配座自由度を特徴とする溶液中でのペプチドの状態を説明する。ほとんどのペプチドおよびタンパク質は、高濃度の変性剤の存在下でまたは上昇した温度で、変性した立体配座を採用する。変性した立体配座におけるペプチドは、例えば、特徴的な円二色性(CD)スペクトルを有し、NMRによって決定される時、長い範囲の相互作用の欠失を特徴とする。「変性した立体配座」および「構造化されていない立体配座」は本明細書で同義的に用いられる。いくつかの実施態様において、本発明は、生理学的条件下で二次構造において大きく欠失する変性した配列に似たX T E N配列を提供する。他の場合、X T E N配列は、生理学的条件下で二次構造を実質的に欠失する。この文脈において用いられる「大きく欠失する」は、X T E N配列のX T E Nアミノ酸残基の50%未満が、本明細書で説明される手段によって測定または決定される時、二次構造に寄与することを意味する。「実質的に欠失する」は、この文脈において使用する場合、X T E N配列のX T E Nアミノ酸残基の少なくとも約60%、または約70%、または約80%、または約90%、または約95%、または少なくとも約99%が、本明細書で説明される方法によって測定または決定される時、二次構造に寄与しないことを意味する。

【0117】

種々の方法が、所与のポリペプチドにおける二次構造および三次構造の存在または不在を認めるために、当該技術分野で確立されている。特に、二次構造は、例えば、「遠-U V」スペクトル領域(190~250nm)における円二色性分光法によって、分光光度的に測定することができる。アルファ-ヘリックスおよびベータ-シートなどの二次構造要素は各々、特徴的な形状および程度のCDスペクトルを生じる。二次構造はまた、米国特許出願公報第20030228309A1号に説明されるような、周知のChou-Fasmanアルゴリズム(Chou, P. Y., et al. (1974) Biochemistry, 13: 222-45)およびGarnier-Osguthorpe-Robson(「GOR」)アルゴリズム(Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol 266: 540-553)など、あるコンピュータプログラムまたはアルゴリズムを介してポリペプチド配列について推定することができる。所与の配列について、該アルゴ

リズムは、二次構造がいくつか存在するかまたはまったく存在しないかを推定することができ、例えば、アルファ-ヘリックスもしくはベータ-シートを形成する配列の残基の合計および／もしくは百分率、または（二次構造を欠失する）ランダムコイル形成を結果として生じるよう推定された配列残基の百分率として表される。

【0118】

いくつかの実施態様において、対象の融合タンパク質組成物において用いられるXTE N配列は、Chou-Fasmanアルゴリズムによって決定される時、0%～約5%未満の範囲のアルファ-ヘリックス百分率を有することができる。他の場合、融合タンパク質組成物のXTE N配列は、Chou-Fasmanアルゴリズムによって決定される時、0%～約5%未満の範囲のベータ-シート百分率を有する。いくつかの実施態様において、融合タンパク質組成物のXTE N配列は、Chou-Fasmanアルゴリズムによって決定される時、0%～約5%未満の範囲のアルファ-ヘリックス百分率および0%～約5%未満の範囲のベータ-シート百分率を有する。いくつかの実施態様において、融合タンパク質組成物のXTE N配列は、約2%未満のアルファ-ヘリックス百分率および約2%未満のベータ-シート百分率を有する。他の場合、融合タンパク質組成物のXTE N配列は、GORアルゴリズムによって決定される時、高い程度のランダムコイル百分率を有する。いくつかの実施態様において、XTE N配列は、GORアルゴリズムによって決定される時、少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、より好ましくは少なくとも約92%、より好ましくは少なくとも約93%、より好ましくは少なくとも約94%、より好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、より好ましくは少なくとも約97%、より好ましくは少なくとも約98%、および最も好ましくは少なくとも約99%のランダムコイルを有する。

【0119】

(1. 非反復性配列)

いくつかの実施態様において、組成物のXTE N配列は、実質的に非反復性である。一般に、反復性アミノ酸配列は、コラーゲンおよびロイシンジッパーなどの天然の反復性配列によって具現化されるように、より高次の構造を凝集または形成する傾向を有する。これらの反復性アミノ酸はまた、結晶性のまたは偽結晶性の構造を結果的に生じる接触を形成する傾向にあり得る。対照的に、非反復性配列が凝集する低い傾向は、配列が反復性である場合にさもなくば凝集しがちであろう比較的低頻度の帯電したアミノ酸を有する長い配列のXTE Nの設計を可能にする。典型的には、CFXTE N融合タンパク質は、配列が実質的に非反復性である約100超～約3000のアミノ酸残基のXTE N配列を含む。一実施態様において、XTE N配列は、配列中の3つの連続したアミノ酸がセリンでない限り（この場合、3つ以下の連続したアミノ酸はセリン残基である）、同一のアミノ酸種類である約100超～約3000のアミノ酸残基を有する。前述の実施態様において、XTE N配列は、「実質的に非反復性で」ある。

【0120】

ポリペプチドまたは遺伝子の反復性の程度は、コンピュータプログラムもしくはアルゴリズムによって、または当該技術分野で公知の他の手段によって測定することができる。ポリペプチド配列における反復性は例えば、所与の長さのより短い配列がポリペプチド内で生じる回数を決定することによって評価することができる。例えば、200アミノ酸残基のポリペプチドは、192回重複する9アミノ酸配列（または9マー「フレーム」）および198の3マーフレームを有するが、独特な9マーまたは3マーの配列の数は、該配列内の反復性の量に依存する。全体的なポリペプチド配列におけるサブシーケンスの反復性の程度を反映するスコア（以後、「サブシーケンススコア」）が生じる。本発明の文脈において、「サブシーケンススコア」は、200アミノ酸配列内の独特な3マーサブシーケンスの絶対数によって除されるポリペプチドの200の連続したアミノ酸の配列にわたる各独特な3マーフレームの発生の合計を意味する。反復性および非反復性のポリペプチドの最初の200のアミノ酸に由来するこのようなサブシーケンススコアの例を実施例4

4に呈する。いくつかの実施態様において、本発明は、1つ以上のX T E Nを各々含むC F X T E Nを提供し、この場合、該X T E Nは、12未満、より好ましくは10未満、より好ましくは9未満、より好ましくは8未満、より好ましくは7未満、より好ましくは6未満、および最も好ましくは5未満のサブシーケンススコアを有する。この節において説明される上記の実施態様において、約10未満のサブシーケンススコアを有するX T E N（すなわち、9、8、7等）は、「実質的に非反復性で」ある。

【0121】

X T E Nの非反復性特徴は、反復性配列を有するポリペプチドと比較して、より大きな程度の溶解度およびより小さな凝集傾向をC F融合タンパク質に分け与える。これらの特性は、いくつかの場合100mg/mLを超過する極度に高い薬物濃度を含むX T E N含有医薬調製物の製剤化を容易にする。

10

【0122】

さらに、該実施態様のX T E Nポリペプチドは、哺乳類に投与される場合に免疫原性を低下または実質的に除去するために、低い程度の内部反復性を有するよう設計される。グリシン、セリン、およびグルタミン酸などの3つのアミノ酸に大きく限定される短い反復したモチーフから構成されるポリペプチド配列は結果的に、哺乳類に投与される場合、これらの配列における推定T細胞エпитープの不在にもかかわらず、比較的高い抗体力価を生じ得る。このことは、タンパク質凝集体、交差架橋した免疫原、および反復性炭水化物を含む、反復したエпитープを有する免疫原が、光度に免疫原性であり、例えば、B細胞活性化を生じるB細胞受容体の交差架橋を結果的に生じることができることが示されるように、ポリペプチドの反復性の性質によって生じ得る（Johansson, J., et al. (2007) Vaccine, 25 : 1676-82 ; Yanikai, Z., et al. (2006) Biochem Biophys Res Commun, 345 : 1365-71 ; Hsu, C. T., et al. (2000) Cancer Res, 60 : 3701-5 ; Bachmann MF, et al. Eur J Immunol. (1995) 25 (12) : 3445-3451）。

20

【0123】

（2. 例示的な配列モチーフ）

本発明は、モチーフのアミノ酸配列が非反復性である、複数単位のより短い配列またはモチーフを含む融合パートナーとして用いられるX T E Nを包含する。非反復性基準は、X T E N配列を作製するために多量体化される配列モチーフのライブラリーを用いた「構築ブロック」アプローチにもかかわらず適合することができる。したがって、モチーフ自体が一般t値基に非反復性のアミノ酸配列からなるので、X T E N配列は、4つの異なる種類の配列モチーフと同じくらい少数の複数単位からなり得るのに対し、全体的なX T E N配列は実質的に非反復性にされる。

30

【0124】

一実施態様において、X T E Nは、約100超～約3000のアミノ酸残基の非反復性配列を有し、この場合、X T E N配列の少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約100%が非重複性の配列モチーフからなり、この場合、各モチーフは約9～36のアミノ酸残基を有する。他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約100%が非重複性の配列モチーフからなり、この場合、各モチーフは9～14のアミノ酸残基を有する。なおも他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約100%が非重複性配列モチーフからなり、この場合、各モチーフは12のアミノ酸残基を有する。これらの実施態様において、配列モチーフは、全体的な配列が構造化されていない柔軟な特徴を有するよう、小さな親水性アミノ酸から主として構成さ

40

50

れることが好ましい。X T E Nに含まれるアミノ酸の例は、例えば、アルギニン、リシン、トレオニン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、およびグリシンである。コドンの最適化、配列モチーフをコードする組み立てポリヌクレオチド、タンパク質の発現、発現したタンパク質の電荷分布および溶解度、ならびに二次構造および三次構造などの変数を試験する結果として、亢進した特徴を有するX T E N組成物が主として、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）の残基を含むことが発見され、この場合、該配列は、実質的に非反復性であるよう設計される。一実施態様において、X T E N配列は、長さ約100超～約3000のアミノ酸残基、好ましくは400超～約3000のアミノ酸残基である実質的に非反復性の配列において配置されるグリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、またはプロリン（P）から選択される主として4～6種類のアミノ酸を有する。いくつかの実施態様において、X T E Nは、約100超～約3000のアミノ酸残基の配列を有し、この場合、該配列の少なくとも約80%は、非重複性配列モチーフからなり、この場合、各モチーフは、9～36のアミノ酸残基を有し、この場合、各モチーフは、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択される4～6種類のアミノ酸からなり、かつ、この場合、全長のX T E Nにおける任意の1つのアミノ酸の種類の含有量は30%を超過しない。他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約90%は非重複性の配列モチーフからなり、この場合、各モチーフは、9～36のアミノ酸残基を有し、この場合、該モチーフは、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択される4～6種類のアミノ酸からなり、かつ、この場合、全長のX T E Nにおける任意の1つのアミノ酸の種類の含有量は30%を超過しない。他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約90%は、非重複性配列モチーフからなり、この場合、各モチーフは、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択される4～6種類のアミノ酸からなる12のアミノ酸残基を有し、かつ、この場合、全長のX T E Nにおける任意の1つのアミノ酸の種類の含有量は30%を超過しない。なおも他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%、または約100%は、非重複性配列モチーフからなり、この場合、該モチーフの各々は、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）からなる12のアミノ酸残基を有し、かつ、この場合、全長のX T E Nにおける任意の1つのアミノ酸の種類の含有量は30%を超過しない。

【0125】

なおも他の実施態様において、X T E Nは、約100超～約3000のアミノ酸残基の非反復性配列を含み、この場合、該配列の少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%は、9～14のアミノ酸残基の非重複性配列モチーフからなり、この場合、該モチーフは、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択される4～6種類のアミノ酸からなり、かつ、この場合、任意の1つのモチーフにおける任意の2つの連続したアミノ酸残基の配列は、配列モチーフにおいて3回以上反復しない。他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%は、12のアミノ酸残基からなる非重複性配列モチーフからなり、この場合該モチーフは、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択される4～6種類のアミノ酸からなり、かつ、この場合、任意の1つの

配列モチーフにおける任意の2つの連続したアミノ酸残基の配列は、該配列モチーフにおいて3回以上反復しない。他の実施態様において、X T E N配列の少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%は、12のアミノ酸残基からなる非重複性配列モチーフからなり、この場合該モチーフは、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）からなり、かつ、この場合、任意の1つの配列モチーフにおける任意の2つの連続したアミノ酸残基の配列は、該配列モチーフにおいて3回以上反復しない。なおも他の実施態様において、X T E Nは、12のアミノ酸配列モチーフからなり、この場合、該アミノ酸は、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）から選択され、かつ、この場合、任意の1つの配列モチーフにおける任意の2つの連続したアミノ酸残基の配列は、該配列モチーフにおいて3回以上反復せず、かつ、この場合、全長のX T E Nにおける任意の1つのアミノ酸の種類の含有量は30%を超過しない。本節において説明される先の前述の実施態様において、X T E N配列は実質的に非反復性である。

10

【0126】

いくつかの実施態様において、本発明は、約100超～約3000アミノ酸残基の非反復性X T E N配列（複数可）を含む組成物を提供し、この場合、該配列の少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%～約100%が、表3のアミノ酸配列から選択される2つ以上の非重複性配列モチーフの複数単位からなる。いくつかの実施態様において、X T E Nは、非重複性配列の約80%、または少なくとも約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%～約100%が、表3の単一モチーフファミリーから選択される2つ以上の非重複性配列からなり、結果的に、全体的な配列が実質的に非反復性に留まる「ファミリー」配列を生じる該非重複性配列のモチーフを含む。したがって、これらの実施態様において、X T E N配列は、表3の配列のA Dモチーフファミリー、またはA Eモチーフファミリー、またはA Fモチーフファミリー、またはA Gモチーフファミリー、またはA Mモチーフファミリー、またはA Qモチーフファミリー、またはB Cファミリー、またはB Dファミリーの非重複配列モチーフの複数単位を含む。他の実施態様において、X T E Nは、表3のモチーフファミリーの2つ以上に由来するモチーフ配列を含む。

20

30

【0127】

【表 3 - 1】

表 3 : 1 2 アミノ酸の XTEN 配列モチーフおよびモチーフファミリー

モチーフファミリー*	配列番号	モチーフ配列
AD	31	GESPGGSSGSES
AD	32	GSEGSSGPGESS
AD	33	GSSESGSSEGGP
AD	34	GSGGEPSESGSS
AE, AM	35	GSPAGSPTSTEE
AE, AM, AQ	36	GSEPATSGSETP
AE, AM, AQ	37	GTSESATPESGP
AE, AM, AQ	38	GTSTEPSEGSAP
AF, AM	39	GSTSESPSGTAP
AF, AM	40	GTSTPESGSASP
AF, AM	41	GTSPSGESSTAP
AF, AM	42	GSTSSTAESPGP
AG, AM	43	GTPGSGTASSSP
AG, AM	44	GSSTPSGATGSP
AG, AM	45	GSSPSASTGTGP
AG, AM	46	GASPGTSSTGSP
AQ	47	GEPAGSPTSTSE
AQ	48	GTGEPSSTPASE
AQ	49	GSGPSTESAPTE

10

20

【表 3 - 2】

モチーフファミリー*	配列番号	モチーフ配列
AQ	50	GSETPSGPSETA
AQ	51	GPSETSTSEPGA
AQ	52	GSPSEPTEGTSA
BC	53	GSGASEPTSTEP
BC	54	GSEPATSGTEPS
BC	55	GTSEPSTSEPGA
BC	56	GTSTEPSEPGSA
BD	57	GSTAGSETSTEA
BD	58	GSETATSGSETA
BD	59	GTSESATSESGA
BD	60	GTSTEASEGSAS

30

*は、種々の順列において互いに用いる場合に「ファミリー配列」を結果として生じる個々のモチーフ配列を示す。

40

【0 1 2 8】

他の実施態様において、C F X T E N 組成物は、約 1 0 0 超～約 3 0 0 0 のアミノ酸残基からなる非反復性 X T E N 配列を含み、この場合、該配列の少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 9 0 %、または約 9 1 %、または約 9 2 %、または約 9 3 %、または約 9 4 %、または約 9 5 %、または約 9 6 %、または約 9 7 %、または約 9 8 %、または約 9 9 %～約 1 0 0 %は、表 9～1 2 のポリペプチド配列の 1 つ以上から選択される非重複性の 3 6 のアミノ酸配列モチーフからなる。

【0 1 2 9】

C F X T E N 融合タンパク質の X T E N 成分が、グリシン (G)、アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)、グルタミン酸 (E)、およびプロリン (P) から選択さ

50

れる4～6のアミノ酸からなる該融合タンパク質のアミノ酸の100%未満を有するかまたは表3由来のXTENと比較して100%未満の配列同一性を有する実施態様において、その他のアミノ酸残基は、14の天然L-アミノ酸のその他から選択されるが、XTEN配列が、少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の親水性アミノ酸を含むよう、親水性アミノ酸から優先的に選択される。グリシン(G)、アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)、グルタミン酸(E)、およびプロリン(P)ではないXTENアミノ酸は、XTEN配列配列じゅうに散在し、配列モチーフ内もしくは配列モチーフ間に配置され、またはXTEN配列の1つ以上の短いストレッチにおいて濃縮される。CFXTENのXTEN成分がグリシン(G)、アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)、グルタミン酸(E)、およびプロリン(P)以外のアミノ酸を含むような場合において、該アミノ酸が疎水性残基ではなく、かつXTEN成分の二次構造を実質的に与えるべきではないことが好ましい。XTENの構築にあまり好ましくない疎水性残基には、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、およびメチオニンが挙げられる。加えて、以下のアミノ酸、すなわち(ジスルフィド形成および酸化を回避するための)システイン、(酸化を回避するための)メチオニン、(デスアミデーション(desamidation)を回避するための)アスパラギンおよびグルタミンのうちの少数(例えば、5%未満)を含むかまたはまったく含まないよう、XTEN配列を設計することができる。したがって、いくつかの実施態様において、グリシン(G)、アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)、グルタミン酸(E)、およびプロリン(P)に加えて他のアミノ酸を含むCFXTEN融合タンパク質のXTEN成分は、Chou-Fasmanアルゴリズムによって測定されるようなアルファ-ヘリックスおよびベータ-シートに寄与する残基の5%未満を有する配列を有し、かつGORアルゴリズムによって測定されるような少なくとも90%、または少なくとも約95%以上のランダムコイル形成を有するであろう。

【0130】

(3. 配列の長さ)

本発明の別の態様において、本発明は、伸長した長さの配列を有するXTENポリペプチドの担体を含むCFXTEN組成物を包含する。本発明は、非反復性の構造化されていないポリペプチドの長さを増大させると、XTENの構造化されていない性質を亢進し、相応して、XTEN担体を含む融合タンパク質の生物学的特性及び薬物動態特性を高めるという発見を用いる。実施例においてより完全に説明されるように、XTENの長さにおける比例的延長は、単一のファミリー配列モチーフ(例えば、表3の4つのAEモチーフ)の固定された反復順序によって作製される場合でさえ、GORアルゴリズムによって決定される時、より短いXTEN長と比較して、より高い百分率のランダムコイル形成を有する配列を結果的に生じる。一般に、実施例において説明されるように、構造化されていないポリペプチド融合パートナーの長さを増大させると、結果的に、配列長のより短い構造化されていないポリペプチドパートナーとの融合タンパク質と比較して、終末半減期の不相応な延長を有する融合タンパク質を結果的に生じる。

【0131】

本発明のCFXTENに含まれるよう熟慮されるXTENの非限定例を以下の表4に呈する。一実施態様において、本発明は、CFXTEN組成物を提供し、この場合、融合タンパク質(複数可)のXTEN配列長は、約100超～約3000のアミノ酸残基であり、いくつかの場合、400超～3000のアミノ酸残基であり、この場合、XTENは、XTENに連結されていないCFと比較して、CFXTENに亢進した薬物動態特性を与える。いくつかの実施態様において、本発明のCFXTEN組成物のXTEN配列は、長さ約100、または約144、または約288、または約401、または約500、または約600、または約700、または約800、または約900、または約1000、ま

たは約1500、または約2000、または約2500、または最大約3000のアミノ酸残基であり得る。他の場合、XTE N配列は、長さ約100~150、約150~250、約250~400、401~約500、約500~900、約900~1500、約1500~2000、または約2000~約3000のアミノ酸残基であり得る。一実施態様において、CFXTE Nは、XTE N配列を含むことができ、この場合、該配列は、表4から選択されるXTE Nと比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を呈する。いくつかの実施態様において、XTE N配列は、融合タンパク質をコードする遺伝子のXTE N部分における最適化されたN末端リーダー配列(NTS)のためのコードヌクレオチドを含むことによるCFXTE NのN末端成分としての最適化した発現のために設計される。一実施態様において、発現したCFXTE NのN末端XTE N配列は、AE48またはAM48、AE624、またはAE912またはAM923の配列と比較して少なくとも90%の配列同一性を有する。別の実施態様において、XTE Nは、実施例14~17に説明されるN末端残基を有する。

10

【0132】

他の実施態様において、CFXTE N融合タンパク質は、第一および第二のXTE N配列を含み、この場合、XTE N配列における残基の累積的合計は、約400超~約3000のアミノ酸残基であり、かつXTE Nは、配列において同一であり得るかまたは異なり得る。先の実施態様において、CFXTE N融合タンパク質は、第一および第二のXTE N配列を含み、この場合、該配列は各々、表4から選択される少なくとも第一のもしくは加えて第二のXTE Nと比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を呈する。2つ以上のXTE NがCFXTE N組成物において用いられる例には、少なくとも1つのCFのN末端およびC末端の両方に連結されたXTE Nを有するコンストラクトを含むが、これに限定されない。

20

【0133】

下記により完全に説明されるように、本発明は、CFXTE Nが、XTE Nの長さを選択して、対象に投与される融合タンパク質に標的半減期を与えることによって設計される方法を提供する。一般に、CFXTE N組成物に組み込まれた累積的な約400の残基よりも長いXTE N長は結果的に、より短い累積的長さ；例えば、約280よりも短い残基と比較してより長い半減期を生じる。しかしながら、別の実施態様において、CFXTE N融合タンパク質は、対象への皮下投与または筋肉内投与の後、より小さな全身吸収速度を追加的に与えるよう選択される、より長い配列長を有するXTE Nを含むよう設計される。このような実施態様において、 C_{max} は、XTE Nに連結されていない、匹敵する用量のCFとの比較において低下し、それにより、該組成物についての治療ウィンドウ内にCFXTE Nを維持する能力に寄与する。したがって、XTE Nは、本明細書に説明される他の物理的／化学的特性に加えて、投与されたCFXTE Nにデポー特性を与える。

30

40

【表 4－1】

表 4：XTENポリペプチド

XTEN 名称	配列 番号	アミノ酸配列
AE48	61	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS
AM48	62	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS
AE144	63	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AF144	64	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GPGTSESPSGTAP GSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP
AE288	65	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF504	66	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSXPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGXSXPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP
AF540	67	GSTSSTAESP GPGTSSTAESP GPGTSESPSGTAPGSTSSTAESP GPGTSSTAESP GP GTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESP GPGTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAP

10

20

【表 4 - 2】

XTEN 名称	配列 番号	アミノ酸配列
		GTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAP GSTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAP GTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAP
AD576	68	GSSSEGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGG PGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEP GPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEP GSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG PGESSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG SSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG GSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG GEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG SESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG ESPGGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG
AE576	69	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF576	70	GSTSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSTSEPSGTAPGTSSTAESP GPGTSSSTAESP G GTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAP GTSPSGESSTAPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTSEPSGTAP GTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTPESGSASP GTSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAP GTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAP GTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAP GTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAPGTSTSEPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAP GTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTSEPSGTAP GTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP
AE624	71	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AD836	72	GSSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSE SGESPGGSSGSESGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGS ESGSPGGSSGSESGSPGGSSGSESGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGS GGPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGS SGSESGSPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGGPGGESSGSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGGPGGESSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSGGE PSESGSSGSGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSE SSGPGESSGESPGGSSGSESGSEGGPGGESSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG ESGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSGSGGEPSESGSSGSEGGPGGESSGSESGSGGEP ESPGGSSGSESGSEGGPGSSEGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGGPGGESSGSESG SSGPGESSGSEGGPGGESSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGS PGGSSGSESGGEPSESGSSGSEGGPGGESSGSESGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESG SESGSSEGGPGSSEGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGGESSGSESG SGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGGESSGSESG

10

20

30

40

XTEN 名称	配列 番号	アミノ酸配列
		GSGGEPSESGSS
AE864	73	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF864	74	GSTSESPGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP GTSSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP G GTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAP GTSTPESGPXXXGASASGAPSTXXXXSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAP PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTA PGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSESPSGTA PGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSAS PGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSESPSGTAPGTSESPSGTA PGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTA PGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTA PGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSP
AG864	75	GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSPGSSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSS GSPGTPGSGTASSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGA TGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGS TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGT GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGS PSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSPG ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGTSSSTGATGSPGTPGSGTASSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSSTPSGATG PGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS GSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSP
AM875	76	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSSTAESP GPGTSTPESGSAS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSSTPS GATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSSSTAESP GPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTTPGSGTASSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG STSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG

40

【表 4 - 4】

XTEN 名称	配列 番号	アミノ酸配列
		SPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP
AE912	77	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AM923	78	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESP GPGTSTEPESGSASPGTSESPTS GTAPGTSESPTSGTAPGTSTEPESGSASPGTSTEPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTGPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS TSSTAESP GPGTSESPTSGTAPGTSPSGESSTAPGTGPGSGTASSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSSTAESP G GTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS PGTSSTAESP GPGTSTEPESGSASPGTSESPTSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP
AM1318	79	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESP GPGTSTEPESGSAS PGTSESPTSGTAPGTSESPTSGTAPGTSTEPESGSASPGTSTEPESGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTGPGSGTASSPGSSTPS GATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGPEPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAESP GPGTSESPTSGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPTSGTAPGTSESPTSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASAGAP STGGTSPSGESSTAPGTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTSTEP GSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSESPTSGTAPGTSESPTSGTAPGTSTEPESGSASPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTSSESPTSGTAPGTSPSGESSTAPGT SSSTAESP GPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTGPGSGTASSPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP
BC 864	80	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEP SGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTE

10

20

30

40

【表 4-5】

[illegible]

【 0 1 3 4 】

(4. XTENセグメント)

一実施態様において、本発明は、単離されたCFXTEN融合タンパク質を提供し、この場合、XTEN成分の累積的な長さは、表4、9、10、11、12、および13から選択される少なくとも1つのポリペプチド配列セグメントを含む約100超～約3000のアミノ酸残基であり、かつXTEN配列の残りの少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、またはそれより多くが、親水性アミノ酸を含み、かつXTENの残りの約2%未満が、疎水性アミノ酸もしくは芳香族アミノ酸もしくはシステインからなる。いくつかの実施態様において、XTENは、セグメントが同一かまたは異なる複数のセグメントを含む。別の実施態様において、本発明は、単離されたCFXT

E N融合タンパク質を提供し、この場合、X T E N成分の累積的な長さは、約100超～約3000のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも約100～約923、または少なくとも約100～約875、または少なくとも約100～約576、または少なくとも約100～約144のアミノ酸残基の少なくとも1つの配列セグメントを含み、この場合配列セグメント（複数可）は、少なくとも3つの異なる種類のアミノ酸から成り、配列セグメント（複数可）におけるグリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）の残基の合計が、配列セグメントの全アミノ酸配列の少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%を構成し、X T E N配列（複数可）の残りの少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%が親水性アミノ酸から成り、かつ、X T E N配列（複数可）の残りの2%未満が疎水性アミノ酸もしくは芳香族アミノ酸もしくはシステインからなる。別の実施形態において、本発明は、単離されたC F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、X T E N成分の累積的な長さは、約100超～約3000のアミノ酸残基であり、かつ少なくとも約200～約923、または少なくとも約200～約875、または少なくとも約200～約576、または少なくとも約200～約288のアミノ酸残基の少なくとも1つの配列セグメントを含み、この場合、配列セグメント（複数可）におけるグリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）の残基の合計が、配列セグメントの全アミノ酸配列の少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%を構成し、かつ該セグメントのサブシーケンススコアは、12未満、より好ましくは10未満、より好ましくは9未満、より好ましくは8未満、より好ましくは7未満、より好ましくは6未満、最も好ましくは5未満であり、かつX T E N配列（複数可）の残りの少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%が親水性アミノ酸からなり、かつX T E N配列（複数可）の残りの約2%未満が疎水性アミノ酸、芳香族アミノ酸、またはシステインアミノ酸からなる。

【0135】

（5．N末端X T E N発現増強配列）

いくつかの実施態様において、本発明は、C F X T E N融合タンパク質のN末端部分として組み込まれた短い長さのX T E N配列を提供する。融合タンパク質の発現は、結合している融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに組み込まれた（N末端X T E Nをコードする）最適化されたN末端リーダーポリヌクレオチド配列を含む好適な発現ベクターで形質転換された宿主細胞において亢進することが発見された。実施例14～17において説明されるように、結合している融合タンパク質遺伝子における最適化されたN末端リーダー配列（N T S）を含むこのような発現ベクターで形質転換された宿主細胞は結果的に、N T Sを含まないポリヌクレオチドからの相応する融合タンパク質の発現と比較して、融合タンパク質の非常に亢進した発現を生じ、発現を亢進するために用いられる非X T E Nリーダー配列の組み込みの必要性を除去する。一実施態様において、本発明は、N T Sを含むC F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、宿主細胞におけるコード遺伝子からの結合している融合タンパク質の発現は、（コード遺伝子がN T Sを欠失する）N末端X T E N配列を含まないC F X T E N融合タンパク質の発現と比較して約50%、約50%、または約75%、または約100%、または約150%、または約200%、または約400%亢進する。

【0136】

一実施態様において、CFXTENのN末端XTENポリペプチドは、個々のアミノ酸配列が以下のとおりであるAE48またはAM48のアミノ酸配列と比較して、少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、より好ましくは少なくとも約92%、より好ましくは少なくとも約93%、より好ましくは少なくとも約94%、より好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、より好ましくは少なくとも約97%、より好ましくは少なくとも約98%、より好ましくは少なくとも99%の配列同一性を呈するかまたは100%の配列同一性を呈する配列を含む：

AE48：MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSSTPSGAT
GSPGASPGTSSSTGS (配列番号61)

AM48：MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGAT
GSPGSSSTPSGATGS (配列番号62)

。

【0137】

別の実施態様において、短い鎖のN末端XTENは、より長い長さのXTENに連結され、CFXTEN融合タンパク質のN末端領域を形成し、この場合、短い長さのN末端XTENをコードするポリヌクレオチド配列は、宿主細胞における亢進した発現の特性を与え、かつ、この場合、発現したXTENの長い長さは、先に説明した通り、融合タンパク質におけるXTEN担体の亢進した特性に起因する。前述において、短い長さのXTENは、本明細書に開示される任意のXTEN（例えば、表3のXTEN）に連結され、結果として生じるXTENは順に、融合タンパク質の成分としての本明細書に開示される任意のCF（例えば、表1または表2のCF）のN末端に連結される。あるいは、短い長さのXTENをコードするポリヌクレオチド（またはその相補体）は、本明細書に開示される任意のXTENをコードするポリヌクレオチド（またはその相補体）に連結され、結果として生じるN末端XTENコード遺伝子は順に、本明細書に開示される任意のCFをコードするポリヌクレオチドの5'に（またはその相補体の3'末端に）連結される。いくつかの実施態様において、長い長さのN末端XTENポリペプチドは、配列AE624、AE912、およびAM923からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較して、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、もしくは少なくとも約91%、もしくは少なくとも約92%、もしくは少なくとも約93%、もしくは少なくとも約94%、もしくは少なくとも約95%、もしくは少なくとも約96%、もしくは少なくとも約97%、もしくは少なくとも約98%、もしくは少なくとも99%を呈するか、または100%の配列同一性を呈する。

【0138】

先に説明された前述の任意のN末端XTENの実施態様において、N末端XTENは、融合タンパク質の標的部分をコードする遺伝子にN末端XTENをコードするヌクレオチドを接合するために採用される制限エンドヌクレアーゼ制限部位を収容するために、好ましくはGESTPAから選択される約1～約6の追加的なアミノ酸残基を有することができる。N末端配列の生成および本発明の融合タンパク質への組み込みのための方法は、実施例においてより完全に説明される。

【0139】

(6. 正味の電荷)

他の実施態様において、XTENポリペプチドは、XTEN配列における正味の電荷を有するおよび／または疎水性アミノ酸の比を低下させるアミノ酸残基の組み込みによって与えられる構造化されていない特徴を有する。全体的な正味の電荷および正味の電荷密度は、XTEN配列における帯電したアミノ酸の含有量を修飾することによって制御される。いくつかの実施態様において、組成物のXTENの正味の電荷密度は、+0.1電荷／残基を上回り得るかまたは-0.1電荷／残基を下回り得る。本明細書のタンパク質またはペプチドの「正味の電荷密度」によって意味されるのは、該タンパク質またはペプチド

におけるアミノ酸の総数によって除される正味の電荷である。他の実施態様において、X T E Nの正味の電荷密度は、約0%、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、または約20%、またはそれより多くあり得る。

【0140】

ヒトまたは動物におけるほとんどの組織および表面は、正味の負の電荷を有するので、いくつかの実施態様において、X T E N配列は、X T E N含有組成物と血管、健常組織、または種々の受容体などの種々の表面との間の非特異的相互作用を最小化するために正味の負の電荷を有するよう設計される。特定の理論によって結びつけられることなく、X T E Nは、正味の負の電荷を個々の保有しかつX T E Nポリペプチドの配列にわたって分布されるX T E Nポリペプチドの個々のアミノ酸間の静電反発力により開いた立体配座を採用することができる。伸長した配列長のX T E Nにおける正味の負の電荷のこのような分布は、構造化されていない立体配座をもたらすことができ、該立体配座は順に、水力学的半径における有効な増大を結果的に生じる k とができる。好ましい実施態様において、負の電荷は、グルタミン酸残基の組み込みによって与えられる。したがって、一実施態様において、本発明は、X T E N配列が約8、10、15、20、25、またはさらに約30%のグルタミン酸を含むX T E Nを提供する。一般的に、グルタミン酸残基は、X T E N配列にわたって均一に一定間隔で配置される。いくつかの場合において、X T E Nは、産物の電荷均一性を増大させることができかつその等電点を鋭くすることができ、それゆえ生成手順を簡素化するために、結果として生じるC F X T E N融合タンパク質の物理化学的特性を亢進することのできる、非常に類似した pK_a を有するであろう帯電した残基を有するX T E Nを結果的に生じることのできる20 kDaのX T E Nあたり約10~80、または約15~60、または約20~50のグルタミン酸残基を含むことができる。

【0141】

本発明の組成物のX T E Nは一般的に、正に帯電したアミノ酸を全く有さないかまたは該アミノ酸の低含有量を有する。いくつかの実施態様において、X T E Nは、正の電荷を有する約10%未満のアミノ酸残基、または正の電荷を有する約7%未満、もしくは約5%未満、もしくは約2%未満、もしくは約1%未満のアミノ酸残基を有し得る。しかしながら、本発明は、リシンなど、正の電荷を有するアミノ酸の制限された数が、該リシンのイプシロンアミンとペプチドにおける反応基、リンカー架橋、またはX T E N主鎖に抱合されるべき薬物もしくは小分子における反応基との間の抱合を可能にするためにX T E Nに組み込まれる。前述の一実施態様において、X T E Nは、約1~約100のリシン残基、または約1~約70のリシン残基、または約1~約50のリシン残基、または約1~約30のリシン残基、または約1~約20のリシン残基、または約1~約10のリシン残基、または約1~約5のリシン残基、またはそれに代わるものとしてたった1つの単一のリシン残基を有する。先のリシン含有X T E Nを用いて、X T E N、凝固因子、加えて、増殖関連疾患もしくは障害の治療に有用な化学治療薬を含む融合タンパク質が構築され、この場合、X T E N成分に組み込まれた薬剤の分子の最大数は、X T E Nに組み込まれたリシン、または反応性側鎖を有する他のアミノ酸（例えば、システイン）の数によって決定される。

【0142】

いくつかの実施態様において、X T E N配列は、より良好な発現挙動または精製挙動をもたらす、セリンまたはグリシンなどの他の残基によって分離される帯電した残基を含む。正味の電荷に基づいて、いくつかのX T E Nは、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、またはさらには6.5の等電点(pI)を有する。好ましい実施態様において、X T E Nは、1.5~4.5の等電点を有する。これらの実施態様において、本発明のC F X T E N〔融合タンパク質組成物に組み込まれたX T E Nは、構造化されていない立体配座ならびに哺乳類のタンパク質および組織へのX T E N成分の低下した結合に寄与する生理学的条件下で正味の負の電荷を保

有する。

【0143】

疎水性アミノ酸は、ポリペプチドに対して構造を与えるので、本発明は、X T E Nにおける疎水性アミノ酸の含有量が、典型的には、5 %未満、または2 %未満、または1 %未満の疎水性アミノ酸含有量であることを提供する。一実施態様において、C F X T E N融合タンパク質のX T E N成分におけるメチオニンおよびトリプトファンのアミノ酸含有量は、典型的には5 %未満、または2 %未満、および最も好ましくは1 %未満である。別の実施態様において、X T E Nは、正の電荷を有する10 %未満のアミノ酸、または正の電荷を有する約7 %未満、もしくは約5 %未満、もしくは約2 %未満のアミノ酸残基を有する配列を有し、メチオニン残基およびトリプトファン残基の合計は2 %未満であり、かつアスパラギン残基およびグルタミン残基の合計は、全X T E N配列の10 %未満である。

10

【0144】

(7. 低免疫原性)

別の態様において、本発明は、X T E N配列が、低い程度の免疫原性を有するかまたは実質的に非免疫原性である組成物を提供する。いくつかの因子は、X T E Nの低免疫原性に寄与することができ、例えば、X T E N配列における、非反復性配列、構造化されていない立体配座、高い程度の溶解度、低い程度の自己凝集もしくは自己凝集の欠失、配列内のタンパク質分解性部位の低い程度もしくは欠失、およびエピトープの低い程度もしくは欠失である。

20

【0145】

立体配座のエピトープは、タンパク質抗原の複数の不連続なアミノ酸配列から構成されるタンパク質表面の領域によって決定される。タンパク質の精確な折りたたみは、これらの配列を、宿主体液性免疫系によって「外来」として認識できる、該タンパク質に対する抗体の産生もしくは細胞仲介性免疫応答の活性化を結果的に生じる、十分に規定された安定な空間的立体配置、またはエピトープにする。後者の場合、個体におけるタンパク質に対する免疫応答は、個体のH L A - D Rアロタイプのペプチド結合特異性の関数であるT細胞エピトープ認識によって著しく影響される。T細胞の表面における同族のT細胞受容体によるM H CクラスIIペプチド複合体の会合は、C D 4分子などの他のある共受容体の交差結合とともに、活性化された状態をT細胞内で誘導することができる。活性化は、B細胞などの他のリンパ球をさらに活性化させて抗体を産生させる、または完全な細胞免疫応答としてTキラー細胞を活性化させるサイトカインの放出をもたらす。

30

【0146】

A P C (抗原提示細胞)の陽めんにおける提示のための所与のM H CクラスII分子を得k都合するペプチドの能力は、いくつかの因子に依存しており、最も顕著なのはその一次配列である。一実施態様において、より低い程度の免疫原性は、抗原提示細胞における抗原加工に対する抵抗するX T E N配列を設計すること、および／またはM H C受容体を十分に結合しない配列を選択することによって達成される。本発明は、M H C I I受容体との結合を低下させ、およびT細胞受容体のためのエピトープの形成もしくは抗体結合を回避するよう設計され、結果的に低い程度の免疫原性を生じる、実質的に非反復性のX T E Nポリペプチドを有するC F X T E N融合タンパク質を提供する。免疫原性の回避は、X T E N配列の立体配座の柔軟性の結果、すなわち、アミノ酸残基の選択及び順序による二次構造の欠失に少なくとも一部起因する。例えば、特に関心対象であるのは、水溶液中でまたは立体配座エピトープを結果的に生じ得る生理学的条件下でコンパクトに折りたたまれた立体配座に適応する傾向の低い配列である。従来 of 治療的实施および投薬を用いた、X T E Nを含む融合タンパク質の投与は、X T E N配列に対する中和抗体の形成を一般的に生じるだけでなく、C F X T E N組成物におけるC F融合パートナーの免疫原性も低下させるであろう。

40

【0147】

一実施態様において、対象の融合タンパク質において利用されるX T E N配列は、ヒト

50

T細胞によって認識されるエピトープが実質的に存在し得ない。より低い免疫原性のタンパク質を生成する目的のためのこのようなエピトープの除去はすでに開示されており、例えば、本命い最初に引用により組み込まれているWO 98/52976、WO 02/079232、および WO 00/3317を参照されたい。ヒトT細胞エピトープについてのアッセイは、すでに説明されている(Stickler, M., et al. (2003) J Immunol Methods, 281: 95-108)。特に関心対象であるのは、T細胞エピトープも非ヒト配列も生じないオリゴマー化されることのできるペプチド配列である。このことは、T細胞エピトープの存在について、およびヒトではない6~15マー、特に9マーの配列の発生についてこれらの配列の直接的な反復を試験した後、XTEN配列の設計を変更して、エピトープ配列を除去または破棄することによって達成される。いくつかの実施態様において、XTEN配列は、MHC受容体に結合することが推定されるXTENのエピトープの数の制限によって、実質的に非免疫原性である。MHC受容体に対して結合することのできるエピトープ数の減少とともに、T細胞の活性化およびT細胞ヘルパー機能についての能力の同時低下、B細胞の低下した活性化または上方制御、ならびに低下した抗体産生がある。低い程度の推定T細胞エピトープは、実施例45に示されるように、例えばTEPITOPE(Sturniolo, T., et al. (1999) Nat Biotechnol, 17: 555-61)などのエピトープ推定アルゴリズムによって決定することができる。タンパク質内の所与のペプチドフレームのTEPITOPEスコアは、Sturniolo, T. et al. (1999) Nature Biotechnology 17: 555に開示されるように、複数の最も普遍的なヒトMHC対立遺伝子に対する該ペプチドフレームの結合の K_d (解離定数、親和性、オフレート)の対数である。該スコアは、少なくとも $20 \log$ を上回り、約 $10 \sim$ 約 -10 にわたり($10e^{10} K_d \sim 10e^{-10} K_d$ の結合拘束に相当)、M、I、L、V、FなどのMHCにおけるペプチドディスプレイの間にアンカー残基として機能する疎水性アミノ酸を回避することによって低下することができる。いくつかの実施態様において、CFXTENに組み込まれたXTEN成分は、約 -5 以上、または -6 以上、または -7 以上、または -8 以上のTEPITOPEスコアにおいて、あるいは -9 以上のTEPITOPEスコアにおいて推定T細胞エピトープを有しない。本明細書で使用する場合、「 -9 以上」のスコアは、 $10 \sim -9$ のTEPITOPEスコアを包括的に包含するであろうが、 -10 が -9 よりも小さいので -10 のスコアを包含しないであろう。

【0148】

別の実施態様において、対象のCFXTEN融合タンパク質に組み込まれたものを含む本発明のXTEN配列は、MHC II受容体に結合することのできる小ペプチドへのXTENのプロセッシングを低下させるXTENの配列由来の公知のタンパク質分解性部位の制限によって、実質的に非免疫原性にする。別の実施態様において、XTEN配列は、二次構造を実質的に欠く配列の使用によって実質的に非免疫原性にされ、該構造の高いエントロピーにより多くのプロテアーゼに対する耐性を与える、したがって、低下したTEPITOPEスコアおよび、XTENからの公知のタンパク質分解性部位の除去によって、CFXTEN融合タンパク質組成物のXTENを含めたXTEN組成物を、免疫系の受容体を含む哺乳類受容体によって結合することが実質的にできないようにする。一実施態様において、CFXTEN融合タンパク質のXTENは、哺乳類受容体に対する $>100 \text{ nM } K_d$ の結合を有し得、または哺乳類細胞表面もしくは循環しているポリペプチド受容体に対しては、 $500 \text{ nM } K_d$ 超もしくは $1 \mu\text{M } K_d$ 超を有し得る。

【0149】

加えて、非反復性配列およびXTENのエピトープの相応する欠失は、B細胞がXTENに結合しまたはXTENによって活性化される能力を制限する。反復性配列は認識され、数個のB細胞とさえ多価接触を形成することができ、複数のT細胞と無関係の受容体の交差連結の結果として、B細胞増殖および抗体産生を刺激することができる。対照的に、XTENは、その伸長した配列にわたって多くの異なるB細胞と接触することができるが

、各個々のB細胞は、該配列の反復性のないことにより、個々のX T E Nと1つまたは少数の接触しかなし得ない。いずれの理論によっても結びつけられることなく、X T E Nは典型的には、B細胞の増殖を刺激する傾向、およびしたがって免疫応答が非常により低い。一実施態様において、C F X T E Nは、X T E N Tに融合しない相応のC Fと比較して、低下した免疫原性を有する。一実施態様において、哺乳類への最大3非経口用量のC F X T E Nの投与は結果的に、1：100の血清希釈において検出可能な抗C F X T E N I g Gを生じるが、1：1000の希釈においては生じない。別の実施態様において、哺乳類へのC F X T E Nの最大3経口用量の投与は結果的に、1：100の血清希釈において検出可能な抗C F I g Gを生じるが、1：1000の希釈においては生じない。別の実施態様において、哺乳類への最大3経口用量のC F X T E Nの投与は結果的に、1：1000の血清希釈において検出可能な抗X T E N I g Gを生じるが、1：1000の希釈においては生じない。先の実施態様において、哺乳類は、マウス、ラット、ウサギ、またはカニクイザルであり得る。

【0150】

高い程度の反復性を有する配列に対する非反復性配列を有するX T E Nの追加的な特長は、抗体とより弱い接触を形成する非反復性X T E Nである。抗体は、多価分子である。例えば、I g Gは、2つの同一の結合部位を有し、I g Mは、10の同一の結合部位を含む。したがって、反復性配列に対する抗体は、このような反復性配列の潜在能力および／または除去に影響することのできる高い結合活性を有するこのような反復性配列と多価の接触を形成することができる。対照的に、非反復性X T E Nに対する抗体は、一価の相互作用を生じ得、結果的に、C F X T E N組成物が、延長した時間循環に留まることができるよう、免疫クリアランスの見込みをほとんど生じない。

【0151】

(8. 増大した水力学的半径)

別の態様において、本発明は、X T E Nポリペプチドが、X T E Nを組み込んでいるC F X T E N融合タンパク質に相応の増大した見かけの分子量を与える高い水力学的半径を有する、X T E Nを提供する。実施例38に詳述されるように、F I X配列またはF V I I配列など、C F配列に対するX T E Nの連結は結果的に、X T E Nに連結されていないC Fと比較して、増大した水力学的半径、増大した見かけの分子量、および増大した見かけの分子量因子を結果的に生じる。例えば、長期化した半減期が所望である治療適用において、高い水力学的半径を有するX T E Nが、C Fを含む融合タンパク質に組み込まれている組成物は、(天然のF I XおよびF V I Iの両方よりも大きな、約70kDAの見かけの分子量に相当する)およそ3～5nmの糸球体の孔サイズを超えて、該組成物の水力学的半径を効果的に拡大することができ(Calici et al., 2003, Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates, Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277)、結果的に循環しているタンパク質の低下した腎クリアランスを生じる。タンパク質の水力学的半径は、その分子量によっておよび、形状またはコンパクトさを含めたその構造によって決定される。特定の理論に結び付けられることなく、X T E Nは、ペプチドの個々の電荷間の静電反発力、または二次構造を与える能力を欠失する配列中の特定のアミノ酸によって与えられる固有の柔軟性により、開いた立体配座を採用することができる。X T E Nポリペプチドの開いた、伸長した、および構造化されていない立体配座は、典型的な球状タンパク質などの二次および／または三次構造を有するかなりの配列長および／または分子量のポリペプチドと比較してより大きな比例した水力学的半径を有することができる。米国特許第6,406,632号および第7,294,513号において説明されるような分子ふるいクロマトグラフィー(SEC)の使用などによる、水力学的半径を決定するための方法は、当該技術分野で周知である。実施例38の結果が示すように、X T E Nの増大する長さの付加は結果的に、水力学的半径、見かけの分子量、および見かけの分子量因子のパラメータにおける比例的な増大を生じ、C F X T E Nを所望の特徴的なカ

ットオフの見かけの分子量または水力学的半径に仕立てることができる。したがって、ある実施態様において、CFXTEN融合タンパク質は、該融合タンパク質が少なくとも約5 nm、または少なくとも約8 nm、または少なくとも約10 nm、または12 nm、または少なくとも約15 nmの水力学的半径を有することができるよう、XTENを用いて構成されることができる。先の実施態様において、CFXTEN融合タンパク質におけるXTENによって与えられる大きな水力学的半径は、結果として生じる融合タンパク質の低下した腎クリアランスをもたらす、終末半減期の相応する延長、平均滞留時間の延長、および／または腎クリアランス速度の低下をもたらす。

【0152】

別の実施態様において、選択された長さおよび配列（例えば、表4由来の配列またはその配列バリエーション）のXTENは、CFXTENに選択的に組み込まれ、生理学的条件下で少なくとも約500 kDa、または少なくとも約800 kDa、または少なくとも約1000 kDa、または少なくとも約1500 kDa、または少なくとも約1800 kDa、または少なくとも約2000 kDa、または少なくとも約2300 kDa、またはそれより大きな見かけの分子量を有する融合タンパク質を作製することができる。別の実施態様において、選択された長さおよび配列のXTENは、CFに選択的に連結され、生理学的条件下で、少なくとも4の、あるいは少なくとも5の、あるいは少なくとも6の、あるいは少なくとも8の、あるいは少なくとも10の、あるいは少なくとも15の見かけの分子量因子を、あるいは、少なくとも20以上の見かけの分子量因子を有するCFXTEN融合タンパク質を結果的に生じる。別の実施態様において、CFXTEN融合タンパク質は、生理学的条件下で、該融合タンパク質の実際の分子量に対して約4～約20である、または約6～約15である、または約8～約12である、または約9～約10である見かけの分子量因子を有する。

【0153】

(V). CFXTENバリエーション、構造的立体配置、および特性)

対象の組成物のCFは、天然の全長のFIXポリペプチドまたはFVIIポリペプチドに限定されないだけでなく、組換えバージョン、ならびに配列バリエーション、FVII配列およびFIX配列の組み合わせ、またはそれらの断片を有する生物学的におよび／または薬理学的に活性のある形態も含む。例えば、種々のアミノ酸の欠失、挿入、および置換がCFにおいて実施され、CFの生物学的活性または薬理学的特性に関して本発明の精神から逸脱せずにバリエーションを作製することは認識される。ポリペプチド配列におけるアミノ酸についての保存的置換の例を表5に示す。しかしながら、CFの配列同一性が、本明細書に開示される具体的な配列と比較して100%未満であるCFXTENの実施態様において、本発明は、その他の任意の19の天然L-アミノ酸と、隣接するアミノ酸残基を含めたCFの配列内の任意の位置にあり得る所与のCF（例えば、FIXまたはFVII）の所与のアミノ酸残基との置換を熟慮する。任意の1つの置換が、生物活性における望ましくない変化を結果的に生じる場合、代替的なアミノ酸のうちの1つを採用することができる。本明細書に説明される方法によって、または例えばそのすべての内容が全体として引用により組み込まれている米国特許第5,364,934号において示される保存的突然変異および非保存的突然変異についての任意の技術およびガイドラインを用いて、または当該技術分野で一般的に公知の方法を用いて、コンストラクトを評価する。加えて、バリエーションには、例えばポリペプチドを含むことができ、この場合、1つ以上のアミノ酸残基が、天然ペプチドの生物活性のすべてではないにしてもいくらかを保有するCFの全長の天然アミノ酸配列のN末端またはC末端において付加または欠失され；例えば、凝固カスケードにおいて別の凝固因子を活性化させるおよび／または該カスケードに関与する能力は、フィブリン形成および止血をもたらす。

【0154】

一実施態様において、CFXTEN融合タンパク質に組み込まれるFIX因子は、表1に由来する配列と比較して少なくとも約80%の配列同一性を、あるいは、表1に由来する配列と比較して少なくとも約81%、または約82%、または約83%、または約84

%、または約 85 %、または約 86 %、または約 87 %、または約 88 %、または約 89 %、または約 90 %、または約 91 %、または約 92 %、または約 93 %、または約 94 %、または約 95 %、または約 96 %、または約 97 %、または約 98 %、または約 99 %の配列同一性を呈する配列を有する。

【0155】

一実施態様において、CFXTEN融合タンパク質に組み込まれる第VII因子は、表2由来の配列と比較して少なくとも約80%の配列同一性を、あるいは表2由来の配列と比較してat least 約81%、または約82%、または約83%、または約84%、または約85%、または約86%、または約87%、または約88%、または約89%、または約90%、または約91%、または約92%、または約93%、または約94%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%の配列同一性を呈する配列を有する。

【0156】

【表5】

表5：例示的な保存的アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換
Ala (A)	val; leu; ile
Arg (R)	lys; gln; asn
Asn (N)	gin; his; lys; arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro
His (H)	asn; gin; lys; arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg; gin; asn
Met (M)	leu; phe; ile
Phe (F)	leu; val; ile; ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; phe; thr; ser
Val (V)	Ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン

(1. 内部XTEN配列)

本発明は、CF配列に対して内部に配置された1つ以上のXTEN配列を含むCFXTENを包含する。1つ以上の内部に配置されたXTENは、36~ ≥ 1000 のアミノ酸残基の配列長であり得る。いくつかの実施態様において、CFXTENは、表4、9、10、11、12、および13から選択される1つ以上のXTENと比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する1または2または3または4またはそれより多くのXTEN配列を有することができ、この場合、XTEN配列は、CF配列に対して内部に配置される。前述の一実施態様において、1つ以上の内部XTENを有するCFXTENは、表4から選択される1つ以上のXTENと比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もし

くは100%の配列同一性を有する融合タンパク質のN末端またはC末端に配置される追加的なXTENを有する。別の実施態様において、本発明は、プロテアーゼによって作用される場合にXTENが放出されることができるよう、開裂配列（例えば、表7の開裂配列）によってCFに連結されたC末端XTENをさらに含む（下記に詳述されるような）内部XTENを有するCFXTENを提供した。開裂配列によるXTENの連結は、下記におよび実施例においてより完全に説明される。

【0157】

いくつかの実施態様において、図2に示されかつ実施例においてより完全に説明されるように、XTENは、FIX配列のドメイン間に、例えば、G1aとEGF1との間に、またはEGF1とEGF2との間に、またはEGF2と活性化ペプチドとの間に、またはAPのR145 - A146およびR180 - V181の活性化ペプチド残基間（すなわち、配列TVFPDV¹VDYVNSTEAE²ITLDNITQSTQSF³ND⁴F（配列番号84）の任意の2つのアミノ酸の間）の活性化ペプチドの配列内に、またはEGF2と活性化ペプチドとの間に、または活性化ペプチドとプロテアーゼドメインとの間に配置されることができ、または前述の任意の組み合わせであり得る。他の実施態様において、図2に示されかつ実施例においてより完全に詳述されるように、XTENは、FIX配列の個々のドメイン内の既存のループ配列内に挿入されることができ、それにより1) XTENは、該ドメインの外側にループ化構造を形成し、かつ該ドメインの正常なアーキテクチャーを破壊せず；かつ2) XTENは、組み込まれた開裂部位の開裂によって放出されることができ、

【0158】

別の実施態様において、本発明は、FVII配列のドメイン間、例えば、G1aとEGF1との間、またはEGF1とEGF2との間、またはEGF2と活性化ペプチドとの間、または活性化ペプチドとプロテアーゼドメインとの間に配置される1つ以上のXTEN、あるいは前述の任意の組み合わせを組み込むFVIIを含むCFXTENを提供する。XTENは、表4、8、9、10、11、12、および13由来の配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%またはそれより大きな配列同一性を有する配列を含むがこれらに限定されない36~>1000のアミノ酸残基の配列であり得る。一実施態様において、図5および図6に示されるように、XTENは、残基Arg¹⁵² - Ile¹⁵³間においてEGF2ドメインと単一の溶解性開裂部位との間に組み込まれる。他の実施態様において、図5および図6において示されかつ実施例においてより完全に説明されるように、XTENは、FVII配列の個々のドメイン内の既存のループ配列内に挿入されることができ、それにより1) XTENは、該ドメインの外側にループ化構造を形成しかつ該ドメインの正常なアーキテクチャーを破壊せず；かつ2) XTENは、組み込まれた開裂部位の開裂によって放出されることができ、

【0159】

（2. 第VII因子 - FIX複合配列バリエーション）

本発明は、野生型第VII因子を活性化しない凝血原プロテアーゼによって開裂可能な少なくとも1つの異種性配列を含む単離された第VII因子ポリペプチドを提供し、この場合、開裂の際に異種性配列である第VII因子ポリペプチドが活性化される。例えば、配列の一部に組み込まれまたは配列の一部を第IX因子由来の活性化ペプチドドメイン（AP）配列の第VII因子コンストラクト部分と置き換える第VII因子 - 第IX因子複合配列バリエーションを有するCFXTENは結果的に、凝固カスケードの内在性システムの一部として活性化されることができ、複合組成物を生じる。融合タンパク質のCF成分と同じ第VII因子 - 第IX因子配列バリエーションを組み込むCFXTENは、CF成分が活性化されない組成物の対象への投与を可能にし、内在性凝固カスケードの惹起によってまたは自己活性化によって（後者は遅い過程である）活性化されるまで、プロテアーゼ阻害剤による不活性化に大きく抵抗性のある不活性の循環するデポーとしてとどまるので多量で投薬することができる。FVII/FIX複合配列に関する非限定例を、天然FIXお

よびF V I Iのものとの相同性を有する複合アミノ酸配列の当該部分を示す図36に示す。いくつかの実施態様において、C F X T E Nは、F I X活性化ペプチド配列の部分または全体を、F V I IのプロテアーゼドメインのN末端側への、すなわち、全長の前駆体ポリペプチドの位置212におけるアルギニンまたは位置213におけるイソロイシンで始まるN末端に向けてのF V I I配列についての1つまたは両方のF I X A P開裂部位と置き換える第V I I因子-第I X因子配列バリエーションを含む。一実施態様において、第V I I因子-第I X因子配列C Fは、完全長のF I X A Pドメインに加え、F I XのR145-A146開裂部位およびR180-V181開裂部位の片側または両側において隣接するアミノ酸残基に接する少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4、または少なくとも約5、または少なくとも約6、または少なくとも約7、または少なくとも約8、または少なくとも約9、または少なくとも約10、または少なくとも約11、または少なくとも約12のアミノ酸を組み込む（例えば、N末端側における12の隣接するアミノ酸およびC末端側の5の隣接するアミノ酸の場合における配列R V S V S Q T S K L T R A E T V F P D V D Y V N S T E A E T I L D N I T Q S T Q S F N D F T R V V G G E（配列番号1））。別の実施態様において、C F X T E Nは、R145-A146開裂部位に隣接する少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4、または少なくとも約5の配列を含むA Pの一部を組み込む第V I I因子-第I X因子配列バリエーションを含む（例えば、開裂部位のいずれかの側にある6の隣接するアミノ酸の場合におけるT S K L T R A E T V F P（配列番号3））。別の実施態様において、C F X T E Nは、R180-V181 A P開裂部位の片側または両側に隣接する少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4、または少なくとも約5のアミノ酸の配列を含むA Pの一部を組み込む第V I I因子-第I X因子配列バリエーションを含む（例えば、F I X由来の開裂部位のN末端隣接における4のアミノ酸およびC末端としてのバリンの場合における該配列およびD F T R V（配列番号4））。別の実施態様において、C F X T E Nは、融合タンパク質のF V I I成分のC末端とX T E N成分との間のリンカーと同じA P配列をさらに含む本節の前述の任意の実施態様の第V I I因子-第I X因子配列バリエーション；例えば、F V I Iバリエーション-A P配列-X T E NのN末端からC末端への立体配置を含み、それによりF V I IからF V I I aへの移行のものによる同じ内在性凝固因子によるC F X T E N融合タンパク質からの第V I I因子-第I X因子配列バリエーション成分の放出を可能にする。別の実施態様において、C F X T E Nは、F V I Iバリエーション配列とX T E Nとの間のリンカーとしての第X I因子開裂配列K L T R A E T（配列番号6）をさらに含む本節の前述の任意の実施態様の第V I I因子-第I X因子配列バリエーションを含み、それにより内在性の凝固カスケードの開始によるC F X T E N融合タンパク質からの第V I I因子-第I X因子配列バリエーション成分の放出を可能にする。第V I I因子-第I X因子配列バリエーションからのX T E Nの放出とともに、活性化された第V I I因子-第I X因子配列バリエーションが、無処置のC F X T E Nと比較してより短い半減期を有し、それにより対象における組成物の安全性および許容性の余地を増大させるであろうことが期待される。本節の実施態様において、活性化された第V I I因子-第I X因子配列バリエーション分子は、適切な任意のアッセイまたは本明細書で開示されるパラメータ（例えば、プロトロンビン時間または出血時間アッセイ）によって測定されるように、天然F V I I aとして生物活性の少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%を有することができる。

【0160】

なおも別の実施態様において、本発明は、連結されたX T E Nを有さない、本節の前述の実施態様の第V I I因子-第I X因子配列バリエーションを提供し、内在性または外因性のいずれかの凝固カスケードによって活性化されることのできる第V I I因子-第I X因子複合の循環するデポーターとしての対象への投与を可能にする。一実施態様において、本発明は、表43由来の配列と比較して、少なくとも約80%の配列同一性、または少なくとも約85%の配列同一性、または少なくとも約90%の配列同一性、または少なくとも約9

10

20

30

40

50

5 %の配列同一性、または少なくとも約96 %の配列同一性、または少なくとも約97 %の配列同一性、または少なくとも約98 %の配列同一性、または少なくとも約99 %の配列同一性を呈する全体的な配列を有する組み込まれたF I X由来の配列を有する第V I I因子 - 第I X因子配列バリエーションをC F X T E Nに提供する。別の実施態様において、本発明は、X T E Nを有さない表43由来の配列と比較して、少なくとも約80 %の配列同一性、または少なくとも約85 %、または少なくとも約90 %、または少なくとも約95 %、または少なくとも約96 %、または少なくとも約97 %、または少なくとも約98 %、または少なくとも約99 %の配列同一性を呈する配列を有する組み込まれたF I X由来の開裂配列(X T E N非含有)を第V I I因子 - 第I X因子配列バリエーションに提供する。

【0161】

第V I I因子 - 第I X因子配列を含むC F X T E Nは、本明細書に説明されるようなアッセイ又はインビボでのパラメータ（例えば、インビトロでの凝固アッセイまたは血友病モデルにおける薬力学的効果）を用いて生物活性について評価することができ、相応の天然F V I I配列と比較して少なくとも約40 %、または約50 %、または約55 %、または約60 %、または約70 %、または約80 %、または約90 %、または約95 %またはそれより大きな活性を保持する該配列は、対象のC F X T E Nにおける包含に好適と考えられる。好適なレベルの活性を保持することが見出されたC Fは、上記に説明される1つ以上のX T E Nポリペプチドに連結することができる。一実施態様において、好適なレベルの活性を保有することが見出されたC Fは、表4由来の配列と少なくとも約80 %の配列同一性を、あるいは表4の配列と比較して少なくとも約81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または約100 %の配列同一性を有する1つ以上のX T E Nポリペプチドに連結して、結果的にキメラ融合タンパク質を生じることができる。

【0162】

(3. C F X T E N融合タンパク質立体配置)

本発明は、特異的なN末端からC末端への立体配置において連結されたC F成分およびX T E N成分を有するC F X T E N融合タンパク質組成物を提供する。いくつかの実施態様において、1つ以上のC Fは、1つ以上のX T E Nに、N末端またはC末端のいずれかにおいて、スペーサーを用いてまたは用いずに連結され、ブロックコポリマーを形成し、C F X T E N融合タンパク質におけるC FおよびX T E Nの配列配置は、ブロックコポリマー化学物質において公知の立体配置と同じである。2つ以上のC F、X T E N、またはスペーサーがある場合、C F、X T E Nまたはスペーサーの各々は、同じかまたは異なる配列を有し、C Fおよび/またはX T E Nは、連続的にまたは交互に（規則的にまたは不規則に）のいずれかで連結される。したがって、本明細書に提供される処方すべてにおいて、2つ以上のC F、X T E N、またはスペーサーがある場合、C F、X T E N、およびスペーサーの各々は同じかまたは異なる。いくつかの実施態様において、C F X T E Nは、1つのX T E Nポリペプチドに連結されたC Fとの単量体融合タンパク質である。他の実施態様において、C F X T E Nは、2つ以上のX T E Nポリペプチドに連結されたC Fとの単量体融合タンパク質である。さらに他の実施態様において、C F X T E Nは、1つのX T E Nポリペプチドに連結された2つ以上のC Fとの単量体融合タンパク質である。さらに他の実施態様において、C F X T E Nは、2つ以上のX T E Nポリペプチドに連結された2つ以上のC Fとの単量体融合タンパク質である。さらに他の実施態様において、C F X T E Nは、X T E NがC F配列内に（例えば、図2および図5に示されるような1つ以上のドメイン間などのF I X配列内に）配置された単一のC Fとの単量体融合タンパク質である。表6は、本発明のC F X T E N融合タンパク質によって包含される立体配置の非限定例を提供し、本明細書に開示されるまたは当該技術分野で公知のスペーサーおよび開裂配列の組み込みを含む数多くの他の変形は、当業者に明らかである。

【0163】

【表 6】

表 6 : CFXTEN 立体配置

成分*	立体配置**
単一の CF; 単一の XTEN	CF-XTEN
	XTEN-CF
単一の CF; 複数の XTEN	XTEN-CF-XTEN
	CF-XTEN-XTEN
	XTEN-XTEN-CF
	XTEN-CF-XTEN-XTEN
	XTEN-XTEN-CF-XTEN
	XTEN-XTEN-CF-XTEN
複数の CF, 単一の XTEN	CF-XTEN-CF
	XTEN-CF-CF
	CF-CF-XTEN
	CF-XTEN-CF-CF
複数の CF; 複数の XTEN	CF-XTEN-CF-XTEN
	XTEN-CF-XTEN-CF
	XTEN-XTEN-CF-XTEN-CF
	XTEN-XTEN-CF-CF
	CF-XTEN-XTEN-CF
	CF-CF-XTEN-XTEN
	CF-CF-XTEN-XTEN-CF
	CF-XTEN-CF-XTEN-CF

* 1つの成分について単一であるかまたは2つ以上の該成分について複数であることを特徴とする。

** 増殖因子成分およびXTEN成分のN末端からC末端への立体配置を反映

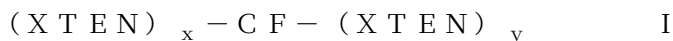
【0164】

本発明は、表1または表2から選択される単一のまたは複数のCF（またはその断片もしくは配列バリエーション）、表6に示される立体配置にある表4から選択される単一のまたは複数のXTEN（またはその配列バリエーション）を含むがこれらに限定されないCFXTEN融合タンパク質組成物を熟慮する。単一のXTENに連結される単一のCFを含む融合タンパク質の配列に関する非限定例を表41に呈する。一実施態様において、CFXT

EN組成物は、表41由来のCFXTENと比較して少なくとも約80%の配列同一性を、あるいは、表41由来のCFXTENと比較して少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または約100%の配列同一性を有する融合タンパク質を含むであろう。一般的に、結果として生じるCFXTENは、XTENに連結されていない相応のCFの生物活性の少なくとも一部を保有する。本節において説明された先の前述の融合タンパク質において、CFXTEN融合タンパク質は、表7由来の開裂配列をさらに含むことができ、開裂配列は、CFとXTENとの間に、または（2つ以上のCFがCFXTENに含まれる場合、）隣接するCF間に配置される。いくつかの場合において、開裂配列を含むCFXTENはまた、CFと開裂配列の間にまたはXTENと開裂配列の間に1つ以上のスペーサー配列アミノ酸を有し、プロテアーゼのアクセスを容易にし、該スペーサーアミノ酸は、グリシンおよびアラニンを好ましいアミノ酸として含めた任意の天然アミノ酸を含む。CF、XTEN、開裂配列（複数可）、およびスペーサーアミノ酸を含むCFXTENの非限定例を表42に呈する。しかしながら、本発明は、表1および表2の任意のCF配列と表42のCF配列との置換、表4の任意のXTEN配列と表42のXTEN配列との置換、および表7の任意の開裂配列と表42の開裂配列との置換も熟慮する。1つ以上の開裂配列を有するCFXTEN実施態様において、CF成分は、下記により完全に説明される開裂配列（複数可）の開裂によるXTENからのCFの放出の際に、生物学的に活性となるかまたは活性の亢進を有するかのいずれかである。

【0165】

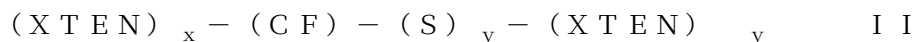
CFXTEN組成物の一実施態様において、本発明は、式Iの融合タンパク質を提供する：



式中、各発生について独立して、CFは凝固因子であり、xは0または1のいずれかであり、かつyは0または1のいずれかであり、この場合 $x + y \geq 1$ であり、かつXTENは伸長した組換えポリペプチドである。

【0166】

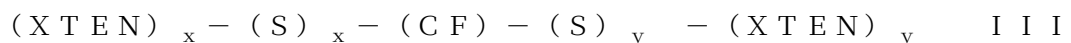
CFXTEN組成物の別の実施態様において、本発明は、式IIの融合タンパク質を提供する：



式中、各発生について独立して、CFは凝固因子aであり、Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり、xは0または1のいずれかであり、かつyは0または1のいずれかであり、この場合 $x + y \geq 1$ であり、かつXTENは伸長した組換えポリペプチドである。

【0167】

CFXTEN組成物の別の実施態様において、本発明は、単離された融合タンパク質を提供し、この場合、融合タンパク質は、式IIIからなる：



式中、各発生について独立して、CFは凝固因子であり、Sは開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり、xは0または1のいずれかであり、かつyは0または1であり、この場合 $x + y \geq 1$ であり、かつXTENは、伸長した組換えポリペプチドである。

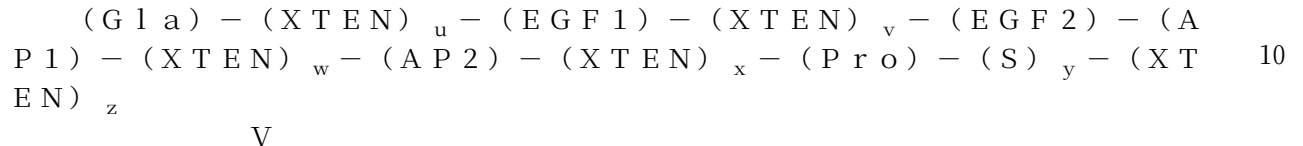
【0168】

CFXTEN組成物の別の実施態様において、本発明は、式IVの単離された融合タンパク質を提供する：

$(Gla) - (XTEN)_u - (EGF1) - (XTEN)_v - (EGF2) - (XTEN)_w - (AP) - (XTEN)_x - (Pro) - (S)_y - (XTEN)_z \quad IV$
 式中、各発生について独立して、GlaはFIXのGladメインであり、EGF1は、FIXのEGF1ドメインであり、EGF2は、FIXのEGF2ドメインであり、AP

は、F I Xの活性化因子ペプチドであり； P R Oは、F I Xのプロテアーゼドメインであり、Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり、uは、0または1のいずれかであり、vは0または1のいずれかであり、xは0または1のいずれかであり、yは0または1のいずれかであり、zは0または1のいずれかであり、ただし、 $u + v + x + z \geq 1$ でありかつX T E Nが伸長した組換えポリペプチドであることという条件付きである。

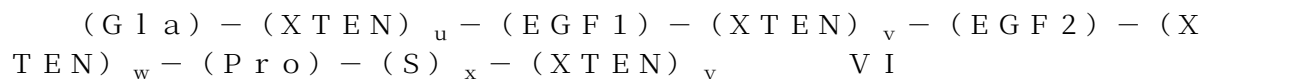
C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式Vの単離された融合タンパク質を提供する：



式中、各発生について独立して、G l aはF I XのG l aドメインであり、E G F 1は、F I XのE G F 1ドメインであり、E G F 2は、F I XのE F G 2ドメインであり、A P 1は、A Pドメインの第一の天然開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのN末端配列部分であり、A P 2は、A Pドメインの第二の天然開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのC末端配列部分であり、P R Oは、F I Xのプロテアーゼドメインであり、Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり、uは、0または1のいずれかであり、vは0または1のいずれかであり、wは0または1のいずれかであり、xは0または1のいずれかであり、yは0または1のいずれかであり、zは0または1のいずれかであり、ただし、 $u + v + w + x + z \geq 1$ でありかつX T E Nが伸長した組換えポリペプチドであることという条件付きである。

【0169】

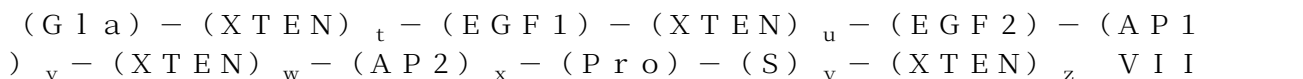
C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式V Iの単離された融合タンパク質を提供する：



式中、各発生について独立して、G l aはF V I IのG l aドメインであり、E G F 1は、F V I IのE G F 1ドメインでありE G F 2はF V I IのE F G 2ドメインであり、P R OはF V I Iのプロテアーゼドメインであり、Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり、uは0または1のいずれかであり、vは0または1のいずれかであり、xは0または1のいずれかであり、yは0または1のいずれかであり、かつX T E Nは伸長した組換えポリペプチドである。

【0170】

C F X T E N組成物の別の実施態様において、本発明は、式V I Iの単離された融合タンパク質を提供する：



式中、各発生について独立して、G l aはF V I IのG l aドメインであり、E G F 1はF V I IのE G F 1ドメインであり、E G F 2はF V I IのE F G 2ドメインであり、P R Oは、F V I Iのプロテアーゼドメインであり、A P 1は、天然開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのN末端配列部分であり、A P 2は、天然開裂配列を含むF I Xの活性化因子ペプチドドメインのC末端配列部分であり、Sは、開裂配列を任意に含むことのできる1～約50のアミノ酸残基を有するスペーサー配列であり、tは0または1のいずれかであり、uは0または1のいずれかであり、vは0または1のいずれかであり、xは0または1のいずれかであり、yは0または1のいずれかであり、zは0または1のいずれかであり、X T E Nは伸長した組換えポリペプチドである。該実施態様において、第V I I因子バリエーションには、第I X因子の活性化因子ペプチドドメイン由来の1つまたは両方の開裂配列、例えば、下記により完全に説明されるように、R 1 4 5 - A 1 50

46開裂部位に隣接する少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4、または少なくとも約5のアミノ酸からなる配列（例えば、5の隣接するアミノ酸の場合、配列TSKLT R A E T V F P（配列番号3））、およびR180-V181開裂部位に隣接する少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4、または少なくとも約5のアミノ酸からなる配列（例えば、5の隣接するアミノ酸の場合、配列FND F T R V V G G E D（配列番号85））を含むことができる。、あた、本発明は、第V I I因子バリエーションのA P配列についての表7の任意の他の開裂配列の置換を熟慮する。

【0171】

式Vおよび式V Iの実施態様は、第I X因子および第V I I因子のC F X T E N立体配置をそれぞれ包含し、この場合、約36アミノ酸 $\sim$ 1000アミノ酸にわたる長さの1つ以上のX T E N（例えば、表4および9～13から選択される配列）は、第I X因子配列または第V I I因子配列の隣接するドメイン間にそれぞれ挿入および連結される。本発明は、表7から選択される追加的な開裂配列を任意に介して、追加的なX T E NをF I XまたはF V I IのC末端に任意に連結して結果的にC F X T E N組成物を生じることで、F I XまたはF V I I Iのいずれかのドメイン間のX T E Nの挿入に関して起こり得るすべての順列を熟慮し、これに関する非限定例を図2、図5、および図6に描く。本節に説明される先の前述の実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、凝固因子関連の疾患、障害、または容態の治療における治療薬としての使用についての立体配置の好適性を決定するために、本明細書に開示される任意の適切なインビトロアッセイ（例えば、表40のアッセイまたは実施例において説明されるアッセイ）を用いて、生物活性の保持（任意の組み込まれたX T E N放出開裂部位の開裂後を含む）について評価されることができる。

【0172】

いくつかの実施態様において、治療有効量の式I～V I Iのうちの1つの融合タンパク質の投与を必要とする対象への該融合タンパク質の投与は結果的に、X T E Nに連結されておらずかつ対象に投与されるかなりの量で投与される相応のC Fと比較して、該融合タンパク質について終末半減期における少なくとも2倍、または終末半減期の少なくとも3倍、もしくは少なくとも4倍、もしくは少なくとも5倍、もしくは少なくとも10倍、もしくは少なくとも20倍、もしくは少なくとも40倍、もしくは少なくとも100倍の延長を生じる。いくつかの実施態様において、治療有効量の式I～V I Iのうちの1つの融合タンパク質の投与を必要とする対象への該融合タンパク質の投与は結果的に、X T E Nに連結されておらずかつ対象に投与されるかなりの量で投与される相応のC Fと比較して、融合タンパク質についての治療ウィンドウ内で経過する少なくとも2倍、もしくは少なくとも3倍、もしくは少なくとも4倍、もしくは少なくとも5倍、もしくは少なくとも10倍、もしくは少なくとも20倍、もしくは少なくとも40倍、もしくは少なくとも100倍もしくはそれより長い時間の延長を生じる。他の実施態様において、治療有効量の式I～V I Iのうちの1つの融合タンパク質の投与を必要とする対象への該融合タンパク質の投与は結果的に、X T E Nに連結されておらずかつかなりの用量で投与されるC Fと比較して、連続的な用量間で少なくとも48時間、または少なくとも72時間、または少なくとも96時間、または少なくとも約120時間、または少なくとも約7日間、または少なくとも約14日間、または少なくとも約21日間の治療有効量の血中レベルの融合タンパク質を維持するのに必要な連続した用量間の時間の延長を生じることができる。

【0173】

任意のスペーサー配列基は、本発明によって包含される対象の融合タンパク質に任意に導入される。スペーサーは、C F成分がその所望の三次構造を仮定し得および／またはその標的基質と適切に相互作用し得るよう、宿主細胞からの融合タンパク質の発現を亢進しまたは立体障害を低下させるために提供される。スペーサーおよび望ましいスペーサーを同定する方法については、例えば、本明細書に引用により具体的に組み込まれているGeorge, et al. (2003) Protein Engineering 15: 871-879を参照されたい。一実施態様において、スペーサーは、長さ1～5

0のアミノ酸残基、または長さ約1〜25残基もしくは約1〜10残基である1つ以上のペプチド配列を含む。スパーサー配列は、開裂部位を除き、20の任意の天然L型アミノ酸を含むことができ、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）を含むことができるがこれらに限定されない立体的に妨げられていない親水性アミノ酸を好ましくは含む。いくつかの場合、スパーサーは、ポリグリシンもしくはポリアラニンであり得、または主としてグリシン残基およびアラニン残基の組み合わせの混合物である。開裂配列を除くスパーサーポリペプチドは、主として二次構造を、例えば、Chou-FasmanアルゴリズムおよびGORアルゴリズムによって決定される時、約10%未満、または約5%未満、実質的に欠くこととなる。一実施態様において、CFXTEN融合タンパク質組成物におけるスパーサー配列は、同一であるかまたは異なる1つ以上の開裂配列をさらに含み、この場合、開裂配列は、融合タンパク質からCFを放出するためのプロテアーゼによって作用され得る。

【0174】

いくつかの実施態様において、開裂配列のCFXTENへの組み込みは、XTENからのCFの報酬つの際に活性となるかまたはより活性のあるCFの放出を可能にするよう設計され、例えば、CF成分の酵素活性は増大する。先の1つの実施態様において、放出後に活性となるCFは、FIXまたはその配列バリエーションである。先の別の実施態様において、放出後に活性となるCFは、FVIIまたはその配列バリエーションである。開裂配列は、CF配列に十分近くに、一般的にCF配列末端の18アミノ酸内に、または12アミノ酸内に、または6アミノ酸内に、または2アミノ酸内に配置され、それにより開裂後にCFに付着した任意の残余残基は、（例えば、リガンドもしくは基質への結合などの）活性にそれほど干渉せず、開裂配列の開裂を有効にすることができるようプロテアーゼに対する十分なアクセスをなおも提供する。いくつかの実施態様において、開裂部位は、CFXTENが、対象への投与後に開裂されることができるよう、哺乳類対象に対して内在性のプロテアーゼによって開裂されることができるよう配列である。このような場合、CFXTENは、CFのためのプロドラッグまたは循環デポーとして機能することができる。一実施態様において、開裂配列の開裂によって融合タンパク質から放出されるCFは、無処置のCFXTEN融合タンパク質と比較して、CFの天然基質についての酵素活性の少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約8倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約20倍の亢進を呈する。

【0175】

本発明によって熟慮される開裂部位の例には、FXIa、FXIIa、カリクレイン、FVIIa、FIXa、FXa、FIIa（トロンビン）、エラスターゼ-2、グランザイムB、MMP-12、MMP-13、MMP-17、もしくはMMP-20から選択される哺乳類内在性プロテアーゼによって、またはTEV、エンテロキナーゼ、PreScission（商標）プロテアーゼ（リノウイルス3Cプロテアーゼ）、およびソルターゼ（sortase）Aなどの非哺乳類プロテアーゼによって開裂可能なポリペプチド配列が挙げられるが、これらに限定されない。先のプロテアーゼおよびその他によって開裂されることが公知の配列は、当該技術分野で公知である。例示的な開裂配列および該配列内の切断部位を表7に、その配列バリエーションと同様に呈する。例えば、トロンビン（活性化型凝固因子II）は、配列LT~~PRSLLV~~（配列番号86）に作用し[Rawlings N. D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320]、該配列は、該配列における位置4のアルギニンの後ろで切断される。活性化型FIIaは、リン脂質およびカルシウムの存在下でFXaによるFIIの開裂によって生じ、凝固経路における第IX因子から下流である。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、フィブリノーゲンを開裂することであり、次にフィブリノーゲンは順に、凝固形成を始める。FIIa活性は、きっちりと制御され、凝固が適切な止血に必要な場合に生じるにすぎない。しかしながら、凝固が哺乳類において進行中の過程である場合、CFXTENへのLT~~PRSLLV~~（配列番号86）配列の組み込み

およびC F成分とX T E N成分との間の連結によって、凝固が生理学的に必要とされる場合に、X T E Nは、外因性のまたは内在性のいずれかの凝固経路の活性化と同時に、隣接するC Fから除去され、それにより経時的にC Fを放出する。同様に、内在性プロテアーゼによって作用されるC F X T E Nへの他の開裂配列、特に表7に列挙される活性化された凝固タンパク質に対して感受性のある該開裂配列の組み込みは、C F X T E Nに関するある実施態様において、無処置の形態のC F X T E Nから放出されるC F成分についてのより高い程度の活性を提供するC Fの持続的な放出を提供するであろう。一実施態様において、本発明は、開裂の際に融合タンパク質からC Fを放出するよう作用可能に配置された1つ以上の開裂配列を含むC F X T E Nを提供し、この場合、1つ以上の開裂配列は、表7から選択される配列と少なくとも約86%、または少なくとも約92%、またはそれより大きな配列同一性を有する。別の実施態様において、開裂配列を含むC F X T E Nは、表42から選択される配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有するであろう。

10

【0176】

いくつかの実施態様において、切断部位の両側に隣接する2つまたは3つのアミノ酸のみ（合計4～6のアミノ酸）が、開裂配列に組み込まれ、該開裂配列は順に、該実施態様のC F X T E Nに組み込まれる。他の実施態様において、公知の開裂配列は、公知の配列における1つ以上の欠失もしくは挿入、または1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸の任意の1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸との置換を有し、この場合、欠失、挿入、または置換は、低下または亢進した許容性を結果的に生じるが、プロテアーゼに対する許容性の不在を生じず、X T E NからのC Fの放出の速度を仕立てる能力を結果として生じる。例示的な置換を表7に示す。

20

【表 7】

表 7：プロテアーゼ開裂配列

配列に作用する プロテアーゼ	例示的な開裂配 列	配列 番号	最小切断部位*	配列 番号
FXIa	KLTR↓AET	87	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIa	DFTR↓VVG	88	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIIa	TMTR↓IVGG	89	NA	
カリクレイン	SPFR↓STGG	90	-/-FL/R↓Y/SR/RT/-/-	
FVIIa	LQVR↓IVGG	91	NA	
FIXa	PLGR↓IVGG	92	-/-G/R↓-/-/-/-	
FXa	IEGR↓TVGG	93	IA/E/GFP/R↓STI/VFS/-/G	
FIIa (トロンビ ン)	LTPR↓SLLV	94	-/-PLA/R↓SAG/-/-/-	
Elastase-2	LGPV↓SGVP	95	-/-/-VIAT↓-/-/-/-	
Granzyme-B	VAGD↓SLEE	96	V/-/-D↓-/-/-/-	
MMP-12	GPAG↓LGGA	97	G/PA/-/G↓L/-/G/-	98
MMP-13	GPAG↓LRGA	99	G/P/-/G↓L/-/GA/-	100
MMP-17	APLG↓LRLR	101	-/PS/-/-↓LQ/-/LT/-	
MMP-20	PALP↓LVAQ	102	NA	
TEV	ENLYFQ↓G	103	ENLYFQ↓G/S	104
エンテロキナー ゼ	DDDK↓IVGG	105	DDDK↓IVGG	106
プロテアーゼ 3C (PreScission (商 標))	LEVLFQ↓GP	107	LEVLFQ↓GP	108
ソルターゼ A	LPKT↓GSES	109	L/P/KEAD/T↓G/-/EKS/S	110

↓は、開裂部位を示す。 NA：適用不可能

* スラッシュの前、間、または後の複数のアミノ酸の列挙は、該位置において置換されることのできる代替アミノ酸を示し、「-」は、任意のアミノ酸が、中央の列に示される相応のアミノ酸と置換され得ることを示す。

【0177】

(a) CFXTENの薬物動態特性

本発明は、XTENに連結されていないCFと比較して増大した薬物動態を有するCFXTEN融合タンパク質を提供する。所与のXTENをCFに連結することによって増大することのできるCFの薬物動態特性には、終末半減期、曲線下面積(AUC)、 C_{max} 、分布の大きさ、および生物学的利用能；凝固因子と関連した障害、疾患、および関連した容態の治療において増大した有用性を提供する特性が挙げられるが、これらに限定されない。増大した特性の結果として、CFXTENは、本明細書に説明される方法によって組成物に適切であると決定された用量および用量投与計画で用いられる場合、所望の薬理学的効果を結果的に生じる循環濃度を達成することができ、XTENに連結されていないCFの同等な用量と比較して、組成物の生物活性成分についての安全な範囲内に延長した時間、なおもとどまる。このような場合、CFXTENは、XTENに連結されていないCFと比較して融合タンパク質組成物のための治療ウィンドウ内に延長した時間とどまり、対象に同等な用量で投与される。本明細書で使用する場合、「同等な用量」は、同等な様式で対象に投与される活性のあるCFファルマコフォア（例えば、FIXまたはFVII）について等価のモル/kgの用量を意味する。CFXTEN融合タンパク質の「同

等な薬用量」が、薬剤のより大きな重量を表すであろうが、投与される融合タンパク質の用量におけるC Fの本質的に同じモル当量を有するであろうことは、当該技術分野において理解される。

