

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-545457

(P2013-545457A)

(43) 公表日 平成25年12月26日 (2013. 12. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
C O 7 K 14/745 (2006. 01)	C O 7 K 14/745	4 C O 7 6
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 P 7/04 (2006. 01)	A 6 1 P 7/04	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 364 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-537840 (P2013-537840)	(71) 出願人	508121599
(86) (22) 出願日	平成23年11月3日 (2011. 11. 3)		カタリスト・バイオサイエンス・イン
(85) 翻訳文提出日	平成25年6月27日 (2013. 6. 27)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/059233		CATALYST BIOSCIENCE
(87) 国際公開番号	W02012/061654		S, INC.
(87) 国際公開日	平成24年5月10日 (2012. 5. 10)		アメリカ合衆国94080カリフォルニア
(31) 優先権主張番号	61/456, 298		州サウス・サンフランシスコ、リトルフィ
(32) 優先日	平成22年11月3日 (2010. 11. 3)		ールド・アベニュー260番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 修飾第 I X 因子ポリペプチドおよびその使用

(57) 【要約】

修飾第 I X 因子 (F I X) ポリペプチドおよびその使用が提供される。そのような修飾 F I X ポリペプチドは F I X a および他の形態の F I X を含む。修飾 F I X ポリペプチドの中で、活性が改変され、典型的には凝血促進活性の増加を含めて凝血促進活性が改変されているものが提供される。したがって、そのような修飾ポリペプチドは治療薬である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸置換を含む修飾 F I X ポリペプチドであって、アミノ酸置換が、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 R 3 1 8 でのチロシン (Y) への置換 (R 3 1 8 Y)、R318E、R318F、R318W、R318D、R318I、R318K、R318L、R318M、R318S、R318V、S61A、S61C、S61D、S61E、S61F、S61G、S61I、S61K、S61L、S61P、S61R、S61V、S61W、S61Y、D64A、D64C、D64F、D64H、D64I、D64L、D64M、D64P、D64R、D64S、D64T、D64W、Y155F、Y155L、N157D、N157E、N157F、N157I、N157K、N157L、N157M、N157R、N157V、N157W、N157Y、S158A、S158D、S158E、S158F、S158G、S158I、S158K、S158L、S158M、S158R、S158V、S158W、S158Y、N167D、N167Q、N167E、N167F、N167G、N167H、N167I、N167K、N167L、N167M、N167P、N167R、N167V、N167W、N167Y、T169A、T169D、T169E、T169F、T169G、T169I、T169K、T169L、T169M、T169P、T169R、T169S、T169V、T169W、T169Y、T172A、T172D、T172E、T172F、T172G、T172I、T172K、T172L、T172M、T172P、T172R、T172S、T172V、T172W、T172Y、D203M、D203Y、D203F、D203H、D203I、D203K、D203L、D203R、D203V、D203W、A204M、A204Y、A204F、A204I、A204W、E239S、E239R、E239K、E239D、E239F、E239I、E239L、E239M、E239T、E239V、E239W、E239Y、H257F、H257E、H257D、H257I、H257K、H257L、H257M、H257Q、H257R、H257V、H257W、R312Y、R312L、R312C、R312D、R312E、R312F、R312I、R312K、R312M、R312P、R312S、R312T、R312V、R312W、K316M、K316D、K316F、K316H、K316I、K316L、K316R、K316V、K316W、K316Y、F342I、F342D、F342E、F342K、F342L、F342M、F342S、F342T、F342V、F342W、F342Y、T343R、T343E、T343D、T343F、T343I、T343K、T343L、T343M、T343S、T343V、T343W、T343Y、N346Y、N346E、N346F、N346H、N346I、N346K、N346L、N346M、N346Q、N346R、N346V、N346W、K400E、K400C、K400D、K400F、K400G、K400L、K400M、K400P、K400S、K400T、K400V、K400Y、R403D、R403F、R403I、R403K、R403L、R403M、R403S、R403V、R403Y、E410D、E410S、E410A、E410F、E410G、E410I、E410K、E410L、E410M、E410P、E410R、E410T、E410V、E410W、E410Y、T412A、T412V、T412C、T412D、T412E、T412F、T412G、T412I、T412M、T412P、T412W および T412Y、または未修飾 F I 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の中から選択され、対応するアミノ酸残基が、配列番号 3 のポリペプチドとの未修飾 F I X ポリペプチドのアライメントによって同定され、
ただし、修飾 F I X ポリペプチドが修飾 F 3 4 2 I / T 3 4 3 R / Y 3 4 5 T を含有しない、修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 2】

アミノ酸置換 R318Y、R318E、R318F、R318W、S61A、D64A、Y155F、Y155L、N157D、S158A、S158D、S158E、N167D、N167Q、T169A、T172A、D203M、D203Y、A204M、A204Y、E239S、E239R、E239K、H257F、H257E、R312Y、R312L、K316M、F342I、T343R、T343E、T343D、N346Y、K400E、R403D、E410D、E410S、E410A、T412A および T412V のの中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3】

R 3 1 8 または 3 1 8 に対応する残基でのアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換が、Y、E、F、および W のの中から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y を含む、請求項 3 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 5】

R 3 3 8 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける 3 3 8 に対応する残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 3 または請求項 4 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6】

アミノ酸置換 R 3 3 8 D もしくは R 3 3 8 E または未修飾 F I 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、請求項 3～5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 7】

アミノ酸置換 R 3 3 8 E を含む、請求項 3～6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 8】

残基 R 3 1 8 および R 3 3 8 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 R 3 1 8 および R 3 3 8 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3～6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 9】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E または未修飾 F I 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、請求項 3～8 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 10】

T 3 4 3 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 T 3 4 3 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 3 または請求項 4 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 11】

アミノ酸置換 T 3 4 3 R、T 3 4 3 E、もしくは T 3 4 3 D または未修飾 F I 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、請求項 1～10 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 12】

アミノ酸置換 T 3 4 3 R を含む、請求項 1～11 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 13】

残基 R 3 1 8 および T 3 4 3 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 R 3 1 8 および T 3 4 3 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3～12 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 14】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / T 3 4 3 R または未修飾 F I 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、請求項 3～13 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 15】

E 4 1 0 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 E 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 3～14 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 16】

N もしくは S である、残基 E 4 1 0 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3～15 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 17】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / E 4 1 0 N または未修飾 F I 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、請求項 3～16 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 18】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y ならびに配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの残基 3 3 8、3 4 3、4 0 3、および 4 1 0 の中から選択されるアミノ酸残基でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける残基 3 3 8、3 4 3、4 0 3、もしくは 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 1～17 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける R 3 3 8 E、T 3 4 3 R、R 4 0 3 E、および E 4 1 0 N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 1 8 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 20】

置換 R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E、Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、R318Y/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/R403E、R318Y/R338E/R403E、R318Y/R338E/E410N、K228N/R318Y/E410N、R318Y/R403E/E410N、D203N/F205T/R318Y/E410N、A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N、I251S/R318Y/E410N/R338E、D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N、A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、R318Y/R338E/R403E/E410S、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A、R318Y/R338E/R403E/T412A、R318Y/R338E/E410S、R318Y/R338E/T412A、R318Y/R338E/E410N/T412V、D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N、R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N、K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E、K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E、Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N、R318Y/T343R/R403E/E410N、Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E、Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E、K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E、Y155F/R318Y/T343R/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N および Y155F/R318Y/R403E/E410N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1～19 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 21】

アミノ酸置換 R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E、Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、R318Y/T343R/E410N または Y155F/R318Y/R338E/R403E を含む、請求項 1～20 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

10

【請求項 22】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N、R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N、または R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / E 4 1 0 N を含む、請求項 1～21 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 23】

未修飾 F I X ポリペプチドにおける D 2 0 3、F 2 0 5、および K 2 2 8 の中から選択されるアミノ酸残基でのまたはアミノ酸残基 D 2 0 3、F 2 0 5、もしくは K 2 2 8 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3 または 4 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 24】

D 2 0 3 N、F 2 0 5 T、および K 2 2 8 N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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アミノ酸置換を含む、請求項 1～23 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

20

【請求項 25】

アミノ酸置換 D 2 0 3 N / F 2 0 5 T / R 3 1 8 Y もしくは K 2 2 8 N / R 3 1 8 Y または未修飾 F I 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、請求項 1～24 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 26】

F または L から選択される、アミノ酸位置 Y 1 5 5 でのまたは 1 5 5 に対応する残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 1～25 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

30

【請求項 27】

アミノ酸置換 Y 1 5 5 F または未修飾 F I 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、請求項 1～26 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 28】

配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの残基 1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、2 2 8、2 5 1、2 6 0、もしくは 3 4 6 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける 1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、2 2 8、2 5 1、2 6 0、もしくは 3 4 6 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 26 または請求項 27 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 29】

A 1 0 3 N、D 1 0 4 N、N 1 0 5 S、K 1 0 6 S、K 2 2 8 N、I 2 5 1 S、N 2 6 0 S、および N 3 4 6 D の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1～28 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

40

【請求項 30】

Y155F/K228N、Y155F/I251S、D104N/K106S/Y155F/K228N、Y155F/N346D、Y155F/N260S、Y155F/N260S/N346D、D104N/K106S/Y155F/N260S、D104N/K106S/Y155F/K228N、A103N/N105S/Y155F および D104N/K106S/Y155F の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1～29 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

50

【請求項 3 1】

配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの 3 3 8、4 0 3、および 4 1 0 の中から選択される残基でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける 3 3 8、4 0 3、もしくは 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 2 6 または請求項 2 7 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 2】

R 3 3 8 E、R 4 0 3 E、および E 4 1 0 N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 3 1 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 3】

Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/R338E/T343R/R403E、Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S、Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E、Y155F/T343R/R403E/E410N、Y155F/R338E/T343R/E410N および Y155F/R338E/R403E/E410N の中から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 3 2 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 4】

アミノ酸置換 Y 1 5 5 F ならびに配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドのアミノ酸位置 2 4 7 および / または 2 4 9 でのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 3 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 5】

アミノ酸置換 Y 1 5 5 F / K 2 4 7 N / N 2 4 9 S を含む、請求項 1 ～ 3 4 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 6】

アミノ酸置換 Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、Y155F/K228N/K247N/N249S、Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R、Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N および Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 3 5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 7】

アミノ酸置換 Y 1 5 5 F / K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / R 3 3 8 E / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N を含む、請求項 1 ～ 3 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 8】

R、E、および D の中から選択される、T 3 4 3 でのまたは 3 4 3 に対応する残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 3 7 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 3 9】

アミノ酸置換 T 3 4 3 R または未修飾 F I 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、請求項 3 8 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 0】

R 3 3 8、Y 3 4 5、および N 3 4 6 の中から選択されるアミノ酸残基でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3 8 または請求項 3 9 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 1】

アミノ酸置換 R 3 3 8 E、Y 3 4 5 T、N 3 4 6 Y、もしくは N 3 4 6 D または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 4 0 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 2】

アミノ酸置換 T 3 4 3 R / Y 3 4 5 T、T 3 4 3 R / N 3 4 6 D、T 3 4 3 R / N 3 4

10

20

30

40

50

6 Y、もしくは R 3 3 8 E / T 3 4 3 R または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 4 1 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 3】

アミノ酸置換 K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N、R338E/T343R/E410N、Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E、R338E/T343R/R403E/E410N、R338E/T343R/R403E、K247N/N249S/R338E/T343R/R403E または K247N/N249S/R338E/T343R/E410N を含む、請求項 1 ～ 4 2 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 4】

アミノ酸置換 K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N、R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / E 4 1 0 N、または Y 1 5 5 F / I 2 5 1 S / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E を含む、請求項 1 ～ 4 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。 10

【請求項 4 5】

未修飾 F I X ポリペプチドにおける K 2 4 7、N 2 4 9、R 4 0 3、および E 4 1 0 の中から選択されるアミノ酸残基でのまたはアミノ酸残基 K 2 4 7、N 2 4 9、R 4 0 3、もしくは E 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3 8 または請求項 3 9 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 6】

K 2 4 7 N、N 2 4 9 S、R 4 0 3 E、および E 4 1 0 N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 4 5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。 20

【請求項 4 7】

アミノ酸置換 K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N を含む、請求項 1 ～ 4 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 4 8】

配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの 1、5、53、61、64、85、103、104、105、106、108、148、155、157、158、159、167、169、172、179、202、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、265、284、293、312、314、315、316、317、318、319、320、321、333、338、343、345、346、392、394、400、403、410、412 および 413 または未修飾 F I X ポリペプチドにおける対応する位置に対応する、1 つまたは複数の位置にアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 4 7 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。 30

【請求項 4 9】

Y1N、K5A、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、A103N、D104N、N105S、N105T、K106N、K106S、K106T、V108S、V108T、T148A、Y155F、Y155H、N157D、N157Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、T169A、T172A、T179A、V202M、V202Y、D203M、D203Y、D203N、A204M、A204Y、F205S、F205T、K228N、E239N、E239S、E239A、E239R、E239K、T241N、H243S、H243T、K247N、N249S、N249T、I251S、H257F、H257Y、H257E、H257S、N260S、A262S、A262T、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、F314N、H315S、K316S、K316T、K316M、G317N、R318E、R318Y、R318N、R318A、S319N、A320S、L321N、L321S、L321T、R333A、R333E、R338A、R338E、F342I、T343R、T343E、T343Q、Y345A、Y345T、N346D、N346T、K392N、K394S、K394T、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410S、E410N、E410A、E410D、T412V、T412A および K413N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 4 8 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。 40

【請求項 5 0】

置換 R 3 1 8 E / R 4 0 3 E、E 4 1 0 N / T 4 1 2 A、もしくは E 4 1 0 N / T 4 1 2 V から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 4 9 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。 50

ド。

【請求項 51】

未修飾 F I X ポリペプチドにおける 2 つのアミノ酸置換を含む修飾第 I X 因子 (F I X) ポリペプチドであって、

第 1 のアミノ酸置換が、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける 53、61、64、85、103、104、105、106、108、155、158、159、167、169、172、179、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、265、284、293、312、314、315、316、317、318、319、321、333、338、343、345、346、392、394、400、403、410、412 および 413 の中から選択されるアミノ酸残基または未修飾 F I X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基にあり、対応するアミノ酸残基が、配列番号 3 のポリペプチドとの未修飾 F I X ポリペプチドのアライメントによって同定され、

第 2 のアミノ酸置換が、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける 5、53、61、64、85、155、158、159、167、239、260、284、293、312、318、333、338、346、400、403、410、412、および 413 の中から選択されるアミノ酸残基または未修飾 F I X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基にあり、対応するアミノ酸残基が、配列番号 3 のポリペプチドとの未修飾 F I X ポリペプチドのアライメントによって同定される、修飾第 I X 因子 (F I X) ポリペプチド。

【請求項 52】

第 1 のアミノ酸置換が、アラニン (A l a、A) ; アルギニン (A r g、R) ; アスパラギン (A s n、N) ; アスパラギン酸 (A s p、D) ; システイン (C y s、C) ; グルタミン酸 (G l u、E) ; グルタミン (G l n、Q) ; グリシン (G l y、G) ; ヒスチジン (H i s、H) ; イソロイシン (I l e、I) ; ロイシン (L e u、L) ; リシン (L y s、K) ; メチオニン (M e t、M) ; フェニルアラニン (P h e、F) ; プロリン (P r o、P) ; セリン (S e r、S) ; トレオニン (T h r、T) ; トリプトファン (T r p、W) ; チロシン (T y r、Y) ; および、バリン (V a l、V) の中から選択されるアミノ酸残基による置換であり、置換するアミノ酸は、置換されるアミノ酸と同じではない、請求項 51 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 53】

第 1 のアミノ酸置換が、アラニン (A l a、A) ; アスパラギン (A s n、N) ; アスパラギン酸 (A s p、D) ; グルタミン酸 (G l u、E) ; グルタミン (G l n、Q) ; ヒスチジン (H i s、H) ; イソロイシン (I l e、I) ; ロイシン (L e u、L) ; リシン (L y s、K) ; メチオニン (M e t、M) ; フェニルアラニン (P h e、F) ; セリン (S e r、S) ; トレオニン (T h r、T) ; チロシン (T y r、Y) ; およびバリン (V a l、V) の中から選択されるアミノ酸残基による置換または保存的アミノ酸置換である、請求項 51 または請求項 52 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 54】

第 1 のアミノ酸置換が、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、A103N、D104N、N105S、K106S、K106N、V108S、Y155F、Y155H、Y155Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、T169A、T172A、T179A、V202M、V202Y、D203M、D203Y、A204M、A204Y、K228N、E239A、E239N、E239S、E239R、E239K、T241N、H243S、K247N、N249S、I251S、H257F、H257E、H257F、H257Y、H257S、Y259S、N260S、A262S、K265T、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、F314N、H315S、K316S、K316N、K316A、K316E、K316S、K316M、G317N、R318A、R318E、R318Y、R318N、S319N、A320S、L321S、K321N、R333A、R333E、R333S、R338A、R338E、R338L、F342I、T343R、T343E、T343Q、Y345A、Y345T、N346D、N346Y、K392N、K394S、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410N、E410D、E410S、E410A、T412A、T412V および K413N または保存的アミノ酸置換または未修飾 F I 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の中から選択される、請求項 51 ~ 53 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 55】

第2のアミノ酸置換が、アラニン (Ala、A)；アルギニン (Arg、R)；アスパラギン (Asn、N)；アスパラギン酸 (Asp、D)；システイン (Cys、C)；グルタミン酸 (Glu、E)；グルタミン (Gln、Q)；グリシン (Gly、G)；ヒスチジン (His、H)；イソロイシン (Ile、I)；ロイシン (Leu、L)；リシン (Lys、K)；メチオニン (Met、M)；フェニルアラニン (Phe、F)；プロリン (Pro、P)；セリン (Ser、S)；トレオニン (Thr、T)；トリプトファン (Trp、W)；チロシン (Tyr、Y)；および、バリン (Val、V)の中から選択されるアミノ酸残基による置換であり、

置換するアミノ酸は、置換されるアミノ酸と同じではない、請求項 51～52のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

10

【請求項 56】

第2のアミノ酸置換が、アラニン (Ala、A)；アルギニン (Arg、R)；アスパラギン (Asn、N)；アスパラギン酸 (Asp、D)；グルタミン酸 (Glu、E)；グルタミン (Gln、Q)；ヒスチジン (His、H)；ロイシン (Leu、L)；リシン (Lys、K)；フェニルアラニン (Phe、F)；セリン (Ser、S)；トレオニン (Thr、T)；チロシン (Tyr、Y)；およびバリン (Val、V)の中から選択されるアミノ酸残基による置換または保存的アミノ酸置換である、請求項 51～55のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

20

【請求項 57】

第2のアミノ酸置換が、K5A、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、Y155F、Y155H、Y155Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、E239A、E239N、E239S、E239R、E239K、N260S、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、R318A、R318E、R318Y、R318N、R333A、R333E、R333S、R338A、R338E、R338L、N346D、N346Y、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410N、E410D、E410S、E410A、T412A、T412VおよびK413Nまたは保存的アミノ酸置換または未修飾 F I 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の中から選択される、請求項 51～56のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 58】

第1のアミノ酸置換が、318、155、247、249、338、403、および410の中から選択される位置でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基での置換である、請求項 51～57のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

30

【請求項 59】

第1のアミノ酸置換が、R318Y、Y155F、K247N、N249S、R338E、R403E、およびE410Nの中から選択される、または未修飾 F I 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アミノ酸置換である、請求項 51～58のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 60】

第2のアミノ酸置換が、338、155、247、249、318、403、および410の中から選択される位置にある、または未修飾 F I X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基にある、請求項 51～59のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

40

【請求項 61】

第2のアミノ酸置換が、R338E、Y155F、K247N、N249S、R318Y、R403E、およびE410Nの中から選択される、または対応するアミノ酸残基での同じ置換である、請求項 51～60のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 62】

アミノ酸置換K400E/R403E、D85N/K228N、D85N/I251S、K400A/R403A、R338A/R403A、R338E/R403E、K293A/R403A、K293E/R403E、R318A/R403A、R338E/E410N、K228N/E410N、K228N/R338E、K228N/R338AおよびR403E/E410Nの中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 51～61

50

のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 3】

配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける 53、61、64、85、103、104、105、106、108、155、158、159、167、169、172、179、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、265、284、293、312、314、315、316、317、318、319、321、333、338、343、346、345、392、394、400、403、410、412 および 413 の中から選択される位置にさらなるアミノ酸置換を含む、請求項 5 1 ~ 6 2 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 4】

さらなるアミノ酸置換が、Y1N、Y5A、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、A103N、D104N、N105S、K106S、K106N、V108S、Y155F、Y155H、Y155Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、T169A、T172A、T179A、V202M、V202Y、D203M、D203Y、A204M、A204Y、K228N、E239A、E239N、E239S、E239R、E239K、T241N、H243S、K247N、N249S、I251S、H257F、H257E、H257Y、H257S、Y259S、N260S、A262S、K265T、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、F314N、H315S、K316S、K316N、K316A、K316E、K316S、K316M、G317N、R318A、R318E、R318Y、R318N、S319N、A320S、L321S、R333A、R333E、R333S、R338A、R338E、R338L、F342I、T343R、T343E、T343Q、Y345A、Y345T、N346D、N346Y、K392N、K394S、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410N、E410D、E410S、E410A、T412A、T412V および K413N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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する、請求項 6 2 または請求項 6 3 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 5】

置換 D85N/D203N/F205T、D85N/D104N/K106S/I251S、K293A/R338A/R403A、K293E/R338E/R403E、R338E/R403E/E410N、D203N/F205T/K228N、D203N/F205T/E410N、D203N/F205T/R338E、D203N/F205T/R338A、D203N/F205T/R338E/R403E、K228N/R338E/R403E、K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/N260S、D104N/K106S/K228N/K247N/N249S、A103N/N105S/K228N、D104N/K106S/K228N、A103N/N105S/I251S、D104N/K106S/I251S、A103N/N105S/K247N/N249S、D104N/K106S/K247N/N249S、K228N/K247N/N249S、D104N/K106S/N260S、Y259F/K265T/Y345T、D104N/K106S/K247N/N249S/N260S および K247N/N249S/R338E/R403E/E410N に対応するアミノ酸置換の中から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項 5 1 ~ 6 4 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 6】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1 つまたは複数のグリコシル化部位を導入および／または排除する、1 つまたは複数の修飾を含む、請求項 1 ~ 6 5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 7】

グリコシル化部位が、N-、O-、および S-グリコシル化部位の中から選択される、請求項 6 6 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 8】

1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のグリコシル化部位が導入されている、請求項 6 6 または請求項 6 7 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 6 9】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、アンチトロンビン I I I および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加を示す、請求項 1 ~ 6 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 7 0】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上の

、アンチトロンビン I I I および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加を示す、請求項 69 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 71】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、触媒活性の増加を示す、請求項 1～70 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 72】

触媒活性の増加が、F V I I I a の存在下におけるものである、請求項 71 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 73】

触媒活性の増加が、F V I I I a の非存在におけるものである、請求項 72 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

10

【請求項 74】

修飾 F I X ポリペプチドの触媒活性が、未修飾 F I X ポリペプチドの触媒よりも少なくとも約 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 %、もしくはそれ以上または 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 %、もしくはそれ以上大きい、請求項 69～73 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

20

【請求項 75】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、薬物動態学的特性の改善を示す、請求項 1～74 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 76】

薬物動態学的特性の改善が、未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、1 つまたは複数のクリアランスの減少、分布容積の改変、インビボにおける回収率の増加、インビボにおける総修飾 F I X ポリペプチド暴露の増加、血清半減期の増加、および平均共鳴時間 (MRT) の増加の中から選択される、請求項 75 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 77】

薬物動態学的特性の改善が、血清半減期の増加であり、血清半減期が、 α 、 β 、または γ 相である、請求項 76 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

30

【請求項 78】

薬物動態学的特性の改善が、クリアランスの減少であり、修飾 F I X ポリペプチドのクリアランスが、未修飾 F I X ポリペプチドのクリアランスの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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 減少する、請求項 76 または請求項 77 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 79】

薬物動態学的特性の改善が、分布容積の改変であり、分布容積が、増加するまたは減少する、請求項 76 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

40

【請求項 80】

分布容積の改変が、分布容積の減少であり、修飾 F I X ポリペプチドの分布容積が、未修飾 F I X ポリペプチドの分布容積の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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 減少する、請求項 79 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 81】

分布容積の改変が、分布容積の増加であり、修飾 F I X ポリペプチドの分布容積が、未

50

修飾 F I X ポリペプチドの分布容積の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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上増加する、請求項 79 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 82】

薬物動態学的特性の改善が、インビボにおける回収率の増加であり、修飾 F I X ポリペプチドのインビボにおける回収率が、未修飾 F I X ポリペプチドのインビボにおける回収率の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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上増加する、請求項 76 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

10

【請求項 83】

薬物動態学的特性の改善が、インビボにおける総修飾 F I X ポリペプチド暴露の増加であり、インビボにおける総修飾 F I X ポリペプチド暴露が、未修飾 F I X ポリペプチドのインビボにおける総暴露の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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上増加する、請求項 76 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

20

【請求項 84】

薬物動態学的特性の改善が、血清半減期の増加であり、血清半減期が、未修飾 F I X ポリペプチドの血清半減期の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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上増加する、請求項 76 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 85】

