

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6363600号
(P6363600)

(45) 発行日 平成30年7月25日 (2018. 7. 25)

(24) 登録日 平成30年7月6日 (2018. 7. 6)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 14/745 (2006. 01)	C O 7 K 14/745
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 15/86 (2006. 01)	C 1 2 N 15/86 Z
請求項の数 39 (全 187 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2015-524250 (P2015-524250)	(73) 特許権者	508121599
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)		カタリスト・バイオサイエンス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-524801 (P2015-524801A)		CATALYST BIOSCIENCE S, INC.
(43) 公表日	平成27年8月27日 (2015. 8. 27)		アメリカ合衆国94080カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、リトルフィールド・アベニュー260番
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/032616		
(87) 国際公開番号	W02014/018120	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成26年1月30日 (2014. 1. 30)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成27年6月23日 (2015. 6. 23)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	61/741, 806		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成24年7月25日 (2012. 7. 25)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 富田 憲史
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 修飾第X因子ポリペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、成熟ナンバリングに基づいて、未修飾第X因子（FX）ポリペプチドにおける位置196および332に対応する位置でアミノ酸置換を含む単離された修飾FXポリペプチドであって、

対応するアミノ酸位置は、配列番号：134に記載されているポリペプチドと未修飾FXポリペプチドのアラインメントにより同定され；

位置196でのアミノ酸置換はセリン（S）またはトレオニン（T）であり；

位置332でのアミノ酸置換は、アラニン（A）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、セリン（S）およびグリシン（G）から選択され；

未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134に記載されているFXの成熟形態のアミノ酸の配列を有するか、または配列番号：134の残基140-142が除去されている成熟FX形態であるか、または配列番号：2の完全長FX前駆体ポリペプチドであるか、または配列番号：134のアミノ酸1-139からなるアミノ酸残基の配列を有する軽鎖および配列番号：134のアミノ酸残基143-448の配列からなる重鎖を有するFXの二本鎖形態であるか、または配列番号：134のアミノ酸1-139からなるアミノ酸残基の配列を有する軽鎖および配列番号：134のアミノ酸残基195-448の配列からなる重鎖を有する活性化FXa形態であり；

修飾FXポリペプチドは、未修飾FXポリペプチドと比較して最大5個のアミノ酸置換を含み；

10

20

位置 1 9 6 および 3 3 2 での置換に加えて、アミノ酸置換は、
配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 2 1 1 に対応する位置での S；位置 2 1 4 に対応する位置での D；位置 2 1 4 に対応する位置での A；位置 2 1 4 に対応する位置での S；位置 2 1 6 に対応する位置での R；位置 2 1 6 に対応する位置での K；位置 2 1 6 に対応する位置での A；位置 2 1 6 に対応する位置での S；位置 2 1 8 に対応する位置での R；位置 2 1 8 に対応する位置での K；位置 2 1 8 に対応する位置での A；位置 2 1 9 に対応する位置での H；位置 2 7 3 に対応する位置での A；位置 2 7 3 に対応する位置での E；位置 2 7 6 に対応する位置での A；位置 2 7 6 に対応する位置での E；位置 3 0 6 に対応する位置での E；位置 3 2 6 に対応する位置での S；位置 3 2 6 に対応する位置での T；位置 3 2 6 に対応する位置での V；位置 3 2 6 に対応する位置での Q；位置 3 2 6 に対応する位置での N；位置 3 2 6 に対応する位置での M；位置 3 2 6 に対応する位置での K；位置 3 2 6 に対応する位置での Y；位置 3 2 6 に対応する位置での E；位置 3 2 6 に対応する位置での D；位置 3 3 8 に対応する位置での A；位置 3 3 8 に対応する位置での S；位置 3 3 8 に対応する位置での N；位置 3 3 8 に対応する位置での R；位置 3 3 8 に対応する位置での V；位置 3 3 8 に対応する位置での Y；位置 3 3 8 に対応する位置での M；位置 4 2 0 に対応する位置での A；位置 4 2 0 に対応する位置での E；位置 4 2 4 に対応する位置での A；および位置 4 2 4 に対応する位置での E；
 ならびに

10

配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、
位置 5 1 に対応する位置での N；

20

位置 5 6 に対応する位置での N および 位置 5 8 に対応する位置での S；
位置 6 2 に対応する位置での N および 位置 6 4 に対応する位置での S；
位置 6 5 に対応する位置での N および 位置 6 7 に対応する位置での S；
位置 6 7 に対応する位置での N；
位置 7 3 に対応する位置での N および 位置 7 5 に対応する位置での S；
位置 7 5 に対応する位置での N および 位置 7 7 に対応する位置での S；
位置 7 7 に対応する位置での N および 位置 7 9 に対応する位置での S；
位置 7 8 に対応する位置での N および 位置 8 0 に対応する位置での S；
位置 8 2 に対応する位置での S；
位置 8 3 に対応する位置での N；

30

位置 8 2 に対応する位置での N および 位置 8 4 に対応する位置での S；
位置 8 5 に対応する位置での N および 位置 8 7 に対応する位置での S；
位置 8 6 に対応する位置での N および 位置 8 8 に対応する位置での S；
位置 9 5 に対応する位置での N および 位置 9 7 に対応する位置での S；
位置 1 1 4 に対応する位置での N；
位置 1 1 9 に対応する位置での N および 位置 1 2 1 に対応する位置での S；位置 1 2 2 に対応する位置での S；
位置 2 1 5 に対応する位置での N および 位置 2 1 7 に対応する位置での S；
位置 2 4 3 に対応する位置での N および 位置 2 4 5 に対応する位置での S；
位置 2 6 4 に対応する位置での N および 位置 2 6 6 に対応する位置での S；
位置 2 9 3 に対応する位置での N および 位置 2 9 5 に対応する位置での S；
位置 3 8 8 に対応する位置での N；
位置 3 8 9 に対応する位置での N および 位置 3 9 1 に対応する位置での S；
位置 4 2 8 に対応する位置での N および 位置 4 3 0 に対応する位置での S；および
位置 4 2 9 に対応する位置での N および 位置 4 3 1 に対応する位置での S
 から選択される非天然グリコシル化部位を導入する 1 つまたは複数のアミノ酸置換から選択され、

40

修飾 F X ポリペプチドは、活性 F X a 形態のとき、アミノ酸置換を含まない修飾 F X ポリペプチドと同じアミノ酸配列を含む未修飾 F X ポリペプチドの活性形態と比較して、少なくとも 5 0 倍増加した第 V a 因子（F V a）補因子依存性、およびアンチトロンビン I I

50

I (A T I I I) に対する増加した耐性を示し；
補因子依存性は、修飾を含まない未修飾 F X ポリペプチドに対する修飾 F X ポリペプチドの F V a 依存性活性／F V a 非依存性活性の比率を比較することにより評価される、修飾第 X 因子 (F X) ポリペプチド。

【請求項 2】

位置 196 でのアミノ酸置換がセリン (S) である、請求項 1 に記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 3】

位置 332 に対応する位置でのアミノ酸置換が A である、請求項 1 または請求項 2 に記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 4】

活性化 F X a ポリペプチドである、請求項 1－3 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号：92－96 および 224－228 のいずれかに記載されているアミノ酸の配列を含む、修飾第 X 因子 (F X) ポリペプチドであって、

修飾 F X ポリペプチドは、完全長 F X ポリペプチド、成熟形態、二本鎖チモーゲン形態、または二本鎖活性化形態であり；

未修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：2 の完全長ポリペプチドであるか、または配列番号：134 の成熟形態であるか、または配列番号：134 のアミノ酸 1－139 からなるアミノ酸残基の配列を有する軽鎖および配列番号：134 のアミノ酸残基 143－448 の配列からなる重鎖を有する F X の二本鎖形態であるか；または配列番号：134 のアミノ酸 1－139 からなるアミノ酸残基の配列を有する軽鎖および配列番号：134 のアミノ酸残基 195－448 の配列からなる重鎖を有する活性化 F X a 形態である、
修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 6】

F V a 補因子依存性が、未修飾ポリペプチドと比較して、少なくとも 75 倍、100 倍、125 倍、150 倍、200 倍、250 倍、300 倍、350 倍、400 倍、450 倍、500 倍、600 倍、700 倍、800 倍、900 倍または 1000 倍増加している、
請求項 1－4 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 7】

同じ形態の未修飾ポリペプチドと比較して、3 個または 4 個のみのアミノ酸置換を含む、請求項 1－4 および 6 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 8】

未修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：134 のアミノ酸 1－139 からなるアミノ酸残基の配列からなる軽鎖および配列番号：134 のアミノ酸 195－448 の配列からなる重鎖を有する二本鎖 F X a 形態である、請求項 1－7 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 9】

未修飾 F X ポリペプチドにおいて 2 個のみのアミノ酸置換を含む請求項 1 に記載の修飾 F X ポリペプチドであって、アミノ酸置換は、

位置 196 に対応する位置での S および位置 332 に対応する位置での A；

位置 196 に対応する位置での S および位置 332 に対応する位置での D；

位置 196 に対応する位置での S および位置 332 に対応する位置での E；

位置 196 に対応する位置での S および位置 332 に対応する位置での S；および

位置 196 に対応する位置での S および位置 332 に対応する位置での G；

でのアミノ酸置換から選択される、修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 10】

位置 196 に対応する位置での S および位置 332 に対応する位置での A でのアミノ酸置換を含む、請求項 9 に記載の修飾 F X ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 11】

配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、成熟ナンバリングに基づいて、未修飾FXaポリペプチドにおける位置196および位置332でアミノ酸置換を含む、FXaポリペプチドである修飾活性第X因子ポリペプチドであって、位置196での置換はセリン（S）であり、332での置換はアラニン（A）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、セリン（S）またはグリシン（G）であり；

修飾FXaポリペプチドは最大5個のみアミノ酸置換を含み；

未修飾FXaは、配列番号：134の残基1－139として記載されているアミノ酸の配列からなる軽鎖、および配列番号：134の残基195－448として記載されているアミノ酸の配列からなる重鎖を含み；

修飾FXaは、アミノ酸置換を含まない未修飾FXaポリペプチドと比較して、少なくとも50倍増加したFVa補因子依存性を示し；

補因子依存性は、FVaの非存在下と比較しての、第Va因子（FVa）の存在下での修飾FXaの触媒活性の比率であり、

位置196および332での置換に加えて、アミノ酸置換は、

配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置211に対応する位置でのS；位置214に対応する位置でのD；位置214に対応する位置でのA；位置214に対応する位置でのS；位置216に対応する位置でのR；位置216に対応する位置でのK；位置216に対応する位置でのA；位置216に対応する位置でのS；位置218に対応する位置でのR；位置218に対応する位置でのK；位置218に対応する位置でのA；位置219に対応する位置でのH；位置273に対応する位置でのA；位置273に対応する位置でのE；位置276に対応する位置でのA；位置276に対応する位置でのE；位置306に対応する位置でのE；位置326に対応する位置でのS；位置326に対応する位置でのT；位置326に対応する位置でのV；位置326に対応する位置でのQ；位置326に対応する位置でのN；位置326に対応する位置でのM；位置326に対応する位置でのK；位置326に対応する位置でのY；位置326に対応する位置でのE；位置326に対応する位置でのD；位置338に対応する位置でのA；位置338に対応する位置でのS；位置338に対応する位置でのN；位置338に対応する位置でのR；位置338に対応する位置でのV；位置338に対応する位置でのY；位置338に対応する位置でのM；位置420に対応する位置でのA；位置420に対応する位置でのE；位置424に対応する位置でのA；および位置424に対応する位置でのE；ならびに

配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、

位置51に対応する位置でのN；

位置56に対応する位置でのNおよび位置58に対応する位置でのS；

位置62に対応する位置でのNおよび位置64に対応する位置でのS；

位置65に対応する位置でのNおよび位置67に対応する位置でのS；

位置67に対応する位置でのN；

位置73に対応する位置でのNおよび位置75に対応する位置でのS；

位置75に対応する位置でのNおよび位置77に対応する位置でのS；

位置77に対応する位置でのNおよび位置79に対応する位置でのS；

位置78に対応する位置でのNおよび位置80に対応する位置でのS；

位置82に対応する位置でのS；

位置83に対応する位置でのN；

位置82に対応する位置でのNおよび位置84に対応する位置でのS；

位置85に対応する位置でのNおよび位置87に対応する位置でのS；

位置86に対応する位置でのNおよび位置88に対応する位置でのS；

位置95に対応する位置でのNおよび位置97に対応する位置でのS；

位置114に対応する位置でのN；

位置119に対応する位置でのNおよび位置121に対応する位置でのS；位置122に

10

20

30

40

50

対応する位置での S ;

位置 2 1 5 に対応する位置での N および位置 2 1 7 に対応する位置での S ;

位置 2 4 3 に対応する位置での N および位置 2 4 5 に対応する位置での S ;

位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ;

位置 2 9 3 に対応する位置での N および位置 2 9 5 に対応する位置での S ;

位置 3 8 8 に対応する位置での N ;

位置 3 8 9 に対応する位置での N および位置 3 9 1 に対応する位置での S ;

位置 4 2 8 に対応する位置での N および位置 4 3 0 に対応する位置での S ; および

位置 4 2 9 に対応する位置での N および位置 4 3 1 に対応する位置での S

から選択される非天然グリコシル化部位を導入する 1 つまたは複数のアミノ酸置換から選択される、

修飾活性第 X 因子ポリペプチド。

【請求項 1 2】

位置 3 3 2 での置換が A である、請求項 1 1 に記載の修飾 F X a ポリペプチド。

【請求項 1 3】

未修飾 F X ポリペプチドが、

a) 配列番号：1 3 4 の残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：1 3 4 の残基 1 4 3 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモーゲン F X ポリペプチド、または

b) 配列番号：1 3 4 の残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：1 3 4 の残基 1 9 5 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含む活性 F X (F X a) ポリペプチド

から選択される、請求項 1 - 1 0 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 1 4】

a) 配列番号：2 2 4 - 2 2 8 のいずれかにおいて記載されているアミノ酸の配列；

b) 配列番号：2 2 4 - 2 2 8 のいずれかの残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列からなる軽鎖および残基 1 4 3 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列からなる重鎖を含むアミノ酸の配列；および

c) 配列番号：2 2 4 - 2 2 8 のいずれかの残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列からなる軽鎖および残基 1 9 5 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列からなる重鎖を含むアミノ酸の配列

から選択されるアミノ酸の配列を含む、請求項 1 - 1 0 および 1 2 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 1 5】

配列番号：9 2 - 9 6 のいずれかに記載されているアミノ酸の配列またはその活性化 F X a 形態を含む、請求項 1 4 に記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 1 6】

配列番号：2 2 4 - 2 2 8 のいずれかに記載されているアミノ酸の配列を含む、請求項 1 4 に記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 1 7】

一本鎖ポリペプチドである、請求項 1 - 1 0 および 1 3 - 1 6 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 1 8】

二本鎖ポリペプチドである、請求項 1 - 1 0 および 1 3 - 1 6 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 1 9】

F X a ポリペプチドである、請求項 1 - 1 6 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド。

【請求項 2 0】

薬学的に許容される媒体中に請求項 1 - 1 9 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチド

10

20

30

40

50

を含む医薬組成物。

【請求項 2 1】

局所的投与、全身投与、または局所投与用に製剤されている、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

単一投薬量投与用に製剤されている、請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

請求項 1 - 1 9 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を含む核酸分子。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 2 5】

原核生物ベクター、ウイルスベクター、または真核生物ベクターである、請求項 2 4 に記載のベクター。

【請求項 2 6】

ウイルスベクターが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、およびサイトメガロウイルスベクターから選択される、請求項 2 5 に記載のベクター。

【請求項 2 7】

請求項 2 4 - 2 6 のいずれかに記載のベクターを含む単離細胞または細胞培養物。

【請求項 2 8】

真核細胞である、請求項 2 7 に記載の細胞または細胞培養物。

【請求項 2 9】

真核細胞が哺乳動物細胞である、請求項 2 8 に記載の細胞または細胞培養物。

【請求項 3 0】

哺乳動物細胞が、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK-21) または 293 細胞または CHO 細胞から選択される、請求項 2 9 に記載の細胞または細胞培養物。

【請求項 3 1】

修飾 F X ポリペプチドが産生される条件下で請求項 2 7 - 3 0 のいずれかに記載の細胞または細胞培養物を培養することを含む、請求項 1 - 1 9 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチドを産生する方法。

【請求項 3 2】

修飾 F X ポリペプチドを単離することをさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

出血障害を処置することにおける使用のための請求項 1 - 1 9 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチドを含む医薬組成物であって、

修飾 F X ポリペプチドは、アミノ酸置換を含む完全長 F X、成熟形態または F X a 形態であり、

出血障害は、凝固因子の欠損による障害、凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による障害、血液疾患、出血性障害、フォン・ヴィレブランド病、ビタミン K アンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する障害、遺伝的血小板障害、ビタミン K エポキシドレダクターゼ C1 欠損症、ガンマーカルボキシラーゼ欠損症、外傷と関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、卒中、血液凝固障害、播種性血管内凝固症候群 (DIC)、ベルナル・スーリエ症候群、グランツマン血小板無力症および貯蔵プール欠損症から選択される、医薬組成物。

【請求項 3 4】

出血障害の処置のための医薬の製造における請求項 1 - 1 9 のいずれかに記載の修飾 F X ポリペプチドの使用であって、

修飾 F X ポリペプチドは、アミノ酸置換を含む完全長 F X、成熟形態または F X a 形態であり、

10

20

30

40

50

出血障害は、凝固因子の欠損による障害、凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による障害、血液疾患、出血性障害、フォン・ヴィレブランド病、ビタミンKアンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する障害、遺伝的血小板障害、ビタミンKエポキシドレダクターゼC1欠損症、ガンマーカルボキシラーゼ欠損症、外傷と関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、卒中、血液凝固障害、播種性血管内凝固症候群（DIC）、ベルナル・スーリエ症候群、グランツマン血小板無力症および貯蔵プール欠損症から選択される、使用。

【請求項35】

出血障害が血友病である、請求項34に記載の使用。

【請求項36】

出血障害が血友病Aまたは血友病Bである、請求項34または35に記載の使用。

【請求項37】

薬学的に許容される担体中に請求項23に記載の核酸分子または請求項24-26のいずれかに記載のベクターを含む医薬組成物。

【請求項38】

出血障害を処置することにおける使用のための薬学的に許容される担体中に請求項23に記載の核酸分子または請求項24-26のいずれかに記載のベクターを含む医薬組成物であって、

出血障害は、凝固因子の欠損による障害、凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による障害、血液疾患、出血性障害、フォン・ヴィレブランド病、ビタミンKアンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する障害、遺伝的血小板障害、ビタミンKエポキシドレダクターゼC1欠損症、ガンマーカルボキシラーゼ欠損症、外傷と関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、卒中、血液凝固障害、播種性血管内凝固症候群（DIC）、ベルナル・スーリエ症候群、グランツマン血小板無力症および貯蔵プール欠損症から選択される、医薬組成物。

【請求項39】

出血障害が血友病である、請求項33、37または38に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

優先権の利益は、2012年7月25日に提出された「Modified Factor X Polypeptides and Uses Thereof」と題する米国仮特許出願第61/741,806号に対して主張される。

【0002】

本出願は、「Modified Factor X Polypeptides and Uses Thereof」と題する、本明細書と共に同日に提出された、米国特許出願第13/815,768号に関し、これは、米国仮出願第61/741,806号に対する優先権を主張する。

【0003】

上記出願のそれぞれの主題は、その全体が参照によって組み込まれる。

【0004】

電子的に提供される配列表の参照による組み込み

配列表の電子バージョンは本明細書と共に提出され、この内容はそれらの全体が参照によって組み込まれる。電子ファイルは、サイズが1.68メガバイトであり、4941SEQPC1.txtという名称である。

【0005】

技術分野

修飾治療用タンパク質が提供される。特に、第X因子チモーゲン、第Xa因子および他の形態の第X因子を含む修飾第X因子ポリペプチド、およびその使用が提供される。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0006】

背景

止血は出血の停止につながる複雑な生理学的プロセスである。血小板、血漿タンパク質、および血管内皮細胞はこのプロセスの3つの構成成分であり、それぞれが、組織傷害の直後に起こり、通常の下で、血餅の迅速な形成をもたらす事象において重要な役割を果たす。これの中心は、特定の血漿タンパク質（または凝固因子）が、別の以前に活性化された凝固因子により「カスケード」において連続して活性化され、トロンビンの迅速な産生をもたらす一連のタンパク質分解事象である凝固カスケードである。次に、このカスケードにおいて産生された多量のトロンビンは、血餅形成のために必要とされるフィブリンペプチドにフィブリノーゲンを切断するように機能する。第X因子（FX）は、出血障害を処置するための治療薬として提案されており、凝固経路におけるその中心の役割のために、他の凝固因子治療薬よりも有利である。FXでの最近の処置は、安全なアプローチであると考えられるので、非活性化チモージェンの治療上の使用に基づいている。改善されたFX治療薬または代替のFX治療薬が必要とされている。

10

【発明の概要】

【0007】

概要

未修飾FXポリペプチドと比較して、改変した特性または活性、たとえば、増加した補因子（FVa）依存性、増加した半減期、阻害因子（たとえばアンチトロンビンIII）に対する増加した耐性および／または改変したグリコシル化を示す修飾または変異体第X因子（FX）ポリペプチドが、本明細書において提供される。本明細書において提供される修飾FXポリペプチドは、上記特性または活性のいずれか、または全てを示し得る。修飾FXポリペプチドは、その成熟、チモージェン、活性または活性化または触媒活性形態であり得る。

20

【0008】

たとえば、修飾FXポリペプチドの活性FX（FXa）形態が、アミノ酸置換を含まない修飾FXポリペプチドと同じであるFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍、10倍、20倍、30倍、40倍、および一般的に少なくとも50倍増加したFVa補因子依存性を示すように、未修飾FXポリペプチドにおいてアミノ酸置換を含む修飾FXポリペプチドが、本明細書において提供される。未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134に記載されているアミノ酸の配列を有するか、またはそのチモージェン、活性または触媒活性形態であり、または配列番号：134と少なくとも75%配列同一性を有するアミノ酸の配列を有するか、またはそのチモージェン、活性または触媒活性形態である。1つの例において、未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基143-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモージェンFXポリペプチド、または配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基143-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモージェンFXポリペプチドと少なくとも75%配列同一性を示すアミノ酸の配列であり得る。別の例において、未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基195-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含む活性FX（FXa）ポリペプチド、または配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基195-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むFXaと少なくとも75%配列同一性を示すアミノ酸の配列である。さらなる例において、未修飾FXaポリペプチドは、上記活性FXaに関して触媒活性である。未修飾FXポリペプチドのいずれかは、配列番号：134と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一

30

40

50

性、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態を有し得る。

【0009】

上記されている、および本明細書における修飾FXポリペプチドの特定の例において、修飾FXポリペプチドの成熟またはチモーゲン形態は、別のセリンプロテアーゼからの異種活性化ペプチドを含まない。他の例において、本明細書において、修飾FXポリペプチドの成熟またはチモーゲン形態は、修飾活性化ペプチドを含まない。本明細書におけるさらなる例において、修飾FXポリペプチドのFXa形態またはその触媒活性部分は、別のセリンプロテアーゼからの異種活性化ペプチドまたは修飾活性化ペプチドを含むチモーゲンFXポリペプチドから産生されない。修飾FXポリペプチドは、単離されていてもよく、実質的に精製されていてもよく、または精製されていてもよい。

10

【0010】

未修飾FXポリペプチドにおいてアミノ酸置換を含む単離された修飾活性第X因子(FXa)ポリペプチドであって、修飾FXポリペプチドの活性FX(FXa)形態は、アミノ酸置換を含まない修飾FXポリペプチドと同じであるFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、および一般的に少なくとも50倍増加したFVa補因子依存性のような、増加した補因子依存性を示す、単離された修飾活性第X因子(FXa)ポリペプチドもまた、本明細書において提供される。修飾FXaは、一般的に、活性化ペプチドを含まない。未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基195-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むFXaと少なくとも75%配列同一性を示すアミノ酸の配列、またはその触媒活性形態を含む活性FX(FXa)ポリペプチドであり得る。

20

【0011】

増加した補因子依存性を示す本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドの例において、補因子依存性は、未修飾ポリペプチドと比較して、少なくとも75倍、100倍、125倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍またはそれ以上増加している可能性がある。

【0012】

配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして位置196での天然アミノ酸残基、または未修飾FXポリペプチドにおいてアミノ酸残基196に対応する残基が、中性極性アミノ酸残基で置換されているポリペプチドは、本明細書において提供されるかかる修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドに含まれる。例えば、中性極性アミノ酸は、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、トリプトファン(W)、システイン(C)およびチロシン(Y)から選択され、一般的にセリン(S)またはトレオニン(T)である。対応するアミノ酸残基(すなわち、配列番号：4に記載されているものの以外のFXポリペプチドにおける位置196に対応するアミノ酸残基)は、配列番号：134のポリペプチドと未修飾FXポリペプチドのアラインメントにより同定される。これは図3において例示されている。例えば、配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして位置196に対応する位置でのSでのアミノ酸置換または位置196に対応する位置でのTでのアミノ酸置換、または196に対応する位置でのSまたはTを含まない未修飾FXポリペプチドにおいて対応するアミノ酸残基での同じアミノ酸置換を含む修飾FXポリペプチドが、本明細書において提供される。特定の例において、修飾FXポリペプチドは、配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして位置196に対応する位置でのSでのアミノ酸置換、または位置196に対応する位置でのSを含まない未修飾FXポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含む。

30

40

【0013】

本明細書において提供される、または上記されている修飾FXポリペプチドまたは単離されたFXポリペプチドの例において、ポリペプチドは、軽鎖においてまたは重鎖のプロ

50

テアーゼドメインにおいてさらなるアミノ酸置換を含むことができる。他の例において、位置 196 での上記アミノ酸置換は、ポリペプチドにおける修飾のみである。したがって、本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドは、同じ形態の未修飾 F X a ポリペプチド、例えば、配列番号：134 に記載されているアミノ酸の配列を有する未修飾ポリペプチド、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態と比較して、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、または 20 個のみのアミノ酸置換を含み得る。

【0014】

本明細書における例において、さらなるアミノ酸置換は、配列番号：134 に記載されているアミノ酸位置を基準にして位置 195 または 197 に対応する位置でのイソロイシン (I)、アラニン (A)、バリン (Valanine) (V)、セリン (S) またはトレオニン (T) での置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換に対応しない。さらなるアミノ酸置換は、改変したグリコシル化、阻害因子に対する増加した耐性および／または増加した触媒活性をもたらす、与える、または生じることができる。例えば、阻害因子に対する増加した耐性は、アンチトロンビン I I I (A T I I I) に対する増加した耐性であり得る。

【0015】

本明細書において特定の例において、本明細書に記載されているまたは上記されている修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドのいずれかは、配列番号：134 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、211、214、216、218、219、273、276、306、326、332、338、420 および 424 から選択される位置に対応するアミノ酸位置でアミノ酸置換を有し、対応するアミノ酸位置は、配列番号：134 に記載されているポリペプチドと未修飾 F X ポリペプチドのアラインメントにより同定される。例えば、アミノ酸置換は、配列番号：134 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 211 に対応する位置での S；位置 214 に対応する位置での D；位置 214 に対応する位置での A；位置 214 に対応する位置での S；位置 216 に対応する位置での R；位置 216 に対応する位置での K；位置 216 に対応する位置での A；位置 216 に対応する位置での S；位置 218 に対応する位置での R；位置 218 に対応する位置での K；位置 218 に対応する位置での A；位置 219 に対応する位置での H；位置 273 に対応する位置での A；位置 273 に対応する位置での E；位置 276 に対応する位置での A；位置 276 に対応する位置での E；位置 306 に対応する位置での E；位置 326 に対応する位置での S；位置 326 に対応する位置での T；位置 326 に対応する位置での V；位置 326 に対応する位置での Q；位置 326 に対応する位置での N；位置 326 に対応する位置での M；位置 326 に対応する位置での K；位置 326 に対応する位置での Y；位置 326 に対応する位置での E；位置 326 に対応する位置での D；位置 332 に対応する位置での A；位置 332 に対応する位置での D；位置 332 に対応する位置での E；位置 332 に対応する位置での S；位置 332 に対応する位置での G；位置 338 に対応する位置での A；位置 338 に対応する位置での S；位置 338 に対応する位置での N；位置 338 に対応する位置での R；位置 338 に対応する位置での V；位置 338 に対応する位置での Y；位置 338 に対応する位置での M；位置 420 に対応する位置での A；位置 420 に対応する位置での E；位置 424 に対応する位置での A；または位置 424 に対応する位置での E でのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換であり得る。

【0016】

例えば、上記のものを含む、本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：134 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 196 に対応する位置での S、位置 211 に対応する位置での S および位置 219 に対応する位置での H；位置 196 に対応する位置での S および位置 214 に対応する位置での D；位置 196 に対応する位置での S および位置 214 に対応する位置

10

20

30

40

50

でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置214に対応する位置でのS；位置196に対応する位置でのSおよび位置216に対応する位置でのR；位置196に対応する位置でのSおよび位置216に対応する位置でのK；位置196に対応する位置でのSおよび位置216に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置216に対応する位置でのS；位置196に対応する位置でのSおよび位置218に対応する位置でのR；位置196に対応する位置でのSおよび位置218に対応する位置でのK；位置196に対応する位置でのSおよび位置218に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置273に対応する位置でのE；位置196に対応する位置でのSおよび位置273に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置276に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置276に対応する位置でのE；位置196に対応する位置でのSおよび位置306に対応する位置でのE；位置196に対応する位置でのSおよび位置326に対応する位置でのE；位置196に対応する位置でのSおよび位置326に対応する位置でのD；位置196に対応する位置でのSおよび位置326に対応する位置でのM；位置196に対応する位置でのSおよび位置326に対応する位置でのN；位置196に対応する位置でのSおよび位置326に対応する位置でのQ；位置196に対応する位置でのSおよび位置332に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置332に対応する位置でのD；位置196に対応する位置でのSおよび位置332に対応する位置でのE；位置196に対応する位置でのSおよび位置332に対応する位置でのS；位置196に対応する位置でのSおよび位置332に対応する位置でのG；位置196に対応する位置でのSおよび位置338に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置338に対応する位置でのS；位置196に対応する位置でのSおよび位置420に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置420に対応する位置でのE；位置196に対応する位置でのSおよび位置424に対応する位置でのA；位置196に対応する位置でのSおよび位置424に対応する位置でのE；または位置196に対応する位置でのS、位置420に対応する位置でのEおよび位置424に対応する位置でのEでのアミノ酸置換、または未修飾FXポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じアミノ酸置換、または未修飾FXポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含むFXポリペプチドである。

【0017】

上記のものを含む、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドにおいて、修飾FXポリペプチドは、非天然グリコシル化部位の導入によりグリコシル化を改変するアミノ酸置換を含み得る。例えば、非天然グリコシル化部位は、配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置51に対応する位置でのN；位置56に対応する位置でのNおよび位置58に対応する位置でのS；位置62に対応する位置でのNおよび位置64に対応する位置でのS；位置65に対応する位置でのNおよび位置67に対応する位置でのS；位置67に対応する位置でのN；位置73に対応する位置でのNおよび位置75に対応する位置でのS；位置75に対応する位置でのNおよび位置77に対応する位置でのS；位置77に対応する位置でのNおよび位置79に対応する位置でのS；位置78に対応する位置でのNおよび位置80に対応する位置でのS；位置82に対応する位置でのS；位置83に対応する位置でのN；位置82に対応する位置でのNおよび位置84に対応する位置でのS；位置85に対応する位置でのNおよび位置87に対応する位置でのS；位置86に対応する位置でのNおよび位置88に対応する位置でのS；位置95に対応する位置でのNおよび位置97に対応する位置でのS；位置114に対応する位置でのN；位置119に対応する位置でのNおよび位置121に対応する位置でのS；位置122に対応する位置でのS；位置215に対応する位置でのNおよび位置217に対応する位置でのS；位置243に対応する位置でのNおよび位置245に対応する位置でのS；位置264に対応する位置でのNおよび位置266に対応する位置でのS；位置293に対応する位置でのNおよび位置295に対応する位置でのS；位置388に対応する位置でのN；位置389に対応する位置でのNお

よび位置 3 9 1 に対応する位置での S ; 位置 4 2 8 に対応する位置での N および位置 4 3 0 に対応する位置での S ; または位置 4 2 9 に対応する位置での N および位置 4 3 1 に対応する位置での S でのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換により導入され得る。

【0018】

例えば、上記のものを含む、本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 5 1 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 5 6 に対応する位置での N および位置 5 8 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 5 8 に対応する位置での N および位置 6 0 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 6 2 に対応する位置での N および位置 6 4 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 6 5 に対応する位置での N および位置 6 7 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 6 7 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 7 3 に対応する位置での N および位置 7 5 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 7 5 に対応する位置での N および位置 7 7 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 7 7 に対応する位置での N および位置 7 9 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 7 8 に対応する位置での N および位置 8 0 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 8 2 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 8 3 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 8 2 に対応する位置での N および位置 8 4 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 8 5 に対応する位置での N および位置 8 7 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 8 6 に対応する位置での N および位置 8 8 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 9 5 に対応する位置での N および位置 9 7 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 1 1 4 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 9 に対応する位置での N および位置 1 2 1 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 1 1 9 に対応する位置での N および位置 1 2 1 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 1 2 2 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 5 に対応する位置での N および位置 2 1 7 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 4 3 に対応する位置での N および位置 2 4 5 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N および

10

20

30

40

50

位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 6 4 に対応する位置での N、位置 2 6 6 に対応する位置での S および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 9 3 に対応する位置での N および位置 2 9 5 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N、位置 2 6 6 に対応する位置での S および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 3 8 9 に対応する位置での N および位置 3 9 1 に対応する位置での S ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 4 2 8 に対応する位置での N および位置 4 3 0 に対応する位置での S ; または位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 4 2 9 に対応する位置での N および位置 4 3 1 に対応する位置での S でのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含む修飾 F X ポリペプチドである。

10

【0019】

20

1 つの例において、配列番号 : 1 3 7 - 1 5 7、1 6 9、2 0 5 - 2 0 8、2 1 4 - 2 4 3 および 2 4 6 - 2 6 5 のいずれかにおいて記載されているアミノ酸の配列、または配列番号 : 1 3 7 - 1 5 7、1 6 9、2 0 5 - 2 0 8、2 1 4 - 2 4 3 および 2 4 6 - 2 6 5 のいずれかにおいて記載されているアミノ酸の配列のいずれかと少なくとも 7 5 % 配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を含む修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。別の例において、配列番号 : 1 3 7 - 1 5 7、1 6 9、2 0 5 - 2 0 8、2 1 4 - 2 4 3 および 2 4 6 - 2 6 5 のいずれかの残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基 1 4 3 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列、または配列番号 : 1 3 7 - 1 5 7、1 6 9、2 0 5 - 2 0 8、2 1 4 - 2 4 3 および 2 4 6 - 2 6 5 のいずれかの残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基 1 4 3 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列のいずれかと少なくとも 7 5 % 配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を含む修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。さらなる例において、配列番号 : 1 3 7 - 1 5 7、1 6 9、2 0 5 - 2 0 8、2 1 4 - 2 4 3 および 2 4 6 - 2 6 5 のいずれかの残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基 1 9 5 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列、または配列番号 : 1 3 7 - 1 5 7、1 6 9、2 0 5 - 2 0 8、2 1 4 - 2 4 3 および 2 4 6 - 2 6 5 のいずれかの残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基 1 9 5 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列のいずれかと少なくとも 7 5 % 配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を含む修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。さらなる例において、修飾を含み、触媒活性を示す上記形態のいずれかの触媒活性形態を含む修飾 F X ポリペプチドまたは単離された修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。

30

40

【0020】

配列番号 : 1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして 1 9 8、2 0 2、2 1 1、2 1 4、2 1 7、2 1 9、3 2 7 および / または 3 3 8 である天然アミノ酸残基、またはアミノ酸残基 1 9 8、2 0 2、2 1 1、2 1 4、2 1 7、2 1 9、3 2 7 および / または 3 3 8 に相当する残基での未修飾 F X ポリペプチドにおいてアミノ酸置換を含み、それ

50

により修飾 F X ポリペプチドは F V a 依存性触媒活性を示す修飾第 X 因子 (F X) ポリペプチドが、本明細書において提供される。かかる例において、対応するアミノ酸残基は、たとえば図 3 において例示されている、配列番号：1 3 4 のポリペプチドと未修飾 F X ポリペプチドのアラインメントにより同定される。未修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸の配列を有するか、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態であり、または配列番号：1 3 4 と少なくとも 7 5 % 配列同一性を有するアミノ酸の配列を有するか、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態である。1 つの例において、未修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：1 3 4 の残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：1 3 4 の残基 1 4 3 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモーゲン F X ポリペプチド、または配列番号：1 3 4 の残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：1 3 4 の残基 1 4 3 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモーゲン F X ポリペプチドと少なくとも 7 5 % 配列同一性を示すアミノ酸の配列であり得る。別の例において、未修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：1 3 4 の残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：1 3 4 の残基 1 9 5 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含む活性 F X (F X a) ポリペプチド、または配列番号：1 3 4 の残基 1 - 1 3 9 として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：1 3 4 の残基 1 9 5 - 4 4 8 として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含む F X a と少なくとも 7 5 % 配列同一性を示すアミノ酸の配列である。さらなる例において、未修飾 F X a ポリペプチドは、上記活性 F X a に関して触媒活性である。未修飾 F X ポリペプチドのいずれかは、配列番号：1 3 4 と少なくとも 8 0 %、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 % またはそれ以上の配列同一性、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態を有し得る。かかる修飾 F X ポリペプチドは、単離されていてもよく、または実質的に精製されていてもよい。

【0 0 2 1】

例えば、本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 2 0 2 に対応する位置での S；位置 2 1 1 に対応する位置での S；位置 2 1 4 に対応する位置での D；位置 2 1 4 に対応する位置での A；位置 2 1 4 に対応する位置での S；位置 2 1 7 に対応する位置での S；位置 2 1 9 に対応する位置での H；位置 3 2 7 に対応する位置での A；位置 3 2 7 に対応する位置での L；位置 3 3 8 に対応する位置での A；位置 3 3 8 に対応する位置での S；位置 3 3 8 に対応する位置での N；位置 3 3 8 に対応する位置での R；位置 3 3 8 に対応する位置での V；位置 3 3 8 に対応する位置での Y および位置 3 3 8 に対応する位置での M でのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含む。

【0 0 2 2】

本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドの特定の例において、修飾 F X ポリペプチドは、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H でのアミノ酸置換、配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含む。例えば、本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドは、配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H；位置 1 9 7 に対応する位置での A、位置 2 1 4 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H；または位置 1 9 5 に対応する位置での L、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H でのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含むものを含む。

【0 0 2 3】

本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドの他の例において、修飾 F X ポリペ

10

20

30

40

50

プチドは、配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置327に対応する位置でのAおよび位置338に対応する位置でのAでのアミノ酸置換；または位置327に対応する位置でのLおよび位置338に対応する位置でのMでのアミノ酸置換、または未修飾FXポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換を含む。例えば、位置200に対応する位置でのV、位置327に対応する位置でのLおよび位置338に対応する位置でのMでのアミノ酸置換；または位置200に対応する位置でのV、位置327に対応する位置でのL、位置334に対応する位置でのAおよび位置338に対応する位置でのMでのアミノ酸置換を含む修飾FXポリペプチドが、本明細書において提供される。

【0024】

配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置197に対応する位置でのS；位置200に対応する位置でのA；位置200に対応する位置でのV；位置326に対応する位置でのS；位置326に対応する位置でのT；位置326に対応する位置でのV；位置326に対応する位置でのN、位置326に対応する位置でのM；位置326に対応する位置でのK；位置326に対応する位置でのY；位置327に対応する位置でのA；位置327に対応する位置でのL；位置334に対応する位置でのA；位置334に対応する位置でのT；位置334に対応する位置でのN；位置336に対応する位置でのE；位置338に対応する位置でのA；位置338に対応する位置でのS；位置338に対応する位置でのN；位置338に対応する位置でのR；位置338に対応する位置でのV；位置338に対応する位置でのY；および／または位置338に対応する位置でのM、または未修飾FXポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換であり、それにより、修飾FXポリペプチドがFVa依存性触媒活性を示す、未修飾FXポリペプチドにおいてアミノ酸置換を含む修飾FX因子（FX）ポリペプチドが、本明細書において提供される。かかる例において、対応するアミノ酸残基は、たとえば図3において例示される、配列番号：134のポリペプチドと未修飾FXポリペプチドのアラインメントにより同定される。未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134に記載されているアミノ酸の配列を有するか、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態であり、または配列番号：134と少なくとも75%配列同一性を有するアミノ酸の配列を有するか、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態である。1つの例において、未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基143-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモーゲンFXポリペプチド、または配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および、配列番号：134の残基143-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むチモーゲンFXポリペプチドと少なくとも75%配列同一性を示すアミノ酸の配列であり得る。別の例において、未修飾FXポリペプチドは、配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基195-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含む活性FX（FXa）ポリペプチド、または配列番号：134の残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖、および配列番号：134の残基195-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むFXaと少なくとも75%配列同一性を示すアミノ酸の配列である。さらなる例において、未修飾FXaポリペプチドは、上記活性FXaに関して触媒活性である。未修飾FXポリペプチドのいずれかは、配列番号：134と少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性、またはそのチモーゲン、活性または触媒活性形態を有し得る。かかる修飾FXポリペプチドは、単離されていてもよく、または実質的に精製されていてもよい。

【0025】

本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのかかる例において、修飾FXポリペプチドはまた、アミノ酸置換、位置196に対応する位置でのS、位置196に対応す

10

20

30

40

50

る位置での I ; 位置 1 9 6 に対応する位置での L ; 位置 1 9 6 に対応する位置での T ; 位置 3 2 6 に対応する位置での A および / または位置 3 2 6 に対応する位置での Q を含み得る。

【0026】

F V a 依存性触媒活性を示すものを含む本明細書において提供される修飾 F X ポリペプチドは、非天然グリコシル化部位の導入によりグリコシル化を改変するアミノ酸置換を含み得る。例えば、非天然グリコシル化部位は、配列番号：1 3 4 に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置 5 1 に対応する位置での N ; 位置 5 6 に対応する位置での N および位置 5 8 に対応する位置での S ; 位置 6 2 に対応する位置での N および位置 6 4 に対応する位置での S ; 位置 6 5 に対応する位置での N および位置 6 7 に対応する位置での S ; 位置 6 7 に対応する位置での N ; 位置 7 3 に対応する位置での N および位置 7 5 に対応する位置での S ; 位置 7 5 に対応する位置での N および位置 7 7 に対応する位置での S ; 位置 7 7 に対応する位置での N および位置 7 9 に対応する位置での S ; 位置 7 8 に対応する位置での N および位置 8 0 に対応する位置での S ; 位置 8 2 に対応する位置での S ; 位置 8 3 に対応する位置での N ; 位置 8 2 に対応する位置での N および位置 8 4 に対応する位置での S ; 位置 8 5 に対応する位置での N および位置 8 7 に対応する位置での S ; 位置 8 6 に対応する位置での N および位置 8 8 に対応する位置での S ; 位置 9 5 に対応する位置での N および位置 9 7 に対応する位置での S ; 位置 1 1 4 に対応する位置での N ; 位置 1 1 9 に対応する位置での N および位置 1 2 1 に対応する位置での S ; 位置 1 2 2 に対応する位置での S ; 位置 2 1 5 に対応する位置での N および位置 2 1 7 に対応する位置での S ; 位置 2 4 3 に対応する位置での N および位置 2 4 5 に対応する位置での S ; 位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 2 9 3 に対応する位置での N および位置 2 9 5 に対応する位置での S ; 位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 3 8 9 に対応する位置での N および位置 3 9 1 に対応する位置での S ; 位置 4 2 8 に対応する位置での N および位置 4 3 0 に対応する位置での S ; または位置 4 2 9 に対応する位置での N および位置 4 3 1 に対応する位置での S でのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換により導入され得る。

【0027】

例えば、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H ; 位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H ; 位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S および位置 2 1 9 に対応する位置での H ; 位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N および位置 2 6 6 に対応する位置での S ; 位置 1 1 9 に対応する位置での N、位置 1 2 1 に対応する位置での S、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; 位置 1 1 4 に対応する位置での N、位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H および位置 3 8 8 に対応する位置での N ; または位置 1 9 6 に対応する位置での S、位置 2 1 1 に対応する位置での S、位置 2 1 9 に対応する位置での H、位置 2 6 4 に対応する位置での N、位置 2 6 6 に対応する位置での S および位置 3 8 8 に対応する位置での N でのアミノ酸置換を含む修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。

10

20

30

40

50

【0028】

非天然グリコシル化部位の導入によりグリコシル化を改変するアミノ酸置換を含むが、F V a 依存性触媒活性を維持しているか、または示す修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。例えば、配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして、位置51に対応する位置でのN；位置56に対応する位置でのNおよび位置58に対応する位置でのS；位置62に対応する位置でのNおよび位置64に対応する位置でのS；位置65に対応する位置でのNおよび位置67に対応する位置でのS；位置67に対応する位置でのN；位置73に対応する位置でのNおよび位置75に対応する位置でのS；位置75に対応する位置でのNおよび位置77に対応する位置でのS；位置77に対応する位置でのNおよび位置79に対応する位置でのS；位置78に対応する位置でのNおよび位置80に対応する位置でのS；位置82に対応する位置でのS；位置83に対応する位置でのN；位置82に対応する位置でのNおよび位置84に対応する位置でのS；位置85に対応する位置でのNおよび位置87に対応する位置でのS；位置86に対応する位置でのNおよび位置88に対応する位置でのS；位置95に対応する位置でのNおよび位置97に対応する位置でのS；位置114に対応する位置でのN；位置119に対応する位置でのNおよび位置121に対応する位置でのS；位置122に対応する位置でのS；位置215に対応する位置でのNおよび位置217に対応する位置でのS；位置243に対応する位置でのNおよび位置245に対応する位置でのS；位置264に対応する位置でのNおよび位置266に対応する位置でのS；位置293に対応する位置でのNおよび位置295に対応する位置でのS；位置388に対応する位置でのN；位置389に対応する位置でのNおよび位置391に対応する位置でのS；位置428に対応する位置でのNおよび位置430に対応する位置でのS；または位置429に対応する位置でのNおよび位置431に対応する位置でのSでのアミノ酸置換、または未修飾 F X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換により導入される非天然グリコシル化部位を含む修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。

10

20

【0029】

単離されたまたは実質的に精製された形態を含む修飾 F X ポリペプチドの中で、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のみのアミノ酸置換を含むものが、本明細書において提供される。1つの例において、配列番号：164、173、174、176、177、179-181、183-190、192-203、205-209、213、259-261および263-265のいずれかにおいて記載されているアミノ酸の配列、または配列番号：164、173、174、176、177、179-181、183-190、192-203、205-209、213、259-261および263-265のいずれかにおいて記載されているアミノ酸の配列のいずれかと少なくとも75%配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を有する修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。別の例において、配列番号：164、173、174、176、177、179-181、183-190、192-203、205-209、213、259-261および263-265のいずれかの残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基143-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列、または配列番号：164、173、174、176、177、179-181、183-190、192-203、205-209、213、259-261および263-265のいずれかの残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基143-448として記載されているアミノ酸の配列のいずれかと少なくとも75%配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を有する修飾 F X ポリペプチドが、本明細書において提供される。さらなる例において、配列番号：164、173、174、176、177、179-181、183-190、192-203、205-209、213、259-261および263-265のいずれかの残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基195-448として記載さ

30

40

50

れているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列、または配列番号：164、173、174、176、177、179-181、183-190、192-203、205-209、213、259-261および263-265のいずれかの残基1-139として記載されているアミノ酸の配列を含む軽鎖および残基195-448として記載されているアミノ酸の配列を含む重鎖を含むアミノ酸の配列のいずれかと少なくとも75%配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を有する修飾FXポリペプチドが、本明細書において提供される。さらなる例において、上記ポリペプチドのいずれかの触媒活性形態であり、アミノ酸置換を含み、触媒活性を示す修飾FXポリペプチドが、本明細書において提供される。

【0030】

10

本明細書において提供される例において、修飾FXポリペプチドは、FXa形態または触媒活性断片のとき、アミノ酸置換を含まない同じFXaポリペプチドと比較して、増加したFVa補因子依存性を示す、ものを含む。例えば、補因子依存性は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1200倍または1500倍増加されている。

【0031】

本明細書において提供される例において、修飾FXポリペプチドは、活性FX (FXa) 形態または触媒活性的に (catalytically) 活性な断片において、アミノ酸置換を含まない同じFXaポリペプチドと比較して、阻害因子、たとえばアンチトロンビンIII (AT-III) またはTFPIに対する増加した耐性を示す、ものを含む。阻害因子耐性は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、5000倍、5500倍または6000倍増加している。

20

【0032】

本明細書において提供される例において、修飾FXポリペプチドは、活性FX (FXa) 形態または触媒活性的に活性な断片において、アミノ酸置換を含まない同じFXaの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%またはそれ以上の触媒活性を示す、ものを含む。1つの例において、触媒活性はFVaの存在下である。別の例において、触媒活性はFVaの非存在下である。

30

【0033】

本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドの例において、修飾FXポリペプチドは、配列番号：134に記載されているアミノ酸位置を基準にして位置195に対応する位置でのロイシン (L) でのアミノ酸置換、または未修飾FXポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での同じ置換をさらに含む得る。

【0034】

40

本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドの例において、修飾ポリペプチドは、ヒトポリペプチドであってよく、また非ヒトポリペプチドであってよい。いくつかの例において、修飾FXポリペプチドはチモーゲンポリペプチドである。他の例において、修飾FXポリペプチドは、活性であるまたは活性化されている、例えば、修飾FXポリペプチドは、重鎖における活性化ペプチドを欠くまたは含まない。かかる例において、活性化は、TF/FVIIaまたはFVIIa/FIXaテナーゼ (tenase) 複合体またはラッセルクサリヘビ蛇毒 (Russell's Viper Venom) FX活性化因子によるタンパク質分解性の切断によって達成され得る。いくつかの例において、修飾FXポリペプチドは二重鎖ポリペプチドである。他の例において、修飾FXポリペプチドは一本鎖ポリペプチドである。

50

【0035】

本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドの例において、一次配列のみが修飾されている。本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドのいずれかの他の例において、ポリペプチドは、化学修飾または翻訳後修飾をさらに含み得る。例えば、修飾FXポリペプチドは、グリコシル化されている、カルボキシル化されている、ヒドロキシル化されている、硫酸化されている、リン酸化されている、アルブミン化されている、またはポリエチレングリコール（PEG）部分にコンジュゲートされている。本明細書において提供される修飾FXポリペプチドまたは単離された修飾FXポリペプチドのさらなる例において、ポリペプチドはキメラタンパク質または融合タンパク質である。

10

【0036】

上記されているものまたは本明細書において他に記載されているものを含む、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのいずれかをコードするヌクレオチドの配列を含む核酸分子が、本明細書において提供される。かかる核酸分子を含むベクターもまた、本明細書において提供される。ベクターは、原核生物ベクター、ウイルスベクター、または真核ベクターであり得る。ベクターは、哺乳動物ベクターであり得る。例において、ベクターがウイルスベクターである場合、それは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、またはサイトメガロウイルスベクターであり得る。

【0037】

20

上記核酸分子またはベクターのいずれかを含む単離細胞もまた、本明細書において提供される。細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞であり得る。哺乳動物細胞は、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK-21）または293細胞またはCHO細胞であり得る。細胞は、修飾FXポリペプチドを発現することができる。したがって、本明細書において提供される細胞によって産生される修飾FXポリペプチドもまた、本明細書において提供される。

【0038】

薬学的に許容される媒体中に本明細書において提供される修飾FXポリペプチド、本明細書において提供される核酸または本明細書において提供されるベクターのいずれかを含む医薬組成物が、本明細書において提供される。医薬組成物は、局所的投与、全身投与、または局所投与用に製剤されていてよい。例えば、製剤は、経口投与、経鼻投与、経肺投与、頬側投与、経皮投与、皮下投与、十二指腸内投与、経腸投与、非経口投与、静脈内投与、または筋肉内投与用に製剤されている。いくつかの例において、医薬組成物は、徐放性用に製剤されている組成物であり得る。他の例において、医薬組成物は、単一投薬量投与用に製剤されている。本明細書において提供される組成物は、活性FXaであり、活性化ポリペプチドを含まないアミノ酸置換を含む修飾FXポリペプチドにおけるあらゆるものを含む。組成物は医薬組成物であり得る。

30

【0039】

a) 配列番号：134に記載されているアミノ酸の配列1-139、または配列番号：134のアミノ酸1-139の配列と少なくとも75%配列同一性を示し、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を有する軽鎖、および配列番号：136-265のいずれかのアミノ酸143-448の配列、または配列番号：136-265のいずれかのアミノ酸143-448の配列と少なくとも75%配列同一性を示し、未修飾FXポリペプチドと比較して、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を有する重鎖を含む修飾FXチモーゲンを含む組成物を提供すること；b) チモーゲンの活性化切断によりポリペプチドから活性化ペプチドを取り出し、それにより修飾FXaポリペプチドを産生すること、による、修飾活性第X因子（FXa）ポリペプチドを産生する方法が、本明細書において提供される。方法において使用されるFXチモーゲンは、配列番号：4-133、136-265および417-546のいずれかにおいて記載されているポリペプチドをコードする核酸、または配列番号：4-133、136-265および417-546のいずれかと少なくとも7

40

50

5%配列同一性を有し、未修飾FXポリペプチドと比較して、アミノ酸置換を含むアミノ酸の配列を有するポリペプチドをコードする核酸の発現により産生される修飾FXチモーゲンを含む。本明細書において提供される方法において、活性化ペプチドの取り出しによる活性化切断は、インビボまたはインビトロにおいて達成され得る。例えば、活性化切断は、TF/FVIIaまたはFVIIa/FIXaテナーゼ複合体から選択される活性化因子またはラッセルクサリヘビ蛇毒FX活性化因子によって達成され得る。本明細書において提供される方法は、組成物から活性化因子を取り出す工程を含むことができる。本明細書における方法はまた、組成物から活性化ペプチドを取り出す工程を含むことができる。

【0040】

10

本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのいずれか、または本明細書において提供される医薬組成物のいずれかを対象に投与することにより、疾患または状態、すなわち出血障害を処置する方法が、本明細書において提供される。方法において使用される修飾FXポリペプチドは、アミノ酸置換を含むそのチモーゲン、FXaまたは触媒活性部分であり得る。本明細書における方法において、ポリペプチドまたは医薬組成物での処置は、疾患または状態と関連する症状を改善または緩和する。本明細書において提供される方法はまた、出血障害と関連する症状における変化について対象をモニタリングすることを含む。

【0041】

出血障害を処置する本明細書において提供される方法において、出血障害は先天性出血障害または後天性出血障害である。例えば、出血障害は、凝固因子の欠損による障害、凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による障害、血液疾患、出血性障害、フォン・ヴィレブランド病、ビタミンKアンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する障害、遺伝的血小板障害、ビタミンKエポキシドレダクターゼC1欠損症、ガンマーカルボキシラーゼ欠損症、外傷と関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、卒中(stroke)、血液凝固障害、播種性血管内凝固症候群(DIC)、ベルナール・スーリエ症候群、グランツマン血小板無力症または貯蔵プール欠損症であり得る。例において、出血障害が、凝固因子の欠損によるか、または凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による場合、凝固因子は、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第V因子、第XII因子、第I因子またはフォン・ヴィレブランド因子である。例において、出血障害が、凝固因子の欠損による場合、凝固因子は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第XI因子であり得る。例えば、出血障害は、血友病A、血友病Bまたは血友病Cである。

20

30

【0042】

本明細書における方法の例において、出血障害が凝固因子の欠損による場合、障害は家族性多発性凝固因子欠損症(FMFD)である。本明細書における例において、出血障害が凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による場合、凝固因子は、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、および第XII因子である。かかる例において、後天性阻害因子は自己抗体である。例えば、出血障害は後天性血友病である。本明細書における方法の例において、出血障害が遺伝的血小板障害である場合、それは、チェディアック・ヒガシ症候群、ハーマンスキー・パドラック症候群、トロンボキサンA2機能障害、グランツマン血小板無力症、およびベルナール・スーリエ症候群であり得る。本明細書における他の例において、障害が、ビタミンKアンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する場合、ビタミンKアンタゴニストは、ヘパリン、五糖類、ワルファリン、小分子抗血栓薬およびFXa阻害因子であり得る。

40

【0043】

本明細書における方法の他の例において、障害は、血栓症、血小板減少症、卒中および血液凝固障害である。本明細書における方法のさらなる例において、出血障害は、外傷、手術または創傷に由来する。かかる例において、例えば、出血は、急性関節血症、慢性血友病性関節症、血腫、血尿症、中枢神経系出血、消化管出血、または脳出血として見られる。他の例において、出血は抜歯による。本明細書における他の例において、出血障害が

50

手術による場合、手術は、心臓手術、血管形成術、肺手術、腹部手術、脊髄手術、脳外科手術、血管手術、口腔外科、または臓器移植手術である。例えば、移植手術は、骨髄、心臓、肺、脾臓、または肝臓の移植による。

【0044】

出血障害を処置ための方法の本明細書における例において、修飾FXポリペプチドは、未修飾FXポリペプチドと比較して、増加した半減期を示すことができる。例えば、増加した半減期は、A T - I I I に対する増加した耐性によって、または導入された非天然グリコシル化部位のグリコシル化による高グリコシル化(hyperglycosylation)によって達成される。

【0045】

出血障害を処置ための方法の本明細書における例において、方法はまた、1つまたは複数のさらなる凝固因子を投与することを含み得る。例えば、1つまたは複数のさらなる凝固因子は、血漿精製凝固因子または組換え凝固因子、ビタミンK、ビタミンK誘導体、およびプロテインC阻害因子などの凝血促進薬、血漿、血小板、赤血球またはコルチコステロイドであり得る。

【0046】

本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのいずれかの医薬用途もまた、本明細書において提供される。1つの例において、出血障害を処置することにおける使用のための、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのいずれかが、本明細書において提供される。他の例において、出血障害の処置のための医薬の製造における、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのいずれかを含む医薬組成物の使用が、本明細書において提供される。本明細書において提供される医薬用途において、修飾FXポリペプチドは、アミノ酸置換を含むそのチモーゲン、FXaまたは触媒活性形態である。

【0047】

出血障害を処置するための本明細書において提供される使用または使用のためのポリペプチドにおいて、出血障害は先天性出血障害または後天性出血障害である。例えば、出血障害は、凝固因子の欠損による障害、凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による障害、血液疾患、出血性障害、フォン・ヴィレブランド病、ビタミンKアンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する障害、遺伝的血小板障害、ビタミンKエポキシドレダクターゼC1欠損症、ガンマーカルボキシラーゼ欠損症、外傷と関連する出血、損傷、血栓症、血小板減少症、卒中、血液凝固障害、播種性血管内凝固症候群(DIC)、ベルナル・スーリエ症候群、グランツマン血小板無力症または貯蔵プール欠損症であり得る。例において、出血障害が、凝固因子の欠損によるか、または凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による場合、凝固因子は、第V I I 因子、第I X 因子、第X 因子、第X I 因子、第V 因子、第X I I 因子、第I I 因子またはフォン・ヴィレブランド因子である。例において、出血障害が、凝固因子の欠損による場合、凝固因子は、第V I I 因子、第V I I I 因子、第I X 因子、第X I 因子であり得る。例えば、出血障害は、血友病A、血友病Bまたは血友病Cである。

【0048】

出血障害を処置するための本明細書において提供される使用または使用のためのポリペプチドの例において、出血障害が凝固因子の欠損による場合、障害は家族性多発性凝固因子欠損症(FMFD)である。本明細書における例において、出血障害が、凝固因子に対する後天性阻害因子の存在による場合、凝固因子は、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、および第X I I 因子である。かかる例において、後天性阻害因子は自己抗体である。例えば、出血障害は後天性血友病である。本明細書において提供される使用または使用のためのポリペプチドの例において、出血障害が遺伝的血小板障害である場合、それは、チェディアック・ヒガシ症候群、ハーマンスキー・パドラック症候群、トロンボキサンA2機能障害、グランツマン血小板無力症、およびベルナル・スーリエ症候群であり得る。本明細書における他の例において、障害が、ビタミンKアンタゴニストを有する抗凝固薬治療に由来する場合、ビタミンKアンタゴニストは、ヘパ

10

20

30

40

50

リン、五糖類、ワルファリン、小分子抗血栓薬およびFXa阻害因子であり得る。

【0049】

出血障害を処置するための本明細書において提供される使用または使用のためのポリペプチドの他の例において、障害は、血栓症、血小板減少症、卒中および血液凝固障害である。さらなる例において、出血障害は、外傷、手術または創傷に由来する。かかる例において、例えば、出血は、急性関節血症、慢性血友病性関節症、血腫、血尿症、中枢神経系出血、消化管出血、または脳出血として見られる。本明細書における他の例において、出血は抜歯による出血である、本明細書における他の例において、出血障害が手術によるとき、手術は、心臓手術、血管形成術、肺手術、腹部手術、脊髄手術、脳外科手術、血管手術、口腔外科、または臓器移植手術である。例えば、移植手術は、骨髄、心臓、肺、脾臓、または肝臓の移植による。

10

【0050】

出血障害を処置するための本明細書において提供される使用または使用のためのポリペプチドの本明細書における例において、修飾FXポリペプチドは、未修飾FXポリペプチドと比較して、増加した半減期を示すことができる。例えば、増加した半減期は、AT-IIIに対する増加した耐性によって、または導入された非天然グリコシル化部位のグリコシル化による高グリコシル化によって達成される。

【0051】

包装材料および包装材料内に含有される本明細書において提供される修飾FXポリペプチドのいずれかを含む医薬組成物のいずれかを含む製品が、本明細書において提供される。本明細書において提供される製品の例において、修飾FXポリペプチドは、出血障害の処置のために有効であり、包装材料は、修飾FXポリペプチドが出血障害の処置に使用されることを示すラベルを含む。本明細書における医薬組成物のいずれか、組成物の投与のためのデバイスを含み、投与のための説明書を含んでいてもよいキットも、本明細書において提供される。

20

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、ジスルフィド結合により連結された軽鎖および重鎖を含む第X因子チモーゲン形態の構造的描写である (Venkateswarluら, Biophysical Journal 82:1190-1206 (2002)から採用)。突然変異誘発に対して標的化されるアミノ酸残基は強調されている。

30

配列番号：134に記載されている成熟ヒトチモーゲンを基準にして、軽鎖は130アミノ酸（配列番号：134の残基1-139に対応する）であり、重鎖は306アミノ酸（配列番号：134の残基143-448に対応する）である。軽鎖は、γ-カルボキシグルタミン酸（GLA）-リッチドメイン（配列番号：134の残基1-39に対応する）、次に、短い疎水性スタック(stack)（配列番号：134の残基40-45に対応する）および2つの上皮成長因子（EGF）様ドメイン：EGF1（配列番号：134のアミノ酸46-84に対応する）およびEGF2（配列番号：134のアミノ酸85-128に対応する）を含む。重鎖は、重鎖のアミノ末端で52アミノ酸残基活性化を含む。重鎖はまた、配列番号：134のIle195に対応する残基で始まる触媒ドメインを含む。FXの軽鎖および重鎖は、配列番号：134に記載されているアミノ酸残基を基準にして（軽鎖の）Cys132および（重鎖の）Cys302間のジスルフィド結合により連結されているままである。FXの活性第X因子（FXa）形態は、第X因子チモーゲン形態の構造的特徴を含むが、重鎖部分は活性化ペプチドを欠いており、したがって配列番号：134に記載されている成熟第X因子において疎水性残基Ile195-G198に対応する新規N-末端で開始する触媒ドメインのみ（キモトリプシン様セリンプロテアーゼドメインとも称される；配列番号：134の残基195-448に対応する）を含む。FXaのコンホメーションはまた、配列番号：134に記載されている残基に対応する触媒ドメインの内部においてIle195およびAsp378のα-NH₂基間の塩橋の形成によってFXチモーゲンと異なる。塩橋形成は、活性化ドメインの再配列、触媒作用のために必要とされるオキシアニオンホール形成、および基質結合部位の形成（S1-S4

40

50

）を含む触媒ドメイン構造の数多くの変化と関連する。広範な基質特異性に寄与するエキソサイト（exosite）領域における残基もまた、暴露される。触媒残基His 236、Asp 282およびSer 379は、活性プロテアーゼの活性部位触媒3残基(catalytic triad)を構成する。残基を並び替えるコンホメーション変化はまた、ヘパリンに結合するヘパリン結合残基を暴露し、阻害因子AT-I-I-Iによる認識を容易にする。

【0053】

【図2】図2は、血液凝固カスケードを示す。図2Aは、FXaの非依存性産生に関する血液凝固の内因性経路および外因性経路ならびに凝固形成のためにトロンビンおよびフィブリンを生成する共通経路への経路の収束を表している。これらの経路は相互接続している。図は、1つまたは複数のペプチド結合の切断によってチモーゲンが活性型プロテアーゼに転換される活性化カスケードに関与する分子の順序を示す。次いで活性型プロテアーゼは、カスケードにおける次のチモーゲン分子のための活性化プロテアーゼとして作用し、最終的に凝固形成をもたらす。図は、FXaの活性がトロンビンおよびフィブリンの最終産生のためにFVaの存在により調節されることを示す（FVa依存性活性）。FXa単独はまた、低いレベルでトロンビン活性化することができる（FVa非依存性活性）。図2Aは、FVaと独立して果たすことができる凝固経路外の他のFXa活性をさらに示す。図2Bは、同じ経路を示し、凝固を阻害することができるアンチトロンビン（AT-I-I-I）を含む経路の調節因子をさらに示す。

【0054】

【図3】図3は、配列番号：134に記載されている成熟ヒトFXと他のFXポリペプチドの例示的なアラインメントを示す。「*」は、アラインされた残基が同一であることを意味し、「:」は、アラインされた残基が同一でないが、類似であり、アラインされた位置で保存的アミノ酸残基を含むことを意味し、「.」は、アラインされた残基が類似であり、アラインされた位置で半保存的アミノ酸残基を含むことを意味する。アミノ酸置換についての例示的な非限定的な対応する位置は強調により示される。例えば、図3Aは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：404に記載されているホオジロテナガザル(white-cheeked Gibbon)のアラインメントを示す。図3Bは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：405に記載されているヒヒFXのアラインメントを示す。図3Cは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：406に記載されているアカゲザルFXのアラインメントを示す。図3Dは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：407に記載されているダスキーティティサル(Dusky titi monkey)FXのアラインメントを示す。図3Eは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：408に記載されているゾウFXのアラインメントを示す。図3Fは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：409に記載されているマウスFXのアラインメントを示す。図3Gは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：410に記載されているウサギFXのアラインメントを示す。図3Hは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：411に記載されているラットFXのアラインメントを示す。図3Iは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：412に記載されているイヌFXのアラインメントを示す。図3Jは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：135に記載されているFX変異体I195Lのアラインメントを示す。図3Kは、配列番号：134に記載されている成熟FXと配列番号：549におけるアミノ酸残基41-488として記載されているFX変異体活性化ペプチド(Ap)152Tのアラインメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0055】

詳細な説明

概要

A. 定義

B. 止血および第X因子機能

1. 凝固経路

10

20

30

40

50

a. 組織因子（外因性）凝固経路	
b. 内因性凝固経路	
c. 共通経路	
2. 第Ⅴ因子非依存性活性	
a. トロンビン活性化	
b. 炎症および細胞増殖	
i. エフェクター細胞プロテアーゼ受容体－1（EPR－1）	
ii. プロテアーゼ活性化受容体（PAR）	
3. 第Ⅹ因子阻害因子	
C. 第Ⅹ因子構造および活性化	10
1. プロセッシングおよび構造	
2. 活性化	
3. 生物製剤としてのⅩおよびⅩa因子	
D. 修飾第Ⅹ因子ポリペプチド	
E. 第Ⅹ因子ポリペプチドの産生	
1. ベクターおよび細胞	
2. 発現系	
a. 原核生物発現	
b. 酵母	
c. 昆虫および昆虫細胞	20
d. 哺乳動物細胞	
e. 植物	
2. 精製	
3. 融合タンパク質	
4. ポリペプチド修飾	
5. ヌクレオチド配列	
F. 修飾第Ⅹ因子活性の評価	
1. インビトロアッセイ	
2. 非ヒト動物モデル	
3. 臨床アッセイ	30
G. 製剤および投与	
1. 製剤	
a. 投薬量	
b. 剤形	
2. 修飾FⅤⅩポリペプチドの投与	
3. 修飾FⅤⅩポリペプチドをコードする核酸の投与（遺伝子療法）	
H. 治療上の使用	
I. 併用療法	
J. 製品およびキット	
K. 実施例	40

【0056】

A. 定義

他に特に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、発明（複数可）が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書における全開示を通して言及される全ての特許、特許出願、公開出願、および刊行物、Genbank配列、データベース、ウェブサイト、ならびに他の出版物は、他に特に述べられない限り、それらの全体が参照によって組み込まれる。本明細書における用語について、複数の定義がある場合、このセクションにおける定義が優先される。URLまたは他のそのような識別子もしくはアドレスが参照される場合、そのような識別子は、変化し得、また、インターネット上の特定の情報は移り変わり得るが、等価な情報は

、インターネットを検索することによって見出すことができることを理解されたい。それに対する参照は、そのような情報の有用性および公的な普及を証明する。

【0057】

本明細書において使用されるように、凝固経路または凝固カスケードは、不溶性フィブリン血餅の形成に至る、一連の活性化事象を指す。凝固カスケードまたは凝固経路において、セリンプロテアーゼの不活性タンパク質（チモーゲンとも呼ばれる）は、1つまたは複数のペプチド結合の切断によって活性プロテアーゼに変換され、次いで、これは、カスケードにおける次のチモーゲン分子のための活性化プロテアーゼとして働く。カスケードの最終タンパク質分解工程において、フィブリノーゲンは、トロンビンによってフィブリンにタンパク質分解によって切断され、次いで、これは、傷害の部位で架橋して、血餅を形成する。

10

【0058】

本明細書において使用されるように、「止血」は、器官または身体部分における出血または血流の停止を指す。止血という用語は、血管傷害の後の失血を予防するための血液凝血から続く組織修復の後の血餅の溶解の全プロセスを包含することができる。

【0059】

本明細書において使用されるように、「凝血」または「凝固」は、不溶性フィブリン血餅の形成を指すまたは血液の凝固因子が、凝固カスケードにおいて相互作用し、不溶性フィブリン血餅の形成を最終的にもたらすプロセスを指す。

【0060】

20

本明細書において使用されるように、「プロテアーゼ」は、共有結合性のペプチド結合の加水分解を触媒する酵素である。これらの名称は、チモーゲン形態ならびにその活性化単鎖形態、活性化二重鎖形態、および活性化多重鎖形態を含む。明確にするために、プロテアーゼに対する言及は、全ての形態を指す。プロテアーゼは、たとえば、それらの活性部位の触媒活性および標的基質のペプチド結合を切断するメカニズムに依存して、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、およびメタロプロテアーゼを含む。

【0061】

本明細書において使用されるように、セリンプロテアーゼまたはセリンエンドペプチダーゼは、酵素の活性部位におけるセリン残基の存在によって特徴づけられるペプチダーゼのクラスを指す。セリンプロテアーゼは、原核生物および真核生物における消化酵素として機能するだけでなく、血液凝血および炎症を含む体内における広範囲の機能に参加する。セリンプロテアーゼによる切断のメカニズムは、セリンによる、標的ペプチド結合の求核攻撃に基づく。システイン、トレオニン、もしくはアスパラギン酸と結合した水分子または金属もまた、この役割を果たすことができる。セリン、ヒスチジン、およびアスパラギン酸の一行に並んだ側鎖は、ほとんどのセリンプロテアーゼに共通の触媒3残基を形成する。セリンプロテアーゼの活性部位は、ポリペプチド基質が結合するくぼみとして形づくられる。

30

【0062】

本明細書において使用されるように、第X因子（FX）またはFXポリペプチドは、活性形態のとき、プロトロンビンに対する触媒活性（すなわちプロトロンビン合成活性）を示すセリンプロテアーゼポリペプチドを指す。FXは、凝固経路の一員であるセリンプロテアーゼであり、具体的には、一般的な凝固経路における第1のセリンプロテアーゼである。FXは、前駆体ポリペプチド（たとえば配列番号：2に記載されている）から細胞において処理され、プロペプチド領域を含むポリペプチドを生じ、これは、結局は切断され、シグナル配列およびプロペプチドを欠いている成熟ポリペプチド（たとえば配列番号：134に記載されている）を産生する。分泌FXポリペプチドは二重鎖ポリペプチドである。FXポリペプチドは、不活性チモーゲンまたは活性第X因子（FXa）を含む。活性FXaは、活性化ペプチドを欠いている。FXaは、その補因子第Va因子へ活性FX（FXa）が結合すると非常に増加する触媒活性を示すFXの形態である。FXa活性はま

40

50

た、 Ca^{++} およびリン脂質の包含により増強される。本明細書において提供されるように、FXa形態の、FVa補因子の存在下で完全に活性化形態において、プロトロンビンに対する触媒活性を示すチモーゲン様形態へのコンホメーション変化をもたらす変異が、導入され得る。したがって、本明細書においてFXまたはFXポリペプチドへの言及は、全ての形態を含み、これは、それらの前駆体、単一の一本鎖および二本鎖形態、例えば、成熟形態、チモーゲン形態、FXa形態、例えば、チモーゲン様形態、またはそれらの触媒活性部分を含む。

【0063】

FXへの言及は、ヒトFXポリペプチド、例えば、配列番号：2に記載されている前駆体ポリペプチド、および一本鎖および二本鎖形態、例えば、成熟形態、チモーゲン形態、FXa形態、例えば、チモーゲン様形態、またはそれらの触媒活性形態を含む。例えば、シグナル配列およびプロペプチド領域を欠いている成熟FXは、配列番号：134に記載されている。そのチモーゲン形態は、130アミノ酸軽鎖（配列番号：134の残基1-139に対応する）および306アミノ酸重鎖（配列番号：134の残基143-448に対応する）を含む二重鎖形態である。そのFXa形態は、130アミノ酸重鎖（配列番号：134の残基1-139に対応する）および重鎖（配列番号：134のアミノ酸残基194-448に対応する）を含む二重鎖形態、またはその触媒活性形態である。述べられているように、FXはまた、補因子FVaの非存在下でチモーゲンのようであるFXaを含む修飾形態を含む。