【0178】

いくつかの実施態様において、薬物動態特性の増大したC F X T E Nは、表41、表42、または表43の任意の1つから選択されるタンパク質配列と比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有する配列であり得る。他の実施態様において、薬物動態特性の増大したC F X T E Nは、表4由来の配列と比較して少なくとも約80%の配列同一性をまたはそれに代わるものとして、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは約99%の配列同一性を有する1つ以上のX T E Nに連結された、表1由来のまたは表2由来の配列と比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、またはそれに代わるものとして、表4由来の配列と比較して、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは約99%の配列同一性を有するC F配列を含むことができる。本発明の組成物について、半減期のより長いC F T E Nが一般的に好ましく、それにより患者の簡便さを改良し、用量間の間隔を延長し、および持続した効果を達成するのに必要な薬物の量を減少させる。本節において説明される前述の実施態様において、融合タンパク質の投与は、融合タンパク質に連結されておらずかつ対象に同等な単位用量または用量投与計画で投与される相応のC F成分と比較して、融合タンパク質のモルにおけるより低い単位用量を用いて、（対象の疾患、容態、または障害を評価するのに有用であるような本明細書に開示される）パラメータの少なくとも1つにおける改良を結果的に生じる。前述の実施態様において、改良を達成するために投与されるモルにおける総用量は、融合タンパク質に連結されていない相応のC F成分と比較して、少なくとも約3倍低いか、または少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約6倍、もしくは少なくとも約8倍、もしくは少なくとも約10倍低い。

【0179】

X T E Nを含む融合タンパク質の薬物動態特徴に関係する実施例においてより完全に説明されるように、X T E N配列の長さを増大させることは、X T E Nを含む融合タンパク質の終末半減期の不相応な延長を与えることが観察された。したがって、本発明は、X T E Nを含むC F X T E N融合タンパク質を提供し、この場合、融合タンパク質に連結されておらずかつ同等な用量で投与される相応のC Fと比較して、対象に投与されるC F X T E Nについての終末半減期の延長を与えるよう選択され、この場合、延長は、融合タンパク質に連結されていないC Fと比較して、少なくとも約2倍長いか、または少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約6倍、もしくは少なくとも約7倍、もしくは少なくとも約8倍、もしくは少なくとも約9倍、もしくは少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約15倍、もしくは少なくとも約20倍、もしくは少なくとも約40倍、もしくは少なくとも約80倍、もしくは少なくとも約100倍、もしくはそれより長い終末半減期の延長である。外来的に投与される第I X因子は、およそ18～24時間のヒトにおける終末半減期を有することが報告されており（M o r f i n i , M . B l o o d T r a n s f u s . （2008） 6（s2）： s21-s25）、外来的に投与される第V I I因子は、およそ4～6時間の終末半減期を有することが報告されている（K l i t g a a r d T , B r J C l i n P h a r m a c o l （2008） 65（1）：3-11）のに対し、実施例において説明されるように、動物に実験的に投与された本明細書に開示される種々のC F X T E N組成物は、かなりより長い終末半減期値を結果的に生じた。一実施態様において、本発明は、X T E Nに連結されておらずかつ同等な用量で対象に投与される相応のC Fと比較

して少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約300%、または少なくとも約500%、または少なくとも約1000%、または少なくとも約2000%のACUの増大を呈するCFXTEN融合タンパク質を提供する。CFXTENの薬物動態パラメータは、投薬、回数間の血液試料の採取、およびタンパク質のアッセイを、ELISA、HPLC、ラジオアッセイ、または当該技術分野で公知のもしくは本明細書に説明される他の方法を用いた後、半減期および他のPKパラメータを派生させるためのデータの標準的な算出によって決定することができる。

【0180】

増大したPKパラメータによって、XTENに連結されていないCFと比較して、CFXTEN組成物の減少した投薬が可能となる。いくつかの実施態様において、XTENに連結されていない相応のCFと比較して、より少量のモル量の約2倍低い、または約3倍低い、または約4倍低い、または約5倍低い、または約6倍低い、または約8倍低い、または約10倍低いもしくは高い融合タンパク質が、止血を維持するために必要とされる用量投与計画の下で投与され、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応のモル量のCFとしての同等な曲線下面積を達成する。他の実施態様において、融合タンパク質は、XTENに連結されていないさもなくば同じ投薬量の相応のCFの毎日の投与と比較して、対象に投与される約2日間ごとの、約7日間ごとの、約14日間後との、約21日間ごとの、または約毎月のあまり頻繁ではない投与計画の融合タンパク質を有し、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応のCFとして同等な曲線下面積を達成する。なおも他の実施態様において、XTENに連結されていない相応のモル量のCFと比較して、累積的なより少量のモル量の約5%、または約10%、または約20%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%未満の融合タンパク質が、止血を維持するのに必要とされる用量投与計画の下で、対象に投与され、なおも融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応のCFとしての少なくとも同等な曲線下面積を達成する。累積的なより少量のモル量は、少なくとも約1週間、または約14日間、または約21日間、または約1ヶ月間の期間についての測定基準である。

【0181】

本発明は、1つ以上の開裂配列、例えば表7由来の配列によってXTEN配列から分離されたCF分子を含むCFXTENを提供する。いくつかの実施態様において、無処置のCFXTEN組成物は、XTENに連結されていない相応のCFと比較して、その無処置の形態においてより低い活性を有するが、より長い半減期を有するが、対象への投与の際に、CF成分が内在性プロテアーゼによる開裂配列（複数可）における開裂によって融合タンパク質から徐々に放出され、そうすると、CF成分が活性、すなわち、その標的凝固タンパク質基質に効果的に結合し活性化する能力を呈するよう設計される。非限定例において、開裂配列を有するCFXTENは、表42由来の配列と比較して約80%の配列同一性を、または表42由来の配列と比較して約85%、もしくは約90%、もしくは約95%、もしくは約97%、もしくは約98%、もしくは約99%の配列同一性を有する。したがって、本節における前述の実施態様のCFXTENは、プロドラッグまたは循環するデポーとして機能し、XTENに連結されていないCFと比較してより長い終末半減期を結果的に生じる。このような場合、XTENに連結されていない相応のCFと比較してより高濃度のCFXTENを対象に投与することができ、その理由は、より小さな割合の循環している組成物が活性となっているからである。

【0182】

(b) CFXTENの薬理学および医薬特性

本発明は、XTENに連結されていないCFと比較して亢進した特性を有することのできるXTENに共有結合したCFを含むCFXTEN組成物、ならびに該組成物の個々の2つのCF成分の治療的および／もしくは生物学的活性もしくは効果を亢進する方法を提

供する。加えて、本発明は、アルブミン、免疫グロブリンポリペプチドパートナー、より短い長さのポリペプチド、および／または反復性配列を有するポリペプチドパートナーを含む当該技術分野で公知の融合タンパク質と比較して、亢進した特性を有するCFXTEN組成物を提供する。加えて、CFXTEN融合タンパク質は、ペグ化したコンストラクトなど、化学的抱合体を上回る有意な利点を提供し、組換えCFXTEN融合タンパク質が、生成物の研究および開発および製造のいずれの段階の時間および経費も削減することができる細菌細胞発現系において作製されることができ、結果的に、ペグ化した抱合体と比較してCFXTENの生成物および代謝産物の両方についての毒性のあまりない、より均質な規定された生成物を生じるという事実で明らかである。

【0183】

治療薬として、CFXTENは、以下の非限定的である例示的な亢進した特性の1つ以上を含む、XTENを含まない治療薬を上回るいくつかの利点を有する：増大した溶解度、増大した熱安定性、低下した免疫原性、増大した見かけの分子量、低下した腎クリアランス、低下したタンパク質分解、低下した代謝、亢進した治療効率、より低い有効治療用量、増大した生物学的利用能、CFについての治療ウィンドウ内に血中レベルを維持することのできる薬用量間の延長した時間、皮下もしくは筋肉内に投与した場合の「仕立てられた」吸収速度、亢進した凍結乾燥安定性、亢進した血清／血漿安定性、延長した終末半減期、血流における増大した溶解度、中和抗体による低下した結合、低下した活発なクリアランス、低下した副作用、基質結合親和性の保持、分解に対する安定性、凍結融解に対する安定性、プロテアーゼに対する安定性、ユビキチン化に対する安定性、投与の容易さ、他の医薬賦形剤もしくは担体との適合性、対象における残留性、保管における増大した安定性（例えば、延長した有効期間）、生物もしくは環境における低下した毒性、およびこれらに類すること。亢進した特性の正味の効果は、CFXTEN組成物の使用が、XTENに連結されていないCFと比較して亢進した治療のおよび／もしくは生物学的効果を結果として生じることができ、または凝固因子に関連した疾患もしくは障害を有する対象に投与される場合、改良した患者の服薬順守を結果的に生じることができることである。

【0184】

発現したタンパク質の物理的特性および構造特性を測定するための具体的なアッセイおよび方法は、当該技術分野において公知であり、タンパク質の凝集、溶解度、二次構造および三次構造、融解特性、混入、および水分含有量などの特性を決定するための方法を含む。このような方法には、分析的遠心分離、EPR、HPLC - イオン交換、HPLC - 分子ふるい、HPLC - 逆相、光散乱、毛細管電気泳動、円二色性、示差走査熱量測定、蛍光、HPLC - イオン交換、HPLC - 分子ふるい、IR、NMR、ラマン分光法、屈折分析、およびUV／可視分光法を含み、これらのうちのいくつかは、実施例において説明されるように、本発明のCFXTENに適用される。追加的な方法は、Arnaud et al., Prot Expr and Purif (2006) 48, 1-13に開示されている。本発明の組成物の亢進した特性を解明するためのこれらの方法の適用は、当業者の理解内である。

【0185】

一実施態様において、融合パートナーとしてのXTENは、CF負荷量の溶解度を増大させる。したがって、水中での溶解度または安定性の程度など、CFの医薬特性または物理化学的特性の亢進が所望である場合、融合タンパク質に組み込まれたXTEN配列の長さおよび／またはモチーフファミリー組成物は、個々の融合タンパク質に異なる程度の溶解度および／または安定性を与えるよう各々選択され得、それにより、CFXTEN組成物の全体的な医薬特性が亢進される。CFXTEN融合タンパク質は、本明細書に説明される方法を用いて構築およびアッセイされ、必要とされる場合に所望の特性を結果的に生じるよう調整された物理化学的特性およびXTENを確認することができる。一実施態様において、CFXTENのXTEN配列は、融合タンパク質が、融合タンパク質に連結されていないCFと比較して少なくとも約25%大きいまたは、融合タンパク質に連結されていない相応のCFよりも少なくとも約30%、もしくは少なくとも40%、もしくはは

少なくとも約50%、もしくは少なくとも約75%、もしくは少なくとも約100%、もしくは少なくとも約200%、もしくは少なくとも約300%、もしくは少なくとも約400%、もしくは少なくとも約500%、もしくは少なくとも約1000%大きな内にある水性溶解度を有するよう選択される。

【0186】

本発明は、X T E Nに連結されていないC Fと比較して亢進した溶解度および回復の容易さを有する、宿主細胞から発現したC F X T E Nを生成および回収する方法を提供する。いくつかの実施態様において、該方法には、真核宿主細胞を、約200よりも大きな、または約400よりも大きな、または約600よりも大きな、または約800よりも大きなアミノ酸残基の累積的配列長の1つ以上のX T E N成分を有するC F X T E Nをコードするポリヌクレオチドで形質転換する工程、宿主細胞においてC F X T E N融合タンパク質を発現させる工程、および発現した融合タンパク質を可溶性形態で回収する工程を含む。本節において説明される先の実施態様において、C F X T E N融合タンパク質のX T E Nは、表4から選択される1つ以上のX T E Nと比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、または約90%、もしくは約91%、もしくは約92%、もしくは約93%、もしくは約94%、もしくは約95%、もしくは約96%、もしくは約97%、もしくは約98%、もしくは約99%、最大約100%の配列同一性を有することができ、C Fは、表1または表2から選択されるC Fと比較して、少なくとも約80%の配列同一性を、または約90%、もしくは約91%、もしくは約92%、もしくは約93%、もしくは約94%、もしくは約95%、もしくは約96%、もしくは約97%、もしくは約98%、もしくは約99%、もしくは100%の配列同一性を有することができ、C F X T E N成分は、式I ~ V I Iから選択されるN末端からC末端への立体配置にあることができる。

【0187】

一実施態様において、本発明は、C F X T E N組成物および、X T E Nに連結されていない相応のC Fの同等な薬用量と比較してより長い時間、治療ウィンドウ内にC F成分を維持することのできる該組成物を作製するための方法を提供する。C F X T E N融合タンパク質の「同等な薬用量」は、より大きな薬剤重量を表すであろうが、融合タンパク質の用量における同じ概算モル等価量のC Fを有するであろうし、および／またはC Fに対する同じ概算モル濃度を有するであろうことは、当該技術分野において理解される。治療ウィンドウ内にC F成分を維持することのできる組成物を作製する方法には、C Fとの抱合に適したX T E Nを選択して、所与の用量および用量投与計画を提供する工程、C F X T E Nの投与を必要とする対象へのC F X T E Nの投与の工程、それに続く投与された組成物の薬物動態特性、C F X T E N融合タンパク質の活性、および安全性を確認するアッセイの工程を含む。該方法によって、本明細書に提供されるC F X T E Nは、治療ウィンドウ内にC Fの循環する濃度を延長した時間維持することによって、投与された組成物の増大した効能を可能にする。本明細書で使用する場合、「治療ウィンドウ」は、許容し得ない毒性を伴わずに、疾患または容態に効能または所望の薬理学的効果を経時的に提供する血中濃度範囲または血漿濃度範囲、すなわち、任意の生の治療効果を達成するための最小量と（より高い用量または濃度で）対象に対する毒性の直前の応答である応答を結果的に生じる最大量との間の循環血中濃度の範囲としての薬物または生物の量を意味する。加えて、治療ウィンドウは一般的に、時間の態様；許容し得ない毒性もしくは有害事象を結果的に生じない所望の薬理学的効果を経時的に結果的に生じる最大濃度および最小濃度を包含する。また、対象のために治療ウィンドウ内に留まる投薬された組成物は、「安全範囲」内であるといわれ得る。

【0188】

結果として生じる機能的特徴または生物学および薬理学的な活性およびパラメータを含む本発明のC F X T E N組成物の特徴は、所望の特徴を測定するために、当該技術分野で公知の任意の好適なスクリーニングアッセイによって決定することができる。本発明は、C F X T E Nに所望の程度の生物活性および／または治療活性ならびに安全特性を提供

するために、異なる組成または立体配置のCFXTEN融合タンパク質をアッセイする方法を提供する。具体的なインビボおよびエクビボでの生物学的アッセイを用いて、CFXTENに組み込まれるべき構築されたCFXTENおよび／またはCF成分の各々活性を評価し、該アッセイには、実施例のアッセイ、表40のアッセイ、ならびに以下のアッセイまたはCFの特性および効果をアッセイするための当該技術分野で公知の他のこのようなアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。プロトロンビン（PT）および活性化型部分的プロトロンビン（aPTT）アッセイ（Belaaouaj A A et al., J. Biol. Chem. (2000) 275:27123-8; Diaz-Collier J A. Haemost (1994) 71:339-46）、血液凝固時間（WBCT）、血栓弾性描写法、または出血時間アッセイなど、凝固活性の決定を可能にする機能的アッセイを実施することができる。他の考えられ得るアッセイは、米国特許第5,534,617号に説明されるような、チップ結合型受容体もしくは結合タンパク質を有するピアコアアッセイまたはELISAアッセイ、本明細書の実施例に説明されるアッセイ、放射性受容体アッセイ、または当該技術分野で公知の他のアッセイなどの結合アッセイまたは競合的結合アッセイを用いてアッセイされることのできる相応のCFの標的基質に対するCFXTENの結合親和性を決定し得る。前述のアッセイを用いて、（単一の成分としてまたはCFXTEN融合タンパク質としてアッセイされる）CF配列バリエーションを評価することもでき、該バリエーションがCFXTENに含まれるのに好適であるよう、該バリエーションが、天然のCFまたはそのいくつかの断片と同じ程度の生物活性を有するかどうかを決定することができ、天然CFと比較して、例えば少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の活性である。

【0189】

用量の最適化は、すべての薬物にとって、特に狭い治療ウィンドウを有する薬物にとって重要である。例えば、多様な症状または異常な臨床的パラメータを呈するすべての患者のための標準化された単一用量のCFは、必ずしも常に有効ではないかもしれない。これらの因子の考慮は、許容し得ない毒性を結果的に生じかつ安全性範囲の外側となるであろう量または臨床的改良が達成されないような不十分な効力と対比して、治療有効量または薬理学的有効量のCFXTENを決定する目的のための、人並みに熟達した臨床医の範囲内に十分ある。

【0190】

多くの場合、異なる年齢または疾患の程度の対象におけるCFのための治療ウィンドウが確立されており、および公表された文献において入手可能でありまたはCFを含む認可された製剤のための薬物ラベルに記載されている。他の場合、治療ウィンドウは、本開示のCFXTENを含む新たな組成物のために確立されることができる。所与の組成物について治療ウィンドウを確立するための方法は、当業者に公知である（例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, McGraw-Hill (2005)を参照されたい）。例えば、標的の疾患または障害を有する対象における用量の段階的増大の研究を用いて、効能または所望の薬理学的効果、有害事象の様相、および循環している血中レベルの決定を決定することによって、所与の対象または対象の集団についての治療ウィンドウは、所与の薬物もしくは生物製剤、または生物製剤もしくは薬物の組み合わせについて決定することができる。用量の段階的増大の研究は、当該技術分野で公知の様にまたは本明細書に説明されるように、生理学的または生化学的パラメータを、代謝性の疾患もしくは障害に関連した1つ以上のパラメータ、または特定の適応の有益な結果と関連した臨床的パラメータについて、無効用量、有害事象、最大許容用量、およびそれに類することを決定するための所見および／または測定されたパラメータとともに、決定したまたは導き出された循環している血中レベルを確立する薬物動態パラメータの測定結果とともにモニターする対象または対象の群における代謝研究を通じてCFXTENの活性を評価することができる。次に、本結果は、前述の決定されたパラメータ

または有効レベルと一致した治療薬の投与された用量および血中濃度と相関づけることができる。これらの方法によって、ある範囲の用量および血中濃度は、最少有効用量ならびに、所望の効果が生じかつそれを上回ると毒性が生じる最大用量および最大血中濃度と相関づけることができ、それにより投薬された治療薬についての治療ウィンドウを確立する。最大値を上回る融合タンパク質の血中濃度（またはC F成分によって測定されるような）は、治療ウィンドウまたは安全性範囲の外側と考えられる。したがって、前述の方法によってC_{m i n}血中レベルが確立され、それを下回ると、C F X T E N融合タンパク質は所望の薬理学的効果を有さないであろうし、許容し得ない副作用、毒性、または有害事象を惹起して、C F X T E Nについての安全性範囲の外側となるであろう濃度に到達する前の最大循環濃度を表すであろうC_{m a x}血中レベルが確立される。このような濃度が確立されると、投薬の頻度および投薬量は、適切な用量および投薬頻度を提供して、治療ウィンドウ内に融合タンパク質（複数可）を維持するために、C_{m a x}およびC_{m i n}の測定結果によってさらに精密にすることができる。

10

【0191】

当業者は、本明細書に開示された手段によってまたは当該技術分野で公知の他の方法によって、投与されたC F X T E Nが、所望の間隔の間治療ウィンドウに留まり、またはX T E Nの用量もしくは長さもしくは配列における調整を必要とすることを確認することができる。さらに、治療ウィンドウ内にC F X T E Nを維持するための適切な用量および投薬頻度の決定は、治療有効量の投与計画を確立し、治療有効量の融合タンパク質を用いた複数の連続した用量の、該融合タンパク質を必要とする対象への投与についてのスケジュー

ールは、治療ウィンドウ内にとどまる連続したC_{m a x}ピークおよび／またはC_{m i n}谷部を結果的に生じ、標的の疾患、障害、または容態と関連した少なくとも1つの測定されたパラメータにおける改良を結果的に生じる。いくつかの場合、適切な用量で対象に投与されたC F X T E Nは、X T E Nに連結されておらずかつ同等な用量で投与される相応のC Fと比較して、治療ウィンドウ内に少なくとも約2倍長い、あるいは、X T E Nに連結されておらずかつ同等な用量で投与される相応のC Fと比較して、少なくとも約3倍長い、あるいは少なくとも約4倍長い、あるいは少なくとも約5倍長い、あるいは少なくとも約6倍長い、あるいは少なくとも約7倍長い、あるいは少なくとも約8倍長い、あるいは少なくとも約9倍長い、または少なくとも約10倍長い、またはそれより長い期間とどまるC F X T E N融合タンパク質の血中濃度を結果的に生じる。本明細書で用いる場合、「適切な用量」は、対象に投与されると、所望の治療効果もしくは薬理学的効果または治療ウィンドウ内の血中濃度を結果的に生じるであろう薬物または生物製剤の用量を意味する。

20

30

【0192】

一実施態様において、治療有効量の投与計画で投与されるC F X T E Nは、融合タンパク質に連結されておらずかつ対象に同等な用量投与計画で投与される融合タンパク質の相応の生物活性タンパク質と比較して、融合タンパク質の血中レベルについての少なくとも2つの連続したC_{m a x}ピークおよび／またはC_{m i n}谷部の間の少なくとも約3倍長い、あるいは少なくとも約4倍長い、あるいは少なくとも約5倍長い、あるいは少なくとも約6倍長い、あるいは少なくとも約7倍長い、あるいは少なくとも約8倍長い、あるいは少なくとも約9倍長い、または少なくとも約10倍長い時間の延長を結果的に生じる。別の実施態様において、治療有効量の投与計画で投与されるC F X T E Nは、融合タンパク質に連結されておらずかつC Fについて治療有効量の投与計画を用いて対象に投与される相応の生物活性タンパク質成分（複数可）と比較して、医薬組成物の融合タンパク質のモルにおけるあまり頻繁ではない投薬またはより低い総薬用量を用いて、1、または2、または3、またはそれより多くの測定されたパラメータにおける同等な改良を結果的に生じる。測定されたパラメータには、凝固因子関連障害を有する対象を評価するための、本明細書に開示された臨床的、生化学的、または生理学的パラメータのいずれか、あるいは当該技術分野で公知のその他が挙げられる。

40

【0193】

50

いくつかの実施態様において、本発明のCFXTEN融合タンパク質は、凝固因子と関連した疾患、障害、および容態の治療および予防において公知の、または該治療および予防における天然CFの使用と関連した、インビトロでの生物活性または薬理学的効果に関して、融合タンパク質に連結されていない相応のCFの生物活性の少なくとも約0.05%、または約0.1%、または約1%、または約10%、または約20%、または約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%、または約95%、または約98%、または約99%を保有する。CFXTEN融合タンパク質の保有された活性を評価するためにアッセイすることのできるパラメータまたは生理学的効果に関する非限定例には、プロトロンビン時間(PT)、活性化型部分的トロンボプラスチン時間(aPTT)、出血時間、全血凝固時間(WBCT) 10、および血栓弾性描写法が挙げられる。いくつかの実施態様において、CF成分の活性は、無処置のCFXTEN融合タンパク質によって明らかとなるのに対し、他の場合において、CF成分の活性は、CFXTEN融合タンパク質に組み込まれた開裂配列に作用するプロテアーゼの作用による融合タンパク質からのCFの開裂および放出の際に主として明らかとなり、その実施態様は先に開示されている。前述において、CFXTENは、先により完全に説明されるように、XTENに連結されると凝固基質に対するCF成分の結合親和性を低下させるが、CFXTEN配列に組み込まれた開裂配列(複数可)の開裂を通じてXTENから放出されると、回復したまたは増大した親和性を有するよう設計される。前述の一実施態様において、本発明は、開裂配列によってXTENに連結されたFIXを含む単離された融合タンパク質を提供し、この場合、融合タンパク質は、開裂の前に 20、実質的に不活性であり、かつ、この場合、開裂配列においてタンパク質分解性開裂によって融合タンパク質から放出されたFIXは、XTENに連結されていない天然FIXと比較して、活発であるとして少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%である生物活性を有する。

【0194】

他の場合、CFXTENは、対象に投与されるCFXTENの終末半減期を延長させるが、なおも生物活性を保有するために、CFXTENの活発なクリアランスを低下させるよう設計することができる。循環からCFを除去するためのクリアランス機構は、なおも完全に解明されなければならない。CFの取り込み、除去、および不活性化は、循環系 30、においておよび脈管外空間において生じることができる。凝固因子は、多数の他のタンパク質、脂質、および受容体と相互作用する複合体タンパク質であり、これらの相互作用の多くは、CFの循環からの除去に寄与することができる。例えば、異種性にグリコシル化されるタンパク質であるFVIIについてのクリアランス機構には、肝臓によるクリアランスを含み得る。FVIIaクリアランスに及ぼす該タンパク質のガンマーカルボキシグルタミン酸(Gla)ドメインおよびシアル酸含有量の効果は、灌流した肝臓モデルを用いて研究されており、それに伴う結果は、炭水化物受容体(例えば、アシアロ糖タンパク質受容体ASGPR)が、FVIIaクリアランスにおいてある役割を担い得ることを示唆している(Appa, R. S., et al. Thromb Haemost. 40

(2010, epub May 27) 104(2))。加えて、CFは、第VIIa因子などの静脈内投与された凝固因子の一般的に乏しい生物学的利用能に反映される 40、滲出および迅速な活発なクリアランスを通じて失われる可能性がある(NovoSevenパッケージ挿入物を参照されたい)。本発明のCFXTENは、低下した活発なクリアランスによって、および/または構造化されていないXTENの凝固因子への付加によって分子の水力学的半径または見かけの大きさを増大させることによる低下した滲出によって、達成される比較的より高い生物学的利用能を有する。一実施態様において、本発明は、1つ以上のXTENを融合タンパク質のCF成分に連結することによって融合タンパク質のクリアランスを低下させるCFXTENを提供し、この場合、融合タンパク質は、XTENに連結されていない相応のCFと比較して、少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約7倍、または少なくとも約8倍、 50

または少なくとも約10倍、または少なくとも約12倍、または少なくとも約15倍の見かけの分子量因子の増大を有し、かつ、この場合、対象に投与されるとCFXTENの終末半減期は、少なくとも約2倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約8倍、または少なくとも約10倍、または少なくとも約20倍、または少なくとも約30倍、または少なくとも約40倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約60倍、または少なくとも約70倍、または少なくとも約80倍、またはそれより長く延長する。前述の実施態様において、この場合、少なくとも2つのXTEN分子がCFXTENに組み込まれ、XTENは、同一であり得るかまたは、異なる配列組成（および正味の電荷）もしくはは長さからなり得る。2つのXTENが単一のFVIIに連結された前述の実施態様に関する非限定例は、図6に示され、（FVIIのドメインを用いて表される）コンストラクトGla-EGF1-EGF2-AE144-プロテアーゼ-AE864またはGla-EGF1-AE288-EGF2-プロテアーゼ-AE864（この場合、AE XTEN成分は、組み込まれたグルタミン酸により、およそ17%の正味の電荷を有する）、Gla-EGF1-EGF2-AG144-プロテアーゼ-AG864またはGla-EGF1-AG144-EGF2-プロテアーゼ-AE864（この場合、AG XTEN成分は、正味の電荷をほぼ有さない）を含む。特定の理論によって結びつけられることなく、より高い正味の電荷を有するCFXTEN組成物のXTENは、先に説明されるように、低下した活発なクリアランスにさらに機用sるうであろう、血管、組織、または種々の受容体などの種々の負に帯電した表面との非特異的相互作用をほとんど有しないと期待される。逆に、正味の電荷の低い（またはまったくない）凝固過程および凝固因子の活性化の強度に対する細胞（例えば、血小板）および脈管表面の公知の寄与を考慮すると、CFXTEN組成物のXTENは、活発なクリアランスに寄与しながら、会合した凝固因子の活性を増強することのできる表面とのより高い程度の相互作用を有すると期待される（Zhou, R., et al., *Biomaterials* (2005) 26 (16): 2965-2973; London, F., et al., *Biochemistry* (2000) 39 (32): 9850-9858）。したがって、本発明は、効力、生物学的利用能、および半減期の程度が、CFXTEN組成物におけるXTENの種類および長さの選択および配置によって仕立てられることができるCFXTENを提供する。したがって、本発明は、表1由来のまたは表2由来のCFおよび表4由来のXTENが、前述の例の個々の成分と置換され、例えば、表6由来のまたは式I~VI由来の立体配置において、個々の成分の代替的な立体配置と比較して、コンストラクトが低下したクリアランスを有するよう作製される組成物を熟慮する。いくつかの実施態様において、終末半減期を延長させるための前述の方法は、活発なクリアランスが低下していない第二の立体配置におけるCFXTENの半減期と比較して、少なくとも約30%、または約50%、または約75%、または約100%、または約150%、または約200%、または約300%、または約400%、またはそれより長い終末半減期の延長を結果的に生じることのできる形成されたCFXTENを提供する。本発明はさらに、低下したオン速度または増大したオフ速度のいずれかの結果として、クリアランス受容体に対する低下した結合は、N末端またはC末端のいずれかの阻害によって、および組成物の別のポリペプチドへの連結として該末端を用いることによって、CF、XTEN、またはスペーサーの配列の別の分子が、低下した結合を結果的に生じようとなかろうと、果たされ得る。CFXTEN融合タンパク質の特定の立体配置の選択は、活発なクリアランスの低下した速度が達成されるよう、クリアランス受容体に対する結合の程度を低下させる。

【0195】

活発なクリアランスの低下が所望されるが生物活性の少なくとも一部の保有も所望される場合、CFXTENは、無処置の分子に十分な生物活性を保有するよう設計される。したがって、一実施態様において、本発明は、CFXTENの生物活性が、相応の天然凝固因子と比較して、生物活性の約0.01%~40%、または約0.01%~30%、または約0.01%~20%、または約0.01%~10%の範囲にあるよう設計されたCFXTENを提供する。標的受容体についての形成されたCFXTENの生物活性は、XTE

10

20

30

40

50

Nに連結されていない相応の天然CFと比較して、「実質的に低下する」。したがって、本発明は、組成物、およびCFXTENを形成することによって生物活性は低下したが半減期の延長した組成物を作製する方法を提供し（この例は先に提供されている）、それにより活発なクリアランス機構をなおも回避しながら所望のインビボでの生物学的応答を提供することができる。延長した半減期によって、XTENに連結されていないCFと比較してまたはCFXTEN立体配置（この場合、融合タンパク質は、凝固因子クリアランス機構を受けやすい）と比較して、より多量の薬用量および低下した投薬頻度が可能となる。

【0196】

(VI)．本発明の組成物の使用)

別の態様において、本発明は、出血障害においておよび／またはFIXもしくはFVIIによって仲介される凝固因子に関連した疾患、障害、もしくは容態において有益な効果を達成するための方法を提供する。本明細書で使用する場合、「凝固因子に関連した疾患、障害、または容態」は、出血障害（例えば、欠陥性血小板機能、血小板減少症、またはフォン・ウィルブランド病）、凝固障害（凝固因子欠乏症を含む血液凝固に関する任意の障害）、血友病B（別名クリスマス病）、第IX因子関連出血障害、第VII因子欠乏症、血友病A、脈管性損傷、血友病に苦しんでいない対象における制御されていない出血、外傷または手術由来の出血、抗凝固薬治療法による出血、およびFIXまたはFVIIの対象への投与によって寛解または矯正することのできる肝臓の疾患または容態による出血を含むよう意図されるが、これらに限定されない。本発明は、比較的短い終末半減期および／または狭い治療ウィンドウを有する第IX因子または第VII因子を用いた治療の他の方法の不利および／または限界に対処する。

【0197】

いくつかの実施態様において、本発明は、治療有効量または予防有効量のCFXTENをヒトなどの対象に投与する工程を含む、凝固因子に関連した疾患、障害、または容態を有する該対象を治療するための方法を提供し、この場合、該投与は、凝固因子に関連した疾患、障害、または容態と関係する1つ以上の生化学的もしくは物理的パラメータまたは臨床エンドポイントの改良を結果として生じる。前述の一実施態様において、CFXTENはFVIIを含む。前述の別の実施態様において、CFXTENはFIXを含む。有効量は、凝固因子に関連した疾患、障害、または容態を治療する（例えば、治療するまたは重症度を低下させる）または予防する（例えば、発症または重症度の見込みを低下させる）のを助ける上で有益な効果を生じる。本明細書で使用する場合、「治療すること」は、薬物または生物製剤（例えば、CFXTEN）を投与して、既存の疾患、障害、もしくは容態における改良を達成すること、または疾患、障害、もしくは容態の発症を予防すること（予防法を含む）を意味する。治療有効量のCFXTEN融合タンパク質は、単回用量または反復した用量として対象に投与すると、潜在的な疾患、障害、もしくは容態の改良もしくは寛解、または潜在的な疾患、障害、もしくは容態と関係する徴候もしくは症状もしくは生理学的パラメータにおける改良をもたらす組成物の量であり得る。

【0198】

止血は、複数のタンパク質因子によって調節され、このようなタンパク質およびその類似体は、凝固因子に関連した疾患、障害、および容態の治療において有用性を認める。しかしながら、市販の凝固因子の使用は、このような疾患、障害、および容態に苦しんでいる対象の管理において最適を下回る成功に遭遇した。特に、用量の最適化および投薬頻度は、凝固因子に関連した疾患、障害、もしくは容態における出血症状または血友病に苦しんでいない対象における制御されていない出血の治療または予防において用いられる凝固因子にとって重要である。凝固因子が短い半減期を有するという事実によって、臨床的有益性を達成するために頻繁な投薬が必要となり、このことは、このような患者の管理の困難さを結果として生じる。

【0199】

本発明は、凝固因子に関連した疾患、障害、もしくは容態に苦しんでいいるまたはこれ

らを発症する危険にある対象に、C F X T E Nを投与することを含む治療方法を提供し、この場合、投与は、該容態と関係する1つ以上の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床的エンドポイントの改良を結果的に生じる。一実施態様において、血友病Aに苦しんでいる対象に治療有効量のC F X T E N組成物を投与することを含み、この場合、投与は、該容態と関係する1つ以上の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床的エンドポイントの改良を結果的に生じる。別の実施態様において、治療方法は、血友病Bに苦しんでいる対象に治療有効量のC F X T E N組成物を投与することを含み、この場合、投与は、該容態と関係する1つ以上の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床的エンドポイントの改良を結果的に生じる。別の実施態様において、治療方法は、第V I I 因子欠乏症に苦しんでいる対象に治療有効量のC F X T E N組成物を投与することを含み、この場合、投与は、該容態と関係する1つ以上の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床的エンドポイントの改良を結果的に生じる。別の実施態様において、治療方法は、制御されていない出血に苦しんでいるかまたはそれを発症する対象に治療有効量のC F X T E N組成物を投与することを含み、この場合、投与は、該容態と関係する1つ以上の生化学的もしくは生理学的パラメータまたは臨床的エンドポイントの改良を結果的に生じる。ほとんどの場合、F V I Iを含むC F X T E Nを利用する開示された治療方法の実施態様は、F V I Iが活性化された、すなわちF V I I aである組成物である。しかしながら、本発明は、F V I Iが活性化されていないC F X T E N組成物も熟慮する。F V I Iを含むC F X T E Nの比較的長い半減期のため、哺乳類内在性プロテアーゼによって活性化されることのできる不活性化型のF V I Iを含む組成物（なぜなら、該プロテアーゼには1つ以上の開裂配列、例えば表7の配列を含むからである）または融合タンパク質は、自己活性化を受け、それにより1) 活性化型F V I Iの急速投与量が、惹起された内在性凝固カスケードの凝固タンパク質を介して入手可能であり、または2) 活性化型F V I Iの持続的な量は、循環に持続的にまたは一過性に存在するプロテアーゼ、例えば、M M P - 1 2、M M P - 1 7等を介する活性化によって入手可能である。

【0200】

したがって、本発明は、（先に説明されたような）F V I Iバリエーションを含むC F X T E Nの投与を含む、凝固因子に関連した疾患、障害、または容態を有する対象のための治療方法を提供し、この場合、F V I Iは活性化されないが、内在性プロテアーゼによって開裂されると、F V I I成分を活性化型に変換する1つ以上の開裂配列を有する。前述の一実施態様において、該方法は、少なくとも約12時間、または少なくとも約24時間、または少なくとも約48時間、または少なくとも約48時間、または少なくとも約96時間、または少なくとも約144時間、または少なくとも約160時間の終末半減期を有するC F X T E N組成物を利用する。したがって、該方法は、ある形態の慢性凝固障害を有する対象を、本質的に「プロドラッグ」形態のF V I Iであるもので治療する手段を表す。

【0201】

いくつかの実施態様において、対象へのC F X T E Nの投与は、同じアッセイを用いてまたは測定された臨床的パラメータに基づいて決定される、X T E Nに連結されていない相応のC F成分のものよりも程度の大きな生化学的、生理学的、または臨床的パラメータの1つ以上の改良を結果的に生じる。他の実施態様において、治療有効量の投与計画を用いた対象へのC F X T E Nの投与は、同じアッセイを用いてまたは測定された臨床的パラメータに基づいて決定される、X T E Nに連結されていない相応のC F成分の活性よりも持続時間の長い生化学的、生理学的、または臨床的パラメータの1つ以上の活性を結果的に生じる。一実施態様において、対象へのF V I Iを含む治療有効量のC F X T E Nの投与は、X T E Nに連結されていない同等量のF V I Iの投与後の同等な時間での対象におけるプロトロンビン時間と比較して、投与約2～7日後の少なくとも約5%、または約10%、または約20%、または約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、またはそれより長いプロトロンビン時間の短縮を結果として生じる。別の実施態様において、治療有効量を用いたF V I Iを含むC F X T E Nの対象

への投与は、対象に投与されるX T E Nに連結されていないF V I Iの同等な用量投与計画と比較して少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも4倍長い時間、対象において正常の30%以内のプロトロンビン時間の維持を結果的に生じる。別の実施態様において、F I Xを含む治療有効量のC F X T E Nの対象への投与は、X T E Nに連結されていない同等な量のF I Xの投与後の同等な時間での対象における活性化型部分的プロトロンビン時間と比較して、投与約2～7日後の対象における少なくとも約5%、または約10%、または約20%、または約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、またはそれより長い活性化型部分的プロトロンビン時間の短縮を結果的に生じる。別の実施態様において、F I Xを含むC F X T E Nの対象への、治療有効量を用いた投与は、対象に投与されるX T E Nに連結されていないF I Xの同等な用量投与計画と比較して、少なくとも2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍長い時間の、対象における正常の30%以内の活性化型部分的プロトロンビン時間の維持を結果的に生じる。別の実施態様において、F V I Iを含むC F X T E Nの対象への治療有効量を用いた投与は、対象に投与されるX T E Nに連結されていない同等な量のF V I Iと比較して、少なくとも2倍、または約3倍、または少なくとも約4倍長い時間、対象における正常の30%内の（出血時間アッセイにおける）出血時間の維持を結果的に生じる。別の実施態様において、F I Xを含むC F X T E Nの対象への治療有効量を用いた投与は、対象に投与されるX T E Nに連結されていない同等な量のF I Xと比較して、少なくとも2倍、または約3倍、または少なくとも約4倍長い時間、対象における正常の30%以内の（出血時間アッセイにおける）出血時間の維持を結果的に生じる。

【0202】

本明細書に説明されるように、C F X T E Nに関する亢進したP Kパラメータの結果として、C Fは、X T E Nに連結されていない相応のC Fと比較して、用量間のより長い間隔を用いて投与され、凝固因子に関連した疾患、障害、もしくは容態の症状もしくは臨床的以上を予防、治療、緩和、逆転、もしくは寛解させ、または治療途中の対象の生存を長期化する。特定の適用において、F V I Iを含むC F X T E Nは、血友病Aおよび血友病Bの治療における有用性を有する。

【0203】

高濃度で投与されるF V I I aは、F I XまたはF V I I Iの不在下でさえF Xの活性化を結果として生じるバイパス薬として機能することができるが観察されている。バイパス薬として作用するために、F V I I aは、健常者においてF V I I aのレベルをおよそ100倍ほど超過した濃度で投与されなければならない。これらのレベルは、F V I Iの結合する組織因子（T F）の不在下でF V I I aが低い活性を有するので、一般的に安全である。組織因子は、外来性の系を介して凝固を惹起する損傷した組織に放出または呈される。F V I I aの循環半減期は、抗トロンビン（A T）によるその不活性化によって一部制限される。抗トロンビンは、F V I Iに結合することはできないが、F V I I aにのみ結合することができる。したがって、一実施態様において、本発明は、活性化型のF V I Iを含むある量のC F X T E Nを投与することによって血友病Aまたは血友病Bを治療する方法を提供し、この場合、対象の循環においてF Xを活性化させる能力は、X T E Nに連結されておらずかつ同等な用量で同等な対象に投与されるF V I Iと比較して、少なくとも約2倍長い、または少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約20倍長い時間維持される。本発明はさらに、F V I I a - X T E Nへの活性化の前に約5%以下ほどA Tによって不活性化されることのできないX T E Nに連結されたF V I Iを含むC F X T E N融合タンパク質を提供する。一実施態様において、本発明は、活性化されていないF V I I成分を有するC F X T E Nを投与することを含む治療方法を提供し、この場合、C F X T E Nは循環デポーとして機能し、この場合、F V I I aへと活性化されかつA Tと複合体形成しないF V I Iについての曲線下面積は、X T E Nに連結されておらずかつ同等な用量で投与されるF V I Iよりも少なくとも約2倍大きい、または少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍、

もしくは少なくとも約20倍大きい。

【0204】

治療方法のいくつかの実施態様において、(i)より小さなモル量の(例えば、約2倍未満、または約3倍未満、または約4倍未満、または約5倍未満、または約6倍未満、または約8倍未満、または約10倍未満またはそれより大きな)融合タンパク質は、さもなくば同じ用量投与計画の下でX T E Nに連結されていない相応のC Fとの比較において投与され、融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応のC Fと同等な治療効果を達成し；(i i)融合タンパク質は、さもなくば同じ投薬量の下で、X T E Nに連結されていない相応のC Fとの比較においてあまり頻繁には投与されず(例えば、2日間ごと、約7日間ごと、約14日間ごと、約21日間ごと、または約毎月)、融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応のC Fと同等な治療効果を達成し；または累積的なより小さなモル量(例えば、約5%、または約10%、または約20%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%未満)の融合タンパク質が、さもなくば同じ用量投与計画の下でX T E Nに連結されていない相応のC Fとの比較において投与され、融合タンパク質は、X T E Nに連結されていない相応のC Fと同等な治療効果を達成する。累積的なより小さなモル量は、少なくとも約1週間、または約14日間、または約21日間、または約1ヶ月間の期間についての基準である。治療効果は、本明細書に説明される測定された任意のパラメータまたは臨床的エンドポイントによって決定することができる。

【0205】

本発明の方法には、所望のパラメータまたは臨床効果を達成および／または維持するのに十分な時間、治療有効量のC F X T E Nの連続的な用量の投与を含み、このような連続的な用量の治療有効量は、C F X T E Nについての治療有効用量投与計画、すなわち、融合タンパク質の連続的に投与される用量についてのスケジュールを確立し、この場合、用量は、本明細書に説明されるものを含むがこれらに限定されない、凝固因子に関連した疾患、障害、または容態の任意の臨床的徴候もしくは症状、様相、測定されたパラメータ、または特徴に及ぼす持続した有益な効果を結果として生じるための治療有効量で与えられる。一実施態様において、該方法は、X T E Nに連結されかつ同等な用量で投与されるC Fを含む医薬組成物の投与によって仲介される効果と比較して、C F成分(複数可)によって仲介される少なくとも1つのパラメータ、生理学的条件、または臨床結果(その非限定例は先に説明されている)におけるより大きな改良を結果として生じる、X T E N配列(複数可)に連結したC Fと少なくとも1つの医薬として許容し得る担体とを含む、C F X T E N融合タンパク質組成物を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを必要とする対象に、外医薬組成物を投与することを含む。一実施態様において、医薬組成物は、治療有効用量で投与される。別の実施態様において、医薬組成物は、(本明細書に定義されるような)治療有効用量投与計画を投薬期間の長さの間、用いて投与される。

【0206】

治療有効量のC F X T E Nは、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの因子、ならびに個々における所望の応答を誘発する投与された融合タンパク質の能力に従って変動する。治療有効量は、C F X T E Nの任意の毒性効果または有害効果が、治療的に有益な効果によって凌がれるものでもある。予防有効量は、所望の予防的結果、例えば、出血症状の遅延した開始を達成するのに必要な時間に必要とされるC F X T E Nの量を指す。治療の方法において、対象に投与されるC F X T E Nの用量は、負荷用量および維持用量として70kgの対象については、約0.5mg~1000mg/用量、または約1mg~400mg/用量、または約10mg~約300mg/用量にわたっており、対象の体重および容態の重症度に依存する。

【0207】

治療方法は、治療有効用量の投与計画を用いて、凝固因子の疾患、障害、または容態と関係した1つ以上のパラメータにおける改良をもたらすC F X T E Nの投与を含む。いくつかの実施態様において、対象へのC F X T E Nの投与は、同じアッセイを用いてまたは

測定された臨床的パラメータに基づいて決定される、X T E Nに連結されていない相応のC F成分のものよりも大きな程度の生化学的、生理学的、または臨床的パラメータの1つ以上における活性を結果的に生じる。前述の一実施態様において、治療有効用量の投与計画を用いた対象へのC F X T E Nの投与は、対象に投与されるX T E Nに連結されていない同等な用量のC Fと比較して、対象における少なくとも約10%、または約20%、または約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%、または約100%またはそれより長いプロトロンビン時間または活性化型部分的トロンボプラスチン時間の改良を結果的に生じる。前述の別の実施態様において、治療有効用量の投与計画を用いた対象へのC F X T E Nの投与は、対象に投与されるX T E Nに連結されていないC Fの同等な用量投与計画と比較して、少なく

10

【0208】

本発明は、凝固因子に関連した疾患、障害、および容態、または凝固因子が補助的療法である容態、例えば、損傷または手術による出血症状を治療するのに有用な他の治療方法および組成物（例えば、他の凝固タンパク質）とともに投与される。

【0209】

別の態様において、本発明は、所望の薬理学的特性または医薬特性を有するC F X T E N組成物を設計する方法を提供する。C F X T E N融合タンパク質は、凝固因子に関連した疾患、障害、および容態の治療のための治療効能を改良すること、C Fと比較して融合

20

【0210】

一般に、図31～図33に示されるように、融合タンパク質および本発明の組成物の設計および生成における工程には、（1）特定の疾患、障害、または容態を治療するためのC Fの選択（例えば、表1および表2の天然のタンパク質、配列、活性を有するアナログまたは誘導体）；（2）結果として生じるC F X T E Nに所望のP Kおよび物理化学的特徴を与えるX T E Nを選択すること（例えば、対象へのC F X T E N組成物の投与は、X T E Nに連結されていないC Fと比較してより長い時間治療ウィンドウ内に維持される融合タンパク質を結果的に生じる）；（3）C F X T E Nの所望のN末端からC末端への立体配置を確立して、所望の効能またはP Kパラメータを達成すること；（4）形成されたC F X T E Nをコードする発現ベクターの設計を確立すること；（5）好適な宿主を発現ベクターで形質転換すること；ならびに（6）結果として生じる融合タンパク質の発現および回収が含まれる。半減期の延長（24時間超）または治療ウィンドウ内で経過する延長した時間が所望であるC F X T E Nについては、組み込むために選択されたX T E Nは一般的に、単一のX T E NがC F X T E Nに組み込まれることになっている少なくとも約100、または約144、または約288、または約432、または約576、または約864、または約875、または約912、または約923のアミノ酸残基を有する。別の

30

40

【0211】

半減期の延長が必要ではないが、医薬特性（例えば溶解度）の増大が所望である他の実施態様において、C F X T E Nは、より短い長さのX T E Nを含むよう設計される。前述のいくつかの実施態様において、C F X T E Nは、少なくとも約24、または約36、または約48、または約60、または約72、または約84、または約96のアミノ酸残基を有するX T E Nに連結されたC Fを含み、その中で、生理学的条件下の融合タンパク質

50

の溶解度は、X T E Nに連結されていない相応のC Fよりも少なくとも3倍大きく、またはそれに代わるものとして、X T E Nに連結されていないC Fよりも少なくとも4倍、もしくは5倍、もしくは6倍、もしくは7倍、もしくは8倍、もしくは9倍、もしくは少なくとも10倍、もしくは少なくとも20倍、もしくは少なくとも30倍、もしくは少なくとも50倍、もしくは少なくとも60倍もしくはそれより大きい。前述の一実施態様において、C Fは第I X因子である。別の実施態様において、C Fは第V I I因子である。別の実施態様において、X T E Nは、表4および表9～表13由来の配列と比較して少なくとも約80%、または約90%、または約95%の配列同一性を有する配列である。

【0212】

別の態様において、本発明は、天然C Fと比較して、製造の容易さを改良し、増大した安定性、増大した水溶解度、および／または製剤の容易さを結果的に生じるC F X T E N組成物を作製する方法を提供する。一実施態様において、本発明には、結果的に生じる可溶性形態のより高濃度のC F X T E Nが、融合していない状態のC Fと比較して、生理学的条件下で達成されることができるよう、1つ以上のX T E NにC Fを連結する工程を含むC Fの水溶解度を増大させる方法を含む。融合タンパク質に組み込まれる場合にC Fの増大した水溶解度を与えるようX T E Nの特性に寄与する因子には、高い溶解度のX T E N融合パートナーおよび溶液中での低い程度のX T E N分子間自己凝集を含む。いくつかの実施態様において、該方法は、水溶解度が、融合していないC Fと比較して生理学的条件下で少なくとも約20%、または少なくとも約30%大きな、または少なくとも約50%大きな、または少なくとも約75%大きな、または少なくとも約90%大きな、または少なくとも約100%大きな、または少なくとも約150%大きな、または少なくとも約200%大きな、または少なくとも約400%大きな、または少なくとも約600%大きな、または少なくとも約800%大きな、または少なくとも約1000%大きな、または少なくとも約2000%大きな、または少なくとも約4000%大きな、または少なくとも約6000%大きなC F X T E N融合タンパク質を結果的に生じる。一実施態様において、C F X T E N融合タンパク質のX T E Nは、表4および表9～13由来の配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも90%、または約95%の配列同一性を有する配列である。

【0213】

別の実施態様において、本発明には、結果的に生じるC F X T E Nの有効期間が、C Fを、融合していない状態のC Fと比較して延長するよう選択された1つ以上のX T E Nと連結する工程を含む、C Fの有効期間を延長する方法を含む。本明細書で使用する場合、有効期間は、溶液中にあるかまたはいくつかの他の貯蔵製剤中にあるC FまたはC F X T E Nの機能的活性が活性の過度の損失なく安定したままである経時的な時間を指す。本明細書で使用する場合、「機能的活性」は、当該技術分野で公知のように、受容体もしくはリガンド、または基質を結合する能力、あるいは酵素活性、あるいはC Fと関係した1つ以上の公知の機能的活性を示す能力など、薬理学的効果または生物活性を指す。分解または凝集するC Fは一般的に、溶液中に留まるものと比較して、低下した機能的活性または低下した生物学的利用能を有する。融合タンパク質に組み込まれるとC Fの有効期間を延長させる該方法の能力に起用する因子には、X T E N融合パートナーの、増大した水溶解度、低下した溶液中での自己凝集、および増大した熱安定性が含まれる。特に、X T E Nが凝集する低い傾向は、より高い薬物濃度のC Fを含む医薬調製物を製剤する方法を容易にし、X T E Nの熱安定性は、C F X T E N融合タンパク質が、延長した時間、可溶性でありかつ機能的に活発であるままである特性に寄与する。一実施態様において、該方法は、同じ貯蔵条件および取り扱い条件に供した標準物質に対してより大きな活性を呈する「長期化した」または「延長した」有効期間を有するC F X T E N融合タンパク質を結果的に生じる。一実施態様において、該方法には、単離されたC F X T E Nを、X T E Nがその構造化されていない立体配座を保有する能力、およびC F X T E Nが相応の融合していないC Fのものよりも長い時間製剤中で可溶性のままである能力を高める1つ以上の医薬として許容し得る賦形剤とともに製剤化する工程を含む。一実施態様において、該方法は

、C Fを、表4および表9～13から選択される1つ以上のX T E Nに連結して、所与の時点で比較した場合、および標準物質と同じ貯蔵条件および取り扱い条件に供した場合、標準物質の機能的活性の約100%超を、または機能的活性の約105%超、110%、120%、130%、150%、または200%を保有する溶液を結果として生じるC F X T E N融合タンパク質を作製することを含む。

【0214】

また、有効期間は、貯蔵を開始した時の機能的活性に対して標準化された貯蔵後に留まる機能的活性の点においても評価され得る。長期化または延長した機能的活性によって呈されるような、有効期間の長期化または延長した本発明のC F X T E N融合タンパク質は、同じ条件に同じ時間供した場合に、X T E Nに連結されていない等価のC Fの50%超の機能的活性を、または機能的活性の約60%、70%、80%、もしくは90%超を保有する。例えば、表4および表9～13から選択される1つ以上のX T E N配列に融合した凝固因子を含む本発明のC F X T E N融合タンパク質は、溶液中のC F X T E Nの元の活性の約80%以上を種々の温度条件下で最長2週間、または4週間、または6週間以上の期間保有する。いくつかの実施態様において、C F X T E Nは、80℃で10分間加熱した場合、溶液中のC F X T E Nの元の活性の少なくとも50%、または約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、および最も好ましくは少なくとも約90%以上を保有する。他の実施態様において、C F X T E Nは、37℃で約7日間加熱または維持される場合、溶液中のC F X T E Nの元の活性の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、またはそれに代わるものとして少なくとも約90%以上を保有する。別の実施態様において、C F X T E N融合タンパク質は、約30℃～約70℃の温度への約1時間～約18時間の時間にわたる曝露の後で、C F X T E Nの機能的活性の少なくとも約80%以上を保有する。本節に説明される先の前述の実施態様において、C F X T E N [の保有された活性は、融合タンパク質に連結されていない相応のC Fのものよりも、所与の時点において、少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約6倍大きい。

【0215】

(V I I) . 本発明の核酸配列)

本発明は、C F X T E Nキメラ融合タンパク質をコードする単離されたポリ核酸、およびその相同的バリエーションを含むC F X T E Nキメラ融合タンパク質をコードするポリ核酸分子を提供する。別の態様において、本発明は、C F X T E Nキメラ融合タンパク質をコードするポリ核酸、およびその相同的バリエーションを含むC F X T E Nキメラ融合タンパク質をコードするポリ核酸分子と相補的な配列を作製する方法を包含する。一般に、および図4～図6において示されるように、C F X T E N融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を作製し、およびその結果として生じる遺伝子産物を発現する方法には、C FおよびX T E Nをコードするヌクレオチドを構築すること、フレームにおいて成分を連結すること、コード遺伝子を宿主細胞に適切な発現ベクターに組み込むこと、適切な宿主細胞を発現ベクターで形質転換すること、および形質転換した宿主細胞において融合タンパク質を発現させるまたは発現させることのできる条件下で、宿主細胞を培養し、それにより生物活性のあるC F X T E Nポリペプチドを産生し、該ポリペプチドが、単離された融合タンパク質として、当該技術分野で公知の標準的なタンパク質精製方法によって回収されることを含む。分子生物学における標準的な組み換え技術を用いて、本発明のポリヌクレオチドおよび発現ベクターを作製する。

【0216】

本発明によると、C F X T E Nをコードする核酸配列（またはその相補体）を用いて、適切な宿主細胞においてC F X T E N融合タンパク質の発現に向かう組換えDNA分子を生成する。いくつかのクローニング戦略は、本発明を実施するのに好適であり、その多くを用いて、本発明のC F X T E N組成物の融合タンパク質をコードする遺伝子またはその相補体を含むコンストラクトを生成する。いくつかの実施態様において、クローニング戦

略を用いて、少なくとも1つの第一のC Fと少なくとも1つの第一のX T E Nポリペプチドとを含む単量体C F X T E Nをコードする遺伝子またはその相補体を作製する。前述の一実施態様において、該遺伝子は、C Fまたはその配列バリエーションをコードする配列を含む。他の実施態様において、クローニング戦略を用いて、少なくとも1つの第一の分子のC Fをコードするヌクレオチドまたはその相補体と、1つの第一のおよび少なくとも1つの第二のX T E Nをコードするヌクレオチドまたはその相補体を含む単量体C F X T E Nをコードする遺伝子を作製し、それを用いて、C F X T E N組成物の融合タンパク質の発現のために宿主細胞を形質転換する。本節に説明される先の前述の実施態様において、該遺伝子は、開裂配列（複数可）もコードするスペーサー配列をコードするヌクレオチドをさらに含むことができる。

10

【0217】

所望のX T E N配列を設計する上で、本発明の組成物のX T E Nの非反復性の性質が、X T E Nコード配列の作製における「構築ブロック」分子アプローチの使用にもかかわらず、達成されることが発見された。このことは、後で連結および／または多量体化されてX T E N配列をコードする遺伝子を作製する、先に説明されるペプチド配列モチーフをコードするポリヌクレオチドのライブラリーの使用によって達成された（図4および図5ならびに実施例を参照されたい）。したがって、発現した融合タンパク質のX T E N（複数可）は、4つの異なる配列モチーフと同じくらい少ない複数の単位からなり得、なぜなら、モチーフ自体は非反復性アミノ酸からなり、全体的なX T E N配列は非反復性となるからである。したがって、一実施態様において、X T E Nをコードするポリヌクレオチドは、フレームにおいて作用可能に連結された非反復性の配列またはモチーフをコードする複数のポリヌクレオチドを含み、この場合結果として生じる発現したX T E Nアミノ酸配列は非反復性である。

20

【0218】

一アプローチにおいて、C F X T E N融合タンパク質に相応するDNA配列を含むコンストラクトをまず調製する。組成物のC FをコードするDNAを、標準的な方法を用いて、C F mRNAを所有しかつそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織または単離された細胞から調製されたc DNAライブラリーから得る。ライブラリーを、従来の分子生物学技術を用いたハイブリッド形成によって、関心対象のC F遺伝子を同定するよう設計された、例えば約20～100塩基を含むプローブを用いてスクリーニングする。プローブについての最良の候補は、凝固因子について高度に相同性の配列を表すが、1つ以上の位置において変性していてもよいものであり、偽陽性が最小化される十分な長さでありかつ十分に明白であるべきである。必要な場合、コード配列は、c DNAへと逆転写されなかったかもしれないmRNAの前駆体および加工中間体を検出するために、上述のSambrook, et al. において説明される従来のプライマー伸長手順を用いて得ることができる。次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）方法論を用いて、標的のDNAまたはRNAのコード配列を増幅して、C F遺伝子（複数可）を含むC F X T E Nコンストラクトの調製に十分な材料を得る。次に、アッセイを実施して、ハイブリッド形成している全長の遺伝子が所望のC F遺伝子（複数可）であることを確認することができる。これらの従来法によって、DNAは、このような源から調製されたc DNAライブラリーから簡便に得ることができる。C Fコード遺伝子（複数可）はまた、ゲノムライブラリーから得られ、または当該技術分野で公知の標準的な合成手順（例えば、Engels et al. (Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734, 1989) において説明される方法のうちの1つを用いた、公共のデータベース、特許、または文献引用から得られるDNA配列を用いた自動核酸合成）によって得られる。このような手順は、当該技術分野で周知であり、かつ科学文献および特許文献において十分説明されている。例えば、配列は、(American Chemical Societyにより公表されている) Chemical Abstracts Services (CAS) Registry Numbersおよび／または関心対象のタンパク質または該タンパク質の断片もしくはバリエーションのアミノ酸配列を含むCA

30

40

50

S RegistryまたはGenBankにおけるエントリーに相応する、ncbi.nlm.nih.govにおけるワールドワイドウェブにおいて入手可能なNational Center for Biotechnology Information (NCBI) ウェブページを通じて入手可能なGenBank Accession Numbers (例えば、遺伝子座ID、NP_XXXXX、およびXP_XXXXX) モデルタンパク質識別子から得ることができる。本明細書で提供されるこのような配列識別子については、これらのCASおよびGenBankおよびGenSeq受入番号の各々と関係した要約ページならびに引用される雑誌公表物 (例えば、PubMed ID番号 (PMID)) は、特に本明細書に説明されるアミノ酸配列に関して、その全体が引用により各々組み込まれる。一実施態様において、CFコード遺伝子は、表1もしくは表2の任意の1つからのタンパク質、またはその断片もしくはバリエーションをコードする。

10

【0219】

対象のCFXTENタンパク質のCF部分をコードする遺伝子またはポリヌクレオチドは、単一のCFを含む発現した融合タンパク質の場合、次に、生物系における高レベルのタンパク質発現に適切な転写配列および翻訳配列の制御下のプラスミドまたは他のベクターであるコンストラクトへとクローン化される。後者の工程において、XTENをコードする第二の遺伝子またはポリヌクレオチドは、CFをコードする遺伝子 (複数可) に隣接しそれとともにフレーム内にあるコンストラクトへとクローン化することによって、CF遺伝子のN末端および／またはC末端をコードするヌクレオチドへと遺伝子的に融合される。この第二の工程は、連結工程または多量体化工程を通じて生じる。本節に説明される先の前述の実施態様において、作製される遺伝子コンストラクトが、あるいは個々の融合タンパク質をコードする個々の遺伝子の相補体であり得ることは理解されるべきである。

20

【0220】

XTENをコードする遺伝子は、実施例により完全に説明される方法を含む、制限酵素伸介性クローニング、PCR、および重複伸長など、完全に合成的にまたは酵素的加工と組み合わせられた合成によってのいずれかで1つ以上の工程において作製されることができる。本明細書に開示された方法を用いて、例えば、XTENをコードするポリヌクレオチドの短い配列を、所望の長さおよび配列のより長いXTENへと連結することができる。一実施態様において、該方法は、約9～14アミノ酸、または約12～20アミノ酸、または約18～36アミノ酸、または約48～約144アミノ酸、または約144～約288またはそれより長いXTENモチーフ配列またはセグメント配列、あるいはモチーフ又はセグメントの長さの前述の範囲の任意の組み合わせをコードする2つ以上のコドン最適化オリゴヌクレオチドを連結する。

30

【0221】

あるいは、開示された方法を用いて、XTENコード配列を、所望の長さのより長い配列へと多量体化し、例えば、XTENの36アミノ酸をコードする遺伝子は、72の、次いで144、次いで288などのアミノ酸をコードする遺伝子へと二量体化することができる。多量体化を用いてでさえ、XTENポリペプチドは、XTENコード遺伝子が、使用されている最小単位のモチーフについて選択されたコドンの設計を通じて低い反復性を有するかまたは事実上まったく反復性を有さないように構築されることができ、形質転換された宿主におけるコード遺伝子の組換えを低下させ安定性を増大させることができる。非反復性配列を有するXTENをコードする遺伝子は、遺伝子合成の標準的な技術を用いてオリゴヌクレオチドから構築される。遺伝子設計は、コドンの使用およびアミノ酸組成を最適化するアルゴリズムを用いて実施することができる。本発明の一方法において、比較的短いXTENをコードするポリヌクレオチドコンストラクトのライブラリーを、図4および図5に示すように作製した後、構築する。このことは、各ライブラリーメンバーが、同じアミノ酸配列を有するが多くの異なるコード配列が可能であるよう純粋なコドンライブラリーであり得る。このようなライブラリーを、部分的に無作為化されたオリゴヌクレオチドから構築することができ、該ライブラリーを用いて、配列モチーフを含むXTENセグメントの大きなライブラリーを作製することができる。無作為化スキームを最適化

40

50

して、各位置についてのアミノ酸選択およびコドンの使用を制御することができる。前述を達成するための例示的な方法を実施例に開示する。

【0222】

(ポリヌクレオチドライブラリー)

別の態様において、本発明は、所望の長さおよび配列のX T E Nを個一度する遺伝子を構築するために用いられるX T E N配列をコードするポリヌクレオチドのライブラリーを提供する。

【0223】

ある実施態様において、X T E Nコードライブラリーコンストラクトは、固定された長さのポリペプチドセグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。初期工程として、9 ~ 14のアミノ酸残基のモチーフをコードするオリゴヌクレオチドのライブラリーを構築することができる。好ましい実施態様において、12のアミノ酸のモチーフをコードするオリゴヌクレオチドのライブラリーが構築される。

【0224】

X T E Nコード配列セグメントは、より長いコード配列へと二量体化または多量体化されることができる。二量体化または多量体化は、連結、重複伸長、P C R構築、または当該技術分野で公知の類似のクローン化技術によって実施することができる。この加工は、結果として生じるX T E Nコード配列が配列の組織化および所望の長さに到達して、X T E Nコード遺伝子を提供するまで、複数回反復することができる。明らかなように、例えば12のアミノ酸モチーフをコードするポリヌクレオチドのライブラリーは、36のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドのライブラリーへと二量体化および／または連結されることができる。異なる長さのモチーフ、例えば、27~42のアミノ酸をコードするライブラリーをもたらす9~14のアミノ酸モチーフをコードするライブラリーは、本発明によって熟慮される。順に、27~42のアミノ酸、好ましくは（実施例において説明されるように）36のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドのライブラリーは、本明細書に開示されるように、C F X T E N融合タンパク質をコードする遺伝子への組み込みのために所望の長さのX T E N配列をコードする連続的により長い長さのポリヌクレオチドを含むライブラリーへと連続的に二量体化されることができる。いくつかの実施態様において、具体的な配列X T E Nファミリー、例えば、表3のA D配列、A E配列、A F配列、A G配列、A M配列、またはA Q配列に限定されるアミノ酸をコードするポリヌクレオチドのライブラリーが構築される。他の実施態様において、ライブラリーは、表3由来のモチーフファミリーの2つ以上をコードする配列を含む。36マーをコードするライブラリーの代表的な非限定的なポリヌクレオチド配列名称および配列を表9~表12に呈し、それらを作製するために用いた方法を、個々の実施例においてより完全に説明する。他の実施態様において、X T E Nをコードするライブラリーは、コドンの少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%が、グリシン（G）、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、グルタミン酸（E）、およびプロリン（P）のアミノ酸についてのコドンからなる群から選択されるアミノ酸をコードする無作為化した配列に連結されたポリヌクレオチドコドンのセグメントから構築される。該ライブラリーを順に、連続的な二量体化または連結に用いて、例えば、コードされたX T E Nが、C F X T E N融合タンパク質の相補体として発現する場合に、本明細書に開示された特性の1つ以上を有することのできる48、72、144、288、576、864、875、912、923、1318のアミノ酸、または最大全長約3000のアミノ酸、および中間長のX T E N配列をコードするポリヌクレオチド配列ライブラリーを達成することができる。いくつかの場合、ポリヌクレオチドライブラリー配列には、下記により完全に説明される「配列決定アイランド」として用いられる追加的な塩基も含んでよい。

【0225】

図5は、本発明の実施態様におけるX T E NポリヌクレオチドコンストラクトおよびC F X T E Nポリヌクレオチドコンストラクトの構築における代表的な非限定的工程の模式的流れ図ある。個々のオリゴヌクレオチド501を、12のアミノ酸モチーフ（「12マー」）などの配列モチーフ502へとアニーリングし、それをその後、B b s IおよびK p n Iの制限部位を含むオリゴ503と連結する。所望の長さのX T E N遺伝子504を達成するまで、ライブラリー由来の追加的な配列モチーフを12マーへとアニーリングする。X T E N遺伝子をスタッパーベクターへとクローン化する。ベクターは任意にF l a g配列506をコードした後、B s a I、B b s I、およびK p n I部位によって隣接されるスタッパー配列507をコードし、この場合、（この例においてF I Xをコードする）単一のC F遺伝子508であり、結果的に単一のC Fを含むC F X T E Nをコードする遺伝子を生じる500。X T E N配列および前駆体配列をコードするポリヌクレオチドについてのX T E N名称に関する非網羅的なリストを表8に提供する。

【0226】

【表8-1】

表8：XTENのDNA配列および前駆体配列

XTEN 名称	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列
AE48	111	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTACCCCGGGTAGC GGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCT
AM48	112	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTGCATCCCCGGGC ACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCT
AE144	113	GGTAGCGAACCGGCAACTTCCGGCTCTGAAACCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAGTCTGGCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCT TCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAACCGGCTACT TCCGGTCTGAAACTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACT TCTGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA

【0227】

【表 8 - 2】

XTEN 名称	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列
AF144	114	GGTACTTCTACTCCGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTG AATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGG TTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCG TCTGGCACCACACAGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCAGGT ACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTACTCCGAAAGCG GCTCCGCATCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTAC CTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCT TCTACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA
AE288	115	GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCCTGCTACC TCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGAATCTGGTCCA GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCCGGCTGGCTCT CCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAGAA GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCAAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCTGAGTCCGGCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCAGGTAGCGAACC GGCTACT TCTGGTTCTGAAACCCAGGTAGCGAACC GGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCT TCCGAAGGCAGCGCACCAAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA
AE576	116	GGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCA GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCT TCCGAAGGCAGCGCACCAAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCAGGTAGCGAACC GGCTACT TCTGGTTCTGAAACCCAGGTAGCGAACC GGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTAGCCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAAGGTAGCCCAGCAGGTTCT CCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACC GGCTACT TCTGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCAAGGTACTTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCC AGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGC AACCCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACC GTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA AGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACC TCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA AGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAAGGTAGCCCAGCAGGTTCT TCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA AGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTAC CTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGAATCTGGTCC AGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGC TACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA AGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAGA AGGTAGCCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA A
AF576	117	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCG

10

20

30

40

【表 8 - 3】

XTEN 名称	配列 番号	DNA スクレオチド配列	
		CAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCCTTCTGGTACCGCTCCAG GTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGC AGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT TCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAAT CTTCTACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCT TACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCT TCTACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTA CCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTC TACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACT AGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGC ACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGTTCTACTA GCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGC TTCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACTAGC TCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCA TCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCG AATCCCCGCTGGTACCGCACCCAGGTACTTCTACCCCGAAAGCGGCTCTGCCTT CTCCAGGTACTTCTACCCCGAAAGCGGCTCCGCATCTCCAGGTTCTACTAGCG AATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGCTGGTACTGC TCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGTACTGCACCAGGTTCTACTAGCTCT ACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCT CCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAAT CTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCACC AGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCTCAGGTTCTACTAGCGAATCT CCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCACCA GGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTG AATCTTCTACCGCACCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAGG TACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACTGCT GAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT CTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCAG AATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTA CTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA	10
AE624	118	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTACCCCGGGTAGC GGTACTGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCC AGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCAGGCTC TCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCC AGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGC TACCCCGGAATCTGGCCCAGGTAGCGAACCAGGCTACTTCTGGTCTGAAACCCC AGGTAGCGAACCAGGCTACCTCCGTTCTGAAACTCCAGGTAGCCCGGCGAGGCTC TCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCC AGGTACCTCTACCGAACCCTCTGAGGGCAGCGCACCCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCTACCTCCACCAGGA AGGTACTTCTACCGAACCCTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTACCTCTACTGAACC TTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCAGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCC AGGTACTTCTACCGAACCCTCCGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGGCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCCC AGGTAGCGAACCAGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGC TACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCC AGGTACCTCTACCGAACCCTTCTGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCTACCTCCACCAGGA AGGTACTTCTACCGAACCCTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTACCTCTGAAAGCGC	30 40

【表 8 - 4】

XTEN 名称	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列
		AACCTCTGAGTCTGGCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAAGGTACTTCTGAAAGCGC TACTCCTGAGTCCGGCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAATTCTACTGAAGAAGGTAGCCCGGCAGGCTC TCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCC AGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA
AM875	119	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCACCAAGGTAGCGAACCGGCTACT TCCGGTTCTGAAACCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCAATTCTACTGAAGAA GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGGAA AGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAG GTTCTACTAGCGAATCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAG CGGTTCCGCTTCTCCAGGTACCTCTACTCCGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGT AGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCTGAATCCGGCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGT ACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAAGGT ACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCT ACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAAGGT ACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCTGAGTCCGGCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGT ACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGT ACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTTGCTACTTCT GGTTCTGAAACCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTG CTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTAG CCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACT TCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTGCA AGCGCAAGCGGCGCGCCAAGCACGGGAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA GTCCGGCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCC GGCTGGCTCTCCAATTCTACTGAAGAAGGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCT CCTGGCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGCTCTGGCACCGCACCAAGGTACTTCCC CTAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAAGGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTC CTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCG TCTGCATCTACCGGTACCGGCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAA ACTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCCGGCTCTGAAACCCAGGTTCCACAGCTCTACTGCAGAATCTCCG GGCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCTCCTA GCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAA CTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCACCAAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTG GTCCAGGTACCTCTACTCCGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCG AATCTCCTTCTGGCACTGCACCAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCG CTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCG AACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAAGGTAGCTCTACTCCGCTCTGGTGCAACCGGCT CCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCAGGTGCTTCCCCGGG CACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCGGAGTCTGGTCCAGGTAGCCCTGCAGGT TCTCCTACCTCCACTGAGGAAGGTAGCTCTACTCCGCTCTGGTGCAACCGGCTCCC CAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCAGGTGCTTCCCCGGGCAC CAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCC AGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCCGAAGGTAGCGCACCA
AE864	120	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCT

10

20

30

40

40

【表 8 - 6】

XTEN 名称	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列
		GCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTG CATCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAG CGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTTCTGGCACT GCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGTTCTACCAGCT CTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCAT CTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCAGTGAATCTCCGGGC CCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTACTCCTG AAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCC CAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCAGGTTCTACTAGCTCTAC TGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCA GGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCTC CTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTTCTGGCACTGCACCAG GTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCXXXXXXXXXXXXTGAAGCGCAAGCGGC GCGCAAGCACGGGAXXXXXXXXXTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGTCCAGGT TCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTT CTGGTACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGTCCAGGTTCT TACCAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCT GGTACTGCACCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTACT TCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTT CTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTC CCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCC CGTTCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGTCCAGGTTCTACT AGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCT ACCGCACCGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCGAGGTACTTCT ACCCCGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCAGGTACTTCTACCCCGAAAGCGGCTCC GCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGTCCAGGTACTTCTA CCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGTGAATCTCC GGGTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGTCCAGGTTCTACTAGC GAATCCCCGTCTGGTACCGCACCGAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCG CACAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCCCCGAG CGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCT CCAGGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCG GCGAATCTTCTACCGTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCG AGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACT GCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCGGCCAGGTAGCTCTACTCCGTTCTG GTGCAACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA XXXX was inserted in two areas where no sequence information is available.
AG864	122	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTT CTACTGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACTGGTCCAGG TACCCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGT GCTACCGGCTCTCCAGGTTCTAACCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCAGGTG CTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCG CATCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCAGGTAC TCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCT ACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCC CGGTTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAC CGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCG GGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTTCTGGTGCTACCG GCTCTCCAGGTTCTAACCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCAGGTTCTAGCCC TTCTGCTTCCACCGGTACTGGGCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGC TCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCAGGTGCATCTCCGG GCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCCCCGCACTAGCTCTACTGGTTCT TCCAGGTGCTTCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCTGGCAGC GGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCCCCGGGCACT

【表 8－7】

XTEN 名称	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列
		AGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAG GTACTCCGGGCAGCGGTAAGTCTTCTTCTCTCCAGGTGCATCTCCGGGCACTAG CTCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTCTCCAGGT GCTTCTCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTG CAACCGGTTCCCAAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCAAGGTGC ATCCCTTGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGC ATCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCAAGGTAGC TCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCAAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAA CCGGCTCCCAAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCAGGTGCTTC CCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCCCGGGTACCAGCTCTAC CGGTTCTCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACTGCATCTTCTCTCCAGGTGCTTCT CCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTGCATCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCC TGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCC TCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCGGTA GCGGTACCGCATCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTC TCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCT TCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCCC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGC ATCTACTGGTACTGGTCCAGGTGCATCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCA GGTACTCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTG GTGCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCAGG TTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGC TCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTAC CGGTACTGGTCCAGGTGCATCCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCT AGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCA TCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCAAGGTAGCT CTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCAAGGTGCATCCCTGGCACCAGCTCTAC CGGTTCTCCA
AM923	123	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTGCATCCCGGGC ACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACCAGGTACTTCCGGTTCTGAAACCCC AGGTAGCCAGCAGGTTCTCCAACCTTCTACTGAAGAAGGTTCTACCAGCTCTAC CGCAGAATCTCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGAAAGCGGCTCTGCATCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCC CCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAG GTACCTCTACTCCGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTAGCGAACCAGGCAACCT CCGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGCCAG GTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACCGAACCCT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCAGGTTCTCCTACCTCCACCAGGGAAG GTACTTCTACCGAACCCTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACCGAACCCT CCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCCTCCGAGGGCAGCGCACCAG GTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTC CGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCAGGAAGGTAGCTCTACCCCGTCTGG TGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCCAGGT AGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTACCTCTACCGAACCCTCCG AGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTA GCGAACCAGCAACCTCCGGTTCTGAACTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGA CTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTA CTTCTACCGAACCCTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTGCAAGCGCAAGCGGCGCGC CAAGCACGGGAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCCAGGTAGCC

XTEN 名称	配列 番号	DNA スクレオチド配列
		CGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAATT CTACTGAAGAAGGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTAC TAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCT ACTGCACCAGGTACCCCTGGCAGCGGTACCCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTA CCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCTACCGGTAC CGGCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCGGAATCCGGCCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCCGGCTCTGA AACCCAGGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCAGGTTCTACTAG CTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCTCCTAGCGCGAATCTTCTACC GCTCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAACC TGAACCTCCGGCTCTGAAACCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCACCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTC CGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGC ACCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGA ACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGC ACCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCGAGGTTCTAGCCCGTCT GCTTCCACTGGTACTGGCCAGGTGCTTCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTC CAGGTAGCGAACC TGCTACCTCCGGTTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCG CAACTCCGGAGTCTGGTCCAGGTAGCCCTGCAGGTTCTCTACCTCCACTGAGG AAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCGAGGTTCTAGCCCGTCTGC TTCCACTGGTACTGGCCAGGTGCTTCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCAGGTACCTCTACTGAACCG TCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
AE912	124	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTACCCCGGGTAGC GGTACTGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCTTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCC AGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCAGGCTC TCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCC AGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGC TACCCCGGAATCTGGCCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCTGGTCTGAAACCC AGGTAGCGAACC GGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTAGCCCGGCAGGCTC TCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCC AGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCCAGGTACTTCTACCGAAC TCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCTACCTCCACCGAGGA AGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTACCTCTACTGAACC TTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCTGAAATCCGGTCCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCC AGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGGCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCAGGTAGCCCTGTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCCC AGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGC TACTCCGGAGTCTGGCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTACCGAAC GTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCC AGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCCAGGTACTTCTACCGAAC GTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCTACCTCCACCGAGGA AGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCCAGGTACCTCTGAAAGCGC AACTCCTGAGTCTGGCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCCAGGTACTTCTGAAAGCGC TACTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAGAAGGTAGCCCGGCAGGCTC TCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCC AGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCCAGGTACCTCTGAAAGCGC

【表 8 - 9】

XTEN 名称	配列 番号	DNA スクレオチド配列
		AACTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGGCC AGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGC TACTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAGAAGGTACTTCTACCGAACC TCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGC TACCCCGGAATCTGGCCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCC AGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTAGCCAGCAGGCTC TCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACC AGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA
AM1318	125	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACCGGCTACT TCCGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCAACCTTCTACTGAAGAA GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGGAA AGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAG GTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAG CGGTTCCGCTTCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGT AGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCTGAATCCGGGCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGT ACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCT ACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCTGAGTCCGGGCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGT ACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGT ACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCT GGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTG CTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTAG CCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACT TCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTCCA GAACCAACGGGGCCGGCCCCAAGCGGAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTC TGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGGCCAGGTAGCCC GGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA GTCCGGGCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCC GGCTGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA GTCCGGGCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCC GGCTGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAGAAGGTACTTCTACCAGCTCTACCCTGAATCT CCTGGGCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCACCGAGGTACTTCCC CTAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCAC CGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCACCGAGGTACTTCTCCT AGCGGCGAATCTTCTACCGCACCAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGC GCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGGCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAA ACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACT GCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCCCCTA

10

20

30

40

【表 8 - 1 0】

XTEN 名称	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列
		GCGGTGAATCTTCTACCGCACCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCG CACCAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCG GCCCAGGTAGCTCTACTCCGTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCC GTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCT CCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCTATCCCCGGGT ACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTGCAAGCGCAAGCGGCGCGCCAAGCACGGG AGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACC GCTGAATCTCCGGGCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAG GTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCAGGTACCTCTACTGAACCGT CTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAG GTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGG TGCTACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT ACTTCTACTCCGGAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTACTTCTCCTAGGCTGAAT CTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTAC TTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGG CTCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTTC TACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCT GGCACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTAGC CCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG GAGTCCGGGCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGGCCAGGTAGCGAACCAGGCAACCTCCGGTCTGAAACCCAGGTAGC TCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCGAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTA CCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTCTAC TAGCGAATCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCCCTAGCGGTGAATCTTCT ACTGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTAGCTCT ACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCTATCCCCGGGTACCAGCTCTACC GGTTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCCCTG CTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCCTCCGACTTCTAC TGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA
BC864	126	GGTACTTCCACCGAACCATCCGAACCAGGTAGCGCAGGTACTTCCACCGAACCA TCCGAACCTGGCAGCGCAGGTAGCGAACCAGGCAACCTCTGGTACTGAACCATCA GGTAGCGGCGCATCCGAGCCTACCTCTACTGAACCAGGTAGCGAACCAGGCTACC TCCGGTACTGAGCCATCAGGTAGCGAACCAGGCAACTTCCGGTACTGAACCATCA GGTAGCGAACCAGGCAACTTCCGGCACTGAACCATCAGGTAGCGGTGCATCTGAG CCGACCTCTACTGAACCAGGTACTTCTACTGAACCATCTGAGCCGGGCAGCGCA GGTAGCGAACCAGCTACTTCTGGCACTGAACCATCAGGTACTTCTACTGAACCA TCCGAACCAGGTAGCGCAGGTAGCGAACCAGTACTTCTGCTAGCTTCTAGCCATCA GGTAGCGAACCAGGCTACCTCTGGTACTGAACCATCAGGTACTTCTACCAGCA TCCGAGCCTGGTAGCGCAGGTACTTCTACCGAACCATCCGAGCCAGGCAGCGCA GGTAGCGAACCAGGCAACCTCTGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGAACCAGCAAC TTCTGGTACTGAACCATCAGGTACTAGCGAGCCATCTACTTCCGAACCAGGTGC AGGTAGCGGCGCATCCGAACCTACTTCCACTGAACCAGGTACTAGCGAGCCATC CACCTCTGAACCAGGTGCAGGTAGCGAACCAGGCAACTTCCGGCACTGAACCATC AGGTAGCGAACCAGGCTACCTCTGGTACTGAACCATCAGGTACTTCTACCAGACC ATCCGAGCCTGGTAGCGCAGGTACTTCTACCGAACCATCCGAGCCAGGCAGCGC AGGTAGCGGTGCATCCGAGCCGACCTCTACTGAACCAGGTAGCGAACCAGCAA CTTCTGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGAACCAGCTACCTCTGGTACTGAACCAT CAGGTAGCGAACCAGGCTACTTCCGGCACTGAACCATCAGGTAGCGAACCAGCA ACCTCCGGTACTGAACCATCAGGTACTTCCACTGAACCATCCGAACCAGGGTAGC GCAGGTAGCGAACCAGGCAACTTCCGGCACTGAACCATCAGGTAGCGGTGCATCT GAGCCGACCTCTACTGAACCAGGTACTTCTACTGAACCATCTGAGCCGGGCAGC GCAGGTAGCGAACCAGTGAACCTCCGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGGCGCATCT GAACCAACCTCTACTGAACCAGGTACTTCCAGCGAACCATCTGAGCCAGGCAGC GCAGGTAGCGGCGCATCTGAACCAACCTCTACTGAACCAGGTAGCGAACCAGC AATTCTGGTACTGAACCATCAGGTAGCGGCGCATCTGAGCCTACTTCCACTGA ACCAGGTAGCGAACCAGGCAACTTCCGGCACTGAACCATCAGGTAGCGGTGCATC

【表 8 - 1 1】

XTEN 名称	配列 番号	DNA スクレオチド配列
		TGAGCCGACCTCTACTGAACCAGGTACTTCTACTGAACCATCTGAGCCGGGCAG CGCAGGTAGCGAACC GGCAACTTCCGGCACTGAACCATCAGGTAGCGGTGCATC TGAGCCGACCTCTACTGAACCAGGTACTTCTACTGAACCATCTGAGCCGGGCAG CGCAGGTAGCGAACCAGCTACTTCTGGCACTGAACCATCAGGTACTTCTACTGA ACCATCCGAACCAGGTAGCGCAGGTAGCGAACCCTGCTACCTCTGGTACTGAGCC ATCAGGTACTTCTACTGAACCATCCGAGCCGGGTAGCGCAGGTACTTCCACTGA ACCATCTGAACCTGGTAGCGCAGGTACTTCCACTGAACCATCCGAACCAGGTAG CGCAGGTACTTCTACTGAACCATCCGAGCCGGGTAGCGCAGGTACTTCCACTGA ACCATCTGAACCTGGTAGCGCAGGTACTTCCACTGAACCATCCGAACCAGGTAG CGCAGGTACTAGCGAACCATCCACCTCCGAACCAGGCGCAGGTAGCGGTGCATC TGAACCGACTTCTACTGAACCAGGTACTTCCACTGAACCATCTGAGCCAGGTAG CGCAGGTACTTCCACCGAACCATCCGAACCAGGTAGCGCAGGTACTTCCACCGA ACCATCCGAACCTGGCAGCGCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCTGGTACTGAACC ATCAGGTAGCGGTGCATCCGAGCCGACCTCTACTGAACCAGGTAGCGAACCAGC AACTTCTGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGAACCAGCTACCTCTGGTACTGAACC ATCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCTGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGAACCAGC CAACTTCTGGTACTGAACCATCAGGTACTAGCGAGCCATCTACTTCCGAACCAG GTGCAGGTAGCGAACCCTGCAACCTCCGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGGCGCAT CTGAACCAACCTCTACTGAACCAGGTACTTCCACCGAACCATCTGAGCCAGGCA GCGCAGGTAGCGAACCCTGCAACCTCCGGCACTGAGCCATCAGGTAGCGGCGCA TCTGAACCAACCTCTACTGAACCAGGTACTTCCACCGAACCATCTGAGCCAGGC AGCGCA
BD864	127	GGTAGCGAACTGCTACTTCCGGCTCTGAGACTGCAGGTACTAGTGAATCCGCA ACTAGCGAATCTGGCGCAGGTAGCACTGCAGGCTCTGAGACTTCCACTGAAGCA GGTACTAGCGAGTCCGCAACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAACTGCTAC CTCTGGCTCCGAGACTGCAGGTAGCGAACTGCAACCTCTGGCTCTGAACTGC AGGTACTTCCACTGAAGCAAGTGAAGGCTCCGCATCAGGTACTTCCACCGAAGC AAGCGAAGGCTCCGCATCAGGTACTAGTGAAGTCCGCAACTAGCGAATCCGGTGC AGGTAGCGAAACCGCTACCTCTGGTTCCGAAACTGCAGGTACTTCTACCGAGGC TAGCGAAGGTTCTGCATCAGGTAGCACTGCTGGTTCCGAGACTTCTACTGAAGC AGGTACTAGCGAATCTGCTACTAGCGAATCCGGCGCAGGTACTAGCGAATCCGC TACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAACTGCAACCTCTGGTTCCGAGACTGC AGGTACTAGCGAGTCCGCTACTAGCGAATCTGGCGCAGGTACTTCCACTGAAGC TAGTGAAGGTTCTGCATCAGGTAGCGAACTGCTACTTCTGGTTCCGAAACTGC AGGTAGCGAAACCGCTACCTCTGGTTCCGAAACTGCAGGTACTTCTACCGAGGC TAGCGAAGGTTCTGCATCAGGTAGCACTGCTGGTTCCGAGACTTCTACTGAAGC AGGTACTAGCGAGTCCGCTACTAGCGAATCTGGCGCAGGTACTAGTGAATCCGC TAGTGAAGGTTCTGCATCAGGTAGCGAACTGCTACTTCTGGTTCCGAAACTGC AGGTAGCACTGCTGGCTCCGAGACTTCTACCGAAGCAGGTAGCACTGCAGGTTT CGAAACTTCCACTGAAGCAGGTAGCGAACTGCTACCTCTGGCTCTGAGACTGC AGGTACTAGCGAATCTGCTACTAGCGAATCCGGCGCAGGTACTAGCGAATCCGC TACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAACTGCAACCTCTGGTTCCGAGACTGC AGGTACTAGCGAATCTGCTACTAGCGAATCCGGCGCAGGTACTAGCGAATCCGC TACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAACTGCAACCTCTGGTTCCGAGACTGC AGGTAGCGAAACCGCTACCTCTGGTTCCGAAACTGCAGGTACTTCTACCGAGGC AGGTAGCGAAGTCTGCATCAGGTAGCACTGCTGGTTCCGAGACTTCTACTGAAGC AGGTAGCGAAACTGCTACTTCCGGCTCTGAGACTGCAGGTACTAGTGAATCCGC AACTAGCGAATCTGGCGCAGGTAGCACTGCAGGCTCTGAGACTTCCACTGAAGC AGGTAGCACTGCTGGTTCCGAAACCTCTACCGAAGCAGGTAGCACTGCAGGTTT TGAACCTTCCACTGAAGCAGGTACTTCCACTGAGGCTAGTGAAGGCTCTGCATC AGGTAGCACTGCTGGTTCCGAAACCTCTACCGAAGCAGGTAGCACTGCAGGTTT TGAACCTTCCACTGAAGCAGGTACTTCCACTGAGGCTAGTGAAGGCTCTGCATC AGGTAGCACTGCAGGTTCTGAGACTTCCACCGAAGCAGGTAGCGAACTGCTAC TTCTGGTTCCGAAACTGCAGGTACTTCCACTGAAGCTAGTGAAGGTTCCGCATC AGGTACTAGTGAGTCCGCAACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAACC GCA CCTCCGGTTCTGAAACTGCAGGTACTAGCGAATCCGCAACCAGCGAATCTGGCG CAGGTACTAGTGAGTCCGCAACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAAACCGCA ACCTCCGGTTCTGAAACTGCAGGTACTAGCGAATCCGCAACCAGCGAATCTGGC