薬物動態学的特性の改善が、M R T の増加であり、M R T が、未修飾 F I X ポリペプチドのインビボにおける M R T の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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上増加する、請求項 76 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

30

【請求項 86】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、凝血促進活性の増加を示す、請求項 1 ～ 85 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 87】

修飾 F I X ポリペプチドの凝血促進活性が、未修飾 F I X ポリペプチドの凝血促進活性よりも少なくとも約 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 %、もしくはそれ以上または 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 %、もしくはそれ以上大きい、請求項 86 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

40

【請求項 88】

未修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 2、3、20、もしくは 325 のいずれかにお

50

いて記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2、3、20、もしくは 325 のいずれかにおいて記載される F I X ポリペプチドと少なくとも 60 % の配列同一性を有する配列、または配列番号 2、3、20、もしくは 325 のいずれかにおいて記載される F I X ポリペプチドの活性断片を含む配列である、請求項 1～87 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 89】

未修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 2、3、20、または 325 のいずれかにおいて記載される F I X ポリペプチドと少なくとも 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1～88 のいずれかに記載の修飾 F I X

10

【請求項 90】

未修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 2、3、20 または 325 において記載されるアミノ酸の配列を有する、請求項 1～89 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 91】

配列番号 76、84-87、90-91、95-97、100、102、104-105、113、121-122、125-126、129-134、138、146-173、175-176、178-185、188、193-194、196-198、200、202-206、208-210、212、215-272、326-41 および 413-417 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 76、84-87、90-91、95-97、100、102、104-105、113、121-122、125-126、129-134、138、146-173、175-176、178-185、188、193-194、196-198、200、202-206、208-210、212、215-272、326-41 および 413-417 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列と少なくとも 60 % のアミノ酸配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、修飾 F I X ポリペプチド。

20

【請求項 92】

配列番号 76、84-87、90-91、95-97、100、102、104-105、113、121-122、125-126、129-134、138、146-173、175-176、178-185、188、193-194、196-198、200、202-206、208-210、212、215-272、326-41 および 413-417 のいずれかにおいて記載される修飾 F I X ポリペプチドに対して少なくともまたは約 65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有するアミノ酸の配列を含む、請求項 91 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

30

【請求項 93】

修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 76、84-87、90-91、95-97、100、102、104-105、113、121-122、125-126、129-134、138、146-173、175-176、178-185、188、193-194、196-198、200、202-206、208-210、212、215-272、326-41 および 413-417 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列を含む、請求項 91 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 94】

ヒトポリペプチドである、請求項 1～93 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 95】

非ヒトポリペプチドである、請求項 1～94 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

40

【請求項 96】

成熟ポリペプチドである、請求項 1～95 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 97】

二重鎖ポリペプチドである、請求項 1～96 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 98】

単鎖ポリペプチドである、請求項 1～97 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

50

【請求項 99】

活性であるまたは活性化されている、請求項 1～98 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 100】

活性化が、第 X I 因子 (F X I a) または F V I I a によるタンパク質分解性の切断によって達成される、請求項 99 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 101】

活性化が、組織因子／第 V I I a 因子複合体によるタンパク質分解性の切断によって達成される、請求項 99 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 102】

一次配列のみが修飾されている、請求項 1～101 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 103】

化学修飾または翻訳後修飾をさらに含む、請求項 1～101 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 104】

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 (P E G) 部分にコンジュゲートされている、請求項 103 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 105】

キメラまたは融合タンパク質である、請求項 1～104 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 106】

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の修飾を含む、請求項 1～105 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 107】

修飾 F I X ポリペプチドが未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 1 つの F I X 活性を示す限り、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、もしくは 60、またはそれ以上の修飾を含む、請求項 1～106 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 108】

未修飾 F I X ポリペプチドの活性の少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、もしくはそれ以上または 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、もしくはそれ以上を示す、請求項 103 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 109】

1 つまたは複数の活性が、F I X ポリペプチドの第 V I I I a 因子結合、第 X 因子結合、リン脂質結合、および／または血液凝固活性の中から選択される、請求項 107 または請求項 108 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 110】

活性が、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して増加する、請求項 107～109 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 111】

活性が、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して減少する、請求項 107～109 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 112】

活性が、インビトロ、エクスビボ、またはインビボにおいて測定される、請求項 1 0 7 ～ 1 1 1 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 1 3】

請求項 1 ～ 1 1 2 のいずれかに記載の修飾 F I 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 1 1 4】

請求項 1 1 3 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 1 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 1 1 4 に記載のベクター。

【請求項 1 1 6】

哺乳動物ベクターである、請求項 1 1 4 または請求項 1 1 5 に記載のベクター。

【請求項 1 1 7】

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中から選択される、請求項 1 1 4 または請求項 1 1 5 に記載のベクター。

【請求項 1 1 8】

請求項 1 1 0 ～ 1 1 3 のいずれかに記載のベクターを含む細胞。

【請求項 1 1 9】

真核細胞である、請求項 1 1 8 に記載の細胞。

【請求項 1 2 0】

真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 1 1 9 に記載の細胞。

【請求項 1 2 1】

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細胞の中から選択される、請求項 1 2 0 に記載の細胞。

【請求項 1 2 2】

修飾 F I X ポリペプチドを発現する、請求項 1 1 8 ～ 1 2 1 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 2 3】

請求項 1 1 8 ～ 1 2 2 のいずれかに記載の細胞によって産生される修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 2 4】

薬学的に許容される媒体中に請求項 1 ～ 1 1 2 および請求項 1 2 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 1 2 5】

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 1 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2 6】

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、請求項 1 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2 7】

徐放性用に製剤されている、請求項 1 2 4 ～ 1 2 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 2 8】

単一投薬量投与用に製剤されている、請求項 1 2 4 ～ 1 2 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 2 9】

請求項 1 2 4 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の医薬組成物を投与することによって対象を処置することを含む方法であって、対象が、F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態を有する方法。

【請求項 1 3 0】

10

20

30

40

50

疾患または状態が、活性 F I X (F I X a) の投与によって処置される、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

医薬組成物を用いる処置が、疾患または状態と関連する症状を回復させるまたは軽減する、請求項 1 2 9 または請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態と関連する症状の変化について対象をモニターすることをさらに含む、請求項 1 2 9 ～ 1 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 3】

処置されることとなる疾患または状態が、血液凝固障害、血液障害、出血性障害、血友病、および出血障害の中から選択される、請求項 1 2 9 ～ 1 3 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 4】

血友病が、血友病 B である、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

1 つまたは複数のさらなる凝固因子を投与することをさらに含む、請求項 1 2 9 ～ 1 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 6】

1 つまたは複数のさらなる凝固因子が、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、ならびにコルチコステロイドの中から選択される、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

包装材料および包装材料内に含有される、請求項 1 2 4 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の医薬組成物を含む製品。

【請求項 1 3 8】

修飾 F I X ポリペプチドが、F I X または凝血促進薬の投与によって処置可能な疾患の処置に有効であり、包装材料が、修飾 F I X ポリペプチドが、F I X または凝血促進薬の投与によって処置可能な疾患の処置に使用されることを示すラベルを含む、請求項 1 3 3

【請求項 1 3 9】

請求項 1 2 4 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の医薬組成物、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もよいキット。

【請求項 1 4 0】

F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態の処置における使用のための、請求項 1 ～ 1 1 2 および 1 2 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 4 1】

F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態の処置のための薬剤の調製における、請求項 1 2 4 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 1 4 2】

疾患または状態が、活性 F I X (F I X a) の投与によって処置される、請求項 1 4 0 に記載の修飾 F I X ポリペプチドまたは請求項 1 4 1 に記載の使用。

【請求項 1 4 3】

処置が、疾患または状態と関連する症状を回復させるまたは軽減する、請求項 1 4 0 に記載の修飾 F I X ポリペプチドまたは請求項 1 4 1 に記載の使用。

【請求項 1 4 4】

F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態と関連する症状における変化について対象をモニターすることをさらに含む、請求項 1 4 0 もしくは 1 4 2 もしくは 1 4 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドまたは請求項 1 4 1 ～ 1 4 3 の

10

20

30

40

50

いずれかに記載の使用。

【請求項 1 4 5】

処置されることとなる疾患または状態が、血液凝固障害、血液障害、出血性障害、血友病、および出血障害の中から選択される、請求項 1 4 0 もしくは 1 4 2 ～ 1 4 4 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドまたは請求項 1 4 1 ～ 1 4 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 4 6】

血友病が、血友病 B である、請求項 1 4 0 もしくは 1 4 2 ～ 1 4 5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドまたは請求項 1 4 1 ～ 1 4 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 4 7】

1 つまたは複数のさらなる凝固因子を投与することをさらに含む、請求項 1 4 0 もしくは 1 4 2 ～ 1 4 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドまたは請求項 1 4 1 ～ 1 4 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 4 8】

1 つまたは複数のさらなる凝固因子が、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、ならびにコルチコステロイドの中から選択される、請求項 1 4 7 に記載の修飾 F I X ポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

優先権の利益は、Edwin Madison、Christopher Thanos、および Grant Ellsworth Blouse の、2010 年 11 月 3 日に提出された「MODIFIED FACTOR IX POLYPEPTIDES AND USES THEREOF」と題する米国仮特許出願第 61/456,298 号に対して主張される。

【0 0 0 2】

本出願はまた、「MODIFIED FACTOR IX POLYPEPTIDES AND USES THEREOF」と題する、本明細書と共に同日に提出された、対応する米国特許出願第 [代理人整理番号 33328.04918. US01/4918] 号にも関し、これもまた、米国仮特許出願第 61/456,298 号に対する優先権を主張する。

【0 0 0 3】

許可される場合、上記に参照される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。

【0 0 0 4】

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 1.07 メガバイトであり、4918 SEQ PC1. txt という名称である。

【0 0 0 5】

修飾 F I X ポリペプチドが、提供される。F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加などのような改善された特性を示すように修飾される。これらのポリペプチドをコードする核酸分子および修飾 F I X ポリペプチドを使用するための方法もまた、提供される。

【背景技術】

【0 0 0 6】

組換えで産生された第 I X 因子 (F I X) ポリペプチドは、血友病、特に血友病 B の処置について承認されてきた。血栓溶解疾患の処置において有用な抗凝固活性を示す F I X

10

20

30

40

50

ポリペプチドもまた、治療上興味深い。したがって、F I Xは、他の凝固因子のように、凝血促進療法および抗凝固療法にとって重要な治療剤となる。治療上の使用のためのF I Xポリペプチドについての必要性がある。そのため、本明細書における目的の中でも、改善された治療特性を有するように設計された修飾F I Xポリペプチドを提供することを目的とする。

【発明の概要】

【0007】

修飾F I Xポリペプチドが、提供される。提供される修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、改善された凝血促進治療特性を有する。たとえば、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドの中には、血液凝固活性の増加、触媒活性の増加、A T-I I I、ヘパリン、および／もしくはA T-I I I／ヘパリン複合体に対する抵抗性の増加、ならびに／またはi) クリアランスの減少、i i) 分布容積の改変（たとえば増加もしくは減少）、i i i) インビボ（i n v i v o）における回収率の増強、i v) インビボにおける総タンパク質暴露の増強（つまりA U C）、v) 血清半減期（ α -、 β -、および／もしくは γ -相）の増加、ならびに／またはv i) 平均共鳴時間（mean resonance time）（M R T）の増加などのような改善された薬物動態学的特性を示すものがある。いくつかの例では、改善された薬物動態学的特性が、グリコシル化の増加および／または低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（L R P）に対する結合の減少の結果である。修飾F I Xポリペプチドをコードする核酸および出血障害の処置などのために修飾F I Xポリペプチドを使用するための方法もまた、

【0008】

本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドの中で、未修飾F I Xポリペプチド中に2つのアミノ酸置換を含むものがあり、第1のアミノ酸置換は、配列番号3において記載される配列を有する成熟F I Xポリペプチドにおける53、61、64、85、103、104、105、106、108、155、158、159、167、169、172、179、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、265、284、293、312、314、315、316、317、318、319、321、333、338、343、346、345、392、394、400、403、410、412および413の中から選択される位置に対応する位置にあり、第2のアミノ酸置換は、配列番号3において記載される配列を有する成熟F I Xポリペプチドにおける5、53、61、64、85、155、158、159、167、239、260、284、293、312、318、333、338、346、400、403、410、412、および413の中から選択される位置に対応する位置にある。

【0009】

いくつかの例では、第1または第2のアミノ酸置換が、アラニン（A l a、A）；アルギニン（A r g、R）；アスパラギン（A s n、N）；アスパラギン酸（A s p、D）；システイン（C y s、C）；グルタミン酸（G l u、E）；グルタミン（G l n、Q）；グリシン（G l y、G）；ヒスチジン（H i s、H）；イソロイシン（I l e、I）；ロイシン（L e u、L）；リシン（L y s、K）；メチオニン（M e t、M）；フェニルアラニン（P h e、F）；プロリン（P r o、P）；セリン（S e r、S）；トレオニン（T h r、T）；トリプトファン（T r p、W）；チロシン（T y r、Y）；およびバリン（V a l、V）の中から選択されるアミノ酸残基との置換である、ただし、置換するアミノ酸はそれが置換されるアミノ酸と同じではない。特定の例では、第1のアミノ酸置換が、アラニン；アスパラギン；アスパラギン酸、グルタミン酸；グルタミン；ヒスチジン；イソロイシン；ロイシン；リシン；メチオニン；フェニルアラニン；セリン；トレオニン；チロシン、およびバリンの中から選択されるアミノ酸残基との置換である。たとえば、例示的なアミノ酸置換は、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、A103N、D104N、N105S、K106S、K106N、V108S、Y155F、Y155H、Y155Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、T169A、T172A、T179A、V202M、V202Y、D203M、D203Y、A204M、A204Y、K228N、E239A、E239N、E239S、E239R、E239K、T241N、H243S、K247N、N249S、I251S、H257F、H257E、H257F、

H257Y、H257S、Y259S、N260S、A262S、K265T、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、F314N、H315S、K316S、K316N、K316A、K316E、K316S、K316M、G317N、R318A、R318E、R318Y、R318N、S319N、A320S、L321S、R333A、R333E、R333S、R338A、R338E、R338L、T343R、T343E、T343Q、F342I、Y345A、Y345T、N346D、N346Y、K392N、K394S、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410N、E410D、E410S、E410A、T412A、T412VまたはK413Nを含む。他の例示的なアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0010】

いくつかの場合では、第2のアミノ酸置換が、アラニン；アルギニン；アスパラギン；アスパラギン酸；グルタミン酸；グルタミン；ヒスチジン；ロイシン；リシン；フェニルアラニン；セリン；トレオニン；チロシン；またはバリンの中から選択されるアミノ酸残基との置換である。たとえば、例示的なアミノ酸置換は、K5A、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、Y155F、Y155H、Y155Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、E239A、E239N、E239S、E239R、E239K、N260S、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、R318A、R318E、R318Y、R318N、R333A、R333E、R333S、R338A、R338E、R338L、N346D、N346Y、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410N、E410D、E410S、E410A、T412A、T412VまたはK413Nを含む。他の例示的なアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0011】

特定の例では、第1のアミノ酸置換が、たとえばY155F、K247N、N249S、R318Y、R338E、R403E、およびE410Nなどのように、155、247、249、318、338、403、および410の中から選択される位置に対応する位置にある。さらなる例では、第2のアミノ酸置換が、たとえばY155F、K247N、N249S、R318Y、R338E、R403E、およびE410Nなどのように、155、247、249、318、338、403、および410の中から選択される位置に対応する位置にある。

【0012】

本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドの中で、K400E/R403E、R318E/R403E、R318Y/E410N、K228N/R318Y、Y155F/K228N、Y155F/I251S、Y155F/N346D、Y155F/N260S、R338E/T343R、E410N/T412A、E410N/T412V、R318Y/R338E、D85N/K228N、D85N/I251S、K400A/R403A、R338A/R403A、R338E/R403E、K293A/R403A、K293E/R403E、R318A/R403A、R338E/E410N、K228N/E410N、K228N/R338E、K228N/R338AおよびR403E/E410Nに対応するアミノ酸置換の中から選択されるアミノ酸置換を含有するものがある。

【0013】

いくつかの例では、修飾F I Xポリペプチドが、配列番号3において記載される配列を有する成熟F I Xポリペプチドにおける53、61、64、85、103、104、105、106、108、155、158、159、167、169、172、179、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、265、284、293、312、314、315、316、317、318、319、321、333、338、343、346、345、392、394、400、403、410、412および413の中から選択される位置の1つまたは複数などに、1つまたは複数のさらなるアミノ酸置換を含有する。たとえば、修飾F I Xポリペプチドは、Y5A、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、A103N、D104N、N105S、K106S、K106N、V108S、Y155F、Y155H、Y155Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、T169A、T172A、T179A、V202M、V202Y、D203M、D203Y、A204M、A204Y、K228N、E239A、E239N、E239S、E239R、E239K、T241N、H243S、K247N、N249S、I251S、H257F、H257E、H257F、H257Y、H257S、Y259S、N260S、A262S、K265T、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、F314N、H315S、K316S、K316N、K316A、K316E、K316S、K316M、G317N、R318A、R318E、R318Y、R318N、S319N、A320S、L321S、R333A、R333E、R333S、R338A、R338E、R338L、T343R、T343E、T343Q、F342I、Y345A、Y345T、N346D、N346Y、K392N、K394S、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410N、E410D、E410S、E410A、T412A、T412VおよびK413N、または保存的アミノ酸置換の中から選択される、さらなるアミノ酸置換を含有することができる。

【0014】

いくつかの例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、R318Y/R338E/R403E、D203N/F205T/R318Y、R318Y/R338E/E410N、K228N/R318Y/E410N、R318Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/R403E/E410N、D203N/F205T/R318Y/E410N、A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/E410N/R338E、I251S/R318Y/E410N/R338E、D104N/K106S/I251S/R318Y/E410N/R338E、A103N/N105S/Y155F、D104N/K106S/Y155F、Y155F/K247N/N249S、A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、D104N/K106S/Y155F/K228N、Y155F/K228N/K247N/N249S、R318Y/R338E/R403E/E410S、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A、R318Y/R338E/R403E/T412A、R318Y/R338E/E410S、R318Y/R338E/T412A、R318Y/R338E/E410N/T412V、D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、Y155F/N260S/N346D、K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/N260S、Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K228N、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、D85N/D203N/F205T、D85N/D104N/K106S/I251S、K293A/R338A/R403A、K293E/R338E/R403E、R338E/R403E/E410N、D203N/F205T/K228N、D203N/F205T/E410N、D203N/F205T/R338E、D203N/F205T/R338A、D203N/F205T/R338E/R403E、K228N/R338E/R403E、K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/N260S、K228N/K247N/N249S/D104N/K106S、A103N/N105S/K228N、D104N/K106S/K228N、A103N/N105S/I251S、D104N/K106S/I251S、A103N/N105S/K247N/N249S、D104N/K106S/K247N/N249S、K228N/K247N/N249S、D104N/K106S/K228N/K247N/N249S、K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/N260S、Y259F/K265T/Y345TおよびD104N/K106S/K247N/N249S/N260Sに対応するアミノ酸置換の中から選択されるアミノ酸置換を含有する。

【 0 0 1 5 】

未修飾 F I X ポリペプチド中に修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドであって、修飾が、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸置換 S61A、D64A、Y155F、N157D、S158A、S158D、S158E、N167D、N167Q、T169A、T172A、D203M、D203Y、A204M、A204Y、E239S、E239R、E239K、H257F、H257E、R312Y、R312L、K316M、R318E、R318Y、T343R、T343E、F342I、N346Y、K400E、E410D、E410S、E410A、T412A および T 4 1 2 V に対応する修飾の中から選択される修飾 F I X ポリペプチドもまた、本明細書において提供される。いくつかの例では、修飾 F I X ポリペプチドが、2 つ以上のアミノ酸置換を含有する。

【 0 0 1 6 】

特定の場合では、修飾 F I X ポリペプチドが、突然変異 Y 1 5 5 F を含有する。たとえば、Y 1 5 5 F ならびに配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの 2 4 7、2 4 9、3 3 8、4 0 3、および 4 1 0 に対応する位置の中から選択されるアミノ酸位置に修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドが、提供される。一例では、修飾 F I X が、Y 1 5 5 F / K 2 4 7 N / N 2 4 9 S を含有する。さらなる場合では、修飾 F I X ポリペプチドが、突然変異 R 3 1 8 Y を含有する。たとえば、R 3 1 8 Y ならびにたとえば R 3 3 8 E、R 4 0 3 E、または E 4 1 0 N などのように、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの 3 3 8、4 0 3、および 4 1 0 に対応する位置から選択されるアミノ酸位置に修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドが、提供

される。

【 0 0 1 7 】

いくつかの例では、修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの 5、53、61、64、85、103、104、105、106、108、148、155、157、158、159、167、169、172、179、202、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、265、284、293、312、314、315、316、317、318、319、320、321、333、338、343、345、346、392、394、400、403、410、412 および 413 に対応する位置の中から選択されるアミノ酸位置に 1 つまたは複数のさらなる修飾を含有する。例示的な修飾（複数可）は、アミノ酸置換 K5A、S53A、S61A、D64A、D64N、D85N、A103N、D104N、N105S、N105T、K106N、K106N、K106T、V108S、V108T、T148A、Y155F、Y155H、N157D、N157Q、S158A、S158D、S158E、T159A、N167D、N167Q、T169A、T172A、T179A、V202M、V202Y、D203M、D203Y、D203N、A204M、A204Y、F205S、F205T、K228N、E239N、T241N、E239S、E239A、E239R、E239K、H243S、H243T、K247N、N249S、N249T、I251S、I251T、H257F、H257Y、H257E、H257S、N260S、A262S、A262T、Y284N、K293E、K293A、R312Q、R312A、R312Y、R312L、F314N、H315S、K316S、K316T、K316M、G317N、R318E、R318Y、R318N、R318A、S319N、A320S、L321N、L321S、L321T、R333A、R333E、R338A、R338E、T343R、T343E、T343Q、F342I、Y345A、Y345T、N346D、N346T、K392N、K394S、K394T、K400A、K400E、R403A、R403E、E410Q、E410S、E410N、E410A、E410D、T412V、T412A および K413N に対応する修飾の中から選択される。

【 0 0 1 8 】

したがって、アミノ酸置換 K400E/R403E、R318E/R403E、R318Y/E410N、R318Y/R338E/R403E、D203N/F205T/R318Y、K228N/R318Y、R318Y/R338E/E410N、K228N/R318Y/E410N、R318Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/R403E/E410N、D203N/F205T/R318Y/E410N、A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/E410N/R338E、I251S/R318Y/E410N/R338E、D104N/K106S/I251S/R318Y/E410N/R338E、A103N/N105S/Y155F、D104N/K106S/Y155F、Y155F/K228N、Y155F/I251S、Y155F/K247N/N249S、A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、D104N/K106S/Y155F/K228N、Y155F/K228N/K247N/N249S、R318Y/R338E/R403E/E410S、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A、R318Y/R338E/R403E/T412A、R318Y/R338E/E410S、R318Y/R338E/T412A、R318Y/R338E/E410N/T412V、D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、Y155F/N346D、Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、Y155F/N260S、Y155F/N260S/N346D、K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/N260S、Y155F/K247N/N249S/N260S、R338E/T343R および D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K228N、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、T343R/Y345T、E410N/T412A、R410N/T412V および R318Y/R338E に対応する修飾の中から選択される修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。特定の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N または Y 1 5 5 F / K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N に対応する修飾を含有する。

【 0 0 1 9 】

いくつかの場合では、未修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 2、3、20、もしくは 325 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列を含有するまたはその種変異体または配列番号 2、3、20、もしくは 325 のいずれかの F I X と少なくとも 60% の配列同一性を有する変異体であるまたは配列番号 2、3、20、もしくは 325 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列を含む F I X ポリペプチドの活性断片である。たとえば、種変異体は、配列番号 4～18 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列を有することができる。他の例では、配列番号 2、3、20、または 325 のいずれかの F I X と少なくとも 60% の配列同一性を有する変異体が、配列番号 75～272 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列を有する。さらなる例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの活性断片であり、修飾 F I X ポリペプチドが、修飾（複数可）を含有する。

10

【0020】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドのいずれも、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のグリコシル化部位を導入するおよび／または排除する、1つまたは複数の修飾を含有することができる。いくつかの例では、グリコシル化部位が、N-、O-、および S-グリコシル化部位の中から選択される。一例では、1つまたは複数の N-グリコシル化部位が、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して導入される。いくつかの例では、N-グリコシル化部位が、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの Y1、S3、G4、K5、L6、E7、F9、V10、Q11、G12、L14、E15、R16、M19、E20、K22、S24、F25、E26、E27、A28、R29、E30、V31、F32、E33、T35、E36、R37、T39、E40、F41、W42、K43、Q44、Y45、V46、D47、G48、D49、Q50、E52、S53、N54、L57、N58、G59、S61、K63、D65、I66、N67、S68、Y69、E70、W72、P74、F77、G79、K80、N81、E83、L84、D85、V86、T87、N89、I90、K91、N92、R94、K100、N101、S102、A103、D104、N105、K106、V108、S110、E113、G114、R116、E119、N120、Q121、K122、S123、E125、P126、V128、P129、F130、R134、V135、S136、S138、Q139、T140、S141、K142、A146、E147、A148、V149、F150、P151、D152、V153、D154、Y155、V156、S158、T159、E160、A161、E162、T163、I164、L165、D166、I168、T169、Q170、S171、T172、Q173、S174、F175、N176、D177、F178、T179、R180、G183、E185、D186、K188、P189、K201、V202、D203、E213、E224、T225、G226、K228、E239、E240、T241、H243、K247、N249、I251、R252、I253、P255、H257、N258、N260、A261、A262、I263、N264、K265、A266、D276、E277、P278、V280、N282、S283、Y284、D292、K293、E294、N297、I298、K301、F302、G303、S304、Y306、R312、F314、H315、K316、G317、R318、S319、L321、V322、Y325、R327、P329、L330、D332、R333、A334、T335、L337、R338、K341、F342、T343、Y345、N346、H354、E355、G357、R358、Q362、E372、E374、G375、E388、M391、K392、G393、K394、R403、N406、K409、E410、K411、および K413 のの中から選択される位置に対応するアミノ酸位置に導入される。