【0064】

FXに対する言及はまた、その変異体、たとえば対立遺伝子変異体および種変異体、スプライス変異体によってコードされる変異体、および他の変異体、例えば、配列番号：2に記載されている前駆体ポリペプチドと少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチド、またはそれらの成熟形態、チモーゲン形態またはFXa形態を含む。かかる変異体は、FVa結合、触媒活性、プロトロンビン結合、プロトロンビナーゼ活性および／または血液凝固活性を含むが、これらに限定されない1つ以上のFX活性を示す、その任意のFXa形態、または触媒部分を含む。活性は、天然型または野生型第X因子の活性と比較して、減少または増加され得る。例えば、FXポリペプチドは、FXa形態または触媒活性部分が、天然型または野生型FXaポリペプチドの活性の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%またはそれ以上を示すポリペプチドを含む。例示的な変異体は、ヒト（配列番号：2に記載されており、配列番号：1によってコードされる前駆体プレプロペプチド；および配列番号：134に記載されている成熟形態）、キタホオジロテナガザル（Northern White-Cheeked Gibbon）（配列番号：393に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：404に記載されている成熟形態）、アヌビスヒヒ（Olive Baboon）（配列番号：394に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：405に記載されている成熟形態）、アカゲザル（配列番号：395に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：406に記載されている成熟形態）、ダスキーティティサル（配列番号：396に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：407に記載されている成熟形態）、アフリカゾウ（African elephant）（配列番号：397に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：408に記載されている成熟形態）、マウス（配列番号：398に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：409に記載されている成熟形態）、ウサギ（配列番号：399に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：410に記載されている成熟形態）、ラット（配列番号：400に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：411に記載されている成熟形態）、イヌ（配列番号：401に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：412に記載されている成熟形態）、ブタ（配列番号：402に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：41

10

20

30

40

50

3に記載されている成熟形態)、およびウシ(配列番号: 403に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号: 414に記載されている成熟形態)を含むが、これらに限定されない種変異体を含む。例示的な変異体はまた、配列番号: 547-552に記載されている変異体を含むが、これらに限定されないヒトFXの対立遺伝子変異体を含む(Cargillら(1999) Nat. Gen., 22:231-238)。

【0065】

本明細書において使用されるように、前駆体FXポリペプチドは、分泌のためのタンパク質を標的化するN-末端シグナルペプチドおよびプロペプチドを含むFXポリペプチドの非分泌形態を指す。シグナルペプチドは、小胞体において開裂される。例示的なFX前駆体ポリペプチドは、配列番号: 2に記載されているポリペプチド、またはその対立遺伝子もしくは種変異体または他の変異体、たとえば配列番号: 393-403または547-552に記載されているものである。

10

【0066】

本明細書において使用されるように、「プロ領域」、「プロペプチド」、または「プロ配列」は、切断されて、成熟タンパク質を産生する領域またはセグメントを指す。プロ領域は、成熟した生物学的活性ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸の配列であり、少数のアミノ酸ほどの小さなものとする事ができるまたは多重ドメイン構造とすることができる。FXポリペプチドにおいて、プロペプチド領域は、一般的に約9個のアミノ酸であるが、種に依存して変化し得る(たとえば、より長く、またはより短く)。FXにおいて、プロペプチド配列は、タンパク質の翻訳後修飾において機能し、細胞からのタンパク質の分泌前に開裂される。例えば、プロペプチドは、小胞体におけるビタミンK-依存性カルボキシラーゼによるγ-カルボキシ化のための認識要素である。該反応は、Glaドメインにおけるグルタミン酸残基のγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)への変換により起こる。この修飾は、血中のチモーゲンの最適なCa²⁺-媒介活性化のために必要とされる。例えば、gla残基は、第X/Xa因子がカルシウム依存的にリン脂質(すなわち細胞表面)に結合することを可能にし、これは、プロトロンビナーゼ複合体のアセンブリーのために必要条件である。例示的なプロペプチドまたはプロ領域は、配列番号: 2のアミノ酸32-40に対応する。

20

【0067】

本明細書において使用されるように、FXのプロペプチド形態は、シグナルペプチドを欠くが、プロペプチドを保持しているタンパク質である。例えば、配列番号: 2に記載されているヒトFXに対する例示で、プロペプチドは、配列番号: 2のアミノ酸32-40に対応する9個のアミノ酸プロペプチドである。したがって、FXの例示的なプロペプチド形態は、配列番号: 2のアミノ酸32-488として記載されているヒトFX、またはその対立遺伝子変異体および種変異体を含む変異体である。

30

【0068】

本明細書において使用されるように、「成熟FXポリペプチド」は、シグナル配列およびプロペプチド配列を欠くFXポリペプチドを指す。プロペプチドは、ポリペプチドの分泌の前に、トランスゴルジ装置(trans-Golgi apparatus)におけるタンパク質分解切断により除去される。例示的な成熟FXポリペプチドは、配列番号: 134に記載されており、その変異体、たとえば、種変異体および対立遺伝子変異体も含む。例えば、例示的なかかる変異体は、配列番号: 404-414のいずれかにおいて記載されている。成熟FXポリペプチドは、一般的に、二重鎖ポリペプチドを産生するための鎖内タンパク質分解前のFXの一本鎖形態を示す。

40

【0069】

本明細書において使用されるように、チモーゲンは、通常、血漿中で存在するFXポリペプチドの二重鎖不活性形態を示す。二重鎖形態は、軽鎖が重鎖から開裂されるように、重鎖および軽鎖間の残基Arg140-Arg142(配列番号: 134に記載されている残基に対応する)を除去する鎖内切断によって産生される。これは、循環への分泌中または該分泌後に起こる。チモーゲンは、重鎖のN-末端での活性化ペプチドの存在のため

50

に、活性形態よりも大型である。FXについて、チモーゲンは、 γ -カルボキシグルタミン酸 (GLA) -リッチドメインおよび2つの上皮成長因子 (EGF) 様ドメインを含む軽鎖を含む。重鎖は、アミノ酸 (たとえば配列番号: 134におけるCys132およびCys302) 間のジスルフィド結合により軽鎖に連結される。重鎖は、N-末端で52個のアミノ酸残基活性化ペプチド (たとえば配列番号: 134におけるアミノ酸残基Ser143からArg194) を含む。重鎖はまた、セリンプロテアーゼドメイン (たとえば配列番号: 134の残基Ile195からLys448) を含み、これは触媒3残基を有するセリンプロテアーゼドメイン (たとえば配列番号: 134におけるHis²³⁶、Asp²⁸² およびSer³⁷⁹、およびキモトリプシンナバリングによってHis⁵⁷、Asp¹⁰² およびSer¹⁹⁵ に対応する) を含む。チモーゲン形態は、一般的に、不活性であり、活性化ペプチドセグメントを除去する触媒切断によって活性ポリペプチドに変換され得る。したがって、チモーゲンは、活性化因子の作用によってタンパク質分解酵素に変換される酵素的に不活性なタンパク質である。

10

【0070】

本明細書において使用されるように、活性化ペプチドは、触媒機構を遮蔽し、したがって、触媒中間体の形成を予防することによって (つまり基質結合部位を立体的に閉鎖することによって)、タンパク質分解活性を抑制するように機能するFX重鎖のN-末端で存在するセグメントを指す。例示的なFX活性化ペプチドは、配列番号: 134におけるアミノ酸残基Ser143からArg194に対応する成熟FXポリペプチドの重鎖のN-末端での52個のアミノ酸残基活性化ペプチドである。

20

【0071】

本明細書において使用されるように、修飾活性化ペプチドは、未修飾第X因子ポリペプチドまたは天然第X因子ポリペプチドの活性化ペプチドと比較して、例えば、1つまたは複数のアミノ酸差異の存在によって、FXポリペプチドに対して天然ではない活性化ペプチドを指す。1つまたは複数のアミノ酸差異は、1つもしくは複数のアミノ酸置換 (交換)、アミノ酸挿入、もしくはアミノ酸欠失などのようなアミノ酸突然変異とすることができるまたは、挿入もしくは欠失およびその任意の組合せとすることができる。例えば、修飾活性化ペプチドは、未修飾または天然FXポリペプチドの活性化ペプチドと比較して (たとえば配列番号: 134におけるSer143からArg194として記載されているアミノ酸残基の配列と比較して)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50またはそれ以上のアミノ酸差異を有することができるものである。例示的なアミノ酸修飾は、未修飾または天然 (たとえば野生型) FXポリペプチドにおいて存在しないプロテアーゼ処理部位をもたらす修飾である。例えば、修飾は、天然型または野生型FXポリペプチドの別のプロテアーゼからの異種活性化ペプチドでの置換を含む。

30

【0072】

本明細書において使用されるように、修飾活性化ペプチドを含まない修飾FXポリペプチドへの言及は、ポリペプチドの活性化ペプチドが未修飾第X因子ポリペプチドまたは天然第X因子ポリペプチドの活性化ペプチドと比較して異なっていないことを意味する。例えば、修飾FXポリペプチドが活性化ペプチドを含む態様において、それは、天然型または野生型活性化ペプチドを含む。したがって、修飾活性化ペプチドを含まない本明細書における修飾FXポリペプチドへの言及は、そこにおける修飾 (たとえばアミノ酸置換) が軽鎖または重鎖のプロテアーゼドメインのみ、一般的に重鎖のプロテアーゼドメインのみであることを意味する。

40

【0073】

本明細書において使用されるように、活性FX (FXa) または活性化FXは、重鎖がN-末端活性化ペプチドを含まないFXポリペプチドの二重鎖形態を指す。FXaは、活性化ペプチドを除去する重鎖の切断により活性化される。したがって、FXaは、ジスルフィド結合によって連結された2つの鎖からなるヘテロダイマーである。ヒトFXについて、軽鎖は、約16,000ダルトンの分子量を有し、配列番号: 134のアミノ酸の配

50

列1-139からなり、重鎖は、約38,000ダルトンの分子量を有し、セリンプロテアーゼドメインを作り上げる配列番号：134のアミノ酸残基Ile195からLys448からなる。FXの活性化は、活性化ペプチドを放出するArg194-Ile195結合の切断によって起こる。活性化は、外因性第Xase因子複合体（第VIIa因子／TF複合体）または内因性第Xase因子複合体（FIXa／FVIIa複合体）により成し遂げられる。活性化は、一般的に、リン脂質およびカルシウムイオンの存在を必要とする。活性化はまた、ラッセルクサリヘビ毒（RVV-X）により成し遂げることができる。FXaは、触媒活性、FVa結合、ヘパリン結合、プロトロンビン結合、プロトロンビナーゼ活性および／または血液凝固活性を示す。本明細書における目的上、FXaへの言及は、活性化ペプチドを欠いており、触媒活性、FVa結合、ヘパリン結合、プロトロンビン結合、プロトロンビナーゼ活性および／または血液凝固活性のようなFXa活性を示すことができる任意のFX二重鎖形態を指す。したがって、FXaへの言及は、飽和濃度のFVaの存在下で、FXa活性を示すチモーゲン様FXaポリペプチドを含む。

10

【0074】

本明細書において使用されるように、FXaポリペプチドの「触媒活性部分」は、触媒3残基（たとえば配列番号：134におけるHis²³⁶、Asp²⁸²およびSer³⁷⁹、およびキモトリプシンナバリングによるHis⁵⁷、Asp¹⁰²およびSer¹⁹⁵に対応する）を含むが、配列番号：134のアミノ酸残基Ile195からLys448に対応する重鎖の全長を含まない重鎖のアミノ酸の隣接する部分を含む活性FXaポリペプチドを指す。触媒活性部分はまた、FXaの軽鎖のすべてまたは一部を含み得る。FXaポリペプチドの触媒活性部分は、完全長FXaと比較して、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上の活性、たとえば、少なくとも120%、130%、140%、150%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上の活性を示す。本明細書において修飾FXaまたはその触媒活性部分への言及は、触媒活性部分が修飾（たとえばアミノ酸置換）を含むことを意味すると理解される。

20

【0075】

本明細書において使用されるように、ラッセルクサリヘビ毒（RVV-X）は、具体的に第X因子を特異的に活性化するVipera russelli（ラッセルクサリヘビ）の毒メタロプロテアーゼを指す（Takeyaら（1992）J Biol. Chem., 267:14109-14117）。RVV-Xは、約79,000ダルトンの分子量を有し、ジスルフィド結合された重鎖および軽鎖を含む。RVV-Xは、第X因子活性化のためにリン脂質を必要とせず、活性化の増強のための外因性Ca²⁺およびアミノ末端Gladメインの存在を必要としない。RVV-Xの活性は、EDTAの存在下で阻害される。ヘビ毒プロテアーゼの精製された調製物は、知られており利用でき（たとえばCatalog No. RVVX-2010, Haematologic Technologies, Inc.; Catalog No. ab62233; Abcam, Cambridge, MA参照）、その配列も知られている（たとえばTakeyaら（1992）J Biol. Chem., 267:14109-14117およびUniprot No. Q7LZ61、Q4PRD1およびQ4PRD2参照）。

30

【0076】

本明細書において使用されるように、「チモーゲン様」タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質分解切断により活性化されているが、補因子の非存在下で、チモーゲンと関連する特性、たとえば、低い活性または活性なし、またはコンホメーションまたはそのコンホメーションと似ている生じる活性またはタンパク質のチモーゲン形態の生じる活性をまだ示すタンパク質を指す。例えば、本明細書において提供される修飾FXaポリペプチドについて、FVa補因子に結合しないとき、FXaの二重鎖活性化形態はチモーゲン様タンパク質である。それは非常に低い活性を示す。FVaに結合すると、FXaの二重鎖活性化形態は、コンホメーション変化または「コンホメーション平衡」におけるシフトを受け、凝固因子としての完全な活性を獲得する。

40

【0077】

50

本明細書において使用されるように、F Xに関する「野生型」または「天然」は、自然界においてヒトおよび他の動物を含む生物において存在する対立遺伝子変異体を含む天然F X遺伝子または天然に存在するF X遺伝子を指す。言及が野生型または天然F X a ポリペプチドに対する場合、これは、F X a ポリペプチドの活性部分または触媒活性部分であると理解される。種に無関係の野生型第X因子に対する言及は、任意の種の野生型第X因子を包含するように意図される。コード前駆体ポリペプチド、その断片、ならびにシグナルペプチドおよびプロペプチドを欠く成熟形態、ならびにその任意の翻訳前または翻訳後処理形態または修飾形態などのようなその処理形態が、野生型F Xポリペプチドの中に含まれる。グリコシル化、カルボキシル化およびヒドロキシル化による修飾を含むが、これらに限定されない、翻訳後修飾されるものもまた、天然F Xポリペプチドの中に含まれる。天然F Xポリペプチドはまた、チモーゲンを含む二重鎖分泌形態および活性形態、ならびにその任意の処理形態またはアイソフォームをも含む。例えば、ヒトは、天然F Xを発現する。野生型ヒトF Xのアミノ酸配列は、配列番号：2に記載されており、本明細書に記載されているその成熟、チモーゲン、活性および触媒活性形態、および配列番号：547-552に記載されている対立遺伝子変異体およびその成熟、チモーゲン、活性および触媒活性形態を含む。キタホオジロテナガザル（配列番号：393に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：404に記載されている成熟形態）、アヌビスヒヒ（配列番号：394に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：405に記載されている成熟形態）、アカゲザル（配列番号：395に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：406に記載されている成熟形態）、ダスキーティティサル（配列番号：396に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：407に記載されている成熟形態）、アフリカゾウ（配列番号：397に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：408に記載されている成熟形態）、マウス（配列番号：398に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：409に記載されている成熟形態）、ウサギ（配列番号：399に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：410に記載されている成熟形態）、ラット（配列番号：400に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：411に記載されている成熟形態）、イヌ（配列番号：401に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：412に記載されている成熟形態）、ブタ（配列番号：402に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：413に記載されている成熟形態）、およびウシ（配列番号：403に記載されている前駆体プレプロペプチドおよび配列番号：414に記載されている成熟形態）。

【0078】

本明細書において使用されるように、種変異体は、マウスおよびヒトなどのような異なる哺乳動物種を含む様々な種の中のポリペプチドにおける変異体を指す。

【0079】

本明細書において使用されるように、対立遺伝子変異体は、同じ種のメンバーの中のタンパク質における変異を指す。

【0080】

本明細書において使用されるように、スプライス変異体は、2つ以上の種類のmRNAをもたらす、ゲノムDNAの転写一次産物のディファレンシャルプロセッシング(differential processing)によって産生される変異体を指す。

【0081】

本明細書において使用されるように、対応する残基は、アライメントされた場所に存在する残基を指す。関連ポリペプチドまたは変異ポリペプチドは、当業者らに知られている任意の方法によってアライメントされる。そのような方法は、典型的に、マッチを最大限にし、マニュアルアライメントを使用するならびに入手可能な多数のアライメントプログラム（たとえばBLASTP）および当業者らに知られている他のものを使用することによるなどのような方法を含む。F Xポリペプチドの配列をアライメントすることによって、当業者は、指標として、保存された同一のアミノ酸残基を使用して、対応する残基を同

10

20

30

40

50

定することができる。典型的には、ポリペプチドのアミノ酸が記載されている配列におけるアミノ酸に対応するという記述は、標準アラインメントアルゴリズム、たとえばGAPアルゴリズムを使用して同一性または相同性を最大化する（保存されたアミノ酸がアラインメントされる）ように、ポリペプチドと記載されている配列とのアラインメント時に、同定されるアミノ酸を指す。例えば、図3に記載されているアラインメントを基準にして、配列番号：134に記載されている成熟ヒトFXの軽鎖におけるアミノ酸残基His8は、配列番号：404に記載されているホオジロヒヒ(white-cheeked baboon)におけるAsn8に対応する。別の例において、配列番号：134に記載されている成熟ヒトFXの重鎖におけるAsp164は、配列番号：411に記載されているラットFXにおけるAsp161に対応する。

10

【0082】

本明細書において使用されるように、ドメイン（典型的に、3またはそれ以上、一般に、5または7またはそれ以上のアミノ酸の配列）は、構造的におよび／または機能的に分子の他の部分と異なり、同定可能である、タンパク質またはコード核酸などのような分子の部分の部分を指す。たとえば、ドメインは、1つもしくは複数の構造モチーフから構成されるタンパク質内で、独立して折り畳まれた構造を形成することができるおよび／またはタンパク質分解活性などのような機能的活性により認識される、ポリペプチド鎖のそれらの部分を含む。タンパク質は、1つまたは2つ以上の異なるドメインを有することができる。たとえば、ドメインは、プロテアーゼドメインまたはgladメインを定めるモチーフに対する相同性などのような、関連するファミリーメンバーに対する、その中の配列の相同性によって、同定する、定める、または区別することができる。他の例において、ドメインが、タンパク質分解活性など、その機能によってまたはDNA結合、リガンド結合、および二量体化などのような、生体分子と相互作用する能力によって区別することができる。ドメインは、ドメインが、独立してまたは他の分子に融合して、たとえばタンパク質分解活性またはリガンド結合などのような活性を実行できるように、独立して、生物学的機能または生物学的活性を示すことができる。ドメインは、アミノ酸の線状配列またはアミノ酸の非線状配列とすることができる。多くのポリペプチドは、複数のドメインを含有する。そのようなドメインは、知られており、当業者らによって同定することができる。本明細書における例証のために、定義は、提供されるが、名称によって特定のドメインを認識することは、当技術分野における技術の範囲内に十分にあることが理解されたい。必要に応じて、適切なソフトウェアを、ドメインを同定するために利用することができる。

20

30

【0083】

本明細書において使用されるように、プロテアーゼドメインまたは触媒活性ドメインは、触媒活性を与えるドメインである。プロテアーゼのプロテアーゼドメインに対する言及は、これらのタンパク質のいずれかの単鎖形態、二重鎖形態、および多重鎖形態を含む。タンパク質のプロテアーゼドメインは、たとえば触媒中心などのような、そのタンパク質分解活性に必要とされる、そのタンパク質の必須の特性を全て含有する。FXに関して、プロテアーゼドメインは、触媒トライアドを含めて、キモトリプシン／トリプシンファミリープロテアーゼドメインと、相同性および構造的特徴を共有する。たとえば、配列番号：134に記載されているFXポリペプチドにおいて、プロテアーゼドメインは、配列番号：134のアミノ酸位置Ile195からLys448に対応し、触媒トライアド残基（たとえば配列番号：134におけるHis²³⁶、Asp²⁸²およびSer³⁷⁹、キモトリプシンナッキングによってHis⁵⁷、Asp¹⁰²およびSer¹⁹⁵に対応する）を含む。

40

【0084】

本明細書において使用されるように、ガンマーカルボキシグルタミン酸（Gla）ドメインは、タンパク質、たとえば、Glaを形成するためのビタミンK依存性カルボキシル化による、グルタミン酸残基、一般に、全てではないが、ほとんどのグルタミン酸残基の翻訳後修飾を含有するビタミンK依存性タンパク質の部分の部分を指す。Glaドメインは、カ

50

ルシウムイオンの高親和性結合および負電荷リン脂質への結合を担う。典型的に、G l aドメインは、ビタミンK依存性タンパク質の成熟形態のN-末端で始まり、保存芳香族残基で終わる。二重鎖に切断されると、G l aドメインは軽鎖中である。成熟F Xを基準にして、G l aドメインは、配列番号：134において記載される例示的なポリペプチドのアミノ酸位置1～39に対応する。G l aドメインは、十分に知られており、それらの場所は、特定のポリペプチドにおいて同定することができる。様々なビタミンK依存性タンパク質のG l aドメインは、N-末端の疎水性残基の、細胞表面膜上の負電荷リン脂質との相互作用を媒介する疎水性パッチへのクラスタリングを含めて、配列相同性、構造的相同性、および機能的相同性を共有する。例示的な他のG l a含有ポリペプチドは、F I X、F V I I、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS、オステオカルシン、マトリックスG l aタンパク質、成長停止特異的タンパク質6（G a s 6）およびプロテインZを含むが、これらに限定されない。

10

【0085】

本明細書において使用されるように、上皮成長因子（E G F）ドメイン（E G F-1またはE G F-2）は、上皮成長因子（E G F）配列の特異的な30～40のアミノ酸部分に対して配列相同性を共有する、タンパク質の部分を指す。E G Fドメインは、ジスルフィド結合に関与することが示された（E G Fにおいて）、6つのシステイン残基を含む。E G Fドメインの主な構造は、C-末端の短い二本鎖シートへのループが後続する二本鎖ベータシートである。F Xは、2つのE G Fドメイン：E G F-1およびE G F-2を含む。これらのドメインは、配列番号：134において記載される成熟F Xポリペプチドの、アミノ酸位置46～84および85～128にそれぞれ対応する。二重鎖形態に切断されたとき、E G Fドメインは軽鎖中である。

20

【0086】

本明細書において使用されるように、「未修飾ポリペプチド」または「未修飾F X」およびその文法的な変化形は、本明細書において提供される修飾のために選択される出発ポリペプチドを指す。出発ポリペプチドは、ポリペプチドの天然に存在する野生型形態であり得る。例示的な未修飾F Xポリペプチドは、配列番号：134に記載されているヒトF X、およびそのチモーゲンまたはF X a二本鎖形態である。さらに、出発ポリペプチドは、それが、天然野生型アイソフォームと異なるように、改変するまたは変異させることができるが、それにもかかわらず、本明細書において産生される、引き続いて修飾されるポリペプチドと比較して、出発未修飾ポリペプチドと本明細書において呼ばれる。したがって、未修飾参照タンパク質と比較して、特定の活性または特性における望ましい増加または減少を有するように修飾された、当技術分野において知られている既存のタンパク質は、出発未修飾ポリペプチドとして選択し、使用することができる。たとえば、グリコシル化を改変するための1つまたは複数のアミノ酸残基における変化などのように、1つまたは複数の単一アミノ酸変化によってその天然形態から修飾され、望ましい特性における増加または減少のいずれかを有するタンパク質は、同じまたは異なる特性のさらなる修飾のための、本明細書において未修飾と呼ばれる、標的タンパク質とすることができる。

30

【0087】

本明細書において使用されるように、「修飾第X因子ポリペプチド」および「修飾第X因子」は、未修飾第X因子ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のアミノ酸差異を有するF I Xポリペプチドのあらゆる形態、たとえばF XチモーゲンまたはF X aを含むF Xポリペプチドを指す。1つまたは複数のアミノ酸差異は、1つもしくは複数のアミノ酸置換（交換）、アミノ酸挿入、もしくはアミノ酸欠失などのようなアミノ酸突然変異とすることができるまたは全ドメインの挿入もしくは欠失およびその任意の組合せとすることができる。典型的に、修飾F Xポリペプチドは、未修飾F Xポリペプチドと比較して、一次配列における1つまたは複数の修飾を有する。たとえば、本明細書において提供される修飾F Xポリペプチドは、未修飾F Xポリペプチドと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、またはそれ以上のアミノ酸差異を有することができる。任意の修飾は

40

50

、結果として生じるポリペプチドが、たとえば触媒活性、タンパク質分解活性、血栓活性または凝固活性などのような、天然 F X ポリペプチドと関連する、少なくとも 1 つの F X 活性を示す限り、企図される。

【0088】

本明細書において使用されるように、F X ポリペプチドの「特性」は、物理的または構造的特性、たとえば三次元構造、p I、半減期、コンホメーション、および他のそのような物理的特徴を指す。

【0089】

本明細書において使用されるように、F X ポリペプチドの「活性」または「F X 活性」または「F X a 活性」は、活性第 X a 因子形態のポリペプチドによって示される任意の活性を指す。そのような活性は、インビトロおよび／またはインビボにおいて試験することができ、凝固活性もしくは血液凝固活性、凝血促進活性、プロトロンビン活性化を達成するためのなどのようなタンパク質分解または触媒活性；抗原性（抗 F X 抗体に結合する能力もしくはそれへの結合についてあるポリペプチドと競合する能力）；F V a、プロトロンビン、ヘパリンに結合する能力および／またはリン脂質に結合する能力を含むが、これらに限定されない。活性は、たとえば、インビトロにおいてまたはインビボにおいて凝固を測定することによって、承認されるアッセイを使用して、インビトロにおいてまたはインビボにおいて評価することができる。そのようなアッセイの結果は、ポリペプチドが、インビボにおけるポリペプチドの活性に相互に関連し得る活性を示すことを示し、インビボ活性は、生物学的活性と呼ぶことができる。F X の修飾形態の機能性または活性を決定するためのアッセイは、当業者らに知られている。F X ポリペプチドの活性を評価するための例示的なアッセイは、血液凝固活性を評価するためのプロトロンボプラスチン時間（P T）アッセイもしくは活性化部分トロンボプラスチン時間（a P T T）アッセイ、または触媒活性もしくはタンパク質分解活性を評価するための、以下の実施例に記載されているような合成基質を使用する発色アッセイを含む。

【0090】

本明細書において使用されるように、「少なくとも 1 つの活性を示す」または「少なくとも 1 つの活性を保持する」は、同じ条件下で同じ形態の未修飾 F X ポリペプチドと比較した、修飾 F I X ポリペプチドによって示される F X 活性を指す。典型的に、活性は、ポリペプチドの F X a 形態またはその触媒活性部分の活性である。たとえば、二重鎖形態の修飾 F X a ポリペプチドの活性は、同じ実験条件下で、二重鎖形態の未修飾 F X a ポリペプチドと比較され、2 つのポリペプチドの間の唯一の差異は、研究中の修飾である。典型的に、同じ形態の未修飾 F X ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持するまたは示す修飾 F X ポリペプチドは、インビボにおいて投与された場合、修飾 F X ポリペプチドが、凝血促進治療薬として治療的に有効となるのに十分な量の活性を保持する。修飾 F X ポリペプチドは、同じ形態における未修飾 F X ポリペプチドと比較して、増加したまたは減少した活性を示すことができる。一般に、修飾 F X ポリペプチドは、未修飾 F X ポリペプチドの活性の 0.5 % ~ 500 %、たとえば凝血促進薬としての治療的効能を示す同じ形態の未修飾 F X ポリペプチドの活性の少なくとも 0.5 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、もしくはそれ以上またはその前後を示すとき、活性を示す。必要であれば、凝血促進薬としての治療的効能を維持するために必要とされる活性の量は、経験的に決定することができる。典型的に、活性の 0.5 % ~ 20 %、0.5 % ~ 10 %、0.5 % ~ 5 % の保持は、インビボにおいて凝血促進薬としての治療的効能を保持するのに十分である。保持されることとなる特定のレベルは、ポリペプチドの意図される使用についての関数であり、経験的に決定することができる。活性は、たとえば、本明細書において記載されるものなどのようなインビトロアッセイまたはインビボアッセイを使用して、測定することができる。

【0091】

本明細書において使用されるように、FXに関する「触媒活性」または「タンパク質分解活性」は、FXa形態、またはその触媒活性部分が、基質のタンパク質分解性の切断を触媒する能力を指す。そのような活性を評価するためのアッセイは、当技術分野において知られている。アッセイは、基質との安定なアシル酵素中間体の形成をモニターまたは評価するアッセイ、触媒活性と相関するFXaの阻害因子への結合を評価するアッセイ、およびFXa基質（たとえばプロトロンビン）または合成基質の切断を直接的に評価するアッセイを含む。たとえば、FXのタンパク質分解活性は、フルオレセイン-モノ-p'-グアニジノベンゾエート(FMGB)またはSpectrozyme FXa(メトキシカルボニル-D-シクロヘキシルグリシル-グリシル(glycyl)-アルギニン-パラ-ニトロアニリドアセテート)などのような発色基質または蛍光基質を使用して、エコチンなどのようなタイトバインディング可逆性阻害因子を使用して、またはFXa基質プロトロンビンを使用して測定することができる。触媒活性の評価は直接的または間接的であってよい。例えば、触媒活性は、合成基質Pefafloor TH(H-D-CHA-Ala-Arg-AMC)に対する活性化トロンビンの活性をモニタリングすることによって、本明細書の実施例4において例示されているとおりFXa基質の下流活性の切断をモニタリングすることにより評価することができる。例示的なアッセイは実施例において記載されている。触媒活性を評価するためのアッセイは、FVaの存在または非存在下で行うことができ、また、リン脂質またはCa²⁺の存在または非存在下で行うこともできる。触媒活性は、触媒効率またはk_{cat}/k_mとして示すことができ、これは、プロテアーゼが基質を開裂する効率の尺度であり、当業者によく知られている定常状態下で測定される。

10

20

【0092】

本明細書において使用されるように、「凝固活性」または「血液凝固活性」または「凝血促進活性」は、ポリペプチドが凝固を達成する能力を指す。血液凝固活性を評価するためのアッセイは、当業者らに知られており、プロトロンボプラスチン時間(PT)アッセイまたは活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセイを含む。

【0093】

本明細書において使用されるように、プロトロンビナーゼ活性は、基質プロトロンビンに対する特定の触媒活性を指し、プロトロンビン(第II因子)からトロンビン(第IIa因子)へ変換する活性である。活性は、例えば、切断反応のSDS-PAGE分解産物のタンパク質分析によって、直接的に評価することができる。活性はまた、発色または蛍光放出部分を切断時にモニタリングすることにより合成基質を使用して評価することができる。活性はまた、基質または合成基質(たとえばPefafloor TH(H-D-CHA-Ala-Arg-AMC))に対するトロンビンの活性をモニタリングすることにより間接的に評価することができる。プロトロンビナーゼ活性を評価するためのアッセイは、FVaの存在または非存在下で行うことができ、また、リン脂質またはCa²⁺の存在または非存在下で行うこともできる。

30

【0094】

本明細書において使用されるように、「凝固の阻害因子」は、凝固または血餅形成を阻害または防止するように作用するタンパク質または分子を指す。凝固の阻害または防止は、インビボまたはインビトロにおいて観察することができ、プロトロンボプラスチン時間(PT)アッセイまたは活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセイを含むがこれらに限定されない当分野で知られている方法を使用してアッセイすることができる。

40

【0095】

本明細書において使用されるように、アンチトロンビンIII(ATまたはAT-III)は、セリンプロテアーゼ阻害因子(セルピン)である。AT-IIIは、分泌の間に切断されて、432アミノ酸の成熟アンチトロンビン(配列番号:554)を放出する、464のアミノ酸残基(配列番号:553)を含有する前駆体タンパク質として合成される。

50

【0096】

本明細書において使用されるように、「AT-I IIの阻害効果」または「AT-I IIによる阻害」は、FXポリペプチドのFXa形態、またはその触媒活性またはチモゲン様形態の触媒または血液凝固活性を阻害するアンチトロンビンI II（ATまたはAT-I II）の能力を指す。AT-I IIによる阻害は、阻害因子へのFXポリペプチドまたは修飾FXポリペプチドの結合を評価することによって、アッセイすることができる。阻害因子へのポリペプチドの結合を決定するためのアッセイは、当技術分野において知られている。加えて、B I A c o r e バイオセンサー機器などのような表面プラズマ共鳴もまた、AT-I IIまたは他の阻害因子へのFXポリペプチドの結合を測定するために使用することができる。しかしながら、AT-I IIなどのような共有結合性の阻害因子について、結合速度(on-rate)のみをB I A c o r eを使用して測定することができる。阻害活性はまた、AT-I IIの存在下でFXaの触媒活性または血液凝固活性を評価することにより評価することができる。たとえばAT-I IIなどのような共有結合性の阻害因子について、阻害についての二次速度定数も測定することができる。たとえば、AT-I IIによる阻害はまた、FXaの阻害についての二次速度定数(k_{app})を決定することにより評価することができる。阻害反応は、一般的に、AT-I IIの完全活性のために必要とされるヘパリンの存在下で行われる。例えば、一般的に、AT-I IIは、 $K_{0.5}$ （すなわちFXaの触媒活性の50%阻害のために必要とされるAT-I IIのモル濃度）が80 nM未満、一般的に70 nM未満、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM以下であるとき、阻害効果を示す。例えば、AT-I IIは、血漿FXaおよび野生型FXaに対して約2 nMの $K_{0.5}$ を示す。別の例において、AT-I IIは、 k_{app} ($M^{-1} s^{-1}$) が 1.0×10^6 以上、一般的に 2.0×10^6 以上、 3.0×10^6 、 4.0×10^6 、 5.0×10^6 、 6.0×10^6 、 7.0×10^6 、 8.0×10^6 、 9.0×10^6 、 1.0×10^7 、 2.0×10^7 またはそれ以上であるとき、阻害効果を示す。例えば、AT-I IIは、血漿FXaおよび野生型FXaに対してそれぞれ約 1.4×10^7 および 9.7×10^6 の k_{app} を示す。

【0097】

本明細書において使用されるように、「AT-I IIに対する増加した耐性」または「TFPIに対する増加した耐性」のような阻害因子に対する増加した耐性は、未修飾FXポリペプチドなどのような参照ポリペプチドと比較した、AT-I II、TFPIまたは他の阻害因子のような阻害因子の阻害効果に対するポリペプチドの感受性の減少についての任意の量を指す。修飾FXポリペプチドに対する阻害因子、例えば、AT-I IIまたはTFPIの阻害効果を決定するためのアッセイは、阻害因子（たとえばAT-I IIまたはTFPI）の存在下で行われ、参照または未修飾FXポリペプチドに対する同じ阻害因子（たとえばAT-I IIまたはTFPI）の阻害効果と比較される。たとえば、修飾FXポリペプチドが、AT-I IIの存在下または非存在下においてその基質プロトロンビンを切断する能力を測定することができ、AT-I IIが反応を阻害する程度を決定することができる。これは、AT-I IIの存在下または非存在下において、未修飾FXポリペプチドがプロトロンビンを切断する能力と比較することができる。同様のアッセイをTFPIで行うことができる。阻害因子に対する増加した耐性を示す修飾ポリペプチドは、未修飾ポリペプチドと比較して、たとえば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%またはそれ以上の阻害因子の効果に対する耐性の増加を示す。阻害に対する耐性は、修飾FXの阻害活性 対 未修飾FXポリペプチドの阻害活性の比率として決定することができる。例えば、 $K_{0.5}$ は、決定することができる、 $K_{0.5}$ 値 ($K_{0.5}$ 変異体/ $K_{0.5}$ 野生型)の比率として示される野生型FXaと比較して修飾FXポリペプチドの阻害因子耐性（たとえばAT-I II耐性またはTFPI耐性）の程度の表現である。1.0より大きい比率は、修飾FXポリペ

チドが阻害因子（たとえばA T-I I IまたはT F P I）に対する増加した耐性を示すことを意味する。別の例において、 $k_{a p p}$ は、決定することができ、 $k_{a p p}$ 値（ $k_{a p p}$ 野生型/ $k_{a p p}$ 変異体）の比率として示される野生型F X aと比較して修飾F X ポリペプチドの阻害因子耐性（たとえばA T-I I I耐性またはT F P I耐性）の程度の表現である。1. 0より大きい比率は、修飾F X ポリペプチドが阻害因子、たとえばA T-I I Iおよび／またはT F P Iに対する増加した耐性を示すことを意味する。

【0098】

本明細書において使用されるように、補因子は、他の特定のタンパク質または分子に結合して、活性複合体を形成するタンパク質または分子を指す。いくつかの例では、補因子への結合が、最適なタンパク質分解活性に必要とされる。たとえば、第V a因子（F V a）は、F X aの補因子である。F V aへのF X aまたはF X aのチモーゲン様形態の結合は、その基質に対するF X aのタンパク質分解活性の増加をもたらすコンホメーション変化を誘発する。

10

【0099】

本明細書において使用されるように、第V a因子（F V a）は、F X aに対して補因子として機能する非酵素的に活性な凝固因子を示す。第V因子は、活性化血小板の表面上でトロンビンにより活性化される一本鎖ポリペプチドであり、カルシウムにより互いに非共有的に結合される二重鎖ポリペプチドであるF V aを生じる。F V aはF X aに結合し、プロトロンビナーゼ複合体を形成し、これはリン脂質および Ca^{2+} の存在化でプロトロンビンからトロンビンに変換する。インビボにおいて、これは、一般的に、細胞表面上で起こる。トロンビンを活性化するためのF X aの活性がF V aの存在下で非常に増加されるため、F V aはF X aに対する補因子である。

20

【0100】

本明細書において使用されるように、「F V a非依存性活性」は、F V aの非存在下でのF X aの活性を指す。

【0101】

本明細書において使用されるように、「F V a依存性活性」は、F V aの存在下でのF X aの活性を指す。

【0102】

本明細書において使用されるように、「補因子依存性」または「相対的補因子依存性」は、F V aの非存在下と比較してF V aの存在下でより良いF X a活性を提供することを指し、F V a非依存性活性に対するF V a依存性活性の比率として示すことができる。典型的に、F X aは、完全な活性が補因子の存在に依存するように、補因子の非存在下よりも補因子の存在下で有意に良い活性を示す。例えば、活性F X aとその活性化補因子F V aとの関連性は、補因子の非存在と比較して、活性（たとえば触媒活性）において2, 000倍よりも大きい増加をもたらす。

30

【0103】

本明細書において使用されるように、増加した補因子依存性は、未修飾F X ポリペプチドのような参照ポリペプチドと比較して、修飾F X ポリペプチドの増加した補因子依存性の任意の量を指す。増加した補因子依存性を示す修飾ポリペプチドは、未修飾ポリペプチドと比較して、例えば、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%またはそれ以上の補因子への増加した依存度を指す。増加した補因子依存性は、修飾を含まない参照ポリペプチドまたは未修飾F X ポリペプチドに対する修飾F X ポリペプチドの補因子依存性（F V a依存性活性/F V a非依存性活性）の比率として決定することができる。たとえば、修飾F X ポリペプチドは、未修飾F X ポリペプチドと比較して、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍ま

40

50

たはそれ以上増加した補因子依存性を示すとき、増加した補因子依存性を示す。

【0104】

本明細書において使用されるように、グリコシル化部位は、炭水化物部分を付加することができる、ポリペプチドにおけるアミノ位置を指す。典型的に、グリコシル化タンパク質は、炭水化物部分の付加のために、アスパラギンまたはセリンなどのような1つまたは複数のアミノ酸残基を含有する。

【0105】

本明細書において使用されるように、天然グリコシル化部位は、炭水化物部分が野生型ポリペプチドにおいて付加されるアミノ酸位置を指す。FXにおいて4つの天然グリコシル化部位：配列番号：134を基準にして残基Thr159、Thr171、Asn181およびAsn191に対応する2つのO-グリコシル化部位および2つのN-グリコシル化部位がある。

10

【0106】

本明細書において使用されるように、非天然グリコシル化部位は、野生型ポリペプチドにおいて存在しない、修飾ポリペプチドにおいて炭水化物部分が付加されるアミノ酸位置を指す。非天然グリコシル化部位は、アミノ酸置換によってFXポリペプチドの中に導入することができる。O-グリコシル化部位は、たとえば、天然残基のセリンまたはトレオニンとのアミノ酸置換によって、生成することができる。N-グリコシル化部位は、たとえば、モチーフAsn-Xaa-Ser/Thr/Cysを確立することによって、生成することができ、ここで、Xaaは、プロリンではない。アミノ酸修飾によるこのコンセンサス配列の生成は、たとえば、天然アミノ酸残基のアスパラギンとの単一アミノ酸置換、天然アミノ酸残基のセリン、トレオニン、もしくはシステインとの単一アミノ酸置換、または天然残基のアスパラギンとの第1のアミノ酸置換および天然残基のセリン、トレオニン、もしくはシステインとの第2のアミノ酸置換を含む二重アミノ酸置換を含むことができる。

20

【0107】

本明細書において使用されるように、「グリコシル化のレベル」は、例えば、グリコシル化が可能である宿主細胞における発現時に、グリカンにより占有され得るグリコシル化部位の数を指す。

【0108】

本明細書において使用されるように、グリコシル化のレベルを基準にしての増加は、未修飾または野生型FXポリペプチドを基準にしてグリカンにより占有され得るグリコシル化部位の数が多数あることを示す。グリコシル化のレベルの増加を示す修飾ポリペプチドは、未修飾または野生型FXポリペプチドと比較してグリカンにより占有されるグリコシル化部位の数が多数あるとき、高グリコシル化され得る。

30

【0109】

本明細書において使用されるように、「生物学的活性」は、化合物、組成物、または他の混合物のインビボ投与に際して結果として生じる、化合物のインビボ活性または生理学的応答を指す。したがって、生物学的活性は、そのような化合物、組成物、および混合物の治療的効能および医薬活性を包含する。生物学的活性は、そのような活性を試験するまたは使用するために設計されるインビトロ系において観察することができる。したがって、本明細書における目的上、FXポリペプチドの生物学的活性は、血液凝固活性を包含する。

40

【0110】

本明細書において使用されるように、用語「評価する」およびその文法的な変化形は、ポリペプチドの活性についての絶対値を得るという意味でおよびまた活性のレベルを示す指数、比、百分率、視覚的値、または他の値を得るという意味でも、定量的決定および定質的決定を含むように意図される。評価は、直接的または間接的なものであってもよい。たとえば、ポリペプチドによる基質の切断の検出は、産物の直接的な測定によるものとすることができるまたは切断された基質の結果として生じる活性を決定することによって間

50

接的に測定することができる。

【0111】

本明細書において使用されるように、「成熟ナンバリング」または「標準ナンバリング」は、成熟FXポリペプチドに基づく残基のナンバリングを指す。本明細書における目的上、成熟ナンバリングは、配列番号：134に記載されている成熟FXの残基のナンバリングに基づく。

【0112】

本明細書において使用されるように、「キモトリプシンナンバリング」は、配列番号：556の成熟キモトリプシンポリペプチドのナンバリングに基づくアミノ酸残基のナンバリングを指す。たとえば第X因子のプロテアーゼドメインなどのような他のセリンプロテアーゼのプロテアーゼドメインのアラインメントは、三次元モデリングおよび一般的なセリンプロテアーゼの構造の重ね合わせに由来する配列照合パターンに基づいてキモトリプシンを用いてなすことができる。（たとえばGreer, J., *Proteins Struct. Funct. Genet.* 7 (1990) 317-334参照）。そのような場合、キモトリプシンのアミノ酸に対応する第X因子のアミノ酸は、キモトリプシンアミノ酸のナンバリングが与えられる。配列番号：134において記載されるFXポリペプチドの重鎖のプロテアーゼドメインに対応するアミノ酸位置195～448の対応するキモトリプシンナンバーは、表1において提供される。配列番号：134において記載される配列と比較したアミノ酸位置は、標準のフォントとし、それらの位置のアミノ酸残基は、太字とし、対応するキモトリプシンナンバーは、イタリック体とする。たとえば、成熟キモトリプシン（配列番号：556）との成熟第FX因子（配列番号：134）のアライメントに際して、第X因子におけるアミノ酸位置195でのイソロイシン（I）は、I16のキモトリプシンナンバリングが与えられる。続くアミノ酸は、それに応じてナンバリングされる。残基が、プロテアーゼにおいて存在するが、キモトリプシンにおいて存在しない場合、アミノ酸残基は文字表記が与えられる（たとえば、成熟ナンバリングによる残基330は、キモトリプシンナンバリングによる残基146Aである）。

【0113】

10

20

【表 1 - 1】

表 1. 第 X 因子のキモトリプシンナンバリング

195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209
I	V	G	G	Q	E	C	K	D	G	E	C	P	W	Q
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
A	L	L	I	N	E	E	N	E	G	F	C	G	G	T
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239
I	L	S	E	F	Y	I	L	T	A	A	H	C	L	Y
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254
Q	A	K	R	F	K	V	R	V	G	D	R	N	T	E
61	61A	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	73A
255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269
Q	E	E	G	G	E	A	V	H	E	V	E	V	V	I
74	75	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284
K	H	N	R	F	T	K	E	T	Y	D	F	D	I	A
90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299
V	L	R	L	K	T	P	I	T	F	R	M	N	V	A
105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314
P	A	C	L	P	E	R	D	W	A	E	S	T	L	M
120	121	122	123	124	124A	125	126	127	128	129	129A	130	131	132

10

20

30

【表 1 - 2】

315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
T	Q	K	T	G	I	V	S	G	F	G	R	T	H	E
133	133A	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146
330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344
K	G	R	Q	S	T	R	L	K	M	L	E	V	P	Y
146A	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359
V	D	R	N	S	C	K	L	S	S	S	F	I	I	T
163	164	165	166	167	168	169	170	172	173	174	175	176	177	178
360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374
Q	N	M	F	C	A	G	Y	D	T	K	Q	E	D	A
178A	179	180	181	182	183	184	185	185A	185B	186	187	188	189	190
375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389
C	Q	G	D	S	G	G	P	H	V	T	R	F	K	D
191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205
390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404
T	Y	F	V	T	G	I	V	S	W	G	E	G	C	A
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	220	221
405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419
R	K	G	K	Y	G	I	Y	T	K	V	T	A	F	L
222	223	223A	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235
420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434
K	W	I	D	R	S	M	K	T	R	G	L	P	K	A
236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	
K	S	H	A	P	E	V	I	T	S	S	P	L	K	
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	

【0 1 1 4】

本明細書において使用されるように、核酸は、DNA、RNA、ならびにペプチド核酸（PNA）およびその混合物を含むその類似体を含む。核酸は、一本鎖または二本鎖とすることができる。蛍光または放射ラベルなどの検出可能なラベルなどを用いて所望によりラベルされるプローブまたはプライマーを指す場合、一本鎖分子が、企図される。そのような分子は、典型的に、それらの標的が、統計的にユニークとなるような長さであるまたはライブラリーのプロービングもしくはプライミングのために低コピー数（典型的に5未満、一般に3未満）のものとする。一般に、プローブまたはプライマーは、対象の遺伝子と相補的なまたは同一の配列の少なくとも14、16、または30の連続ヌクレオチドを含有する。プローブおよびプライマーは、10、20、30、50、100、またはそれ

以上の核酸長とすることができる。

【0115】

本明細書において使用されるように、ペプチドは、2～40のアミノ酸長であるポリペプチドを指す。

【0116】

本明細書において使用されるように、本明細書において提供されるアミノ酸の様々な配列において生じるアミノ酸は、それらの知られている3文字または1文字の略語に従って同定される(表2)。様々な核酸断片において生じるヌクレオチドは、当技術分野においてルーチン的に使用される標準的な1文字を用いて命名される。

【0117】

本明細書において使用されるように、「アミノ酸」は、アミノ基およびカルボン酸基を含有する有機化合物である。ポリペプチドは、2つまたはそれ以上のアミノ酸を含有する。本明細書における目的上、アミノ酸は、20の天然アミノ酸、非天然アミノ酸、およびアミノ酸類似体(つまり α -炭素が側鎖を有するアミノ酸)を含む。

【0118】

J. Biol. Chem., 243:3557-3559 (1968)に記載、および米国特許法施行規則§§1.821～1.822に採用される標準的なポリペプチド命名法に合わせて、アミノ酸残基についての略語を表2に示す。

【0119】

【表2】

表2—対応の表

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/またはGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/またはAsp
C	Cys	システイン
X	Xaa	知られていないものまたは他

【0120】

本明細書における式によって表される全てのアミノ酸残基配列は、アミノ末端からカル

10

20

30

40

50

ボキシル末端への従来の方向に、左から右への配向を有することに留意されたい。さらに、語句「アミノ酸残基」は、対応の表（表2）において列挙されるアミノ酸ならびに米国特許法施行規則 § 1. 821 ~ 1. 822 において言及されるものおよび参照によって本明細書において組み込まれるものなどのような修飾アミノ酸および例外的なアミノ酸を含むように、広く定義される。さらに、アミノ酸残基配列の始まりまたは終わりのダッシュは、1つまたは複数のアミノ酸残基のさらなる配列に対する、NH₂ などのようなアミノ末端基に対する、またはCOOH などのようなカルボキシル末端基に対するペプチド結合を示すことに留意されたい。

【0121】

本明細書において使用されるように、「疎水性アミノ酸」は、Eisenberg 疎水性コンセンサススケールを使用して疎水性であると決定されるあらゆるアミノ酸を含む。例示的なものは、天然疎水性アミノ酸、たとえばイソロイシン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、トリプトファン、メチオニン、アラニン、グリシン、システインおよびプロリン（Eisenbergら, (1982) Faraday Symp. Chem. Soc. 17:109-120）である。非天然疎水性アミノ酸も含まれる。

10

【0122】

本明細書において使用されるように、「酸性アミノ酸」は、天然アミノ酸中で、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基を含む。非天然酸性アミノ酸も含まれる。

【0123】

本明細書において使用されるように、「極性アミノ酸」は、側鎖が水性（すなわち水）環境に存在することが好ましいように親水性であるアミノ酸を指す。かかるアミノ酸は、一般的に、タンパク質の表面上に位置する。かかるアミノ酸は、一般的に、水との水素結合に関与することができる酸素または窒素を含有する官能基、たとえば酸、アミド、アルコールまたはアミンを有する極性側鎖を有するものを含むとき、分類される。例示的なかかるアミノ酸は、Arg (R)、Asn (N)、Asp (D)、Glu (E)、Gln (Q)、His (H)、Lys (K)、Ser (S)、Thr (T) および Tyr (Y) である。Cys (C) および Trp (W) はまた、弱い極性と考えられる。

20

【0124】

本明細書において使用されるように、極性および中性アミノ酸は、中性側鎖を含む極性アミノ酸である。置換のための例示的なかかるアミノ酸残基は、Asn (N)、Gln (Q)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C) または Tyr (Y) である。

30

【0125】

本明細書において使用されるように、「天然アミノ酸」は、ポリペプチドにおいて生じる20種のL-アミノ酸を指す。

【0126】

本明細書において使用されるように、「非天然アミノ酸」は、表2において列挙される天然アミノ酸のうちの1つではない、アミノ基およびカルボン酸基を含有する有機化合物を指す。したがって、非天然アミノ酸は、たとえば、20種の天然アミノ酸以外のアミノ酸またはアミノ酸の類似体を含み、アミノ酸のD-立体異性体を含むが、これらに限定されない。例示的な非天然アミノ酸は、当業者らに知られており、修飾第VII因子ポリペプチド中に含むことができる。

40

【0127】

本明細書において使用されるように、アミノ酸の適した保存的交換は、当業者に知られており、結果として生じる分子の生物学的活性を改変することなく、一般になされ得る。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須の領域における単一アミノ酸の交換が生物学的活性を実質的に改変しないことを認識する（たとえば、Watsonら Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub.co., p. 224を参照されたい）。かかる交換は、以下の表3に記載される交換に従ってなされ得る：

【0128】

【表 3】

表 3

もともとの残基	例示的な保存的交換
A l a (A)	G l y ; S e r
A r g (R)	L y s
A s n (N)	G l n ; H i s
C y s (C)	S e r
G l n (Q)	A s n
G l u (E)	A s p
G l y (G)	A l a ; P r o
H i s (H)	A s n ; G l n
I l e (I)	L e u ; V a l
L e u (L)	I l e ; V a l
L y s (K)	A r g ; G l n ; G l u
M e t (M)	L e u ; T y r ; I l e
P h e (F)	M e t ; L e u ; T y r
S e r (S)	T h r
T h r (T)	S e r
T r p (W)	T y r
T y r (Y)	T r p ; P h e
V a l (V)	I l e ; L e u

10

20

【0129】

他の交換もまた許容可能であり、経験的にまたは知られている保存的交換に従って決定されてもよい。

【0130】

本明細書において使用されるように、DNAコンストラクトは、自然界において見出されない様式で組み合わせられ、並べられたDNAのセグメントを含有する一本鎖もしくは二本鎖、線状、または環状のDNA分子である。DNAコンストラクトは、ヒトの操作の結果として存在し、操作された分子のクローンおよび他のコピーを含む。

30

【0131】

本明細書において使用されるように、DNAセグメントは、特定の性状を有する、より大きなDNA分子の部分である。たとえば、特定のポリペプチドをコードするDNAセグメントは、プラスミドまたはプラスミド断片などのような、より長いDNA分子の部分であり、5'から3'方向に読み取られる場合、特定のポリペプチドのアミノ酸の配列をコードする。

【0132】

本明細書において使用されるように、ポリヌクレオチドという用語は、5'端から3'端に読み取られるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドベースの一本鎖ポリマーまたは二本鎖ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドは、RNAおよびDNAを含み、天然源から単離する、インビトロにおいて合成する、または天然分子および合成分子の組合せから調製することができる。ポリヌクレオチド分子の長さは、ヌクレオチド（「nt」と省略）または塩基対（「bp」と省略）により本明細書において示される。ヌクレオチドという用語は、状況が可能にする場合、一本鎖分子および二本鎖分子に使用される。この用語が、二本鎖分子に適用される場合、用語は、全長を表すために使用され、塩基対という用語と等価であることが理解されるであろう。二重鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖はわずかに長さが異なることがあり得、そしてその端がずれることがあり得、したがって、二重鎖ポリヌクレオチド分子内の全てのヌクレオチドが対になることができるとは限らないことが当業者らによって認識されるであろう。そのような対でない端は、一般に、

40

50

20ヌクレオチド長を超えないであろう。

【0133】

本明細書において使用されるように、「一次配列」は、ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の配列を指す。

【0134】

本明細書において使用されるように、2つのタンパク質または核酸の間の「類似性」は、タンパク質のアミノ酸の配列または核酸のヌクレオチド配列の間の関連性を指す。類似性は、残基の配列の同一性および／または相同性の程度ならびにそこに含有される残基に基づくものとすることができる。タンパク質または核酸の間の類似性の程度を評価するための方法は、当業者らに知られている。たとえば、配列類似性を評価するためのある方法において、2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列は、配列の間で最大のレベルの同一性が得られるようにアライメントされる。「同一性」は、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列が一樣である程度を指す。アミノ酸配列のアライメントおよびある程度のヌクレオチド配列のアラインメントはまた、アミノ酸（またはヌクレオチド）における保存的な差異および／または頻繁な交換を考慮することができる。保存的な差異は、含まれる残基の物理化学的特性を保存する差異である。アラインメントは、全体的（配列の全体の長さにわたるおよび全ての残基を含む、比較される配列のアラインメント）または局所的（最も類似する1つまたは複数の領域のみを含む配列の部分のアラインメント）なものとすることができる。

【0135】

本明細書において使用されるように、用語「相同性」および「同一性」は、区別なく使用されるが、タンパク質についての相同性は、保存的なアミノ酸変化を含むことができる。一般に、対応する位置を同定するために、アミノ酸の配列は、最も高度な程度のマッチが得られるように、アライメントされる（たとえば Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carilloら (1988) SIAM J Applied Math 48:1073を参照されたい）。

【0136】

本明細書において使用されるように、「配列同一性」は、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの間の比較における、同一のアミノ酸（またはヌクレオチド塩基）の数を指す。相同性ポリペプチドは、所定の数の同一アミノ酸残基または相同性アミノ酸残基を指す。相同性は、同一残基と同様に、保存的なアミノ酸交換を含む。配列同一性は、それぞれのサプライヤーによって確立されるデフォルトギャップペナルティーを用いて使用される標準的なアライメントアルゴリズムプログラムによって決定することができる。相同性核酸分子は、所定の数の同一ヌクレオチドまたは相同性ヌクレオチドを指す。相同性は、同一残基と同様に、コードアミノ酸を変化させない交換（つまり「サイレント交換」）を含む。実質的に相同性の核酸分子は、典型的に、中程度のストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシーで、核酸の全長に沿ってまたは対象の完全長核酸分子の少なくとも約70%、80%、もしくは90%に沿ってハイブリダイズする。ハイブリダイズする核酸分子におけるコドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子もまた、企図される。（タンパク質の相同性の決定のために、保存的なアミノ酸は、同一のアミノ酸と同様にアライメントすることができ、この場合、同一性の百分率および相同性百分率は、変わる）。任意の2つの核酸分子が、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%「同一の」ヌクレオチド配列を有する（または任意の2つのポリペプチドが、そのようなアミノ酸配列を有する）かどうかは、「FASTA」プログラムなどのような、知られているコンピューターアルゴリズムを使用して、たとえば、Pe

arsonら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)におけるデフォルトパラメーターを使用して、決定することができる（他のプログラムは、G C Gプログラムパッケージ（Devereux, Jら, Nucleic Acids Research 12(I): 387 (1984)）、B L A S T P、B L A S T N、F A S T A [Atschul, S.Fら, J. Molec. Biol. 215:403 (1990); Guide to H u g e Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), and Carill oら SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988)を含む）。たとえば、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n データベースのB L A S T機能は、同一性を決定するために使用することができる。他の市販で入手可能なまたは公的に入手可能なプログラムは、D N A S t a r 「M e g A l i g n」プログラム（M a d i s o n , W I）およびU n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n 10
n G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p (U W G) 「G a p」プログラム（M a d i s o n W I）を含む。タンパク質および／または核酸分子の相同性または同一性のパーセントは、たとえば、G A P コンピュータープログラムを使用して配列情報を比較することによって決定することができる（たとえば、Smith and Waterman (Adv. A ppl. Math. 2: 482 (1981)によって改訂されたNeedlemanら J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)）。手短かに言えば、G A P のプログラムは、2つの配列のうちの短い方のシンボルの総数によって割った、類似する、アライメントされたシンボル（つまりヌクレオチドまたはアミノ酸）の数として類似性を定義する。G A P プログラムのためのデフォルトパラメーターは、（1）単項比較マトリックス（同一の場合には1および同一でない場合には0 20
という値を含有する）ならびにSchwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequen ce and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)によって記載されるGribskovら Nucl. Acids Res. 14: 6745 (1986)の加重比較マトリックス；（2）それぞれのギャップに対する3. 0のペナルティーおよびそれぞれのギャップにおけるそれぞれのシンボルに対するさらなる0. 10のペナルティー；ならびに（3）エンドギャップに対するペナルティーなし、を含むことができる。

【0137】

そのため、本明細書において使用されるように、用語「同一性」は、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの間の比較を表す。1つの非限定的な例では、「～に少なくとも90%同一の」は、参照ポリペプチドと比較した、90～100%の同一性パーセントを指す。90%またはそれ以上のレベルでの同一性は、例証目的と仮定して、1 30
00アミノ酸の試験および参照ポリヌクレオチド長が比較され、試験ポリペプチドにおけるアミノ酸の多くとも10%（つまり100のうち10）が参照ポリペプチドのアミノ酸と異なるという事実を示す。類似する比較は、試験ポリヌクレオチドおよび参照ポリヌクレオチドの間でなすことができる。そのような差異は、アミノ酸配列の全長にわたってランダムに分布した点突然変異として表され得る、またはそれらは最大に許容できる、たとえば10/100のアミノ酸差異（約90%の同一性）まで、様々な長さの1つまたは複数の場所にクラスター形成し得る。差異は、核酸またはアミノ酸の交換、挿入、または欠失として定義される。約85～90%以上の相同性または同一性のレベルでは、結果は、プログラムおよびギャップパラメーターセットに非依存性であるはずであり、そのような 40
高度なレベルの同一性は、ソフトウェアに頼ることなく容易に評価できることが多い。

【0138】

本明細書において使用されるように、用語「実質的に同一の」または「類似する」は、当業者らによって理解されるように、状況により変わるが、当業者らは、そのようなものを評価することができることもまた理解されたい。

【0139】

本明細書において使用されるように、配列のアライメントは、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における対応する位置をアライメントするための相同性（類似性および／または同一性）の使用を指す。典型的に、50%またはそれ以上の同一性によって関係する2つまたはそれ以上の配列が、アライメントされる。配列のアライメントセットは、対応する位置でアライメントされる2つまたはそれ以上の配列を指し、ゲノムDNA配列とア 50

ライメントされる、E S Tおよび他のc D N Aなどのような、R N Aに由来するアライメント配列を含むことができる。

【0140】

本明細書において使用されるように、「特異的にハイブリダイズする」は、標的核酸分子への核酸分子（たとえばオリゴヌクレオチド）の相補的塩基対合によるアニーリングを指す。当業者らは、特定の分子の長さおよび組成などのような、特異的ハイブリダイゼーションに影響を及ぼすインビトロパラメーターおよびインビボパラメーターに精通している。インビトロハイブリダイゼーションに特に関連するパラメーターは、アニーリング温度および洗浄温度、緩衝液組成、ならびに塩濃度をさらに含む。非特異的結合核酸分子を除去するための例示的な洗浄条件は、高ストリンジェンシーでは0.1×SSPE、0.1%SDS、65℃、中ストリンジェンシーでは0.2×SSPE、0.1%SDS、50℃である。等価なストリンジェンシー条件は、当技術分野において知られている。当業者は、特定の適用に適切な標的核酸分子への核酸分子の特異的なハイブリダイゼーションを達成するために、これらのパラメーターを容易に調整することができる。

10

【0141】

本明細書において使用されるように、単離もしくは精製タンパク質またはその触媒活性タンパク質の言及は、タンパク質が由来する組織の細胞に由来する細胞性物質または他の混入タンパク質が実質的にないまたは化学的に合成される場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質が実質的にないことを意味する。調製物は、そのような純度を評価するために当業者らによって使用される薄層クロマトグラフィー（TLC）、ゲル電気泳動、および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などのような標準的な分析方法によって決定されるように、容易に検出可能な不純物がそれらにないまたは十分に純粋であり、さらなる精製が、物質のタンパク質分解活性および生物学的活性などのような物理的特性および化学的特性を検出可能に変化させないであろうと思われる場合、実質的に不純物がないと決定することができる。実質的に純粋なポリペプチドを産生するためのタンパク質の精製のための方法は、当業者らに知られている。

20

【0142】

細胞性物質が実質的にないという用語は、タンパク質が単離されるまたは組換えで産生される細胞の細胞性構成成分からタンパク質が分離されている、タンパク質の調製物を含む。一実施形態では、細胞性物質が実質的にないという用語が、約30%未満（乾燥重量による）の非プロテアーゼタンパク質（本明細書において混入タンパク質とも呼ばれる）、一般に、約20%未満の非プロテアーゼタンパク質または10%の非プロテアーゼタンパク質または約5%未満の非プロテアーゼタンパク質を有するプロテアーゼタンパク質の調製物を含む。プロテアーゼタンパク質またはその活性部分が、組換えで産生される場合、それもまた、実質的に培養培地がない、すなわち、培養培地は、プロテアーゼタンパク質調製物の容量の20%、10%、または5%未満、その前後、またはそれと等しい。

30

【0143】

本明細書において使用されるように、化学的前駆体または他の化学物質が実質的にないという用語は、タンパク質が、タンパク質の合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されている、プロテアーゼタンパク質の調製物を含む。この用語は、約30%（乾燥重量による）、20%、10%、5%以下、またはそれ未満の化学的前駆体または非プロテアーゼ化学物質もしくは構成成分を有するプロテアーゼタンパク質の調製物を含む。

40

【0144】

本明細書において使用されるように、組換えDNA法を使用することによる組換え法による産生は、クローニングDNAによりコードされるタンパク質を発現させるための、分子生物学のよく知られている方法の使用を指す。

【0145】

本明細書において使用されるように、ベクター（またはプラスミド）は、その発現または複製のいずれかのために細胞の中に異種核酸を導入するために使用される別個のエレメ

50

ントを指す。ベクターは、典型的にエピソームのままであるが、ゲノムの染色体の中への遺伝子またはその部分の統合を達成するように設計することができる。細菌人工染色体、酵母人工染色体、および哺乳動物人工染色体などのような人工染色体であるベクターもまた企図される。そのような媒体の選択および使用は、当業者らによく知られている。

【0146】

本明細書において使用されるように、発現は、核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。核酸が、ゲノムDNAに由来する場合、発現は、適切な真核生物宿主細胞または真核生物宿主生物が選択される場合、mRNAのスプライシングなどのようなプロセッシングを含むことができる。

【0147】

本明細書において使用されるように、発現ベクターは、DNA断片の発現を達成することができる、プロモーター領域などのような調節配列と作動可能に連結されるDNAを発現することができるベクターを含む。そのようなさらなるセグメントは、プロモーター配列およびターミネーター配列を含むことができ、所望により、1つまたは複数の複製開始点、1つまたは複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含むことができる。発現ベクターは、プラスミドまたはウイルスDNAに一般に由来するまたは両方のエレメントを含有することができる。したがって、発現ベクターは、適切な宿主細胞の中への導入に際してクローニングDNAの発現をもたらす、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、または他のベクターなどのような組換えDNAコンストラクトまたは組換えRNAコンストラクトを指す。適切な発現ベクターは、当業者らによく知られており、真核細胞および／または原核細胞において複製可能なベクターならびにエピソームのままのベクターまたは宿主細胞ゲノムの中に統合するベクターを含む。

【0148】

本明細書において使用されるように、ベクターはまた、「ウイルスベクター」または「ウイルス性ベクター」を含む。ウイルスベクターは、細胞の中に外因性遺伝子に移入する（媒体またはシャトルとして）ように外因性遺伝子に作動可能に連結される、操作されたウイルスである。

【0149】

本明細書において使用されるように、アデノウイルスは、ヒトにおいて結膜炎および上気道感染症を引き起こすDNA含有ウイルスのグループのいずれかを指す。

【0150】

本明細書において使用されるように、裸のDNAは、ワクチンおよび遺伝子療法に使用することができるヒストンなしのDNAを指す。裸のDNAは、形質転換またはトランスフェクションと呼ばれる遺伝子移入プロセスの間に細胞から細胞に移される遺伝物質である。形質転換またはトランスフェクションにおいて、レシピエント細胞によって取り込まれる精製DNAまたは裸のDNAは、レシピエント細胞に、新しい特徴または表現型を与えるであろう。

【0151】

本明細書において使用されるように、操作可能にまたは作動可能に連結は、DNAセグメントを指す場合、セグメントが、意図される目的に一致して機能するように、たとえば、転写がプロモーターにおいて開始し、コードセグメントを通してターミネーターに進むように配置されることを意味する。

【0152】

本明細書において使用されるように、タンパク質の活性または遺伝子もしくは核酸の発現を調整する作用物質は、タンパク質の活性を減少させるもしくは増加させるまたは他の場合には改変するまたはいくつかの様式において、細胞における核酸の発現をアップレギュレートするもしくはダウンレギュレートするまたは改変する。

【0153】

本明細書において使用されるように、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、異なるポリペプチドに作動可能に連結されたポリペプチドを指す。本明細書において

10

20

30

40

50

提供されるキメラタンパク質または融合タンパク質は、1つもしくは複数の修飾FXポリペプチドもしくはその部分ならびに任意の1つもしくは複数の転写／翻訳制御シグナルについての1つもしくは複数の他のポリペプチド、シグナル配列、局在化のためのタグ、精製のためのタグ、免疫グロブリンGのドメインの一部、および／または標的作用物質を含むことができる。キメラFXポリペプチドはまた、他のポリペプチドと交換されるポリペプチドのそれらの内因性ドメインまたは内因性領域を有するものをも含む。これらのキメラタンパク質または融合タンパク質は、融合タンパク質として組換え手段によって産生されるもの、たとえばスルフヒドリル基へのカップリングを通じた化学的カップリングなどのように、化学的手段によって産生されるもの、ならびに少なくとも1つのポリペプチド（つまりFX）またはその部分が、リンカー（複数可）を介して直接的または間接的に他のポリペプチドに連結される任意の他の方法により産生されるものを含む。

10

【0154】

本明細書において使用されるように、作動可能に連結は、融合タンパク質を指す場合、インフレームで互いに融合されるプロテアーゼポリペプチドおよび非プロテアーゼポリペプチドを指す。非プロテアーゼポリペプチドは、プロテアーゼポリペプチドのN-末端またはC-末端に融合することができる。

【0155】

本明細書において使用されるように、標的作用物質は、細胞表面受容体などのような細胞表面分子への特異的な結合を提供する、タンパク質またはその有効な部分などのような任意の部分であり、受容体は、いくつかの場合では、結合したコンジュゲートまたはその部分を内部移行することができる。標的作用物質はまた、たとえば、コンジュゲートのアフィニティー単離または精製、表面へのコンジュゲートの付加、またはコンジュゲートもしくはコンジュゲートを含有する複合体の検出を促進するもしくは容易にする作用物質とすることもできる。

20

【0156】

本明細書において使用されるように、分子の誘導体または類似体は、分子から誘導される部分または分子の修飾バージョンを指す。

【0157】

本明細書において使用されるように、「疾患または障害」は、感染症、後天性状態、遺伝的状態を含むが、これらに限定されない原因または状態に起因し、同定可能な症状により特徴づけられる、生物における病的状態を指す。本明細書における対象の疾患および障害は、凝固タンパク質によって媒介されるものおよび凝固タンパク質が病因または病状において役割を果たすものを含む、凝固を伴うものを含む。疾患および障害はまた、血友病などにおいて、タンパク質の欠如によって引き起こされるものを含み、本明細書において特に関心があるのは、凝固タンパク質における欠損の欠乏症により凝固が生じないそれらの障害である。

30

【0158】

本明細書において使用されるように、「凝血促進薬」は、血液凝固を促進する任意の物質を指す。

【0159】

本明細書において使用されるように、「抗凝固薬」は、血液凝固を阻害する任意の物質を指す。

40

【0160】

本明細書において使用されるように、「血友病」は、血液凝血因子における欠乏によって引き起こされる出血障害を指す。血友病は、たとえば、凝血因子の欠如、発現の低下、または機能の低下の結果となり得る。最も一般的な型の血友病は、血友病Aであり、これは、第VIII因子における欠乏に起因する。第2の一般的な型の血友病は、血友病Bであり、これは、第IX因子における欠乏に起因する。FXI欠乏と呼ばれる血友病Cは、より軽度な、それほど一般的でない形態の血友病である。

【0161】

50

本明細書において使用されるように、「先天性血友病」は、遺伝する血友病の型を指す。先天性血友病は、凝血因子遺伝子の突然変異、欠失、挿入、または他の修飾に起因し、凝血因子の産生は、欠如している、低下している、または機能しない。たとえば、第ⅤⅠⅠ因子および第ⅠⅩ因子などのような凝血因子遺伝子における遺伝的突然変異は、先天性血友病、血友病AおよびBをそれぞれもたらす。

【0162】

本明細書において使用されるように、「後天性血友病」は、FⅤⅠⅠⅠを不活性化する自己抗体の産生に由来する、成人期において発症する血友病の型を指す。

【0163】

本明細書において使用されるように、「出血障害」は、対象が、乏しい血液凝固による出血を制御する能力が減少している状態を指す。出血障害は、遺伝し得または獲得され得、また、たとえば、凝固経路における欠損もしくは欠乏、血小板活性における欠損もしくは欠乏、または血管の欠損に起因し得る。

10

【0164】

本明細書において使用されるように、「後天性出血障害」は、肝臓疾患、ビタミンK欠乏症、またはクマジン（ワルファリン）もしくは他の抗凝固薬による療法などのような状態によって引き起こされる凝血欠乏に起因する出血障害を指す。

【0165】

本明細書において使用されるように、疾患または状態を有する対象を「処置する」は、本明細書において提供されるポリペプチド、組成物、または他の産物が、対象に投与されることを意味する。

20

【0166】

本明細書において使用されるように、治療剤、治療レジメン、放射線防護剤、または化学療法剤は、ワクチンを含む従来の薬剤および薬剤療法を意味し、これらは、当業者らに知られている。放射線治療剤は、当技術分野においてよく知られている。

【0167】

本明細書において使用されるように、処置は、状態、障害、または疾患の症状が回復するまたは有益に改変される任意の様式を意味する。したがって、処置は、予防法、療法、および／または治療法を包含する。処置はまた、本明細書における組成物の任意の、医薬としての使用をも包含する。処置はまた、本明細書において提供される修飾FⅩおよび組成物の任意の、医薬としての使用をも包含する。

30

【0168】

本明細書において使用されるように、医薬組成物または他の治療薬の投与によるなどのような処置による特定の疾患または障害の症状の改善は、永久的なものまたは一時的なもの、永続的なものまたは一過性のものにかかわらず、組成物または治療薬の投与に帰し得るまたは関連し得る、症状の任意の緩和を指す。

【0169】

本明細書において使用されるように、予防または予防法は、疾患または状態を発症する危険性を低下させる方法を指す。予防法は、疾患もしくは状態を発症する危険性の減少および／または症状の悪化もしくは疾患の進行の予防または症状の悪化もしくは疾患の進行の危険性の低下を含む。

40

【0170】

本明細書において使用されるように、特定の疾患を処置するための化合物または組成物の有効量は、疾患と関連する症状を改善させるまたはいくつかの様式では低下させるのに十分な量である。上記量は、単一投与量として投与することができまたはレジメンに従って投与することができ、それによって、それは、有効となる。その量は、疾患を治療することができるが、典型的に、疾患の症状を改善させるために投与される。典型的に、反復投与が、症状の所望の改善を達成するために必要とされる。

【0171】

本明細書において使用されるように、「治療有効量」または「治療有効用量」は、治療

50

的効能をもたらすのに少なくとも十分な化合物を含有する作用物質、化合物、物質、または組成物を指す。有効量は、疾患または障害の症状を予防する、治癒する、改善させる、阻止する、または部分的に阻止するために必要な治療剤の含量である。

【0172】

本明細書において使用されるように、処置される「患者」または「対象」は、哺乳動物を含むヒトまたは非ヒト動物を含む。哺乳動物は、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、およびサルなどのような霊長動物；イヌ、ウマ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウシなどのような家畜化された動物；ならびにマウス、ラット、ハムスター、およびアレチネズミなどのようなげっ歯動物を含む。