10

20

30

40

【表 8－12】

XTEN 名称	配列 番号	DNA スクレオチド配列
		GCAGGTAGCGAAACTGCTACTTCCGGCTCTGAGACTGCAGGTACTTCCACCGAA GCAAGCGAAGGTTCCGCATCAGGTACTTCCACCGAGGCTAGTGAAGGCTCTGCA TCAGGTAGCACTGCTGGCTCCGAGACTTCTACCGAAGCAGGTAGCACTGCAGGT TCCGAAACTTCCACTGAAGCAGGTAGCGAAACTGCTACCTCTGGCTCTGAGACT GCAGGTACTAGCGAATCTGCTACTAGCGAATCCGGCGCAGGTACTAGCGAATCC GCTACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAAACTGCAACCTCTGGTTCCGAGACT GCAGGTAGCGAAACTGCTACTTCCGGCTCCGAGACTGCAGGTAGCGAAACTGCT ACTTCTGGCTCCGAAACTGCAGGTACTTCTACTGAGGCTAGTGAAGGTTCCGCA TCAGGTACTAGCGAGTCCGCAACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAAACTGC TACCTCTGGCTCCGAGACTGCAGGTAGCGAAACTGCAACCTCTGGCTCTGAAAC TGCAGGTACTAGCGAATCTGCTACTAGCGAATCCGGCGCAGGTACTAGCGAATC CGCTACCAGCGAATCCGGCGCAGGTAGCGAAACTGCAACCTCTGGTTCCGAGAC TGCA

10

【0237】

当該技術分野で公知の1つ以上の発現ベクターへとXTENコード遺伝子のライブラリーをクローン化してもよい。十分に発現するライブラリーメンバーの同定を容易にするために、リポータータンパク質への融合としてライブラリーを構築することができる。好適なリポーター遺伝子に関する非限定例は、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、およびベクターガラクトシダーゼである。スクリーニングすることによって、選択の宿主生物において高濃度で発現することのできる短いXTEN配列を同定することができる。その後、ランダムXTEN二量体のライブラリーを作製して、高レベルの発現についてのスクリーンを反復することができる。その後、発現レベル、プロテアーゼ安定性、または抗血清に対する結合などのいくつかの特性について、結果として生じるコンストラクトをスクリーニングすることができる。

20

【0238】

本発明の一態様は、ポリヌクレオチド配列の作製がコドンの最適化を受けた融合タンパク質の成分をコードするポリヌクレオチド配列を提供することである。特に関心対象なのは、ポリペプチド組成物の発現を改良する目的のコドンの最適化、および産生宿主におけるコード遺伝子の遺伝的安定性を改良することである。例えば、コドンの最適化は、グリシンの多いXTEN配列または非常に反復性のアミノ酸配列を有するXTEN配列にとって特に重要である。コドンの最適化は、コンピュータプログラムを用いて実施され（Gustafsson, C., et al. (2004) Trends Biotechnol, 22: 346-53）、そのうちのいくつかはリボソーム転写中断（ribosomal pausing）を最小化する（Coda Genomics Inc.）。一実施態様において、ライブラリーのすべてのメンバーが同じアミノ酸配列をコードするがコドンの使用が変動する、コドンライブラリーを構築することによって、コドンの最適化を実施することができる。このようなライブラリーは、XTEN含有産物の大規模作製に特に好適な、高度に発現しかつ遺伝的に安定なメンバーをスクリーニングされることができる。XTEN配列を設計する場合、いくつかの特性を考慮することができる。コードDNA配列における反復性を最小化することができる。加えて、産生宿主によってまれに用いられるコドン（例えば、大腸菌におけるAGGおよびAGAのアルギニンコドンならびに1つのロイシンコドン）の使用を回避または最小化することができる。大腸菌の場合の場合、2つのグリシンコドンGGAおよびGGGは、高度に発現したタンパク質においてまれに用いられる。したがって、XTEN配列をコードする遺伝子のコドン最適化は、非常に望ましくあり得る。高レベルのグリシンを有するDNA配列は、不安定性もしくは低い発現レベルをもたらすことのできる高いGC含有量を有する傾向がある。したがって、可能な場合、XTENコード配列のGC含有量が、XTENを製造するために用いられる産生生物に好適であるようコドンを選択することが好ましい。

30

40

【0239】

50

任意に、全長のX T E Nをコードする遺伝子は、1つ以上の配列決定アイランドを含む。この文脈において、配列決定アイランドとは、X T E Nライブラリーコンストラクト配列とは別個でありかつ全長のX T E Nをコードする遺伝子に存在しないもしくは存在すると期待されない制限部位を含む、短いストレッチの配列である。一実施態様において、配列決定アイランドは、配列5' - A G G T G C A A G C G C A A G C G G C G C G C C A A G C A C G G G A G G T - 3' (配列番号128)である。別の実施態様において、配列決定アイランドは、配列5' - A G G T C C A G A A C C A A C G G G G C C G G C C C C A A G C G G A G G T - 3' (配列番号129)である。

【0240】

一実施態様において、ポリヌクレオチドライブラリーは、開示された方法を用いて構築され、この場合、ライブラリーのすべてのメンバーが同じアミノ酸配列をコードするが配列における個々のアミノ酸についてのコドン使用が変動する。このようなライブラリーは、X T E N含有産物の大規模作製に特に好適な、高度に発現しかつ遺伝的に安定なメンバーをスクリーニングされることができる。

【0241】

任意に、ある望ましくない配列を含む単離物を除去するために、ライブラリーにおけるクローンを配列決定することができる。短いX T E N配列の初期のライブラリーは、アミノ酸配列におけるいくつかの変動を可能にする。例えば、いくつかの親水性アミノ酸が特定の位置で生じることができるよう、いくつかのコドンが無作為化することができる。反復性多量体化の加工の間、結果として生じるライブラリーメンバーを、高レベルの発現のためのスクリーンに加えて、溶解度またはプロテアーゼ耐性のような他の特徴についてスクリーニングすることができる。

【0242】

一旦、所望の長さおよび特性のX T E Nをコードする遺伝子が選択されると、C Fをコードする遺伝子に隣接してそれとともにフレーム内にある、またはそれに代わるものとして、C Fの隣接するドメインをコードするヌクレオチド間にある、またはそれに代わるものとして、所与のC Fドメインをコードする配列内にある、またはそれに代わるものとして、末端X T E Nに連結されたスペーサー／開裂配列をコードするヌクレオチドとともにフレーム内にある、コンストラクトへとクローニングすることによって、C F遺伝子（複数可）をコードするヌクレオチドに、所望の位置で遺伝子的に融合される。本発明は、コードされるべきC F X T E Nに応じて、前述の種々の順列を提供する。例えば、先に示されるように、C F X T E N融合タンパク質をコードする遺伝子は、式V Iによって具現化されるなど、C Fと2つのX T E Nとを含み、該遺伝子は、C Fをコードし、組成および配列長において同一であるかまたは異なることができる2つのX T E Nをコードするポリヌクレオチドを有するであろう。前述の非限定的な一実施態様において、C Fポリヌクレオチドは凝固因子をコードするであろうし、C末端X T E Nをコードするポリヌクレオチドは、A E 8 6 4をコードするであろうし、およびE G F 2のC末端に隣接する内部X T E NをコードするポリヌクレオチドはA E 1 4 4をコードするであろう。C F遺伝子をX T E Nコンストラクトにクローン化する工程は、図32に示されるように、連結工程または多量体化工程を通じて生じることができる。C F X T E N融合タンパク質をコードするコンストラクトは、式I～式V Iの立体配置など、成分X T E N、C F、およびスペーサー配列の異なる立体配置において設計することができる。一実施態様において、コンストラクトは、以下の順序（5'から3'）のC FおよびX T E Nにおける成分の単量体ポリペプチドをコードするものに相補的なポリヌクレオチド配列、または該単量体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。別の実施態様において、コンストラクトは、以下の順序（5'から3'）のC F、スペーサー配列、およびX T E Nにおける成分の単量体ポリペプチドをコードするものに相補的なポリヌクレオチド配列、または該単量体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む。スペーサーポリヌクレオチドは任意に、開裂配列をコードする配列を含むことができる。当業者にとって明らかなように、前述の他の順列または多量体は可能である。

10

20

30

40

50

【0243】

本発明は、(a)表8由来のポリヌクレオチド配列、または(b)(a)のポリヌクレオチドと相補的な配列と比較して高い百分率の配列同一性を有するXTENコードポリヌクレオチドバリエーションを含むポリヌクレオチドも包含する。高い百分率の配列同一性を有するポリヌクレオチドは、前述の(a)もしくは(b)と比較して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、それに代わるものとして少なくとも約81%、それに代わるものとして少なくとも約82%、それに代わるものとして少なくとも約83%、それに代わるものとして少なくとも約84%、それに代わるものとして少なくとも約85%、それに代わるものとして少なくとも約86%、それに代わるものとして少なくとも約87%、それに代わるものとして少なくとも約88%、それに代わるものとして少なくとも約89%、それに代わるものとして少なくとも約90%、それに代わるものとして少なくとも約91%、それに代わるものとして少なくとも約92%、それに代わるものとして少なくとも約93%、それに代わるものとして少なくとも約94%、それに代わるものとして少なくとも約95%、それに代わるものとして少なくとも約96%、それに代わるものとして少なくとも約97%、それに代わるものとして少なくとも約98%、およびそれに代わるものとして少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するもの、またはストリンジェントな条件下で標的ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリッド形成することのできるものである。

10

【0244】

また、ヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列の相同性、配列類似性、もしくは配列同一性は、BestFitまたはGap対比較プログラム(GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711)などの公知のソフトウェアまたはコンピュータプログラムを用いることによって従来通り決定してもよい。BestFitは、SmithおよびWaterman(Advances in Applied Mathematics, 1981, 2: 482-489)の局所相同性アルゴリズムを用いて、2つの配列間の同一性または類似性の最良のセグメントを見出す。Gapは、1つの配列のすべてと、NeedlemanおよびWunsch(Journal of Molecular Biology, 1970, 48: 443-453)の方法を用いて別の類似の配列のすべてとの包括的なアラインメントを実施する。BestFitなどの配列アラインメントプログラムを用いる場合、配列相同性、類似性、または同一性の程度を決定するために、デフォルト背艇を用いてもよく、または適切なスコア化マトリックスを選択して、同一性、類似性、または相同性のスコアを最適化してもよい。

20

30

【0245】

「相補的で」ある核酸配列は、標準的なワトソン-クリック相補性則に従って塩基対形成することができるものである。本明細書で使用する場合、用語「相補的な配列」は、先に示される同じヌクレオチド比較によって評価され得るように、または本明細書に説明されるものなど、ストリンジェントな条件下でCFXTEN配列をコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成することができるものとして定義されるように、実質的に相補的である核酸配列を意味する。

40

【0246】

CFXTENキメラ融合タンパク質をコードする結果として生じるポリヌクレオチドは次に、発現ベクターへと個々にクローン化されることができる。核酸配列は、種々の手順によってベクターへと挿入される。一般に、DNAは、当該技術分野で公知の技術を用いて、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位(複数可)へと挿入される。ベクター成分には一般的に、シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない。これらの成分の1つ以上を含む好適なベクターの構築は、当業者に公知である標準的な連結技術を採用する。このような技術は、当該技術分野において周知であり、化学文献および特

50

許文献において十分に説明されている。

【0247】

種々のベクターは公共的に入手可能である。ベクターは例えば、組換えDNA手順に簡便に供され得るプラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態にあり得、ベクターの選択は、導入されるべき宿主細胞にしばしば依存する。したがって、ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外実体として存在し、その複製が染色体複製に依存する、ベクター、例えばプラスミドであり得る。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入されると、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、組み込まれ先の染色体（複数可）とともに複製されるものであり得る。

【0248】

本発明は、宿主細胞と適合性がありかつ宿主細胞によって認識され、およびCFXTE N融合タンパク質の制御された発現のためのCFXTE N遺伝子に作用可能に連結された複製配列および制御配列を含むプラスミドベクターの使用を提供する。ベクターは通常、複製部位、および形質転換された細胞における表現型選択を提供することのできるタンパク質をコードする配列を保持する。このようなベクター配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスについて周知である。使用することのできる有用な発現ベクターには、例えば、染色体配列、非染色体配列、および合成DNA配列のセグメントを含む。「発現ベクター」は、好適な宿主において融合タンパク質をコードするDNAの発現をもたらすことのできる好適な制御配列に作用可能に連結されたDNA配列を含むDNAコンストラクトを指す。必要条件は、ベクターが選択の宿主細胞において複製可能かつ生存可能であること

【0249】

他の好適なベクターには、SV40およびpcDNAの誘導体ならびに、Smith, et al., Gene 57: 31-40 (1988)によって説明されるような、colEI、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEXなどの公知の細菌プラスミド、pMB9およびその誘導体、RP4などのプラスミド、NM989などのファージIの数多くの誘導体などのファージDNA、およびM13などの他のファージDNA、ならびに糸状一本鎖ファージDNA；2ミクロンプラスミドもしくは2mプラスミドなどの酵母プラスミド、ならびにセントロメアおよび組込みの酵母シャトルベクター；昆虫細胞もしくは哺乳類細胞において有用なベクターなど、真核細胞において有用なベクター；ファージDNAもしくは発現制御配列を採用するよう修飾されたプラスミドなど、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター；ならびにこれらの類似物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。また、本発明において用いることのできる酵母発現系には、非融合型pYES2ベクター (Invitrogen)、融合pYESHisA、B、C (Invitrogen)、pRSベクター、およびこれらの類似物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0250】

ベクターの制御配列には、転写をもたらすプロモーター、このような転写を制御する任意のオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終止を制御する配列が含まれる。プロモーターは、選択の宿主細胞において転写活性を示し、かつ宿主細胞に対して同属性または異種性のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子に由来し得る、任意のDNA配列であり得る。

【0251】

哺乳類細胞におけるCFポリペプチドバリエーションをコードするDNAの転写を方向づけるのに好適なプロモーターの例は、SV40プロモーター (Subramaniet al., Mol. Cell. Biol. 1 (1981), 854-864)、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子) プロモーター (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814)、CMVプロモーター (Boshart et al., Cell 41: 521-530, 1985)、またはアデノウイルス2型主要後期 (major late) プロモーター (Kau

10

20

30

40

50

fman and Sharp, Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982)である。ベクターは、UCOE (遍在性クロマチン開放要素)などの配列も保持し得る。

【0252】

糸状真菌宿主細胞における使用に好適なプロモーターの例は、例えば、ADH3プロモーターまたはtpiAプロモーターである。他の有用なプロモーターの例は、アスペルギルス・オリゼTAKAアミラーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (miehei) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルス・ニガー中性 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガー酸安定性 α -アミラーゼ、アスペルギルス・ニガーもしくはアスペルギルス・アワモリグルコアミラーゼ (gluA)、リゾムコール・ミエヘイリパーゼ、アスペルギルス・オリゼアルカリプロテアーゼ、アスペルギルス・オリゼトリオースリン酸イソメラーゼ、またはアスペルギルス・ニデュランスアセトアミダーゼに由来するものである。好ましいのは、TAKA-アミラーゼおよびgluAプロモーターである。原核宿主との発現ベクターの使用に好適なプロモーターには、 β -ラクタマーゼ系およびラクトースプロモーター系 [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36, 776]、およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーター [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] が含まれ、すべて、CFXTENポリペプチドをコードするDNAに作用可能に連結される。細菌系における使用のためのプロモーターは、CFXTENポリペプチドをコードするDNAに作用可能に連結されたシャイン・ダルガルノ (S. D.) 配列も含むことができる。

【0253】

本発明は、例えば、pVL941 (Summers, et al., Virology 84:390-402 (1978))、pVL1393 (Invitrogen)、pVL1392 (Summers, et al., Virology 84:390-402 (1978) およびInvitrogen)、ならびにpBlueBacIII (Invitrogen) などだがこれらに限定されない非融合転移ベクターと、pAc700 (Summers, et al., Virology 84:390-402 (1978))、pAc701およびpAc70-2 (pAc700と同じであり、異なるリーディングフレームを有する)、pAc360 (Invitrogen) などだがこれらに限定されない融合転移ベクターの両方を用いてバキュロウイルス発現系を含む他の発現系の使用を熟慮し、pBlueBacHisA、B、C (;Invitrogen) も用いることができる。

【0254】

哺乳類細胞におけるCFポリヌクレオチドバリエーションをコードするDNAの転写を方向づけるのに好適なプロモーターの例は、CMVプロモーター (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985)、SV40プロモーター (Sbramani et al., Mol. Cell. Biol. 1 (1981), 854-864)、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子) プロモーター (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814)、アデノウイルス2型主要後期プロモーター (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982)である。ベクターは、UCOE (遍在性クロマチン開放要素)などの配列も保持し得る。

【0255】

糸状真菌宿主細胞における使用に好適なプロモーターの例は、例えば、ADH3プロモーターまたはtpiAプロモーターである。

【0256】

10

20

30

40

50

C F X T E NをコードするDNA配列も、必要な場合、h G H終結因子 (P a l m i t e r e t a l . , S c i e n c e 2 2 2 , 1 9 8 3 , p p . 8 0 9 - 8 1 4) またはT P I 1終結因子 (A l b e r a n d K a w a s a k i , J . M o l . A p p l . G e n . 1 , 1 9 8 2 , p p . 4 1 9 - 4 3 4) またはA D H 3 (M c K n i g h t e t a l . , T h e E M B O J . 4 , 1 9 8 5 , p p . 2 0 9 3 - 2 0 9 9) などの好適な終結因子に作用可能に接続され得る。発現ベクターは、アデノウイルスから得られたスプライス部位を含む、プロモーターから下流かつC F X T E N配列のための挿入部位から上流に配置された1セットのRNAスプライス部位も含み得る。また、発現ベクターに含まれているのは、挿入部位の下流に配置されたポリアデニル化シグナルである。特に好ましいポリアデニル化シグナルには、S V 4 0由来の初期または後期ポリアデニル化シグナル (K a u f m a n a n d S h a r p , 同誌)、アデノウイルス5 E l b領域由来のポリアデニル化シグナル、h G H終結因子 (D e N o t o e t a l . N u c l . A c i d s R e s . 9 : 3 7 1 9 - 3 7 3 0 , 1 9 8 1) を含む。発現ベクターには、プロモーターとRNAスプライス部位の間に配置されるアデノウイルス2型三連リーダー；およびS V 4 0エンハンサーなどのエンハンサー配列も含み得る。

【0257】

本発明のC F X T E Nを宿主細胞の分泌経路へと向かわせるために、分泌シグナル配列 (別名、リーダー配列、プレプロ配列、またはプレ配列) は、組換えベクターに含まれ得る。分泌シグナル配列は、C F X T E NをコードするDNA配列に作用可能に連結されており、C F X T E N融合タンパク質をコードするDNA配列に対して5'に通常配置される。分泌シグナル配列は、タンパク質と通常会合しているものであり得るかまたは、分泌された別のタンパク質をコードする遺伝子に由来し得る。非限定例には、大腸菌発現のためのO m p A、P h o A、およびD s b A、酵母発現のためのp p Lーアルファ、D E X 4、インベルターゼシグナルペプチド、酸ホスファターゼシグナルペプチド、C P Y、またはI N U 1、ならびに哺乳類発現のためのI L 2 L、S V 4 0、I g Gカップ、およびI g Gラムダが挙げられる。シグナル配列は典型的には、転置 (t r a n s l o c a t i o n) および分泌過程の間にタンパク質からタンパク質分解性に取り出され、規定されたN末端を生じる。方法は、A r n a u , e t a l . , P r o t e i n E x p r e s s i o n a n d P u r i f i c a t i o n 4 8 : 1 - 1 3 (2006) に開示されている。

【0258】

C F X T E N、プロモーター、ならびに任意に終結因子および／または分泌シグナル配列をそれぞれコードするDNA配列を連結して、それらを複製に必要な情報を含む好適なベクターへと挿入するのに用いられる手順は、当業者に周知である (例えば、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 8 9 参照)。

【0259】

他の場合、本発明は、コンストラクト、および、ヘルパードメインの存在なしでタンパク質のN末端におけるX T E N融合物の発現を可能にするための翻訳の開始を促進するために、X T E N担体コード配列のN末端において含まれることのできるX T E N特徴を有する少なくとも約20～約60のアミノ酸をコードする発現に最適化されたポリヌクレオチド (言い換えれば、20～60のコードされた最適化されたアミノ酸をコードするポリヌクレオチドは、C Fに対してN末端であるX T E N成分をコードするポリヌクレオチドに対してフレームにおいて連結される) を含むコンストラクトを作製する方法を提供する。前述の利点において、該配列は、その後の開裂を必要とせず、それによりX T E N含有組成物を製造する工程数を減少させる。実施例においてより詳細に説明されるように、最適化されたN末端配列は、構造化されていないタンパク質の属性を有するが、翻訳の開始および亢進した発現を促進する能力について選択されたアミノ酸をコードするヌクレオチ

ド塩基を含み得る。前述の一実施態様において、最適化されたポリヌクレオチドは、A E 9 1 2と比較して少なくとも約90%の配列同一性を有するX T E N配列をコードする。前述の一実施態様において、最適化されたポリヌクレオチドは、A E 9 2 3と比較して少なくとも約90%の配列同一性を有するX T E N配列をコードする。前述の別の実施態様において、最適化されたポリヌクレオチドは、A E 4 8と比較して少なくとも約90%の配列同一性を有するX T E N配列をコードする。前述の別の実施態様において、最適化されたポリヌクレオチドは、A M 4 8と比較して少なくとも約90%の配列同一性を有するX T E N配列をコードする。一実施態様において、最適化されたポリヌクレオチドN T Sは、

A E 4 8 : 5' - A T G G C T G A A C C T G C T G G C T C T C C A A C C T C
C A C T G A G G A A G G T A C C C C G G G T A G C G G T A C T G C T T C T T C C
T C T C C A G G T A G C T C T A C C C C T T C T G G T G C A A C C G G C T C T C
C A G G T G C T T C T C C G G G C A C C A G C T C T A C C G G T T C T C C A - 3'
(配列番号130)

10

および

A M 4 8 : 5' - A T G G C T G A A C C T G C T G G C T C T C C A A C C T C
C A C T G A G G A A G G T G C A T C C C C G G G C A C C A G C T C T A C C G G T
T C T C C A G G T A G C T C T A C C C C G T C T G G T G C T A C C G G C T C T C
C A G G T A G C T C T A C C C C G T C T G G T G C T A C T G G C T C T C C A - 3'
(配列番号131)

20

から選択される配列またはその相補体と比較して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を呈する配列を含む。

【0260】

この様式において、単量体C F X T E N融合タンパク質をコードするキメラDNA分子は、コンストラクト内に生じる。任意に、このキメラDNA分子は、より適切な発現ベクターである別のコンストラクトへと転移またはクローン化され得る。この点において、キメラDNA分子を発現することのできる宿主細胞は、キメラDNA分子を用いて形質転換

30

【0261】

本発明における使用のための哺乳類細胞株の例は、C O S - 1 (A T C C C R L 1 6 5 0)、C O S - 7 (A T C C C R L 1 6 5 1)、B H K - 2 1 (A T C C C C L 1 0)、およびB H K - 2 9 3 (A T C C C R L 1 5 7 3; G r a h a m e t a l., J. G e n. V i r o l. 3 6: 5 9 - 7 2, 1 9 7 7)、B H K - 5 7 0細胞(A T C C C R L 1 0 3 1 4)、C H O - K 1 (A T C C C C L 6 1)、C H O - S (I n v i t r o g e n 1 1 6 1 9 - 0 1 2)、および2 9 3 - F (I n v i t r o g e n R 7 9 0 - 7)である。t k⁻ t s 1 3 B H K細胞株も受入番号C R L 1 6 3 2の下でA T C Cから入手可能である。加えて、R a t H e p I細胞(ラット肝細胞癌; A T C C C R L 1 6 0 0)、R a t H e p I I細胞(ラット肝細胞癌; A T C C C R L 1 5 4 8)、T C M K細胞(A T C C C C L 1 3 9)、ヒト肺細胞(A T C C H B 8 0 6 5)、N C T C 1 4 6 9細胞(A T C C C C L 9. 1)、C H O細胞(A T C C C C L 6 1)、およびD U K X細胞(U r l a u b a n d C h a s i n, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 7 7: 4 2 1 6 - 4 2 2 0, 1 9 8 0)を含むいくつかの他の細胞株が本発明内で用いられ得る。

40

【0262】

好適な酵母細胞の例には、サッカロミケス属またはシゾサッカロミケス属の細胞、特に出芽酵母またはサッカロミケス・クルイベリの株が挙げられる。酵母細胞を異種性DNA

50

で形質転換し、そこから異種性ポリペプチドを産生するための方法は、例えば米国特許第4, 599, 311号、米国特許第4, 931, 373号、米国特許第4, 870, 008号、第5, 037, 743号、および米国特許第4, 845, 075号において説明されており、それらのすべては引用により本明細書により組み込まれている。形質転換された細胞は、選択可能なマーカー、普遍的に薬剤耐性、または特定の栄養物質、例えばロイシンの不在下で増殖する能力によって決定された表現型によって選択される。酵母における使用に好ましいベクターは、米国特許第4, 931, 373号において開示されたPOT1ベクターである。CFXTENをコードするDNA配列は、例えば先に説明されたように、シグナル配列および任意にリーダー配列によって先行され得る。好適な酵母細胞のさらなる例は、キラー酵母などのクルイベロミセス属、ハンゼヌラ属、例えばH. ポリモルファ、またはピキア属、例えば、P. パストリスの株である (Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, pp. 3459-3465; 米国特許第4, 882, 279号参照)。他の真菌細胞の例は、糸状真菌、例えば、コウジカビ属、アカパンカビ属、フザリウム属、またはトリコデルマ属、特に、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニデュランス、またはアスペルギルス・ニガーの株である。タンパク質の発現のためのコウジカビ属の使用は、例えば、欧州特許第272 277号、欧州特許第238 023号、欧州特許第184 438号において説明されている。フザリウム・オキシスポルムの形質転換は、例えばMalarrier et al., 1989, Gene 78: 147-156によって説明されるように実施され得る。トリコデルマ属の形質転換は、例えば欧州特許第24 4 234号に説明されるように実施され得る。

【0263】

本発明において使用することのできる他の好適な細胞には、大腸菌（例えば、DH5- α 株）、枯草菌、サルモネラ・ティフィムリウム、またはシュードモナス属、ストレプトミセス属、およびスタフィロコッカス属の株などの原核宿主細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好適な原核細胞の非限定例には、アクチノプラネス、アーキオグロブス、ブデオビブリオ、ボレリア、クロロフレクス、エンテロコッカス、エシェリキア、ラクトバチルス、リステリア、オセアノバチルス、パラコッカス、シュードモナス、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、ストレプトマイセス、サーモプラズマ、およびビブリオ由来のものが挙げられる。

【0264】

哺乳類細胞を形質移入し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法は、例えば、Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601-621; Southern and Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327-341; Loyter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 422-426; Wigler et al., Cell 14 (1978), 725; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603, Graham and van der Eb, Virology 52 (1973), 456; およびNeumann et al., EMBO J. 1 (1982), 841-845において説明されている。

【0265】

クローン化したDNA配列は、培養された哺乳類細胞に、例えば、リン酸カルシウム仲介性トランスフェクション (Wigler et al., Cell 14:725-732, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973)、FuGENEG (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) もしくはリポフェクタミン (Invitrogen) などの多くの市販の

試薬によるトランスフェクションによって、または電気穿孔法 (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982) によって導入される。外来性DNAを発現する細胞を同定および選択するために、選択可能な表現型を与える遺伝子 (選択可能なマーカー) は一般的に、関心対象の遺伝子またはcDNAとともに細胞へと導入される。好ましい選択可能なマーカーには、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシン、およびメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を与える遺伝子が含まれる。選択可能なマーカーは、増幅可能な選択可能なマーカーであり得る。好ましい増幅可能な選択可能なマーカーは、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) である。選択可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知であり、緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、ベクターガラクトシダーゼ (β -gal)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) などのリポーターを含む。選択可能なマーカーは、Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., 引用により本明細書に組み込まれる) によって概説されている。当業者は、好適な選択可能なマーカーを容易に選択することができる。任意の公知の選択可能なマーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現することができる限り採用され得る。

10

【0266】

選択可能なマーカーは、関心対象の遺伝子と同時に別個のプラスミドにおいて細胞へと導入され得るかまたは、同じプラスミドにおいて導入され得る。同じプラスミドにおける場合、選択可能なマーカーおよび関心対象の遺伝子は、異なるプロモーターまたは同じプロモーターの制御下にあり、後者の配置は、2シストロン性メッセージを生じる。この種類のコンストラクトは、当該技術分野で公知である (例えば、LevinsonおよびSimonsenの米国特許第4,713,339号)。「担体DNA」として公知の追加的なDNAを、細胞に導入される混合物に添加することも有利であり得る。

20

【0267】

細胞がDNAを取り込んだ後、該細胞は、適切な増殖培地において典型的には1~2日間増殖して、関心対象の遺伝子を発現し始める。本明細書で使用する場合、用語「適切な増殖培地」は、細胞の増殖および関心対象のCFXTE Nの発現に必要な栄養物質および他の成分を含む培地を意味する。培地には一般的に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖類、ビタミン類、塩類、リン脂質類、タンパク質、及び増殖因子が含まれる。ガンマーカルボキシル化したタンパク質の産生のために、培地は、ビタミンKを、好ましくは約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含む。次に、薬物選択を適用して、選択可能なマーカーを安定した様式で発現している細胞の増殖を選択する。増殖可能な選択可能なマーカーで形質移入した細胞について、薬物濃度は、増加したコピー数のクローン化した配列を選択するよう増大し得、それにより発現レベルを増大させる。安定して形質移入された細胞のクローンを次に、関心対象のCFポリペプチドバリエーションの発現についてスクリーニングする。

30

【0268】

次に、形質転換または形質移入した宿主細胞を、CFポリペプチドバリエーションの発現を可能にする条件下で好適な栄養物質培地において培養し、その後、結果として生じるペプチドが後に培養物から回収され得る。細胞を培養するのに用いられる培地は、適切なサプリメントを含む最小培地または複合培地など、宿主細胞を増殖するのに好適な任意の従来培地であり得る。好適な培地は、市販の供給元から入手可能であるかまたは、(例えば、米国培養細胞系統保存機関のカatalogにおいて) 公表されたレシピに従って調製され得る。温度、pH、およびそれらに類することなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞ですでに用いられたものであり、当業者に明らかである。

40

【0269】

遺伝子発現は、試料において直接的に、例えば従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量するノザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロット法

50

(DNA分析)、またはインサイツハイブリダイゼーションによって、適切に標識されたプローブを用いて、本明細書に提供される配列に基づいて測定され得る。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、およびDNA-RNA複合二本鎖またはDNA-タンパク質二本鎖抗体はを採用してもよい。該抗体は順に標識され得、該二本鎖が表面に結合するアッセイが実施され得、それにより、表面における二本鎖の形成の際に、二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

【0270】

あるいは、遺伝子発現を、細胞もしくは組織切片の免疫組織化学的染色、および細胞培養物もしくは体液のアッセイなどの免疫学的蛍光法、または選択可能なマーカーの検出によって測定して、遺伝子産物の発現を直接的に定量してもよい。試料液の免疫組織化学的染色および/またはアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得、および任意の哺乳類において調製され得る。簡便に、抗体は、天然配列CFポリペプチドに対して、または本明細書に提供されるDNA配列に基づいた合成ペプチドに対して、またはCFに融合しかつ特異的抗体エピトープをコードする外来性配列に対して調製され得る。選択可能なマーカーの例は、当業者に周知であり、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)、ベクターガラクトシダーゼ(β -gal)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)などのリポーターを含む。

【0271】

発現したCFXTENポリペプチド産物(複数可)当該技術分野で公知の方法を介して、または本明細書に開示された方法によって精製され得る。ゲル濾過、(例えば、抗CF抗体カラムを用いた)アフィニティ精製、塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト吸着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、およびゲル電気泳動などの手順を用いてよく、各々は、個々の宿主細胞によって産生される融合タンパク質を回収および生成するためにあつらえられる。追加的な精製は、高性能液体クロマトグラフィーなど、従来の化学的精製手段によって達成され得る。いくつかの発現したCFXTENは、単離および精製の間に再折りたたみを必要とし得る。精製方法は、Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor (ed.), Springer-Verlag 1994, およびSambrook, et al., 上述に説明されている。多工程精製分離は、Baron, et al., Crit. Rev. Biotechnol. 10:179-90 (1990) およびBelow, et al., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994)においても説明されている。治療目的のために、本発明のCFXTEN融合タンパク質が実質的に純粋であることが好ましい。したがって、本発明の好ましい実施態様において、本発明のCFXTENは、少なくとも約90~95%の均質性まで、好ましくは少なくとも約98%の均質性まで精製される。純度は、例えばゲル電気泳動法、HPLC、およびアミノ末端アミノ酸配列決定によって評価され得る。

【0272】

(VII) . 医薬組成物)

本発明は、CFXTENを含む医薬組成物を提供する。一実施態様において、医薬組成物は、CFXTEN融合タンパク質と少なくとも1つの医薬として許容し得る担体とを含む。本発明のCFXTENポリペプチドは、医薬として有用な組成物を調製するために、公知の方法に従って製剤化されることができ、それにより該ポリペプチドが、水性の溶液もしくは緩衝液、医薬として許容し得る懸濁液、およびエマルジョンなど、医薬として許容し得る担体ビヒクルとの混合において組み合わされる。非水性溶媒の例には、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコール、および植物油が挙げられる。治療用製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)において説明されるように、凍結乾燥した製剤もしくは水溶液の形態において、所望の程度の純度を有する活

性成分を、任意の生理学的に許容し得る担体、賦形剤、もしくは安定剤と混合することによって、貯蔵のために調製される。

【0273】

医薬組成物は、経口的に、鼻内に、非経口的に、または吸入療法によって投与することができ、錠剤、ロゼンジ錠、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、アンプル剤、坐剤の形態、またはエアゾールの形態を取り得る。該医薬組成物はまた、水性または非水性の希釈剤、シロップ剤、顆粒剤、または散剤における活性成分の懸濁液、溶液、およびエマルションの形態も取り得る。加えて、医薬組成物は、他の医薬として活性のある化合物または本発明の複数の化合物も含むことができる。

【0274】

より特定には、本医薬組成物は、経口、直腸、鼻内、（経皮的、エアゾール、頬側、および舌下を含む）局的、腔内、（皮下、注入ポンプによる皮下、筋肉内、静脈内、および皮内を含む）非経口、硝子体内、および肺内を含む任意の好適な経路によって、療法のために投与され得る。好ましい経路が、受け手の条件および年齢、ならびに治療途中の疾患とともに変動することも認識される。

【0275】

一実施態様において、医薬組成物は、皮下的に投与される。この実施態様において、組成物は、投与前に再構成されるべき凍結乾燥した粉末として供給され得る。組成物は、患者に直接的に投与することのできる液体形態でも供給され得る。一実施態様において、組成物は、患者が組成物を容易に自己投与することができるよう、あらかじめ充填した注射器における液体として供給される。

【0276】

本発明において有用な延長放出製剤は、マトリックスと被覆組成物とを含む経口製剤であり得る。好適なマトリックス材料には、蠟（例えば、カマウバ（camauba）、蜜蠟、パラフィン蠟、セレシン、セラック蠟、脂肪酸、および脂肪アルコール）、油、硬化油脂（硬化菜種油、ひまし油、牛脂、ヤシ油、および大豆油）、およびポリマー（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびポリエチレングリコール）が含まれ得る。他の好適なマトリックス錠剤形成材料は、微結晶セルロース、粉状セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロース、であり、他の担体および充填剤を伴う。錠剤は、顆粒、被覆した粉末、またはペレットも含んでもよい。また、錠剤は、多層であってもよい。多層錠剤は、活性成分が、顕著に異なる薬物動態特性を有する場合に特に好ましい。任意に、仕上げられた錠剤は、被覆されまたは非被覆であってもよい。

【0277】

被膜組成物は、不溶性マトリックスポリマーおよび／または水溶性材料を含んでもよい。水溶性材料は、ポリエチレングリコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、または糖類などの単量体材料（例えば、ラクトース、スクロース、フルクトース、マンニトール、およびこれらに類するもの）、塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、およびこれらに類するもの）、有機酸（例えば、フマル酸、コハク酸、硫酸、および酒石酸）、およびこれらの混合物などのポリマーであり得る。任意に、腸溶性ポリマーは、被膜組成物へと組み込まれてもよい。好適な腸溶性ポリマーには、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アセタートスクシナート、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、フタラート、ポリビニルアセタートフタラート、セルロースアセタートフタラート、セルロースアセタートトリメリタート、セラック、ゼイン、およびカルボキシル基を含むポリメタクリレートが挙げられる。被膜組成物は、例えばジエチルフタラート、クエン酸エステル、ポリエチレングリコール、グリセロール、アセチル化グリセリド、アセチル化クエン酸エステル、ジブチルセバサート、およびひまし油などの好適な可塑剤を添加することによって可塑化され得る。被膜組成物には、二酸化シリコン、二酸化チタン、滑石、カオリン、アルミナ、デンプン、粉状セルロース、MCC、またはポラクリリン（polacrilin）カリウ

10

20

30

40

50

ムなどの不溶性材料であり得る充填剤も含み得る。被膜組成物は、有機溶媒または水性溶媒またはこれらの混合物における溶液またはラテックスとして適用され得る。水、低級アルコール、低級塩素化炭化水素、ケトン、またはこれらの混合物などの溶媒を用いてもよい。

【0278】

本発明の組成物は、種々の賦形剤を用いて製剤化され得る。好適な賦形剤には、微結晶セルロース（例えば、Avicel PH102、Avicel PH101）、ポリメタクリラート、ポリ（エチルアクリラート、メチルメタクリラート、トリメチルアンモニオエチルメタクリラートクロリド）（Eudragit RS-30Dなど）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（Methocel K100M、Premium CR Methocel K100M、Methocel E5、Opadry（登録商標））、ステアリン酸マグネシウム、滑石、クエン酸トリエチル、水性エチルセルロース分散液（Surelease（登録商標））、および硫酸プロタミンが挙げられる。遅延放出剤は、例えば、溶剤、分散媒体被膜、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤、および吸収遅延剤も含み得る。医薬として許容し得る塩は、これらの遅延放出剤において使用することもでき、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、または硫酸塩などの鉱物塩、および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、または安息香酸塩などの有機酸の塩である。組成物は、水、塩類溶液、グリセロール、およびエタノールなどの液体、ならびに湿潤剤、乳化剤、またはpH緩衝剤などの物質も含み得る。リポソームも担体として用いてもよい。

【0279】

別の実施態様において、本発明の組成物は、長時間にわたって制御された様式で有益な活性薬を送達する上での有用性を示したリポソームに封入されている。リポソームは、捕捉された水性容量を含む閉じた二重層膜である。リポソームは、単一膜の二重層を有する単ラメラ小胞であるかまたは、各々、水性層によって隣部から分離されている複数膜の二重層を有する多ラメラ小胞でもあり得る。結果として生じる膜の二重層構造は、脂質の疎水性（非極性）尾部が、二重層の中心へと向けられているのに対し、親水性（極性）頭部は、水性相へと向いているようになっている。一実施態様において、リポソームは、単核の食細胞系の臓器、主として肝臓および脾臓による取り込みを回避する柔軟な水溶性ポリマーで被覆されてもよい。リポソームを取り囲むのに好適な親水性ポリマーには、PEG、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタクリラート、ポリヒドロキシエチルアクリラート、ヒドロキシメチルセルロースヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリアスパルタミド（polyaspartamide）、およびそれらのすべての内容が全体として引用により組み込まれている米国特許第6,316,024号、第6,126,966号、第6,056,973号、第6,043,094号において説明されるような親水性ペプチド配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【0280】

リポソームは、当該技術分野で公知の任意の脂質または脂質の組み合わせから構成されてもよい。例えば、小胞形成脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ならびに第6,056,973号および第5,874,104号において説明されるようなスフィンゴミエリンなどのリン脂質を含む天然脂質または合成脂質であり得る。小胞形成脂質は、1,2-ジオレイルオキシ-3-（トリメチルアミノ）プロパン（DOTAP）；N-[1-（2,3-ジテトラデシルオキシ）プロピル]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（DMRIE）；N-[1-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（DORIE）；N-[1-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）；3- [

10

20

30

40

50

N- (N', N'-ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DC - Cholesterol) ; または米国特許第 6, 056, 973 号においても開示されているようなジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDAB) などの糖脂質、セレブロシド、または陽イオン性脂質でもあり得る。コレステロールはまた、米国特許第 5, 916, 588 号および第 5, 874, 104 号において開示されるような小胞に安定性を与えるよう適切な範囲に存在し得る。

【0281】

追加的なリポソーム技術は、その内容が引用により本明細書に組み込まれている米国特許第 6, 759, 057 号、第 6, 406, 713 号、第 6, 352, 716 号、第 6, 316, 024 号、第 6, 294, 191 号、第 6, 126, 966 号、第 6, 056, 973 号、第 6, 043, 094 号、第 5, 965, 156 号、第 5, 916, 588 号、第 5, 874, 104 号、第 5, 215, 680 号、および第 4, 684, 479 号において説明される。これらは、リポソームおよび脂質被覆微細気泡、ならびにそれらの製造方法を説明する。したがって、本発明の開示およびこれらの他の特許の開示の両方を考慮する当業者は、本発明のポリペプチドの延長した放出のためのリポソームを製造し得る。

10

【0282】

脂質製剤について、所望の特性は、該製剤が静脈内投与、筋肉内投与、関節内投与、または皮下投与のために、25、28、30、31、32 ゲージ針を通過できる形態で供給されるべきであることである。

20

【0283】

経皮製剤を介した投与は、例えば、それらのすべての内容が全体として引用により本明細書に組み込まれている米国特許第 5, 186, 938 号および第 6, 183, 770 号、第 4, 861, 800 号、第 6, 743, 211 号、第 6, 945, 952 号、第 4, 284, 444 号、ならびに WO 89/09051 において説明されるものを含む、当該技術分野で公知でもある方法を用いて実施することができる。経皮パッチは、吸収の問題を有するポリペプチドを用いた特に有用な実施態様である。パッチは、12 時間、24 時間、3 日間、および 7 日間の期間にわたって、皮膚浸透性活性成分の放出を制御するように作ることができる。一例において、2 倍の日用過剰量の本発明のポリペプチドは、不揮発性流体中に配置される。本発明の組成物は、粘着性の不揮発性液体の形態で提供される。具体的な製剤の皮膚を通じての浸透は、当該技術分野における標準的な方法による測定基準であり得る (例えば、Franz et al., J. Invest. Derm. 64: 194-195 (1975))。好適なパッチの例は、受動的転移皮膚パッチ、イオン泳動皮膚パッチ、または Nicoderm などのマイクロニードルを有するパッチである。

30

【0284】

他の実施態様において、組成物は、鼻内、頬側、または舌下の経路を介して脳へと送達され、嗅覚通路を通じた中枢神経系への活性成分の転移を可能にし、全身性投与を低下させ得る。この投与経路のために通常用いられるデバイスは、米国特許第 6, 715, 485 号に含まれる。この経路を介して送達される組成物は、一定の薬物と関連した全身性毒性の危険を低下させる増大した中枢神経系投薬または減少した総身体負担を可能にし得る。皮下的に植え込み式のデバイスにおける送達のための医薬組成物の調製は、例えば、米国特許第 3, 992, 518 号、第 5, 660, 848 号、および第 5, 756, 115 号において説明されるものなど、当該技術分野において公知の方法を用いて実施することができる。

40

【0285】

浸透ポンプは、錠剤、丸剤、カプセル剤、または植え込み式のデバイスの形態における遅延放出薬として用いられ得る。浸透ポンプは、当該技術分野において周知であり、延長した放出薬物送達のための浸透ポンプを提供する上で経験のある企業から、当業者にとって容易に入手可能である。例は、ALZA の DUROS (商標)、ALZA の OROS (

50

商標)、Osmotica PharmaceuticalのOsmodex (商標) システム、Shire LaboratoriesのEnSoTrol (商標) システム、およびAlzet (商標) である。浸透ポンプ技術を説明する特許は、米国特許第6, 890, 918号、第6, 838, 093号、第6, 814, 979号、第6, 713, 086号、第6, 534, 090号、第6, 514, 532号、第6, 361, 796号、第6, 352, 721号、第6, 294, 201号、第6, 284, 276号、第6, 110, 498号、第5, 573, 776号、第4, 200, 0984号、および第4, 088, 864号であり、それらの内容は引用により本明細書に組み込まれる。本発明の開示およびこれらの他の特許の開示の両方を考慮する当業者は、本発明のポリペプチドの延長した放出のための浸透ポンプを製造し得る。

10

【0286】

注射器ポンプも遅延放出薬として用いられ得る。このようなデバイスは、米国特許第4, 976, 696号、第4, 933, 185号、第5, 017, 378号、第6, 309, 370号、第6, 254, 573号、第4, 435, 173号、第4, 398, 908号、第6, 572, 585号、第5, 298, 022号、第5, 176, 502号、第5, 492, 534号、第5, 318, 540号、および第4, 988, 337号において説明されており、それらの内容は引用により本明細書に組み込まれる。本発明の開示およびこれらの他の特許の開示の両方を考慮する当業者は、本発明の組成物の延長した放出のための注射器ポンプを製造し得る。

【0287】

20

(IX). 医薬キット)

別の態様において、本発明は、CFXTENポリペプチドの使用を容易にするためのキットを提供する。該キットは、本明細書に提供される医薬組成物、該医薬組成物を同定するラベル、ならびに貯蔵、再構成、および／または該医薬組成物の対象への投与についての説明書を含む。いくつかの実施態様において、該キットは好ましくは、注射のためにまたは滅菌水、緩衝液、もしくはデキストロースによる再構成のために用意ができている製剤において互いに、(a) 疾患、容態、または障害を治療するのに十分な量のCFXTEN融合タンパク質組成物を必要とする対象への投与の際の該CFXTEN融合タンパク質組成物、および(b) ある量の医薬として許容し得る担体を、CFXTEN薬物ならびに貯蔵条件および取り扱い条件を同定するラベル、ならびに薬物について認可された適応症に関するシート、認可された適応症の予防および／または治療のための使用のためのCFXTEN薬物の再構成および／または投与、適切な薬用量および安全情報、ならびに薬物のロットおよび有効期限を同定する情報についての説明書とともに含む。前述の別の実施態様において、該キットは、CFXTEN組成物に好適な希釈剤を保持することのできる第二の容器を含み、該容器の使用は、ユーザーに、対象に送達されるべき適切な濃度のCFXTENを提供する。

30

【実施例】

【0288】

(実施例)

(実施例1: XTEN_{AD36}モチーフセグメントの構築)

40

以下の実施例は、36のアミノ酸のモチーフ配列をコードするコドンの最適化された遺伝子の収集物の集まりを説明する。第一の工程として、スタッパーベクターpCW0359をpETベクターに基づいて構築し、それは、T7プロモーターを含む。pCW0359は、セルロース結合ドメイン(CBD)およびTEVプロテアーゼ認識部位の後の、Bsai部位、BbsI部位、およびKpnI部位によって隣接されるスタッパー配列をコードする。Bsai部位およびBbsI部位が消化後に適合性のあるオーバーハングを生じるよう、該部位を挿入した。スタッパー配列に、GFP遺伝子の切りつめられたバージョンおよびHisタグが続く。スタッパー配列は終止コドンを含み、したがってスタッパープラスミドpCW0359を保持する大腸菌細胞は、非蛍光性コロニーを形成する。スタッパーベクターpCW0359をBsaiおよびKpnIで消化して、ス

50

タッファーセグメントを取り出し、結果として生じるベクター断片をアガロースゲル精製によって単離した。配列は、X T E N _ A D 3 6 と命名され、モチーフの A D ファミリーを反映した。そのセグメントは、アミノ酸配列 $[X]_3$ を有し、式中 X は、配列 G E S P G G S S G S E S (配列番号 3 1)、G S E G S S G P G E S S (配列番号 3 2)、G S S E S G S S E G G P (配列番号 3 3)、または G S G G E P S E S G S S (配列番号 3 4) を有する 1 2 マーペプチドである。インサートを、以下の対のリン酸化型合成オリゴヌクレオチド対をアニーリングすることによって得た：

A D 1 f o r : A G G T G A A T C T C C D G G T G G Y T C Y A G C G G T T C Y G A R T C (配列番号 1 3 2)

A D 1 r e v : A C C T G A Y T C R G A A C C G C T R G A R C C A C C H G G A G A T T C (配列番号 1 3 3)

A D 2 f o r : A G G T A G C G A A G G T T C T T C Y G G T C C D G G Y G A R T C Y T C (配列番号 1 3 4)

A D 2 r e v : A C C T G A R G A Y T C R C C H G G A C C R G A A G A A C C T T C G C T (配列番号 1 3 5)

A D 3 f o r : A G G T T C Y T C Y G A A A G C G G T T C T T C Y G A R G G Y G G T C C (配列番号 1 3 6)

A D 3 r e v : A C C T G G A C C R C C Y T C R G A A G A A C C G C T T T C R G A R G A (配列番号 1 3 7)

A D 4 f o r : A G G T T C Y G G T G G Y G A A C C D T C Y G A R T C T G G T A G C T C (配列番号 1 3 8)

本発明者らは、リン酸化型オリゴヌクレオチド 3 K p n I ストッパー f o r : A G G T T C G T C T T T C A C T C G A G G G T A C (配列番号 1 3 9)、および非リン酸化型オリゴヌクレオチド p r _ 3 K p n I ストッパー r e v : C C T C G A G T G A A G A C G A (配列番号 1 4 0) もアニーリングした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド対を連結し、結果的に、1つの B b s I / K p n I セグメントに連結した変動する数の 1 2 マー反復を表す変動する長さの産物の混合物を生じた。36 アミノ酸の長さに相応する産物を混合物から、調製用アガロースゲル電気泳動法によって単離し、B s a I / K p n I で消化したスタッファーベクター p C W 0 3 5 9 へと連結した。結果として生じる L C W 0 4 0 1 と命名されたライブラリーにおけるクローンのほとんどは、誘導後に緑色蛍光を示し、このことは、X T E N _ A D 3 6 の配列が、G F P 遺伝子とフレーム内で t 連結し、かつ X T E N _ A D 3 6 のほとんどの配列が良好な発現レベルを有していたことを示す。

【0289】

本発明者らは、I P T G を含むアガープレートにライブラリー L C W 0 4 0 1 由来の 96 の単離物を刻印することによって、高レベルの蛍光について該単離物をスクリーニングした。同じ単離物を P C R によって評価し、36 のアミノ酸と強い蛍光とを有するセグメントを含む 48 の単離物を同定した。これらのセグメントについてのヌクレオチドおよびアミノ酸のコンストラクトのファイル名を表 9 に列挙する。

【0290】

【表 9 - 1】

表 9 : 36 マーモチーフについての DNA 配列およびアミノ酸配列

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
LCW0401_001_ GFP-N_A01.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPGG SSGESGESPPGGSSGES	141	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAGTC TGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTG GCTCTAGCGGTTCCGAGTCAGGTGAA TCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGA GTCA	142
LCW0401_002_ GFP-N_B01.ab1	GSEGSSGPGESSGESPPGG SSGESGSSESSESSEGGP	143	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTTG CGAGTCTTCAGGTGAATCTCCTGGTG GTTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTTCC TCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCG GTCCA	144
LCW0401_003_ GFP-N_C01.ab1	GSSEGSSEGGPGSSESG SSEGGPGESPGGSSGES	145	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGA AGGTGGTCCAGGTTCTCTGAAAGCG GTTCTTCTGAGGGTGGTCCAGGTGAA TCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCCGA GTCA	146
LCW0401_004_ GFP-N_D01.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	147	GGTCCCGGTGGCGAACCGTCTGAATC TGGTAGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCG GTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTTCT GGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAG CTCA	148
LCW0401_007_ GFP-N_F01.ab1	GSSEGSSEGGPGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	149	GGTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGA GGGTGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTT CCGGTCCAGGTGAGTCTTACAGGTAGC GAAGGTTCTTCTGGTCTGGTGAATC TTCA	150
LCW0401_008_ GFP-N_G01.ab1	GSSEGSSEGGPGESP SSGESGSEGSSGPGESS	151	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGA GGGTGGTCCAGGTGAATCTCCAGGT GGTTCAGCGGTTCTGAGTCAGGTAG CGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGTGAAT CCTCA	152
LCW0401_012_ GFP-N_H01.ab1	GSGGEPSESGSSSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	153	GGTCTGGTGGTGAACCGTCTGAGTC TGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGCGAAC CATCCGAATCTGGTAGCTCAGGTAGC GAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTC TTCA	154
LCW0401_015_ GFP-N_A02.ab1	GSSEGSSEGGPGSEGSS GPGESSGESPPGGSSGES	155	GGTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGA AGGCGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCT TCTGGTCCAGGCGAATCTTACAGGTGA ATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTG AGTCA	156
LCW0401_016_ GFP-N_B02.ab1	GSSEGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESSESSEGGP	157	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGA GGGCGGTCCAGGTTCTTCCGAAAGC GGTCTTCCGAGGGCGGTCCAGGTTCT TCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCG GTCCA	158
LCW0401_020_ GFP-N_E02.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSSESSESSEGGP	159	GGTCCCGGTGGCGAACCGTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CTGGTCCAGGCGAATCTTACAGGTCC TCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGG TCCA	160
LCW0401_022_ GFP-N_F02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	161	GGTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTTCTTCCGAAAGCG GTTCTTCTGAAGGTGGTCCAGGTTCC GGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAG CTCA	162
LCW0401_024_ GFP-N_G02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGESPGGSSGES	163	GGTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTTCTTCCGAAAGCG	164

10

20

30

40

【表 9 - 2】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
			GTTCTTCTGAAGGTGGTCCAGGTGAA TCTCCAGGTGGTTCTAGCGGTTCTGA ATCA	
LCW0401_026_ GFP-N_H02.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPG SSGSESGSEGSSGPGEES	165	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCTGAGTC TGGTAGCTCAGGTGAATCTCCTGGTG GCTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTAGC GAAGGTTCTTCTGGTCTGGTGAATC TTCA	166
LCW0401_027_ GFP-N_A03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPG SSGSESGSGGEPSESGSS	167	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTG GTTCTAGCGGTTCTGAGTCAGGTTCT GGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAG CTCA	168
LCW0401_028_ GFP-N_B03.ab1	GSSESGSSEGGPGSSSEG SSEGGPGSSSESSESSEGGP	169	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGA GGGCGGTCCAGGTTCCTCCGAAAGC GGTTCCTCCGAGGGCGGTCAGGTTCT TTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCG GTCCA	170
LCW0401_030_ GFP-N_C03.ab1	GESPPGSSGSESGSEGSS GPGEESGSEGSSGPGEES	171	GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCG GTTCTGAGTCAGGTAGCGAAGGTTCT TCCGGTCCGGGTGAGTCTCAGGTAG CGAAGGTTCTTCCGGTCTGGTGAGT CTTCA	172
LCW0401_031_ GFP-N_D03.ab1	GSGGEPSESGSSSGGEP SESGSSGSSESSESSEGGP	173	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGTGAAC CTTCTGAATCTGGTAGCTCAGGTTCT TCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGG TCCA	174
LCW0401_033_ GFP-N_E03.ab1	GSGGEPSESGSSSGGEP SESGSSSGGEPSESGSS	175	GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATC TGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGCGAAC CATCCGAGTCTGGTAGCTCAGGTTCC GGTGGTGAACCATCCGAGTCTGGTA GCTCA	176
LCW0401_037_ GFP-N_F03.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSEGSSGPGEES	177	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATC TGGTAGCTCAGGTTCCGAAAGCG GTTCTTCTGAGGGCGGTCCAGGTAGC GAAGGTTCTTCTGGTCCGGGCGAGTC TTCA	178
LCW0401_038_ GFP-N_G03.ab1	GSGGEPSESGSSSEGSS GPGEESGSGGEPSESGSS	179	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAGTC TGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CTGGTCCGGGTGAGTCTCAGGTTCT GGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTA GCTCA	180
LCW0401_039_ GFP-N_H03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPG SSGSESGSGGEPSESGSS	181	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTGAATCTCCTGGTG GTTCCAGCGGTTCCGAGTCAGGTTCT GGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAG CTCA	182
LCW0401_040_ GFP-N_A04.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSSESSESSEGGP	183	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGA GGGCGGTCCAGGTTCCGGTGGTGAAC CATCTGAATCTGGTAGCTCAGGTTCT TTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTG GTCCA	184
LCW0401_042_ GFP-N_C04.ab1	GSEGSSGPGEESGESPPG SSGSESGSEGSSGPGEES	185	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCTGG TGAGTCTCAGGTGAATCTCCAGGTG GCTCTAGCGGTTCCGAGTCAGGTAGC GAAGGTTCTTCTGGTCTGGCGAGTC CTCA	186

10

20

30

40

【表 9 - 3】

ファイル名	アミノ酸配列	配列 番号	ヌクレオチド配列	配列 番号
LCW0401_046_ GFP-N_D04.ab1	GSSSEGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSEGSSEGGP	187	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGA AGGCGGTCCAGGTCTTCCGAAAGC GGTTCCTCTGAGGGCGGTCCAGGTTT CTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTG GTCCA	188
LCW0401_047_ GFP-N_E04.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPG SSGESGESPPGSSGSES	189	GGTTCCTGGTGGCGAACCTTCCGAGTC TGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTG GTTCTAGCGGTTCCGAGTCAGGTGAA TCTCCGGGTGGTTCAGCGGTTCTGA GTCA	190
LCW0401_051_ GFP-N_F04.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPPGSSGSES	191	GGTTCCTGGTGGCGAACCATCTGAGTC TGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CCGGTCCAGGCGAGTCTTCAGGTGA ATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTG AGTCA	192
LCW0401_053_ GFP-N_H04.ab1	GSPGGSSGESGESPPG SSGESGESPPGSSGSES	193	GGTGAATCTCCTGGTGGTTCAGCGG TTCCGAGTCAGGTGAATCTCCAGGTG GCTCTAGCGGTTCCGAGTCAGGTGAA TCTCCTGGTGGTCTAGCGGTTCTGA ATCA	194
LCW0401_054_ GFP-N_A05.ab1	GSEGSSGPGESESGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	195	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGG TGAATCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CTGGTCCTGGTGAATCCTCAGGTTCC GGTGGCGAACCATCTGAATCTGGTA GCTCA	196
LCW0401_059_ GFP-N_D05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPPGSSGSES	197	GGTTCCTGGTGGCGAACCATCCGAATC TGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CTGGTCCTGGCGAATCTTCAGGTGAA TCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGA ATCA	198
LCW0401_060_ GFP-N_E05.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	199	GGTTCCTGGTGGTGAACCGTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTTCTCTGAAAGCG GTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTTCC GGTGGTGAACCTTCTGAGTCTGGTAG CTCA	200
LCW0401_061_ GFP-N_F05.ab1	GSSSEGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	201	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGA GGGCGGTCCAGGTTCTGGTGGCGAA CCATCTGAATCTGGTAGCTCAGGTAG CGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGTGAAT CTTCA	202
LCW0401_063_ GFP-N_H05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	203	GGTTCCTGGTGGTGAACCGTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CTGGTCCTGGCGAGTCTTCAGGTAGC GAAGGTTCTTCTGGTCTCTGGTGAATC TTCA	204
LCW0401_066_ GFP-N_B06.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	205	GGTTCCTGGTGGCGAACCATCCGAGTC TGGTAGCTCAGGTTCTTCCGAAAGCG GTTCTTCCGAAAGGCGGTCCAGGTTCT GGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTA GCTCA	206
LCW0401_067_ GFP-N_C06.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPG SSGESGESPPGSSGSES	207	GGTTCCTGGTGGCGAACCTTCCGAATC TGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTG GTTCTAGCGGTTCCGAATCAGGTGAA TCTCCAGGTGGTCTAGCGGTTCCGA ATCA	208
LCW0401_069_ GFP-N_D06.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGESPPGSSGSES	209	GGTTCCTGGTGGTGAACCATCTGAGTC TGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGCGAAC CGTCCGAGTCTGGTAGCTCAGGTGAA	210

10

20

30

40

【表 9 - 4】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
			TCTCCGGGTGGTTCAGCGGTCCGAATCA	
LCW0401_070_GFP-N_E06.ab1	GSEGSSGPGESSGSSESG SSEGPGSEGSSGPGESS	211	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGG CGAATCCTCAGGTTCTCCGAAAGCG GTTCTTCCGAAGGTGGTCCAGGTAGC GAAGGTTCTTCCGGTCTCTGGTGAATC TTCA	212
LCW0401_078_GFP-N_F06.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGESGESPGGSSGSES	213	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGA AGGCGGTCCAGGTGAATCTCCGGGT GGCTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTGA ATCTCTGGTGGCTCCAGCGGTTCCG AGTCA	214
LCW0401_079_GFP-N_G06.ab1	GSEGSSGPGESSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	215	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGG CGAGTCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTT CCGGTCTTGGCGAGTCTTCAGGTTCC GGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTA GCTCA	216

10

(実施例 2 : X T E N _ A E 3 6 セグメントの構築)

36 のアミノ酸長の X T E N 配列をコードするコドンライブラリーを構築した。X T E N ヒア列を X T E N _ A E 3 6 と命名した。そのセグメントは、アミノ酸配列 [X]₃ を有し、式中、X は、配列 G S P A G S P T S T E E (配列番号 35)、G S E P A T S G S E T P (配列番号 36)、G T S E S A T P E S G P (配列番号 37)、または G T S T E P S E G S A P (配列番号 38) を有する 12 マーのペプチドである。インサートを、以下に対するリン酸化型合成オリゴヌクレオチド対をアニーリングすることによって得た：

20

A E 1 f o r : A G G T A G C C C D G C W G G Y T C T C C D A C Y T C Y A C Y G A R G A (配列番号 217)

A E 1 r e v : A C C T T C Y T C R G T R G A R G T H G G A G A R C C W G C H G G G C T (配列番号 218)

A E 2 f o r : A G G T A G C G A A C C K G C W A C Y T C Y G G Y T C T G A R A C Y C C (配列番号 219)

30

A E 2 r e v : A C C T G G R G T Y T C A G A R C C R G A R G T W G C M G G T T C G C T (配列番号 220)

A E 3 f o r : A G G T A C Y T C T G A A A G C G C W A C Y C C K G A R T C Y G G Y C C (配列番号 221)

A E 3 r e v : A C C T G G R C C R G A Y T C M G G R G T W G C G C T T T C A G A R G T (配列番号 222)

A E 4 f o r : A G G T A C Y T C T A C Y G A A C C K T C Y G A R G G Y A G C G C W C C (配列番号 223)

A E 4 r e v : A C C T G G W G C G C T R C C Y T C R G A M G G T T C R G T A G A R G T (配列番号 224)

40

本発明者らは、リン酸化型オリゴヌクレオチド 3 K p n I ストッパー f o r : A G G T T C G T C T T C A C T C G A G G G T A C (配列番号 139) およびヒリン酸化型オリゴヌクレオチド p r _ 3 K p n I ストッパー r e v : C C T C G A G T G A A G A C G A (配列番号 140) もアニーリングした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド対を連結し、結果的に、1つの B b s I / K p n I セグメントに連結された 12 マーの変動する数の反復を表す変動する長さの産物の混合物を生じた。36 アミノ酸の長さに相応する産物を調製用アガロースゲル電気泳動法によって混合物から単離し、B s a I / K p n I で消化したスタッファーベクター p C W 0 3 5 9 へと連結した。L C W 0 4 0 2 と命名された、結果として生じるライブラリーにおけるクロンのほとんどは、誘導後に緑色蛍光

50

を示し、このことは、X T E N _ A E 3 6 が G F P 遺伝子とフレームにおいて連結され、X T E N _ A E 3 6 のほとんどの配列が良好な発現を示すことを示す。

【 0 2 9 3 】

本発明者らは、ライブラリー L C W 0 4 0 2 由来の 9 6 の単離物を、I P T G を含むアガープレートに刻印することによって、高レベルの蛍光について該単離物をスクリーニングした。同じ単離物を P C R によって評価し、3 6 のアミノ酸と強い蛍光とを有するセグメントを含む 4 8 の単離物を同定した。これらの単離物を配列決定し、正確な X T E N _ A E 3 6 セグメントを含む 3 7 のクローンを同定した。これらのセグメントについてのヌクレオチドおよびアミノ酸コンストラクトのファイル名を表 1 0 に列挙する。

【 0 2 9 4 】

【表 10-1】

表 10 : 36 マーモチーフについての DNA 配列およびアミノ酸配列

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
LCW0402_002_GFP-N_A07.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	225	GGTAGCCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACC GAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA	226
LCW0402_003_GFP-N_B07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	227	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCG AACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA	228
LCW0402_004_GFP-N_C07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	229	GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTA GCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAAC TCCTGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAA GCGCAACCCCGGAGTCTGGCCCA	230
LCW0402_005_GFP-N_D07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	231	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTA GCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAA AGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA	231
LCW0402_006_GFP-N_E07.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEE	233	GGTAGCGAACCCGGCAACCTCCGGCTCTG AAACCCCAAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCCCGGCA GGTCTCCGACTTCCACTGAGGAA	234
LCW0402_008_GFP-N_F07.ab1	GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSE GSAP	235	GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAAT CCGGTCCAGGTAGCGAACCCGGCTACTTC TGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA	236
LCW0402_009_GFP-N_G07.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSEPATSG SETP	237	GGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCA CTGAGGAAGGTAGCCCCGGCTGGCTCTCC AACCTCCACTGAAGAAGGTAGCGAACCG GCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCA	238
LCW0402_011_GFP-N_A08.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	239	GGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTAC TGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACT CCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGA ACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCA	240
LCW0402_012_GFP-N_B08.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAP	241	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTAC TGAGGAAGGTAGCCCCGGCTGGTTCTCCG ACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA	242
LCW0402_013_GFP-N_C08.ab1	GTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	243	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGT CCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCT CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACT GAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA	244
LCW0402_014_GFP-N_D08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAP	245	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTA GCGCTCCAGGTAGCCCCGGCAGGTTCTCC TACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCTGAGGGTAGCGCACCA	246
LCW0402_015_GFP-N_E08.ab1	GSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATP ESGP	247	GGTAGCGAACCCGGCTACTTCCGGCTCTG AGACTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCC GACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAA AGCGCTACCCCTGAGTCTGGCCCA	248

10

20

30

40

【表 10-2】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
LCW0402_016_ GFP-N_F08.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	249	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCA GCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCTGAGTCCGGCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCA	250
LCW0402_020_ GFP-N_G08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPT STEE	251	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCA GCGCACCAGGTAGCGAACCGGCTACTTC CGGTTCTGAAACCCAGGTAGCCAGCA GGTTCTCCAATTCTACTGAAGAA	252
LCW0402_023_ GFP-N_A09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSG SETP	253	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCAC CGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCTGAATCCGGCCAGGTAGCGAACCGG CAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA	254
LCW0402_024_ GFP-N_B09.ab1	GTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPT STEE	255	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC CGGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCG ACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCAATTCTACTGAAGAA	256
LCW0402_025_ GFP-N_C09.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	257	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCA GCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA	258
LCW0402_026_ GFP-N_D09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSG SETP	259	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCA CCGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTTC TGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCG GCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA	260
LCW0402_027_ GFP-N_E09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	261	GGTAGCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCA CTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCC GAAGGCAGCGCACCGGTACTTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA	262
LCW0402_032_ GFP-N_H09.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEE	263	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTG AAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAAC TCCGGAGTCTGGTCCAGGTAGCCCTGCA GGTTCTCTACCTCCACTGAGGAA	264
LCW0402_034_ GFP-N_A10.ab1	GTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	265	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGT CTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCT GAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA	266
LCW0402_036_ GFP-N_C10.ab1	GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	267	GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCAC CGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTTCT GAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA	268
LCW0402_039_ GFP-N_E10.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAP	269	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCT GAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCA	270
LCW0402_040_ GFP-N_F10.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAP	271	GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTG AAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCTGAATCTGGCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA	272
LCW0402_041_ GFP-N_G10.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAP	273	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTA GCGCACCAGGTAGCCAGCAGGTCTCTCC TACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA	274
LCW0402_050_ GFP-N_A11.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETP	275	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTG AAACTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC TCCGGAATCCGGCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCCGGCTCTGAAACCCCA	276
LCW0402_051_ GFP-N_B11.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSG	277	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTG AAACCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC	278

10

20

30

40

【表 10-3】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
	SETP		TCCTGAGTCTGGCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAAACCCCA	
LCW0402_059_GFP-N_E11.ab1	GSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSTEPSE GSAP	279	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCACCA	280
LCW0402_060_GFP-N_F11.ab1	GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSG SETP	281	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCA	282
LCW0402_061_GFP-N_G11.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATP ESGP	283	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACCGAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCA	284
LCW0402_065_GFP-N_A12.ab1	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGP	285	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCA	286
LCW0402_066_GFP-N_B12.ab1	GSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSTEPSE GSAP	287	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA	288
LCW0402_067_GFP-N_C12.ab1	GSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGSEPATSG SETP	289	GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCA	290
LCW0402_069_GFP-N_D12.ab1	GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSG SETP	291	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCGAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCA	292
LCW0402_073_GFP-N_F12.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPT STEE	293	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTA GCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCGAGGAA	294
LCW0402_074_GFP-N_G12.ab1	GSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATP ESGP	295	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTAGCCCAGCTGGTTCTCC AACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAATCTGGTCCA	296
LCW0402_075_GFP-N_H12.ab1	GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGP	297	GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCTGAGTCTGGCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCA	298

(実施例 3 : X T E N _ A F 3 6 セグメントの構築)

36 のアミノ酸長の配列をコードするコドンライブラリーを構築した。該配列を X T E M _ A F 3 6 と命名した。そのセグメントは、アミノ酸配列 [X] 3 を有し、式中 X は配列 G S T S E S P S G T A P (配列番号 39)、G T S T P E S G S A S P (配列番号 40)、G T S P S G E S S T A P (配列番号 41)、または G S T S S T A E S P G P (配列番号 42) を有する 12 マーのペプチドである。インサートを、以下の対のリン酸化型合成オリゴヌクレオチド対をアニーリングすることによって得た：

A F 1 f o r : A G G T T C T A C Y A G C G A A T C Y C C K T C T G G Y A C Y G C W C C (配列番号 299)

A F 1 r e v : A C C T G G W G C R G T R C C A G A M G G R G A T T C G C T R G T A G A (配列番号 300)

A F 2 f o r : A G G T A C Y T C T A C Y C C K G A A A G C G G Y T C Y G C W T C T C C (配列番号 301)

A F 2 r e v : A C C T G G A G A W G C R G A R C C G C T T T C M G G R G T A G

10

20

30

40

50

ARGT (配列番号 302)

AF3 for: AGGTAC YTCYCKAGCGGYGAATCTTCTACYG
CWCC (配列番号 303)

AF3 rev: ACCTGGWGC RGTAGAAGATTCTCCGCTMGGRG
ARGT (配列番号 304)

AF4 for: AGGTTCTYACYAGCTCTACYGCWGAATCTCCKG
GYCC (配列番号 305)

AF4 rev: ACCTGGRC CMGGAGATTCTWGC RGTAGAGCTRG
TRGA (配列番号 306)

本発明者らは、リン酸化型オリゴヌクレオチド 3KpnI ストッパー for: AGG
TTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (配列番号 139) および非リン酸化型オリ
ゴヌクレオチド pr_3KpnI ストッパー rev: CCTCGAGTGAAGAC
GA (配列番号 140) もアニーリングした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド対を
連結し、結果的に、1つの BbsI/KpnI セグメントに連結した 12 マーの変動する
数の反復を表す変動する長さの産物の混合物を生じた。36 のアミノ酸の長さに相応する
産物を、調製用アガロースゲル電気泳動法によって混合物から単離し、BsaI/Kpn
I で消化したスタッパーベクター pCW0359 へと連結した。LCW0403 と命名
された結果として生じるライブラリーにおけるクロンのほとんどは、誘導後に緑色蛍光
を示し、このことは、XTEN__AF36 の配列が GFP 遺伝子とフレーム内で連結され
、かつ XTEN__AF36 のほとんどの配列が良好な発現を示すことを示す。

10

20

【0297】

本発明者らは、ライブラリー LCW0403 由来の 96 の単離物を、IPTG を含むア
ガープレートに刻印することによって、高レベルの蛍光について該単離物をスクリーニ
ングした。同じ単離物を PCR によって評価し、36 のアミノ酸と強い蛍光とを有するセグ
メントを含む 48 の単離物を同定した。これらの単離物を配列決定し、正確な XTEN__
AF36 セグメントを含む 44 のクロンを同定した。これらのセグメントについてのヌ
クレオチドおよびアミノ酸コンストラクトのファイル名を表 11 に列挙する。

【0298】

【表 1 1 - 1】

表 1 1 : 3 6 マーモチーフについての DNA 配列およびアミノ酸配列

ファイル名	アミノ酸配列	配列 番号	ヌクレオチド配列	配列 番号
LCW0403_004_ GFP-N_A01.ab1	GTSTPESGSASPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	307	GGTACTTCTACTCCGAAAGCGGTTCCG CATCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGA ATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTA GCGGCGAATCTTCTACTGCTCCA	308
LCW0403_005_ GFP-N_B01.ab1	GTSPSGESSTAPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	309	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTA CCGCACCAGGTCTACTAGCTCTACCGC TGAATCTCCGGGCCAGGTACTTCTCCG AGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCA	310
LCW0403_006_ GFP-N_C01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSTPESG SASP	311	GGTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTC CTGGTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGA ATCTTCTACTGCTCCAGGTACTTCTACTC CTGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCA	312
LCW0403_007_ GFP-N_D01.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	313	GGTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTTCACCAGCTCTACCGC AGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCCCCT AGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA	314
LCW0403_008_ GFP-N_E01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSTPESG SASP	315	GGTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCC TGGCCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAA TCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA	316
LCW0403_010_ GFP-N_F01.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPS GTAP	317	GGTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTC CTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGAAAG CGGCTCTGCATCTCCAGGTCTACTAGC	318

10

20

【 0 2 9 9】

【表 1 1 - 2】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
			GAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA	
LCW0403_011_ GFP-N_G01.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	319	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTACCTCTACTCCGGAAG CGGCTCTGCATCTCCAGGTACTTCTACC CCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA	320
LCW0403_012_ GFP-N_H01.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSESPS GTAP	321	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCA CCGCTCCAGGTACCTCTCTAGCGGCGA ATCTTCTACCGTCCAGGTTCTACTAGC GAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA	322
LCW0403_013_ GFP-N_A02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	323	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTC CGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGC AGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCTCCT AGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA	324
LCW0403_014_ GFP-N_B02.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPS GTAP	325	GGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTACCTCTACCCCTGAAAG CGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACCAGC GAATCCCCGTCTGGCACCGCACCA	326
LCW0403_015_ GFP-N_C02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	327	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCC GGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCT GAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCCCGA GCGGTGAATCTTCTACTGCACCA	328
LCW0403_017_ GFP-N_D02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGSTSTAE SPGP	329	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCC GTCTGGCACCGCACCGGTTCTACTAGC TCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA	330
LCW0403_018_ GFP-N_E02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSTAE SPGP	331	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGC TGAATCTCCTGGTCCAGGTTCTACTAGC TCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCA	332
LCW0403_019_ GFP-N_F02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS STAESPGPGSTSTAE SPGP	333	GGTTCTACTAGCGAATCCCCCTTCTGGTA CTGCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGC TGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGC TCTACTGCAGAATCTCCTGGTCCA	334
LCW0403_023_ GFP-N_H02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGSTSESPS GTAP	335	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTA CCGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCC GTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGC GAATCTCCTTCTGGTACTGCACCA	336
LCW0403_024_ GFP-N_A03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSTAE SPGP	337	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGC TGAATCTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGC TCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA	338
LCW0403_025_ GFP-N_B03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGES STAP	339	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTC CTGGTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCT GAATCTCCGGGTCCAGGTACCTCCCTA GCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA	340
LCW0403_028_ GFP-N_D03.ab1	GSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGA TGSP	341	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTAC CGGCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGT GCAACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTC CGTCTGGTGCAACCGGTCCCCA	342
LCW0403_029_ GFP-N_E03.ab1	GTSPSGESSTAPGTST PESGSASPGSTSTAE SPGP	343	GGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTA CTGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAG CGGCTCCGCATCTCCAGGTTCTACTAGC TCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCA	344
LCW0403_030_ GFP-N_F03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSTPESG SASP	345	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTC CGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGC AGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACT CCGGAAGCGGTTCCGCTTCTCCA	346
LCW0403_031_	GTSPSGESSTAPGSTS	347	GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTA	348

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
GFP-N_G03.ab1	STAESPGPGTSTPESG SASP		CCGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGC TGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTTCTACC CCGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA	
LCW0403_033_ GFP-N_H03.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS STAESPGPGSTSTAE SPGP	349	GGTTCTACTAGCGAATCCCCCTTCTGGTA CTGCACCAGGTTCTACCAGCTCTACTGC TGAATCTCCGGGCCAGGTTCCACCAGC TCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCA	350
LCW0403_035_ GFP-N_A04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGSTSTAE SPGP	351	GGTTCACCAGCTCTACCGCTGAATCTC CGGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCC TTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACTAGC TCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCA	352
LCW0403_036_ GFP-N_B04.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSTPESG SASP	353	GGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTC CGGGTCCAGGTTCTCCCCGAGCGGTGA ATCTTCTACTGCACCAGGTTCTTCTACTC CGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA	354
LCW0403_039_ GFP-N_C04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPGES STAP	355	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCA CCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCC GTCTGGTACCGCACCAGGTTCTTCTCCT AGCGGCGAATCTTCTACCGCACCA	356
LCW0403_041_ GFP-N_D04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESG SASP	357	GGTTCTACCAGCGAATCCCCCTTCTGGTA CTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCC TTCTGGCACCGCACCAGGTTCTTCTACC CCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA	358
LCW0403_044_ GFP-N_E04.ab1	GTSTPESGSASPGSTS STAESPGPGSTSTAE SPGP	359	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTG CATCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGC AGAATCTCCGGGCCAGGTTCTACTAGC TCTACTGCTGAATCTCCTGGGCCA	360
LCW0403_046_ GFP-N_F04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPGES STAP	361	GGTTCTACCAGCGAATCCCCCTTCTGGCA CTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCC TTCTGGTACCGCACCAGGTTCTTCTCCG AGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCA	362
LCW0403_047_ GFP-N_G04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSESPS GTAP	363	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGC AGAATCTCCGGGCCAGGTTCTACTAGC GAATCCCCCTTCTGGTACCGCTCCA	364
LCW0403_049_ GFP-N_H04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSTPESG SASP	365	GGTTCACCAGCTCTACTGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGC AGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACT CCTGAAAGCGGTTCCGCATCTCCA	366
LCW0403_051_ GFP-N_A05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSESPS GTAP	367	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCC GGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCT GAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACTAGCG AATCTCCTTCTGGTACCGCTCCA	368
LCW0403_053_ GFP-N_B05.ab1	GTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGSTSTAE SPGP	369	GGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTA CTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCC TTCTGGTACTGCTCCAGGTTCCACCAGC TCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCA	370
LCW0403_054_ GFP-N_C05.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSTAE SPGP	371	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTA CTGCTCCAGGTTCTTCCCCTAGCGGTGA ATCTTCTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCT CTACCGCAGAATCTCCGGGTCCA	372
LCW0403_057_ GFP-N_D05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGTSPGES STAP	373	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCC GTCTGGCACCGCACCAGGTTCTCCCCCT AGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA	374
LCW0403_058_ GFP-N_E05.ab1	GSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESG SASP	375	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCA CTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCC GTCTGGCACTGCACCAGGTACCTCTACC	376

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
			CCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA	
LCW0403_060_ GFP-N_F05.ab1	GTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAE SPGP	377	GGTACCTCTACTCCGAAAGCGGTTCCG CATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCC GTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGC TCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCCA	378
LCW0403_063_ GFP-N_G05.ab1	GSTSSTAESPGPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	379	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTC CGGGCCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGA ATCTTCTACCCTCCAGGTACTTCTCCGA GCGGTGAATCTTCTACCCTCCA	380
LCW0403_064_ GFP-N_H05.ab1	GTSPSGESSTAPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	381	GGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTA CTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGA ATCTTCTACCCTCCAGGTACCTCCCCTA GCGGTGAATCTTCTACCCTCCA	382
LCW0403_065_ GFP-N_A06.ab1	GSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPS GTAP	383	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGAAAG CGGTTCCGCTTCTCCAGGTTCTACTAGC GAATCTCCGCTCTGGCACCGCACCA	384
LCW0403_066_ GFP-N_B06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	385	GGTTCTACTAGCGAATCTCCGTTCTGGCA CTGCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGA ATCTTCTACCCTCCAGGTACTTCCCCTA GCGGCGAATCTTCTACCCTCCA	386
LCW0403_067_ GFP-N_C06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGSTSTAE SPGP	387	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTA CCGCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAG CGGCTCCGCTTCTCCAGGTTCCACTAGC TCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA	388
LCW0403_068_ GFP-N_D06.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSESPS GTAP	389	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTTCTACCAGCTCTACCGC TGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGC GAATCTCCGCTCTGGCACCGCACCA	390
LCW0403_069_ GFP-N_E06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	391	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTTCTGGTA CCGCACCAGGTACTTCTACCCCGGAAAG CGGCTCTGCTTCTCCAGGTACTTCTACCC CGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCA	392
LCW0403_070_ GFP-N_F06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	393	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTTCTGGTA CTGCTCCAGGTACTTCTACTCTGAAAG CGGTTCCGCTTCTCCAGGTACTTCTACTC CGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA	394

(実施例 4 : X T E N _ A G 3 6 セグメントの構築)

36 のアミノ酸長の配列をコードするコドンライブラリーを構築した。該配列を X T E M _ A G 3 6 と命名した。そのセグメントは、アミノ酸配列 [X]₃ を有し、式中 X は配列 G T P G S G T A S S S P (配列番号 43)、G S S T P S G A T G S P (配列番号 44)、G S S P S A S T G T G P (配列番号 45)、または G A S P G T S S T G S P (配列番号 46) を有する 12 マーのペプチドである。インサートを、以下の対のリン酸化型合成オリゴヌクレオチド対をアニーリングすることによって得た：

A G 1 f o r : A G G T A C Y C C K G G Y A G C G G T A C Y G C W T C T T C Y T C T C C (配列番号 395)

A G 1 r e v : A C C T G G A G A R G A A G A W G C R G T A C C G C T R C C M G G R G T (配列番号 396)

A G 2 f o r : A G G T A G C T C T A C Y C C K T C T G G T G C W A C Y G G Y T C Y C C (配列番号 397)

A G 2 r e v : A C C T G G R G A R C C R G T W G C A C C A G A M G G R G T A G A G C T (配列番号 398)

A G 3 f o r : A G G T T C T A G C C C K T C T G C W T C Y A C Y G G T A C Y G G Y C C (配列番号 399)

A G 3 r e v : A C C T G G R C C R G T A C C R G T R G A W G C A G A M G G G C

10

20

30

40

50

T A G A (配列番号 400)

A G 4 f o r : A G G T G C W T C Y C C K G G Y A C Y A G C T C T A C Y G G T T C T C C (配列番号 401)

A G 4 r e v : A C C T G G A G A A C C R G T A G A G C T R G T R C C M G G R G A W G C (配列番号 402)

本発明者らは、リン酸化型オリゴヌクレオチド 3 K p n I ストッパー f o r : A G G T T C G T C T T C A C T C G A G G G T A C (配列番号 139) および非リン酸化型オリゴヌクレオチド p r _ 3 K p n I ストッパー r e v : C C T C G A G T G A A G A C G A (配列番号 140) もアニーリングした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド対を連結し、結果的に、1つの B b s I / K p n I セグメントに連結した 12 マーの変動する数の反復を表す変動する長さの産物の混合物を生じた。36 のアミノ酸の長さに相応する産物を、調製用アガロースゲル電気泳動法によって混合物から単離し、B s a I / K p n I で消化したスタッフターベクター p C W 0 3 5 9 へと連結した。L C W 0 4 0 4 と命名された結果として生じるライブラリーにおけるクローンのほとんどは、誘導後に緑色蛍光を示し、このことは、X T E N _ A G 3 6 の配列が G F P 遺伝子とフレーム内で連結され、かつ X T E N _ A G 3 6 のほとんどの配列が良好な発現を示すことを示す。

【0302】

本発明者らは、ライブラリー L C W 0 4 0 4 由来の 96 の単離物を、I P T G を含むアガープレートに刻印することによって、高レベルの蛍光について該単離物をスクリーニングした。同じ単離物を P C R によって評価し、36 のアミノ酸と強い蛍光とを有するセグメントを含む 48 の単離物を同定した。これらの単離物を配列決定し、正確な X T E N _ A G 3 6 セグメントを含む 44 のクローンを同定した。これらのセグメントについてのヌクレオチドおよびアミノ酸コンストラクトのファイル名を表 12 に列挙する。

【0303】

【表 12-1】

表 12 : 36 マーモチーフについての DNA 配列およびアミノ酸配列

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
LCW0404_001_GFP-N_A07.ab1	GASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGA TGSP	403	GGTGCATCCCCGGGCACTAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTAC TGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTC CTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA	404
LCW0404_003_GFP-N_B07.ab1	GSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSTPSGA TGSP	405	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCG GCTCTCCAGGTCTAGCCCGTCTGCTTC TACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACC CCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA	406
LCW0404_006_GFP-N_C07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGSSTPSGA TGSP	407	GGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTCTAGCCCTTCTGCTTCC ACTGGTACCGGCCAGGTAGCTCTACCC CGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA	408
LCW0404_007_GFP-N_D07.ab1	GTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGASPGTSS TGSP	409	GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTT CCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGG TGCAACTGGTTCCCCAGGTGCATCCCT GGTACTAGCTCTACCGGTCTCCA	410
LCW0404_009_GFP-N_E07.ab1	GTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGSRPSAST GTGP	411	GGTACCCCTGGCAGCGGTACTGCTTCTT CTTCTCCAGGTGCTTCCCCTGGTACCAG CTCTACCGGTCTCCAGGTCTAGACCT TCTGCATCCACCGGTACTGGTCCA	412
LCW0404_011_GFP-N_F07.ab1	GASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGASPGTSS TGSP	413	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGG TGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCCCCG GGTACCAGCTCTACCGGTCTCCA	414
LCW0404_012_GFP-N_G07.ab1	GTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGA TGSP	415	GGTACCCCGGCAGCGGTACCGCATCTT CCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGG TGCTACCGGTCCCCAGGTAGCTCTACC	416