20

30

【0021】

グリコシル化を導入する例示的な修飾は、アミノ酸置換 Y1N、Y1N+S3T、S3N+K5S/T、G4T、G4N+L6S/T、K5N+E7T、L6N+E8T、E7N+F9T、F9N++Q11S/T、V10N+G12S/T、Q11N+N13T、G12N+L14S/T、L14N+R16T、E15T、E15N+E17T；R16N+C18S/T、M19N+E21T；E20N+K22T、K22N、S24N+E26T；F25N+E27T；E26N+A28T；E27N+R29T；A28N+E30T；R29N+V31S/T、E30N+F32T；V31N+E33T；F32N+N34T、E33N、T35N+R37S/T、E36T；E36N；R37N、T39N+F41S/T、E40N+W42T、F41N+K43S/T、W42N+Q44S/T、K43N+Y45T；Q44N+V46S/T、Y45N+D47T、V46N+G48S/T、D47N+D49S/T、G48N+Q50S/T、D49N+C51S/T、Q50N+E52S/T、E52N+N54T、S53N+P55S/T、C56S/T、L57N+G59S/T、G59N+S61T；G60S/T、S61N+K63S/T、K63N+D65S/T、D65N+N67S/T、I66N+S68S/T、Y69S/T、Y69N+C71S/T、S68N+E70S/T、E70N+W72S/T、W72N+P74S/T、P74N+G76S/T、F75N、G76N+E78T、E78N+K80T、F77T、F77N+G79S/T、G79N+N81S/T、K80N+C82S/T、E83S/T、E83N+D85S/T、L84N+V86S/T、D85N、V86A、V86N+C88S/T、T87N+N89S/T、I90N+N92S/T、K91S/T、I90N+N92S/T、K91N+G93S/T、R94S/T、R94N+E96S/T、K100N、A103S/T、S102N+D104S/T、A103N+N105S/T、D104N+K106S/T、V107S/T、K106N+V108S/T、V108N+V110S/T、S111N、E113N+Y115S/T、G114N+R116S/T、R116N+A118S/T、E119N+Q121S/T、K122S/T、Q121N+S123S/T、K122N+C124S/T

40

50

S123N+E125S/T、E125N+A125S/T、P126N+V128S/T、A127N+P129T、V128N+F130S/T、P129N+P131S/T、F130N+C132S/T、R134N、V135N+V137S/T、S136N、S138N、V137N+Q139T;Q139N、T140N+L142S/T、S141N+L143S/T、K142N、A146N+A148S/T、E147N+V149S/T、T148N+F150S/T、V149N+P151S/T、F150N+D152S/T、P151N+V153S/T、D152N+D154S/T、V153N+Y155S/T、D154N+V156S/T、Y155N+N157S/T、V156N、S158N+E160S/T、T159N+A161S/T、E160N+E162S/T、A161N、E162N+I164S/T、T163N+L165S/T、I164N+D166S/T、L165N+N167S/T、D166N+I168S/T、I168N+Q170S/T、T169N、Q170N、S171N+Q173S/T、T172N、Q173N+F175S/T、S174N+N176S/T、F175N+D177S/T、F178S/T、D177N、D177E、F178N+R180S/T、T179N+V181S/T、R180N+V182S/T、G183+E185S/T、G184N+D186T、E185N+A187S/T、D186N+K188S/T、A187N+P189T、K188N+G190S/T、P189N+Q181S/T、G200N+V202T、K201N+D203S/T、K201T、V202N+A204S/T、D203N+F205S/T、E213N+W215S/T、K214T、V223T、E224N+G226S/T、T225N+V227S/T、G226N+K228S/T、V227N+I229T、K228N、H236N+I238T;I238N+E240T;E239N、E240N+E242S/T、E242N、T241N+H243S/T、H243N+E245S/T、K247N+N249S/T、V250N+R252T、I251S/T、I251N+I253S/T、R252N+I254S/T、I253N+P255S/T、P255N+H257S/T、H257N+Y259S/T、N260S/T、A262S/T、A261N+I263S/T、A262N+N264S/T、I263N+K265S/T、K265N+N267S/T、A266N+H268S/T、D276N+P278S/T、P278N+V280S/T、E277N+L279S/T、V280N+N282S/T、Y284S/T、S283N+V285S/T、Y284N、D292N+K294S/T、K293N+Y295S/T、E294N、F299S/T、I298N+L300S/T、K301N+G303S/T、F302N、G303N+G305S/T、S304N+Y306S/T、Y306N+S308S/T、R312N+F314S/T、V313N+H315T、F314N+K316S/T、H315N+G317S/T、K316N+R138S/T、G317N、R318N+A320S/T、S319N+L321S/T、A320N+V322T、L321N+L323S/T、V322N+Q324S/T、Y325N+R327S/T、R327N+P329S/T、P329N+V331S/T、L330N+D332S/T、D332N+A334S/T、R333N、A334N+C336S/T、T335N+L337S/T、L337N、R338N、S339N+K341T、T340N+F342T;K341N、F342N+I344S/T、T343N+Y345S/T、Y345N+N347S/T、M348S/T、G352N+H354T、F353N、F353N+E355T、H354N+G356S/T、H354V、H354I、E355T、E355N+G357S/T、G356N+R358T、G357N+D359S/T、R358N、Q362N+D364S/T、V370N;T371V;T371I;E372T、E372N+E374S/T、E374N、G375N、W385N+E387T;G386N+E388T、E388N+A390S/T、A390N+K392T、M391N+G393S/T、K392N+K394S/T、K392V、G393T、G393N+Y395S/T、K394N+G396S/T、R403N+V405S/T、I408S/T、K409N+K411S/T、E410N、K411N+K413S/T、およびK413Nに対応する修飾の中から選択されるものを含む。いくつかの例では、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のグリコシル化部位が、導入される。

10

20

30

40

50

【0022】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の N-グリコシル化部位を排除する、1つまたは複数の修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドもまた、本明細書において提供される。たとえば、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの N157 または N167 に対応するアミノ酸位置の N-グリコシル化部位は、排除することができる。N-グリコシル化部位を排除する例示的な修飾は、アミノ酸置換 N157D、N157Q、N167D、および N167Q に対応する修飾の中から選択されるものを含む。さらなる例では、F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の O-グリコシル化部位を排除する、1つまたは複数の修飾を含有する。たとえば、排除することができる O-グリコシル化部位は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの S53、S61、T159、および T169 の中から選択される位置に対応するアミノ酸位置のものを含む。N-グリコシル化部位を排除する例示的な修飾は、アミノ酸置換 S53A、S61A、T159A、および T169A に対応する修飾の中から選択されるものを含む。

【0023】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の硫酸化部位を導入するおよび/または排除する、1つまたは複数の修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドもまた、提供される。一例では、修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの Y155 位に対応するアミノ酸位置の硫酸化部位を排除する修飾を含有する。例示的なそのような修飾は、アミノ酸置換 Y155H、Y155F、および Y155Q に対応するものである。

【0024】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1 つまたは複数のリン酸化部位を導入するおよび／または排除する、1 つまたは複数の修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドが、提供される。一例では、修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの位置 S 1 5 8 に対応するアミノ酸位置のリン酸化部位を排除する修飾を含有する。例示的なそのような修飾は、アミノ酸置換 S 1 5 8 A、S 1 5 8 D、および S 1 5 8 E に対応するものである。未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1 つまたは複数の β-ヒドロキシル化部位を導入するおよび／または排除する、1 つまたは複数の修飾を含有する F I X ポリペプチドもまた、提供される。ある場合では、修飾 F I X ポリペプチドは、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの位置 D 6 4 に対応するアミノ酸位置の β-ヒドロキシル化部位を排除する修飾を含有する。例示的なそのような修飾は、アミノ酸置換 D 6 4 N および D 6 4 A に対応するものである。

10

【0025】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドのいずれも、たとえば、アミノ酸置換 Y1A、Y1C、Y1D、Y1E、Y1G、Y1H、Y1K、Y1N、Y1P、Y1Q、Y1R、Y1S、Y1T、S3T、K5A、K5I、K5L、K5F、K5E、L6A、L6C、L6D、L6E、L6G、L6H、L6K、L6N、L6P、L6Q、L6R、L6S、L6T、L6M、F9A、F9C、F9D、F9E、F9G、F9H、F9K、F9N、F9P、F9Q、F9R、F9S、F9T、F9I、F9M、F9W、V10A、V10C、V10D、V10E、V10G、V10H、V10K、V10N、V10P、V10Q、V10R、V10S、V10T、V10F、V10I、V10K、V10M、V10W、V10Y、Q11E、Q11D、Q11A、Q11C、Q11G、Q11P、G12D、G12E、G12G、G12H、G12K、G12N、G12P、G12Q、G12R、G12S、G12T、N13A、N13C、N13G、N13H、N13P、N13T、L14A、L14C、L14D、L14E、L14G、L14H、L14K、L14N、L14P、L14Q、L14R、L14S、L14T、L14F、L14I、L14M、L14V、L14W、L14Y、E15D、E15H、E15P、R16E、R16A、R16C、R16G、R16P、R16T、E17A、E17C、E17G、E17P、E17T、C18D、C18E、C18G、C18H、C18K、C18N、C18P、C18Q、C18R、C18S、C18T、M19A、M19C、M19D、M19E、M19G、M19H、M19K、M19N、M19P、M19Q、M19R、M19S、M19T、M19F、M19I、M19M、M19V、M19W、M19Y、E20A、E20C、E20G、E20P、E20T、E21A、E21C、E21G、E21P、K22H、K22P、K22T、S24H、S24P、F25A、F25C、F25D、F25E、F25G、F25H、F25K、F25N、F25P、F25Q、F25R、F25S、F25T、F25I、F25M、F25W、F25Y、E26A、E26C、E26G、E26P、E27A、E27C、E27G、E27H、E27P、E27S、E27T、A28C、A28D、A28E、A28G、A28H、A28K、A28N、A28P、A28Q、A28R、A28S、A28T、R29A、R29C、R29G、R29P、R29F、E30D、E30H、E30P、V31A、V31C、V31D、V31E、V31G、V31H、V31K、V31N、V31P、V31Q、V31R、V31S、V31T、V31F、V31I、V31W、V31Y、F32A、F32C、F32D、F32E、F32G、F32H、F32K、F32N、F32P、F32Q、F32R、F32S、F32T、E33H、E33N、E33P、E33Q、E33S、E33T、N34E、N34D、N34F、N34I、N34L、T35D、T35E、T35A、T35C、T35G、T35P、F41A、F41C、F41D、F41E、F41G、F41H、F41K、F41N、F41P、F41Q、F41R、F41S、F41T、F41M、F41W、F41Y、W42A、W42C、W42D、W42E、W42G、W42H、W42K、W42N、W42P、W42Q、W42R、W42S、W42T、K43A、K43C、K43G、K43P、Q44P、Q44T、Q44、Y45A、Y45C、Y45D、Y45E、Y45G、Y45H、Y45K、Y45N、Y45P、Y45Q、Y45R、Y45S、Y45T、V46A、V46C、V46D、V46E、V46G、V46H、V46K、V46N、V46P、V46Q、V46R、V46S、V46T、V46F、V46I、V46M、V46W、V46Y、D47A、D47C、D47G、D47H、D47P、D47T、G48D、G48E、G48P、G48T、D49H、D49P、D49Q、D49T、Q50A、Q50C、Q50D、Q50G、Q50H、Q50P、Q50T、C51D、C51E、C51G、C51H、C51K、C51N、C51P、C51Q、C51R、C51S、C51T、E52P、E52T、S53A、S53C、S53G、S53H、S53P、S53T、N54H、N54P、N54T、L57A、L57C、L57D、L57E、L57G、L57H、L57K、L57N、L57P、L57Q、L57R、L57S、L57T、L57F、L57I、L57M、L57W、L57Y、G60C、G60D、G60H、G60P、G60T、C62D、C62H、C62P、K63T、D65H、D65T、I66A、I66C、I66D、I66E、I66G、I66H、I66K、I66N、I66P、I66Q、I66R、I66S、I66T、I66M、I66W、I66Y、Y69A、Y69C、Y69D、Y69E、Y69G、Y69H、Y69K、Y69N、Y69P、Y69Q、Y69R、Y69S、Y69T、C71H、C71P、W72A、W72C、W72D、W72E、W72G、W72H、W72K、W72N、W72P、W72Q、W72R、W72S、W72T、W72I、W72Y、F75A、F75C、F75D、F75E、F75G、F75H、F75K、F75N、F75P、F75Q、F75R、F75S、F75T、F77A、F77C、F77D、F77E、F77G、F77H、F77K、F77N、F77P、F77Q、F77R、F77S、F77T、L84A、L84C、L84D、L84E、L84G、L84H、L84K、L84N、L84P、L84Q、L84R、L84S、L84T、L8

20

30

40

50

4M、L84W、L84Y、V86I、V86L、V86M、V86F、V86W、V86Y、V86A、V86C、V86D、V86E、V86G、V86H、V86K、V86N、V86P、V86Q、V86R、V86S、V86T、I90A、I90C、I90D、I90E、I90G、I90H、I90K、I90N、I90P、I90Q、I90R、I90S、I90T、I90M、I90W、K91A、K91C、K91G、K91P、N92A、N92C、N92G、N92P、N92T、G93D、G93E、G93H、G93K、G93N、G93P、G93Q、G93R、G93S、G93T、R94A、R94C、R94G、R94P、C95D、C95E、C95G、C95H、C95K、C95N、C95P、C95Q、C95R、C95S、C95T、E96P、E96T、Q97A、Q97C、Q97G、Q97P、F98A、F98C、F98D、F98E、F98G、F98H、F98K、F98N、F98P、F98Q、F98R、F98S、F98T、F98M、F98W、F98Y、K100A、K100C、K100G、K100P、N101H、N101T、A103D、A103E、A103H、A103K、A103N、A103P、A103Q、A103R、A103S、A103T、D104T、K106H、K106P、K106T、V107A、V107C、V107D、V107E、V107G、V107H、V107K、V107N、V107P、V107Q、V107R、V107S、V107T、V108A、V108C、V108D、V108E、V108G、V108H、V108K、V108N、V108P、V108Q、V108R、V108S、V108T、V108F、V108M、V108W、V108Y、S110A、S110C、S110G、S110P、C111D、C111E、C111H、C111K、C111N、C111P、C111Q、C111R、C111S、C111T、T112A、T112C、T112G、T112P、E113D、E113H、E113P、G114D、G114E、G114H、G114K、G114N、G114P、G114Q、G114R、G114S、G114T、Y115A、Y115C、Y115D、Y115E、Y115G、Y115H、Y115K、Y115N、Y115P、Y115Q、Y115R、Y115S、Y115T、Y115M、Y115W、R116P、R116T、L117A、L117C、L117D、L117E、L117G、L117H、L117K、L117N、L117P、L117Q、L117R、L117S、L117T、A118D、A118E、A118H、A118K、A118N、A118P、A118Q、A118R、A118S、A118T、N120D、N120H、N120P、Q121T、S123H、S123T、V128A、V128C、V128D、V128E、V128G、V128H、V128K、V128N、V128P、V128Q、V128R、V128S、V128T、F130A、F130C、F130D、F130E、F130G、F130H、F130K、F130N、F130P、F130Q、F130R、F130S、F130T、V135A、V135C、V135D、V135E、V135G、V135H、V135K、V135N、V135P、V135Q、V135R、V135S、V135T、V135W、V135Y、V137A、V137C、V137D、V137E、V137G、V137H、V137K、V137N、V137P、V137Q、V137R、V137S、V137T、V137M、V137W、V137Y、S138H、S138T、T140D、T140H、S141T、K142H、K142P、L143A、L143C、L143D、L143E、L143G、L143H、L143K、L143N、L143P、L143Q、L143R、L143S、L143T、L143F、L143I、L143M、L143V、L143W、L143Y、R145H、R145P、R145T、A146P、A146T、T148H、T148P、V149A、V149C、V149D、V149E、V149G、V149H、V149K、V149N、V149P、V149Q、V149R、V149S、V149T、V149F、V149I、V149M、V149W、V149Y、F150A、F150C、F150D、F150E、F150G、F150H、F150K、F150N、F150P、F150Q、F150R、F150S、F150T、F150M、F150W、F150Y、D152A、D152C、D152G、D152P、D152S、D152T、V153A、V153C、V153D、V153E、V153G、V153H、V153K、V153N、V153P、V153Q、V153R、V153S、V153T、V153F、V153I、V153M、V153W、V153Y、D154A、D154C、D154G、D154P、D154Q、D154S、Y155A、Y155C、Y155D、Y155E、Y155G、Y155H、Y155K、Y155N、Y155P、Y155Q、Y155R、Y155S、Y155T、Y155M、Y155V、Y155W、V156A、V156C、V156D、V156E、V156G、V156H、V156K、V156N、V156P、V156Q、V156R、V156S、V156T、V156I、V156M、V156W、V156Y、N157A、N157C、N157G、N157H、N157P、N157Q、N157T、S158H、S158P、S158T、T159A、T159C、T159G、T159P、E160A、E160C、E160G、E160P、A161C、A161D、A161E、A161H、A161K、A161N、A161P、A161Q、A161R、A161S、A161T、E162P、E162T、T163A、T163C、T163G、T163P、I164A、I164C、I164D、I164E、I164G、I164H、I164K、I164N、I164P、I164Q、I164R、I164S、I164T、L165A、L165C、L165D、L165E、L165G、L165H、L165K、L165N、L165P、L165Q、L165R、L165S、L165T、L165M、L165W、L165Y、I168A、I168C、I168D、I168E、I168G、I168H、I168K、I168N、I168P、I168Q、I168R、I168S、I168T、F175A、F175C、F175D、F175E、F175G、F175H、F175K、F175N、F175P、F175Q、F175R、F175S、F175T、F178A、F178C、F178D、F178E、F178G、F178H、F178K、F178N、F178P、F178Q、F178R、F178S、F178T、F178M、F178W、F178Y、T179A、T179C、T179G、T179P、R180A、R180C、R180D、R180G、R180H、R180P、V181A、V181C、V181D、V181E、V181G、V181H、V181K、V181N、V181P、V181Q、V181R、V181S、V181T、V181F、V181I、V181M、V181W、V181Y、V182A、V182C、V182D、V182E、V182G、V182H、V182K、V182N、V182P、V182Q、V182R、V182S、V182T、V182F、V182I、V182M、V182W、V182Y、G183D、G183E、G183H、G183K、G183N、G183P、G183Q、G183S、G183T、G184D、G184E、G184H、G184K、G184N、G184P、G184Q、G184R、G184S、G184T、E185A、E185C、E185G、E185H、E185P、E185T

、D186A、D186C、D186G、D186H、D186P、D186T、A187C、A187D、A187E、A187G、A187H、A187K、A187N、A187P、A187Q、A187R、A187S、A187T、K188A、K188C、K188G、K188H、K188P、K188T、G190D、G190E、G190H、G190K、G190N、G190P、G190Q、G190R、G190S、G190T、F192A、F192C、F192D、F192E、F192G、F192H、F192K、F192N、F192P、F192Q、F192R、F192S、F192T、F192W、F192Y、W194A、W194C、W194D、W194E、W194G、W194H、W194K、W194N、W194P、W194Q、W194R、W194S、W194T、Q195H、Q195P、Q195T、V196A、V196C、V196D、V196E、V196G、V196H、V196K、V196N、V196P、V196Q、V196R、V196S、V196T、V196F、V196I、V196M、V196W、V196Y、V197A、V197C、V197D、V197E、V197G、V197H、V197K、V197N、V197P、V197Q、V197R、V197S、V197T、V197F、V197I、V197M、V197W、V197Y、L198A、L198C、L198D、L198E、L198G、L198H、L198K、L198N、L198P、L198Q、L198R、L198S、L198T、L198I、L198Y、N199A、N199C、N199G、N199H、N199P、N199S、N199T、G200P、G200T、K201A、K201C、K201D、K201E、K201G、K201H、K201N、K201P、K201Q、K201S、K201T、V202A、V202C、V202D、V202E、V202G、V202H、V202K、V202N、V202P、V202Q、V202R、V202S、V202T、V202F、V202I、V202M、V202W、V202Y、D203A、D203C、D203G、D203P、D203T、A204C、A204D、A204E、A204G、A204H、A204K、A204N、A204P、A204Q、A204R、A204S、A204T、F205A、F205C、F205D、F205E、F205G、F205H、F205K、F205N、F205P、F205Q、F205R、F205S、F205T、F205M、F205V、F205W、F205Y、G207H、G207P、G208C、G208D、G208E、G208H、G208K、G208N、G208P、G208Q、G208R、G208S、G208T、S209A、S209C、S209G、S209P、I210A、I210C、I210D、I210E、I210G、I210H、I210K、I210N、I210P、I210Q、I210R、I210S、I210T、I210F、I210W、I210Y、V211A、V211C、V211D、V211E、V211G、V211H、V211K、V211N、V211P、V211Q、V211R、V211S、V211T、V211F、V211I、V211M、V211W、N212A、N212C、N212G、N212P、E213H、E213P、E213S、E213T、K214T、W215A、W215C、W215D、W215E、W215G、W215H、W215K、W215N、W215P、W215Q、W215R、W215S、W215T、I216A、I216C、I216D、I216E、I216G、I216H、I216K、I216N、I216P、I216Q、I216R、I216S、I216T、V217A、V217C、V217D、V217E、V217G、V217H、V217K、V217N、V217P、V217Q、V217R、V217S、V217T、V217I、V217Y、A219H、A219P、A219T、V223A、V223C、V223D、V223E、V223G、V223H、V223K、V223N、V223P、V223Q、V223R、V223S、V223T、V223M、V223W、V223Y、G226P、V227A、V227C、V227D、V227E、V227G、V227H、V227K、V227N、V227P、V227Q、V227R、V227S、V227T、V227F、V227I、V227M、V227W、V227Y、K228A、K228C、K228G、K228H、K228P、I229A、I229C、I229D、I229E、I229G、I229H、I229K、I229N、I229P、I229Q、I229R、I229S、I229T、I229M、I229W、I229Y、T230A、T230C、T230G、T230P、V231A、V231C、V231D、V231E、V231G、V231H、V231K、V231N、V231P、V231Q、V231R、V231S、V231T、V232A、V232C、V232D、V232E、V232G、V232H、V232K、V232N、V232P、V232Q、V232R、V232S、V232T、V232F、V232I、V232M、V232W、V232Y、A233C、A233D、A233E、A233G、A233H、A233K、A233N、A233P、A233Q、A233R、A233S、A233T、A233V、G234D、G234E、G234H、G234K、G234N、G234P、G234Q、G234R、G234S、G234T、E235H、E235N、E235P、E235Q、E235S、E235T、H236A、H236C、H236G、H236P、N237A、N237C、N237G、N237P、N237T、I238A、I238C、I238D、I238E、I238G、I238H、I238K、I238N、I238P、I238Q、I238R、I238S、I238T、E239A、E239C、E239G、E239P、E240H、E240T、V250A、V250C、V250D、V250E、V250G、V250H、V250K、V250N、V250P、V250Q、V250R、V250S、V250T、V250M、V250W、V250Y、I251A、I251C、I251D、I251E、I251G、I251H、I251K、I251N、I251P、I251Q、I251R、I251S、I251T、I253A、I253C、I253D、I253E、I253G、I253H、I253K、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253M、I253W、I253Y、I254A、I254C、I254D、I254E、I254G、I254H、I254K、I254N、I254P、I254Q、I254R、I254S、I254T、P255H、H256P、H256T、H257A、H257C、H257G、H257P、N258P、N258T、Y259A、Y259C、Y259D、Y259E、Y259G、Y259H、Y259K、Y259N、Y259P、Y259Q、Y259R、Y259S、Y259T、Y259M、Y259W、Y259F、N260A、N260C、N260G、N260P、A261D、A261E、A261H、A261K、A261N、A261P、A261Q、A261R、A261S、A261T、A262C、A262D、A262E、A262G、A262H、A262K、A262N、A262P、A262Q、A262R、A262S、A262T、I263A、I263C、I263D、I263E、I263G、I263H、I263K、I263N、I263P、I263Q、I263R、I263S、I263T、I