【0173】

本明細書において使用されるように、組合せは、2つのアイテムの間のまたはそれ以上のアイテムの間の任意の関連を指す。関連は、空間的なものとすることができるまたは共通の目的のための2つもしくはそれ以上のアイテムの使用を指すことができる。

【0174】

本明細書において使用されるように、組成物は、2つまたはそれ以上の産物または化合物（たとえば作用物質、修飾因子、調節因子など）の任意の混合物を指す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性製剤もしくは非水性製剤、またはそれらの任意の組合せとすることができる。

【0175】

本明細書において使用されるように、「製品」は、作製され、販売される産物である。本出願の全体にわたって使用されるように、この用語は、包装製品に含有される修飾プロテアーゼポリペプチドおよび核酸を包含するように意図される。

【0176】

本明細書において使用されるように、流体は、流動することができる任意の組成物を指す。したがって、流体は、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリーム、および他のそのような組成物の形態をしている組成物を包含する。

【0177】

本明細書において使用されるように、「キット」は、包装された組合せを指し、所望により、組合せの要素を使用する方法を実施するための試薬および他の産物および／または成分を含む。たとえば、本明細書において提供される修飾プロテアーゼポリペプチドまたは核酸分子ならびに投与、診断、および生物学的活性または生物学的特性の評価を含むが、これらに限定されない目的のための他のアイテムを含有するキットが提供される。キットは、所望により、使用のための説明書を含む。

【0178】

本明細書において使用されるように、動物は、これらに限定されないが、ヒト、ゴリラ、およびサルを含む霊長動物；マウスおよびラットなどのようなげっ歯動物；ニワトリなどのような家禽；ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジなどのような反芻動物；ブタなどのようなヒツジに近い動物ならびに他の動物などのような任意の動物を含む。非ヒト動物は、企図される動物としてヒトを除外する。本明細書において提供されるプロテアーゼは、任意の源、動物、植物、原核生物、および菌類に由来するものである。

【0179】

本明細書において使用されるように、遺伝子療法は、そのような療法が求められる障害または状態を有する哺乳動物、特にヒトの標的細胞である、ある種の細胞の中へのDNAなどのような異種核酸の移入を伴う。本明細書における目的上、遺伝子療法は、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドをコードする核酸の移入を伴う。DNAなどのような核酸は、直接的またはベクターもしくは他のデリバリービヒクルなどにおいてDNAなどの異種核酸が発現し、それによって、コードされる治療産物が産生される様式で、選択される標的細胞の中に導入される。その代わりに、DNAなどのような異種核酸は、いくつかの様式において、治療産物をコードするDNAの発現を媒介することができるまたはそれは、いくつかの様式において、直接的または間接的に治療産物の発現を媒介する

10

20

30

40

50

、ペプチドまたはRNAなどのような産物をコードすることができる。遺伝的療法はまた、欠陥遺伝子を置換するまたは核酸が導入される哺乳動物もしくは細胞により産生される遺伝子産物を補充する遺伝子産物をコードする核酸を送達するために使用することもできる。導入された核酸は、哺乳動物宿主において通常産生されないまたは治療有効量でもしくは治療的に有用な時に産生されない、プロテアーゼまたは修飾プロテアーゼなどのような治療化合物をコードすることができる。治療産物をコードする、DNAなどのような異種核酸は、産物またはその発現を増強するまたはその他の場合には改変するために、罹患した宿主の細胞の中への導入の前に、修飾することができる。遺伝的療法はまた、遺伝子発現の阻害因子またはリプレッサーまたは他の修飾因子のデリバリーを伴い得る。

【0180】

10

本明細書において使用されるように、遺伝子療法のための治療的に有効な産物は、異種核酸、典型的にDNAによってコードされ、宿主の中への核酸の導入に際して、遺伝性疾患もしくは後天性疾患の症状、徴候を改善させるもしくは排除するまたは疾患を治癒する産物が発現される、産物である。

【0181】

本明細書において使用されるように、ポリペプチドが、アミノ酸の記載される配列から「本質的になる」という説明は、完全長ポリペプチドの記載される部分またはその断片のみが存在することを意味する。ポリペプチドは、他の源からのさらなるアミノ酸を所望により含むことができ、一般にそれらを含み、またはそれを他のポリペプチドの中に挿入することができる。

20

【0182】

本明細書において使用されるように、単数形「1つの(a)」 「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が他に特に明らかに指示しない限り、複数の指示物を含む。したがって、たとえば、「細胞外ドメイン」を含む化合物への言及は、1つまたは複数の細胞外ドメインを有する化合物を含む。

【0183】

本明細書において使用されるように、範囲および量は、「約」、その特定の値または範囲として表現することができる。約はまた、まさにその量をも含む。したがって、「約5塩基」は、「約5塩基」およびまた「5塩基」をも意味する。

【0184】

30

本明細書において使用されるように、「所望による」または「所望により」は、引き続いて記載される事象または状況が、生じるまたは生じないことおよび説明が、前記事象または状況が生じる場合およびそれが生じない場合を含むことを意味する。たとえば、所望により交換される基は、基が交換されないまたは交換されることを意味する。

【0185】

本明細書において使用されるように、任意の保護基、アミノ酸、および他の化合物についての略語は、他に示されない限り、それらの共通の使用法、認識される略語、またはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature ((1972) Biochem. 11:1726を参照されたい)に従うものとする。

【0186】

40

B. 止血および第X因子

本明細書において、修飾された活性化第X因子(FXa)ポリペプチドおよびその触媒活性断片を包含する、修飾された(modify)第X因子(FX)ポリペプチドが提供される。血栓形成の共通経路における最初の酵素として、FXは、凝固カスケードにおける独特の重要な位置を占める。FX上流の凝固因子IXまたはVIIIにおける欠損は、FXaの不適切な産生をもたらす。不適切なFXaの結果は、トロンビンおよび血餅形成フィブリンレベルの低下であり、これは、血友病を生じる[Robertsら(2006). Hemophilia A and hemophilia B. In MA Lichtmanら, eds., Williams Hematology, 7th ed., pp. 1867-1886. New York: McGraw-Hill]。よって、FXは、上流凝固因子における欠損をバイパスするための魅力的な治療法であり、外科手技の最中またはその後の凝血促進等、他の血

50

友病非依存性の医薬適用において有用でもあり得る。

【0187】

F X aは、カスケードにおける他の凝血因子における欠損をバイパスする治療用凝血原として働く潜在性を有するが、治療法としての完全に機能的なF Xの使用は、全身性凝固の過剰な活性化のために、非実用的であることを証明した。活性F X aがその活性化補助因子、F V aと会合してプロトロンビナーゼ複合体を形成すると、トロンビン活性化において100,000倍を超える増加を生じるが、F X a単独は、低レベルのトロンビン活性化が可能である [Nesheimら (1979) J. Biol. Chem., 254:10952-10962]。よって、F X aの注入は、望ましくない凝固誘発を生じ得る。実際には、F X aの投与は、インビボ (in vivo)でトロンビン生成を引き起こし、動物モデルにおける播種性血管内凝固 (D I C) の誘導に用いられる [Kruithofら (1997) Thombosis and Haemostasis 77(2):308-311; Gilesら (1984) J. Clin. Invest. 74(6):2219-2225]。したがって、治療法としてのF X aの使用は、かかる医薬調製物が血栓形成性であり、播種性血管内 (intravasal) 凝固をもたらし得るという懸念のために限定される。したがって、治療法としてのF Xの使用のための研究は、不活性チモーゲンF Xの使用に着目した (例えば、米国特許第4,501,731号明細書を参照)。本明細書で提供される修飾されたF X aポリペプチドを包含する修飾されたF Xポリペプチドは、これらの問題を克服する。

10

【0188】

治療法としてのF X a使用の別の限定要因は、抗トロンビン (A T) I I IおよびプロテインC等、血漿プロテアーゼ阻害因子 (inhibitor) によるその急速な不活性化による、循環F X aの短い半減期に帰する [Gitelら (1984) J. Biol. Chem. 259(11):6890-6895; Gilesら (1988) Br. J. Haematol. 69(4):491-497]。

20

【0189】

F X aの望ましくない活性は、凝固経路の活性に限定されない。F X aは、免疫および炎症経路の活性化ならびに傷害に応答した有糸分裂誘発においても十分に立証された役割を果たす [Altieri (1993) Blood 81:569-579; Altieri (1995) FASEB J. 9:860-865; Cirinoら (1997) J. Clin. Invest. 99(10):2446-2451; Leadleyら (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 1(2):169-175]。免疫、炎症および有糸分裂誘発経路のF X a媒介性の活性化は、浮腫等、望まれない効果を生じ得る [Cirinoら (1997) J. Clin. Invest. 99(10):2446-2451]。F X aのこれらの活性は第V因子とは無関係に生じ、これについてはより詳細に後述する。

30

【0190】

重要なことに、第X因子のチモーゲン立体構造 (後述) は、上述の経路を活性化することができない [Ambrosiniら (1997) J. Biol. Chem. 272(13):8340-8345]。したがって、上述の治療法としてのF X a使用の落とし穴を克服するため、本明細書で提供されるF X aポリペプチドは、ポリペプチドがチモーゲン立体構造を模倣し、F V aの非存在下において低活性から活性なしを提示するように、ポリペプチドの構造的変性能力を変更するように修飾されている。しかし、飽和レベルのF V aの存在下では、F X a突然変異体の活性は、プロトロンビナーゼ複合体へとアセンブルした後に完全に回復される。本明細書に実証されている通り、本明細書で提供される修飾されたF XのF X a型は、F V aの非存在下と比較したF V aの存在下での触媒活性の比として、150,000以上、一般に、300,000以上の相対補助因子依存性を提示する型を包含し、この値は、野生型F X aにより提示されるものをおよそ50倍～100倍超える。

40

【0191】

突然変異体I195L [キモトリプシンナンバリングによるI16Lに相当、Ivanciuら (2011) Nature Biotechnology, 29:1028-1033およびBunceら (2011) Blood, 117:290-8を参照] 等、チモーゲン様活性を提示することが記述されている本技術分野における既存のF X a突然変異体は、F V aの非存在下で実質的な活性を依然として保持する。このことは、ある特定のチモーゲン様F X a突然変異体の治療適用を限定し得る。本明細書において、補助因子依存性の大幅な増加を提示 (exhibit) する修飾されたF X aチモーゲン

50

様ポリペプチドが、血栓症または炎症に関連する毒性を付与することなく凝固を容易にすることにより、治療上の利点を提示することが見出される。したがって、かかる修飾されたFXaポリペプチドが、本明細書で提供される。加えて、本明細書で提供されるFXaポリペプチドは、ATIII等、血漿プロテアーゼ阻害因子による不活性化に抵抗し、他にも循環半減期の増加または改善を提示するポリペプチドも包含する。

【0192】

次のセクションおよびサブセクションは、FX型（例えば、チモーゲンおよびFXa型）の凝固経路、構造、プロセッシングおよび調節ならびに凝固経路におけるFXの機能について記載する。FV依存性および非依存性活性の構造、機能および調節についても後述する。

10

【0193】

1. 凝固経路

凝固は、血液が血餅を形成する複雑な過程である。これは、損傷した血管からの失血の休止である止血の重要な部分であり、そこでは、損傷した血管壁が、血小板およびフィブリン含有血餅に覆われて出血を止め、損傷した血管の修復が始まる。凝固障害は、出血〔大出血（hemorrhage）〕または閉塞性凝血（血栓症）リスクの増加をもたらす得る。凝固経路は、高度に保存されており、細胞（血小板）およびタンパク質（凝固因子）構成成分に参与する。凝固の第1相において、血小板が活性化されて、傷害部位に止血栓を形成する。続いて、血小板血栓を強化するフィブリン鎖の形成をもたらすタンパク質分解カスケードにおいて作用する、血漿凝固因子に参与する二次止血が起こる。

20

【0194】

血小板血栓の補強をもたらすタンパク質分解カスケードは、セリンプロテアーゼの循環チモーゲン（不活性チモーゲン）およびその糖タンパク質補助因子が活性化されて、活性構成成分となり、続いてこれがカスケードにおける次の反応を触媒し、最終的に架橋されたフィブリンをもたらす一連の反応によって生じる。凝固因子は、一般に、ローマ数字で示される（例えば、第X因子）。ローマ数字に付属する小文字の「a」は、活性型を示す（例えば、第Xa因子）。

【0195】

凝固カスケードは古典的に、3経路へと分けられる：外因性（または組織因子）経路、内因性（または接触活性化）経路および共通経路（図2を参照）。内因性および外因性経路は、並行して生じ、第X因子において収束して共通経路を形成し、フィブリン血餅の形成をもたらす〔Mannら（1990）Blood, 76(1):1-16〕。

30

【0196】

a. 組織因子（外因性）凝固経路

凝固は、血管への傷害により、血管を裏打ちする内皮が損傷されてから殆ど直後に開始される。血液凝固開始の一次経路は、組織因子経路である。組織因子（TF）は、正常であれば血流に曝露（expose）されない、細胞表面上に発現される膜貫通型タンパク質である。血液に曝露されると、TFは、循環セリンプロテアーゼ第VII因子（FVII）と会合し、膜表面における第VII因子の活性化（FVIIa）をもたらす。次に、TF/FVIIa複合体（テナーゼとも呼ばれる）は、TF保有細胞表面における不活性循環第X因子（FX）の活性セリンプロテアーゼ（FXa）への変換を触媒する。

40

【0197】

b. 内因性凝固経路

内因性凝固経路は、血漿中に内因的に存在する酵素に参与し、血管の統合性が損なわれた後に露出したコラーゲンにおける、第XI因子（FXI）を包含するタンパク質複合体の形成から始まる。他の事象の中でもとりわけ、FXIは、活性化されてFXIaとなり、プロテアーゼカスケードを開始する。FXIaは、（第XI因子）FXIをFXIaへと変換する。第XIa因子は、第IX因子（FIX）をFIXaへと活性化する。次に、FIXaは、その糖タンパク質補助因子、FVIIIIaとテナーゼ複合体を形成し、これは、活性化された血小板の表面においてFXをFXaへと活性化する。

50

【0198】

c. 共通経路

外因性および内因性経路は、TF/FVIIaおよびFVIIa/FIXaテナーゼ複合体によるFXのチモーゲン型の切断、したがって、活性FX (FXa)を形成するFX活性化において収束する(図2)。Ca²⁺の存在下における、1:1化学量論におけるFXaとその活性化補助因子、第V因子(FVa)との相互作用は、膜結合型プロトロンビナーゼ複合体の形成をもたらす。プロトロンビナーゼ複合体は、FXaとそのFVa補助因子、基質プロトロンビンおよびリン脂質表面との会合により膜表面上に形成される。プロトロンビナーゼは、プロトロンビン(FIIとも呼ばれる)をArg323-Ile324で切断し、続いてArg274-Thr275で切断することにより作用して、活性セリンプロテアーゼ、トロンビン(FIIaとも呼ばれる)を得る[Krishnaswamyら(1986) J. Biol. Chem., 261:8977-8984; Krishnaswamyら(1987) J. Biol. Chem., 262:3291-3299]。次に、トロンビンは、フィブリノーゲンをフィブリンへと変換し、活性化トランスグルタミナーゼ第XIII因子によるフィブリンタンパク質の架橋後に、傷害部位に血餅をもたらす。

10

【0199】

フィブリノーゲンからフィブリンへの変換に加えて、FXa活性化トロンビンは、フィードバックして直接的な切断により内因性凝固経路をさらに活性化し、これにより内因性凝固経路の数種の構成成分を活性化(例えば、第XI因子を第XIa因子へと変換および第VII因子を第VIIa因子へと変換)することにより、凝固の増幅および伝播に

20

【0200】

プロトロンビナーゼ複合体におけるその役割に加えて、FXaは、トロンビンに加えてFV、FVIIおよびFVIIを包含する凝固因子を活性化することにより活性をフィードバックすることができ、プロテアーゼ活性化受容体(PAR)の活性化における役割を果たし得る[Fosterら(1983) J. Biol. Chem., 258(22):13970-13977; Eatonら(1986) Biochemistry, 25(2):505-512; Butenas and Mann (1996) Biochemistry, 35(6):1904-1910]。

【0201】

2. 第V因子非依存性活性

第V/Va因子の非存在下で、FXaは、低レベルのトロンビン活性化が可能であり、炎症応答、遺伝子発現および細胞増殖の媒介を包含する非止血性細胞事象においても機能する[Camererら(1999) J. Biol. Chem. 274:32225-32233; Cirinoら(1997) J. Clin. Invest. 99(10):2446-2451; Gajdusekら(1986) J. Cell Biol. 103:419-428; Gasicら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:2317-2320; Herbertら(1998) J. Clin. Invest. 101:993-1000; Koら(1996) J. Clin. Invest. 98:1493-1501; Papapetropoulosら(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4738-4742; Sendenら(1998) J. Immunol 161:4318-4324]。これらのFV/FVa非依存性活性は、下にさらに詳細に記載されている。

30

【0202】

a. トロンビン活性化

その第Va因子補助因子の非存在下で、FXaは、一部の触媒活性を維持し、有意に低下されてはいるが、プロトロンビン活性化をもたらす[Nesheimら(1979) J. Biol. Chem., 254:10952-10962]。プロトロンビン活性化の経路は、FXaが溶液中に存在するか、リン脂質の表面においてFVaと共にプロトロンビナーゼ複合体に取り込まれているかに依存して明確に異なる。溶液において、プロトロンビン活性化は、プロトロンビンのArg274における初回切断により進められてプレトロンビンおよび断片1、2を生じ、続いてプレトロンビン断片内のArg323における第2の切断が行われて、 α -トロンビンのジスルフィド結合したAおよびB鎖を生じる[Mannら(1981) Methods Enzymol., 80:286-302]。

40

50

【0203】

対照的に、膜結合型プロトロンビンが、膜結合型プロトロンビナーゼにより活性化される場合、プロトロンビン活性化は、先ずArg323における切断により進められてメイゾトロンビンのジスルフィド結合した鎖を中間体産物として生じ、続いて、メイゾトロンビンのArg274における切断が行われて、 α -トロンビンおよび活性化ペプチド断片1.2を生じる [Krishnaswamyら (1986) J. Biol. Chem. 261(19) 8977-8984]。

【0204】

メイゾトロンビン中間体は、それ自体が強力な血管収縮薬として働く優れたセリンプロテアーゼであり [Thompsonら (1987) Blood, 70:410a. (Abstract 1494); Thompsonら (1990) J. Vasc. Med. Biol., 1:348; Doyle and Mann (1990) J. Biol. Chem., 265(18):10693-10701]、トロンボモジュリンに結合されると、抗凝固薬プロテインC (後述) を活性化することにより、血液凝固における調節エレメントとして作用し得る [Mannら (1990) Blood, 76(1):1-16]。

【0205】

b. 炎症および細胞増殖

凝固経路におけるその役割に加えて、FXaは、炎症および有糸分裂誘発を包含する他の生理的機序に寄与する [Leadleyら (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 1(2):169-175]。FXaは、主として、エフェクター細胞プロテアーゼ受容体 (EPR-1) に結合することにより、またはプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) のタンパク質分解による活性化により、様々な細胞におけるこれらのシグナル伝達経路を開始する。

【0206】

i. エフェクター細胞プロテアーゼ受容体-1 (EPR-1)

エフェクター細胞プロテアーゼ受容体-1 (EPR-1) は、単球、白血球、血管内皮細胞および平滑筋 (smooth muscle) 細胞の表面におけるFXaの受容体として同定された [Altieri (1995) FASEB J 9:860-865; Nicholsonら (1996) J. Biol. Chem. 271:28407-28413; Bonoら (1997) J. Cell. Physiol. 172:36-43]。EPR-1へのFXaの結合は、白血球活性化 [Altieri (1995) J. Leukocyte Biol. 58:120-127]、トロンビン形成 [Bouchardら (1997) J. Biol. Chem. 272:9244-9251; Ambrosini and Altieri (1996) J. Biol. Chem. 271:1243-1248] および細胞増殖 (Nicholsonら (1996) J. Biol. Chem. 271:28407-28413) をもたらす。白血球活性化は、サイトカインの合成および接着分子の発現を伴い、これは、免疫応答の一部として血管拡張および炎症をもたらす。

【0207】

成熟FX配列の位置83~88に位置付けられるFXa配列LFT R K L (配列番号555) は、EPR-1の認識部位である [Ambrosiniら (1997) J. Biol. Chem. 272 (13): 8340-8345; Cirinoら (1997) J. Clin. Invest. 99(10):2446-2451]。FXa酵素活性は、EPR-1結合に必要とされない [Herbertら (1998) J. Clin. Invest. 101:993-1000; Ambrosiniら (1997) J. Biol. Chem. 272 (13): 8340-8345]。しかし、第X因子のチモーゲン立体構造は、EPR-1結合モチーフへの接近を防止するため、FXの活性化は、EPR-1結合に必要とされる。FXaの軽鎖における立体構造転移は、相互作用ドメインを露わにし、EPR-1結合と、続くシグナル伝達を可能にする。

【0208】

ii. プロテアーゼ活性化受容体 (PAR)

FXaは、プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) のタンパク質分解による活性化を介して細胞シグナル伝達を開始することができる。PARは、血小板、内皮細胞、筋細胞およびニューロンにおいて高度に発現されるGタンパク質共役受容体である [Macfarlaneら (2001) Pharmacol. Rev. 53(2):245-282]。特に、FXaは、プロテアーゼ活性化受容体-1 (PAR-1) およびプロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR-2) を切断してN末端ペプチドを放出させ、続いてこれはテザーリガンドとして作用して活性化をもたらす [McLeanら (2001) Thrombosis Research 103:281-297]。PAR-1およびPAR-2の活性化は、Gタンパク質共役シグナル伝達によって媒介される細胞増殖の増加 [Macfarlane

10

20

30

40

50

ら (2001) Pharmacol. Rev. 53(2):245-282]、炎症性サイトカインおよび接着分子の産生の増加 [McLeanら (2001) Thombosis Research 103:281-297; Sendenら (1998) J. Immunol 161:4318-4324; Papapetropoulosら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4738-4742] ならびに血栓形成促進性組織因子 (TF) の産生の増加 [McLeanら (2001) Thombosis Research 103:281-297] をもたらす。FXa 酵素活性は、PAR シグナル伝達の活性化に必要とされる [McLeanら (2001) Thombosis Research 103:281-297]。

【0209】

3. 第X因子阻害因子

第X因子活性は、血液における3種の主要な抗凝固性タンパク質系によって阻害される：抗トロンビンIII (AT-III) /ヘパリン、プロテインC /プロテインSおよび組織因子経路阻害因子 (TFPI)。3種の系は、第X因子活性の阻害、それによる凝固経路の阻害において明確に異なる相補的な役割を果たす。

【0210】

抗トロンビン (AT-III) は、第X因子が、AT-III の反応部位ループにおける反応性結合に攻撃を開始する際に、タンパク質分解過程の中間段階に酵素を捕獲することにより、第Xa 因子のセリンプロテアーゼ活性を阻害する。ヘパリンは、AT-III の反応部位ループにおける立体構造変化を誘導して、活性部位への第Xa 因子の侵入を容易にすることにより、また、第Xa 因子の表面における塩基性残基と直接的に相互作用して、安定な不活性三元複合体の形成を容易にすることにより、第Xa 因子の阻害を助ける [Rezaie, AR, (2000) J. Biol. Chem., 275(5):3320-3327; Langdownら (2004) J. Biol. Chem., 279 (45): 47288-47297]。

【0211】

プロテインC経路において、血漿中を循環する別のビタミンK依存性セリンプロテアーゼチモージェンであるプロテインCは、凝固経路の結果としてのトロンビン形成後に、内皮表面におけるトロンビントロンボモジュリン-内皮プロテインC受容体複合体による限定タンパク質分解により活性化プロテインC (APC) に変換される [Esmon and Owen (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2249-2252]。続いて、活性プロテインC (APC) は、タンパク質分解による切断により第Va 因子 (FVa) を不活性化することにより、第Xa 因子活性を阻害する。FVa のAPC消化は、プロテインSにより、FVa のプロテインC切断を触媒し、FXa に結合してプロテインCの不活性化を阻害することにより容易になる [Mosnier and Griffin JH (2006) Front. Biosci., 11: 2381-2399]。

【0212】

組織因子経路阻害因子 (TFPI) は、第X因子チモージェンではなく第Xa 因子の活性部位にまたはその付近に直接的に結合することにより、第Xa 因子を阻害する [Brozeら (1988) Blood, 71 (2): 335-343; Brozeら (1990) Biochemistry, 7539-7546]。上に記すAT-IIIと同様に、FXa のTFPI阻害は、ヘパリンの存在下で加速される。続いて、FXa-TFPI複合体は、FVIIa-組織因子テナーゼ複合体に結合しこれを阻害することにより、組織因子凝固経路 (および追加的なFX活性化) を阻害する。

【0213】

C. 第X因子構造および活性化

他の凝固酵素と同様に、第X因子は、タンパク質分解による切断が活性化に必要とされる、チモージェンと呼ばれる不活性前駆体として血液中を循環する。チモージェンは、活性化後に産生されるセリンプロテアーゼと比較して、約10,000倍以下のタンパク質分解活性を保有する。上に記す通り、血管損傷部位における凝固の開始は、特異的なタンパク質分解による切断によりチモージェンが変換されて活性プロテアーゼとなって、次に続く反応のための活性酵素を生成する一連の反応をもたらす。FXa は、TF / FVIIa および FVIIa / FXa テナーゼ複合体により、FXチモージェンのタンパク質分解による切断により生成される (図2を参照)。これは結果的に、血液細胞活性化および可溶性フィブリンノーゲンから不溶性フィブリンへの変換、したがって、血餅の形成をもたらす。過剰なプロテアーゼは、「自殺」基質として作用するか、または活性酵素を認識する循環

10

20

30

40

50

プロテアーゼ阻害因子との反応により除去される。よって、凝固チモーゲンのタンパク質分解による活性化は、凝固カスケードの重要な調節的特色である。

【0214】

第X因子cDNAは、多数の哺乳類種からクローニングされている。例示的なFXポリペプチドとして、ヒト（配列番号2に表記され、配列番号1にコードされる前駆プレプロペプチド；および配列番号134に表記されている成熟型）、キタホオジロテナガザル（配列番号393に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号404に表記されている成熟型）、オリーブヒヒ（アヌビスヒヒ）（配列番号394に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号405の成熟型）、アカゲザル（配列番号395に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号406に表記されている成熟型）、ダスキーティティサル（配列番号396に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号407に表記されている成熟型）、アフリカゾウ（配列番号397に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号408に表記されている成熟型）、マウス（配列番号398に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号409に表記されている成熟型）、ウサギ（配列番号399に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号410に表記されている成熟型）、ラット（配列番号400に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号411に表記されている成熟型）、イヌ（配列番号401に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号412に表記されている成熟型）、ブタ（配列番号402に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号413に表記されている成熟型）およびウシ（配列番号403に表記されている前駆プレプロペプチドおよび配列番号414に表記されている成熟型）が挙げられるがこれらに限定されない。ヒトFXの数種のアレル変異体も同定されている [Cargillら (1999) Nat. Gen., 22:231-238；配列番号547～552]。

【0215】

血流中への分泌により不活性FXチモーゲン前駆体のプロセッシングを調節し、機能的FXa活性酵素の生成をもたらす過程および構造的な特色について、ヒトFX成熟、チモーゲンおよびFXaポリペプチドを例証しつつ、下に概要を述べる。かかる記載に基づき、当業者であれば、そのアレルまたは種変異体を包含する、他のFXポリペプチドにおけるその相当する成熟、チモーゲン、FXaおよび触媒活性型が分かるか、またはこれらを決定することができる。例えば、チモーゲン型が、上述の単鎖成熟型のうちいずれかの2本鎖型を包含し、それにより、ポリペプチドが、ジスルフィド結合により連結された軽鎖および重鎖を含有するように、アミノ酸残基が、単鎖FXの鎖内タンパク質分解により切除されることが理解される。加えて、種およびアレル変異体ならびに他の変異体のFXaは、一般に、活性化ペプチドをさらに欠くその2本鎖型として存在する。ヒトFXに関して例証する本明細書における記載ならびにその種およびアレル変異体に関する本技術分野における知識に鑑みて、当業者であれば、例証されているアレルおよび種変異体ならびに本技術分野において公知の他の変異体におけるかかる型に相当する残基に精通しており、これを同定することができる。

【0216】

1. FXプロセッシング、翻訳後修飾およびチモーゲン分泌

第X因子は、セリンエンドプロテイナーゼであり、キモトリプシン様フォールドを有するプロテアーゼのS1ペプチダーゼファミリーのメンバーである。第X因子をコードするヒト遺伝子は、第13染色体の長腕（13q34）に位置付けられる。これは、8個のエクソンで構成され、およそ33キロベースの長さであり、主に肝臓において発現される。ヒトFX転写物は、1560ヌクレオチドの長さであり、短い5'非翻訳領域と、1467ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（終止コドンを含む）と、3'非翻訳領域とを包含する。1467ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（またはFX mRNA；配列番号1）は、488アミノ酸のプレプロペプチド（Swiss-Prot受託番号P00742；配列番号2）をコードする。

【0217】

第X因子は、肝臓において、プレプロペプチドと命名される単鎖前駆体タンパク質として合成される。プレプロペプチドFXは、肝細胞の分泌経路を移行する際にプロセッシングされる。ヒトFXを例証すると、プレプロペプチドは、第X因子ポリペプチドを小胞体（ER）への転位を経て肝細胞分泌経路へと導く、31アミノ酸のN末端シグナルペプチド（配列番号2のアミノ酸1～31）を含有する。続いて、シグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼにより切断され、新たなアミノ末端に9アミノ酸のプロペプチド（配列番号2のaa32～40）を残して、プロペプチド型のFXを生成する。ポリペプチドが、ER内腔においてその三次構造へとフォールドされる際に、12個のジスルフィド結合が形成される。ヒトFXを参照すると、これらの結合は、配列番号134に表記されている残基に相当する、位置17および22、50および61、55および70、72および81、89および100、96および109、111および124、132および302、201および206、221および237、350および364、375および403におけるシステイン残基の間に形成される（図1を参照）。

10

【0218】

次に、その結果得られたポリペプチドは、ER内腔において翻訳後修飾される。N末端プロペプチドは、ビタミンK依存性カルボキシラーゼにより数個のグルタミン酸残基（配列番号134に表記されているFXポリペプチドのアミノ酸6、7、14、16、19、20、25、26、29、32および39に相当）を変換してγ-カルボキシグルタミン酸（Gla）とするための認識エレメントとして働く [Furie and Furie (1988) Cell, 53:505-518]。このγ-カルボキシ化工程は、ERおよびゴルジ体の間のFX前駆体の輸送における役割を果たし [Stanton and Wallin (1992) Biochem. J., 284:25-31]、循環成熟FXチモーゲンの最適なCa²⁺媒介性活性化に関与する。FXポリペプチドは、β-ヒドロキシル化およびグリコシル化により、トランスゴルジ区画においてさらに翻訳後修飾される。研究により、これらの残基のグリコシル化が、その生理的活性化因子による第X因子チモーゲンの認識に重要であることが示された [Yangら (2009) J. Thromb. Haemost., 7(10):1696-1702]。例えば、ヒトFXを参照すると、ヒドロキシル化は、配列番号134に表記されているFXポリペプチドの位置63に相当するアスパラギン酸残基において生じ [McMullenら (1983) Biochemistry, 22:2875-2884]、グリコシル化は、配列番号134に表記されているFXポリペプチドの残基159および171に相当する位置におけるスレオニン残基ならびに残基181および191に相当する位置におけるアスパラギン残基において生じる [Inoue and Morita (1993) Eur. J. Biochem, 218:153-163]。

20

30

【0219】

プロペプチドは、トランスゴルジ体におけるタンパク質分解による切断により除去されて、プロペプチドを欠く成熟型（配列番号134に表記）を生成し、これは、血流へのチモーゲンの分泌に先立ち行われる。加えて、単鎖成熟FXの鎖内タンパク質分解もトランスゴルジ区画において行われ、これは、プロペプチド切断の前であっても後であってもよい [Stanton and Wallin (1992) Biochem. J. 284:25-31]。これは、配列番号134に表記されている残基に相当するアミノ酸140～142の除去と、2本鎖ポリペプチドの生成をもたらす。よって、その結果得られる分泌されたFXチモーゲンは、ジスルフィド結合によって連結された軽鎖および重鎖として存在する。例えば、配列番号134に表記されている成熟単鎖型を参照すると、軽鎖は、130アミノ酸（配列番号134の残基1～139に相当）であり、重鎖は、306アミノ酸（配列番号134の残基143～448に相当）である。分泌されたチモーゲンは、配列番号134のアミノ酸140～142の切除による2本鎖型として存在し、それにより、FXの軽および重鎖は、配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照したCys132（軽鎖）およびCys302（重鎖）の間のジスルフィド結合により連結を維持する [Di Scipioら (1977) Biochemistry, 16:698-706]。

40

【0220】

軽鎖および重鎖を含有する、分泌された2本鎖チモーゲン不活性型は、酵素の活性化の

50

ために除去される必要がある活性化ペプチドを重鎖のN末端に含有する（図2を参照）。配列番号134に表記されているヒトFXに関して、野生型FXチモーゲンは、配列番号134のアミノ酸1～139に相当するアミノ酸の配列を有する軽鎖と、アミノ酸143～448に相当するアミノ酸の配列を有する重鎖とを有し、それにより、活性化ペプチドは、重鎖のアミノ末端における52アミノ酸残基で構成される。活性FX（FXa）は、タンパク質分解による切断により生成されて、さらに後述する活性化ペプチドを除去する。FXaの軽および重鎖は、配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照したCys132（軽鎖）およびCys302（重鎖）の間のジスルフィド結合により連結を維持する。

【0221】

10

活性化ペプチド（後述）の切断に先立ち、循環する第X因子のチモーゲン型は、4種の主要セグメントに関してFXaとは構造的に明確に異なる構造的立体構造で存在する。「活性化ドメイン」と総称されるこれらのセグメントは、重鎖のN末端（活性化ペプチドプラス配列番号134の残基195～198）ならびに残基325～334、365～377および400～406（配列番号134に表記されている残基に相当）である。重鎖のN末端における活性化ペプチドは、FXの活性化ドメインセグメントを立体構造的に遮断する。不活性チモーゲンにおいて、活性化ドメインは、基質結合ポケット（S1部位）の一部を覆い、これにより基質接近を制限し、触媒活性を殆ど不可能にする。

【0222】

2. 活性化第X因子（FXa）の活性化および生成

20

チモーゲン型の活性化切断と、一般に、活性化ペプチドの放出は、活性セリンプロテアーゼの生成に必要とされる。一般に、セリンプロテアーゼに関して、チモーゲンから活性セリンプロテアーゼへの変換は、キモトリプシンナバリングに従ったArg¹⁵後の（典型的には、Arg¹⁵およびIle¹⁶間の結合の）切断を必要とする。これは、活性化ペプチドの除去をもたらし、Ile¹⁶で始まる触媒ドメインにおける新たなN末端を露出させ得る。例えば、FXに関して、活性化されたFX（FXa）は、配列番号134に表記されている残基に相当するアミノ酸194～195間のタンパク質分解による切断後に行われる活性化ペプチドの除去により、FXチモーゲンから生成される。FXに関して、タンパク質分解による切断は、インビボにおいて、凝固経路上流の活性化されたセリンプロテアーゼによって、即ち、TF/FVIIaおよびFVIIa/FIXaテナーゼ複合体によって開始される。タンパク質分解による切断による活性化は、本明細書の実施例に記載されている通り、例えば、ラッセルクサリヘビ毒FX活性化因子を用いて、インビトロ（in vitro）において誘導することもできる。

30

【0223】

活性化ペプチドを除去するためのタンパク質分解プロセッシングは、配列番号134に表記されている成熟FXにおける疎水性残基Ile195～Gly198に相当する、重鎖の新たなN末端を露わにする。その結果得られたFXaは、ジスルフィド結合により軽鎖に連結された、触媒として活性を有する重鎖を含有する。配列番号134に表記されているアミノ酸の配列に関して、野生型FXaは、配列番号134のアミノ酸1～139に相当するアミノ酸残基の配列を有する軽鎖と、配列番号134のアミノ酸残基195～448に相当するアミノ酸の配列を有する重鎖とを有する。FXaの軽および重鎖は、配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照したCys132（軽鎖）およびCys302（重鎖）の間のジスルフィド結合により連結を維持する。

40

【0224】

重鎖の露出された新たなN末端配列は、触媒ドメインへとフォールドされ、配列特異的様式でN末端結合間隙へと挿入される。N末端挿入は、キモトリプシンナバリングにより、触媒ドメイン内部におけるIle16およびAsp194のα-NH₂基の間に塩橋の形成をもたらす（配列番号134に表記されている成熟FXのナバリングによるIle195およびAsp378に相当）。塩橋形成は、活性化ドメインの再編成、触媒作用に必要とされるオキシアニオンホール形成および基質結合部位の形成を包含する、触媒

50

ドメイン構造における多数の変化に関連する。これらの変化は、活性セリンプロテアーゼの成熟化をもたらす。例えば、疎水性コアにおけるA s p 3 7 8と新たに露出されたN末端の間に埋もれた塩橋の形成を適合させるための三次構造の再編成は、活性化ドメインにS 1サブサイトを整える立体構造変化をもたらし、活性プロテアーゼを生じる。

【0225】

配列番号134の重鎖残基195～448は、キモトリプシン様セリンプロテアーゼドメインを特色とする。キモトリプシン様セリンプロテアーゼファミリーの他のメンバーと同様に、FXのプロテアーゼドメインは、触媒活性部位において収束する2個のグリークキー (Greek key) β -バレルサブドメインを含有する。残基H i s 2 3 6、A s p 2 8 2およびS e r 3 7 9は、活性プロテアーゼの活性部位触媒3残基を作り出す。配列番号134のA r g 4 2 9の後のF X aの追加的な自己タンパク質分解は、 α 型のF X aを β 型に変換する [Mertens and Bertina, Biochem. J. (1980) 185:647-658]。しかし、F X aのこれら2型は、機能的に識別不能である [Pryzdial and Kessler, J. Biol. Chem. (1996) 271:16621-16626]。

【0226】

プロテアーゼドメインの活性部位は、S 1～S 4にナンバリングされる4個のサブポケットに分けられる。S 1ポケットは、三次元構造において触媒3残基の隣に位置付けられ、基質特異性および結合の主要な決定要因である。S 1ポケットは、C y s 4 0 3-C y s 3 7 5ジスルフィド結合によって連結された配列番号134の残基398～403および373～379、ならびに配列番号134の残基409～412によって形成されるループにより形成される。S 1ポケット内において、A s p 3 7 3、G l y 4 0 0およびG l y 4 1 0は、基質結合選択性にとって重要な残基である。S 2部位は、配列番号134の残基270～279に相当するループによって形成された小型の浅いポケットである [Raiら, Curr. Med. Chem. (2001) 8(2):101-119]。配列番号134のT y r 2 7 9に相当するT y rは、S 2サブサイトにおける酵素特異性に重要である [Rezaie, J. Biol. Chem. (1996) 271(39):23807-23814]。F X aのS 3区域は、S 1ポケットの周縁部に位置付けられ、溶媒曝露されており、結合特異性を殆ど付与しない。S 4サブサイトは、配列番号134のアミノ酸270～279および350～359を含有するループの間に形成され、3個のリガンド結合ドメインを含有する：「疎水性ボックス」（配列番号134の残基T y r 2 7 9、P h e 3 5 6およびT r p 3 9 9により形成）、「カチオンホール」（配列番号134のG l u 2 7 7の側鎖およびK 2 7 6の主鎖により形成）および水部位（配列番号134の残基T h r 2 7 8、I l e 3 5 7およびT h r 3 5 9により形成） [Raiら, Curr. Med. Chem. (2001) 8(2):101-119]。

【0227】

F X aおよびチモーゲン型の軽鎖は、それぞれ明確に異なる機能特性を保有する、3個の特徴的構造ドメインを有する [Leytusら, Biochemistry. (1986) 25:5098-5102; Padmanabhanら, J. Mol. Biol. (1993) 232:947-966]。 γ -カルボキシグルタミン酸 (GLA) リッチドメイン（配列番号134の残基1～39）は、上述の11個のGLA残基を含有し、細胞膜とのC a²⁺依存性FX会合に重要である：プロトロンビナーゼ複合体のアセンブリーの要件 [Morita and Jackson, J. Biol. Chem. (1986) 261(9):4015-4023]。GLAドメインに続いて、短い疎水性スタック（配列番号134の残基40～45に相当）、ならびに2個の上皮増殖因子 (EGF) 様ドメイン：E G F 1（配列番号134のアミノ酸46～84に相当）およびE G F 2（配列番号134のアミノ酸85～128に相当）が存在し、これは、タンパク質-タンパク質相互作用に関与し、E G F 1の場合、残基G l y 4 7、G l y 6 4、G l n 4 9、A s p / H y a 6 3およびA s p 4 6に関与するC a²⁺結合に関与する [Selander-Sunnerhagenら, J. Biol. Chem. (1992) 267(27):19642-19649]。

【0228】

F X aは、完全に機能的な活性部位を保有し、プロトロンビンを切断してトロンビンとするための触媒機構を含有するが、ある程度の活性は存在するものの、この反応にとって

は不十分な触媒である。この補助因子非依存性活性は、上に記す通り、F X a の注入に伴う有害副作用の原因の一部となる。一般に、生物学的基質の効率的な切断による完全な活性は、補助因子として第 V a 因子 (F V a) を必要とする。血小板膜上に存在する F V a は、F X a に結合し、リン脂質に対する F X a の親和性増加および触媒活性の増加をもたらす [例えば、Segers ら (2007) Thromb. Haemost., 98:530-542 を参照]。例えば、実施例に示す通り、野生型 F X a は、一般に、F V a の存在下で、その非存在下よりも、その基質に対し 3 0 0 0 倍超増加した触媒活性を提示する。F X a におけるコア補助因子結合エピトープは、配列番号 1 3 4 に表記されている残基に相当する A r g 3 4 7、L y s 3 5 1 および L y s 4 1 4 である [例えば、Rudolph ら (2001) J. Biol. Chem., 276:5123-5128 を参照]。

10

【0229】

D. 修飾第 X 因子ポリペプチド

修飾 (複数可) を含有しない相当する型の F X ポリペプチドと比較して変更または改善された活性または特性を提示する、F X チモーゲンプロテアーゼおよび活性 F X (F X a) プロテアーゼポリペプチドを包含する、変異体または修飾第 X 因子 (F X) ポリペプチドが、本明細書で提供される。特に、かかる変更または改善された活性または特性は、F X ポリペプチドが活性化された場合に、または修飾された F X a ポリペプチドとして存在する場合に明らかである。本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドにおいて変更された活性または特性は、F V a 補助因子依存性の増加、阻害因子に対する抵抗性の増加、グリコシル化のレベルもしくは程度の増加、半減期の増加および／または触媒活性の増加を包含する。例えば、阻害因子に対する抵抗性の増加は、組織因子経路阻害因子 (T F P I) または抗トロンビン I I I (A T - I I I) の一方または両方に対する抵抗性の増加として顕在化され得る。本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドの活性型は、F V a の存在下を包含して触媒活性、したがって凝血原活性を提示する。かかる修飾された F X ポリペプチドは、F V I I I a および F I X a 等、凝固カスケードにおけるより初期に作用する酵素の必要を同時にバイパスしつつ、疾患または状態の処置において用いて、凝固活性を提供することができる。

20

【0230】

特に、その活性 F X a 型で存在する場合、創傷部位における局所的活性の改善を維持または提示するが、補助因子の非存在下では全身性活性を殆ど提示しないから全く提示しない、第 X 因子チモーゲンおよび F X a ポリペプチドを包含する修飾された F X ポリペプチドが、本明細書で提供される。この結果は、野生型 F X a または本技術分野におけるいずれか既存の F X a 変異体と比較して実質的に増加した補助因子依存性をもたらす、本明細書で提供される修飾 (複数可) によるものである。したがって、活性 F X a ポリペプチドとして本明細書で提供される修飾されたプロテアーゼは、野生型 F X a よりもはるかに優れた効力を提示するが、循環する遊離型は、創傷部位における F V a 補助因子に結合しているときのみ強い (即ち、野生型 F X a に匹敵する) 活性を提示することができるため、安全性の増加を提示し得る。本明細書で提供される F X チモーゲン型および F X a を包含する修飾された F X ポリペプチドは、血友病 (血友病 A または B) を有する対象を処置するための治療適用と共に、外科手術または他の外傷における等、止血を制御するための他の適用において用いることができる。

30

40

【0231】

半減期の増加を提示する、第 X 因子チモーゲンおよび F X a 型を包含する修飾された F X ポリペプチドも包含されている。血友病の処置のための治療法としての第 X 因子／第 X a 因子チモーゲン／プロテアーゼの使用に関する問題は、それらの短い半減期である。例えば、第 X 因子は、2 4 ~ 4 0 時間の半減期を提示する。凝固経路に欠陥または欠損を提示する血友病患者の長期処置のため、不都合かつ望まれない頻度における反復的な投薬を回避するためには、より長い半減期が有利である。本明細書で提供される修飾第 X 因子／第 X a 因子チモーゲン／プロテアーゼは、グリコシル化のレベルおよび／または種類の変更を理由とする半減期の変更を提示する。グリコシル化は、タンパク質の安定性、溶解性

50

を増加させ、免疫原性を低下させることにより、ポリペプチドの血清半減期を増加させることができる。第X因子チモーゲンおよびFXa型を包含する本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、ATIIIおよび他の阻害因子等、阻害因子に対する抵抗性の増加により、活性型の場合の半減期の増加も提示する。

【0232】

FXポリペプチドにおける修飾（複数可）は、発現、精製およびプロセッシング（インビトロまたはインビボ）されたときに、活性化ペプチドを欠く軽鎖と重鎖とを含有するFXaをもたらしことのできる型でさえあれば、いかなる型のFXポリペプチドになすこともできる。本明細書における目的のため、本明細書におけるFXポリペプチドにおけるアミノ酸置き換え（複数可）への言及は、軽鎖（アミノ酸残基1～139に相当）および重鎖（アミノ酸残基140～448に相当）を含有し、それにより、重鎖は、FXa型に正常には存在しないアミノ酸残基140～142および52アミノ酸の活性化ペプチドを含有する、配列番号134に表記されている成熟型における残基に関するものである。したがって、修飾された成熟型のFXが本明細書で提供される。アミノ酸置き換えは、配列番号134に表記されている成熟ポリペプチドとのアライメントにより、本技術分野において公知のいずれかのFX型またはいずれかの変異体FXの相当する残基においてなすことができる（例えば、図1を参照）。よって、ジスルフィド結合により連結された重鎖および軽鎖を含有する、配列番号134のアミノ酸残基140～142に相当するアミノ酸残基を欠く2本鎖チモーゲン型であり、配列番号134に表記されているナンバリングを参照したアミノ酸置き換え（複数可）を含有する、修飾されたFXポリペプチドも本明細書で提供される。アミノ酸残基140～142に相当するアミノ酸残基を欠き、重鎖における活性化ペプチドを欠き、ジスルフィド結合により連結された重鎖および軽鎖を含有する配列番号134の2本鎖型であり、配列番号134に表記されているナンバリングを参照したアミノ酸置き換え（複数可）を含有する修飾されたFXa型が、さらに本明細書で提供される。他の型のFXまたは配列番号134以外の他のFXポリペプチドにおける相当する残基は、配列番号134とのアライメントにより同定することができる。

【0233】

本願を通じて、いずれかのセリンプロテアーゼにおけるアミノ酸残基のナンバリングに用いられる一般的なナンバリングスキームである、キモトリプシンナンバリングについて参照することもできる[Greer (1990) Proteins: Structure, Function and Genetics, 7: 317-334]。配列番号134に表記されている成熟配列およびキモトリプシンに基づくFXナンバリングの相当するナンバリングスキームは、本明細書の表1で提供されている。よって、キモトリプシンナンバリングを参照して、本技術分野において公知のいずれかの変異体FXにおいて本明細書で提供されるアミノ酸置き換え（複数可）を生成することも当業者のレベルの範囲内である。

【0234】

したがって、配列番号134に表記されている成熟FXに修飾を含有する修飾されたFXポリペプチド、または修飾（複数可）を包含するそのチモーゲン、活性もしくは触媒活性型、あるいは配列番号134に対し、または修飾（複数可）を包含するそのチモーゲン、活性もしくは触媒活性型に対し、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するその変異体が、本明細書で提供される。例えば、修飾は、配列番号393～414または547～552のいずれかに表記されているいずれかの配列等、本技術分野において公知のいずれかのアレルもしくは種変異体または本技術分野において公知の他の変異体（例えば、セクションD. 5を参照）あるいはそのチモーゲン、活性または触媒活性型を参照してなすことができる。

【0235】

その結果得られた修飾されたFXポリペプチドは、単鎖型であってもよく、または2本以上の鎖を含有してもよい。典型的には、修飾されたFXポリペプチドは、2本鎖チモーゲンまたは2本鎖活性FXaである。単鎖ポリペプチドとして本明細書で提供されるいず

れかの修飾されたポリペプチドが、自己活性化または活性化されて、2本鎖型を生成することが理解される。さらに、活性化ペプチドを含有する、チモーゲン型で本明細書で提供されるいずれかの修飾されたポリペプチドは、公知の活性化因子（例えば、他の凝固因子複合体またはRVV）により活性化されて、修飾されたFXa、2本鎖型を生成することができる。活性化工程は、インビトロで行ってもよく、またはインビボ投与、例えば、チモーゲン型のインビボ投与により引き起こしてもよい。例えば、インビトロで活性化が行われる場合、活性化ペプチドまたは他の切断されたペプチド配列は、本技術分野において公知の通り、また、実施例を包含する本明細書の他の箇所に記載されている通り、最終FXa型から精製することができる。修飾されたFXポリペプチドの活性は、典型的には、その2本鎖活性FXa型で提示される。

10

【0236】

例えば、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、少なくとも1個のジスルフィド結合により連結された軽鎖および重鎖を有する2本鎖型を包含する。特に、FXポリペプチドにおける修飾は、配列番号134のアミノ酸1～139に相当するアミノ酸の配列を有する軽鎖およびアミノ酸143～448に相当するアミノ酸の配列を有する重鎖を有するチモーゲン2本鎖型、またはチモーゲンであり、配列番号134のアミノ酸1～139に相当するアミノ酸の配列を有する軽鎖およびアミノ酸143～448に相当するアミノ酸の配列を有する重鎖を有するFXに対し少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するその変異体におけるものである。他の例において、FXポリペプチドにおける修飾（複数可）は、活性化ペプチドを欠く2本鎖FXa型におけるものである。例えば、FXポリペプチドにおける修飾（複数可）は、配列番号134のアミノ酸残基1～139に相当するアミノ酸の配列を有する軽鎖および配列番号134のアミノ酸195～448に相当するアミノ酸の配列を有する重鎖を有するFXaにおけるもの、または触媒活性を有し、配列番号134のアミノ酸残基1～139に相当するアミノ酸の配列を有する軽鎖および配列番号134のアミノ酸195～448に相当するアミノ酸の配列を有する重鎖を有するFXaに対しもしくはその触媒活性部分に対し、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するその変異体におけるものである。

20

30

【0237】

出発点の無修飾の参照ポリペプチドの本明細書で提供される修飾は、アミノ酸置き換えもしくは置換、アミノ酸の付加もしくは欠失またはこれらのいずれかの組み合わせを包含する。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50個以上の修飾された位置を有するポリペプチドを包含する。出発参照FXポリペプチドと比較して2個以上の修飾を有する修飾されたFXポリペプチドも、本明細書で提供される。修飾されたFXポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50個以上の修飾された位置を有するポリペプチドを包含する。

40

【0238】

本明細書で提供される修飾（複数可）は、FXポリペプチドのFXa型の活性または特性を変更して、例えば、修飾（複数可）を含有しないFXa型と比較して補助因子依存性を増加させる、阻害因子に対する抵抗性を増加させる、グリコシル化を変更するおよび／または半減期を増加させるいずれか1個または複数の修飾（複数可）を包含することができる。例えば、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、補助因子依存性を増加させる修飾（複数可）を包含することができる。かかる例において、FVaの非存在下での触媒活性（FVa非依存性触媒活性）を減少させること、および／または補助因子FVaの非存在下での基質親和性（例えば、プロトロンビンに対する）を減少させることにより、補助因子依存性を増加させることができる。別の例において、本明細書で提供さ

50

れる修飾されたF Xポリペプチドは、半減期を増加させる修飾（複数可）を包含することができる。かかる例において、半減期の増加は、T F P IまたはA T—I I I等、阻害因子に対する抵抗性を増加させる1個または複数の修飾（複数可）により引き起こすことができる。他の例において、半減期の増加は、修飾されたF Xポリペプチドがグリコシル化または高グリコシル化される（hyperglycosylated）ような、新たなグリコシル化部位の付加を生じる1個または複数の修飾（複数可）により引き起こすことができる。本明細書における特定の例において、本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、修飾（複数可）を含有しないF Xと比較して補助因子依存性を増加させ、半減期を増加させる修飾（複数可）を包含することができる。一部の例において、単一のアミノ酸置換または置き換え等、単一の修飾は、F Xポリペプチドの2、3、4種以上の特性または活性を変更する。本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドと、一般に、そのF X a型は、各特性および活性に関してアッセイして、修飾の効果の範囲を同定することができる。かかるアッセイは、本技術分野において公知であり、後述する。

10

【0239】

本明細書で提供される、その結果得られる修飾されたF Xポリペプチドは、修飾されたF X aとしての活性2本鎖型の場合、F V a依存性凝固活性を提示する。活性型の場合、F V a依存性活性が保存される、即ち、修飾（複数可）を含有しないF X aと比較して保持または増加される。例えば、活性は、修飾（複数可）を含有しないF X aのF V a依存性活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%以上である。

20

【0240】

その結果得られる修飾されたF Xポリペプチドが、修飾（複数可）を含有しないF Xポリペプチドと比較して、それぞれがその活性2本鎖型である場合、補助因子依存性の増加、阻害因子に対する抵抗性の増加、グリコシル化の変更〔例えば、高グリコシル化〕および／または半減期の増加を提示し、F V a依存性凝固活性を保存する限りにおいて、本明細書で提供されるいずれかの修飾は、当業者に公知の他のいずれかの修飾（例えば、セクションD. 5に表記されているいずれか）と組み合わせることができる。

【0241】

限定されないが、炭水化物部分の付加、ポリエチレングリコール（PEG）部分の付加、F cドメインの付加等を包含する、ポリペプチドの一次配列に存在するまたは存在しない他の修飾が、修飾されたF Xポリペプチドにおいて包含されてもよい。例えば、かかる追加的な修飾は、タンパク質の安定性または半減期を増加させるためになすことができる。本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、細胞機構により追加的に修飾されたF Xポリペプチドも包含し、例えば、グリコシル化された、γ-カルボキシル化されたおよびβ-ヒドロキシル化されたポリペプチドを包含する。

30

【0242】

本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドのいずれかをコードする核酸分子も、本明細書で提供される。特定の例において、核酸配列は、例えば、コードされた配列の発現レベルを増加させるようコドン最適化することができる。特定のコード使用は、修飾されたポリペプチドが発現される宿主生物に依存する。当業者であれば、哺乳類またはヒト細胞、細菌または酵母、例えば、エシェリキア・コリ（*E. coli*）またはサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）等における発現に最適なコドンに精通している。例えば、コドン使用情報は、kazusa.or.jp.codonにおいて利用できるコドン使用データベースから入手することができる〔例えば、データベースの記載に関してRichmond (2000) *Genome Biology*, 1:241を参照〕。Forsburg (2004) *Yeast*, 10:1045-1047; Brownら (1991) *Nucleic Acids Research*, 19:4298; Sharpら (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16:8207-8211; Sharpら (1991) *Yeast*, 657-78も参照されたい。

40

【0243】

一部の例において、コード核酸分子が、ポリペプチドのプロセッシングを変更するため

50

の異種配列を含有するよう修飾されてもよい。例えば、核酸は、ポリペプチドの分泌もしくは産生を増加させるために、またはタンパク質の機能的産生を他の形で改善するために、異種シグナル配列、プレプロペプチド（シグナル配列およびプロペプチドを含有）またはプロペプチドをコードする核酸を含有することができる。特定の例において、核酸は、第X因子のプロペプチドよりもガンマーカルボキシラーゼに対し変更された（例えば、低下した）親和性を提示する、ビタミンK依存性タンパク質のプレプロペプチドまたはプロペプチドをコードする核酸を含有することができる。ガンマーカルボキシラーゼは、第X因子の活性に必要とされる、グルタミン酸（G l u）からガンマカルボキシルグルタミン酸（G l a）への修飾を触媒する酵素である。第X因子のプロペプチドの親和性は、第V I I因子、プロテインS、第I X因子、プロテインCおよびプロトロンビン等、他のビタミンK依存性ポリペプチドと比べてガンマーカルボキシラーゼに対し最高の親和性を有する [Camireら (2000) Biochemistry, 39:14322-9]。ガンマーカルボキシラーゼに対し低下した親和性を提示する別のビタミンK依存性ポリペプチドのプレプロペプチドまたはプロペプチドを含有するようコード核酸を修飾することは、より優れた基質代謝回転を可能にし、ひいてはタンパク質産生を改善し、ガンマーカルボキシル化された産生総タンパク質のパーセンテージの増加をもたらすことにより、ガンマーカルボキシル化を増強させる。例えば、プロトロンビンプロペプチド（配列番号415～546のうちいずれかのアミノ酸残基1～43として表記）をコードする異種配列を含有する、修飾されたF Xポリペプチドをコードする核酸が本明細書で提供される。本明細書の他の箇所に記載されている通り、コード核酸は、カルボキシル化された第X因子の分率をさらに増加させるために、ビタミンKエポキシド還元酵素（V K O R）トランスフェクト細胞において産生することもできる [例えば、Sunら (2005) Blood, 106:3811-3815を参照]。

【0244】

本明細書で提供される修飾されたポリペプチドおよびコード核酸分子は、当業者に公知の標準組換えDNA技法により産生することができる。標的タンパク質におけるいずれかの1個または複数のアミノ酸に突然変異を引き起こすための、本技術分野において公知のいずれかの方法を用いることができる。方法は、コード核酸分子の標準部位特異的もしくはランダム突然変異誘発または固相ポリペプチド合成方法を包含する。特に、ペプチド合成と、続くペプチドライゲーションを包含する全面的な化学合成方法を用いることができる。F Xポリペプチドをコードする核酸分子は、コード核酸のランダム突然変異誘発、エラープロードPCR、部位特異的突然変異誘発（例えば、Stratageneから入手できるQuickChange等のキット等、キットを使用）、重複PCR、遺伝子シャッフリングまたは他の組換え方法等、突然変異誘発に付すことができる。続いて、ポリペプチドをコードする核酸は、異種的に発現されるよう宿主細胞に導入することができる。一部の例において、修飾されたF Xポリペプチドは、全面的な化学合成、固相または溶液相ペプチド合成の使用等、合成的に産生される。

【0245】

後述するサブセクションにおいて、変更された特性および活性を提示し、修飾されたF XチモーゲンまたはF X a型を包含し、核酸分子をコードする、本明細書で提供される例示的な修飾されたF Xポリペプチドが記載される。後述の記載は、補助因子依存性の増加、阻害因子（例えば、A T - I I I）に対する抵抗性の増加およびグリコシル化の変更の中から得られる1種または複数の特性または活性に基づき編成される。本明細書で提供される修飾されたポリペプチドのうち1種または複数が、上に同定されている特性または活性のうち1、2または全種を提示し得るように、これらの特性および活性が相互排他的ではないことが理解される。

【0246】

さらに、配列番号134に表記されている位置を参照した位置195におけるV a l、A l a、S e rもしくはT h rへのおよび／または位置196におけるI l e、A l a、S e rもしくはT h rへの（キモトリプシンナックリングによる残基16および17に相当）修飾を含有する修飾されたF Xポリペプチドの本明細書に後述する一部の例において

、修飾されたFXポリペプチドは、野生型第X因子に存在しないプロテアーゼプロセッシング部位をもたらすために、別のセリンプロテアーゼ由来の異種活性化ペプチドを含有しない。一例において、前駆体、成熟またはチモーゲン型として、位置195および／または196（例えば、Ile、Val、Ala、SerまたはThrによる）にアミノ酸置き換えを含有する、本明細書で提供される修飾第X因子ポリペプチドは、プロテアーゼ切断部位の一部としてArg194（キモトリプシンナリングによるArg15）を含有する。特定の例において、本明細書で提供される第X因子ポリペプチドの前駆体、成熟またはチモーゲン型は、配列番号134に表記されているアミノ酸の配列のアミノ酸残基143～194に相当するFX活性化ペプチドを含有する。本明細書における例において、位置195および／または196（例えば、Ile、Val、Ala、SerまたはThrによる）に修飾を含有する、活性型の本明細書で提供される修飾されたFXaポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸の配列のアミノ酸残基143～194に相当する活性化ペプチドを含有する修飾されたFXチモーゲンの活性化切断およびプロセッシングにより活性にされる。

10

【0247】

1. グリコシル化の変更

ポリペプチドのグリコシル化が変更されるように、FXポリペプチドに1個または複数の修飾（複数可）を含有する、修飾されたFXチモーゲンおよび修飾されたFXaポリペプチドを包含する修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。修飾は、アミノ酸の挿入、欠失または置き換えとなり得る。特に、修飾は、アミノ酸置き換えである。グリコシル化部位は、グリコシル化が可能な真核細胞においてポリペプチドが産生される際にこれがグリコシル化されるような、グリコシド結合を介したポリペプチドへの単糖およびオリゴ糖の付着のための部位を提供する。2種の主要な型のグリコシル化は、アスパラギン残基のアミド窒素を介して糖単位が付着されるN結合型グリコシル化と、セリン、スレオニン、ヒドロキシリジンまたはヒドロキシプロリン残基のヒドロキシル基を介して糖単位が付着されるO結合型グリコシル化である。他のよりマイナーな型のグリコシド結合は、システインへのS結合およびトリプトファンへのC結合を包含する。N結合型グリコシル化は、コンセンサス配列－Asn－Xaa－Ser／Thr／Cys（式中、Xaaはプロリンではない）におけるアスパラギンに生じる。O－グリコシル化に公知のモチーフは存在しないが、O－グリコシル化は、高比率のセリン、スレオニンおよびプロリン残基を有する配列に存在する可能性がより高い。しかし、潜在的グリコシル化部位の存在は、その部位が、ERにおける翻訳後プロセッシングにおいてグリコシル化されることを保証しない。さらに、グリコシル化のレベルは、所定の部位において変動する可能性があり、ある一部位は、多くの異なるグリカン構造を有し得る。

20

30

【0248】

FXは、一般に、ポリペプチドの活性化ペプチド部分（配列番号134を参照した残基Thr159、Thr171、Asn181およびAsn191に相当）に存在する2個のO結合型および2個のN結合型グリコシル化部位を有する、グリコシル化されたタンパク質である。これらのグリコシル化残基は、生理的活性化因子によるチモーゲン活性化に必要とされる〔例えば、Yangら（2009）J. Thromb. Haemost., 7:1696-1702を参照〕。

40

【0249】

本明細書において、ポリペプチドの機能および活性を変更することができる、さらに別のグリコシル化部位をFXに導入してよいことが見出される。一般に、ポリペプチドの機能および活性は、さらに別のグリコシル化部位の付加により改善または増加され、これにより治療上の利益をもたらす。例えば、グリコシル化は、タンパク質の安定性、溶解性を増加させ、免疫原性を低下させることにより、ポリペプチドの血清半減期を増加させることができる。グリコシル化は、タンパク質のタンパク質分解を低下させることにより、タンパク質の安定性を増加させることができ、熱分解、変性剤への曝露、酸素フリーラジカルによる損傷およびpHの変化からタンパク質を保護することができる。グリコシル化は、標的タンパク質が、細胞表面受容体を包含する他のタンパク質への結合に関与し得るク

50

リアランス機序から逃れることを可能にすることもできる。シアル酸を含有する炭水化物部分は、タンパク質の溶解性に影響を及ぼすことができる。シアル酸部分は、高度に親水性であり、標的タンパク質の疎水性残基を遮蔽することができる。これは、標的タンパク質の凝集および沈殿を減少させる。凝集の減少は、標的タンパク質に対する免疫応答の防止も助ける。炭水化物は、さらに、免疫系から免疫原性配列を遮蔽することができる。炭水化物部分に占有される空間の容量は、免疫系によって調査される利用できる表面積を減少させることができる。これらの特性は、標的タンパク質の免疫原性の低下をもたらす。

【0250】

したがって、グリコシル化の変更を提示する、本明細書で提供されるFXポリペプチドは、血液における半減期の増加を包含する、薬物動態および薬力学特性の改善を提示することができる。グリコシル化の変更を提示する、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、触媒活性の増加および／または阻害因子に対する抵抗性の増加等、他の活性および特性の変更を提示することもできる。特に、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドの中でも、グリコシル化の変更を提示するポリペプチドと、補助因子依存性の増加（例えば、セクションD. 2を参照）またはTFPIもしくはATI等阻害因子に対する抵抗性の増加（例えば、セクションD. 3を参照）のうち一方または両方を提示するポリペプチドが包含される。

10

【0251】

本明細書で提供されるFXポリペプチドの中でも、無修飾のFXポリペプチドと比較してグリコシル化のレベルおよび／または種類を変更させることにより修飾されたポリペプチドが包含される。グリコシル化は、無修飾のFXポリペプチドと比較して増加または減少され得る。場合によっては、グリコシル化のレベルまたは程度が増加され、高グリコシル化されたFXポリペプチドをもたらす。これは、例えば、無修飾のFXポリペプチドにおいては見出されない、炭水化物が連結される少なくとも1個の非天然グリコシル化部位を取り込むことにより達成することができる。高グリコシル化されたFXポリペプチドは、無修飾のFXポリペプチドにおいて見出されるがグリコシル化されていない、少なくとも1個の天然グリコシル化部位への炭水化物部分の連結により生成することもできる。

20

【0252】

本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、変更された、例えば、新たなO結合型グリコシル化、N結合型グリコシル化またはO結合型およびN結合型グリコシル化を含有することができる。一部の例において、修飾されたFXポリペプチドは、それぞれ異なるグリコシル化部位に連結された1、2、3、4、5個以上の炭水化物部分を包含する。グリコシル化部位（複数可）は、天然グリコシル化部位（複数可）および／または非天然グリコシル化部位（複数可）となり得る。一部の例において、修飾されたFXポリペプチドは、2個以上の非天然グリコシル化部位がグリコシル化される。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、1、2、3、4、5個以上の非天然グリコシル化部位を導入するよう修飾することができる。

30

【0253】

非天然グリコシル化部位は、アミノ酸置き換えにより導入することができる。O-グリコシル化部位は、例えば、セリンまたはスレオニンによる天然残基のアミノ酸置き換えにより作製することができる。N結合型グリコシル化部位は、モチーフAsn-Xaa-Ser/Thr/Cys（式中、Xaaはプロリンではない）を作製することにより作製することができる。アミノ酸修飾によるこのコンセンサス配列の作製は、アスパラギンによる天然アミノ酸残基の置き換え、セリン、スレオニンもしくはシステインによる天然アミノ酸残基の置き換えまたはアスパラギンによる天然アミノ酸残基の置き換えおよびセリン、スレオニンもしくはシステインによる天然残基のアミノ酸置き換えに関与し得る。非天然グリコシル化部位は、FXポリペプチドにおけるいずれかの領域において作製することができる。例えば、1個または複数のグリコシル化部位は、軽鎖および／または重鎖に導入することができる。一部の例において、1個または複数のグリコシル化部位は、軽鎖のEGF1ドメインにおいて導入される。他の例において、非天然グリコシル化部位は、重

40

50

鎖のプロテアーゼドメイン領域に導入される。グリコシル化のレベル（例えば、導入された非天然グリコシル化部位の数）は、無修飾または野生型 F X ポリペプチドのグリコシル化のレベルと比較して、少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 % 以上増加され得る。

【0254】

本明細書で提供される例示的な修飾（複数可）は、限定されないが、それぞれ配列番号 134 に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置 51 に相当する位置における N；位置 56 に相当する位置における N および位置 58 に相当する位置における S；位置 62 に相当する位置における N および位置 64 に相当する位置における S；位置 65 に相当する位置における N および位置 67 に相当する位置における S；位置 67 に相当する位置における N；位置 73 に相当する位置における N および位置 75 に相当する位置における S；位置 75 に相当する位置における N および位置 77 に相当する位置における S；位置 77 に相当する位置における N および位置 79 に相当する位置における S；位置 78 に相当する位置における N および位置 80 に相当する位置における S；位置 82 に相当する位置における S；位置 83 に相当する位置における N；位置 82 に相当する位置における N および位置 84 に相当する位置における S；位置 85 に相当する位置における N および位置 87 に相当する位置における S；位置 86 に相当する位置における N および位置 88 に相当する位置における S；位置 95 に相当する位置における N および位置 97 に相当する位置における S；位置 114 に相当する位置における N；位置 119 に相当する位置における N および位置 121 に相当する位置における S；位置 122 に相当する位置における S；位置 215 に相当する位置における N および位置 217 に相当する位置における S；位置 243 に相当する位置における N および位置 245 に相当する位置における S；位置 264 に相当する位置における N および位置 266 に相当する位置における S；位置 293 に相当する位置における N および位置 295 に相当する位置における S；位置 388 に相当する位置における N；位置 389 に相当する位置における N および位置 391 に相当する位置における S；位置 428 に相当する位置における N および位置 430 に相当する位置における S、および／または位置 429 に相当する位置における N および位置 431 に相当する位置における S による、無修飾の F X ポリペプチドにおけるアミノ酸置き換え（複数可）を包含する、1 個または複数のアミノ酸置き換え（複数可）による修飾による非天然グリコシル化の導入を包含する。配列番号 134 に表記されているアミノ酸残基を参照した、非天然グリコシル化を導入するための本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドにおける非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）が、表 4 に表記されている。

【0255】

【表 4】

表4			
E51N	Q56N/Q58S	K62N/G64S	L65N/E67S
E67N	L73N/G75S	G75N/E77S	E77N/K79S
G78N/N80S	E82S	L83N	E82N/F84S
T85N/K87S	R86N/L88S	D95N/D97S	G114N
D119N/G121S	K122S	R243N/K245S	E264N/E266S
T293N/R295S	K388N	D389N/Y391S	T428N/G430S
R429N/L431S	E215N/N217S		

【0256】

典型的には、グリコシル化が変更された、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドは、F X の少なくとも 1 種の活性を保持する。場合によっては、無修飾の F X ポリペプチドと比較した、修飾された F X ポリペプチドに存在するグリコシル化レベルの変更またはグリコシル化の種類の変化は、触媒活性の増加および／または A T - I I I 等の阻

害因子に対する抵抗性の増加として顕在化され得る。活性の増加は、グリコシル化の付加を理由とすることができるか、または非依存的にもしくはグリコシル化の変更と協調して作用して活性の変化を引き起こす二次的アミノ酸修飾（複数可）を理由とすることができる。セクションD. 2およびセクションD. 3は、本明細書で提供される修飾（複数可）のうちいずれかと組み合わせてグリコシル化を変更することができる、例示的な修飾（複数可）について記載する。

【0257】

例えば、グリコシル化が変更された本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、無修飾のFXと比較して、半減期の増加、触媒活性の増加および／または凝固活性の増加を提示する。グリコシル化が変更された修飾されたFXポリペプチドの半減期は、無修飾または野生型FXポリペプチドの半減期と比較して、少なくともまたは約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%以上増加され得る。半減期は、本明細書に記載されている薬物動態（PK）またはクリアランス試験の実施（例えば、実施例7）等により、本技術分野において公知のアッセイにおいて測定されるものを用いて決定することができる。グリコシル化が変更された修飾されたFXポリペプチドの触媒活性は、インビボまたはインビトロいずれかのアッセイにおいて測定される無修飾または野生型FXポリペプチドの触媒活性と比較して、少なくともまたは約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%以上増加され得る。触媒活性の増加は、FVa依存性および／またはFVa非依存性触媒活性となり得る。典型的には、グリコシル化が変更された本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、FVa依存性触媒活性を保持する、または修飾されたポリペプチドが補助因子依存性の増加を提示するような、FVa依存性触媒活性の増加を提示する。例示的なかかる修飾されたFXポリペプチドは、セクションD. 2に表記されている。

【0258】

他の例において、グリコシル化が変更された本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、無修飾のFXと比較して、AT-I-I-Iに対する抵抗性の増加等、阻害因子に対する抵抗性の増加を提示する。グリコシル化が変更された修飾されたFXポリペプチドのAT-I-I-I等の阻害因子に対する抵抗性は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、5000倍、5500倍、6000倍以上増加され得る。よって、適切なインビトロ、インビボまたはエクスビボ（ex vivo）アッセイにおいて評価される場合、グリコシル化が変更された修飾されたFXポリペプチドは、無修飾のFXポリペプチドの抵抗性と比較して、AT-I-I-Iに対する抵抗性の増加を呈することができる。例示的なかかる修飾されたFXポリペプチドは、セクションD. 3に表記されている。

【0259】

2. 補助因子依存性の増加

FXポリペプチドに1個または複数の修飾（複数可）を含有し、活性FXa型の場合、補助因子FVaの非存在下（FVa非依存性活性）と比較して、FVaの存在下で（FVa依存性活性）より優れた触媒活性を提示する、修飾されたFXチモーゲンおよび修飾されたFXaポリペプチドを包含する、修飾されたFXポリペプチドが本明細書で提供される。修飾は、アミノ酸の挿入、欠失または置き換えとなり得る。特に、修飾は、アミノ酸置き換えである。本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しないFXaと比較して、FVaの非存在下に対するFVaの存在下の触媒活性の比としての補助因子依存性の増加を提示する。

【0260】

F V aは、F X aの活性を実質的に増加させるよう作用するが、野生型F X aは、F V aの非存在下であってもある程度の活性を提示する。例えば、本明細書の実施例に例証されている通り、野生型F X a（例えば、血漿由来または組換えにより産生）の補助因子依存性は、およそ3, 000である。上に記す通り、F V a非依存性活性は、治療法としてのF X aの使用を限定する望まれない活性をもたらし得る。本明細書において、F V a依存性活性を保持しつつ、F V a非依存性活性の限定または低下を達成することができることを見出される。F V aの存在下における触媒活性の変化は、F V a依存性凝固活性の増加として顕在化され得る。よって、膜表面におけるプロトロンビナーゼ活性を維持しつつ、望まれない活性を低下、最小化または消失させて、治療適用に必要とされる血餅形成を引き起こすことができる。活性F X aポリペプチドとしての本明細書で提供される修飾されたプロテアーゼは、野生型F X aよりもはるかに優れた効力を提示する一方、循環する遊離型は、創傷部位におけるF V a補助因子に結合しているときにのみ活性を提示し得るため、さらにより安全となり得る。