10

20

30

40

50

【0304】

【表12-2】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
			CCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA	
LCW0404_014_GFP-N_H07.ab1	GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	417	GGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTGTTCTCCAGGTGCATCCCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGTACACAGCTCTACTGGTTCTCCA	418
LCW0404_015_GFP-N_A08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	419	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCCGTCTGCTTCACTGGTACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGCACACAGCTCTACTGGTTCTCCA	420
LCW0404_016_GFP-N_B08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	421	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTACTCCGGGAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCCA	422
LCW0404_017_GFP-N_C08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	423	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTCCCCAGGTGCATCCCCCTGGCACACAGCTCTACCGGTTCTCCA	424
LCW0404_018_GFP-N_D08.ab1	GTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	425	GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA	426
LCW0404_023_GFP-N_F08.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP	427	GGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTACTCCGGGACGCGTACTGCTTCTTCTCTCCA	428
LCW0404_025_GFP-N_G08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	429	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACACAGCTCTACTGGTTCTCCA	430
LCW0404_029_GFP-N_A09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP	431	GGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCCGTCTGCATCTACCGGTACCGGCCCA	432
LCW0404_030_GFP-N_B09.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP	433	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCCA	434
LCW0404_031_GFP-N_C09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	435	GGTACCCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGCACACAGCTCTACCGGTTCTCCA	436
LCW0404_034_GFP-N_D09.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	437	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCATCCCCGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA	438
LCW0404_035_GFP-N_E09.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	439	GGTGCTTCTCCGGGACACAGCTCTACTGTTCTCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCA	440
LCW0404_036_GFP-N_F09.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	441	GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCA	442
LCW0404_037_GFP-N_G09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	443	GGTGCTTCTCCGGGACACAGCTCTACTGTTCTCCAGGTCTAGCCCTTCTGCATCACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCA	444
LCW0404_040_	GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	445	GGTGATCCCCGGGACACAGCTCTACCG	446

【0305】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
GFP-N_H09.ab1	PSGATGSPGSSTPSGA TGSP		GTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGG TGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACC CCGCTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA	
LCW0404_041_ GFP-N_A10.ab1	GTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGT ASSSP	447	GGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTT CCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCGGT AGCGGTACCGCATCTTCTTCTCCA	448
LCW0404_043_ GFP-N_C10.ab1	GSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGA TGSP	449	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTA CTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGG TGCTACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACT CCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA	450
LCW0404_045_ GFP-N_D10.ab1	GASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGSSPSAST GTGP	451	GGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCT ACCGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTT CTGCATCCACTGGTACTGGTCCA	452
LCW0404_047_ GFP-N_F10.ab1	GTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSS TGSP	453	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTT CTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAG CTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCG GGCACTAGCTCTACTGGTCTCCA	454
LCW0404_048_ GFP-N_G10.ab1	GSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGA TGSP	455	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCG GTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAG CTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACC CCGCTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA	456
LCW0404_049_ GFP-N_H10.ab1	GSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGA TGSP	457	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTG GTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTAC TGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCC CTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA	458
LCW0404_050_ GFP-N_A11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGSSTPSGA TGSP	459	GGTGCTATCTCCTGGTACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCT ACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACTC CTTCTGGTGCTACCGGTTCTCCA	460
LCW0404_051_ GFP-N_B11.ab1	GSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGA TGSP	461	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTG GCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGG TGCTACTGGTTCCCCAGGTAGCTCTACC CCGCTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA	462
LCW0404_052_ GFP-N_C11.ab1	GASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSS TGSP	463	GGTGCTATCCCCGGGTACCAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTAC TGCATCTTCTCTCCAGGTGCTTCTCCG GGCACCAGCTCTACTGGTCTCCA	464
LCW0404_053_ GFP-N_D11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSS TGSP	465	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTG GTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATC CACTGGTACCGGTCCAGGTGCTTCCCCCT GGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA	466
LCW0404_057_ GFP-N_E11.ab1	GASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSPSAST GTGP	467	GGTGCTATCTCCTGGTACTAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCT TCTGCATCTACCGGTACTGGTCCA	468
LCW0404_060_ GFP-N_F11.ab1	GTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGASPGTSS TGSP	469	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTT CCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACTGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCG GGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA	470
LCW0404_062_ GFP-N_G11.ab1	GSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGA TGSP	471	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCG GCTCCCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTAC CGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACTC CGTCTGGTGCTACCGGCTCCCCA	472
LCW0404_066_ GFP-N_H11.ab1	GSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSS TGSP	473	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTA CCGGCCCCAGGTCTAGCCCGTCTGCTTC TACCGGTACTGGTCCAGGTGCTTCTCCG	474

10

20

30

40

【表 1 2 - 4】

ファイル名	アミノ酸配列	配列番号	ヌクレオチド配列	配列番号
LCW0404_067_ GFP-N_A12.ab1	GTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSNPSAST GTGP	475	GGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTT CTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTAACCCCT TCTGCATCCACCGGTACCGGCCCA	476
LCW0404_068_ GFP-N_B12.ab1	GSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGASPGTSS TGSP	477	GGTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTA CTGGCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGG TGCTACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCG GGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA	478
LCW0404_069_ GFP-N_C12.ab1	GSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTA SSSP	479	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCG GCTCTCCAGGTGCATCCCCGGGTACCAG CTCTACCGGTTCTCCAGGTACTCCGGGT AGCGGTACCGCTTCTTCTCTCCA	480
LCW0404_070_ GFP-N_D12.ab1	GSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGA TGSP	481	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCG GTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGG TGCAACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACC CCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA	482
LCW0404_073_ GFP-N_E12.ab1	GASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGA TGSP	483	GGTGCTTCTCCTGGCACTAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTAC CGCATCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACT CCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA	484
LCW0404_075_ GFP-N_F12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSAST GTGP	485	GGTAGCTCTACCCGTCTGGTGCTACTG GCTCCCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATC CACCGGTACCGGTCCAGGTTCTAGCCCG TCTGCATCTACTGGTACTGGTCCA	486
LCW0404_080_ GFP-N_G12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGSSPSAST GTGP	487	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCT ACTGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTT CTGCTTCCACTGGTACTGGTCCA	488
LCW0404_081_ GFP-N_H12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGT ASSSP	489	GGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCT ACCGGTACCGGTCCAGGTACCCCTGGCA GCGGTACCGCATCTTCTCTCCA	490

(実施例 5 : X T E N _ A E 8 6 4 の構築)

X T E N _ A E 8 6 4 を、X T E N _ A E 3 6 から A E 7 2、1 4 4、2 8 8、5 7 6、および 8 6 4 への連続的な二量体化から構築した。X T E N _ A E 7 2 セグメントの収集物を X T E N _ A E 3 6 の 3 7 の異なるセグメントから集めた。3 7 の異なる 3 6 アミノ酸セグメントすべてを保有する大腸菌の培養物を混合し、プラスミドを単離した。このプラスミドプールを B s a I / N c o I で消化し、小さな断片をインサートとして生じた。同じプラスミドプールを B b s I / N c o I で消化し、大きな断片をベクターとして生じた。インサート断片およびベクター断片を連結し、結果的に長さを二倍にし、連結混合物を B L 2 1 G o l d (D E 3) 細胞へと形質転換して、X T E N _ A E 7 2 のコロニーを得た。

【0 3 0 7】

この X T E N _ A E 7 2 セグメントのライブラリーを L C W 0 4 0 6 と命名した。L C W 0 4 0 6 由来のすべてのクローンを組み合わせ、先に説明したのと同じ過程を用いて再度二量体化し、X T E N _ A E 1 4 4 のライブラリー L C W 0 4 1 0 を生じた。L C W 0 4 1 0 由来のすべてのクローンを組み合わせ、先に説明したのと同じ過程を用いて再度二量体化し、X T E N _ A E 2 8 8 のライブラリー L C W 0 4 1 4 を生じた。2 つの単離物 L C W 0 4 1 4 . 0 0 1 および L C W 0 4 1 4 . 0 0 2 をライブラリーから無作為に拾い、配列決定して同一性を実証した。L C W 0 4 1 4 由来のすべてのクローンを組み合わせ、先に説明したのと同じ過程を用いて再度二量体化し、X T E N _ A E 5 7 6 のライブラリー L C W 0 4 1 8 を生じた。本発明者らは、高レベルの G F F P 蛍光についてライブラリー L C W 0 4 1 8 由来の 9 6 の単離物をスクリーニングした。P C R による正しい大

きさのインサートかつ強い蛍光を有する 8 の単離物を配列決定し、2 の単離物（LCW0418.018 および LCW0418.052）を、配列決定および発現データに基づいてさらに使用するために選択した。

【0308】

XTEN__AE864 の具体的なクローン pCW0432 を、先に説明したのと同じ二量体化過程を用いて、XTEN__AE576 の LCW0418.018 および XTEN__AE288 の LCW0414.002 を組み合わせることによって構築した。

【0309】

（実施例 6：XTEN__AM144 の構築）

XTEN__AE36 の 37 の異なるセグメント、XTEN__AF36 の 44 のセグメント、および XTEN__AG36 の 44 のセグメントから出発して、XTEN__AM144 セグメントの収集物を集めた。

【0310】

125 の異なる 36 アミノ酸セグメントすべてを保有する大腸菌の培養物を混合し、プラスミドを単離した。このプラスミドプールを BsaI/NcoI で消化し、小さな断片をインサートとして生じた。同じプラスミドプールを BbsI/NcoI で消化し、大きな断片をベクターとして生じた。インサート断片およびベクター断片を連結し、結果的に長さを二倍にし、連結混合物を BL21Gold (DE3) 細胞へと形質転換して、XTEN__AM72 のコロニーを得た。

【0311】

この XTEN__AM72 セグメントのライブラリーを LCW0461 と命名した。LCW0461 すべてのクローンを組み合わせ、先に説明したのと同じ過程を用いて再度二量体化し、ライブラリー LCW0462 を生じた。ライブラリー LCW0462 由来の 1512 の単離物を、タンパク質発現についてスクリーニングした。個々のコロニーを 96 ウェルプレートへと転移させ、出発物質培養物として一晚培養した。これらの出発物質培養物を新鮮自己誘導培地へと希釈し、20～30 時間培養した。発現を、395 nm での励起および 510 nm での発光を有する蛍光プレートリーダーを用いて測定した。192 の単離物は、高レベルの発現を示し、DNA 配列決定に供された。ライブラリー LCW0462 におけるほとんどのクローンは、良好な発現および類似の物理化学的特性を示し、XTEN__AM36 セグメントのほとんどの組み合わせが有用な XTEN 配列を生じることが示唆された。LCW0462 由来の 30 の単離物を、複数の XTEN__AM144 セグメントを含む多機能性タンパク質の構築のために、XTEN__AM144 セグメントの好ましい収集物として選択した。これらのセグメントについてのヌクレオチドおよびアミノ酸コンストラクトのファイル名を表 13 に列挙する。

【0312】

【表 13-1】

表 13：AM144 セグメントの DNA 配列およびアミノ酸配列

クローン	整えられた配列	配列番号	タンパク質配列	配列番号
LCW462_r1	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTT CCTCTCCAGGTAGCTCTACCCGCTCTGGT GCTACCGGTICCCAGGTAGCTCTACCCC GCTGGTIGCAACCGGCTCCCCAGGTAGC CCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGA AGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAG TCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTC CGAAGGTAGCGCTCCAGGTTCTAGCCCT TCTGCATCCACCGGTACCGGCCAGGTTT TAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTC CAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACT GGTCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTC	491	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	492

【0313】

【表 1 3 - 2】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	CGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACT GAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTA GCGAACCGGCAACCTCCGGTCTGAAAC TCCA			
LCW462_r5	GGTTCTACCAGCGAATCCCCCTTCTGGCAC TGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCCTT CTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCGAG CGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCT CTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCC AGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCCTGAATCCGGTCCAGGTGCATCTCCT GGTACCAGCTCTACCGGTCTTCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCT CCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTAC CGGTTCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTC CTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGC GAATCTCCGCTCTGGCACTGCACCAGGTA CCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCT CCA	493	GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGA SPGTSSTGSPGSSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGS TSESPSGTAPGSTSESPSG TAPGTSTPESGSAASP	494
LCW462_r9	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCA GCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCTGAGTCCGGCCAGGTACTTCTGAA AGCGTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTA CCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCT CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGG AGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCT ACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAG GTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAA ACCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGA CCTCCACCGAGGAAGGTGCTTCTCCTGG CACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTA GCCCTTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCA GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGTAC TGGTCCA	495	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEE GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGP	496
LCW462_r10	GGTAGCGAACC'GGCAACCTCTGGCTCTG AAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCAGGTT CTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCCT CCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGG TACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGC GAATCTTCTACCGCACCAGGTGCATCTCC GGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTT CTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGC CCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTAC TGGTTCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTG GTGCAACCGGTTCCCAGGTAGCTCTACT CCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAGGTGC ATCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCTC CA	497	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPG ASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSP	498
LCW462_r15	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGG TTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCA CCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCT TCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCA GGTAGCGAACC'GGCTACTTCTGGTCTG AAACCCAGGTAGCGAACC'GGCTACCTC	499	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEP	500

10

20

30

40

【表 1 3 - 3】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	CGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTA CCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGG GTAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACC GTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCT ACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAG GTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGA AACTCCA		SEGSAPGSEPATSGSETP	
LCW462_r1 6	GGTACCTCTACCGAACCCTCCGAAGGTA GCGCTCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCC TACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGC CCAGGTAGCGAACCCTGCTACCTCCGGCT CTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGC AACCCCGGAATCTGGTCCAGGTAGCCCG GCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCT GGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCG AAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC TACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTT CTACCGAACCCTCCGAGGGTAGCGCTCC AGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTG AACTCCA	501	GTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	502
LCW462_r2 0	GGTACTTCTACCGAACCCTCCGAAGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCG AACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTAC TTCTACCGAACCCTCCGAAGGCAGCGCT CCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGG GCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACC TTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCT ACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCC GGCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTC CTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAA CCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCG AACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCA CCGAGGAA	503	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEE	504
LCW462_r2 3	GGTACTTCTACCGAACCCTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCT GAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTTC TACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTC CAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGC ACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAA GCGGCTCCGCTTCTCCAGGTAGCGAACC TGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGT ACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTG GCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGGCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAG TCCGGCCCA	505	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GSTSEPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASPG SEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGP	506
LCW462_r2 4	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGG CTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTA	507	GSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	508

10

20

30

40

【表 1 3 - 4】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	CCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCT TCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTAGCCC TGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAG GTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACT GAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCG AAGGTAGCGCTCCAGGTGCTTCCCCGGG CACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTA GCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCA GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTC CTCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTG AATCTCCTGGCCAGGTACTTCTCCTAGC GGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTC TACTCCGGAAGCGGTTCTGCATCTCCA		GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSP GSTSSTAESP GPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	10
LCW462_r2 7	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCA GCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTAC TTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGCA CCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCCAGGTACCTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCCGGCCAGGTACTCCT GGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGG TGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCT ACTGGTTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCG GCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGGAAG GTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAG CGTCCA	509	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSP GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP	510
LCW462_r2 8	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCA CTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCC GAAGGCAGCGCACCAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGCA CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG AGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCTGGCCAGGTACCCCG GGTAGCGGTACTGCTTCTTCTCCTCTCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCT CTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCT ACCGGTTCTCCAGGTACCTCTACTGAACC TTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTG AAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAGG TACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC GCACCA	511	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GTPGSGTASSSPGSSPS GATGSPGASPGTSSTGSP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	512
LCW462_r3 8	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTG AAACTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC TCCGGAATCCGGCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCCGGCTCTGAAACCCAGGTA GCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCC CCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTTC TTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGCTCTG TGCTACCGGCTCCCGAGGTGCATCTCCT GGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCT CCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTAC CGGTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTT CTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTA	513	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGSSPS GATGSPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	514

【表 1 3 - 5】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	GCGAACCTGCTACTTCTGGTCTGAAACT CCA			
LCW462_r3 9	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACACAGGTACTTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTA GCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAG GAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTT CTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACC TTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCG GCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAAG GTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGC GCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTGCTTCCCCGGGC ACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTCTAG CCCGTCTGCTTCTACTGGTACTGGTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACT GGTCCA	515	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGP	516
LCW462_r4 1	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGG TTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCT CTACCGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCCC TGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAAT CCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTC CGGTTCTGAAACCCAGGTGCATCTCCTG GTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTAGC TCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTA CTGGTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCT TCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGA ATCCCCTTCTGGCACCGCACCAGGTACTT CTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA	517	GSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSP GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGP GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASP	518
LCW462_r4 2	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCAC CGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGT CTGGTACCGCACACAGGTACTTCTCCTAGC GGCGAATCTTCTACCGCACACAGGTACCT CTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCC AGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGT AGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAAGGTAGCGCACACAGGTACCTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGG TCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAA GGTAGCGCACACAGGTAGCTCTACCCCGT CTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCT CCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCT CTCCA	519	GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPG TSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGS STPSGATGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSP	520
LCW462_r4 3	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCC GGGCCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAA TCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTA CTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA GGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCC TGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAGC GGTTCCGCTTCTCCAGGTACTTCTCCTAG CGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTA CCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCA	521	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGPGTSSST AESP GPGTSTEPESGSASP GTSPSGESSTAPGTSSST AESP GPGTSTEPESGSASP GSTSSTAESPGPGTSESP SGTAPGTSPSGESSTAP	522

10

20

30

40

【表 1 3 - 6】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	GGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCG CTTCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCCT GAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCG AATCTCCGTCTGGCACCAGCACCAGGTAC TCCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCAC CA			
LCW462_r4 5	GGTACCTCTACTCCGGAAGCGGTTCCG CATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCG TCTGGCACCAGCACCAGGTTCTACTAGCTC TACTGCTGAATCTCCGGGCCAGGTACCT CTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCC AGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCCTGAATCCGGTCCAGGTACCTCTGA AAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGGT ACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCG CTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAA GGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCT ACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAG GTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGC GCTCCC	523	GTSTPESGSASPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESP TSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGP SESATPESGPSTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPSTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAP	524
LCW462_r4 7	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTA GCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTC TGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCG GCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTA CTTCTACTGAACCGTCTGAAAGTAGCGC ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG GAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCG CAACCCCGGAGTCCGGGCCAGGTGCATC TCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACC GGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTG CTACTGGTTCGCCAGGTAGCTCTACTCCG TCTGGTGCAACCGGTTCCCAGGTAGCTC TACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAG GTGCATCCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGT TCTCCA	525	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPSTSESATPESGP GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	526
LCW462_r5 4	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTG AAACTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTC CGGCTCTGAAACCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTG AATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTAGCTCT ACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCT CCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCT ACTGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTC TGGTGCTACCGGTTCCCAGGTGCTTCTC CTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT AGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTC TCCA	527	GSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPSTSTEPSEGSAP GSSTPSGATGSPGSSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGSSSTPSGATGSP	528
LCW462_r5 5	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCT GAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGT	529	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPSTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GSTSESPSGTAPGTSPSG	530

10

20

30

40

【表 1 3 - 7】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	CCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAG GCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCT TCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTTCTACTA GCGAATCTCCGTCTGGCACTGCTCCAGGT ACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGC TCCAGGTACTTCCCCTAGCGGCGAATCTT CTACCGCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCT CCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCAGGT ACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CTCCA		ESSTAPGTSPSGESSTAP GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	10
LCW462_r5 7	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTA GCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCT GGTTCTGAAACCCAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCGACCTCCACCGAGGAAGGTAG CCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AGTCCGGCCCAGGTACCTCTACCGAACC GTCTGAGGGCAGCGCACCGGTACCTCT ACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAG GTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAG CGCACCGGTACTTCTGAAAGCGCAACC CCTGAATCCGGTCCAGGTAGCTCTACTCC GTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCTA GCCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCCA GGTGCTTCCCCGGGCACCGCTCTACTG GTTCTCCA	531	GTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGP GSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSP	532
LCW462_r6 1	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTG AGACTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCC GACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAA AGCGCTACCCCTGAGTCTGGCCCAGGTA CCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC TCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAG GGCAGCGCACCGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTACCTCT ACTCCGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCCCGTCTGGCACCG GCACCGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGA ATCTCCGGGCCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCT CTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTA GCGCTCCA	533	GSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGP GTSTPESGSASPGTSESP SGTAPGSTSSTAESPSPG TSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAP	534
LCW462_r6 4	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCT GAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCGGTAC TCTACCGAACCGTCTGAAAGGTAGCGCA CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG AGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCTGGCCCAGGTACTCCT GGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGT TCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCGAGCTC TACCGGTTCTCCAGGTTCCACCGAGCTCTA CTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCT CCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGG TACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGCTT CTCCA	535	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GTPGSGTASSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP GSTSSTAESPSPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	536

10

20

30

40

【表 1 3 - 8】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
LCW462_r6 7	GGTAGCCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAGTCCGGCCAGGTACCTCTACC GAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTA CTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG TCCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCTGGC TCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTAGCCCCG GCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAAG GTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGC GCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACCGAA CCGTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTT CTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGT AGCGCACCA	537	GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	538
LCW462_r6 9	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTAC CGCACCAGGTCTACTAGCTCTACCGCTG AATCTCCGGGCCCCAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCC AGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGT AGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAAGGTAGCGCACCAGGTCTAGCCCT TCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTAG CTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACC GGTTCTCCAGGTACTTCTACTCCGAAAG CGTTCCGCACTCCAGGTACTTCTCCTA GCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACC TCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCC A	539	GTSPSGESSTAPGSTSST AESP GPGTSPSGESSTAP GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP GTSTPESGSASPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	540
LCW462_r7 0	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGT CTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCT GAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTAG CCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGG AAGGTAGCCCCGCTGGTTCTCCGACTTCT ACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTT CCGAAGGTAGCGCTCCAGGTCTAGCCC TTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGGTA GCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCC CCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAAC TGGCTCTCCAGGTAGCGAACC GGCAACT TCCGGCTCTGAAACCCAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCTGAGTCTGGCCCAGGT AGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAAA CCCCA	541	GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP	542
LCW462_r7 2	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCG AACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTAG CTTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCC CAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACC GGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGG TGCTACTGGCTCTCCAGGTACTTCTGAAA GCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAG CGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTC CAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGG	543	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP GSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSP GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASP	544

10

20

30

40

【表 1 3 - 9】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	TAGCGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCT CCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAG CGAATCTCCGTCTGGCACTGCACCAGGT ACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTC TCCA			
LCW462_17 3	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGC ATCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAG AATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCT ACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTAG CCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGC TCTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTC TACCGGTTCTCCAGGTAGCGAACCAGCA ACCTCCGGCTCTGAAACCCAGGTACCT CTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGCCC AGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTTCTACTAGCGAATCTC CTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGC GAATCTCCGTCTGGCACTGCACCAGGTA CCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCT CCC	545	GTSTPESGSASPGSTSST AESP GPGSTSSTAESP GP GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEE GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASP	546
LCW462_17 8	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTAC TGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACT CCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGA ACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTTCT ACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCCCGTCTGGTA CCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGA ATCTTCTACCGCACCAAGGTACCTCTACCG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAG CCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGG AAGGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGG TAGCGCACCAAGGTAGCGAACCTGCAACC TCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTGA AAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCCAGGT ACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCA	547	GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP	548
LCW462_17 9	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTA GCGCTCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCC TACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAAGGTAC CTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTC CAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCT ACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTG AATCTTCTACCGCACCAAGGTTCTACCAGC GAATCCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCT TACCAGCGAATCCCCCTTCTGGCACCGCA CCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCT CCGCTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCCAGG TACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA	549	GTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSPSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASPG SEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP	550
LCW462_18 7	GGTAGCGAACC GGCAACCTCTGGCTCTG AAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCAGGTA CTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCA CCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATC	551	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP GTSPSGESSTAPGSTSST AESP GPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAESP GP	552

10

20

30

40

【表 1 3 - 1 0】

クローン	整えられた配列	配列 番号	タンパク質配列	配列 番号
	TCCGGGGCCAGGTACTTCTCCGAGCGGT GAATCTTCTACTGCTCCAGGTTCTACTAG CGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTA CTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCT CCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAAT CTCCGGGTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCT GGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTA CCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGT AGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAACTGGCT CTCC		GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGANWL S	
LCW462_r8 8	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTAC TGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCG ACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAC CTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCT CCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCTGAATCCGGTCCAGGTGCATCT CCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCT CTCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCT ACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTC TGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGG GCAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCCAGGT AGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTC TCCA	553	GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGP GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	554
LCW462_r8 9	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGG TTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACT GCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCC CGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC TGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCG AAGGTAGCGCTCCAGGTACCTCTGAAAG CGCAACTCCTGAGTCTGGCCAGGTAGC GAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAA TCTGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTC TGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAA AGCGCAACCCCGGAATCCGGGCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGG CCCA	555	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	556

10

20

30

(実施例 7 : XTEN__AM288 の構築)

ライブラリー LCW0462 全体を実施例 6 において説明される通り二量体化し、結果的に、LCW0463 と命名された XTEN__AM288 クローンのライブラリーを生じた。ライブラリー LCW0463 由来の 1512 の単離物を、実施例 6 において説明されるプロトコルを用いてスクリーニングした。176 の高度に発現するクローンを配列決定し、40 の好ましい XTEN__AM288 セグメントを、299 のアミノ酸残基を有する複数の XTEN セグメントを含む多機能性タンパク質の構築のために選択した。

40

【0320】

(実施例 8 : XTEN__AM432 の構築)

本発明者らは、segments from library of XTEN__AM144 セグメントのライブラリー LCW0462 由来のセグメントおよび XTEN__AM288 セグメントのライブラリー LCW0463 由来のセグメントを組み換えることによって、XTEN__AM432 セグメントのライブラリーを生じた。この XTEN__AM432 セグメントの新たなライブラリーを LCW0464 と命名した。プラスミドを、LCW0462 および LCW0463 をそれぞれ有する大腸菌の培養物から単離した。ライブ

50

ラリーLCW0464からの1512の単離物を、実施例6において説明されるプロトコルを用いてスクリーニングした。176の高度に発現するクローンを配列決定し、39の好ましいXTEN__AM432セグメントを、より長いXTENの構築のために、および432のアミノ酸残基を有する複数のXTENセグメントを含む多機能性タンパク質の構築のために選択した。

【0321】

並行して、本発明者らは、XTEN__AM144およびXTEN__AM288の好ましいセグメントを用いて、XTEN__AM432セグメントのライブラリーLMS0100を構築した。このライブラリーのスクリーニングは、さらなる構築のために選択される4の単離物を生じた。

【0322】

(実施例9：XTEN__AM875の構築)

スタッファーベクターpCW0359をBsaIおよびKpnIで消化してスタッファーセグメントを取り出し、結果として生じるベクター断片を、アガロースゲル精製によって単離した。

【0323】

本発明者らは、アミノ酸GASASGAPSTG(配列番号559)をコードしかつ制限酵素AscI制限ヌクレオチド配列GGCGCGCCを内側に有する配列決定アイランドA(SI-A)を導入するために、リン酸化型オリゴヌクレオチドBsaI-AscI-KpnI for P: AGGTGCAAGCGCAAGCGGCGCGCCCAAGCA C G G G A G G T T C G T C T T C A C T C G A G G G T A C (配列番号557)および非リン酸化型オリゴヌクレオチドBsaI-AscI-KpnI rev: CCTCGA GTGAAGACGAACCTCCCGTGCTTGGCGCGCCCGCTTGGCGCT TGC(配列番号558)をアニーリングした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド対を、先に調製された、BsaIおよびKpnIで消化したスタッファーベクターpCW0359と連結して、SI-Aを含むpCW0466を生じた。次に、本発明者らは、実施例8由来の43の好ましいXTEN__AM432セグメントおよびpCW0466由来のSI-Aセグメントを、実施例5において説明された同じ二量体化過程を用いて、C末端において組み換えることによって、XTEN__AM443セグメントのライブラリーを生じた。この新たなXTEN__AM443セグメントのライブラリーをLCW0479と命名した。

【0324】

本発明者らは、実施例5において説明される同じ二量体化過程を用いて、XTEN__AM443セグメントのライブラリーLCW0479由来のセグメントおよび実施例8由来の43の好ましいXTEN__AM432セグメントを組み換えることによって、XTEN__AM875セグメントのライブラリーを生じた。この新たなXTEN__AM875セグメントのライブラリーをLCW0481と命名した。

【0325】

(実施例10：XTEN__AM1318の構築)

本発明者らは、アミノ酸GPEPTGPAPSG(配列番号562)をコードしかつ制限酵素FseI認識ヌクレオチド配列GGCCGGCCを内側に有する配列決定アイランドB(SI-B)を導入するために、リン酸化型オリゴヌクレオチドBsaI-FseI-KpnI for P: AGGTCCAGAACCAACGGGGCGCGCCCAAGCGGAGGTTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(配列番号560)および非リン酸化型オリゴヌクレオチドBsaI-FseI-KpnI rev: CCTCGA GTGAAGACGAACCTCCGCTTGGGGCGCGCCCGCTTGGTTTC TGG(配列番号561)をアニーリングした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド対を、実施例9において用いたようなBsaIおよびKpnIで消化したスタッファーベクターpCW0359と連結し、SI-Bを含むpCW0467を生じた。次に、本発明者らは、実施例8由来の43の好ましいXTEN__AM432セグメントおよびpCW04

67由来のS I - Bセグメントを、実施例5に説明された同じ二量体化過程を用いてC末端において組み換えることによって、X T E N _ A M 4 4 3セグメントのライブラリーを生じた。この新たなX T E N _ A M 4 4 3セグメントのライブラリーをL C W 0 4 8 0と命名した。

【0326】

本発明者らは、X T E N _ A M 4 4 3セグメントのライブラリーL C W 0 4 8 0由来のセグメントおよびX T E N _ A M 8 7 5セグメントのライブラリーL C W 0 4 8 1由来のセグメントを、実施例5におけるのと同じ二量体化過程を用いて組み換えることによって、X T E N _ A M 1 3 1 8セグメントのライブラリーを生じた。この新たなX T E N _ A M 1 3 1 8セグメントのライブラリーをL C W 0 4 8 7と命名した。

10

【0327】

(実施例11：X T E N _ A D 8 6 4の構築)

いくつかの連続した回数の二量体化を用いて、本発明者らは、実施例1に列挙されたX T E N _ A D 3 6のセグメントから出発するX T E N _ A D 8 6 4の収集物を集めた。これらの配列を実施例5に説明されるように構築した。X T E N _ A D 8 6 4由来のいくつかの単離物を評価し、生理学的条件下で良好な発現および優れた溶解度を示すことが分かった。X T E N _ A D 5 7 6の1つの中間体コンストラクトを配列決定した。このクローンを、カニクイザルにおけるP K実験において評価し、約20時間の半減期を測定した。

【0328】

(実施例12：X T E N _ A F 8 6 4の構築)

いくつかの連続した回数の二量体化を用いて、本発明者らは、実施例3に列挙されたX T E N _ A F 3 6のセグメントから出発するX T E N _ A F 8 6 4の収集物を集めた。これらの配列を実施例5に説明される通り集めた。X T E N _ A F 8 6 4由来のいくつかの単離物を評価し、生理学的条件下で良好な発現および優れた溶解度を示すことが分かった。X T E N _ A F 5 4 0の1つの中間体コンストラクトを配列決定した。このクローンをカニクイザルにおけるP K実験において評価し、約20時間の半減期を測定した。X T E N _ A F 8 6 4の全長のクローンは、優れた溶解度を有し、カニクイザルにおいて60時間超の半減期を示した。実施例9に説明されるような配列決定アイランドを含む第二のセットのX T E N _ A F配列を構築した。

20

【0329】

(実施例13：X T E N _ A G 8 6 4の構築)

いくつかの連続した回数の二量体化を用いて、本発明者らは、実施例1に列挙されたX T E N _ A D 3 6のセグメントから出発するX T E N _ A G 8 6 4配列の収集物を集めた。これらの配列を実施例5において説明される通り集めた。X T E N _ A G 8 6 4由来のいくつかの単離物を評価し、生理学的条件下で良好な発現および優れた溶解度を示すことが分かった。X T E N _ A G 8 6 4の全長のクローンは、優れた溶解度を有し、カニクイザルにおいて60時間超の半減期を示した。

30

【0330】

(実施例14：X T E N構築物のN末端伸長の構築および12マーの追加ライブラリーのスクリーニング)

40

本実施例は、ヘルパードメインの存在なしで融合タンパク質のN末端にけるX T E N融合体の発現を可能にするよう翻訳の開始を促進するためのX T E Nタンパク質のN末端の最適なの工程を詳述する。歴史的に、N末端にX T E Nを有するタンパク質の発現は乏しく、G F P蛍光アッセイにおいて本質的に検出できないであろう値を生じる(N末端C B Dヘルパードメインによる発現の25%未満)。コドンレベルで多様性を作製するために、7のアミノ酸配列を選択し、コドンの多様性を用いて調製した。コドン多様性を有する12のアミノ酸をコードする7対のオリゴヌクレオチドを設計し、アニーリングし、N d e I / B s a I制限酵素で消化したスタッファーベクターp C W 0 5 5 1 (スタッファー-X T E N _ A M 8 7 5 - G F P)へと連結し、大腸菌B L 2 1 G o l d (D E 3)コンピテント細胞へと形質転換して、7ライブラリーのコロニーを得た。結果として生じるク

50

ローンは、発現をスクリーニングするためにGFP蛍光の使用を可能にするよう、XTEN_{AM875}-GFPにフレーム内で融合したN末端XTEN12マーを有する。7の作製されたライブラリー由来の個々のコロニーを拾い、96穴深皿プレートにおける500μLのスーパーブロス培地において飽和するまで一晚増殖させた。拾ったコロニー数は、ライブラリーの理論的多様性のおよそ半分～1/3に及んだ(表14を参照されたい)。

【0331】

【表14】

表14：12マーの追加ライブラリーについての理論的多様性およびサンプリング数。コドンの無作為化されたアミノ酸残基に下線を付す。

10

ライブラリー	モチーフファミリー	アミノ酸配列	配列番号	理論的多様性	スクリーニング数
LCW546	AE12	MAS <u>P</u> AGSPTSTEE	563	572	2プレート(168)
LCW547	AE12	MATSE <u>S</u> ATPESGP	564	1536	5プレート(420)
LCW548	AF12	MATSPSGESSTAP	565	192	2プレート(168)
LCW549	AF12	MESTSSTAESP <u>G</u> P	566	384	2プレート(168)
LCW552	AG12	MASSTPSGATGSP	567	384	2プレート(168)
LCW553	AG12	MEASPGTSSTGSP	568	384	2プレート(168)
LCW554	(CBD様)	MASTPESGSSG	569	32	1プレート(84)

20

飽和した一晚培養物を用いて、500μLの新鮮な培養物を自己誘導培地に接種し、この場合、該培養物を26℃で一晩増殖させた。次に、これらの発現培養物を蛍光プレートリーダー(励起395nm、発光510nm)を用いてアッセイし、GFPリポータータンパク質の量を決定した(発現アッセイの結果については図28を参照されたい)。本結果は、発現レベルの中央値が、「水準点」のCBD-N末端ヘルパードメインと比較して発現レベルのおよそ半分であるのに対し、ライブラリー由来の最良のクローンは、水準点に対して非常により近いことを示し、該配列の周囲のさらなる最適化が保証されることを示した。このことは、CBD-N末端水準点の25%未満の発現レベルである先行XTENバージョンとは対照的である。本結果は、アミノ酸MAで始まるライブラリーが、MEで始まるものよりも良好な発現レベルを有したことも示す。このことは、最良のクローンでみると最も明らかであり、MAで主に始まるので、水準点に対してより近かった。CBD-AM875水準点の33%内の176のクローンのうち87%はMAで始まり、MAで始まるライブラリーにおける配列の75%に過ぎないので、最高レベルの発現でMAで始まるクローンの明らかに過剰な提示があった。最良のクローンのうち96を配列決定して、同一性および12の配列を確認し(表15を参照されたい)、LCW546由来の4、LCW547由来の4、およびLCW552由来の4をさらなる最適化のために選択した。

30

40

【0332】

【表 1 5】

表 1 5 : 進行した 1 2 マー DNAヌクレオチド配列

クローン	DNAヌクレオチド配列	配列番号
LCW546_02	ATGGCTAGTCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACT	570
LCW546_06	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACT	571
LCW546_07	ATGGCTAGTCCAGCAGGCTCTCCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACT	572
LCW546_09	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACT	573
LCW547_03	ATGGCTACATCCGAAAGCGCAACCCCTGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACT	574
LCW547_06	ATGGCTACATCCGAAAGCGCAACCCCTGAATCTGGTCCAGGTACTTCTACT	575
LCW547_10	ATGGCTACGTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTACT	576
LCW547_17	ATGGCTACGTCCGAAAGCGCTACCCCTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTACT	577
LCW552_03	ATGGCTAGTTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTACTTCTACT	578
LCW552_05	ATGGCTAGCTCCACTCCGCTCTGGTGCTACTCGGTTCCCCAGGTACTTCTACT	579
LCW552_10	ATGGCTAGCTCTACTCCGCTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTACTTCTACT	580
LCW552_11	ATGGCTAGTTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTTCTACT	581

(実施例 1 5 : X T E N 構築物の N 末端伸長の構築ならびにコドン 3 およびコドン 4 を最適化するライブラリーのスクリーニング)

本実施例は、ヘルパードメインの存在なしでタンパク質の N 末端において X T E N 融合体の発現を可能にするための翻訳の開始を促進するための X T E N タンパク質の N 末端の最適化における工程を詳述する。確立された第一の 2 つのコドンについての優先性ととも (上述の実施例を参照されたい)、第三および第四のコドンは無作為化して優先性を決定した。L C W 5 4 6、L C W 5 4 7、および L C W 5 5 2 由来の最良のクローンに基づいた 3 つのライブラリーを、許容可能な X T E N コドンのすべての組み合わせが第三および第四の残基の位置に存在するよう修飾されたこれらの残基を用いて設計した。各ライブラリーについて許容可能な X T E N コドンすべてを含むために、第三および第四の残基のコドン多様性を有する 1 2 のアミノ酸をコードする 9 対のオリゴヌクレオチド設計し、アニールし、N d e I / B s a I 制限酵素で消化したスタッファーベクター p C W 0 5 5 1 (S t u f f e r - X T E N _ A M 8 7 5 - G F P) へと連結し、大腸菌 B L 2 1 G o l d (D E 3) コンピテント細胞へと形質転換し、3 つのライブラリー L C W 0 5 6 9 ~ 0 5 7 1 のコロニーを得た。作製した 3 つのライブラリー由来の合計 5 0 4 の個々のコロニーを拾い、9 6 穴深皿プレートにおける 5 0 0 μ L のスーパーブロス培地において飽和するまで一晚増殖させた。このことは、相対的なライブラリー性能および配列優先性を理解するのに十分な適用範囲を提供した。飽和した一晚培養物を用いて、新たな 5 0 0 μ L の培養物を自己誘導培地において接種し、該培地において 2 6 ° C で一晚増殖させた。これらの発現培養物を次に、蛍光プレートリーダー (励起 3 9 5 n m、発光 5 1 0 n m) を用いてアッセイして、存在する G F P リポーターの量を決定した。スクリーン由来の上位 7 5 クローンを配列決定し、G F P リポーター発現対基準点試料について再度試験した (図 2 8 を参照されたい。)。5 2 のクローンは、使用可能な配列決定データを生じ、その後の分析に用いた。結果は、ライブラリーによって分類され、L C W 5 4 6 が優れたライブラリーであったことを示す。結果を表 1 6 に呈する。驚くべきことに、最良のクローンについての基本的な蛍光読み取りは ~ 9 0 0 A U であるのに対し、C B D N 末端基準点は ~ 6 0 0 A U に過ぎないことが発見された。このことは、このライブラリーが、C B D N 末端基準点に対して発現においてほぼ等しい先行ライブラリー由来の最良クローンを上回るおよそ 3 3 % の改良を生じた (実施例 1 4)。

【 0 3 3 3 】

【表 1 6】

表16：第三および第四のコドン最適化ライブラリー比較

	LCW569	LCW570	LCW571
個数	21	15	16
平均蛍光 (AU)	628	491	537
標準偏差	173	71	232
変動係数	28%	15%	43%

さらなる傾向が、第三および第四の位置における特定のコードンについての優先性を示すデータにおいて見られた。LCW569ライブラリー内で、第三の位置におけるグルタミン酸コードンGAA、およびトレオニンコードンACTは、表17において見られるようにより高い発現と関係した。

【0334】

【表 1 7】

表17：LCW569における好ましい第三および第四のコードン

	3 =GAA	残部	4 = ACT	残部
個数	8	13	4	17
平均蛍光 (AU)	749	554	744	601
標準偏差	234	47	197	162
変動係数	31%	9%	26%	27%

加えて、上位75クロンの再試験は、いくつかが基準点クロンよりも今や優れていることを示した。

【0335】

実施例16：XTEN構築のN末端伸長の構築ならびに組み合わせの12マーおよび36マーのライブラリーのスクリーニング

本実施例は、ヘルパードメインの存在なしでタンパク質のN末端においてXTEN融合体の発現を可能にするための翻訳の開始を促進するためのXTENタンパク質のN末端の最適化における工程を詳述する。確立された第一の2つのコードンについての優先性とともに（上述の実施例を参照されたい）、まさにN末端における12の選択された12マー配列（上述の実施例を参照されたい）に続いて、125の既に構築された36マーセグメント（上述の実施例を参照されたい）を組み合わせ様式によって組み合わせることによって、N末端をより広範な文脈において検討した。このことは、XTENタンパク質のN末端における新規の48マーを作製し、より長い配列の発現に及ぼすN末端におけるより長い範囲の相互作用の影響の評価を可能にした（図29）。36マーを組み立てるのに用いられた二量体化手順と同様に（上述の実施例を参照されたい）、125の選択された36マーセグメントを含むプラスミドを制限酵素BbsI/NcoIで消化し、適切な断片をゲル精製した。クロンAC94由来のプラスミド（CBD-XTEN-AM875-GFP）もBsaI/NcoIで消化し、適切な断片をゲル精製した。これらの断片を互いに連結し、大腸菌BL21Gold（DE3）コンピテント細胞へと形質転換し、まさにN末端における12の選択された12マーをさらにクローニングするためのベクターとしても機能するライブラリーLCW0579のコロニーを得た。LCW0579のプラスミドをNdeI/EcoRI/BsaIで消化し、適切な断片をゲル精製した。12の選択された12マー配列をコードする12対のオリゴヌクレオチドを設計し、アニーリングし、NdeI/EcoRI/BsaIで消化したLCW0579ベクターと連結し、大腸菌BL21Gold（DE3）コンピテント細胞へと形質転換し、ライブラリーLCW0580のコロニーを得た。1500の独特なクロンの理論的多様性ととともに、作製された

10

20

30

40

50

ライブラリー由来の合計 1 5 1 2 の個々のコロニーを拾い、9 6 穴深皿プレートにおける 5 0 0 μ L のスーパーブロス培地において飽和するまで一晩増殖させた。このことは、相対的なライブラリーの性能および配列の優先性を理解するのに十分な適用範囲を提供した。一晩飽和させた培養物を用いて、自己誘導培地に新たな 5 0 0 μ L 培養物を摂取し、2 6 $^{\circ}$ C で一晩増殖させた。次に、これらの発現培養物を、蛍光プレートリーダー（励起 3 9 5 nm、発光 5 1 0 nm）を用いてアッセイし、存在する G F P リポーターの量を決定した。上位 9 0 のクローンを配列決定し、G F P リポーター発現について再試験した。8 3 のクローンは、使用可能な配列決定データを生じ、その後の分析に用いた。配列決定データを用いて、各クローンに存在する導出 1 2 マーを決定し、発現に及ぼす各 1 2 マーの影響を評価した。クローン L C W 5 4 6 _ 0 6 および L C W 5 4 6 _ 0 9 は、優れた N 末端

10

【 0 3 3 6 】

【表 1 8】

表 18 : LCW546_06 および LCW549_09 で開始するクローンの相対的な性能

	LCW546_06	その他	LCW546_09	その他
個数	11	72	9	74
平均蛍光 (AU)	1100	752	988	775
標準偏差	275	154	179	202
変動係数	25%	20%	18%	26%

20

配列決定および再試験は、類似の結果を生じるデータにおける同じ張りえつの独立した複製物のいくつかの場合も明らかにし、本アッセイにおける信頼性を増大させた。加えて、6 の独特な配列を有する 1 0 のクローンは、基準点クローンよりも優れていた。該 1 0 のクローンを表 1 9 に呈する。これらは、これらの配列の唯一の発生であり、いずれの場合においても、これらの配列のうちの 1 つが生じかつ基準点クローンに勝り損ねることはないことが特筆された。これら 6 つの配列をさらなる最適化のために進行させた。

【 0 3 3 7 】

【表 1 9 - 1】

表 1 9 : 基準点クローンよりも優れた組み合わせの 1 2 マーククローンおよび 3 6 マーククローン

30

クローン名	最初の 6 0 のコドン	配列番号	12 マー名	36 マー名
LCW580_51	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACTGAGGAAGGTGCATCCCCGGGCACC AGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTAC CCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTA GCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGC AGCGCA	582	LCW546_06	LCW0404_040
LCW580_81	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACTGAGGAAGGTGCATCCCCGGGCACC	583	LCW546_06	LCW0404_040

40

【 0 3 3 8 】

【表 19-2】

クローン名	最初の60のコドン	配列番号	12マー名	36マー名
	AGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTAC CCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTA GCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGC AGCGCA			
LCW580_38	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCGT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCCAGC AGGTCTCTCTACCTCCACCGAGGAAGGTA CTTCTACCGAACCCTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGG CAGCGCA	584	LCW546_06	LCW0402_041
LCW580_63	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTC TACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCGT CTGAAGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCCGGTTCTGAAACCCAGGTA GCCAGCAGGTCTTCCAATTCTACTGAA GAAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGG CAGCGCA	585	LCW546_09	LCW0402_020
LCW580_06	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACTGAGGAAGGTACCCCGGTAGCGGT ACTGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACC CCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGC TTCTCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGC AGCGCA	586	LCW546_06	LCW0404_031
LCW580_35	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTC TACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCGT CTGAAGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCCGGTTCTGAAACCCAGGTA GCCAGCAGGTCTTCCAATTCTACTGAA GAAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGG CAGCGCA	587	LCW546_09	LCW0402_020
LCW580_67	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTC TACTGAGGAAGGTACCTCCCTAGCGGCG AATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTA GCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACC TCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACC AGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCA GCGCA	588	LCW546_09	LCW0403_064
LCW580_13	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTC TACTGAGGAAGGTACCTCTACTCCGGA GCGGTTCCGCATCTCCAGGTCTACCAGC GAATCCCGTCTGGCACCACCGAGGTTT TACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGC AGCGCA	589	LCW546_09	LCW0403_060
LCW580_88	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTC TACTGAGGAAGGTACCTCCCTAGCGGCG AATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTA GCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACC TCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACC AGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCA GCGCA	590	LCW546_09	LCW0403_064
LCW580_11	ATGGCTAGTCCTGCTGGCTCTCCGACCTC TACTGAGGAAGGTACCTCTACTCCGGA GCGGTTCCGCATCTCCAGGTCTACCAGC GAATCCCGTCTGGCACCACCGAGGTTT TACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGC AGCGCA	591	LCW546_09	LCW0403_060

実施例 17 : X T E N 構築物の N 末端伸長の構築ならびに X T E N - A M 8 7 5 および
X T E N - A E 8 6 4 のための組み合わせ 12 マーおよび 36 マーのライブラリーのスク

10

20

30

40

50

リーニング

本実施例は、ヘルパードメインの存在なしでタンパク質のN末端におけるX T E N融合体の発現を可能にするための翻訳の開始を促進するためのX T E Nタンパク質のN末端の最適化における工程を詳述する。N末端の最初の4つのコドンについての（上述の実施例を参照されたい）、ならびに確立されたN末端の12マーおよび36マーの最良の対形成のための優先性とともに、組み合わせアプローチに取り掛かり、これらの優先性の合体を検討した。このことは、X T E Nタンパク質のN末端において新規の48マーを作製し、先行する結論の合流性の試験を可能にした。加えて、これらのリーダー配列がすべてのX T E Nタンパク質の一般的な解決策である能力を、X T E N-A E 8 6 4およびX T E N-AM 8 7 5の両方の前に新たな48マーを配置することによって評価した。36マーセグメントの125のクローンすべてを用いる代わりに、最良のG F P発現を有する36マーセグメントの6の選択されたクローン由来のプラスミドをN d e I / E c o R I / B s a Iで消化し、適切な断片をゲル精製した。クローンAC 9 4 (C B D-X T E N-AM 8 7 5-G F P) およびAC 1 0 4 (C B D-X T E N-A E 8 6 4-G F P) 由来のプラスミドをN d e I / E c o R I / B s a Iで消化し、適切な断片をゲル精製した。これらの断片を出該に連結し、大腸菌B L 2 1 G o l d (D E 3) コンピテント細胞へと形質転換し、ライブラリーL C W 0 5 8 5 (-X T E N-AM 8 7 5-G F P) およびL C W 0 5 8 6 (-X T E N-A E 8 6 4-G F P) のコロニーを得、これも、まさにN末端における8の選択された12マーをさらにクローニングするためのベクターとして機能することができた。L C W 0 5 8 5 およびL C W 0 5 8 6 のプラスミドをN d e I / E c o R I / B s a Iで消化し、適切な断片をゲル精製した。先の（発生2）のスクリーニングにおいて最良のG F P発現を有する8の選択された12マー配列をコードする8対のオリゴヌクレオチドを設計し、アニーリングし、N d e I / E c o R I / B s a Iで消化したL C W 0 5 8 5 およびL C W 0 5 8 6 ベクターと連結し、大腸菌B L 2 1 G o l d (D E 3) コンピテント細胞へと形質転換し、最終的なライブラリーL C W 0 5 8 7 (X T E N-AM 9 2 3-G F P) およびL C W 0 5 8 8 (X T E N-A E 9 1 2-G F P) のコロニーを得た。48の独特なクローンの理論的多様性とともに、作製されたライブラリー由来の合計252の個々のコロニーを拾い、96穴深皿プレートにおいて500 μ Lのスーパーブロス培地において飽和するまで一晚増殖させた。このことは、相対的なライブラリー性能および配列優先性を理解するのに十分な適用範囲を提供した。一晚飽和させた培養物を用いて、新たな500 μ Lの培養物を自己誘導培地に接種し、これを26 $^{\circ}$ Cで一晩増殖させた。これらの発現培養物を次に、蛍光プレートリーダー（励起395 nm、発光510 nm）を用いてアッセイし、存在するG F Pリポーターの量を決定した。上位36のクローンを配列決定し、G F Pリポーター発現について再試験した。36のクローンは、使用可能な配列決定データを生じ、これらの36をその後の分析に用いた。配列決定データは、クローンに存在する12マー、第三のコドン、第四のコドン、および36マーを決定し、クローンの多くが、同じ配列の独立した複製物であることを明らかにした。加えて、これらのクローンについての再試験結果は値が近く、スクリーニング手順が頑強であったことを示す。N末端におけるある組み合わせについての優先性を観察し、該優先性は、基準点対照よりもおよそ50%大きなより高い蛍光値を一致して生じた（表20および表21を参照されたい）。これらのデータは、最適化されたN末端X T E Nをコードする配列の融合タンパク質遺伝子への包含が、融合タンパク質の発現に顕著な亢進を与えるという結論を支持する。

【0339】

【表 2 0】

表 20 : XTEN-AM875 についての好ましい N 末端の組み合わせ

クローン名	複製物数	12マー	36マー	平均	標準 偏差	変動 係数
CBD-AM875	非入手	非入手	非入手	1715	418	16%
LCW587_08	7	LCW546_06_3=GAA	LCW404_40	2333	572	18%
LCW587_17	5	LCW546_09_3=GAA	LCW403_64	2172	293	10%

【 0 3 4 0】

10

【表 2 1】

表 21 : XTEN-AE864 についての好ましい N 末端の組み合わせ

クローン名	複製物数	12マー	36マー	平均	標準 偏差	変動 係数
AC82	非入手	非入手	非入手	1979	679	24%
LCW588_14	8	LCW546_06_opt3	LCW404_31	2801	240	6%
LCW588_27	2	LCW546_06_opt34	LCW404_40	2839	556	15%

顕著なことに、X T E N - A M 8 7 5 についての N 末端の好ましい組み合わせおよび X T E N - A E 8 6 4 についての好ましい組み合わせは同じではなく、開始部位由来の 1 5 0 塩基よりもさらにより複雑な相互作用が発現レベルに影響することを示す。好ましいヌクレオチド配列についての配列を表 2 2 に列挙し、好ましいクローンを S D S - P A G E によって分析して、発現を独立して確認した（図 3 0 を参照されたい）。X T E N - A M 9 2 3 および X T E N - A E 9 1 2 の完全な配列をさらなる分析のために選択した。

20

【 0 3 4 1】

【表 2 2】

表 2 2 : N 末端の X T E N - A M 8 7 5 および X T E N - A E 8 6 4 の最初の 4 8 アミノ酸残基についての好ましいヌクレオチド配列

30

クローン名	修飾された XTEN	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
LCW587_08	AM875	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTGCA TCCCCGGGCACCAAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCT ACTGGCTCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCA	592
LCW587_17	AM875	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACC TCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGC GGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCT TCTACCGCACCAAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCA	593
LCW588_14	AE864	ATGGCTGAACCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTACC CCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTT CTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCAAGCTCTA CCGGTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAG	594
LCW588_27	AE864	ATGGCTGAACTGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTGCA TCCCCGGGCACCAAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCT ACTGGCTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAG	595

40

C F X T E N 組成物を作製および評価するための一般的なスキームは図 3 3 に呈され、本実施例の一般的な説明についての基礎を形成する。実例となる実施例に提供されるガイドダンスとともに、開示された方法および当業者に公知の方法を用いて、当業者は、X T E N と C F と当該技術分野で公知の C F のバリエーションを含むある範囲の C F X T E N 融合

50

タンパク質を作製および評価することができる。本実施例はそれゆえ、単に説明目的として解釈されるべきであり、任意のやり方の方法は何でも制限されず、幾多の変法は、当業者に明らかである。本実施例において、モチーフのA EファミリーのX T E Nに連結された凝固因子のC F X T E Nを作製する。

【0342】

X T E Nをコードするポリヌクレオチドを作製するための一般的なスキームを図31および図32に呈する。図32は、本発明の実施態様のうちの1つにおけるX T E Nポリヌクレオチドコンストラクトの構築体における代表的な工程の模式的流れ図である。個々のオリゴヌクレオチド501を12のアミノ酸モチーフ（「12マー」）などの配列モチーフ502へとアニーリングし、それをその後、B b s IおよびK p n I制限部位を含むオリゴ503と連結する。モチーフライブラリーは、具体的な配列のX T E Nファミリー、例えば、表3のA D、A E、A F、A G、A M、またはA Q配列に限定することができる。この場合、A Eファミリーのモチーフをモチーフライブラリーとして用い、それを12マーにアニーリングし、「構築ブロック」長、例えば、36アミノ酸をコードするセグメントを作製する。X T E N配列をコードする遺伝子は、所望の長さのX T E N遺伝子504が達成されるまで、「構築ブロック」の連結および他量体化によって構築されることができる。図32に示すように、この場合のX T E N長は、48アミノ酸残基であるが、より長い長さをこの過程によって達成することができる。例えば、多量体化は、連結、重複伸長、P C R構築、または当該技術分野で公知の類似のクローニング技術によって実施されることができる。X T E N遺伝子は、スタッパーベクターへとクローニングすることができる。図32に示される例において、ベクターは、F l a g配列506に次いで、B s a I、B b s IおよびK p n I部位によって隣接されるスタッパー配列507、およびC F遺伝子（例えば、F V I I）508をコードすることができ、結果的にC F X T E N 500をコードする遺伝子を生じ、この場合、該遺伝子は、X T E N－F V I IのN末端からC末端への構成における融合タンパク質をコードする。当業者に明らかなように、該方法は、代替的な構築におけるおよびX T E N長さの変動する、コンストラクトを作製するために適用することができる。

【0343】

C FをコードするD N A配列は、適切な細胞源から、ゲノムライブラリーから調製されたc D N Aライブラリーから当該技術分野で公知の標準的な手順によって簡便に得ることができ、または公共的に入手可能なデータベース、特許、もしくは文献の参考文献から得られたD N A配列を用いて合成的に作製され得る（例えば、自動核酸合成）。該タンパク質のC F部分をコードする遺伝子もしくはポリヌクレオチドまたはその相補体を次に、生物系における高レベルのタンパク質発現に適切な転写配列および翻訳配列の制御下で、プラスミドまたは他のベクターであり得る本明細書に説明されるものなどのコンストラクトにクローン化することができる。（48のアミノ酸残基を有するX T E Nとして示される図32の場合の）X T E N部分をコードする第二の遺伝子もしくはポリヌクレオチドまたはその相補体は、連結または多量体化の工程を通じて、C Fをコードする遺伝子とフレーム内で隣接したコンストラクトへとクローン化することによって、C F遺伝子の末端をコードするヌクレオチドに遺伝子的に融合することができる。この様式において、C F X T E N融合タンパク質R eをコードする（またはそれに相補的な）キメラD N A分子は、コンストラクト内に生じた。任意に、第二のX T E Nをコードする遺伝子を、C F X T E N遺伝子の反対側末端をコードするヌクレオチドへと挿入しおよびフレーム内で連結し、またはC Fコード領域内に挿入することができる。コンストラクトは、異なる構成で設計されて、融合パートナーの種々の順列を単量体ポリペプチドとしてコードすることができる。例えば、遺伝子は、以下の順序の融合タンパク質：C F－X T E N、X T E N－C F、C F－X T E N－C F、X T E N－C F－X T E N、および前述の多量体をコードするために作製されることができる。任意に、このキメラD N A分子をより適切な発現ベクターである別のコンストラクトへと転移またはクローン化する。この時点で、キメラD N A分子を発現することのできる宿主細胞をキメラD N A分子で形質転換する。上述に説明され

10

20

30

40

50

るように、関心対象のDNAセグメントを含むベクターを周知の方法によって適切な宿主細胞へと、細胞宿主の種類に応じて転移させることができる。

【0344】

XTEN-CF発現ベクターを含む宿主細胞を、プロモーターを活性化させるのに適したように修飾された従来の栄養物質培地において培養する。温度、pH、およびこれらの類似項目などの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞とともにすでに用いられたものであり、当業者に明らかである。融合タンパク質の発現後、培養ブ罗斯を回収し、細胞塊から分離し、結果として生じる粗抽出物は、融合タンパク質の精製のために保持した。

【0345】

遺伝子発現を、試料中で直接、例えば、従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量するためのノザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットブロット法 (DNA分析)、またはインサイツハイブリッド形成によって、適切に標識されたプローブを用いて、本明細書に提供される配列に基づいて測定する。あるいは、遺伝子発現を、遺伝子産物の発現を直接定量するための細胞の免疫組織化学的染色などの免疫学的な蛍光法によって測定する。免疫組織化学的染色および/または試料流体のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルもしくはポリクローナルのいずれかであり得、任意の哺乳類において調製され得る。簡便に、抗体は、本明細書に提供される配列に基づいた合成ペプチドを用いたCF配列ポリペプチドに対して、またはCFに融合しかつ特異的な抗体エпитープをコードする外来性配列調製され得る。選択可能なマーカーの例は当業者に周知であり、高感度緑色蛍光タンパク質、ベクターガラクトシダーゼ (β -gal)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) などのリポーターを含む。

【0346】

CFXTENポリペプチド産物は、当業者に公知の方法を介して精製される。ゲル濾過、アフィニティ精製、塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト吸着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、またはゲル電気泳動法などの手順は、精製に用いられ得る技術すべてである。精製に関する具体的な方法は、Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor, ed., Springer-Verlag 1994、およびSambrook, et al., 上述に説明されている。多工程精製分離はまた、Baron, et al., Crit. Rev. Biotechnol. 10:179-90 (1990) およびBelow, et al., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994) に説明されている。

【0347】

図33に示されるように、単離されたCFXTEN融合タンパク質を次に、それらの化学特性および活性特性について特徴づけるであろう。単離された融合タンパク質を例えば、配列、純度、見かけの分子量、溶解度、および安定性について、当該技術分野で公知の標準的な方法を用いて特徴づける・期待される標準物質に見合う融合タンパク質は次に、活性について評価されるであろうし、該活性は、インビトロまたはインビボにおいて、本明細書に開示される1つ以上のアッセイを用いて、または実施例もしくは表40のアッセイを用いて、本明細書に説明される凝固因子関連パラメータのうちの1つを測定することによって測定することができる。

【0348】

加えて、XTEN-CF融合タンパク質を、1つ以上の動物種に投与して、実施例30~33において説明されるように、標準的な薬物動態パラメータおよび薬力学的特性を決定する。

【0349】

CFXTENコンストラクトを生成、発現、および回収する反復過程の後に、本明細書

10

20

30

40

50

に開示された方法または当該技術分野で公知のその他を用いた該コンストラクトの特徴づけによって、CFとXTENとを含むCFXTEN組成物を当業者によって作製および評価して、相応の融合していないCFと比較して全体的な亢進した治療活性をもたらす、亢進した溶解度、亢進した安定性、改良した薬物動態、および低下した免疫原性などの期待される特性を確認することができる。所望の特性を有さない該融合タンパク質について、このような特性を有する組成物を得るために、異なる配列をこれらの方法によって構築、発現、単離、および評価することができる。

【0350】

実施例19：FVII-XTENのための発現プラスミドの構築

FVII-TEV-XTEN864の発現ベクターの構築

FVIIをコードする遺伝子を含むクローニングベクターをOriGene (SC109205) から購入した。PCR反応を実施して、FVIIコード領域内のBbsIおよびBsaI制限部位を消滅させた。結果として生じるFVIIコード領域を次に、5'末端および3'末端にそれぞれNheIおよびTEV-BsaI配列を導入したプライマーを用いて増幅した。消化したFVII断片を、BsaI/HindIIIで消化したXTEN__AE864断片に融合して、NheI/HindIIIで消化したpSecTag2C発現ベクターへと挿入した。連結したDNA混合物をXL1-Blue細菌細胞へと電気穿孔した。形質転換体をDNAミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトをDNA配列決定によって確認した。最終的なコンストラクトは、FVII-TEV-XTEN__AE864タンパク質をコードするpCW0647.001である (表23)。

【0351】

FVII-XTEN864の発現ベクターの構築

pCW0647.001をテンプレートとして用いて、FVIIを増幅した。PCRプライマーは、5'末端および3'末端にそれぞれNheIおよびBsaI制限酵素認識配列を導入し、TEV部位を欠失した。NheI/BsaIで消化したFVII断片をBsaI/HindIIIで消化したXTEN__AE864断片に融合し、NheI/HindIIIで消化したpSecTag2C発現ベクターへと挿入した。連結したDNA混合物をXL1-Blue細菌細胞へと電気穿孔した。形質転換体をDNAミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトをDNA配列決定によって確認した。最終的なコンストラクトは、FVII-XTEN__AE864タンパク質をコードするpCW0645.001である (表23)。

【0352】

Milliporeプラスミドを用いてFVII-XTEN864の遺伝子をコードする発現ベクターの構築

発現ベクターpCW0645.001をNheIおよびSalIで消化した。結果として生じる4091bp断片は、FVII-XTEN__AE864タンパク質をコードするヌクレオチドを含んでいた。この断片をNheI/SalIで消化したCET1019-AS-puro、CET1019-HS-puro、SC AS-puro、またはDC HS-puro (Milliporeから認可) と連結した。これらのベクターは、遺伝子挿入部位の上流に存在するCMVプロモーターを特長とし、CET1019ベクターは、該プロモーターの上流にUCOE要素も含む。連結したDNA混合物をXL1-Blue細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体をDNAミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトをDNA配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、AC397 (pBC0013、SC AS-puro-FVII-XTEN__AE864)、AC402 (pBC0014、SC HS-puro-FVII-XTEN__AE864)、AC403 (pBC0015、CET1019 AS-puro-FVII-XTEN__AE864)、およびAC404 (pBC0016、CET1019 HS-puro-FVII-XTEN__AE864) であった。

【0353】

F V I I - X T E N 2 8 8 遺伝子をコードする発現ベクターの構築

発現ベクター p C W 0 6 4 5 . 0 0 1 を B s a I および H i n d I I I で消化した。結果として生じる 6 4 0 0 b p 断片を B s a I / H i n d I I I で消化した X T E N _ A E 2 8 8 断片と連結した。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、p B C 0 0 1 9 (p S e c T a g 2 C - F V I I - X T E N _ A E 2 8 8) であった。

【 0 3 5 4 】

発現ベクター p B C 0 0 1 9 を N h e I および S a l I で消化した。結果として生じる 2 3 6 3 b p の断片は、F V I I - X T E N _ A E 2 8 8 タンパク質をコードするヌクレオチドを含んでいた。この断片を、N h e I / S a l I で消化した C E T 1 0 1 9 - A S - p u r o 、または C E T 1 0 1 9 - H S - p u r o (M i l l i p o r e から認可) と連結した。これらのベクターは、遺伝子挿入部位の上流に存在する C M V プロモーターおよび U C O E 要素を特長とする。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、A C 4 0 5 (p B C 0 0 1 7 、 C E T 1 0 1 9 A S p u r o - F V I I - X T E N _ A E 2 8 8) 、および A C 3 9 8 (p B C 0 0 1 8 、 C E T 1 0 1 9 H S p u r o - F V I I - X T E N _ A E 2 8 8) であった (表 2 3) 。

【 0 3 5 5 】

【表 2 3 - 1 】

表 2 3 : F V I I アミノ酸配列および核酸配列

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
FVII-TEV-XTEN_AE864, pCW0647.001	MVSQALRLLCLLLGLQ GCLAAVFVTQEEAHGV LHRRRRANAFLEELRP GSLERECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLFWISY SDGDQCASSPCQNGGS CKDQLQSYICFCLPAFE GRNCETHKDDQLICVN ENGGCEQYCSDHGTGK	596	ATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCT GCCTTCTGCTTGGGCTTCAGGGCTGCCT GGCTGCAGTGTTTCGTAACCCAGGAGGA AGCCACGGCGTCCTGCACCGGCGCCG GCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCT ACGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTG CAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGA GGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGA GAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCCTAC	597

【 0 3 5 6 】

【表 2 3 - 2】

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	RSCRCHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEK RNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLNGA QLCGGTLINTIWVVSAA HCFDKIKNWRNLI AVL GEHDLSEHDGDEQSRR VAQVIIPSTYVPGTTNH DIALLRHLQPVVLTDH VVPCLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLM TQDCLQQSRKVGDSJNI TEYMFCAGYSDGSKDS CKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATV GHFGVYTRVSQYIEWL QKLMRSEPRPGVLLRA PFPGPEGPSENLYFQGG SPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES		AGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGT CCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAG GACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCT GCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGT TGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGAT CTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGA GCAGTACTGCAGTGACCACACGGGCAC CAAGCGCTCCTGTCTGGTGCCACGAGGG GTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCC TGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTG GAAAAATACCTATTCTAGAAAAAGAA ATGCCAGCAAAACCCCAAGGCCGAATTG TGGGGGGCAAGGTGTGCCCAAGGGGG AGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGT GAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCC GCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAG AACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTG GGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGAC GGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCG CAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCC CGGGCACCACCAACACGACATCGCGC TGCTCCGCCTGACCAAGCCGTGTGCTCT CACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACG CTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCA GCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTG GCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTT CAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGA CTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGG AGACTCCCCAAATATCACGGAGTACAT GTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGA GGCCACATGCCACCCACTACCGGGGC ACGTGTTACTGTACGGGCATCGTACGCT GGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCA GTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCAT GCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCCT CCTGCGAGCCCCATTTCCCGGCCAGAA GGCCCATCCGAAAATCTGTATTTTCAGG GTGGGTCTCCAGGTTCTCCAGCCGGGTC CCCAACTTCGACCGAGGAAGGGACCTC CGAGTCAGCTACCCCGAGTCCGGTCTT GGCACCTCCACGGAACCATCGGAGGGC AGCGCCCTCGGGAGCCCTGCGGGAGC CCTACAAGCACCAGAGGGCACCAGT ACAGAGCCAAGTGAGGGGAGCGCCCTT GGTACTAGTACTGAACCATCCGAGGGG TCAGCTCCAGGCACGAGTGAGTCCGCTA CCCCCGAGAGCGGACCGGGCTCAGAGC CCGCCACGAGTGGCAGTGAAACTCCAG GCTCAGAAACCCGCCACTAGTGGGTGAG AGACTCCAGGCAGCCCTGCCGGATCCCC TACGTCCACCGAGGAGGGAACATCTGA GTCCGCAACACCCGAATCCGGTCCAGG CACCTCCACGGAACCTAGTGAAGGCTC GGCACCAGGTACAAGACCCGAACCTAG CGAGGGCAGCGCTCCCGGCAGCCCTGC	

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	GPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSSS		CGGCAGCCCCAACCTCAACTGAGGAGGG CACCAGTACTGAGCCAGCGAGGGATC AGCACCTGGCACCAGCACCGAACCTAG CGAGGGGAGCGCCCTGGGACTAGCGA GTCAGCTACACCAGAGAGCGGGCCTGG AACTTCTACCGAACCCAGTGAGGGATCC GCTCCAGGCACCTCCGAATCCGCAACCC CCGAATCCGGACCTGGCTCAGAGCCCCG CCACAGCGGGAGCGAAACCCCTGGCA CATCCACCGAGCCTAGCGAAGGGTCCG CACCCGGCACCACTACAGAGCCTAGCG AGGGATCAGCACCTGGCACCAGTGAAT CTGCTACACCAGAGAGCGGCCCTGGAA CCTCCGAGTCCGCTACCCCCGAGAGCGG GCCAGGTTCTCCTGCTGGCTCCCCACC TCAACAGAAGAGGGGACAAGCGAAAGC GCTACGCCTGAGAGTGGCCCTGGCTCTG AGCCAGCCACCTCCGGCTCTGAAACCCC TGGCACTAGTGAGTCTGCCACGCTGAG TCCGGACCCGGGACCTCTACTGAGCCCT CGGAGGGGAGCGCTCCTGGCACGAGTA CAGAACCTTCCGAAGGAAGTGCACCGG GCACAAGCACCGAGCCTTCCGAAGGCT CTGCTCCCGGAACCTCTACCGAACCTC TGAAGGGTCTGCACCCGGCACGAGCAC CGAACCCAGCGAAGGGTTCAGCGCCTGG GACCTCAACAGAGCCCTCGGAAGGATC AGCGCCTGGAAGCCCTGCAGGGAGTCC AACTTCCACGGAAGAAGGAACGTCTAC AGAGCCATCAGAGGGGTCCGCACCAGG TACCAGCGAATCCGCTACTCCCGAATCT GGCCCTGGGTCCGAACCTGCCACCTCCG GCTCTGAAACTCCAGGGACCTCCGAATC TGCCACACCCGAGAGCGGCCCTGGCTCC GAGCCCGCAACATCTGGCAGCGAGACA CCTGGCACCTCCGAGAGCGCAACACCC GAGAGCGGCCCTGGCACCAAGCACCGAG CCATCCGAGGGATCCGCCCCAGGCACTT CTGAGTCAGCCACACCCGAAAGCGGAC CAGGATCACCCGCTGGCTCCCCACCAG TACCGAGGAGGGGTCCCCCGCTGGAAG TCCAACAAGCACTGAGGAAGGGTCCCC TGCCGGCTCCCCACAAGTACCGAAGA GGGCACAAGTGAGAGCGCCACTCCCGA GTCCGGGCCTGGCACCAAGCACAGAGCC TTCCGAGGGGTCCGCACCAGGTACCTCA GAGTCTGCTACCCCCGAGTCAGGGCCA GGATCAGAGCCAGCCACCTCCGGGTCT GAGACACCCGGGACTTCCGAGAGTGCC ACCCCTGAGTCCGGAACCCGGGTCCGAG CCCGCCACTTCCGGCTCCGAAACTCCCG GCACAAGCGAGAGCGCTACCCCAGAGT CAGGACCAGGAACATCTACAGAGCCCT CTGAAGGCTCCGCTCCAGGGTCCCCAGC CGGCAGTCCCCTAGCACCGAGGAGGG AACCTCTGAAAGCGCCACACCCGAATC AGGGCCAGGGTCTGAGCCTGCTACAG CGGCAGCGAGACACAGGCACCTCTGA GTCCGCCACACCAGAGTCCGGACCCGG	

【表 2 3 - 4】

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			ATCTCCCGCTGGGAGCCCCACCTCCACT GAGGAGGGATCTCCTGCTGGCTCTCCAA CATCTACTGAGGAAGGTACCTCAACCG AGCCATCCGAGGGATCAGCTCCCGGCA CCTCAGAGTCGGCAACCCCGGAGTCTG GACCCGGAACCTCCGAAAGTGCCACAC CAGAGTCCGGTCCCGGGACTTCAGAATC AGCAACACCCGAGTCCGGCCCTGGGTCT GAACCCGCCACAAGTGGTAGTGAGACA CCAGGATCAGAACCTGCTACCTCAGGGT CAGAGACACCCGGATCTCCGGCAGGCT CACCAACCTCCACTGAGGAGGGCACCA GCACAGAACCAAGCGAGGGCTCCGCAC CCGAACAAGCACTGAACCCAGTGAGG GTTCAGCACCCGGCTCTGAGCCGGCCAC AAGTGGCAGTGAGACACCCGGCACTTC AGAGAGTGCCACCCCGAGAGTGGGCC AGGCACTAGTACCGAGCCCTCTGAAGG CAGTGCGCCAGGTTCTGCTTCATAA	10
FVII- XTEN_AE864, pCW0645.001	MVSQALRLLCLLLGLQ GCLAAVFVTQEEAHGV LHRRRRANAFLEELRP GSLERECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLFWISY SDGDQCASSPCQNGGS CKDQLQSYICFCLPAFE GRNCETHKDDQLICVN ENGGCEQYCSDHGTGK RSCRHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEK RNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGA QLCGGTLINTIWVVSAA HCFDKIKNWRNLI AVL GEHDLSEHDGDEQSRR VAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DH VVPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLM TQDCLQQSRKVG DSPNI TEYMF CAGYSDGSKDS CKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATV GHFGVYTRVSQYIEWL QKLMRSEPRPGVLLRA PFPGPSGPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGPSAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGPSAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSES	598	ATGGTCTCCAGGCCCTCAGGCTCCTCT GCCTTCTGCTTGGGCTTCAGGGCTGCCT GGCTGCAGTGTTCGTAACCCAGGAGGA AGCCCACGGCGTCTGCACCGGCGCCG GCGCGCCAACGCGTTCTTGAGGAGCT ACGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTG CAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGA GGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGA GAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCCTAC AGTGATGGGGACCAAGTGTGCCTCAAGT CCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAG GACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCT GCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGT TGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGAT CTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGA GCAGTACTGCAGTGACCACACGGGCAC CAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGG GTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCC TGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTG GAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAA ATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTG TGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGG AGTGTCCATGGCAGGTCTGTTGTTGGT GAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC CCGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGA ACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGG GCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACG GGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCC GGGCACCACCAACCACGACATCGCGCT GCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTC ACTGACCATGTGGTGGCCCTCTGCCTGC CCGAACGAGACGTTCTCTGAGAGGACGC TGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTTGGTCAG CGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGG CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTC AACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGAC TGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGA GACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGT	599
				20
				30
				40

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	ATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSSS		TCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAA GGACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGG CCCACATGCCACCCACTACCGGGGCAC GTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGG GGCCAGGGGTGCGCAACCGTGGGCCAC TTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCAGT ACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGC GCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCTCTCT GCGAGCCCCATTTCCCGGAGGTAGCCCG GCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC TGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCC GAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCA GGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTA CTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC ACCAGTACCTCTACTGAACCTTCTGAG GGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACCCCGGAATCTGGCCAGGTAGC GAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCC CAGGTAGCGAACC GGCTACCTCCGGTTC TGAAACTCCAGGTAGCCCGGCAGGCTCT CCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTG AAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCAG GTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAG CGCACCAGGTACTTCTACCGAACCGTCC GAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCAGCA GGTTCTCTTACCTCCACCGAGGAAGGTA CTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGC ACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAG GGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGA ATCCGGTCCAGGTAGCGAACC GGCTACT TCTGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCTA CCGAACC GTCCGAAGGTAGTGCACCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAA AGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCAGGT AGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCG AAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCC CTGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GG CAACCTCCGGTTCTGAAACCCAGGTAC CTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGC CCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGG GTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACC GTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCA GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTC TGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGT AGCCAGCAGGTTCTCTACCTCCACCG AGGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCTGAGTCTGGCCAGGTAG CGAACCTGTCTACCTCCGGCTCTGAGACT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCG	

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			GAATCTGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCT CTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAGTCCGGCCAGGTAGCCCGG CTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTTCTACT GAAGAAGGTAGCCCGGCAGGCTCTCCG ACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAA GCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTA CCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGC ACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCT GAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCT ACCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTC CAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTC TGAAACCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAATCTGGCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAG GTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCAC CGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAAC CCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCAGGT ACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG GCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGAC TTCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCAACCTTCTACTGAAGAAGGTACT TCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGA GTCCGGCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTG AAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCAG GTAGCGAACC GGCTACTTCTGGTTCTGA AACCCAGGTAGCGAACC GGCTACTTCT CGGTTCTGAAACTCCAGGTAGCCAGCA GGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTA CTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC ACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAG GGCAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTACCT CTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTAA	
FVII- XTEN_AE288, pBC0019	MVSQALRLLCLLLGLQ GCLAAVFVTQEEAHGV LHRRRRANAFLEELRP GSLERECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLFWISY SDGDQCASSPCQNGGS CKDQLQSYICFLPAFE GRNCETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHTGTK RSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEK RNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGA OLCGGTLINTIWVVSAA	600	ATGGTGTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCT GCCTTCTGCTTGGGCTTCAGGGCTGCCT GGCTGCAGTGTTCTGTAACCCAGGAGGA AGCCACGGCGTCTGCACCGGCGCCG GCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCT ACGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTG CAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGA GGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGA GAGGACGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGT CCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAG GACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCT GCCTCCCTGCTTTCGAGGCGGAACTG TGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGAT	601

40

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	HCFDKIKNWRNLI AVL GEHDLSEHDGDEQSRR VAQVIIPSTYVPGTTNH DIALLRHLQPVVLT DH VVPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLM TQDCLQQRKVGDSPNI TEYMFACAGYS DGSKDS CKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQCATV GHFGVYTRVSQYIEWL QKL MRSEPRPGVLLRA PFPGPSPTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGS APTSTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSSS		CTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGA GCAGTACTGCAGTGACCACACGGGCAC CAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGG GTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCC TGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTG GAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAA ATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTG TGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGG AGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGGT GAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTGTCC GCGGCCACTGTTTCGACAAAAATCAAG AACTGGAGAACCTGATCGCGGTGCTGG GCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACG GGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCC GGGCACCACCAACCACGACATCGCGCT GCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCTCT ACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCTGC CCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGC TGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAG CGGCTGGGGCCAGTGCTGGACCGTGG CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTCT AACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGAC TGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGA GACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGT TCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAA GGACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGG CCCACATGCCACCCACTACCGGGGCAC GTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGG GGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCAC TTTGGGGTGTACACCAGGGTGTCACAGT ACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGC GCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCTCTCT GCGAGCCCCATTCCCGGGTCTCCAGGT ACCTCAGAGTCTGCTACCCCCGAGTCAG GGCCAGGATCAGAGCCAGCCACCTCCG GGTCTGAGACACCCGGGACTTCCGAGA GTGCCACCCCTGAGTCCGGACCCGGGTC CGAGCCCGCCACTTCCGGCTCCGAAACT CCCGGCACAAAGCGAGAGCGCTACCCCA GAGTCAGGACCAGGAACATCTACAGAG CCTCTGAAGGCTCCGCTCCAGGGTCCC CAGCCGGCAGTCCCACTAGCACCGAGG AGGGAACCTCTGAAAGCGCCACACCCG AATCAGGGCCAGGGTCTGAGCCTGCTA CCAGCGGCAGCGAGACACCAGGCACCT CTGAGTCCGCCACACCAGAGTCCGGAC CCGGATCTCCCGCTGGGAGCCCCACCTC CACTGAGGAGGGATCTCTGTGCTGGCTCT CCAACATCTACTGAGGAAGGTACCTCA ACCGAGCCATCCGAGGGATCAGCTCCC GGCACCTCAGAGTCGGCAACCCCGGAG TCTGGACCCGGAACCTCCGAAAGTGCCA CACCAGAGTCCGGTCCCGGGACTTCAG AATCAGCAACACCCGAGTCCGGCCCTG GGTCTGAACCCGCCACAAGTGGTAGTG AGACACCAGGATCAGAACCCTGCTACCT CAGGGTCAGAGACACCCGGATCTCCGG	

【表 2 3 - 8】

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			CAGGCTCACCAACCTCCACTGAGGAGG GCACCAGCACAGAACCAAGCGAGGGCT CCGCACCCGGAACAAGCACTGAACCCA GTGAGGGTTTCAGCACCCGGCTCTGAGCC GGCCACAAGTGGCAGTGAGACACCCGG CACTTCAGAGAGTGCCACCCCGAGAG TGGCCCAGGCACTAGTACCGAGCCCTCT GAAGGCAGTGCGCCAGGTTCGTCTTCAT AA	

10

実施例 20：F I X - X T E N のための発現プラスミドの構築

F I X - X T E N 8 6 4 遺伝子およびベクターの構築

F I X をコードする遺伝子を含むクローン化ベクターを O r i G e n e から購入した (S C 1 2 6 5 1 7) 。 P C R 反応を実施して、F I X コード領域内の 2 つの B b s I 制限部位を消滅させた。結果として生じる F I X コード領域を次に、5' 末端および 3' 末端のそれぞれにおける N h e I および B s a I 制限酵素認識配列を導入するプライマーを用いて増幅した。消化した F I X 断片を B s a I / H i n d I I I で消化した X T E N _ A M 8 6 4 、 A E 8 6 4 、 A F 8 6 4 、または A G 8 6 4 断片に融合し、N h e I / H i n d I I I で消化した p S e c T a g 2 C 発現ベクターへと挿入した。最終的なコンストラクトは、A C 2 8 2 (p C W 0 5 6 2 、 F I X - X T E N _ A M 8 6 4) 、 A C 2 8 3 (p C W 0 5 6 3 、 F I X - X T E N _ A E 8 6 4) 、 p C W 0 5 6 4 (F I X - X T E N _ A F 8 6 4) 、および p C W 0 5 6 5 (F I X - X T E N _ A G 8 6 4) である (表 2 4) 。

20

【0 3 6 1】

F I X ヘルパー遺伝子のための発現ベクターの構築

P C 5 をコードする遺伝子を含むクローン化ベクターを O r i G e n e から購入した (S C 3 1 0 0 5 1) 。 P C 5 コード領域を、N o t I および B s t B I 制限酵素認識配列を導入するプライマーを用いて増幅した。N o t I / B s t B I で消化した P C 5 断片を、N o t I / B s t B I で消化した C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o ベクターまたは D C - H D - p u r o ベクターと連結した。C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o も D C - H D - p u r o も、C M V プロモーターが遺伝子挿入部位の上流に存在する二重カセットを特長とし、C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o は、該プロモーターの上流に U C O E 要素も含む。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、p B C 0 0 3 7 (D C - H D - p u r o - P C 5) および p B C 0 0 3 8 (C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o - P C 5) である。

30

【0 3 6 2】

F I X - X T E N および P C 5 二重発現ベクターの構築

p B C 0 0 3 7 および p B C 0 0 3 8 コンストラクトを N h e I および S a l I で消化して、N h e I / S a l I で消化した F I X - X T E N _ A E 8 6 4 と連結した。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、p B C 0 0 3 5 (D C - H D - p u r o - F I X - X T E N _ A E 8 6 4 - P C 5) および p B C 0 0 3 6 (C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o - F I X - X T E N _ A E 8 6 4 - P C 5) であった。

40

【0 3 6 3】

【表 2 4 - 1】

表 2 4 : F I X アミノ酸配列および核酸配列

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
FIX- XTEN_AM864, pCW0562	MQRVNMIMAESPLITI	602	ATGCAGCGCGTGAACATGATCAT	603
	CLLGYLLESAECTVFLDH		GGCAGAATCACCAGGCCTCATCA	
	ENANKILNRPKRYNSG		CCATCTGCCTTTTAGGATATCTAC	
	KLEEFVQGNLERECME		TCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTC	
	EKCSFEEAREVFENTER		TTGATCATGAAAACGCCAACAAA	
	TTEFWKQYVDGDQCES		ATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTA	
	NPCLNGGSKDDINSYE		TAATTCAGGTAAATTGGAAGAGT	
	CWC PFGEFGKNC ELDV		TTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGA	
	TCNIKNGRCEQFCKNS		GAATGTATGGAAGAAAAGTGTA	
	ADNKVVCSTEGYRLA		GTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTT	
	ENQKSCEPAVPFPCGRV		TTTGAAAACACTGAAAGAACAAC	
	SVSQTSLKTRAETVFPD		TGAATTTTGGAAGCAGTATGTTG	
	VDYVNSTEAETILDNIT		ATGGAGATCAGTGTGAGTCCAAT	
	QSTQSFNDFTRVVGGE		CCATGTTTAAATGGCGGCAGTTG	
	DAKPGQFPWQVVLNG		CAAGGATGACATTAATTCCTATG	
	KVDAFCGGSIVNEKWI		AATGTTGGTGTCCCTTTGGATTG	
	VTAACHCVETGVKITVV		AAGGAAAGAACTGTGAATTAGAT	
	AGEHNIEETEHTEQKRN		GTAACATGTAACATTAAGAATGG	
	VIRIIPHHYNAANKY		CAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAA	
	NHDIALLELDEPLVLNS		ATAGTGCTGATAACAAGGTGGTT	
	YVTPICIADKEYTNIFLK		TGCTCCTGTACTGAGGGATATCG	
	FGSGYVSGWGRVFHKG		ACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCT	
	RSALVLQYLRVPLVDR		GTGAACCAGCAGTGCCATTTCCA	
	ATCLRSTKFTIYNNMFC		TGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACA	
	AGFHEGGRDSCQGD SG		AACTTCTAAGCTCACCCGTGCTG	
	GPHVTEVEGTSFLTGIS		AGACTGTTTTTTCCTGATGTGGACT	
	WGEECAMKGKYG IYT		ATGTAAATTCTACTGAAGCTGAA	
	KVSRYVNWIKEKTKLT		ACCATTTTGGATAACATCACTCA	
	GGTSTEPSEGSAPGSEP		AAGCACCCAATCATTTAATGACT	
	ATSGSETPGSPAGSPTS		TCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAA	
	TEEGSTSSTAESPGPGTS		GATGCCAAACCAGGTCAATTCCC	
	TPESGSASPGSTSES PSG		TTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTA	
	TAPGSTSES PGSTAPGT		AAGTTGATGCATTCTGTGGAGGC	
	STPESGSASPGTSTEP SG		TCTATCGTTAATGAAAAATGGAT	
	SASPGSEPATSGSETPG		TGTAAGTGTGCCCCACTGTGTTG	
	TSESATPESGPGSPAGSP		AAACTGGTGTTAAAATTACAGTT	
	TSTEEGTSTEPSEGSAP		GTCGCAGGTGAACATAATATTGA	
	GTSESATPESGPGTSTEP		GGAGACAGAACATACAGAGCAA	
	SEGSAPGTSTEPSEGS A		AAGCGAAATGTGATTCTGAATTAT	
	PGSPAGSPTSTEEGTSTE		TCCTCACCACA ACTACAATGCAG	
	PSEGSAPGTSTEPSEGS		CTATTAATAAGTACAACCATGAC	
	APGTSESATPESGPGTS		ATTGCCCTTCTGGA ACTGGACGA	
	ESATPESGPGTSTEPSEG		ACCCTTAGTGCTAAACAGCTACG	
	SAPGTSTEPSEGSAPGT		TTACACCTATTTGCATTGCTGACA	
	SESATPESGPGTSTEPSE		AGGAATACACGAACATCTTCCTC	
	GSAPGSEPATSGSETPG		AAATTTGGATCTGGCTATGTAAG	
	SPAGSPTSTEEGSSTPSG		TGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACA	
	ATGSPGTPGSGTASSSP		AAGGGAGATCAGCTTTAGTTCCT	
	GSSTPSGATGSPGTSTE		CAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTT	
	PSEGSAPGTSTEPSEGS		GACCGAGCCACATGTCTTCGATC	
	APGSEPATSGSETPGSP		TACAAAGTTCAACATCTATAACA	
	AGSPTSTEEGSPAGSPT		ACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATG	
	STEEGTSTEPSEGSAPG		AAGGAGGTAGAGATTCATGTCAA	
	ASASGAPSTGGTSESAT		GGAGATAGTGGGGGACCCCATGT	
	PESGPGSPAGSPTSTEE		TACTGAAGTGGAAGGGACCA GTT	
	GSPAGSPTSTEEGSTSST		TCTTAACTGGAATTATTAGCTGG	
	AESPGPGSTSES PGSTAP		GGTGAAGAGTGTGCAATGAAAG	