263M、I263V、I263W、I263Y、N264A、N264C、N264D、N264G、N264H、N264P、K265A、K265C、K265G、K265H、K265P、K265T、Y266A、Y266C、Y266D、Y266E、Y266G、Y266H、Y266K、Y266N、Y266P、Y266Q、Y266R、Y266S、Y266T、Y266M、Y266W、N267A、N267C、N267G、N267H、N267P、N267T、H268P、D269A、D269C、D269E、D269G、D269H、D269N、D269P、D269Q、D269S、D269T、I270A、I270C、I270D、I270E、I270G、I270H、I270K、I270N、I270P、I270Q、I270R、I270S、I270T、I270M、I270W、A271C、A271D、A271E、A271G、A271H、A271K、A271N、A271P、A271Q、A271R、A271S、A271T、L272A、L272C、L272D、L272E、L272G、L272H、L272K、L272N、L272P、L272Q、L272R、L272S、L272T、L272F、L273A、L273C、L273D、L273E、L273G、L273H、L273K、L273N、L273P、L273Q、L273R、L273S、L273T、L273F、L273I、L273M、L273V、L273W、L273Y、E274A、E274C、E274G、E274P、E274T、L275A、L275C、L275D、L275E、L275G、L275H、L275K、L275N、L275P、L275Q、L275R、L275S、L275T、L275W、L275Y、D276P、D276S、D276T、E277A、E277C、E277G、E277P、E277V、E277N、E277D、E277E、E277Q、E277H、E277I、E277L、E277M、E277F、E277S、E277T、E277W、E277Y、P278T、L279A、L279C、L279D、L279E、L279G、L279H、L279K、L279N、L279P、L279Q、L279R、L279S、L279T、L279I、L279Y、V280A、V280C、V280D、V280E、V280G、V280H、V280K、V280N、V280P、V280Q、V280R、V280S、V280T、V280F、V280I、V280W、V280Y、L281A、L281C、L281D、L281E、L281G、L281H、L281K、L281N、L281P、L281Q、L281R、L281S、L281T、L281F、L281I、L281V、L281W、L281Y、S283A、S283C、S283G、S283P、Y284A、Y284C、Y284D、Y284E、Y284G、Y284H、Y284K、Y284N、Y284P、Y284Q、Y284R、Y284S、Y284T、Y284M、V285A、V285C、V285D、V285E、V285G、V285H、V285K、V285N、V285P、V285Q、V285R、V285S、V285T、V285M、V285W、V285Y、T286A、T286C、T286G、T286P、I288A、I288C、I288D、I288E、I288G、I288H、I288K、I288N、I288P、I288Q、I288R、I288S、I288T、C289D、C289H、C289P、I290A、I290C、I290D、I290E、I290G、I290H、I290K、I290N、I290P、I290Q、I290R、I290S、I290T、I290Y、A291D、A291E、A291H、A291K、A291N、A291P、A291Q、A291R、A291S、A291T、D292A、D292C、D292G、D292P、D292T、K293H、K293P、K293T、Y295A、Y295C、Y295D、Y295E、Y295G、Y295H、Y295K、Y295N、Y295P、Y295Q、Y295R、Y295S、Y295T、Y295W、T296A、T296C、T296G、T296P、N297A、N297C、N297G、N297P、I298A、I298C、I298D、I298E、I298G、I298H、I298K、I298N、I298P、I298Q、I298R、I298S、I298T、F299A、F299C、F299D、F299E、F299G、F299H、F299K、F299N、F299P、F299Q、F299R、F299S、F299T、L300A、L300C、L300D、L300E、L300G、L300H、L300K、L300N、L300P、L300Q、L300R、L300S、L300T、L300F、L300I、L300M、L300V、L300W、L300Y、K301A、K301C、K301G、K301P、K301T、F302A、F302C、F302D、F302E、F302G、F302H、F302K、F302N、F302P、F302Q、F302R、F302S、F302T、G303H、G303P、G303T、S304A、S304C、S304G、S304P、S304T、G305D、G305E、G305H、G305N、G305P、G305Q、G305S、G305T、Y306A、Y306C、Y306D、Y306E、Y306G、Y306H、Y306K、Y306N、Y306P、Y306Q、Y306R、Y306S、Y306T、V307A、V307C、V307D、V307E、V307G、V307H、V307K、V307N、V307P、V307Q、V307R、V307S、V307T、S308P、S308T、W310A、W310C、W310D、W310E、W310G、W310H、W310K、W310N、W310P、W310Q、W310R、W310S、W310T、G311H、V313A、V313C、V313D、V313E、V313G、V313H、V313K、V313N、V313P、V313Q、V313R、V313S、V313T、F314A、F314C、F314D、F314E、F314G、F314H、F314K、F314N、F314P、F314Q、F314R、F314S、F314T、F314M、F314W、F314Y、H315A、H315C、H315G、H315P、K316A、K316C、K316G、K316P、G317C、G317D、G317E、G317H、G317K、G317N、G317P、G317Q、G317R、G317S、G317T、R318A、R318C、R318G、R318P、S319D、S319H、S319N、S319P、S319Q、A320C、A320D、A320E、A320G、A320H、A320K、A320N、A320P、A320Q、A320R、A320S、A320T、L321A、L321C、L321D、L321E、L321G、L321H、L321K、L321N、L321P、L321Q、L321R、L321S、L321T、V322A、V322C、V322D、V322E、V322G、V322H、V322K、V322N、V322P、V322Q、V322R、V322S、V322T、V322W、V322Y、L323A、L323C、L323D、L323E、L323G、L323H、L323K、L323N、L323P、L323Q、L323R、L323S、L323T、L323F、L323I、L323M、L323V、L323W、L323Y、Q324A、Q324C、Q324G、Q324P、Y325A、Y325C、Y325D、Y325E、Y325G、Y325H、Y325K、Y325N、Y325P、Y325Q、Y325R、Y325S、Y325T、Y325W、L326A、L326C、L326D、L326E、L326G、L326H、L326K、L

326N、L326P、L326Q、L326R、L326S、L326T、L326F、L326I、L326M、L326V、L326W、L326Y、R327A、R327C、R327G、R327H、R327P、V328A、V328C、V328D、V328E、V328G、V328H、V328K、V328N、V328P、V328Q、V328R、V328S、V328T、V328F、V328I、V328M、V328W、V328Y、L330A、L330C、L330D、L330E、L330G、L330H、L330K、L330N、L330P、L330Q、L330R、L330S、L330T、L330F、L330I、L330V、L330W、L330Y、V331A、V331C、V331D、V331E、V331G、V331H、V331K、V331N、V331P、V331Q、V331R、V331S、V331T、V331F、V331I、V331M、V331W、V331Y、D332A、D332C、D332G、D332P、R333A、R333C、R333D、R333E、R333G、R333H、R333N、R333P、R333Q、R333R、R333S、R333T、A334C、A334D、A334E、A334G、A334H、A334K、A334N、A334P、A334Q、A334R、A334S、A334T、T335A、T335C、T335G、T335P、C336D、C336E、C336H、C336K、C336N、C336P、C336Q、C336R、C336S、C336T、L337A、L337C、L337D、L337E、L337G、L337H、L337K、L337N、L337P、L337Q、L337R、L337S、L337T、R338A、R338E、R338V、R338T、R338C、R338G、R338P、R338I、R338F、R338W、R338S、S339P、S339T、K341A、K341C、K341G、K341P、F342A、F342C、F342D、F342E、F342G、F342H、F342K、F342N、F342P、F342Q、F342R、F342S、F342T、F342M、F342W、T343A、T343C、T343G、T343P、I344A、I344C、I344D、I344E、I344G、I344H、I344K、I344N、I344P、I344Q、I344R、I344S、I344T、Y345F、Y345A、Y345C、Y345D、Y345E、Y345G、Y345H、Y345K、Y345N、Y345P、Y345Q、Y345R、Y345S、Y345T、Y345M、Y345W、N346A、N346C、N346G、N346P、N347H、N347P、M348A、M348C、M348D、M348E、M348G、M348H、M348K、M348N、M348P、M348Q、M348R、M348S、M348T、F349A、F349C、F349D、F349E、F349G、F349H、F349K、F349N、F349P、F349Q、F349R、F349S、F349T、F349I、F349M、F349W、F349Y、C350D、C350H、C350P、C350T、A351E、A351H、A351N、A351P、A351Q、A351R、A351S、A351T、G352A、G352C、G352P、F353A、F353C、F353D、F353E、F353G、F353H、F353K、F353N、F353P、F353Q、F353R、F353S、F353T、F353I、F353M、F353W、H354A、H354C、H354G、H354P、E355A、E355C、E355D、E355G、E355H、E355K、E355N、E355P、E355Q、E355S、E355T、G356D、G356E、G356H、G356K、G356N、G356P、G356Q、G356R、G356S、G356T、G357D、G357E、G357H、G357K、G357N、G357P、G357Q、G357R、G357S、G357T、R358D、R358E、R358H、R358K、R358N、R358P、R358Q、R358R、R358S、R358T、D359A、D359C、D359G、D359P、D359Q、D359S、D359T、S360A、S360C、S360G、S360P、C361D、C361E、C361H、C361K、C361N、C361P、C361Q、C361R、C361S、C361T、V370A、V370C、V370D、V370E、V370G、V370H、V370K、V370N、V370P、V370Q、V370R、V370S、V370T、V370W、V370Y、V373A、V373C、V373D、V373E、V373G、V373H、V373K、V373N、V373P、V373Q、V373R、V373S、V373T、V373F、V373I、V373M、V373W、E374A、E374C、E374G、E374P、G375H、S377A、S377C、S377G、S377P、F378A、F378C、F378D、F378E、F378G、F378H、F378K、F378N、F378P、F378Q、F378R、F378S、F378T、F378W、L379A、L379C、L379D、L379E、L379G、L379H、L379K、L379N、L379P、L379Q、L379R、L379S、L379T、L379I、L379M、L379W、L379Y、T380A、T380C、T380G、T380P、G381D、G381E、G381H、G381K、G381N、G381P、G381Q、G381R、G381S、G381T、I382A、I382C、I382D、I382E、I382G、I382H、I382K、I382N、I382P、I382Q、I382R、I382S、I382T、I382M、I382W、I382Y、I383A、I383C、I383D、I383E、I383G、I383H、I383K、I383N、I383P、I383Q、I383R、I383S、I383T、I383V、S384A、S384C、S384G、S384P、W385A、W385C、W385D、W385E、W385G、W385H、W385K、W385N、W385P、W385Q、W385R、W385S、W385T、W385M、E387A、E387C、E387G、E387H、E387P、E387T、E388H、E388N、E388G、E388P、E388Q、E388T、A390C、A390D、A390E、A390G、A390H、A390K、A390N、A390P、A390Q、A390R、A390S、M391A、M391C、M391D、M391E、M391G、M391H、M391K、M391N、M391P、M391Q、M391R、M391S、M391T、M391F、M391I、M391W、M391Y、K392A、K392C、K392G、K392P、G393C、G393D、G393E、G393H、G393K、G393N、G393P、G393Q、G393R、G393S、G393T、Y395A、Y395C、Y395D、Y395E、Y395G、Y395H、Y395K、Y395N、Y395P、Y395Q、Y395R、Y395S、Y395T、Y398A、Y398C、Y398D、Y398E、Y398G、Y398H、Y398K、Y398N、Y398P、Y398Q、Y398R、Y398S、Y398T、K400H、V401A、V401C、V401D、V401E、V401G、V401H、V401K、V401N、V401P、V401Q、V401R、V401S、V401T、V401F、V401I、V401M、V401W、V401Y、S402A、S402C、S402G、S402P、R403A、R403C、R403G、R403P、R403T、Y404A、Y404C、Y404D、Y

404E, Y404G, Y404H, Y404K, Y404N, Y404P, Y404Q, Y404R, Y404S, Y404T, V405A, V405C, V405D, V405E, V405G, V405H, V405K, V405N, V405P, V405Q, V405R, V405S, V405T, V405W, V405Y, N406F, N406H, N406I, N406L, N406P, N406W, N406Y, W407D, W407E, W407F, W407H, W407I, W407K, W407N, W407P, W407Q, W407R, W407S, W407T, W407Y, I408D, I408E, I408H, I408K, I408N, I408P, I408Q, I408R, I408S, I408T, K409F, K409H, K409I, K409P, K409T, K409V, K409W, K409Y, E410H, K411A, K411C, K411G, K411I, K411P, K411T, K411V, K411W, K411Y, K413T, Y11I, S3Q, S3H, S3N, G4Q, G4H, G4N, K5N, K5Q, L6I, L6V, E7Q, E7H, E7N, E8Q, E8H, E8N, F9V, E15Q, E15N, R16H, R16Q, E17Q, E17H, E17N, E20Q, E20H, E20N, E21Q, E21H, E21N, K22N, K22Q, S24Q, S24N, F25V, E26Q, E26H, E26N, E27Q, E27N, R29H, R29Q, E30Q, E30N, F32I, F32V, T35Q, T35H, T35N, E36Q, E36H, E36N, R37H, R37Q, T38Q, T38H, T38N, T39Q, T39H, T39N, E40Q, E40H, E40N, F41I, F41V, K43N, K43Q, Y45I, D47N, D47Q, G48Q, G48H, G48N, D49N, E52Q, E52H, E52N, S53Q, S53N, P55A, P55S, L57V, N58Q, N58S, G59Q, G59H, G59N, G60Q, G60N, S61Q, S61H, S61N, K63N, K63Q, D64N, D64Q, D65N, D65Q, S68Q, S68H, S68N, Y69I, E70Q, E70H, E70N, P74A, P74S, F75I, F75V, G76Q, G76H, G76N, F77I, F77V, E78Q, E78H, E78N, G79Q, G79H, G79N, K80N, K80Q, E83Q, E83H, E83N, L84I, L84V, D85N, D85Q, T87Q, T87H, T87N, K91N, K91Q, N92Q, N92S, R94H, R94Q, E96Q, E96H, E96N, F98I, F98V, K100N, K100Q, S102Q, S102H, S102N, D104N, D104Q, K106N, K106Q, S110Q, S110H, S110N, T112Q, T112H, T112N, E113Q, E113N, Y115I, R116H, R116Q, L117I, L117V, E119Q, E119H, E119N, K122N, K122Q, S123Q, S123N, E125Q, E125H, E125N, P126A, P126S, A127Q, A127H, A127N, P129A, P129S, P131A, P131S, G133Q, G133H, G133N, R134H, R134Q, S136Q, S136H, S136N, S138Q, S138N, T140Q, T140N, S141Q, S141H, S141N, K142N, K142Q, T144Q, T144H, T144N, R145Q, A146Q, A146H, A146N, E147Q, E147H, E147N, T148Q, T148N, P151A, P151S, D152N, D152Q, D154N, Y155I, S158Q, S158N, T159Q, T159H, T159N, E160Q, E160H, E160N, E162Q, E162H, E162N, T163Q, T163H, T163N, L165I, L165V, D166N, D166Q, T169Q, T169H, T169N, S171Q, S171H, S171N, T172Q, T172H, T172N, S174Q, S174H, S174N, F175I, F175V, D177N, D177Q, F178I, F178V, T179Q, T179H, T179N, R180Q, E185Q, E185N, D186N, D186Q, K188N, K188Q, P189A, P189S, F192I, F192V, F192IH, P193A, P193S, W194I, L198V, N199Q, G200Q, G200H, G200N, D203N, D203Q, F205I, G207Q, G207N, S209Q, S209H, S209N, E213Q, E213N, K214N, K214Q, T218Q, T218H, T218N, A219Q, A219N, A220Q, A220H, A220N, E224Q, E224H, E224N, T225Q, T225H, T225N, G226Q, G226H, G226N, K228N, K228Q, T230Q, T230H, T230N, E239Q, E239H, E239N, E240Q, E240N, T241Q, T241H, T241N, E242Q, E242H, E242N, T244Q, T244H, T244N, E245Q, E245H, E245N, K247N, K247Q, R248H, R248Q, R252H, R252Q, P255A, P255S, Y259I, K265N, K265Q, Y266I, L272I, L272V, E274Q, E274H, E274N, L275I, L275V, D276N, D276Q, E277Q, E277H, E277N, P278A, P278S, L279V, S283Q, S283H, S283N, Y284I, T286Q, T286H, T286N, P287A, P287S, D292N, D292Q, K293N, K293Q, E294Q, E294H, E294N, Y295I, T296Q, T296H, T296N, F299I, F299V, K301N, K301Q, F302I, F302V, G303Q, G303N, S304Q, S304H, S304N, Y306I, S308Q, S308H, S308N, G309Q, G309H, G309N, G311Q, G311N, R312H, R312Q, F314I, F314V, K316N, K316Q, R318H, R318Q, L321I, L321V, Y325I, R327Q, P329A, P329S, D332N, D332Q, T335Q, T335H, T335N, L337I, L337V, R338H, R338Q, S339Q, S339H, S339N, T340Q, T340H, T340N, K341N, K341Q, F342I, F342V, T343Q, T343H, T343N, Y345I, M348I, M348V, F349V, G352Q, G352H, G352N, F353V, D359N, S360Q, S360H, S360N, G363Q, G363H, G363N, D364N, D364Q, S365Q, S365H, S365N, G366Q, G366H, G366N, G367Q, G367H, G367N, P368A, P368S, T371Q, T371H, T371N, E372Q, E372H, E372N, E374Q, E374H, E374N, G375Q, G375N, T376Q, T376H, T376N, S377Q, S377H, S377N, F378I, F378V, L379V, T380Q, T380H, T380N, S384Q, S384H, S384N, G386Q, G386H, G386N, E387Q, E387N, M391V, K392N, K392Q, K394N, K394Q, Y395I, G396Q, G396H, G396N, I397Q, I397H, I397N, Y398I, T399Q, T399H, T399N, K400N, K400Q, S402Q, S402H

、S402N、R403H、R403Q、Y404I、K409N、K409Q、E410Q、E410N、K411N、K411Q、T412Q、T412H、T412N、K413N、K413Q、L414I、L414V、T415Q、T415H、T415N、R252A、H268A、K293A、K400A、R403A、R403EおよびK411Aの中から選択される1つまたは複数の修飾などのような、当技術分野において知られている、任意の他の突然変異を含有することができる。

【0026】

いくつかの場合では、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドが、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、アンチトロニンI I I、ヘパリン、および／またはA T－I I I／ヘパリン複合体に対する抵抗性の増加を示す。たとえば、修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上の、アンチトロニンI I Iおよび／またはヘパリンに対する抵抗性の増加を示すことができる。さらなる場合では、修飾F I Xポリペプチドが、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、触媒活性の増加を示す。これは、F V I I I aの存在下または非存在下におけるものとして行うことができる。たとえば、修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上の触媒活性を示すことができる。

【0027】

修飾F I Xポリペプチドは、たとえばクリアランスの減少（たとえば、未修飾F I Xポリペプチドのクリアランスの少なくとももしくは約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%、もしくは99%）、分布容積の改変（たとえば、未修飾F I Xポリペプチドの分布容積の少なくとももしくは約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%、もしくは99%の減少または未修飾F I Xポリペプチドの分布容積の少なくとももしくは約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%、もしくはそれ以上の増加）、インビボにおける回収率の増加（たとえば、未修飾F I Xポリペプチドのインビボにおける回収率の少なくとももしくは約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%、もしくはそれ以上の）、インビボにおける総修飾F I Xポリペプチド暴露の増加（たとえば、未修飾F I Xポリペプチドのインビボにおける総暴露の少なくとももしくは約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%、もしくはそれ以上の増加）、血清半減期の増加（たとえば、未修飾F I Xポリペプチドの血清半減期の少なくとももしくは約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%、もしくはそれ以上の）、および／または未修飾F I Xポリペプチドと比較した平均共鳴時間（M R T）の増加（たとえば、未修飾F I XポリペプチドのインビボにおけるM R T

の少なくとももしくは約 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 %、もしくはそれ以上の増加) などのような、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して改善された薬物動態学的特性をさらに示すことができる。いくつかの場合では、改善された薬物動態学的特性が、血清半減期の増加であり、血清半減期が、 α 、 β 、または γ 相である。

【0028】

いくつかの場合では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの凝血促進活性よりも、たとえば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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上などのように、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、凝血促進活性の増加を示す。

10

【0029】

いくつかの例では、未修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 3 において記載されるアミノ酸の配列を有する。したがって、配列番号 75 ~ 272 のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列を有する修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。他の例では、未修飾 F I X ポリペプチドが、修飾 (複数可) を除いて、配列番号 3 において記載されるポリペプチドと 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する、対立遺伝子または種変異体などのような、配列番号 3 において記載されるポリペプチドの変異体である。

20

【0030】

いくつかの場合では、提供される修飾 F I X ポリペプチドが、ヒトポリペプチドである。他の場合では、それらが、非ヒトポリペプチドである。さらなる例では、修飾 F I X ポリペプチドが、成熟ポリペプチドである。単鎖および二重鎖 F I X ポリペプチドならびに活性または活性化 F I X ポリペプチドもまた、提供される。いくつかの例では、活性化が、第 I X 因子 (F I X a) または組織因子 / 第 V I I a 因子複合体によるタンパク質分解性の切断によって達成される。

30

【0031】

いくつかの例では、提供される修飾 F I X ポリペプチドが、修飾された一次配列のみを有する。他の例では、化学修飾または翻訳後修飾が、含有される [たとえば、修飾 F I X ポリペプチドは、グリコシル化される、カルボキシル化される、ヒドロキシル化される、硫酸化される、リン酸化される、アルブミン化される (albuminate)、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る]。キメラ F I X ポリペプチドおよび融合 F I X ポリペプチドもまた、提供される。

【0032】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、ポリペプチドが未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 1 つの F I X 活性 (たとえば第 V I I I a 因子結合、第 X 因子結合、リン脂質結合、および / または血液凝固活性) を保持する限り、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 もしくはそれ以上の修飾または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50 もしくは 60 もしくはそれ以上の修飾を含有することができる。たとえば、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくともまたは約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上の活性を保持することができる。いくつかの例では、保持される活性が、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、増加する。他の例では、保持される活性が、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、減

40

50

少する。活性は、インビトロ (in vitro)、エクスビボ (ex vivo)、またはインビボにおいて測定することができる。

【0033】

提供される修飾 F I X 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有する核酸分子が、本明細書において提供される。核酸分子を含有するベクターもまた、提供される。ベクターは、たとえば原核生物ベクター、ウイルスベクター（たとえばアデノウイルス、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、もしくはサイトメガロウイルス）、または真核生物ベクター（たとえば哺乳動物ベクター）とすることができる。これらのベクターを含有する細胞もまた、提供される。細胞は、たとえば哺乳動物細胞 [たとえば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] などのような真核細胞とすることができる。典型的に、細胞は、修飾 F I X ポリペプチドを発現する。したがって、本明細書において提供される細胞のいずれかによって産生される修飾 F I X ポリペプチドもまた、提供される。

10

【0034】

薬学的に許容可能な媒体中に治療有効濃度または量の、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドを含有する医薬組成物が、提供される。いくつかの例では、医薬組成物が、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、または筋肉内投与などのような局所的投与、全身投与、または局所投与用に製剤される。さらなる例では、それが、徐放性または単一投薬量投与用に製剤される。

20

【0035】

対象が、提供される医薬組成物を投与することによって処置される方法であって、対象が、F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態を有する方法が提供される。いくつかの場合では、疾患または状態が、活性 F I X (F I X a) または活性化されていない F I X の投与によって処置される。いくつかの例では、医薬組成物を用いる処置が、疾患または状態に関連する症状を回復させるまたは軽減する。F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態に関連する症状における変化について対象をモニターする工程を含有する方法もまた、提供される。

【0036】

それらの方法を使用して処置されることとなる疾患または状態は、血液凝固障害、血液障害、出血性障害、血友病、および出血障害の中から選択することができる。いくつかの例では、血友病が、血友病 B である。方法はまた、たとえば血漿精製もしくは組換え凝固因子、ビタミン K、ビタミン K 誘導体、およびプロテイン C 阻害因子などのような凝血促進薬、血漿、血小板、赤血球、またはコルチコステロイドなどのような、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むことができる。

30

【0037】

包装材料および包装材料内に含有される、提供される修飾 F I X ポリペプチドを含有する医薬組成物を含有する製品もまた、提供される。修飾 F I X ポリペプチドは、F I X または凝血促進薬の投与によって処置可能な疾患の処置に有効であり、包装材料は、修飾 F I X ポリペプチドが、F I X または凝血促進薬の投与によって処置可能な疾患の処置に使用されることを示すラベルを含む。

40

【0038】

本明細書において提供され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、および所望により、投与のための説明書を含有するキットもまた、提供される。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図 1】図 1 は、血液凝固カスケードを示す。図は、F X a 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。

50

図は、1つまたは複数のペプチド結合の切断によって酵素前駆体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酵素前駆体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2】図2は、血液凝固の細胞に基づくモデルを示す[たとえばHoffman et al.(2001) Thromb Haemost 85:958-965を参照されたい]。図は、3つの相に分けて血液凝固イベントを示しており、血液凝固の開始はTF産生細胞上のTF/FVIIa複合体によるFXからFXaへの活性化によって達成され、FXa/FVaによる活性化後に少量のトロンビンの生成をもたらす。増幅はトロンビンが血小板に結合し、活性化する際に生じ、FVIIIIa/FIXaおよびFVa/FXa複合体を形成する適切な血液凝固因子の十分な量の活性化を開始する。血液凝固の伝播は、創傷部位の多数の活性型血小板の表面で生じ、創傷部位に凝固を確立するために十分なフィブリンをフィブリノゲンから生成するために十分多量なトロンビン生成のバーストをもたらす。