10

【0261】

補助因子依存性の増加は、F XチモーゲンからF X aへの立体構造スイッチに関連する、F Xの重鎖における1個または複数のアミノ酸残基の修飾により達成される。正常には、F Xは、活性化前にチモーゲン型を好み、活性化後にF X a型を好む、チモーゲンから活性プロテアーゼへの立体構造型の平衡状態で存在する。チモーゲン型において、一次特異性ポケット（例えば、S1結合部位）およびオキシアニオンホールは、その「活性立体構造」において存在しないまたは安定化されず、このことは、チモーゲン型を不活性にする。加えて、基質特異性の拡張部位（エキソサイト）およびF V a結合部位もまた、「活性立体構造」へと適切に形成されないまたは安定化されない。変更された活性状態への転移は、A r g 194-I l e 195（キモトリプシンナランバリングによるA r g 15-I l e 16）間の結合の切断によりシフトさせることができ、これにより、A s p 378（キモトリプシンナランバリングによるA s p 194）との塩橋の形成に関与する新たなN末端の作製をもたらす。プロテアーゼ状態への転移は、F X a型との安定化相互作用の存在により、結合切断なしでも生じ得る。例えば、F V a補助因子は、F X aとの強い安定化相互作用をもたらす、平衡をF X a型へとシフトさせる。

20

【0262】

結合切断により、このチモーゲンから活性酵素への転移は、活性酵素を産生するためのプロテアーゼの他の立体構造変化とも関連する。例えば、配列番号134を参照した成熟ナランバリングによる残基195~198、325~334、366~377および400~406（キモトリプシンナランバリングによる残基16~19、142~152、184~193および216~223に相当）に相当する活性化ドメインにおける立体構造変化は、一次特異性ポケットまたは基質結合部位およびオキシアニオンホールを再び整え、安定化する[Tosoら(2008) J. Biol. Chem., 283:18627-18635]。さらに、プロトロンビン結合および触媒作用に関与する、残基213~219および249~259（キモトリプシンナランバリングによる残基34~40および70~80に相当）を含有するループによって形成されるエキソサイト1は、プロエキソサイト状態で存在し、転移に伴う立体構造変化を有する活性立体配置でのみ発現される[Bockら(2007) J. Thromb. Haemost., 5:81-94]。チモーゲンから活性酵素への立体構造変化は、コア補助因子結合エピトープを形成するエキソサイト2におけるA r g 347、L y s 351およびL y s 414を包含するF V a結合部位の発現ももたらす[Bianchini(2004) J Biol. Chem., 279:3671-3679も参照]。活性酵素立体構造は、基質結合によっても安定化される。

30

40

【0263】

F Xタンパク質の立体構造的平衡は、チモーゲンから活性酵素への転移に関連するアミノ酸残基の修飾によってシフトされ得る。これらの残基における修飾は、平衡をチモーゲン様状態へとシフトさせることができる。チモーゲンから活性酵素への転移に関連する残基は、アミノ酸残基195~198（キモトリプシンナランバリングによる残基16~19

50

に相当)等、新たなN末端における残基を包含する。チモーゲン転移に関連する他の残基は、立体構造変化において直接的に役割を果たすか、または他の形でエネルギー的に連結される、活性化ドメインおよびエキソサイト(上に表記)における残基を包含する。これらの領域における残基の突然変異は、転移過程における活性化された酵素の活性化ドメインおよび/またはエキソサイトの構造的攪乱をもたらす、これにより、基質結合および/または触媒作用を変更し、チモーゲン様活性をもたらすことができる。例えば、活性化ドメインの一部は、構造的に変更されると基質のタンパク質分解の低下をもたらす得る自己溶解ループ(キモトリプシンナランバリングによる残基142~152に相当)である。したがって、これらの領域における突然変異は、FXa型をさらに不安定化し、チモーゲン様状態を好む平衡のシフトをもたらすことができる。本明細書において、上述のドメイン
10
に関連するまたはこれに極めて近接した残基の修飾を修飾し、FV非依存性活性に影響を及ぼし、実質的に増加した補助因子依存性を提示するプロテアーゼをもたらすこともできることが見出される。触媒3残基は、触媒活性に必要とされるため、突然変異誘発の標的にされない(例えば、配列番号134を参照したHis236、Asp282およびSer379)。

【0264】

特に、上述のチモーゲンから活性酵素への転移において生じる、分子間塩橋または他の「カップルされた」立体構造変化の形成を崩壊またはこれを不安定化させるために、修飾は、結合切断後にFXaへの転移を開始するN末端ペプチドセグメントにおける残基においてなされる。例えば、FXaにおけるIle195と、また、ある程度までVal196は、タンパク質部分の内に埋もれ、それにより、Ile195の α -アンモニウム基およびAsp378の側鎖カルボキシレート基が、内部塩橋を形成する。この塩橋は、活性酵素を安定化する。例えば、位置195、196および/または378におけるアミノ酸残基の修飾による塩橋の崩壊は、チモーゲン様構造に向けた活性酵素構造の形質転換をもたらすことが見出される。隣接残基197および198の修飾もまた、酵素をチモーゲン様構造へと形質転換するための修飾の標的である。
20

【0265】

加えて、本明細書で提供される修飾は、一部のセリンプロテアーゼにおいてチモーゲン状態を安定化することが公知のチモーゲン3残基における修飾を包含する。例えば、キモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンのチモーゲン構造において、Asp378(キモトリプシンナランバリングによるAsp194)に相当する側鎖は、位置211における埋もれたヒスチジン(キモトリプシンナランバリングによるHis40)とのイオン対によって安定化され、このヒスチジンは、位置219(キモトリプシンナランバリングによるSer32)とも水素結合を形成する[Madisonら(1993) Science, 262:419-421]。このチモーゲン3残基(zymogen triad)(キモトリプシンナランバリングによるAsp194-His40-Ser32)は、チモーゲン型を安定化する。ロイシン(L)は、位置211(キモトリプシンナランバリングによる位置32に相当)に存在し、グリシン(G)は、位置219(キモトリプシンナランバリングによる位置40に相当)に存在するため、相当するチモーゲン3残基は、FXには存在しない。したがって、本明細書における修飾は、FXにおいて相当するチモーゲン3残基(キモトリプシンナランバリングによるAsp194-His40-Ser32)が形成された修飾を包含する。
30
40

【0266】

FXのチモーゲン型と同様に、チモーゲン様立体構造状態のFXaポリペプチドは、触媒活性を殆ど提示しない。上に記す通り、活性は、FVa補助因子によって調節することができる。恐らく、プロテアーゼドメインの立体構造活性化が、FVa結合部位の露出に要求されるため、FXのチモーゲン型およびFXaのチモーゲン様型は、一般に、FVaに対する親和性の低下を提示する。にもかかわらず、FVaは、このように強い安定剤であるため、チモーゲン様立体構造状態からFXaへの平衡は、過剰なFVa補助因子の強い安定化存在の存在下で救出され得る。したがって、本明細書における例において、チモーゲン様変異体は、FVaの非存在下で活性を殆ど提示しないが、FVaの存在下で実質
50

的な活性を提示することができる。その結果得られたF Xポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しないF X aと比較して増加された、F V aの非存在下と比較したF V aの存在下での触媒活性の比（相対補助因子依存性とも呼ばれる）を提示する。補助因子依存性の増加は、F V aの非存在下における触媒活性の減少および／またはF V aの存在下における触媒活性の増加によるものとなり得る。

【0267】

例えば、本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、活性F X a型の場合、10, 000; 20, 000; 30, 000; 40, 000; 50, 000; 100, 000; 200, 000; 300, 000; 400, 000; 500, 000; 600, 000; 700, 000; 800, 000; 900, 000; 1, 000, 000; 2, 000, 000; 3, 000, 000; 4, 000, 000; 5, 000, 000; 6, 000, 000; 7, 000, 000; 8, 000, 000; 9, 000, 000; 10, 000, 000; 15, 000, 000; 20, 000, 000; 25, 000, 000; 30, 000, 000; 35, 000, 000; 40, 000, 000; 45, 000, 000; 50, 000, 000以上を超える等、5000を超える相対補助因子依存性を提示する。修飾（複数可）を含有しないF X aと比較して、相対補助因子依存性は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、4000倍、4500倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10000倍、15000倍、20000倍以上増加する。よって、適切なインビトロ、インビボまたはエクスビボアッセイにおいて評価される場合、修飾されたF Xポリペプチドは、無修飾のF Xポリペプチドと比較して、補助因子依存性の増加を呈することができる。

【0268】

かかる修飾されたF Xポリペプチドの中でも、配列番号134に表記されている位置に相当する、F Xの重鎖におけるアミノ酸位置（複数可）195、196、197、198、200、202、211、214、215、216、217、218、219、273、276、306、326、327、332、334、336、338、378、420および／または424に修飾（複数可）を含有するポリペプチドが包含される。例えば、本明細書に提示される修飾されたF Xポリペプチドは、アミノ酸位置（複数可）198、202、211、214、217、219、327および／または338に修飾（複数可）を含有するポリペプチドを包含する。一般に、修飾は、アミノ酸置き換えである。その結果得られる修飾されたF Xポリペプチドが、活性型の場合、アミノ酸置き換え（複数可）を含有しないF X aと比較して補助因子依存性の増加を提示し、F V a依存性触媒活性を保持するのであれば、アミノ酸置き換えは、その位置における他の19種類のアミノ酸のいずれに行ってもよい。

【0269】

一例において、修飾されたF Xポリペプチドは、配列番号134に表記されている通り、位置195、196、197または198（キモトリプシンナンバリングによる位置16～19）、例えば、少なくとも、位置196に相当する位置における少なくとも1個のアミノ酸置き換え（複数可）等、少なくとも1個のアミノ酸修飾（複数可）を含有する。これらのアミノ酸残基は、F Xチモーゲンの活性化切断により露出された新たなN末端における疎水性残基に相当する。本明細書の他の箇所にて記述されている通り、N末端における疎水性残基は、残基A s p 378（キモトリプシンナンバリングによるA s p 194）と共に、不活性から活性状態への転移に必要な塩橋を形成する。例えば、配列番号134に表記されている例示的なF Xポリペプチドのナンバリングを参照した位置196に存在するV a l残基は、疎水性であり、この相互作用に適する。本明細書において、極性R基を含有する親水性中性アミノ酸残基となるようN末端アミノ酸残基195、196、197および／または198（キモトリプシンナンバリングによる残基16～19に相当）を

修飾すると、塩橋形成を崩壊または不安定化(destablize)するよう特に作用することが見出される。置き換えのための例示的なかかるアミノ酸残基は、A s n (N)、G l n (Q)、S e r (S)、T h r (T)、C y s (C) または T y r (Y) である。

【0270】

本明細書で提供される例示的な修飾として、それぞれ配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置196に相当する位置におけるI；位置196に相当する位置におけるS；位置196に相当する位置におけるL；位置196に相当する位置におけるT；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるV；位置202に相当する位置におけるS；位置211に相当する位置におけるS；位置214に相当する位置におけるD；位置214に相当する位置におけるA；位置214に相当する位置におけるS；位置215に相当する位置におけるN；位置216に相当する位置におけるR；位置216に相当する位置におけるK；位置216に相当する位置におけるA；位置216に相当する位置におけるS；位置217に相当する位置におけるS；位置218に相当する位置におけるR；位置218に相当する位置におけるK；位置218に相当する位置におけるA；位置219に相当する位置におけるH；位置273に相当する位置におけるA；位置273に相当する位置におけるE；位置276に相当する位置におけるA；位置276に相当する位置におけるE；位置306に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるS；位置326に相当する位置におけるT；位置326に相当する位置におけるV；位置326に相当する位置におけるQ；位置326に相当する位置におけるN；位置326に相当する位置におけるM；位置326に相当する位置におけるK；位置326に相当する位置におけるY；位置326に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるD；位置327に相当する位置におけるA；位置327に相当する位置におけるL；位置332に相当する位置におけるA；位置332に相当する位置におけるD；位置332に相当する位置におけるE；位置332に相当する位置におけるS；位置332に相当する位置におけるG；位置334に相当する位置におけるA；位置334に相当する位置におけるT；位置334に相当する位置におけるN；位置336に相当する位置におけるE；位置338に相当する位置におけるA；位置338に相当する位置におけるS；位置338に相当する位置におけるN；位置338に相当する位置におけるR；位置338に相当する位置におけるV；位置338に相当する位置におけるY；位置338に相当する位置におけるM；位置420に相当する位置におけるA；位置420に相当する位置におけるE；位置424に相当する位置におけるA；および／または位置424に相当する位置におけるEによる、無修飾のFXポリペプチドにおけるアミノ酸置き換えが挙げられるがこれらに限定されない。その結果得られる修飾されたFXポリペプチドが、活性型の場合、補助因子依存性の増加を提示し、FVa依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾されたFXポリペプチドは、上述のアミノ酸置き換え（複数可）のうちいずれかの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。かかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍増加された補助因子依存性を提示するポリペプチドを包含する。配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表5および6に表記されている。

【0271】

【表 5】

表 5						
V196I	V196S	V196L	V196T	G197S	G197A	E200A
E200V	K202S	L211S/G219H	N214D	N214A	N214S	E215N
E216R	E216K	E216A	E216S	N217S	E218R	E218K
E218A	T327A/K338A	R273A	R273E	K276A	K276E	R306E
R326S	R326T	R326V	R326Q	R326N	R326M	R326K
R326Y	R326E	R326D	T327A	T327L	R332A	R332D
R332G	S334A	S334T	S334N	R336E	K338A	K338S
K338N	K338R	K338V	K338Y	K338M	K420A	K420E
K424A	K424E	E200V/T327L/ K338M	E220V/T327L/ S334A/K338M	V196S/L211S/ G219H	G197A/L211S/ G219H	I195L/L211S/ G219H
V196S/E216K	V196S/E216A	V196S/E216S	V196S/E218R	V196S/E218K	V196S/E218A	V196S/R332A
V196S/R332D	V196S/R332E	V196S/R332S	V196S/R332G	V196S/R326D	V196S/R326M	V196S/R326N
V196S/R326Q	V196S/R273E	V196S/R273A	V196S/R424E	V196S/K420A	V196S/K420E	V196S/R306E
V196S/N214D	V196S/N214A	V196S/N214S	V196S/E216R	V196S/K276A	V196S/K276E	V196S/K420E/ R424E
V196S/K338A	V196S/K338S	T327A/K338A				

【 0 2 7 2 】

その結果得られる修飾された F X ポリペプチドが、活性型の場合、修飾（複数可）を含まない無修飾の F X a ポリペプチドと比較して少なくとも 2 倍増加された補助因子依存性を提示し、F V a 依存性触媒活性を保持するのであれば、さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）が、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドに包含されてもよく、これは、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知の他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。例えば、さらに別の修飾は、A T - I I I 等、阻害因子に対する抵抗性を増加させるための（例えば、セクション D. 3）、および／またはグリコシル化を変更するための（例えば、セクション D. 1）、本明細書に記載されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。非天然グリコシル化部位を導入するための例示的なアミノ酸置き換え（複数可）として、それぞれ配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置 5 1 に相当する位置における N；位置 5 6 に相当する位置における N および位置 5 8 に相当する位置における S；位置 6 2 に相当する位置における N および位置 6 4 に相当する位置における S；位置 6 5 に相当する位置における N および位置 6 7 に相当する位置における S；位置 6 7 に相当する位置における N；位置 7 3 に相当する位置における N および位置 7 5 に相当する位置における S；位置 7 5 に相当する位置における N および位置 7 7 に相当する位置における S；位置 7 7 に相当する位置における N および位置 7 9 に相当する位置における S；位置 7 8 に相当する位置における N および位置 8 0 に相当する位置における S；位置 8 2 に相当する位置における S；位置 8 3 に相当する位置における N；位置 8 2 に相当する位置における N および位置 8 4 に相当する位置における S；位置 8 5 に相当する位置における N および位置 8 7 に相当する位置における S；位置 8 6 に相当する位置における N および位置 8 8 に相当する位置における S；位置 9 5 に相当する位置における N および位置 9 7 に相当する位置における S；位置 1 1 4 に相当する位置における N；位置 1 1 9 に相当する位置における N および位置 1 2 1 に相当する位置における S；位置 1 2 2 に相当する位置における S；位置 2 1 5 に相当する位置における N および位置 2 1 7 に相当する位置における S；位置 2 4 3 に相当する位置における N および位置 2 4 5 に相当する位置における S；位置 2 6 4 に相当する位置における N および位置 2 6 6 に相当する位置における S；位置 2 9 3 に相当する位置における N および位置 2 9 5 に相当する位置における S；位置 3 8 8 に相当する位置における N；位置 3 8 9 に相当する位置における N および位置 3 9 1 に相当する位置における S；位置 4 2 8 に相当する位置における N および位置 4 3 0 に相当する位置における S、および／または位置 4 2 9 に相当する位置における N および位置 4 3 1 に相当する位置における S による、無修飾の F X ポリペプチドにおけるアミノ酸置き換え（複数可）が挙げられるがこれらに限定されない。配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表 6 に表記されている。

【0273】

【表6】

表6					
L73N/G75S/ V196S	G75N/E77S/ V196S	R86N/L88S/ V196S	G114N/V196S	D95N/D97S/ V196S	E82S/V196S
G78N/N80S/ V196S	E77N/K79S/ V196S	D119N/G121S/ V196S	L83N/V196S	K122S/V196S	E51N/V196S
G114N/D119N/ G121S/V196S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/K388N	T85N/K87S/ V196S	Q56N/Q58S/ V196S	K62N/G64S/ V196S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H
G114N/D119N/ G121S/V196S/ L211S/G219H	L65N/E67S V196S	E67N/V196S	V196S/E215N/ N217S	V196S/E264N/E 266S	G114N/V196S/ L211S G219H/K388N
D119N/G121S/ V196S/E264N/ E266S	G114N/V196S/ E264N/E266S	V196S/R429N/ L431S	V196S/R243N/ K245S	V196S/T293N/ R295S	V196S/D389N/ Y391S
D119N/G121S/ V196S/K388N	V196S/T428N/ G430S	V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/E264N/E 266S	G114N/V196S/ L211S/ G219H/ E264N/E266S	V196S/E264N/ E266S/K388N
E82N/F84S/ V196S	Q58N/K60S/ V196S	G114N/V196S/ L211S/G219H	V196S/L211S/ G219H/E264N/E 266S/K388N	V196S/K388N	

10

【0274】

特定の例において、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、それぞれ配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置196に相当する位置におけるS；位置196に相当する位置におけるT；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるV；位置202に相当する位置におけるS；位置211に相当する位置におけるS；位置214に相当する位置におけるD；位置214に相当する位置におけるA；位置214に相当する位置におけるS；位置215に相当する位置におけるN；位置216に相当する位置におけるR；位置216に相当する位置におけるA；位置216に相当する位置におけるS；位置217に相当する位置におけるS；位置218に相当する位置におけるR；位置218に相当する位置におけるA；位置219に相当する位置におけるH；位置273に相当する位置におけるE；位置276に相当する位置におけるE；位置306に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるS；位置326に相当する位置におけるT；位置326に相当する位置におけるV；位置326に相当する位置におけるN；位置326に相当する位置におけるM；位置326に相当する位置におけるK；位置326に相当する位置におけるY；位置326に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるD；位置327に相当する位置におけるA；位置327に相当する位置におけるL；位置332に相当する位置におけるD；位置332に相当する位置におけるE；位置332に相当する位置におけるS；位置332に相当する位置におけるG；位置334に相当する位置におけるA；位置334に相当する位置におけるT；位置334に相当する位置におけるN；位置336に相当する位置におけるE；位置338に相当する位置におけるA；位置338に相当する位置におけるS；位置338に相当する位置におけるN；位置338に相当する位置におけるR；位置338に相当する位置におけるV；位置338に相当する位置におけるY；位置338に相当する位置におけるM；位置420に相当する位置におけるE；および／または位置424に相当する位置におけるEによる、無修飾のFXポリペプチドにおけるアミノ酸置き換えであるがこれらに限定されない、少なくとも1個の修飾を包含する。

20

30

40

【0275】

本明細書における例において、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含する、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置211に相当する位置におけるSによる置き換えまたは位置

50

219に相当する位置におけるHによる置き換えである、無修飾のFXポリペプチドにおける少なくとも1個のアミノ酸置き換えを有する。その結果得られる修飾されたFXポリペプチドが、活性型の場合、補助因子依存性の増加を提示し、FVa依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾されたFXポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のアミノ酸置き換え（複数可）を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。例えば、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含する本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置211に相当する位置におけるSによる置き換えおよび位置219に相当する位置におけるHによる置き換えである、無修飾のFXポリペプチドにおける少なくとも2個のアミノ酸置き換えを有する。さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）は、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知の他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。特定の例において、さらに別のアミノ酸置き換えは、位置195、196、197または198に存在する。例示的なかかるさらに別のアミノ酸置き換え（複数可）として、位置195に相当する位置におけるLによる置き換え；位置195に相当する位置におけるVによる置き換え；位置195に相当する位置におけるSによる置き換え；位置195に相当する位置におけるTによる置き換え；位置195に相当する位置におけるIによる置き換え；位置195に相当する位置におけるAによる置き換え；位置195に相当する位置におけるFによる置き換え；位置195に相当する位置におけるDによる置き換え；位置195に相当する位置におけるGによる置き換え；位置196に相当する位置におけるIによる置き換え；位置196に相当する位置におけるAによる置き換え；位置196に相当する位置におけるSによる置き換え；位置196に相当する位置におけるLによる置き換え；位置196に相当する位置におけるFによる置き換え；位置196に相当する位置におけるIによる置き換え；位置196に相当する位置におけるTによる置き換え；位置196に相当する位置におけるGによる置き換え；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるA；位置197に相当する位置におけるA；位置197に相当する位置におけるN；位置197に相当する位置におけるH；および位置197に相当する位置におけるRが挙げられるがこれらに限定されない。他の例において、さらに別の修飾は、A-T-I-I-I等、阻害因子に対する抵抗性を増加させるための（セクションD. 3）、および／またはグリコシル化変更を増加させるための（セクションD. 1）、本明細書に記載されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。かかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍増加された補助因子依存性を提示するポリペプチドを包含する。配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドにおける非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表7に表記されている。

【0276】

【表7】

表7			
L211S/G219H	V196L/L211S/G219H	G197A/L211S/G219H	I195L/L211S/G219H
D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H	G114N/V196S/ L211S/G219H	G114N/D119N/ G121S/V196S/ L211S/G219H	G114N/V196S/ L211S G219H/K388N
V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S/K388N	V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/E264N/E266S	G114N/V196S/L211S/ G219H/E264N/E266S
D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/K388N			

【0277】

本明細書における特定の例において、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含する、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、それぞれ配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置196に相当する位置におけるS；位置19

6に相当する位置におけるL；位置196に相当する位置におけるT；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるV；位置202に相当する位置におけるS；位置338に相当する位置におけるA；位置338に相当する位置におけるS；または位置338に相当する位置におけるVによる置き換えである、無修飾のFXポリペプチドにおける少なくとも1個のアミノ酸置き換えを有する。その結果得られる修飾されたFXポリペプチドが、活性型の場合、補助因子依存性の増加を提示し、FVa依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾されたFXポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のアミノ酸置き換え（複数可）を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）は、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知の他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。例えば、さらに別の修飾は、補助因子非依存性を増加させる、AT—III等、阻害因子に対する抵抗性を増加させる（セクションD. 3）および／またはグリコシル化を変更する（セクションD. 1）、本明細書に上述されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。かかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも10倍増加した補助因子依存性を提示するポリペプチドを包含する。配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表8および表9に表記されている。

【0278】

【表8】

表8				
V196S	V196T	V196L	V196T	G197S
K202S	K338A	K338S	K338V	T327A/K338A
E200V/T327L/S334A/K338M	G197A/L211/G219H			

【0279】

特定の例において、その活性型において補助因子依存性の増加を提示する、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含する、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、無修飾のFXポリペプチドのアミノ酸位置196に、非極性、中性または親水性アミノ酸残基となるような少なくとも1個のアミノ酸置き換えを有する。したがって、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸の配列を参照した位置196に相当する位置におけるN、Q、S、T、W、CまたはYによる置き換えである、少なくとも1個のアミノ酸置き換え等、少なくとも1個のアミノ酸修飾を含有する。本明細書で提供されるかかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、一般には、少なくとも100倍以上等、少なくとも50倍増加した補助因子依存性を提示するポリペプチドを包含する。本明細書で提供される例示的なかかる修飾されたFXポリペプチドは、位置196に相当する位置におけるSによる置き換えである少なくとも1個のアミノ酸置き換えを含有する、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含するFXポリペプチドである。その結果得られる修飾されたFXポリペプチドが、活性型の場合、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、一般には、少なくとも100倍以上等、少なくとも50倍増加した補助因子依存性を提示し、FVa依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾されたFXポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のアミノ酸置き換え（複数可）を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）は、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知の他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。例えば、さらに別の修飾は、補助因子非依存性を増加させ、AT—III等、阻害因子に対する抵抗性を増加させ（セクションD. 3）および／またはグリコシル化を変更するための（セクションD. 1

）、本明細書に上述されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表9に表記されている。

【0280】

【表9】

表9				
V196S	V196S/L211S/ G219H	V196S/N214D	V196S/N214A	V196S/N214S
V196S/E216R	V196S/E216K	V196S/E216A	V196S/E216S	V196S/E216S
V196S/E218R	V196S/E218K	V196S/E218A	V196S/R332A	V196S/R332D
V196S/R332E	V196S/R332S	V196S/R332G	V196S/R326D	V196S/R326M
V196S/R326N	V196S/R326Q	V196S/R273E	V196S/R273A	V196S/R424A
V196S/R424E	V196S/K420A	V196S/K420E	V196S/R306E	V196S/K276A
V196S/K276E	V196S/K338A	V196S/K338S	E82S/V196S	E82N/F84S/ V196S
L73N/G75S/ V196S	G75N/E77S/ V196S	R86N/L88S/ V196S	G114N/V196S	D95N/D97S/ V196S
G78N/N80S/ V196S	E77N/K79S/ V196S	D119N/G121S/ V196S	L83N/V196S	K122S/V196S
E51N/V196S	Q58N/K60S/ V196S	G114N/D119N/ G121S/V196S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/K388N	T85N/K87S/ V196S
Q56N/Q58S/ V196S	K62N/G64S/ V196S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H	G114N/V196S/ L211S/G219H	G114N/D119N/ G121S/V196S/ L211S/G219H
L65N/E67S V196S	E67N/V196S	V196S/E215N/ N217S	V196S/E264N/ E266S	G114N/V196S/ L211S G219H/K388N
V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S/K388N	D119N/G121S/ V196S/E264N/ E266S	G114N/V196S/ E264N/E266S	V196S/R429N/ L431S	V196S/R243N/ K245S
V196S/T293N/R2 95S	V196S/D389N/ Y391S	V196S/K388N	D119N/G121S/ V196S/K388N	V196S/T428N/ G430S
V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	G114N/V196S/ L211S/G219H/ E264N/E266S	V196S/E264N/ E266S/K388N	V196S/K420E/R 424E
V196S/E215N/N2 17S				

【0281】

3. 阻害因子に対する抵抗性の増加

FXポリペプチドに1個または複数の修飾（複数可）を含有し、活性FXa型の場合、FX阻害因子による阻害に対する抵抗性の増加を提示する、修飾されたFXチモージェンおよび修飾されたFXaポリペプチドを包含する修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。FX阻害因子は、例えば、組織因子経路阻害因子（TFPI）および抗トロンビンIII（AT-III）を包含する。修飾は、アミノ酸の挿入、欠失または置き換えとなり得る。特に、修飾は、アミノ酸置き換えである。

【0282】

TFPIは、クニッツ（Kunitz）型阻害因子である。TFPIは、配列番号557に表記されているアミノ酸の前駆体配列を有し、配列番号557の29～304として表記されている残基に相当する成熟配列を有する。TFPIは、三価であり、3個のクニッツ型ドメインを含有する。TFPIは、その第2のクニッツドメイン（配列番号557に表記されている配列の残基125～175に相当）によりFXaを直接的に阻害する。TFPIは、FXaが結合した後に、その第1のクニッツドメイン（配列番号557に表記され

10

20

30

40

50

ている配列における残基54～104に相当)を介して、第V I I a因子／組織因子(T F)複合体を阻害することもできる。T F P Iによる阻害は、リン脂質およびF V aの存在下においてより大きい。後述するA T I I Iと同様に、T F P Iの活性は、F X aとの活性部位結合による相互作用により媒介される。チモーゲン様ポリペプチドである修飾されたF Xポリペプチド等、本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドの中でも、結合による相互作用が変更されたためおよび／またはT F P Iによる阻害に利用できないために、T F P Iに対する抵抗性の増加を提示するポリペプチドが包含される。

【0283】

A T-I I Iは、抗凝固薬セルピン(セリンプロテアーゼ阻害因子)である。A T-I I Iは、464アミノ酸残基(配列番号553を参照)を含有する前駆体タンパク質として合成される。分泌の経過において、32残基シグナルペプチドが切断されて、432アミノ酸成熟ヒト抗トロンビン(配列番号554)を生成する。58kDaのA T-I I I糖タンパク質は、血液中を循環し、凝固系の多数のセリンプロテアーゼを阻害するためのセリンプロテアーゼ阻害因子(セルピン)として機能する。A T-I I Iの主な標的は、トロンビンおよび第X a因子であるが、A T-I I Iは、F I X a、F X I a、F X I I aおよびより低い程度ではあるが、F V I I aの活性を阻害することも示した(例えば、図2を参照)。

【0284】

A T-I I Iの作用は、臨床診療において抗凝固薬として広く用いられている、天然起源のヘパラン硫酸または様々な組織由来ヘパリン等、グリコサミノグリカンにより大いに増強される。A T-I I Iは、高度に特異的な様式で、反応中心ループ(R C L)の立体構造変化を誘導する、ヘパリンにおける独特の五糖配列に結合する。かかる立体構造において、A T-I I Iの反応中心ループは、セリンプロテアーゼの反応部位とより効率的に相互作用し、阻害を引き起こすことができる。A T I I I R C Lのこのような「活性化」は、特異的五糖それ自体や、他の「低分子量」型のヘパリン、また、高分子量型のヘパリンにより誘導することができる。A T-I I IおよびF X aの両方における結合部位を有する長鎖ヘパリン(または「高分子量」ヘパリン)は、A T-I I IおよびF X aの銕型としても作用し、これにより、両者を極めて近接させ、阻害性相互作用をさらに容易にする。ヘパリンの非存在下で、A T-I I Iは、F X aの相対的に無効な阻害因子である[Quinseyら(2002) J. Biol. Chem., 277:15971-15978]。

【0285】

A T-I I Iは、F X aと特異的に相互作用し、F Xチモーゲン型とは相互作用しない。A r g 194-I l e 195結合(キモトリプシンナンバリングによるA r g 15-I l e 16)の切断により生じる立体構造スイッチは、A T-I I Iおよびヘパリン相互作用に必要とされるエクソサイトを構造的に露出させる。F X aとのA T-I I I相互作用は、エクソサイト1における拡張された基質結合部位残基により、特に、成熟ナンバリングによるグルタミン酸残基215、216および219(キモトリプシンナンバリングによる残基36、37および39に相当)により媒介または増強される[例えば、Quinseyら(2002) and Bianchiniら(2004) J. Biol. Chem., 279:3671-3679を参照]。F X aのヘパリン結合エクソサイトは、エクソサイト1の反対側に位相幾何学的に位置付けられ、配列番号134に表記されている成熟ナンバリングによる残基A r g 273、L y s 276、A r g 306、A r g 347、L y s 351、L y s 420およびA r g 424(キモトリプシンナンバリングによるA r g 93、L y s 96、A r g 125、A r g 165、L y s 169、L y s 236およびA r g 240に相当)を包含する[例えば、Rezaie(2000) J. Biol. Chem., 275:3320-7を参照]。加えて、自己溶解ループ326～336(キモトリプシンナンバリングによる残基143～154に相当)の塩基性残基は、F X aによるA T-I I Iのヘパリン活性化立体構造の認識における役割も果たす[Rezaieら(2005) J. Biol. Chem., 280:32722-32728; Bianchiniら(2004)]。

【0286】

T F P IまたはA T-I I Iを包含する阻害因子に対する抵抗性の増加は、阻害因子(

例えば、A T - I I I または T F P I) 相互作用に関連する F X ポリペプチドにおける 1 個または複数の残基を修飾することにより達成することができる。また、抵抗性の増加は、ヘパリン相互作用に關与する 1 個または複数の残基を修飾することにより達成することができる。例えば、エキソサイト 1、自己溶解ループまたはヘパリン結合エキソサイトにおける 1 個または複数の残基を修飾することができる。加えて、F X a ポリペプチドをよりチモーゲン様にし、これにより上述の結合部位への接近を立体構造的に攪乱する修飾（複数可）も、阻害因子に対する抵抗性の増加を付与することができる。したがって、阻害因子（例えば、A T I I I または T F P I) に対する抵抗性を増加させるための修飾（複数可）は、チモーゲン 3 残基を形成するための、配列番号 1 3 4 を参照した成熟ナンバリングによる残基 1 9 5 ~ 1 9 8、3 2 5 ~ 3 3 4、3 6 6 ~ 3 7 7 および 4 0 0 ~ 4 0 6（キモトリプシンナンバリングによる残基 1 6 ~ 1 9、1 4 2 ~ 1 5 2、1 8 4 ~ 1 9 3 および 2 1 6 ~ 2 2 3 に相当）および／または残基 2 1 1、2 1 9 または 3 7 8 に相当する活性化ドメインの 1 個または複数の残基にも生じ得る（例えば、上述のセクション D、2 を参照）。

【0287】

例えば、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドは、活性 F X a 型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾の F X a と比較して、少なくとも 3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、500 倍、600 倍、700 倍、800 倍、900 倍、1000 倍、1500 倍、2000 倍、2500 倍、3000 倍、3500 倍、4000 倍、4500 倍、5000 倍、5500 倍、6000 倍以上等、少なくとも 2 倍の、阻害因子（例えば、A T - I I I または T F P I) に対する抵抗性の増加を提示する。よって、適切なインビトロ、インビボまたはエクスピボアッセイにおいて評価される場合、修飾された F X ポリペプチドは、無修飾の F X ポリペプチドと比較して、阻害因子（例えば、A T - I I I または T F P I) に対する抵抗性の増加を呈することができる。

【0288】

かかる修飾された F X ポリペプチドの中でも、配列番号 1 3 4 に表記されている残基に相当する F X の重鎖におけるアミノ酸残基（複数可）1 9 6、1 9 7、2 0 0、2 0 2、2 1 1、2 1 4、2 1 6、2 1 8、2 1 9、2 7 3、2 7 6、3 0 6、3 2 6、3 2 7、3 3 2、3 3 4、3 3 6、3 3 8、4 2 0 および／または 4 2 4 に修飾（複数可）を含有するポリペプチドが包含される。一般に、修飾は、アミノ酸置き換えである。その結果得られる修飾された F X ポリペプチドが、活性型の場合、アミノ酸置き換え（複数可）を含有しない F X a と比較して、阻害因子（例えば、A T - I I I または T F P I) に対する抵抗性の増加を提示し、F V a 依存性触媒活性を保持するのであれば、アミノ酸置き換えは、その位置における他の 1 9 種類のアミノ酸のいずれと行ってもよい。

【0289】

特定の例において、阻害因子に対する抵抗性を引き起こすための修飾（複数可）は、F X a ポリペプチドをよりチモーゲン様とし、これにより阻害因子結合（例えば、A T - I I I 結合または T F P I 結合）の速度を低下させる修飾となり得る。例えば、阻害因子（例えば、A T - I I I または T F P I) に対する抵抗性の増加を提示する修飾された F X ポリペプチドは、配列番号 1 3 4 に表記されている位置を参照した位置 1 9 5、1 9 6、1 9 7 または 1 9 8（キモトリプシンナンバリングによる位置 1 6 ~ 1 9）に相当する位置に、少なくとも 1 個のアミノ酸置き換え（複数可）等、少なくとも 1 個のアミノ酸修飾（複数可）を含有することができる。これらのアミノ酸残基は、F X チモーゲンの活性化切断により作製された新たな N 末端における疎水性残基に相当する。本明細書の他の箇所で記述されている通り、「活性化切断」後に、N 末端における疎水性残基は、「活性化ポケット」へと挿入し、I l e 1 9 5 の新たな α -アンモニウムは、不活性から活性状態への転移に必要な、残基 A s p 3 7 8（キモトリプシンナンバリングによる A s p 1 9 4 に相当）と塩橋を形成する。例えば、配列番号 1 3 4 に表記されている例示的な F X ポリペ

プチドに存在するVal残基は、疎水性であり、活性化ポケット内の最適な相互作用に適する。特定の例において、極性R基を含有する親水性中性アミノ酸残基となるよう、N末端アミノ酸残基195、196、197および／または198（キモトリプシンナバリングによる残基16～19に相当）をアミノ酸置き換え（複数可）により修飾することは、活性を依然として保持しつつ、このα塩橋形成または上述の他の「カップルした」立体構造変化を崩壊または不安定化させる。例示的なかかるアミノ酸残基は、Asn（N）、Gln（Q）、Ser（S）、Thr（T）、Cys（C）またはTyr（Y）である。

【0290】

本明細書における例において、阻害因子（例えば、ATI I I IまたはTFPI）に対する抵抗性の増加を付与する、本明細書で提供される修飾として、それぞれ配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置196に相当する位置におけるI；位置196に相当する位置におけるS；位置196に相当する位置におけるL；位置196に相当する位置におけるT；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるA；位置200に相当する位置におけるV；位置200に相当する位置におけるS；位置202に相当する位置におけるS；位置211に相当する位置におけるS；位置214に相当する位置におけるD；位置214に相当する位置におけるA；位置214に相当する位置におけるS；位置216に相当する位置におけるR；位置216に相当する位置におけるK；位置216に相当する位置におけるA；位置216に相当する位置におけるS；位置218に相当する位置におけるR；位置218に相当する位置におけるK；位置218に相当する位置におけるA；位置219に相当する位置におけるH；位置273に相当する位置におけるA；位置273に相当する位置におけるE；位置276に相当する位置におけるA；位置276に相当する位置におけるE；位置306に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるA；位置326に相当する位置におけるS；位置326に相当する位置におけるT；位置326に相当する位置におけるV；位置326に相当する位置におけるQ；位置326に相当する位置におけるN；位置326に相当する位置におけるM；位置326に相当する位置におけるK；位置326に相当する位置におけるY；位置326に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるD；位置327に相当する位置におけるA；位置327に相当する位置におけるL；位置332に相当する位置におけるA；位置332に相当する位置におけるD；位置332に相当する位置におけるE；位置332に相当する位置におけるS；位置332に相当する位置におけるG；位置334に相当する位置におけるA；位置334に相当する位置におけるT；位置334に相当する位置におけるN；位置336に相当する位置におけるE；位置338に相当する位置におけるA；位置338に相当する位置におけるS；位置338に相当する位置におけるN；位置338に相当する位置におけるR；位置338に相当する位置におけるV；位置338に相当する位置におけるY；位置338に相当する位置におけるM；位置420に相当する位置におけるA；位置420に相当する位置におけるE；位置424に相当する位置におけるA；および／または位置424に相当する位置におけるEによる、無修飾のFXポリペプチドにおけるアミノ酸置き換えが挙げられるがこれらに限定されない。その結果得られる修飾されたFXポリペプチドが、活性型の場合、阻害因子抵抗性（例えば、ATI I I I抵抗性および／またはTFPI抵抗性）の増加を提示し、FVa依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾されたFXポリペプチドは、上述のアミノ酸置き換え（複数可）のうちいずれかの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。かかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍増加した阻害因子抵抗性（例えば、ATI I I I抵抗性および／またはTFPI抵抗性）を提示するポリペプチドを包含する。配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表10～13に表記されている。

【0291】

【表 10】

表 10						
V196I	V196S	V196L	V196T	G197S	E200A	E200V
K202S	L211S/G219H	R326Y	R326A	R326T	R326V	R326Q
R326N	R326M	R326K	T327A	T327L	S334A	S334T
S334N	R336E	K338A	K338S	K338N	K338R	K338V
K338Y	K338M	T327A/K338A	T327L/K338M	E200V/T327L/ K338M	E220V/T327L/ S334A/K338M	V196S/L211S/ G219H
G197A/L211S/ G219H	I195L/L211S/ G219H	V196S/N214D	V196S/N214A	V196S/N214S	V196S/E216R	
V196S/E216K	V196S/E216A	V196S/E216S	V196S/E218R	V196S/E218K	V196S/E218A	V196S/R332A
V196S/R332D	V196S/R332E	V196S/R332S	V196S/R332G	V196S/R326D	V196S/R326M	V196S/R326N
V196S/R326Q	V196S/R273E	V196S/R273A	V196S/R424E	V196S/K420A	V196S/K420E	V196S/R306E
V196S/R424A	V196S/K338A	V196S/K338S	V196S/K276A	V196S/K276E	V196S/K420E/ R424E	

10

【0292】

その結果得られる修飾された F X ポリペプチドが、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾の F X a ポリペプチドと比較して、少なくとも 2 倍増加した阻害因子抵抗性（例えば、A T - I I I 抵抗性および／または T F P I 抵抗性）を提示し、F V a 依存性触媒活性を保持するのであれば、さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）が、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドに包含されてもよく、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。例えば、さらに別の修飾は、補助因子依存性を増加させるため（例えば、セクション D. 2）および／またはグリコシル化を変更するための（例えば、セクション D. 1）、本明細書に記載されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。非天然グリコシル化部位を導入するための例示的なアミノ酸置き換え（複数可）として、それぞれ配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置 5 1 に相当する位置における N；位置 5 6 に相当する位置における N および位置 5 8 に相当する位置における S；位置 6 2 に相当する位置における N および位置 6 4 に相当する位置における S；位置 6 5 に相当する位置における N および位置 6 7 に相当する位置における S；位置 6 7 に相当する位置における N；位置 7 3 に相当する位置における N および位置 7 5 に相当する位置における S；位置 7 5 に相当する位置における N および位置 7 7 に相当する位置における S；位置 7 7 に相当する位置における N および位置 7 9 に相当する位置における S；位置 7 8 に相当する位置における N および位置 8 0 に相当する位置における S；位置 8 2 に相当する位置における S；位置 8 3 に相当する位置における N；位置 8 2 に相当する位置における N および位置 8 4 に相当する位置における S；位置 8 5 に相当する位置における N および位置 8 7 に相当する位置における S；位置 8 6 に相当する位置における N および位置 8 8 に相当する位置における S；位置 9 5 に相当する位置における N および位置 9 7 に相当する位置における S；位置 1 1 4 に相当する位置における N；位置 1 1 9 に相当する位置における N および位置 1 2 1 に相当する位置における S；位置 1 2 2 に相当する位置における S；位置 2 1 5 に相当する位置における N および位置 2 1 7 に相当する位置における S；位置 2 4 3 に相当する位置における N および位置 2 4 5 に相当する位置における S；位置 2 6 4 に相当する位置における N および位置 2 6 6 に相当する位置における S；位置 2 9 3 に相当する位置における N および位置 2 9 5 に相当する位置における S；位置 3 8 8 に相当する位置における N；位置 3 8 9 に相当する位置における N および位置 3 9 1 に相当する位置における S；位置 4 2 8 に相当する位置における N および位置 4 3 0 に相当する位置における S、および／または位置 4 2 9 に相当する位置における N および位置 4 3 1 に相当する位置における S による、無修飾の F X ポリペプチドにおけるアミノ酸置き換え（複数可）が挙げられるがこれらに限定されない。配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドにおけるかかる非限定

20

30

40

50

的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表 1 1 に表記されている。

【 0 2 9 3 】

【表 1 1】

表 1 1					
T85N/K87S/ V196S	Q56N/Q58S/ V196S	K62N/G64S/ V196S	L65N/E67S/ V196S	E67N/V196S	L73N/G75S/ V196S
G75N/E77S/ V196S	R86N/L88S/ V196S	G114N/V196S	D95N/D97S/ V196S	E82S/V196S	E82N/F84S/ V196S
G78N/N80S/ V196S	E77N/K79S/ V196S	D119N/G121S/ V196S	L83N/V196S	K122S/V196S	E51N/V196S
Q58N/K60S/V 196S	G114N/D119N/G 121S/V196S	D119N/G121S/V 196S/L211S/ G219H	G114N/V196S/ L211S/G219H	G114N/ D119N/G121S/ V196S/L211S/G 219H	V196S/E215N/ N217S
V196S/E264N/ E266S	D119N/G121S/ V196S/E264N/ E266S	G114N/V196S/ E264N/E266S	V196S/R429N/ L431S	V196S/R243N/ K245S	V196S/T239N/R 295S
V196S/D389N/ Y391S	V196S/K388N	D119N/G121S/V 196S/K388N	V196S/T428N/ G430S	V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/E264N/E 266S
G114N/V196S/ L211S/G219H/ E264N/E266S	V196S/E264N/ E266S/K388N	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/K388N	G114N/V196S/ L211S/G219H/ K388N	V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S/ K388N	

10

20

【 0 2 9 4 】

特定の例において、本明細書で提供される修飾として、それぞれ配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置 1 9 6 に相当する位置における S；位置 1 9 6 に相当する位置における T；位置 1 9 7 に相当する位置における S；位置 1 9 7 に相当する位置における A；位置 2 0 0 に相当する位置における A；位置 2 0 0 に相当する位置における V；位置 2 0 0 に相当する位置における S；位置 2 0 2 に相当する位置における S；位置 2 1 1 に相当する位置における S；位置 2 1 4 に相当する位置における D；位置 2 1 4 に相当する位置における A；位置 2 1 4 に相当する位置における S；位置 2 1 6 に相当する位置における R；位置 2 1 6 に相当する位置における K；位置 2 1 6 に相当する位置における A；位置 2 1 6 に相当する位置における S；位置 2 1 8 に相当する位置における R；位置 2 1 8 に相当する位置における A；位置 2 1 9 に相当する位置における H；位置 2 7 3 に相当する位置における E；位置 2 7 6 に相当する位置における E；位置 3 0 6 に相当する位置における E；位置 3 2 6 に相当する位置における S；位置 3 2 6 に相当する位置における T；位置 3 2 6 に相当する位置における V；位置 3 2 6 に相当する位置における N；位置 3 2 6 に相当する位置における M；位置 3 2 6 に相当する位置における K；位置 3 2 6 に相当する位置における Y；位置 3 2 6 に相当する位置における E；位置 3 2 6 に相当する位置における D；位置 3 2 7 に相当する位置における A；位置 3 2 7 に相当する位置における L；位置 3 3 2 に相当する位置における D；位置 3 3 2 に相当する位置における E；位置 3 3 2 に相当する位置における S；位置 3 3 2 に相当する位置における G；位置 3 3 4 に相当する位置における A；位置 3 3 4 に相当する位置における T；位置 3 3 4 に相当する位置における N；位置 3 3 6 に相当する位置における E；位置 3 3 8 に相当する位置における A；位置 3 3 8 に相当する位置における S；位置 3 3 8 に相当する位置における N；位置 3 3 8 に相当する位置における R；位置 3 3 8 に相当する位置における V；位置 3 3 8 に相当する位置における Y；位置 3 3 8 に相当する位置における M；位置 4 2 0 に相当する位置における E；および／または位置 4 2 4 に相当する位置における E による、無修飾の F X ポリペプチドにおけるアミノ酸置き換えが挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【 0 2 9 5 】

本明細書における例において、修飾された F X チモーゲンまたは F X a を包含する、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドは、配列番号 1 3 4 に表記されているア

50

ミノ酸位置を参照した、位置 2 1 1 に相当する位置における S による置き換えまたは位置 2 1 9 に相当する位置における H による置き換えである、無修飾の F X ポリペプチドにおける少なくとも 1 個のアミノ酸置き換えを有する。その結果得られる修飾された F X ポリペプチドが、活性型の場合、阻害因子（例えば、A T - I I I または T F P I）に対する抵抗性の増加を提示し、F V a 依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾された F X ポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個以上のアミノ酸置き換え（複数可）を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。例えば、修飾された F X チモーゲンまたは F X a を包含する、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドは、配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置 2 1 1 に相当する位置における S による置き換えおよび位置 2 1 9 に相当する位置における H による置き換えである、無修飾の F X ポリペプチドにおける少なくとも 2 個のアミノ酸置き換えを有する。さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）は、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知の他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。特定の例において、さらに別のアミノ酸置き換えは、位置 1 9 5、1 9 6、1 9 7 または 1 9 8 においてなされる。例示的なかかるさらに別のアミノ酸置き換え（複数可）として、位置 1 9 5 に相当する位置における L による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における V による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における S による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における T による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における I による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における A による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における F による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における D による置き換え；位置 1 9 5 に相当する位置における G による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における I による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における A による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における S による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における L による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における F による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における I による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における T による置き換え；位置 1 9 6 に相当する位置における G による置き換え；位置 1 9 7 に相当する位置における S；位置 1 9 7 に相当する位置における A；位置 1 9 7 に相当する位置における A；位置 1 9 7 に相当する位置における N；位置 1 9 7 に相当する位置における H；および／または位置 1 9 7 に相当する位置における R が挙げられるがこれらに限定されない。他の例において、さらに別の修飾は、補助因子依存性を増加させるため（例えば、セクション D. 2）および／またはグリコシル化を変更するための（例えば、セクション D. 1）、本明細書に記載されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。かかる修飾された F X ポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾の F X a ポリペプチドと比較して、阻害因子に対し少なくとも 2 倍以上増加した抵抗性および／または増加した補助因子依存性を提示するポリペプチドを包含する。配列番号 1 3 4 に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表 1 2 に表記されている。

【0 2 9 6】

【表 1 2】

表 1 2					
V196S/L211S/ G219H	G197A/L211S/ G219H	I195L/L211S/ G219H	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H	G114N/V196S/ L211S/G219H	G114N/ D119N/G121S/V 196S/L211S/G21 9H
V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/E264N/ E266S	G114N/V196S/ L211S/G219H/ E264N/E266S	D119N/G121S/ V196S/L211S/ G219H/K388N	G114N/V196S/ L211S/G219H/ K388N	V196S/L211S/ G219H/E264N/E 266S/ K388N

【0 2 9 7】

本明細書における特定の例において、その活性型において阻害因子抵抗性（例えば、A T - I I I 抵抗性および／または T F P I 抵抗性）の増加を提示する、修飾された F X チ

10

20

30

40

50

モーゲンまたはFXaを包含する本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、それぞれ配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置196に相当する位置におけるS；位置196に相当する位置におけるL；位置196に相当する位置におけるT；位置197に相当する位置におけるS；位置326に相当する位置におけるN；位置334に相当する位置におけるA；位置334に相当する位置におけるT；位置338に相当する位置におけるA；位置338に相当する位置におけるS；または位置338に相当する位置におけるVによる置き換えである、無修飾のFXポリペプチドにおける少なくとも1個のアミノ酸置き換えを有する。その結果得られる修飾されたFXポリペプチドが、活性型の場合、阻害因子抵抗性（例えば、AT-I-I-I抵抗性および／またはTFPI抵抗性）の増加を提示し、FVa依存性触媒活性を保持するのであれば、修飾されたFXポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のアミノ酸置き換え（複数可）を含有することができ、それにより、各置き換えは、異なる位置に存在する。さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）は、本明細書に記載されているまたは本技術分野において公知の他のいかなるアミノ酸置き換えであってもよい。例えば、さらに別の修飾は、補助因子非依存性を増加させる（セクションD. 2）および／またはグリコシル化を変更する（セクションD. 1）、本明細書に上述されているいずれかのさらに別の修飾（複数可）を包含する。かかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍以上増加した補助因子依存性等、少なくとも5倍増加した補助因子依存性を提示するポリペプチドを包含する。

10

20

【0298】

特定の例において、その活性型において阻害因子抵抗性（例えば、AT-I-I-I抵抗性および／またはTFPI抵抗性）の増加を提示する、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含する本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、無修飾のFXポリペプチドに少なくとも2個のアミノ酸置き換え（複数可）を有し、一方の置き換えは、アミノ酸位置195、196、197または198に存在し、他方の置き換えは、位置273、276、306、326、332、338、420および／または424のうち1個または複数に相当する位置における置き換えである。置き換えは、その位置における他の19種類のアミノ酸のいずれと行ってもよい。アミノ酸位置195、196、197または198における例示的な非限定的な置き換えは、位置195または196における、Asn(N)、Gln(Q)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)またはTyr(Y)による置き換え、例えば、SまたはTによる置き換え等、非極性、中性または親水性アミノ酸残基となるよう行われる。位置273、276、306、326、332、338、420および／または424のうち1個または複数に相当する位置における例示的な非限定的な置き換えは、Asp(D)、Glu(E)、Ala(A)、Gly(G)、Ser(S)、Cys(C)、Asn(N)、Gln(Q)、Ile(I)、Leu(L)、Met(M)、Phe(F)、Pro(P)、Thr(T)、Trp(W)、Tyr(Y)またはVal(V)等、酸性または中性アミノ酸残基となるよう行われ、例えば、AまたはEによる置き換えである。位置195、196、197および／または198に、ならびに位置273、276、306、326、332、338、420および／または424のうち1個または複数に少なくとも2個の置き換えを含有するかかる修飾されたFXポリペプチドは、活性型の場合、修飾（複数可）を含有しない無修飾のFXaポリペプチドと比較して、少なくとも2倍、4倍、10倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、特に、少なくとも500倍増加した阻害因子抵抗性（例えば、AT-I-I-I抵抗性および／またはTFPI抵抗性）を提示するポリペプチドを包含する。

30

40

【0299】

特定の例において、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaを包含する、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、無修飾のFXポリペプチドに少なくとも2個のアミノ酸置き換え（複数可）を有し、

50

1) 少なくとも1個は、それぞれ配列番号134に表記されているアミノ酸位置を参照した、位置195に相当する位置におけるLによる置き換え；位置195に相当する位置におけるVによる置き換え；位置195に相当する位置におけるSによる置き換え；位置195に相当する位置におけるTによる置き換え；位置195に相当する位置におけるIによる置き換え；位置195に相当する位置におけるAによる置き換え；位置195に相当する位置におけるFによる置き換え；位置195に相当する位置におけるDによる置き換え；位置195に相当する位置におけるGによる置き換え；位置196に相当する位置におけるIによる置き換え；位置196に相当する位置におけるAによる置き換え；位置196に相当する位置におけるSによる置き換え；位置196に相当する位置におけるLによる置き換え；位置196に相当する位置におけるFによる置き換え；位置196に相当する位置におけるIによる置き換え；位置196に相当する位置におけるTによる置き換え；位置196に相当する位置におけるGによる置き換え；位置197に相当する位置におけるS；位置197に相当する位置におけるA；位置197に相当する位置におけるA；位置197に相当する位置におけるN；位置197に相当する位置におけるH；および／または位置197に相当する位置におけるRに相当する置き換えであり、

2) 少なくとも1個は、位置273に相当する位置におけるA；位置273に相当する位置におけるE；位置276に相当する位置におけるA；位置276に相当する位置におけるE；位置306に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるA；位置326に相当する位置におけるS；位置326に相当する位置におけるT；位置326に相当する位置におけるV；位置326に相当する位置におけるQ；位置326に相当する位置におけるN；位置326に相当する位置におけるM；位置326に相当する位置におけるK；位置326に相当する位置におけるY；位置326に相当する位置におけるE；位置326に相当する位置におけるD；位置332に相当する位置におけるA；位置332に相当する位置におけるD；位置332に相当する位置におけるE；位置332に相当する位置におけるS；位置332に相当する位置におけるG；位置338に相当する位置におけるA；位置338に相当する位置におけるS；位置338に相当する位置におけるN；位置338に相当する位置におけるR；位置338に相当する位置におけるV；位置338に相当する位置におけるY；位置338に相当する位置におけるM；位置420に相当する位置におけるA；位置420に相当する位置におけるE；位置424に相当する位置におけるA；および／または位置424に相当する位置におけるEによる置き換えに相当する置き換えである。配列番号134に表記されているアミノ酸残基を参照した、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドにおけるかかる非限定的なアミノ酸置き換え（複数可）は、表13に表記されている。

【0300】

【表13】

表13					
V196S/R332D	V196S/R332E	V196S/R332S	V196S/R332G	V196S/R326D	V196S/R326M
V196S/R326Q	V196S/R273E	V196S/R273A	V196S/R424E	V196S/K420A	V196S/K420E
V196S/R424A	V196S/K338A	V196S/K338S	V196S/K276A	V196S/K276E	V196S/K420E/ R424E
V196S/R326N	V196S/R306E	V196S/R332A			

【0301】

4. 例示的な修飾されたFXポリペプチド

配列番号2に表記されている前駆体FXポリペプチドまたはそれに対し少なくとも75%配列同一性を提示するその変異体にアミノ酸置き換え（複数可）を含有する、修飾されたFXポリペプチドが本明細書で提供される。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号2に対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するFXポリペプチドにアミノ酸置き換え（複数可）を含有する。例示的なかかる修飾されたFXポリペプチドは、配列番号4～133のいずれかに表記されてい

10

20

30

40

50

るアミノ酸の配列、または配列番号4～133のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有するFXポリペプチドである。特定の例において、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号5～25、32、37、41、42、44、45、47～49、51～58、60～71、73～77、81～111および114～133のいずれかに表記されているアミノ酸の配列、または配列番号5～25、32、37、41、42、44、45、47～49、51～58、60～71、73～77、81～111および114～133のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有するFXポリペプチドである。

10

【0302】

異種シグナル配列を含有する前駆体FXポリペプチドにアミノ酸置き換え（複数可）を含有する修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。例えば、異種シグナル配列は、トロンビン由来のものである（例えば、配列番号415のアミノ酸1～43に相当）。例えば、配列番号415に表記されているFXポリペプチドまたはそれに対し少なくとも75%配列同一性を提示するその変異体にアミノ酸置き換え（複数可）を含有する修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号415に対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するFXポリペプチドにアミノ酸置き換え（複数可）を含有する。例示的なかかる修飾されたFXポリペプチドは、配列番号417～546のいずれかに表記されているアミノ酸の配列、または配列番号417～546のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有するFXポリペプチドである。特定の例において、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号418～438、445、450、454、455、457、458、460～462、464～471、473～484、486～490、494～524および527～546のいずれかに表記されているアミノ酸の配列、または配列番号418～438、445、450、454、455、457、458、460～462、464～471、473～484、486～490、494～524および527～546のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有するFXポリペプチドである。

20

30

【0303】

配列番号134に表記されている成熟FXポリペプチドまたはそれに対し少なくとも75%配列同一性を提示するその変異体にアミノ酸置き換え（複数可）を含有する修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号134に対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するFXポリペプチドにアミノ酸置き換え（複数可）を含有する。例示的なかかる修飾されたFXポリペプチドは、配列番号136～265のいずれかに表記されているアミノ酸の配列、または配列番号136～265のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有するFXポリペプチドである。特定の例において、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205～209、213～243および246～265のいずれかに表記されているアミノ酸の配列、または配列番

40

50

号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205～209、213～243および246～265のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有するFXポリペプチドである。

【0304】

配列番号136～265のいずれか、または配列番号136～265のいずれかに対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列の、チモーゲン、活性または触媒活性型も、本明細書で提供される。特定の例において、配列番号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205～209、213～243および246～265のいずれかのチモーゲン、活性または触媒活性型が提供される。例示的なかかる型は、ジスルフィド結合により連結された重および軽鎖を有する2本鎖型である。アミノ酸置き換え（複数可）は、重鎖に存在する。

10

【0305】

例えば、配列番号134のアミノ酸1～139の配列を有する軽鎖および配列番号134のアミノ酸143～448の配列を有する重鎖を含有するチモーゲンFXポリペプチドに、または軽鎖もしくは重鎖に対し少なくとも75%配列同一性を提示する重鎖を含有するその変異体にアミノ酸置き換え（複数可）を含有するFXのチモーゲン型である修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号134のアミノ酸1～139の配列を有するチモーゲンFX軽鎖ポリペプチドに対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示する軽鎖および／または配列番号134のアミノ酸143～448の配列を有するチモーゲンFX重鎖ポリペプチドに対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示する重鎖を含有するチモーゲンFXポリペプチドにアミノ酸置き換え（複数可）を含有する、修飾されたFXチモーゲンである。例示的なかかる修飾されたFXチモーゲンポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸1～139（即ち、配列番号136～265のいずれかのアミノ酸1～139に相当）の配列を有する軽鎖、または配列番号134のいずれかに表記されているアミノ酸1～139に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する軽鎖と、配列番号136～265のいずれかのアミノ酸143～448の配列を有する重鎖、または配列番号136～265のいずれかに表記されているアミノ酸143～448に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する重鎖を含有するポリペプチドを含有するFXポリペプチドである。特定の例において、修飾されたFXチモーゲンポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸1～139（即ち、配列番号136～265のいずれかのアミノ酸1～139に相当）の配列を有する軽鎖、または配列番号134のいずれかに表記されているアミノ酸1～139に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する軽鎖と、配列番号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205～209、213～243および246～265のいずれかのアミノ酸143～448の配列を有する重鎖、または配列番号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205

20

30

40

50

～209、213～243および246～265のいずれかに表記されているアミノ酸143～448に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する重鎖を含有するポリペプチドを含有するFXポリペプチドである。

【0306】

配列番号134のアミノ酸1～139の配列を有する軽鎖および配列番号134のアミノ酸195～448の配列を有する重鎖を含有するFXaポリペプチド、または軽鎖もしくは重鎖に対し少なくとも75%配列同一性を提示するその変異体にアミノ酸置き換え（複数可）を含有するFXa型である修飾されたFXポリペプチドが、本明細書で提供される。例えば、修飾されたFXポリペプチドは、配列番号134のアミノ酸1～139の配列を有するFXa軽鎖ポリペプチドに対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示する軽鎖、および／または配列番号134のアミノ酸195～448の配列を有するFXa重鎖ポリペプチドに対し少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示する重鎖を含有するFXaポリペプチドにアミノ酸置き換え（複数可）を含有する修飾されたFXaである。例示的なかかる修飾されたFXaポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸1～139（即ち、配列番号136～265のいずれかのアミノ酸1～139に相当）の配列を有する軽鎖、または配列番号134のいずれかに表記されているアミノ酸1～139に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する軽鎖と、配列番号136～265のいずれかのアミノ酸195～448の配列を有する重鎖、または配列番号136～265のいずれかに表記されているアミノ酸195～448に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する重鎖を含有するポリペプチドを含有するFXポリペプチドである。特定の例において、修飾されたFXaポリペプチドは、配列番号134に表記されているアミノ酸1～139（即ち、配列番号136～265のいずれかのアミノ酸1～139に相当）の配列を有する軽鎖、または配列番号134のいずれかに表記されているアミノ酸1～139に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する軽鎖と、配列番号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205～209、213～243および246～265のいずれかのアミノ酸195～448の配列を有する重鎖、または配列番号137～157、164、169、173、174、176、177、179～181、183～190、192～203、205～209、213～243および246～265のいずれかに表記されているアミノ酸195～448に対し少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を提示するアミノ酸の配列を有する重鎖を含有するポリペプチドを含有するFXポリペプチドである。

【0307】

表14に、本明細書で提供される例示的な修飾されたFXポリペプチドをまとめる。

【0308】

【表 1 4 - 1】

表 1 4					
ペプチド	FX プレプロ ペプチド 配列番号	トロンビンFX ハイブリッド 配列番号	成熟 FX 配列番号	FX チモーゲン LC: aa 1-139; HC: aa 143-448 配列番号	活性化 FX (FXa) LC: aa 1-139; HC: aa 195-448 配列番号
V196I	4	417	136	136	136
V196S	5	418	137	137	137
T85N/K87S/V196S	6	419	138	138	138
Q56N/Q58S/V196S	7	420	139	139	139
K62N/G64S/V196S	8	421	140	140	140
L65N/E67S/V196S	9	422	141	141	141
E67N/V196S	10	423	142	142	142
L73N/G75S/V196S	11	424	143	143	143

【表 1 4 - 2】

G75N/E77S/V196S	12	425	144	144	144
R86N/L88S/V196S	13	426	145	145	145
G114N/V196S	14	427	146	146	146
D95N/D97S/V196S	15	428	147	147	147
E82S/V196S	16	429	148	148	148
E82N/F84S/V196S	17	430	149	149	149
G78N/N80S/V196S	18	431	150	150	150
E77N/K79S/V196S	19	432	151	151	151
D119N/G121S/V196S	20	433	152	152	152
L83N/V196S	21	434	153	153	153
K122S/V196S	22	435	154	154	154
E51N/V196S	23	436	155	155	155
Q58N/K60S/V196S	24	437	156	156	156
G114N/D119N/G121S/V196S	25	438	157	157	157
G198A	26	439	158	158	158
G198V	27	440	159	159	159
G198R	28	441	160	160	160
G198K	29	442	161	161	161
G198P	30	443	162	162	162
G198H	31	444	163	163	163
L211S/G219H	32	445	164	164	164
G197P	33	446	165	165	165
D378N	34	447	166	166	166
D378S	35	448	167	167	167
V196L	36	449	168	168	168
V196T	37	450	169	169	169
V196P	38	451	170	170	170
G197V	39	452	171	171	171
G197T	40	453	172	172	172
G197S	41	454	173	173	173
E200A	42	455	174	174	174
E200S	43	456	175	175	175
E200V	44	457	176	176	176
K202S	45	458	177	177	177
R326A	46	459	178	178	178
R326S	47	460	179	179	179
R326T	48	461	180	180	180
R326V	49	462	181	181	181
R326Q	50	463	182	182	182
R326N	51	464	183	183	183
R326M	52	465	184	184	184
R326K	53	466	185	185	185
R326Y	54	467	186	186	186
T327A	55	468	187	187	187
T327L	56	469	188	188	188
S334A	57	470	189	189	189
S334T	58	471	190	190	190
S334N	59	472	191	191	191

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

R336E	60	473	192	192	192
K338A	61	474	193	193	193
K338S	62	475	194	194	194
K338N	63	476	195	195	195
K338R	64	477	196	196	196
K338V	65	478	197	197	197
K338Y	66	479	198	198	198
K338M	67	480	199	199	199
T327A/K338A	68	481	200	200	200
T327L/K338M	69	482	201	201	201
E200V/T327L/K338M	70	483	202	202	202
E200V/T327L/S334A/K338M	71	484	203	203	203
V196S/G197A	72	485	204	204	204
V196S/L211S/G219H	73	486	205	205	205
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	74	487	206	206	206
G114N/V196S/L211S/G219H	75	488	207	207	207
G114N/D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	76	489	208	208	208
G197A/L211S/G219H	77	490	209	209	209
V196S/G197A/L211S/G219H	78	491	210	210	210
I195L/V196S	79	492	211	211	211
I195L/G197A	80	493	212	212	212
I195L/L211S/G219H	81	494	213	213	213
V196S/N214D	82	495	214	214	214
V196S/N214A	83	496	215	215	215
V196S/N214S	84	497	216	216	216
V196S/E216R	85	498	217	217	217
V196S/E216K	86	499	218	218	218
V196S/E216A	87	500	219	219	219
V196S/E216S	88	501	220	220	220
V196S/E218R	89	502	221	221	221
V196S/E218K	90	503	222	222	222
V196S/E218A	91	504	223	223	223
V196S/R332A	92	505	224	224	224
V196S/R332D	93	506	225	225	225
V196S/R332E	94	507	226	226	226
V196S/R332S	95	508	227	227	227
V196S/R332G	96	509	228	228	228
V196S/R326E	97	510	229	229	229
V196S/R326D	98	511	230	230	230
V196S/R326M	99	512	231	231	231
V196S/R326N	100	513	232	232	232
V196S/R326Q	101	514	233	233	233

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

V196S/R273E	102	515	234	234	234
V196S/R273A	103	516	235	235	235
V196S/R424A	104	517	236	236	236
V196S/R424E	105	518	237	237	237
V196S/K420A	106	519	238	238	238
V196S/K420E	107	520	239	239	239
V196S/R306E	108	521	240	240	240
V196S/K276A	109	522	241	241	241
V196S/K276E	110	523	242	242	242
V196S/K420E/R424E	111	524	243	243	243
V196S/R273E/K420E/R424E	112	525	244	244	244
V196S/R273E/R306E/K420E/R424E	113	526	245	245	245
V196S/K338A	114	527	246	246	246
V196S/K338S	115	528	247	247	247
V196S/E215N/N217S	116	529	248	248	248
V196S/E264N/E266S	117	530	249	249	249
D119N/G121S/V196S/E264N/E266S	118	531	250	250	250
G114N/V196S/E264N/E266S	119	532	251	251	251
V196S/R429N/L431S	120	533	252	252	252
V196S/R243N/K245S	121	534	253	253	253
V196S/T293N/R295S	122	535	254	254	254
V196S/D389N/Y391S	123	536	255	255	255
V196S/K388N	124	537	256	256	256
D119N/G121S/V196S/K388N	125	538	257	257	257
V196S/T428N/G430S	126	539	258	258	258
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	127	540	259	259	259
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	128	541	260	260	260
G114N/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	129	542	261	261	261
V196S/E264N/E266S/K388N	130	543	262	262	262
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/K388N	131	544	263	263	263
G114N/V196S/L211S/G219H/K388N	132	545	264	264	264
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S/K388N	133	546	265	265	265

5. 追加的な修飾

追加的な修飾を、本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドのいずれかになすことができる。追加的な修飾（複数可）は、アミノ酸挿入、欠失、置き換え、化学修飾および／または翻訳後修飾となり得る。例えば、化学部分（例えば、ポリマー部分）のための付着部位を提供するため、1個または複数のさらに別の非天然グリコシル化部位を導入するため、および／またはポリペプチドの活性もしくは他の特性を改善もしくは変更するために、さらに別のアミノ酸置き換え（複数可）を、修飾されたF Xポリペプチドにおいてなすことができる。変更され得る例示的な特性または活性として、溶解性、安定性、触媒活性（例えば、プロトロンビナーゼ活性）、補助因子（例えば、F V a）への結合、基質特異性、基質選択性および／または阻害因子（例えば、A T I I I）への結合が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0310】

かかる修飾（複数可）は、当業者に周知のものである〔例えば、米国特許第5,990,079号；第6,017,882号；第6,573,071号；第6,562,598号；第6,660,492号；第6,670,147号；第6,958,322号、第7,078,508号；第7,220,569号；第7,645,602号；第8,048,990号；米国特許出願公開第20030207402号；第2006-0148038号；第20090053185号；第20090175828号；第20090175931号；第20100125052号；第20100255000号；第2010-0285568号；第2011-0015128号；第2011-0293597号；国際公開PCT出願WO1998039456およびWO2005023308；ならびにUp
richard and Perry, Blood Rev 16: 97-110 (2002); Venkateswarluら, Biophys J 82(3):1190-1206 (2002); Vianelloら, Thromb. Res. 107:51-54 (2002); Vianelloら Thromb. Res. 104:257-264 (2001); Vianelloら, Blood Coagul. Fibrinolysis 14:401-405 (2003); Wallmarkら, Blood 78(suppl1): 60 (1991); Wallmarkら, Thromb Haemost. 65:1263 (1991); Wangら, Haemophilia. 11(1):31-37 (2005); Wangら, Haematologica. 90(12):1659-1664 (2005); Watzkeら, J. Biol. Chem. 265:11982-11989 (1990); Watzkeら, J Clin Invest. 88(5):1685-1689 (1991); Watzkeら, Thromb Haemost 69:1452 (1993); Whinnaら, J. Thromb Haemost 2(7):1127-1134; Yangら, Biochemistry 47(22):5976-5985 (2008);およびZamaら, Br. J. Haematol. 106:809-811 (1999)を参照〕。

20

30

【0311】

例えば、修飾されたF Xポリペプチドは、ポリペプチドをポリマーとのコンジュゲーションに対し感受性となるよう修飾することができる。例示的なポリマーとして、例えば、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリジン(polyvinyl pyrrolidone)またはポリプロリンが挙げられる〔Abuchowskiら (1981); Newmarkら (1982); and Katreら (1987)〕。本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、1個または複数のポリエチレングリコール部分により修飾することができる（PEG化）。活性化されたPEG誘導体は、F Xポリペプチドと直接的に相互作用させるために用いることができ、これは、カルボン酸の活性エステルまたは炭酸塩誘導体、特に、脱離基がN-ヒドロキシサクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾールまたは1-ヒドロキシー-2-ニトロベンゼン-4-スルホン酸塩であるものを包含する。マレイミドまたはハロアセチル基を含有するPEG誘導体は、スルフヒドリル基の修飾に用いることができ、ヒドラジンまたはヒドラジド基を含有するPEG試薬は、炭水化物基の過ヨウ素酸酸化により生成されたアルデヒドの修飾に用いることができる。

40

【0312】

ホスホチロシン、ホスホセリンまたはホスホスレオニン等、リン酸化されたアミノ酸残基を有する修飾されたF Xポリペプチド配列も企図される。本明細書で提供されるポリペプチドの追加的な修飾は、限定されないが、アセチル化およびカルボキシル化を包含する、ポリペプチドの化学誘導体化を包含する。例えば、アシル化されたF Xの不活性変異体

50

が産生され、これは、血漿への注射後に徐々に脱アシル化され、これにより活性化第X因子を経時的に生成する [Wolfら (1995) Blood. 86, pp 4153-4157]。

【0313】

本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドの他の適した追加的な修飾は、タンパク質分解に対するその抵抗性を増加させるため、溶解特性を最適化するため、および／または治療剤としてより適したものにするために、標準化学技法および／または組換え核酸方法を用いて修飾されたポリペプチドである。例えば、ペプチドの主鎖を環化して、安定性を増強することができる [Friedlerら (2000) J. Biol. Chem. 275:23783-23789等を参照]。D-アミノ酸または非天然起源の合成アミノ酸等、天然起源のL-アミノ酸以外の残基を包含するアナログを用いることができる。

10

【0314】

追加的な修飾は、ポリペプチドの細胞プロセッシングおよび／または翻訳後修飾を変更、増加または改善する修飾を包含する。例えば、追加的な修飾は、細胞培養におけるプロペプチドプロセッシングの有効性を改善するために、プロペプチド切断部位の領域（例えば、Thr 39）における修飾を包含する [Rudolphら (1997) Prot. Express and Puri., 10: 373-378]。他の例において、また、本明細書の他の箇所に記載されている通り、より高い度合のガンマカルボキシル化は、第X因子のプレプロペプチドをトロンビンのプレプロペプチドに置き換えることにより達成することができる [例えば、Camireら (2000) Biochemistry. 39 pp. 14322-14329を参照]。