10

20

30

40

【表 2 4 - 2】

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	GTSPSGESSTAPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGST SSTAESPGPGSTSSSTAES PGPGTSPSGESSTAPGSE PATSGSETPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGS TSSTAESPGPGTSTPESG SASPGSTSESPSGTAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPAS TGTGPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSST GSPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPG		GCAAAATATGGAATATATACCAAG GTATCCCGGTATGTCAACTGGAT TAAGGAAAAAACAAAGCTCACT GGAGGTACTTCTACTGAACCGTC TGAAGGCAGCGCACCAGGTAGC GAACCGGCTACTTCCGGTTCTGA AACCCAGGTAGCCAGCAGGTT CTCCAACTTCTACTGAAGAAGGT TCTACCAGCTCTACCGCAGAATC TCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAG GTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTG GCACTGCACCAGGTTCTACTAGC GAATCCCCGCTCTGGTACTGCTCC AGGTACTTCTACTCCTGAAAGCG GTTCCGCTTCTCCAGGTACCTCTA CTCCGAAAGCGGTTCTGCATCT CCAGGTAGCGAACC GGCAACCTC CGGCTCTGAAACCCAGGTACCT CTGAAAGCGCTACTCCTGAATCC GGCCCAGGTAGCCCGGCAGGTTT TCCGACTTCCACTGAGGAAGGTA CCTCTACTGAACCTTCTGAGGGC AGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAG CGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGAA GGTAGCGCACCAGGTACTTCTAC CGAACCGTCCGAGGGTAGCGCAC CAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCCT ACCTCCACCGAGGAAGGTACTTC TACCGAACCGTCCGAGGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACCGAACCT TCCGAGGGCAGCGCACCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGT CCGGCCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCCGGTCCAGG TACCTCTACTGAACCTTCCGAAG GCAGCGCTCCAGGTACCTCTACC GAACCGTCCGAGGGCAGCGCACC AGGTACTTCTGAAAGCGCAACCC CTGAATCCGGTCCAGGTACTTCT ACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGC TCCAGGTAGCGAACCTGCTACTT CTGGTTCTGAAACCCAGGTAGC CCGGCTGGCTCTCCGACCTCCAC CGAGGAAGGTAGCTCTACCCCGT CTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGT ACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTC TTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAG GTACCTCTACCGAACCGTCCGAG GGTAGCGCACCAGGTACCTCTAC TGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTC CAGGTAGCGAACCCGGCAACCTCC GGTTCTGAAACTCCAGGTAGCCC TGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGA GGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTC CGACTTCTACTGAGGAAGGTACT TCTACCGAACCTTCCGAAGGTAG	

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			CGCTCCAGGTGCAAGCGCAAGCG GCGCGCCAAGCACGGGAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC CGGCCAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCAATTCT TACTGAAGAAGGTTCTACCAGCT CTACCGCTGAATCTCCTGGCCCA GGTTCTACTAGCGAATCTCCGTC TGGCACCGCACCAAGGTACTTCCC CTAGCGGTGAATCTTCTACTGCA CCAGGTACCCCTGGCAGCGGTAC CGCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTC TACCCCGTCTGGTGCTACTGGCT CTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCA TCTACCGGTACCGGCCAGGTAG CGAACCGGCAACCTCCGGCTCTG AACTCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCGGAATCCGGCCCAGG TAGCGAACCGGCTACTTCCGGCT CTGAAACCCCAGGTTCCACCAGC TCTACTGCAGAATCTCCGGGCCC AGGTTCTACTAGCTCTACTGCAG AATCTCCGGGTCCAGGTACTTCT CCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC TCCAGGTAGCGAACCGGCAACCT CTGGCTCTGAAACTCCAGGTAGC GAACCTGCAACCTCCGGCTCTGA AACCCAGGTACTTCTACTGAAC CTTCTGAGGGCAGCGCACCAAGT TCTACCAGCTCTACCGCAGAATC TCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAG GTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTG GCACTGCACCAAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCC AGGTACCTCTACTGAACCTTCCG AGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCT ACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGC ACCAAGGTAGCTCTACTCCGTCTG GTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCT AGCCCGTCTGCTTCCACTGGTAC TGGCCAGGTGCTTCCCCGGGCA CCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGT AGCGAACCTGCTACCTCCGGTTC TGAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCGGAGTCTGGTCCA GGTAGCCCTGCAGGTTCTCCTAC CTCCACTGAGGAAGGTAGCTCTA CTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCC CCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCC ACTGGTACTGGCCCAGGTGCTTC CCCGGGCACCAAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCGGAGTCTGGCCAGGTAC CTCTACTGAACCGTCTGAGGGTA GCGCTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCCGAAGGTAGCGCACCAAG TTAA	

【表 2 4 - 4】

名称	アミノ酸配列	配列 番号	核酸配列	配列 番号
FIX- XTEN_AE864, pCW0563	MQRVNMIMAESPLITI	604	ATGCAGCGCGTGAACATGATCAT	605
	CLLGYLLESAECTVFLDH		GGCAGAATCACCAGGCCTCATCA	
	ENANKILNRPKRYNSG		CCATCTGCCTTTTAGGATATCTAC	
	KLEEFVQGNLERECME		TCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTC	
	EKCSFEEAREVFENTER		TTGATCATGAAAACGCCAACAAA	
	TTEFWKQYVDGDQCES		ATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTA	
	NPCLNGGSCKDDINSYE		TAATTCAGGTAAATTGGAAGAGT	
	CWCPFGFEGKNCELD		TTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGA	
	TCNIKNGRCEQFCKNS		GAATGTATGGAAGAAAAGTGTA	
	ADNKVVCSCTEGYRLA		GTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTT	
	ENQKSCEPAVPFPCGRV		TTTGAAAACACTGAAAAGAACAAC	
	SVSQTSKLTRAETVFPD		TGAATTTTGGAAGCAGTATGTTG	
	VDYVNSTEAEITLDNIT		ATGGAGATCAGTGTGAGTCCAAT	
	QSTQSFNDFTRVVGGE		CCATGTTTAAATGGCGGCAGTTG	
	DAKPGQFPWQVVLNG		CAAGGATGACATTAATTCCTATG	
	KVDAFCGGSTVNEKWI		AATGTTGGTGTCCCTTTGGATTG	
	VTAAHCVETGVKITVV		AAGGAAAGAACTGTGAATTAGAT	
	AGEHNIEETEHEQKRN		GTAACATGTAACATTAAGAATGG	
	VIRIIPHHNYNAANKY		CAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAA	
	NHDIALLELDEPLVLS		ATAGTGCTGATAACAAGGTGGTT	
	YVTPICIAADKEYTNIFLK		TGCTCCTGTACTGAGGGATATCG	
	FGSGYVSGWGRVPHKG		ACTTGCAGAAAACCAGAAAGTCT	
	RSALVLQYLRVPLVDR		GTGAACCAGCAGTGCCATTTCCA	
	ATCLRSTKFTIYNMFC		TGTGGAAGAGTTTCTGTTTACA	
	AGFHEGGRDSCQGD		AACTTCTAAGCTCACCCGTGCTG	
	SGPHVTEVEGTSFLTGIIS		AGACTGTTTTTCTGATGTGGACT	
	WGEECAMKKGKYGIT		ATGTAAATTCTACTGAAGCTGAA	
	KVSRYVNWIKETKLT		ACCATTTTGGATAACATCACTCA	
	GGSPAGSPTSTEEGTSE		AAGCACCCAATCATTTAATGACT	
	SATPESGPGTSTEPSEGS		TCCTCGGGTGTGGTGGAGAA	
	APGSPAGSPTSTEEGTS		GATGCCAAACCAGGTCAATTCCC	
	TEPSEGSAPGTSTEPSEG		TTGGCAGGTGTGTTTGAATGTA	
	SAPGTSESATPESGPGS		AAGTTGATGCATTCTGTGGAGGC	
	EPATSGSETPGSEPATS		TCTATCGTTAATGAAAAATGGAT	
	GSETPGSPAGSPTSTEE		TGTAAGTGTGCTGCCCCTGTGTTG	
	GTSESATPESGPGTSTEP		AAACTGGTGTGTTAAAATTACAGTT	
	SEGSAPGTSTEPSEGS		GTCGCAGGTGAACATAATATTGA	
	PGSPAGSPTSTEEGTSTE		GGAGACAGAACATACAGAGCAA	
	PSEGSAPGTSTEPSEGS		AAGCGAAATGTGATTTCGAATTAT	
	APGTSESATPESGPGTS		TCCTCACCACTACAATGCAG	
	TEPSEGSAPGTSESATPE		CTATTAATAAGTACAACCATGAC	
	SGPGSEPATSGSETPGT		ATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGA	
	STEPSEGSAPGTSTEPSE		ACCTTAGTGCTAAACAGCTACG	
	GSAPGTSESATPESGPG		TTACACCTATTTGCATTGCTGACA	
	TSESATPESGPGSPAGSP		AGGAATACACGAACATCTTCCTC	
	TSTEEGTSESATPESGP		AAATTTGGATCTGGCTATGTAAG	
	GSEPATSGSETPGTSES		TGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACA	
	ATPESGPGTSTEPSEGS		AAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT	
	APGTSTEPSEGSAPGTS		CAGTACCTTAGAGTTCCACTTGT	
	TEPSEGSAPGTSTEPSEG		GACCGAGCCACATGTCTTCGATC	
	SAPGTSTEPSEGSAPGT		TACAAAGTTCACCATCTATAACA	
	STEPSEGSAPGSPAGSPT		ACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATG	
	STEEGTSTEPSEGSAPG		AAGGAGGTAGAGATTCAATGCAA	
	TSESATPESGPGSEPATS		GGAGATAGTGGGGGACCCCATGT	
	GSETPGTSESATPESGP		TACTGAAGTGGAAGGGACAGTT	
	GSEPATSGSETPGTSES		TCTTAACTGGAATTATTAGCTGG	
	ATPESGPGTSTEPSEGS		GGTGAAGAGTGTGCAATGAAAG	
	APGTSESATPESGPGSP		GCAAATATGGAATATATACCAAG	
	AGSPTSTEEGSPAGSPT		GTATCCCGGTATGTCAACTGGAT	

10

20

30

40

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	STEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPG		TAAGGAAAAAACAAAGCTCACT GGAGGTAGCCCGGTGGCTCTCC TACCTCTACTGAGGAAGGTACTT CTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCT GGTCCAGGTACCTCTACTGAACC GTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTA GCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACTTCTACTGA ACCTTCCGAAGGCAGCGCACCAG GTACCTCTACTGAACCTTCTGAG GGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGA AAGCGCTACCCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACC GGCTACTTCT GGTTCTGAAACCC CAGGTAGCGA ACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAA CTCCAGGTAGCCCGGCAGGCTCT CCGACCTCTACTGAGGAAGGTAC TTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGT CCGGCCCAGGTACCTTACCGAA CCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGG TACTTCTACCGAACCGTCCGAGG GTAGCGCACCAGGTAGCCAGCA GGTTCTCCTACCTCCACCGAGGA AGGTACTTCTACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCACCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACT TCTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCTGAATCCGGTCCAGGT AGCGAACCGGCTACTTCTGGCTC TGAGACTCCAGGTACTTCTACCG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTACTGAACCGTCTGA AGGTAGCGCACCAGGTACTTCTG AAAGCGCAACCCCGGAATCCGGC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAGTCCGGCC CAGGTAGCC CTGCTGGCTCTCCAACCTCCACC GAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGC AACCCCTGAATCCGGCCCAGGTA GCGAACCGGCAACCTCCGGTTCT GAAACCC CAGGTACCTCTGAAAG CGTACTCCGGAGTCTGGCCCAG GTACCTCTACTGAACCGTCTGAG GGTAGCGCTCCAGGTACTTCTAC TGAACCGTCCGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTACCGAACCGTCC GAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTC TACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG CTCCAGGTACCTTACCGAACCT TCTGAAGGTAGCGCACCAGGTAC TTCTACCGAACCGTCCGAGGGTA GCGCACCAGGTAGCCCAGCAGGT TCTCCTACCTCCACCGAGGAAGG TACTTCTACCGAACCGTCCGAGG GTAGCGCACCAGGTACCTCTGAA AGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCC	

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			AGGTAGCGAACCTGCTACCTCCG GCTCTGAGACTCCAGGTACCTCT GAAAGCGCAACCCCGGAATCTGG TCCAGGTAGCGAACCTGCAACCT CTGGCTCTGAAACCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCTGAATC TGGCCAGGTACTTCTACTGAAC CGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA GTCCGGCCAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAAC TTCTACTGAAGAAGGTAGCCCGG CAGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAGTCCGGCCAGGTACCT CTACCGAACCGTCTGAGGGCAGC GCACCAGGTACCTCTGAAAGCGC AACTCCTGAGTCTGGCCAGGTA GCGAACCTGCTACCTCCGGCTCT GAGACTCCAGGTACCTCTGAAAG CGCAACCCCGGAATCTGGTCCAG GTAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCAGGTACCTCTGA AAGCGCTACTCCTGAATCTGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTAGCC CTGCTGGCTCTCCAACCTCCACC GAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGC AACCCTGAATCCGGCCAGGTA GCGAACCGCAACCTCCGGTTCT GAAACCCAGGTACTTCTGAAAG CGCTACTCCTGAGTCCGGCCAG GTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACT TCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGC TGGCTCTCCAACCTTCTACTGAAG AAGGTACTTCTACCGAACCTTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCG GCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACTCCTGAATCCGGTCCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACCCCGGAAT CTGGCCAGGTAGCGAACCGGCT ACTTCTGGTTCTGAAACCCAGG TAGCGAACCGGCTACCTCCGGTT CTGAAACTCCAGGTAGCCAGCA GGCTCTCCGACTTCCACTGAGGA AGGTACTTCTACTGAACCTTCCG AAGGCAGCGCACCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTAGCGAACCTGCAACCT CTGGCTCTGAAACCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCTGAATC TGGCCAGGTACTTCTACTGAAC CGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGT TAA	
FIX- XTEN_AF864, pCW0564	MQRVNMIMAESPLITI CLLGILLSAECTVFLDH ENANKILNRPKRYNSG	606	ATGCAGCGCGTGAACATGATCAT GGCAGAATCACCAGGCCTCATCA CCATCTGCCTTTTAGGATATCTAC	607

[illegible]

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	SESPSGTAPGTSPSGESS TAPGSTSESPSGTAPGT STPESGSASPGTSTPESG SASPGSTSESPSGTAPGT STPESGSASPGSTSSTAE SPGPGSTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPGPG TSPSGESSTAPGTSTPES GSASPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAESPGP GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPG		CTCCTAGCGGCGAATCTTCTACC GCTCCAGGTTCTACTAGCGAATC TCCTTCTGGCACTGCACCAGGTT CTACTAGCGAATCCCCGTCTGGT ACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCT GAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGG TACCTCTACTCCGGAAGCGGTT CTGCATCTCCAGGTTCTACCAGC GAATCTCCTTCTGGCACCGCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCCCCGT CTGGTACCGCACCAAGGTACTTCT CCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC ACCAGGTTCTACTAGCGAATCTC CGTCTGGCACTGCTCCAGGTACT TCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACC GCTCCAGGTACTTCCCCTAGCGG CGAATCTTCTACCGCTCCAGGTT CTACTAGCTCTACTGCAGAATCT CCGGGCCAGGTACCTCTCCTAG CGGTGAATCTTCTACCGCTCCAG GTACTTCTCCGAGCGGTGAATCT TCTACCGCTCCAGGTTCTACTAG CTCTACTGCAGAATCTCCTGGCC CAGGTACCTCTACTCCGGAAGC GGCTCTGCATCTCCAGGTACTTCT ACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATC TCCAGGTTCTACTAGCGAATCTC CTTCTGGCACTGCACCAGGTTCT ACCAGCGAATCTCCGTCTGGCAC TGCACCAGGTACCTCTACCCCTG AAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT TCTACCAGCTCTACCGCAGAATC TCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAG GTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTG GCACTGCACCAGGTACTTCTCCG AGCGGTGAATCTTCTACCGCAC AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTG AATCTCCGGGCCAGGTACTTCT CCGAGCGGTGAATCTTCTACTGC TCCAGGTACCTCTACTCCTGAAA GCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCC ACTAGCTCTACCGCAGAATCTCC GGGCCAGGTTCTACTAGCTCTA CTGCTGAATCTCCTGGGCCAGGT TCTACTAGCTCTACTGCTGAATCT CCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTC TACTGCTGAATCTCCTGGTCCAG GTACCTCCCCGAGCGGTGAATCT TCTACTGCACCAGGTTCTACTAG CGAATCTCCTTCTGGCACTGCAC CAGGTTCTACCAGCGAATCTCCG TCTGGCACTGCACCAGGTACCTC TACCCCTGAAAGCGGTCCGGGGG GGGGGGGTGCAAGCGCAAGCGG CGCGCCAAGCACGGGAGGGGGG GGTAGCGAATCTCCTTCTGGTAC CGTCCAGGTTCTACCAGCGAAT CCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGT	

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			TCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGT ACTGCACCAGGTTCTACTAGCGA ATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCCCCGTCT GGTACTGCTCCAGGTTCTACCAG CGAATCTCCTTCTGGTACTGCAC CAGGTACTTCTACTCCGGAAGC GGTTCCGCATCTCCAGGTACTTCT CCTAGCGGTGAATCTTCTACTGC TCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCG AATCTTCTACTGCTCCAGGTTCTA CCAGCTCTACTGCTGAATCTCCG GGTCCAGGTACTTCCCCGAGCGG TGAATCTTCTACTGCACCAGGTA CTTCTACTCCGGAAGCGGTTCC GCTTCTCCAGGTTCTACCAGCGA ATCTCCTTCTGGCACCCTCCAG GTTCTACTAGCGAATCCCCGTCT GGTACCGCACCAGGTACTTCTCC TAGCGGCGAATCTTCTACCGCAC CAGGTTCTACTAGCGAATCCCCG TCTGGTACCGCACCAGGTACTTC TACCCCGGAAGCGGCTCTGCTT CTCCAGGTACTTCTACCCCGGAA AGCGGCTCCGCATCTCCAGGTTC TACTAGCGAATCTCCTTCTGGTA CCGCTCCAGGTACTTCTACCCCT GAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGG TTCCACTAGCTCTACCGCTGAAT CTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGC GAATCTCCTTCTGGCACCCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCCCCGT CTGGTACCGCACCAGGTACTTCT CCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC ACCAGGTCTACAGCTCTACTG CTGAATCTCCGGGTCCAGGTACT TCCCCGAGCGGTGAATCTTCTAC TGCACCAGGTACTTCTACTCCGG AAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT ACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTC TACTGCTCCAGGTACCTCTCCTA GCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA GGTACCTCCCCTAGCGGTGAATC TTCTACCGCACCAGGTTCTACTA GCTCTACTGCTGAATCTCCGGGT CCAGGTTCTACAGCTCTACTGC TGAATCTCCTGGTCCAGGTACCT CCCCGAGCGGTGAATCTTCTACT GCACCAGGTTCTAGCCCTTCTGC TTCCACCGGTACCGGCCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCAACT GGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCC GTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAG GTAA	
FIX- XTEN_AG864, pCW0565	MQRVNMIMAESPLITI CLLGYLLSAECTVFLDH ENANKILNRPKRYNSG KLEEFVQGNLERECME EKCSFEEAREVFENTER	608	ATGCAGCGCGTGAACATGATCAT GGCAGAATCACCAGGCCTCATCA CCATCTGCCTTTTAGGATATCTAC TCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTC TTGATCATGAAAACGCCAACAAA	609

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	TTEFWKQYVDGDQCES NPCLNGGSKDDINSYE CWC PFGEFGKNC ELDV TCNIKNGRCEQFCKNS ADNKVVCSCTEGYRLA ENQKSCEPAVPFPCGRV SVSQTSKLTRAETVFPD VDYVNSTEAETILDNIT QSTQSFNDFTRVVGGE DAKPGQFPWQVVLNG KVDAFCGGSIVNEKWI VTAACHVETGVKITVV AGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKY NHDIALLELDEPLVLNS YVTPICIADKEYTNIFLK FGSGYVSGWGRVFHKG RSALVLQYLRVPLVDR ATCLRSTKFTIYNMFC AGFHEGGRDSCQGDSDG GPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYGIYT KVSRYVNWIKEKTKLT GGASPGTSSGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTG TGP GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSNPSAS TGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSGSPGASPG GTSSGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSP GSNPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSGSPGASPGTSSS GSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSGSPGAS PGTSSGSPGASPGTSSS GSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSGSPGAS PGTSSGSPGASPGTSSS GSPGASPGTSSTGSPGT GSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASP GTSSGSPGASPGTSSS GSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSGSPG ASPGTSSGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPS		ATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTA TAATTCAGGTAAATTGGAAGAGT TTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGA GAATGTATGGAAGAAAAGTGTA GTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTT TTTGAAAACACTGAAAGAACAAC TGAATTTTGGAAGCAGTATGTTG ATGGAGATCAGTGTGAGTCCAAT CCATGTTTAAATGGCGGCAGTTG CAAGGATGACATTAATTCCTATG AATGTTGGTGTCCCTTTGGATTG AAGGAAAGAACCTGTGAATTAGAT GTAACATGTAACATTAAGAATGG CAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAA ATAGTGCTGATAACAAGGTGGTT TGCTCCTGTACTGAGGGATATCG ACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCT GTGAACCAGCAGTGCCATTTCCA TGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACA AACTTCTAAGCTCACCCGTGCTG AGACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGAA ACCATTTTGATAACATCACTCA AAGCACCCAATCATTTAATGACT TCACTCGGGTTGTTGGTGAGAA GATGCCAAACCAGGTCAATTCCC TTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTA AAGTTGATGCATTCTGTGGAGGC TCTATCGTTAATGAAAAATGGAT TGTAACCTGCTGCCCACTGTGTTG AACTGGTGTTAAAATTACAGTT GTCGCAGGTGAACATAATATTGA GGAGACAGAACATACAGAGCAA AAGCGAAATGTGATTCTGAATTAT TCCTCACCAACACTACAATGCAG CTATTAATAAGTACAACCATGAC ATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGA ACCCTTAGTGCTAAACAGCTACG TTACACCTATTTGCATTGCTGACA AGGAATACACGAACATCTTCCTC AAATTTGGATCTGGCTATGTAAG TGGCTGGGGAAGAGTCTTCACA AAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTT GACCGAGCCACATGTCTTCGATC TACAAAGTTTACCATTCTATAACA ACATGTTCTGTCTGGCTTCCATG AAGGAGGTAGAGATTCATGTCAA GGAGATAGTGGGGGACCCCATGT TACTGAAGTGGAAGGGACCAGTT TCTTAAGTGAATTATTAGCTGG GGTGAAGAGTGTGCAATGAAAG GCAAAATATGGAATATATACCAAG GTATCCCGGTATGTCAACTGGAT TAAGGAAAAAACAAAGCTCACT GGAGGTGCTTCCCCGGGACCCAG CTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAG CCCGTCTGTTCTACTGGTATCTGG TCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTC	

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	GATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSST GSPG		CACTGGTACTGGTCCAGGTACCC CGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCT TCTCCAGGTAGCTCTACTCCGCTCT GGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTT TAACCCCTTCTGCATCCACCGGTA CCGGCCCAGGTGCTTCTCCGGGC ACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGG TACCCCGGGCAGCGGTACCGCAT CTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTC CTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCA GGTACTCTCTGGCAGCGGTACCGC TTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCTCC TGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCT CTACTGGTTCTCCAGGTACCCCG GGTAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCT CCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGG TGCAACCGGCTCTCCAGGTGCTT CTCCGGGCACCACTCTACCGGT TCTCCAGGTACCCCGGGTAGCGG TACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTAG CTCTACTCCGCTCTGGTGCTACCG GCTCTCCAGGTCTTAACCCCTTCTG CATCCACCGGTACCGGCCACCGT TCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGT ACTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCG TTCTGGTGCTACCGGCTCCCCAG GTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCA ACTGGCTCTCCAGGTGCATCTCC GGGCACTAGCTCTACTGGTTCTC CAGGTGCATCCCCTGGCACTAGC TCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCT CCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCT CCAGGTACTCCTGGCAGCGGTAC CGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTC TCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCT TCCAGGTGCTTCTCCGGGCACTA GCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTT CCCCGGGCACTAGCTCTACCGGT TCTCCAGGTCTAGCCCTTCTGCA TCTACTGGTACTGGCCCAGGTAC TCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTT CCTCTCCAGGTGCATCTCCGGGC ACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGG TGCATCCCCTGGCACTAGCTCTA CTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCTCTG GTACCAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTAGCTCTACTCCGCTCTGGTGC AACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTA CTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCC CAGGTGCATCCCCTGGCACCAAGC TCTACCGGTCTCTCCAGGTACCCG GGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCT CTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCT GGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAG CTCTACCCCGTCTGGTGCAACCG GCTCCCCAGGTAGCTCTACTCCG TCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGG TTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGG	

40

【表 2 4 - 1 2】

[illegible]

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
	KNIVVTILDDGIERTHP DLMQNYDALASCDVN GNDLDPMPRYDASNEN KHGTRCAGEVAAAAN NSHCTVGIAFNAKIGGV RMLDGDVTDMEVAKS VSFNPQHVHIYSASWG PDDDGKTVDPAPLTR QAFENGVRMGRRLGS VFVWASGNNGRSKDH CSCDGYTNSIYTISISST AESGKKPWYLEECSSST LATTYSSGESYDKKIITT DLRQRCTDNHTGTSAS APMAAGIIALALEANPF LTWRDVQHVIVRTSRA GHLNANDWKTNAAGF KVSHLYGFGLMDEAE MVMEAEKWTTVPROH VCVESTDRQIKTIRPNS AVRSIYKASGCDNPNR HVNYLEHVVVRIITHP RRGDLAIYLTSPSGTRS QLLANRLFDHSMEGFK NWEFMTIHCWGERAA GDWVLEVYDTPSQLRN FKTPGKLKEWSLVLYG TSVQPYSPTNEFPKVER FRYSRVEDPTDDYGTE DYAGPCDPECSEVGCD GPGPDHCNDCLHYYYK LKNNTRICVSSCPPGHY HADKKRCRKCAPNCES CFGSHGDQCMSCKYGY FLNEETNSCVTHCPDGS YQDTKKNLCKRCSENC KTCTEFHNCTECRDGLS LQGSRCVSVSCEDGRYF NGQDCQPCHRFATCA GAGADGCINCTEGYFM EDGRCVQSCSISYFFDH SSENGYKSKKKDISCL TCNGPGFKNCTSCPSGY LLDLGMCQMGAICKDA TEESWAEGGFCMLVKK NNLCQRKVLQQLCCKT CTFQG		acctatttcaatgatcccaagtggcccagcatgtggtat atgcactgcagtgacaatacacatccctgccagtctga catgaatatcgaaggagccctgggaagagaggctacac gggaaaagaacattgtgtgacactatcctggatgacgga attgagagaacccatccagatctgatgcaaaactacg atgctctggcaagttgcgacgtgaatgggaatgacttg gacccaatgcctcgttatgatgcaagcaacgagaaca agcatgggactcgtgtgctggagaagtggcagccg ctgcaaacaaattcgcactgcacagtcggaattgtcttc aacgccaagatcggaggagtgcgaatgctggacgg agatgtcacggacatggttgaagcaaaatcagttagct tcaacccccagcacgtgcacatttacagcggcagctg ggggccggatgatgatggcgaagactgtggacggacc agccccctcacccggcaagcctttgaaaaacggcgt agaatggggcggagaggcctcgctctgtgtttgtttg ggcatctggaatggtggaaggagcaaaagaccactg ctcctgtgatggtctacaccaacgcatctacaccatct ccatcagcagcactgcagaaaagggaagaaacctt ggatctgggaagagtgttcatccacgctggccacaa ctacagcagcggggagctctacgataagaaaatcatc actacagatctgaggcagcgttgacaggacaaccac actgggacgtcagcctcagccccatggctgcaggc atcattgcctggccctgggaagccaatccgtttctgac ctggagagacgttacagcatgttatgtcaggactccc gtcgggacattgaacgctaagtactggaaaaccaa tgtctgtgttttaaggtgagccatctttatgatttga ctgatggagcagaaagccatggtgatggaggcagag aagtggaccacgttccccggcagcacgtgtgtgtgg agagcacagaccgacaatcaagacaatccgcccta acagtgcagtgcgctccatctacaaagcttcaggctg ctcggataacccccaccgccatgtcaactacctggag cactgcgttgtgcgcatcaccatcaccaacccagga gaggagacctggccatctacctgaactcggccctctgg aactaggtctcagcttttggccaacaggctatttgaatc ctccatggaaggattcaaaaactgggagttcatgacc attcattgtcggggagaaagacgtcgtgtgactggg tecttgaagttatgatactccctctcagctaaggaaact taagactccaggtaaattgaaagaatggtctttgtctct ctacggcACCTCCGTGCAGCCATATT Caccaaccaatgaatttcgaaaagtgaacgggtccg ctatagccgagttgaagacccccacagacgactatggc acagaggattatgcaggtccctgcgaccctgagtga gtgaggttggtgtgacgggccaggaccagaccact gcaatgactgtttgactactactacaagctgaaaaac aataccaggatctgtgtctccagctgccccctggcca ctaccacggcgaacaagaagcgtgcaggaaagtgtgc ccccactgtgagtcctgttgggagccatggtgacc aatgcattgtcgtgcaaatatgatactttctgaatgaag aaaccaacagctgtgttactactgccctgatgggtca tatcaggataccaagaaaaatctttgccggaatgcag tgaanaactgcaagacatgtactgaattccataactgtac agaatgtagggatgggttaagcctgcagggatcccc gtgctctgtctcctgtgaagatggacggtatttcaacgg ccaggactgccagccctgccaccgcttctgcgccact tgtctgtgggcaggagctgatgggtgcattaaactgca cagagggtacttcatggaggatgggagatgcgtgc agagctgtatgatcagctattactttgaccactctfcaga gaatggatacaaatctgcaaaaaatgtgatafcagtt gtttgacgtgcaatggcccaggattcaagaactgtaca	

【表 2 4 - 1 4】

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
			agctgccctagtgggtatctcttagacttaggaatgtgt caaatgggagccatttgaaggatgcaacggaagag tctggggcgaaggaggcttctgtatgcttgtgaaaaa gaacaatctgtccaacggaagggtcttcaacaacttt gctgcaaaacatgtacatttcaaggctga	

実施例 2 4 : F I X - / F X I - X T E N の構築

10

F I X - T E V - X T E N _ A E 8 6 4 遺伝子およびベクターの構築

F I X をコードする遺伝子を含むクローン化ベクターを O r i G e n e から購入した (S C 1 2 6 5 1 7) 。 P C R 反応を実施して、F I X コード領域内の 2 つの B b s I 制限部位を消滅させた。結果として生じる F I X コード領域を次に、5' 末端および 3' 末端のそれぞれに N h e I および S f i I - T E V - B s a I 配列を導入するプライマーを用いて増幅した。消化した F I X 断片を、B s a I / H i n d I I I で消化した X T E N _ A E 8 6 4 断片に融合し、N h e I / H i n d I I I で消化した p S e c T a g 2 C 発現ベクターへと挿入した。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。最終的なコンストラクトは、F I X - T E V - X T E N _ A E 8 6 4 タンパク質をコードする p C W 0 6 4 8 . 0 0 1 である (表 2 5)。

20

【0 3 7 3】

F I X - / F X I - X T E N _ A E 8 6 4 遺伝子およびベクターの構築

S f i I および B s a I を用いて p C W 0 6 4 8 発現ベクターを消化することによって、T E V 部位を除去した。S f i I - K L T R A E T - B s a I (配列番号 6 として開示される「K L T R A E T」)、S f i I - D F T R V V G - B s a I (配列番号 8 8 として開示される「D F T R V V G」)、または S f i I - / F X I - B s a I をコードするオリゴ含有配列をアニーリングし、消化した p C W 0 6 4 8 ベクターと連結した。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、F I X - K L T R A E T - X T E N _ A E 8 6 4 (p C W 0 7 3 5) (配列番号 6 として開示される「K L T R A E T」)、F I X - D F T R V V G - X T E N _ A E 8 6 4 (p C W 0 7 3 6) (配列番号 8 8 として開示される「D F T R V V G」)、および F I X - / F X I - X T E N _ A E 8 6 4 (p C W 0 7 3 7) をコードする。

30

【0 3 7 4】

M i l l i p o r e プラスミドを用いた F I X - / F X I - X T E N _ A E 8 6 4 遺伝子をコードする発現ベクターの構築

発現ベクター p C W 0 7 3 5 を N h e I および S a l I で消化した。結果として生じる 4 1 8 1 b p 断片は、F I X - K L T R A E T - X T E N _ A E 8 6 4 タンパク質 (配列番号 6 として開示される「K L T R A E T」) をコードするヌクレオチドを含んでいた。この断片を、N h e I / S a l I で消化した C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o (M i l l i p o r e) または D C - H D - p u r o (M i l l i p o r e) と連結した。C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o も D C - H D - p u r o も、C M V プロモーターが遺伝子挿入部位の上流に存在する二重カセットを特長とし、C E T 1 0 1 9 - H D - p u r o は、該プロモーターの上流に U C O E 要素も含む。連結した DNA 混合物を X L 1 - B l u e 細菌細胞に電気穿孔した。形質転換体を DNA ミニプレップによってスクリーニングし、所望のコンストラクトを DNA 配列決定によって確認した。結果として生じる発現ベクターは、p B C 0 0 3 3 (D C - H D - p u r o - F I X - K L T R A E T - X T E N _ A E 8 6 4 (配列番号 6 として開示される「K L T R A E T」)) および p B C 0 0 3 4 (C

40

50

E T 1 0 1 9 - H D - p u r o - F I X - K L T R A E T - X T E N _ _ A E 8 6 4 _ (配列番号6として開示される「K L T R A E T」)) であつた (表25)。

【0375】

【表25-1】

表25：開裂配列を有するF I X - X T E N：アミノ酸配列および核酸配列

名称	アミノ酸配列	配列番号	核酸配列	配列番号
FIX-TEV-XTEN_AE864	MQRVNMIMAESPLITI	612	atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcacc	613
	CLLGYLLSAECTVFLDH		aggcctcatcaccatctgccttttaggatactactc	
	ENANKILNRPKRYNSG		agtgcctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacg	
	KLEEFVQGNLERECME		ccaacaaaattctgaatcgccaaagaggtataatt	
	EKCSFEEAREVFENTER		caggtaaattggaagagttgttcaagggaaccttg	
	TTEFWKQYVDGDQCES		agagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttgaa	
	NPCLNGGSKDDINSYE		gaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagAAC	
	CWCPFGFEGKNCELDV		aactgaattttggaagcagtatgttgatggagatca	
	TCNIKNGRCEQFCKNS		gtgtgagtcgaatccatgtttaaatggcggcagttg	
	ADNKVVCSCTEGYRLA		caaggatgacattaatfcctatgaatgttggtgtccc	
	ENQKSCEPAVPFPCGRV		tttgatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaa	
	SVSQTSKLTRAETVFPD		catgtaacattaagaatggcagatgcgagcagtttt	
	VDYVNSTEAEITLDNIT		gtaaaaatagtgtctgataacaagggtgtgtctcct	
	QSTQSFNDFTRVVGGGE		gtactgagggatactgacttgcagaaaaccagaag	
	DAKPGQFPWQVVLNG		tcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaaga	
	KVDAFCGGSIVNEKWI		gtttctgttcacaaaacttctaagctcaccgctgtga	
	VTAAHCvetGVKITVV		gactgttttctgatgtggaactatgtaatttactga	
	AGEHNIEETEHTEQKRN		agctgaaaccattttggataacatactcaaaagcac	
	VIRIIPHHNYNAINKY		ccaatcatttaacttactcgggtgtgtgtgga	
	NHDIALLELDEPLVLNS		gaagatgccaaaaccaggtcaattcccttggcaggt	
	YVTPICIADKEYTNIFLK		tgttttgaatggtaaagtgtatgcattctgtggagget	
	FGSGYVSGWGRVfHKG		ctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgtgccca	
	RSALVLQYLRVPLVDR		ctgtgttgaaactggtgttaaaattacagttgtcga	
	ATCLRSTKFTIYNMFC		gggtgaacataatattgaggagacagaaacatacaga	
	AGFHEGGRDSCQGDSG		gcaaaagcgaatgtgatcgaattatcctcaccac	
	GPHVTEVEGTSFLTGIIS		caactacaatgcagctattaataagtacaacatga	
	WGEECAMKGKYGIYT		cattgcccttctggaactggacgaacccttagtgcct	
	KVSRYVNWIKKTKLT		aaacagctacgttacacctatttgcattgtctgacaag	
	GPEGPSENLYFQGGSPG		gaatacacgaacatcttctcaaatgttgatctggct	
	SPAGSPTSTEEGTSESAT		atgtaagtggctggggaagagtGttccacaaagg	
	PESGPGTSTEPSEGSAP		gagatcagcttttagtttctcagtaaccttagagttccac	
	GSPAGSPTSTEEGTSTEP		ttgttgaccgagccacatgtctAcgatctacaaagt	
	SEGSAPGTSTEPSEGSA		tcaccatctataacaacatgttctgtgtggttccat	
	PGTSESATPESGPGSEP		gaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtg	
	ATSGSETPGSEPATSGS		gggggaccccatgttactgaagtggaaaggaccag	
	ETPGSPAGSPTSTEEGTS		ttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgt	
	ESATPESGPGTSTEPSEG		gcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaagggt	
	SAPGTSTEPSEGSAPGSP		atccccgtatgtcaactggattaaggaaaaaaca	
	AGSPTSTEEGTSTEPSE		agetcaetGCCCCAGAAAGGCCCAtec	
	GSAPGTSTEPSEGSAPG		gaaaatctgtattttcagggtGGGTCTCCAG	
	TSESATPESGPGTSTEPS		GTTCTCCAGCCGGGTCCCCAAC	
	EGSAPGTSESATPESGP		TTCGACCCGAGGAAGGGACCTC	
	GSEPATSGSETPGTSTEP		CGAGTCAGCTACCCCGGAGTCC	
	SEGSAPGTSTEPSEGSA		GGTCCTGGCACCTCCACCGAAC	
	PGTSESATPESGPGTSES		CATCGGAGGGCAGCGCCCCCTG	
	ATPESGPGSPAGSPTST		GGAGCCCCTGCCGGGAGCCCTA	
	EEGTSESATPESGPGSEP		CAAGCACCGAAGAGGGCACCA	
	ATSGSETPGTSESATPES		GTACAGAGCCAAGTGAGGGGA	
	GPGTSTEPSEGSAPGTS		GCGCCCCCTGGTACTAGTACTGA	
	TEPSEGSAPGTSTEPSEG		ACCATCCGAGGGGTCAGCTCCA	
	SAPGTSTEPSEGSAPGT		GGCACGAGTGAGTCCGCTACCC	
	STEPSEGSAPGTSTEPSE		CCGAGAGCGGACCGGGCTCAG	

【0376】

【表 2 5 - 2】

GSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPAT GSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSSS		AGCCCGCCACGAGTGGCAGTG AAACTCCAGGCTCAGAACCCG CCACTAGTGGGTCAGAGACTCC AGGCAGCCCTGCCGGATCCCT ACGTCCACCGAGGAGGGAACA TCTGAGTCCGCAACACCCGAAT CCGGTCCAGGCACCTCCACGGA ACCTAGTGAAGGCTCGGCACC AGGTACAAGCACCGAACCTAG CGAGGGCAGCGCTCCCGGCAG CCCTGCCGGCAGCCCAACCTCA ACTGAGGAGGGCACCAGTACT GAGCCCAGCGAGGGATCAGCA CCTGGCACCGACCGAACCTA GCGAGGGGAGCGCCCTGGGA CTAGCGAGTCAGTACACCA AGAGCGGGCCTGGAACCTTCTAC CGAACCCAGTGAGGGATCCGC TCCAGGCACCTCCGAATCCGCA ACCCCGAATCCGGACCTGGCT CAGAGCCCGCCACCAGCGGGA GCGAAACCCCTGGCACATCCAC CGAGCCTAGCGAAGGGTCCGC ACCCGGCACCGAGTACAGAGCC TAGCGAGGGATCAGCACCTGG CACCAGTGAATCTGCTACACCA GAGAGCGGCCCTGGAACCTCC GAGTCCGCTACCCCGAGAGC GGGCCAGGTTCTCCTGCTGGCT CCCCACCTCAACAGAAGAGG GGACAAGCGAAAGCGCTACGC CTGAGAGTGGCCCTGGCTCTGA GCCAGCCACCTCCGGCTCTGAA ACCCCTGGCACTAGTGAGTCTG CCACGCCTGAGTCCGGACCCGG GACCTCTACTGAGCCCTCGGAG GGGAGCGCTCCTGGCACGAGT ACAGAACCCTCCGAAGGAAGT GCACCGGGCACAAGCACCGAG CCTTCCGAAGGCTCTGCTCCCG GAACCTCTACCGAACCTCTGA AGGGTCTGCACCCGGCACGAG CACCGAACCCAGCGAAGGGTC AGCGCCTGGGACCTCAACAGA GCCCTCGGAAGGATCAGCGCCT GGAAGCCCTGCAGGGAGTCCA ACTTCCACGGAAGAAGGAACG TCTACAGAGCCATCAGAGGGG TCCGCACCAGGTACCAGCGAAT CCGCTACTCCCGAATCTGGCCC TGGGTCCGAACCTGCCACCTCC GGCTCTGAAACTCCAGGGACCT CCGAATCTGCCACACCCGAGA GCGGCCCTGGCTCCGAGCCCGC AACATCTGGCAGCGAGACACC TGGCACCTCCGAGAGCGCAAC ACCCGAGAGCGGCCCTGGCAC CAGCACCGAGCCATCCGAGGG ATCCGCCCCAGGCACTTCTGAG TCAGCCACACCCGAAAGCGGA CCAGGATCACCCGCTGGCTCCC	10 20 30 40

【表 2 5 - 3】

			CCACCAGTACCGAGGAGGGGT CCCCCGCTGGAAGTCCAACAA GCACTGAGGAAGGGTCCCCTG CCGGCTCCCCCACAAGTACCGA AGAGGGCACAAAGTGAGAGCGC CACTCCCGAGTCCGGGCCTGGC ACCAGCACAGAGCCTTCCGAG GGGTCCGCACCAGGTACCTCAG AGTCTGCTACCCCCGAGTCAGG GCCAGGATCAGAGCCAGCCAC CTCCGGGTCTGAGACACCCGGG ACTTCCGAGAGTGCCACCCCTG AGTCCGGACCCGGGTCCGAGC CCGCCACTTCCGGCTCCGAAAC TCCCGGCACAAGCGAGAGCGC TACCCAGAGTCAGGACCAGG AACATCTACAGAGCCCTCTGAA GGCTCCGCTCCAGGGTCCCCAG CCGGCAGTCCCCTAGCACCGA GGAGGGAACCTCTGAAAGCGC CACACCCGAATCAGGGCCAGG GTCTGAGCCTGCTACCAGCGGC AGCGAGACACCAGGCACCTCT GAGTCCGCCACACCAGAGTCC GGACCCGGATCTCCCGCTGGGA GCCCCACCTCCACTGAGGAGG GATCTCCTGCTGGCTCTCCAAC ATCTACTGAGGAAGGTACCTCA ACCGAGCCATCCGAGGGATCA GCTCCCGGCACCTCAGAGTCGG CAACCCCGGAGTCTGGACCCG GAACTTCCGAAAGTGCCACACC AGAGTCCGGTCCCGGGACTTCA GAATCAGCAACACCCGAGTCC GGCCCTGGGTCTGAACCCGCCA CAAGTGGTAGTGAGACACCAG GATCAGAACCTGCTACCTCAGG GTCAGAGACACCCGGATCTCCG GCAGGCTCACCAACCTCCACTG AGGAGGGCACCAGCACAGAAC CAAGCGAGGGCTCCGCACCCG GAACAAGCACTGAACCCAGTG AGGGTTCAGCACCCGGCTCTGA GCCGGCCACAAGTGGCAGTGA GACACCCGGCACTTCAGAGAG TGCCACCCCCGAGAGTGGCCCA GGCACTAGTACCGAGCCCTCTG AAGGCAGTGCGCCAGGTTCTGTC TTCATAA	10	
				20	
				30	
FIX- KLTRAET- XTEN_AE864 (配列番号6 として開示さ れる「KLTR AET」)	MQRVNMIMAESPLITI CLLGYLLSAECTVFLDH ENANKILNRPKRYNSG KLEEFVQGNLERECME EKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCES NPCLNGGSKDDINSYE CWCPFGFEGKNCELDV TCNIKNGRCEQFCKNS ADNKVVCSCTEGYRLA ENQKSCEPAVPFPCGRV SVSQTSLTRAETVFPD	614	atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcacc aggccctcaccatctgccccttttaggatatctactc agtgetgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacg ccaacaaaattctgaatcgcccaagagggtataatt caggtaaattggaagagtttctcaagggaaccttg agagagaatgtatggaagaaaaagtgtagtttgaa gaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaac aactgaattttggaagcagtatgtgatggagatca gtgtgagtcacatccatgtttaaattggcggcagttg caaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccc tttgatttgaaggaaagaactgtgaattagatgttaa catgtaacattaagaatggcagatcgagcagtttt	615	40

VDYVNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVVGGE DAKPGQFPWQVVLNG KVDAFCGGSIVNEKWI VTAAHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNAANKY NHDIALLELDEPLVLNS YVTPICIADKEYTNIFLK FGSGYVSWGWRVHFHK RSALVLQYLRVPLVDR ATCLRSTKFTIYNMFC AGFHEGGRDSCQGDG GPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKKGKYGITY KVSRYVNWIKEKTKLT GPEGPSKLTRAETGSPG SPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPES	gtaaaaatagtgctgataacaaggtggttgcctcct gtactgagggatcactgactgcagaaaaaccagaag tcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaaga gtttctgtttcacaacattctaagctcaccctgctga gactgttttccctgatgtggactatgtaaatctactga agctgaaccatttggataacatcactcaaaagcac ccaatcatttaagtacttactcgggtgttggtgga gaagatgccaaaaccagggtcaatcccttggcaggt tgttttgaatgtaaaagtgtgatcttctgtggagget ctatcggttaataaaaaatggattgtaactgctgccca ctgtgttgaacctggtgttaaaattacagtgtgcga gggtgaacataattaggagagacagacatacaga gcaaaagcgaaatgtgattcgaaattatctcaccac caactacaatgcagctattaataagtacaacatga cattgcccttctggaactggacgaacccttagtgc aaacagctacgttacacctattgcatgtgctgaag gaatacagcaacatcttcccaaaattggatctgget atgtaagtggctggggaagagtGttccacaagg gagatcagctttagttctcagtagcttaggtccac ttgttgaccgagccacatgtctAcgatctacaaagt tcaccatctataacaacatgttctgtgctgcttccat gaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtg ggggacccccatgttactgaagtggaggggaccag ttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgt gcaatgaaaggcaaatatggaatataccaaggt atcccggtatgtcaactggaatgaagaaaaacaa agctcactGGCCAGAGGCCAAtc aagctAacGegtgcGgagacAGGGTCTC CAGGTTCTCCAGCCGGGTCCCC AACTTCGACCCAGGAAGGGAC CTCCGAGTCAGCTACCCCGGAG TCCGCTCCTGGCACCTCCACCG AACCATCGGAGGGCAGCGCCC CTGGGAGCCCTGCCGGGAGCC CTACAAGCACCGAAGAGGGCA CCAGTACAGAGCCAAAGTAGG GGAGCGCCCTGGTACTAGTAC TGAACCATCCGAGGGGTGAGCT CCAGGCACGAGTGAGTCCGCT ACCCCCGAGAGCGGACCGGGC TCAGAGCCCGCCACGAGTGGC AGTGAAACTCCAGGCTCAGAA CCCGCCACTAGTGGGTGAGAG ACTCCAGGCAGCCCTGCCGGAT CCCTACGTCCACCGAGGAGG GAACATCTGAGTCCGCAACACC CGAATCCCGGTCCAGGCACCTCC ACGGAACCTAGTGAAGGCTCG GCACCAGGTACAAGCACCGAA CCTAGCGAGGGCAGCGCTCCC GGCAGCCCTGCCGGCAGCCCA ACCTCAACTGAGGAGGGCAC AGTACTGAGCCCAGCGAGGGA TCAGCACCTGGCACACGACCG AACCTAGCGAGGGGAGCGCCC CTGGGACTAGCGAGTCAGCTAC ACCAGAGAGCGGGCCTGGAAC TTCTACCGAACCAGTGAAGGA TCCGCTCCAGGCACCTCCGAAT CCGCAACCCCCGAATCCGGACC TGGCTCAGAGCCCGCCACGAGC

GPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSSS	GGGAGCGAAACCCCTGGCACA TCCACCGAGCCTAGCGAAGGG TCCGCACCCGGCACCAGTACAG AGCCTAGCGAGGGATCAGCAC CTGGCACCAGTGAATCTGCTAC ACCAGAGAGCGGCCCTGGAAC CTCCGAGTCCGCTACCCCCGAG AGCGGGCCAGGTTCTCCTGCTG GCTCCCCACCTCAACAGAAGA GGGGACAAGCGAAAGCGCTAC GCCTGAGAGTGGCCCTGGCTCT GAGCCAGCCACCTCCGGCTCTG AAACCCCTGGCACTAGTGAGTC TGCCACGCCTGAGTCCGGACCC GGGACCTCTACTGAGCCCTCGG AGGGGAGCGCTCCTGGCACGA GTACAGAACCTTCCGAAGGAA GTGCACCGGGCACAAGCACCG AGCCTTCCGAAGGCTCTGCTCC CGGAACCTCTACCGAACCCCTCT GAAGGGTCTGCACCCGGCACG AGCACCGAACCCAGCGAAGGG TCAGCGCTGGGACCTCAACAG AGCCCTCGGAAGGATCAGCGC CTGGAAGCCCTGCAGGGAGTC CAACTTCCACGGAAGAAGGAA CGTCTACAGAGCCATCAGAGG GGTCCGCACCAGGTACCAGCG AATCCGCTACTCCCGAATCTGG CCCTGGGTCCGAACCTGCCACC TCCGGCTCTGAAACTCCAGGGA CCTCCGAATCTGCCACACCCGA GAGCGGCCCTGGCTCCGAGCCC GCAACATCTGGCAGCGAGACA CCTGGCACCTCCGAGAGCGCA ACACCCGAGAGCGGCCCTGGC ACCAGCACCGAGCCATCCGAG GGATCCGCCCCAGGCATTCTG AGTCAGCCACACCCGAAAGCG GACCAGGATCACCCGCTGGCTC CCCCACCAGTACCGAGGAGGG GTCCCCCGCTGGAAGTCCAACA AGCACTGAGGAAGGGTCCCTT GCCGGCTCCCCACAAGTACCG AAGAGGGCACAAGTGAGAGCG CCTACTCCCGAGTCCGGGCCTGG CACCAGCACAGAGCCTTCCGA GGGGTCCGCACCAGGTACCTCA GAGTCTGCTACCCCCGAGTCAG GGCCAGGATCAGAGCCAGCCA CCTCCGGGTCTGAGACACCCGG GACTTCCGAGAGTGCCACCCCT GAGTCCGGACCCGGGTCCGAG CCCGCCACTTCCGGCTCCGAAA CTCCCGGCACAAGCGAGAGCG CTACCCAGAGTCAGGACCAG GAACATCTACAGAGCCCTCTGA AGGCTCCGCTCCAGGGTCCCCA GCCGGCAGTCCCCTAGCACCG AGGAGGGAACCTCTGAAAGCG CCACACCCGAATCAGGGCCAG

		GGGTCTGAGCCTGCTACCAGCGG CAGCGAGACACCAGGCACCTC TGAGTCCGCCACACCAGAGTCC GGACCCGGATCTCCCGCTGGGA GCCCCACCTCCACTGAGGAGG GATCTCCTGCTGGCTCTCCAAC ATCTACTGAGGAAGGTACCTCA ACCGAGCCATCCGAGGGATCA GCTCCCGGCACCTCAGAGTCGG CAACCCCGGAGTCTGGACCCG GAACTTCCGAAAGTGCCACACC AGAGTCCGGTCCCGGGAATTCA GAATCAGCAACACCCGAGTCC GGCCCTGGGTCTGAACCCGCCA CAAGTGGTAGTGAGACACCAG GATCAGAACCTGCTACCTCAGG GTCAGAGACACCCGGATCTCCG GCAGGCTCACCAACCTCCACTG AGGAGGGCACCAGCACAGAAC CAAGCGAGGGCTCCGCACCCG GAACAAGCACTGAACCCAGTG AGGGTTCAGCACCCGGCTCTGA GCCGGCCACAAGTGGCAGTGA GACACCCGGCACTTCAGAGAG TGCCACCCCGAGAGTGGCCCA GGCACTAGTACCGAGCCCTCTG AAGGCAGTGCGCCAGGTTCTGTC TTCATAA		
FIX- DFTRVVG- XTEN_AE864	MQRVNMIMAE SPGLITI CLLGYLLSAECTVFLDH ENANKILNRPKRYNSG KLEEFVQGNLERECME EKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCES NPCLNGGSKDDINSYE CWCPFGFEGKNC ELDV TCNIKNGRCEQFCKNS ADNKVVCSCTEGYRLA ENQKSCEPAVPFPCGRV SVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAETILDNIT QSTQSFNDFTRVVGGE DAKPGQFPWQVVLNG KVDAFCGGSIVNEKWI VTA AHC VETGVKITVV AGEHNIEETEHT EQKRN VIRIIPHHNYNAINKY NHDIALLELDEPLVLS YVTPIC IADKEYTNIFLK FGSGYVSGWGRVFHKG RSALVLQYLRVPLVDR ATCLRSTKFTIYNMFC AGFHEGGRDSCQGDSG GPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKKGKYG IYT KVSRYVNWIKETKLT GPEGPSDFTRVVGSGPG SPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS A	616	atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcacc aggectcatcaccatctgccttttaggatatctactc agtgcgtaattgtacagtttttcttgatcatgaaacg ccaacaaaaattctgaatcgcccaagaggtataatt caggtaaaattggaagagtttfttcaagggaaccttg agagagaatgtatggaagaaaaagtgtatgtttgaa gaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaac aactgaattttggaagcagtatgttgatggagatca gtgtgagtcctaattccatgtttaaatggcggcagttg caaggatgacattaatttctatgaattgttggtgtccc tttggaattgaaaggaaagaactgtgaattagatgtaa catgtaacattaagaatggcagatcgagcagtttt gtaaaaatagtgcgtgataacaagggtgttctctct gtactgaaggatcgaactgcagaaaaccagaag tctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaaga gtttctgttcaaaaacttetaagctcaccctgtctga gaactgttttctgatgtggactatgtaatttactga agctgaaaccaatttggataacatcactcaaaagcac ccaatcatttaatgaactcactcgggtgtgtgtgga gaagatgacaaaaccagggtcaattccctggcagggt tgtttgaaatggtaaaagttgatgcattctgtggaagct ctatcgtaaatgaaaaatggattgtaactgctgcccc ctgtgttgaactggtgttaaaattacagttgtcgca ggtgaacataatattgaggagacagaacatacaga gcaaaagcgaatgtgattcgaattatttctcacc caactacaatgcagctattaataagtacaacatga cattgcccccttctggaactggacgaacctttagtct aaacagetacgttacacctatttgcattgctgacaag gaatacacgaacatcttctcaaatfttgatctggct atgtaagtgtgctggggaagagtGttccacaagg gagatcagcttttagttcttcagttcagtttaggtccac ttgttgcgcgaccacatgtctAcgatcacaaga tcaccatctataacaacatgttctgtgctggttccat	617

【表 2 5 - 7】

PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSSS		gaaggaggtagagattcatgcaaggagatagtg ggggaccccatgttactgaagtggaggaccag ttcttaactggaattattagctggggggaagagtgt gcaatgaaaggcaaatatggaatataataccaaggt atcccgggtatgtaactggattaaggaaaaacaa agetcaactGGCCCAGAAGGCCCAtec gactteacAegggtAgttggCGGGTCTCC AGGTTCTCCAGCCGGGTCCCCA ACTTCGACCGAGGAAGGGACC TCCGAGTCAGCTACCCCGGAGT CCGGTCTTGGCACCTCCACCGA ACCATCGGAGGGCAGCGCCCC TGGGAGCCCTGCCGGGAGCCCT ACAAGCACCGAAGAGGGCACCC AGTACAGAGCCAAGTGAGGGG AGCGCCCCCTGGTACTAGTACTG AACCATCCGAGGGGTGAGCTCC AGGCACGAGTGAGTCCGCTAC CCCCGAGAGCGGACCGGGCTC AGAGCCCCGCCACGAGTGGCAG TGAAACTCCAGGCTCAGAACCC GCCACTAGTGGGTGAGAGACTC CAGGCAGCCCTGCCGGATCCCC TACGTCCACCGAGGAGGGAAC ATCTGAGTCCGCAACACCCGAA TCCGGTCCAGGCACCTCCACGG AACCTAGTGAAGGCTCGGCAC CAGGTACAAGCACCGAACCTA GCGAGGGCAGCGCTCCCGGCA GCCCTGCCGGCAGCCCAACCTC AACTGAGGAGGGCACCACTAC TGAGCCCAGCGAGGGATCAGC ACCTGGCACCCAGCACCGAACCT AGCGAGGGGAGCGCCCCCTGGG ACTAGCGAGTCAGCTACACCA GAGAGCGGGCCTGGAACCTCT ACCGAACCCAGTGAGGGATCC GCTCCAGGCACCTCCGAATCCG CAACCCCCGAATCCGGACCTGG CTCAGAGCCCGCCACCAGCGG GAGCGAAACCCCTGGCACATC CACCGAGCCTAGCGAAGGGTC CGCACCCGGCACCAAGTACAGA GCCTAGCGAGGGATCAGCACCC TGGCACCAAGTGAATCTGCTACA CCAGAGAGCGGCCCTGGAACC TCCGAGTCCGCTACCCCGGAGA GCGGGCCAGGTTCTCCTGCTGG CTCCCCACCTCAACAGAAGAG GGGACAAGCGAAAGCGCTACG CCTGAGAGTGGCCCTGGCTCTG AGCCAGCCACCTCCGGCTCTGA AACCCCTGGCACTAGTGAGTCT GCCACGCCTGAGTCCGGACCCG GGACCTCTACTGAGCCCTCGGA GGGGAGCGCTCCTGGCACGAG TACAGAACCTTCCGAAGGAAG TGCACCGGGCACAAGCACCGA GCCTTCCGAAGGCTCTGCTCCC GGAACCTCTACCGAACCTCTG AAGGGTCTGCACCCGGCACGA	10 20 30 40

		GCACCGAACCCAGCGAAGGGT CAGCGCCTGGGACCTCAACAG AGCCCTCGGAAGGATCAGCGC CTGGAAGCCCTGCAGGGAGTC CAACTTCCACGGAAGAAGGAA CGTCTACAGAGCCATCAGAGG GGTCCGCACCAGGTACCAAGCG AATCCGCTACTCCCGAATCTGG CCCTGGGTCCGAACCTGCCACC TCCGGCTCTGAAACTCCAGGGA CCTCCGAATCTGCCACACCCGA GAGCGGCCCTGGCTCCGAGCCC GCAACATCTGGCAGCGAGACA CCTGGCACCTCCGAGAGCGCA ACACCCGAGAGCGGCCCTGGC ACCAGCACCCGAGCCATCCGAG GGATCCGCCCCAGGCACTTCTG AGTCAGCCACACCCGAAAGCG GACCAGGATCACCCGCTGGCTC CCCCACCACTACCGAGGAGGG GTCCCCCGCTGGAAGTCCAACA AGCACTGAGGAAGGGTCCCT GCCGGCTCCCCACAAGTACCG AAGAGGGCACAAAGTGAGAGCG CCACTCCCGAGTCCGGGCCTGG CACCAGCACAGAGCCTTCCGA GGGGTCCGCACCAGGTACCTCA GAGTCTGCTACCCCCGAGTCAG GGCCAGGATCAGAGCCAGCCA CCTCCGGGTCTGAGACACCCGG GACTTCCGAGAGTGCCACCCCT GAGTCCGGACCCGGGTCCGAG CCCGCCACTTCCGGCTCCGAAA CTCCCGGCACAAGCGAGAGCG CTACCCAGAGTCAGGACCAG GAACATCTACAGAGCCCTCTGA AGGCTCCGCTCCAGGGTCCCCA GCCGGCAGTCCCACTAGCACCG AGGAGGGAACCTCTGAAAGCG CCACACCCGAATCAGGGCCAG GGTCTGAGCCTGCTACCAGCGG CAGCGAGACACCAGGCACCTC TGAGTCCGCCACACCAGAGTCC GGACCCGGATCTCCCGCTGGGA GCCCCACCTCCACTGAGGAGG GATCTCCTGCTGGCTCTCCAAC ATCTACTGAGGAAGGTACCTCA ACCGAGCCATCCGAGGGATCA GCTCCCGGCACCTCAGAGTCGG CAACCCCGGAGTCTGGACCCG GAACTTCCGAAAGTGCCACACC AGAGTCCGGTCCCGGGACTTCA GAATCAGCAACACCCGAGTCC GGCCCTGGGTCTGAACCCGCCA CAAGTGGTAGTGAGACACCAG GATCAGAACCTGCTACCTCAGG GTCAGAGACACCCGGATCTCCG GCAGGCTCACCAACCTCCACTG AGGAGGGCACCAAGCACAAGC CAAGCGAGGGCTCCGCACCCG GAACAAGCACTGAACCCAGTG

40

【表 2 5 - 9】

			AGGGTTCAGCACCCGGCTCTGA GCCGGCCACAAGTGGCAGTGA GACACCCGGCACTTCAGAGAG TGCCACCCCGAGAGTGGCCCA GGCACTAGTACCGAGCCCTCTG AAGGCAGTGCGCCAGGTTCTGC TTCATAA	
FIX-/FXI/- XTEN_AE864	MQRVNMIMAE SPGLITI CLLG YLLSAECTVFLDH ENANKILNRPKRYNSG KLEEFVQGNLERECME EKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCES NPCLNGGSKDDINSYE CWC PF GFEGKNC EL DV TCNIKNGRCEQFCKNS ADNKVVCSCTEGYRLA ENQKSCEPAVPPFCGRV SVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAETILDNIT QSTQSFNDFTRVV GGE DAKPGQFPWQVVLNG KVDAFCGGSIVNEKWI VTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNAANKY NHDIALLEDEPLVLNS YVTPIC IADKEYTNFLK FGSGYVSGWGRV FHKG RSALVLQYLRVPLVDR ATCLRSTKFTIYNMFC AGFHEGGRDSCQGD SG GPHVTEVEGTSFLTGIIS WGEECAMKGKYG IYT KVSRYVNWIKETKLT GPEQTSKLTRAETVFPG SPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESAT	618	atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcacc aggcctcatcaccatctgcccttttaggatactactc agtgc tgaatgtacagttttcttgatcatgaaacg ccaacaaaattctgaatcgccaaagaggtataatt caggtaaatgggaagattgttcaagggaaccttg agagagaatgtatggaagaaaagtgtatgttgaa gaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaac aactgaattttggaagcagtatgttgatggagatca gtgtgagtc caatccatgtttaaattggcggcagttg caaggatgacattaattcctatgaattgtgtgtccc tttgatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaa catgtaacattaaatggcagatgcgagcagtttt gtaaaaatagtctgataacaagggtgttgcctct gtactgagggatactgacttgcagaaaaccagaag tctgtgaaccagcagtgccatttcctatgtggaaga gtttctgttcaaaaacttcaagtcacccgtgtga gactgttttctctgactgtgactatgtaattctactga agctgaaaccattttggataacatcactcaaaagcac ccaatcatttaatgacttcaactcgggtgtgtgtgga gaagatgccaaccagggtcaattcccttggcaggt tgttttgaatgtaaatgtgatgcattctgtggaggct ctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgtgccca ctgtgttgaactgtgtttaaattacagttgtcgcga gggtgaacataatattgaggagacagaacatacaga gcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcacea caactacaatgcagctattaataagtacaacatga cattgccccttctggaactggacgaacccttagtgc aaacagctacgttacacctatttgcattgtgacaag gaatacagcaacattctcctcaatttggatctggct atgtaagtggctggggaagagtGttccacaagg gagatcagctttagttcttcagtaaccttagagttcac ttgttgaccgagccacatgtctAcgactacaaaagt tcaccatctataacaacatgttctgtgtgtgttccat gaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtg gggggaccccatgttactgaagtggaaagggaccag ttcttaactggaattattagctgggggtgaagagtg gcaatgaaggcaaatatggaatatataccaaggt atcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaaca agctcactGGCCAGAAcaaacAtctaag ctAacGcgtgcGgagacAgtAttccaGGT TCTCCAGCCGGGTCCCCAACTT CGACCGAGGAAGGGACCTCCG AGTCAGCTACCCCGGAGTCCGG TCCTGGCACCTCCACCGAACCA TCGGAGGGCAGCGCCCTGGG AGCCCTGCCGGGAGCCCTACA AGCACCGAAGAGGGCACCACT ACAGAGCCAAGTGAGGGGAGC GCCCCTGGTACTAGTACTGAAC CATCCGAGGGGTACGCTCCAG GCACGAGTGAGTCCGCTACCCC CGAGAGCGGACCGGGCTCAGA GCCCCGCCACGAGTGGCAGTGA AACTCCAGGCTCAGAACCCGCC	619

10

20

30

40

【表 2 5 - 1 0】

PESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPAT GSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSSS		ACTAGTGGGTCAGAGACTCCA GGCAGCCCTGCCGGATCCCCTA CGTCCACCGAGGAGGGAACAT CTGAGTCCGCAACACCCGAATC CGGTCCAGGCACCTCCACGGA ACCTAGTGAAGGCTCGGCACC AGGTACAAGCACCGAACCTAG CGAGGGCAGCGCTCCCGGCAG CCCTGCCGGCAGCCCAACCTCA ACTGAGGAGGGCACCAGTACT GAGCCCAGCGAGGGATCAGCA CCTGGCACCAGCACCGAACCTA GCGAGGGGAGCGCCCCTGGGA CTAGCGAGTCAGCTACACCAG AGAGCGGGCCTGGAACCTTCTAC CGAACCCAGTGAGGGATCCGC TCCAGGCACCTCCGAATCCGCA ACCCCCGAATCCGGACCTGGCT CAGAGCCCCGCCACCAGCGGGA GCGAAACCCCTGGCACATCCAC CGAGCCTAGCGAAGGGTCCGC ACCCGGCACCAGTACAGAGCC TAGCGAGGGATCAGCACCTGG CACCAGTGAATCTGCTACACCA GAGAGCGGCCCTGGAACCTCC GAGTCCGCTACCCCCGAGAGC GGGCCAGGTTCTCCTGCTGGCT CCCCACCTCAACAGAAGAGG GGACAAGCGAAAGCGCTACGC CTGAGAGTGGCCCTGGCTCTGA GCCAGCCACCTCCGGCTCTGAA ACCCCTGGCACTAGTGAGTCTG CCACGCCTGAGTCCGGACCCGG GACCTCTACTGAGCCCTCGGAG GGGAGCGCTCCTGGCACGAGT ACAGAACCTTCCGAAGGAAGT GCACCGGGCACAAGCACCGAG CCTTCCGAAGGCTCTGCTCCCG GAACCTCTACCGAACCTCTGA AGGGTCTGCACCCGGCAGAG CACCGAACCCAGCGAAGGGTC AGCGCCTGGGACCTCAACAGA GCCCTCGGAAGGATCAGCGCCT GGAAGCCCTGCAGGGAGTCCA ACTTCCACGGAAGAAGGAACG TCTACAGAGCCATCAGAGGGG TCCGCACCAGGTACCAGCGAAT CCGCTACTCCCGAATCTGGCCC TGGGTCCGAACCTGCCACCTCC GGCTCTGAAACTCCAGGGACCT CCGAATCTGCCACACCCGAGA GCGGCCCTGGCTCCGAGCCCGC AACATCTGGCAGCGAGACACC TGGCACCTCCGAGAGCGCAAC ACCCGAGAGCGGCCCTGGCAC CAGCACCGAGCCATCCGAGGG ATCCGCCCCAGGCACTTCTGAG TCAGCCACACCCGAAAGCGGA CCAGGATCACCCGCTGGCTCCC CCACCAGTACCGAGGAGGGGT CCCCCGCTGGAAGTCCAACAA	10 20 30 40

		GCACTGAGGAAGGGTCCCCCTG CCGGCTCCCCACAAGTACCGA AGAGGGCACAAAGTGAGAGCGC CACTCCCGAGTCCGGGCCTGGC ACCAGCACAGAGCCTTCCGAG GGGTCCGCACCAGGTACCTCAG AGTCTGCTACCCCCGAGTCAGG GCCAGGATCAGAGCCAGCCAC CTCCGGGTCTGAGACACCCGGG ACTTCCGAGAGTGCCACCCCTG AGTCCGGACCCGGGTCCGAGC CCGCCACTTCCGGCTCCGAAAC TCCCGGCACAAGCGAGAGCGC TACCCCAGAGTCAGGACCAGG AACATCTACAGAGCCCTCTGAA GGCTCCGCTCCAGGGTCCCCAG CCGGCAGTCCCACTAGCACCGA GGAGGGAACCTCTGAAAGCGC CACACCCGAATCAGGGCCAGG GTCTGAGCCTGCTACCAGCGGC AGCGAGACACCAGGCACCTCT GAGTCCGCCACACCAGAGTCC GGACCCGGATCTCCCGCTGGGA GCCCCACCTCCACTGAGGAGG GATCTCCTGCTGGCTCTCCAAC ATCTACTGAGGAAGGTACCTCA ACCGAGCCATCCGAGGGATCA GCTCCCGGCACCTCAGAGTCGG CAACCCCGGAGTCTGGACCCG GAACTTCCGAAAGTGCCACACC AGAGTCCGGTCCCGGGACTTCA GAATCAGCAACACCCGAGTCC GGCCCTGGGTCTGAACCCGCCA CAAGTGGTAGTGAGACACCAG GATCAGAACCTGCTACCTCAGG GTCAGAGACACCCGGATCTCCG GCAGGCTCACC AACCTCCACTG AGGAGGGCACACAGCACAGAAC CAAGCGAGGGCTCCGCACCCG GAACAAGCACTGAACCCAGTG AGGGTTCAGCACCCGGCTCTGA GCCGGCCACAAGTGGCAGTGA GACACCCGGCACTTCAGAGAG TGCCACCCCGAGAGTGGCCCA GGC ACTAGTACCGAGCCCTCTG AAGGCAGTGC GCCAGGTTTCGT TTCATAA	

哺乳類細胞の一過性トランスフェクション

【 0 3 8 3 】

HEK293細胞をトランスフェクションの前日に、10%FBS、1×ペニシリン／ストレプトマイシン、および5mg/mLビタミンKを含む1mLの培地において、12ウェルプレートにおいて1ウェルあたり 1×10^5 個蒔種した。細胞を蒔種した翌日のトランスフェクションのために、OptiMEMに希釈したプラスミドDNA (0.6 μg

)(合計25 μ L)を、希釈したFuGENE6(22.9 μ LのOptiMEMにおける2.1 μ LのFuGENE6)と混合し、室温で30分間インキュベートした後、細胞に添加した。トランスフェクションの3日後または4日後に、培地を回収し、500 $\times$ gで室温で5分間遠心分離した後、上清を0.2 μ mフィルターを用いて濾過し他後、ELISAにおけるFVII-XTENまたはFIX-XTENの発現、および凝固アッセイにおける性能(FVIIについてはPT、およびFIX活性についてはaPTT)を試験した。本結果を表26に呈する。

【0384】

PTアッセイによってFVII-XTENについて測定された力価(活発なFVIIタンパク質)は、ELISAによって測定される力価(総FVIIタンパク質)よりも高いことは留意されるべきであり、これについての実際の原因が明確でないままであるが、(1)XTENによるエピトープ遮断によるFVII-XTENの文脈におけるFVIIの過小評価、(2)PTアッセイによる凝固活性の過大評価、または(1)および(2)の両方の組み合わせにより得る。aPTTアッセイによるFIXについて測定された力価(活発なFIXタンパク質)が、ELISAによって測定された力価(総FIXタンパク質)よりも約20%のみ有意に低いことも留意されるべきであり、未知の理由によるが、そのうちの1つは、CHOまたは他の哺乳類細胞において産生される組換えFIXについて報告された現象である不十分なプロペプチドの加工であり得る。aPTTによるFIX-XTENの力価は、FIX単独と比較してELISAよりもさらに比例的に低く、FIXの活性が、XTENとの融合によって低下し得ることを示唆し、1つの仮定が、FVII-XTENをコードするが間にTEV開裂部位の挿入されたプラスミドコンストラクトで形質移入した細胞から産生される材料についてのTEV処理後のタンパク質の活性およびELISA力価を分析することによって確認された。

【0385】

【表26】

表26: FVII、FVII-XTEN_AE864、FIX、およびFIX-XTEN_AE864の発現

	FVII		FVII-XTEN		FIX		FIX-XTEN	
	ELISA	凝固	ELISA	凝固	ELISA	凝固	ELISA	凝固
ng/ml	391.0	397.7	34.8	176.6	309.8	60.0	13.7	0.4

CHO-K1安定プールおよびFVII-XTENを産生する細胞株の作製

細胞: ATCCから購入したCHO-K1細胞(カタログCCL-61、ロット58078551)を完全培地(F-12K、10%FBS、および1 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシン、付録1)において回復させ、4世代経代した後に、複数のバイアルを5%DMSOを有する完全培地において凍結した。1つのバイアルを完全培地と類似だが5%FBSを有する培地において回復させ、1回以上経代した後トランスフェクションをした。

【0386】

安定したプールの作製: FVII-AE864、FVII-AE864、およびFVII-AE288をそれぞれコードするプラスミドpBC0014、pBC0016、およびpBC0018の構築を先の実施例において説明した。2つのプラスミドpBC0016およびpBC0018はUCOEも保持する。該プラスミドをまずPvuIIで線形化した後、FuGENE6トランスフェクション試薬を用いて、上記由来のCHO-K1細胞の個別のT25フラスコへとトランスフェクトし、フラスコあたり6.5 $\times$ 10⁵個の細胞について3.6 μ gのプラスミドDNAであった。2日後、細胞をT75に転移させ、選択培地(10 μ g/mLピューロマイシンおよび5 μ g/mLビタミンKを有する完全培地)において培養した。フラスコを新鮮な選択培地に2~3日ごとに交換した。トランスフェクションの2週間後、T75フラスコ由来の細胞を安定したプールとして凍結した。

【0387】

クローンの選択: 初回スクリーニングのため、凍結した安定したプール細胞を回復させ

、0.5個／ウェルの標的密度で6枚の96ウェルプレートにおいて蒔種した。蒔種の約1週間後、顕微鏡下で観察されたような単一の細胞クラスターを有するウェル由来の消費済み培地をFV I Iの発現についてE L I S Aによって試験した。E L I S Aによって初回スクリーニングにおいて試験されたクローン数は、p B C 0 0 1 4について154、p B C 0 0 1 6について210、およびp B C 0 0 1 8について135であった。有意な数のクローンは、検出できないレベルのFV I Iを発現した(図9、黒い棒、ng/mLとして表現)が、該クローンのうちの15~20%は、3~8倍高いFV I Iを発現し、これらのクローンは次に、さらなるスクリーニングおよび選択のために選択され、p B C 0 0 1 4については20、p B C 0 0 1 6については30、およびp B C 0 0 1 8については20であった。これらのウェルにおける細胞クラスターのサイズは、1~10にスコア化され、1は最小のクラスター、10は最大のクラスターであった。本結果を図9の灰色の棒として示す。これらのクローンの細胞クラスターサイズの分布は、同じバリエーションについてのクローンすべてのものと類似しており、該クローンが、最速に増殖するものであるために選択されたわけではないことを示唆した。

【0388】

追加的な回数のスクリーニングのために、標準化された数の細胞を複数ウェルプレートに蒔種した。消費済み培地を蒔種の2~3日後に回収し、E L I S AによってFV I I濃度について、およびP Tによって凝固活性について試験し、また、細胞を該プレートから回収し、V i - C e l lを用いて計数した。クローンを(1) E L I S Aおよび凝固に従ったFV I I力価；(2) E L I S A力価／細胞計数の比および凝固力価／細胞計数の比；ならびに(3) ウェスタンブロットによって測定されるような、クローンによって産生される産物の完全性および均質性によって階級分けした。コンストラクトp B C 0 0 1 4、p B C 0 0 1 6、およびp B C 0 0 1 8の各々についてのクローンの選択を以下において個別に説明した。

【0389】

p B C 0 0 1 4：第二ラウンドのスクリーニングのために、初回スクリーニングから選択された上位20のクローンについての96ウェルプレートにおける細胞をまず、T 2 5フラスコにおいて増量した後、二つ組の24ウェルプレートに蒔種し、1つを2日間、もう1つを3日間培養した。消費済みの培地をプレートからFV I I E L I S Aのために回収し、細胞を収穫し、V i - C e l lによって計数した。14のクローンをE L I S Aおよび凝固による力価、E L I S A力価／個、ならびに凝固力価／細胞計数比に従って選択し、さらにスクリーニングした。凍結バイアルを9のクローン、すなわち1 F 1 0、2 F 7、6 H 4、1 A 3、6 F 1 0、5 C 2、5 F 1、3 H 2、4 C 8について調製した。14のクローンのうち、1 F 1 0、1 F 4、2 F 7、4 C 8、6 H 4、および6 G 1を再度スクリーニングし、E L I S Aおよび凝固による力価、E L I S A力価／細胞計数の比、ならびにウェスタンブロットによる産物の完全性および均質性(図10~図12)に従って階級分けした。クローン6 G 1は、全長の産物よりも有意に小さな産物を発現した(図12)ので、廃棄した。追加的な凍結バイアルをクローン1 F 1 0、2 F 7、6 H 4、および4 C 8について調製した。クローン4 C 8をローラボトルにおいてFV I I - A E 8 6 4の産生について試験した。

【0390】

p B C 0 0 1 6：第二ラウンドのスクリーニングのために、初回スクリーニングから選択された上位30のクローンについての96ウェルプレートにおける細胞を12ウェルプレート、次いでT 2 5に転移させ、E L I S Aおよび凝固アッセイに従った力価、E L I S A力価／細胞計数の比、および凝固力価／細胞計数の比によって階級分けした。第三ラウンドのスクリーニングのために、1 D 4、1 G 2、1 G 6、2 C 1 1、2 H 6、3 A 2、3 B 1、3 C 7、3 F 2、3 H 1、3 H 6、3 H 1 0、4 G 8、5 E 1 2、6 F 1 1を含む15のクローンを試験し、先の基準+ウェスタンブロットに従って階級分けし(図13)、凍結した細胞を3 H 6以外の15のクローンすべてについて調製した。1 G 2、2 C 1 1、3 B 1、3 C 7、3 F 2、3 H 1 0、4 G 8、5 E 1 2を含む8のクローンを上

位クローンとして選択し、該クローンのために追加的な凍結バイアルを調製した。クローン3H10をローラーボトルにおける規模拡大産生のために選択した。

【0391】

pBC0018：第二ラウンドのスクリーニングのために、初回スクリーニングから選択された上位20のクローンについての96ウェルプレートにおける細胞をまずT25フラスコにおいて増量した後、24ウェルプレートにおいて蒔種した。消費済み培地をFV I I E L I S Aのためのプレートから回収し、細胞を収穫し、V i - C e l lによって計数した。12のクローンをE L I S Aおよび凝固による力価、E L I S A力価／個、および凝固力価細胞計数比に従って選択し、さらにスクリーニングした。凍結したバイアルを9のクローン、すなわち2C3、2D5、3B2、3B10、3G2、3G12、5A12、6A3、and 6E7について調製した。9のクローンのうち、2D5、3B2、3G2、3G12、5A12、6A3、and 6E7を再度スクリーニングし、E L I S Aおよび凝固による力価、E L I S A力価／細胞計数の比、および凝固力価／細胞計数の比、ならびにウェスタンブロットによる産物の完全性および均質性に従って階級分けした（図14）。クローン3B2は、ウェスタンブロットにおける複数のバンドを示す産物を発現したので、これを廃棄した。追加的な凍結バイアルをクローン2D5、3G2、3G12、5A12、6A3、6E7について調製した。クローン3G12および6E7をローラーボトルにおけるF V I I - A E 2 8 8の産生のために用いた。

10

【0392】

ローラーボトルにおける細胞培地において分泌されるF V I I - X T E Nの産生

20

CHO-K1細胞の安定したプールまたはクローンをT175において、フラスコあたり35mLの選択培地において増量した。細胞をトリプシン処理によって収穫し、該細胞を用いて、ローラーボトルごとにつき1～2のT175フラスコ由来の細胞を用いた300mLの選択培地のローラーボトルに初日に蒔種した（ボトルあたり1700cm²表面積）。消費済み培地／馴らし培地を取り出して除去し（またはこの培地におけるX T E N融合タンパク質が精製されることが出来る場合収穫し）、300mLの移行培地（1%FBS、0.1%Ex-Cyte、5mg/mLビタミンK、および1×ペニシリン／ストレプトマイシン）を各ローラーボトルに添加した。7（または8）日後、消費済み培地を取り出して除去し（またはX T E N融合タンパク質がこの培地から精製されることが出来る場合収穫し）、発現培地（0.1%Ex-Cyte、1%ITS-A、5mg/mLビタミンK、および1×ペニシリン／ストレプトマイシンを含むOpt i M E M）を、ボトルあたり300mLまたは、最適化からの結果に応じた他の容積ほど添加した。馴らし培地は、所望の産物力価および品質に応じて、1日1回、または2、もしくは3、もしくは4日に1回収穫することができた。収穫するために、馴らし培地を遠心ボトルに注ぎ、新鮮な発現培地をボトルあたり300mLまたは最適化からの結果に応じた他の容積ほど添加した。消費済み培地を収穫して新鮮な培地で再充填するこの製造は、ローラーボトルを終止した時に力価および／または産物の質があまりにも低いと考えられるまで、2～4週間持続できた。次に、馴らし培地を卓上遠心機において3500rpm、4～8℃で10分間遠心分離した。次に、0.2mmフィルターを用いて上清を濾過した。濾液を即時処理したかまたは、精製のための正接流濾過（t a n g e n t i a l f l o w f i l t r a t i o n, T F F）による処理の前に-80℃の冷凍庫において保存したかのいずれかであった。

30

40

【0393】

実施例26：F V I I - X T E Nコンストラクトの精製および特徴づけ

正接流濾過および透析濾過によるF V I I - X T E N _ A E 8 6 4の濃縮および緩衝液交換

F V I I - A E 8 6 4（A C 4 0 4）を発現する安定したCHO細胞株由来の総容積10.7Lの上清バッチS279、S281、S282、およびS287を、C u n o Z e t a P l u s B i o c a pフィルターおよびC u n o B i o A s s u r eカプセルを用いて濾過した。該バッチをその後、30,000Da M W C Oを有するM i l l i

50

pore Pellicon 2 Mini カートリッジを用いた正接流濾過によっておよそ 20 倍濃縮した。同じ正接流濾過カートリッジを用いて、試料を 10 mM トリス pH 7.5、1 mM EDTA で、5 容積分の緩衝液交換を伴って透析濾過した。試料を 50 mL の一定分量に分け、-80 °C で凍結させた。F V I I 活性は、濾過由来の透過画分において検出できず、活性の ~75 % の回収が、濃縮され緩衝液交換された材料においてみられた。

【0394】

BaSO₄ 吸着による F V I I - X T E N _ A E 8 6 4 の精製

上清を含む F V I I - A E 8 6 4 (A C 4 0 4) を濃縮し、緩衝液を 10 mM トリス pH 7.5、1 mM EDTA に交換した。その後、5 mL のこの試料を P B S において 10 倍希釈し、追加的な N a C l を 50 mM まで添加した後、BaSO₄ を 20 mg/mL まで添加した。試料を振盪機において室温で 30 分間弾ませた。次に、試料を 3000 rpm で 5 分間遠心分離して、BaSO₄ をペレット化した。上清を廃棄し、ペレットを 5 mL の 200 mM 酢酸ナトリウムにおいて再懸濁し、室温で 30 分間弾ませた。これを 2 回以上反復した。第三の洗浄後、ペレットを 0.8 mL の 100 mM クエン酸三ナトリウム pH 7.0 に再懸濁し、室温で 30 分間弾ませた。これを 1 回反復した。ブラッドフォードアッセイを実施して、試料におけるタンパク質の総量を決定し、Innovin を活性化型トロンボプラスチンとして用いる P T ベースの因子アッセイにおいて F V I I 活性をアッセイした (表 27)。層タンパク質に対する活性の比は、この精製工程からの ~12 倍の正味の精製を示した。

【0395】

【表 27】

表 27: BaSO₄ 吸着による FVII-AE864 の精製表

画分	容積 (ml)	総活性 (U)	総タンパク質 (ug)	比活性	精製	純度 (%)
供給物	5	17.3	6300	0.003	1.0	0.1%
FT 1 回目	5	4.0	4687	0.001	0.3	0.0%
洗浄 1 回目	5	NA	57	NA	NA	NA
洗浄 2 回目	5	NA	8	NA	NA	NA
洗浄 3 回目	5	NA	8	NA	NA	NA
溶出 1 回目	0.8	3.2	85	0.038	13.8	1.9%
溶出 2 回目	0.8	0.4	12	0.030	11.0	1.5%