【図3】図3は、種変異体および修飾第IX因子ポリペプチド(配列番号2~5、14、20、172、267、247、325、346~347、360、365~366、406)を含む種々の第IX因子ポリペプチドのアライメントである。同様に含まれるのは、突然変異V86A/E277A/R338Aを含有する米国特許第7,700,734号からの配列番号6および米国特許第7,125,841号からの配列番号2である。「*」は、その行における残基またはヌクレオチドがアライメントの全ての配列において同一であることを意味し、「:」は保存的置換が認められることを意味し、「.」は、半保存的置換が認められることを意味する。本明細書において記載されるとおり配列番号3における位置に対応する残基は、配列番号3とのアライメントによって決定され得る。Y155、R318、R338、T343、R403およびE410に対応する残基は枠で囲んで示される。

【発明を実施するための形態】

【0040】

概要

A. 定義

B. 止血およびそれにおける第IX因子の役割

1. 血小板の粘着および凝集

2. 凝固カスケード

a. 開始

b. 増幅

c. 伝播

3. 凝固の調節

C. 第IX因子(FIX)構造および機能

1. FIX構造

2. FIX翻訳後修飾

3. FIX活性化

4. FIX機能

5. 生物製剤としてのFIX

D. 修飾FIXポリペプチド

1. 例示的なアミノ酸置換

a. グリコシル化の改変

i. グリコシル化の利点

ii. グリコシル化が改変された、例示的な修飾FIXポリペプチド

(a). 非天然グリコシル化部位(複数可)の導入

(b). 天然グリコシル化部位の排除

b. AT-IIIおよびヘパリンに対する抵抗性の増加

i. AT-III

10

20

30

40

50

i i .	ヘパリン	
i i i .	A T - I I I およびヘパリンに対する抵抗性が増加した、例示的な F I X ポリペプチド	
c .	触媒活性を増加させるための突然変異	
d .	L R P 結合を減少させるための突然変異	
e .	翻訳後修飾を改変するための他の突然変異	
2 .	組合せの修飾	
a .	活性を増加させるための修飾	
b .	リン脂質に対する親和性を増加させるまたはコラーゲンへの結合を低下させる修飾	
c .	阻害因子に対する抵抗性を増加させるためのさらなる修飾	10
d .	グリコシル化を改変するためのさらなる修飾	
e .	プロテアーゼに対する抵抗性を増加させるための修飾	
f .	免疫原性を低下させるための修飾	
g .	例示的な組合せの修飾	
3 .	コンジュゲートおよび融合タンパク質	
E .	F I X 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	20
c .	昆虫および昆虫細胞	
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 F I X ポリペプチド活性の評価	
1 .	インビトロアッセイ	
a .	グリコシル化	30
b .	他の翻訳後修飾	
c .	タンパク質分解活性	
d .	凝固活性	
e .	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	
e .	リン脂質親和性	
2 .	非ヒト動物モデル	
3 .	臨床アッセイ	
G .	製剤および投与	
1 .	製剤	
a .	投薬量	40
b .	剤形	
2 .	修飾 F I X ポリペプチドの投与	
3 .	修飾 F I X 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	
	血友病	
a .	血友病 B	
b .	血友病 A	
J .	併用療法	
K .	製品およびキット	
L .	実施例	50

【0041】

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）が属する分野の技術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、本部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が理解されたい。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。

10

【0042】

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。

20

【0043】

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～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。

【0044】

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。

【0045】

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。

30

【0046】

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（catalytic triad）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。

40

【0047】

本明細書において使用されるように、「第IX因子」またはFIXポリペプチドは、組

50

換えで産生されるポリペプチド、合成によって産生されるポリペプチド、ならびに肝臓および血液を含むが、これらに限定されない細胞または組織から抽出されたまたは単離された第 I X 因子ポリペプチドを含むが、これらに限定されない、任意の第 I X 因子ポリペプチドを指す。第 I X 因子について区別なく使用される代替の名称は、第 9 因子 (Factor 9)、クリスマス因子、血漿トロンボプラスチン成分 (PTC)、凝固因子 I X、および血清因子 I X を含む。第 I X 因子についての略語は、F I X および F 9 を含む。第 I X 因子は、ヒトおよび非ヒト起源の動物を含むが、これらに限定されない異なる種由来の関連ポリペプチドを含む。ヒト第 I X 因子 (h F I X) は、第 I X 因子、対立遺伝子変異アイソフォーム [T 1 4 8 A (配列番号 20 もしくは 3 2 5) または T 4 1 2 P 突然変異を有する対立遺伝子変異体など]、核酸からの合成分子、ヒト組織および細胞から単離されたタンパク質、ならびにその修飾形態を含む。例示的な未修飾成熟ヒト第 I X 因子ポリペプチドは、未修飾および野生型天然第 I X 因子ポリペプチド (配列番号 3 において記載される配列を含有するポリペプチドなど) ならびにプロペプチドおよび／またはシグナルペプチドを含む未修飾および野生型前駆体第 I X 因子ポリペプチド (配列番号 2 において記載される配列を有する前駆体 F I X ポリペプチドなど) を含むが、これらに限定されない。当業者は、成熟第 I X 因子ポリペプチド (配列番号 3) の参照位置が、シグナルペプチドおよびプロペプチド配列を含有する第 I X 因子ポリペプチドである前駆体 F I X ポリペプチド配列番号 2 と比較した場合、4 6 アミノ酸残基ずつ異なることを認識するであろう。したがって、配列番号 3 の第 1 のアミノ酸残基は、配列番号 2 の 4 7 番目の (第 4 7) アミノ酸残基「に対応する」。

10

20

【0048】

用語「第 I X 因子」はまた、残基 1 3 2 C および 2 8 9 C の間でジスルフィド結合によって連結される F I X 軽鎖 (配列番号 2 のアミノ酸 4 7 ~ 1 9 1 および配列番号 3 のアミノ酸 1 ~ 1 4 5 に対応する) ならびに F I X 重鎖 (配列番号 2 のアミノ酸 2 2 7 ~ 4 6 1 および配列番号 3 のアミノ酸 1 8 1 ~ 4 1 5 に対応する) を含有する、第 I X a 因子 (F I X a) と呼ばれる第 I X 因子ポリペプチドの活性化形態を包含する (配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに対応する)。F I X a は、アミノ酸残基 R 1 4 5 および R 1 8 0 の後のタンパク質分解性の切断によって成熟 F I X ポリペプチド (たとえば、配列番号 3 において記載されるもの) から産生される。タンパク質分解性の切断は、たとえば、活性化第 X I 因子 (F X I a) または組織因子／活性化第 V I I 因子 (T F / F V I I a) 複合体によって、実行することができる。本明細書において提供される F I X ポリペプチドは、化学修飾または翻訳後修飾などによって、さらに修飾することができる。そのような修飾は、グリコシル化、ペグ化、アルブミン化 (albumination)、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化、および当技術分野において知られている他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。

30

【0049】

第 I X 因子は、ヒトおよび非ヒト種を含む、任意の種由来の第 I X 因子を含む。非ヒト起源の F I X ポリペプチドは、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ、トリ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、魚、カエル、また他の霊長動物の第 I X 因子ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。非ヒト起源の例示的な F I X ポリペプチドは、たとえばチンパンジー (パン
トログロディテス、配列番号 4)、アカゲザル (マカク ムラッタ、配列番号 5)、マウス (ムス ムスクルス、配列番号 6)、ラット (ラッタス ノルベジクス、配列番号 7)、モルモット (テンジクネズミ、配列番号 8)、ブタ (サス スクロファ、配列番号 9)、イヌ (カニス ファミリアリス、配列番号 10)、ネコ (イエネコ、配列番号 11)、ウサギ (オリクトラガス クニクラス、配列番号 12)、ニワトリ [ガルス ガルス (Gallus gallus)、配列番号 13]、雌ウシ [ボース タウルス (Bos taurus)、配列番号 14]、ヒツジ [オービス アリエス (Ovis aries)、配列番号 15]、カエル (ゼノパス トロピカリス、配列番号 16)、ゼブラフィッシュ (ダニオ レリオ (Danio rerio)、配列番号 17)、日本フグ (トラフグ、配列番号 18) を含む。

40

50

【0050】

F I Xポリペプチドに対する言及はまた、単鎖形態または二重鎖形態、活性を有するその切断形態をした前駆体ポリペプチドおよび成熟F I Xポリペプチドをも含み、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、ならびに配列番号2において記載される前駆体ポリペプチドまたはその成熟形態（配列番号3）に対して、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を含む、他の変異体を含む。配列番号75～272および326～417の修飾F I Xポリペプチドならびにその変異体などのような修飾F I Xポリペプチドが含まれる。F I XポリペプチドのF V I I I a結合、第X因子結合、リン脂質結合、および／または血液凝固活性などのような、F I Xの少なくとも1つの活性を保持するものもまた含まれる。活性を保持することによって、活性は、保持される活性のレベルが、検出可能な効果を得るのに十分である限り、野生型F I Xと比較して、低下させるまたは増加させるなどのように、改変することができる。F I Xポリペプチドは、組織特異的アイソフォームおよびその対立遺伝子変異体、核酸の翻訳によって調製される合成分子、組換え法を通しての、より短いポリペプチドのライゲーションを含む合成などのような化学合成によって生成されるタンパク質、ヒトおよび非ヒトの組織および細胞から単離されるタンパク質、キメラF I Xポリペプチドおよびその修飾形態を含むが、これらに限定されない。F I Xポリペプチドはまた、十分な長さであるまたは完全長成熟ポリペプチドの少なくとも1つの活性（必要に応じて、活性化に際して）を保持するのに適切な領域を含む、F I Xの断片または部分をも含む。F I Xポリペプチドはまた、化学修飾または翻訳後修飾を含有するものおよび化学修飾または翻訳後修飾を含有しないものをも含む。そのような修飾は、ペグ化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化、および当技術分野において知られている他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。

【0051】

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B L A S T P）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。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、対応する残基を同定することができる。たとえば、第I X因子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、対応する残基を同定することができる。たとえば、配列番号3（成熟第I X因子）のアミノ酸位置1におけるチロシン（Y1）は、配列番号2のアミノ酸位置47におけるチロシン（Y47）に対応する。他の場合では、対応する領域を、同定することができる。たとえば、G l aドメインは、配列番号3のアミノ酸位置Y1からV46に、また、配列番号2のアミノ酸位置Y47からV92に対応する。当業者はまた、ヒト配列および非ヒト配列の間のならびにそれらの中に対応するアミノ酸残基を見出すために、指標として保存アミノ酸残基を利用することができる。たとえば、配列番号3（ヒト）のアミノ酸残基Q11およびP74は、配列番号14（ウシ）のR11およびQ74に対応する。対応する位置はまた、たとえばタンパク質構造のコンピューターシミュレーションアラインメントを使用することによる構造のアラインメントに基づくものとすることができる。他の場合では、対応する領域を、同定することができる。

【0052】

本明細書において使用されるように、アミノ酸置換に関する同じ置換は、他の第I X因子ポリペプチドにおける対応する位置における、配列番号3における参照アミノ酸位置での同様の置換を指す。たとえば、配列番号3におけるアミノ酸残基R318でのチロシン

の置換に関する同じ置換は、配列番号 14 におけるアミノ酸残基 R 319 でのチロシンの置換である（たとえば図 3 を参照されたい）。たとえば、配列番号 3 におけるアミノ酸残基 E 410 でのアスパラギンの置換に関する同じ置換は、配列番号 366 におけるアミノ酸残基 S 410 でのアスパラギンの置換である。同じアミノ酸の置換に対する言及は、対応する位置での、置換される残基と異なるアミノ酸残基の置換を指すことが理解される。

【0053】

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。これは、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セグメントを含むことができる。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ことができるまたは多重ドメイン構造とすることができる。

【0054】

本明細書において使用されるように、「成熟第 I X 因子」は、シグナル配列およびプロペプチド配列を欠く F I X ポリペプチドを指す。典型的に、シグナル配列は、翻訳の間に、タンパク質を、小胞体（E R）ーゴルジ経路を介しての分泌に導き、E R への挿入の後に切断される。プロペプチド配列は、典型的に、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切断される。したがって、成熟 F I X ポリペプチドは、典型的に、分泌タンパク質である。一例では、成熟ヒト F I X ポリペプチドが、配列番号 3 において記載される。配列番号 3 において記載されるアミノ酸配列は、配列番号 3 が、配列番号 2 のアミノ酸残基 1～28 に対応するシグナル配列を欠き、また、配列番号 2 のアミノ酸残基 29～46 に対応するプロペプチド配列を欠くという点で、配列番号 2 において記載される前駆体ポリペプチドと異なる。成熟 F I X ポリペプチドに対する言及は、単鎖チモーゲン形態および二重鎖形態を包含する。したがって、成熟 F I X ポリペプチドに対する言及はまた、ジスルフィド結合によって結合される重鎖および軽鎖を含有する二重鎖形態（配列番号 2 のアミノ酸 192～226 に対応する活性化ペプチドを有していない）をも指す。

【0055】

本明細書において使用されるように、F I X に関する「野生型」および「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 I X 遺伝子または天然に存在する F I X 遺伝子によってコードされる F I X ポリペプチドを指す。種に無関係の野生型第 I X 因子に対する言及は、任意の種の野生型第 I 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を欠く成熟形態および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 I 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 I X ポリペプチドの中に含まれる。天然 F I X ポリペプチドはまた、単鎖形態および二重鎖形態をも含む。たとえば、ヒトは、天然 F I X を発現する。例示的な野生型ヒト F I X のアミノ酸配列は、配列番号 2 および 3 ならびにその対立遺伝子変異体において記載される。他の動物はチンパンジー（パン トログロディテス、配列番号 4）、アカゲザル（マカク ムラッタ、配列番号 5）、マウス（ムス ムスクルス、配列番号 6）、ラット（ラッタス ノルベジクス、配列番号 7）、モルモット（テンジクネズミ、配列番号 8）、ブタ（サス スクロファ、配列番号 9）、イヌ（カニス ファミリアリス、配列番号 10）、ネコ（イエネコ、配列番号 11）、ウサギ（オリクトラガス クニクラス、配列番号 12）、ニワトリ（ガルス ガルス、配列番号 13）、雌ウシ（ボース タウルス、配列番号 14）、ヒツジ（オービス アリエス、配列番号 15）、カエル（ゼノパス トロピカリス、配列番号 16）、ゼブラフィッシュ（ダニオ レリオ、配列番号 17）、日本フグ（トラフグ、配列番号 18）を含むが、これらに限

10

20

30

40

50

定されない天然 F I X を産生する。

【0056】

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。

【0057】

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。

【0058】

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 (d i f f e r e n t i a l p r o c e s s i n g) によって産生される変異体を指す。

10

【0059】

本明細書において使用されるように、チモーゲンは、活性化切断などのような成熟切断を含むタンパク質分解性の切断ならびに／または他のタンパク質（複数可）および／もしくはは補因子（複数可）との複合体形成によって活性化されるプロテアーゼを指す。チモーゲンは、タンパク質分解酵素の不活性前駆体である。そのような前駆体は、必ずしも大きいというわけではないが、活性形態よりも一般に大きい。セリンプロテアーゼに関して、チモーゲンは、触媒切断および自己触媒切断を含む特異的な切断によってまたは活性酵素を生成する活性化補因子の結合によって活性酵素に変換される。たとえば、一般に、チモーゲンは、単鎖形態で存在する。チモーゲンは、一般に、不活性であり、1つまたは複数のタンパク質分解部位での触媒切断または自己触媒切断によって成熟活性ポリペプチドに変換されて、二重鎖などのような多重鎖ポリペプチドを生成することができる。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。切断は、自己活性化によって達成することができる。多くの凝固タンパク質は、チモーゲンであり、それらは不活性であるが、血管損傷の後の凝固系の開始に際して切断され、活性化されるようになる。F I X に関して、F I X ポリペプチドは、F I X の二重鎖形態 (F I X a) を産生するために、たとえば活性化 F X I (F X I a) または F V I I a (T F と結合した) などのようなプロテアーゼによる切断まで、チモーゲンとして血漿中に存在する。

20

【0060】

本明細書において使用されるように、活性化配列は、活性プロテアーゼを形成するために、活性化切断または成熟切断に必要とされる部位である、チモーゲンにおけるアミノ酸の配列を指す。活性化配列の切断は、自己触媒によってまたは活性化パートナーによって触媒することができる。

30

【0061】

本明細書において使用されるように、活性化切断は、一種の成熟切断であり、これは、完全な酵素活性の発達に必要とされるコンホメーション変化を誘発する。これは、たとえば、切断により、キモトリプシンにおける A s p 1 9 4 などのようなプロテアーゼの保存領域と相互作用して、活性に必要とされるコンホメーション変化を誘発する新しい N-末端を生成する、セリンプロテアーゼについての古典活性化経路である。活性化は、プロテアーゼの多重鎖形態の産生をもたらすことができる。いくつかの場合では、プロテアーゼの単鎖形態は、タンパク質分解活性を示すことができる。

40

【0062】

本明細書において使用されるように、「活性化第 I X 因子」または「F I X a」は、F I X a ポリペプチドの任意の二重鎖形態を指す。二重鎖形態は典型的にタンパク質分解性の切断に起因するが、合成によって産生することができる。活性化第 I X 因子は、したがって、血液凝固活性が低い、チモーゲン様の二重鎖形態、F V I I I a および F X への結合に際して起こる、完全に活性化された形態、ならびに完全に活性化された二重鎖形態で存在するまたは完全に活性化された形態へのコンホメーション変化を起こす突然変異形態を含む。たとえば、F I X ポリペプチドの単鎖形態（たとえば配列番号 3 を参照されたい

50

）は、成熟 F I X ポリペプチドのアミノ酸残基 R 1 4 5 および R 1 8 0 の後のタンパク質分解によって切断される。切断産物、F I X 重鎖および F I X 軽鎖は、ジスルフィド結合（配列番号 3 の F I X におけるアミノ酸残基 1 3 2 C および 2 8 9 C の間の）によって共に保持され、二重鎖活性化 F I X 酵素を形成する。タンパク質分解性の切断は、たとえば活性化第 X I a 因子（F X I a）および T F と複合体の活性化第 V I I a 因子（F V I I a）によって実行することができる。

【0063】

本明細書において使用されるように、F I X ポリペプチドの「特性」は、物理的または構造的特性、そのような三次元構造、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。

【0064】

本明細書において使用されるように、F I X ポリペプチドの「活性」は、第 I X 因子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、第 X 因子（F X）活性化を達成するためのなどのようなタンパク質分解活性もしくは触媒活性；抗原性（抗 F I 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）；第 V I I I a 因子もしくは第 X 因子に結合する能力；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 I 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 I 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、合成基質を使用する発色アッセイを含む。

【0065】

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 I 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活性を指す。たとえば、二重鎖形態の修飾 F I X ポリペプチドは、同じ実験条件下で、二重鎖形態の未修飾 F I X 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。他の例では、単鎖形態の修飾 F I X ポリペプチドは、同じ実験条件下で、単鎖形態の未修飾 F I X 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 I 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 I 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 I X ポリペプチドが、凝血促進治療薬としての治療的に有効となるのに十分な量の活性を保持する。一般に、凝血促進薬としての治療的効能を保持するための修飾 F I X ポリペプチドについて、保持される活性の量は、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 I X ポリペプチドの活性の 0. 5 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 %、もしくはそれ以上またはその前後である。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 %～2 0 %、0. 5 %～1 0 %、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。

【0066】

修飾 F I X ポリペプチドによって示されるまたは保持される活性は、凝固活性もしくは

血液凝固活性、凝血促進活性；第X因子（FX）活性化を達成するためのなどのようなタンパク質分解活性もしくは触媒活性；抗原性（抗FX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）；第VIIa因子もしくは第X因子に結合する能力；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任意の活性とすることができ、ことが理解される。いくつかの場合では、修飾FXポリペプチドが、未修飾FXポリペプチドと比較して、増加した活性を保持することができる。いくつかの場合では、修飾FXポリペプチドが、未修飾FXポリペプチドと比較して、減少した活性を保持することができる。修飾FXポリペプチドの活性は、問題の修飾を含有していないポリペプチドと比較して、1%の活性、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上の活性を含むが、これらに限定されない、未修飾ポリペプチドの活性のうちの任意のレベルの百分率とすることができ、両方のポリペプチドは、同じ形態をしている。たとえば、修飾FXポリペプチドは、同じ形態をした未修飾FX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。たとえば、それは、未修飾FXポリペプチドの少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%の活性を保持することができる。他の実施形態では、活性における変化が、未修飾FXよりも、少なくとも約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、またはそれ以上大きい。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。

【0067】

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、プロトロンビン時間（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。

【0068】

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、FXタンパク質が、基質のタンパク質分解性の切断を触媒する能力を指し、区別なく使用される。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。たとえば、FXのタンパク質分解活性は、Mess-DCHD-Gly-Arg-AMCなどのような発色基質を使用して測定することができ、基質の切断は、線形回帰によって決定される吸光度および基質加水分解の速度によってモニターされる。

【0069】

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glド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することができるように、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。

10

【0070】

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は、プロテアーゼの触媒活性部分である。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。FIXに関して、プロテアーゼドメインは、触媒3残基を含めて、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3において記載される成熟FIXポリペプチドにおいて、プロテアーゼドメインは、アミノ酸位置181～412

20

【0071】

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を目指す。Glaドメインは、カ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、Gla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。成熟FIXポリペプチドにおいて、Glaドメインは、配列番号3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1～46に対応する。Gla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Gla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Gla含有ポリペプチドは、FVII、FX、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Glaタンパク質、成長停止特異的タンパク質6（Gas6）、およびプロテインZを含むが、これらに限定されない。

30

【0072】

本明細書において使用されるように、上皮成長因子（EGF）ドメイン（EGF-1またはEGF-2）は、上皮成長因子（EGF）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目指す。EGF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（EGFにおいて）、6つのシステイン残基を含む。EGF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。FIXは、2つのEGFドメイン：EGF-1およびEGF-2を含有する。これらのドメインは、配列番号3において記載される成熟FIXポリペプチドの、アミノ酸位置47～83および84～125にそれぞれ対応する。

40

【0073】

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FIX」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と

50

することができる。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。当技術分野において知られている例示的な修飾 F I X ポリペプチドは、たとえば Schuettrumpf et al., (2005) Blood 105(6):2316-23; Melton et al., (2001) Blood Coagul. Fibrinolysis 12(4):237-43; Cheung et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:20529-20531; Cheung et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:11068-11073; Hopfner et al., (1997) EMBO J. 16:6626-6635; Sichler et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:4121-4126; Begbie et al., (2005) Thromb. Haemost. 94(6):1138-47; Chang, J. et al., (1998) J. Biol. Chem. 273(20):12089-94; Yang, L. et al., (2002) J. Biol. Chem. 277(52):50756-60; Yang, L. et al., (2003) J. Biol. Chem. 278(27):25032-8; 米国特許第 5 9 6 9 0 4 0 号、第 5 6 2 1 0 3 9 号、第 6 4 2 3 8 2 6 号、第 7 1 2 5 8 4 1 号、第 6 0 1 7 8 8 2 号、第 6 5 3 1 2 9 8 号; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 2 1 1 0 9 4 号、第 2 0 0 7 0 2 5 4 8 4 0 号、第 2 0 0 8 0 1 8 8 4 1 4 号、第 2 0 0 8 0 0 0 4 2 2 号、第 2 0 0 8 0 0 5 0 7 7 2 号、第 2 0 0 8 0 1 4 6 4 9 4 号、第 2 0 0 8 0 0 5 0 7 7 2 号、第 2 0 0 8 0 1 8 7 9 5 5 号、第 2 0 0 4 0 2 5 4 1 0 6 号、第 2 0 0 5 0 1 4 7 6 1 8 号、第 2 0 0 8 0 2 8 0 8 1 8 号、第 2 0 0 8 0 1 0 2 1 1 5 号、第 2 0 0 8 0 1 6 7 2 1 9 号、および第 2 0 0 8 0 2 1 4 4 6 1 号; ならびに国際特許出願公開 WO 2 0 0 7 1 1 2 0 0 5、WO 2 0 0 7 1 3 5 1 8 2、WO 2 0 0 8 0 8 2 6 1 3、WO 2 0 0 8 1 1 9 8 1 5、WO 2 0 0 8 1 1 9 8 1 5、WO 2 0 0 7 1 4 9 4 0 6、WO 2 0 0 7 1 1 2 0 0 5、および WO 2 0 0 4 1 0 1 7 4 0 において記載される任意の F I X ポリペプチドを含む。

【0074】

本明細書において使用されるように、「修飾第 I X 因子ポリペプチド」および「修飾第 I X 因子」は、未修飾第 I 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 I X ポリペプチドは、未修飾 F I 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 I X ポリペプチドは、未修飾 F I 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、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、F V I I I a に結合する能力、またはリン脂質に結合する能力などのような、天然 F I X ポリペプチドと関連する、少なくとも1つの F I X 活性を示す限り、企図される。

【0075】

本明細書において使用されるように、「アンチトロンビン I I I」または「A T - I I I」は、セリンプロテアーゼ阻害因子（セルピン）である。A T - I I I 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22）を放出する、464のアミノ酸残基（配列番号21）を含有する前駆体タンパク質として合成される。