【0315】

他の例示的な追加的な修飾は、ポリペプチドの1種または複数の特性または活性を変更するためのアミノ酸置き換え（複数可）を包含する。例えば、修飾は、例えば、限定されないが配列番号134に表記されている残基に相当する位置10、11、12、28、29、32、33、34または35におけるアミノ酸置き換えを包含する、Gladメインにおける残基の修飾により、その合成に必要とされるビタミンKに対する依存性を変更する修飾を包含する（例えば、米国特許第6,017,882号および第8,048,990号を参照）。修飾は、別のセリンプロテアーゼまたは他のペプチドもしくはタンパク質の異種残基による活性化ペプチドにおける残基のアミノ酸置き換え（複数可）等により、活性化するFXの能力を増強するためになすこともできる [例えば、米国特許第6,958,322号および第6,573,071号；国際PCT公開出願WO98/38317、WO03/035861、WO2004/005347；米国特許出願公開第2006/0148038号明細書；Himmelsbachら Thromb. Res., 97, 51-67 (2000)；Wolfら (1991) JBC. 266, no. 21. pp. 13726-13730；Volkelら (2005), Mol. Biotechnol., 29 (1):19-30を参照]。追加的な修飾は、FXポリペプチドが補助因子非依存的な形で自己活性化されるような、活性化ペプチドを欠失させるための修飾を包含する [Rudolphら, (2002) Thromb Haemost., 88:756-62]。さらに別の修飾は、天然ではFXを活性化しない他のプロテアーゼが、FXを切断および活性化することができるように、活性化切断部位を変更または修飾する修飾を包含する（例えば、WO98/38317；WO98/38318；WO01/10896を参照）。

20

30

【0316】

本明細書で提供される修飾されたFXのキメラタンパク質を作製することができる。例えば、TF/FVIIa複合体(complexes)等、経路における凝固因子複合体と生産的に相互作用するキメラを生成するために、軽鎖の部分 [例えば、Gladメインおよび／またはEGFドメイン（複数可）] は、FIX等、別の凝固プロテアーゼ由来の相当する部分に置き換えることができる [Thiecら (2003) JBC, 12: 10393-10399]。

40

【0317】

E. FXポリペプチドの産生

修飾されたFXポリペプチドを包含するFXポリペプチドは、タンパク質精製および組換えタンパク質発現のための本技術分野において周知の方法により得ることができる。所望の遺伝子をコードする核酸の同定のための、当業者に公知のいずれかの方法を用いるこ

50

とができる。本技術分野において利用できるいずれかの方法を用いて、例えば、肝臓等、細胞または組織供給源等から、F Xポリペプチドをコードする全長（即ち、全コード領域を網羅する）cDNAまたはゲノムDNAクローンを得ることができる。cDNAは、商業的に（例えば、Origene、メリーランド州ロックビル）または合成方法により得ることもできる。修飾されたF Xポリペプチドは、部位特異的突然変異誘発等により、本明細書に記載されている通りに遺伝子操作することができる。

【0318】

F Xは、核酸分子をクローニングおよび単離するための、本技術分野において公知のいずれかの利用できる方法を用いてクローニングまたは単離することができる。かかる方法は、核酸のPCR増幅、ならびに核酸ハイブリダイゼーションスクリーニング、抗体に基づくスクリーニングおよび活性に基づくスクリーニング等のライブラリーのスクリーニングを包含する。

10

【0319】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）方法を包含する、核酸の増幅のための方法を用いて、F Xポリペプチドをコードする核酸分子を単離することができる。核酸含有材料は、F Xコード核酸分子を単離するための出発材料として用いることができる。例えば、DNAおよびmRNA調製物、細胞抽出物、組織抽出物（例えば、肝臓由来）、体液試料（例えば、血液、血清、唾液）、健康および／または罹患対象由来の試料は、増幅方法において用いることができる。核酸ライブラリーもまた、出発材料の供給源として用いることができる。プライマーを設計して、F Xコード分子を増幅することができる。例えば、プライマーは、F Xが生成される発現配列に基づき設計することができる。プライマーは、F Xアミノ酸配列の戻し翻訳に基づき設計することができる。増幅により生成される核酸分子を配列決定し、F Xポリペプチドをコードしていることを確認することができる。

20

【0320】

ベクター、例えば、タンパク質発現ベクターまたはコアタンパク質コードDNA配列の増幅に設計されたベクターに合成遺伝子をクローニングするための制限エンドヌクレアーゼ部位を含有するリンカー配列を包含する、追加的なヌクレオチド配列を、F Xコード核酸分子に連結することができる。さらに、機能的DNAエレメントを特定する追加的なヌクレオチド配列を、F Xコード核酸分子に作動可能に連結することができる。かかる配列の例として、細胞内タンパク質発現を容易にするために設計されたプロモーター配列およびタンパク質分泌を容易にするために設計された分泌配列が挙げられるがこれらに限定されない。タンパク質結合領域を特定する配列等、追加的なヌクレオチド配列も、F Xコード核酸分子に連結することができる。かかる領域として、特異的標的細胞へのF Xの取り込みを容易にするため、または合成遺伝子の薬物動態を他の形で増強するための配列が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0321】

続いて、同定および単離された核酸は、適切なクローニングベクターに挿入することができる。本技術分野において公知の多数のベクター-宿主系を用いることができる。可能なベクターとして、プラスミドまたは修飾されたウイルスが挙げられるがこれらに限定されないが、ベクター系は、用いる宿主細胞と適合性でなければならない。かかるベクターとして、ラムダ誘導体等のバクテリオファージまたはpBR322もしくはpUCプラスミド誘導体等のプラスミドまたはBlue scriptベクター（Stratagene、カリフォルニア州ラホヤ）が挙げられるがこれらに限定されない。クローニングベクターへの挿入は、例えば、DNA断片を、相補的付着末端を有するクローニングベクターにライゲーションすることにより達成することができる。挿入は、TOPOクローニングベクター（Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド）を用いて引き起こすことができる。DNA断片化に用いられる相補的制限部位が、クローニングベクターに存在しない場合、DNA分子の末端は、酵素により修飾することができる。あるいは、ヌクレオチド配列（リンカー）をDNA末端にライゲーションすることにより、いずれか所望の部位を産生することができる；このようなライゲーションされたリンカーは、制限エン

40

50

ドヌクレアーゼ認識配列をコードする特異的な化学合成されたオリゴヌクレオチドを含有することができる。代替的な方法において、切断されたベクターおよびFXタンパク質遺伝子は、ホモポリマーテイル付加により修飾することができる。遺伝子配列の多くのコピーを生成するために、組換え分子は、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、電気穿孔および超音波穿孔により宿主細胞に導入することができる。

【0322】

標的タンパク質におけるいずれか1個または複数のアミノ酸の突然変異を引き起こす本技術分野において公知のいずれかの方法を用いることができる。方法は、コード核酸分子の標準部位特異的もしくはランダム突然変異誘発または固相ポリペプチド合成方法を含む。例えば、FXポリペプチドをコードする核酸分子は、コード核酸のランダム突然変異誘発、エラープローンPCR、部位特異的突然変異誘発（例えば、Stratageneから入手できるQuickChange等のキット等、キットを使用）、重複PCR、遺伝子シャッフリングまたは他の組換え方法等、突然変異誘発に付すことができる。続いて、ポリペプチドをコードする核酸は、異種的に発現されるよう宿主細胞に導入することができる。一部の例において、修飾されたFXポリペプチドは、固相または溶液相ペプチド合成を用いる等、合成的に産生される。

10

【0323】

特異的な実施形態において、単離されたFXタンパク質遺伝子、cDNAまたは合成されたDNA配列を取り込む組換えDNA分子による宿主細胞の形質転換は、遺伝子の複数のコピーの生成を可能にする。よって、形質転換体を成長させ、形質転換体から組換えDNA分子を単離し、必要であれば、単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収

20

【0324】

1. ベクターおよび細胞

1つまたは複数のFXタンパク質の組換え発現のために、FXタンパク質をコードするヌクレオチド配列の全てまたは一部分を含有する核酸は、適切な発現ベクター、つまり、挿入タンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有するベクターに挿入することができる。例示的なそのようなベクターは、たとえばpCMVなどのような任意の哺乳動物発現ベクターである。必要な転写シグナルおよび翻訳シグナルはまた、FX遺伝子についての天然プロモーターおよび／またはそれらのフランキング領域によって供給することもできる。

30

【0325】

FXまたは修飾FXをコードする核酸を含有するベクターもまた、提供される。ベクターを含有する細胞もまた、提供される。細胞は、真核細胞および原核細胞を含み、ベクターは、その中での使用に適した任意のベクターである。

【0326】

ベクターを含有する、内皮細胞を含む原核細胞および真核細胞が、提供される。そのような細胞は、細菌細胞、酵母細胞、菌類細胞、古細菌、植物細胞、昆虫細胞、および動物細胞を含む。細胞は、コードFXタンパク質が細胞によって発現される条件下で上記細胞を成長させ、かつ発現FXタンパク質を回収することによって、FXポリペプチドまたはその修飾FXポリペプチドを産生するために使用される。本明細書における目的上、FXは、培地の中に分泌させることができる。

40

【0327】

一実施形態では、FX活性を有し、FXポリペプチドの全てもしくは一部分を含有するポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列またはその複数のコピーを含有するベクターが、提供される。ベクターは、細胞におけるFXポリペプチドもしくは修飾FXポリペプチドの発現について選択することができるまたはFXタンパク質が、分泌タンパク質として発現されるように選択することができる。FXが発現される場合、核酸は、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) α-接合因子シグナル配列もしくはその部分などのような分泌シグナルまたは天然シグナル配列をコードする核酸に連結される。

50

【0328】

様々な宿主-ベクター系は、タンパク質コード配列を発現するために使用することができる。これらは、ウイルス（たとえばワクシニアウイルス、アデノウイルス、および他のウイルス）を用いて感染させた哺乳動物細胞株；ウイルス（たとえばバキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞株；酵母ベクターを含有する酵母などのような微生物；またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAを用いて形質転換された細菌を含むが、これらに限定されない。ベクターの発現エレメントは、それらの強度および特異性において変わる。使用される宿主-ベクター系に依存して、多くの適した転写エレメントおよび翻訳エレメントのいずれか1つを使用することができる。

【0329】

ベクターの中へのDNA断片の挿入について当業者らに知られている任意の方法が、適切な転写／翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列を含有するキメラ遺伝子を含有する発現ベクターを構築するために使用することができる。これらの方法は、インビトロ組換えDNAおよび合成技術ならびにインビボ組換え（遺伝的組換え）を含むことができる。FXポリペプチドもしくは修飾FXポリペプチドまたはそのドメイン、誘導体、断片、もしくは相同体のタンパク質をコードする核酸配列の発現は、遺伝子またはその断片が、（1つまたは複数の）組換えDNA分子を用いて形質転換された宿主において発現するように、第2の核酸配列によって調節することができる。たとえば、タンパク質の発現は、当技術分野において知られている任意のプロモーター／エンハンサーによって制御することができる。特定の実施形態では、プロモーターが、FXタンパク質についての遺伝子に対して天然のものではない。使用することができるプロモーターは、SV40初期プロモーター（Bernoist and Chambon, Nature 290:304-310 (1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復配列において含有されるプロモーター（Yamamotoら Cell 22:787-797 (1980))、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら, Nature 296:39-42 (1982))； β -ラクタマーゼプロモーター（Jayら, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543) またはtacプロモーター（DeBoerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)) などのような原核生物発現ベクター；"Useful Proteins from Recombinant Bacteria":Scientific American 242:79-94 (1980)) もまた参照されたい；ノパリン合成酵素プロモーター（Herrar-Estrellaら, Nature 303:209-213 (1984)) またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター（Gardnerら, Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)) を含有する植物発現ベクターならびに光合成酵素リブローズビスリン酸カルボキシラーゼのプロモーター（Herrera-Estrellaら, Nature 310:115-120 (1984))；Gal4プロモーターなどのような酵母および他の菌類に由来するプロモーターエレメント、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、ならびに組織特異性を示し、トランスジェニック動物において使用されてきた以下の動物転写制御領域：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域（Swiftら, Cell 38:639-646 (1984); Ornitzら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987))；膵臓ベータ細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahanら, Nature 315:115-122 (1985))、リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedlら, Cell 38:647-658 (1984); Adamsら, Nature 318:533-538 (1985); Alexanderら, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987))、精巣細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス乳癌ウイルス制御領域（Lederら, Cell 45:485-495 (1986))、肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinckertら, Genes and Devel. 1:268-276 (1987))、肝臓において活性なアルファフェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlaufら, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammerら, Science 235:53-58 (1987))、肝臓中で活性なアルファ1抗トリプシン遺伝子制御領域（Kelseyら, Genes and Devel. 1:161-171 (1987))、骨髄性細胞において活性なベータグロビン遺伝子制御領域（Magramら, Nature 315:338-340 (1985); Kolliasら, Cell 46:89-94 (1985))

10

20

30

40

50

6))、脳のオリゴデンドロサイト細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, Cell 48:703-712 (1987))、骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域 (Shani, Nature 314:283-286 (1985)) および視床下部の性腺刺激細胞において活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, Science 234:1372-1378 (1986)) を含むが、これらに限定されない。

【0330】

特定の実施形態では、FXポリペプチドもしくは修飾FXポリペプチドまたはそのドメイン、断片、誘導体、もしくは相同体をコードする核酸に作動可能に連結されるプロモーター、1つまたは複数の複製開始点、および所望により、1つまたは複数の選択マーカー (たとえば抗生物質抵抗性遺伝子) を含有するベクターが、使用される。FXポリペプチドの発現のためのベクターおよび系は、よく知られているピキアベクター (たとえば Invitrogen, San Diego, CA から入手可能)、特にコードタンパク質の分泌のために設計されるベクターを含む。哺乳動物細胞における発現のための例示的なプラスミドベクターは、たとえば、pCMV、pFUSE (InvivoGen) および当業者によく知られている他の多数のベクターを含む。イー・コリ (E. coli) 細胞の形質転換のための例示的なプラスミドベクターは、たとえば、pQE 発現ベクターを含む (Qiagen, Valencia, CA から入手可能; 系について記載する、Qiagen によって出版される文献もまた参照されたい)。pQE ベクターは、イー・コリにおける組換えタンパク質の、厳重に調節された、高度なレベルの発現を提供するためのファージ T5 プロモーター (イー・コリ RNA ポリメラーゼにより認識される) および二重の lac オペレーター抑圧モジュール、効率的な翻訳のための合成リボソーム結合部位 (RBSII)、6xHis タグコード配列、t₀ および T1 転写ターミネーター、ColE1 複製開始点、ならびにアンピシリン抵抗性を付与するためのベクターラクターマゼ遺伝子を有する。pQE ベクターは、組換えタンパク質の N-または C-末端のいずれかに 6xHis タグを置くことを可能にする。上記プラスミドは、3つの全てのリーディングフレームのためのマルチクロニングサイトを提供し、N-末端 6xHis タグ付きタンパク質の発現を提供する pQE32、pQE30、および pQE31 を含む。イー・コリ細胞の形質転換のための他の例示的なプラスミドベクターは、たとえば、pET 発現ベクターを含む (米国特許第 4,952,496 号を参照されたい; NOVAGEN, Madison, WI から入手可能; 系を記載する、Novagen によって出版されている、文献もまた参照されたい)。そのようなプラスミドは、T7 lac プロモーター、T7 ターミネーター、誘発性イー・コリ lac オペレーター、および lac リプレッサー遺伝子を含有する pET11a; T7 プロモーター、T7 ターミネーター、およびイー・コリ ompT 分泌シグナルを含有する pET12a-c; ならびに His カラムを用いる精製において使用される His-Tag (商標) リーダー配列およびカラムでの精製の後の切断を可能にする トロンピン切断部位、T7-lac プロモーター領域、および T7 ターミネーターを含有する pET15b および pET19b (NOVAGEN, Madison, WI) を含む。

【0331】

2. 発現系

FXポリペプチド (修飾および未修飾) は、たとえば、宿主細胞、宿主動物の中への、FXをコードする核酸分子の導入およびインビトロにおける、FXをコードする核酸分子からの発現などのような、インビトロおよびインビボにおける方法を含む、タンパク質産生のための、当技術分野において知られている任意の方法によって産生することができる。FXおよび修飾FXポリペプチドは、投与および処置に必要な、必要とされる量および形態のFXポリペプチドを産生するのに適した任意の生物において発現することができる。発現宿主は、イー・コリ、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞株およびトランスジェニック動物を含む哺乳動物細胞などのような原核生物および真核生物を含む。発現宿主は、タンパク質産生レベルおよび発現したタンパク質上に存在する翻訳後修飾の種類において異なり得る。発現宿主の選定は、これらの因子ならびに調節および安全性の考慮、産生コス

ト、ならびに精製の必要性および方法などのような他の因子に基づいてなすことができる。

【0332】

真核生物宿主における発現は、サッカロマイセス・セレビシエおよびピキア・パストリア (*Pichia pastoris*) などのような酵母、ショウジョウバエの細胞および鱗翅目の昆虫の細胞などのような昆虫細胞、タバコ、トウモロコシ、イネ、藻類、およびアオウキクサ属などのような植物および植物細胞における発現を含むことができる。発現のための真核細胞はまた、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞などのような哺乳動物細胞株をも含む。真核生物の発現宿主はまた、たとえば、血清、乳、および卵における産生を含む、トランスジェニック動物における産生を含む。

10

【0333】

FXの発現のための、多くの発現ベクターが、入手可能であり、当業者に知られている。発現ベクターの選定は、宿主発現系の選定により影響を及ぼされる。そのような選択は、十分に、当業者の技術のレベルの範囲内にある。一般に、発現ベクターは、転写プロモーターならびに所望によりエンハンサー、翻訳シグナル、ならびに転写終結シグナルおよび翻訳終結シグナルを含むことができる。安定した形質転換に使用される発現ベクターは、形質転換細胞の選択および維持を可能にする選択マーカーを典型的に有する。いくつかの場合において、複製開始点は、細胞におけるベクターのコピー数を増幅させるために使用することができる。

20

【0334】

FXまたは修飾FXポリペプチドはまた、タンパク質融合物として利用するまたは発現することができる。たとえば、融合物は、ポリペプチドに対してさらなる機能性を追加するために生成することができる。融合タンパク質の例は、シグナル配列、局在化のためなどのようなタグ、たとえばhis₆タグもしくはmycタグまたは精製のためのタグ、たとえばGST融合物、ならびにタンパク質分泌および／または膜結合を指示するための配列の融合物を含むが、これらに限定されない。

【0335】

1つの態様において、プロテアーゼは、不活性チモーゲン形態において発現される。他の態様において、FXポリペプチドまたは修飾FXポリペプチドは、活性化が、ポリペプチドのFXチモーゲン形態の発現分泌および精製の後に、ラッセルクサリヘビ蛇毒FX活性化因子 (Haematologic Technologies) との反応により成し遂げられることによって、活性形態において産生することができる。かかる例において、活性化因子は、透析により、または活性化因子 (たとえばバイオチン-ストレプトアビジン) と適合性があるアフィニティークラムを使用することにより、得られる精製された調製物から除去され得る。

30

【0336】

場合によっては、不活性化FXポリペプチド形態は、調製において活性化FXa形態から除去される。たとえば、FXaはコンホメーション的に変化するため、ヘパリンに結合する能力を示す。したがって、FXaは、ヘパリンカラム(column)を使用するクロマトグラフィーによりチモーゲン形態も含む調製物から精製することができる。これは、本明細書における実施例2に例示される。典型的に、ここの例において、FXaポリペプチドは、少なくとも70%、一般的に少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の純度を示す。一般的に、FXa調製物は、実質的に、FXチモーゲン形態を含む他のタンパク質汚染物質を含まない。

40

【0337】

a. 原核生物発現

原核生物 (とりわけイー・コリ) は、大量のFXを産生するための系を提供する (たとえばPlatisら (2003) *Protein Exp. Purif.* 31(2): 222-30およびKhalilzadehら (2004)

50

J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(2): 63-69を参照されたい)。イー・コリの形質転換は、当業者らによく知られている単純で速い技術である。イー・コリについての発現ベクターは、高度なレベルのタンパク質発現を誘発するのにおよび宿主細胞に対していくらかの毒性を示すタンパク質を発現するのに有用である誘発性プロモーターを含有することができる。誘発性プロモーターの例は、*lac*プロモーター、*trp*プロモーター、ハイブリッド *tac*プロモーター、*T7 RNA*プロモーターおよび *SP6 RNA*プロモーター、ならびに温度調節性 λP_L プロモーターを含む。

【0338】

FXは、イー・コリの細胞質内環境において発現させることができる。細胞質は、還元環境であり、いくつかの分子については、これは、不溶性封入体の形成をもたらす得る。ジチオトレイトールおよびβ-メルカプトエタノールなどのような還元剤ならびに変性剤（たとえばグアニジン-HClおよび尿素など）は、タンパク質を再可溶化するために使用することができる。代替アプローチは、酸化環境ならびにシャペロニン様イソメラーゼおよびジスルフィドイソメラーゼを提供し、可溶性タンパク質の産生に至る、細菌の細胞膜周辺腔におけるFXの発現である。典型的に、タンパク質を周辺質に向けるリーダー配列は、発現されることとなるタンパク質に融合される。次いで、リーダーは、周辺質の内部で、シグナルペプチターゼによって除去される。周辺質標的リーダー配列の例は、ペクチン酸リアーゼ遺伝子に由来する *pelB*リーダーおよびアルカリホスファターゼ遺伝子に由来するリーダーを含む。いくつかの場合において、周辺質の発現は、培地の中への発現タンパク質の漏出を可能にする。タンパク質の分泌は、培養上清からの速やかで単純な精製を可能にする。分泌されないタンパク質は、周辺質から浸透圧溶解により得ることができる。細胞質内発現に類似して、いくつかの場合において、タンパク質は、不溶性になり得、変性剤および還元剤は、可溶化および再折り畳みを容易にするために使用することができる。誘発および成長の温度もまた、発現レベルおよび溶解性に影響を及ぼし得る。典型的に、25℃および37℃の間の温度が、使用される。突然変異もまた、発現タンパク質の溶解性を増加させるために使用することができる。典型的に、細菌は、非グリコシル化タンパク質を産生する。したがって、タンパク質が機能のためにグリコシル化を必要とするとき、グリコシル化は、宿主細胞からの精製の後にインビトロにおいて追加することができる。

【0339】

b. 酵母

サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、クルイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、およびピキア・パストリスなどのような酵母は、FXのための有用な発現宿主である（たとえばSkokoら (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38(Pt3): 257-65を参照されたい）。酵母は、エピソーム複製ベクターを用いてまたは相同組換えによる、安定した染色体の統合によって形質転換することができる。典型的に、誘発性プロモーターは、遺伝子発現を調節するために使用される。そのようなプロモーターの例は、*GAL1*、*GAL7*、および *GAL5*ならびに *CUP1*などのようなメタロチオネインプロモーターを含む。発現ベクターは、形質転換DNAの選択および維持のために、*LEU2*、*TRP1*、*HIS3*、および *URA3*などのような選択マーカーを含むことが多い。酵母において発現されるタンパク質は、可溶性であることが多く、*Bip*などのようなシャペロニンおよびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼとの同時発現は、発現レベルおよび溶解性を改善することができる。さらに、酵母において発現されるタンパク質は、サッカロマイセス・セレビシエに由来する酵母接合型アルファー因子分泌シグナルなどのような分泌シグナルペプチド融合物および *Agap*接合接着受容体またはアークスラ・アデニニボランス(*Arxula adeninivorans*)グルコアミラーゼなどのような酵母細胞表面タンパク質との融合物を使用して、分泌のために指示され得る。プロテアーゼ切断部位（たとえば *Kex-2*プロテアーゼ）は、ポリペプチドが分泌経路を出る場合に、融合配列をポリペプチドから除去するよう操作することができる。酵母はまた、*Asn-X-Ser/T*

h rモチーフでのグリコシル化も可能である。

【0340】

c. 昆虫および昆虫細胞

特にバキュロウイルス発現系を使用する昆虫および昆虫細胞は、F Xまたはその修飾形態などのようなポリペプチドを発現するのに有用である（たとえばMunetaら（2003）J. Vet. Med. Sci. 65(2):219-23を参照されたい）。血リンパにおける発現を含む昆虫細胞および昆虫幼虫は、高レベルのタンパク質を発現し、高等真核生物によって使用されるほとんどの翻訳後修飾が可能である。バキュロウイルスは、安全性を改善し、真核生物の発現の調節性の問題を低下させる制限的な宿主範囲を有する。典型的に、発現ベクターは、高レベルの発現のために、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターなどのようなプロモーターを使用する。一般的に使用されるバキュロウイルス系は、オートグラフ・カリフォルニカ核多角体病ウイルス（AcNPV）およびカイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）などのようなバキュロウイルスならびにヨトウガに由来するSf9、シューダレティア・ユニプンクタ（*Pseudaletia unipuncta*）（A7S）およびオオカバマダラ（DpN1）などのような昆虫細胞株を含む。高度な発現のために、発現される分子のヌクレオチド配列は、ウイルスのポリヘドリン開始コドンのすぐ下流に融合される。哺乳動物分泌シグナルは、昆虫細胞において厳密に処理され、発現タンパク質を培養培地の中に分泌するために使用することができる。さらに、細胞株シューダレティア・ユニプンクタ（A7S）およびオオカバマダラ（DpN1）は、哺乳動物細胞株に類似するグリコシル化パターンを有するタンパク質を産生する。

【0341】

昆虫細胞における代替発現系は、安定して形質転換された細胞の使用である。Schneider 2（S2）およびKc細胞（キロショウジョウバエ）およびC7細胞（ヒトスジシマカ）などのような細胞株は、発現に使用することができる。ショウジョウバエメタロチオネインプロモーターは、カドミウムまたは銅を用いる重金属誘発の存在下で高度なレベルの発現を誘発するために使用することができる。発現ベクターは、ネオマイシンおよびハイグロマイシンなどのような選択マーカーの使用によって典型的に維持される。

【0342】

d. 哺乳動物細胞

哺乳動物発現系は、F Xポリペプチドを発現するために使用することができる。発現コンストラクトは、アデノウイルスなどのようなウイルス感染によってまたはリポソーム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランなどのような直接的DNA移入によってならびに電気穿孔および微量注射などのような物理的手段によって、哺乳動物細胞に移入することができる。哺乳動物細胞のための発現ベクターは、mRNAキャップ部位、TATAボックス、翻訳開始配列（Kozakコンセンサス配列）、およびポリアダニル化エレメントを典型的に含む。そのようなベクターは、高度なレベルの発現のための転写プロモーター-エンハンサー、たとえばSV40プロモーター-エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、およびラウス肉腫ウイルス（RSV）の長末端反復配列を含むことが多い。これらのプロモーター-エンハンサーは、多くの細胞型において活性である。組織プロモーターおよび細胞型プロモーターならびにエンハンサー領域もまた、発現に使用することができる。例示的なプロモーター/エンハンサー領域は、エラストーゼI、インスリン、免疫グロブリン、マウス乳癌ウイルス、アルブミン、アルファフェトプロテイン、アルファ1抗トリプシン、ベータグロビン、ミエリン塩基性タンパク質、ミオシン軽鎖2、および生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御などのような遺伝子に由来するものを含むが、これらに限定されない。選択マーカーは、発現コンストラクトを有する細胞を選択し、維持するために使用することができる。選択マーカー遺伝子の例は、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、およびチミジンキナーゼを含むが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

れない。TCR- α およびFc ϵ R1- γ などのような細胞表面シグナリング分子を有する融合物は、活性状態にあるタンパク質の、細胞表面上での発現を指示することができる。

【0343】

多くの細胞株は、哺乳動物発現に利用可能であり、マウス、ラット、ヒト、サル、およびニワトリならびにハムスターの細胞を含む。例示的な細胞株は、BHK（つまりBHK-21細胞）、293-F、CHO、Balb/3T3、HeLa、MT2、マウスNS0（非分泌）および他の骨髓腫細胞株、ハイブリドーマ細胞株およびヘテロハイブリドーマ細胞株、リンパ球、線維芽細胞、Sp2/0、COS、NIH3T3、HEK293、293S、293T、2B8、およびHKBの細胞を含むが、これらに限定されない。細胞株はまた、分泌タンパク質の細胞培養液からの精製を容易にする無血清培地に適合させて利用可能である。1つのそのような例は、無血清EBNA-1細胞株である（Phamら、(2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42）。

【0344】

e. 植物

トランスジェニック植物細胞およびトランスジェニック植物は、FXの発現に使用することができる。発現コンストラクトは、微粒子銃などのような直接的DNA移入およびプロトプラストの中へのPEG媒介性移入を使用してならびにアグロバクテリウム媒介性形質転換を用いて、植物に典型的に移入される。発現ベクターは、プロモーター配列およびエンハンサー配列、転写終結エレメント、ならびに翻訳制御エレメントを含むことができる。発現ベクターおよび形質転換技術は、シロイヌナズナおよびタバコなどのような双子葉植物宿主ならびにトウモロコシおよびイネなどのような単子葉植物宿主の間で通常分けられる。発現に使用される植物プロモーターの例は、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、リボースビスリン酸カルボキシラーゼプロモーター、ならびにユビキチンプロモーターおよびUBQ3プロモーターを含む。ハイグロマイシン、ホスホマンノースイソメラーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどのような選択マーカーは、形質転換細胞の選択および維持を容易にするために使用されることが多い。形質転換植物細胞は、細胞、凝集体（カルス組織）として培養において維持することができる、または完全な植物に再生成させることができる。植物は、哺乳動物細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、これは、これらの宿主においてFXを産生するための選定に影響を及ぼし得る。トランスジェニック植物細胞はまた、タンパク質を産生するよう操作された藻類を含むこともできる（たとえばMayfieldら（2003）PNAS 100:438-442を参照されたい）。植物は、哺乳動物細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、これは、これらの宿主においてFXを産生するための選定に影響を及ぼし得る。

【0345】

2. 精製

宿主細胞に由来するFXポリペプチドの精製のための方法は、選定される宿主細胞および発現系に依存する。分泌分子については、タンパク質は、細胞を除去した後に培養培地から一般に精製される。細胞内発現については、細胞を溶解させ、タンパク質を抽出物から精製することができる。トランスジェニック植物およびトランスジェニック動物などのようなトランスジェニック生物が、発現に使用される場合、組織または器官は、溶解した細胞抽出物を作製するために出発物質として使用することができる。さらに、トランスジェニック動物産生は、乳または卵におけるポリペプチドの産生を含むことができ、これは、収集することができ、必要であれば、さらに、タンパク質を抽出し、さらに、当技術分野における標準的な方法を使用して精製することができる。

【0346】

FXは、SDS-PAGE、サイズ分画クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー、硫安塩析、キレートクロマトグラフィー、ならびにイオン交換クロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない、当技術分野において知られている標準的なタン

パク質精製技術を使用して精製することができる。たとえば、FXポリペプチドは、アニオン交換クロマトグラフィーによって精製することができる。FXポリペプチドを精製するための例示的な方法は、機能的G l aドメインを有する任意のポリペプチドの結合を可能にするイオン置換カラムの使用、その後続く、カルシウムの存在下における溶出によるものである。アフィニティー精製技術もまた、調製の効率および純度を改善するために使用することができる。たとえば、FXに結合する抗体、受容体、および他の分子を、アフィニティー精製において使用することができる。発現コンストラクトはまた、m y c エピトープ、G S T 融合物、またはH i s₆などのようなアフィニティータグを追加するように操作し、タンパク質に対して、それぞれ、m y c 抗体、グルタチオン樹脂、およびN i ー樹脂を用いてアフィニティー精製することができる。純度は、ゲル電気泳動技術および染色技術ならびに分光光度計技術を含む、当技術分野において知られている任意の方法によって評価することができる。

10

【0347】

上記のとおり、FXプロテアーゼは、発現させ、精製して、不活性形態（チモーゲン形態）とすることができるまたは、代わりに、発現プロテアーゼは、活性形態に精製することができる。FXチモーゲンポリペプチドは、最初に、哺乳動物細胞における産生、その後続く精製を含むが、これらに限定されない、本明細書において記載される産生の方法のいずれかによって調製することができる。活性化ペプチドの切断を介して活性化されたFX aポリペプチドは、インビトロにおいて調製することができる（つまりFX a；二重鎖形態）。FXポリペプチドの、活性プロテアーゼ形態、FX aへの切断は、活性化因子（たとえばRussell's Viper Venom FX 活性化因子）、活性化因子の切断および不活性形態のさらなる切断との反応によって達成することができる。

20

【0348】

3. 融合タンパク質

修飾FXポリペプチドおよび1つまたは複数の他のポリペプチドを含有する融合タンパク質もまた、提供される。適した経路による投与のために製剤されるそのような融合タンパク質を含有する医薬組成物が、提供される。融合タンパク質は、任意の順番で、修飾FXポリペプチドならびに抗体またはその断片、成長因子、受容体、リガンド、および他のそのような作用物質などのような作用物質を連結することによって、FXポリペプチドの精製を容易にする、FXポリペプチドの薬力学的特性を、たとえば、標的細胞もしくは標的組織にポリペプチドを向けることによって改変する、および／またはFXポリペプチドの発現もしくは分泌を増加させる目的で、形成される。典型的に、任意のFX融合タンパク質は、非融合ポリペプチドと比較して、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の触媒活性を含む、非融合FXポリペプチドと比較して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%の触媒活性を保持する。

30

【0349】

FXポリペプチドの、他のポリペプチドとの連結は、直接的にまたはリンカーを介して間接的に達成することができる。一例では、連結が、ヘテロ二官能性剤を介するなどのような化学的連結またはチオール連結または他のそのような連結によるものとすることができる。融合はまた、組換え手段によって達成することもできる。他のポリペプチドに対するFXポリペプチドの融合は、FXポリペプチドのN-末端またはC-末端に対するものとすることができる。本明細書中で提供されるFXポリペプチドを有する融合タンパク質において使用することができるポリペプチドの非限定的な例は、たとえば、GST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）ポリペプチド、免疫グロブリンGに由来するFcドメイン、または異種シグナル配列（たとえばトロニンに由来する）を含む。融合タンパク質は、イー・コリマルトース結合タンパク質（MBP）などのような、細胞によるタンパク質の取り込みを助ける、さらなる成分を含有することができる（国際PCT出願WO 01/32711を参照されたい）。

40

【0350】

融合タンパク質は、標準的な組換え技術によって産生することができる。たとえば、異

50

なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、従来の技術に従って、インフレイムで、例えば、ライゲーションのための平滑端または粘着端、適切な末端を提供するための制限酵素による消化、適宜、粘着端の補充、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処置、および酵素的ライゲーションを利用することによって、共にライゲーションすることができる。他の実施形態では、融合遺伝子が、自動DNA合成機を含む従来の技術によって合成することができる。代わりに、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続した遺伝子断片の間の相補的オーバーハングを起こすアンカープライマーを使用して実行することができ、引き続いて、遺伝子断片をアニールし、再増幅させてキメラ遺伝子配列を生成することができる（たとえばAusubelら (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992を参照されたい）。そのうえ、融合部分を既にコードしている多くの発現ベクターが、市販で入手可能である（たとえばGSTポリペプチド）。FXコード核酸は、融合部分がインフレイムでプロテアーゼタンパク質に連結されるように、そのような発現ベクターの中にクローニングすることができる。

10

【0351】

4. ポリペプチド修飾

修飾FXポリペプチドは、裸のポリペプチド鎖または複合体として調製することができる。いくつかの適用のために、翻訳後修飾または他の化学的修飾を有していない「裸の」形態で修飾FXを調製することは望ましいものとなり得る。裸のポリペプチド鎖は、翻訳後にFXを修飾しない適した宿主において調製することができる。そのようなポリペプチドはまた、インビトロ系において、化学的ポリペプチド合成を使用して調製することができる。他の適用のために、ペグ化、アルブミン化、グリコシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化、または他の知られている修飾を含む特定の修飾が、所望され得る。修飾は、インビトロにおいてまたはたとえば、そのような修飾をもたらす、適した宿主において修飾FXを産生することによってなすことができる。

20

【0352】

5. ヌクレオチド配列

FXまたは修飾FXポリペプチドをコードする核酸分子が、本明細書において提供される。核酸分子は、任意のコードFXポリペプチドの対立遺伝子変異体またはスプライス変異体を含む。本明細書において提供される例示的な核酸分子は、配列番号：4～133または417～546のいずれかにおいて記載されるポリペプチド、またはその成熟、チモージェン、活性または触媒活性形態をコードするいずれかのものなど、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドをコードするいずれかのものである。一実施形態では、本明細書において提供される核酸分子が、少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、または99%の配列同一性を有するまたは中もしくは高ストリンジェンシーの条件下で、本明細書において提供されるFXポリペプチドをコードする完全長の任意の核酸の少なくとも70%に沿ってハイブリダイズする。他の実施形態では、核酸分子が、本明細書において提供されるFXポリペプチドのいずれかをコードする縮重コドン配列を有するものを含むことができる。

30

【0353】

F. 修飾FX活性の評価

FXポリペプチドの活性および特性は、インビトロにおいておよび／またはインビボにおいて評価することができる。そのような評価のためのアッセイは、当業者らに知られており、試験された活性および結果を、治療活性およびインビボ活性と相互に関連されることが知られている。一例では、FX変異体が、未修飾FXおよび／または野生型FXと比較して、評価することができる。他の例として、修飾FXポリペプチドの活性は、インビトロまたはインビボにおいてAT-I-I-Iに暴露し、AT-I-I-Iに暴露されていない修飾FXポリペプチドのものと比較して評価することができる。そのようなアッセイは、FVaの存在下または非存在下において実行することができる。インビトロアッセイは、凝固アッセイ、結合アッセイ、タンパク質アッセイ、および分子生物学アッセイを含む、細胞ベースのアッセイなどのような、当業者に知られている任意の検査アッセイを含む。イ

40

50

ンビボアッセイは、動物モデルにおけるFXアッセイおよびヒトに対する投与を含む。いくつかの場合において、FXの活性は、アッセイ決定因子に対して、血液、血清、または他の体液を評価することによってインビボにおいて決定することができる。FX変異体もまた、治療の効能などのような活性または特性を評価するためにインビボにおいて試験することができる。

【0354】

典型的に、本明細書において記載されるアッセイは、FXの活性化形態、つまりFXaに関してのものである。そのようなアッセイはまた、そのような形態が、典型的に、FXの血液凝固活性に必要とされるタンパク質分解活性または触媒活性を含まないので、陰性対照を提供するように、不活性チモーゲン形態を用いる実行することもできる。さらに、

10

【0355】

1. インビトロアッセイ

例示的なインビトロアッセイは、ポリペプチド修飾および活性を評価するためのアッセイを含む。修飾は、当技術分野において知られている、 γ -カルボキシル化、および他の翻訳後修飾を評価するインビトロアッセイ、タンパク質アッセイ、ならびにコンホメーションアッセイを使用して評価することができる。活性についてのアッセイは、第Va因子およびプロトロンビンなどのような他の凝固因子とのFXa相互作用の測定、FXaポリペプチドのタンパク質分解活性を決定するためのタンパク質分解アッセイ、ホスファチジルセリンおよび他のリン脂質に対するFXaポリペプチドの結合性および／または親和性を決定するためのアッセイ、ならびに凝固に対するFXaポリペプチドの効果を決定するための細胞ベースのアッセイを含むが、これらに限定されない。

20

【0356】

修飾FXaポリペプチドの濃度は、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、SDS-PAGE; Bradford法、およびビシンコニン酸(BCA)法; UV吸光度; ならびにこれらに限定されないが、免疫学的方法、放射性の方法、蛍光性の方法、および関連する方法などのような他の定量化可能なタンパク質ラベル法を含むが、これらに限定されない、当技術分野においてよく知られている方法によって評価することができる。プロトロンビンポリペプチドの切断またはFXaプロテアーゼ活性によって産生される産物を

30

【0357】

修飾FXaポリペプチドの構造的特性もまた、評価することができる。たとえば、修飾FXポリペプチドのX線結晶解析、核磁気共鳴(NMR)、および低温電子顕微鏡(cryo-EM)は、FXポリペプチドの3次元構造および／または基質、 Ca^{2+} 、もしくは補因子結合などのようなFXポリペプチドの他の特性を評価するために実行することができる。

40

【0358】

さらに、FXa分解の存在および程度は、硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および電気泳動にかけられたFXa含有試料のウェスタンブロッティングなどのような標準的な技術によって測定することができる。プロテアーゼに暴露されたFXaポリペプチドはまた、修飾FXaポリペプチドの切断部位の場所または変化を決定するためにN-末端配列決定にかけることもできる。

【0359】

a. 翻訳後修飾

FX/FXaポリペプチドはまた、翻訳後修飾の存在について評価することができる。このようなアッセイは当技術分野で知られており、グリコシル化、ヒドロキシル化および

50

カルボキシル化を測定するためのアッセイを含む。グリコシル化についての例示的なアッセイにおいて、炭水化物分析は、例えば、ヒドラジン分解またはエンドグリコシダーゼ処理に暴露されたFX/FXaポリペプチドのSDSページ分析で実施することができる。ヒドラジン分解は、無水ヒドラジンとのインキュベーションによって、糖タンパク質からN結合型グリカンおよびO結合型グリカンを放出するが、エンドグリコシダーゼ放出はPNGase Fに関与し、これは糖タンパク質からほとんどのN-グリカンを放出する。FX/FXaポリペプチドのヒドラジン分解処置またはエンドグリコシダーゼ処置は、蛍光体ラベルまたは発色団ラベルを用いてタグを付けることができる還元末端を生成する。ラベルFX/FXaポリペプチドは、蛍光体支援炭水化物電気泳動(FACE)によって分析することができる。グリカンに対する蛍光性タグはまた、HPLCによる単糖分析、複雑なグリコシル化パターンのプロファイリングまたはフィンガープリンティングに使用することもできる。例示的なHPLC方法は、親水性相互作用クロマトグラフィー、電子相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーを含む。例示的なグリカンプロブは、3-(アセチルアミノ)-6-アミノアクリジン(AA-Ac)および2-アミノ安息香酸(2-AA)を含むが、これらに限定されない。炭水化物部分はまた、グリコシル化FX/FXaポリペプチドを認識する特異的な抗体の使用を通して検出することができる。

10

【0360】

β -ヒドロキシル化を測定するための例示的なアッセイは、アルカリ加水分解に付されたFX/FXaポリペプチドの逆相HPLC分析を含む Fernlund, P and J. Stenflo (1983) J. Biol. Chem. 258(20):12509-12)。FX/FXaポリペプチドのカルボキシル化および γ -カルボキシル化は、アルカリ加水分解、次にカチオン交換カラムを使用するHPLCを使用して評価することができ、修飾された残基は、エドマン分解を使用するアミノ末端配列決定分析の後に同定することができる (Camireら (2000) Biochemistry. 39(46):14322-14329)。プロペプチド(プロ-FX)を含むFXポリペプチドと翻訳後 γ -カルボキシレート修飾に関与するカルボキシラーゼとの相互作用もまた、評価することができる。たとえば、カルボキシラーゼに対するFXペプチドの相対的アフィニティーは、第IX因子プロペプチド/ガンマーカルボキシグルタミン酸ドメイン基質について阻害定数(K_i)を決定することにより比較することができる (Stanley, T. B. (1999) J. Biol. Chem. 274:16940-16944)。

20

30

【0361】

b. タンパク質分解活性 (触媒活性)

修飾FXaポリペプチドは、タンパク質分解活性について試験することができる。FXaのタンパク質分解活性は、発色基質、たとえばF-3301 ($\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH}$; Sigma Aldrich)、S-2222 ($\text{Bz-Ile-Glu}(\gamma\text{-OR})\text{-Gly-Arg-pNAHCl}$; R=H (50%) および R=CH₃ (50%); DiaPharma)、S-2337 (ベンゾイル-Ile-Glu-(γ -ピペリジル)-Gly-Arg-p-ニトロアニリン; Kabi Diagnostica)、CBS 39.31 (Diagnostic Stago Ltd.) または蛍光発生基質、たとえばPefluor FXa ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHA-Gly-Arg-AMC-AcOH}$; Pentaparm) を使用して測定することができる。FXaポリペプチドを、単独で、またはFVaの存在下で、所望によりリン脂質の存在下で、様々な濃度の発色基質とインキュベートする。基質の切断は、吸光度または蛍光によりモニタリングすることができ、基質加水分解の速度は、容易に利用できるソフトウェアを使用する線形回帰により決定することができる。

40

【0362】

第IXa因子のタンパク質分解活性はまた、FXa基質、たとえばプロトロンビンの活性化をモニタリングすることにより間接的に評価することができる。FVaとのプレインキュベーション有りまたは無しで、リン脂質の存在下で、FXaポリペプチドは、精製され

50

たプロトロンビン（市販されている）とインキュベートすることができる。次に、プロトロンビンのFXaポリペプチド切断の結果として産生される活性なトロンビンの量は、蛍光変化を介してモニタリングされる（US 2005/0142032、以下の実施例4も参照）、Pefaf fluor TH（H-D-CHA-Ala-Arg-AMC2AcOH；Centerchem）のような蛍光発生基質、または、吸光度変化によりモニタリングされるT3068（ β -Ala-Gly-Arg-p-ニトロアニリドジアセテート；Sigma Aldrich）のような発色基質に対するトロンビンの活性として測定される。次に、第Xa因子ポリペプチド活性は、測定されたトロンビン活性から推定される。

【0363】

c. 凝固活性

FX/FXaポリペプチドは、当技術分野においてよく知られているアッセイを使用することによって凝固活性について試験することができる。たとえば、アッセイのいくつかは、2ステージ凝血アッセイ（Skogenら、(1983) J. Biol. Chem. 259(4):2306-2310）；プロトロンビン時間（PT）アッセイ；PT試験の改良であるアッセイ；活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）；活性化凝血時間（ACT）；希釈活性化第X因子活性化凝血時間(dilute activated factor X-activated clotting time)（XACT）（Exnerら（2000）Blood Coagul Fibrinolysis. 14(8):773-779）；再石灰化活性化凝血時間；リーーホワイト凝血時間；トロンボエラストグラフィー（TEG）；または回転トロンボエラストメトリー(rotational thromboelastometry)（ROTEM）を含むが、これらに限定されない。たとえば、修飾FX/FXaポリペプチドの凝固活性は、PTベースのアッセイによって決定することができ、FX/FXaは、FX欠損血漿において希釈され、Dade BehringからのInnovin（商標）として入手可能なものなどのようなプロトロンビン時間試薬（リン脂質およびカルシウムを有する）と混合される。血餅形成は、光学的に検出され、血餅までの時間は、決定され、FX欠損血漿のみに対して比較される。

【0364】

d. 他のタンパク質および分子への結合および／またはそれによる阻害

阻害アッセイは、たとえばアンチトロンビンIII（AT-III）／ヘパリン複合体などのようなFXa阻害因子に対する修飾FXaポリペプチドの抵抗性を測定するために使用することができる。他の阻害因子についての阻害の評価もまた、試験することができ、プロテインZ依存性プロテアーゼ阻害因子（ZPI）、およびFXa特異的抗体などのような他のセリンプロテアーゼ阻害因子を含むが、これらに限定されない。阻害は、FXaポリペプチドと市販のAT-IIIおよび未分画ヘパリンとのインキュベーションにより評価することができる。次いで、FXaの活性は、上記に記載される、任意の1つまたは複数の活性アッセイまたは凝固アッセイを使用して測定することができ、AT-IIIまたはZPIによる阻害は、阻害因子とインキュベートされなかったFXaポリペプチドの活性との、阻害因子とインキュベートされたFXaポリペプチドの活性の比較によって評価することができる。

【0365】

FXaポリペプチドは、他の凝固因子および阻害因子に対する結合について試験することができる。たとえば、FVaなどのような補因子、プロトロンビンなどのような基質、AT-III、ZPIおよびヘパリンなどのような阻害因子とのFXaの直接的なおよび間接的な相互作用は、免疫沈降；カラム精製；非還元SDS-PAGE；BIAcore（登録商標）アッセイを含む表面プラズモン共鳴（SPR）；蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）；蛍光偏光（FP）；等温滴定熱量測定（ITC）；円二色性（CD）；タンパク質断片補足性アッセイ（PCA）；核磁気共鳴（NMR）分光法；光散乱；沈降平衡；小ゾーンゲル濾過クロマトグラフィー；ゲル遅延；ファーウェスタンブロッティング；蛍光偏光；ヒドロキシラジカルタンパク質フットプリント；ファージディスプレイ；および様々な様々な2-ハイブリッド系を含むが、これらに限定されない、当技術分野にお

10

20

30

40

50

いて知られている任意の結合アッセイを使用して評価することができる。1つの例として、リン脂質結合F V aへのF X aの結合親和性は、放射性F X aおよびF V aおよび油遠心分離を使用して決定された(Tracyら, (1981) J. Biol. Chem. 256(2): 743-751)。

【0366】

e. リン脂質親和性

ホスファチジルセリン(P S)および他のリン脂質に対する修飾F X/F X aポリペプチドの結合性および/または親和性は、当技術分野においてよく知られているアッセイを使用して決定することができる(たとえばBurriら, (1987) Biochimica et Biophysica Acta. 923(2): 176-186を参照のこと)。高度に純粋なリン脂質(たとえば既知濃度のウシP Sおよび卵ホスファチジルコリン(P C)これは、S i g m aなどから入手可能である)は、有機溶媒において、小さな単層リン脂質小胞を調製するために使用することができる。これらのP S/P C小胞へのF X/F X aポリペプチドの結合は、入射光に対する90°での相対的な光散乱によって決定することができる。P C/P S単独でのおよびP C/P S/F XまたはP C/P S/F X aでの光散乱の強度は、解離定数を決定するために測定される(Burriら, (1987) Biochimica et Biophysica Acta. 923(2): 176-186)。B I A c o r e バイオセンサー機器でなどのような表面プラズマ共鳴もまた、リン脂質膜に対するF X/F X aポリペプチドの親和性を測定するために使用することができる(Erbら, (2002) Eur. J. Biochem. 269(12):3041-3046)。

【0367】

2. 非ヒト動物モデル

非ヒト動物モデルは、修飾F X/F X aポリペプチドの活性、有効性および安定性を評価するために使用することができる。たとえば、非ヒト動物は、疾患または状態についてのモデルとして使用することができる。非ヒト動物は、止血に対する効果をモニターするために、表14に記載されているF X/F X a変異体のいずれか、特にチモーゲンまたはF X aまたはそれらの触媒活性形態のようなF X/F X a変異体の投与の前に、抗凝固治療薬の過剰摂取のような疾患および/または表現型誘導物質を注射することができる。

【0368】

遺伝モデルもまた、有用である。例えば、血友病Aを示す第V I I I因子ノックアウトマウスのような、1つまたは複数の遺伝子の過剰発現、過小発現、またはノックアウトによって疾患または状態を模倣するマウスなどのような動物は、生成することができる(Bi
ら(1995) Nat Gen 10:119-121)。第V I I因子欠乏;第I X因子欠乏(たとえば、血友病Bモデル);第X因子欠乏;第X I因子欠乏(血友病Cモデル);第X I I因子欠乏;およびI、I I、I V、VおよびV I型家族性多発性凝固因子欠乏(F M F D)に限定されないがこれらを含む他の凝固因子における欠乏もまた、F X/F X a変異体を試験するために産生することができる(Roberts, HR and MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies". Thrombosis and Hemorrhage, 2nd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802参照)。そのような動物は、当技術分野においてよく知られているトランスジェニック動物産生技術または天然に存在する突然変異株もしくは誘発突然変異株を使用することによって生成することができる。F X/F X aと関連する疾患の有用な非ヒト動物モデルの例は、出血障害、特に血友病、または血栓症のモデルを含むが、これらに限定されない。損傷または外傷のための非ヒト動物モデル、および外傷後血液希釈性血液凝固障害(post trauma hemodilutional coagulopathy)または急性外傷性血液凝固障害の動物モデルもまた、F X/F X aポリペプチドの活性、たとえば凝固活性を評価するために使用することができる。これらの非ヒト動物モデルは、野生型F X/F X aポリペプチドと比較して、F X/F X a変異体の活性をモニターするために使用することができる。

【0369】

動物モデルはまた、修飾F X/F X aポリペプチドの安定性、半減期およびクリアランスをモニターするために使用することもできる。そのようなアッセイは、修飾F X/F X aポリペプチドを比較するのに、ならびにさらなる非ヒト動物試験およびヒト試験のため

の用量および用量レジメンを計算するのに有用である。例えば、たとえば、表14のいずれかにおいて記載されているものを含む本明細書において提供される任意のFX/FXa変異体のような修飾FX/FXaポリペプチド、特にチモーゲン、FXaまたはそれらの触媒活性部分は、マウスの尾部静脈の中に注射することができる。次いで、血液試料は、注射の後の時点で採取され（数分、数時間、および数日後など）、次いで、限定はしないが、血清または血漿を含む身体的サンプルにおける修飾FX/FXaポリペプチドのレベルは、たとえばELISAまたはラジオイムノアッセイによって、特定の時点でモニターすることができる。FX/FXaポリペプチドの注射後の様々な時点の血液サンプルもまた、実施例8に記載されているように、様々なモデルを使用して凝固活性について試験される。薬物動態学試験のこれらの型は、凝血促進のための投与のための適当な用量を決定することを手助けするFX/FXaポリペプチドの半減期、クリアランスおよび安定性に関する情報を提供することができる。

10

【0370】

表14のいずれかにおいて記載されているもののような修飾FX/FXaポリペプチド、特にチモーゲン、FXaまたはそれらの触媒活性形態は、血友病のための動物モデルを使用して、治療有効性について試験することができる。非限定的な一例では、マウスなどのような動物モデルを、使用することができる。血友病のマウスモデルは、当技術分野において入手可能であり、修飾FX/FXaポリペプチドを試験するために用いることができる。例えば、抗FVII抗体での注射により産生される血友病Aのマウスモデルは、凝固因子ポリペプチドの血液凝固活性を評価するために使用することができ（たとえば、Tranholmら Blood (2003)102:3615-3620）、血友病の誘発モデルにおける修飾FX/FXaポリペプチドの試験を検討する。血友病A（Biら (1995) Nat Gen 10:119-121）または血友病B（Margaritisら (2004) J Clin Invest 113:1025-1031）の遺伝的マウスモデルもまた、修飾FX/FXaポリペプチドを試験するために用いることができる。

20

【0371】

出血障害の非マウスモデルも存在する。FX/FXaポリペプチド活性は、ワルファリン誘導出血またはメラガトラン誘導出血を有するラット（Dinessら (1992) Thromb. Res. 67:233-241、Elgら (2001) Thromb. Res. 101:145-157）、およびヘパリン誘導出血を有するウサギ（Chanら (2003) J. Thromb. Haemost. 1:760-765）において評価することができる。抗凝固薬過剰摂取の霊長動物モデル（Gruberら, (2008) Blood 112: Abstract 3825）もまた、修飾FX/FXaポリペプチド活性を試験するために使用することができる。重度の出血を示す近交系(Inbred)血友病A、血友病Bおよびフォン・ヴィレブランド病イヌ（Brinkhousら (1989) PNAS 86:1382-1386）もまた、修飾FX/FXaポリペプチドを有する非ヒト動物試験において使用することができる。FX/FXaポリペプチドの活性もまた、血小板減少症が血小板抗体の使用およびガンマ照射の組合せにより誘導される出血のウサギモデルにおいて評価することができる（Tranholmら (2003) Thromb. Res. 109:217-223）。

30

【0372】

全身性出血障害を有する動物に加えて、後天性血液凝固障害の損傷および外傷モデルもまた、修飾FX/FXaポリペプチドの活性、および凝固治療薬としての安全性および有効性を評価するために使用することができる。かかるモデルの非限定的な例は、ウサギ冠動脈狭窄モデル（Fattoruttoら (2004) Can J Anaesth; 51:672-679）、ブタにおけるVグレード肝臓損傷モデル（Kopelmanら (2000) Cryobiology; 40:210-217; Martinowitzら (2001) J Trauma; 50:721-729）、ブタ大動脈切開モデル（Sondeenら (2004) Shock; 22:163-168）、外傷の急性血液凝固障害のブタモデル（Harrら, (2011) J Surg Res; 170(2):319-324）；および外傷の後天性血液凝固障害のブタモデル（Dickneite, G. and I. Pr agst, (2009) Br J Anaesth; 102(3):345-354）を含む。

40

【0373】

3. 臨床アッセイ

多くのアッセイは、臨床的使用のためのFX/FXaの活性を評価するのに利用可能で

50

ある。そのようなアッセイは、インビボにおける凝固、タンパク質安定性、および半減期の評価ならびに表現型アッセイを含むことができる。表現型アッセイおよびFX/FXa処置の治療効果を評価するためのアッセイは、FX/FXaの血中レベルの評価（たとえば、肥満度指数（BMI）について修正するための、投与前のならびに第1の投与の後、最後の投与直後、および中間の時点を含む投与の後の時点の血清FX/FXaの測定）、FX/FXaでの処置後に上記方法を使用するインビトロでの血液凝固の評価（たとえばPTアッセイ）、および未修飾FX/FXaおよび/または野生型FX/FXaまたは偽薬を用いて処置される対象と比較した、長い間にわたる症状の回復を含む、FX/FXa処置に対する表現型の応答を含む。修飾FX/FXaポリペプチドで処置される患者は、失血、輸血の必要性、およびヘモグロビンについてモニタリングすることができる。患者は、ルーチ的な投与もしくは反復投与のためのある期間にわたりまたは出血、外傷、もしくは手術手技などのような急性事象に応じた投与の後に定期的にモニターすることができる。

10

【0374】

G. 製剤および投与

出血障害の処置における使用のための修飾FXチモーゲンおよび修飾FXaポリペプチドを含む修飾FXポリペプチドの組成物は、本明細書において提供される。このような組成物は、治療有効量の明細書に記載されている修飾FXチモーゲンまたはFXaポリペプチドを含む。有効濃度のFXポリペプチドまたは薬学的に許容可能なその誘導体は、全身投与、局所投与、または局所的投与のための適した医薬担体または医薬媒体と混合される。化合物は、選択される障害の処置に有効な量で含まれる。組成物における活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、不活性化、排泄率、投薬スケジュール、および投与される量ならびに当業者に知られている他の因子に依存するであろう。

20

【0375】

本明細書において提供される化合物の投与に適した医薬担体または医薬媒体は、当業者らに知られている任意のそのような担体を含み、特定の投与様式に適したものとなる。治療有効量の明細書において記載されるFXポリペプチドを含む医薬組成物はまた、投与の直前に、滅菌水などを用いて再構成される凍結乾燥粉末として提供することができる。

【0376】

1. 製剤

30

修飾FXチモーゲンおよび修飾FXaポリペプチドを含む修飾FXポリペプチドを含有する医薬組成物は、選択される量のポリペプチドを、1つまたは複数の生理学的に許容可能な担体または賦形剤と混合することによって、任意の従来の様式において製剤することができる。担体または賦形剤の選択は、投与する医者の技術の範囲内にあり、多くのパラメーターに依存し得る。これらは、たとえば、投与のモード（すなわち、全身、経口、経鼻、経肺、局所的、局所、または任意の他のモード）および処置される障害を含む。

【0377】

化合物は、微粒子化された形態もしくは他の適した形態で懸濁させることができるまたはより可溶性の活性産物を産生するために誘導体化することができる。結果として生じる混合物の形態は、投与の意図されるモードおよび選択される担体または媒体における化合物の溶解性を含む、多くの因子に依存する。結果として生じる混合物は、溶液、懸濁液、乳濁液、および他のそのような混合物であり、非水性または水性の混合物、クリーム、ゲル、軟膏剤、乳剤、液剤、エリキシル剤、ローション、懸濁剤、チンキ剤、ペースト、泡、エアロゾル、灌注剤、スプレー剤、坐剤、包帯、または全身投与、局所投与、もしくは局所的投与に適している任意の他の製剤として製剤することができる。筋肉内投与、非経口投与、または関節内投与などのような局所的内部投与については、ポリペプチドは、等張緩衝生理食塩水などのような水性ベースの培地において溶液懸濁剤として製剤することができるまたは内部投与のために意図される生体適合性支持体もしくは生体接着性のものと組み合わせられる。

40

【0378】

50

一般に、薬学的に許容可能な組成物は、規制当局に対する承認を考慮して調製されるか、または動物およびヒトにおける使用のための、一般に承認される薬局方に従って調製される。医薬組成物は、アイソフォームが共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または媒体などのような担体を含むことができる。そのような医薬担体は、落花生油、ダイズ油、鉱油、およびゴマ油などのような、石油起源、動物起源、野菜起源、または合成起源のものを含む、水および油などのような、滅菌した液体とすることができる。医薬組成物が静脈内に投与される場合、水は、典型的な担体となる。食塩水ならびに水性デキストロース溶液および水性グリセロール溶液は、特に注射可能な溶液のための、液体担体として利用することができる。組成物は、有効成分と共に、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、またはカルボキシメチルセルロースなどのような希釈剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、および滑石などのような滑沢剤；ならびにデンプン、アカシアゴムなどのような天然ゴム、ゼラチン、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリジン、セルロースおよびその誘導体、ポビドン、クロスポビドン、ならびに当業者らに知られている他のそのような結合剤などのような結合剤を含有することができる。適した医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、およびエタノールを含む。組成物はまた、望ましい場合、少数の量の湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤、たとえばアセテート、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミン酢酸ナトリウム、トリエタノールアミンオレアート、および他のそのような作用物質を含有することができる。これらの組成物は、溶液、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、および徐放性製剤の形態をとることができる。治療化合物およびラクトースまたはデンプンなどのような、適した粉末ベースの粉末ミックスを含有する、たとえば、吸入器または注入器における使用のためのゼラチンのカプセル剤およびカートリッジは、製剤することができる。組成物は、伝統的な結合剤およびトリグリセリドなどのような担体と共に坐剤として製剤することができる。経口製剤は、医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、および他のそのような作用物質などのような、標準的な担体を含むことができる。経口投与のための調製物もまた、ポーマン-バーク阻害因子、コンジュゲーションポーマン-バーク阻害因子、アプロチニン、およびカモスタットなどのようなプロテアーゼ阻害因子と共に適切に製剤することができる。適した医薬担体の例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」において記載される。そのような組成物は、対象または患者への適切な投与のための形態を提供するために、適した量の担体と共に、一般に精製形態において、治療有効量の化合物を含有するであろう。

【0379】

製剤は、投与のモードに適するはずである。たとえば、修飾FXチモーゲンおよび修飾FXαポリペプチドを含む修飾FXを含む組成物は、注射による（たとえばボラス注射または継続注入による）非経口投与のために製剤することができる。注射可能な組成物は、油性媒体または水性媒体において、懸濁剤、液剤、または乳剤としてそのような形態をとることができる。滅菌した注射可能な調製物はまた、たとえば1，4-ブタンジオールにおける液剤として、無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶剤における、滅菌した注射可能な液剤または懸濁剤とすることができる。滅菌した不揮発性油は、溶剤または懸濁媒として慣習的に利用される。この目的のために、合成モノグリセリドもしくは合成ジグリセリド、脂肪酸（オレイン酸を含む）、ゴマ油、やし油、落花生油、綿実油、および他の油のような天然に存在する植物油、またはオレイン酸エチルのような合成脂肪性媒体を含むが、これらに限定されない任意の無刺激の不揮発性油を、利用することができる。緩衝液、保存剤、酸化防止剤、および適した成分は、必要に応じて組み込むことができるまたはその代わりに、製剤を含むことができる。

【0380】

ポリペプチドは、組成物におけるただ一つの薬学的に活性な成分として製剤することができる、または他の活性成分と組み合わせることができる。ポリペプチドは、抗体などのような標的作用物質へのコンジュゲーションなどによって、デリバリーのために標的にすることができる。組織標的リポソームを含むリポソーム懸濁剤もまた、薬学的に許容可能な担体として適し得る。これらは、当業者らに知られている方法に従って調製することができる。たとえば、リポソーム製剤は、米国特許第4, 522, 811号において記載されるように調製することができる。リポソームデリバリーはまた、徐放性製剤を含むこともでき、フィブロンectinを用いて修飾される、コラーゲンゲルおよびリポソームなどのような医薬マトリックスを含む（たとえば、Weinerら（1985）J Pharm Sci. 74(9): 922-5を参照されたい）。本明細書において提供される組成物は、これらに限定されないが、不活性担体またはコロイド分散系などのような、デリバリーを容易にする1つまたは複数のアジュバントをさらに含有することができる。そのような不活性担体の代表的で非限定的な例は、水、イソプロピルアルコール、ガス状フルオロカーボン、エチルアルコール、ポリビニルピロリドン、プロピレングリコール、ゲル産生物質、ステアシルアルコール、ステアリン酸、鯨ろう、ソルビタンモノオレアート、メチルセルロース、およびそれらの2つまたはそれ以上の適した組合せから選択することができる。活性化合物は、処置される対象に対して望ましくない副作用の非存在下において、薬学的に許容可能な担体において、治療的に有用な効果を発揮するのに十分な量で含まれる。治療有効濃度は、本明細書において提供されるアッセイなどのような知られているインビトロ系およびインビボ系において化合物を試験することによって経験的に決定することができる。

【0381】

a. 投薬量

本明細書において提供される修飾FXチモージェンおよび修飾FXaポリペプチドを含む修飾FXポリペプチドを含む医薬組成物は、単回投薬量（直接）投与、複数投薬量投与または希釈または他の修飾のために製剤化することができる。製剤における化合物の濃度は、投与時に、意図される処置のために有効である量の送達のために有効である。典型的に、組成物は、単回投薬量投与のために製剤化される。組成物を製剤化するために、化合物またはそれらの混合物の重量分率を、処置される状態が軽減または改善されるように、有効な濃度で選択されたビヒクル中に溶解、懸濁、分散、または混合される。

【0382】

投与される治療剤の正確な量または用量は、特定のFXポリペプチド（たとえばFXチモージェンまたはFXaおよび／または特定の修飾物）、投与の経路、ならびに疾患の重症度ならびに対象の体重および全身状態などのような他の考慮に依存する。全身投与、治療剤の局所的濃度が、いくつかの場合において、全身投与に際して安全性を伴って達成することができるものよりも、局所的投与の後に、高いものとなり得るが、治療剤の局所的投与は、典型的に、全身投与のあらゆるモードよりも低い用量を必要とするであろう。

【0383】

必要であれば、特定の投薬量および持続時間ならびに処置プロトコールは、経験的に決定するまたは推定することができる。たとえば、組換えFXポリペプチドおよび天然FXポリペプチドの例示的な用量は、適切な投薬量を決定するための出発点として使用することができる。典型的に、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドは、組換え野生型FXポリペプチドと比較して、低下した投薬量および／または低下した頻度で有効となり得る。処置の用量および注射の間の間隔は、出血の重症度および処置に対する患者の応答に応じて変わるであろう、また、適宜、調整することができる。未修飾FXと比較した、修飾FXの活性のレベルおよび半減期などのような因子は、投薬量の決定をなす場合、考慮に入れることができる。特定の投薬量およびレジメンは、経験的に決定することができる。たとえば、未修飾FXポリペプチドよりも長い半減期を示す修飾FXポリペプチドは、未修飾FXポリペプチドよりも低い用量および／または低い頻度で投与することができる。同様に、未修飾FXポリペプチドと比較して、増加した血液凝固活性を示す修飾FXポリペプチドを使用する、治療的効能に必要とされる投薬量は、頻度および量を低下

させることができる。特定の投薬量およびレジメンは、経験的に当業者によって決定することができる。

【0384】

FXチモーゲンまたはFXaを含む修飾FXポリペプチドの投与量は、ポリペプチドの血液レベルをFXポリペプチド形態の通常量の約10%から約400%、50%から100%または100%から250%に上昇させる量であり得る。投薬量レベルをモニタリングまたは調整するために投与されるFXポリペプチドに対する血漿または血液レベルをモニタリングすることは当業者が十分に可能であるレベルである。

【0385】

組成物は、50単位/mLから1000単位/mLまたは約50単位/mLから1000単位/mL、たとえば50単位/mLから500単位/mL、100単位/mLから600単位/mLまたは400単位/mLから1000単位/mLである量におけるFXポリペプチドにて製剤化され得る。組成物の容量は、0.5mLから100mL、たとえば0.5mLから5mL、1mLから10mL、5mLから50mLまたは30mLから60mLであり得る。

【0386】

たとえば、本明細書において提供される修飾FXポリペプチドは、0.01から1,000mg、たとえば0.05から500mg、たとえば1mgから500mgの投薬量で患者への投与のために製剤化され得る。有効量の薬物は、通常、0.0002mg/kgから約20mg/kg体重/日、たとえば、約0.001mg/kgから7mg/kg体重/日、例えば、0.01mg/kgから1mg/kg、0.05mg/kgから0.5mg/kg、0.01mg/kgから0.250mg/kg、0.01mg/kgから0.075mg/kgまたは少なくとも0.04mg/kgまたは少なくとも約0.04mg/kgの投薬量レベルで提供される。典型的には、投薬量は、少なくとも十分な改善が観察されるまで、少なくとも1日1回である。投与は、数分の過程（たとえば1から10分または2から5分）にわたってボラス注入により成し遂げられ得る。あるいは、患者は1から3時間毎にボラス注入を受けることができ、また十分な改善が観察されるとき、ポリペプチドの1日に1回の注入を成し遂げることができる。したがって、いくつかの例において、投与は、1時間毎に、1日毎に、1週毎にまたは1月毎に繰り返すことができる。例えば、出血症状を経験している患者、たとえば凝固因子欠乏または他の関連する外傷を有する患者の処置のために、投与は、止血が成し遂げられるまで、1-24時間毎、たとえば2-12時間毎または4-6時間毎に繰り返すことができる。

【0387】

b. 剤形

医薬品の治療的に活性な化合物およびその誘導体は、典型的に、単位剤形または複数回の剤形で製剤され、投与される。製剤は、適した量の化合物または薬学的に許容可能なその誘導体を含有する、錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒、滅菌した非経口服液剤または非経口懸濁剤、経口服液剤または懸濁剤、および油水乳剤を含むが、これらに限定されない剤形で、ヒトおよび動物に対する投与のために提供することができる。それぞれの単位用量は、必要とされる医薬担体、医薬媒体、または医薬希釈剤と関連して、望ましい治療効果をもたらすのに十分な所定の量の治療的に活性な化合物を含有する。単位用量形態の例は、アンプルおよびシリンジならびに個々に包装される錠剤またはカプセル剤を含む。いくつかの例では、単位用量が、投与前に再構成される凍結乾燥散剤として提供される。たとえば、FXポリペプチドは、注射のための単一用量液剤を生成するために、適した液剤を用いて再構成される凍結乾燥散剤として提供することができる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥散剤が、滅菌蒸留水を用いる再構成によって、緩衝液または食塩水におけるFXポリペプチドをもたらすように、FXポリペプチドおよび塩などのような、さらなる構成成分を含有することができる。単位用量形態は、分割してまたはそれを複数にして投与することができる。複数用量形態は、分離した単位用量形態で投与されるように、単一の容器中に包装される複数の同一単位剤形である。複数用量形態の例は、バイアル、錠剤

もしくはカプセル剤のボトル、またはポイントもしくはガロンのボトルを含む。したがって、複数用量形態は、包装において分離されない複数の単位用量である。

【0388】

2. 修飾FXポリペプチドの投与

本明細書において提供されるFXチモーゲンまたはFXaポリペプチドを含む修飾FXポリペプチド（つまり活性化化合物）は、体液または他の組織試料などのような混合物を修飾FXポリペプチドと接触させることによって、インビトロ、エクスピボ、またはインビボにおいて投与することができる。たとえば、エクスピボにおいて化合物を投与する場合、対象からの体液または組織試料は、たとえばバイパス機械におけるチューブまたはフィルターなどのようなチューブまたはフィルター上にコーティングされているFXポリペプチドと接触させることができる。インビボにおいて投与される場合、活性化化合物は、液体形態、半液体形態、または固体形態において、任意の適切な経路によって、たとえば経口的に、経鼻的に、経肺で、非経口的に、静脈内に、皮内に、皮下に、関節内に、槽内に眼内に、脳室内に、鞘内に、筋肉内に、腹腔内に、気管内に、または局所におよびその任意の2つまたはそれ以上の任意の組合せによって、投与することができ、投与のそれぞれの経路に適した様式において製剤される。修飾FXポリペプチドは、1回または2回、3回、4回、もしくは治療効果を達成するために必要とされる任意の回数などのように、1回よりも多く投与することができる複数回の投与は、任意の経路または経路の組合せを介して達成することができ、時間ごと（たとえば2時間ごと、3時間ごと、4時間ごと、またはそれ以上）、日ごと、週ごとまたは月ごとで投与することができる。

【0389】

投与に最も適した経路は、処置される疾患状態、たとえば出血障害の場所に依存して変わるであろう。一般に、FXポリペプチドは、静脈内ボーラス注射によって投与されるであろう。投与（注入）時間は、約1～10分または2～5分のような数分にわたってであり得る。他の例では、FXの望ましい血液レベルが、血漿レベルによって確かめられるように、活性剤の継続注入によって維持することができる。主治医は、毒性または骨髄、肝臓、もしくは腎臓の機能障害により、投薬量を下げるために、どのようにかついつ療法を終了させる、中断する、調整するかを知っているであろうということに留意されたい。反対に、主治医はまた、臨床応答が適当でない場合に、どのようにかついつ処置をより高度なレベルに調整するかをも知っているであろう（有毒な副作用防止する）。

【0390】

他の例では、出血障害の場所が、FX製剤が代替経路を介して投与されることを示してもよい。たとえば、脳の中への（たとえば脳室内）投与を含む局所的投与は、患者がこの領域における出血を経験している場合、実行されてもよい。同様に、関節における出血の処置のために、関節への治療剤の注射による局所的投与（つまり関節内手段、静脈内手段、または皮下手段）を利用することができる。他の例では、たとえば、クリーム、ゲル、もしくは軟膏剤として製剤された、皮膚への治療剤の局所投与または吸入によるまたは気管内の肺への投与が、出血がこれらのエリアに局在化している場合、適切であってもよい。

【0391】

修飾FXポリペプチドがデポー調製物として製剤される場合、長時間作用性製剤は、植え込み（たとえば皮下にもしくは筋肉内に）または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、たとえば、治療化合物は、適したポリマー物質もしくは疎水性物質（たとえば許容可能な油中の乳剤として）またはイオン置換樹脂と共にまたはわずかに可溶性の誘導体として、たとえばわずかに可溶性の塩として製剤することができる。

【0392】

組成物は、所望の場合、活性成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含有することができる包装、キット、またはディスペンサーデバイスにおいて提供することができる。包装は、たとえば、ブリスターパック等の金属箔またはプラスチック箔を含有する。パックまたはディスペンサーデバイスは、投与のための説明書を添付することができる。活性

剤を含有する組成物は、包装材料、本明細書において提供される作用物質、および作用物質が提供される障害を示すラベルを含有する製品として包装することができる。

【0393】

3. 修飾FXポリペプチドをコードする核酸の投与（遺伝子療法）

修飾FXポリペプチドをコードする核酸分子および遺伝子療法に適したそれらをコードする発現ベクターの組成物もまた、提供される。タンパク質を送達するのではなく、全身的もしくは他の経路などによりインビボにおいてまたはリンパ球を含む細胞の除去、その中への核酸の導入、および宿主もしくは適合性のあるレシピエントへの再導入などによりエクスピボにおいて核酸を投与することができる。