G l a アフィニティークロマトグラフィーによる F V I I - X T E N _ A E 8 6 4 の精製
カルシウム依存性様式で F V I I の G L A ドメインを結合するモノクローナル抗体 (クローン I D C a F V I I - 2 2) を、P i e r c e 製の U l t r a l i n k ビーズに共役させた。P B S における 10 mg の抗体を 1.25 の樹脂に添加し、最終容積を共役緩衝液 (100 mM M O P S、700 mM クエン酸ナトリウム、pH 8.0) で 15 mL にすることによって、共役を実施した。このことは、10 mL の樹脂スラリーおよび 1 mg : 1 mL の抗体質量 : ビーズスラリー容積の比を生じた。該スラリーを室温で 2 時間インキュベートした後、ビーズを共役緩衝液で洗浄した。B C A アッセイは、~70 % の抗体がビーズと共役することを示した。ビーズを次に 1 M トリス pH 8.0 で室温で 2 時間クエンチした。ビーズを 10 mM トリス pH 7.5 および 10 mM C a C l 2 へと平衡化し、5.5 mL のビーズを 10 mM トリス pH 7.5 および ~10 mM C a C l 2 における濃縮され緩衝液交換した F V I I - A E 8 6 4 (A C 4 0 4) 50 mL と混合した。試料を 4 °C で一晚、振盪機上でインキュベートして、F V I I - X T E N を樹脂に結合させた。翌日、ビーズを 45 mL の 10 mM トリス、500 mM N a C l、10 mM C a C l 2、pH 7.5 で 3 回洗浄した後、20 mL の 10 mM トリス、100 mM E D T A、pH 7.5 で溶出した。S D S - P A G E 分析は、純度が 90 % を超過することを示す (図 15)。

【0396】

F V I I - X T E N _ A E 8 6 4 および F V I I - X T E N _ A E 2 8 8 の活性化
アフィニティ精製した F V I I - A E 8 6 4 (A C 4 0 4) および F V I I - A E 2 8 8 (A C 3 9 8) を F X a の添加によって F V I I a - A E 8 6 4 および F V I I a - A E 2 8 8 へと活性化した。F V I I - X T E N タンパク質を 1 0 m M トリス、1 0 m M C a C l 2、p H 7. 5 へと、A m i c o n 限外 1 0, 0 0 0 D a M W C O 濃縮機における反復した回数の濃縮を介して緩衝液交換し、その後希釈した。終容積は、 ~ 0.4 m g / m L において 1 m L であった。N o v a g e n 製の F X a を 1 0 単位 / m L の終濃度に添加し、試料を 4 ° C で一晩インキュベートした。還元型 S D S - P A G E は、活性化の際に生じるに過ぎ得ない、分子からの軽鎖の損失を表す非還元型試料と比較して、D T T を用いた上部バンドにおける下方向の移行による F V I I - X T E N タンパク質から F V I I a - X T E N タンパク質への完全な変換を示した (図 1 6)。加えて、軽鎖は、ゲル上でより低く表れるように見え、対照の F V I I a の軽鎖と同じ位置に泳動し、F V I I から F V I I a への F V I I ドメインの移行をさらに確認した。類似の緩衝液条件のもとで、F V I I - X T E N 融合体は、トロンビン、F I X a m、F X I I a、または R 1 5 2 と I 1 5 3 の間のペプチド結合を選択的に切断することのできる任意の他のプロテアーゼの添加によって、F V I I a - X T E N へと活性化される。

【0397】

F V I I - X T E N _ A E 8 6 4 および F V I I - X T E N _ A E 2 8 8 の自己活性化
アフィニティ精製した F V I I - A E 8 6 4 (A C 4 0 4) および F V I I - X T E N _ A E 2 8 8 (A C 3 9 8) を F V I I a - A E 8 6 4 および F V I I a - A E 2 8 8 へ、試料を 4 ° C で 1 週間インキュベートすることによって活性化した。F V I I - X T E N タンパク質を 1 0 m M トリス、1 0 m M C a C l 2、p H 7. 5 へと、A m i c o n 限外 1 0, 0 0 0 D a M W C O 濃縮機における反復した回数の濃縮を介して緩衝液交換し、その後希釈した。インキュベーション後、タンパク質を S D S - P A G E によってアッセイし、上部バンドは、分子からの軽鎖の損失を表す非還元型試料と比較して、D T T を用いて上部バンドにおける特徴的な下方向の移行を示した (図 1 7)。加えて、軽鎖は、F X a により活性化された材料の 2 つのロットと同じ点におけるゲルにおいてより低く表れるのを見ることができ、該タンパク質が F V I I a - X T E N に自己活性化したという結論をさらに確証する。

【0398】

陰イオン交換クロマトグラフィーによる F V I I - X T E N _ A E 8 6 4 の精製
上清を含む F V I I - A E 8 6 4 (A C 4 0 4) の試料を濃縮し、1 0 m M トリス p H 7. 5、1 m M E D T A へと緩衝液交換した後、1 M C a C l 2 を添加して ~ 5 m M の C a C l 2 の終濃度に調整した。試料を、A k t a クロマトグラフィーシステムにおいて平衡化した 2 m L のマクロキャップ Q カラムに負荷した。タンパク質を 0 ~ 1 0 0 % の直線勾配の緩衝液 B で 2 0 カラム容積にわたって溶出した。緩衝液 A は m、2 0 m M M E S、5 m M C a C l 2 p H 6. 0 を含み、緩衝液 B は、2 0 m M M E S、5 m M C a C l 2 p H 6. 0、および 5 0 0 m M N a C l を含んだ。画分を、I n n o v i n を活性化型トロンボプラスチンとして用いる P T ベースの因子アッセイを用いて F V I I 活性についてアッセイした。活性の単一の締まったピークは、4 7. 9 m L と 5 2. 4 m L の間で、または 2 3. 2 ~ 2 7. 8 m S / c m で溶出しながら観察された (図 1 9)。ブラッドフォードアッセイを実施して、負荷および溶出画分におけるタンパク質の総量を決定した。活性と総タンパク質との比は、カラムからの ~ 5 倍の正味の精製を示した。

【0399】

疎水性相互作用クロマトグラフィーによる F V I I - X T E N _ A E 8 6 4 の精製
上清を含む F V I I - A E 8 6 4 (A C 4 0 4) の試料を濃縮し、1 0 m M トリス p H 7. 5、1 m M E D T A へと緩衝液交換した後、1 M C a C l 2 の添加によって ~ 5 m M C a C l 2 の終濃度に調整した。試料を A k t a クロマトグラフィーシステムにおいて平衡化した 2 m L トヨパールフェニルカラムへと負荷した。タンパク質を 0 ~ 1 0 0

%の緩衝液Bの直線勾配を用いて20カラム容積にわたって溶出した。緩衝液Aは、10 mM トリス、5 mM CaCl₂、3 M NaCl、pH 7.5を含み、緩衝液Bは、10 mM トリス、5 mM CaCl₂、pH 7.5を含んだ。画分を、Innovinを活性化型トロンボプラスチンとして用いるPTベースの因子アッセイを用いてFVII活性についてアッセイした。活性の単一のピークは、1 Mと2 MのNaClの間で溶出されるのが観察された(図20)。ブラッドフォードアッセイを実施して、負荷および溶出画分におけるタンパク質の総量を決定した。活性と総タンパク質との比は、カラムからの～2倍の正味の精製を示した。

【0400】

陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた単量体FVII-AE864からの凝集したタンパク質の除去

アフィニティ精製したFVII-AE864(AC404)を負荷し、1 mL緩衝液と10 mL試料との比で、200 mM MES、210 mM CaCl₂ pH 6.0の添加によってpH 6.0に調整した。Akta FPLCシステムを用いて、試料を2 mLマクロキャップQカラムを用いて精製した。カラムを緩衝液A(20 mM MES、1 mM CaCl₂、pH 6.0)へと平衡化し、試料を負荷した。試料を、30%～80%の緩衝液B(20 mM MES、1 mM CaCl₂、pH 6.0+500 mM NaCl)の直線勾配を用いて、20カラム容積にわたって溶出した。215 nmのクロマトグラムは、溶出特性において2つのピークを示した(図21のA)。初期ピークおよび後期ピークに相応する画分をプールし、60 cmのBioSep G4000カラムを用いた分子ふるいクロマトグラフィー(SEC)を介して分析した。初期ピークは、単量体AE864タンパク質の特徴的な水力学的半径を有する単分散した集団を含んでいた(10.1 nmまたは1.9 MDaの見かけの分子量)(図21のB)。後期ピークは、2つの集団を含んでおり、より小さな単量体ピークは、初期ピークにおける凝集体の不在を示し、カラムの空隙容積(22 mL)においてより早期に溶出するより大きなピークは、凝集したタンパク質の特徴である。

【0401】

FVII-AE864およびFVII-AE288のSEC分析

FVII-AE864(AC404)およびFVII-AE288(AC398)をアフィニティおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、特徴づけた。60 cmのBioSep G4000カラムを用いる分子ふるいクロマトグラフィーは、単量体AE864タンパク質(15.2の見かけの分子量因子について10.1 nmまたは1.9 MDaの見かけの分子量)または単量体AE288タンパク質(9.0の見かけの分子量因子について8.2 nmまたは650 kDaの見かけの分子量)のいずれかについて特徴的な水力学的半径を有する単分散した集団を示した(図18)。最小の凝集は、いずれかの試料において観察された。SDS-PAGEは、90%超の純粋なタンパク質を示し、最小の宿主細胞タンパク質の混入を伴った。

【0402】

脂質付加組織因子により示されるFVII-AE864およびFVII-AE288の凝固活性分析

活性を、以下の通りPTベースの第VII因子アッセイによってアッセイした：標準曲線を、正常血漿をFVII欠乏性血漿で10倍希釈した後、第VII因子欠乏性血漿を用いてさらに4、5倍の連続希釈を実施することによって調製した。これは、活性の100、20、4、0.8、および0.16 m単位/mLにおける点で標準曲線を作成し、ここで、活性の1単位を1 mLの正常ヒト血漿におけるFVII活性の量として定義する。また、FVII欠乏性血漿は、無血漿(null plasma)における活性の背景レベルを決定するために含まれた。1:10の容積比で試料を、FVII-XTENをFVII欠乏性血漿に添加することによって調製した。試料を37℃で分子デバイスプレートリーダー分光計において3分間インキュベートし、その点において、凝固反応を試料1容積あたり2容積のトロンボプラスチン(Dade Innovin, B4212-50

）の添加によって開始した。濁度を405 nmで5分間モニターして、反応特性を作成した。。PT時間または凝固活性の開始する時間は、OD405 nmがベースラインを0.06ほど上回って増大する第一の時間として定義した。対数-直線標準曲線を、PT時間に対して直線的に関連する活性の対数を用いて作成した。これから、プレートウェルにおける試料の活性を決定した後、試料における活性を、FVII欠乏性血漿への希釈を説明するために11ほど乗じることによって決定した。四つ組の測定結果に基づいて、FVII-AE864（AC404）の融合体の活性は、30単位/mLであり、FVII-AE288（AC398）は15 U/mLであった。加えて、凝固に関するこの脂質付加した組織因子の活性化を用いて、トロンビン発生アッセイ、TEGアッセイ、ローテム（rotam）アッセイ、および基質のターンオーバー、機械的凝固形成、または光凝固検出による凝固酵素機能の検出を包含する他のインビトロ/エクスピボのように洗練された読み出しを伴う凝固アッセイにおけるFVII-XTEN融合体の活性をアッセイする。

10

【0403】

FVII-AE864およびFVII-AE288の可溶性組織因子により開始される凝固活性分析

FVIIa-AE288に対するFVII-AE288（AC398）の活性化の後、活性を、可溶性組織因子（sTF）誘導性凝固によって測定した。このことは、Staggo STA-Clot FVIIa活性アッセイキットを用いて実施される。簡潔には、FIIaを結合しFVIIa活性を亢進するが、FVIIからFVIIaに変化しないをsTFとともに試料をインキュベートした。FVII無血漿における凝固を誘導する時間を、分子デバイスプレートリーダーにおいてモニターされる場合、ベースラインを上回って0.06ほどOD405 nmが増大する第一の時間として定義した。この時間を、FVII無血漿へ添加した既知のFVIIa量を含む標準曲線と比較し、活性数を算出した。FVIIa-AE288試料は、112 U/mLのFVIIa活性と等価の活性を含んだ。加えて、凝固に関するこの可溶性組織因子の活性化を用いて、凝固アッセイにおけるFVII-XTEN融合体の活性をアッセイし、該アッセイには、トロンビン発生アッセイ、TEGアッセイ、ローテムアッセイ、および基質のターンオーバー、機械的凝固形成、または光凝固検出による凝固酵素機能の検出を包含する他のインビトロ/エクスピボのように洗練された読み出しを伴う。

20

30

【0404】

FVII-AE864およびFVII-AE288のELISAベースの濃度決定

FVII-XTEN融合体濃度を、アフィニティ精製したポリクローナルヒツジ抗ヒトFVII抗体を用いるELISAアッセイを用いて決定し、ここで、修飾されていない形態の抗体を用いて、該タンパク質を捕捉し、HRP抱合した形態を用いて、該タンパク質を検出した。捕捉抗体を4℃で一晩、高結合96ウェルアッセイプレート（Corning 3690）へと被覆した。プレートを3%BSA含有PBSを用いて室温で1時間ブロッキングした。プレートをPBSTにおいてプレート洗浄機を用いて6回洗浄した。次に、PBSTに希釈した試料または標準物質を適切なウェルへと室温で2時間結合させた。10 ng/mL~1 pg/mL未満に及ぶ標準曲線を、PBSTにおける既知の濃度の市販の血漿由来のFVII（Abcamカタログ番号ab62386）を連続希釈することによって調製した。プレートをPBSTでプレート洗浄機を用いて再度6回洗浄した。FVII-XTENを次に、検出抗体を用いて検出し、該抗体を37℃で1時間結合させた。プレートをPBSTでプレート洗浄機を用いて再度6回洗浄し、水でさらに1回洗浄した。次に、シグナルをTMB基質で顕色させ、分子デバイスプレートリーダー分光計において405 nmで読み取ることによって定量した。次に、4パラメータ適合を標準物質、および標準曲線との比較によって決定される試料の濃度に関して実施する。

40

【0405】

蛍光基質の直接的なターンオーバーを介したFVII-AE864活性およびFVII-AE288活性の評価

50

F V I I - X T E N 融合体活性を、基質 D - F P R - 6 - アミノ - 1 - ナフタレンスルホンアミド (D - F P R - A N S N) におけるペプチド結合の開裂をモニターすることによって決定し、式中、D F P R 部分は、A N S H 部分における第二級アミンに連結されたペプチド鎖である。アルギニン残基と A N S H 部分の間の結合が、F V I I 触媒ドメインのセリンプロテアーゼ活性によって開裂される場合、A N S H は放出され、強いフルオロフォアとなる。F V I I - X T E N 活性は、20 mM トリス pH 8.0、135 mM NaCl における 50 μ M ~ 100 μ M に及ぶ基質濃度で 50 pM ~ 1 μ M に及ぶ酵素濃度で測定される。A N S N 蛍光 (励起 352 nm、発光 470 nm) の変化を経時的にモニターすることによって、F V I I a 触媒ドメインの活性を決定することができる。この活性を F V I I a 由来の標準曲線と比較して、試料における F V I I a 等価物の量を決定することができ、または k c a t および K m などの動態特性を決定することができる。

10

【0406】

F X a により共役した色素生成基質アッセイを介した F V I I - A E 864 活性および F V I I - A E 288 活性の評価

リン脂質およびカルシウムの存在下で組織因子 (T F) と複合体形成する場合、F V I I および F V I I - X T E N は、第 X 因子を第 X a 因子へと活性化する。B i o p h e n 第 V I I 因子は、第 V I I 因子活性を試験するための色素発生アッセイである。第 V I I 因子は、ウサギトロンプラスチンによって提供される組織因子と酵素複合体を形成する。次に、定常濃度でアッセイに存在する第 X 因子を活性化させ、過剰量で第 X a 因子となる。F X a の濃度は、具体的な第 X a 因子色素発生基質 (S X a - 11) に及ぼす活性によって実際に測定される。第 X a 因子は、基質を開裂し、p N A を生じる。生じた p N A の量は、第 X a 因子活性に直接的に比例する。最終的に、アッセイされる試料における第 V I I 因子活性の量と、生じた第 X a 因子の活性の間には直接的な関連性があり、放出される p N A の量によって測定され、405 nm における色素顕色によって決定される。未知の試料由来のシグナルを既知の F V I I 活性の標準曲線由来のシグナルと比較することによって、未知の試料における F V I I 活性の量を算出することは可能である。

20

【0407】

実施例 27: F I X - X T E N 濃度決定のための E L I S A アッセイ

F I X - X T E N 濃度を、具体的な符合した対の抗体による E L I S A アッセイを用いて決定し、害アッセイにおいて、検出抗体を H R P と抱合させ、検出を簡素化した (A f f i n i t y B i o l o g i c a l s カタログ番号 F I X - E I A)。高結合 96 ウェルアッセイプレート (C o r n i n g 3690) に捕捉抗体を 4℃で一晩被覆させた。プレートを 3% B S A 含有 P B S で室温で 1 時間ブロッキングした。プレートをプレート洗浄機を用いて P B S T において 6 回洗浄した。P B S T に希釈した試料または標準物質を次に、適切なウェルへと室温で 2 時間結合させた。標準曲線は、25 ng/mL ~ 1 pg/mL 未満におよび、P B S T における既知の濃度の市販の血漿由来の F I X (A b c a m カタログ番号 a b 62544) を連続希釈することによって調製した。プレートをプレート洗浄機を用いて P B S T で再度 6 回洗浄した。次に、F I X を、37℃で 1 時間結合させる検出抗体を用いて検出した。プレートをプレート洗浄機を用いて P B S T で再度 6 回洗浄し、水でさらに 1 回洗浄した。次に、シグナルを T M B 基質を用いて顕色させ、分子デバイスプレートリーダー分光計において 405 nm で読み取ることによって定量した。次に、4 パラメータ適合を、標準物質および標準曲線との比較によって決定した試料の濃度に関して実施する。

30

40

【0408】

実施例 28: F I X - X T E N 活性決定のための a P T T ベースのアッセイ

F I X - X T E N は、内在的なまたは接触で活性化された凝固経路における F I X を置き換えるよう作用するであろう。この凝固経路の活性を、活性化型部分的トロンプラスチン時間アッセイ (a P T T) を用いて評価する。F I X 活性を以下のとおり具体的に測定し、標準曲線を、正常対照血漿 (P a c i f i c H e m o s t a s i s カタログ番号 100595) を F I X 欠乏性血漿 (カタログ番号 100900) で 2 倍希釈し、次に、

50

第 I X 因子欠乏性血漿で 6、4 倍連続希釈を再度実施することによって調製した。このことは、活性の 500、130、31、7.8、2.0、0.5、および 0.1 m 単位/mL における点での標準曲線を作成し、ここで、活性の 1 単位を 1 mL の正常ヒト血漿における F I X 活性の量として定義する。また、F I X 欠乏性血漿は、無血漿における活性の背景レベルを決定するために含まれた。F I X-X T E N を F I X 欠乏性血漿に、1 ; 10 の容積比で添加することによって試料を調製した。試料を以下の通り a P T T アッセイを用いて試験した。試料を分子デバイスプレートリーダー分光計において 37℃ で 2 分間インキュベートし、その点において等容積の a P T T 試薬 (P a c i f i c H e m o s t a s i s カタログ番号 100402) を添加し、さらに 3 分間の 37℃ インキュベーションを実施した。インキュベーション後、1 容積の塩化カルシウム (P a c i f i c H e m o s t a s i s カタログ番号 100304) を添加することによって、該アッセイを活性化させた。濁度を 450 nm において 5 分間モニターして、反応特性を作成した。a P T T 時間、または凝固活性の開始する時間を、OD 405 nm がベースラインを 0.06 ほど上回って増大する最初の時点として定義した。対数 - 直線標準曲線を、a P T T 時間と直線的に関連する活性の対数を用いて作成した。これから、プレートウェルにおける試料の活性を決定した後、試料における活性を、F I X 欠乏性血漿への希釈を説明するために 11 ほど乗じることによって決定した。

【0409】

実施例 29 : F I X / c F X I / X T E N は、F I X-X T E N と比較して亢進した活性を有する

F I X (p C W 0 5 9 6)、F I X-X T E N (p C W 0 5 9 7)、F I X / c F X I 1 / X T E N (p C W 0 7 3 5)、F I X / c F X I 2 / X T E N (p C W 0 7 3 6) および F I X / c F X I 3 / X T E N (p C W 0 7 3 7) を、C H O - K 1 細胞において一過性に発現させた。一過性トランスフェクションの上清を 30,000 M W C O 濃縮装置においておよそ 15 倍ほど濃縮した。濃縮した試料および非濃縮試料の濃度を E L I S A によって決定した。次に、濃縮した試料の凝固活性を、a P T T ベースの因子アッセイを用いて決定した。含有する X T E N について、活性は、任意の F X I c 開裂部位の存在によって劇的に変化した。3 つの場合すべてにおいて、F X I 開裂部位の存在は、凝固活性を 30 倍超ほど亢進した (図 22 および表 28 を参照されたい)。相対的に一致する E L I S A の測定結果は、このことが、力価の変化よりもむしろ比活性の亢進であることを示す。加えて、F X I 開裂部位コンストラクトについての E L I S A 濃度に対する活性測定結果の比は今や、F I X に対する比と類似しており、F I X-F X I c-X T E N が、X T E N の不在下で発現した F I X ドメインと類似の特性の F I X ドメインを含むことを示した。

【0410】

【表 28】

表 28 : F I X / c F X I / X T E N コンストラクトの活性

コンストラクト	ELISA による濃度 (ng/ml)	活性による濃度 (ng/ml)	活性のある 画分
F I X / c T E V / X T E N	非入手	非入手	4%
F I X	197	30	15%
F I X-X T E N	10	0	2%
F I X / c F X I 1 / X T E N	23	7	30%
F I X / c F X I 2 / X T E N	26	9	34%
F I X / c F X I 3 / X T E N	29	11	40%

実施例 30 : ラット F V I I-X T E N _ A E 8 6 4 における C F X T E N 融合ポリペプチドの薬物動態分析

F V I I 単独と比較して、C F X T E N F V I I-X T E N _ A E 8 6 4 の薬物動態をスプラッグ・ドローリーにおいて試験した。F V I I-X T E N _ A E 8 6 4 および F V I I を雌のスプラッグ・ドローリー系ラット (n=3) に、頸静脈カテーテルを通じて 3 μ

g／個体で静脈内投与した。血液試料（0.2 mL）を予冷しておいたヘパリン処理済みチューブへと投与前、0.08、0.5、1、2、4、8、24、48、72時間の時点で回収し、血漿へと処理した。試験品の定量を、捕捉および検出の両方について抗FVII抗体を用いるELISAアッセイによって実施した。非コンパートメント分析をWinNonLinにおいて実施し、すべての時点は、PKパラメータを決定するための適合に含まれていた。

【0411】

薬物動態結果を表29および図23に要約する。データは、XTENが、FVII単独と比較してCFXTEN融合タンパク質としてFVIIの半減期を大いに延長することができ、FVII-XTENが、FVIIについての1時間と比較しておよそ38時間の半減期を有することを示す。加えて、ラットにおいて50.8 mLの分布の算出された容積でFVII-XTENを血流に制限し、細胞外空間への滲出がほとんどないことを示した。

10

【0412】

【表29】

表29：ラットにおけるFVII試験品の半減期

試験品（コンストラクト）	T _{1/2} （時間）
FVII-XTEN(AP315)	37.9
FVII (P318)	1.0

20

実施例31：ラットFIX-XTEN_AE864におけるCFXTEN融合ポリペプチドの薬物動態分析

マクロキャップQ精製したFIX-XTEN_AE864の薬物動態を、スプラッグ・ドローリー系ラット（n=3）において試験し、未精製のFIX-XTEN、開裂したFIX-XTEN TEV（XTENをTEVプロテアーゼの使用によって融合タンパク質から除去する調製）、および市販のFIX Benefixと比較した。化合物を雌のスプラッグ・ドローリーラットに頸静脈カテーテルを通じて3 μg／個体で静脈内投与した。血液試料（0.2 mL）を、予冷しておいたヘパリン処理済みチューブへと投与前、0.08、0.5、1、2、4、8、24、48、72時間の時点で回収し、血漿へと処理した。試験品の定量を、捕捉および検出の両方について抗FVII抗体を用いるELISAアッセイによって実施した。非コンパートメント分析をWinNonLinにおいて実施し、すべての時点は、PKパラメータを決定するための適合に含まれていた。

30

【0413】

薬物動態結果を表30および図24に要約する。データは、XTENが、開裂したFIX-XTEN TEVまたはFIX Benefixのいずれかと比較してCFXTEN融合タンパク質としてFIXの半減期を大いに延長することができ、FVII-XTENが、FIX Benefixについての4.6時間と比較しておよそ34.7時間の半減期を有することを示す。加えて、ラットにおいて38 mLの分布の算出された容積でFVII-XTENを血流に制限し、細胞外空間への滲出がほとんどないことを示した。

40

【0414】

【表 3 0】

表30：ラットにおけるFIX試験品の半減期

試験品（コンストラクト）	T _{1/2} （時間）
FIX-XTEN マクロキャップ Q [AP316a]	34.7
FIX-XTEN [AP316]	33.1
FIX-XTEN TEV [AP316b]	1.5
FIX Benefix	3.3

10

実施例 3 2：動物モデルにおける F V I I a－X T E N _ A E 8 6 4 の薬力学的評価

F V I I a－X T E Nコンストラクトのインビボでの薬理活性を、血友病、手術、外傷、血小板減少／血小板機能不全、クロピドグレル／ヘパリン誘発性出血、および水力学的注射のものを含むがこれらに限定されない出血の種々の臨床前モデルを用いて評価する。これらのモデルは、他の F V I I aアプローチのために使用および公表されたものと等価の方法を用いて、マウス、ラット、ウサギ、およびイヌを含む複数の種において開発されることができる。F V I I a－X T E N組成物は、インビボでの投与に適合した水性緩衝液（例えば、リン酸緩衝塩類溶液、またはトリス緩衝塩類溶液）において提供される。組成物は、特定のモデルのために最適化された適切な用量、投薬頻度、投薬スケジュール、および投与経路で投与される。効能の決定には、とりわけ、F V I I a活性の測定、プロトロンビン時間（P T）、活性化型部分プロトロンビン時間（a P T T）、出血回数、全血凝固時間（W B C T）、トロンボエラストグラフィー（T E GまたはR O T E M）を含む。

20

【0 4 1 5】

P Dモデルの一例において、F V I I a－X T E NおよびF V I I aを、遺伝的に欠損したまたは実験的に誘導したH e m AまたはH e m Bマウスに投与する。投与後の種々の時点で、F V I I aおよびF V I I a－X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F V I I aおよびF V I I a－X T E Nの活性を市販のF V I I a活性キットによって測定し、凝固時間をP Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F V I I a－X T E Nコンストラクトが、より少ない頻度またはより簡便な投薬間隔でF V I I aの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF V I I aおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

30

【0 4 1 6】

マウス出血チャレンジP Dモデルにおいて、F V I I a－X T E NおよびF V I I aを、遺伝的に欠損したまたは実験的に誘導されたH e m AまたはH e m Bマウスに投与し、止血チャレンジに及ぼす効果を測定する。止血チャレンジには、とりわけ、尾部処置チャレンジ、ヘマートロプシー（h e m a r t h r o p t h y）チャレンジ、関節出血、または伏在静脈チャレンジを含むことができる。投与後の種々の時点で、F V I I aおよびF V I I a－X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F V I I aおよびF V I I a－X T E Nの活性を市販のF V I I a活性キットによって測定し、出血時間を測定し、凝固時間をP Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、V I I a－X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬間隔でF V I I aの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF V I I aおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

40

【0 4 1 7】

イヌP Dモデルにおいて、F V I I a－X T E NおよびF V I I aを、遺伝的に欠損した血友病イヌに投与する。投与後の種々の時点で、F V I I aおよびF V I I a－X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F V I I aおよびF V I I a－X T E Nの活性を市販のF V I I a活性キットによって測定し、凝固時間をP Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F V I I a－X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではない

50

かまたはより簡便な投薬によるF V I I aの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF V I I aおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

【0418】

イヌ出血チャレンジPDモデルにおいて、F V I I a-X T E NおよびF V I I aを、遺伝的に欠損した血友病イヌに投与し、止血チャレンジに及ぼす効果を測定する。止血チャレンジには、とりわけ角皮の出血時間を含むことができる。投与後の種々の時点において、F V I I およびF V I I a-X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F V I I およびF V I I a-X T E Nの活性を市販のF V I I a活性キットによって測定し、出血時間を測定し、凝固時間をP Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F V I I a-X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬間隔によるF V I I aの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF V I I aおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

10

【0419】

出血に関する追加的な臨床前モデルには、血友病、手術、外傷、血小板減少／血小板機能不全、クロピドグレル／ヘパリン誘発性出血、および水力学的注射のものを含むがこれらに限定されない。これらのモデルは、他のF V I I aアプローチについて使用および公表されたものと等価の方法を用いて、マウス、ラット、ウサギ、およびイヌを含む複数種において開発されることができる。全体として、本結果は、F V I I a-X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬間隔によるF V I I aの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF V I I aおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

20

【0420】

実施例33：動物モデルにおけるF I X-X T E N_A E 8 6 4の薬力学的評価

F I X-X T E Nコンストラクトのインビボでの薬理活性を、血友病、手術、外傷、血小板減少／血小板機能不全、クロピドグレル／ヘパリン誘発性出血、および水力学的注射のものを含むがこれらに限定されない出血に関する種々の臨床前モデルを用いて評価する。これらのモデルは、他のF I Xアプローチについて使用および公表されたものと等価の方法を用いて、マウス、ラット、ウサギ、およびイヌを含む複数種において開発されることができる。F I X-X T E N組成物は、インビボでの投与に適合した水性緩衝液（例えば、リン酸緩衝塩類溶液またはトリス緩衝塩類溶液）において提供される。組成物は、特定のモデルのために最適化された適切な用量、投薬頻度、投薬スケジュール、および投与経路で投与される。効能の読み出しには、とりわけ、F I X活性の測定、P T、a P T T、出血回数、全血凝固時間（W B C T）、トロンボエラストグラフィー（T E GまたはR O T E M）を含む。

30

【0421】

PDモデルの一例において、F I X-X T E NおよびF I Xを、遺伝的に欠損したまたは実験的に誘導したH e m AまたはH e m Bマウスに投与する。投与後の種々の時点で、F I XおよびF I X-X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F I XおよびF I X-X T E Nの活性を市販のF I X活性キットによって測定し、凝固時間をa P T Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F I X-X T E Nコンストラクトが、より少ない頻度またはより簡便な投薬間隔でF I Xの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF I Xおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

40

【0422】

マウス出血チャレンジPDモデルにおいて、F I X-X T E NおよびF I Xを、遺伝的に欠損したまたは実験的に誘導されたH e m AまたはH e m Bマウスに投与し、止血チャレンジに及ぼす効果を測定する。止血チャレンジには、とりわけ、尾部処置チャレンジ、ヘマートロプチャーチャレンジ、関節出血、または伏在静脈チャレンジを含むことができる。投与後の種々の時点で、F I XおよびF I X-X T E NのレベルをE L I S Aによって

50

測定し、F I XおよびF I X－X T E Nの活性を市販のF I X活性キットによって測定し、出血時間を測定し、凝固時間をa P T Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F I X－X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬間隔でF I Xの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF I Xおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

【0423】

イヌPDモデルにおいて、F I X－X T E NおよびF I Xを、遺伝的に欠損した血友病イヌに投与する。投与後の種々の時点で、F I XおよびF I X－X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F I XおよびF I X－X T E Nの活性を市販のF I X活性キットによって測定し、凝固時間をa P T Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F I X－X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬によるF I Xの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF I Xおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

10

【0424】

イヌ出血チャレンジPDモデルにおいて、F I X a－X T E NおよびF I Xを、遺伝的に欠損した血友病イヌに投与し、止血チャレンジに及ぼす効果を測定する。止血チャレンジには、アッセイのうちでとりわけ角皮の出血時間を含むことができる。投与後の種々の時点において、F I XおよびF I X－X T E NのレベルをE L I S Aによって測定し、F I XおよびF I X－X T E Nの活性を市販のF I X活性キットによって測定し、出血時間を測定し、凝固時間をa P T Tアッセイによって測定する。全体として、本結果は、F I X－X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬間隔によるF I Xの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF I Xおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

20

【0425】

出血に関する追加的な臨床前モデルには、血友病、手術、外傷、血小板減少／血小板機能不全、クロピドグレル／ヘパリン誘発性出血、および水力学的注射のものを含むがこれらに限定されない。これらのモデルは、他のF I Xアプローチについて使用および公表されたものと等価の方法を用いて、マウス、ラット、ウサギ、およびイヌを含む複数種において開発されることができる。全体として、本結果は、F I X－X T E Nコンストラクトが、あまり頻繁ではないかまたはより簡便な投薬間隔によるF I Xの同等な薬用量に対する潜在能力におけるF I Xおよび／または等価物と比較して、出血を阻害する上でより有効であり得ることを示すことができる。

30

【0426】

実施例34：開裂配列を有するC F X T E N

F X I aによって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X－X T E N融合タンパク質は、図2のFにおいて図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製されることができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、放出部位開裂配列は、F X I aプロテアーゼ（E C 3. 4. 21. 27, U n i p r o t P 0 3 9 5 1）によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含むF I X－X T E Nに組み込まれることができる。具体的には、アミノ酸配列K L T R A E T（配列番号6）は、F X I aプロテアーゼによって該配列のアルギニンの後ろで切断される。F X Iは、内在性凝固経路または接触で活性化した凝固経路におけるF I Xの直前に配置された凝血原プロテアーゼである。活発なF X I aは、F X I I aによる酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によって、F X Iから生じる。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割はF I Xの位置R 1 9 1およびR 2 2 6におけるタンパク質を切断し、次に、このことが凝固経路を永続化させることによって、酵素前駆体からペプチドを切り出すことによってF I Xを活性化することである。F X I aの生成はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときにのみ生じる。それゆえ、K L T R A E T開裂配列（配列番号6）の組み込みによって、X T E Nドメインは、内在性凝固経路の活

40

50

性化と同時に、および凝固が生理学的に必要とされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X-X T E N融合タンパク質が、内在性経路の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F X I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じる天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X-X T E Nがプロドラッグとして無処置のままである状況を作る。

【0427】

F X I I aによって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質は、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、X T E N放出部位配列は、F X I I aプロテアーゼ (E C 3. 4. 21. 38, UniProt P00748) によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含むことができる。具体的には、配列T M T R I V G G (配列番号89) は、該配列の位置4におけるアルギニンの後ろで切断される。F X I I は、内在性凝固経路または接触で活性化した凝固経路におけるF I Xの前に配置された凝血原プロテアーゼである。活発なF X I aは、非自己表面との接触によって、およびカリクレインによる開裂によって、F X I I から生じる。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によってF X I を活性化することであり (図3)、次に、このことが凝固経路を永続化させる。F X I I aの生成はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときにのみ生じる。それゆえ、T M T R I V G G開裂配列 (配列番号89) の組み込みによって、X T E Nドメインは、内在性凝固経路の活性化と同時に、および凝固が生理学的に必要とされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X-X T E N融合体が、内在性経路の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F X I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じる天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X-X T E Nがプロドラッグとして無処置のままである状況を作る。

【0428】

カリクレインによって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、X T E N放出部位配列は、カリクレインプロテアーゼ (E C 3. 4. 21. 34, UniProt P03952) によって認識および開裂されるアミノ酸配列であり得る。具体的には、配列S P F R V V G G (配列番号620) [Rawlings N. D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320] は、該配列の位置4におけるアルギニンの後ろで切断される。カリクレインは、内在性凝固経路または接触で活性化した凝固経路におけるF I Xの前に配置された凝血原プロテアーゼである。活発なカリクレインは、非自己表面との接触によって、血漿カリリエン (Kallikrein) から生じる。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によってF X I I を活性化することであり (図3)、次に、このことが凝固経路を永続化させる。カリクレインの生成はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときにのみ生じる。それゆえ、S P F R V V G G開裂配列 (配列番号620) の組み込みによって、X T E Nドメインは、内

10

20

30

40

50

在性凝固経路の活性化と同時に、および凝固が生理学的に必要とされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X-X T E N融合体が、内在性経路の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F X I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じる天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X-X T E Nがプロドラッグとして無処置のままである状況を作る。

【0429】

F V I I aによって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位配列は、F V I I aプロテアーゼ(E C 3. 4. 21. 21, U n i p r o t P 0 8 7 0 9)によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列L Q V R I V G G (配列番号91) [R a w l i n g s N. D., e t a l. (2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320]は、該配列の位置4におけるアルギニンの後ろで切断される。F V I I aは、外来性凝固経路または細胞の損傷で活性化した凝固経路におけるF I Xの前に配置された凝血原プロテアーゼである。活発なF V I I aは、組織因子、リン脂質、およびカルシウムに対する結合によって促進される自己触媒過程においてF V I Iから生じる。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によってF I XおよびF Xを活性化することであり(図3)、次に、このことが凝固経路を永続化させる。F V I I a活性はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときのみ生じる。それゆえ、L Q V R I V G G開裂配列(配列番号91)の組み込みによって、X T E Nドメインは、内在性凝固経路の活性化と同時に、および凝固が生理学的に必要とされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X-X T E N融合体が、内在性経路の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F V I I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じるであろう天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X-X T E Nがプロドラッグとして無処置のままである状況を作る。

【0430】

F I X aによって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位開裂配列は、F I X aプロテアーゼ(E C 3. 4. 21. 22, U n i p r o t P 0 0 0 7 4 0)によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列P L G R I V G G (配列番号92) [R a w l i n g s N. D., e t a l. (2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320]は、該配列の位置4におけるアルギニンの後ろで切断される。活発なF I X aは、リン脂質およびカルシウムの存在下でF X I aまたはF V I I aのいずれかによるF I Xの開裂によって生じる。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によってF Xを活性化することであり(図3)、次に、このことが凝固経路を永続化させる。F I X a活性はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときのみ生じる。それゆえ、P L G R I V G G配列(配列番号92)の

組み込みによって、X T E Nドメインは、外来性凝固経路または内在性凝固経路のいずれかの活性化と同時に、および凝固が生理学的に必要とされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X-X T E N融合体が、内在性経路の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F V I I aまたはF X I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じるであろう天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X-X T E Nがプロドラッグとして無処置のままであろう状況を作る。

10

【0431】

F X aによって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、F X aプロテアーゼ(E C 3. 4. 21. 6, U n i p r o t P 0 0 7 4 2)によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列I E G R T V G G (配列番号93) [R a w l i n g s N. D., e t a l.

(2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320]は、該配列の位置4におけるアルギニンの後ろで切断される。活発なF X aは、リン脂質およびカルシウムの存在下でF I X aによるF Xの開裂によって生じ、凝固経路における第I X因子からすぐ下流の工程である。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によってF I Iを活性化することであり(図3)、次に、このことが凝固経路を永続化させる。F X a活性はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときにのみ生じる。それゆえ、I E G R T V G G配列(配列番号93)の組み込みによって、X T E Nドメインは、外来性凝固経路または内在性凝固経路のいずれかの活性化と同時に、および凝固が生理学的に必要とされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X-X T E N融合体が、凝固の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F V I I aまたはF X I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じるであろう天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X-X T E Nがプロドラッグとして無処置のままであろう状況を作る。

20

30

【0432】

F I I a(トロンビン)によって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、F I I aプロテアーゼ(E C 3. 4. 21. 5, U n i p r o t P 0 0 7 3 4)によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列L T P R S L L V (配列番号94) [R a w l i n g s N. D., e t a l. (2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320]は、該配列の位置4におけるアルギニンの後ろで切断される。活発なF I I aは、リン脂質およびカルシウムの存在下でF X aによるF I Iの開裂によって生じ、凝固経路における第I X因子から下流にある。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、酵素フィブリノーゲンを開裂させることであり(図3)、次に、このことが凝固経路を開始する。F I I a活性はきっちりと制御されており、凝固が適切な止血に必要なときにのみ生じる。それゆえ、L T P R S L L V配列(配列番号94)の組み込みによって、X T E Nド

40

50

メインは、外来性凝固経路または内在性凝固経路のいずれかの活性化と同時に、および凝固が生理学的に必要なとされる場合に、F I Xから取り出されるに過ぎないであろう。このことは、F I X－X T E N融合体が、凝固の活性化の間に1つの追加的な様式で加工される状況を作る。F V I I aまたはF X I aによってF I XドメインのR 1 9 1およびR 2 2 6において生じるであろう天然の開裂に加えて、第三の開裂が、X T E Nタンパク質から今や活性化されたF I X aを脱共役するであろうX T E N放出部位において生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、分子が遊離F I X aを生じるよう加工され、遊離F I X aが、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強する凝固の活性化まで、F I X－X T E Nがプロドラッグとして無処置のままである状況を作る。

10

【0433】

エラスターゼ - 2 によって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X－X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、エラスターゼ - 2プロテアーゼ (E C 3. 4. 21. 37, U n i p r o t P 0 8 2 4 6) によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。

具体的には、配列L G P V S G V P (配列番号95) [R a w l i n g s N. D., e t a l. (2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320] は、該配列の位置4の後ろで切断される。エラスターゼは、好中球によって構成的に発現され、循環におけるすべての場合に存在する。その活性はセルピンによってきっちりと制御されており、それゆえ、ほとんどの場合最小に活発である。それゆえ長い寿命のF I X－X T E Nが循環すると、その画分が開裂され、凝固に用いられるためのより短い寿命のF I Xのプールを作製する。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、予防量のF I Xを定常的に放出する循環するプロドラッグデポを作る。

20

【0434】

M M P - 1 2 によって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X－X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、M M P - 1 2プロテアーゼ (E C 3. 4. 24. 65, U n i p r o t P 3 9 9 0 0) によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列G P A G L G G A (配列番号97) [R a w l i n g s N. D., e t a l. (2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320]

は、該配列の位置4の後ろで切断される。M M P - 1 2は、全血において構成的に発現される。それゆえ、長い寿命のF I X－X T E Nが循環すると、その画分が開裂され、凝固に用いられるためのより短い寿命のF I Xのプールを作製する。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、予防量のF I Xを定常的に放出する循環するプロドラッグデポを作る。

30

【0435】

M M P - 1 3 によって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X－X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、M M P - 1 3プロテアーゼ (E C 3. 4. 24. -, U n i p r o t P 4 5 4 5 2) によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列G P A G L R G A (配列番号99) [R a w l i n g s N. D., e t a l. (2008) N u c l e i c A c i d s R e s., 36: D320] は、該配列の位置4の後ろで切断される。M M P - 1 3は、全血において構成的に発現される。それゆえ、長い寿命のF I X－X T E Nが循環すると、その画分が開裂され、凝固

40

50

に用いられるためのより短い寿命のF I Xのプールを作製する。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、予防量のF I Xを定常的に放出する循環するプロドラッグデポーを作る。

【0436】

MMP - 17によって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、MMP - 20プロテアーゼ (E C . 3 . 4 . 24 . - , U n i p r o t Q 9 U L Z 9) によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列A P L G L R L R (配列番号101) [R a w l i n g s N . D . , e t a l . (2 0 0 8) N u c l e i c A c i d s R e s . , 36 : D 320] は、該配列の位置4の後ろで切断される。MMP - 17は、全血において構成的に発現される。それゆえ、長い寿命のF I X-X T E Nが循環すると、その画分が開裂され、凝固に用いられるためのより短い寿命のF I Xのプールを作製する。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、予防量のF I Xを定常的に放出する循環するプロドラッグデポーを作る。

10

【0437】

MMP - 20によって放出可能なC末端X T E N

F I XのC末端に融合したX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに図示されるように、F I X成分とX T E N成分の間に配置されたX T E N放出部位開裂配列を用いて作製することができる。例示的な配列を表42に提供する。この場合、該放出部位は、MMP - 20プロテアーゼ (E C . 3 . 4 . 24 . - , U n i p r o t O 6 0 8 8 2) によって認識および開裂されるアミノ酸配列を含む。具体的には、配列P A L P L V A Q (配列番号102) [R a w l i n g s N . D . , e t a l . (2 0 0 8) N u c l e i c A c i d s R e s . , 36 : D 320] は、(矢印によって示される) 位置4の後ろで切断される。MMP - 20は、全血において構成的に発現される。それゆえ、長い寿命のF I X-X T E Nが循環すると、その画分が開裂され、凝固に用いられるためのより短い寿命のF I Xのプールを作製する。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、予防量のF I Xを定常的に放出する循環するプロドラッグデポーを作る。

20

30

【0438】

C末端X T E Nの放出速度の最適化

C末端X T E Nの放出速度を変更した前述の実施例のバリエーションを作製することができる。X T E N放出プロテアーゼによるX T E N放出の速度が、X T E N放出部位の配列に依存するので、X T E N放出部位におけるアミノ酸配列を変動させることによって、X T E N放出速度を制御することができる。多くのプロテアーゼの配列特異性は当該技術分野で周知であり、いくつかのデータベースにおいて記録されている。この場合、プロテアーゼのアミノ酸特異性は、基質の組み合わせライブラリーを用いて [H a r r i s , J . L . , e t a l . (2 0 0 0) P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 97 : 7754]、または [S c h e l l e n b e r g e r , V . , e t a l . (1993) B i o c h e m i s t r y , 32 : 4344] に示されるように基質混合物の開裂に従うことによってマッピングされる。代替案は、ファージディスプレイによる最適なプロテアーゼ開裂配列の同定である [M a t t h e w s , D . , e t a l . (1993) S c i e n c e , 260 : 1113]。コンストラクトを、バリエーション配列を用いて作製し、X T E Nポリペプチドの検出のための標準的なアッセイを用いてX T E N放出についてアッセイする。

40

【0439】

実施例35：C F配列に対して内部のX T E Nの組み込み

K N S A D Kループへの内部X T E N融合 (配列番号621)

50

F I Xのループに挿入されたX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに示されるように作製することができる。具体的には、X T E N配列を融合体として、E G F 2ドメインのK N S A D N Kループ（配列番号6 2 2）（残基1 4 6～1 5 2）へと挿入し、該ループは、公知の血友病Bの突然変異を有さず、F I X結晶構造において高度に構造化されていない。この場合、該挿入は、ループ配列のS A結合における天然配列を分割することによって、およびX T E N配列を間隙へと融合させることによって作製される。このことは、ループ配列K N-X T E N-A D N K（配列番号6 2 3として開示される「A D N K」）を生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、F I X-X T E Nが凝固の活性化までプロドラッグとして無処置のままであろう状況を作り、この場合において分子は、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強するF I X a-X T E Nを生じるよう加工される。

10

【0 4 4 0】

L A E Nループ（配列番号6 2 4）への内部X T E N融合

F I Xのループに挿入されたX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のFに示されるように作製することができる。具体的には、X T E N配列を融合体として、E G F 2ドメインのL A E Nループ（配列番号6 2 4）（残基1 6 3～1 6 6）へと挿入し、該ループは、公知の血友病Bの突然変異を有さず、F I X結晶構造において高度に構造化されていない。この場合、該挿入は、該配列のA E結合における天然配列を分割することによって、およびX T E N配列を間隙へと融合させることによって作製される。このことは、ループ配列L A-X T E N-E Nを生じるであろう。本発明の組成物の所望の特長において、このことは、F I X-X T E Nが凝固の活性化までプロドラッグとして無処置のままであろう状況を作り、この場合において分子は、それを必要とする対象における凝固機能を再構成または増強するF I X a-X T E Nを生じるよう加工される。

20

【0 4 4 1】

活性化ペプチドへの内部X T E N融合

F I Xのループに挿入されたX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のDに示されるように作製することができる。具体的には、X T E N配列を活性化ペプチド（残基1 9 2～2 2 6）へと配置し、それにより2つの天然F X I a開裂部位のいずれも破壊されないようになっている。挿入は、該配列のT 2 0 9-I 2 1 0における天然配列を分割し、およびX T E N配列を間隙へと融合させることによってなされる。このことは、K L T R A E T V F P D V D Y V N S T E A E T-X T E N-I L D N I T Q S T Q S F N D F T R V V G G E（それぞれ配列番号6 2 5および6 2 6）の残基1 8 8において開始する配列を生じる。活発なF X I aは、F X I I aによる酵素前駆体のタンパク質分解性開裂によってF X I から生じる。一旦活性化されると、凝固におけるその天然の役割は、タンパク質を位置R 1 9 1およびR 2 2 6において切断することによってF I X酵素前駆体から活性化ペプチドを切り出すことによって、F I Xを活性化することである（図4）。これらの切断部位を矢印によって示し、配列は、凝固カスケードの間に天然の開裂活性を可能にするよう変更されないP 4-P 4'部位を残すよう設計される。それゆえ、X T E Nドメインは、内在性凝固経路内の正常な活性化過程の一部として、F I Xから除去されるに過ぎないであろう。

30

40

【0 4 4 2】

F I X E G Fドメイン間における内部X T E N融合

F I Xのループに挿入されたX T E Nタンパク質からなるF I X-X T E N融合タンパク質を、図2のCに示されるように作製することができる。具体的には、X T E N配列をF I Xの2つのE G F様ドメイン（接合部は残基1 2 9と残基1 3 0の間である）の間に配置する。挿入は、E 1 2 9-L 1 3 0における天然の配列を分割し、X T E N配列を間隙に融合させることによってなされる。このこと、の残基1 2 1において開始する配列を生じるであろう。それにより2つの天然F X I a開裂部位のいずれも破壊されないようになっている。挿入は、該配列のT 2 0 9-I 2 1 0における天然配列を分割し、および

50

X T E N配列を間隙へと融合させることによってなされる。このことは、F G F E G K N C E — X T E N — L D V T C N I K N G R (それぞれ配列番号627および628)の残基121において開始する配列を生じるであろう。実際、このことは、凝固の活性化までF I X —X T E Nが無処置で循環するであろう状況を作り、この場合、該分子は、個体における凝固機能を再構成または増強するF I X a —X T E Nを生じるよう加工される。

【0443】

実施例36：F V I I aを含むC F X T E Nを評価するためのヒト臨床治験設計

N o v o S e v e n (登録商標)は、凝固カスケードの外來性経路を活性化させることによって止血を促進するよう意図された組換えヒト第V I I a凝固因子(r F V I I a)である。その短い半減期により、N o v o S e v e nは、止血が達成されるまで2時間ごと〜6時間ごとに静脈内に投薬される。X T E NのF V I Iへの融合は、該タンパク質の半減期を改良し、したがって、このようなF V I I含有融合タンパク質組成物を用いて低下した投薬頻度を可能にする。

【0444】

臨床治験は、N o v o S e v e nに対するF V I I a—X T E Nの効能および利点がヒトにおいて立証されることができるよう設計されることができ。例えば、F V I I a—X T E Nは、N o v o S e v e nについて実施されるような出血の治療のための臨床治験において使用されることができ。このような研究は、3つの相を含むであろう。第一に、成人患者における第I相安全性および薬物動態研究を実施して、(正常対象または血友病患者のいずれかの)ヒトにおける最大許容用量および薬物動態および薬力学を決定し、ならびにさらなる研究において追跡されるべき潜在的な毒性および有害事象を規定する。F V I I a—X T E N組成物の単回上昇用量が投与され、生化学的パラメータ、P Kパラメータ、および臨床的パラメータを測定する研究が実施される。このことは、最大許容用量の決定を可能にし、個々の成分についての治療ウィンドウを構成する薬用量および循環薬における閾値および最大濃度を確立するであろう。その後、臨床治験は、疾患、障害、または容態を有する患者において実施される。

【0445】

臨床治験は、N o v o S e v e nが臨床上の有益性を提供すると期待され得る任意の疾患に苦しんでいる患者において実施され得る。例えば、このような適応には、第V I I I因子または第I X因子に対する阻害剤による血友病Aまたは血友病Bの患者における、および後天性血友病を有する患者における出血症状、第V I I I因子または第I X因子に対する阻害剤による血友病Aまたは血友病Bの患者におけるならびに後天性血友病を有する患者における外科的介入または侵襲的手順における出血の予防、先天的F V I I 欠乏症を有する患者における外科的介入または侵襲的手順における出血の予防が挙げられる。F V I I a—X T E Nは、追加的な患者集団における使用のためにも示され得る。パラメータおよび臨床的エンドポイントを、融合タンパク質組成物の投薬の関数として測定し、有害事象と関連した安全性データを集めることに加えて、その後の第I I I相治験に適した用量に関する用量範囲情報を生じる。P Kパラメータは、F V I I —X T E N組成物についての治療ウィンドウおよび治療用量投与計画を確立するための生理学的、臨床的、および安全性パラメータデータと相関しており、臨床医は該組成物についての適切な用量範囲を確立することができる。最終的に、第I I I相効能研究を実施し、この場合患者は、用量投与計画でF V I I —X T E N組成物を投与され、個々の組成物の薬物動態特性および薬力学的特性を考慮して適切と思われる投薬スケジュールを用いて、(市販のN o v o S e v e nなどの)ポジティブコントロールまたは偽薬を投与し、それにともない、すべての薬剤は、研究のエンドポイントに到達するのに適切に延長した期間投与される。モニターされるパラメータには、P Tアッセイ、出血時間アッセイ、出血症状の制御、または自発的出血症状の発症;偽薬群もしくはポジティブコントロール群に対して追跡されるパラメータが挙げられる。効能の結果は、標準的な統計方法を用いて決定される。毒性および有害事象のマーカーも本研究において追跡され、化合物が説明されている様式で使用する場

10

20

30

40

50

合に安全であることを検証する。

【0446】

実施例37：FIXを含むCFXTENを評価するためのヒト臨床治験設計

凝固第IX因子（組換え）であるBenefix（登録商標）は、手術設定における出血の制御および予防を含む血友病（先天的第IX因子欠乏症またはクリスマス病）を有する患者における出血症状の制御および予防のために示される。すべての第IX因子産物についての治療の薬用量および期間は、第IX因子欠乏症の重症度、出血の位置および程度、ならびに患者の臨床的容態、年齢、および第IX因子の回復による。XTENのFIXへの融合は、該タンパク質の半減期を改良し、したがって低下した投薬頻度を可能にする。

【0447】

臨床治験は、他の第IX因子臨床産物に対するFIX-XTENの効能利点がヒトにおいて検証されることができるよう設計されることができる。例えば、FIX-XTENは、Benefixについて実施されるように、出血症状の治療のための臨床治験において使用されることができる。このような研究は3相を含むであろう。第一に、成人患者における第I相安全性薬物動態研究を実施して、（正常な対象または血友病患者のいずれかである）ヒトにおける最大許容用量および薬物動態および薬力学を決定し、ならびに将来的な研究において追跡されるべき潜在的な毒性および有害事象を規定する。FIX-XTEN組成物の単回上昇用量を投与し、生化学的パラメータ、PKパラメータ、および臨床的パラメータを測定する本研究を実施する。このことは、最大許容用量の決定を可能にし、個々の成分についての治療ウィンドウを構成する薬用量および循環薬における閾値および最大濃度を確立するであろう。その後、臨床治験を、疾患、障害、または容態を有する患者において実施する。

【0448】

臨床治験は、第IX因子が臨床上的利点を提供すると期待され得る任意の疾患に苦しんでいる患者において実施され得る。例えば、このような適応には、手術設定における出血の制御および予防を含む血友病B（先天的第IX因子欠乏症またはクリスマス病）を有する患者における出血症状の制御および予防が含まれる。FIX-XTENは、追加的な患者集団における使用のためにも示され得る。パラメータおよび臨床的エンドポイントは、融合タンパク質組成物の投薬の関数として測定され、有害事象と関連した安全性データを集めることに加えて、その後の第III相治験に適した用量に関する用量範囲方法を生じる。PLパラメータは、臨床医が組成物について適切な用量範囲を確立できる、FIX-XTEN組成物についての治療ウィンドウおよび治療用量投与計画を確立するための生理学的、臨床的、および安全性パラメータデータと相関している。最終的に、第III相効能研究を実施し、この場合患者は、用量投与計画においてFIX-XTEN組成物を投与され、および個々の組成物の薬物動態特性および薬力学的特性を考慮して適切と思われる投薬スケジュールを用いて、（市販のBenefixなどの）ポジティブコントロールまたは偽薬が投与され、すべての薬剤は、研究エンドポイントを達成するのに適した延長した時間投与される。モニターされるパラメータには、aPTTアッセイ、出血時間アッセイ、出血症状の制御、または自発的出血症状の発生；偽薬群もしくはポジティブコントロール群に対して追跡されるパラメータが含まれる。効能の結果は、標準的な統計方法を用いて決定される。毒性および有害事象のマーカーも本研究において追跡され、説明された様式で用いる場合に化合物が安全であることを検証する。

【0449】

実施例38：多様な負荷量を有するXTEN融合タンパク質の分析用分子ふるいクロマトグラフィー

分子ふるいクロマトグラフィー分析を、増大する長さの種々の治療用タンパク質および構造化されていない組換えタンパク質を含む融合タンパク質に関して実施した。例示的なアッセイは、1mg/mLの濃度で40μgの精製済みグルカゴン融合タンパク質を20mMリン酸pH6.8、114mM NaClにおいて0.6mL/分の流速で分離するTSK Gel-G4000 SWXL（7.8mm×30cm）カラムを用いた。クロマ

10

20

30

40

50

トグラム特性を、OD 214 nmおよびOD 280 nmを用いてモニターした。すべてのアッセイのためのカラム較正を、BioRad製の分子ふるい構成標準物質を用いて実施し、マーカーには、チログロブリン (670 kDa)、ウシガンマグロブリン (158 kDa)、ニワトリ卵白アルブミン (44 kDa)、ウマミオグロビン (17 kDa)、およびビタミンB12 (1.35 kDa)を含む。グルカゴン-Y288、グルカゴン-Y144、グルカゴン-Y72、グルカゴン-Y36の代表的なクロマトグラフィー特性を、図35における重ね合わせとして示す。本データは、各化合物の見かけの分子量が、付着したXTEN配列の長さに比例することを示す。しかしながら、本データは、各コンストラクトの見かけの分子量が、(同じアッセイにおいて分析される標準物質との比較によって示されるように) 球状タンパク質について期待されるものよりも有意に大きいことも示す。CFXTEN組成物を含む評価されるすべてのコンストラクトについてのSEC分析に基づいて、見かけの分子量、(算出された分子量に対する見かけの分子量の比として表される) 見かけの分子量因子、および水力学的半径 (nmにおける R_H) を表31に示す。本結果は、576以上のアミノ酸の異なるXTENの組み込みが、およそ339 kDa~760の融合タンパク質についての見かけの分子量を与え、かつ864以上のアミノ酸のXTENがおよそ800 kDaよりも大きな見かけの分子量を与えることを示す。実際の分子量に対する見かけの分子量における比例的増大に関する結果は、いくつかの異なるモチーフファミリー由来のXTENを用いて作製された融合タンパク質と一致し、すなわち、AD、AE、AF、AG、およびAMは、少なくとも4倍の増加および約17倍高い比を有する。加えて、576以上のアミノ酸 (およびY288に融合したグルカゴンの場合288残基) を有するXTEN融合パートナーの、種々の負荷量を有する融合タンパク質への組み込みは結果的に、およそ3~5 nmの糸球体の孔サイズを十分に超えている7 nm以上の水力学的半径とともに生じた。したがって、増殖およびXTENを含む融合タンパク質は、延長した終末半減期の一因となり、相応の融合していない生物学的負荷量のタンパク質に対する治療効果または生物学的効果を改良する、腎クリアランスを低下させたことが期待される。

【0450】

10

20

【表 3 1】

表31：種々のポリペプチドのSEC分析

コンストラクト名	XTEN または 融合パ ートナ ー	治療用タンパク質	実際の 分子量 (kDa)	見かけの 分子量 (kDa)	見かけの 分子量因 子	R _H (nm)
AC14	Y288	グルカゴン	28.7	370	12.9	7.0
AC28	Y144	グルカゴン	16.1	117	7.3	5.0
AC34	Y72	グルカゴン	9.9	58.6	5.9	3.8
AC33	Y36	グルカゴン	6.8	29.4	4.3	2.6
AC89	AF120	グルカゴン	14.1	76.4	5.4	4.3
AC88	AF108	グルカゴン	13.1	61.2	4.7	3.9
AC73	AF144	グルカゴン	16.3	95.2	5.8	4.7
AC53	AG576	GFP	74.9	339	4.5	7.0
AC39	AD576	GFP	76.4	546	7.1	7.7
AC41	AE576	GFP	80.4	760	9.5	8.3
AC52	AF576	GFP	78.3	526	6.7	7.6
AC398	AE288	FVII	76.3	650	8.5	8.2
AC404	AE864	FVII	129	1900	14.7	10.1
AC85	AE864	エキセンジン-4	83.6	938	11.2	8.9
AC114	AM875	エキセンジン-4	82.4	1344	16.3	9.4
AC143	AM875	CF	100.6	846	8.4	8.7
AC227	AM875	IL-1ra	95.4	1103	11.6	9.2
AC228	AM131 8	IL-1ra	134.8	2286	17.0	10.5

実施例 39：カニクイザルにおける GFP に融合した伸長したポリペプチドの薬物動態
 GFP-L288、GFP-L576、GFP-XTEN_AF576、GFP-XTEN_Y576、および XTEN_AD836-GFP の薬物動態をカニクイザルにおい
 て試験し、PKパラメータに及ぼす構造化されていないポリペプチドの組成および長さの
 効果を決定した。血液試料を注射後の種々の時点で分析し、血漿中の GFP 濃度を、捕捉
 のための GFP に対するポリクローナル抗体を用いた ELISA によって、検出のための
 同じポリクローナル抗体のビオチン化調製物を用いた ELISA によって測定した。結果
 を図 25 に要約する。本結果は、XTEN 配列の長さを増大させると半減期の驚くべき延
 長を示す。例えば、10 時間の半減期が、(XTEN において 288 アミノ酸残基を有する)
 GFP-XTEN_L288 について決定された。576 のアミノ酸まで構造化されてい
 ないポリペプチド融合パートナーの長さを二倍にすると、複数の融合タンパク質コン
 ストラクト、すなわち GFP-XTEN_L576、GFP-XTEN_AF576、G
 FP-XTEN_Y576 について 20～22 時間まで半減期を延長した。836 の残基
 まで構造化されていないポリペプチド融合パートナーの長さをさらに伸長すると、XTEN
 _AD836-GFP について 72～75 時間の半減期を結果的に生じた。したがって
 、288 残基から 576 残基までポリマー長を伸長すると、インビボでの半減期が約 10
 時間延長した。しかしながら、ポリペプチドの長さを 576 残基から 836 残基まで 26
 0 残基ほど伸長すると、インビボでの半減期の比例的であることを超える延長を結果的に
 生じた。したがって、伸長した構造化されていないポリペプチドを含む融合タンパク質は

、より短い長さのポリペプチドと比較して亢進した薬物動態の特性を有すると期待される。

【0451】

実施例40：X T E Nの血清安定性

G F PのN末端に融合したX T E N—A E 8 6 4を含む融合タンパク質を、サル血漿およびラット腎臓可溶化液において37℃で最大7日間インキュベートした。試料を時点0、1日後、および7日後に抜き取り、S D S P A G E後にウェスタン分析を用いた検出およびG F Pに対する抗体を用いた検出によって、図26に示す通り分析した。X T E N—A E 8 6 4の配列は、血漿において8日間を超える無視できる分解の兆候を示した。しかしながら、X T E N—A E 8 6 4は、ラット腎臓可溶化液において3日間にわたって迅速に分解した。融合タンパク質のインビボでの安定性を血漿試料において試験し、この場合、G F P—A E 8 6 4を、先に説明した通り、免疫沈降させ、S D S P A G Eによって分析した。注射後最大7日間抜き取られた試料は、分解の非常にわずかな兆候を示した。本結果は、C F X T E N融合タンパク質の薬物動態特性の亢進における一因子である、血清プロテアーゼによる分解に対するC F X T E Nの耐性を示す。

10

【0452】

実施例41：X T E Nに連結することによるペプチド負荷量の増大した溶解度および安定性

溶解度および安定性の物理的／化学的特性を亢進するX T E Nの能力を評価するために、グルカゴンとより短い長さのX T E Nとの融合タンパク質を調製および評価した。試験品を中性pHにおけるトリス緩衝塩類溶液において調製し、G c g—X T E N溶液の特徴づけを逆相H P L Cおよび分子ふるいクロマトグラフィーによって実施し、該タンパク質が溶液中で均質かつ非凝集性であることを確認した。本データを表32に呈する。比較目的のために、同じ緩衝液中で修飾されていないグルカゴンの溶解度限界を60 μM (0.2 mg/mL)で測定し、本結果は、添加したX T E Nのすべての長さについて、溶解度における実質的な増大が達成されたことを示す。重要なことに、ほとんどの場合、グルカゴン—X T E N融合タンパク質を調製して、標的濃度を達成し、所与のコンストラクトについての最大溶解度限界を決定するために評価されなかった。しかしながら、A F—1 4 4 X T E Nに連結されたグルカゴンの場合、溶解度限界を決定し、結果は、X T E Nに連結されていないグルカゴンと比較して、溶解度における60倍の亢進が達成された。加えて、グルカゴン—A F 1 4 4 C F X T E Nを安定性について評価し、冷蔵条件の下で少なくとも6ヶ月間、および37℃でおよそ1ヶ月間、液体製剤において安定であることが認められた(データ非表示)。

20

30

【0453】

本データは、グルカゴンなどの生物活性タンパク質への短い長さのX T E Nポリペプチドの連結が、結果として生じる融合タンパク質によるタンパク質の溶解度特性を顕著に亢進することができ、より高いタンパク質濃度で安定性を与えることができるという結論を支持する。

【0454】

【表 3 2】

表32：グルカゴン-XTENコンストラクトの溶解度

試験品	溶解度
グルカゴン	60 μ M
グルカゴン-Y36	>370 μ M
グルカゴン-Y72	>293 μ M
グルカゴン-AF108	>145 μ M
グルカゴン-AF120	>160 μ M
グルカゴン-Y144	>497 μ M
グルカゴン-AE144	>467 μ M
グルカゴン-AF144	>3600 μ M
グルカゴン-Y288	>163 μ M

実施例 4 2：推定アルゴリズムによる二次構造についての配列分析

アミノ酸配列は、周知の Chou - Fasman アルゴリズム (Chou, P. Y., et al. (1974) Biochemistry, 13: 222-45) および Garnier - Osguthorpe - Robson、または「GOR」法 (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996).

GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence.

Methods Enzymol 266:540-553) など、あるコンピュータプログラムまたはアルゴリズムを介して二次構造について評価されることができ、所与の配列について、アルゴリズムは、いくつかの二次構造が存在するかまたはまったく存在しないかを推定することができ、例えば、アルファヘリックスまたはベータシートまたは、ランダムコイル形成を結果として生じるよう推定された配列の残基の百分率を形成する配列の合計および／または百分率として表されることができ。

【0455】

XTEN「ファミリー」由来のいくつかの代表的な配列は、Chou - Fasman 法および GOR 法についての 2 つのアルゴリズムツールを用いて評価され、これらの配列における二次構造の程度を評価した。Chou - Fasman ツールは、2009 年 6 月 19 日に存在したように、.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1 におけるワールドワイドウェブに配置された URL「Biosupport」インターネットサイトにおいて、

バージニア大学の William R. Pearson によって提供された。GOR ツールは、2008 年 6 月 19 日に存在したように、.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl におけるワールドワイドウェブに配置された URL ネットワークタンパク質配列分析インターネットサイトにおいて、Pole Informatique Lyonnais によって提供された。

【0456】

分析における第一の工程として、単一の XTEN 配列を 2 つのアルゴリズムによって分析した。AE864 組成物は、アミノ酸 G、S、T、E、P、および A からなる 4 つの 12 アミノ酸配列モチーフの複数のコピーから作成された 864 のアミノ酸残基を有する XTEN である。配列モチーフは、モチーフ内に限定された反復性があり、および任意の 2

つの連続したアミノ酸の配列が任意の1つの12アミノ酸モチーフにおいて2倍を超えて反復されずかつ全長のXTE Nの3つの連続したアミノ酸が同一ではない全体的な配列内に限定された反復性がある、という事実を特徴とする。N末端から連続的により長い部分のAF864配列を、Chou - FasmanアルゴリズムおよびGORアルゴリズム（後者は、最小17アミノ酸の長さを必要とする）によって分析した。該配列を、推定ツールへとFASTAフォーマット配列を入力し、および分析を実行することによって分析した。分析由来の結果を表33に呈する。

【0457】

本結果は、Chou - Fasman計算によって、AEファミリーの4つのモチーフ（表1）が、アルファヘリックスまたはベータシートを全く有さないことを示す。最大288残基の配列は、アルファヘリックスもベータシートも有さないことが類似して認められた。432残基の配列は、少量の二次構造を有すると推定され、たった2つのアミノ酸が、0.5%の全体的なパーセンテージについてのアルファヘリックスに起因する。全長のAF864ポリペプチドは、0.2%の全体的なパーセンテージについてアルファヘリックスに起因する同じ2つのアミノ酸を有する。ランダムコイル形成についての算出は、長さを増大させると、ランダムコイル形成のパーセンテージが増大することを明らかにした。配列の最初の24のアミノ酸は、91%のランダムコイル形成を有し、全長の配列について最大99.77%の値ほど長さを増大させると増大した。

【0458】

他のモチーフファミリー由来の500アミノ酸以上の数多くのXTE N配列も分析し、大部分が95%超のランダムコイル形成を有することを明らかにした。例外は、3つの連続したセリン残基が1つ以上の場合にある配列であり、結果的に、推定ベータシート形成を生じた。しかしながら、これらの配列でさえ、およそ99%のランダムコイル形成を有していた。

【0459】

対照的に、A、S、およびPのアミノ酸に限定された84の残基のポリペプチド配列を、高い程度の推定アルファヘリックスを推定するChou - Fasmanアルゴリズムによって評価した。複数の反復「AA」および「AAA」配列を有する配列は、69%のアルファヘリックス構造の全体的な推定パーセンテージを有していた。GORアルゴリズムは、本実施例において分析されたアミノ酸G、S、T、E、Pからなる12のアミノ酸配列モチーフからなるどんな配列と比べても、78.57%のランダムコイル形成を推定した。

【0460】

本分析は、1) 連続したアミノ酸に関して限定された反復性を有するG、S、T、E、P、およびAの複数の配列モチーフから作られるXTE Nは、非常に少量のアルファヘリックスおよびベータシートを有すると推定され；2) XTE Nの長さを増大させると、アルファヘリックスまたはベータシートの形成の確率をさほど増大させず；3) アミノ酸G、S、T、E、P、およびAからなる非反復性の12マーの添加によるXTE N配列長の漸増は結果的に、ランダム固オイル形成の増大したパーセンテージを生じるという結論を支持する。対照的に、より高い程度の内部反復性を有するA、S、およびPに限定されたアミノ酸からつくられるポリペプチドは、Chou - Fasmanアルゴリズムおよびランダムコイル形成によって決定される時、アルファヘリックスの高いパーセンテージを有すると推定される。これらの方法によって評価される数多くの配列に基づいて、長さ約400のアミノ酸残基よりも大きな（任意の1つのモチーフにおける2つ以下の同一の連続したアミノ酸として定義される）限定された反復性を有するG、S、T、E、P、およびAの配列モチーフから作られるXTE Nは、非常に限定された二次構造を有すると期待されると結論付けられる。3つの連続したセリンを含むモチーフの例外はあるが、表3由来の配列モチーフの任意の順序または組み合わせを用いて、二次構造を本質的に欠失するXTE N配列を結果的に生じる約400残基超の長さのXTE Nポリペプチドを作製することができる。このような配列は、本明細書に開示された本発明のCFXTE N実施

10

20

30

40

50

態様において説明された特徴を有すると期待される。

【0461】

【表33-1】

表33：ポリペプチド配列のCHOU-FASMANおよびGOR推定計算

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	GSTSESPSGTAP	629	12	残基の合計*: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	未決定
	GTS TPESGSASP	630	12	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	未決定
	GTSPSGESSTAP	631	12	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	未決定
	GSTSSTAESPGP	632	12	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	未決定
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP	633	24	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	91.67%
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP	634	36	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	94.44%
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE	635	48	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	93.75%
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAP	636	60	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	96.67%
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP	637	108	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	97.22%
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	638	216	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	99.07%
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP	639	432	残基の合計: H: 2 E: 3 パーセント: H: 0.5 E: 0.7	99.54%

10

20

30

40

【0462】

【表 3 3 - 2】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP				
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	640	864	残基の合計: H: 2 E: 3 パーセント: H: 0.2 E: 0.3	99.77%
AD 576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGP GSSESGSSEGGPGSESPGGSSGSES GSEGGSGPGESSGSSESGSSEGGP GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSES GESPGGSSGSES GSGGEPSESGSS GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS GSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESS GESPGGSSGSES GSGGEPSESGSS GSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSS GSSESGSSEGGPGSESPGGSSGSES GESPGGSSGSES GSESPGGSSGSES	641	576	残基の合計: H: 7 E: 0 パーセ ント: H: 1.2 E: 0.0	99.65%

【表 3 3 - 3】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	GESPGGSSGSESGESPGGSSGSES GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS GSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSES GESPGGSSGSESGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSS GESPGGSSGSESGSESGSGPGESS GSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS				
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	642	576	残基の合計: H: 2 E: 0 パーセント: H: 0.4 E: 0.0	99.65%
AF540	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP GSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGTSESPSGTAP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAP	643	540	残基の合計: H: 2 E: 0 パーセ ント: H: 0.4 E: 0.0	99.65

【表 3 3 - 4】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSNPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSNPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSP	644	504	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	94.44%
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	645	864	残基の合計: H: 2 E: 3 パーセント: H: 0.2 E: 0.4	99.77%

10

20

30

40

【表 3 3 - 5】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGSTSSTAESP G GTSTPESGSASPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSSSTAESP G GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGSTSSTAESP G GTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESP GPGTSSSTAESP G GSTSSTAESP GPGTSSSTAESP G GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSTPESGPXX XGASASGAPSTXXXXSESPSGT APGSTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAPGTSTPESGSA SPGTSPSGESSTAPGTSPSGESST APGSTSSTAESP GPGTSPSGESST APGTSTPESGSASPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAPGTSPSGESST APGSTSESPSGTAPGTSTPESGSA SPGTSTPESGSASPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSA SPGTSPSGESSTAPGTSPSGESST APGTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSPSGESST APGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSP	646	875	残基の合計: H: 2 E: 0 パーセ ント: H: 0.2 E: 0.0	95.20%
AG864	GGSPGASPGTSS TGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSPGSSSTPSGATGSPGNSPAS TGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSG TASSPGSSSTPSGATGSPGTPGSG TASSPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSPGSSSTPS GATGSPGASPGTSS TGSPGTPGS GTASSPGSSSTPSGATGSPGNSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSSTPSGATGSPGAS PGTSS TGSPGASPGTSS TGSPGAS PGTSS TGSPGTPGSGTASSPGAS PGTSS TGSPGASPGTSS TGSPGAS PGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSPGASPGTSS TGSPGA SPGTSS TGSPGASPGTSS TGSPGS STPSGATGSPGSSSTPSGATGSPG ASPGTSS TGSPGTPGSGTASSPG SSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG	647	868	残基の合計: H: 0 E: 0 パーセント: H: 0.0 E: 0.0	94.70%

【表 3 3 - 6】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSP				
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGP GTSTEPSEGSASPGTSESPTAP GSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASP GTSTEPSEGSASPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GASASGAPSTGGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSTPAGSPTSTEE GSTSSTAESPGPGTSESPTAP GTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSASTGTGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSTSSTAESPGP GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTEPSEGSASPGTSESPTAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP	648	875	残基の合計: H: 7 E: 3 パーセント: H: 0.8 E: 0.3	98.63%
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGP GTSTEPSEGSASPGTSESPTAP GSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASP GTSTEPSEGSASPGSEPATSGSETP	649	1318	残基の合計: H: 7 E: 0 パーセント: H: 0.7 E: 0.0	99.17%

【表 3 3 - 7】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GPEPTGPAPSGGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSTSSTAESP GPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGTSESPSGTAP GTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASASGAPSTG GTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GP GTSPSGESSTAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGTSTPESGSASP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP				10
					20
					30
AM923	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSESPSGT APGTSESPSGTAPGTSTPESGSA SPGTSTPESGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTST	650	924	残基の合計: H: 4 E: 3 パーセ ント: H: 0.4 E: 0.3	98.70%

【表 3 3 - 8】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATG SPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGASASGAPSTGGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSSTAESP GPGTSES P SGT APGTSPSGESSTAPGTTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGP GSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSSTAES PGPGTSSTAESP GPGTSPSGESS TAPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAES PGPGTSTEPSEGSASPGTSES P SG TAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAP				10
					20
AE912	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSE	651	913	残基の合計: H: 8 E: 3 パー セント: H: 0.9 E: 0.3	99.45%
					30
					40

【表 3 3 - 9】

配列名	配列	配列 番号	残基数	Chou-Fasman 計算	GOR 計算
	TPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS AP				10
BC 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSA GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGA GSGASEPTSTEPGTSEPSTSEPGA GSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPS GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSA GSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA GSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA GSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGA GSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA	652		残基の合計: H: 0 E: 0 パー セント: H: 0 E: 0	99.77%
	ASPAAPAPASPAAPAPSAPAAAP ASPAPAAPSAAPAPSAASPA PSAPPAAASPAAPSAPPAASAAA PAAASAAAAPSAAA	653	84	残基の合計: H: 58 E: 0 パーセント: H: 69.0 E: 0.0	78.57%

* H: アルファヘリックス E: ベータシート

実施例 4 3: 反復性についてのポリペプチド配列の分析

ポリペプチドアミノ酸配列を、全体的なポリペプチド内により短いサブシーケンスが現れる回数を定量することによって、反復性について評価することができる。例えば、200アミノ酸残基のポリペプチドは、192の重複する9アミノ酸サブシーケンス（または9マー「フレーム」）を有するが、独特な9マーサブシーケンスの数は、配列内の反復性の量に依存する。本分析において、200アミノ酸配列内の独特な3マーサブシーケンスの絶対数によって除されたポリマー部分の最初の200アミノ酸にわたる各3アミノ酸フレ

[illegible]

10

20

30

40

【表 3 4 - 4】

配列名	アミノ酸配列	配列番号	スコア
	ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGNSPASTGTGPGSSPASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSTGSP		10
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	667	6.1
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSS TAESP GPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGST SESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSTPESGSASPG STSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAP GTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGTSTPESGPXXXGASASGAPSTXXXSES PGTAPGSTSES PSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGS TSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSA SPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSSSTAES PGPGTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPS GESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTS PSGESSTAPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	668	7.5
AG868	GGSPGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGNSPASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGNSPASTGTGPGSSPASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS	669	7.5

10

20

30

40

【表 3 4 - 5】

配列名	アミノ酸配列	配列番号	スコア
	STGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSP		
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESG SASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESP GPGSTSESPSGTAPGT SPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSSSTAESP GPGSTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGSTSSSTAESP GPGTSTEPESGSASPGSTSESP SGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA P	670	4.5
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESG SASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGPEPTGPA PGGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG STSSTAESP GPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSP GASASGAPSTGGTSPSGESSTAPGSTSSSTAESP GPGTSPSGESSTA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTG TGPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTSTEPESGSASPGTSPSGE SSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTEPESGSASPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGS PGSSTPSGATGSPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSSTAES PGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	671	4.5

【0 4 7 6】

実施例 4 4 : T E P I T O P E スコアの算出

Sturniolo [Sturniolo, T., et al. (1999)
Nat Biotechnol, 17: 555] によって説明されるように、ポケッ

10

20

30

40

50

トポテンシャル (pocket potential) を加算することによって、9 マーペプチド配列の T E P I T O P E スコアを算出することができる。本実施例において、個別の T e p i t o p e スコアを個々の H L A 対立遺伝子について算出した。表 3 5 は、H L A × 0 1 0 1 B についてのポケットポテンシャルを一例として示し、これは、コーカサス人の集団において高い頻度で生じる。配列 P 1 - P 2 - P 3 - P 4 - P 5 - P 6 - P 7 - P 8 - P 9 を有するペプチドの T E P I T O P E スコアを算出するために、表 3 5 における相応の個々のポケットポテンシャルを加算した。配列 F D K L P R T S G (配列番号 6 7 2) を有する 9 マーのペプチドの H L A * 0 1 0 1 B スコアは、0、-1.3、0、0.9、0、-1.8、0.09、0、0 の合計である。

【0477】

10

長いペプチドについての T E P I T O P E スコアを評価するために、配列の 9 マーのサブシーケンスすべてについての過程を反復することができる。この過程を、他の H L A 対立遺伝子によってコードされるタンパク質について反復することができる。表 3 6 ~ 表 3 9 は、コーカサス人の集団において高い頻度で生じる H L A 対立遺伝子のタンパク質産物についてポケットポテンシャルを与える。

【0478】

この方法によって算出された T E P I T O P E スコアは、およそ -10 から +10 まで及んだ。しかしながら、P 1 位置において疎水性アミノ酸 (F K L M V W Y (配列番号 6 7 3)) を欠失する 9 マーペプチドは、-1009 から -989 の範囲の T E P I T O P E スコアを算出した。この値は、生物学的に意味がなく、疎水性アミノ酸が、H L A 結合のためのアンカー残基として機能するという事実を反映しており、P 1 における疎水性残基を欠失するペプチドは、H L A に対する結合因子が何らないと考えられる。ほとんどの X T E N 配列は、疎水性残基を欠失するので、9 マーのサブシーケンスの組み合わせすべては、-1009 から -989 までの範囲で T E P I T O P E を有する。本方法は、X T E N ポリペプチドが、推定 T 細胞エピトープをいくつか有し得るかまたはまったく有し得ないことを確認する。

20

【0479】

【表 3 5】

表 35 : HLA*0101B 対立遺伝子についてのポケットポテンシャル

アミノ酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	-2.4	-	-2.7	-2	-	-1.9
E	-999	0.1	-1.2	-0.4	-	-2.4	-0.6	-	-1.9
F	0	0.8	0.8	0.08	-	-2.1	0.3	-	-0.4
G	-999	0.5	0.2	-0.7	-	-0.3	-1.1	-	-0.8
H	-999	0.8	0.2	-0.7	-	-2.2	0.1	-	-1.1
I	-1	1.1	1.5	0.5	-	-1.9	0.6	-	0.7
K	-999	1.1	0	-2.1	-	-2	-0.2	-	-1.7
L	-1	1	1	0.9	-	-2	0.3	-	0.5
M	-1	1.1	1.4	0.8	-	-1.8	0.09	-	0.08
N	-999	0.8	0.5	0.04	-	-1.1	0.1	-	-1.2
P	-999	-0.5	0.3	-1.9	-	-0.2	0.07	-	-1.1
Q	-999	1.2	0	0.1	-	-1.8	0.2	-	-1.6
R	-999	2.2	0.7	-2.1	-	-1.8	0.09	-	-1
S	-999	-0.3	0.2	-0.7	-	-0.6	-0.2	-	-0.3
T	-999	0	0	-1	-	-1.2	0.09	-	-0.2
V	-1	2.1	0.5	-0.1	-	-1.1	0.7	-	0.3
W	0	-0.1	0	-1.8	-	-2.4	-0.1	-	-1.4
Y	0	0.9	0.8	-1.1	-	-2	0.5	-	-0.9

【 0 4 8 0 】

【表 3 6】

表 36 : HLA*0301B 対立遺伝子についてのポケットポテンシャル

アミノ酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	2.3	-	-2.4	-0.6	-	-0.6
E	-999	0.1	-1.2	-1	-	-1.4	-0.2	-	-0.3
F	-1	0.8	0.8	-1	-	-1.4	0.5	-	0.9
G	-999	0.5	0.2	0.5	-	-0.7	0.1	-	0.4
H	-999	0.8	0.2	0	-	-0.1	-0.8	-	-0.5
I	0	1.1	1.5	0.5	-	0.7	0.4	-	0.6
K	-999	1.1	0	-1	-	1.3	-0.9	-	-0.2
L	0	1	1	0	-	0.2	0.2	-	-0
M	0	1.1	1.4	0	-	-0.9	1.1	-	1.1
N	-999	0.8	0.5	0.2	-	-0.6	-0.1	-	-0.6
P	-999	-0.5	0.3	-1	-	0.5	0.7	-	-0.3
Q	-999	1.2	0	0	-	-0.3	-0.1	-	-0.2
R	-999	2.2	0.7	-1	-	1	-0.9	-	0.5
S	-999	-0.3	0.2	0.7	-	-0.1	0.07	-	1.1
T	-999	0	0	-1	-	0.8	-0.1	-	-0.5
V	0	2.1	0.5	0	-	1.2	0.2	-	0.3
W	-1	-0.1	0	-1	-	-1.4	-0.6	-	-1
Y	-1	0.9	0.8	-1	-	-1.4	-0.1	-	0.3

【 0 4 8 1 】

【表 3 7】

表 37 : HLA*0401B 対立遺伝子についてのポケットポテンシャル

アミノ酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	1.4	-	-1.1	-0.3	-	-1.7
E	-999	0.1	-1.2	1.5	-	-2.4	0.2	-	-1.7
F	0	0.8	0.8	-0.9	-	-1.1	-1	-	-1
G	-999	0.5	0.2	-1.6	-	-1.5	-1.3	-	-1
H	-999	0.8	0.2	1.1	-	-1.4	0	-	0.08
I	-1	1.1	1.5	0.8	-	-0.1	0.08	-	-0.3
K	-999	1.1	0	-1.7	-	-2.4	-0.3	-	-0.3
L	-1	1	1	0.8	-	-1.1	0.7	-	-1
M	-1	1.1	1.4	0.9	-	-1.1	0.8	-	-0.4
N	-999	0.8	0.5	0.9	-	1.3	0.6	-	-1.4
P	-999	-0.5	0.3	-1.6	-	0	-0.7	-	-1.3
Q	-999	1.2	0	0.8	-	-1.5	0	-	0.5
R	-999	2.2	0.7	-1.9	-	-2.4	-1.2	-	-1
S	-999	-0.3	0.2	0.8	-	1	-0.2	-	0.7
T	-999	0	0	0.7	-	1.9	-0.1	-	-1.2
V	-1	2.1	0.5	-0.9	-	0.9	0.08	-	-0.7
W	0	-0.1	0	-1.2	-	-1	-1.4	-	-1
Y	0	0.9	0.8	-1.6	-	-1.5	-1.2	-	-1

【0 4 8 2】

【表 3 8】

表 38 : HLA*0701B 対立遺伝子についてのポケットポテンシャル

アミノ酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	-1.6	-	-2.5	-1.3	-	-1.2
E	-999	0.1	-1.2	-1.4	-	-2.5	0.9	-	-0.3
F	0	0.8	0.8	0.2	-	-0.8	2.1	-	2.1
G	-999	0.5	0.2	-1.1	-	-0.6	0	-	-0.6
H	-999	0.8	0.2	0.1	-	-0.8	0.9	-	-0.2
I	-1	1.1	1.5	1.1	-	-0.5	2.4	-	3.4
K	-999	1.1	0	-1.3	-	-1.1	0.5	-	-1.1
L	-1	1	1	-0.8	-	-0.9	2.2	-	3.4
M	-1	1.1	1.4	-0.4	-	-0.8	1.8	-	2
N	-999	0.8	0.5	-1.1	-	-0.6	1.4	-	-0.5
P	-999	-0.5	0.3	-1.2	-	-0.5	-0.2	-	-0.6
Q	-999	1.2	0	-1.5	-	-1.1	1.1	-	-0.9
R	-999	2.2	0.7	-1.1	-	-1.1	0.7	-	-0.8
S	-999	-0.3	0.2	1.5	-	0.6	0.4	-	-0.3
T	-999	0	0	1.4	-	-0.1	0.9	-	0.4
V	-1	2.1	0.5	0.9	-	0.1	1.6	-	2
W	0	-0.1	0	-1.1	-	-0.9	1.4	-	0.8
Y	0	0.9	0.8	-0.9	-	-1	1.7	-	1.1