【0076】

本明細書において使用されるように、「ヘパリン」は、抗凝固特性を有する、直鎖で、高度に硫酸化されたグリコサミノグリカンのうちの、異成分からなるグループを指す。ヘパリンは、A T-I I I に結合して、A T-I I I /ヘパリン複合体を形成することができる。

【0077】

本明細書において使用されるように、「A T-I I I および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加」は、未修飾 F I X 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、A T-I I I のみ、ヘパリンのみ、および／または A T-I I I /ヘパリン複合体の阻害効果に対する、修飾 F I X ポリペプチドなどのような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。A T-I I I、ヘパリン、および／または A T-I I I /ヘパリン複合体に対する抵抗性の増加は、A T-I I I、ヘパリン、および／または A T-I I I 複合体に対する修飾 F I X 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。抵抗性の増加はまた、A T-I I I、ヘパリン、または A T-I I I /ヘパリン複合体の存在下において、F I X ポリペプチドの触媒または血液凝固活性の阻害を測定することによって、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または阻害因子によるポリペプチドの酵素活性の阻害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。たとえば A T-I I I または A T-I I I /ヘパリン複合体などのような、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を測定することができる。たとえばヘパリンなどのような、非共有結合性の阻害因子について、 k_i を測定することができる。さらに、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、1つまたは複数の定められる条件を使用して、A T-I I I、ヘパリン、および／または A T-I I I /ヘパリン複合体への F I X 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、A T-I I I または A T-I I I /ヘパリン複合体などのような共有結合性の阻害因子については、結合速度 (o n - r a t e) のみを B I A c o r e を使用して測定することができ、ヘパリンなどのような非共有結合性の阻害因子については、結合速度 (o n - r a t e) および解離速度 (o f f - r a t e) の両方を測定することができる。F I X 血液凝固活性に対するたとえば A T-I I I /ヘパリンの阻害効果を決定するためのアッセイもまた、当技術分野において知られている。たとえば、修飾 F I X ポリペプチドが、A T-I I I /ヘパリンの存在下または非存在下においてその基質 F X を切断する能力を測定することができ、A T-I I I /ヘパリンが反応を阻害する程度を決定することができる。これは、A T-I I I の存在下または非存在下において、未修飾 F I X ポリペプチドがその基質 F X を切断する能力と比較することができる。その代わりに、F I X ポリペプチドの阻害についての二次速度定数を測定し、未修飾 F I X ポリペプチドの阻害についての二次速度定数と比較することができる。阻害についての二次速度定数を比較する場合、阻害に対する抵抗性の増加は、阻害の二次速度定数の減少を意味する。A T-I I I および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加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、それぞれ A T-I I I、ヘパリン、および／または A T-I I I /ヘパリン複合体の効果に対する抵抗性の増加を示す。

【0078】

本明細書において使用されるように、補因子は、他の特異的な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、F V I I I a は、F I X a の補因子である。F I X a への F V I I I a の結合は、その基質 (F X) に対する F I 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。

【0079】

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

10

20

30

40

50

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。

【0080】

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の位置を指す。F I Xにおいて6つの天然グリコシル化部位；配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドにおけるアミノ酸位置に対応するN 1 5 7およびN 1 6 7での2つのN-グリコシル化部位ならびにS 5 3、S 6 1、T 1 5 9、T 1 6 9、T 1 7 2、およびT 1 7 9での6つのO-グリコシル化部位がある。

10

【0081】

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の位置を指す。非天然グリコシル化部位は、アミノ酸置換によってF I X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A s n - X a a - S e r / T h r / C y sを確立することによって、生成することができ、ここで、X a a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

【0082】

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の増加」およびその任意の文法的な変化形は、参照ポリペプチドまたはタンパク質と比較した、ポリペプチドに連結された炭水化物の量の増加を指す。炭水化物は、N結合型、O結合型、C結合型とすることができるまたは任意の他の連結によって付加することができる。グリコシル化のレベルは、未修飾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%、またはそれ以上、増加させることができる。ポリペプチドのグリコシル化のレベル（つまり炭水化物の量）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。たとえば、炭水化物含有量またはグリコシル化のレベルは、高pHアニオン交換クロマトグラフィー、蛍光体支援炭水化物電気泳動（fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis）（FACE）、連続的なエキソグリコシダーゼ消化、質量分析、NMR、ゲル電気泳動、または本明細書において記載されるもしくは当技術分野において知られている任意の他の方法によって評価することができる。

30

【0083】

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上の効果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、F I X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

【0084】

本明細書において使用されるように、薬物動態学的特性は、身体における、F I Xポリペプチドなどのような薬剤または作用物質の作用に関連する特性、特に、薬剤が身体に吸

50

収され、分布し、代謝され、排除される速度を指す。薬物動態は、様々なパラメーターによって評価することができる。これらは、クリアランス、分布容積、インビボ回収率、インビボにおける総修飾 F I X ポリペプチド暴露、血清半減期、および平均共鳴時間 (M R T) を含むが、これらに限定されない。ポリペプチドの薬物動態学的特性は、たとえば、ヒトまたは動物モデルへのポリペプチドの投与および様々な時点での身体における F I X の量の評価などのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。クリアランス、分布容積、インビボ回収率、インビボにおける総修飾 F I X ポリペプチド暴露、血清半減期、および平均共鳴時間 (M R T) などのような様々なパラメーターは、当技術分野においてよく知られており、本明細書において記載される計算を使用して評価される。

10

【0085】

本明細書において使用されるように、「薬物動態学的特性の改善」は、たとえば未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、修飾 F I X ポリペプチドなどのようなポリペプチドの薬物動態学的特性における望ましい変化を指す。変化は、増加または減少とすることができる。

【0086】

本明細書において使用されるように、クリアランスは、投与の後の、対象の身体からの、ポリペプチドなどのような作用物質の除去を指す。クリアランスは、実施例 6 において記載されるものなどのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。たとえば、F I X ポリペプチドをマウスに投与するアッセイを実行することができ、身体からのポリペプチドのクリアランスは、様々な時点で血漿中の F I X の量を測定し、用量 / $AUC_{0-i n f}$ としてクリアランスを計算することによって、評価することができる。未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、修飾 F I X ポリペプチドのクリアランスの改善は、未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、修飾 F I X ポリペプチドのクリアランスにおける減少を指す。修飾 F I X ポリペプチドのクリアランスは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % まで減少し得る。

20

【0087】

本明細書において使用されるように、平均共鳴時間 (M R T) は、F I X ポリペプチドが投与の後に身体において存在する時間を指す。M R T は、実施例 6 において記載されるものなどのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。たとえば、F I X ポリペプチドをマウスに投与するアッセイを実行することができ、ポリペプチドの M R T は、様々な時点で血漿中の F I X の量を測定し、 $AUMC_{0-l a s t} / AUC_{0-l a s t}$ として M R T を計算することによって評価することができる。AUC_{0-l a s t} は、曲線下面積の合計であり、AUMC_{0-l a s t} は、1 次モーメント曲線下面積の合計である。未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、修飾 F I X ポリペプチドの M R T の改善は、未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、修飾 F I X ポリペプチドの M R T における増加を指す。修飾 F I X ポリペプチドの M R T は、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、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 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上まで増加することができる。

30

40

【0088】

本明細書において使用されるように、インビボ回収率は、投与される F I X ポリペプチドの総量に関して、投与の後のある期間の後に循環において検出可能な F I X ポリペプチドの百分率を指す。インビボ回収率は、実施例 6 において記載されるものなどのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。たとえば、

50

F I Xポリペプチドをマウスに投与するアッセイを実行することができ、評価されるポリペプチドのインビボ回収率は、 C_{max} での血漿中のF I Xの量を測定し、それを、投与されたF I Xの量と比較するによって評価することができる。未修飾F I Xポリペプチドと比較した、修飾F I Xポリペプチドのインビボ回収率の改善は、未修飾F I Xポリペプチドと比較した、修飾F I Xポリペプチドのインビボ回収率における増加を指す。修飾F I Xポリペプチドのインビボ回収率は、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加することができる。

10

【0089】

本明細書において使用されるように、血漿半減期 ($t_{1/2}$) は、F I Xポリペプチドの排除半減期またはF I Xポリペプチドの血漿濃度がその最初のまたは投与の後の最大の濃度の2分の1に達した時間を指す。血漿半減期への言及は、 α -、 β -、および/または γ -相の間の血漿半減期を含む。血漿半減期は、実施例6において記載されるものなどのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。たとえば、F I Xポリペプチドをマウスに投与するアッセイを実行することができ、ポリペプチドの血漿半減期は、様々な時点で血漿中のF I Xの量を測定することによって評価することができる。 $T_{1/2\beta}$ は、たとえば、血漿F I X濃度対時間曲線の対数線形プロットの終末相 (terminal phase) の間の、負の傾きによって割った $-\ln 2$ として計算される。未修飾F I Xポリペプチドと比較した、修飾F I Xポリペプチドの血漿半減期の改善は、未修飾F I Xポリペプチドと比較した、修飾F I Xポリペプチドの血漿半減期における増加を指す。修飾F I Xポリペプチドの血漿半減期は、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加することができる。

20

【0090】

本明細書において使用されるように、インビボにおける暴露は、投与されたF I Xポリペプチドの濃度時間曲線下の血漿面積またはAUCに関しての、投与の後の循環におけるF I Xポリペプチドの量を指す。インビボにおける暴露は、実施例6において記載されるものなどのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。たとえば、F I Xポリペプチドをマウスに投与するアッセイを実行することができ、ポリペプチドのインビボ回収率は、様々な時点で血漿中のF I Xの量 (つまりAUC) を測定し、それを、投与されたF I Xの量と比較するによって評価することができる。未修飾F I Xポリペプチドと比較した、修飾F I Xポリペプチドのインビボにおける暴露の改善は、未修飾F I Xポリペプチドと比較した、修飾F I Xポリペプチドのインビボにおける暴露における増加を指す。修飾F I Xポリペプチドのインビボにおける暴露は、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加することができる。

30

40

【0091】

本明細書において使用されるように、分布容積は、投与の後の、血漿および身体の間でのF I Xポリペプチドの分布を指す。それは、血漿においてポリペプチドの観察される濃度をもたらすように、ポリペプチドの量が均一に分布する必要がある容積として定義される。分布容積は、実施例6において記載されるものなどのような、当技術分野においてよく知られている方法を使用して評価することができる。たとえば、定常状態分布容積

50

($MRT * Cl$ として計算される)である V_{ss} および終末消失定数(β)に基づく分布容積 $[Cl / (ln 2 / T_{1/2\beta})]$ として計算]である V_z は、FIXポリペプチドをマウスに投与するアッセイにおいて評価することができ、血漿におけるFIXの濃度は、様々な時点で決定される。未修飾FIXポリペプチドと比較した、修飾FIXポリペプチドの分布容積の改善は、クリアランスについてのタンパク質のメカニズムおよび安全性プロファイルに依存して、修飾FIXポリペプチドの分布容積における増加または減少のいずれかを指すことができる。たとえば、ポリペプチドが複数のコンパートメントの中で分布する場合、修飾FIXポリペプチドの分布容積の減少は、未修飾FIXポリペプチドと比較して、対象のコンパートメントにおける薬剤暴露および活性の有意な増加をもたらすことができる(たとえば血管コンパートメント対血管外コンパートメント)。他の場合では、たとえば、薬剤安全性が C_{max} によって制限される場合、他のコンパートメントへの再分布(たとえば内皮細胞の表面への結合)は、未修飾FIXポリペプチドと比較して、対象のコンパートメント内のより長い終末半減期および/または作用持続時間ならびに優れた安全性プロファイルをもたらす得る。修飾FIXポリペプチドの分布容積は、未修飾FIXポリペプチドと比較して、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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%減少し得る。他の例では、修飾FIXポリペプチドの分布容積が、未修飾FIXポリペプチドの分布容積の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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加する。

【0092】

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接的に測定することができる。

【0093】

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19の成熟ウシキモトリプシンポリペプチドのアミノ酸ナンバリングを指す。たとえば第IX因子のプロテアーゼドメインなどのような他の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、キモトリプシンを用いてなすことができる。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IX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。対応する位置は、マニュアルアライメントを使用してまたは入手可能な多数のアライメントプログラムを使用することによって(たとえばBLASTP)、当業者によって、そのようなアライメントによって決定することができる。対応する位置はまた、たとえばタンパク質構造のコンピューターシミュレーションアラインメントを使用することによる構造のアラインメントに基づくものとする。ポリペプチドのアミノ酸が開示される配列におけるアミノ酸に対応するという記載は、GAPアルゴリズムなどのような標準的なアライメントアルゴリズムを使用して、同一性または相同性を最大にするための、開示される配列とのポリペプチドのアラインメント(保存アミノ酸がアライメントされる)に際して同定されるアミノ酸を指す。配列番号3において記載されるFIXポリペプチドのアミノ酸位置181~415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3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

19) との成熟第 I X 因子 (配列番号 3) のアライメントに際して、第 I X 因子におけるアミノ酸位置 181 のバリン (V) は、V 16 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。一例では、成熟第 I X 因子 (配列番号 3) のアミノ酸位置 213 のグルタミン酸 (E) は、キモトリプシンナンバリングに基づいてアミノ酸位置 E 49 に対応する。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、キモトリプシンナンバリングによる A 95 a および A 95 b は、成熟第 I X 因子配列 (配列番号 3) に関するナンバリングによる A 261 および A 262 にそれぞれ対応する。

【0094】

表1. 第IX因子のキモトリプシンナンバリング

【表1-1】

181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
V	V	G	G	E	D	A	K	P	G	Q	F	P	W	Q
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
V	V	L	N	G	K	V	D	A	F	C	G	G	S	I
31	32	33	34	35	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
V	N	E	K	W	I	V	T	A	A	H	C	V	E	T
47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	60A
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
G	V	K	I	T	V	V	A	G	E	H	N	I	E	E
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
T	E	H	T	E	Q	K	R	N	V	I	R	I	I	P
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
H	H	N	Y	N	A	A	I	N	K	Y	N	H	D	I
91	92	93	94	95	95A	95B	96	97	98	99	100	101	102	103
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
A	L	L	E	L	D	E	P	L	V	L	N	S	Y	V
104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
T	P	I	C	I	A	D	K	E	Y	T	N	I	F	L
119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	129A	129B	130	131

10

20

30

40

【表 1 - 2】

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
K	F	G	S	G	Y	V	S	G	W	G	R	V	F	H
132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	147
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
K	G	R	S	A	L	V	L	Q	Y	L	R	V	P	L
148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
V	D	R	A	T	C	L	R	S	T	K	F	T	I	Y
163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
N	N	M	F	C	A	G	F	H	E	G	G	R	D	S
178	179	180	181	182	183	184	184A	185	186	187	188	188A	189	190
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
C	Q	G	D	S	G	G	P	H	V	T	E	V	E	G
191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
T	S	F	L	T	G	I	I	S	W	G	E	E	C	A
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	219	220	221
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
M	K	G	K	Y	G	I	Y	T	K	V	S	R	Y	V
221A	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415					
N	W	I	K	E	K	T	K	L	T					
236	237	328	239	240	241	242	243	244	245					

10

20

30

【0095】

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。

40

【0096】

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

50

プチドを指す。

【0097】

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の使用される標準的な単一の文字の名称を用いて命名される。

【0098】

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の天然に存在するアミノ酸、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。

【0099】

J. Biol. Chem., 243:3557-3559 (1968)、および適合する米国特許法施行規則 § 1. 821~1. 822に記載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2Aに示す。

【0100】

表2A-対応の表

【表2-1】

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	リシン
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

【0101】

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. 8 2 1 ~ 1. 8 2 2 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。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。

【0102】

本明細書において使用されるように、「天然に存在するアミノ酸」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。

【0103】

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に存在するアミノ酸のうちの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、天然に存在しないアミノ酸は、たとえば、20種の天然に存在する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IX因子ポリペプチド中に含むことができる。

【0104】

本明細書における目的上、保存的アミノ酸交換は、ポリペプチドおよびそのドメインにおいてなされてもよい。ただし、結果として生じるタンパク質がFIXの活性を示す。表2Bにおいて記載されるものなどのような保存的アミノ酸交換は、タンパク質分解活性を排除しないものである。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 et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub.co., p. 224を参照されたい）。MTSPの触媒活性断片、特に単鎖プロテアーゼ部分もまた定義内に含まれる。保存的なアミノ酸交換は、以下の表2Bに記載される交換に従ってなされる。

【0105】

表2B

10

20

【表 2 - 2】

もともとの残基	保存的交換	
Ala (A)	Gly; Ser, Abu	
Arg (R)	Lys, orn	
Asn (N)	Gln; His	
Cys (C)	Ser	
Gln (Q)	Asn	
Glu (E)	Asp	
Gly (G)	Ala; Pro	
His (H)	Asn; Gln	10
Ile (I)	Leu; Val; Met; Nle; Nva	
Leu (L)	Ile; Val; Met; Nle; Nv	
Lys (K)	Arg; Gln; Glu	
Met (M)	Leu; Tyr; Ile; NLe Val	
オルニチン	Lys; Arg	
Phe (F)	Met; Leu; Tyr	
Ser (S)	Thr	
Thr (T)	Ser	
Trp (W)	Tyr	
Tyr (Y)	Trp; Phe	20
Val (V)	Ile; Leu; Met; Nle; Nv	

【0106】

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。

【0107】

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

【0108】

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。

【0109】

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。

【0110】

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。

【0111】

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して行うことができる。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）なものとして行うことができる。

【0112】

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 et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073を参照されたい]。

【0113】

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 et al. 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、GCGプログラムパッケージ [Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(I): 387 (1984)]、BLASTP、BLASTN、FASTA [Atschul, S.F., et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994), and Carillo et al. SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988)を含む]。たとえば、National Center for Biotechnology InformationデータベースのBLAST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、DNASTar「MegAlign」プログラム (Madison, WI) およびUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG)「Gap」プログラム (Madison WI)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、GAP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. Appl. Math. 2: 482 (1981)によって改訂されたNeedleman et al. J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)]。手短かに言えば、GAP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。GAP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という値を含有する）ならびにSchwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)によって記載されるGribskov et al. 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。

【0114】

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、100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。

【0115】

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。

【0116】

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配列とアライメントされる、ESTおよび他のcDNAなどのような、RNAに由来するアライメント配列を含むことができる。

【0117】

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。

【0118】

本明細書において使用されるように、単離もしくは精製ポリペプチドもしくはタンパク質またはその生物学的活性部分は、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。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く決定することができる。実質的に化学的に純粋な化合物を産生するための化合物の精製の方法は、当業者らに知られている。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物となり得る。そのような場合、さらなる精製は、化合物の特異的活性を増加させ得る。

【0119】

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、実質的に培地がない、すなわち、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。

【0120】

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参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。

【0121】

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。

【0122】

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LEMENTを指す。ベクターは、典型的にエピソードのままであるが、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。

【0123】

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。

10

【0124】

本明細書において使用されるように、発現ベクターは、そのような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、およびその他同種のもの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ド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。

20

【0125】

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。ウイルス性ベクターは、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。

30

【0126】

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。

【0127】

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。

40

【0128】

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用可能に連結されたは、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過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。

【0129】

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

50

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。

【0130】

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F I X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F I X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F I X）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

【0131】

本明細書において使用されるように、作動可能に連結されたは、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。

20

【0132】

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。

【0133】

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。

30

【0134】

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、遺伝的状态を含むが、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。

40

【0135】

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。

【0136】

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。

【0137】

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症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

50

れは、第 V I I I 因子における欠乏症に起因する。第 2 の一般的な型の血友病は、血友病 B であり、これは、第 I X 因子における欠乏症に起因する。F X I 欠乏症と呼ばれる血友病 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。

【0138】

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 V I I I 因子および第 I X 因子などのような凝血因子遺伝子における遺伝性の突然変異は、先天性血友病、血友病 A および B をそれぞれもたらす。

【0139】

本明細書において使用されるように、「後天性血友病」は、F V I I I 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。

【0140】

本明細書において使用されるように、「出血障害」は、対象が、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症、血小板活性における欠損もしくは欠乏症、または血管の欠損に起因し得る。

【0141】

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症に起因する出血障害を指す。

【0142】

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。

【0143】

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。

【0144】

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 F I X および組成物の任意の、医薬としての使用をも包含する。

【0145】

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回復は、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。

【0146】

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。

【0147】

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回復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、疾患を治癒する

10

20

30

40

50

ことができるが、典型的に、疾患の症状を回復させるために投与される。典型的に、反復投与が、症状の所望の回復を達成するために必要とされる。

【0148】

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、治療上の効果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、回復させる、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。

【0149】

本明細書において使用されるように、処置されることとなる「患者」または「対象」は、ヒトまたは哺乳動物を含む非ヒト動物を含む。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、雌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。

10

【0150】

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、空間的なものとして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。

【0151】

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。

20

【0152】

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。

【0153】

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。

30

【0154】

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。本明細書において使用されるように、抗体は、軽鎖および重鎖の可変領域から構成される、Fab断片などのような抗体断片を含む。

【0155】

本明細書において使用されるように、受容体は、特定のリガンドに対する親和性を有する分子を指す。受容体は、天然に存在する分子または合成分子とすることができる。受容体はまた、当技術分野において抗リガンドと呼ぶこともできる。

40

【0156】

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、雌ウシ、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。

50

【0157】

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。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、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。

10

【0158】

本明細書において使用されるように、異種核酸は、核酸が発現する細胞によってインビボにおいて通常産生されないまたは細胞によって産生されるが、異なる座にあるもしくは異なって発現されるまたは転写、翻訳、もしくは他の調節可能な生化学的プロセスに影響を及ぼすことによって、DNAなどのような内因性核酸の発現を改変する媒介物を媒介するもしくはコードする核酸である。異種核酸は、一般に、核酸が導入される細胞にとって内因性ではないが、他の細胞から得られたまたは合成的に調製されたものである。異種核酸は、内因性のものとすることができるが、異なる座から発現するまたはその発現が改変された核酸である。一般に、必ずではないが、そのような核酸は、細胞によってまたは核酸が発現される細胞と同じ方法で通常産生されないRNAおよびタンパク質をコードする。DNAなどのような異種核酸はまた、DNAなどのような外来性核酸と呼ぶこともできる。したがって、異種核酸または外来性核酸は、DNAなどのような核酸分子対応物がゲノムにおいて見出されるように、全く同じ配向または位置に存在しない核酸分子を含む。それはまた、他の生物または種に由来する核酸分子を指すこともできる（つまり外因性）。

20

30

【0159】

核酸が発現される細胞に対して異種または外来性であるとして当業者が認識するまたは考えるであろう、DNAなどのような任意の核酸は、本明細書において異種核酸によって包含され、異種核酸は、内因的にも発現する、外因的に追加される核酸を含む。異種核酸の例は、薬剤抵抗性を付与するタンパク質などのような追跡可能なマーカータンパク質をコードする核酸、抗癌剤、酵素、およびホルモンなどのような治療的に有効な物質をコードする核酸、ならびに抗体などのような他の種類のタンパク質をコードする、DNAなどのような核酸を含むが、これらに限定されない。異種核酸によってコードされる抗体は、異種核酸が導入された細胞の表面上に分泌され得るまたは発現され得る。

40

【0160】

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、徴候を回復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。RNAiおよびアンチセンスなどのような生物学的活性核酸分子もまた含まれる。

【0161】

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

50

「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。

【0162】

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。

【0163】

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。

【0164】

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。

【0165】

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。

【0166】

B. 止血およびそれにおける第IX因子の役割

修飾FIXaポリペプチドを含む修飾第IX因子(FIX)ポリペプチドおよびその触媒活性断片が、本明細書において提供される。第IX因子ポリペプチドは、止血の調節およびプロセスにおいて役割を果たし、したがって、治療剤として使用することができる。臨床的使用のためのFIXなどのような治療タンパク質の有効なデリバリーは、薬学に対する主な課題である。一度血流に入ると、これらのタンパク質は、腎臓における(糸球体)濾過または血液におけるタンパク質分解などのようなタンパク質排除のための通常の経路を使用する代謝およびクリアランスを含む様々な生理学のプロセスによって、短時間内に、循環から絶えず排除される。一度胃腸管内腔に入ると、これらのタンパク質は、内腔のプロテアーゼによって絶えず消化される。後者は、静脈内注射において治療剤として使用されるタンパク質の半減期に影響を及ぼす、制限的なプロセスになり得る。さらに、血液中の阻害因子は、治療タンパク質の活性を特異的に阻害し得る。たとえば、アンチトロンビン(AT-III)、ヘパリン、およびAT-III/ヘパリン複合体は、FIXの血液凝固活性を阻害し得る。薬物動態学的および薬力学的特性の改善、触媒活性の増加、ならびに/または阻害因子に対する抵抗性の増加を含む、特性の改善を有するFIXのより効果的な変異体が、必要とされる。

【0167】

本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドは、血清半減期の増加などのような薬物動態学的特性の改善；アンチトロンビンIII(AT-III)、ヘパリン、およびAT-III/ヘパリン複合体などのような阻害因子に対する抵抗性の増加；触媒活性の増加；またはその任意の組合せを含む、特性の改善を示す。したがって、血液凝固活性が増加した修飾FIXポリペプチドが提供される。したがって、これらのポリペプチドは、たとえば、止血を調整するための治療薬として、様々な使用および適用を有する。以下の議論は、第IX因子およびその修飾の議論の前に、凝固プロセスおよびこのプロセスにおける第IX因子の役割の概説を提供する。