【0394】

修飾FXポリペプチドは、核酸分子の発現によって細胞および組織に送達することができる。修飾FXポリペプチドは、修飾FXポリペプチドをコードする核酸分子として投与ことができ、エクスピボ技術および直接的インビボ発現を含む。核酸は、当業者らに知られている任意の方法によって細胞および組織に送達することができる。単離核酸配列は、さらなる操作のためにベクターの中に組み込むことができる。本明細書において使用されるように、ベクター（またはプラスミド）は、その発現または複製のいずれかのために細胞の中に異種DNAを導入するために使用される別個のエLEMENTを指す。そのような媒体の選択および使用は、当業者の技術の範囲内に十分にある。

【0395】

コード核酸分子の発現による修飾FXポリペプチドの投与のための方法は、組換えベクターの投与を含む。ベクターは、複製の起点の包含などによりエピソードのままとなるように設計することができるまたは細胞における染色体の中に統合するよう設計することができる。修飾FXポリペプチドはまた、非ウイルス性ベクターを使用して、エクスピボ遺伝子発現療法において使用することができる。たとえば、細胞は、修飾FXポリペプチドコード核酸をゲノムの場所の中に統合し、調節配列に作動可能に連結されるまたは結果として、それが、ゲノムの場所における調節配列に作動可能に連結されて配置されることなどによって、修飾FXポリペプチドを発現するように操作することができる。次いで、そのような細胞は、処置を必要とする患者などのような対象に局所的にまたは全身的に投与することができる。

【0396】

ウイルス性ベクターは、たとえばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、および遺伝子療法のために設計される他のものを含み、利用することができる。ベクターは、エピソードのままとすることができるまたは処置される対象の染色体の中に統合することができる。修飾FXポリペプチドは、ウイルスによって発現させることができ、修飾FXポリペプチドは、処置を必要とする対象に投与される。遺伝子療法に適したウイルス性ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、および上記に述べられている他のものを含む。たとえば、アデノウイルス発現技術は、当技術分野においてよく知られており、アデノウイルス産生および投与方法もまた、よく知られている。アデノウイルス血清型は、たとえばAmerican Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) から利用可能である。アデノウイルスは、エクスピボにおいて使用することができる、たとえば、細胞は、処置を必要とする患者から単離され、修飾FXポリペプチド発現アデノウイルスベクターを用いて形質導入される。適した培養期間の後、形質導入された細胞は、対象に局所的小および／または全身的に投与される。代わりに、修飾FXポリペプチド発現アデノウイルス粒子は、単離され、対象の疾患または状態を予防する、処置する、または回復させるために、治療有効量のデリバリーのために、薬学的に許容可能な担体において製剤される。典型的に、アデノウイルス粒子は、対象体重1キログラム当たり1個の粒子から 10^1 個の粒子の範囲、一般に、対象体重1キログラム当たり 10^6 個または 10^8 個の粒子から 10^{12} 個の粒子の間の用量で送達される。

10

20

30

40

50

【0397】

いくつかの場面において、細胞表面膜タンパク質もしくは標的細胞に特異的な抗体または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどのような、細胞を標的にする作用物質と共に核酸源を提供することが望ましい。FXはまた、デリバリーのために、特定の細胞型の中に向けることもできる。たとえば、FXポリペプチドをコードするアデノウイルスベクターは、肝細胞などのような非分裂細胞における安定した発現に使用することができる (Marg aritisら (2004) J Clin Invest 113:1025-1031)。他の例では、FXポリペプチドをコードするウイルス性ベクターまたは非ウイルス性ベクターが、続くデリバリーのために、単離細胞の中に形質導入することができる。FXの発現およびデリバリーのためのさらなる細胞型は、線維芽細胞および内皮細胞を含むが、これらに限定されない。

10

【0398】

核酸分子は、人工染色体および他の非ウイルス性ベクターの中に導入することができる。ACESなどのような人工染色体 (Lindenbaumら (2004) Nucleic Acids Res. 32(21): e172を参照されたい) は、アイソフォームをコードし、発現するように操作することができる。手短かに言えば、哺乳動物人工染色体 (MAC) は、細胞の中に大きなペイロードの遺伝子情報を自律複製非統合方式において導入するための手段を提供する。MACの中で特有に、哺乳動物サテライトDNAベースの人工染色体発現 (ACE) は、異なる種の細胞株において再現性よくデノボ生成され、宿主細胞の染色体から容易に精製することができる。次いで、精製された哺乳動物ACEは、様々なレシピエント細胞株に再導入することができ、ACEは、長期間、選択圧の非存在下においてACE系を使用して安定して維持される。このアプローチを使用して、1つまたは2つの遺伝子標的を特異的に積むことがLMTK (-) およびCHO細胞中で達成された。

20

【0399】

修飾FXポリペプチドをコードする核酸を導入する他の方法は、酵母における2工程遺伝子置換技術であり、酵母人工染色体 (YAC) においてクローニングされる完全アデノウイルスゲノム [Ad2; Ketnerら (1994) PNAS 91: 6186-6190] ならびにYACクローンにおける特異的な領域を標的とするためのアデノウイルス配列、関心のある遺伝子のための発現カセット、ならびにポジティブ選択マーカーおよびネガティブ選択マーカーを含有するプラスミドを用いて始まる。YACは、より大きな遺伝子の組み込みを可能にするので、特に関心がある。このアプローチは、哺乳動物細胞または全動物に対する遺伝子移入のための、記載される修飾FXポリペプチドのいずれかをコードする核酸を運ぶ、アデノウイルスベースのベクターの構築に使用することができる。

30

【0400】

核酸は、リポソームなどのような媒体にカプセル化するまたは細菌細胞、特に弱毒化された細菌などのような細胞の中に導入するまたはウイルス性ベクターの中に導入することができる。たとえば、リポソームが利用される場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、たとえば、特定の細胞型に対して向性のカプシドタンパク質またはその断片、サイクリングにおいて内部移行を起こすタンパク質に対する抗体、および細胞内局在化を標的にし、細胞内半減期を増強させるタンパク質が、ターゲティングのためにおよび／または取り込みを容易にするために使用することができる。

40

【0401】

エクスピボおよびインピボにおける方法については、修飾FXポリペプチドをコードする核酸分子は、処置されることとなる、適したドナーまたは対象からの細胞の中に導入される。療法の目的のために核酸を導入することができる細胞は、たとえば、処置されることとなる疾患または状態に適切な任意の所望の利用可能な細胞型を含み、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などのような血球; 様々な幹細胞または前駆細胞、特にたとえば、骨髓、臍帯血、末梢血、胎児肝臓、およびそれらの他の源から得られる幹細胞などのような造血幹細胞または造血前駆細胞を含むが、これらに限定されない。

50

【0402】

エクスピボ処置については、処置されることとなる対象と適合性のあるドナーに由来する細胞または処置されることとなる対象からの細胞は、除去され、核酸は、これらの単離細胞の中に導入され、修飾細胞は、対象に投与される。処置は、たとえば患者の中に植え込まれる多孔質膜内にカプセル化されるものなどのように、直接的投与を含む（たとえば、それぞれ、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第4,892,538号および第5,283,187号を参照されたい）。インビトロにおける哺乳動物細胞の中への核酸の移入に適した技術は、リボソームならびにカチオン脂質（たとえばDOTMA、DOPE、およびDC-Chol）の使用、電気穿孔法、微量注射法、細胞融合法、DEAE-デキストラン法、ならびにリン酸カルシウム沈降法を含む。DNAデリバリーの方法は、インビボにおいて修飾FXポリペプチドを発現させるために使用することができる。そのような方法は、電気穿孔、超音波、およびリン酸カルシウムデリバリーの使用などのように、局所的小および全身的なデリバリーを含む、核酸のリボソームデリバリーおよび裸のDNAのデリバリーを含む。他の技術は、微量注射、細胞融合、染色体媒介性遺伝子移入、マイクロセル媒介性遺伝子移入、およびスフェロプラスト融合を含む。

10

【0403】

修飾FXポリペプチドのインビボ発現は、さらなる分子の発現に連結させることができる。たとえば、修飾FXポリペプチドの発現は、操作されたウイルスなどにおいて、細胞毒性産物の発現と連結することができるまたは細胞毒性ウイルスにおいて発現させることができる。そのようなウイルスは、治療的效果のために標的とされる特定の細胞型を標的にすることができる。発現修飾FXポリペプチドは、ウイルスの細胞毒性を増強させるように使用することができる。

20

【0404】

修飾FXポリペプチドのインビボ発現は、細胞特異的プロモーターまたは組織特異的プロモーターなどのような特異的な調節配列に、修飾FXポリペプチドコード核酸分子を作動可能に連結することを含むことができる。修飾FXポリペプチドはまた、とりわけ標的細胞型および／または標的組織において感染するおよび／または複製するベクターから発現することができる。誘発性プロモーターは、修飾FXポリペプチド発現を選択的に調節するために使用することができる。例示的な調節可能な発現系は、ドキシサイクリン誘発性遺伝子発現系であり、これは、組換えFX発現を調節するために使用されてきた（Sroufら（2003）Thromb. Haemost. 90(3):398-405）。

30

【0405】

核酸分子は、裸の核酸としてまたはベクター、人工染色体、リボソーム、および他の媒体において、全身投与、局所経路、局所的経路、および投与の他の経路によって対象に投与することができる。全身およびインビボにおけるものである場合、核酸分子または核酸分子を含有する媒体は、細胞を標的にすることができる。

【0406】

投与はまた、細胞または組織を典型的に標的にするベクターまたは細胞の投与などによって直接的なものとするすることができる。たとえば、腫瘍細胞および増殖は、修飾FXポリペプチドのインビボ発現についての標的細胞となり得る。修飾FXポリペプチドのインビボ発現に使用される細胞はまた、患者にとって自己となる細胞をも含む。そのような細胞は、患者から取り出され、修飾FXポリペプチドの発現のための核酸を、導入し、次いで、注射または植え付けなどによって患者に投与することができる。

40

【0407】

H. 治療上の使用

本明細書で提供される修飾されたFX/FXaポリペプチドは、FXチモゲンまたはFXaが用いられる様々な治療法と共に診断方法において用いることができる。かかる方法として、下に記載および収載する生理的および医学的状態の処置方法が挙げられるがこれらに限定されない。典型的には、かかる処置は、止血性応答の増加等、凝固の増加が望

50

まれる処置を包含する。例えば、本明細書で提供される修飾されたポリペプチドは、例えば、血友病患者において生じる出血障害の処置において用いることができる。FX/FXaポリペプチドは、凝固経路におけるその中心的役割のため、限定されないが血友病A（第VII因子欠損症）、血友病B（第IX因子欠損症）または血友病C（第XI因子欠損症）を包含する患者の凝固因子欠損症の処置に特に適しており、これにより欠損因子の要求をバイパスする。本明細書で提供される修飾されたポリペプチドは、外科手術または他の外傷と併せて用いることもできる。

【0408】

本明細書における方法において、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドのいずれかのFXチモーゲンもしくはFXa型またはこれらの触媒活性断片のいずれかを、対象に投与することができる。本明細書で提供される修飾されたポリペプチドは、治療活性を保持するが、修飾された特性、特に、補助因子依存性の増加、触媒活性の増加、基質親和性の増加、グリコシル化の変更および／またはAT-IIIに対する抵抗性の増加を提示するよう設計される。かかる修飾された特性は、例えば、補助因子の存在下に限定される修飾されたFX/FXaポリペプチドの凝固活性の増加により、ポリペプチドの治療上の有効性を改善することができる。変更された特性は、半減期の増加をもたらすこともできる。本明細書で提供される修飾されたFX/FXaポリペプチドは、野生型FX/FXaと比較して、同じ効果を達成するためのより低い投薬量を包含する、インビボ活性および治療効果の改善と、より少ないおよび／または低頻度の投与、副作用の減少ならびに治療効果の増加等、投与および処置における他の改善を提示することができる。

【0409】

例えば、実用上の限定は、血液障害の処置のためのバイパス戦略としての、無修飾のFXaポリペプチドを包含するFXaポリペプチドの臨床用途を制限した。例えば、循環する無修飾のFXaは、内在性の循環するプロテアーゼ阻害因子により急速に不活性化され、20～40時間の生物学的FX半減期[Robertsら, (1965) Thromb Diath Haemorrh. 13:305-313]を1～2分間未満に[Gitelら, (1984) J Biol Chem. 259:6890-6895]低下させる。加えて、凝固の病的活性化は、単独のまたは医薬組成物におけるFXaポリペプチドの投与に対する懸念である[Gitelら, (1984) J Biol Chem. 259:6890-6895; Lechler (1999) Thromb Res. 95(Suppl. 1):S39-S50]。これは、FXaポリペプチドの投与を用いて、播種性血管内凝固(DIC)の動物モデルを作製することができるという事実によって証明される[Kruihofら, (1997) Thrombosis and Haemostasis. 77(2):308-311; Gilesら, (1984) J Clin Invest. 74:2219-2225]。

【0410】

本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドは、FXaポリペプチドの臨床用途の限定に取り組むために修飾された。FXポリペプチド投与による過剰な凝血を防止するために、本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドは、FXa型の補助因子依存性の増加（実施例4を参照）を提示するよう修飾されており、活性化された補助因子FVaが存在しない限り、FXaポリペプチドが最小活性から活性なしを提示するように、修飾されたFXaポリペプチド活性を制限する。FVa利用能および会合に基づく修飾されたFXaポリペプチド活性の限定は、無修飾のFXaポリペプチド処置に関連する血栓症リスクを低下または排除する。重要なことに、しかし、FVaの存在下では、本明細書に記載されている修飾されたFXaポリペプチドは、正常な、場合によっては、正常を超える触媒活性を実証する。本明細書に記載されている修飾されたFXaポリペプチドの補助因子依存性の増加が、望まれない凝血を低下または排除しつつ、本明細書における修飾されたFXaポリペプチドを包含する修飾されたFXポリペプチドは、無修飾のFXaポリペプチドと比較して、血清半減期の改善、阻害因子に対する抵抗性の増加、触媒活性の増加および／または凝固活性の増加等、薬物動態および薬力学特性の改善を提示することができる。

【0411】

一部の例において、FXチモーゲンまたはFXa型を包含するFXポリペプチドの処置

方法は、持続的な治療効果を引き起こすために、作用のより長い持続時間を必要とする。これは、血友病患者および他の先天性または慢性出血障害の処置に特に当てはまる。本明細書の他の箇所でも記述されている通り、FXaの半減期は、一部には、AT-III等の阻害因子による阻害のために、40時間未満である。AT-III抵抗性を提示する、および／または非天然グリコシル化部位の導入により高グリコシル化されている、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、半減期の増加を提示することができる。よって、本明細書に記載されているかかる修飾されたFXポリペプチドを用いて、凝血障害のためのより長く持続する治療法を送達することができる。

【0412】

特に、修飾されたFX/FXaポリペプチドは、処置のためにFX/FXaを用いることのできる治療方法における使用のために企図されている。典型的には、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、凝血原であり、先天性出血障害および後天性出血障害を包含する出血障害の処置に用いることができる。例示的な疾患および障害は、血液凝固障害、血液障害、出血性障害、血友病、凝固因子欠損症、ならびに外傷および外科手術に関連する出血を包含する後天性血液障害等が挙げられるがこれらに限定されない。一部の例において、FX/FXaポリペプチドにより処置する出血は、脳、内耳領域、眼、肝臓、肺、腫瘍組織、胃腸管等、臓器において生じる。他の実施形態において、出血は、出血性胃炎および分娩後女性等における大量子宮出血等における、びまん性である。

【0413】

例えば、血友病AおよびB等、出血障害の患者は、多くの場合、外科手術または外傷における出血合併症のリスクがある。かかる出血は、急性関節血症（関節における出血）、慢性血友病性関節症、血腫（例えば、筋肉、後腹膜、舌下および咽頭後）、血尿（腎臓の管からの出血）、中枢神経系出血、胃腸出血（例えば、UGI出血）および大脳大出血として顕在化され得、これはまた、修飾されたFX/FXaポリペプチドにより処置することができる。その上、外科手術（例えば、肝切除）または抜歯等、外傷に関連するいずれかの出血は、修飾されたFX/FXaポリペプチドにより処置することができる。

【0414】

修飾されたFX/FXaポリペプチドによる疾患および状態の処置は、本明細書に記載されている適した製剤を用いて、限定されないが、注射、経肺、経口および経皮投与を包含するいずれかの適した投与経路により引き起こすことができる。処置は、典型的には、静脈内ボラス投与により引き起こされる。

【0415】

必要であれば、特定の投薬量および持続時間および処置プロトコールは、経験的に決定または外挿することができる。野生型または無修飾のFXチモーゲンまたはFXaポリペプチドの投薬量は、修飾されたFXチモーゲンまたはFXaポリペプチドの投薬量を決定するためのガイダンスとして用いることができる。修飾されたFXチモーゲンまたはFXaポリペプチドの投薬量は、関連する動物試験から決定または外挿することもできる。無修飾のFX/FXaと比較した修飾されたFX/FXaの活性のレベルおよび半減期等の因子は、かかる決定を行う際に用いることができる。特定の投薬量およびレジメンは、種々の因子に基づき経験的に決定することができる。かかる因子は、個体の体重、総体的健康、年齢、用いた特異的化合物の活性、性別、食事、投与時間、排泄率、薬物組み合わせ、疾患の重症度および経過ならびに疾患に対する患者の素質ならびに処置する医師の判断を包含する。活性成分、ポリペプチドは、典型的には、医薬品として有効な担体と組み合わせられる。担体材料と組み合わせる単一剤形または複数剤形を産生することができる活性成分の量は、処置されている宿主および特定の投与様式に応じて変動し得る。

【0416】

一部の例において、修飾されたFXポリペプチドの不活性チモーゲン型は、病的出血を制御するために投与することができる。例えば、FXポリペプチドは、約50～800ユニット/mlの投薬量で投与することができ、FXチモーゲンの比活性は、約20～130ユニット/mgタンパク質である（米国特許第4,501,731号）。修飾されたF

10

20

30

40

50

Xポリペプチドのチモーゲン型が投与される場合、内在性テナーゼ複合体が、投与されたFXチモーゲンを切断して、治療活性を付与する活性化FX (FXa) とする。

【0417】

一部の例において、本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドは、活性化FX型 (FXa) における病的出血を制御するために投与することができる。例えば、精製されたFXポリペプチドは、実施例2Bに記載されている通り精製の最中等、インビトロにおいて投与前に、ラッセルクサリヘビ毒FX活性化因子 (Haematologic Technologies) または他の凝固因子により活性化することができる。チモーゲン様活性を提示するよう修飾された、本明細書で提供される修飾されたFXaポリペプチドは、約10~250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間等、10~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間、一般に、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等、10~75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間の投薬量で投与することができる (例えば、米国特許出願公開第20090175931号を参照)。

10

【0418】

他の例において、本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドは、治療組成物、例えば、直接的なFX活性化因子を含有するまたは含有しない組成物の一部として投与することができる。例えば、治療組成物は、第II因子および/またはプロトロンビン等、テナーゼ複合体の一部を形成しない他の凝固因子を含有することができる。別の例において、修飾されたFXポリペプチドは、FVIIまたはFVIIa; FIXまたはFIXa等、活性またはチモーゲン型のFX活性化酵素を含有してもよい治療組成物において提供することができる。FXポリペプチドは、例えば、10:1の比で活性化第VII因子 (FVIIa) と組み合わせて、阻害因子による血友病患者に投与することができる [Shirahataら, (2012) Haemophilia 18:94-101]。別の例において、0.58 IU/ml

20

FXおよび0.29 IU/ml FIXを含有する治療用濃縮製剤を用いて、抗凝固薬の過量投与により誘導される凝固障害を処置することができる [Olesenら, (2009) J. Thrombosis and Haemostasis 7(S2):Abstract No. PP-M0-386]。他の例において、修飾されたプロトロンビン複合体濃縮製剤は、修飾されたFXポリペプチドならびに凝血因子II、VIIおよびIXと共にプロテインCおよびプロテインSを用いて生成することができる。

【0419】

血液の凝血時間におけるFX/FXaポリペプチドの効果は、限定されないが、全血プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)、活性化凝血時間 (ACT)、再石灰化活性化凝血時間またはLee-White凝血時間を包含する、本技術分野において公知の凝血検査のいずれかを用いてモニターすることができる。

30

【0420】

患者の状態が改善したら、必要であれば、化合物または組成物の維持用量を投与することができ、投薬量、剤形もしくは投与頻度またはこれらの組み合わせを修飾することができる。場合によっては、対象は、疾患症状が再発したら、または予定される投薬量に基づき、長期基盤における間欠的処置を要求することができる。他の場合において、大出血、外傷または外科手技等、急性事象に応答して、追加的な投与を要求することができる。

【0421】

修飾されたFX/FXaポリペプチドは、単独でまたは他の薬剤と組み合わせて治療活性を有する。このセクションは、例示的な使用および投与方法を提供する。このような記載されている治療法は、例示的なものであり、修飾されたFX/FXaポリペプチドの適用を限定しない。以下は、FX/FXaを単独でまたは他の薬剤と組み合わせて処置薬剤として用いることができる、いくつかの例示的な状態である。

40

【0422】

1. 先天性出血障害

本明細書に記載されているもの等、修飾されたFXチモーゲンおよびFXaポリペプチドを用いて、先天性出血障害を処置することができる。例えば、FXおよびFXaポリペプチドを用いて、内因性または外因性凝固経路のいずれかにおけるいずれかの凝固因子を

50

バイパスし、その欠損による凝固障害を処置することができる。先天性凝固因子欠損症に起因する出血障害は、血友病A（第V I I I因子欠損症）；血友病B（第I X因子欠損症）；血友病C（第X I因子欠損症）；第V I I因子欠損症；第X因子欠損症；第X I I因子欠損症；ならびにI、I I、I V、VおよびV I型家族性多発性凝固因子欠損症（F M F D）を包含する〔Roberts, HR and MD Bingham, “Other Coagulation Factor Deficiencies,” Thrombosis and Hemorrhage, 2nd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802を参照〕。修飾されたF X／F X aポリペプチドは、限定されないが、フォン・ヴィルブラント病、遺伝性血小板障害（例えば、チェディアック・東およびヘルマンスキー・パドラック症候群等、貯蔵プール疾患、トロンボキサンA 2機能不全、グランツマン血小板無力症ならびにベルナール・スーリエ症候群）およびランデュ・オスラー・ウェーバー症候群としても公知の遺伝性出血性毛細血管拡張症（Telangiectasia）等の追加的な先天性出血疾患および障害の処置において用いることもできる。

10

【0423】

a. 血友病

本明細書に記載されているもの等、修飾されたF XチモーゲンおよびF X aポリペプチドを用いて、血友病等、先天性出血障害を処置することができる。血友病は、1種または複数の血液凝固因子における欠損に起因する出血障害である。これは、組織損傷部位において血餅を形成する能力の減少によって特徴付けられる。先天性X連鎖血友病は、血友病Aおよび血友病Bを包含し、これらは、それぞれF V I I IおよびF I Xに欠損をもたらす突然変異（複数可）に起因する。血友病Aは、10,000名の男性に1名の比率で発生し、一方、血友病Bは、50,000名の男性につき1名に発生する。血友病AおよびBは、軽度、中等度または重度としてさらに分類される。血漿レベル5%～25%の正常に機能する第V I I IまたはI X因子は軽度、1%～5%は中等度、1%未満は重度として分類される。多くの場合F X I欠損症と称される血友病Cは、相対的に軽度の、稀な常染色体劣性遺伝疾患であり、100000名につき約1名に影響を及ぼす。

20

【0424】

血友病の患者は、自発的または外傷に応答したものとなり得る、反復性の関節および筋肉出血を患う。出血は、重度急性疼痛の原因となり、移動を制限し、滑膜肥大化を包含する続発性合併症をもたらす。さらに、関節における反復性の出血は、関節損傷の原因となり、滑膜、軟骨および骨を破壊し得る、慢性滑膜炎の原因となり得る。出血は、一般に、新鮮凍結血漿（F F P）の輸血、F X I補充療法により処置されるか、または外部の創傷または抜歯の処置等、外用処置のために、フィブリン糊により処置される。血友病AまたはBのために最も一般的な処置は、患者にF V I I IまたはF I Xが投与される補充療法である。製剤は、血漿由来または組換え産物として商業的に入手でき、組換えタンパク質は、現在、以前には処置されなかった患者における最適な処置である。これらの治療法は、大いに成功を収め得るが、患者が、新たに投与された第V I I I因子または第I X因子に対する阻害因子を発生させる場合、合併症が生じる。

30

【0425】

阻害因子は、F V I I IまたはF I Xと反応し、凝血原機能に干渉する、大部分はI g G 4サブクラスのI g G抗体である。阻害因子は、5名の重度血友病A患者につき約1名に影響を及ぼす。大部分の対象は、多くの場合小児期初期である第V I I I因子の最初の注入の投与直後にこれらの阻害因子を発生させるが、対象は、阻害因子を後年に発生させる。阻害因子はまた、軽度または中等度血友病Aの15名につき約1名に影響を及ぼす。これらの阻害因子は通常、成人期に発生し、投与された外因性F V I I Iを破壊するだけでなく、内在性F V I I Iも破壊する。その結果、軽度および中等度血友病は、重度となる。臨床的には、阻害因子を有する血友病A患者は、F V I I Iに再曝露されたときに経験する既往性応答の強度に従って高および低レスポnderに分類される。阻害因子は、100名の血友病B患者につき約1名に影響を及ぼす。殆どの場合、阻害因子は、治療用第I X因子の最初の注入後に発生し、アレルギー反応を伴い得る。

40

【0426】

50

本明細書で提供される修飾されたF XチモーゲンおよびF X aポリペプチドならびに本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドをコードする核酸は、阻害因子を有する血友病患者を包含する血友病患者のための治療法において普遍的に用いることができ、血友病に関連する出血状態の処置に用いることができる。本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドを用いて、例えば、F V I I I aおよび／またはF I X aの必要をバイパスしつつトロンビン生成を増強することにより、自発的出血エピソードを制御もしくは防止するか、または外傷もしくは外科手技に応答した出血を制御もしくは防止することができる。

【0427】

修飾されたF Xポリペプチドは、例えば、動物モデルを用いることにより、治療上の有効性に関して検査することができる。例えば、F V I I IまたはF I X欠損マウス、抗体誘導性血友病性マウスまたは他のいずれか公知の血友病の疾患モデルは、修飾されたF Xポリペプチドにより処置することができる。疾患症状および表現型の進行をモニターして、修飾されたF Xポリペプチドの効果を査定する。修飾されたF Xポリペプチドは、臨床治験等において、動物モデルや対象に投与して、プラセボ対照および／または無修飾のF Xポリペプチドを用いた対照と比較したインビボ有効性を査定することもできる。

【0428】

b. 他の凝固因子欠損症

本明細書に記載されているもの等、修飾されたF XチモーゲンおよびF X aポリペプチドを用いて、F V I I IおよびF I X以外の凝固因子における欠損に起因する凝固障害の患者を処置することもできる。例えば、F Xポリペプチドを用いて、第V I I因子欠損症、第X因子欠損症、第X I I I因子欠損症ならびにI I、I V、VおよびV I型家族性多発性凝固因子欠損症（F M F D）の患者を処置することができる（Roberts, HR and MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," Thrombosis and Hemorrhage, 2nd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802を参照）。

【0429】

i. 第V I I因子欠損症

本明細書に記載されているもの等、修飾されたF XチモーゲンおよびF X aポリペプチドは、第V I I因子欠損症の対象または患者において用いることができる。第V I I因子欠損症は、500,000名につきおよそ1名に影響を及ぼす常染色体劣性遺伝出血障害である。F V I I欠損症は、臨床的に軽度、中等度または重度となることができ、軽度から中等度欠損症は、外科手術および外傷後の出血の増加によって特徴付けられる。重度F V I I欠損症（1%未満のF V I I活性）の患者は、血友病と類似の症状を経験する。例えば、F V I I欠損症対象は、関節出血、関節出血、自発的鼻出血、胃腸出血、尿路出血する傾向がある。脳内出血および筋肉出血も報告されている一方、女性は、重度月経過多（重い月経性出血）を経験し得る。処置は、血漿、P C Cおよび組換えF V I I aを用いた補充療法により行うことができる [Hednerら, (1993) Transfusion Med Rev, 7:78-83; 米国特許出願公開第2009-0291890号明細書]。本明細書に記載されている修飾されたF Xポリペプチドは、凝固経路においてF V I Iの下流で作用し、よって、F V I I欠損症患者における出血エピソードの処置および外科的介入または観血的手技における出血の防止において用いることができる。修飾されたF Xポリペプチドは、チモーゲン型または活性化F X（F X a）ポリペプチドとして投与することができる。

【0430】

i i. 第X因子欠損症

本明細書に記載されているもの等、修飾されたF XチモーゲンおよびF X aポリペプチドは、第X因子欠損症の対象または患者において用いることができる。第X因子欠損症は、1,000,000名に1名の発生率による稀な常染色体劣性遺伝出血障害である。第X因子欠損症は、臨床的に軽度（6~10 IU/dL）から重度（<1 IU/dLまたは正常F X活性の<1%）に及ぶ可変的な出血表現型を呈する。正常の10~15%の第X因子活性を有する個体は、限定的な自発的出血を経験し、大出血は、外科手術または外傷

10

20

30

40

50

との関連においてのみ生じる [Peyvandiら, (1998) Br J Haematol. 102:626-628; Uprichard, J and DJ Perry, (2002) Blood Reviews. 16:97-110; Roberts, HR and MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," Thrombosis and Hemorrhage, 2nd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802]。FX欠損症患者が、鼻出血を経験することはよくあり、影響を受ける女性の50%は、月経過多を提示する。重度症例の患者において、関節血症、重度術後大出血および中枢神経系大出血も報告されている。

【0431】

現在、第X因子欠損症の補充処置は、血液 [Girolamiら (1970) Thromb Diath Haemorrh 24(1):175-184]、新鮮凍結血漿 (FFP) [Girolamiら, (1970) Br J Haematol 19(2):179-192] および併用 (combination) 療法、例えば、因子を含有するプロトロンビナーゼ複合体濃縮製剤 (PCC) [Lechler, E (1999) Thromb Res 95(Suppl 1):S39-S50] に限定されている。FXを含有する併用療法は、セクションIにさらに記載されている。FXポリペプチド投与は、現在利用できない。本明細書に記載されている修飾されたFXaポリペプチドを用いて、FX欠損症患者における出血エピソードを処置し、外科的介入または観血的手技における出血を防止することができる。

【0432】

i i i . 家族性多発性凝固因子欠損症

本明細書に記載されているもの等、修飾されたFXチモーゲンおよびFXaポリペプチドを用いて、家族性多発性凝固因子欠損症 (FMFD) と呼ばれる、遺伝する多発性凝固因子欠損に起因する凝固障害の患者を処置することもできる。いずれの因子が影響を受けるかに基づいて分類される、6型のFMFDが存在する。I型FMFDは、第VおよびVII因子における欠損に起因し、II型FMFDは、第VIIおよびIX因子における欠損に起因し、III型FMFDの患者は、ビタミンK依存性凝固因子 (即ち、第II、VII、IXおよびX因子) を欠損し、IV型FMFDは、第VIIおよびVIII因子における欠損に起因し、第VIII、IXおよびX因子における欠損は、V型FMFDをもたらす、第IXおよびXI因子における欠損は、VI型FMFDとして分類される。FMFD、IIおよびIV型は、凝固経路におけるFX上流の凝固因子に欠損を含有し、よって、単独のまたは他の処置と組み合わせた、本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドによる処置から恩恵を得ることができる。本明細書に記載されているFXポリペプチドを用いて、通常、併用療法の一部として、他の型のFMFDを処置することもできる。FMFDのうち、I型およびIII型のみが、広範に特徴付けられている。

【0433】

III型FMFDの臨床的顕在化は、因子欠損または機能不全の程度に応じて、無症状から重度大出血に及ぶ。FII、FVII、FIXおよびFXの合成におけるカルボキシ化工程の欠陥をもたらす、ガンマグルタミルカルボキシラーゼおよびビタミンKエポキシド還元酵素複合体の欠陥は、これら4因子の欠損の組み合わせを産生し得る [Brennerら, (1998) Blood. 92:4554-4559; Oldenburgら, (2000) Thromb Haemost. 84:937-941]。III型FMFDは、常染色体劣性遺伝様式で遺伝する。III型FMFDの一部の個体は、大用量のビタミンKに応答性である [Goldsmithら, (1982) J Clin Invest. 69:1253-1260]。しかし、出血エピソードの処置は、欠損因子を置き換える治療法を必要とする (Roberts, HR and MD Bingham, "Other Coagulation Factor Deficiencies," Thrombosis and Hemorrhage, 2nd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998: 773-802)。よって、本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドは、一部の型のFMFDのための処置レジメンの一部として用いることができる。

【0434】

c. その他

他の先天性出血障害は、本明細書で提供されるFXチモーゲンまたはFXaポリペプチドを包含するFXポリペプチドにより処置して、凝固を促進することができる。フォン・ヴィルブランド病 (vWD) に関連する、自発的および外科手術関連の出血エピソードは

、本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドを用いて処置することができる。vWDは、凝血タンパク質、フォン・ウィルブランド因子(vWF)の欠陥または欠損が原因の出血障害であり、集団の1%~2%において生じると推定される。vWDの対象は、容易に挫傷し、反復性の鼻出血をし、抜歯、扁桃摘出術または他の外科手術後に出血し、女性患者は、月経性出血が増加し得る。修飾されたFXポリペプチドを用いて、vWD患者における自発的および外科手術関連の出血を寛解させることができる。

【0435】

例えば、グランツマン血小板無力症およびヘルマンスキー・パドラック症候群等、他の血小板関連の出血障害も、内在性凝血活性の低下に関連する。血小板関連の出血障害の患者における過剰な自発的または外科手術関連の出血も、治療量の修飾されたFXポリペプチドによって制御することができる。例えば、外科手術を受けているグランツマン血小板無力症の患者は、外科手術の前、最中および／または後に、修飾されたFXポリペプチドにより処置して、大量失血を防止することができる。修飾されたFXポリペプチドは、不活性チモーゲン型でまたは活性化FX(FXa)ポリペプチドとして投与することができる。

10

【0436】

2. 後天性出血障害

出血障害は、先天性ではなく後天性であってもよい。本明細書に記載されているもの等、修飾されたFXチモーゲンおよびFXaポリペプチドを用いて、後天性出血障害を処置することもできる。後天性出血障害は、外科手技の結果としての凝固障害、薬物誘導性の凝固障害、例えば、化学療法レジメンによる血小板減少症を包含する。一例において、修飾されたFXポリペプチドは、抗凝固療法の過量投与に対する解毒薬として用いることができる(米国特許出願公開第2011/0015128号)。修飾されたFXポリペプチドを用いて、肝臓疾患、ビタミンK欠損症の結果としての後天性第X因子欠損症等、後天性凝固因子欠損症を処置することもできる。修飾されたFX処置から恩恵を受けることのできる他の後天性出血障害は、溶血性尿毒症症候群、アレルギー性紫斑病(ヘノッホ・シェーライン紫斑病)および播種性血管内凝固(DIC)を包含する。

20

【0437】

一例において、修飾されたFX/FXaポリペプチドを用いて、対象における外傷もしくは外科手術による出血エピソードまたは低められた血小板の数値もしくは活性を処置することができる。例えば、例えば輸血の結果としての血液希釈凝固障害または外傷後の急性外傷性凝固障害は、修飾されたFX/FXaポリペプチドにより処置することができる。外科手術を受けている患者のための例示的な方法は、大出血を防止するための処置と、限定されないが、心臓外科手術、血管形成、肺外科手術、腹部外科手術、脊髄外科手術、脳外科手術、血管外科手術、歯科外科手術または骨髄、心臓、肺、脾臓もしくは肝臓の移植を包含する臓器移植外科手術等の外科手術の前、最中または後の処置とを包含する。

30

【0438】

a. 化学療法一後天性血小板減少症

白血病および他のがん等のための化学療法処置は、血小板減少症をもたらす得る。これは、化学療法を受けている患者の骨髄における血小板産生の減少によるものである可能性が高く、典型的には、薬物療法の6~10日後に起こる。後天性血小板減少症の処置は通常、血小板、赤血球細胞または血漿輸血によるものであり、これは、血小板欠損に起因し得るいずれかの異常な自発的出血の防止に役立つ。化学療法誘導性血小板減少症または他のいずれかの後天性もしくは先天性血小板減少症の患者における出血は、治療量の本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドの投与により制御することもできる。例えば、胃腸管等に制御できない出血を伴う血小板減少症患者に、治療量のFXポリペプチドの静脈内ボラス注射を投与して、大出血を止めることができる。修飾されたFXポリペプチドは、不活性チモーゲン型でまたは活性化FX(FXa)ポリペプチドとして投与することができる。

40

【0439】

50

b. 他の凝固障害

他の後天性凝固障害は、本明細書に提示されている修飾されたF Xポリペプチドを用いて処置することができる。凝固障害は、限定されないが、劇症肝不全[F H F；肝毒性(hepatotoxic)薬物、毒素、代謝疾患、感染性疾患および虚血等が原因]、硬変を包含する他の肝臓疾患およびウィルソン病に関連する疾患、ビタミンK欠損症(抗生物質処置または食事等が原因)、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少症(T T C)ならびに播種性血管内凝固障害(D I C)を包含する状態に起因し得る。従来の処置は、一般に、血漿、赤血球細胞(R B C)または血小板の輸血によってなされるが、不成功となり得る。

【0440】

一例において、修飾されたF Xポリペプチドは、観血的手技を受けているF H Fの患者に投与して、出血を防止することができる。新鮮凍結血漿(F F P)による従来の処置は多くの場合不成功であり、大量の血漿を必要とし、容量過負荷および全身浮腫(皮下結合組織への浮腫液の全身性浸潤)を生じ得る。例えば、肝臓生検または肝臓移植等、観血的外科手術の最中、前および／または後の静脈内ボラスによる治療量の修飾されたF Xポリペプチドによる処置は、F H F患者における出血を防止し、止血を確立することができる。患者を血液のP Tによりモニターして、処置の有効性を決定することができる。

10

【0441】

別の例において、F Xは、例えば、従来の輸血注入に応答しなかった、肝臓機能不全およびD I Cに関連する重度帝王切開後腹腔内出血等、凝固障害に関連する重度出血の患者に投与することができる。さらに、修飾されたF Xポリペプチドを用いて、新生児および小児科患者における凝固障害を処置することができる。本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、無修飾のF Xポリペプチドと比較して、凝固活性の増加のためのF V a依存性の増強と半減期の増加を提示し、したがって、例えば、より低用量で、低頻度で、より少ない有害反応により投与することができる。修飾されたF Xポリペプチドは、内在性酵素により活性化されるよう不活性チモーゲン型で、または活性化F X(F X a)ポリペプチドとして投与することができる。

20

【0442】

c. 移植—後天性出血

骨髄移植(B M T)および幹細胞移植(S C T)後の重度出血は、血小板の低下によって生じる、これらの手技に関連する相対的によく見られる生命に関わる合併症である。例えば、びまん性肺泡大出血(D A H)は、移植集団における推定発生率1～21%、死亡率60～100%の、B M Tの肺性合併症である。かかる出血エピソードの従来の処置は、副腎皮質ステロイド処置ならびに血漿、血小板および／またはR B Cの輸血を包含するが、これらの大部分は、全死亡率およそ50%で不成功に終わる[Hicksら(2002) Bone Marrow Transpl. 30:975-978]。副腎皮質ステロイドおよび／または血小板注入による同時的処置ありまたはなしによる、静脈内ボラスによるF Xの投与を行ってD A Hを処置し、止血を確立することができる。本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、無修飾のF Xポリペプチドと比較して、凝固活性の増加のためのF V a依存性の増強と半減期の増加を提示し、したがって、例えば、より低用量で、低頻度で、より少ない有害反応により投与することができる。修飾されたF Xポリペプチドは、内在性酵素により活性化されるよう不活性チモーゲン型で、または活性化F X(F X a)ポリペプチドとして投与することができる。

30

40

【0443】

d. 抗凝固薬治療誘導性の出血

血栓塞栓症等の状態の処置のために抗凝固療法を受けている患者は、ワルファリン、ヘパリン、フォンダパリヌクスおよびリバーロキサバン等、抗凝固薬の急性投与による出血エピソードを提示し得るか、またはかかる治療法の長期使用の結果として出血性障害を発症し得る。出血エピソードのための処置は、典型的に、ヘパリンを中和するためのビタミンK、血漿、外因性F I Xおよびプロタミン等、凝血原の投与を包含する。単独での、または医薬品製剤の一部としての外因性F Xの投与を行って、抗凝固薬の効果を中和し、P

50

T、a P T T および／または他の凝固マーカーを増加させ、止血を確立することもできる [Gruberら, 2008 Blood. 112:Abstract 3825]。本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドは、抗凝固薬処置による後天性出血障害の患者における出血エピソードを制御するための処置において用いることができる。修飾された F X ポリペプチドは、内在性酵素により活性化されるよう不活性チモーゲン型で、または活性化 F X (F X a) ポリペプチドとして投与することができる。より急速な処置のため、修飾されたポリペプチドは、一般に、活性化 F X (F X a) ポリペプチドとして投与される。

【0444】

e. 後天性血友病

第 V I I I 因子阻害因子は、それ以外の点では健康な個体において自発的に発生することがあり、「後天性血友病」として公知の状態をもたらす。後天性血友病は、年間発生率が百万名の集団につき 0.2～1.0 名の稀な状態である。自己抗体は、主に I g G 4 抗体であり、これは、F V I I I に結合すると、トロンビン切断、フォン・ヴィルブランド因子相互作用および／またはリン脂質結合に干渉することにより、F V I I I 活性を阻害する。これは、影響を受ける患者のおよそ 87% において生命に関わる大出血をもたらす。主に関節および筋肉において出血する遺伝性血友病の患者とは対照的に、一般的な出血部位は、皮膚、粘膜、筋肉および後腹膜である。後天性血友病は、活性化プロトロンビン複合体濃縮製剤または組換え活性化第 V I I 因子 [Novo Seven (登録商標)、Novo Nordisk] により処置して、出血エピソードを制御することができる。本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドは、凝固活性の増強を提示し、F V I I 補充療法の必要をバイパスする。修飾された F X ポリペプチドは、内在性酵素により活性化されるよう不活性チモーゲン型で、または活性化 F X (F X a) ポリペプチドとして投与することができる。より急速な回復を必要とする適用のため、例えば、外科手術において、修飾されたポリペプチドは、活性化 F X (F X a) ポリペプチドとして投与することができる。

【0445】

3. 外傷および外科的出血

修飾された F X ポリペプチドは、正常な凝固系を有する対象における周術期および外傷による失血に関連する出血を処置するための治療法として用いることができる。例えば、修飾された F X ポリペプチドを患者に投与して、凝固を促進し、外科手術に関連する失血を低下させ、さらに、輸血の必要を低下させることができる。

【0446】

一部の例において、修飾された F X ポリペプチドは、様々な種類の外科手術を受けている正常な凝固の患者に投与して、急速な止血を引き起こし、失血を防止することができる。修飾された F X による処置は、外科手術部位における止血を促進し、失血を低下または防止し、これにより、輸血の必要を低下または消失させることができる。本明細書で提供される修飾された F X ポリペプチドの一部は、半減期の増加、循環プロテアーゼ阻害因子に対する抵抗性の増加および触媒活性の増加等、特性の増強を提示し、したがって、例えば、より低用量で、低頻度で、より少ない有害反応により投与することができる。修飾された F X ポリペプチドは、内在性酵素により活性化されるよう不活性チモーゲン型で、または活性化 F X (F X a) ポリペプチドとして投与することができる。

【0447】

本明細書に記載されているもの等、修飾第 X 因子ポリペプチドを用いて、外傷による傷害を有する対象における凝固を促進し、失血を防止することもできる。外傷は、外因性作用因子による生きた組織への傷害として定義され、米国における主な死亡原因の第 4 位である。外傷は、鈍的外傷（内部圧迫、臓器損傷および内部大出血をもたらす）または貫通性外傷（身体を貫通し、組織、血管および臓器を破壊し、外部大出血をもたらす作用因子の結果）のいずれかとして分類される。外傷は、限定されないが、自動車事故（鈍的および／または貫通性外傷を引き起こす）、銃創（貫通性外傷を引き起こす）、刺創（貫通性外傷を引き起こす）、機械による事故（貫通性および／または鈍的外傷を引き起こす）お

10

20

30

40

50

よび有意な高さからの落下（貫通性および／または鈍的外傷を引き起こす）を包含する、いくつかの事象によって引き起こされ得る。外傷の結果としての制御できない大出血は、関連する死亡率の多くの原因である。

【0448】

びまん性凝固障害は、対象の25～36%もの多さにおいて生じる、外傷患者に関連する相対的に一般的な合併症である。凝固障害は、凝固因子および血小板の希釈および消費、線維素溶解、アシドーシスならびに低体温等、種々の因子により、傷害後早期に発症し得る。従来の管理は、新鮮凍結血漿（FFP）血小板、RBCおよび／または寒冷沈降物の輸血による補充療法、アシドーシスの補正ならびに低体温の処置に参与する。これらの工程は、多くの場合、出血を止め、死亡を防止するには不十分である。治療量のFX単独または他の治療法との組み合わせの投与による処置は、外傷患者における凝固を促進し、失血を低下させることができる。例えば、FXポリペプチド含有処置は、希釈性凝固障害のブタモデルにおける凝固および最終血餅強度を増強した [Dickneiteら, (2010) J Trauma 68(5):1151-1157; Mitterlechnerら, (2011) J Thrombosis and Haemostasis. 9(4):729-737]。本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは、無修飾のFXポリペプチドと比較して、凝固活性の増加のためのFVa依存性の増強と半減期の増加を提示し、したがって、例えば、より低用量で、低頻度で、より少ない有害反応により投与することができる。修飾されたFXポリペプチドは、内性酵素により活性化されるよう不活性化チモーゲン型で、または活性化FX（FXa）ポリペプチドとして投与することができる。

【0449】

I. 併用療法

本明細書に記載されている修飾されたFXポリペプチドのいずれかは、限定されないが、他の生物製剤、小分子化合物および外科手術を包含する他の治療剤または手技と組み合わせ、それに先立ち、それと間欠的に、またはそれに引き続き投与することができる。FX（FXaおよびrFXaを包含）の適応があるかまたはそれが用いられたことがあり、他の薬剤および処置が利用できる、上に例証されているもの全てを包含するいずれかの疾患または状態のために、チモーゲンまたは活性化型のFXは、それらと組み合わせで用いることができる。したがって、チモーゲンまたは活性化型の本明細書で提供される修飾されたFXポリペプチドは同様に用いることができる。処置する疾患または状態に応じて、例示的な組み合わせとして、ビタミンK、ビタミンK誘導体およびプロテインC阻害因子、血漿、血小板、赤血球細胞ならびに副腎皮質ステロイド等、他の精製された血漿または組換え凝固因子、凝血原との組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

【0450】

一部の例において、血液および新鮮凍結血漿（FFP）は、第X因子レベルの最小の上昇のための第X因子補充療法の供給源である [Girolamiら (1970) Thromb Diath Haemorrh 24(1):175-184; Girolamiら, (1970) Br J Haematol 19(2):179-192]。しかし、第X因子欠損症処置は、典型的に、FII、FVIIおよびFIXに加えて第X因子を含有するプロトロンビナーゼ複合体濃縮製剤（PCC）による処置によって引き起こされる [Lechler, E (1999) Thromb Res 95(Suppl 1):S39-S50]。かかる濃縮製剤は、商業的に入手することができ、例えば、Konyne 80 (Cutter, USA); Profilnine HT (Alpha, USA); Proplex T (Baxter Hyland, USA; またはBebulin VH (Immuno, USA) が挙げられる。活性化FX（FXa）を含有する活性化 (Activated) PCC、例えば、Autoplex (Baxter, Hyland, USA) およびFEIBA (Immuno, USA) も入手できる。典型的には、止血は、10～20 IU/dLの術後FXレベルにより達成される [Knightら, (1985) Transfusion, 25(1):78-80; Bolton-Maggs, PHB. The rare coagulation disorders. Treatment of hemophilia. Manchester: World Federation of Hemophilia; 2006]。FIXおよびFXの濃縮製剤は、第X因子欠損症の処置にも用いられた。しかし、無修飾のFXポリペプチドを含有するPCC、活性化PCCおよび他の濃縮製剤を用いる場合、血栓塞栓性エピソードが懸念となる [Lechler (1999) Thromb Res. 95(

Suppl. 1):S39-S50]。F X含有濃縮製剤の血栓塞栓性エピソードは、本明細書に記載されているもの等、修飾されたF Xポリペプチドを用いることにより低下または排除することができる。

【0451】

本明細書で提供される修飾されたF Xポリペプチドは、無修飾のF Xポリペプチドと比較して、凝固活性の増加のためのF V a依存性の増強と半減期の増加を提示し、したがって、例えば、より低用量で、低頻度で、より少ない有害反応により投与することができる。修飾されたF Xポリペプチドは、内在性酵素により活性化されるよう不活性チモーゲン型で、または活性化F X (F X a) ポリペプチドとして投与することができる。

【0452】

J. 製品およびキット

修飾されたF Xポリペプチドもしくは修飾されたF Xポリペプチドをコードする核酸またはこれらの誘導体もしくは生物学的活性部分の医薬品化合物は、包装材料と、止血性疾患または障害の処置に有効な医薬組成物と、修飾されたF Xポリペプチドまたは核酸分子が、止血性疾患または障害の処置に用いられることを示すラベルとを含有する製品として包装することができる。

【0453】

本明細書で提供される製品は、包装材料を含有する。医薬品産物の包装において用いるための包装材料は、当業者に周知のものである。例えば、それぞれその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5, 323, 907号および第5, 052, 558号を参照されたい。医薬品包装材料の例として、ブリスターパック、瓶、チューブ、吸入器、ポンプ、袋、バイアル、容器、シリンジ、瓶ならびに選択された製剤および企図される投与および処置様式に適したいずれかの包装材料が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書で提供される化合物および組成物の多様な製剤は、いずれかの止血性疾患または障害のための種々の処置として企図される。

【0454】

修飾されたF Xポリペプチドおよび核酸分子は、キットとして提供することもできる。キットは、本明細書に記載されている医薬組成物と、投与のための品目とを包含することができる。例えば、修飾されたF Xに、シリンジ、吸入器、投薬量カップ、ドロップパーまたはアプリケーター等、投与のための装置を供給することができる。キットは、投薬量、投薬レジメンを包含する適用のための説明書と、投与様式のための説明書とを包含してもよい。キットは、本明細書に記載されている医薬組成物と、診断のための品目を包含することもできる。例えば、かかるキットは、対象のF XまたはF Xに調節される系の濃度、

【実施例】

【0455】

K. 実施例

以下の実施例は、説明の目的のみのために含まれ、本発明の範囲を限定するようには意図されない。

【0456】

実施例1

第X因子ポリペプチドのクローニングおよび発現

A. p F U S E ベクターへの第X因子遺伝子のクローニング

488アミノ酸ヒト第X因子(F X)前駆体ポリペプチド(P00742; 配列番号: 1において記載)をコードする核酸を、伸長因子-1 α (EF-1 α)コアプロモーターならびにヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)1型長い末端反復のRセグメントおよびU5配列の部分(R-U5')を含む複合プロモーターhEF1-HTLVを含有する哺乳動物発現ベクター、pFUSE-hIgG1-Fc2(本明細書においてpFUSEと略す)(InvivoGen; 配列番号: 266)にクローン化した。In-Fusion CF Dry-Down PCR Cloning Kit(Clontech)を供給者によって指定された条件に従って用いた。

【0457】

In Fusionプロセスのために、ヒト免疫グロブリン1 (hIgG1) Fc部分
を含まないプラスミドpFUSEを、pFUSE-Acc-F1フォワードプライマー：
GTGCTAGCTGGCCAGACATGATAAG (配列番号：267) およびpF
USE-Acc-R3リバースプライマー：CATGGTGGCCCTCCTTCGCC
GGTGATC (配列番号：268) でのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて直線
化し、アクセプターDNAとして用いた。FXの全長コード配列を、FX-wtsp-I
nvivo-F1フォワードプライマー：

【化1】

CGAAGGAGGGCCACCATGGGGCGCCCACTGCACCTC

10

(配列番号：269)

およびFX-I nvivo-R1リバースプライマー：

【化2】

TGTCTGGCCAGCTAGCACTCACTTTAATGGAGAGGACG

(配列番号：270)

と共にヒトFX cDNA (Origene、Rockville、MD) を鋳型として
用いてPCRによって増幅した。上記の2つのFXドナー増幅プライマー配列に関して、
フォワードおよびリバースプライマー配列それぞれにおけるFX「ATG」開始および「
TGA」終止コドンの相補配列の両方に下線をつけた。18nt長相同性領域、In F
usionのための非アニーリング5'プライマー末端を太字で示す。

20

【0458】

標準的PCR反応およびサーモサイクリング条件を、Phusion High-Fi
delity Master Mix Kit (New England Biolabs) と共に製造者によって推奨されるとおり用いた。アクセプターおよびドナーPCR産
物の両方を、次いでイー・コリ由来damメチル化PCR鋳型バックグラウンドを除去す
るためにDpnI制限酵素で消化した。次いでそれらを混合し、In-Fusion反応
を供給者によって指定された条件を用いて実施した。

【0459】

30

反応混合物をイー・コリXL1 Blue supercompetent cells (Stratagene) に形質転換した。コロニーを25ppm Zeocin (I
nvivoGen) を添加した2xYTアガープレート上で選択した。プラスミドDNA
を選択されたクローンから単離し、正確なクローニングを検証するために配列決定した。
正確な配列を含むクローンをさらなる試験について用いた。

【0460】

B. プロトロンビンシグナルペプチドおよびプロペプチド配列を有するFXプラスミドの
構築

FX天然シグナルペプチドおよびプロペプチド配列をプロトロンビン配列と交換するた
めに、上記実施例1Aにおいて産生されたプラスミドを、F10-Pro-Acc-F1
フォワードプライマー：GCCAATTCTCTTTCTTGAAGAGATG (配列番号
：271) およびpFUSE-Acc-R3リバースプライマー：CATGGTGGCC
CTCCTTCGCCGGTGATC (配列番号：272) でのPCRにより直線化し、
アクセプターDNAとして用いた。プロトロンビンシグナルペプチドおよびプロペプチド
(配列番号：415のアミノ酸1-43として記載されているもの、および配列番号：2
73として記載されているもの) のヌクレオチド配列を、FII-SP+Pro-F10
Acc-F1フォワードプライマー：

40

【化3】

CGAAGGAGGGCCACCATGGCGCACGTCCGAGGCTTG

50

(配列番号：274) および F I I - S P + P r o - F 1 0 A c c - R 1 リバースプライマー：

【化4】

TTCAAGAAAGGAATTGGCTCGCCGGACCCGCTGGAGCAG

(配列番号：275) と共にヒトプロトロンビン cDNA (O r i g e n e) を鋳型として用いて P C R によって増幅した。上に記載の2つのプロトロンビンドナー増幅プライマー配列に関して、18 nt 長相同性領域、I n F u s i o n のための非アニーリング5'プライマー末端を太字で示し、プロトロンビン ' A T G ' 開始コドン、フォワードプライマー配列において下線をつける。標準的 P C R 反応および I n F u s i o n 反応を上

10

【0461】

C. F X 変異体の生成

F X 変異体を、新たに合成されたDNAに設計された突然変異を組み込むためのプライマーとして働く特異的に設計したオリゴヌクレオチドと共に Q u i k C h a n g e L i g h t n i n g S i t e - D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t (S t r a t a g e n e) を製造者の説明書に従って用いて生成した。望まれる突然変異を含む相補的プライマーを、クローン化 F X cDNA 配列を鋳型として含有する実施例1Bにおいて生成される精製した二重鎖スーパーコイルプラスミドDNAを用いるサイクルにおいて伸長した。プライマーの伸長は、新たに合成される鎖への対象の突然変異の組み込みをもたらし、ねじれ型ニック (s t a g g e r e d n i c k s) を含む突然変異プラスミドを生じた。増幅に続いて、イー・コリ由来プラスミドDNAの d a m メチル化親鎖を除去するために突然変異導入産物を D p n I 制限酵素で消化した。次いでDNAをイー・コリ X L 1 B l u e s u p e r c o m p e t e n t c e l l s (S t r a t a g e n e) に形質転換し、25 ppm Z e o c i n (I n v i v o G e n) を添加した 2 x Y T アガープレート上での選択が続いた。プラスミドDNAを選択されたクローンから単離し、F X 遺伝子上の望まれる位置での突然変異の組み込みを検証するために配列決定した。

20

【0462】

F X 変異体を生成するために用いた各相補的プライマー対由来のオリゴヌクレオチドの内の1つのヌクレオチド配列を以下の表15に提供する。置換されたアミノ酸をコードするヌクレオチドトリプレット配列を大文字で示す。たとえば置換 I 1 6 L (キモトリプシンナランピングによる I 1 6 L ; 配列番号：416) を含有する F X 変異体を生成するために、F X - I 1 6 L フォワードプライマーおよび F X - I 1 6 L フォワードに相補的であるプライマーを、3-bp 「A T C」野生型配列を3-bp 「C T G」突然変異体配列で置き換えるために用いた。

30

【0463】

下の表15は、F X 突然変異誘発に用いたオリゴヌクレオチドプライマーを記載する。突然変異体トリプレットを大文字で示し、プライマー名は、プライマーを用いた突然変異誘発の結果として産生された、キモトリプシンナランピングによる、突然変異体に対応する。

40

【0464】

表15

【表 15 - 1】

表15: オリゴヌクレオチドプライマー		
プライマー名 (キモトリプシン ナンバリング)	プライマー配列 (5' から 3')	配列番号
FX-II6L-For	gacaacaacctcaccaggCTGgtgggaggccaggaatgc	276
FX-V17A-For	CaacaacctcaccaggatcGCCggaggccaggaatgcaag	277
FX-V17I-For	caacctcaccaggatcATCggaggccaggaatgc	278
FX-V17L-For	caacctcaccaggatcCTGggaggccaggaatgc	279
FX-V17T-For	caacctcaccaggatcACCggaggccaggaatgc	280
FX-V17S-For	caacctcaccaggatcAGCggaggccaggaatgc	281
FX-V17P-For	caacctcaccaggatcCCCggaggccaggaatgc	282
FX-G18A-For	accaggatcgtgGCCggccaggaatgcaaggac	283
FX-G18P-For	accaggatcgtgCCCggccaggaatgcaaggac	284
FX-G18S-For	accaggatcgtgAGCggccaggaatgcaaggac	285
FX-G18V-For	accaggatcgtgGTGggccaggaatgcaaggac	286
FX-G18T-For	accaggatcgtgACCggccaggaatgcaaggac	287
FX-G19A-For	caccaggatcgtgggaGCCcaggaatgcaaggac	288
FX-G19V-For	caccaggatcgtgggaGTGcaggaatgcaaggac	289
FX-G19R-For	caccaggatcgtgggaCGGcaggaatgcaaggac	290
FX-G19K-For	caccaggatcgtgggaAAGcaggaatgcaaggac	291
FX-G19P-For	caccaggatcgtgggaCCCcaggaatgcaaggac	292
FX-G19H-For	caccaggatcgtgggaCACcaggaatgcaaggac	293
FX-D194N-For	gatgcctgccaggggAACagcggggggcccgac	294
FX-D194S-For	gatgcctgccaggggAGCagcggggggcccgac	295
FX-L32S/G40H-For	gtgtccctggcaggccAGCctcatcaatgaggaaaacgagCACttct gtggtggaacc	296
FX-E21A-For	gatcgtgggaggccagGCTgcaaggacggggag	297
FX-E21S-For	gatcgtgggaggccagAGCTgcaaggacggggag	298
FX-E21V-For	gatcgtgggaggccagGTGtcaaggacggggag	299
FX-K23S-For	ggaggccaggaatgcAGCgacggggagtgtccc	300
FX-R143A-For	gtgagcggcttcgggGCCacccacgagaagggc	301
FX-R143S-For	gtgagcggcttcgggAGCacccacgagaagggc	302
FX-R143T-For	gtgagcggcttcgggACCacccacgagaagggc	303
FX-R143V-For	gtgagcggcttcgggGTGacccacgagaagggc	304
FX-R143Q-For	gtgagcggcttcgggCAGacccacgagaagggc	305
FX-R143N-For	gtgagcggcttcgggAACacccacgagaagggc	306
FX-R143M-For	gtgagcggcttcgggATGacccacgagaagggc	307
FX-R143K-For	gtgagcggcttcgggAAGacccacgagaagggc	308
FX-R143Y-For	gtgagcggcttcgggTACacccacgagaagggc	309
FX-R143D-For	gtgagcggcttcgggGACacccacgagaagggc	310
FX-T144A-For	gagcggcttcgggcgcGCCacgagaaggccgg	311
FX-T144L-For	gagcggcttcgggcgcCTGacgagaaggccgg	312

10

20

30

40

【表 15 - 2】

表 15: オリゴヌクレオチドプライマー		
プライマー名 (キモトリプシン ナンバリング)	プライマー配列 (5' から 3')	配列番号
FX-S152A-For	gagaagggccggcagGCCaccaggctcaagatg	313
FX-S152T-For	gagaagggccggcagACCaccaggctcaagatg	314
FX-S152N-For	gagaagggccggcagAACaccaggctcaagatg	315
FX-R154E-For	ggccggcagtcaccGAGctcaagatgctggag	316
FX-K156A-For	cagtcaccaggctcGCCatgctggaggtgccc	317
FX-K156S-For	cagtcaccaggctcAGCatgctggaggtgccc	318
FX-K156N-For	cagtcaccaggctcAACatgctggaggtgccc	319
FX-K156D-For	cagtcaccaggctcGACatgctggaggtgccc	320
FX-K156R-For	cagtcaccaggctcAGGatgctggaggtgccc	321
FX-K156V-For	cagtcaccaggctcGTGatgctggaggtgccc	322
FX-K156Y-For	cagtcaccaggctcTACatgctggaggtgccc	323
FX-K156M-For	cagtcaccaggctcATGatgctggaggtgccc	324
FX-V17S/G18A-For	caacctaccaggatcAGCGCCggccagggaatgcaag	325
FX-II6L/V17S-For	gacaacaacctaccaggCTGAGCggaggccagggaatgcaag	326
FX-II6L/G18A-For	gacaacaacctaccaggCTGgtgGCCggccagggaatgcaaggac	327
FX-S152A/K156M-For	gagaagggccggcagGCCaccaggctcATGatgctggaggtgccc	328
FX-N35D-For	ccctggcaggccctgctcaccGACgaggaaaacgagggtttctgt	329
FX-N35A-For	ccctggcaggccctgctcaccGCCgaggaaaacgagggtttctgt	330
FX-N35S-For	ccctggcaggccctgctcaccAGCgaggaaaacgagggtttctgt	331
FX-E37R-For	caggccctgctcatcaatgagCGCaacgagggtttctgtggtgga	332
FX-E37K-For	caggccctgctcatcaatgagAAGaacgagggtttctgtggtgga	333
FX-E37A-For	caggccctgctcatcaatgagGCCaacgagggtttctgtggtgga	334
FX-E37S-For	caggccctgctcatcaatgagAGCaacgagggtttctgtggtgga	335
FX-E39R-For	ctgctcatcaatgaggaaaacCGCggtttctgtggtggaactatt	336
FX-E39K-For	ctgctcatcaatgaggaaaacAAGggtttctgtggtggaactatt	337
FX-E39A-For	ctgctcatcaatgaggaaaacGCCggtttctgtggtggaactatt	338
FX-R150A-For	gggcgcacccacgagaagggcGCCcagtcaccaggctcaagatg	339
FX-R150D-For	gggcgcacccacgagaagggcGACcagtcaccaggctcaagatg	340
FX-R150E-For	gggcgcacccacgagaagggcGAGcagtcaccaggctcaagatg	341
FX-R150S-For	gggcgcacccacgagaagggcAGCagtcaccaggctcaagatg	342
FX-R150G-For	gggcgcacccacgagaagggcGGCagtcaccaggctcaagatg	343
FX-R143E-For	gggattgtgagcggcttcgggGAGaccacgagaagggccggcag	344
FX-R143D-For	gggattgtgagcggcttcgggGACaccacgagaagggccggcag	345
FX-R143M-For	gggattgtgagcggcttcgggATGaccacgagaagggccggcag	346
FX-R143N-For	gggattgtgagcggcttcgggAACaccacgagaagggccggcag	347
FX-R143Q-For	gggattgtgagcggcttcgggCAGaccacgagaagggccggcag	348
FX-R93E-For	gaggtggtcatcaagcacaacGAGttcacaaggagacctatgac	349
FX-R93A-For	gaggtggtcatcaagcacaacGCCttcacaaggagacctatgac	350
FX-R240A-For	gccttctcaagtggatcgacGCCtccatgaaaaccaggggcttg	351
FX-R240E-For	gccttctcaagtggatcgacGAGtccatgaaaaccaggggcttg	352
FX-K236A-For	accaaggtcaccgccttctcGCCtgatcgacagggtccatgaaa	353
FX-K236E-For	accaaggtcaccgccttctcGAGtgatcgacagggtccatgaaa	354

10

20

30

40

【表 15 - 3】

表 15: オリゴヌクレオチドプライマー		
プライマー名 (キモトリプシン ナンバリング)	プライマー配列 (5' から 3')	配列番号
FX-R125A-For	gcgcctgcctgcctccccgagGCCgactgggccgagtcacgctg	355
FX-R125E-For	gcgcctgcctgcctccccgagGAGgactgggccgagtcacgctg	356
FX-K96A-For	atcaagcacaaccgggttcacaGCCgagacctatgacttcgacatc	357
FX-K96E-For	atcaagcacaaccgggttcacaGAGgagacctatgacttcgacatc	358
FX-K236E/R240E-For	gtcaccgccttcctcGAGtggtacgacGAGtccatgaaaaccagg	359
FX-K156A-For	ggccggcagtcaccaggctcGCatgctggagggtgcctacgtg	360
FX-K156S-For	ggccggcagtcaccaggctcAGCagctggagggtgcctacgtg	361
FX-E[51]N-For	gatggcgaccagtgtAACaccagtccttgccag	362
FX-Q[56]N/Q[58]S-For	gagaccagtccttgcAACaacAGCggcaaatgtaaagac	363
FX-Q[58]N/K[60]S-For	cagtccttgccagaacAACggcAGCtgtaaagacggcctc	364
FX-K[62]N/G[64]S-For	gaaccaggggcaaatgtAACgacAGCctcgggggaatacacc	365
FX-L[65]N/E[67]S-For	caaatgtaaagacggcAACgggAGCtacacctgcacctg	366
FX-E[67]N-For	gtaaagacggcctcgggAACtacacctgcacctgtttag	367
FX-L[73]N/G[75]S-For	gaatacacctgcacctgtAACgaaAGCttcgaaggcaaaaac	368
FX-G[75]N/E[77]S-For	ctgcacctgtttagaaAACttcAGCggcaaaaactgtgaattattc	369
FX-R[86]N/L[88]S-For	ctgtgaattattcacAACaagAGCtgcagcctggacaac	370
FX-T[85]N/K[87]S-For	caaaaactgtgaattattcAACcggAGCctctgcagcctggac	371
FX-L[83]N-For	ggcaaaaactgtgaaAACttcacacggaagctc	372
FX-E[82]N/F[84]S-For	gaaggcaaaaactgtAACttaAGCcacacggaagctctgc	373
FX-E[82]S-For	gaaggcaaaaactgtAGCttattcacacggaag	374
FX-G[78]N/N[80]S-For	gtttagaaggattcgaAACaaaAGCtgtgaattattcacac	375
FX-E[77]N/K[79]S-For	ctgtttagaaggattcAACggcAGCaactgtgaattattc	376
FX-D[95]N/D[97]S-For	cagcctggacaacgggAACtgtAGCcagttctgccacgag	377
FX-G[114]N-For	gtgctcctgcgcccgcAACTacacctggctgac	378
FX-K[122]S-For	ctggctgacaacggcAGCgcctgcattcccacag	379
FX-D[119]N/G[121]S-For	gggtacacctggctAACaacAGCaaggcctgcattccc	380
FX-K23N/G25S-For	ggaggccaggaatgcAACgacAGCgagtgtccctggcag	381
FX-E36N/N38S-For	gccctgctcatcaatAACgaaAGCgagggtttctgtggtg	382
FX-R63N/K65S-For	ctctaccaagccaagAACttcAGCgtgagggtaggggac	383
FX-E84N/E86S-For	ggtgaggcggtgcacAACgtgAGCgtggtcatcaagcac	384
FX-T113N/R115S-For	ctcaagacccccatcAACttcAGCatgaacgtggcgctg	385
FX-K134N/G136S-For	acgtgatgacgcagAACacgAGCattgtgagcggttc	386
FX-R202N/K204S-For	ggcccgacgtcaccAACttcAGCgacacctacttcgtg	387
FX-D205N/Y207S-For	gtcaccgccttcagAACaccAGCttcgtgacaggcatc	388
FX-K204N-For	cacgtcacccgcttcAACgacacctacttcgtg	389
FX-T244N/G246S-For	gacagggtccatgaaaAACaggAGCttgcccaggccaag	390
FX-R245N/L247S-For	aggtecatgaaaaccAACggcAGCcccaaggccaagagc	391
FX-G[114]N+D[119]N/G[121]S-For	gtgctcctgcgcccgcAACTacacctggctAACaacAGCaaggc ctgcattccc	392

【0465】

下の表 16 は、配列番号：134 において記載される成熟 FX ポリペプチドと比較したナンバリングを用いて示される、およびキモトリプシンナンバリングに基づく突然変異を有する生成された FX 変異体を記載する。提供される配列番号は、列挙された突然変異体のコード前駆体ポリペプチドおよび成熟配列を指す。

【 0 4 6 6 】

【表 1 6 - 1 】

表 16: F X変異体			
突然変異 (成熟 F Xナンバリング)	突然変異 (キモトリブシンナンバリング)	配列番号 (前駆体)	配列番号 (成熟)
I195L	I16L	416	135
V196I	V17I	417	136
V196S	V17S	418	137
T85N/K87S/V196S	T[85]N/K[87]S/V17S	419	138
Q56N/Q58S/V196S	Q[56]N/Q[58]S/V17S	420	139
K62N/G64S/V196S	K[62]N/G[64]S/V17S	421	140
L65N/E67S/V196S	L[65]N/E[67]S/V17S	422	141
E67N/V196S	E[67]N/V17S	423	142
L73N/G75S/V196S	L[73]N/G[75]S/V17S	424	143
G75N/E77S/V196S	G[75]N/E[77]S/V17S	425	144
R86N/L88S/V196S	R[86]N/L[88]S/V17S	426	145
G114N/V196S	G[114]N/V17S	427	146
D95N/D97S/V196S	D[95]N/D[97]S/V17S	428	147
E82S/V196S	E[82]S/V17S	429	148
E82N/F84S/V196S	E[82]N/F[84]S/V17S	430	149
G78N/N80S/V196S	G[78]N/N[80]S/V17S	431	150
E77N/K79S/V196S	E[77]N/K[79]S/V17S	432	151
D119N/G121S/V196S	D[119]N/G[121]S/V17S	433	152
L83N/V196S	L[83]N/V17S	434	153
K122S/V196S	K[122]S/V17S	435	154
E51N/V196S	E[51]N/V17S	436	155
Q58N/K60S/V196S	Q[58]N/K[60]S/V17S	437	156
G114N/D119N/G121S/V196S	G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S	438	157
G198A	G19A	439	158
G198V	G19V	440	159
G198R	G19R	441	160
G198K	G19K	442	161
G198P	G19P	443	162
G198H	G19H	444	163
L211S/G219H	L32S/G40H	445	164
G197P	G18P	446	165
D378N	D194N	447	166
D378S	D194S	448	167
V196L	V17L	449	168
V196T	V17T	450	169
V196P	V17P	451	170
G197V	G18V	452	171
G197T	G18T	453	172
G197S	G18S	454	173
E200A	E21A	455	174
E200S	E21S	456	175
E200V	E21V	457	176

10

20

30

【表 16 - 2】

表 16: F X変異体			
突然変異 (成熟 F Xナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	配列番号 (前駆体)	配列番号 (成熟)
K202S	K23S	458	177
R326A	R143A	459	178
R326S	R143S	460	179
R326T	R143T	461	180
R326V	R143V	462	181
R326Q	R143Q	463	182
R326N	R143N	464	183
R326M	R143M	465	184
R326K	R143K	466	185
R326Y	R143Y	467	186
T327A	T144A	468	187
T327L	T144L	469	188
S334A	S152A	470	189
S334T	S152T	471	190
S334N	S152N	472	191
R336E	R154E	473	192
K338A	K156A	474	193
K338S	K156S	475	194
K338N	K156N	476	195
K338R	K156R	477	196
K338V	K156V	478	197
K338Y	K156Y	479	198
K338M	K156M	480	199
T327A/K338A	T144A/K156A	481	200
T327L/K338M	T144L/K156M	482	201
E200V/T327L/K338M	E21V/T144L/K156M	483	202
E200V/T327L/S334A/K338M	E21V/T144L/S152A/K156M	484	203
V196S/G197A	V17S/G18A	485	204
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	486	205
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H	487	206
G114N/V196S/L211S/G219H	G[114]N/V17S/L32S/G40H	488	207
G114N/D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H	489	208
G197A/L211S/G219H	G18A/L32S/G40H	490	209
V196S/G197A/L211S/G219H	V17S/G18A/L32S/G40H	491	210
I195L/V196S	I16L/V17S	492	211
I195L/G197A	I16L/G18A	493	212
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	494	213
V196S/N214D	V17S/N35D	495	214
V196S/N214A	V17S/N35A	496	215
V196S/N214S	V17S/N35S	497	216
V196S/E216R	V17S/E37R	498	217
V196S/E216K	V17S/E37K	499	218
V196S/E216A	V17S/E37A	500	219
V196S/E216S	V17S/E37S	501	220
V196S/E218R	V17S/E39R	502	221
V196S/E218K	V17S/E39K	503	222
V196S/E218A	V17S/E39A	504	223
V196S/R332A	V17S/R150A	505	224
V196S/R332D	V17S/R150D	506	225
V196S/R332E	V17S/R150E	507	226