10

20

30

40

50

【0483】

【表39】

表 39 : HLA*1501B 対立遺伝子についてのポケットポテンシャル

アミノ酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	-0.4	-	-0.4	-0.7	-	-1.9
E	-999	0.1	-1.2	-0.6	-	-1	-0.7	-	-1.9
F	-1	0.8	0.8	2.4	-	-0.3	1.4	-	-0.4
G	-999	0.5	0.2	0	-	0.5	0	-	-0.8
H	-999	0.8	0.2	1.1	-	-0.5	0.6	-	-1.1
I	0	1.1	1.5	0.6	-	0.05	1.5	-	0.7
K	-999	1.1	0	-0.7	-	-0.3	-0.3	-	-1.7
L	0	1	1	0.5	-	0.2	1.9	-	0.5
M	0	1.1	1.4	1	-	0.1	1.7	-	0.08
N	-999	0.8	0.5	-0.2	-	0.7	0.7	-	-1.2
P	-999	-0.5	0.3	-0.3	-	-0.2	0.3	-	-1.1
Q	-999	1.2	0	-0.8	-	-0.8	-0.3	-	-1.6
R	-999	2.2	0.7	0.2	-	1	-0.5	-	-1
S	-999	-0.3	0.2	-0.3	-	0.6	0.3	-	-0.3
T	-999	0	0	-0.3	-	-0	0.2	-	-0.2
V	0	2.1	0.5	0.2	-	-0.3	0.3	-	0.3
W	-1	-0.1	0	0.4	-	-0.4	0.6	-	-1.4
Y	-1	0.9	0.8	2.5	-	0.4	0.7	-	-0.9

10

20

【0484】

【表 40-1】

表 40：例示的な生物活性、例示的なアッセイ、および好ましい適応症

生物活性のあるタンパク質	生物活性	例示的な活性アッセイ	好ましい適応症:
第IX因子（凝固第IX因子（ヒト）；第IX因子複合体；クリスマス因子；血漿トロンボプラスチン成分（PTC）；プロトロンビン複合体濃縮物（PCC）；ノナコグ（Nonacog）アルファ；モノニン（MONONINE）；アルファニン-SD；ベプリン；PROPLEX-T；コナイン（KONYNE）；プロフィルニンSD；BeneFIX；イムニン（IMMUNINE）VH)	凝固第IX因子は、ビタミンK依存性因子であり、不活性型酵素前駆体として血中を循環する。第IX因子は、第Xia因子によって活性化型に変換され、活性化ペプチドを切り出し、したがって1つ以上のジスルフィド結合によって互いに保持された重鎖および軽鎖を生じる。血液凝固カスケードにおいて、活性化型第IX因子は、第X因子をその活性化型に、Ca ²⁺ イオン、膜リン脂質、および第VIII因子と相互作用を通じて活性化する。点突然変異、挿入および欠失を含むこの遺伝子の変異は、血友病Bもしくはクリスマス病とも呼ばれる退行性X連結型障害第IX因子欠乏症を生じる。	第IX因子凝固活性: Valder R. et al., 2001 "Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX" Blood 97: 130-138. 活性化型部分的トロンボプラスチン時間: Rao LV, Activation of human factor VII during clotting in vitro Blood. 1985; 65(1):218-26; Park CH, A 診断的チャレンジ: mild hemophilia B with normal activated partial thromboplastin time. Blood Coagul Fibrinolysis. 2010 Jun;21(4):368-71.	血友病B；出血；第IX因子欠乏症；クリスマス病；第VIII因子阻害剤もしくは第VII因子欠乏症を有する患者における出血症状

10

20

30

【0485】

【表 4 0 - 2】

生物活性のあるタンパク質	生物活性	例示的な活性アッセイ	好ましい適応症:
第VII因子（凝固第VII因子；活性部位不活性型第VII因子（DEGR-VIIa/FR-VIIa）；Eptacog アルファ；凝固第VIIa因子；Novoseven；NiaStase；Novostase；MONOCLATE-P）	凝固第VII因子は、止血に必須のビタミンK依存性因子である。この因子は、酵素前駆体で血中を循環し、少量のタンパク質分解によって、第IXa因子、第Xa因子、第XIIa因子、またはトロンビンのいずれかによって活性化型に変換される。第VII因子の活性化の際、触媒ドメインを含む重鎖および2つのEGF様ドメインを含む軽鎖を生じ、2つの鎖はジスルフィド結合によって互いに保持される。第III因子およびカルシウムイオンの存在下で、活性化型因子は次に第IX因子を第IXa因子におよび／または第X因子を第Xa因子に変換することによって凝固カスケードをさらに活性化させる。この遺伝子の欠損は、凝固障害を生じることがで	プロトロンビン凝固時間を用いる凝固アッセイ (Belaaouaj AA et al., J. Biol. Chem. 275: 27123-8, 2000; Diaz-Collier JA et al., Thromb Haemost 71: 339-46, 1994).	出血障害；冠血管再狭窄；血友病AおよびB；肝臓障害；血栓症；脈管再狭窄；手術関連出血症状

10

20

30

【 0 4 8 6 】

【表 4 1 - 1】

表 4 1 : C F と単一の X T E N とを含む例示的な C F X T E N

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
FVII- AE288	ANAFLEELRPGSLE	674	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC	675
	RECKEEQCSFEEA		TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG	
	REIFKDAERTKLF		GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG	
	WISYSDGDQCASS		CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG	
	PCQNGGSKDQLQ		ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA	
	SYICFCLPAFEGRN		CGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC	
	CETHKDDQLICVN		AGTGATGGGGACCACTGTGCCT	
	ENGGCEQYCS DHT		CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG	
	GTRRSCRCHEGYS		CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG	
	LLADGVSCPTTVE		TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC	
	YPCGKIPILEKRNA		TGCCTTCGAGGGCCGGAACGTG	
	SKPQGRIVGGKVC		GAGACGCACAAGGATGACCAG	
	PKGECPWQVLLL		CTGATCTGTGTGAACGAGAACG	
	NGAQLCGGTLINTI		GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG	
	WVVSAAHCFDKIK		TGACCACACGGGCACCAAGCGC	
	NWRNLIAVLGEHD		TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT	
	LSEHDGDEQSRRV		ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT	
	AQVIIPSTYVPGTT		GTCCTGCACACCCACAGTTGAA	
	NHDIALRLHQPV		TATCCATGTGGAAAAATACCTA	
	VLTDHVVPCLPE		TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG	
	RTFSERTLAFVRF		CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG	
	LVSGWGQLLDRG		GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA	
	ATALELMVLNVPR		GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC	
	LMTQDCLQQSRK		TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA	
	VGDSNPITEYMFC		GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC	
	AGYSDGSKDSCKG		AACACCATCTGGGTGGTCTCCG	
	DSGGPHATHYRGT		CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT	
	WYLTGIVSWGQG		CAAGAACTGGAGGAACCTGATC	
	CATVGHFVYTRV		GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC	
	SQYIEWLQKLMRS		TCAGCGAGCACGACGGGGATG	
	EPRPGVLLRAPFPG		AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC	
	GTSESATPESGPGS		AGGTCATCATCCCCAGCACGTA	
	EPATSGSETPGTSE		CGTCCCGGGCACCACCAACCAC	
	SATPESGPGSEPAT		GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC	
	SGSETPGTSESATP		ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA	
	ESGPGTSTEPSEGS		CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG	
	APGSPAGSPTSTEE		CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA	
	GTSESATPESGPGS		GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT	
	EPATSGSETPGTSE		CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC	
	SATPESGPGSPAGS		CAGCTGCTGGACCGTGCGCCA	
	PTSTEEGSPAGSPT		CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT	
	STEEGTSTEPSEGS		CAACGTGCCCCGGCTGATGACC	
	APGTSESATPESGP		CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC	
	GTSESATPESGPGT		GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA	
	SESATPESGPGSEP		ATATCACGGAGTACATGTTCTG	
	ATSGSETPGSEPAT		TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC	
	SGSETPGSPAGSPT		AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC	
	STEEGTSTEPSEGS		AGTGGAGGCCCACATGCCACCC	
	APGTSTEPSEGSA		ACTACCGGGGCACGTGGTACCT	
	GSEPATSGSETPGT		GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC	
	SESATPESGPGTST		CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC	

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	EPSEGSAP		ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCTGGTACC TCTGAAAGCGCAACTCCTGAGT CTGGCCCAGGTAGCGAACCTGC TACCTCCGGCTCTGAGACTCCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCC CGGAATCTGGTCCAGGTAGCGA ACCTGCAACCTCTGGCTCTGAA ACCCAGGTACCTCTGAAAGCG CTACTCCTGAATCTGGCCCAGG TACTTCTACTGAACCGTCCGAG GGCAGCGCACCCAGGTAGCCCTG CTGGCTCTCCAACCTCCACCGA AGAAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCTGAATCCGGCCCAGGTA GCGAACC GGCAACCTCCGGTTC TGAAACCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAGTCCGGCC CAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCC GACTTCCACCGAGGAAGGTAGC CCGGCTGGCTCTCCAACCTCTA CTGAAGAAGGTACTTCTACCGA ACCTTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCC CTGAGTCCGGCCCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAATCC GGTCCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACCCCGGAATCTGGCCCAGG TAGCGAACC GGCTACTTCTGGT TCTGAAACCCAGGTAGCGAAC CGGCTACCTCCGGTTCTGAAAC TCCAGGTAGCCAGCAGGCTCT CCGACTTCCACTGAGGAAGGTA CTTCTACTGAACCTTCCGAAGG CAGCGCACCCAGGTACCTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCTC CAGGTAGCGAACCTGCAACCTC TGGCTCTGAAACCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCTGAAT CTGGCCCAGGTACTTCTACTGA ACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA	
FVII- AE864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCSHT GTRKSCRCHEGYS	676	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG	677

[illegible]

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GAAAGCGCAACTCCTGAGTCTG GCCCAGGTAGCGAACCTGCTAC CTCCGGCTCTGAGACTCCAGGT ACCTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCTGGTCCAGGTAGCGAACCC TGCAACCTCTGGCTCTGAAACC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAATCTGGCCCAGGTAC TTCTACTGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAA GCGCTACTCCTGAGTCCGGCCC AGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCG ACTTCCACCGAGGAAGGTAGCC CGGCTGGCTCTCCAACCTTCTACT GAAGAAGGTAGCCCGGCAGGC TCTCCGACCTCTACTGAGGAAG GTACTTCTGAAAGCGCAACCCC GGAGTCCGGCCCAGGTACCTCT ACCGAACCGTCTGAGGGCAGCG CACCAGGTACCTCTGAAAGCGC AACTCCTGAGTCTGGCCCAGGT AGCGAACCTGCTACCTCCGGCT CTGAGACTCCAGGTACCTCTGA AAGCGCAACCCCGGAATCTGGT CCAGGTAGCGAACCTGCAACCT CTGGCTCTGAAACCCAGGTAC CTCTGAAAGCGCTACTCCTGAA TCTGGCCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAGGGCAGCGCACC AGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCA ACCTCCACCGAAGAAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCTGAATC CGGCCAGGTAGCGAACCGGCA ACCTCCGGTTCTGAAACCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCC TGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCG GCTGGCTCTCCGACTTCCACCG AGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCAACCTTCTACTGAAGAAGGT ACTTCTACCGAACCTTCCGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTGA AAGCGCTACCCCTGAGTCCGGC CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAATCCGGTCCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACCCCGGAA TCTGGCCCAGGTAGCGAACCGG CTACTTCTGGTTCTGAAACCCC AGGTAGCGAACCGGCTACCTCC GGTTCTGAAACTCCAGGTAGCC CAGCAGGCTCTCCGACTTCCAC TGAGGAAGGTACTTCTACTGAA CCTTCCGAAGGCAGCGCACCAG GTACCTCTACTGAACCTTCTGA	

【表 4 1 - 6】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GGGCAGCGCTCCAGGTAGCGAA CCTGCAACCTCTGGCTCTGAAA CCCCAGGTACCTCTGAAAGCGC TACTCTGAATCTGGCCCAGGT ACTTCTACTGAACCGTCCGAGG GCAGCGCACCA	
FVII- AF864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTRKSCRCHEGYS LLADGVSTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLI AVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALLRLHQPV VLTDHV VPLCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFGVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG GSTSESPSGTAPGT SPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGSTSES PSGTAPGTSTPESG SASPGTSTPESGSA SPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGT SPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGES STAPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGS TSSTAESP GPGTST PESGSASPGTSTPE SGSASPGSTSESPS	678	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGGCCGGAAGTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC	679

10

20

30

40

CFXTE ^N 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNAヌクレオチド配列	配列 番号
	GTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGSTS ESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTA SPGPGTSPSGESST APGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGS TSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSST AESP GPGTSPSGES STAPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAP GTSTPESGPXXXG ASASGAPSTXXXX SESPSGTAPGSTSE SPSGTAPGSTSESP SGTAPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPG TSTPESGSASPGTS PSGESSTAPGTSPS GESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESS TAPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGTS PSGESSTAPGSTSE SPSGTAPGTSTPES GSASPGTSTPESGS ASPGSTSESPSGTA PGTSTPESGSASPG STSSTAESPGPGST SESPSGTAPGSTSE SPSGTAPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAES PGPGTSPSGESSTA PGTSTPESGSASPG TSPSGESSTAPGTS PSGESSTAPGTSPS GESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTA PGSSPSASTGTGPG SSTPSGATGSPGSS TPSGATGSP		AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGGC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCTCCTGCG AGCCCCATTTCCTGGTGTCT ACCAGCGAATCTCCTTCTGGCA CCGCTCCAGGTACCTCTCCTAG CGGCGAATCTTCTACCGCTCCA GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTC TGGCACTGCACCAGGTTCTACT AGCGAATCCCCGTCTGGTACTG CTCCAGGTACTTCTACTCCTGA AAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT ACCTCTACTCCGGAAGCGGTT CTGCATCTCCAGGTTCTACCAG CGAATCTCCTTCTGGCACCGCT CCAGGTTCTACTAGCGAATCCC CGTCTGGTACCGCACCAGGTAC TTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTA CCGCACCAGGTTCTACTAGCGA ATCTCCGCTCTGGCACTGCTCCA GGTACTTCTCCTAGCGGTGAAT CTTCTACCGCTCCAGGTACTTCC CCTAGCGGCGAATCTTCTACCG CTCCAGGTTCTACTAGCTCTACT GCAGAATCTCCGGGCCCAGGTA CCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCT ACCGCTCCAGGTACTTCTCCGA GCGGTGAATCTTCTACCGCTCC AGGTTCTACTAGCTCTACTGCA GAATCTCCTGGCCCAGGTACCT CTACTCCGGAAGCGGCTCTGC ATCTCCAGGTACTTCTACCCCTG AAAGCGGTTCTGCATCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCTTCTG GCACTGCACCAGGTTCTACCAG CGAATCTCCGTCTGGCACTGCA CCAGGTACCTCTACCCCTGAAA GCGGTTCCGCTTCTCCAGGTTCT ACCAGCTCTACCGCAGAATCTC CTGGTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGCTCTGCATCTCCA GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTC TGGCACTGCACCAGGTACTTCT CCGAGCGGTGAATCTTCTACCG CACCAGGTTCTACTAGCTCTAC CGCTGAATCTCCGGGCCCAGGT ACTTCTCCGAGCGGTGAATCTT CTACTGCTCCAGGTACCTCTACT	

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			CCTGAAAGCGGTTCTGCATCTC CAGGTTCCACTAGCTCTACCGC AGAATCTCCGGGCCAGGTTCT ACTAGCTCTACTGCTGAATCTC CTGGCCCAGGTTCTACTAGCTC TACTGCTGAATCTCCGGGTCCA GGTTCTACCAGCTCTACTGCTG AATCTCCTGGTCCAGGTACCTC CCCGAGCGGTGAATCTTCTACT GCACCAGGTTCTACTAGCGAAT CTCCTTCTGGCACTGCACCAGG TTCTACCAGCGAATCTCCGTCT GGCAGTGCACCAGGTACCTCTA CCCCTGAAAGCGGTCCXXXXXX XXXXXXTGCAAGCGCAAGCGG CGCGCCAAGCACGGGAXXXXX XXXTAGCGAATCTCCTTCTGGT ACCGCTCCAGGTTCTACCAGCG AATCCCCGTCTGGTACTGCTCC AGGTTCTACCAGCGAATCTCCT TCTGGTACTGCACCAGGTTCTA CTAGCGAATCTCCTTCTGGTAC CGCTCCAGGTTCTACCAGCGAA TCCCCGTCTGGTACTGCTCCAG GTTCTACCAGCGAATCTCCTTCT GGTACTGCACCAGGTACTTCTA CTCCGGAAAGCGGTTCCGCATC TCCAGGTACTTCTCCTAGCGGT GAATCTTCTACTGCTCCAGGTA CCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCT ACTGCTCCAGGTTCTACCAGCT CTAAGTCTGAATCTCCGGGTCC AGGTACTTCCCCGAGCGGTGAA TCTTCTACTGCACCAGGTACTTC TACTCCGGAAAGCGGTTCCGCT TCTCCAGGTTCTACCAGCGAAT CTCCTTCTGGCACCGCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCCCCGTCT GGTACCGCACCAAGGTACTTCTC CTAGCGGCGAATCTTCTACCGC ACCAGGTTCTACTAGCGAATCC CCGTCTGGTACCGCACCAAGGTA CTTCTACCCCGGAAAGCGGCTC TGCTTCTCCAGGTACTTCTACCC CGGAAAGCGGCTCCGCATCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCTCCT TCTGGTACCGCTCCAGGTACTT CTACCCCTGAAAGCGGCTCCGC TTCTCCAGGTTCCACTAGCTCTA CCGCTGAATCTCCGGGTCCAGG TTCTACCAGCGAATCTCCTTCTG GCACCGCTCCAGGTTCTACTAG CGAATCCCCGTCTGGTACCGCA	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTPSG ATGSPGSNPSASTG TGPASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSNPS ASTGTGPGSSPSAS TGTGPGSSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGAS PGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGS PGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGAS PGTSSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTG TGPASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGAS PGTSSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTG		AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCCGGGCACCAACCAAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCCTCACTGA CCATGTGGTGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATGTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCTCCTGCG AGCCCCATTTCCCGGTGGTGCT TCCCCGGGCACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCT GCTTCTACTGGTACTGGTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACT GGTACTGGTCCAGGTACCCCGG GTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCT CCAGGTAGCTCTACTCCGTCTG GTGCTACCGGCTCTCCAGGTTT TAACCCCTTCTGCATCCACCGGT ACCGGCCCAGGTGCTTCTCCGG GCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTACCCCGGGCAGCGGTACC GCATCTTCTTCTCCAGGTAGCTC TACTCCTTCTGGTGCAACTGGTT CTCCAGGTACTCCTGGCAGCGG TACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTG CTTCTCCTGGTACTAGCTCTACT GGTTCTCCAGGTGCTTCTCCGG GCACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTACCCCGGGTAGCGGTACT GCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTC TACCCCTTCTGGTGCAACCGGC TCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCA CCAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TACCCCGGGTAGCGGTACCGCT TCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTAC TCCGCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTTCTAACCCCTTCTGCATCC	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	TGPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSP		ACCGGTACCGGCCCCAGGTTCTA GCCCTTCTGCTTCCACCGGTA GGCCCAGGTAGCTCTACCCCTT CTGGTGCTACCGGCTCCCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAA CTGGCTCTCCAGGTGCATCTCC GGGCACTAGCTCTACTGGTTCT CCAGGTGCATCCCCTGGCACTA GCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCT TCTCCTGGTACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTACTCCTGGCAG CGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAG GTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCT ACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCC GGGCACTAGCTCTACTGGTTCT CCAGGTGCTTCCCCGGGCACTA GCTCTACCGGTTCTCCAGGTCT AGCCCTTCTGCATCTACTGGTA CTGGCCCAGGTACTCCGGGCAG CGGTACTGCTTCTTCTCTCCAG GTGCATCTCCGGGCACTAGCTC TACTGGTTCTCCAGGTGCATCC CCTGGCACTAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACC AGCTCTACTGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCAAC CGGTTCCCCAGGTAGCTCTACT CCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCC AGGTGCATCCCCTGGCACCAGC TCTACCGGTTCTCCAGGTACCC CGGGCAGCGGTACCGCATCTTC CTCTCCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACCGGTTCCCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGC AACCGGCTCCCCAGGTAGCTCT ACTCCGTCTGGTGCAACCGGCT CCCCAGGTCTAGCCCGTCTGC TTCCACTGGTACTGGCCCAGGT GCTTCCCCGGGCACCAGCTCTA CTGGTTCTCCAGGTGCATCCCC GGGTACCAGCTCTACCGGTTCT CCAGGTACTCCTGGCAGCGGTA CTGCATCTTCTCTCCAGGTGCT TCTCCGGGCACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTGCATCTCCGGG CACTAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTGCATCCCCTGGCACTAGCT CTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCT CCTGGTACCAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTACCCCTGGTAGCGG TACTGCTTCTTCTCTCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCTACC GGTTCTCCAGGTACCCCGGGTA	

【表 4 1 - 1 3】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	NHDIALLRLHQPV VLTDHVVPLCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWQGQLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGSTSST AESP GPGTSTPESG SASPGTSES PGT APGSTSES PGTAP GTSTEPSEGSASPGT STEPSEGSASPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGA SASGAPSTGGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGSTSSTAESPG PGTSES PGTAPG TSPSGESSTAPGTP GSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSAS TGTGPGSEPATSGS		TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGACCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCAACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACAGGGT CTCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCCGGTGGTACT TCTACTGAACCGTCTGAAGGCA GCGCACCAAGGTAGCGAACCGGC TACTTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCCAGCAGGTTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTTCTAC CAGCTCTACCGCAGAATCTCCT GGTCCAGGTACCTCTACTCCGG AAAGCGGCTCTGCATCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCTTCTG GCACTGCACCAAGTTCTACTAG CGAATCCCCGTCTGGTACTGCT CCAGGTACTTCTACTCCTGAAA GCGGTTCCGCTTCTCCAGGTAC CTCTACTCCGGAAGCGGTTCT GCATCTCCAGGTAGCGAACCGG	

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	ETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG STSSTAESPGPGST SSTAESPGPGTSPS GESSTAPGSEPATS GSETPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGS PGSTSSTAESPGPG TSTPESGSASPGST SESPSGTAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAP		CAACCTCCGGCTCTGAAACCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCTGAATCCGGCCCAGGTAGCC CGGCAGGTTCTCCGACTTCCAC TGAGGAAGGTACCTCTACTGAA CCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAGTCCGGTCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAGGGTAGCGCACCAGGT AGCCCAGCAGGTTCTCCTACCT CCACCAGGAAGGTACTTCTAC CGAACCGTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTACTTCTACCGAACCTT CCGAGGGCAGCGCACCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACCCCTGAG TCCGGCCCAGGTACTTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCCGGTCC AGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAAGGCAGCGCTCCAGGTACCT CTACCGAACCGTCCGAGGGCAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCAACCCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTACTGAACCTTCCGA AGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAA CCTGCTACTTCTGGTCTGAAAC CCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCT CCGACCTCCACCAGGAAGGTA GCTCTACCCCGTCTGGTGCTACT GGTTCTCCAGGTACTCCGGGCA GCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTG CTACTGGCTCTCCAGGTACCTCT ACCGAACCGTCCGAGGGTAGCG CACCAGGTACCTCTACTGAACC GTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGT AGCGAACCGGCAACCTCCGGTT CTGAAACTCCAGGTAGCCCTGC TGGCTCTCCGACTTCTACTGAG GAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTC CGACTTCTACTGAGGAAGGTAC TTCTACCGAACCTTCCGAAGGT AGCGCTCCAGGTGCAAGCGCAA GCGGCGCGCCAAGCACGGGAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCC TGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCG GCTGGCTCTCCGACTTCCACCG AGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCAACCTTCTACTGAAGAAGGT TCTACCAGCTCTACCGCTGAAT CTCCTGGCCCAGGTTCTACTAG CGAATCTCCGTCTGGCACCGCA	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA クレオチド配列	配列 番号
			CCAGGTA CTTCCCCTAGCGGTG AATCTTCTACTGCACCAGGTAC CCCTGGCAGCGGTACCGCTTCT TCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCC GTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA GGTTCTAGCCCGTCTGCATCTA CCGGTACCGGCCCAGGTAGCGA ACCGGCAACCTCCGGCTCTGAA ACTCCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACTCCGGAATCCGGCCCAGG TAGCGAACCGGCTACTTCCGGC TCTGAAACCCCAGGTTCCACCA GCTCTACTGCAGAATCTCCGGG CCCAGGTTCTACTAGCTCTACT GCAGAATCTCCGGGTCCAGGTA CTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCT ACCGCTCCAGGTAGCGAACCGG CAACCTCTGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAACCTGCAACCTCC GGCTCTGAAACCCCAGGTACTT CTACTGAACCTTCTGAGGGCAG CGCACCAGGTTCTACCAGCTCT ACCGCAGAATCTCCTGGTCCAG GTACCTCTACTCCGGAAGCGG CTCTGCATCTCCAGGTTCTACTA GCGAATCTCCTTCTGGCACTGC ACCAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTA CCTCTACTGAACCTCCGAGGG CAGCGCTCCAGGTACCTCTACC GAACCTTCTGAAGGTAGCGCAC CAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACCGGCTCCCCAGGTTCT AGCCCGTCTGCTTCCACTGGTA CTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGG CACCAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTAGCGAACCTGCTACCTCCG GTTCTGAAACCCCAGGTACCTC TGAAAGCGCAACTCCGGAGTCT GGTCCAGGTAGCCCTGCAGGTT CTCCTACCTCCACTGAGGAAGG TAGCTCTACTCCGTCTGGTGCA ACCGGCTCCCCAGGTTCTAGCC CGTCTGCTTCCACTGGTACTGG CCCAGGTGCTTCCCCGGGCACC AGCTCTACTGGTTCTCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCTACTCCGGA GTCTGGCCCAGGTACCTCTACT GAACCGTCTGAGGGTAGCGCTC CAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAAGGTAGCGCACCA	
FVII- AM1318	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA	684	GCCAACGCGTTTCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG	685

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTKRSCRCHEGYS LLADGV SCTPTVE YPCGKPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLV NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLHQPV VLTDHVVPLCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWGQLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMF C AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFGVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGSTSST AESP GPGTSTPESG SASPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGT STPESGSASPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPT STEEGSTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGSTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSP		GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAACGTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTGTGTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCAGCAGC TCAGCGAGCAGCAGCGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGCGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCCTCCTGCG	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGP EPTGPAPSGGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTA PGTSPSGESSTAPG STSESPSGTAPGST SESPSGTAPGTSPS GESSTAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGTSPSGESSTA PGTSPSGESSTAPG TSPSGESSTAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPG TSSTGSPGASASGA PSTGGTSPSGESST APGSTSSTAESPGP GTSPSGESSTAPGT SESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSSPSAST GTGPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGS PGTSTPESGSASPG TSPSGESSTAPGTS PSGESSTAPGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGTSTEPSEG SAPGSTSESPSGTA		AGCCCCATTTCCCGGTGGTACT TCTACTGAACCGTCTGAAGGCA GCGCACCAGGTAGCGAACCGGC TACTTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCCCAGCAGGTTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTTCTAC CAGCTCTACCGCAGAATCTCCT GGTCCAGGTACCTCTACTCCGG AAAGCGGCTCTGCATCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCTTCTG GCACTGCACCAGGTTCTACTAG CGAATCCCCGTCTGGTACTGCT CCAGGTACTTCTACTCCTGAAA GCGGTTCCGCTTCTCCAGGTAC CTCTACTCCGGAAGCGGTTCT GCATCTCCAGGTAGCGAACCGG CAACCTCCGGCTCTGAAACCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCTGAATCCGGCCCAGGTAGCC CGGCAGGTTCTCCGACTTCCAC TGAGGAAGGTACCTCTACTGAA CCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAGTCCGGTCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACCGAACC GTCCGAGGGTAGCGCACCAGGT AGCCCAGCAGGTTCTCCTACCT CCACCGAGGAAGGTACTTCTAC CGAACCGTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTACTTCTACCGAACCTT CCGAGGGCAGCGCACCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACCCCTGAG TCCGGCCCAGGTACTTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCCGGTCC AGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAAGGCAGCGCTCCAGGTACCT CTACCGAACCGTCCGAGGGCAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCAACCCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTACTGAACCTTCCGA AGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAA CCTGCTACTTCTGGTTCTGAAAC CCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCT CCGACCTCCACCGAGGAAGGTA GCTCTACCCCGTCTGGTGCTACT GGTTCTCCAGGTACTCCGGGCA GCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTG CTACTGGCTCTCCAGGTACCTCT ACCGAACCGTCCGAGGGTAGCG CACCAGGTACCTCTACTGAACC GTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGT	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	PGSTSESPSGTAPG TSTPESGSASPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG SSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSTSESP SGTAPGTSPSGESS TAPGSTSSTAESPG PGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSPAG SPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEG SAP		AGCGAACC GGCAACCTCCGGTT CTGAAACTCCAGGTAGCCCTGC TGGCTCTCCGACTTCTACTGAG GAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTC CGACTTCTACTGAGGAAGGTAC TTCTACCGAACCTTCCGAAGGT AGCGCTCCAGGTCCAGAACCAA CGGGGCCGGCCCCAAGCGGAG GTAGCGAACC GGCAACCTCCGG CTCTGAAACCCCAGGTACCTCT GAAAGCGCTACTCCTGAATCCG GCCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCT TCCGACTTCCACTGAGGAAGGT ACTTCTGAAAGCGCTACTCCTG AGTCCGGCCCAGGTAGCCCGGC TGGCTCTCCGACTTCCACCGAG GAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTC CAACTTCTACTGAAGAAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACTCCTGAG TCCGGCCCAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCGACTTCCACCGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCA ACTTCTACTGAAGAAGGTTCTA CCAGCTCTACCGCTGAATCTCC TGGCCCAGGTTCTACTAGCGAA TCTCCGTCTGGCACCGCACCA GTACTTCCCCTAGCGGTGAATC TTCTACTGCACCAGGTTCTACC AGCGAATCTCCTTCTGGCACCG CTCCAGGTTCTACTAGCGAATC CCCGTCTGGTACCGCACCAAGGT ACTTCTCCTAGCGGCGAATCTT CTACCGCACCAAGGTACTTCTAC CGAACCTTCCGAGGGCAGCGCA CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CCCCTGAGTCCGGCCCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACTCCTGAA TCCGGTCCAGGTAGCGAACCGG CAACCTCTGGCTCTGAAACCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCGGAATCTGGTCCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACTCCGGAATC CGGTCCAGGTACCTCTACTGAA CCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAGTCCGGTCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACCTCCCCTAGCGG CGAATCTTCTACTGCTCCAGGT ACCTCTCCTAGCGGCGAATCTT CTACCGCTCCAGGTACCTCCCC TAGCGGTGAATCTTCTACCGCA CCAGGTACTTCTACCGAACCGT	

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAG CCCAGCAGGTTCTCCTACCTCC ACCGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCGTCCGAGGGTAGCGCACC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCA CCGGTACCGGCCAGGTAGCTC TACTCCGTCTGGTGCAACTGGC TCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTC TGGTGCAACCGGCTCCCCAGGT AGCTCTACCCCGTCTGGTGCTA CCGGCTCTCCAGGTAGCTCTAC CCCGTCTGGTGCAACCGGCTCC CCAGGTGCATCCCGGGTACTA GCTCTACCGGTTCTCCAGGTGC AAGCGCAAGCGGCGCGCCAAG CACGGGAGGTACTTCTCCGAGC GGTGAATCTTCTACCGCACCAG GTTCTACTAGCTCTACCGCTGA ATCTCCGGGCCCAGGTACTTCT CCGAGCGGTGAATCTTCTACTG CTCCAGGTACCTCTGAAAGCGC TACTCCGGAGTCTGGCCCAGGT ACCTCTACTGAACCGTCTGAGG GTAGCGCTCCAGGTACTTCTAC TGAACCGTCCGAAGGTAGCGCA CCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATC TACTGGTACTGGCCCAGGTAGC TCTACTCCTTCTGGTGCTACCGG CTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGT ACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTACTTCTACTCCGGAAGCGG TTCCGCATCTCCAGGTACTTCTC CTAGCGGTGAATCTTCTACTGC TCCAGGTACCTCTCCTAGCGGC GAATCTTCTACTGCTCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCAACCCCTGA ATCCGGTCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCTGGCTCTGAGACTC CAGGTACTTCTACCGAACCGTC CGAAGGTAGCGCACCAGGTTCT ACCAGCGAATCCCCTTCTGGTA CTGCTCCAGGTTCTACCAGCGA ATCCCCTTCTGGCACCGCACCA GGTACTTCTACCCCTGAAAGCG GCTCCGCTTCTCCAGGTAGCCC GGCAGGCTCTCCGACCTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCGGAGTCCGGCCCAGG TACCTCTACCGAACCGTCTGAG GGCAGCGCACCAGGTAGCCCTG CTGGCTCTCCAACCTCCACCGA AGAAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCTGAATCCGGCCCAGGTA	

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA シクレオチド配列	配列 番号
	TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAP		CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAGCTGGACGAACCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTCT ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGTA CCTCTGAAAGCGCAACTCCTGA GTCTGGCCCAGGTAGCGAACCT GCTACCTCCGGCTCTGAGACTC CAGGTACCTCTGAAAGCGCAAC CCCGGAATCTGGTCCAGGTAGC GAACCTGCAACCTCTGGCTCTG AAACCCAGGTACCTCTGAAAG CGCTACTCCTGAATCTGGCCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCG AGGGCAGCGCACCAAGGTAGCCC TGCTGGCTCTCCAACCTCCACC GAAGAAGGTACCTCTGAAAGCG CAACCCCTGAATCCGGCCCAGG TAGCGAACCGGCAACCTCCGGT TCTGAAACCCAGGTACTTCTG AAAGCGCTACTCCTGAGTCCGG CCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCT CCGACTTCCACCGAGGAAGGTA GCCCCGGCTGGCTCTCCAACCTT TACTGAAGAAGGTACTTCTACC GAACCTTCCGAGGGCAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCTGAGTCCGGCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAAT CCGGTCCAGGTACTTCTGAAAG CGCTACCCCGGAATCTGGCCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCTG GTTCTGAAACCCAGGTAGCGA	

【表 4 1 - 2 2】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			ACCGGCTACCTCCGGTTCTGAA ACTCCAGGTAGCCCAGCAGGCT CTCCGACTTCCACTGAGGAAGG TACTTCTACTGAACCTTCCGAA GGCAGCGCACCAGGTACCTCTA CTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTAGCGAACCTGCAACC TCTGGCTCTGAAACCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCTACTCCTGA ATCTGGCCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAGGGCAGCGCAC CA	
FIX- AE864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRNIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICLADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSRV VNWIKEKTKLTGG SPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESAT	688	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGA AAAACACTGAAA GAACAACCTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTAAGGAGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAACCTGCTGCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTGCAATTATTCCTACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAACCTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA	689

[illegible]

20

30

40

【表 4 1 - 2 4】

[illegible]

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			CCTCTGAAAGCGCAACCCCTGA ATCCGGCCCCAGGTAGCGAACCG GCAACCTCCGGTTCTGAAACCC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC TCCTGAGTCCGGCCCAGGTAGC CCGGCTGGCTCTCCGACTTCCA CCGAGGAAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCAAC TTCTACTGAAGAA GGTACTTCTACCGAACCTTCCG AGGGCAGCGCACCAAGGTACTTC TGAAAGCGCTACCCCTGAGTCC GGCCCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACTCCTGAATCCGGTCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACCCCG GAATCTGGCCCAGGTAGCGAAC CGGCTACTTCTGGTTCTGAAAC CCCAGGTAGCGAACCGGCTACC TCCGGTTCTGAAACTCCAGGTA GCCCAGCAGGCTCTCCGACTTC CACTGAGGAAGGTACTTCTACT GAACCTTCCGAAGGCAGCGCAC CAGGTACCTCTACTGAACCTTC TGAGGGCAGCGCTCCAGGTAGC GAACCTGCAACCTCTGGCTCTG AAACCCCAGGTACCTCTGAAAG CGTACTCCTGAATCTGGCCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCG AGGGCAGCGCACCA	
FIX- AF864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVD AFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRN VIRIIPPHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPIC IADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLOY	690	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACA ACTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TG TACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG	691

20

30

40

【表 4 1 - 2 6】

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR YVNWIKEKTKLTGG STSESPSGTAPGTS PSGESSTAPGSTSE SPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGS ASPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGTS PSGESSTAPGSTSE SPSGTAPGTSPSGE SSTAPGTSPSGESS TAPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPG TSPSGESSTAPGST SSTAESPGPGTSTP ESGSASPGTSTPES GSASPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTA PGTSTPESGSASPG STSSTAESPGPGTS TPESGSASPGSTSE SPSGTAPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAES PGPGTSPSGESSTA PGTSTPESGSASPG STSSTAESPGPGST SSTAESPGPGSTSS TAESPGPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESS TAPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPG TSTPESGPXXXGA SASGAPSTXXXXS ESPSGTAPGSTSES PSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGT STPESGSASPGTSP SGESSTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTA ES SPGPGTSPSGESS T APGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGS T SESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSES PSGTAPGTSTPESG		AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTCTGCCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAACCTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATT ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGTT CTACCAGCGAATCTCCTTCTGG CACCGCTCCAGGTACCTCTCCT AGCGGCGAATCTTCTACCGCTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCC TTCTGGCACTGCACCAGGTTCT ACTAGCGAATCCCCGTCTGGTA CTGCTCCAGGTACTTCTACTCCT GAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAG GTACCTCTACTCCGAAAGCGG TTCTGCATCTCCAGGTTCTACCA GCGAATCTCCTTCTGGCACCGC TCCAGGTTCTACTAGCGAATCC CCGTCTGGTACCGCACCAAGTA CTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCT ACCGCACCAAGGTTCTACTAGCG AATCTCCGTCTGGCACTGCTCC AGGTAATCTCCTAGCGGTGAA TCTTCTACCGCTCCAGGTACTTC CCCTAGCGGCGAATCTTCTACC GCTCCAGGTTCTACTAGCTCTA CTGCAGAATCTCCGGGCCAGG	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	SASPGTSTPESGSA SPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGS TSSTAESP GPGSTS ESPSGTAPGSTSES PSGTAPGTSPSGES STAPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAP GTSTPESGSASPGT SPSGESSTAPGTSP SGESSTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTA ESPGPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAP GSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSST PSGATGSP		TACCTCTCCTAGCGGTGAATCTT CTACCGCTCCAGGTACTTCTCC GAGCGGTGAATCTTCTACCGCT CCAGGTTCTACTAGCTCTACTG CAGAATCTCCTGGCCCAGGTAC CTCTACTCCGGAAAGCGGCTCT GCATCTCCAGGTACTTCTACCC CTGAAAGCGGTTCTGCATCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCTCCT TCTGGCACTGCACCAGGTTCTA CCAGCGAATCTCCGTCTGGCAC TGCACCAGGTACCTCTACCCCT GAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAG GTTCTACCAGCTCTACCGCAGA ATCTCCTGGTCCAGGTACCTCT ACTCCGGAAAGCGGCTCTGCAT CTCCAGGTTCTACTAGCGAATC TCCTTCTGGCACTGCACCAGGT ACTTCTCCGAGCGGTGAATCTT CTACCGCACCAGGTTCTACTAG CTCTACCGCTGAATCTCCGGGC CCAGGTACTTCTCCGAGCGGTG AATCTTCTACTGCTCCAGGTAC CTCTACTCCTGAAAGCGGTTCT GCATCTCCAGGTTCCTACTAGCT CTACCGCAGAATCTCCGGGCCC AGGTTCTACTAGCTCTACTGCT GAATCTCCTGGCCCAGGTTCTA CTAGCTCTACTGCTGAATCTCC GGGTCCAGGTTCTACCAGCTCT ACTGCTGAATCTCCTGGTCCAG GTACCTCCCCGAGCGGTGAATC TTCTACTGCACCAGGTTCTACTA GCGAATCTCCTTCTGGCACTGC ACCAGGTTCTACCAGCGAATCT CCGTCTGGCACTGCACCAGGTA CCTCTACCCCTGAAAGCGGTCC XXXXXXXXXXXXTGAAGCGC AAGCGGCGCGCCAAGCACGGG AXXXXXXXXXTAGCGAATCTCCT TCTGGTACCGCTCCAGGTTCTA CCAGCGAATCCCCGTCTGGTAC TGCTCCAGGTTCTACCAGCGAA TCTCCTTCTGGTACTGCACCAG GTTCTACTAGCGAATCTCCTTCT GGTACCGCTCCAGGTTCTACCA GCGAATCCCCGTCTGGTACTGC TCCAGGTTCTACCAGCGAATCT CCTTCTGGTACTGCACCAGGTA CTTCTACTCCGGAAAGCGGTTT CGCATCTCCAGGTACTTCTCCTA GCGGTGAATCTTCTACTGCTCC AGGTACCTCTCCTAGCGGCGAA	

40

【表 4 1 - 2 8】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			TCTTCTACTGCTCCAGGTTCTAC CAGCTCTACTGCTGAATCTCCG GGTCCAGGTA CTTC CCGAGCG GTGAATCTTCTACTGCACCAGG TACTTCTACTCCGGAAAGCGGT TCCGCTTCTCCAGGTTCTACCAG CGAATCTCCTTCTGGCACCGCT CCAGGTTCTACTAGCGAATCCC CGTCTGGTACCGCACCAAGGTAC TTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTA CCGCACCAGGTTCTACTAGCGA ATCCCCGTCTGGTACCGCACCA GGTACTTCTACCCCGGAAAGCG GCTCTGCTTCTCCAGGTA CTTCT ACCCCGGAAAGCGGCTCCGCAT CTCCAGGTTCTACTAGCGAATC TCCTTCTGGTACCGCTCCAGGT ACTTCTACCCCTGAAAGCGGCT CCGCTTCTCCAGGTTCCACTAG CTCTACCGCTGAATCTCCGGGT CCAGGTTCTACCAGCGAATCTC CTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCT ACTAGCGAATCCCCGTCTGGTA CCGCACCAGGTA CTTCTCCTAG CGGCGAATCTTCTACCGCACCA GGTTCTACCAGCTCTACTGCTG AATCTCCGGGTCCAGGTA CTTC CCCGAGCGGTGAATCTTCTACT GCACCAGGTA CTTCTACTCCGG AAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGG TACCTCCCCTAGCGGCGAATCT TCTACTGCTCCAGGTA CTCTCC TAGCGGCGAATCTTCTACCGCT CCAGGTA CTCTCCCTAGCGGTG AATCTTCTACCGCACCAAGGTTCT TACTAGCTCTACTGCTGAATCTC CGGGTCCAGGTTCTACCAGCTC TACTGCTGAATCTCCTGGTCCA GGTACCTCCCCGAGCGGTGAAT CTTCTACTGCACCAGGTTCTAG CCCTTCTGCTTCCACCGGTACCG GCCCAGGTAGCTCTACTCCGTC TGGTGCAACTGGCTCTCCAGGT AGCTCTACTCCGCTGGTGCAA CCGGCTCCCCA	
FIX- AG864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA	692	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGA AAAACACTGAAA GAACA ACTGAATTTTGGAAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG	693

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVD AFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHT E QKRNVIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPIC IADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFC A GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR Y VNWIKEKTKLTGG ASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGA TGSPGSNPSASTGT GPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPG SGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSNP SA STGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGS PGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGAT		GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGT C CCTTTGGATT TGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAC TGCTGCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTTCGAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATT CGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAC TGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTT CACCATCTAT AACAA CATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTC ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGTG CTTCCCCGGGCACCAGCTCTAC TGGTTCTCCAGTTCTAGCCCGT CTGCTTCTACTGGTACTGGTCCA GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCAC	

20

30

40

【表 4 1 - 3 0】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	GSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTG TGPASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTG TGPASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSP		TGGTACTGGTCCAGGTACCCCG GGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTC TCCAGGTAGCTCTACTCCGTCT GGTGCTACCGGCTCTCCAGGTT CTAACCTTCTGCATCCACCGG TACCGGCCAGGTGCTTCTCCG GGCACCAGCTCTACTGGTTCTC CAGGTACCCCGGGCAGCGGTAC CGCATCTTCTTCTCCAGGTAGCT CTACTCCTTCTGGTGCAACTGGT TCTCCAGGTACTCCTGGCAGCG GTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGT GCTTCTCCTGGTACTAGCTCTAC TGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCGG GCACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTACCCCGGGTAGCGGTACT GCTTCTTCTCTCCAGGTAGCTC TACCCCTTCTGGTGCAACCGGC TCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCA CCAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TACCCCGGGTAGCGGTACCGCT TCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTAC TCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTTCTAACCTTCTGCATCC ACCGGTACCGGCCAGGTTCTA GCCCTTCTGCTTCCACCGGTACT GGCCAGGTAGCTCTACCCCTT CTGGTGCTACCGGCTCCCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAA CTGGCTCTCCAGGTGCATCTCC GGGCACTAGCTCTACTGGTTCT CCAGGTGCATCCCTGGCACTA GCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCT TCTCCTGGTACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTACTCCTGGCAG CGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAG GTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCT ACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCC GGGCACTAGCTCTACTGGTTCT CCAGGTGCTTCCCCGGGCACTA GCTCTACCGGTTCTCCAGGTCT AGCCCTTCTGCATCTACTGGTA CTGGCCCAGGTACTCCGGGCAG CGGTACTGCTTCTTCTCTCCAG GTGCATCTCCGGGCACTAGCTC TACTGGTTCTCCAGGTGCATCC CCTGGCACTAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACC AGCTCTACTGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCAAC CGGTTCCCCAGGTAGCTCTACT CCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCC AGGTGCATCCCTGGCACCAGC	

10

20

30

40

【表 4 1 - 3 1】

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スク레オチド配列	配列 番号
			TCTACCGGTTCTCCAGGTACCC CGGGCAGCGGTACCGCATCTTC CTCTCCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACCGGTTCCCCAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGC AACCGGCTCCCCAGGTAGCTCT ACTCCGCTCTGGTGCAACCGGCT CCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGC TTCCACTGGTACTGGCCCAGGT GCTTCCCCGGGCACCAGCTCTA CTGGTTCTCCAGGTGCATCCCC GGGTACCAGCTCTACCGGTTCT CCAGGTACTCCTGGCAGCGGTA CTGCATCTTCCTCTCCAGGTGCT TCTCCGGGCACCAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTGCATCTCCGGG CACTAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTGCATCCCCTGGCACTAGCT CTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCT CCTGGTACCAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTACCCCTGGTAGCGG TACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCTACC GGTTCTCCAGGTACCCCGGTA GCGGTACCGCATCTTCTTCTCCA GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTG CTACTGGTTCTCCAGGTACTCC GGGCAGCGGTACTGCTTCTTCC TCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTC TGGTGCTACTGGCTCTCCAGGT AGCTCTACCCCGTCTGGTGCTA CTGGCTCCCCAGGTTCTAGCCC TTCTGCATCCACCGGTACCGGT CCAGGTTCTAGCCCGTCTGCAT CTACTGGTACTGGTCCAGGTGC ATCCCCGGGCACTAGCTCTACC GGTTCTCCAGGTACTCCTGGTA GCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCA GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGC TACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCC CTTCTGCATCCACCGGTACCGG CCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTT CTACCGGTACTGGTCCAGGTGC TTCTCCGGGTACTAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTGCATCTCCTGGT ACTAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGC AACCGGCTCTCCAGGTTCTAGC CCTTCTGCATCTACCGGTACTG GTCCAGGTGCATCCCCTGGTAC CAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT TCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGG TACCGGTCCAGGTACCCCTGGC	

【表 4 1 - 3 2】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			AGCGGTACCGCATCTTCCTCTC CAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACCGGTTCCCCAGGTAGC TCTACTCCTTCTGGTGCTACTGG CTCCCCAGGTGCATCCCCCTGGC ACCAGCTCTACCGGTTCTCCA	
FIX- AM875	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRNIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICIADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFC GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR VNWIKEKTKLTGG TSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGSPAG SPTSTEEGSTSSTA ESPGPGTSTPESGS ASPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPG TSTPESGSASPGTS TPESGSASPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGSTEPS	694	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTCTGCCC ACTGTGTTGAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTGCGAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAGTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT	695

10

20

30

40

【表 4 1 - 3 3】

[illegible]

【表 4 1 - 3 4】

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			AGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAGGGCAGCGCTCCAGGTACCT CTACCGAACCTTCTGAAGGTAG CGCACCAGGTAGCTCTACTCCG TCTGGTGCAACCGGCTCCCCAG GTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACT GGTACTGGCCCAGGTGCTTCCC CGGGCACCAGCTCTACTGGTTC TCCAGGTAGCGAACCTGCTACC TCCGGTTCTGAAACCCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCAACTCCGGA GTCTGGTCCAGGTAGCCCTGCA GGTTCTCCTACCTCCACTGAGG AAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACCGGCTCCCCAGGTTCT AGCCCGTCTGCTTCCACTGGTA CTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGG CACCAGCTCTACTGGTTCTCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTC CGGAGTCTGGCCCAGGTACCTC TACTGAACCGTCTGAGGGTAGC GCTCCAGGTACTTCTACTGAAC CGTCCGAAGGTAGCGCACCA	
FIX- AG864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIUTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHTE QKRN VIRIIPHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPIC IADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM	696	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAAC TGAATTTTGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTA CTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAC TGTGCC	697

20

30

40

[illegible]

20

30

40

【表 4 1 - 3 7】

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GCTCTACTCCGTCTGGTGCTACC GGTTCTCCAGGTACCCCGGGTA GCGGTACCGCATCTTCTTCTCCA GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTG CTACTGGTTCTCCAGGTACTCC GGGCAGCGGTACTGCTTCTTCC TCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTC TGGTGCTACTGGCTCTCCAGGT AGCTCTACCCCGTCTGGTGCTA CTGGCTCCCCAGGTTCTAGCCC TTCTGCATCCACCGGTACCGGT CCAGGTTCTAGCCCGTCTGCAT CTACTGGTACTGGTCCAGGTGC ATCCCCGGGCACTAGCTCTACC GGTTCTCCAGGTACTCCTGGTA GCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCA GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGC TACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCC CTTCTGCATCCACCGGTACCGG CCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTT CTACCGGTACTGGTCCAGGTGC TTCTCCGGGTACTAGCTCTACTG GTTCTCCAGGTGCATCTCCTGGT ACTAGCTCTACTGGTTCTCCAG GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGC AACCGGCTCTCCAGGTTCTAGC CCTTCTGCATCTACCGGTACTG GTCCAGGTGCATCCCCTGGTAC CAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT TCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGG TACCGGTCCAGGTACCCCTGGC AGCGGTACCGCATCTTCCTCTC CAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACCGGTTCCCCAGGTAGC TCTACTCCTTCTGGTGCTACTGG CTCCCCAGGTGCATCCCCTGGC ACCAGCTCTACCGGTTCTCCA	
FIX- AM875	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC	698	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACCTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGIAGTGGGGATATCGACTTG	699

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIETEHE QKRNVRIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICIAADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFCFA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSRV VNWIKEKTKLTGG TSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGSPAG SPTSTEEGSTSSTA ESPGPGTSTPESGS ASPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPG TSTPESGSASPGTS TPESGSASPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGSTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSS TPGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGAS ASGAPSTGGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGSTSSTAESPG PGSTSESPSGTAPG TSPSGESSTAPGTP		CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTGTGCTGCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTAA AATTACAGTTGTCTGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAGTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCTCAAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTG ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGTA CTTCTACTGAACCGTCTGAAGG CAGCGCACCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCCGGTTCTGAAACCC CAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCC AACTTCTACTGAAGAAGGTTCT ACCAGCTCTACCGCAGAATCTC CTGGTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGCTCTGCATCTCCA GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTC TGGCACTGCACCAGGTTCTACT AGCGAATCCCCGTCTGGTACTG CTCCAGGTACTTCTACTCCTGA	

20

30

40

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	GSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSAS TGTGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG STSSTAESPGPGST SSTAESPGPGTSPS GESSTAPGSEPATSG GSETPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGS PGSTSSTAESPGPG TSTPESGSASPGST SESPSGTAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAP		AAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT ACCTCTACTCCGGAAAGCGGTT CTGCATCTCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGCTCTGAAACC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAATCCGGCCCAGGTAG CCCGGCAGGTTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTACCGAA CCGTCCGAGGGTAGCGCACCAG GTAGCCCAGCAGGTTCTCCTAC CTCCACCGAGGAAGGTACTTCT ACCGAACCCTCCGAGGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACCGAACC TTCCGAGGGCAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCTACCCCTG AGTCCGGCCCAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCTGAATCCGGT CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTAC CTCTACCGAACCCTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAA GCGCAACCCCTGAATCCGGTCC AGGTACTTCTACTGAACCTTCC GAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCG AACCTGCTACTTCTGGTTCTGA AACCCCAGGTAGCCCGGCTGGC TCTCCGACCTCCACCGAGGAAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGC TACTGGTTCTCCAGGTACTCCG GGCAGCGGTACTGCTTCTTCT CTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCT GGTGCTACTGGCTCTCCAGGTA CCTCTACCGAACCCTCCGAGGG TAGCGCACCAGGTACCTCTACT GAACCGTCTGAGGGTAGCGCTC CAGGTAGCGAACC GGCAACCTC CGGTTCTGAAACTCCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCGACTTCTAC TGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGT TCTCCGACTTCTACTGAGGAAG GTACTTCTACCGAACCTTCCGA AGGTAGCGCTCCAGGTGCAAGC GCAAGCGGCGCGCCAAGCACG GGAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAG CCCGGCTGGCTCTCCGACTTCC ACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCAACCTTCTACTGAAGA	

20

30

40

【表 4 1 - 4 1】

40

【表 4 1 - 4 2】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
FIX- AM1318	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHT QKRN VIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR Y VNWIKEKTKLTGG TSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGSPAG SPTSTEEGSTSSTA ESPGPGTSTPESGS ASPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPG TSTPESGSASPGTS TPESGSASPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS A PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES	700	CGTCCGAAGGTAGCGCACCA TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACCTGAATTTTGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTAAGGAGGATATCGACTTG CAGAAAACAGAAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTGTGCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTGCAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAGTGGACGAACCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTACCATCTAT AACAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTC ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA	701

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	ATPESGPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGPE PTGPAPSGGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPT STEEGSTSSTAESP GPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGT SPSGESSTAPGTST EPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSE GSAPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGT SSTGSPGASASGAP STGGTSPSGESSTA PGSTSSTAESP GPG TSPSGESSTAPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPG TSTPESGSASPGTS PSGESSTAPGTSPS		TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGTA CTTCTACTGAACCGTCTGAAGG CAGCGCACCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCCGGTTCTGAAACCC CAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCC AACTTCTACTGAAGAAGGTTCT ACCAGCTCTACCGCAGAATCTC CTGGTCCAGGTACCTCTACTCC GGAAAGCGGCTCTGCATCTCCA GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTC TGGCACTGCACCAGGTTCTACT AGCGAATCCCCGTCTGGTACTG CTCCAGGTACTTCTACTCCTGA AAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGT ACCTCTACTCCGGAAGCGGTT CTGCATCTCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGCTCTGAAACC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAATCCGGCCCAGGTAG CCCGGCAGGTTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTACCGAA CCGTCCGAGGGTAGCGCACCAG GTAGCCCAGCAGGTTCTCCTAC CTCCACCGAGGAAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAGGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACCGAACC TTCCGAGGGCAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCTACCCCTG AGTCCGGCCCAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCTGAATCCGGT CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAA GCGCAACCCCTGAATCCGGTCC AGGTACTTCTACTGAACCTTCC GAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCG AACCTGCTACTTCTGGTTCTGA AACCCAGGTAGCCCGGCTGGC TCTCCGACCTCCACCGAGGAAG GTAGCTCTACCCCGTCTGGTGC TACTGGTTCTCCAGGTACTCCG GGCAGCGGTACTGCTTCTTCCT CTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCT	

20

30

40

CFX10N 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA シクレオチド配列	配列 番号
	GESSTAPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGS PGSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGTS TPESGSASPGSPAG SPTSTEETSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSS TPSGATGSPGASPG TSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSTSESPSG TAPGTSPSGESSTA PGSTSSATAESP SSTPSGATGSPGAS PGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGSPAGSP TSTEETSPAGSPTS TEETSTEPSEGS P		GGTGCTACTGGCTCTCCAGGTA CCTCTACCGAACCGTCCGAGGG TAGCGCACCGAGGTACCTCTACT GAACCGTCTGAGGGTAGCGCTC CAGGTAGCGAACCGGCAACCTC CGGTTCTGAAACTCCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCGACTTCTAC TGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGT TCTCCGACTTCTACTGAGGAAG GTACTTCTACCGAACCTTCCGA AGGTAGCGCTCCAGGTCCAGAA CCAACGGGGCCGGCCCCAAGCG GAGGTAGCGAACCGGCAACCTC CGGCTCTGAAACCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCTGAAT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCGAGG TTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTC CTGAGTCCGGCCCAGGTAGCCC GGCTGGCTCTCCGACTTCCACC GAGGAAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCCAACCTTCTACTGAAGAAGG TACTTCTGAAAGCGCTACTCCT GAGTCCGGCCCAGGTAGCCCGG CTGGCTCTCCGACTTCCACCGA GGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCT CCAACCTTCTACTGAAGAAGGTT CTACCAGCTCTACCGCTGAATC TCTTGGCCCAGGTTCTACTAGC GAATCTCCGTCTGGCACCGCAC CAGGTACTTCCCCTAGCGGTGA ATCTTCTACTGCACCAGGTTCTA CCAGCGAATCTCCTTCTGGCAC CGCTCCAGGTTCTACTAGCGAA TCCCCGTCTGGTACCGCACCG GTACTTCTCCTAGCGGCGAATC TTCTACCGCACCGGTACTTCT ACCGAACCTTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTACTTCTGAAAGCGC TACCCCTGAGTCCGGCCCAGGT ACTTCTGAAAGCGCTACTCCTG AATCCGGTCCAGGTAGCGAAC GGCAACCTCTGGCTCTGAAACC CCAGGTACCTCTGAAAGCGCTA CTCCGGAATCTGGTCCAGGTAC TTCTGAAAGCGCTACTCCGGAA TCCGGTCCAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCGGTACCTCCCCTAGC GGCGAATCTTCTACTGCTCCAG	

20

30

40

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA シクレオチド配列	配列 番号
			GTACCTCTCCTAGCGGCGAATC TTCTACCGCTCCAGGTACCTCCC CTAGCGGTGAATCTTCTACCGC ACCAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAGGGTAGCGCACCAGGTA GCCCCAGCAGGTTCTCCTACCTC CACCGAGGAAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCAC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCC ACCGGTACCGGCCCAGGTAGCT CTACTCCGTCTGGTGCAACTGG CTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGT CTGGTGCAACCGGCTCCCCAGG TAGCTCTACCCCGTCTGGTGCT ACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTA CCCCGTCTGGTGCAACCGGCTC CCCAGGTGCATCCCCGGGTACT AGCTCTACCGGTTCTCCAGGTG CAAGCGCAAGCGGCGCGCCAA GCACGGGAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACCGCACCA GGTTCTACTAGCTCTACCGCTG AATCTCCGGGCCCAGGTACTTC TCCGAGCGGTGAATCTTCTACT GCTCCAGGTACCTCTGAAAGCG CTACTCCGGAGTCTGGCCCAGG TACCTCTACTGAACCGTCTGAG GGTAGCGCTCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAAGGTAGCGC ACCAGGTTCTAGCCCTTCTGCA TCTACTGGTACTGGCCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACC GGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGG GTACTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTACTTCTACTCCGGAAAGC GGTTCCGCATCTCCAGGTACTT CTCCTAGCGGTGAATCTTCTACT GCTCCAGGTACCTCTCCTAGCG GCGAATCTTCTACTGCTCCAGG TACTTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGTCCAGGTAGCGAAC CGGCTACTTCTGGCTCTGAGAC TCCAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAAGGTAGCGCACCAGGTT CTACCAGCGAATCCCCCTTCTGG TACTGCTCCAGGTTCTACCAGC GAATCCCCCTTCTGGCACCGCAC CAGGTACTTCTACCCCTGAAAG CGGCTCCGCTTCTCCAGGTAGC CCGGCAGGCTCTCCGACCTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTGAAAG CGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCTG	

20

30

40

【表 4 1 - 4 6】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			AGGGCAGCGCACCAGGTAGCCC TGCTGGCTCTCCAACCTCCACC GAAGAAGGTACCTCTGAAAGCG CAACCCCTGAATCCGGCCCAGG TAGCGAACCGGCAACCTCCGGT TCTGAAACCCCAGGTAGCTCTA CCCCGTCTGGTGCTACCGGTT CCCAGGTGCTTCTCCTGGTACT AGCTCTACCGGTTCTCCAGGTA GCTCTACCCCGTCTGGTGCTACT GGCTCTCCAGGTTCTACTAGCG AATCCCGTCTGGTACTGCTCC AGGTACTTCCCCTAGCGGTGAA TCTTCTACTGCTCCAGGTTCTAC CAGCTCTACCGCAGAATCTCCG GGTCCAGGTAGCTCTACCCCTT CTGGTGCAACCGGCTCTCCAGG TGCATCCCCGGGTACCAGCTCT ACCGGTTCTCCAGGTACTCCGG GTAGCGGTACCGCTTCTTCCTCT CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CGACTTCTACTGAGGAAGGTAG CCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTACCGA ACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA	

【 0 5 0 9 】

* 配列名は、凝固因子およびX T E N成分のN末端からC末端への設定を反映する。

【 0 5 1 0 】

【表 4 2 - 1】

表42: CF、開裂配列、およびXTEN配列を含む例示的なCFXEN

CFXTE ^N 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
FVII- FXIa- AE288	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTRKSCRCHEGYS LLADGV SCTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL V NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLRHOPV	702	GCCAACGCGTTCTCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGA ACTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA	703

【表 4 2 - 2】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	VLTDHVPLCLPE RTFSERTLAFVRF LVSGWGQLLDGR ATALELMVLNVPR LMTQDCLQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG KLTRAETGGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAP		TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCTT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCCGGTGGTGGT ACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG AGTCTGGCCCAGGTAGCGAACC TGCTACCTCCGGCTCTGAGACT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAATCTGGTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCAACCTCCA CCGAAGAAGGTACCTCTGAAAG CGCAACCCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCCG GTTCTGAAACCCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAGTCC	

50

【表 4 2 - 3】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			GGCCCAGGTAGCCCCGGCTGGCT CTCCGACTTCCACCGAGGAAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCAAC TCTACTGAAGAAGGTACTTCTA CCGAACCTTCCGAGGGCAGCGC ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCTGAGTCCGGCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA ATCCGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACCCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTC TGGTTCTGAAACCCAGGTAGC GAACCGGCTACCTCCGGTTCTG AAATCCAGGTAGCCCAGCAGG CTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACTGAACCTTCCG AAGGCAGCGCACCGAGGTACCTC TACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCAGGTAGCGAACCTGCAA CCTCTGGCTCTGAAACCCAGG TACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGC ACCA	10
FVII- FXIa- AE864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTRSRRCHEGYS LLADGVSCPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLHQPV VLT DHVVPLCLPE RTFSERTLAFVRES LVSGWGQLLDRG ATAELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRG WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV	704	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTGTGTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC	705

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG KLTRAETGGSPAG SPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS		TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCCTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCTCTCTGCG AGCCCCATTTCCTCGGTGGTGGT AGCCCGGCTGGCTCTCTACCT CTACTGAGGAAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCTGAGTCTGGT CCAGGTACCTCTACTGAACCGT CCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAG CCCAGCAGGCTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGCAGCGCACC AGGTACCTCTACTGAACCTTCT GAGGGCAGCGCTCCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCGGAATC TGGCCAGGTAGCGAACC GGCT ACTTCTGGTCTGAAACCCAG GTAGCGAACC GGCTACCTCCGG TTCTGAAACTCCAGGTAGCCCG GCAGGCTCTCCGACCTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCCGGCCAGGT ACCTCTACCGAACC GTCTGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTAC CGAACC GTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTAGCCAGCAGGTCTCTC CTACCTCCACCGAGGAAGGTAC TTCTACCGAACC GTCCGAGGGT AGCGCACCAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC	

40

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	TEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAP		AGGTA CTCTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTA CTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTA CTCTCTGAAAGC GCAACCCCTGAATCCGGTCCAG GTAGCGAACC GGCTACTTCTGG CTCTGAGACTCCAGGTA CTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTA CTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCCAGGTACCTCTGA AAGCGCAACCCCGGAGTCCGGC CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CAACCTCCACCGAAGAAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA TCCGGCCCCAGGTAGCGAACC GG CAACCTCCGGTTCTGAAACCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCGGAGTCTGGCCCCAGGTACCT CTACTGAACCGTCTGAGGGTAG CGCTCCAGGTA CTTCTACTGAA CCGTCCGAAGGTAGCGCACCAG GTACTTCTACCGAACCGTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG CTCCAGGTACCTCTACCGAACC TTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACCGTCCGAGG GTAGCGCACCAGGTAGCCCAGC AGGTTCTCCTACCTCCACCGAG GAAGGTA CTTCTACCGAACCGT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACTCCTGAG TCTGGCCCCAGGTAGCGAACCTG CTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCTGGTCCAGGTAGCG AACCTGCAACCTCTGGCTCTGA AACCCAGGTACCTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCTGGCCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTA CTTCT GAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG GCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCA ACTT CTACTGAAGAAGGTAGCCC GG AGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTA CTTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAGTCCGGCCCCAGGTAC CTTACCGAACCGTCTGAGGGC AGCGCACCAGGTACCTCTGAAA	

【表 4 2-7】

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHT QKRNIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICLADKEYTNI KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFC GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR VNWIKEKTKLTGK LTRAETGGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS AP		TGATAACAAGGTGGTTTGTCTCC TGTACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAACGTCTGCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCTCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAACGTGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATT ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGGT GGTACCTCTGAAAGCGCAACTC CTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGA ACCTGCTACCTCCGGCTCTGAG ACTCCAGGTACCTCTGAAAGCG CAACCCCGGAATCTGGTCCAGG TAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGCACCAGGTA	

【表 4 2 - 8】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GCCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACCGAAGAAGGTACCTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGCC CAGGTAGCGAACCGGCAACCTC CGGTTCTGAAACCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCAA CTTCTACTGAAGAAGGTACTTC TACCGAACCTTCCGAGGGCAGC GCACCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACCCCTGAGTCCGGCCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCCGGTCCAGGTACTTCTG AAAGCGCTACCCCGGAATCTGG CCCAGGTAGCGAACCGGCTACT TCTGGTTCTGAAACCCAGGTA GCGAACCGGCTACCTCCGGTTC TGAAACTCCAGGTAGCCAGCA GGCTCTCCGACTTCCACTGAGG AAGGTACTTCTACTGAACCTTC CGAAGGCAGCGCACCAGGTACC TCTACTGAACCTTCTGAGGGCA GCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC AACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTC CTGAATCTGGCCCAGGTACTTC TACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA	10
FIX- FXIa- AE864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERIT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHT QKRNIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICADKEYTNIFL	708	TATAATTTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT	709

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	ESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAP		AGGGCAGCGCACACCAGGTA TACCGAACCGTCCGAGGGTAGC GCACCAGGTAGCCCAGCAGGTT CTCCTACCTCCACCGAGGAAGG TACTTCTACCGAACCGTCCGAG GGTAGCGCACACCAGGTACCTCTA CTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTA CTTCTACTGAACCGTCCGAAGG TAGCGCACACCAGGTACTTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGTC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTC TGGCTCTGAGACTCCAGGTACT TCTACCGAACCGTCCGAAGGTA GCGCACACCAGGTACTTCTACTGA ACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCC CGGAATCCGGCCCAGGTACCTC TGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCAGGTAGCCCTGCTGGCT CTCCAACCTCCACCGAAGAAGG TACCTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGCCCAGGTAGCGAAC CGGCAACCTCCGGTTCTGAAAC CCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTA CCTCTACTGAACCGTCTGAGGG TAGCGCTCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTACCGAACCGTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGA ACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCACACCAGGTAGCCC AGCAGGTTCTCCTACCTCCACC GAGGAAGGTACTTCTACCGAAC CGTCCGAGGGTAGCGCACCAAGG TACCTCTGAAAGCGCAACTCCT GAGTCTGGCCCAGGTAGCGAAC CTGCTACCTCCGGCTCTGAGAC TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAATCTGGTCCAGGTA GCGAACCTGCAACCTCTGGCTC TGAAACCCAGGTACCTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCTGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACACCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA	

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA シクレオチド配列	配列 番号
			GGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTAGCCC GGCAGGCTCTCCGACCTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCGGAGTCCGGCCCAGG TACCTCTACCGAACCGTCTGAG GGCAGCGCACCAAGGTACCTCTG AAAGCGCAACTCCTGAGTCTGG CCCAGGTAGCGAACCTGCTACC TCCGGCTCTGAGACTCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCAACCCCGGA ATCTGGTCCAGGTAGCGAACCT GCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCTGAATCTGGCCCAGGTACT TCTACTGAACCGTCCGAGGGCA GCGCACCAAGGTAGCCCTGCTGG CTCTCCAACCTCCACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCC CTGAATCCGGCCCAGGTAGCGA ACCGGCAACCTCCGGTTCTGAA ACCCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACTCCTGAGTCCGGCCCAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCGACT TCCACCGAGGAAGGTAGCCCGG CTGGCTCTCCAACCTTCTACTGA AGAAGGTACTTCTACCGAACCT TCCGAGGGCAGCGCACCAAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACCCCTGA GTCCGGCCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCCGGTC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCGGAATCTGGCCCAGGTAGC GAACCGGCTACTTCTGGTTCTG AAACCCAGGTAGCGAACCGGC TACCTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGA CTTCCACTGAGGAAGGTACTTC TACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCACCAAGGTACCTCTACTGAAC CTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGG TAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGCACCA	
FVII- FXIIa- AE288	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDOLICVN	710	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT	711

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	ENGGCEQYCS DHT GTRKSRCH EGY S LLADGVSCPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL V NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLRHQP V VLTDHVVPCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG TMTRIVGGGGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAP		CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAACGTG GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTGTGTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCAACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGGC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCCGGTGGTGGT ACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG AGTCTGGCCCAGGTAGCGAACC TGCTACCTCCGGCTCTGAGACT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAA	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			CCCCGBAATCTGGTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCAACCTCCA CCGAAGAAGGTACCTCTGAAAG CGCAACCCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCCG GTTCTGAAACCCCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAGTCC GGCCAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCCGACTTCCACCGAGGAAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCAAC TCTACTGAAGAAGGTACTTCTA CCGAACCTTCCGAGGGCAGCGC ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCTGAGTCCGGCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA ATCCGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACCCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTC TGGTTCTGAAACCCCAGGTAGC GAACCGGCTACCTCCGGTTCTG AAACCTCCAGGTAGCCAGCAGG CTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACTGAACCTTCCG AAGGCAGCGCACCAAGGTACCTC TACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCAGGTAGCGAACCTGCAA CCTCTGGCTCTGAAACCCCAGG TACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGC ACCA	
FVII- FXIIa- AE864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCSHT GTKRSCRCHEGYS LLADGVSTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV	712	GCCAACGCGTTCTTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAACGTG GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT	713

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	AQVIIPSTYVPGTT NHDIALLRHLQPV VLTDHVVPLCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFG TMTRIVGGGGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPT		GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCTGC ACCAGCCCGTGGTCCTCACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCTGGTGGTGGT AGCCCCGGCTGGCTCTCCTACCT CTACTGAGGAAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCTGAGTCTGGT CCAGGTACCTCTACTGAACCGT CCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAG CCCAGCAGGCTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGCAGCGCACC AGGTACCTCTACTGAACCTTCT GAGGGCAGCGCTCCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCGGAATC TGGCCAGGTAGCGAACCGGCT ACTTCTGGTTCTGAAACCCAG GTAGCGAACCGGCTACCTCCGG	

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA シクレオチド配列	配列 番号
			GTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTACTTCT GAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG GCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCAACCT CTACTGAAGAAGGTAGCCCGGC AGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAGTCCGGGCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCTGAGGGC AGCGCACCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCTGAGTCTGGCCC AGGTAGCGAACCTGCTACCTCC GGCTCTGAGACTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATC TGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCAG GTACCTCTGAAAGCGCTACTCC TGAATCTGGCCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGT ACCTCTGAAAGCGCAACCCCTG AATCCGGCCCAGGTAGCGAAC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAG CCCGGCTGGCTCTCCGACTTCC ACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCAACCTTCTACTGAAGA AGGTACTTCTACCGAACCTTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCTGAGTC CGGCCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAATCTGGCCCAGGTAGCGAA CCGGCTACTTCTGGTTCTGAAA CCCCAGGTAGCGAACCGGCTAC CTCCGGTTCTGAAACTCCAGGT AGCCCAGCAGGCTCTCCGACTT CCACTGAGGAAGGTACTTCTAC TGAACCTTCCGAAGGCAGCGCA CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCA	
FIX- FXIIa-	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE	714	TATAATTGAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAAGGGAACCTTGA	715

【表 4 2 - 1 7】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
AE288	EAREVFENTERTT		GAGAGAATGTATGGAAGAAAA	
	EFWKQYVDGDQC		GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA	
	ESNPCLNGGSCKD		GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA	
	DINSYECWCPFGF		GAACAACCTGAATTTTGGAAGCA	
	EGKNCELDVTCNI		GTATGTTGATGGAGATCAGTGT	
	KNGRCEQFCKNSA		GAGTCCAATCCATGTTTAAATG	
	DNKVVCSCTEGYR		GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT	
	LAENQKSCEPAVP		TAATTCCTATGAATGTTGGTGTG	
	FPCGRVSVSQTSK		CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA	
	LTRAETVFPDVDY		CTGTGAATTAGATGTAAACATGT	
	VNSTEAETILDNIT		AACATTAAGAATGGCAGATGCG	
	QSTQSFNDFTRVV		AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC	
	GGEDAKPGQFPW		TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC	
	QVVLNGKVD AFC		TGTA CTGAGGGATATCGACTTG	
	GG SIVNEKWIVTA		CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA	
	AHC VETGVKITVV		ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT	
	AGEHNIEETEHE		GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA	
	QKRNVIRIIPHHNY		CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA	
	NAAINKYNHDIAL		GACTGTTTTCTCTGATGTGGACT	
	LELDEPLVLNSYV		ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA	
	TPIC IADKEYTNIFL		AACCATTTTGGATAACATCACT	
	KFGSGYVSWGWR		CAAAGCACCCAATCATTTAATG	
	VFHKGRSALVLQY		ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG	
	LRVPLVDRATCLR		AGAAGATGCCAAACCAGGTCA	
	STKFTIYNMFC A		ATCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA	
	GFHEGGRDSCQGD		ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG	
	SGGPHVTEVEGTS		TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA	
	FLTGIISWGEECAM		AAATGGATTGTAAGTCTGCTGCC	
	KGKYGIYTKVSR Y		ACTGTGTTGAAAGTGGTGTTAA	
	VNWIKEKTKLTGT		AATTACAGTTGTCTGCAGGTGAA	
	MTRIVGGGGTSES		CATAATATTGAGGAGACAGAAC	
	ATPESGPGSEPA TS		ATACAGAGCAAAAGCGAAATG	
	GSETPGTSESATPE		TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC	
	SGPGSEPA TS GSET		AACTACAATGCAGCTATTAATA	
	PGTSESATPESGPG		AGTACAACCATGACATTGCCCT	
	TSTEPSEGSAPGSP		TCTGGAACTGGACGAACCCTTA	
	AGSPTSTEEGTSES		GTGCTAAACAGCTACGTTACAC	
	ATPESGPGSEPA TS		CTATTTGCATTGCTGACAAGGA	
	GSETPGTSESATPE		ATACACGAACATCTTCCTCAAA	
	SGPGSPAGSPTSTE		TTTGGATCTGGCTATGTAAAGTG	
	EGSPAGSPTSTEEG		GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA	
	TSTEPSEGSAPGTS		AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT	
	ESATPESGPGTSES		CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG	
	ATPESGPGTSESAT		TTGACCGAGCCACATGCTTTCG	
	PESGPGSEPA TSGS		ATCTACAAAGTTACCATCTAT	
	ETPGSEPA TSGSET		AACAACATGTTCTGTGCTGGCT	
	PGSPAGSPTSTEEG		TCCATGAAGGAGGTAGAGATTCT	
	TSTEPSEGSAPGTS		ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG	
	TEPSEGSAPGSEPA		ACCCCATGT TACTGAAGTGGAA	
	TSGSETPGTSESAT		GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA	
	PESGPGTSTEPSEG		TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG	
	SAP		TGCAATGAAAGGCAAAATATGGA	
			ATATATACCAAGGTATCCCGGT	

【表 4 2 - 1 9】

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	LTRAETVFPDVDY VNSTEAETILDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVD AFC GGSIVNEKWIVTA AHC VETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRN VIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPIC IADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR Y VNWIKEKTKLTGT MTRIVGGGGSPAG SPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS A PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS A PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESAT		CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TG TACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTCTGCCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTGCGAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAC TGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAAATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATT ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGGT GGTAGCCCCGGCTGGCTCTCCTA CCTCTACTGAGGAAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAGTCT GGTCCAGGTACCTCTACTGAAC CGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGG TAGCCCAGCAGGCTCTCCGACT TCCACTGAGGAAGGTACTTCTA	
				10
				20
				30
				40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	PESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAP		CTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC ACCAGGTACCTCTACTGAACCT TCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACCCCGGA ATCTGGCCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCTGGTTCTGAAACCC CAGGTAGCGAACCGGCTACCTC CGGTTCTGAAACTCCAGGTAGC CCGGCAGGCTCTCCGACCTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTGAAAG CGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCTG AGGGCAGCGCACCCAGGTACTTC TACCGAACCGTCCGAGGGTAGC GCACCAGGTAGCCCAGCAGGTT CTCCTACCTCCACCGAGGAAGG TACTTCTACCGAACCGTCCGAG GGTAGCGCACCCAGGTACCTCTA CTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTA CTTCTACTGAACCGTCCGAAGG TAGCGCACCCAGGTACTTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGTC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTC TGGCTCTGAGACTCCAGGTACT TCTACCGAACCGTCCGAAGGTA GCGCACCCAGGTACTTCTACTGA ACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCC CGGAATCCGGCCCAGGTACCTC TGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCAGGTAGCCCTGCTGGCT CTCCAACCTCCACCGAAGAAGG TACCTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGCCCAGGTAGCGAAC CGGCAACCTCCGGTTCTGAAAC CCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTA CCTCTACTGAACCGTCTGAGGG TAGCGCTCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTACCGAACCGTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGA ACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCACCCAGGTAGCCC AGCAGGTTCTCCTACCTCCACC GAGGAAGGTACTTCTACCGAAC CGTCCGAGGGTAGCGCACCCAGG TACCTCTGAAAGCGCAACTCCT	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			GAGTCTGGCCAGGTAGCGAAC CTGCTACCTCCGGCTCTGAGAC TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAATCTGGTCCAGGTA GCGAACCTGCAACCTCTGGCTC TGAAACCCAGGTACCTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCTGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACCAAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTAGCCC GGCAGGCTCTCCGACCTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCGGAGTCCGGCCCAGG TACCTCTACCGAACCGTCTGAG GGCAGCGCACCAAGGTACCTCTG AAAGCGCAACTCCTGAGTCTGG CCCAGGTAGCGAACCTGCTACC TCCGGCTCTGAGACTCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCAACCCCGGA ATCTGGTCCAGGTAGCGAACCT GCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCTGAATCTGGCCCAGGTACT TCTACTGAACCGTCCGAGGGCA GCGCACCAAGGTAGCCCTGCTGG CTCTCCAACCTCCACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCC CTGAATCCGGCCCAGGTAGCGA ACCGGCAACCTCCGGTTCTGAA ACCCCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACTCCTGAGTCCGGCCCAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCGACT TCCACCGAGGAAGGTAGCCCGG CTGGCTCTCCAACCTTCTACTGA AGAAGGTACTTCTACCGAACCT TCCGAGGGCAGCGCACCAAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACCCCTGA GTCCGGCCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCCGGTC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCGGAATCTGGCCCAGGTAGC GAACCGGCTACTTCTGGTTCTG AAACCCAGGTAGCGAACCGGC TACCTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGA CTTCCACTGAGGAAGGTACTTC TACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCACCAAGGTACCTCTACTGAAC CTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGG	

【表 4 2 - 2 2】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			TAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGCACCA	
FVII- Kallikrei n-AE288	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTRSCRCHEGYS LLADGVSCPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLV NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLHQPV VLT DHV VPLCLPE RTFSERTLAFVRF LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRG WYLTGIVSWGQG CATVGHFVGYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG SPFRSTGGGGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEG	718	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCAACCAACAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCTT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC	719

10

20

30

40

20

30

【表 4 2 - 2 4】

CFXTE ^N 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNAヌクレオチド配列	配列 番号
	SYICFLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTKRSCRCHEGYS LLADGVSCPTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLV NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLI AVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLHQPV VLTDHVVP LCLPE RTFSERTLAFVRF S LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVGYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG SPFRSTGGGGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE		CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTGTGTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCTGGTGGTGGT AGCCCGGCTGGCTCTCTACCT CTACTGAGGAAGGTACTTCTGA	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	GSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAP		AAGCGCTACTCCTGAGTCTGGT CCAGGTACCTCTACTGAACCGT CCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAG CCCAGCAGGCTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGCAGCGCACC AGGTACCTCTACTGAACCTTCT GAGGGCAGCGCTCCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCGGAATC TGGCCCAGGTAGCGAACC GGCT ACTTCTGGTTCTGAAACCCAG GTAGCGAACC GGCTACCTCCGG TTCTGAAACTCCAGGTAGCCCG GCAGGCTCTCCGACCTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCCGGCCAGGT ACCTCTACCGAACC GTCTGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTAC CGAACCGTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTAGCCAGCAGGTTCTC CTACCTCCACCGAGGAAGGTAC TTCTACCGAACC GTCCGAGGGT AGCGCACCAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCAACCCCTGAATCCGGTCCAG GTAGCGAACC GGCTACTTCTGG CTCTGAGACTCCAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCAGGTACCTCTGA AAGCGCAACCCCGGAGTCCGGC CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CAACCTCCACCGAAGAAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA TCCGGCCCAGGTAGCGAACC GG CAACCTCCGGTTCTGAAACCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCGGAGTCTGGCCAGGTACCT CTACTGAACCGTCTGAGGGTAG CGCTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCCGAAGGTAGCGCACCAG GTACTTCTACCGAACC GTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG CTCCAGGTACCTCTACCGAACC TTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACC GTCCGAGG	

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GTAGCGCACCAGGTAGCCCAGC AGGTTCTCCTACCTCCACCGAG GAAGGTACTTCTACCGAACCGT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACTCCTGAG TCTGGCCCAGGTAGCGAACCTG CTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCTGGTCCAGGTAGCG AACCTGCAACCTCTGGCTCTGA AACCCAGGTACCTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCTGGCCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTACTTCT GAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG GCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCAACCT CTACTGAAGAAGGTAGCCCGGC AGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAGTCCGGCCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCTGAGGGC AGCGCACCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCTGAGTCTGGCCC AGGTAGCGAACCTGCTACCTCC GGCTCTGAGACTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATC TGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCAG GTACCTCTGAAAGCGCTACTCC TGAATCTGGCCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGT ACCTCTGAAAGCGCAACCCCTG AATCCGGCCCAGGTAGCGAACCC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAG CCCGGCTGGCTCTCCGACTTCC ACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCAACCTTCTACTGAAGA AGGTACTTCTACCGAACCTTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCTGAGTC CGGCCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAATCTGGCCCAGGTAGCGAA CCGGCTACTTCTGGTTCTGAAA CCCCAGGTAGCGAACCGGCTAC CTCCGGTTCTGAAACTCCAGGT	

【表 4 2 - 2 7】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			AGCCCAGCAGGCTCTCCGACTT CCACTGAGGAAGGTACTTCTAC TGAACCTTCCGAAGGCAGCGCA CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCA	10
FIX- Kallikrei n-AE288	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAETILDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRNIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICLADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFCFA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSRY VNWIKEKTKLTGS PFRSTGGGGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT	722	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACCTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTAAGGAGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTCTGCTGCC ACTGTGTTGAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTGCGAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAACCTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA	723

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スク레オチド配列	配列 番号
	STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS AP		AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCCACCATCTAT AACAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTG ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGAA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGT GGTACCTCTGAAAGCGCAACTC CTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGA ACCTGCTACCTCCGGCTCTGAG ACTCCAGGTACCTCTGAAAGCG CAACCCCGGAATCTGGTCCAGG TAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGCACCAGGTA GCCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACCGAAGAAGGTACCTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGCC CAGGTAGCGAACCGGCAACCTC CGGTTCTGAAACCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTACTTC TACCGAACCTTCCGAGGGCAGC GCACCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACCCCTGAGTCCGGCCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCCGGTCCAGGTACTTCTG AAAGCGCTACCCCGGAATCTGG CCCAGGTAGCGAACCGGCTACT TCTGGTTCTGAAACCCAGGTA GCGAACCGGCTACCTCCGGTTC TGAAACTCCAGGTAGCCAGCA GGCTCTCCGACTTCCACTGAGG AAGGTACTTCTACTGAACCTTC CGAAGGCAGCGCACCAGGTACC TCTACTGAACCTTCTGAGGGCA GCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC AACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTC CTGAATCTGGCCCAGGTACTTC TACTGAACCGTCCGAGGGCAGC	

20

30

40

【表 4 2 - 2 9】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			GCACCA	
FIX- Kallikrein-AE864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEILDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRNIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICLADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFCF GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSRY VNWIKEKTKLTGS PFRSTGGGGSPAG SPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESAT	724	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACCTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTG CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTAAGGAGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTCTGCCCC ACTGTGTTGAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTGCAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAACCTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTG ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA	725

10

20

30

40

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	PESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAP		TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGT0GGT GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTA CCTCTACTGAGGAAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAGTCT GGTCCAGGTACCTCTACTGAAC CGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGG TAGCCCAGCAGGCTCTCCGACT TCCACTGAGGAAGGTACTTCTA CTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC ACCAGGTACCTCTACTGAACCT TCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACCCCGGA ATCTGGCCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCTGGTTCTGAAACCC CAGGTAGCGAACC GGCTACCTC CGGTTCTGAAACTCCAGGTAGC CCGGCAGGCTCTCCGACCTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTGAAAG CGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCTG AGGGCAGCGCACCAAGGTACTTC TACCGAACCGTCCGAGGGTAGC GCACCAGGTAGCC CAGCAGGTT CTCCTACCTCCACCGAGGAAGG TACTTCTACCGAACCGTCCGAG GGTAGCGCACCAAGGTACCTCTA CTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTA CTTCTACTGAACCGTCCGAAGG TAGCGCACCAAGGTACTTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGTC CAGGTAGCGAACC GGCTACTTC TGGCTCTGAGACTCCAGGTACT TCTACCGAACCGTCCGAAGGTA GCGCACCAAGGTACTTCTACTGA ACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCC CGGAATCCGGCCCAGGTACCTC TGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCC CAGGTAGCCCTGCTGGCT CTCCAACCTCCACCGAAGAAGG TACCTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGCCCAGGTAGCGAAC CGGCAACCTCCGGTTCTGAAAC CCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTA CCTCTACTGAACCGTCTGAGGG TAGCGCTCCAGGTACTTCTACT	

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GAACCGTCCGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTACCGAACCGTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGA ACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCACCAGGTAGCCC AGCAGGTTCTCCTACCTCCACC GAGGAAGGTACTTCTACCGAAC CGTCCGAGGGTAGCGCACCAGG TACCTCTGAAAGCGCAACTCCT GAGTCTGGCCCAGGTAGCGAAC CTGCTACCTCCGGCTCTGAGAC TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAATCTGGTCCAGGTA GCGAACCTGCAACCTCTGGCTC TGAAACCCAGGTACCTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCTGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTAGCCC GGCAGGCTCTCCGACCTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCGGAGTCCGGCCCAGG TACCTCTACCGAACCGTCTGAG GGCAGCGCACCAGGTACCTCTG AAAGCGCAACTCCTGAGTCTGG CCCAGGTAGCGAACCTGCTACC TCCGGCTCTGAGACTCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCAACCCCGGA ATCTGGTCCAGGTAGCGAACCT GCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCTGAATCTGGCCCAGGTACT TCTACTGAACCGTCCGAGGGCA GCGCACCAGGTAGCCCTGCTGG CTCTCCAACCTCCACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCC CTGAATCCGGCCCAGGTAGCGA ACCGGCAACCTCCGGTTCTGAA ACCCAGGTACTTCTGAAAGCG CTACTCCTGAGTCCGGCCCAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCGACT TCCACCGAGGAAGGTAGCCCGG CTGGCTCTCCAACCTTCTACTGA AGAAGGTACTTCTACCGAACCT TCCGAGGGCAGCGCACCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACCCCTGA	