【0168】

止血は、血管系に対する傷害に起因する出血を止める生理学的メカニズムである。正常な止血は、細胞性構成成分および可溶性血漿タンパク質に依存し、血餅の形成に最終的に至る一連のシグナリング事象を伴う。傷害が血管に対して生じ、内皮細胞が損害を与えられた後に、凝固は、素速く開始される。凝固の一次フェーズにおいて、血小板は、活性化されて、傷害の部位で止血性の血栓を形成する。二次止血が続く、血漿凝固因子が伴い、これは、タンパク質分解カスケードにおいて作用し、血小板血栓を強化するフィブリン鎖の形成をもたらす。

【0169】

血管傷害に際して、傷害を与えられた直後のエリアへの血流は、血管の収縮によって制限され、内皮下の結合組織上に新しく露出した線維状コラーゲンに血小板が粘着することを可能にする。この粘着は、フォンビルブランド因子（vWF）に依存性であり、これは、傷害の3秒以内に内皮に結合し、それによって、血小板の粘着および凝集を容易にする。凝集した血小板の活性化は、ADP、ATP、トロンボキサン、およびセロトニンを含む様々な因子の分泌をもたらす。粘着分子、フィブリノーゲン、vWF、トロンボスポンジン、およびフィブロネクチンもまた、放出される。そのような分泌は、血小板のさらなる粘着および凝集、血小板活性化および血管収縮の増加、ならびに血液凝固酵素複合体のアセンブリのためのプラットフォームとして働く、血小板表面上の陰イオン性リン脂質の暴露を促進する。血小板は、形状を変化させ、仮足形成に至り、これは、他の血小板への凝集をさらに容易にし、緩い血小板血栓をもたらす。

【0170】

ペプチダーゼの凝血カスケード（凝固カスケード）は、同時に開始される。凝固カスケードは、タンパク質分解性の切断を伴う一連の活性化事象を含む。そのようなカスケードにおいて、セリンプロテアーゼの不活性タンパク質（チモージェンとも呼ばれる）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ジェン分子のための活性化プロテアーゼとして働き、最終的に、フィブリンの架橋によって血餅形成をもたらす。たとえば、カスケードは、トロンビンなどのような活性化分子（プロトロンビンの切断に由来する）を生成し、これは、血小板をさらに活性化し、また、フィブリノーゲンの切断に由来するフィブリンを生成する。次いで、フィブリンは、血餅を安定化するために血小板血栓のまわりに架橋ポリマーを形成する。傷害の修復に際して、フィブリンは、主要な構成成分がプラスミノージェンおよび組織型プラスミノージェン活性化因子（tPA）である線溶系によって消化される。これらのタンパク質の両方は、重合フィブリンの中に組み込まれ、それらは、相互作用して、プラスミンを生成し、これは、順番に、フィブリンに作用して、前に形成された血餅を溶解する。血餅形成の間に、凝固因子阻害因子はまた、傷害部位を除く血餅形成を予防するために血液中を循環する。

【0171】

傷害から血餅形成および続く線溶までの系の相互作用は、下記に記載される。

【0172】

1. 血小板の粘着および凝集

血液の凝血は、正常な条件下で能動的に回避される。血管内皮は、血管拡張を支持し、血小板の粘着および活性化を阻害し、凝固を抑制し、フィブリン切断を増強し、かつ炎症性の特徴をしている。血管内皮細胞は、亜酸化窒素（NO）およびプロスタサイクリンなどのような分子を分泌し、これは、血小板の凝集を阻害し、血管を拡張する。これらの分子の放出は、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）およびcGMP依存性プロテインキナーゼI（cGKI）を活性化し、環状グアノシンーリン酸（cGMP）レベルを増加させ、これは、血管壁における平滑筋の弛緩を引き起こす。さらに、内皮細胞は、CD39などのような細胞表面ADPアーゼを発現し、これは、血小板から放出されたADPをアデニンヌクレオチド血小板阻害因子に変換することによって、血小板の活性化および凝集を制御する。内皮はまた、線溶カスケードにおける酵素の調節において重要な役割を果たす。内皮細胞は、プラスミノージェン（アネキシンII）およびウロキナーゼの受容体の

発現ならびに組織型プラスミノゲン活性化因子およびウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子の分泌を通してプラスミンの生成を直接的に促進し、これらの全ては、血餅クリアランスを促進する。血栓形成促進性の調節の最終層において、内皮細胞は、ヘパラン硫酸を産生することによって、凝固カスケードを阻害する際に能動的な役割を果たし、これは、トロンビンおよび他の凝固因子のアンチトロンビン I I I 阻害の反応速度を増加させる。

【0173】

しかしながら、急性血管外傷下で、血管収縮性のメカニズムが、優勢であり、内皮は、自然に、血栓形成促進性、凝固促進性 (procoagulatory)、および炎症促進性になる。これは、内皮拡張剤：アデノシン、NO、およびプロスタサイクリンの低下；ならびにそれらの収縮を誘発するための、血管平滑筋細胞に対する、ADP、セロトニン、およびトロンボキサンの直接的な作用によって達成される (Becker, Heindl et al., 2000)。止血性の血栓の形成に至る内皮の機能における変化に対する主なトリガーは、血液および細胞外マトリックス (ECM) 構成成分の間の内皮細胞壁の損失である [Ruggeri (2002) Nat Med 8:1227-1234]。循環する血小板は、内皮の病変のエリアを同定し、識別し、暴露した内皮下層に接着する。様々な血栓形成性の基質および局所的に生成されたアゴニストまたは放出されたアゴニストとのそれらの相互作用は、血小板活性化をもたらす。このプロセスは、2つのステージ、1) 粘着：表面への初期の連結および2) 凝集：血小板-血小板接着を有するとして記載されている [Savage et al. (2001) Curr Opin Hematol 8:270-276]。

【0174】

血小板粘着は、循環する血小板が、細胞表面上のコラーゲン結合タンパク質との相互作用を通しておよびこれもまた内皮上に存在するvWFとの相互作用を通して暴露したコラーゲンに結合する場合、開始される。vWFタンパク質は、内皮によって2つの方向に；基底面に (basolaterally) および血流の中に分泌される可変サイズの多量体構造である。vWFはまた、第V I I I 因子に結合し、これは、第V I I I 因子の安定化および循環におけるその存続において重要である。

【0175】

血小板粘着および続く活性化は、vWFが、G P I b (血小板糖タンパク質受容体複合体 G P I b - I X - V の一部) にその A 1 ドメインを介して結合する場合、達成される。vWFおよびG P I bの間の相互作用は、ずり応力における増加が、G P I bに対するvWFの親和性の対応する増加をもたらすように、剪断力によって調節される。白血球上のV L A - 2としても知られているインテグリン $\alpha 1 \beta 2$ は、血小板上の主要なコラーゲン受容体であり、この受容体を通じた結合は、血小板活性化に寄与する細胞内シグナルを生成する。 $\alpha 1 \beta 2$ を通じた結合は、低親和性コラーゲン受容体、G P V I の結合を容易にする。これは、免疫グロブリンスーパーファミリーの一部であり、血小板活性化のための最も強力な細胞内シグナルを生成する受容体である。血小板活性化は、アデノシン二リン酸 (ADP) の放出をもたらす、これは、トロンボキサン A 2 に変換される。

【0176】

血小板活性化はまた、血小板インテグリン $\alpha I I b \beta 3$ としても知られている血小板糖タンパク質 I I b - I I I a (G P I I b - I I I a) 受容体の表面発現をもたらす。G P I I b - I I I a 受容体は、これらの受容体を通して血小板を連結するフィブリノーゲン分子により互いの血小板の粘着 (つまり凝集) を可能にする。これは、傷害の部位での血小板血栓の形成をもたらして、さらなる失血を予防するのを助けるが、損害を与えられた血管組織は、凝固カスケードおよび血小板血栓のまわりで安定化フィブリン網の形成を開始する因子を放出する。

【0177】

2. 凝固カスケード

凝固経路は、それぞれの酵素が、チモーゲンまたは不活性形態として血漿中に存在する、タンパク質分解経路である。チモーゲンの切断は、前駆体分子から活性形態を放出する

ために調節される。経路は、活性化プロセスを制御する、一連のポジティブフィードバックループおよびネガティブフィードバックループとして機能し、最終目標は、トロンبینを産生することであり、次いで、これは、可溶性フィブリノーゲンをフィブリンに変換して、血餅を形成することができる。凝固因子および他のタンパク質は、1つまたは複数の、凝固の内在性経路、外因性経路、または共通経路を通して、血液凝固に参加する。下記に議論されるように、これらの経路は、相互に連絡し、血液凝固は、活性化の細胞ベースのモデルを通しておそらく起こる。

【0178】

トロンبینの生成は、歴史的に、3つの経路、活性化第X因子（F X a）の生成のための代替経路を提供する内在性経路（経路の全ての構成成分が、血漿に対して内在性であることを示唆する）および外因性経路（経路の1つまたは複数の構成成分が、血漿に対して外因性であることを示唆する）ならびにトロンبین形成をもたらす最終共通経路に分けられてきた（図1）。これらの経路は、凝固を達成するために、相互に連絡した、相互依存性のプロセスに共に参加する。これらの経路を説明する凝固の細胞ベースのモデルが、開発された（図2）[Hoffman et al. (2001) Thromb Haemost 85:958-965]。このモデルにおいて、「外因性」経路および「内在性」経路は、それぞれ、異なる細胞表面、組織因子（T F）を有する細胞、および血小板上で達成される。凝固のプロセスは、異なるフェーズ、開始、増幅、および伝播に分類され、この間に、外因性経路および内在性経路は、様々なステージで機能して、血餅形成のための、十分な量のフィブリノーゲンをフィブリンに変換するために必要とされるトロンبینの大量の著しい増加をもたらす。

【0179】

a. 開始

F V I I は、凝固カスケードの開始を担う凝固因子であると考えられ、この開始は、T F とのその相互作用に依存性である。T F は、平滑筋細胞、線維芽細胞、単球、リンパ球、顆粒球、血小板、および内皮細胞などのような様々な細胞によって発現される膜貫通糖タンパク質である。骨髄性細胞および内皮細胞は、それらが、炎症促進性サイトカインなどによって刺激される場合のみ、T F を発現する。しかしながら、平滑筋細胞および線維芽細胞は、T F を恒常的に発現する。したがって、一度、これらの細胞が、組織傷害の後に血流に接すると、凝固カスケードは、血漿中の第V I I 因子またはF V I I a とのT F の結合によって速やかに開始される。T F / F V I I a 複合体は、F V I I a のT F への直接的な結合によってまたはF V I I のT F への結合および次いで、F X a、F I X a、F X I I a、もしくはF V I I a それ自体などのような血漿プロテアーゼによるF V I I のF V I I a への続く活性化によって形成することができる。T F / F V I I a 複合体は、T F を有する細胞に固定されたままであり、それは、少量のF X をF X a に活性化し、これは、凝固の「外因性経路」として知られている。

【0180】

T F / F V I I a 複合体はまた、少量のF I X をF I X a に切断する。F X a は、その補因子F V a と結合して、これもまた、T F を有する細胞上で、プロトロンبینをトロンبینに次いで変換することができる複合体を形成する。しかしながら、産生された少量のトロンبینは、完全な凝固に必要とされるフィブリン形成を支持するのに不十分である。さらに、あらゆる活性F X a および活性F I X a は、アンチトロンبینI I I （A T - I I I）および他のセルピンによって循環において阻害され、これについては、下記により詳細に議論される。これは、通常、循環において血餅形成を予防するであろう。しかしながら、傷害の存在下において、血管系への損害は、血小板凝集およびトロンبین形成のこの部位での活性化をもたらし、それによって、凝固シグナルの増幅を可能にする。

【0181】

b. 増幅

増幅は、トロンبینが血小板に結合し、血小板を活性化する場合、起こる。活性化血小板は、それらのアルファ顆粒からF V を放出し、これは、トロンبینによって活性化されて、F V a になる。トロンبینはまた、血小板膜上でF V I I I / v W F 複合体からF V

I I Iを放出し、活性化し、F X Iを切断して、F X I aにする。これらの反応は、それらの表面上にF V a、F V I I I a、およびF I X aを有する活性化血小板を生成し、これは、伝播ステージの間のトロンビン生成の大量の著しい増加のためのステージを準備するものである。

【0182】

c. 伝播

凝固の伝播は、傷害の部位の多くの血小板の表面で生じる。上記に記載されるように、活性化血小板は、それらの表面上に、F X I a、F V I I I a、およびF V aを有する。外因性経路が達成されるのは、ここにおいてである。F X I aは、F I Xを活性化して、F I X aにし、これは、次いで、F V I I I aと結合することができる。このプロセスは、T Fを有する細胞上のT F / F V I I a複合体によるF I Xの切断によって生成される少量のF I X aに加えて、その補因子、F V I I I a、カルシウム、および適したリン脂質表面と複合体を形成した大量のF I X aを生成する。この複合体は、テナーゼまたは第X因子活性化複合体複合体と呼ばれ、それは、第X因子(F X)を切断して、活性化し、第X a因子(F X a)にする。F X a分子は、F V aに結合して、プロトロンビンを活性化してトロンビンにするプロトロンビナーゼ複合体を生成する。トロンビンは、より多くの血小板を活性化するためにポジティブフィードバックループにおいて作用し、増幅フェーズについて記載されるプロセスを再度開始する。

【0183】

直後に、フィブリノーゲンから十分な量のフィブリンを生成して、止血性のフィブリン血餅を形成するのに十分に多い、著しく増加したトロンビンを生成するための、適切な複合体を有する、十分な数の活性化血小板がある。フィブリノーゲンは、トロンビンによって切断された場合、フィブリノペプチドAおよびフィブリノペプチドBを放出する、血漿において可溶性の二量体である。次いで、フィブリノペプチドBは、トロンビンによって切断され、この第2のタンパク質分解性の切断によって自発的に形成されたフィブリン単量体は、不溶性ゲルを形成する。重合したフィブリンは、非共有結合性の力および静電力によって共に保持され、トロンビンによるF X I I Iの切断によって産生されるトランスアミド化(transamidating)酵素因子X I I I a(F X I I I a)によって安定化される。トロンビンはまた、T A F Iをも活性化し、これは、血餅表面でプラスミン生成を低下させることによって線溶を阻害する。さらに、トロンビンは、それ自体、さらなる安定化のために血餅の構造の中に組み込まれる。これらの不溶性フィブリン凝集体(血餅)は、凝集した血小板(血栓)と共に、損害を与えられた血管をブロックし、さらなる出血を予防する。

【0184】

3. 凝固の調節

凝固の間、カスケードは、さらなる血餅形成を阻害するために、恒常的な刺激プロセスによって調節される。調節は、a) フィブリン血餅形成による組織の虚血を制限するのに、およびb) 組織傷害の部位にのみ血餅形成を局在化することによって、広範囲の血栓症を予防するのに重要である。

【0185】

調節は、いくつかの阻害分子の作用によって達成される。たとえば、アンチトロンビンI I I(A T-I I I)および組織因子経路阻害因子(T F P I)は、凝固カスケードにおける因子を阻害するために恒常的に働く。T F P Iは、主に、F X aおよびF V I I a / T F複合体を阻害する。対照的に、セリンプロテアーゼ阻害因子(セルピン)であるA T-I I Iは、主に、トロンビン、F X a、およびF I X aを阻害する。A T-I I Iによるこれらの凝固因子の阻害は、ヘパリンによって非常に増強され、これは、A T-I I Iに結合して、阻害反応を加速する活性化コンホメーション変化を誘発する。ヘパリンはまた、A T-I I I非依存性の様式においてF I X a / F V I I I a複合体の活性を阻害することができる(Yuan et al., (2005) Biochemistry 44:3615-3625)。血小板活性化を介して刺激されるさらなる因子、プロテインCは、F V aおよびF V I I I aのタンパ

ク質分解性の切断および不活性化によって凝固を調節する。プロテイン S は、プロテイン C の活性を増強する。さらに、凝固阻害に寄与する他の因子は、必須の膜タンパク質、トロンボモジュリンであり、これは、血管内皮細胞によって産生され、トロンビンに対する受容体として働く。トロンビンのトロンボモジュリンへの結合は、トロンビン凝血促進活性を阻害し、またプロテイン C 活性化にも寄与する。

【0186】

線溶、フィブリン血餅の崩壊もまた、凝固を調節するためのメカニズムを提供する。血餅における架橋フィブリン多量体は、セリンプロテアーゼであるプラスミンによって可溶性ポリペプチドに分解される。プラスミンは、その不活性前駆体プラスミノーゲンから生成することができ、2つの方法において：フィブリン血餅の表面の組織プラスミノーゲン活性化因子 (t P A) との相互作用によっておよび細胞表面のウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子 (u P A) との相互作用によってフィブリン血餅の部位に動員される。第1のメカニズムは、血管内の血餅の溶解を担う主要なメカニズムであると思われる。第2のものは、血餅融解を媒介することができるが、組織リモデリング、細胞移動、および炎症において主要な役割を果たすことができる。

【0187】

血餅融解もまた、2つの方法において調節される。第一に、効率的なプラスミン活性化および線溶は、血餅表面でまたは細胞膜上で形成される複合体においてのみ生じるが、血液中に遊離しているタンパク質は、非効率的な触媒であり、速やかに不活性化される。第二に、プラスミノーゲン活性化因子およびプラスミンは、プラスミノーゲン活性化因子に作用するプラスミノーゲン活性化因子阻害因子1型 (P A I - 1) および P A I - 2 ならびにプラスミンを不活性化する α 2 - 抗プラスミンおよび α 2 - マクログロブリンなどのような分子によって不活性化される。正常な状況下で、凝固および線溶の間の適時のバランスは、血管傷害の後の、血餅の効率的な形成および除去をもたらすが、望まれない血栓症エピソードまたは出血エピソードを同時に予防する。

【0188】

C. 第 I X 因子 (F I X) 構造および機能

活性または機能の改善を有する修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。F I X は、凝固カスケードに関与するポリペプチドである。凝固カスケードにおける F I X の役割は、その構造および活性化のメカニズムに関連する。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドによる凝固の修飾もまた、その構造および活性化のメカニズムに関連づけられることが理解される。これらの特徴は、未修飾 F I X ポリペプチドと同じとなり得る。他の場合では、これらの特徴は、本明細書において提供される F I X ポリペプチドにおいて修飾され、したがって、活性または特性が改変されたまたは改善されたポリペプチドをもたらすことができる。たとえば、F I X ポリペプチドの修飾は、F I X ポリペプチドの1つまたは複数の活性を改変することができる。たとえば、野生型 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化のレベルの増加を示す修飾 F I X ポリペプチドが提供される。修飾 F I X ポリペプチドは、したがって、インビボアッセイを使用して試験される場合に、野生型 F I X ポリペプチドと比較して、クリアランスの低下および血清半減期の増加などのような、薬物動態学的特性の改善を示すことができる。A T - I I I 、ヘパリン、および A T - I I I / ヘパリン複合体などのような阻害因子に対する抵抗性の増加ならびに／または触媒活性の増加を示す修飾 F I X ポリペプチドもまた、提供される。したがって、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、改善された治療特性を示す修飾 F I X ポリペプチドが、提供される。F I X ポリペプチドおよび修飾 F I X ポリペプチドの構造的および機能的特徴の要約を下記に記載する。

【0189】

第 I X 因子は、ビタミン K 依存性セリンプロテアーゼであり、止血における重要な凝固因子である。それは、肝臓において単鎖チモーゲンとして合成され、凝固カスケードの一部として活性化されるまでこの不活性化状態で血液中を循環する。F X I a または T F / F V I I a 複合体による F I X チモーゲンから活性化 F I X (F I X a) への活性化の後

に、F I X a は、その補因子、F V I I I a に結合する。結果として生じる F I X a / F V I I I a 複合体は、F X に結合して、F X a に活性化し、したがって、止血を確立するために上記に記載される凝固カスケードを継続する。血液中の F I X の濃度は、約 4 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、それは、約 18 ~ 24 時間の半減期を有する。

【0190】

クリスマス病または第 I X 因子欠乏症としても知られている血友病 B は、F I X 遺伝子における任意の 1 つまたは複数の様々な突然変異に起因する F I X の欠乏症または機能障害によって引き起こされる。血友病 A は一般的なではないが、血友病 B は、再発性の関節の出血が、滑膜肥大、滑膜、軟骨、および骨の破壊を伴う慢性滑膜炎に至り、進行性で重症の関節損傷のために、慢性痛、関節の硬直、および運動制限に至り得る、深刻な疾患のままである。再発性の筋肉出血もまた、急性痛、腫脹、および運動制限をもたらすが、他の部位の出血が、罹患および死亡の一因となり得る。処置は、典型的に、組換え F I X (r F I X) を用いる置換療法によるものである。血友病 B などのような第 I X 因子療法に適用可能な疾患および状態を処置するために、改善された治療薬として働くことができる、活性化に際して凝固活性の増加を有するように設計される修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。

10

【0191】

1. F I X 構造

ヒト F I X 遺伝子は、X 染色体上に位置し、約 34 kb 長であり、8 つのエクソンを有する。ヒト F I X 転写物は、2803 ヌクレオチドであり、短い 5' 非翻訳領域、1383 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）、および 3' 非翻訳領域を含有する。1383 ヌクレオチドオープンリーディングフレーム（または F I X m R N A ; 配列番号 1）は、細胞性分泌経路に第 I X 因子ポリペプチドを導く 28 アミノ酸 N 末端シグナルペプチド（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 28）を含有する 461 アミノ酸前駆体ポリペプチド（S w i s s - P r o t 受託番号 P 0 0 7 4 0 ; 配列番号 2）をコードする。疎水性シグナルペプチドに加えて、F I X 前駆体ポリペプチドはまた、切断された場合に、F I X a への活性化までチモージェンとして血液中を循環する 415 アミノ酸成熟ポリペプチド（配列番号 3）を放出する 18 アミノ酸プロペプチド（配列番号 2 のアミノ酸 29 ~ 46）をも含有する。シグナルペプチドおよびプロペプチドに加えて、F I X 前駆体はまた、以下のセグメントおよびドメインを含有する：G l a ドメイン（配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 1 ~ 46 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 47 ~ 92）、上皮成長因子（E G F）様ドメイン 1（E G F 1 ; 配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 47 ~ 83 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 93 ~ 129）、E G F 2（配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 84 ~ 125 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 130 ~ 171）、軽鎖（配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 1 ~ 145 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 47 ~ 191）、活性化ペプチド（配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 146 ~ 180 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 192 ~ 226）、重鎖（配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 181 ~ 415 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 227 ~ 461）、およびセリンプロテアーゼドメイン（配列番号 3 において記載される成熟 F I X タンパク質のアミノ酸 181 ~ 413 に対応する配列番号 2 のアミノ酸 227 ~ 459）。

20

30

40

【0192】

プロトロンビン、凝固因子 V I I および X、ならびにプロテイン C、S、および Z などのような他のビタミン K 依存性タンパク質のように、F I X の G l a ドメインは、カルシウムイオンの存在下において、細胞のリン脂質膜と相互作用する膜結合モチーフである。ビタミン K 依存性タンパク質は、これらのタンパク質の G l a ドメインにおいてクラスター形成されるアミノ酸である γ -カルボキシグルタミン酸の翻訳後合成のためにビタミン K を必要とする。F I X G l a ドメインは、12 のグルタミン酸残基を有し、これらは、それぞれ、潜在的なカルボキシル化部位となる。そのため、それらの多くは、 γ -カル

50

ボキシグルタミン酸残基を生成するために、カルボキシル化によって修飾される。カルシウムイオンによって占められた場合に、膜への結合を達成するために脂質二重層の中に挿入される、F I Xポリペプチド中の疎水性残基を暴露するようにG l aドメインの正確な折り畳みを促進する、高および低親和性両方の、F I X G l aドメイン中の、合計8つのC a²⁺結合部位がある。

【0193】

G l aドメインに加えて、F I Xポリペプチドはまた、2つのE G F様ドメインをも含有する。E G F様ドメインはそれぞれ、E G Fタンパク質において観察される同じパターンをした各ドメインにおいて、3つのジスルフィド結合を形成する6つの高度に保存されたシステイン残基を含有する。第1のE G F様ドメイン（E G F 1）は、カルシウムイオンによって占められた場合に、分子の正確な折り畳みに寄与し、生物学的活性を促す、高親和性C a²⁺結合部位を含有するカルシウム結合E G Fドメインである [Rao et al. , (1995) Cell 82:131-141]。第2のE G Fドメイン（E G F 2）は、カルシウム結合部位を含有していない。

【0194】

F I Xのセリンプロテアーゼドメインまたは触媒ドメインは、F I X aのタンパク質分解活性を担うドメインである。他のセリンプロテアーゼのように、F I Xは、H 2 2 1、D 2 6 9、およびS 3 6 5（キモトリプシンナランピングによるH 5 7、D 1 0 2、およびS 1 9 5に対応する）からなるセリンプロテアーゼ触媒3残基を含有する。

【0195】

F I X aへの成熟F I Xの活性化は、R 1 4 5－A 1 4 6結合およびR 1 8 0－V 1 8 1結合（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに関するナンバリング）のタンパク質分解性の切断によって達成され、配列番号3において記載される成熟F I Xタンパク質のアミノ酸1 4 6～1 8 0に対応する活性化ペプチドを放出する。したがって、活性化の後に、F I X aは、2つの鎖；軽鎖および重鎖からなる。軽鎖は、G l aドメイン、E G F 1、およびE G F 2ドメインを含有し、重鎖は、プロテアーゼドメインを含有する。2つの鎖は、C 1 3 2およびC 2 8 9の間の単一のジスルフィド結合によって共に保持される。