【表 16-3】

表 16: F X変異体			
突然変異 (成熟 F Xナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	配列番号 (前駆体)	配列番号 (成熟)
V196S/R332S	V17S/R150S	508	227
V196S/R332G	V17S/R150G	509	228
V196S/R326E	V17S/R143E	510	229
V196S/R326D	V17S/R143D	511	230
V196S/R326M	V17S/R143M	512	231
V196S/R326N	V17S/R143N	513	232
V196S/R326Q	V17S/R143Q	514	233
V196S/R273E	V17S/R93E	515	234
V196S/R273A	V17S/R93A	516	235
V196S/R424A	V17S/R240A	517	236
V196S/R424E	V17S/R240E	518	237
V196S/K420A	V17S/K236A	519	238
V196S/K420E	V17S/K236E	520	239
V196S/R306E	V17S/R125A	521	240
V196S/K276A	V17S/K96A	522	241
V196S/K276E	V17S/K96E	523	242
V196S/K420E/R424E	V17S/K236E/R240E	524	243
V196S/R273E/K420E/R424E	V17S/R93E/K236E/R240E	525	244
V196S/R273E/R306E/K420E/R424E	V17S/R93E/R125E/K236E/R240E	526	245
V196S/K338A	V17S/K156A	527	246
V196S/K338S	V17S/K156S	528	247
V196S/E215N/N217S	V17S/E36N/N38S	529	248
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	530	249
D119N/G121S/V196S/E264N/E266S	D[119]N/G[121]S/V17S/E84N/E86S	531	250
G114N/V196S/E264N/E266S	G[114]N/V17S/E84N/E86S	532	251
V196S/R429N/L431S	V17S/R245N/L247S	533	252
V196S/R243N/K245S	V17S/R63N/K65S	534	253
V196S/T293N/R295S	V17S/T113N/R115S	535	254
V196S/D389N/Y391S	V17S/D205N/Y207S	536	255
V196S/K388N	V17S/K204N	537	256
D119N/G121S/V196S/K388N	D[119]N/G[121]S/V17S/K204N	538	257
V196S/T428N/G430S	V17S/T244N/G246S	539	258
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	540	259
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	541	260
G114N/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	G[114]N/V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	542	261
V196S/E264N/E266S/K388N	V17S/E84N/E86S/K204N	543	262
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/K388N	D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H/K204N	544	263
G114N/V196S/L211S/G219H/K388N	G[114]N/V17S/L32S/G40H/K204N	545	264
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S/K388N	V17S/L32S/G40H/E84N/E86S/K204N	546	265

【0467】

実施例 2

F Xポリペプチドの発現、精製および活性化

A. F Xポリペプチドの発現および精製

野生型および変異体の F Xポリペプチドを CHO 発現 (CHOX) 細胞 (Excelligene) において発現した。CHO 発現 (CHOX) 細胞を DM204B Complete medium (Irvine Scientific) において維持し、産生細胞地に接種するために用いた。トランスフェクションを WAVE バイオリアクター (GE Healthcare) において行った。4.6 L の DM204B Complete medium を有するおよそ 400 mL の種培地で、 1.2×10^6 vc/mL の播種密度で 20 L ウェーブバッグに接種した。WAVE バイオリアクターを 37.1°C で振動角 6 度および振動速度 24 rpm に合わせ、細胞が 3 日後に $13-16 \times 10^6$ vc/mL の細胞密度に達するようにした。16 mg の F X プラスミド DNA および 102.5 mg

のPEI（ポリエチレンジアミン）を混合し、トランスフェクション複合体を形成し、5.0 LのTfMAX2に希釈し、最初の播種の3日後にWAVEバイオリアクター上の培養物に加えた。トランスフェクション複合体およびTfMAX培地をウェーブバッグに加えた。培養物を4日間発現させ、粗FX溶解物を回収した。回収するために、ウェーブバッグの内容物を3時間、4℃で静置した。次に、培養上清をCUNOデプスフィルターによって回収し、次にFXを精製した。

【0468】

機能性Gladメインを有するFXポリペプチドが吸着し、カルシウム溶出工程が続くQ Fast Flow カラム（GE Healthcare）を用いてFXポリペプチドを精製した。典型的には、トランスフェクトした細胞由来の培養上清を20 mM Tris pH 8.0を含む溶液で2倍に希釈し、次に500 mM EDTA pH 8.0を1.5 mMの最終EDTA濃度に希釈されたサンプルに加えた。サンプルをろ過し、それらを緩衝液B（20 mM Tris pH 8.0、1 M NaCl）で次に緩衝液A（20 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl）で最初に予め平衡化されたQ Fast Flow カラム上に負荷した。サンプルのロードの完了後に、280 nmでのフロースルー（flow-through）の吸光度がベースラインに達するまで、カラムを緩衝液Aで洗浄した。緩衝液Aを緩衝液C（20 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、10 mM CaCl₂）と置き換え、ポンプ洗浄を緩衝液を完全に置き換えるように一連において(in the lines)行った。ポンプ洗浄完了後に、緩衝液Cをカラムに適用し、FXポリペプチドを溶離し、画分に回収した。溶出後に、桃色素（培養培地からの）をカラムから洗い流すまで、画分を回収する間、カラムを緩衝液Bで洗浄した。カラムを、緩衝液Aでの洗浄により、再使用のために再平衡化した。

【0469】

溶出画分をSource 15Q カラム（GE Healthcare）を使用してさらに精製した。FXを含む上記緩衝液Cで回収された画分をプールし、EDTAを20 mMの最終濃度に加えた。次に、プールした画分を50 mM Tris、pH 8.0で2倍に希釈し、緩衝液D（20 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.01% Tween 20、2.5 mM CaCl₂）で予め平衡化したSource 15Q カラムに負荷した。負荷されるカラムを緩衝液Dでの洗浄後、0.15 M NaClから0.5 M NaClの勾配をカラムに適用し、画分を回収した。FXを含有する画分をプールし、CaCl₂を12.5 mMまで加えた。

【0470】

B. FXおよびFX変異体の活性化

FXチモゲンから活性化FX（FXa）を産生するために、ビオチンであらかじめコンジュゲートされた10.1 μg/mLのラッセルクサリヘビ蛇毒FX活性化因子（Hematologic Technologies）を、実施例2Aにおいて作製されたプールした画分に加えた。活性化反応物を1.5時間37℃でインキュベートし、次に20 mM MES、pH 6.0にて1:5希釈した。次に、混合物をStrepTrap カラム（GE Healthcare）に付し、ラッセルクサリヘビ蛇毒FX活性化因子を取り出した。

【0471】

最後に、不活性FXを、ヘパリン HP クロマトグラフィーにより活性化FXaから分離した。StrepTrap カラムからのカラムフロースルーを、緩衝液E（20 mM MES、pH 6.0、50 mM NaCl）においてあらかじめ平衡化されたヘパリン HP カラム（GE Healthcare）に直接付した。20 mM MES、pH 6.0中0.1から0.7 M NaClの線状勾配をカラムに適用し、画分を回収した。活性FXaを含む画分をプールし、血液透析濾過(diafiltration)により緩衝液を5 mM MES、pH 6.0、100 mM NaClに交換した。

【0472】

実施例 3

10

20

30

40

50

貯蔵溶液中の触媒活性プロテアーゼ (FXa) 濃度の決定

FXaまたはFXa変異体の貯蔵溶液中の第Xa因子 (FXa) の触媒活性濃度の決定を、トリプシン様セリンプロテアーゼのための活性部位滴定剤 (active site titrant) として開発された蛍光発生エステル基質であるフルオレセインーモノ-p'-グアニジノベンゾエート (FMGB) での貯蔵プロテアーゼサンプルの滴定により行った。場合によっては、活性FXaまたはFXa変異体の濃度をまた、野生型FXaに対してピコモル K_i を有する大腸菌からのFXaの天然タイトバインディング可逆性阻害因子であるエコチン (Seymourら (1994) *Biochemistry* 33:3949-3958) での滴定により決定した。FMGB滴定が不可能であったFXa変異体のサブセットについて、エコチン滴定は、以下に記載されるとおりに達成した。

10

【0473】

A. 活性部位滴定剤フルオレセインーモノ-p'-グアニジノベンゾエート (FMGB) を用いるFXaの活性部位滴定

FXaの貯蔵溶液中で触媒活性第X因子 (FXa) の濃度を、蛍光発生エステル基質フルオレセインーモノ-p'-グアニジノベンゾエート (FMGB) を使用するBockら (Archives of Biochemistry and Biophysics (1989) 273:375-388) に記載されている滴定アッセイの修飾バージョンにより決定した。FMGBはFXまたは不活性プロテアーゼとではなく、FXaと直ちに反応し、FMGB濃度が飽和しており、脱アシル化が特に遅く、触媒作用の律速である条件下で、事実上安定なアシル-酵素中間体を形成する。これらの条件下で、FXaプロテアーゼは、一回の触媒代謝回転を受け、フルオレセインフル

20

【0474】

Bockらにより当初に記載されているアッセイへの修飾は、1) 飽和量のFXaに対する補因子の包含、2) 第Va因子 (血漿精製FVa、Hematologic Technologies) および高濃度のリン脂質 (75% ホスファチジルコリン (PC) / 25% ホスファチジルセリン (PS); PC/PS小胞直径 $\sim 120\text{ nm}$; Avanti Polar Lipids) の添加、および3) FMGBの増加した濃度であった。

【0475】

FVaおよびPC/PS小胞の非存在下で、立証された増加した補因子依存性を有するFXa変異体は、FMGBエステル基質とわずかに反応したか、または反応しなかった。したがって、これらの修飾は、高度の補因子依存性が引き起こされたFXa変異体の完全な触媒活性をサポートするために必要とされた (実施例4A参照)。

30

【0476】

さらなる修正版を、反応容量を最小限にし、サンプルスループットを増加させるように96ウェルプレートフォーマットのためのアッセイを修正するように開発した (最大18サンプル/1プレート)。活性部位滴定アッセイを、96ウェルハーフエリア黒色プレート (Costar #3694) において最終50 μL 反応容量で行った。現在の方法を、10-100 μM の範囲である貯蔵溶液でのFXaプロテアーゼ変異体の活性部位滴定のために最適化した。この範囲外と推定された濃度を有するプロテアーゼ貯蔵物について、濃縮または最初の希釈工程を必要とした。最終反応物は、1 μM FVaおよび240 μM PC/PSリン脂質を含む1 $\times$ 緩衝液A (50mM HEPES-NaOH、50mM NaCl、5mM CaCl_2 および0.1% BSA、pH7.4) 中、 $\sim 300-650\text{ nM}$ のそれぞれのFXa変異体および10、50または75 μM FMGBを含んだ。FMGBの希釈標準 (working) 溶液を、乾燥重量に基づいてDMF中5mM FMGBの貯蔵濃度から緩衝液Aにおいて2 $\times$ 濃度 (20-150 μM) で調製し、濃度をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH7.2における吸光係数19,498 $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を用いる452nmでの吸光分光法によって確認した。

40

【0477】

50

活性部位滴定アッセイを以下のとおり調製した。FXa変異体を、 $2 \times$ FVaおよびPC/PS小胞（それぞれ $2 \mu\text{M}$ および $480 \mu\text{M}$ ）を含む $1 \times$ 緩衝液Aにおいて $0.6 - 1.3 \mu\text{M}$ に希釈し、 $25 \mu\text{L}$ の容量を96ウェルハーフエリア黒色アッセイプレートのデュプリケートウェルにアリコートした。反応を、 $1 \times$ 緩衝液A中の $25 \mu\text{L}$ の $2 \times$ 希釈標準溶液のFMGB（ $20 - 150 \mu\text{M}$ ）の添加により開始した。 485 nm の励起および 535 nm の発光のEnvision microplate reader（Perkin Elmer）を使用して、反応のバースト相におけるフルオレセイン蛍光の放出を、30秒毎180分間測定した。

【0478】

活性FXaによるFMGBの触媒作用に続いて放出されるフルオレセインの化学量論量を、 $1 \mu\text{M}$ FVaおよび $240 \mu\text{M}$ PC/PSリン脂質を含む $1 \times$ 緩衝液A中の遊離フルオレセインの標準曲線を用いて決定した。フルオレセイン標準溶液は、 0.1 N NaOHにおける吸光係数 $89, 125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いる 496 nm での標準条件下での吸光分光法によって確認されるFMGBの正確な濃度で、DMF中 $\sim 70 - 150 \text{ mM}$ の貯蔵溶液から新たに調製した。次に、遊離フルオレセインの標準曲線を、0から $2.5 \mu\text{M}$ FMGBの範囲を有する $1 \mu\text{M}$ FVaおよび $240 \mu\text{M}$ PC/PSリン脂質を含む $1 \times$ 緩衝液Aへの標準の連続希釈により作成した。

【0479】

データ分析のために、反応トレースを、Envision software package（Perkin Elmer）から、TXTファイルとして出力し、後の非線状データ分析を、Microsoft Excel表計算ソフト環境内の自動曲線適合（automated curve fitting）および統計分析のためのソフトウェアパッケージであるXLfit4で行った（IDBS Software）。バックグラウンドFMGB加水分解の寄与を決定し、FXaが加えられていないコントロールウェルのセットを使用して、実験反応トレースから減算した。一般的に、バックグラウンドFMGB加水分解は、観察される総蛍光バーストの5%未満であった。補正曲線を、 $\Delta \text{蛍光} = Y_0 + \text{Amp} * (1 - \exp(-k_{obs} * (X - X_0))) + \text{slope} * (X - X_0)$ [式中、パラメーターXおよび X_0 = 完了の時間および反応開始の時間、 Y_0 = アッセイ系におけるバックグラウンド蛍光を構成する補正值（offset）、 Amp = 上に概説した飽和アッセイ条件下でのバースト相の振幅、 k_{obs} はアシル酵素形成に関して観察された一次速度定数であり、 slope はプロテアーゼによるFMGBの完全代謝回転に関するバルク速度定数（bulk rate constant）である] の形の線形成分（脱アシル化の低速を表すため）を有する単一指数方程式（single exponential equation）にフィットさせた。反応物中の活性FXaプロテアーゼの濃度を、振幅（Amp）に関するフィットパラメーターのフルオレセイン標準曲線との比較によって算出した。デュプリケートアッセイからの値を平均し、標準偏差を決定した。次に、貯蔵調製物中の活性FXaの濃度を、算出されたアッセイ濃度から決定し、アッセイにおいて使用された希釈の程度で調整した。

【0480】

B. タイトバイディング阻害因子を使用するFXaの活性部位滴定

FMGB滴定が不可能であったとき、FXaの貯蔵溶液中の触媒活性第Xa因子またはFXa変異体の濃度を、大腸菌由来のFXaのタイトバイディング可逆性阻害因子である既知の量のエコチンでの滴定により決定した。

【0481】

市販されている調製物（Molecular Innovations、Inc.）中の活性エコチンの濃度を、市販の大腸菌エコチン調製物と既知の濃度の組換えヒトリプシン（rHトリプシン、Polymun Scientific）を滴定することによって決定した。 100 nM 活性部位滴定rHトリプシンの最終濃度および $0 - 200 \text{ nM}$ エコチンの段階量（stepped dose）を使用して、滴定を 2.0 mL 容量の $1 \times$ 緩衝液B（ 20 mM HEPES、 150 mM NaCl、 5 mM CaCl_2 、 0.1% PE

10

20

30

40

50

G 8000) 中で行った。96 ウエルディープウエルポリプロピレンプレート中で室温で60分インキュベーション後、2.0 mLをきれいな石英キュベット(10 mm x 10 mm)に移した。FMGBを最終濃度5 μ M (5.3 mM貯蔵から1.9 μ L / 2.0 mL)に加え、残存活性r hートリプシンをFMGBバーストから決定した。データを、エコチンのそれぞれの量に対するバーストプラトー (plateau) の50秒にわたって積分し、 $\Delta F_{obs} / \Delta F_{max}$ [式中、 ΔF_{max} は阻害因子の非存在下でのr hートリプシンバーストの全振幅であり、 ΔF_{obs} は阻害因子の存在下でのバーストの振幅である]に変換した。その後、活性阻害因子の希釈標準濃度を、完全阻害で外挿されるX-interceptおよび反応物中の活性r hートリプシンの既知の量から決定した。

【0482】

エコチン活性部位滴定反応を、0.1% BSAを補った1×緩衝液B中、2×濃度(400 nM–0 nM)でのエコチンの1.33倍希釈シリーズ(50 μ Lへの150 μ L)を調製することにより行った。FXaまたはFXa変異体プロテアーゼサンプルを2×希釈標準濃度(400 nM)に希釈し、50 μ Lを96 ウエルポリプロピレンアッセイプレートのデュプリケートウェルにアリコートした。反応を、100 μ L (50 μ L + 50 μ L)の反応容量において200 nM–0 nMの範囲のエコチンの最終濃度に50 μ Lの2×エコチン 12点希釈シリーズを加えることにより開始した。

【0483】

阻害反応は室温(～25℃)で120分間インキュベートし、蛍光発生基質、Pef a f l u o r X a (CH₃SO₂–D–CHA–Gly–Arg–AMC、Center chem)でFXaまたはFXa変異体の残存活性を読み出した。ペプチド基質に対して高い活性を有する野生型FXaおよびFXa変異体を、許容される範囲内の反応速度を成し遂げるように、0.1% BSA緩衝液を補った1×緩衝液Bにて最終75 μ L容量に10から100倍希釈した。ペプチド基質に対する乏しい活性を有するFXa変異体を、不希釈で試験した。75 μ Lの希釈または不希釈サンプルを、96 ウエル黒色アッセイプレートに移し、次に、25 μ Lの0.4 mM (0.1 mM最終) Pef a f l u o r X aを加えた。次に、反応の初期速度を25℃で15–60分間測定した。希釈変化による解離は速度測定中に無視できると仮定した。したがって、インキュベーション濃度は以下のデータ分析における阻害因子およびプロテアーゼについて使用される最終濃度であった。

【0484】

阻害因子の非存在下での反応速度(V_0)に対する阻害因子の存在下での反応速度(V_i)の比率を、プロテアーゼの固定の濃度で阻害因子(エコチン)のそれぞれの濃度について決定した。 V_i / V_0 比率をプロットし、得られる滴定曲線を、Prism software package (Graphpad Software)において方程式(1)の表現により評価した。分析は、 $n = 1$ の阻害因子/プロテアーゼ化学量論と仮定して行った。

方程式(1)：

$$V_i / V_0 = Y - \text{Intercept} + \text{slope} * [\text{エコチン}]$$

次に、方程式(1)から外挿されるX-Interceptに関するフィット値を、方程式(2)を使用して、全濃度のプロテアーゼが知られており、エコチンが用量応答曲線を作成するために使用される濃度で活性であったと仮定して、貯蔵FXa溶液の活性部位滴定(AST)濃度および「画分活性」値を決定するために使用した。エコチン濃度増加に対する活性の線形損失(0%–90%)により定義された値のみを評価した。

方程式(2)：

$$([\text{X-Intercept}]_{\text{fit-値}} / [\text{FXa}]_{\text{アッセイ}}) * [\text{FXa}]_{\text{全タンパク質}} = [\text{FXa}]_{\text{エコチン-AST}}$$

【0485】

実施例4

基質、プロトロンビン(FII)に対するFXaの触媒活性の決定

10

20

30

40

50

基質、プロトロンビン（FII）に対するFXaおよびFXa変異体の触媒活性を、血漿精製FVaおよびリン脂質の存在（補因子依存性）および非存在（補因子非依存性）の両方において評価した。それぞれの触媒活性を、合成基質Pefaf fluor TH（H-D-CHA-Ala-Arg-AMC；Centerchem）のトロンビン（FIIa）介在切断によって産生される蛍光を、トロンビン（FIIa）を産生するプロトロンビン（FII）のFXa切断を評価するために使用した蛍光発生アッセイを間接的に使用して評価した。

【0486】

基質プロテアーゼ（プロトロンビン）が補因子依存性アッセイにおいて活性化プロテアーゼ（FXa）の濃度より少なくとも1000倍および変異体活性に依存する補因子非依存性アッセイにおいて活性化プロテアーゼ（FXa）の濃度より少なくとも10から1000倍を超えて過剰であった場合の動力学的速度定数を算出するために様々なプロトロンビン濃度を用いた。簡潔には、以下のアッセイは、室温（25℃）で30-60分にわたって測定される動力学のアッセイにおいて、基質、Pefaf fluor THに対するトロンビンの活性を直接的に観察することによりプロトロンビナーゼ触媒プロトロンビン活性化の動力学基準を提供する。FXa／プロトロンビナーゼ機能（ k_{cat} および K_M ）の動力学的速度定数の決定のために、実験は、固定された飽和量の第Va因子（20nM）の存在下または非存在下で限定量の第Xa因子、およびプロトロンビンの濃度の増加（0から8μM）でPC／PS含有リン脂質小胞（20μM）で行った。次に、トロンビンによるPefaf fluor THの触媒作用に続く遊離フルオロフォア、AMC（7-アミノ-4-メチルクマリン）の放出を反応の経過にわたって連続的に評価し、FXa変異体の動力学的速度定数を決定した。

【0487】

A. FVa依存性アッセイプロトコール

FVa（血漿精製された、Hematologic Technologies、Inc.）およびリン脂質（75%ホスファチジルコリン（PC）／25%ホスファチジルセリン（PS）；PC／PS小胞直径～120nm；Avanti Polar Lipids）の存在下でFXaによるプロトロンビン（FII）活性化の動力学的速度を評価するアッセイのために、FXa変異体を上記実施例1-3において記載したとおり発現し、精製し、活性化し、および活性部位滴定した。次に、FXa変異体を、2×濃度のFVa（40nM）およびPC／PS小胞（40μM）を含有する2mL容量の1×緩衝液A（20mM Hepes／150mM NaCl／5mM CaCl₂／0.1% BSA／0.1% PEG-8000、pH7.4）にて0.2pMの2×濃度に連続希釈した。

【0488】

DFP／FPR-cmk処理したプロトロンビン（FII）の5μM溶液を0.1mM Pefaf fluor TH基質を含有する1×緩衝液A 2.0mL中に調製した。これは、試験されたプロトロンビンの最高濃度を表し、3つのアッセイプレートの十分な容量を提供した。次に、プロトロンビン／Pefaf fluor TH溶液を0.1mM Pefaf fluor THを含有する1×緩衝液A 最終容量700μLで12チャンネルデュープウェルポリプロピレンプレート中に1.8倍系列希釈し、5000nM、2778nM、1543nM、857nM、476nM、265nM、147nM、82nM、45nM、25nM、14nMおよび0nM プロトロンビンの最終希釈物を得た。各プロトロンビン希釈シリーズ合計25μLを、最大3つの96ウェルハーフエリア黒色アッセイプレートに分注した。典型的にはアッセイ反応は、予め定義したプレートマップ（FXa変異体4種／プレート）によって、プロトロンビナーゼ溶液（FXa／FVa／リン脂質／Ca²⁺）25μLを、プロトロンビン希釈物シリーズ25μLを含む3つのアッセイプレートに分配するように、BioMek FX liquid handling systemまたは12チャンネルマイクロピペットを用いて開始した。

【0489】

アッセイにおける試薬の最終濃度は、次のとおりであった：0.1 pM FXa、20 nM FVa、20 μM PC/PS小胞、50 μM Pefaf fluor TH、および0 nMから2500 nMのプロトロンビン（FII）希釈物。反応をSpectraMax fluorescence plate readerにおいて30分間、25℃でモニターした。遊離AMCの標準曲線を0 μMから100 μM AMCに及ぶ用量範囲を用いるデータ分析計算においてRFUからμMへの変換係数として利用した。

【0490】

B. FVa非依存性アッセイプロトコール

FVaの非存在下であるが、リン脂質（75%ホスファチジルコリン（PC）／25%ホスファチジルセリン（PS）；PC/PS小胞直径～120 nm；Avanti Polar Lipids）の存在下でFXaによるプロトロンビン（FII）活性化の動学的速度を評価するアッセイのために、FXa変異体を上記実施例1-3において記載したとおり発現し、精製し、活性化し、および活性部位滴定した。次に、FXa変異体を、2×濃度のPC/PS小胞（40 μM）を含有する2 mL容量の1×緩衝液Aにて2×濃度の20 pM（野生型）または1 nM-4 nM（FXa変異体について）に連続希釈した。DFP/FPR-cmk処理したプロトロンビン（FII）の8 μM溶液を0.1 mM

Pefaf fluor TH基質を含有する1×緩衝液A 2.0 mL中に調製した。これは、試験されたプロトロンビンの最高濃度を表し、最大3つのアッセイプレートの十分な容量を提供した。次に、プロトロンビン/Pefaf fluor TH溶液を0.1 mM

Pefaf fluor THを含有する1×緩衝液A 最終容量700 μLで12チャンネルディーブウエルポリプロピレンプレート中に1.8倍系列希釈し、8000 nM、4444 nM、2469 nM、1372 nM、762 nM、423 nM、235 nM、131 nM、73 nM、40 nM、22 nMおよび0 nM プロトロンビンの最終希釈物を得た。各プロトロンビン希釈シリーズ合計25 μLを、最大3つの96 ウェルハーフエリア黒色アッセイプレートに分注した。典型的にはアッセイ反応は、予め定義したプレートマップ（FXa変異体4種／プレート）によって、FVa非依存性プロトロンビナーゼ溶液（FXa／リン脂質／Ca²⁺）25 μLを、プロトロンビン希釈物シリーズ25 μLを含む3つのアッセイプレートに分配するように、BioMek FX liquid handling systemまたは12チャンネルマイクロピペットを用いて開始した。

【0491】

アッセイにおける試薬の最終濃度は、次のとおりであった：10 pM FXaまたは0.5-2 nM FXa変異体、20 μM PC/PS小胞、50 μM Pefaf fluor TH、および0 nMから4000 nMのプロトロンビン（FII）希釈物。反応をSpectraMax fluorescence plate readerにおいて30分間、25℃でモニターした。遊離AMCの標準曲線を0 μMから100 μM AMCに及ぶ用量範囲を用いるデータ分析計算においてRFUからμMへの変換係数として利用した。

【0492】

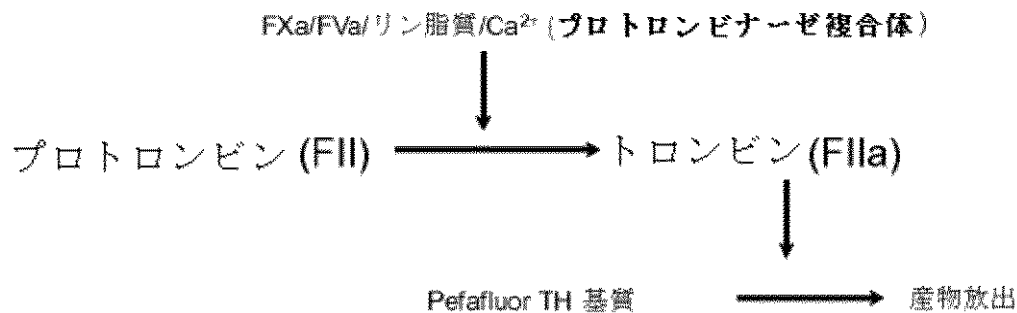
C. データ分析

FXaによるプロトロンビン（FII）の触媒作用の定常状態動力学を決定するために用いる全ての方程式は、参考文献Petersenら(1985)Biochem.J.225:149-158の“Zymogen-A ctivation Kinetics:Modulatory effects of trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid and poly-D-lysine on plasminogen activation”に記載されたものに基づく。以下のスキームAに記載した系の定常状態動力学に関する理論は、産物の放物型蓄積（parabolic accumulation）を表す方程式（3）の表現によって記載される。

【0493】

【化 5】

スキーム A:



10

【0494】

方程式 (3)

【数 1】

$$p = a_0 \frac{k_a [z_0]}{K_z + [z_0]} * \frac{k_e [S_0]}{K_s + [S_0]} * \frac{t^2}{2}$$

20

【0495】

スキーム A の機序により、 a_0 は活性化プロテアーゼ (FXa) の濃度であり、 z_0 はチモーゲン (FII) の濃度であり、 K_a および K_z はチモーゲンの活性酵素 (FIIa) への活性化因子触媒転換に関する K_{cat} および K_M を示し、 K_e および K_s は所与の時間 t にわたる FIIa による基質から産物への転換に関する K_{cat} および K_M を示す。

【0496】

プログレス曲線の分析のために、方程式 (3) を、蛍光発生基質のプロトロンビン加水分解の定常状態動力学を非依存的に決定し、化合物定数 K_2 に置き換えた方程式 (4) の形に再計算した。

30

【0497】

方程式 (4)

【数 2】

$$p = a_0 \frac{k_a [z_0]}{K_z + [z_0]} * k_2 * \frac{t^2}{2}$$

40

【0498】

1 × 緩衝液 A 中の Pefluor TH でのトロンビン (FIIa) 活性が 5.7 μM の K_M および 40.4 s^{-1} の K_{cat} 値を有すると非依存的に決定した。これらの値の方程式 (5) への代入は、36.3 s^{-1} の K_2 補正係数を与えた。

【0499】

方程式 (5)

【数 3】

$$k_2 = \frac{k_e [S_0]}{K_M + [S_0]}$$

【0500】

FXa触媒活性の程度を決定するために、SoftMax Pro application (Molecular Devices) で集めた生データを、. TXTファイルとして出力した。さらなる非線形データ分析を、XE Runner data analysis module (IDBS Software) を用いるActivityBase software package内で直接実施した。集計表テンプレートを、各プロトンピン濃度で検査したFXa変異体の放物型反応速度 (parabolic reaction velocities) ($\mu\text{M}/\text{秒}^2$) を方程式 (6) に示す標準直角双曲線の関数 (すなわちミカエリスメンテン方程式) に自動的にフィットするように設定し、 V_{max} および K_M についてのフィット値を得た。

【0501】

方程式 (6)

【数 4】

$$\text{反応速度 } (\mu\text{M}/\text{秒}^2) = \frac{V_{\text{max}} [S_0]}{K_M + [S_0]}$$

【0502】

次に、検査したFXa変異体についての K_{cat} 値を方程式 (7) による V_{max} ($\mu\text{M}/\text{秒}^2$) に対するフィット値から算出した。

【0503】

方程式 (7)

【数 5】

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[FXa] * 0.5 * k_2}$$

【0504】

特異的定数 K_{cat}/K_M を K_M のフィット値および (上の方程式 (7) の計算から生じる) 算出された K_{cat} から直接算出した。

【0505】

D. 結果

以下の表17-18は、FXa補因子 (FVa) の存在下および非存在下でのアッセイしたFXa変異体それぞれについての、表19に記載されている触媒活性を計算するために使用される動力学的パラメーターを記載する。各FXa突然変異体、ならびに組換え野生型FXa (FXa WTと称される) および血漿精製FXa (Haematological Technologies, Inc) についての、ミカエリスメンテン定数 K_M のフィット値、および計算される触媒速度定数 k_{cat} を、以下の表17および18においてそれぞれ提供する。表17および18はまた、 K_M および k_{cat} 動力学的パラメーターについて標準偏差 (S. D.)、変動係数 (百分率として; %CV) および実施アッセイ数 (n) も提供する。各動力学的パラメーターをFXa補因子FVaの存在下および非存

10

20

30

40

50

在下で F X a 突然変異体について決定した。

【0506】

表 18 に記載されている F X a ポリペプチドに対する計算された k_{cat} 値を、表 17 に記載されている K_M のフィット値により割り、触媒活性についての動学的定数 k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$) を出した。F X a 突然変異体の触媒活性を、触媒活性定数として、および野生型 F X a の活性の百分率として表 19 に記載されている。相対的補因子依存性も表 19 において示される (最後のカラム)。ここで、補因子依存性は、F V a の存在下での触媒活性 (k_{cat}/K_M) (F V a 依存性触媒活性) を F V a の非存在下での触媒活性 (k_{cat}/K_M) (F V a 非依存性触媒活性) で割った比率として定義される。

10

【0507】

F X a 変異体の活性を野生型 F X a と比較する場合 (WT k_{cat}/K_M の%)、活性におけるいかなる差異も突然変異の結果であり、たとえば異なる発現系に関連する翻訳後修飾における差異の結果ではないことを確実にするために変異体 F X a ポリペプチドについて用いたのと同じ条件を用いて発現および精製した組換え野生型 F X a ポリペプチド (F X a WT) と比較した。したがって、比較に用いた野生型 F X a ポリペプチドは、配列が配列番号 1 において記載される F X 遺伝子のクローニングから生成され、CHO 細胞からアミノ酸配列が配列番号: 134 のアミノ酸 1-139 および 195-448 として記載されているポリペプチドとして発現された実施例 2 において記載される組換え野生型 F X a であった。

20

【0508】

F X a 変異体の観察された触媒活性 (表 19 における k_{cat}/K_M) は、いくつかの変異体 (たとえば、F X a-G197P、F X a-G198A、F X a-D378N および F X a-I195L/V196S) での検出不可能なプロトンビナーゼ活性から、野生型 F X a (たとえば、F X a-L65N/E67S/V196S、F X a-R236V、F X a-V196S および F X a-L211S/G219H) と比較してプロトンビナーゼ (F I I) の活性化についての k_{cat}/K_M におけるわずかな増加までの範囲であった。いくつかの変異体は、野生型 F X a と比較して著しく増加した補因子依存性を示した (F X a-V196S、F X a-K338S、F X a-I195L、F X a-G197S、およびそれらの組合せ、たとえば、F X a-V196S/K338S、F X a-V196S/R326M、F X a-V196S/R326N、F X a-V196S/K276E および F X a-V196S/R332G)。観察される改善された補因子依存性は、主に F V a の非存在下で F X a 変異体の活性における減少によるものであったが、しかしながら、いくつかの変異体は F V a 依存アッセイにおいて 3 から 5 倍低い K_M 値により証明される補因子の非存在下でより低い基質親和性を示した (表 17)。

30

【0509】

単一のまたは複数の追加的グリコシル化部位を提供するように変異されたいくつかの F X a 変異体は、ほぼ野生型活性 (たとえば、F X a-E82N/F84S/V196S、F X a-G114N/V196S/E264N/E266S、F X a-V196S/E264N/E266S/K388N および F X a-G114N/V196S/L211S/G219H) を示したが、他は低下した触媒活性を示した。

40

【0510】

【表 17-1】

表 17. F X a 突然変異体に対する K _M のフィット値		F V a 存在				F V a 非存在			
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n	K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n
血漿 F X a	血漿 F X a	146.0	49.9	34%	120	145.5	44.4	31%	100
FX 野生型	FX 野生型	165.2	78.0	47%	38	127.9	22.0	17%	16
I195L	I16L	101.8	41.5	41%	28	145.6	63.5	44%	10
V196I	V17I	129.5	3.1	2%	2	136.7	11.0	8%	2
V196S	V17S	78.2	22.0	28%	47	252.5	185.5	73%	25
T85N/K87S/V196S	T85N/K87S/V17S	38.6	3.1	8%	3	499.5	334.2	67%	3
Q56N/Q58S/V196S	Q56N/Q58S/V17S	76.9	29.9	39%	3	384.8	352.7	92%	3
K62N/G64S/V196S	K62N/G64S/V17S	109.7	16.5	15%	2	461.8	360.4	78%	3
L65N/E67S/V196S	L65N/E67S/V17S	60.8	13.4	22%	2	977.7	766.2	78%	3
E67N/V196S	E67N/V17S	107.4	29.2	27%	3	713.2	34.2	5%	2
L73N/G75S/V196S	L73N/G75S/V17S	66.7	13.8	21%	3	645.7	502.7	78%	3
G75N/E77S/V196S	G75N/E77S/V17S	63.7	20.7	33%	2	305.5	209.9	69%	3
R86N/L88S/V196S	R86N/L88S/V17S	98.7	22.2	22%	3	105.1	41.8	40%	3
G114N/V196S	G114N/V17S	113.4	39.1	34%	6	1310.5	976.3	75%	4
D95N/D97S/V196S	D95N/D97S/V17S	53.6	18.7	35%	4	1422.5	534.3	38%	4
E82S/V196S	E82S/V17S	48.5	12.3	25%	9	194.1	110.0	57%	10
E82N/F84S/V196S	E82N/F84S/V17S	70.6	19.7	28%	2	593.9	198.7	33%	5
G78N/N80S/V196S	G78N/N80S/V17S	53.7	17.2	32%	4	443.0	457.1	103%	5
E77N/K79S/V196S	E77N/K79S/V17S	88.9	33.1	37%	4	398.2	173.4	44%	4
D119N/G121S/V196S	D119N/G121S/V17S	108.5	24.7	23%	4	748.9	526.4	70%	4
L83N/V196S	L83N/V17S	78.5	26.5	34%	4	266.2	74.8	28%	3
K122S/V196S	K122S/V17S	134.1	32.4	24%	6	978.3	383.3	39%	5
E51N/V196S	E51N/V17S	118.6	18.9	16%	2	959.7	278.1	29%	2
Q58N/K60S/V196S	Q58N/K60S/V17S	97.9	10.9	11%	2	911.0	215.4	24%	2
G114N/D119N/G121S/V196S	G114N/D119N/G121S/V17S	54.9	15.6	28%	4	92.0	25.0	27%	4
G198A	G19A	挿入なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198V	G19V	挿入なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0

【表 17-2】

表 17. F X a 突然変異体に対するK _M のフィット値		F V a 存在				F V a 非存在			
突然変異 (成熟 F X a ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n	K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n
G198R	G19R	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198K	G19K	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198P	G19P	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198H	G19H	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
L211S/G219H	L32S/G40H		11.7	18%	2	112.1	7.1	6%	2
G197P	G18P	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
D378N	D194N	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
D378S	D194S	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
V196L	V17L	107.9	11.4	11%	2	137.1	42.9	31%	2
V196T	V17T	116.4	11.5	10%	2	138.8	13.8	10%	2
V196P	V17P	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G197V	G18V	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G197T	G18T	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
G197S	G18S	103.4	4.0	4%	2	153.9	11.6	8%	2
E200A	E21A	116.8	5.6	5%	2	158.9	11.9	7%	2
E200S	E21S	157.3	14.5	9%	2	124.1	46.1	37%	2
E200V	E21V	127.7	6.9	5%	2	158.8	22.7	14%	2
K202S	K23S	105.5	1.4	1%	2	152.4	28.9	19%	2
R326A	R143A	119.8	25.5	21%	2	143.2	46.2	32%	2
R326S	R143S	101.2	10.2	10%	2	136.9	82.7	60%	2
R326T	R143T	81.3	1.4	2%	2	142.0	87.1	61%	2
R326V	R143V	63.0	22.1	35%	2	193.5	38.8	20%	2
R326Q	R143Q	69.4	9.1	13%	2	143.1	86.1	60%	2
R326N	R143N	82.5	5.2	6%	2	136.2	82.6	61%	2
R326M	R143M	78.7	5.1	6%	2	174.3	41.2	24%	2
R326K	R143K	114.2	19.6	17%	2	158.1	16.9	11%	2
R326Y	R143Y	68.2	14.6	21%	2	144.8	29.8	21%	2
T327A	T144A	116.5	24.8	21%	2	169.3	60.7	36%	2
T327L	T144L	127.1	32.8	26%	3	198.1	91.9	46%	2

【表 17-3】

表 17. F X a 突然変異体に対する K _M のフィット値									
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	F V a 存在			F V a 非存在			n	n
		K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V		
S334A		115.4	18.0	16%	150.0	67.1	45%	2	2
S334T		106.6	24.3	23%	160.4	52.0	32%	2	2
S334N		95.6	22.6	24%	160.7	58.3	36%	2	2
R336E		105.7	20.2	19%	158.3	39.4	25%	2	2
K338A		100.0	20.1	20%	168.5	34.3	20%	4	4
K338S		109.7	18.3	17%	167.1	20.6	12%	4	4
K338N		115.0	40.6	35%	159.6	60.8	38%	2	2
K338R		112.2	4.0	4%	182.4	55.9	31%	2	2
K338V		90.1	24.4	27%	158.7	35.3	22%	2	2
K338Y		151.8	0.5	0%	167.1	35.2	21%	2	2
K338M		180.3	26.3	15%	180.0	27.8	15%	2	2
T327A/K338A		187.9	19.9	11%	255.8	47.3	18%	2	2
T327L/K338M		151.7	11.1	7%	174.8	27.1	16%	2	2
E200V/T327L/K338M		125.8	9.5	8%	163.4	33.4	20%	2	2
E200V/T327L/S334A/K338M		70.0	7.3	10%	171.7	11.9	7%	2	2
V196S/G197A		活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
V196S/L211S/G219H		48.2	11.5	24%	116.1	12.3	11%	2	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H		41.3	23.0	56%	101.5	52.0	51%	2	2
G114N/V196S/L211S/G219H		37.3	17.1	46%	76.2	21.0	28%	2	2
G114N/D119N/G121S/V196S/L211S/G219H		41.4	18.2	44%	132.1	55.9	42%	4	4
G197A/L211S/G219H		96.1	28.9	30%	114.0	26.6	23%	3	3
V196S/G197A/L211S/G219H		活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
I195L/V196S		活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
I195L/G197A		活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0
I195L/L211S/G219H		111.0	44.4	40%	257.4	147.8	57%	5	5
V196S/N214D		63.4	6.4	10%	250.7	0.1	0%	2	2
V196S/N214A		82.9	16.1	19%	185.1	57.9	31%	2	2
V196S/N214S		79.5	9.4	12%	158.1	24.4	15%	2	2

【表 17-4】

突然変異 (成熟 F ₂ ナンバリング)	突然変異 (キモトリブシンナンバリング)	F V a 存在				F V a 非存在			
		K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n	K _M (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n
V196S/E216R	V17S/E37R	59.1	7.9	13%	3	269.3	2.9	1%	2
V196S/E216K	V17S/E37K	70.0	1.0	1%	2	258.3	132.8	51%	2
V196S/E216A	V17S/E37A	66.6	4.7	7%	2	268.6	91.8	34%	2
V196S/E216S	V17S/E37S	79.5	19.0	24%	2	165.7	80.4	49%	2
V196S/E218R	V17S/E39R	64.3	15.8	25%	3	231.9	7.1	3%	2
V196S/E218K	V17S/E39K	76.6	9.4	12%	2	204.2	41.1	20%	2
V196S/E218A	V17S/E39A	79.2	6.3	8%	2	217.1	5.3	2%	2
V196S/R332A	V17S/R150A	67.8	19.5	29%	4	372.0	82.3	22%	3
V196S/R332D	V17S/R150D	87.0	53.1	61%	5	149.2	53.1	36%	5
V196S/R332E	V17S/R150E	55.1	14.2	26%	2	178.2	68.3	38%	2
V196S/R332S	V17S/R150S	70.6	32.2	46%	6	147.0	33.9	23%	5
V196S/R332G	V17S/R150G	54.5	21.7	40%	5	192.8	74.8	39%	4
V196S/R326E	V17S/R143E	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
V196S/R326D	V17S/R143D	18.8	8.9	48%	5	2169.5	32.5	1%	2
V196S/R326M	V17S/R143M	39.4	1.4	3%	2	265.9	72.4	27%	2
V196S/R326N	V17S/R143N	20.1	3.6	18%	3	338.3	100.5	30%	2
V196S/R326Q	V17S/R143Q	22.1	5.8	26%	12	892.1	577.8	65%	3
V196S/R273E	V17S/R93E	58.7	4.9	8%	3	199.1	38.2	19%	2
V196S/R273A	V17S/R93A	62.6	10.7	17%	2	152.0	34.4	23%	2
V196S/R424A	V17S/R240A	65.0	15.9	25%	2	107.3	1.5	1%	2
V196S/R424E	V17S/R240E	66.3	5.5	8%	7	173.2	70.8	41%	2
V196S/K420A	V17S/K236A	54.7	20.3	37%	2	70.9	24.1	34%	2
V196S/K420E	V17S/K236E	49.9	16.0	32%	2	102.2	13.1	13%	2
V196S/R306E	V17S/R125A	66.6	3.8	6%	2	110.5	n.d.	n.d.	1
V196S/K276A	V17S/K96A	58.3	11.6	20%	2	339.1	96.2	28%	2
V196S/K276E	V17S/K96E	47.0	8.1	17%	2	436.6	51.1	12%	2
V196S/K420E/R424E	V17S/K236E/R240E	60.0	22.0	37%	3	167.5	111.4	67%	2
V196S/R273E/K420E/R424E	V17S/R93E/K236E/R240E	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
V196S/R273E/R306E/K420E/R424E	V17S/R93E/R125E/K236E/R240E	活性なし	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0

【表 17-5】

表 17. F X a 突然変異体に対する K _m のフィット値		F V a 存在				F V a 非存在			
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	K _m (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n	K _m (nM)	±S.D. (nM)	%C V	n
V196S/K338A	V17S/K156A	17.5	2.8	16%	2	820.8	417.6	51%	2
V196S/K338S	V17S/K156S	17.9	5.1	29%	10	2996.2	1390.0	46%	8
V196S/E215N/N217S	V17S/E36N/N38S	151.7	32.4	21%	3	1078.5	634.6	59%	4
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	97.4	16.0	16%	4	948.7	447.3	47%	4
D119N/G121S/V196S/E264N/E266S	D119N/G121S/V17S/E84N/E86S	101.1	69.8	69%	2	179.5	89.6	50%	2
G114N/V196S/E264N/E266S	G114N/V17S/E84N/E86S	57.1	19.4	34%	2	88.0	51.4	58%	2
V196S/R429N/L431S	V17S/R245N/L247S	110.7	4.7	4%	2	512.1	122.8	24%	2
V196S/R243N/K245S	V17S/R63N/K65S	33.2	4.2	13%	3	86.2	57.9	67%	2
V196S/T293N/R295S	V17S/T113N/R115S	154.9	45.9	30%	2	944.4	379.5	40%	2
V196S/D389N/Y391S	V17S/D205N/Y207S	119.8	98.2	82%	2	95.9	62.6	65%	3
V196S/K388N	V17S/K204N	134.0	54.7	41%	5	1522.3	969.2	64%	4
D119N/G121S/V196S/K388N	D119N/G121S/V17S/K204N	61.4	25.3	41%	2	63.7	13.9	22%	2
V196S/T428N/G430S	V17S/T244N/G246S	88.5	23.9	27%	2	839.1	63.1	8%	2
V196S/L211S/G219H/E266S	V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	30.7	7.2	23%	3	166.0	44.8	27%	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	D119N/G121S/V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	40.5	8.1	20%	2	75.5	18.9	25%	2
G114N/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	G114N/V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	62.4	21.0	34%	4	77.5	17.9	23%	2
V196S/E264N/E266S/K388N	V17S/E84N/E86S/K204N	64.2	36.0	56%	2	66.8	15.3	23%	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/K388N	D119N/G121S/V17S/L32S/G40H/K204N	57.2	24.5	43%	3	68.0	22.9	34%	2
G114N/V196S/L211S/G219H/K388N	G114N/V17S/L32S/G40H/K204N	95.7	52.5	55%	4	71.4	23.3	33%	2
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S/K388N	V17S/L32S/G40H/E84N/E86S/K204N	74.6	1.0	1%	2	133.9	43.3	32%	2

【表 18 - 1】

表 18. F X a 突然変異体の計算された K _{cat}									
突然変異 (成熟 F X a ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	F V a 存在				F V a 非存在			
		K _{cat}	(s ⁻¹)	±S.D. (s ⁻¹)	%CV	n	K _{cat} (s ⁻¹)	±S.D. (s ⁻¹)	%CV
FX 野生型	FX 野生型	46.4	16.4	35%	120	1.6E-02	6.3E-03	40%	100
I195L	I16L	37.8	14.7	39%	38	9.5E-03	4.1E-03	44%	16
V196I	V17I	31.2	8.6	27%	28	3.1E-04	9.4E-05	30%	10
V196S	V17S	28.3	4.7	17%	2	3.0E-03	8.6E-05	3%	2
T85N/K87S/V196S	T[85]N/K[87]S/V17S	31.7	10.9	34%	47	3.8E-05	8.1E-06	22%	25
Q56N/Q58S/V196S	Q[56]N/Q[58]S/V17S	3.8	0.8	20%	3	5.8E-05	4.1E-05	70%	3
K62N/G64S/V196S	K[62]N/G[64]S/V17S	21.1	6.4	30%	3	5.3E-05	3.7E-05	71%	3
L65N/E67S/V196S	L[65]N/E[67]S/V17S	42.8	0.2	0%	2	8.5E-05	6.2E-05	72%	3
E67N/V196S	E[67]N/V17S	27.9	9.2	33%	2	1.3E-04	8.3E-05	65%	3
L73N/G75S/V196S	L[73]N/G[75]S/V17S	28.9	13.9	48%	3	7.2E-05	1.8E-06	3%	2
G75N/E77S/V196S	G[75]N/E[77]S/V17S	10.9	3.0	27%	3	6.6E-05	4.6E-05	70%	3
R86N/L88S/V196S	R[86]N/L[88]S/V17S	14.8	4.1	28%	2	5.5E-05	2.9E-05	52%	3
G114N/V196S	G[114]N/V17S	30.0	16.0	53%	3	7.3E-05	2.8E-05	39%	3
D95N/D97S/V196S	D[95]N/D[97]S/V17S	21.4	7.0	33%	6	1.4E-04	8.2E-05	60%	4
E82S/V196S	E[82]S/V17S	13.5	3.1	23%	4	2.5E-05	1.3E-05	53%	4
E82N/F84S/V196S	E[82]N/F[84]S/V17S	7.2	3.8	53%	9	1.7E-05	5.4E-06	32%	10
G78N/N80S/V196S	G[78]N/N[80]S/V17S	15.0	0.9	6%	2	2.6E-05	7.6E-06	29%	5
E77N/K79S/V196S	E[77]N/K[79]S/V17S	6.5	2.2	34%	4	1.8E-05	9.6E-06	55%	5
D119N/G121S/V196S	D[119]N/G[121]S/V17S	11.3	2.4	22%	4	2.9E-05	9.0E-06	31%	4
L83N/V196S	L[83]N/V17S	22.0	4.9	22%	4	4.4E-05	2.7E-05	60%	4
K122S/V196S	K[122]S/V17S	11.2	0.8	7%	4	3.1E-05	1.0E-05	33%	3
E51N/V196S	E[51]N/V17S	19.5	6.5	33%	6	6.3E-05	3.1E-05	49%	5
Q58N/K60S/V196S	Q[58]N/K[60]S/V17S	27.1	6.7	25%	2	1.2E-04	2.3E-05	20%	2
G114N/D119N/G121S/V196S	G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S	22.5	1.5	7%	2	9.3E-05	1.6E-05	18%	2
G198A	G19A	18.0	6.4	36%	4	8.7E-06	2.1E-06	24%	4
G198V	G19V	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
G198R	G19R	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
G198K	G19K	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
G198P	G19P	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0

【表 18 - 2】

表 18. F X a 突然変異体の計算された k_{cat}												
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)		突然変異 (キモトリプシンナンバリング)		F V a 存在				F V a 非存在				
				k_{cat}	(s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n	k_{cat} (s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n
G198H		G19H	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
L211S/G219H		L32S/G40H	28.0		7.7	28%	2	7.0E-03	7.1E-05	1%	2	
G197P		G18P	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
D378N		D194N	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
D378S		D194S	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
V196L		V17L	39.8		5.1	13%	2	1.1E-03	1.1E-04	10%	2	
V196T		V17T	39.4		8.0	20%	2	2.8E-04	6.0E-05	22%	2	
V196P		V17P	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
G197V		G18V	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
G197T		G18T	活性なし		n.d.		n.d.	0	活性なし		n.d.	0
G197S		G18S	20.7		1.7	8%	2	1.6E-04	3.5E-05	23%	2	
E200A		E21A	29.6		6.8	23%	2	1.5E-03	4.5E-04	29%	2	
E200S		E21S	17.7		1.7	9%	2	2.8E-03	7.8E-04	27%	2	
E200V		E21V	30.2		5.5	18%	2	2.1E-03	4.4E-04	22%	2	
K202S		K23S	39.1		1.7	4%	2	1.6E-03	2.5E-05	2%	2	
R326A		R143A	19.4		2.6	13%	2	6.1E-03	1.6E-03	27%	2	
R326S		R143S	17.2		1.6	9%	2	2.6E-03	1.0E-03	39%	2	
R326T		R143T	16.8		0.5	3%	2	2.2E-03	8.1E-04	36%	2	
R326V		R143V	27.0		1.7	6%	2	4.7E-03	1.4E-03	30%	2	
R326Q		R143Q	16.5		0.1	1%	2	1.5E-03	4.7E-04	30%	2	
R326N		R143N	18.9		0.9	5%	2	2.2E-03	7.3E-04	32%	2	
R326M		R143M	14.1		0.6	4%	2	3.3E-03	3.0E-04	9%	2	
R326K		R143K	14.7		1.2	8%	2	9.7E-04	4.7E-05	5%	2	
R326Y		R143Y	22.3		3.5	16%	2	4.7E-03	1.5E-03	31%	2	
T327A		T144A	33.9		4.4	13%	2	2.8E-03	7.2E-04	26%	2	
T327L		T144L	35.2		5.4	15%	3	4.4E-03	4.3E-04	10%	2	
S334A		S152A	25.9		1.8	7%	2	2.4E-03	5.3E-04	22%	2	
S334T		S152T	33.2		1.5	4%	2	2.3E-03	8.6E-04	37%	2	
S334N		S152N	29.7		0.2	1%	2	1.6E-03	3.1E-04	20%	2	
R336E		R154E	33.4		6.5	20%	3	4.6E-03	9.9E-04	22%	2	

【 0 5 1 7 】

10

20

30

40

【表 18 - 3】

表 18. F X a 突然変異体の計算された k_{cat}									
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	F V a 存在				F V a 非存在			
		k_{cat}	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n	k_{cat} (s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n
K338A	K156A	35.6	6.9	19%	5	7.6E-04	3.6E-04	48%	4
K338S	K156S	31.8	5.3	17%	5	4.6E-04	2.3E-04	50%	4
K338N	K156N	31.3	5.3	17%	3	2.7E-03	5.8E-04	21%	2
K338R	K156R	41.2	0.6	1%	2	6.5E-03	4.4E-03	68%	2
K338V	K156V	34.2	3.5	10%	2	9.7E-04	3.9E-05	4%	2
K338Y	K156Y	47.7	8.3	17%	2	1.6E-03	1.9E-04	12%	2
K338M	K156M	53.6	12.2	23%	2	7.2E-03	3.2E-03	44%	2
T327A/K338A	T144A/K156A	45.0	3.8	8%	2	2.6E-04	3.9E-07	0%	2
T327L/K338M	T144L/K156M	28.3	1.7	6%	2	6.5E-03	5.2E-04	8%	2
E200V/T327L/K338M	E21V/T144L/K156M	37.9	1.5	4%	2	4.1E-03	3.1E-04	7%	2
E200V/T327L/S334A/K338M	E21V/T144L/S152A/K156M	20.6	2.6	12%	2	6.1E-04	3.3E-05	5%	2
V196S/G197A	V17S/G18A	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	12.6	1.8	15%	11	1.7E-05	3.0E-06	17%	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	D119N/G121S/V17S/L32S/G40H	14.6	2.0	14%	2	1.4E-05	3.7E-06	27%	2
G114N/V196S/L211S/G219H	G114N/V17S/L32S/G40H	12.9	3.0	23%	2	1.3E-05	2.2E-06	17%	2
G114N/D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	G114N/D119N/G121S/V17S/L32S/G40H	13.4	5.5	41%	3	1.0E-05	2.5E-06	25%	4
G197A/L211S/G219H	G18A/L32S/G40H	12.5	2.1	17%	2	2.1E-04	3.9E-05	19%	3
V196S/G197A/L211S/G219H	V17S/G18A/L32S/G40H	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
I195L/V196S	I16L/V17S	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
I195L/G197A	I16L/G18A	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	31.3	10.7	34%	4	1.9E-04	1.2E-04	62%	5
V196S/N214D	V17S/N35D	13.4	2.1	16%	3	3.6E-05	5.1E-06	14%	2
V196S/N214A	V17S/N35A	17.2	0.2	1%	2	3.8E-05	3.7E-06	10%	2
V196S/N214S	V17S/N35S	22.8	0.5	2%	2	5.6E-05	5.9E-06	11%	2
V196S/E216R	V17S/E37R	13.4	2.9	22%	3	4.6E-05	1.2E-05	25%	2
V196S/E216K	V17S/E37K	20.7	1.2	6%	2	4.2E-05	4.2E-06	10%	2
V196S/E216A	V17S/E37A	14.7	1.1	7%	2	3.7E-05	1.4E-05	37%	2
V196S/E216S	V17S/E37S	15.4	4.2	28%	2	3.0E-05	1.2E-05	41%	2

【表 18 - 4】

表 18. F X a 突然変異体の計算された k_{cat}		F V a 存在				F V a 非存在			
突然変異 (成熱 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリブシンナンバリング)	k_{cat} (s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n	k_{cat} (s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n
V196S/E218R	V17S/E39R	12.3	3.4	28%	3	4.3E-05	4.6E-06	11%	2
V196S/E218K	V17S/E39K	14.6	4.4	30%	2	3.3E-05	1.1E-05	34%	2
V196S/E218A	V17S/E39A	19.7	8.1	41%	2	3.9E-05	9.3E-06	24%	2
V196S/R332A	V17S/R150A	23.3	4.9	21%	4	8.3E-05	3.3E-05	40%	3
V196S/R332D	V17S/R150D	41.6	35.7	86%	5	2.4E-05	2.5E-06	10%	5
V196S/R332E	V17S/R150E	19.3	5.2	27%	2	5.4E-05	1.5E-05	28%	2
V196S/R332S	V17S/R150S	23.0	11.2	49%	6	2.1E-05	3.6E-06	17%	5
V196S/R332G	V17S/R150G	20.8	9.7	47%	5	1.6E-05	3.2E-06	20%	4
V196S/R332F	V17S/R143E	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
V196S/R332D	V17S/R143D	2.3	1.0	44%	5	6.9E-06	1.7E-06	25%	2
V196S/R332M	V17S/R143M	9.1	0.5	5%	2	5.8E-06	2.1E-06	35%	2
V196S/R332N	V17S/R143N	6.2	0.7	10%	3	4.8E-06	1.6E-06	34%	2
V196S/R332Q	V17S/R143Q	6.5	1.3	21%	12	6.8E-06	6.8E-06	100%	3
V196S/R273E	V17S/R93E	19.5	4.8	25%	3	3.9E-05	1.0E-05	26%	2
V196S/R273A	V17S/R93A	16.7	0.2	1%	2	2.7E-05	4.1E-06	15%	2
V196S/R424A	V17S/R240A	17.6	3.1	18%	2	2.9E-05	1.6E-05	55%	2
V196S/R424E	V17S/R240E	16.3	3.6	22%	7	2.5E-05	1.0E-05	40%	2
V196S/K420A	V17S/K236A	15.6	6.1	39%	2	2.7E-05	1.1E-06	4%	2
V196S/K420E	V17S/K236E	10.6	1.0	10%	2	2.4E-05	6.3E-06	27%	2
V196S/R306E	V17S/R125A	14.8	2.8	19%	2	2.1E-05	n.d.	n.d.	1
V196S/K276A	V17S/K96A	9.1	2.0	22%	2	1.7E-05	3.0E-06	18%	2
V196S/K276E	V17S/K96E	6.4	1.8	28%	2	1.0E-05	2.5E-06	24%	2
V196S/K420E/R424E	V17S/K236E/R240E	5.1	3.3	65%	3	2.6E-05	1.3E-05	49%	2
V196S/R273E/K420E/R424E	V17S/R93E/K236E/R240E	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
V196S/R273E/R306E/K420E/R424E	V17S/R93E/R125E/K236E/R240E	活性なし	n.d.	n.d.	0	活性なし	n.d.	n.d.	0
V196S/K338A	V17S/K156A	1.9	0.3	14%	2	3.0E-06	8.5E-07	28%	2
V196S/K338S	V17S/K156S	2.5	0.8	33%	10	8.9E-06	3.8E-06	42%	8
V196S/E215N/N217S	V17S/E36N/N38S	24.9	3.7	15%	3	9.4E-05	5.4E-05	58%	4
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	27.6	7.9	28%	4	7.1E-05	3.5E-05	50%	4

【 0 5 1 9 】

10

20

30

40

【表 18-5】

表 18. F X a 突然変異体の計算された k_{cat}		F V a 存在				F V a 非存在			
突然変異 (成熟 F X a ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシンナンバリング)	k_{cat} (s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n	k_{cat} (s^{-1})	$\pm S.D.$ (s^{-1})	%CV	n
D119N/G121S/V196S/E264N/E266S	D[119]N/G[121]S/V17S/E84N/E86S	12.6	10.9	87%	2	3.0E-05	1.2E-05	42%	2
G114N/V196S/E264N/E266S	G[114]N/V17S/E84N/E86S	23.2	0.0	0%	2	2.0E-05	1.7E-06	9%	2
V196S/R429N/L431S	V17S/R245N/L247S	25.0	8.1	32%	2	4.1E-05	6.7E-06	16%	2
V196S/R243N/K245S	V17S/R63N/K65S	5.1	1.7	34%	3	6.1E-05	4.9E-05	81%	2
V196S/T293N/R295S	V17S/T113N/R115S	23.1	9.4	40%	2	7.7E-05	1.6E-05	20%	2
V196S/D389N/Y391S	V17S/D205N/Y207S	8.5	2.8	34%	2	1.1E-04	5.3E-05	47%	3
V196S/K388N	V17S/K204N	24.3	6.9	28%	5	1.4E-04	9.8E-05	73%	4
D119N/G121S/V196S/K388N	D[119]N/G[121]S/V17S/K204N	24.0	0.3	1%	2	1.7E-05	6.4E-06	38%	2
V196S/T428N/G430S	V17S/T244N/G246S	21.0	2.4	11%	2	8.2E-05	3.5E-06	4%	2
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	13.1	5.1	39%	3	1.9E-05	8.8E-06	46%	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	13.8	2.7	20%	2	1.8E-05	1.4E-05	76%	2
G114N/V196S/L211S/G219H/E264N/E266S	G[114]N/V17S/L32S/G40H/E84N/E86S	15.4	6.8	44%	4	8.4E-06	3.9E-06	47%	2
V196S/E264N/E266S/K388N	V17S/E84N/E86S/K204N	17.2	2.3	14%	2	1.0E-05	6.0E-06	59%	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H/K388N	D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H/K204N	7.7	2.1	27%	3	9.0E-06	5.2E-06	58%	2
G114N/V196S/L211S/G219H/K388N	G[114]N/V17S/L32S/G40H/K204N	24.3	19.3	79%	4	8.3E-06	5.9E-06	71%	2
V196S/L211S/G219H/E264N/E266S/K388N	V17S/L32S/G40H/E84N/E86S/K204N	10.4	1.1	11%	2	1.9E-05	1.4E-05	70%	2

【表 19-1】

表 19. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k_{cat}/K_M) および相対的補因子依存性												
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	F V a 依存性触媒活性 (F V a 存在)					F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非存在)					
		k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1} s^{-1}$)	%CV	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1} s^{-1}$)	%C V	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	相対的 補因子 依存性
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	血漿 F X a	3.3E+08	1.1E+08	34%	129%	120	1.1E+05	4.5E+04	40%	151%	100	2,941
	FXa 野生型	2.6E+08	1.1E+08	42%	100%	38	7.5E+04	3.0E+04	40%	100%	16	3,427
	I195L	3.2E+08	8.3E+07	26%	126%	28	2.3E+03	9.6E+02	41%	3%	10	138,730
	V196I	2.2E+08	3.1E+07	14%	85%	2	2.2E+04	1.1E+03	5%	29%	2	9,857
	V196S	4.2E+08	1.5E+08	36%	163%	47	2.2E+02	1.2E+02	56%	0.3%	25	1,949,704
	T85N/K87S/V196S	9.7E+07	1.2E+07	12%	38%	3	1.2E+02	5.0E+01	41%	0.2%	3	796,199
	Q56N/Q58S/V196S	2.8E+08	2.7E+07	10%	109%	3	1.7E+02	6.6E+01	40%	0.2%	3	1,689,225
	K62N/G64S/V196S	3.9E+08	5.8E+07	15%	153%	2	2.0E+02	6.1E+01	30%	0.3%	3	1,954,206
	L65N/E67S/V196S	4.5E+08	5.2E+07	11%	176%	2	1.6E+02	6.3E+01	39%	0.2%	3	2,783,973
	E67N/V196S	2.6E+08	8.4E+07	32%	101%	3	1.0E+02	2.3E+00	2%	0.1%	2	2,577,649
	L73N/G75S/V196S	1.7E+08	7.6E+07	44%	67%	3	1.1E+02	2.4E+01	22%	0.1%	3	1,622,299
	G75N/E77S/V196S	2.6E+08	1.5E+08	58%	99%	2	2.0E+02	5.1E+01	25%	0.3%	3	1,260,991
	R86N/L88S/V196S	2.9E+08	1.3E+08	44%	113%	3	7.2E+02	1.9E+02	26%	1%	3	404,779
	G114N/V196S	2.0E+08	6.1E+07	31%	77%	6	1.1E+02	3.2E+01	28%	0.2%	4	1,720,332
	D95N/D97S/V196S	2.7E+08	1.0E+08	38%	106%	4	1.7E+01	5.5E+00	32%	0.0%	4	15,813,111
	E82S/V196S	1.5E+08	9.5E+07	61%	60%	9	1.1E+02	6.1E+01	56%	0.1%	10	1,414,270
	E82N/F84S/V196S	2.2E+08	7.5E+07	34%	87%	2	4.8E+01	1.6E+01	33%	0.1%	5	4,676,971
G78N/N80S/V196S	1.3E+08	5.7E+07	45%	49%	4	5.8E+01	3.7E+01	64%	0.1%	5	2,180,187	
E77N/K79S/V196S	1.5E+08	8.3E+07	57%	57%	4	7.7E+01	1.9E+01	25%	0.1%	4	1,913,457	
D119N/G121S/V196S	D119N/G121I/S/V17S	2.1E+08	5.2E+07	25%	80%	4	6.2E+01	1.4E+01	23%	0.1%	4	3,348,627
L83N/V196S	L83N/V17S	1.5E+08	3.8E+07	25%	59%	4	1.2E+02	4.5E+01	37%	0.2%	3	1,261,176
K122S/V196S	K122I/S/V17S	1.4E+08	1.9E+07	13%	55%	6	6.5E+01	2.5E+01	39%	0.1%	5	2,200,872
E51N/V196S	E51I/V17S	2.3E+08	2.0E+07	9%	88%	2	1.2E+02	1.2E+01	10%	0.2%	2	1,858,168
Q58N/K60S/V196S	Q58I/N/K160S/V17S	2.3E+08	4.1E+07	18%	90%	2	1.0E+02	6.3E+00	6%	0.1%	2	2,265,746
G114N/D119N/G121S/V196S	G114I/N/D119I/N/G121I/S/V17S	3.2E+08	4.1E+07	13%	125%	4	1.1E+02	5.4E+01	51%	0.1%	4	3,062,135

【表 19-2】

表 19. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k_{cat}/K_M) および相対的補因子依存性											
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	F V a 依存性触媒活性 (F V a 存在)				F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非存在)					相対的 補因子 依存性
		k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	野生型 k_{cat}/K_M の %	n
G198A		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198V		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198R		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198K		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198P		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G198H		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
L211S/G219H		4.3E+08	4.1E+07	10%	168%	2	6.2E+04	4.6E+03	7%	83%	2
G197P		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
D378N		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
D378S		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
V196L		3.7E+08	8.6E+07	23%	145%	2	8.4E+03	1.8E+03	22%	11%	2
V196T		3.4E+08	1.0E+08	30%	134%	2	2.0E+03	2.4E+02	12%	3%	2
V196P		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G197V		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G197T		活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
G197S		2.0E+08	8.4E+06	4%	78%	2	1.0E+03	1.5E+02	15%	1%	2

【表 19-3】

表 1 9. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k _{cat} /K _M) および相対的補因子依存性												
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	F V a 依存性触媒活性 (F V a 存在)					F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非存在)					相対的 補因子 依存性
		k _{cat} /K _M (M ⁻¹ s ⁻¹)	±S.D. (M ⁻¹ s ⁻¹)	%CV	野生型 k _{cat} /K _M の %	n	k _{cat} /K _M (M ⁻¹ s ⁻¹)	±S.D. (M ⁻¹ s ⁻¹)	%C V	野生型 k _{cat} /K _M の %	n	
E200A	E21A	2.5E+08	4.6E+07	18%	98%	2	9.5E+03	2.1E+03	22%	13%	2	26,489
E200S	E21S	1.1E+08	2.7E+05	0%	44%	2	2.3E+04	2.4E+03	10%	31%	2	4,796
E200V	E21V	2.4E+08	3.1E+07	13%	92%	2	1.3E+04	9.5E+02	7%	17%	2	18,368
K202S	K23S	3.7E+08	2.1E+07	6%	144%	2	1.1E+04	2.2E+03	20%	14%	2	34,688
R326A	R143A	1.6E+08	1.3E+07	8%	64%	2	4.3E+04	2.5E+03	6%	57%	2	3,817
R326S	R143S	1.7E+08	1.3E+06	1%	66%	2	2.1E+04	5.1E+03	25%	28%	2	8,216
R326T	R143T	2.1E+08	2.6E+06	1%	80%	2	1.7E+04	5.0E+03	29%	23%	2	11,901
R326V	R143V	4.5E+08	1.3E+08	29%	176%	2	2.4E+04	2.5E+03	10%	32%	2	18,752
R326Q	R143Q	2.4E+08	3.3E+07	14%	93%	2	1.2E+04	3.9E+03	33%	16%	2	19,958
R326N	R143N	2.3E+08	3.5E+06	2%	89%	2	1.8E+04	5.7E+03	31%	24%	2	12,662
R326M	R143M	1.8E+08	4.6E+06	3%	70%	2	2.0E+04	6.4E+03	32%	26%	2	9,107
R326K	R143K	1.3E+08	1.2E+07	9%	50%	2	6.2E+03	9.6E+02	16%	8%	2	20,886
R326Y	R143Y	3.3E+08	1.9E+07	6%	128%	2	3.2E+04	3.4E+03	11%	43%	2	10,164
T327A	T144A	2.9E+08	2.4E+07	8%	114%	2	1.7E+04	1.7E+03	10%	22%	2	17,524
T327L	T144L	2.9E+08	1.1E+08	37%	114%	3	2.4E+04	9.0E+03	37%	32%	2	12,215
S334A	S152A	2.3E+08	5.1E+07	22%	89%	2	1.7E+04	4.0E+03	24%	22%	2	13,610
S334T	S152T	3.2E+08	8.7E+07	27%	125%	2	1.6E+04	1.1E+04	65%	22%	2	19,693
S334N	S152N	3.2E+08	7.3E+07	23%	124%	2	1.0E+04	1.8E+03	17%	14%	2	31,084
R336E	R154E	3.2E+08	8.4E+07	26%	126%	3	2.9E+04	1.0E+03	3%	39%	2	11,104
K338A	K156A	3.6E+08	4.2E+07	12%	139%	5	4.4E+03	1.8E+03	41%	6%	4	80,902
K338S	K156S	2.9E+08	4.5E+07	15%	114%	5	2.7E+03	1.1E+03	41%	4%	4	109,860
K338N	K156N	2.9E+08	5.5E+07	19%	111%	3	1.8E+04	3.1E+03	18%	24%	2	16,112
K338R	K156R	3.7E+08	7.9E+06	2%	143%	2	3.3E+04	1.4E+04	42%	45%	2	10,973
K338V	K156V	3.9E+08	6.7E+07	17%	151%	2	6.3E+03	1.6E+03	26%	8%	2	61,833
K338Y	K156Y	3.1E+08	5.4E+07	17%	122%	2	9.7E+03	9.1E+02	9%	13%	2	32,379
K338M	K156M	3.0E+08	2.4E+07	8%	115%	2	3.9E+04	1.2E+04	30%	52%	2	7,576
T327A/K338A	T144A/K156A	2.4E+08	5.3E+06	2%	93%	2	1.0E+03	1.9E+02	18%	1%	2	231,251

【 0 5 2 3 】

10

20

30

40

【表 19-4】

表 19. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k_{cat}/K_M) および相対的補因子依存性											
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリブシン ナンバリング)	F V a 依存性触媒活性 (F V a 存在)				F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非存在)					
		k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	野生型 k_{cat}/K_M の %	n
T327L/K338M	T144L/K156M	1.9E+08	2.3E+06	1%	73%	2	3.8E+04	2.9E+03	8%	50%	2
E200V/T327L/K338M	E214V/T144L/K156M	3.0E+08	1.1E+07	4%	117%	2	2.5E+04	3.3E+03	13%	34%	2
E200V/T327L/S334A/K338M	E214V/T144L/S152A/K156M	2.9E+08	6.1E+06	2%	114%	2	3.6E+03	5.5E+01	2%	5%	2
V196S/G197A	V17S/G18A	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	2.7E+08	7.0E+07	26%	107%	11	1.5E+02	9.9E+00	7%	0.2%	2
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	D119N/G121S/V17S/L32S/G40H	4.0E+08	1.8E+08	44%	156%	2	1.7E+02	1.2E+02	73%	0.2%	2
G114N/V196S/L211S/G219H	G114N/V17S/L32S/G40H	3.7E+08	8.9E+07	24%	143%	2	1.8E+02	8.0E+01	43%	0.2%	2
G114N/D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	G114N/D119N/G121S/V17S/L32S/G40H	3.3E+08	2.4E+07	7%	128%	3	8.3E+01	2.4E+01	29%	0.1%	4
G197A/L211S/G219H	G18A/L32S/G40H	1.3E+08	1.8E+07	13%	52%	2	1.9E+03	7.0E+02	37%	3%	3
V196S/G197A/L211S/G219H	V17S/G18A/L32S/G40H	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
I195L/V196S	I16L/V17S	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
I195L/G197A	I16L/G18A	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	2.9E+08	2.7E+07	10%	112%	4	7.0E+02	1.1E+02	16%	0.9%	5
V196S/N214D	V17S/N35D	2.1E+08	1.4E+07	7%	82%	3	1.4E+02	2.0E+01	14%	0.2%	2
V196S/N214A	V17S/N35A	2.1E+08	3.8E+07	18%	82%	2	2.2E+02	4.7E+01	22%	0.3%	2
V196S/N214S	V17S/N35S	2.9E+08	4.1E+07	14%	112%	2	3.5E+02	1.7E+01	5%	0.5%	2
V196S/E216R	V17S/E37R	2.3E+08	2.4E+07	11%	88%	3	1.7E+02	4.1E+01	24%	0.2%	2
V196S/E216K	V17S/E37K	3.0E+08	2.1E+07	7%	115%	2	1.8E+02	7.7E+01	42%	0.2%	2
V196S/E216A	V17S/E37A	2.2E+08	3.2E+07	14%	87%	2	1.4E+02	4.6E+00	3%	0.2%	2

【 0 5 2 4 】

10

20

30

40

【表 19-5】

表 19. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k_{cat}/K_M) および相対的補因子依存性												
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	F V a 依存性触媒活性 (F V a 依存)					F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非依存)					相対的 補因子 依存性
		k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	
V196S/E216S	V17S/E37S	1.9E+08	7.2E+06	4%	75%	2	1.8E+02	1.6E+01	9%	0.2%	2	1,039,836
V196S/E218R	V17S/E39R	1.9E+08	1.3E+07	7%	74%	3	1.8E+02	1.4E+01	8%	0.2%	2	1,028,287
V196S/E218K	V17S/E39K	1.9E+08	3.4E+07	18%	73%	2	1.6E+02	2.3E+01	14%	0.2%	2	1,176,402
V196S/E218A	V17S/E39A	2.5E+08	8.3E+07	34%	96%	2	1.8E+02	4.7E+01	26%	0.2%	2	1,364,144
V196S/R332A	V17S/R150A	3.5E+08	3.0E+07	9%	136%	4	2.2E+02	3.9E+01	18%	0.3%	3	1,618,345
V196S/R332D	V17S/R150D	4.3E+08	1.2E+08	28%	168%	5	1.8E+02	6.7E+01	37%	0.2%	5	2,395,228
V196S/R332E	V17S/R150E	3.5E+08	3.8E+06	1%	136%	2	3.4E+02	2.2E+02	63%	0.5%	2	1,019,834
V196S/R332S	V17S/R150S	3.3E+08	3.9E+07	12%	126%	6	1.5E+02	3.5E+01	24%	0.2%	5	2,209,279
V196S/R332G	V17S/R150G	3.8E+08	6.1E+07	16%	149%	5	9.1E+01	3.4E+01	37%	0.1%	4	4,218,821
V196S/R326E	V17S/R143E	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.
V196S/R326D	V17S/R143D	1.3E+08	2.7E+07	21%	49%	5	3.2E+00	8.3E-01	26%	0.0%	2	39,452,222
V196S/R326M	V17S/R143M	2.3E+08	4.1E+06	2%	90%	2	2.2E+01	1.8E+00	8%	0.0%	2	10,595,674
V196S/R326N	V17S/R143N	3.1E+08	3.4E+07	11%	121%	3	1.4E+01	6.5E-01	5%	0.0%	2	22,111,090
V196S/R326Q	V17S/R143Q	3.0E+08	5.7E+07	19%	118%	12	6.6E+00	2.5E+00	39%	0.0%	3	46,198,526
V196S/R273E	V17S/R93E	3.3E+08	5.6E+07	17%	128%	3	2.0E+02	1.4E+01	7%	0.3%	2	1,681,120
V196S/R273A	V17S/R93A	2.7E+08	4.2E+07	16%	105%	2	1.9E+02	6.9E+01	37%	0.2%	2	1,446,828
V196S/R424A	V17S/R240A	2.7E+08	1.9E+07	7%	106%	2	2.7E+02	1.5E+02	56%	0.4%	2	993,583
V196S/R424E	V17S/R240E	2.4E+08	5.1E+07	21%	95%	7	1.5E+02	2.1E+00	1%	0.2%	2	1,663,352
V196S/K420A	V17S/K236A	2.8E+08	5.4E+06	2%	111%	2	4.0E+02	1.5E+02	38%	0.5%	2	712,414
V196S/K420E	V17S/K236E	2.2E+08	5.0E+07	23%	86%	2	2.4E+02	9.2E+01	39%	0.3%	2	927,406
V196S/R306E	V17S/R125A	2.2E+08	5.4E+07	24%	87%	2	1.9E+02	n.d.	n.d.	0.2%	1	1,194,201
V196S/K276A	V17S/K96A	1.6E+08	3.1E+06	2%	60%	2	5.0E+01	5.3E+00	11%	0.1%	2	3,117,288
V196S/K276E	V17S/K96E	1.3E+08	1.5E+07	12%	52%	2	2.3E+01	3.0E+00	13%	0.0%	2	5,713,870
V196S/K420E/R424E	V17S/K236E/R240E	7.9E+07	2.3E+07	29%	31%	3	1.7E+02	3.6E+01	21%	0.2%	2	465,277
V196S/R273E/K420E/R424E	V17S/R93E/K236E/R240E	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.