40

【表 4 2 - 3 2】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			GTCCGGCCCCAGGTACTTCTGAA AGCGTACTCCTGAATCCGGTC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTAC CCCGGAATCTGGCCCAGGTAGC GAACCGGCTACTTCTGGTTCTG AAACCCAGGTAGCGAACC GGC TACCTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGA CTTCCACTGAGGAAGGTACTTC TACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCACCAGGTACCTCTACTGAAC CTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGG TAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGCACCA	10
FVII- FIIa- AE288	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTRSCRCHEGYS LLADGV SCTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLV NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALLRLHQPV VLT DHV VPLCLPE RTFSERTLAFVRF S LVSGWGQLLD RG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVGYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG LTPRSLLVGGTSES ATPESGPGSE PATS GSETPGTSESATPE SGPGSE PATSGSET PGTSESATPESGPG	726	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAACGTG GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGA AAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCAACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCAATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG	727
				20
				30
				40

【表 4 2 - 3 3】

40

【表 4 2 - 3 4】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			TACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCAGGTAGCGAACCTGCAA CCTCTGGCTCTGAAACCCCAGG TACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGC ACCA	
FVII- FIIa- AE864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTRKSCRCHEGYS LLADGVSTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL V NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLI AVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLHQPV VLTDHVVPCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFGVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG LTPRSLLVGGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATP	728	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC AGTGATGGGGACCAAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCTCTACTGA CCATGTGGTGGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC	729

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	ESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAP		AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCTCCTGCG AGCCCCATTTCCCGGTGGTGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCTACCT CTACTGAGGAAGGTACTTCTGA AAGCGCTACTCCTGAGTCTGGT CCAGGTACCTCTACTGAACCGT CCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAG CCCAGCAGGCTCTCCGACTTCC ACTGAGGAAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGCAGCGCACC AGGTACCTCTACTGAACCTTCT GAGGGCAGCGCTCCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCGGAATC TGGCCCAGGTAGCGAACCGGCT ACTTCTGGTTCTGAAACCCAG GTAGCGAACC GGCTACCTCCGG TTCTGAAACTCCAGGTAGCCCG GCAGGCTCTCCGACCTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAAAGCGC AACCCCGGAGTCCGGCCCAGGT ACCTCTACCGAACC GTCTGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTAC CGAACCGTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTAGCCAGCAGGTTCTC CTACCTCCACCGAGGAAGGTAC TTCTACCGAACC GTCCGAGGGT AGCGCACCAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCAACCCCTGAATCCGGTCCAG GTAGCGAACC GGCTACTTCTGG CTCTGAGACTCCAGGTACTTCT ACCGAACC GTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCAGGTACCTCTGA AAGCGCAACCCCGGAGTCCGGC CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CAACCTCCACCGAAGAAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA TCCGGCCCAGGTAGCGAACC GG	

20

30

40

CFX TEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			CAACCTCCGGTTCTGAAACCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCGGAGTCTGGCCCAGGTACCT CTACTGAACCGTCTGAGGGTAG CGCTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCCGAAGGTAGCGCACCAG GTACTTCTACCGAACCGTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG CTCCAGGTACCTCTACCGAACC TTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACCGTCCGAGG GTAGCGCACCAGGTAGCCCAGC AGGTTCCTCTACCTCCACCAG GAAGGTACTTCTACCGAACCGT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACTCCTGAG TCTGGCCCAGGTAGCGAACCTG CTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCTGGTCCAGGTAGCG AACCTGCAACCTCTGGCTCTGA AACCCCAGGTACCTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCTGGCCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTACTTCT GAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG GCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCAACCT CTACTGAAGAAGGTAGCCCGGC AGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCC GGAGTCCGGCCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCTGAGGGC AGCGCACCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCTGAGTCTGGCCC AGGTAGCGAACCTGCTACCTCC GGCTCTGAGACTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATC TGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCCAG GTACCTCTGAAAGCGCTACTCC TGAATCTGGCCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGT ACCTCTGAAAGCGCAACCCCTG AATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAG CCCGGCTGGCTCTCCGACTTCC	

20

30

40

【表 4 2 - 3 7】

CFX TEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			ACCGAGGAAGGTAGCCCCGGCTG GCTCTCCAAC TTCTACTGAAGA AGGTACTTCTACCGAACCTTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCTGAGTC CGGCCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAATCTGGCCCAGGTAGCGAA CCGGCTACTTCTGGTTCTGAAA CCCCAGGTAGCGAACC GGCTAC CTCCGGTTCTGAAACTCCAGGT AGCCCAGCAGGCTCTCCGACTT CCACTGAGGAAGGTACTTCTAC TGAACCTTCCGAAGGCAGCGCA CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCA	
FIX- FIIa- AE288	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRN VIRIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPIC IADKEYTNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR Y	730	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACA ACTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TG TACTGAGGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTA ACTGCTGCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA	731

CFX TEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA クレオチド配列	配列 番号
	VNWIKEKTKLTGL TPRSLLVGGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS AP		AATTACAGTTGTCTGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAGTGGACGAACCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAAACATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTC ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGT GGTACCTCTGAAAGCGCAACTC CTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGA ACCTGCTACCTCCGGCTCTGAG ACTCCAGGTACCTCTGAAAGCG CAACCCCGGAATCTGGTCCAGG TAGCGAACCTGCAACCTCTGGC TCTGAAACCCAGGTACCTCTG AAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGACACAGGTA GCCCTGCTGGCTCTCCAACCTC CACCGAAGAAGGTACCTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGCC CAGGTAGCGAACCGGCAACCTC CGGTTCTGAAACCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTACTTC TACCGAACCTTCCGAGGGCAGC GCACCGGTACTTCTGAAAGCG CTACCCCTGAGTCCGGCCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCCGGTCCAGGTACTTCTG AAAGCGCTACCCCGGAATCTGG CCCAGGTAGCGAACCGGCTACT	

40

【表 4 2 - 3 9】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			TCTGGTTCTGAAACCCCAGGTA GCGAACCGGCTACCTCCGGTTC TGAAACTCCAGGTAGCCCAGCA GGCTCTCCGACTTCCACTGAGG AAGGTACTTCTACTGAACCTTC CGAAGGCAGCGCACCAGGTACC TCTACTGAACCTTCTGAGGGCA GCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC AACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTC CTGAATCTGGCCCAGGTACTTC TACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA	10
FIX- FIIa- AE864	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE QKRNVIIPHHNY NAAINKYNHDIAL LELDEPLVLNSYV TPICIAADKEYTNIFL KFGSGYVSWGWR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNMFCFA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSRV VNWIKEKTKLTGL TPRSLLVGGSPAGS PTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSG	732	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTCAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTG CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTAAGTGAAGGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTAAGTGTGCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCGAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAAAGCGAAATG TGATTCTGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGAAGTGGACGAACCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA	733

10

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	TPESGPGTSTEPSE GSAP		GGTACTTCTGAAAGCGCAACCC CGGAATCCGGCCCAGGTACCTC TGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCAGGTAGCCCTGCTGGCT CTCCAACCTCCACCGAAGAAGG TACCTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGCCCAGGTAGCGAAC CGGCAACCTCCGGTTCTGAAAC CCCAGGTACCTCTGAAAGCGCT ACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTA CCTCTACTGAACCGTCTGAGGG TAGCGCTCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTACCGAACCGTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCA GCGCTCCAGGTACCTCTACCGA ACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCACCAAGGTAGCCC AGCAGGTTCTCCTACCTCCACC GAGGAAGGTACTTCTACCGAAC CGTCCGAGGGTAGCGCACCAAG TACCTCTGAAAGCGCAACTCCT GAGTCTGGCCCAGGTAGCGAAC CTGCTACCTCCGGCTCTGAGAC TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAATCTGGTCCAGGTA GCGAACCTGCAACCTCTGGCTC TGAAACCCAGGTACCTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCTGGCC CAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACCAAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGG CTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAA CTTCTACTGAAGAAGGTAGCCC GGCAGGCTCTCCGACCTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCG CAACCCCGGAGTCCGGCCCAGG TACCTCTACCGAACCGTCTGAG GGCAGCGCACCAAGGTACCTCTG AAAGCGCAACTCCTGAGTCTGG CCCAGGTAGCGAACCTGCTACC TCCGGCTCTGAGACTCCAGGTA CCTCTGAAAGCGCAACCCCGGA ATCTGGTCCAGGTAGCGAACCT GCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCTGAATCTGGCCCAGGTACT TCTACTGAACCGTCCGAGGGCA GCGCACCAAGGTAGCCCTGCTGG	

40

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
	VGDSPNITEYMFCA AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVGYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG APLGLRLRGGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAP		GTTGTGTGGGGGGACCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCCGGGCACCACCAACCAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC ACCAGCCCGTGGTCCTCACTGA CCATGTGGTGCCCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCTCTGAGA GGACGCTGGCCTTCGTGCGCTT CTCATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGGACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCATGGTCCT CAACGTGCCCCGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAGCAGTCAC GGAAGGTGGGAGACTCCCCAA ATATCACGGAGTACATGTTCTG TGCCGGCTACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAGGGGGAC AGTGGAGGCCCACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGTGGTACCT GACGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACCGTGGGCC ACTTTGGGGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAGTGGCTG CAAAAGCTCATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCCTCCTGCG AGCCCCATTTCCCGGTGGGTGGT ACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG AGTCTGGCCCAGGTAGCGAACC TGCTACCTCCGGCTCTGAGACT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAATCTGGTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCAACCTCCA CCGAAGAAGGTACCTCTGAAAG CGCAACCCCTGAATCCGGCCCCA GGTAGCGAACC GGCAACCTCCG GTTCTGAAACCCCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAGTCC GGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCCGACTTCCACCAGGAAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCAAC TCTACTGAAGAAGGTACTTCTA CCGAACCTTCCGAGGGCAGCGC	

40

【表 4 2 - 4 4】

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			ACCAGGTA CTTCTGAAAGCGCT ACCCCTGAGTCCGGCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA ATCCGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACCCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACC GGCTACTTC TGGTTCTGAAACCC CAGGTAGC GAACCGGCTACCTCCGGTTCTG AAACTCCAGGTAGCCCAGCAGG CTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACTGAACCTTCCG AAGGCAGCGCACCAGGTACCTC TACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCAGGTAGCGAACCTGCAA CCTCTGGCTCTGAAACCC CAGG TACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGC ACCA	
FVII- MMP- 17- AE864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSCKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTKRSCRCHEGYS LLADGV SCTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLV NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALLRLHQPV VLTDHV VPLCLPE RTFSERTLAFVRF S LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRG T WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG APLGLRLRGGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSE	736	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGA ACTGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG CAAACCCCAAGGCCGAATTGTG GGGGGCAAGGTGTGCCCCAAA GGGGAGTGTCCATGGCAGGTCC TGTTGTTGGTGAATGGAGCTCA GTTGTGTGGGGGGACCTGATC AACACCATCTGGGTGGTCTCCG CGGCCCACTGTTTCGACAAAAT CAAGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGGGCGAGCACGACC TCAGCGAGCACGACGGGGATG AGCAGAGCCGGCGGGTGGCGC AGGTCATCATCCCCAGCACGTA CGTCCCGGGCACCAACCAACAC GACATCGCGCTGCTCCGCCTGC	737

10

20

30

40

【表 4 2 - 4 5】

[illegible]

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	SGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAP		GTAGCGAACCGGCTACTTCTGG CTCTGAGACTCCAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCAGGTACCTCTGA AAGCGCAACCCCGGAGTCCGGC CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CAACCTCCACCGAAGAAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA TCCGGCCCAGGTAGCGAACCGG CAACCTCCGGTTCTGAAACCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCGGAGTCTGGCCCAGGTACCT CTACTGAACCGTCTGAGGGTAG CGCTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCCGAAGGTAGCGCACCAG GTACTTCTACCGAACCGTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG CTCCAGGTACCTCTACCGAACC TTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACCGTCCGAGG GTAGCGCACCAGGTAGCCCAGC AGGTCTCCTACCTCCACCGAG GAAGGTACTTCTACCGAACCGT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACTCCTGAG TCTGGCCCAGGTAGCGAACCTG CTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCTGGTCCAGGTAGCG AACCTGCAACCTCTGGCTCTGA AACCCAGGTACCTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCTGGCCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTACTTCT GAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG GCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCGGCTGGCTCTCCAACCT CTACTGAAGAAGGTAGCCCGGC AGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAGTCCGGCCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCTGAGGGC AGCGCACCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCTGAGTCTGGCCC AGGTAGCGAACCTGCTACCTCC GGCTCTGAGACTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATC TGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA	

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA スクレオチド配列	配列 番号
			ACCTCTGGCTCTGAAACCCAG GTACCTCTGAAAGCGCTACTCC TGAATCTGGCCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGT ACCTCTGAAAGCGCAACCCCTG AATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAG CCCGGCTGGCTCTCCGACTTCC ACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTG GCTCTCCAACCTTCTACTGAAGA AGGTACTTCTACCGAACCTTCC GAGGGCAGCGCACCCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCTGAGTC CGGCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAATCTGGCCCAGGTAGCGAA CCGGCTACTTCTGGTTCTGAAA CCCCAGGTAGCGAACCGGCTAC CTCCGGTTCTGAAACTCCAGGT AGCCCAGCAGGCTCTCCGACTT CCACTGAGGAAGGTACTTCTAC TGAACCTTCCGAAGGCAGCGCA CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCA	
FIX- MMP- 17-FXIa	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT QSTQSFNDFTRVV GGEDAKPGQFPW QVVLNGKVDAFC GGSIVNEKWIVTA AHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHE	738	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGAAAACACTGAAA GAACAACCTGAATTTTGGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC TGATAACAAGGTGGTTTGCTCC TGTAAGGAGATATCGACTTG CAGAAAACCAGAAGTCCTGTGA ACCAGCAGTGCCATTTCATGT GGAAGAGTTTCTGTTTCACAAA	739

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	QKRN VIRIIPH HNY NAAINKYN HDIAL LELDEPLV LNSYV TPIC IADKEY TNIFL KFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLR STKFTIYNNMFCA GFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAM KGKYGIYTKVSR Y VNWIKEKTKLTGA PLGLRLRGKLTRA ET		CTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA GACTGTTTTTCCTGATGTGGACT ATGTAAATTCTACTGAAGCTGA AACCATTTTGGATAACATCACT CAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGGGTTGTTGGTGG AGAAGATGCCAAACCAGGTCA ATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGA ATGGTAAAGTTGATGCATTCTG TGGAGGCTCTATCGTTAATGAA AAATGGATTGTA ACTGCTGCCC ACTGTGTTGAAACTGGTGTTAA AATTACAGTTGTCGCAGGTGAA CATAATATTGAGGAGACAGAAC ATACAGAGCAA AAGCGAAATG TGATTCGAATTATTCCTCACCAC AACTACAATGCAGCTATTAATA AGTACAACCATGACATTGCCCT TCTGGA ACTGGACGAACCCTTA GTGCTAAACAGCTACGTTACAC CTATTTGCATTGCTGACAAGGA ATACACGAACATCTTCCTCAA TTTGGATCTGGCTATGTAAGTG GCTGGGGAAGAGTCTTCACAA AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT CAGTACCTTAGAGTTCCACTTG TTGACCGAGCCACATGTCTTCG ATCTACAAAGTTCACCATCTAT AACAA CATGTTCTGTGCTGGCT TCCATGAAGGAGGTAGAGATTC ATGTCAAGGAGATAGTGGGGG ACCCCATGTTACTGAAGTGGA GGGACCAGTTTCTTAACTGGAA TTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG TGCAATGAAAGGCAAATATGGA ATATATACCAAGGTATCCCGGT ATGTCAACTGGATTAAGGAAAA AACAAAGCTCACTGGGGTGGT 0	
FIX- MMP- 17- Elastase	YNSGKLEEFVQGN LERECMEEKCSFE EAREVFENTERTT EFWKQYVDGDQC ESNPCLNGGSCKD DINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNI KNGRCEQFCKNSA DNKVVCSCTEGYR LAENQKSCEPAVP FPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPDVDY VNSTEAEITLDNIT OSTOSFNDFTRVV	740	TATAATTCAGGTAAATTGGAAG AGTTTGTTC AAGGGAACCTTGA GAGAGAATGTATGGAAGAAAA GTGTAGTTTTTGAAGAAGCACGA GAAGTTTTTGA AAACACTGAAA GAACA ACTGAATTTTGAAGCA GTATGTTGATGGAGATCAGTGT GAGTCCAATCCATGTTTAAATG GCGGCAGTTGCAAGGATGACAT TAATTCCTATGAATGTTGGTGTC CCTTTGGATTTGAAGGAAAGAA CTGTGAATTAGATGTAACATGT AACATTAAGAATGGCAGATGCG AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGC	741

20

30

40

CFX TEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA クレオチド配列	配列 番号
	YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLV NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLIAVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLRHQP VLTLDHVVPCLPE RTFSERTLAFVRFS LVSGWGQLLDRG ATALELMVLNVPR LMTQDCLQQSRK VGDSPNITEYMFC AGYSDGSKDSCKG DSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQG CATVGHFVYTRV SQYIEWLQKLMRS EPRPGVLLRAPFPG KLTRAETVFPD VDYVNSTEAETILD NITQSTQSFNDFTR VVGGE GGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSP TSTEEGSTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSA		TGCCTTCGAGGGCCGGA ACTGTGAGACGCACAAG GATGACCAGCTGATCT GTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGT ACTGTCAGTGACCAC ACGGGCACCAAGCGC TCCTGTTCGGTGCCAC GAGGGGTACTCTCTG CTGTCGGCAGACGGG GTGTCCTGCACACCC ACAGTTGAAATATCC ATGTGGAAAAATACCT ATTCTAGAAAAAAGAA ATGCCAGCAAACCCCA AAGGCCGAATTGTGG GGGGGCAAGGTGTGCC CCCAAGGGGAGTGTC CATGGCAGGTCCGTG TTGTTGGTGAATGGAG CTCATGTTGTGTTGGG GGGACCTGATCAACAC CATCTGGGTGGTCTCC GCGCCACTGTTTCGAC AAAATCAAGAACTGG AGGAACCTGATCGCGG TGCTGGGCGAGCACGAC CAGCTCAGCGAGCACG ACGGGGATGAGCAGAG CCGGCGGGGTGGCGC GAGTCATCATCCCAGC ACGTAAGTCTCCGGGC ACCACCAACCACGAC ATCGCGCTGCTCCGCT GCACTGACCCCGTGGT CCTCACTGACCATGTG GTGCCCTCTGCCTG CCCGAACGGACGTTCT CTGAGAGGACGCTGG CCTTCGTGCGCTTCT CATTGGTCAGCGGCT TGGGGCAGCTGCTGG ACCGTGGCGCCA CGGCCCTGGAGCTCAT GGTCTCAACCGTGCCC CGGCTGATGACC CAGGACTGCCTGCAG CAGTCACGGAAGGTGG GAGACTCCCCA AATATCACGGAGTAC ATGTTCTGTGCCGGCT ACTCGGATGGCAGC AAGGACTCCTGCAAG GGGGACAGTGAGGCC CACATGCCACCC ACTACCGGGGCACGT GGTACCTGACGGGC ATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCGCAACC GTGGGGCACTTTTGG GGTGTACACCAGGGT CTCCCAGTACATCGAG TTGGCTGCAAAAGCT CATGCGCTCAGAGC CACGCCCAGGAGTCT CCTGCGAGCCCCATT TCCCGGTGGTGGT ACCTCTGAAAGCGCA ACTCCTGAGTCTGGC CCAGGTAGCGAACC TGCTACCTCCGGCTC TGAGACTCCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAA CCCCGGAATCTGGT CCAGGTAGCGAACCT TGCAACCTCTGGCT CTGAAACCCCAAGGT ACCTCTGAAA	

40

【表 4 2 - 5 1】

CFX TEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA クレオチド配列	配列 番号
			GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTAGC CCTGCTGGCTCTCCAACCTCCA CCGAAGAAGGTACCTCTGAAAG CGCAACCCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCCG GTTCTGAAACCCAGGTACTTC TGAAAGCGCTACTCCTGAGTCC GGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCT CTCCGACTTCCACCGAGGAAGG TAGCCCGGCTGGCTCTCCAAC TCTACTGAAGAAGGTACTTCTA CCGAACCTTCCGAGGGCAGCGC ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCTGAGTCCGGCCCAGGTA CTTCTGAAAGCGCTACTCCTGA ATCCGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACCCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTC TGGTTCTGAAACCCAGGTAGC GAACCGGCTACCTCCGGTTCTG AAACCTCCAGGTAGCCAGCAGG CTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACTGAACCTTCCG AAGGCAGCGCACCAGGTACCTC TACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCAGGTAGCGAACCTGCAA CCTCTGGCTCTGAAACCCAGG TACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGC ACCA	
FVII-FIX AP- AE864	ANAFLEELRPGSLE RECKEEQCSFEEA REIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASS PCQNGGSKDQLQ SYICFCLPAFEGRN CETHKDDQLICVN ENGGCEQYCS DHT GTKRSCRCHEGYS LLADGV SCTPTVE YPCGKIPILEKRNA SKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL V NGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIK NWRNLI AVLGEHD LSEHDGDEQSRRV AQVIIPSTYVPGTT NHDIALRLHQPV VLTDHV VPLCLPE	744	GCCAACGCGTTCCTGGAGGAGC TACGGCCGGGCTCCCTGGAGAG GGAGTGCAAGGAGGAGCAGTG CTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAG ATCTTCAAGGACGCGGAGAGGA CGAAGCTGTTCTGGATTTCTTAC AGTGATGGGGACCAGTGTGCCT CAAGTCCATGCCAGAATGGGGG CTCCTGCAAGGACCAGCTCCAG TCCTATATCTGCTTCTGCCTCCC TGCCTTCGAGGGCCGGAAC TGT GAGACGCACAAGGATGACCAG CTGATCTGTGTGAACGAGAACG GCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG TGACCACACGGGCACCAAGCGC TCCTGTCTGGTGCCACGAGGGGT ACTCTCTGCTGGCAGACGGGGT GTCCTGCACACCCACAGTTGAA TATCCATGTGGAAAAATACCTA TTCTAGAAAAAAGAAATGCCAG	745

CFX1EN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
	AGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAP		AACCCCGGAGTCCGGCCAGGT ACCTCTACCGAACCCTCTGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTAC CGAACCGTCCGAGGGTAGCGCA CCAGGTAGCCCAGCAGGTTCTC CTACCTCCACCGAGGAAGGTAC TTCTACCGAACCCTCCGAGGGT AGCGCACCAGGTACCTCTACTG AACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTT CTACTGAACCGTCCGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCAACCCCTGAATCCGGTCCAG GTAGCGAACC GGCTACTTCTGG CTCTGAGACTCCAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACTGAACC GTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCAGGTACCTCTGA AAGCGCAACCCCGGAGTCCGGC CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CAACCTCCACCGAAGAAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA TCCGGCCCCAGGTAGCGAACC GG CAACCTCCGGTTCTGAAACCCC AGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCGGAGTCTGGCCCAGGTACCT CTACTGAACCGTCTGAGGGTAG CGCTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCCGAAGGTAGCGCACCAG GTACTTCTACCGAACCGTCCGA AGGCAGCGCTCCAGGTACCTCT ACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG CTCCAGGTACCTCTACCGAACC TTCTGAAGGTAGCGCACCAGGT ACTTCTACCGAACCGTCCGAGG GTAGCGCACCAGGTAGCCCAGC AGGTTCTCCTACCTCCACCGAG GAAGGTACTTCTACCGAACCGT CCGAGGGTAGCGCACCAGGTAC CTCTGAAAGCGCAACTCCTGAG TCTGGCCCCAGGTAGCGAACCTG CTACCTCCGGCTCTGAGACTCC AGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCTGGTCCAGGTAGCG AACCTGCAACCTCTGGCTCTGA AACCCCGAGGTACCTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCTGGCCCAG GTACTTCTACTGAACCGTCCGA GGGCAGCGCACCAGGTACTTCT GAAAGCGCTACTCCTGAGTCCG	

20

30

40

CFXTEN 名*	アミノ酸配列	配列 番号	DNA ヌクレオチド配列	配列 番号
			GCCCAGGTAGCCCCGGCTGGCTC TCCGACTTCCACCGAGGAAGGT AGCCCCGGCTGGCTCTCCAATT CTACTGAAGAAGGTAGCCCCGGC AGGCTCTCCGACCTCTACTGAG GAAGGTACTTCTGAAAGCGCAA CCCCCGAGTCCGGCCCAGGTAC CTCTACCGAACCGTCTGAGGGC AGCGCACCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACTCCTGAGTCTGGCCC AGGTAGCGAACCTGCTACCTCC GGCTCTGAGACTCCAGGTACCT CTGAAAGCGCAACCCCGGAATC TGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCAG GTACCTCTGAAAGCGCTACTCC TGAATCTGGCCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTAGCCCTGCTGGCTC TCCAACCTCCACCGAAGAAGGT ACCTCTGAAAGCGCAACCCCTG AATCCGGCCCAGGTAGCGAACC GGCAACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA CTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAG CCCGGCTGGCTCTCCGACTTCC ACCGAGGAAGGTAGCCCCGGCTG GCTCTCCAATTCTACTGAAGA AGGTACTTCTACCGAACCTTCC GAGGGCAGCGCACCAGGTACTT CTGAAAGCGCTACCCCTGAGTC CGGCCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCTGAATCCGGTCCAG GTACTTCTGAAAGCGCTACCCC GGAATCTGGCCCAGGTAGCGAA CCGGCTACTTCTGGTTCTGAAA CCCCAGGTAGCGAACCGGCTAC CTCCGGTTCTGAAACTCCAGGT AGCCCAGCAGGCTCTCCGACTT CCACTGAGGAAGGTACTTCTAC TGAACCTTCCGAAGGCAGCGCA CCAGGTACCTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAG CGAACCTGCAACCTCTGGCTCT GAAACCCCAGGTACCTCTGAAA GCGCTACTCCTGAATCTGGCCC AGGTACTTCTACTGAACCGTCC GAGGGCAGCGCACCA	

* 配列名は、C F、開裂配列、およびX T E N成分のN A末端からC末端への設定を反映する。

【 0 5 3 8 】

【表 4 3 - 1】

表 4 3 : FIX AP 配列、開裂配列、および XTEN**を組み込んでいる例示的な FVII バリエーション

FVII コンストラクト名*	アミノ酸配列	配列番号
FVII(Gla-EGF2)-(AP)-FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCSHTGTGRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVCCKGECWQVLLLVNGAQLCGGGRTINTIWWVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNGS KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEGESKPQ GRHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQ LLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCAGYS DGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFVG YTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP	746
FVII(Gla-EGF2)-(AP)-FVII(Pro)-AE288	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCSHTGTGRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVCCKGECWQVLLLVNGAQLCGGGRTINTIWWVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNGS KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEGESKPQ GRHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQ LLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCAGYS DGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFVG YTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP GGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP	747
FVII(Gla-EGF2)-(AP)-FVII(Pro)-AE864	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCSHTGTGRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVCCKGECWQVLLLVNGAQLCGGGRTINTIWWVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNGS KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEGESKPQ GRHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQ LLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCAGYS DGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFVG YTR VSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP GGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT	748

10

20

30

40

【表 4 3 - 2】

FVII コンスト ラクト名*	アミノ酸配列	配列 番号
	GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	
FVII(Gla- EGF2)-(K142- V149)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGGRTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNG KLTRAETV GSKPQGRHDIALLR LHQP VVLTDHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSP NITEYMF CAGYSDGSKDSC KGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGC ATVGHFVGYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP	749
FVII(Gla- EGF2)- (K142-V149)- FVII(Pro)- AE288	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGGRTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNG KLTRAETV GSKPQGRHDIALLR LHQP VVLTDHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSP NITEYMF CAGYSDGSKDSC KGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGC ATVGHFVGYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP PGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	750
FVII(Gla- EGF2)- (K142-V149)- FVII(Pro)- AE864	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGGRTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNG KLTRAETV GSKPQGRHDIALLR LHQP VVLTDHV VPLCLPERTFSERTLA FVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSP NITEYMF CAGYSDGSKDSC KGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGC ATVGHFVGYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP PGGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	751
FVII(Gla-	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ	752

【表 4 3 - 3】

FVII コンスト ラクト名*	アミノ酸配列	配列 番号
EGF2)-(D177- G184)- FVII(Pro)	CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGGRTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNG DFTRVVGGGSKPQGRHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTL AFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG D SPNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQ GCATVGHF G VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP	10
FVII(Gla- EGF2)-(D177- G184)- FVII(Pro)- AE288	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGGRTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNG DFTRVVGGGSKPQGRHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTL AFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG D SPNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQ GCATVGHF G VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP GGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	753 20
FVII(Gla- EGF2)-(D177- G184)- FVII(Pro)- AE864	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNA SKPQIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGGRTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNG DFTRVVGGGSKPQGRHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTL AFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG D SPNITEYMF CAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQ GCATVGHF G VYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP GGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGT TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	754 30 40
FVII(Gla- EGF2)-(D177- T179)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNA SKDFTRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH	755

【表 4 3 - 4】

FVII コンスト ラクト名*	アミノ酸配列	配列 番号	
	CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFCAGYSDGSK DSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYI EWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP		
FVII(Gla-EGF2)-(D177-T179)- FVII(Pro)- KLTRAET- AE288 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKDFTRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFCAGYSDGSK DSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYI EWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAP	756	10
FVII(Gla-EGF2)-(D177-T179)- FVII(Pro)- KLTRAET- AE864 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKDFTRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFCAGYSDGSK DSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYI EWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP PGPEGPSKLTRAETGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSSS	757	30
FVII(Gla-EGF2)-(K142-T179)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRKL TRAETVFPD VDYVNSTEAE TILDNITQSTQSFNDFTRIVGGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEH DLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQ	758	40

【表 4 3 - 5】

FVII コンストラクト名*	アミノ酸配列	配列番号
	DCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLR APFP	
FVII(Gla-EGF2)-(K142-T179)- FVII(Pro)- KLTRAET-AE288 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQC\$FEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGG\$CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCE\$THKDDQLICVNENGG CEQYCS\$DHTG\$TKR\$SRCHEGY\$LLADGV\$CTPTVEYPCGKIPILEKRKL TRAETVFPD\$VDYVN\$STEAE\$TILDNITQ\$TQSFNDFTRIVGGKVC\$PKGEC PWQV\$LLLVN\$GAQLC\$GGTLINTIWV\$V\$AAHCFDKIKNWRNLI\$AVLGEH DLSEHDGDEQ\$SRRVAQ\$VIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQP\$VVLTDHVVP LCLPERTF\$ERTLAFVRF\$SLV\$SGWGQL\$LD\$RGATALELMVLNVPRLMTQ DCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLR APFPGPEGPSKLTRAETGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS\$TEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS\$TEEGSPA GSPTS\$TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS\$TEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	759
FVII(Gla-EGF2)-(K142-T179)- FVII(Pro)- KLTRAET-AE864 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQC\$FEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGG\$CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCE\$THKDDQLICVNENGG CEQYCS\$DHTG\$TKR\$SRCHEGY\$LLADGV\$CTPTVEYPCGKIPILEKRKL TRAETVFPD\$VDYVN\$STEAE\$TILDNITQ\$TQSFNDFTRIVGGKVC\$PKGEC PWQV\$LLLVN\$GAQLC\$GGTLINTIWV\$V\$AAHCFDKIKNWRNLI\$AVLGEH DLSEHDGDEQ\$SRRVAQ\$VIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQP\$VVLTDHVVP LCLPERTF\$ERTLAFVRF\$SLV\$SGWGQL\$LD\$RGATALELMVLNVPRLMTQ DCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLR APFPGPEGPSKLTRAETGSPGSPAGSPTS\$TEEGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGSPAGSPTS\$TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS\$TEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS\$TEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT\$S GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTS\$TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS\$TEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS\$TEEGSPAGSPTS\$TEEG SPAGSPTS\$TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTS\$TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTS\$TEEGSPAGSPTS\$TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTS\$TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSSS	760
FVII(Gla-EGF2)-(R134-T179)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQC\$FEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGG\$CKDQLQSYICFCLPAFEGRNCE\$THKDDQLICVNENGG CEQYCS\$DHTG\$TKR\$SRCHEGY\$LLADGV\$CTPTVPFPCGRVSV\$QTSK LTRAETVFPD\$VDYVN\$STEAE\$TILDNITQ\$TQSFNDFTRIVGGKVC\$PKGE CPWQV\$LLLVN\$GAQLC\$GGTLINTIWV\$V\$AAHCFDKIKNWRNLI\$AVLGE HDLSEHDGDEQ\$SRRVAQ\$VIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQP\$VVLTDHV VPLCLPERTF\$ERTLAFVRF\$SLV\$SGWGQL\$LD\$RGATALELMVLNVPRLM TQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR	761

【表 4 3 - 6】

FVII コンスト ラクト名*	アミノ酸配列	配列 番号
	GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVL LRAPFP	
FVII(Gla- EGF2)-(R134- T179)- FVII(Pro)- KLTRAET- AE288 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTG TKRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVPFPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPD VDYVN STEAETIL DNITQSTQSFNDFTRIVGGKVC PKGE CPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGE HDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLM TQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSKDSC KGDSGGPHATHYR GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVL LRAPFP GPEGPSKLTRAETGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS A P	762
FVII(Gla- EGF2)-(R134- T179)- FVII(Pro)- KLTRAET- AE864 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTG TKRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVPFPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPD VDYVN STEAETIL DNITQSTQSFNDFTRIVGGKVC PKGE CPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGE HDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLM TQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSKDSC KGDSGGPHATHYR GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVL LRAPFP GPEGPSKLTRAETGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSSS	763
FVII(Gla- EGF2)-(D177- V181)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTG TKRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKDFTRVVGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHD IALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYSDGSK DSC KGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYI	764

10

20

30

40

【表 4 3 - 7】

FVII コンスト ラクト名*	アミノ酸配列	配列 番号
	EWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP	
FVII(Gla-EGF2)-(D177-T179)- FVII(Pro)- KLTRAET- AE288 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKDFTRVVGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNPITEYMFCAGYSDGSK DCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYI EWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAP	765
FVII(Gla-EGF2)-(D177-T179)- FVII(Pro)- KLTRAET- AE864 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTPTVEYPCGKIPILEKRNA SKDFTRVVGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH CFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDR GATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNPITEYMFCAGYSDGSK DCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYI EWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPGPEGPSKLTRAETGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS ETPATSGETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSSS	766
FVII(Gla-EGF2)-(K142-V181)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTVPFPCGKIPILEKRKL TRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGKVC PKGEC PWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEH DLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNH DIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQ DCLQQSRKVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLR APFP	767
FVII(Gla-	ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ	768

FVII コンスト ラクト名*	アミノ酸配列	配列番号
EGF2)-(K142-V181)- FVII(Pro)- KLTRAET-AE288 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	CASSPCQNGGSCCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGVSC TPTVPFPCGKIPILEKRKL TRAETVFPD VDYVNSTEAE TILDNITQSTQSFNDFTRVVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEH DLSEHDGDEQSR RVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPR LMTQ DCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLR APFPGPEGPSKLTRAETGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	10
FVII(Gla-EGF2)-(K142-V181)- FVII(Pro)- KLTRAET-AE864 (配列番号 6 として開示 される「K LTRAET」)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQC SFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSCCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGVSC TPTVPFPCGKIPILEKRKL TRAETVFPD VDYVNSTEAE TILDNITQSTQSFNDFTRVVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEH DLSEHDGDEQSR RVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPR LMTQ DCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGT WYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLR APFPGPEGPSKLTRAETGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSSS	769 20 30
FVII(Gla-EGF2)-(R134-V181)- FVII(Pro)	ANAFLEELRPGSLERECKEEQC SFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSCCKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGG CEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGVSC TPTVPFPCGRVSVSQTSK LTRAETVFPD VDYVNSTEAE TILDNITQSTQSFNDFTRVVGGKVC PKGE CPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGE HDLSEHDGDEQSR RVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV VPLCLPERTF SERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPR LM TQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYR GTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVL LRAPFP	770 40
FVII(Gla-EGF2)-(R134-	ANAFLEELRPGSLERECKEEQC SFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQ CASSPCQNGGSCCKDOLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDOLICVNENGG	771

【表 4 3 - 9】

[illegible]

【 0 5 4 6 】

* 配列名は、F V I I バリエント（G l a－E G F 2ドメイン）、F I X A P開裂配列、F V I I プロテアーゼドメイン、X T E N開裂配列、およびX T E N成分（含まれる場合は後者）のN末端からC末端への設定を反映する。

* * 必ずしもすべての配列がX T E Nを組み込んでいるわけではない。

【 0 5 4 7 】

(項目 1)

伸長した組換えポリペプチド（X T E N）を含む単離された第 V I I 因子ポリペプチドであって、該 X T E N が少なくとも 2 0 0 のアミノ酸残基を含み、この場合、該第 I X 因子ポリペプチドは、対象に投与される場合に約 1 2 時間よりも長い終末半減期を呈する、該第 V I I 因子ポリペプチド。

【 0 5 4 8 】

(項目2)

前記第 I X 因子ポリペプチドが、最適に整列した場合に、表 2 から選択される配列と比較して少なくとも 90 % の配列同一性を呈する、項目 1 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0549】

(項目 3)

前記第 V I I 因子が、その C 末端で前記 X T E N に連結する、項目 1 または 2 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0550】

(項目 4)

第 X I a 因子、第 X I I a 因子、カリクレイン、第 V I I a 因子、第 I X a 因子、第 X a 因子、第 I I a 因子 (トロンビン)、エラスターゼ - 2、MMP - 12、MMP 13、MMP - 17、および MMP - 20 からなる群から選択される哺乳類プロテアーゼによって開裂可能な配列を介して前記 X T E N に連結される、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0551】

(項目 5)

前記哺乳類プロテアーゼによる前記開裂配列における開裂が、前記第 I X 因子ポリペプチドから前記 X T E N を放出する、項目 4 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0552】

(項目 6)

前記 X T E N が以下を特徴とする、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド：

(a) X T E N アミノ酸残基の累積合計が、200 超 ~ 約 3000 アミノ酸残基であり；

(b) アスパラギン残基およびグルタミン残基の合計が、該 X T E N の全アミノ酸配列の 10 % 未満であり；

(c) メチオニン残基およびトリプトファン残基の合計が、該 X T E N の全アミノ酸配列の 2 % 未満であり；

(d) 該 X T E N 配列が、10 未満のサブシーケンススコアを有し；

(e) 該 X T E N 配列が、G O R アルゴリズムによって決定される時、90 % 超のランダムコイル形成を有し；かつ

(f) 該 X T E N 配列が、C h o u - F a s m a n アルゴリズムによって決定される時、2 % 未満のアルファヘリックスおよび 2 % 未満のベータ - シートを有する。

【0553】

(項目 7)

少なくとも約 4 の見かけの分子量因子を呈する、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0554】

(項目 8)

前記 X T E N が、表 4、表 9、表 10、表 11、表 12、または表 13 から選択されるアミノ酸配列の同等な長さで少なくとも 90 % の配列同一性を呈する、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0555】

(項目 9)

式 V I I に従って構成された、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド：

(G l a) - (X T E N)_u - (E G F 1) - (X T E N)_v - (E G F 2) - (A P 1) - (X T E N)_w - (A P 2) - (X T E N)_x - (P r o) - (S)_y - (X T E N)_z V I I。

【0556】

10

20

30

40

50

この場合、各発生について独立して、

- (a) G l aが、第 I X 因子の G l a ドメインであり；
- (b) E G F 1 が、第 I X 因子の E G F 1 ドメインであり；
- (c) E G F 2 が、第 I X 因子の E G F 2 ドメインであり；
- (d) A P 1 が、第 I X 因子の活性化因子ペプチドドメインの一部であり；
- (e) A P 2 が、少なくとも第一の開裂配列を含む第 I X 因子の活性化ペプチドドメインの一部であり；
- (f) P R O が、第 I X 因子のプロテアーゼドメインであり；
- (g) S が、開裂配列を任意に含むことのできる 1 ～約 50 のアミノ酸残基を有するスーパーサー配列であり；
- (h) X T E N が、表 4、表 9、表 10、表 11、表 12、または表 13 から選択されるアミノ酸の同等な長さで少なくとも 90% の配列同一性を呈する伸長した組換えポリペプチドであり、
- (i) u が、0 または 1 のいずれかであり；
- (j) v が、0 または 1 のいずれかであり；
- (k) x が、0 または 1 のいずれかであり；
- (l) y が、0 または 1 のいずれかであり；かつ
- (m) z が、0 または 1 のいずれかであり、ただし、 $u + v + x + y + z \geq 1$ という条件付きである。

【0557】

(項目 10)

Y = 1 であり、かつ、S が F X I a、F X I I a、カリクレイン、F V I I a、F I X a、F X a、F I I a (トロンビン)、エラスターゼ - 2、MMP - 12、MMP 13、MMP - 17、および MMP - 20 からなる群から選択される哺乳類プロテアーゼによって開裂可能である開裂配列を含む、項目 9 に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0558】

(項目 11)

2 つ以上の X T E N を含む、項目 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0559】

(項目 12)

前記 X T E N が、前記第 I X 因子に含まれる任意の 2 つの隣接したドメイン間に組み込まれ、この場合、該 2 つの隣接したドメインが G l a、E G F 1、E G F 2、A P、およびペプチダーゼ S 1 (P r o) からなる群から選択される、項目 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

【0560】

(項目 13)

(i) 同等なモル用量で哺乳類に投与される場合、前記 X T E N を欠失する相応する第 I X 因子と比較して、哺乳類に投与する場合により長い終末半減期を有し；

(i i) 該第 I X 因子ポリペプチドのより小さなモル量が、他は等価な用量投与計画の下で哺乳類に投与される X T E N を欠失する相応する第 I X 因子との比較において哺乳類に投与される場合、該第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な曲線下面積 (AUC) を達成し；

(i i i) 該第 I X 因子ポリペプチドのより小さなモル量が、他は等価な用量投与計画の下で哺乳類に投与される X T E N を欠失する相応の第 I X 因子との比較において哺乳類に投与される場合、該 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な治療効果を達成し；

(i v) 該第 I X 因子ポリペプチドが、他は等価なモル量を用いて哺乳類に投与された X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較してあまり頻繁に哺乳類に投与されない場合、第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な曲線

10

20

30

40

50

下面積（AUC）を達成し；

（v）該第 I X 因子ポリペプチドが、他は等価なモル量を使用して哺乳類に投与された X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較してあまり頻繁に哺乳類に投与されない場合、第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な治療効果を達成し；

（v i）他は等価な投薬期間の下で哺乳類に投与された X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較して、累積的により小さなモル量の第 I X 因子ポリペプチドが、哺乳類に投与される場合、該第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な曲線下面積（AUC）を達成し；又は

（v i i）他は等価な投薬期間の下で哺乳類に投与される X T E N を欠失する相応の第 I X 因子と比較して、累積的により小さなモル量の第 I X 因子ポリペプチドが、哺乳類に投与される場合、該第 I X 因子ポリペプチドが、該 X T E N を欠失する相応の第 I X 因子として同等な治療効果を達成することの特徴とする、項目 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の単離された第 I X 因子ポリペプチド。

10

【0561】

（項目 1 4）

項目 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の治療有効量の第 I X 因子ポリペプチドを含む組成物を対象に投与することを含む、該対象における凝固障害を治療する方法。

【0562】

（項目 1 5）

前記凝固障害が血友病 B である、項目 1 4 に記載の方法。

20

【0563】

（項目 1 6）

項目 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の治療有効量の第 I X 因子ポリペプチドを含む組成物を対象に投与することを含む、該対象における出血症状を治療する方法。

【0564】

（項目 1 7）

項目 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の治療有効量の第 I X 因子を含む組成物を、凝固タンパク質を欠損する対象に投与することを含む、該対象を治療する方法。

【0565】

（項目 1 8）

前記凝固タンパク質が、野生型の第 V I I 因子、第 I X 因子、または第 X I 因子と置き換わる、項目 1 7 に記載の方法。

30

【図 1】

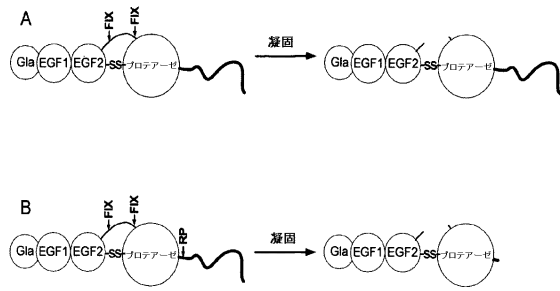


FIG. 1

【図 2】

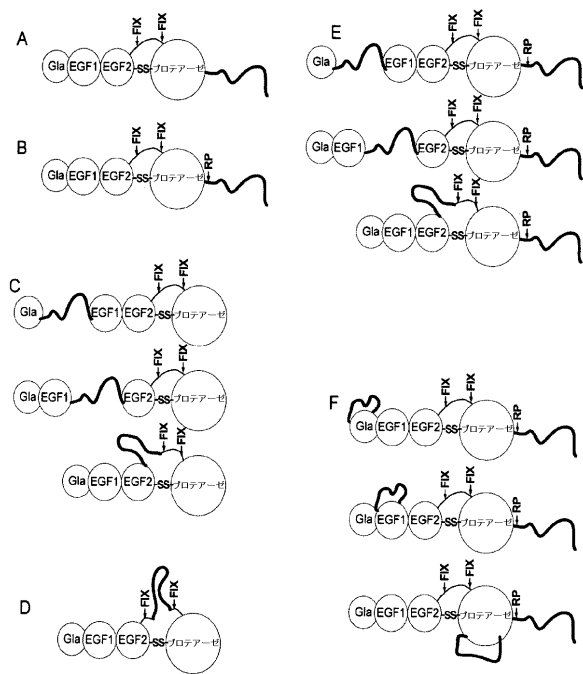


FIG. 2

【図 3】

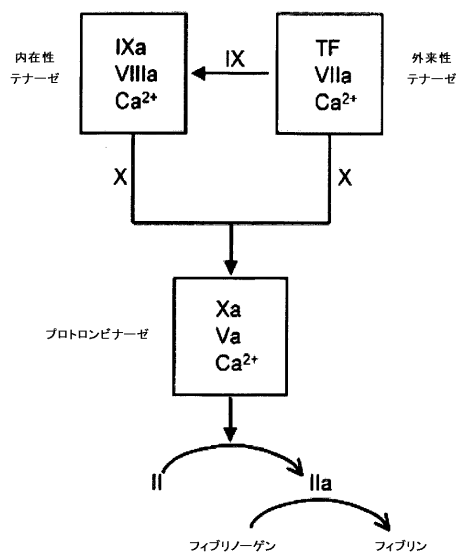


FIG. 3

【図 4】

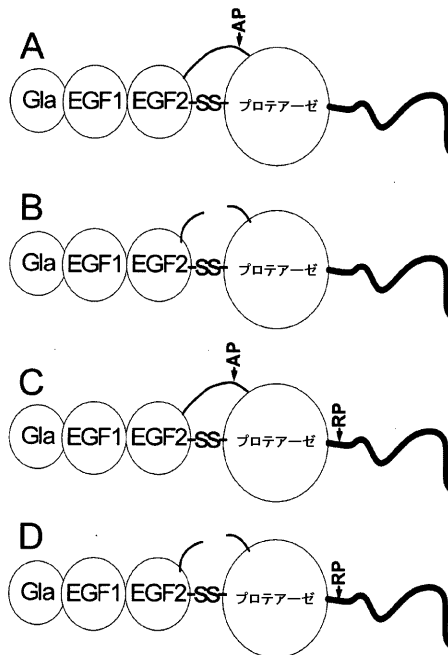


FIG. 4

【図 5】

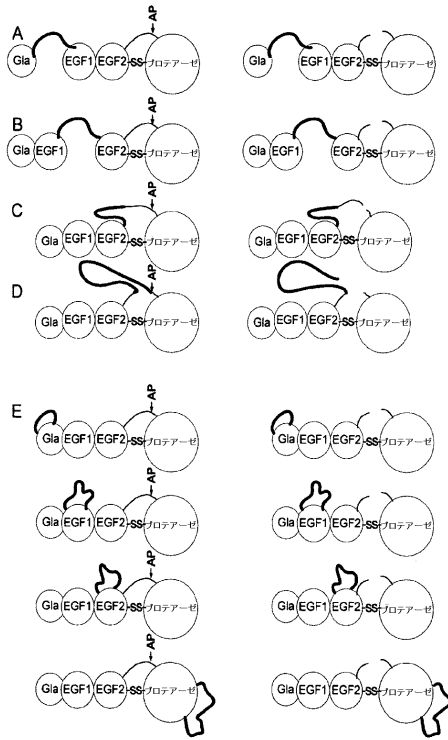


FIG. 5

【図 6】

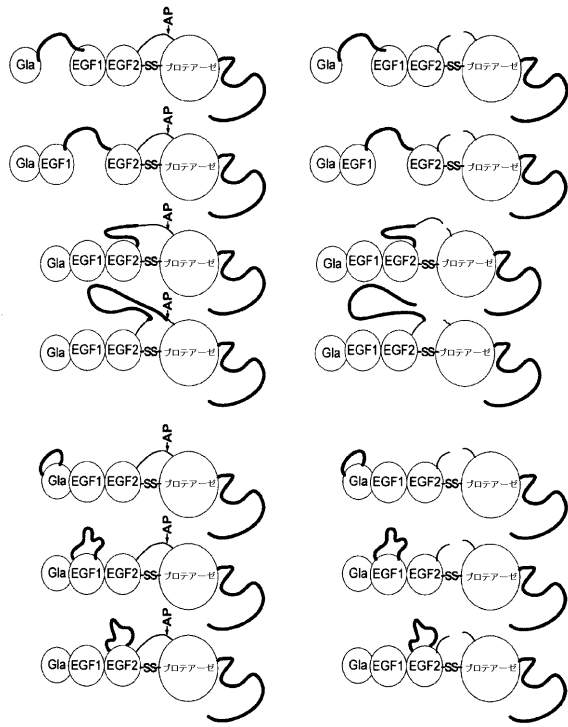


FIG. 6

【図 7】

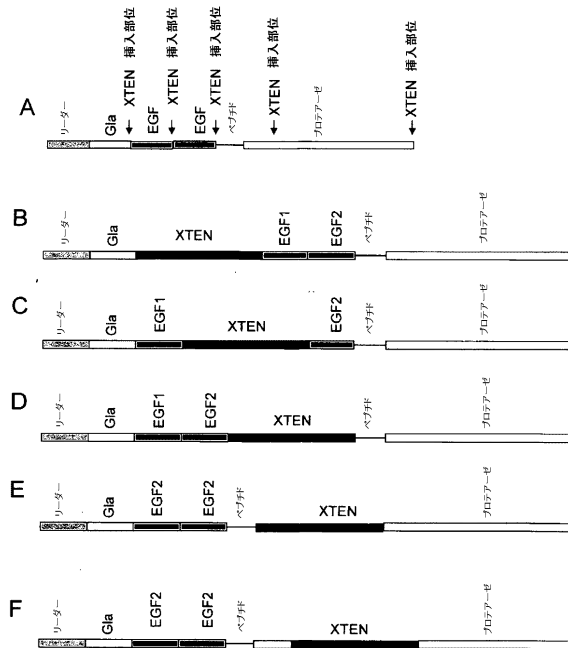


FIG. 7

【図 8】

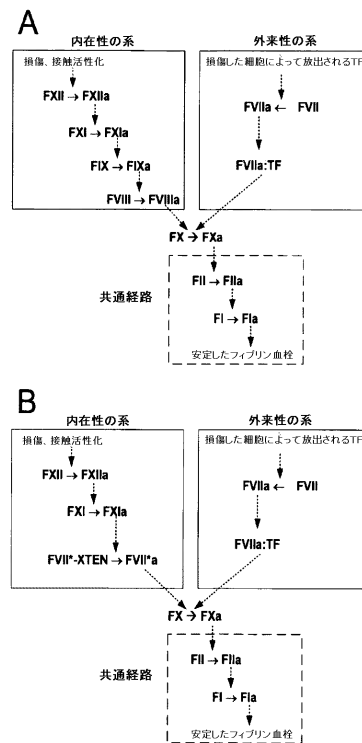


FIG. 8

【図 9】

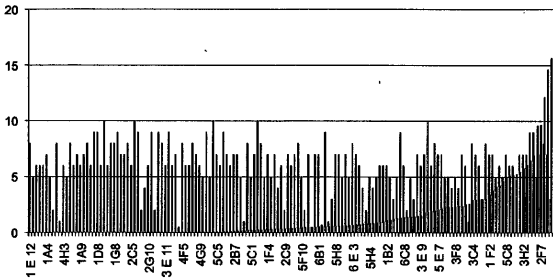


FIG. 9

【図 10】

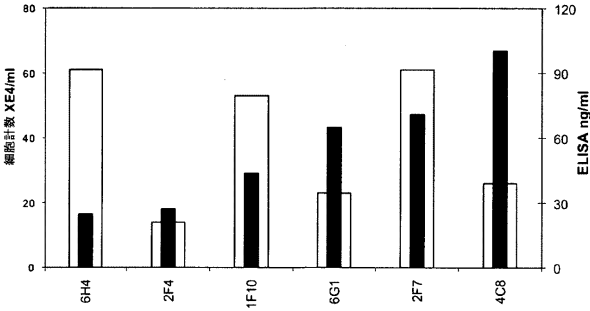


FIG. 10

【図 11】

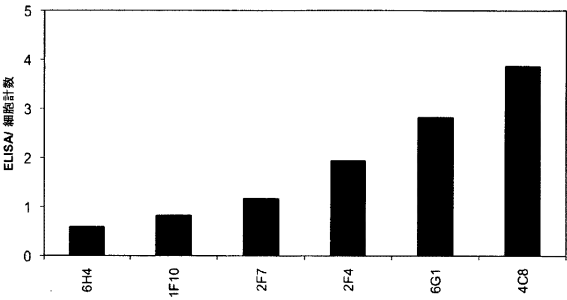


FIG. 11

【図 12】

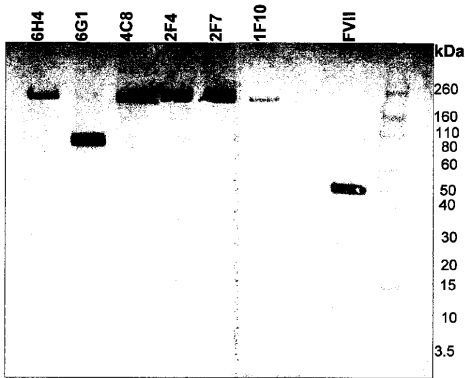


FIG. 12

【図 13】

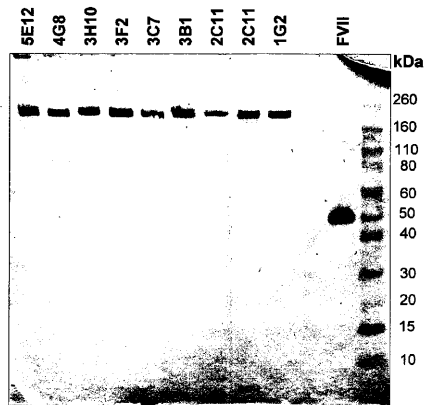


FIG. 13

【図 14】

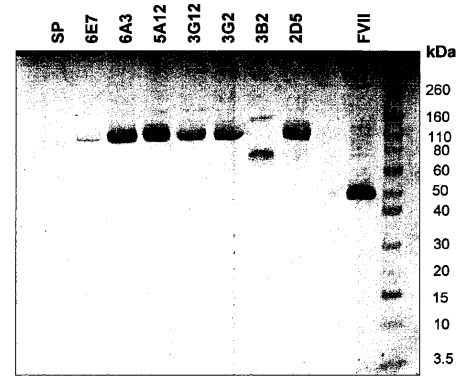


FIG. 14

【図 18】

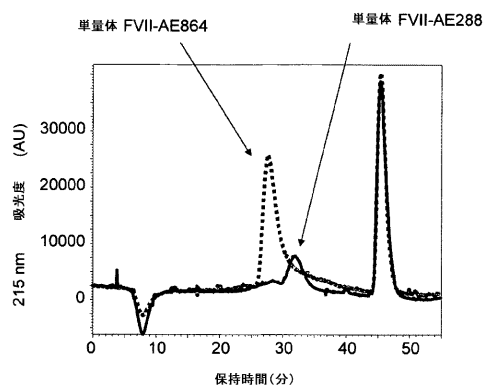


FIG. 18

【図 19】

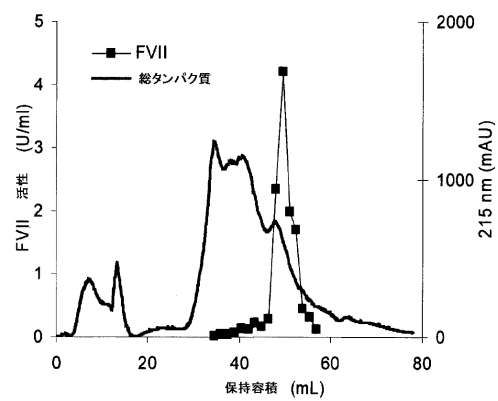


FIG. 19

【図 20】

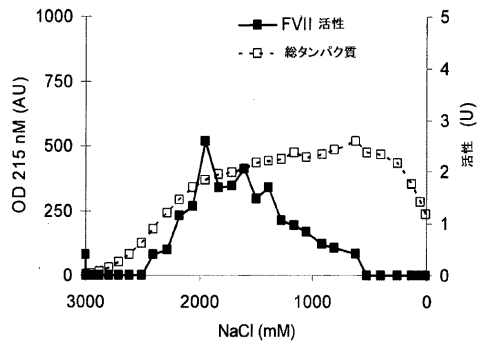


FIG. 20

【図 21】

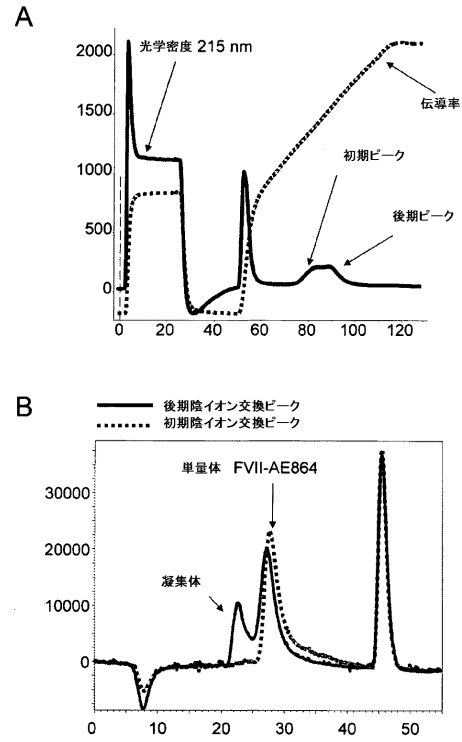


FIG. 21

【図 22】

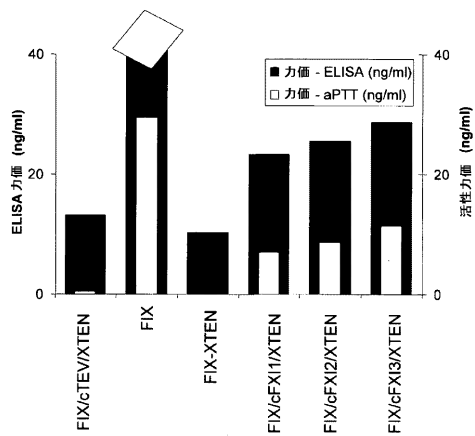


FIG. 22

【図 23】

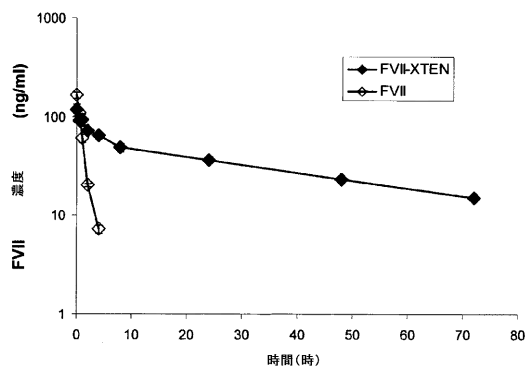


FIG. 23

【図 24】

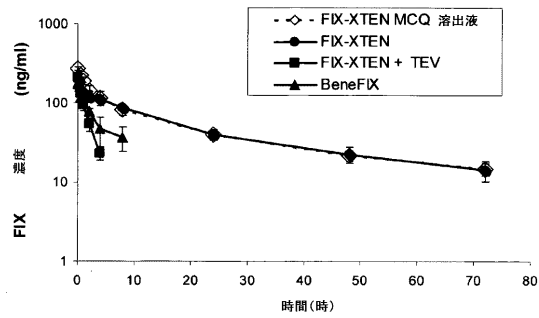


FIG. 24

【図 25】

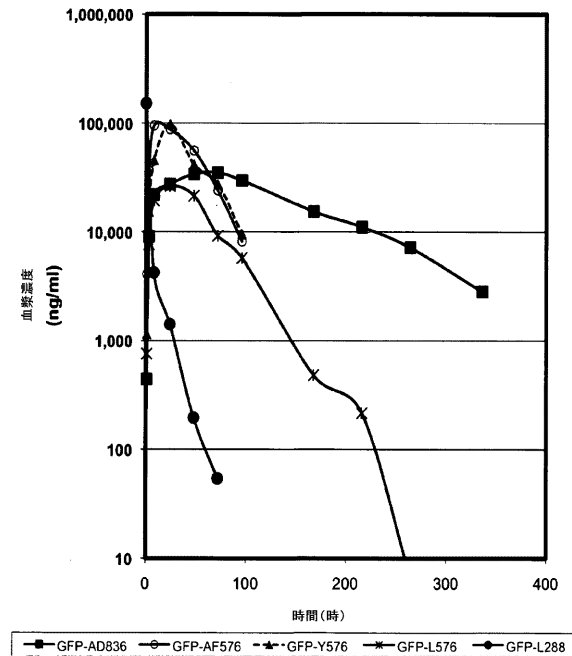


FIG. 25

【図 27】

LCW0569 ATGGCTNNNNNGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGT
M A X X A G S P T S T E E
LCW0570 ATGGCTNNNNNGAAAGCGCAACCCCTGAGTCCGGTCCAGGT
M A X X E S A T P E S G P
LCW0571 ATGGCTNNNNNACTCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGT
M A X X T P S G A T G S P

X = APST, GS or GE
TCAG/C/TCAG, AG/G/TC or G/AG/AG
多様性 : 16 4 4

- パッチ2ライブラリーは、パッチ1スクリーニング由来の3つの最良のクローンに基づいている。
- 6つのアミノ酸G、E、S、P、A、Tについての24のコドンすべてが含まれている。
- 新たな各ライブラリーは、アニーリングされた3×3=9対のオリゴから構成される。

FIG. 27

【図 28】

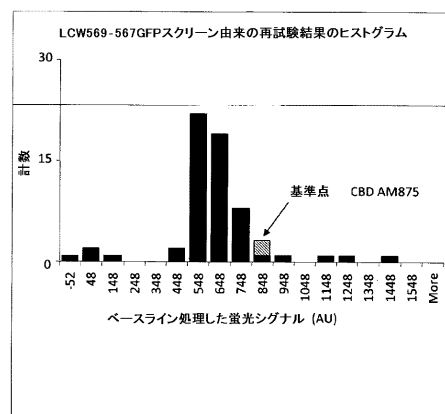


FIG. 28

【図 29】

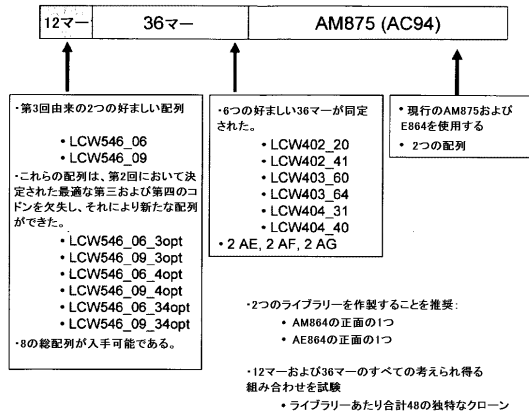


FIG. 29

【図 31】

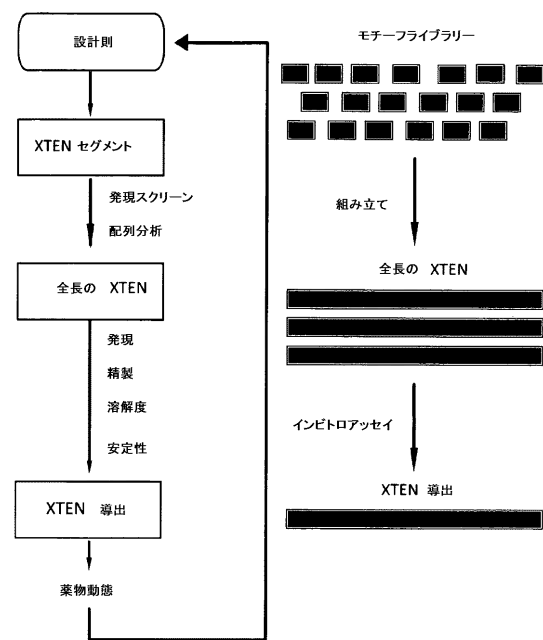


FIG. 31

【図 32】

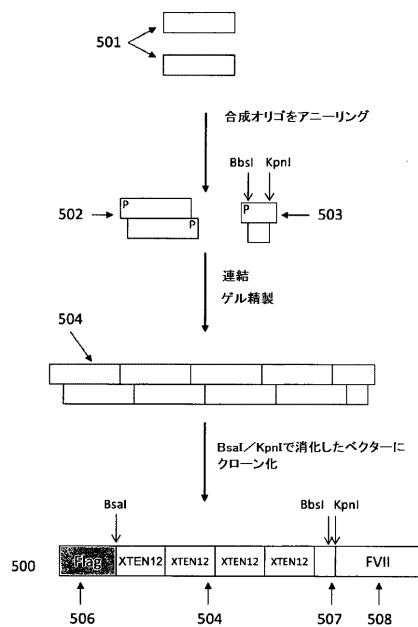


FIG. 32

【図 33】

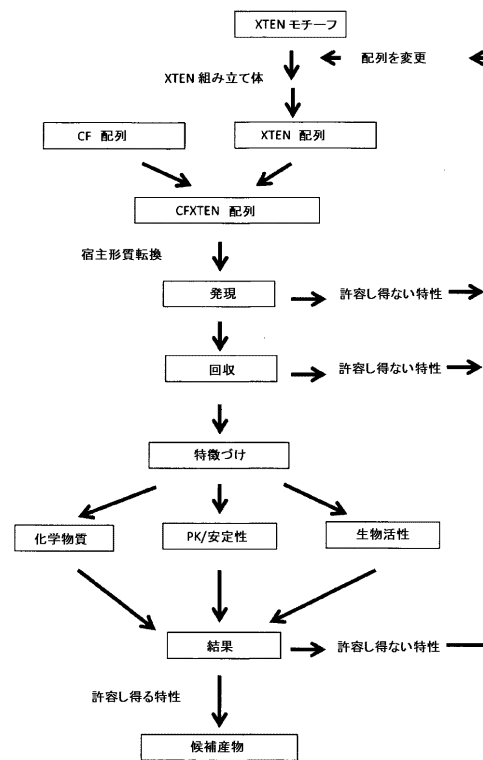


FIG. 33

【図 3 4】

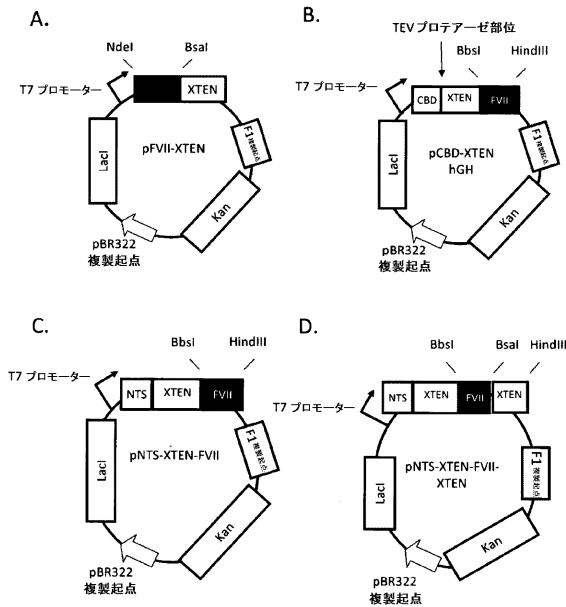


FIG. 34

【図 3 5】

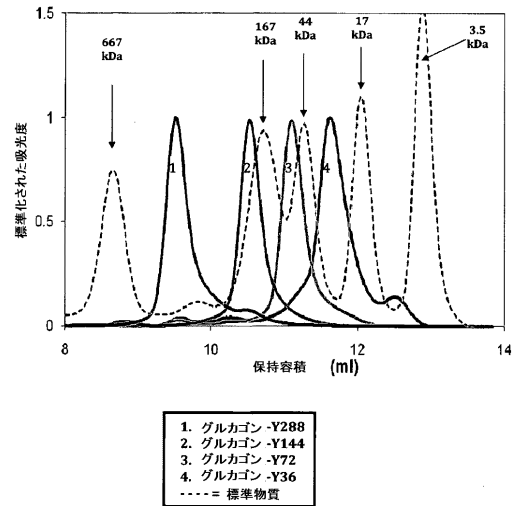
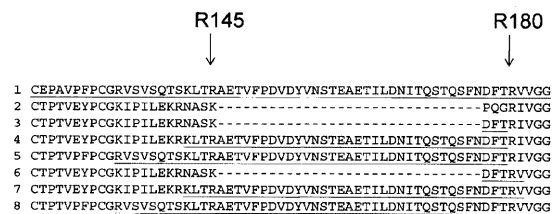


FIG. 35

【図 3 6】



1. FIX, 天然
2. FVII, 天然
3. P4_R180-P2_R180
4. P4_R145-P2_R180
5. 完全 AP
6. P4_R180-P1'_R180
7. P4_R145-P1'_R180
8. 完全 AP + P1'

FIG. 36

【図 15】

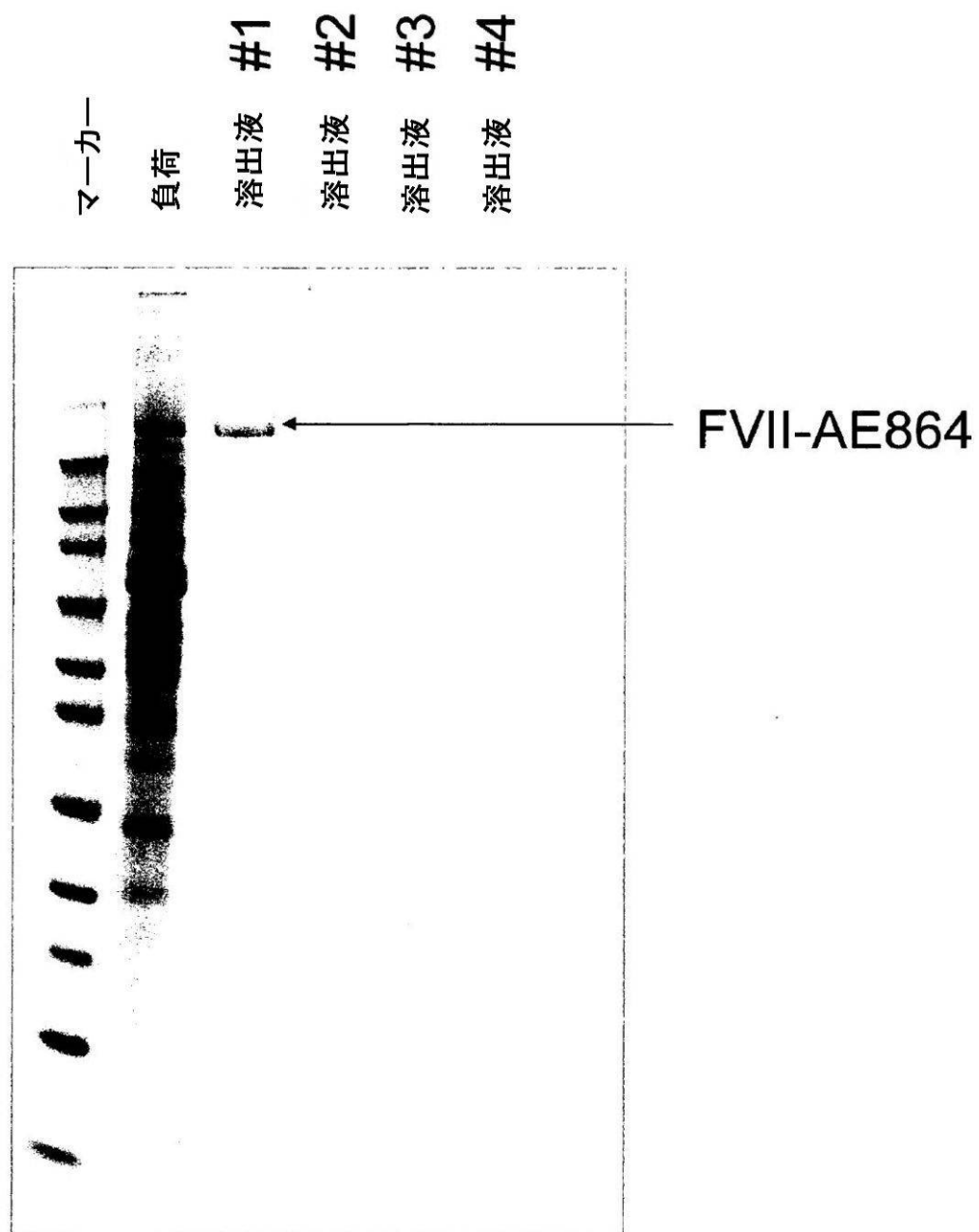


FIG. 15

【図 16】

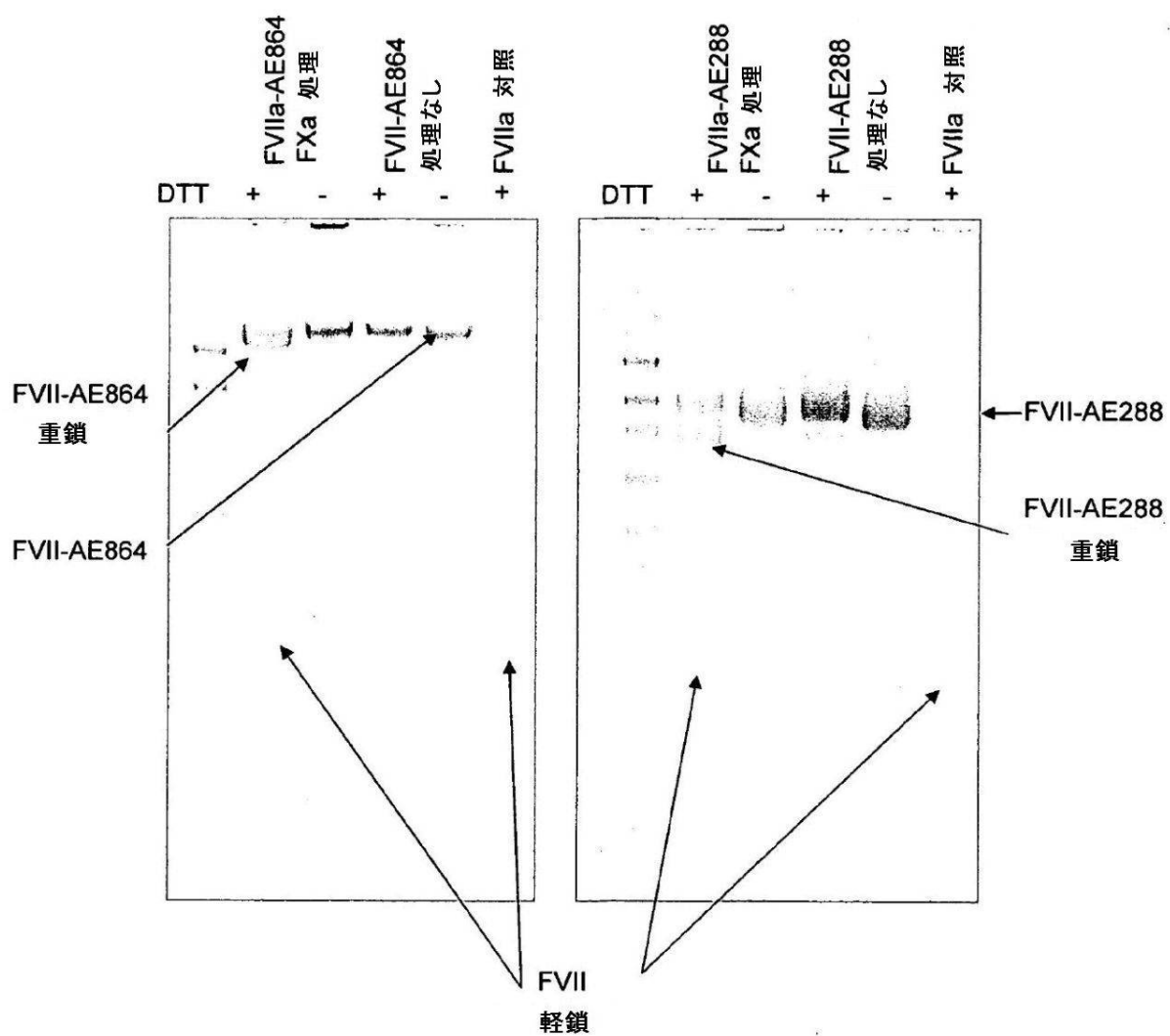


FIG. 16

【図 17】

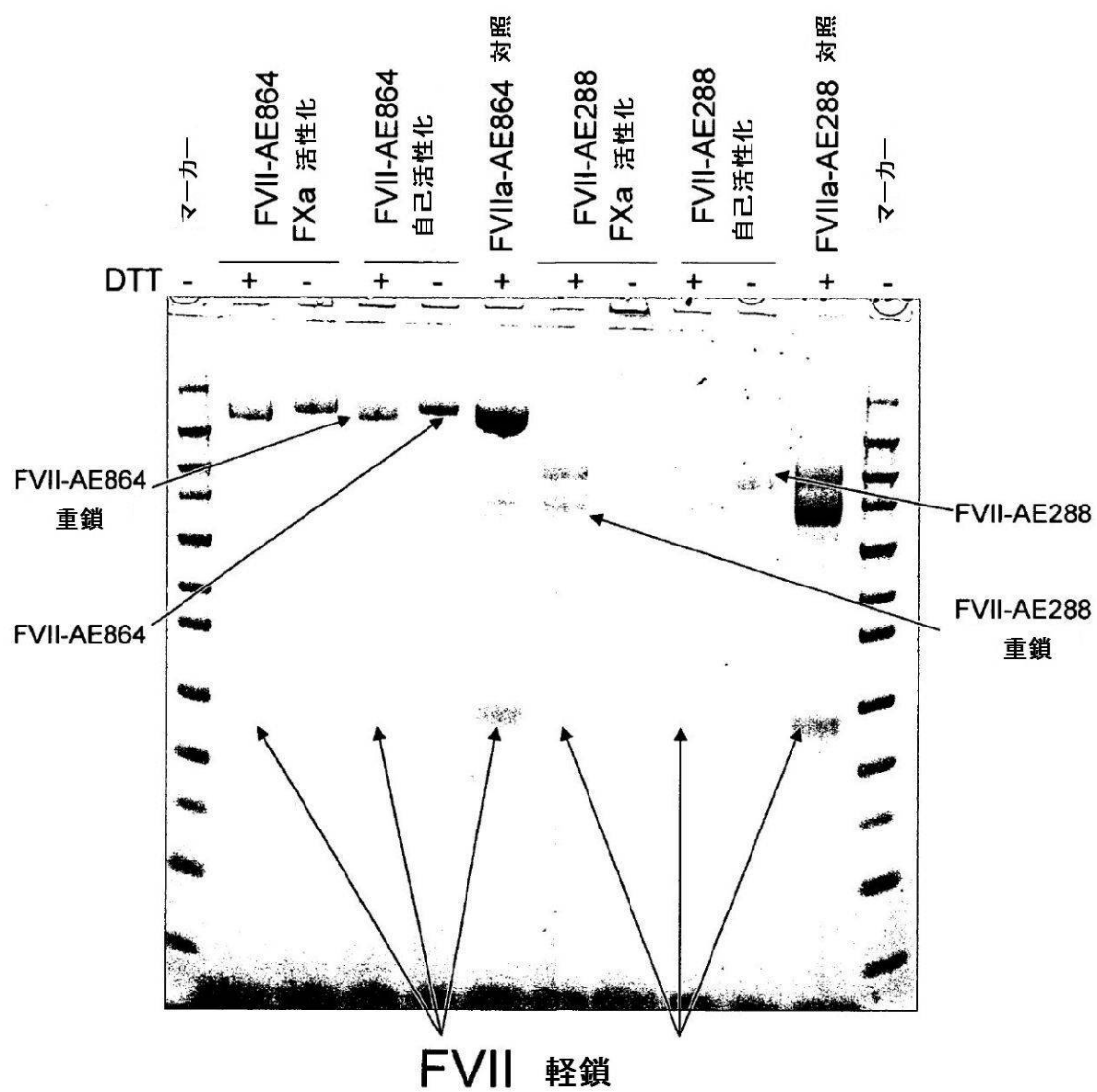


FIG. 17

【図 26】

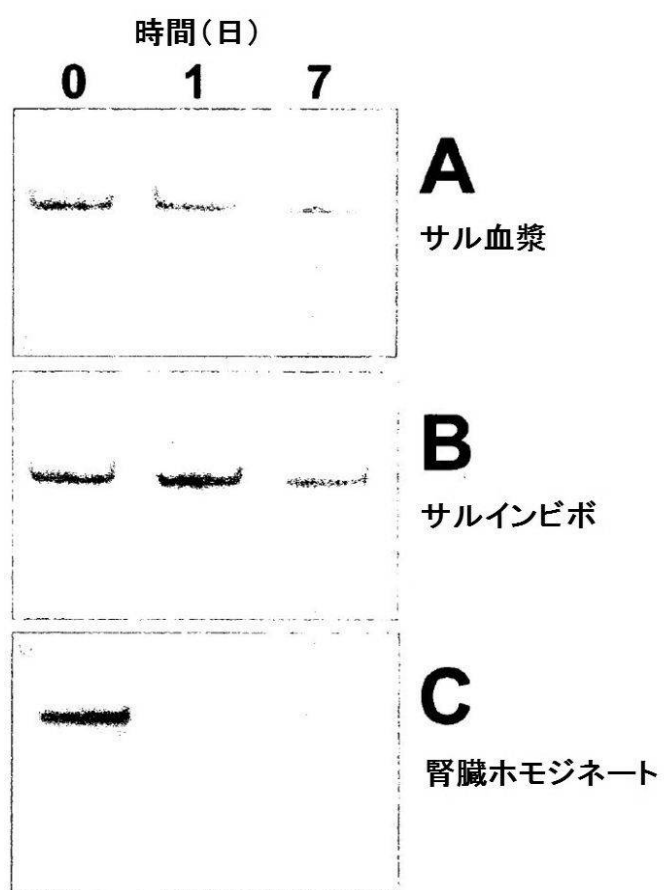


FIG. 26

【図 30】

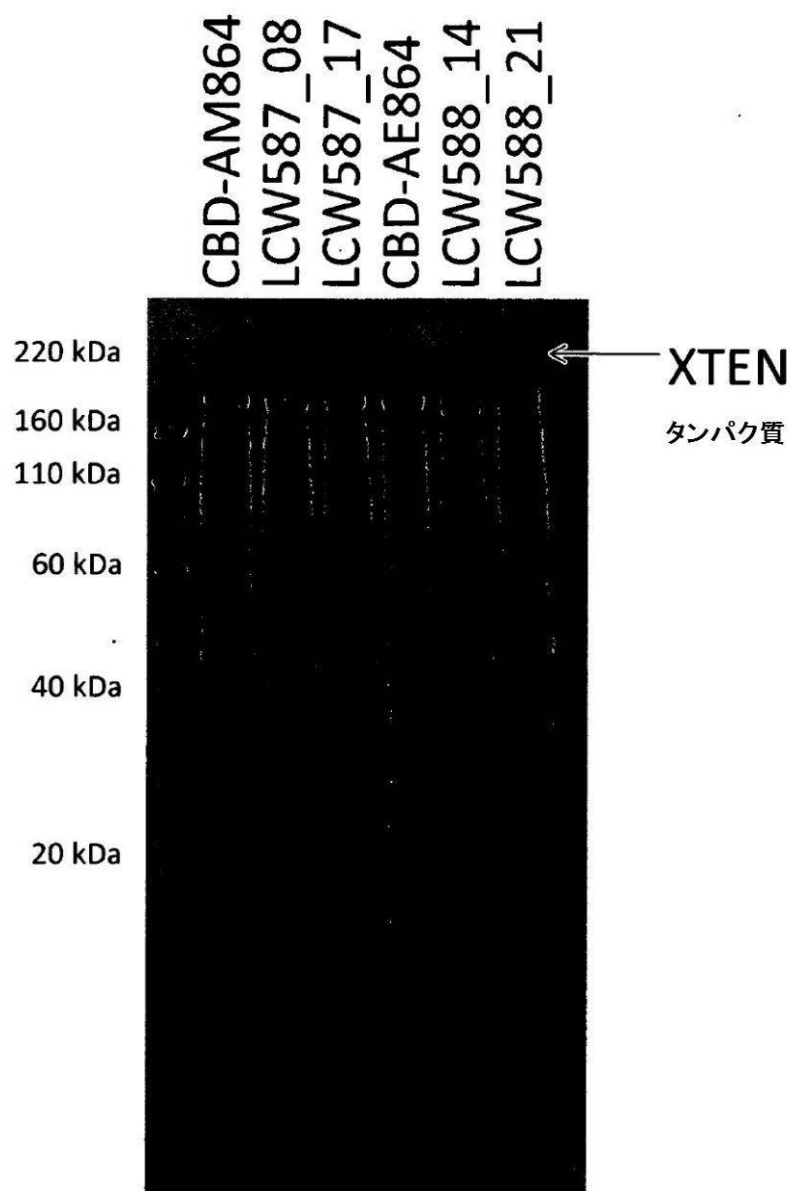


FIG. 30

【配列表】

[0005813641000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	38/45	(2006.01)	A 6 1 K	37/52	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(31)優先権主張番号 12/699,761

(32)優先日 平成22年2月3日(2010.2.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/236,493

(32)優先日 平成21年8月24日(2009.8.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/280,955

(32)優先日 平成21年11月10日(2009.11.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 シェレンバーガー, フォルカー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3, パロ アルト, モレノ アベニュー 9 1 4
- (72)発明者 シルバーマン, ジョシュア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 7, サニーバール, ダートシャー ウェイ 8 2 9
- (72)発明者 ステマー, ウィレム ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 5 1, ロス ガトス, キャシー コート 1 0 8
- (72)発明者 ワン, チア-ウェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 3 5, ミルピタス, デイビッド レーン 1 4 4 9
- (72)発明者 スピンク, ベンジャミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, ノータム アベニュー 3 7 9
- (72)発明者 ギーティング, ネイサン カール
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 5 4, サンタ クララ, ガーゾニー プレイス 2 0 0 9
- (72)発明者 トー, ウェイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フリーモント, リンフォード テラス 6 1 8 9

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 7 / 1 0 3 5 1 5 (WO, A 2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

UniProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

DWPI(Thomson Innovation)