【表 19-6】

表 19. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k_{cat}/K_M) および相対的補因子依存性		F V a 依存性触媒活性 (F V a 存在)						F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非存在)					
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	相対的 補因子 依存性	
V196S/R273E/R306E/K4 20E/R424E	V17S/R93E/R125E/K 236E/R240E	活性なし	n.d.	n.d.	0%	0	活性なし	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	
V196S/K338A	V17S/K156A	1.1E+08	3.3E+07	30%	43%	2	3.9E+00	9.6E-01	24%	0.0%	2	28,406,569	
V196S/K338S	V17S/K156S	1.4E+08	4.9E+07	34%	56%	10	3.0E+00	9.4E-01	31%	0.0%	8	47,490,591	
V196S/E215N/N217S	V17S/E36N/N38S	1.7E+08	4.9E+07	29%	66%	3	8.7E+01	5.2E+00	6%	0.1%	4	1,971,094	
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	2.8E+08	6.6E+07	23%	111%	4	7.5E+01	6.0E+00	8%	0.1%	4	3,815,411	
D119N/G121S/V196S/E 264N/E266S	D[119]N/G[121]S/V1 7S/E84N/E86S	1.1E+08	2.9E+07	26%	44%	2	1.7E+02	1.5E+01	9%	0.2%	2	675,381	
G114N/V196S/E264N/E 266S	G[114]N/V17S/E84N/ E86S	4.3E+08	1.5E+08	34%	168%	2	2.8E+02	1.8E+02	66%	0.4%	2	1,562,440	
V196S/R429N/L431S	V17S/R245N/L247S	2.3E+08	8.3E+07	36%	89%	2	8.2E+01	6.6E+00	8%	0.1%	2	2,791,109	
V196S/R243N/K245S	V17S/R63N/K65S	1.5E+08	3.5E+07	23%	58%	3	6.6E+02	1.3E+02	19%	0.9%	2	226,278	
V196S/T293N/R295S	V17S/T113N/R115S	1.5E+08	1.7E+07	12%	57%	2	8.5E+01	1.8E+01	21%	0.1%	2	1,733,605	
V196S/D389N/Y391S	V17S/D205N/Y207S	9.2E+07	5.1E+07	56%	36%	2	1.3E+03	2.7E+02	21%	2%	3	70,856	
V196S/K388N	V17S/K204N	2.0E+08	7.1E+07	36%	77%	5	8.7E+01	1.0E+01	12%	0.1%	4	2,288,700	
D119N/G121S/V196S/K 388N	D[119]N/G[121]S/V1 7S/K204N	4.3E+08	1.8E+08	42%	167%	2	2.6E+02	4.4E+01	17%	0.3%	2	1,661,646	
V196S/T428N/G430S	V17S/T244N/G246S	2.5E+08	9.4E+07	38%	97%	2	9.8E+01	3.2E+00	3%	0.1%	2	2,555,985	
V196S/L211S/G219H/E2 64N/E266S	V17S/L32S/G40H/E8 4N/E86S	4.2E+08	6.7E+07	16%	163%	3	1.1E+02	2.2E+01	20%	0.2%	2	3,707,889	
D119N/G121S/V196S/L 211S/G219H/E264N/E26 6S	D[119]N/G[121]S/V1 7S/L32S/G40H/E84N/ E86S	3.4E+08	9.6E+05	0%	132%	2	2.3E+02	1.3E+02	56%	0.3%	2	1,486,131	
G114N/V196S/L211S/G 219H/E264N/E266S	G[114]N/V17S/L32S/ G40H/E84N/E86S	2.5E+08	7.7E+07	30%	98%	4	1.2E+02	7.8E+01	66%	0.2%	2	2,147,579	
V196S/E264N/E266S/K3 88N	V17S/E84N/E86S/K2 04N	3.3E+08	2.2E+08	67%	128%	2	1.7E+02	1.3E+02	76%	0.2%	2	1,969,113	

【 0 5 2 6 】

10

20

30

40

【表 1 9 - 7】

表 1 9. F X a 変異体の計算された特異性定数 (k_{cat}/K_M) および相対的補因子依存性											
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (ギモトリプシン ナンバリング)	F V a 依存性触媒活性 (F V a 存在)				F V a 非依存性触媒活性 (F V a 非存在)				相対的 補因子 依存性	
		k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	野生型 k_{cat}/K_M の %	n	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%C V	野生型 k_{cat}/K_M の %	n
D119N/G121S/V196S/L 211S/G219H/K388N	D[119]N/G[121]S/V1 7S/L32S/G40H/K204 N	1.5E+08	9.1E+07	59%	60%	3	1.3E+02	3.4E+01	27%	0.2%	2
G114N/V196S/L211S/G 219H/K388N	G[114]N/V17S/L32S/ G40H/K204N	2.4E+08	8.5E+07	35%	94%	4	1.1E+02	4.7E+01	44%	0.1%	2
V196S/L211S/G219H/E2 64N/E266S/K388N	V17S/L32S/G40H/E8 4N/E86S/K204N	1.4E+08	1.3E+07	9%	54%	2	1.7E+02	1.6E+02	92%	0.2%	2

【 0 5 2 7】

実施例 5

アンチトロンビン／ヘパリン複合体による F X a の阻害の決定

10

20

30

40

50

アンチトロンビン／ヘパリン複合体（AT／ヘパリン）による野生型FXaまたはFXa変異体の阻害を、小分子基質、 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHG-Gly-Arg-AMC}$ （Pefaf fluor FXa；Centerchem）に対するFXaの触媒活性についてのAT／ヘパリンによる阻害のレベルを測定することによって評価した。予め定義されたアッセイ条件下でFXa変異体の触媒活性の50%阻害（ IC_{50} ）のために必要であったATのモル濃度に相当する $K_{0.5}$ 値を、検査した各FXa変異体について決定した。阻害反応を、より長いヘパリン鎖により提供される「鋳型（templating）」効果によって阻害反応の速度を増加する全長未分画ヘパリン（UFH；Calbiochem）の存在下で実施した（たとえば、Olsonら（2004）Thromb Haemost 92(5), 929-939参照）。AT／UFH複合体による野生型FXaまたはFXa変異体の阻害についての見かけの二次速度定数（ K_{app} ）も修飾したプロトコール（AT／UFH複合体とのインキュベーション時間を変更した）を用いて直接評価した。

10

【0528】

A. アンチトロンビン／UFH複合体によるFXaの阻害

UFH存在下での阻害反応のために、1×緩衝液A（20mM Hepes、150mM NaCl、5mM CaCl_2 、0.01% Tween-20、0.1% PEG 8000、pH7.4）1.0mL容量中の過剰UFH（2μM）の溶液中への血漿精製ヒトAT-III（Molecular Innovations）の20μM貯蔵物の希釈によって、2000nM、1000nM、200nMまたは100nM AT／UFHの2x溶液（最終2μM UFH）を調製した。AT／UFH溶液を15分間、室温でインキュベートし、次に、2μM UFHを含有する1×緩衝液Aの容量500μLで96ディープウエルポリプロピレンプレート中に2倍連続希釈した。ATの最終希釈物はATの出発濃度に依存し、2000-0nM、1000-0nM、200-0nMまたは100-0nM（すなわち列A-H）の範囲であった。標準条件下でAT阻害に対する増加した耐性を示した変異体を、より高い濃度のATを使用してさらに試験した。各AT希釈物35μLのアリコート、96ウエルV底保存プレートのそれらそれぞれの列に分注し、全てのカラム（すなわち1-12）を満たした。FXa変異体を最初に1×緩衝液A中に100nMへ希釈した。次に、各100nM FXa変異体50μLを1×緩衝液A 2.5mL中、2.0nMの濃度へ希釈し、次に、同じ予め定義したプレートマップ（プレート1枚当たりFXa変異体4種）に従ってこの溶液70μLを96ウエルV底保存プレートに分注した。

20

30

【0529】

アッセイ反応は、各FXa変異体に対して計2枚の重複アッセイプレートにおいて1ウェル当たりAT／UFHの各希釈物35μLを含有するプレートにFXa溶液35μLを分配するようにプログラムしたBioMek FX liquid handling systemを用いて開始した。最終阻害アッセイ条件は、1.0nM FXa、および、1μM UFH中の35nMから0nM、50nMから0nM、100nMから0nM、500nMから0nMまたは1000nMから0nMのATの範囲のAT／UFH希釈物であった。

【0530】

40

阻害反応物を30秒間、室温（～25℃）でさらにインキュベートし、反応物40μLアリコートを、15mg/mLポリブレンを補ったアッセイ緩衝液A中に0.3mM Pefaf fluor Xaを20μL含有する96ウェル黒色ハーフエリアプレートにBioMek FXを移した。AT／UFH反応をクエンチするために、最終濃度5mg/mLのポリブレン（ヘキサジメトリンブロミド）を反応物に加えた。FXaの残存活性を、25℃に設定した蛍光プレート読み取り装置において基質切断の初速度を60分間追跡することによって評価した。残存活性の決定のための最終アッセイ条件は、緩衝液A中の2.0nM FXa変異体、0.1mM Pefaf fluor FXおよび5mg/mLポリブレンであった。

【0531】

50

AT/U FHによるFXaまたはFXa変異体に対する阻害の程度を決定するために、SoftMax Pro application (Molecular Devices) で集めた生データを、TXTファイルとして出力した。さらなる非線形データ分析を、XE Runner data analysis module (IDBS Software) を用いるActivityBase software packageで直接実施した。テンプレートを、各実験AT濃度で各FXa反復についてのAT希釈系列、ATのFXaに対する比および V_i/V_0 比を算出するために用いた。残存FXa活性(V_i/V_0 として表す)対AT濃度の非線形回帰分析を、 $[C + (Amp * (1 - (X / (K_{0.5} + X))))]$; 式中、C = オフセット (アッセイの経過において100% 阻害に達しなかったデータセットの外挿を可能にするために0に固定)、Amp = フィットおよび $K_{0.5}$ の振幅 (アッセイ条件下で最大半量の阻害のために必要なATの濃度に相当する)、の形の双曲線阻害方程式を用いて処理した。

10

【0532】

いくつかのFXa変異体について、AT/U FHはATの検査した最高濃度で総プロテアーゼ活性の10~15%未満を阻害し、標準スクリーニング条件下でのアッセイについて検出の上限を表している。したがって10%未満の最大阻害を有する変異体は、10000nMの下限 $K_{0.5}$ 値に帰され、ほとんどの場合は報告された値より大きなAT抵抗性を有すると予測される。

【0533】

表20は、AT/U FHを用いて実施したアッセイの結果を提供する。結果は、フィットされた $K_{0.5}$ パラメーターとしておよび、野生型FXaと比較した各変異体についてのAT-I I I抵抗性の程度をフィットされた $K_{0.5}$ 値の比($K_{0.5}$ 変異体/ $K_{0.5}$ 野生型)として表す表現として表す。比較に用いた野生型FXaポリペプチドは、実施例1-2において調製された組換え野生型FXaであった。

20

【0534】

いくつかのFXa変異体は、野生型FXa (FXa WT) と比較して500倍を超えて増加したATに対する抵抗性を示した。たとえばFXa-V196S/K276E、FXa-V196S/R332G、FXa-V196S/R332D、FXa-V196S/R326D、FXa-V196S/K338S、FXa-V196S/K420AおよびFXa-V196S/R424Eは、AT-I I Iに顕著な抵抗性を示す群に含まれる。

30

【0535】

【表 20-1】

表 20. AT-III/U FHによるFXa変異体の阻害						
突然変異 (成熟FX ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	$K_{0.5}$ (nM)	$\pm$ S.D. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}$ $/K_{0.5\text{-wt}}$	n
血漿 FXa	血漿FXa	2	1	44%	1	23
FXa野生型	FXa野生型	2	1	59%	1	10
I195L	I16L	89	41	47%	49	17
V196I	V17I	5	2	37%	3	3
V196S	V17S	132	25	19%	73	14
L211S/G219H	L32S/G40H	8	2	30%	4	3
V196L	V17L	18	2	10%	10	3
V196T	V17T	48	3	7%	26	2
G197S	G18S	75	9	11%	41	2
E200A	E21A	5	1	24%	3	2
E200S	E21S	2	0	6%	1	2
E200V	E21V	4	0	6%	2	2
K202S	K23S	5	2	54%	3	2
R326A	R143A	3	1	19%	2	2
R326S	R143S	3	0	6%	1	2
R326T	R143T	5	0	7%	3	2
R326V	R143V	10	2	24%	5	2
R326Q	R143Q	4	2	45%	2	2
R326N	R143N	10	7	69%	6	4
R326M	R143M	7	3	43%	4	4
R326K	R143K	6	1	14%	3	2
R326Y	R143Y	6	1	11%	3	2
T327A	T144A	5	1	13%	3	2
T327L	T144L	5	2	33%	3	2

【0536】

10

20

30

【表 20-2】

表 20. AT-III/UFHによるFXa変異体の阻害						
突然変異 (成熟FX ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	$K_{0.5}$ (nM)	$\pm$ S.D. (nM)	%CV	$K_{0.5-mut}$ $/K_{0.5-wt}$	n
S334A	S152A	12	8	69%	7	2
S334T	S152T	19	9	45%	11	2
S334N	S152N	8	0	4%	4	2
R336E	R154E	5	0	6%	3	2
K338A	K156A	23	3	13%	13	4
K338S	K156S	34	8	24%	19	4
K338N	K156N	8	1	19%	4	2
K338R	K156R	6	1	24%	3	2
K338V	K156V	52	2	4%	29	2
K338Y	K156Y	7	0	6%	4	2
K338M	K156M	4	1	25%	2	2
T327A/K338A	T144A/K156A	42	3	8%	23	2
T327L/K338M	T144L/K156M	5	1	27%	3	2
E200V/T327L/K338M	E21V/T144L/K156M	8	2	27%	4	2
E200V/T327L/S334A/K338M	E21V/T144L/S152A/K156M	40	13	31%	22	2
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	194	35	18%	108	4
G197A/L211S/G219H	G18A/L32S/G40H	128	43	34%	71	4
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	180	29	16%	100	4
V196S/N214D	V17S/N35D	154	18	12%	86	2
V196S/N214A	V17S/N35A	185	107	58%	103	2
V196S/N214S	V17S/N35S	186	7	4%	103	2
V196S/E216R	V17S/E37R	236	57	24%	131	2
V196S/E216K	V17S/E37K	400	99	25%	222	4
V196S/E216A	V17S/E37A	279	111	40%	155	2
V196S/E216S	V17S/E37S	178	31	17%	99	2
V196S/E218R	V17S/E39R	321	22	7%	178	2
V196S/E218K	V17S/E39K	404	200	49%	224	2
V196S/E218A	V17S/E39A	167	38	23%	93	2
V196S/R332A	V17S/R150A	3757	2834	75%	2085	4
V196S/R332D	V17S/R150D	7284	3841	53%	4042	2
V196S/R332E	V17S/R150E	3961	2026	51%	2198	4
V196S/R332S	V17S/R150S	7247	3345	46%	4022	4
V196S/R332G	V17S/R150G	8357	3285	39%	4638	4
V196S/R326D	V17S/R143D	5455	3531	65%	3027	2
V196S/R326M	V17S/R143M	850	286	34%	472	4
V196S/R326N	V17S/R143N	1178	472	40%	654	4
V196S/R326Q	V17S/R143Q	642	148	23%	356	4
V196S/R273E	V17S/R93E	1491	923	62%	828	2
V196S/R273A	V17S/R93A	1144	552	48%	635	4
V196S/R424A	V17S/R240A	1756	811	46%	975	4
V196S/R424E	V17S/R240E	3969	3725	94%	2203	4
V196S/K420A	V17S/K236A	10000	0	0%	5550	3
V196S/K420E	V17S/K236E	10000	0	0%	5550	3
V196S/R306E	V17S/R125A	10000	0	0%	5550	3
V196S/K276A	V17S/K96A	7450	3606	48%	4135	2

【表 20-3】

表 20. AT-III/U FHによるFXa変異体の阻害						
突然変異 (成熟FX ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	$K_{0.5}$ (nM)	$\pm$ S.D. (nM)	%CV	$K_{0.5\text{-mut}}$ $/K_{0.5\text{-wt}}$	n
V196S/K276E	V17S/K96E	10000	0	0%	5550	2
V196S/K420E/R4 24E	V17S/K236E/R240 E	3019	1649	55%	1675	4
V196S/K338A	V17S/K156A	1783	692	39%	990	4
V196S/K338S	V17S/K156S	2260	975	43%	1254	4

10

* 10000 nMの $K_{0.5}$ 値は、アッセイ条件下で10%未満の阻害を有するこれらの変異体についての下限值を示す。

【0538】

B. アンチトロンビン/U FH複合体によるFXaの阻害に対する二次速度定数(k_{ap})の決定

AT/U FHによるFXa変異体の阻害に対する二次速度定数(k_{app})を、実施例5Aに記載したのと同じアッセイを若干の変更を伴って用いて決定した。使用される方法は、競合速度論的または不連続的方法よりも、同時に複数の変異体に対する二次速度定数を評価するためにさらに変更することができる(たとえば、Olsonら(2004) Thromb Haemost 92(5), 929-939参照)。

20

【0539】

U FHの存在下での阻害反応のために、AT/U FHの1000 nM溶液を、1×緩衝液A(20 mM Hepes、150 mM NaCl、5 mM CaCl_2 、0.01% Tween-20、0.1% PEG 8000、pH 7.4) 1.0 mL容量の中の過剰量U FH(2 μ M)溶液中への血漿精製ヒトAT(Molecular Innovations) 20 μ M保存物の希釈によって調製した。AT/U FH溶液を、15分間、室温でインキュベートし、2 μ M U FHを含有する1×緩衝液Aの最終容量500 μ Lで96ディープウエルポリプロピレンプレートのカラムにおいて2.0倍系列希釈した。変更した k_{app} アッセイのためのAT-IIIの最終希釈は、500 nM-0 nM(すなわち列A-H)の範囲であった。各AT-III希釈物の合計35 μ Lを96ウエルV底保存プレートのそれらそれぞれの列に全てのカラムを満たすように(すなわち1~12)分注した。FXa変異体を1×緩衝液A中に100 nMに最初に希釈した。次に、各100 nM FXa変異体の50 μ Lを1×緩衝液A 2.5 mL中で濃度2.0 nMへ希釈し、次に、上記と同じ予め定義したプレートマップ(プレート1枚当たりFXa変異体4種)に従ってこの溶液の70 μ Lアリコート96ウエルV底保存プレートに分注した。

30

【0540】

アッセイ反応は、各FXa変異体に対して計2枚の重複アッセイプレートにおいて1ウエル当たりAT/U FHの各希釈物35 μ Lを含有するプレートにFXa溶液35 μ Lを分配するようにプログラムしたBioMek FX liquid handling systemを用いて開始した。最終阻害アッセイ条件は、1.0 nM FXaおよび1 μ M U FH中に500 nMから0 nMの範囲のAT希釈物であり、ヘパリンは過剰のままであった。阻害反応物をさらに、予測される阻害速度定数に依存して室温(~25°C)で様々な時間インキュベートし、>90%阻害がアッセイにおけるATの最も高い濃度(500 nM)で達成できるように調整した。典型的なインキュベーション時間を各変異体または変異体の種類について特異的に決定したが、全般的には表21に概説したインキュベーション時間に従った。

40

【0541】

表21. 予測される k_{app} 値に基づくアッセイインキュベーション時間

【表 2 1】

予測される k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	FXa/ATIII インキュベーション(秒)
1.0E-07	10
1.0E-06	30
1.0E-05	120
1.0E-04	600
1.0E-03	3600
1.0E-02	7200

10

【0542】

予め決定されたインキュベーション時間後、15 mg/mLポリブレンを補ったアッセイ緩衝液A中に0.3 mM Pefluor Xaを20 µL含む96ウェル黒色ハーフエリアプレートに、反応物の40 µLアリコートをしてBioMek FXによって移した。最終濃度5 mg/mLのポリブレン（ヘキサジメトリンブロミド）を、AT/U FH 反応をクエンチするために緩衝液Aに添加した。FXaの残存活性を25℃に設定した蛍光読み取り装置において基質切断の初速度を60分間追跡することによって評価した。残存活性の決定のための最終アッセイ条件は、緩衝液A中、1.0 nM FXa変異体、0.1 mM Pefluor Xaおよび5 mg/mL ポリブレンであった。ActivityBase software packageおよびXE Runner data analysis module (IDBS Software)を用いた実施例5AにおいてAT/U FH阻害アッセイについて上に記載したのと類似するやり方で $K_{0.5}$ 値を算出するためのデータ分析を実施した。実施例5Aに概説した擬一次条件下でのアッセイ設定を用いて、種々のインキュベーション時間を検査することにより、次の方程式：

20

30

方程式（8）

【数6】

$$k_{app} = \frac{k_{obs}}{\left(\frac{[AT]}{S.I.} \right)}$$

方程式（9）

【数7】

$$k_{obs} = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$$

40

を用いてATによる阻害についての見かけの二次速度定数（ k_{app} ）を算出することが可能である。

【0543】

$t_{1/2}$ （アッセイの時間によって定義される）での $K_{0.5} = [AT]$ についてのフィット値から、ATによる所与のFXa変異体の阻害についての K_{obs} およびそれにより K_{app} を算出するために必要な全ての値が入手可能になる。算出された K_{app} 値は、文献において典型的に報告される値を示すことから本算出において1.2の一定値をも

50

たらず阻害の化学量論（S．I．）における変化のいかなる潜在的影響も考慮していない（たとえば、Olsonら（2004）Thromb Haemost 92(5), 929-939参照）。

【0544】

表22は、AT/U FHを用いて実施した二次速度アッセイの結果を提供する。結果は、フィットされた K_{app} パラメーターとしておよび、野生型FXaと比較した各変異体についてのAT抵抗性の程度をそれらのフィットされた K_{app} 値の比（ K_{app} 野生型/ K_{app} 変異体）として表す表現としての両方で表す。比較のために使用される野生型FXaポリペプチドは、実施例1-3に記載されているとおり、配列番号：1に記載されているFX遺伝子のクローニングから産生され、配列番号：134のアミノ酸1-139および195-448として記載されているアミノ酸配列を有するポリペプチドとしてCHO細胞から発現される、組換え野生型FXa（すなわちFX WTポリペプチド）であった。いくつかのFXa変異体は、野生型FXaと比較して300倍を超えて増加したATに対する抵抗性を示した。例えば、FXa-V196S/R332G、FXa-V196S/K420E/R424E、FXa-V196S/R332D、FXa-V196S/R332SおよびFXa-V196S/K338Sは、ATに顕著な抵抗性を示すこの群に含まれる。

【0545】

【表22-1】

表22. AT/U FHによる阻害についての二次速度定数						
突然変異 (成熟FX ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	k_{app-wt} / $k_{app-mut}$	n
血漿 FXa	血漿 FXa	1.4E+07	7.2E+06	52%	1	3
FX 野生型	FX 野生型	9.7E+06	4.6E+06	47%	1	6
I195L	I16L	5.3E+05	9.1E+04	17%	18	4
V196S	V17S	5.3E+05	1.7E+05	32%	18	11

【0546】

10

20

【表 2 2 - 2】

表 2 2. AT/U FHによる阻害についての二次速度定数						
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリブシン ナンバリング)	k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	k_{app-wt} / k_{app-} mut	n
T85N/K87S/V196S	T[85]N/K[87]S/V17S	1.8E+05	2.1E+03	1%	55	2
Q56N/Q58S/V196S	Q[56]N/Q[58]S/V17S	3.2E+05	2.1E+04	7%	31	2
K62N/G64S/V196S	K[62]N/G[64]S/V17S	2.8E+05	4.3E+03	2%	35	2
L65N/E67S/V196S	L[65]N/E[67]S/V17S	3.8E+05	1.7E+04	4%	25	2
E67N/V196S	E[67]N/V17S	4.4E+05	4.3E+02	0%	22	2
L73N/G75S/V196S	L[73]N/G[75]S/V17S	3.1E+05	7.6E+03	2%	32	2
G75N/E77S/V196S	G[75]N/E[77]S/V17S	4.4E+05	5.2E+02	0%	22	2
R86N/L88S/V196S	R[86]N/L[88]S/V17S	4.9E+05	5.2E+03	1%	20	2
G114N/V196S	G[114]N/V17S	3.4E+05	8.0E+03	2%	28	4
D95N/D97S/V196S	D[95]N/D[97]S/V17S	4.1E+05	2.0E+05	49%	24	2
E82S/V196S	E[82]S/V17S	2.3E+05	2.2E+05	96%	42	8
E82N/F84S/V196S	E[82]N/F[84]S/V17S	4.2E+05	1.6E+05	39%	23	3
G78N/N80S/V196S	G[78]N/N[80]S/V17S	1.5E+05	5.0E+04	33%	64	4
E77N/K79S/V196S	E[77]N/K[79]S/V17S	2.1E+05	1.2E+05	57%	47	2
D119N/G121S/V196S	D[119]N/G[121]S/V17S	7.5E+05	1.7E+05	23%	13	2
L83N/V196S	L[83]N/V17S	6.0E+05	3.2E+04	5%	16	2
K122S/V196S	K[122]S/V17S	9.3E+05	1.4E+05	15%	11	4
E51N/V196S	E[51]N/V17S	8.6E+05	2.9E+04	3%	11	2
Q58N/K60S/V196S	Q[58]N/K[60]S/V17S	6.4E+05	1.3E+04	2%	15	2
G114N/D119N/G121S/V196S	G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S	1.4E+05	8.1E+04	59%	71	5
V196T	V17T	3.2E+06	8.3E+04	3%	3	2
G197S	G18S	1.4E+06	3.9E+05	28%	7	2
S334T	S152T	1.2E+07	3.1E+06	25%	1	4
K338A	K156A	5.8E+06	1.1E+06	19%	2	2
K338S	K156S	3.2E+06	1.7E+05	5%	3	2
K338V	K156V	3.4E+06	2.1E+05	6%	3	2
T327A/K338A	T144A/K156A	1.5E+06	4.6E+05	32%	7	2
T327L/K338M	T144L/K156M	5.4E+06	2.7E+06	50%	2	2
E200V/T327L/K338M	E21V/T144L/K156M	3.4E+06	1.2E+06	36%	3	2
E200V/T327L/S334A/K338M	E21V/T144L/S152A/K156M	3.8E+06	6.9E+05	18%	3	2
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	2.5E+05	3.9E+04	15%	39	4
D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H	9.5E+04	n.d.	n.d.	102	1
G114N/V196S/L211S/G219H	G[114]N/V17S/L32S/G40H	5.6E+04	n.d.	n.d.	173	1
G114N/D119N/G121S/V196S/L211S/G219H	G[114]N/D[119]N/G[121]S/V17S/L32S/G40H	6.5E+04	2.2E+04	34%	149	5
G197A/L211S/G219H	G18A/L32S/G40H	1.2E+06	5.2E+05	44%	8	2
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	3.1E+05	3.1E+04	10%	31	4
V196S/N214D	V17S/N35D	7.6E+05	4.0E+05	53%	13	2
V196S/N214A	V17S/N35A	1.4E+06	1.0E+05	7%	7	2

【表 2 2 - 3】

表 2 2 . AT/U FHによる阻害についての二次速度定数						
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	k_{app-wt} / $k_{app-mut}$	n
V196S/N214S	V17S/N35S	9.0E+05	8.4E+04	9%	11	2
V196S/E216R	V17S/E37R	4.5E+05	1.4E+05	31%	22	2
V196S/N216K	V17S/E37K	2.5E+05	2.7E+03	1%	39	2
V196S/N216A	V17S/E37A	3.3E+05	8.4E+03	3%	29	2
V196S/N216S	V17S/E37S	4.7E+05	4.1E+03	1%	21	2
V196S/E218R	V17S/E39R	4.1E+05	8.8E+04	22%	24	2
V196S/N218K	V17S/E39K	2.1E+05	2.3E+04	11%	48	2
V196S/N218A	V17S/E39A	5.4E+05	5.5E+04	10%	18	4
V196S/R332A	V17S/R150A	2.9E+04	6.7E+03	23%	339	3
V196S/R332D	V17S/R150D	5.6E+03	1.9E+03	35%	1,754	6
V196S/R332E	V17S/R150E	2.3E+04	4.9E+03	21%	428	2
V196S/R332S	V17S/R150S	9.1E+03	7.9E+03	86%	1,070	5
V196S/R332G	V17S/R150G	3.3E+03	1.4E+03	43%	2,926	6
V196S/R326D	V17S/R143D	6.3E+03	4.9E+03	78%	1,555	3
V196S/R326M	V17S/R143M	3.5E+04	2.9E+03	8%	280	4
V196S/R326N	V17S/R143N	2.5E+04	3.0E+03	12%	396	4
V196S/R326Q	V17S/R143Q	5.2E+04	1.1E+04	21%	186	4
V196S/R273E	V17S/R93E	2.3E+04	4.2E+03	18%	415	2
V196S/R273A	V17S/R93A	7.8E+03	1.2E+03	15%	1,257	4
V196S/R424A	V17S/R240A	2.7E+04	1.4E+03	5%	364	2
V196S/R424E	V17S/R240E	8.3E+03	2.7E+03	33%	1,173	2
V196S/K420A	V17S/K236A	2.5E+04	3.9E+03	15%	389	4
V196S/K420E	V17S/K236E	1.4E+04	8.4E+03	58%	672	4
V196S/R306E	V17S/R125A	3.5E+04	5.4E+03	16%	281	4
V196S/K276A	V17S/K96A	4.7E+05	1.6E+05	34%	21	4
V196S/K276E	V17S/K96E	3.2E+05	1.8E+05	57%	30	4
V196S/K420E/R424E	V17S/K236E/R240E	5.1E+03	2.8E+01	1%	1,929	2
V196S/K338A	V17S/K156A	4.5E+04	2.5E+04	55%	218	4
V196S/K338S	V17S/K156S	2.3E+04	7.6E+03	33%	421	10
V196S/E215N/N217S	V17S/E36N/N38S	7.5E+05	6.4E+03	1%	13	2
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	8.7E+05	6.1E+04	7%	11	2
D119N/G121S/V196S/ E264N/E266S	D[119]N/G[121]S/V 17S/E84N/E86S	4.0E+05	1.8E+04	4%	24	2
G114N/V196S/E264N/ E266S	G[114]N/V17S/E84N/ E86S	2.0E+05	n.d.	n.d.	48	1
V196S/R429N/L431S	V17S/R245N/L247S	2.4E+05	5.6E+03	2%	40	2
V196S/R243N/K245S	V17S/R63N/K65S	5.0E+05	1.2E+04	2%	19	2
V196S/T293N/R295S	V17S/T113N/R115S	6.1E+05	1.2E+02	0%	16	2
V196S/D389N/Y391S	V17S/D205N/Y207S	7.6E+05	1.7E+04	2%	13	2
V196S/K388N	V17S/K204N	7.1E+05	3.0E+04	4%	14	4
D119N/G121S/V196S/ K388N	D[119]N/G[121]S/V 17S/K204N	1.4E+05	4.9E+03	4%	71	2
V196S/T428N/G430S	V17S/T244N/G246S	9.5E+05	1.6E+04	2%	10	2
V196S/L211S/G219H/ E264N/E266S	V17S/L32S/G40H/E 84N/E86S	2.1E+05	1.5E+04	7%	46	2
D119N/G121S/V196S/ L211S/G219H/E264N/ E266S	D[119]N/G[121]S/V 17S/L32S/G40H/E84 N/E86S	1.4E+05	1.7E+04	12%	69	2
G114N/V196S/L211S/ G219H/E264N/E266S	G[114]N/V17S/L32S /G40H/E84N/E86S	8.3E+04	1.4E+04	16%	118	3

【表 2 2 - 4】

表 2 2 . AT / U F H による阻害についての二次速度定数						
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm S.D.$ ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	k_{app-wt} / $k_{app-mut}$	n
V196S/E264N/E266S/ K388N	V17S/E84N/E86S/K 204N	2.7E+05	1.8E+04	7%	37	2
D119N/G121S/V196S/ L211S/G219H/K388N	D[119]N/G[121]S/V 17S/L32S/G40H/K20 4N	6.2E+04	7.3E+03	12%	157	4
G114N/V196S/L211S/ G219H/K388N	G[114]N/V17S/L32S /G40H/K204N	3.7E+04	2.1E+03	6%	267	2
V196S/L211S/G219H/ E264N/E266S/K388N	V17S/L32S/G40H/E 84N/E86S/K204N	2.2E+05	1.2E+04	6%	44	2

10

【 0 5 4 9 】

実施例 6

F X a のその補因子第 V a 因子への機能性補因子結合 ($K_{D-a p p}$) の決定

基質プロトロンビン (F I I) の存在下またはその飽和での補因子第 V a 因子 (F V a) に対する F X a 変異体の機能性補因子結合 ($K_{D-a p p}$) を、F X a による活性化で生じるトロンビン (F I I a) の合成基質 P e f a f l u o r T H での活性をアッセイすることによる蛍光発生アッセイにおいて間接的に評価した。補因子 (F V a) が活性化プロテアーゼ (F X a) の濃度より少なくとも 1 0 0 0 倍過剰である F V a 濃度の範囲を見かけの動力学的速度定数 ($K_{D-a p p}$) を算出するために用いた。アッセイは、基質プロトロンビン (F I I) の飽和レベルで触媒活性を評価する前に、プロトロンビナーゼ複合体を形成するリン脂質小胞の存在下で F X a と補因子 (F V a) を種々の濃度で予めインキュベートする実施例 4 (基質プロトロンビン (F I I) に対する F X a の触媒活性の決定) に記載したアッセイの変形であるように設計した。簡潔には、活性化および活性部位滴定された F X a 変異体をリン脂質小胞を有するカルシウム含有緩衝液で希釈し、プロトロンビナーゼ複合体を形成するように様々な濃度の F V a と混合し、次にアッセイを開始するために飽和濃度のプロトロンビンおよび蛍光基質 P e f a f l u o r T H (H - D - C H A - A l a - A r g - A M C 、 C e n t e r c h e m) と混合した。産生されるトロンビンによる P e f a f l u o r T H の触媒作用に続く遊離フルオロフォア、A M C (7 - アミノ - 4 - メチルクマリン) の放出を連続的経時的に測定し、F X a 変異体の動力学的速度定数を決定した。

20

30

【 0 5 5 0 】

A. アッセイプロトコール

種々の F V a 濃度 (血漿精製 F V a 、 H e a m a t o l o g i c T e c h n o l o g i e s 、 I n c .) およびリン脂質の存在下で F X a によるプロトロンビン活性化の動力学的速度を評価するアッセイのために、F X a 変異体を上記実施例 1 - 3 において記載したとおり発現、精製、活性化および活性部位滴定した。次に、F X a 変異体を 1 × 緩衝液 A (2 0 m M H e p e s / 1 5 0 m M N a C l / 5 m M C a C l ₂ / 0 . 1 % B S A / 0 . 1 % P E G - 8 0 0 0 、 p H 7 . 4) 0 . 2 5 m L 容量中に 0 . 4 - 8 p M (4 ×) の濃度に系列希釈した。F V a を、8 0 μ M の新鮮再懸濁リン脂質 (7 5 % ホスファチジルコリン (P C) / 2 5 % ホスファチジルセリン (P S) ; P S / P C 小胞直径 ~ 1 2 0 n m ; A v a n t i P o l a r L i p i d s) を含有する 1 × 緩衝液 A 1 . 0 m L 容量中に、試験される変異体に依存して様々な最高 (t o p) 濃度に、一般的に 2 - 6 0 n M (最高用量の 4 ×) の範囲へさらに希釈した。F V a 溶液を、8 0 μ M P C / P S 小胞 (4 ×) を含有する 1 × 緩衝液 A 最終用量 0 . 4 m L で、1 2 チャンネルディープウェルポリプロピレンプレートにおける 1 . 8 倍系列希釈した。次に、F V a の希釈系列を、4 × F X a 希釈物 (各 2 5 μ L) と 1 : 1 で 9 6 ウェル丸底黒色アッセイプレートに

40

50

において、予め定義したプレートマップ（FXa変異体4種／プレート）に従って混合し、種々の濃度のFVaと平衡化プロトロンビナーゼ複合体を形成するように15分間、25℃で予めインキュベートした。最終2×溶液（50μL）は次のとおりであった：0.2–4pM FXa変異体、60–0nM FVaおよび40μM PC／PS小胞。

【0551】

活性部位滴定し、DFP／FPR-cmk処理したプロトロンビン（FII）の5000nM（2×）の溶液を0.1mM Pefaf fluor TH基質を含有する1×緩衝液A 30mL中に調製し、4種のアッセイのために十分な容量を提供した。これは実施例4、表17に報告した K_M 値より少なくとも10–50倍高いプロトロンビン（FII）の2×飽和濃度を示した。典型的にはアッセイ反応は、FII／Pefaf fluor TH希釈物50μLを、各FXa変異体およびFVa希釈物（プロトロンビナーゼ複合体）50μLを含む4枚のアッセイプレートに分配するようにプログラムしたBioMek FX liquid handling systemを用いて開始した。アッセイにおける試薬の最終濃度は、0.1–2.0pM FXa、20μM PC／PS小胞、50μM Pefaf fluor TH、2.5μM プロトロンビン（FII）および0–0.5nM、0–1.0nM、0–3.0nMまたは0–10nM FVa希釈物であったが、他のFVa希釈物の範囲も時々使用した。反応を、SpectraMax fluorescence plate readerにおいて30分間、25℃でモニターした。遊離AMCの標準曲線を0μMから100μM AMCに及ぶ用量範囲を用いる続くデータ分析計算においてRFUからμMへの変換係数として利用した。

【0552】

B. データ分析

FXa変異体のFVaに対する機能的親和性をそれらの触媒活性に基づいて決定するために、SoftMax Pro application (Molecular Devices) で集めた生データを、TXTファイルとして出力した。さらなる非線形データ分析を、XE Runner data analysis module (IDBS Software) を用いるActivityBase software packageで直接実施した。データ分析は、若干の変更を伴って本質的に実施例4Cにおいて記載のとおりであった。Abaseテンプレートを、各FVa濃度で検査したFXa変異体の放物型反応速度（μM／秒²）を方程式（10）に示す標準直角双曲線の関数（すなわちミカエリスメンテン方程式）に自動的にフィットするように設定し、 V_{max} および K_{D-app} のフィット値を得た。

【0553】

方程式（10）

【数8】

$$\text{反応速度 } (\mu\text{M} / \text{秒}^2) = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_{D-app} + [S_0]}$$

【0554】

表23は、アッセイしたFXa変異体それぞれについての機能的親和性（ K_{D-app} ）を記載する。組換え野生型FXa（FXa WTと称する）、および血漿精製FXa（Haematologic Technologies, Inc）もアッセイした。表23は、親和性に関する動力学的定数 K_{D-app} （nM）として、およびFXa変異体と比較した野生型FXaの機能的親和性の比として（各FXa変異体の機能的親和性は、基質プロトロンビン（FII）の活性化についての K_{D-app} （nM）によって定義される）表した結果を示す。FXa変異体の活性を野生型FXaと比較する場合は、活性におけるいかなる差異も突然変異の結果であり、たとえば異なる発現系に関連する翻訳後修飾における差異の結果ではないことを確実にするために、変異体FXaポリペプチドについ

て用いたのと同じ条件を用いて発現および精製した組換え野生型 F X a ポリペプチドと比較した。したがって、比較に用いた野生型 F X a ポリペプチドは、配列が配列番号 1 において記載される F X 遺伝子のクローニングから生成され、C H O 細胞から配列番号：1 3 4 のアミノ酸 1-1 3 9 および 1 9 5-4 4 8 として記載されているアミノ酸配列を有するポリペプチドとして発現された、実施例 1-3 において記載される（組換え野生型 F X a（すなわち F X a W T ポリペプチド）であった。標準偏差（S. D.）、変動係数（百分率として；% C V）および実施アッセイ数（n）も表 2 3 において提供する。

【0 5 5 5】

いくつかの変異体が野生型と類似の親和性または K_{D-app} における名目上の増加を示したが（たとえば、F X a-R 3 2 6 Y および F I X a-F X a-L 2 1 1 S/G 2 1 9 H）、いくつかの変異体は、 K_{D-app} における 1 0-1 0 0 倍を超える増加を有する機能的親和性における顕著な増加を表した。顕著に増加した補因子依存性を有する変異体（実施例 4）は、機能的補因子親和性において最も大きな減少を示した。たとえば、F X a-V 1 9 6 S/R 3 2 6 Q、F X a-V 1 9 6 S/K 4 2 0 E/R 4 2 4 E、F X a-V 1 9 6 S/R 2 7 3 E および F X a-V 1 9 6 S/K 3 3 8 S はこの群に含まれる。

【0 5 5 6】

【表 2 3-1】

表 2 3. F X a 変異体の機能的補因子親和性 (K_{D-app})						
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	K_{D-app} (nM)	$\pm$ S.D. (nM)	%CV	$K_{D-wt}/$ K_{D-mut}	n
血漿 FXa	血漿 FXa	0.01	0.00	21%	1.64	5
FX 野生型	FX 野生型	0.02	0.01	47%	1.00	3
I195L	I16L	0.18	0.06	33%	0.09	10
V196S	V17S	0.39	0.12	32%	0.04	14
Q56N/Q58S/V196S	Q[56]N/Q[58]S/V17S	0.49	0.18	37%	0.03	2
K62N/G64S/V196S	K[62]N/G[64]S/V17S	0.72	0.25	34%	0.02	2
E67N/V196S	E[67]N/V17S	1.08	0.13	12%	0.01	2
L73N/G75S/V196S	L[73]N/G[75]S/V17S	0.45	0.07	16%	0.04	2
G75N/E77S/V196S	G[75]N/E[77]S/V17S	0.90	0.28	31%	0.02	2
G114N/V196S	G[114]N/V17S	0.73	0.24	32%	0.02	3
D119N/G121S/V196S	D[119]N/G[121]S/V17S	0.62	0.19	30%	0.03	3
K122S/V196S	K[122]S/V17S	0.46	0.17	37%	0.03	3
E51N/V196S	E[51]N/V17S	0.38	0.05	14%	0.04	2
Q58N/K60S/V196S	Q[58]N/K[60]S/V17S	0.52	0.19	36%	0.03	3
L211S/G219H	L32S/G40H	0.02	0.00	7%	0.67	3
V196L	V17L	0.06	0.01	21%	0.27	3
V196T	V17T	0.31	n.d.	n.d.	0.05	1
G197S	G18S	0.18	0.07	39%	0.09	3
R326A	R143A	0.03	n.d.	n.d.	0.60	1
R326S	R143S	0.03	n.d.	n.d.	0.55	1
R326T	R143T	0.04	n.d.	n.d.	0.42	1
R326Q	R143Q	0.03	n.d.	n.d.	0.50	1
R326N	R143N	0.04	0.01	22%	0.44	2
R326M	R143M	0.04	n.d.	n.d.	0.39	1
R326K	R143K	0.03	n.d.	n.d.	0.60	1
R326Y	R143Y	0.02	0.00	2%	0.86	2
K338A	K156A	0.20	n.d.	n.d.	0.08	1

【0 5 5 7】

【表 2 3 - 2】

表 2 3. F X a 変異体の機能的補因子親和性 (K_{D-app})						
突然変異 (成熟 F X ナンバリング)	突然変異 (キモトリブシン ナンバリング)	K_{D-app} (nM)	$\pm$ S.D. (nM)	%CV	$K_{D-wt}/$ K_{D-mut}	n
K338S	K156S	0.15	0.04	25%	0.11	3
K338N	K156N	0.06	n.d.	n.d.	0.25	1
K338R	K156R	0.02	0.01	55%	0.73	2
K338V	K156V	0.15	0.05	35%	0.11	3
K338M	K156M	0.36	n.d.	n.d.	0.04	1
T327A/K338A	T144A/K156A	0.24	0.15	59%	0.06	2
T327L/K338M	T144L/K156M	0.03	0.00	17%	0.61	2
E200V/T327L/S334A/K338M	E21V/T144L/S152A/K156M	0.11	0.04	37%	0.14	3
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	0.32	0.09	29%	0.05	2
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	0.37	0.05	14%	0.04	3
V196S/N214D	V17S/N35D	0.32	0.07	23%	0.05	3
V196S/N214A	V17S/N35A	0.38	n.d.	n.d.	0.04	1
V196S/N214S	V17S/N35S	0.33	n.d.	n.d.	0.05	1
V196S/E216R	V17S/E37R	0.16	0.06	38%	0.10	3
V196S/N216K	V17S/E37K	0.25	0.06	23%	0.06	2
V196S/N216A	V17S/E37A	0.29	0.12	41%	0.05	2
V196S/N216S	V17S/E37S	0.40	0.13	31%	0.04	3
V196S/E218R	V17S/E39R	0.34	0.12	34%	0.05	3
V196S/N218K	V17S/E39K	0.29	0.05	18%	0.05	2
V196S/N218A	V17S/E39A	0.36	0.13	35%	0.04	3
V196S/R332A	V17S/R150A	0.54	n.d.	n.d.	0.03	1
V196S/R332D	V17S/R150D	1.70	0.60	35%	0.01	3
V196S/R332E	V17S/R150E	0.49	0.04	7%	0.03	2
V196S/R332S	V17S/R150S	0.56	0.11	19%	0.03	2
V196S/R332G	V17S/R150G	0.56	0.12	22%	0.03	3
V196S/R326D	V17S/R143D	1.02	0.33	32%	0.02	3
V196S/R326M	V17S/R143M	0.56	0.27	48%	0.03	4
V196S/R326N	V17S/R143N	2.21	0.15	7%	0.01	2
V196S/R326Q	V17S/R143Q	1.21	0.26	21%	0.01	3
V196S/R273E	V17S/R93E	15.04	3.42	23%	0.001	3
V196S/R273A	V17S/R93A	2.45	0.08	3%	0.01	3
V196S/R424A	V17S/R240A	5.86	0.11	2%	0.003	2
V196S/R424E	V17S/R240E	6.31	1.00	16%	0.002	3
V196S/K420A	V17S/K236A	0.37	n.d.	n.d.	0.04	1
V196S/K420E	V17S/K236E	0.39	n.d.	n.d.	0.04	1
V196S/R306E	V17S/R125A	2.25	1.49	66%	0.01	5
V196S/K276A	V17S/K96A	0.62	0.11	18%	0.03	3
V196S/K276E	V17S/K96E	0.70	0.02	3%	0.02	3
V196S/K420E/R424E	V17S/K236E/R240E	20.86	13.15	63%	0.001	4
V196S/K338A	V17S/K156A	0.93	0.24	26%	0.02	3
V196S/K338S	V17S/K156S	0.91	0.19	21%	0.02	3
V196S/E215N/N217S	V17S/E36N/N38S	0.28	0.03	10%	0.06	2
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	0.48	0.03	6%	0.03	2
V196S/R429N/L431S	V17S/R245N/L247S	1.06	0.34	32%	0.01	2
V196S/T293N/R295S	V17S/T113N/R115S	0.64	0.15	23%	0.02	2
V196S/K388N	V17S/K204N	0.59	0.06	10%	0.03	2
V196S/T428N/G430S	V17S/T244N/G246S	0.73	0.10	14%	0.02	2

【 0 5 5 8 】

実施例 7

F X a ポリペプチドの薬物動態学分析

F X a 変異体ポリペプチドの薬物動態学 (PK) 特性を静脈内投与後の種々の時点での

50

マウス血漿中の変異体FXaの量を測定することによって評価した。ELISAアッセイをマウス血漿中の全FXaタンパク質を定量するために用い、薬物動態学的特性を評価した。

【0559】

A. 動物。

Charles Rivers Laboratories (Hollister, CA)によって供給されたオスCD-1マウス(30-40 gm)を処理前の少なくとも3日間隔離した。系列PK研究のために、オスCD-1マウス(30-37 gm)に留置頸動脈血管カニューレを装着した。PDまたはPK実験に用いる前は、濾過水道水および食餌を自由摂取させた。

【0560】

B. 投与および血液採取

マウス(1時点あたりN=3)にFXaポリペプチドを尾静脈を介して静脈内投与(0.5 mg/kg、投与容量2 ml/kg)した。投与後の適切な時点(2-960分)で動物を麻酔し、最終的な心穿刺を用いてクエン酸を含むシリンジに血液を抜いた(0.5-1 mL)。最後のPK試験のための十分な量のタンパク質が入手できない場合、合計4-6匹だけの動物およびずらして配置した時点を使用する一連の出血を利用した。過剰な血液量を除去することなく全ての時点で採取するために全過程のそれぞれについてマウス2匹を用いた。一連の出血実験において、血液は、0.9%生理食塩水を含む0.1 mLシリンジに少量の血液を最初に除去することによって覚醒動物を拘束して試料採取した。次いで0.1 Mクエン酸ナトリウム4.5 µLを含むシリンジを取り付け、血液0.05 mLをシリンジに抜き、血液を1.5 mLチューブに移した。最初のシリンジを再び取り付け、生理食塩水0.07 mLをカニューレを通じて戻した。プロセスを繰り返す場合カニューレは次の時点まで蓋をしておいた。一連および最後の試験の両方に関して血液試料を採取15分間以内に遠心分離(9000 rpm、8分間、4℃)、血漿を除去し、直ちに液体窒素中で新鮮凍結し、分析まで凍結保存(-70℃)した。

【0561】

C. PK評価

クエン酸処理血液試料を、上記実施例7Bに記載されているとおり、投与後960分までの種々の時点(すなわち、投与前、2、5、10、15、30、60、120、240、360および960分)で最終実験のために心穿刺によってまたは系列実験のために留置カテーテルによって採取した。FXaの血漿濃度を、ヒト第X/Xa因子特異的ELISAを用いて決定した。1対のポリクローナル検出および捕捉抗体(#FX-EIA-C、Affinity Biologicals、Ancaster、ON)を使用した。FX/Xa ELISAは、興味ある変異体の薬物動態パラメータを決定するために使用される尺度を提供した。

【0562】

簡潔には、FX/Xaを(1:500)に対するアフィニティー精製ポリクローナル抗体、Coating Buffer(15 mM Na₂CO₃、35 mM NaHCO₃、pH 9.6)中のプレートのウェルに2時間室温(RT)でコートした。プレートを洗浄バッファー(PBST)で洗浄し、サンプル希釈剤(100 mM HEPES、100 nM NaCl、10 mM EDTA、1.0% BSA、0.1% Tween-20、pH 7.2)において希釈されたFX/Xaを含有する血漿試料を適用した。全てのサンプルおよび標準物を、一貫性を維持するためにサンプル希釈剤(Sample Diluent)に希釈された1:200 CD-1マウス血漿の最終濃度に標準化した。血漿試料をプレート上で1:200および1:1000に希釈し、次に、1:4希釈し、1:1000および1:4000のさらなる希釈セットを得た。未結合物質を除去するためにプレートを洗浄後、FX/Xaに対するペルオキシダーゼコンジュゲート検出抗体(1:1000)を捕捉されたFX/Xaに結合させるためにプレートに添加した。未結合コンジュゲート抗体を除去するためにプレートを洗浄後、化学発光基質(SuperSignal

Femto、#37074、Thermo Scientific)とのインキュベーションによってペルオキシダーゼ活性が開始した。化学発光シグナルをSpectraMax 蛍光プレートリーダーを使用して測定した。ペルオキシダーゼ活性の標準曲線は、 0.82 pg/ml から 25 ng/ml の濃度範囲にわたって特徴的に直線的である。異なるFXa変異体に対する抗体親和性における差異を排除するためにFXa変異体それ自体を標準曲線のために用いた。各試料を2枚の別々のアッセイプレートで測定し、標準曲線の線形範囲内の測定値を血漿試料中のFXa変異体の濃度を算出するために用いた。

【0563】

D. PKデータ分析

FXa変異体でのマウス研究からのPK (ELISA) パラメーターをWinNonLin (v5.1、Pharsight Corp.、Mountain View、CA)での非コンパートメント解析を用いて算出した。FXa変異体のPKは、見かけの双指数関数的血漿減衰 (biexponential plasma decay) に従った。検査した各変異体について選択されたパラメーターを表25に提供する。PKパラメーターは、ハーフタイム (終末、分)、MRT ($\text{MRT}_{0-\text{last}}$ 、分)、曲線下面積 (AUC) $0 \sim$ 最終 (分 $\mu\text{g/ml}$) / 用量 (mg/kg) ; 最大濃度 (C_{max} ; ($\mu\text{g/ml}$) / 用量 ($\mu\text{g/kg}$)、 V_d (mL/kg) およびクリアランス (Cl 、 mL/min/kg)を含んだ。

【0564】

【表24】

表24. 薬物動態パラメータを算出するために用いた定義および式

定義/式	定義
血漿半減時間	血漿FXa濃度対時間プロファイルの終末相でのFXaポリペプチドの半減期
ベータ $T_{1/2}$ ($T_{1/2\beta}$)	血漿FXa濃度対時間曲線の対数直線プロットの終末相における負勾配で割った $-\ln 2$ として算出
$\text{MRT}_{0-\text{last}}$	身体に存在するFXaポリペプチドの平均時間; $\text{AUMC}_{0-\text{last}} / \text{AUC}_{0-\text{last}}$ として算出される、式中 $\text{AUMC}_{0-\text{last}}$ は初期モーメント対時間曲線の下での総面積であり、以下で AUC と記載される
$\text{AUC}_{0-\text{last}} / \text{用量}$	$[\text{AUC}_{(0-t)}]$ として算出され、式中 t はIV用量 (mg/kg) で割ったFXaポリペプチドの測定可能な血漿濃度での最終時点である
$\text{AUC}_{0-\text{inf}} / \text{用量}$	$[\text{AUC}_{(0-t)} + Ct / (\ln 2 / T_{1/2\beta})]$ として算出され、式中 t はIV用量 (mg/kg) で割ったFXaポリペプチドの測定可能な血漿濃度を有する最終時点である
$C_{\text{max}} / \text{用量}$	(mg/kg 当たり $\mu\text{g/mL}$)
C_{max}	最大に測定された血漿FXa濃度に対応する投与後時間
Cl	(用量 / $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$) として算出される全身クリアランス
V_{ss}	定常状態分布容積; $\text{MRT} * \text{Cl}$ として算出
V_z	終末排出定数 (β) に基づく分布容積; $\text{Cl} / (\ln 2 / T_{1/2\beta})$ として算出

【0565】

【表 2 5 - 1】

表 2 5. E L I S Aによって評価した F X a変異体の PK特性											
突然変異 (成熟 ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	n	ベータ $T_{1/2}$	T_{max}	C_{max} / 用量	AUC_{0-last} / 用量	AUC_{0-inf} / 用量	V_z	CI	MRT (0- last)	MRT (0-inf)
I195L	I16L	4	320	4	16	548	788	577	1.3	81	312
E82S/V196S	E[82]S/V17S	1	403	22	29	1719	3388	172	0.3	272	120
V196S	V17S	4	523	3	30	1840	2757	306	0.44	241	743
G197S	G18S	2	225	6	17	1584	2383	134	0.43	125	310
K338A	K156A	2	462	2	21	1411	1844	350	0.56	267	577
K338S	K156S	2	570	4	16	795	1770	402	0.71	106	715
V196S/L211 S/G219H	V17S/L32S/ G40H	2	405	4	23	1408	1723	336	0.58	248	483

【 0 5 6 6】

【表 2 5 - 2】

表 2 5. E L I S Aによって評価した F X a変異体の PK特性											
突然変異 (成熟 ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	n	ベータ $T_{1/2}$	T_{max}	C_{max} / 用量	AUC_{0-last} / 用量	AUC_{0-inf} / 用量	V_z	CI	MRT (0- last)	MRT (0-inf)
I195L/L211 S/G219H	I16L/L32S/ G40H	2	337	4	23	1095	1708	284	0.59	111	377
V196S/R332 A	V17S/R150A	1	172	5	19	1205	1522	163	0.66	110	213
V196S/R332 D	V17S/R150D	2	427	2	14	1250	1503	410	0.67	249	473
V196S/R332 S	V17S/R150S	2	516	2	20	632	1471	382	1.07	67	626
V196S/R332 G	V17S/R150G	1	266	2	22	1029	1463	262	0.68	101	292
E67N/V196 S	E[67]N/V17S	2	322	2	20	1113	1396	328	0.72	157	337
R86N/L88S/ V196S	R[86]N/L[88] S/V17S	2	249	2	21	747	1353	267	0.74	75	309
D95N/D97S/ V196S	D[95]N/D[97] S/V17S	2	162	10	16	938	1333	178	0.76	75	195
D119N/G12 1S/V196S	D[119]N/G[1 21]S/V17S	2	473	2	21	755	1312	566	0.82	87	489
L83N/V196 S	L[83]N/V17S	2	213	4	23	981	1298	251	0.84	91	226
V196S/E264 N/E266S	V17S/E84N/ E86S	2	400	2	23	987	1296	441	0.77	149	383
V196S/R243 N/K245S	V17S/R63N/ K65S	2	306	4	15	1150	1269	348	0.79	217	329
V196S/D389 N/Y391S	V17S/D205N/ Y207S	2	267	2	23	1046	1250	308	0.87	166	306
V196S/K388 N	V17S/K204N	1	514	2	18	639	1151	644	0.87	104	548
G114N/V19 6S	G[114]N/V17 S	2	277	2	22	808	1132	342	0.91	93	285
T85N/K87S/ V196S	T[85]N/K[87] S/V17S	2	309	2	19	933	1131	370	0.99	175	341
G114N/V19 6S/L211S/G 219H	G[114]N/V17 S/L32S/G40H	2	326	2	22	928	1098	412	0.92	137	289
G78N/N80S/ V196S	G[78]N/N[80] S/V17S	1	195	2	14	631	768	373	1.31	93	194
D119N/G12 1S/V196S/E 264N/E266S	D[119]N/ G[121]S/V17 S/E84N/E86S	1	384	2	12	611	741	689	1.39	139	351
V196S/L211 S/G219H/E2 64N/E266S	V17S/L32S/ G40H/E84N/ E86S	1	249	2	12	522	658	540	1.55	78	210
D119N/G12 1S/V196S/L 211S/G219H	D[119]N/ G[121]S/V17 S/L32S/G40H	1	332	6	11	530	614	786	1.63	112	239

【0567】

実施例8

F X a ポリペプチドの凝血促進活性のインビボ評価

F V I I I 欠損マウス系 (F V I I I ^{-/-}) を、血友病 A のマウスモデルとして F X a ポリペプチドの凝血促進活性を評価するために確立した。マウスを F X a ポリペプチドで処理し、20 分間に失われた血液量を F X a ポリペプチドの凝血促進活性を決定するために測定した。

【0568】

A. F X a ポリペプチド凝血促進活性のインビボ評価

オス F V I I I ^{-/-} マウスをケタミン/キシラジンカクテル (生理食塩水中 45 mg / ml および 3.6 mg / ml) の腹腔内投与によって麻酔し、体温降下が生じないことを確実にするために温めたプラットホーム (39°C) 上に置いた。処置室を温度 82°F に維持した。尾部切断の 10 分前に尾部を予め温めた P B S、10 mL に浸漬した (15 mL 遠心管; 39°C)。最大 15 匹のマウスに、組換えヒト F X a (5 mM M E S pH 5.5、100 mM N a C l に希釈された) または修飾 F X a ポリペプチド (5 mM M E S pH 6、100 mM N a C l に希釈された) を一回注射で尾静脈を介して注射した。マウスの陰性対照群は適当な緩衝液だけを受けた。注射し損ねた場合は、動物を研究から排除した。

【0569】

F X a ポリペプチドまたは緩衝液の注射は、尾部切断の 5 分前に行った。尾部切断はカミソリ刃を用いて尾部末端から 5 mm で行い、血液を P B S 中に 20 分間採取した。採取期の最後に総失血を評価した。採取チューブを混合し、各試料の 1 mL アリコートを取り、ヘモグロビン含有量についてアッセイした。T r i t o n X-100 を滅菌水中、1 対 4 に希釈し、100 μ L を 1 mL 試料に添加して溶血させた。次いで試料の吸光度を 546 nm の波長で測定した。失血量を算出するために、P B S 中に希釈し、T r i t o n X-100 で上のおり溶血させた既知の容量のマウス血液の 546 nm での吸光度を測定することによって作成した標準曲線に対して吸光度を読み取った。値を平均値 ± S E M として表す。

【0570】

1. 野生型 F X a 血液凝固活性を評価する用量反応研究

1 つの試験において、野生型 F X a の血液凝固活性を、上記 F V I I I ^{-/-} マウスにおいて 0.1、0.3 および 1 mg F X a / kg 体重の用量を使用して分析した。緩衝液 (5 mM M E S pH 5.5、100 mM N a C l) のみを受けた対照群における失血は 940.95 ± 30.78 μ l (n = 9) であった。0.1 mg / kg で野生型 F X a での処理は失血に対して阻害効果を有さなかったが (958.76 ± 31.91 μ l、n = 9)、0.3 mg / kg および 1 mg / kg での処理はそれぞれ 870.36 ± 53.92 μ l および 802.62 ± 52.92 μ l に失血の阻害をもたらした (それぞれの用量で n = 10)。正確な E D 50 値は、高用量の野生型 F X a に対して観察された毒性によって、この試験において決定することができなかった。

【0571】

次の試験において、野生型 F X a の最大耐量 (M T D) が 0.125 mg / kg であると決定した。さらなる試験は、0.1 mg / kg の単回投与後の凝固を試験した。この実験において、野生型 F X a での処理は、緩衝液のみ群 (890.14 ± 23.97 μ l から 914.03 ± 23.48 μ l (緩衝液群、n = 15; 用量群、n = 10)) と比較して失血に対して阻害効果がなかった。クラスカルーワリス、次にダンボストテスト (用量反応実験)、およびマンホイットニーテスト (単回投与実験) をそれぞれ使用する統計分析は、0.1 mg / kg での野生型 F X a で失血の有意な阻害がないことを証明した。

【0572】

2. F X a - I 195 L (I 16 L) 血液凝固活性を評価する用量反応研究

I 195 L (キモトリプシンナランピングによると I 16 L) F X a 突然変異体の凝血

10

20

30

40

50

促進効果の用量反応を、上記F V I I I - / -マウスにおいて試験した。第1の分析において、緩衝液（5mM MES pH6、100mM NaCl）のみを受けた動物群における失血は $930.74 \pm 16.33 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）であった。0.2、0.6および 2mg/kg でFXa-I195L（I16L）での処理は失血の有意な阻害をもたらした：それぞれ $717.34 \pm 41.34 \mu\text{l}$ （ $n=8$ ）、 $704.93 \pm 46.45 \mu\text{l}$ （ $n=10$ ）、および $488 \pm 95.65 \mu\text{l}$ （ $n=11$ ）（クラスカルーワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0573】

第2の試験において、緩衝液のみ群における失血は $910.85 \pm 23.79 \mu\text{l}$ （ $n=12$ ）であった。0.46mg/kgでFXa-I195L（I16L）での処理は、失血の有意な阻害がなかった（ $828.24 \pm 36.79 \mu\text{l}$ ； $n=8$ ）。しかしながら、1.53および 4.58mg/kg の増加した用量でFXa-I195L（I16L）での処理は、対照群と比較して失血の有意な阻害をもたらした：それぞれ $690.99 \pm 41.88 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）および $121.62 \pm 76.52 \mu\text{l}$ （ $n=7$ ）（クラスカルーワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0574】

3. FXa-V196S（V17S）血液凝固活性を評価する用量反応研究

FXa-V196S（キモトリプシンナバリングによるとV17S）突然変異体の凝血促進効果の用量反応を、上記方法を使用してF V I I I - / -マウスにおいて評価した。第1の試験において、緩衝液（5mM MES pH6、100mM NaCl）のみを受けた動物の対照群における失血は $855.94 \pm 62.55 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）であった。0.7および 2.33mg/kg でFXa-V196S（V17S）での処理は対照群と比較して失血の有意な阻害がなかった：それぞれ $737.16 \pm 21.75 \mu\text{l}$ （ $n=8$ ）および $614.38 \pm 75.13 \mu\text{l}$ （ $n=8$ ）。しかしながら、 6.98mg/kg の増加したFXa-V196S（V17S）用量は、緩衝液のみの群と比較して失血の有意な阻害をもたらした（ $151.51 \pm 32.43 \mu\text{l}$ （ $n=7$ ）；クラスカルーワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0575】

第2の試験において、緩衝液のみ群における失血は $877.36 \pm 41.7 \mu\text{l}$ （ $n=8$ ）であった。0.7mg/kgでFXa-V196S（V17S）での処理は、失血の有意な阻害がなかった（ $532.80 \pm 53.34 \mu\text{l}$ ； $n=9$ ）；一方、2.33および 6.98mg/kg でFXa-V196S（V17S）での処理は失血の阻害をもたらし、緩衝液のみ群と比較して有意であった（それぞれ $189.66 \pm 40.14 \mu\text{l}$ （ $n=8$ ）および $89.28 \pm 14.46 \mu\text{l}$ （ $n=7$ ）；クラスカルーワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0576】

第3の試験において、緩衝液のみ群における失血は $1018.82 \pm 27.13 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）であった。0.7mg/kgでFXa-V196S（V17S）での処理は、失血の有意な阻害がなかった（ $760.27 \pm 25.92 \mu\text{l}$ 、 $n=9$ ）。2.33および 6.98mg/kg でFXa-V196S（V17S）での処理は失血の阻害をもたらし、緩衝液のみ群と比較して有意であった（それぞれ $414.06 \pm 61.89 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）および $187.24 \pm 25.08 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）；クラスカルーワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0577】

4. 低下した温度でのFXa突然変異体の血液凝固活性を評価する用量反応研究

以前の実験（実施例8A1-3）は 82°F の室温で行ったが、FXa-V196S（V17S）凝固活性をまた $72-74^\circ\text{F}$ の室温で評価した。第1の試験において、緩衝液のみ群における失血は $939.93 \pm 19.12 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）であった。0.7mg/kgでFXa-V196S（V17S）での処理は、失血の有意な減少がなかったが（ $798.71 \pm 26.04 \mu\text{l}$ ； $n=9$ ）、2.33および 6.98mg/kg でFXa

10

20

30

40

50

－V196S（V17S）での処理は、緩衝液のみ群と比較して失血の有意な減少をもたらした（それぞれ $502.48 \pm 93.31 \mu\text{l}$ （ $n=8$ ）および $141.81 \pm 30.37 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）；クラスカル－ワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0578】

72－74 ° F の室温での第2の評価において、緩衝液のみ群における失血は $977.42 \pm 20.61 \mu\text{l}$ （ $n=9$ ）であった。0.7 mg/kg で FXa－V196S（V17S）での処理は、失血の有意な減少がなかった（ $690.52 \pm 79.41 \mu\text{l}$ ； $n=10$ ）。2.33 および 6.98 mg/kg の両方で FXa－V17S での処理は、緩衝液のみ群と比較して失血の有意な阻害をもたらした（それぞれ $305.74 \pm 70 \mu\text{l}$ （ $n=10$ ）および $152.42 \pm 37.44 \mu\text{l}$ （ $n=10$ ）；クラスカル－ワリス、次にダンポストテストを使用して $p < 0.05$ ）。

【0579】

他の FXa－ポリペプチドの凝固活性を、72－74 ° F の室温で上記のとおりに決定した。試験された FXa－ポリペプチドに対する非線形回帰を用いて算出した ED₅₀ 値を、以下の表 26 に示す。

【0580】

【表 26】

突然変異 (成熟 ナンバリング)	突然変異 (キモトリプシン ナンバリング)	n/ 群/ 実験	N (実験)	平均 ED ₅₀ (mg/kg)
I195L	I16L	7 - 12	2	2.5
V196S	V17S	7 - 10	5	2.0
G114N/V196S	G[114]N/V17S	8 - 10	2	1.4
D95N/D97S/V196S	D[95]N/D[97]S/V17S	8 - 10	2	>3
E82S/V196S	E[82]S/V17S	8 - 10	2	>3
G197S	G18S	8 - 10 *	2	0.7
K338A	K156A	7 - 10	3	1.9
K338S	K156S	7 - 10	2	1.6
V196S/L211S/G219H	V17S/L32S/G40H	7 - 10	3	2.5
I195L/L211S/G219H	I16L/L32S/G40H	8 - 9	3	1.7
V196S/R332A	V17S/R150A	8 - 10	2	0.2
V196S/R332D	V17S/R150D	8 - 10	3	0.08
V196S/R332S	V17S/R150S	8 - 9	3	0.1
V196S/R332G	V17S/R150G	8 - 10	5	0.2
V196S/ K338A	V17S/K156A	8	1	7.9
V196S/ K338S	V17S/K156S	8 - 10	1	>5
V196S/E264N/E266S	V17S/E84N/E86S	8 - 10	2	2.7
V196S/R243N/K245S	V17S/R63N/K65S	8 - 10	2	>3
V196S/L211S/G219H/ E264N/E266S	V17S/L32S/G40H/E84 N/E86S	9 - 10	2	2.1
D119N/G121S/V196S/ L211S/G219H/K388N	D[119]N/G[121]S/V17 S/L32S/G40H/K204N	8 - 10	2	>3

*＝実験 2 における最も高い用量群は 3 匹のみの動物を有し、死亡がこの用量で観察された。

【0581】

変更が当業者に明らかであることから、本発明が添付の特許請求の範囲の範囲によってのみ限定されることが意図される。

【図 3 C】

6/14

FIGURE 3B

エト
アカサザル

【図 3 E】

8/14

FIGURE 3D

ヒト
アフリカゾウ

【図 3 G】

10/14

FIGURE 3F

[illegible]

【図 3 I】

12/14

FIGURE 3H

[illegible]

【図 3 J】

13/14

FIGURE 3J

[illegible]

```

L 1  AARRPVVDNRTTBOEGEAAHVHEVJLKNRPETKEYPDVLAVLPLKTPITPRNMAVP
L 195L *****
L 1  ACPEDPMAEMLTQKTOGTVISGFGRIHEKBOSTRKALPEVPDNCIKLSSPFIITO
L 195L *****
L 1  ACLEPDMALSLMTQKTVISGFGRIHEKBOSTRKALPEVPDNCIKLSSPFIITO
L 195L *****
L 1  NNFCAGIDTRQEDACQGDGGEPHTRFKDTPTVTGIVSMBGCARKKKGITYTVAPLAK
L 195L *****
L 1  NNFCAGIDTRQEDACQGDGGEPHTRFKDTPTVTGIVSMBGCARKKKGITYTVAPLAK
L 195L *****
L 1  WIDMSKTRGQLPKAKSHAPEVITSSPLK
L 195L *****

```

0006363600000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	
<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i>	<i>19/00</i>	
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	B
<i>A 6 1 P</i>	<i>7/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>7/04</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/36</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>38/36</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>9/50</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>9/50</i>	

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 クリストファー・サノス

アメリカ合衆国 9 4 1 1 8 カリフォルニア州サンフランシスコ、サクラメント・ストリート 3 5 7
9 番

(72)発明者 エドウィン・エル・マディソン

アメリカ合衆国 9 4 1 2 1 カリフォルニア州サンフランシスコ、フォーティエイス・アベニュー 5
5 8 番

審査官 上村 直子

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 1 2 6 4 5 (JP, A)

特表 2 0 1 0 - 5 3 9 9 4 5 (JP, A)

特表 2 0 0 6 - 5 0 7 8 0 6 (JP, A)

特表 2 0 0 9 - 5 1 5 5 5 9 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 4 9 8 0 4 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 4 / 7 4 5

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

W P I D S / W P I X (STN)