【0196】

2. F I X翻訳後修飾

第I X因子前駆体ポリペプチドは、血液の中に分泌される成熟チモーゲンになるように広範囲な翻訳後修飾を受ける。そのような翻訳後修飾は、γ-カルボキシル化、β-ヒドロキシル化、シグナルペプチドおよびプロペプチドの切断、OおよびN結合型グリコシル化、硫酸化、ならびにリン酸化を含む。N末端シグナルペプチドは、小胞体（E R）にポリペプチドを導き、その後にはそれは切断される。細胞からの分泌の直前に、プロペプチドは、切断部位の前の4つのアミノ酸内の少なくとも2つのアルギニン残基を認識する、たとえばP A C E／フューリンなどのようなプロセシングプロテアーゼによって切断される。

【0197】

単一酵素、ビタミンK依存性ガンマカルボキシラーゼは、E R中のγ-カルボキシル化F I Xを触媒する [Berkner (2000) J. Nutr.. 130:1877-80]。カルボキシル化反応において、γ-カルボキシラーゼは、F I Xプロペプチドに結合し、ポリペプチドのG l aドメインにおけるグルタミン酸残基のγ-炭素上の第2のカルボキシル化を触媒する（つまり、G l uからγ-カルボキシグルタミルまたはG l aに）。グルタミン酸残基が全てγ-カルボキシル化されることを仮定すると、F I Xは、12のG l a残基を含有し、最初の10個は、他のビタミンK依存性タンパク質と相同性の位置にある。次いで、F I XのG l aドメインは、基質を放出する前に、クラスター中のグルタミン酸を全て前進的に（p r o c e s s i v e l y）カルボキシル化する [Morris et al. 1995; Berkner 2000; Stenina et al. 2001]。

【0198】

F I Xもまた、部分的に β -ヒドロキシル化される。この修飾は、E G F 1におけるD 6 4（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応する）の β -炭素をヒドロキシル化するジオキシゲナーゼによって実行される。ヒトF I Xポリペプチドのおよそ3分の1が、 β -ヒドロキシル化される。D 6 4は、F I XのE G F 1ドメインにおける高親和性C a²⁺結合部位に寄与するが、この残基のヒドロキシル化は、C a²⁺結合にも生物学的活性にも必要であるように思われない [Derian et al., (1989) J. Biol. Chem. 264:6615-6618, Sunnerhagen et al., (1993) J. Biol. Chem. 268: 23339-23344]。さらなる翻訳後修飾は、位置155のチロシンでのスルホン化および位置158のセリン残基でのリン酸化を含む。第I X因子のこれらの翻訳後修飾は、F I Xのインビボ回収率の寄与に関係した [Kaufman (1998) Thromb. Haemost. 79:1068-1079、米国特許第7, 575, 897号]。

10

【0199】

F I Xは、配列番号3において記載される成熟F I XポリペプチドのN 1 5 7およびN 1 6 7に対応する活性化ペプチドにおけるアスパラギン残基でN結合型グリコシル化される。翻訳後修飾はまた、O結合型二糖および三糖を有する位置53（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応する）にセリン残基をももたらすが、位置61のセリン残基は、O結合型四糖を含有する [Nishimura et al., (1989) J Biol. Chem. 264:20320-20325, Harris et al., (1993) Biochemistry 32:6539-6547]。さらに、アミノ酸位置159および169（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応する）のトレオニン残基は、O-グリコシル化される [Agarwala et al., (1994) Biochemistry 33:5167-5171]。アミノ酸位置172および179のトレオニン残基もまた、O-グリコシル化され得る。

20

【0200】

3. F I X活性化

第I X因子は、タンパク質分解性の切断によって活性化されるまで、最小のタンパク質分解活性を有するチモーゲンとして主に循環する。活性化は、T F / F V I I a複合体または第X I a因子によって達成することができる。T F / F V I I aによる活性化は、内在性経路を通してのものであるが、F X I aによる活性化は、上記に記載される外因性経路を通してのものである。活性化のプロセスは、連続的なものであるように思われ、A r g 1 4 5 - A l a 1 4 6結合が最初に切断され、A r g 1 8 0 - V a l 1 8 1結合の切断がその後に続く [Schmidt et al. (2003) Trends Cardio. Med. 13:39-45]。タンパク質分解性の切断は、活性化ペプチドを放出し、アミノ酸位置132および289（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応するナンバリング）の2つのシステインの間のジスルフィド結合によって共に保持される、軽鎖（配列番号3のアミノ酸位置1～145に対応する）および重鎖（配列番号3のアミノ酸位置181～415に対応する）を含有する二重鎖F I X a分子を形成する。

30

【0201】

F X中の少なくとも2つのエキソサイトは、F I X / T F / F V I I a三元複合体を形成するために、T F / F V I I a複合体中のT Fへの結合に関与するように思われる [Chen et al., (2002) Thromb. Haemost. 88:74-82]。研究は、F I XのE G F 1ドメインが、T F / F V I I a複合体によるF I X活性化に必要とされることを示唆する。たとえば、F I XのE G F 1ドメインにおけるG 4 8（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに関する）の突然変異は、T F / F V I I aによるその活性化を低下させる [Wu et al., (2000) Thromb. Haemost. 84:626-634]。さらに、F I XのE G F 1ドメインは、T F / F V I I a複合体におけるT Fと相互作用することが示された [Zhong et al., (2002) J. Biol. Chem 277:3622]。対照的に、しかしながら、E G F 1ドメインは、F X I aによるF I X活性化に必要とされるように思われない。G l aドメインもまた、T F / F V I I a複合体への結合およびそのため活性化に関与する。F I XのG l aドメインは、T Fにおける、F Xと同じ領域と相互作用し、これもまた、T F / F V I I a複合体によって活性化される [Kirchhofer et al., (2000) Biochem. 39:7380-7387]

40

50

」。

【0202】

活性化ペプチドの切断および放出の後に、V181（配列番号3において記載される成熟FIXポリペプチドに対応する；キモトリプシンナバリングによるV16）の新しいアミノ末端が生成される。活性化ペプチドの放出は、コンホメーション変化を促進し、それによって、V181のアミノ基が活性部位の中に入り、D364の側鎖カルボキシレートと塩ブリッジを形成する。そのような変化は、その変化によりS365のヒドロキシル側鎖がその基質、FXの切断部位を加水分解することができる反応性の種に変換するので、チモーゲン状態の活性状態への変換に必要とされる。さらなるコンホメーション変化がFVIIaとの結合などによって誘発され、最大の触媒活性を有するFIXaポリペプチドを生成するまで、活性化FIXaポリペプチドは、チモーゲン様のコンホメーションのままである。

10

【0203】

4. FIX機能

FIXは、凝固経路において重要な役割を果たし、欠乏症またはFIX活性の欠如は、血友病Bに至る。一度、FIXからFIXaに活性化されたら、FIXaは、順番に、大量のFXを、凝固に必要とされるFIXaに活性化するように機能する。そうするために、FIXaは、活性化血小板のリン脂質表面上で、内在性テナーゼ複合体とも呼ばれるFIXa/FVIIa複合体を形成するためにその補因子、第VIIIa因子に最初に結合しなければならない。FIXのG1aドメインおよびEGF2ドメインの両方は、リン脂質への安定した結合にとって重要である。次いで、FIXa/FVIIa複合体は、FXに結合してこの凝固因子を切断し、FIXaを形成する。

20

【0204】

FIXaは、その補因子、FVIIaおよび生理学的基質、FXの非存在下において事実上不活性である。実験的研究は、これが主に99ループに起因することを示す。FIXaにその補因子が結合していない場合、Y177は、Y99およびK98（キモトリプシンナバリングによる、配列番号3において記載される成熟FIXポリペプチドのY266およびK265に対応する）の側鎖が基質結合を妨げる不活性コンホメーションにおいて99ループを固定する。FIXaへのFVIIaの結合は、このチモーゲン様のコンホメーションを解き放ち、放出し、FXは、次いで、FIXa/FVIIa複合体と結合し、解き放たれた99ループを再配列し、引き続いて活性部位のくぼみに結合することができる[Sichler et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:4121-4126]。リン脂質へのFIXaの結合およびCa²⁺の存在は、反応をさらに増強する。

30

【0205】

FIXa/FVIIa相互作用のいくつかのモデルが、提唱されてきた[たとえばAutin et al., (2005) J. Thromb. Haemost. 3:2044-2056, Stoilova-McPhie et al., (2002) Blood 99: 1215-1223, Bajaj et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:16302-16309, Schmidt et al., (2003) Trends Cardiovasc. Med. 13:39-45を参照されたい]。FIXaは、FIXaポリペプチドの2つ以上のドメインを伴う相互作用においてFVIIaに結合する。FVIIaは、3つの非共有結合鎖：A1、A2、およびA3-C1-C2からなるヘテロ二量体である。A3-C1-C2はまた、軽鎖とも呼ばれる。FIXaのプロテアーゼドメインは、FVIIaのA2サブユニットと相互作用するように思われる。研究は、FIXaの293ヘリックス（キモトリプシンナバリングによる126ヘリックス）、330ヘリックス（キモトリプシンナバリングによる162ヘリックス）、およびN346（キモトリプシンナバリングによるN178）が、FVIIaのA2サブユニットとの相互作用に参与することを示唆する。FIXaのEGF1/EGF2ドメインは、FVIIaのA3サブユニットと相互作用する。さらに、FIXaのG1aドメインは、FVIIaのC2ドメインと相互作用することが仮定される。カルシウムイオンおよびリン脂質もまた、FIXaおよびFVIIaの結合に寄与する。たとえば、リン脂質の存在は、約2000倍まで、FVIIaへのFIXaの結合を増加させる

40

50

[Mathur et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:]。F I X a / F V I I I a 複合体による F X の結合の後に、F I X a のプロテアーゼドメイン（または触媒ドメイン）は、F X a を形成するための R 1 9 4 - I 1 9 5 での F X の切断を担う。

【0206】

F I X a の活性は、上記に議論されるように、A T - I I I / ヘパリン複合体などのような阻害分子および低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（L R P）などのような他のクリアランスのメカニズムによって調節される。L R P は、肝臓、脳、胎盤、および肺を含む様々な組織上に発現される膜糖タンパク質である。L R P は、F I X a に加えて、アポリポタンパク質、リパーゼ、プロテイナーゼ、プロテイナーゼ阻害剤複合体、およびマトリックスタンパク質を含むが、これらに限定されない広範囲のタンパク質および複合体に結合する。F I X のチモーゲン形態または不活性形態は、L R P に結合しない。もっと正確に言えば、活性化に際して、L R P 結合部位が暴露される [Neels et al., (2000) Blood 96:3459-3465]。この結合部位は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの残基 3 4 2 ~ 3 4 6 にわたるプロテアーゼドメインにおけるループに位置する [Rohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:9394-9401]。

【0207】

5. 生物製剤としての F I X

第 I X 因子は、完全に、血液凝固プロセスに関与し、その活性化形態（F I X a）において、それは、F V I I I a とテナーゼ複合体を形成し、F X を F X a に活性化する。F X a は、リン脂質、カルシウム、および F V a と共に、プロトロンビンをトロンビンに変換し、これは、順番に、フィブリノーゲンをフィブリン単量体に切断し、したがって、強固で網目の血餅の形成を促進する。多くの研究は、外因性 F I X が、血友病を有する患者において血液凝血を促す能力を実証した。たとえば、F I X が欠損している血友病 B 患者は、外因性 F I X を用いる置換療法によって処置することができる。初期の置換療法は、M o n o N i n e（登録商標）第 I X 因子および A l p h a - n i n e - S D（登録商標）第 I X 因子として販売される治療薬などのような血漿精製 F I X を利用した。B e b u l i n（登録商標）V H、F X および低量の F V I I との F I X の精製濃縮物；K o n y n e（登録商標）8 0（B a y e r）、F I I、F X、および低レベルの F V I I との F I X の精製濃縮物；P R O P L E X（登録商標）T（B a x t e r I n t e r n a t i o n a l）、F I I、F V I I、および F X と共に F I X を含有する、プールされた正常ヒト血漿からの調製された熱処理産物；ならびに P r o f i l n i n e S D（登録商標）（A l p h a T h e r a p e u t i c C o r p o r a t i o n）を含む、血漿精製 F I X 複合体治療薬もまた、使用されてきた。より最近では、しかしながら、ヒト組換え第 I X 因子 [B e n e F I X（登録商標）凝固因子 I X（組換え体）、W y e t h] が、手術背景における出血の制御および予防を含む、血友病 B 患者における出血エピソードの制御および予防における使用のために承認されてきた。B e n e F I X（登録商標）凝固因子 I X（組換え体）は、配列番号 2 0 において記載されるアミノ酸配列を有し、血漿由来第 I X 因子の A l a 1 4 8 対立形質と同一である。したがって、配列番号 3 において記載される野生型 F I X ポリペプチドと比較して、B e n e F I X（登録商標）、凝固因子 I X（組換え体）は、T 1 4 8 A 突然変異を含有する。

【0208】

凝血促進薬としてのその使用に加えて、F I X の不活性形態または触媒活性が低下した形態は、血栓症の疾患および状態の処置などにおいて、抗凝血薬として使用することができる。

【0209】

典型的に、F I X は、静脈内に投与されるだけでなく、経口的に、全身性に、頬側に、経皮に、筋肉内に、および皮下に投与することもできる。F I X は、一度または複数回、投与することができる。一般的に、複数回の投与は、凝固を達成するために、F I X を用いる処置レジメンにおいて使用される。

【0210】

10

20

30

40

50

本明細書において下記に議論されるように、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、未修飾または野生型または他の治療的に活性な F I X ポリペプチドが使用されることが知られている、任意の処置あるいは製薬の方法において使用することもできる。そのような使用、方法、およびプロセスにおいて、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、野生型または未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、改善された特性を示す。

【0211】

D. 修飾 F I X ポリペプチド

修飾第 I X 因子ポリペプチドが、本明細書において提供される。F I X ポリペプチドは、野生型または未修飾 F I X ポリペプチドの一次配列における 1 つまたは複数のアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換（交換）によって修飾することができる。結果として生じる修飾ポリペプチドは、未修飾または野生型 F I X ポリペプチドと比較した、改善された特性または活性を示す。たとえば、修飾第 I X 因子および第 I X a 因子ポリペプチドの修飾 F I X a ポリペプチドおよび断片を含む修飾第 I X 因子ポリペプチドは、高グリコシル化を含む、改変されたグリコシル化などのような改変された翻訳後修飾および／またはリン酸化もしくは硫酸化の減少などのような改変されたリン酸化もしくは硫酸化；A T－I I I および／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性の増加；L R P への結合の減少；触媒活性の増加；クリアランスの減少およびインビボにおける血清半減期の増加を含む、改善された薬物動態学的特性；血液凝固活性の増加；またはその任意の組合せを有することができる。典型的に、修飾 F I X ポリペプチドは、凝血促進活性を示す。したがって、それらの単鎖チモーゲン形態からの活性化および補因子、F V I I I a への続く結合に際して増加した血液凝固活性を示す修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。そのような修飾 F I X ポリペプチドは、たとえば血友病 B などのような不十分な凝固によって特徴づけられる疾患または状態を有する患者に投与することができる。

【0212】

いくつかの例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、A T－I I I、ヘパリン、および A T－I I I／ヘパリン複合体を含む阻害因子に対する抵抗性の増加を示す。そのような修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示すことができる。さらなる例では、本明細書において提供される修飾第 I X 因子ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、改変されたグリコシル化レベルおよび／またはグリコシル化の種類の改変などのような、改変された翻訳後修飾を示す。

【0213】

いくつかの例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化の増加を示す。したがって、高グリコシル化 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。修飾 F I X ポリペプチドは、炭水化物成分が連結される、少なくとも 1 つの非天然グリコシル化部位（つまり未修飾または野生型 F I X ポリペプチドにおいて見出されないグリコシル化部位）の組み込みにより、グリコシル化の増加を示すことができる。そのような修飾 F I X ポリペプチドは、クリアランスの減少および血清半減期の増加を含む、インビボにおける改善された薬物動態学的特性を示すことができる。非天然グリコシル化部位および続く炭水化物成分の導入は、1 つまたは複数の他のタンパク質との F I X ポリペプチドの相互作用を立体的に妨げることによって、修飾 F I X ポリペプチドの活性をさらに改善することができる。たとえば、グリコシル化部位は、炭水化物成分がこの部位に付加される場合に、それが A T－I I I／ヘパリン複合体との修飾 F I X ポリペプチドの相互作用を立体的に妨げ、A T－I I I／ヘパリンに対する抵抗性が増加したポリペプチドをもたらすように、導入することができる。これは、さらに、循環からのポリペプチドのクリアランスを低下させることができる。したがって、新しいグリコシル化部位の導入の効果は、炭水化物成分がまた、A T－I I I／ヘパリン複合体などのような他のタンパク質との相互作用をも立体的に妨げる場合

、数倍になり得る。

【0214】

たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を導入する、1つまたは複数の修飾を含有することができる。たとえば、1、2、3、4、5、6、またはそれ以上の非天然グリコシル化部位を導入することができる。導入することができるグリコシル化部位は、N-グリコシル化部位、O-グリコシル化部位、またはその組合せを含むが、これらに限定されない。したがって、グリコシル化を促進する細胞においてまたはインビトログリコシル化の後に産生される場合、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、天然グリコシル化部位（たとえば、配列番号3において記載される成熟 F I X ポリペプチドの S 5 3、S 6 1、N 1 5 7、N 1 6 7、T 1 5 9、T 1 6 9、T 1 7 2、および T 1 7 9 に対応する天然グリコシル化部位）に連結される炭水化物成分に加えて、それぞれ異なる非天然グリコシル化部位に連結される1、2、3、4、5、6、またはそれ以上の炭水化物成分を含有することができる。特定の例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、1つまたは複数の非天然N-グリコシル化部位を含有する。したがって、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、N-グリコシル化のレベルの増加を示すことができる。

【0215】

たとえば、グリコシル化が増加した修飾 F I X ポリペプチドはまた、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、溶解性の増加、A T-I-I-I/ヘパリン抵抗性の増加、血清半減期の増加、免疫原性の減少、および/または血液凝固活性の増加をも示すことができる。そのような修飾 F I X ポリペプチドは、血友病または傷害などのような、出血障害または出血事象の処置において使用することができ、F I X ポリペプチドは、血液凝固を促進するために機能することができる。いくつかの場合では、グリコシル化の増加を示す、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、タンパク質を不活性またはほとんど不活性にする、1つまたは複数の修飾をも含有することができる。そのようなポリペプチドは、そのため、抗凝固薬活性の増加を示すことができ、血栓症の事象、状態、または疾患の処置において使用することができる。典型的に、しかしながら、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、凝血促進薬である。

【0216】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、他の活性および/または特性をも示すことができる。たとえば、修飾 F I X ポリペプチドのいくつかは、触媒活性を増加させる1つまたは複数の修飾を含有する。他の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、リン酸化、硫酸化、ヒドロキシル化、および/またはグリコシル化を減少させる、1つまたは複数の修飾を含有する。さらなる例では、修飾 F I X ポリペプチドが、F I X および L R P の間の相互作用に干渉する修飾を含有する。L R P への F I X の結合を妨害することによって、循環からの F I X のクリアランスを減少させることができる。したがって、L R P への F I X の結合を低下させる修飾は、インビボにおける F I X の薬物動態学的特性を改善することができる。

【0217】

1つもしくは複数の非天然グリコシル化部位を導入するまたは阻害因子に対する抵抗性を増加させる修飾などのような、本明細書において記載されるアミノ酸置換などのような修飾は、配列番号2において記載される配列を有する前駆体 F I X ポリペプチドを含む任意の F I X ポリペプチド（たとえば未修飾もしくは野生型 F I X ポリペプチド）、配列番号3において記載される成熟 F I X ポリペプチドにおいて、または配列番号2もしくは配列番号3において記載される F I X ポリペプチドに対して少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する F I X ポリペプチドにおいて、なすことができる。アミノ酸残基に対する本明細書における言及は、配列番号3において記載される成熟 F I X ポリペプチドのナンバリングに関するものである

ことが理解される。配列番号3と他のF I Xポリペプチドの配列のアライメントによって、前駆体、成熟、または他の活性形態などのような任意の形態の他のF I Xポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基を同定することは、当業者のレベルの範囲内にある（たとえば図3を参照されたい）。本明細書において提供される任意のアミノ酸置換は、異なるまたは置換アミノ酸残基と同じでない、対応するアミノ酸残基でなすことができる。本明細書において記載される活性または特性について、任意の結果として生じる修飾F I Xポリペプチドを試験することは、当業者のレベルの範囲内にある。

【0218】

たとえば、アミノ酸置換などのような修飾は、当技術分野において記載されるものなどのような、任意の種、対立遺伝子、または修飾変異体においてなすことができる。F I Xの対立遺伝子変異体は、T 1 4 8 AおよびT 4 1 2 Pを含むが、これらに限定されない。本明細書において提供されるアミノ酸置換のいずれも、突然変異T 1 4 8 AまたはT 4 1 2 Pを含有する第I X因子とすることができる。たとえば、任意のアミノ酸置換などのような修飾は、配列番号325または配列番号20において記載されるF I Xポリペプチドにおいてなすことができる。本明細書における修飾のための例示的な種変異体は、それらの配列が配列番号4～18においてそれぞれ記載されるチンパンジー、アカゲザル、マウス、ラット、モルモット、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ、雌ウシ、ヒツジ、カエル、ゼブラフィッシュ、および日本フグF I Xポリペプチド由来のF I Xポリペプチドを含む、ヒトおよび非ヒトポリペプチドを含むが、これらに限定されない。F I Xポリペプチドにおける修飾は、一次配列の修飾およびポリペプチドの一次配列におけるものではない修飾を含む、当技術分野において記載されるものなどのような、他の修飾をも含有するF I Xポリペプチドに対してなすことができる（たとえば、本明細書において記載されるアミノ修飾をなすことができる、例示的な修飾F I Xポリペプチドを記載するD. 6部を参照されたい）。

【0219】

他の例では、アミノ酸置換などのような修飾が、配列番号2もしくは配列番号3の活性断片などのようなF I Xポリペプチドの任意の活性断片または当技術分野において記載されるものなどのような種、対立遺伝子、もしくは修飾変異体の活性断片においてなすことができる。活性断片は、ポリペプチドの触媒活性ドメインまたは本明細書において記載されるアミノ酸置換などのようなアミノ酸修飾を含有する触媒活性部分を含有するアミノ酸の連続配列を含有する。活性断片は、配列番号3において記載されるF I Xポリペプチドなどのようなポリペプチドの成熟形態の活性の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上を示す。

【0220】

F I Xポリペプチドの修飾はまた、異なるF I Xポリペプチドのハイブリッドであるポリペプチドおよび知られているポリペプチドの配列に基づいて、組換えで調製されたまたは当技術分野において知られている他の方法によって合成されたもしくは構築された合成F I Xポリペプチドの修飾をも含む。たとえば、第F V I I因子（F V I I）および第X因子（F X）を含むが、これらに限定されない他の凝固因子ファミリーメンバーとのF I Xのアライメントに基づいて、ファミリーメンバーの間の相同性ドメインは、容易に同定される。F I Xポリペプチドのキメラ変異体は、構築することができ、1つもしくは複数のアミノ酸または全ドメインは、対応するファミリーメンバーのアミノ酸配列を使用して、F I Xアミノ酸配列において置換される。さらに、キメラF I Xポリペプチドは、1つもしくは複数のアミノ酸または全ドメインが、異なる種のアミノ酸配列を使用して、ヒトF I Xアミノ酸配列において置換されるものを含む。そのようなキメラタンパク質は、出発未修飾F I Xポリペプチドとして本明細書において使用することができる。

【0221】

出発未修飾参照ポリペプチドの本明細書において提供される修飾は、アミノ酸置換もしくは交換、アミノ酸の追加もしくは欠失、またはその任意の組合せを含む。たとえば、修飾F I Xポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、1

3、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、またはそれ以上の修飾位置を有するものを含む。いくつかの例では、F I Xのある活性または特性を改変するためになされる修飾はまた、またはその代わりに、もう1つの他の活性または特性に影響を及ぼすことができる。たとえば、阻害因子に対する抵抗性を増加させるためになされる修飾はまた、またはその代わりに、触媒活性を増加させることができる。他の例では、新しいグリコシル化部位を導入するためになされる修飾がまた、阻害因子に対する抵抗性の増加および／または触媒活性の増加をもたらすことができる。さらなる例では、L R Pへの結合の減少のためになされる修飾はまた、またはその代わりに、A T—I I I／ヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる。したがって、本明細書において記載される修飾は、典型的に、F I X活性または特性に対するそれらの意図される影響に 10
関して記載されるが、本明細書において記載される修飾のいずれも、単独でまたは1つもしくは複数の他の修飾と共に、他の予測されない活性または特性における変化をもたらし得ることが理解される。

【0222】

本明細書において提供される任意の修飾は、当業者に知られている任意の他の修飾と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾F I Xポリペプチドは、それがその二重鎖形態をしている場合、凝固活性の増加を示す。修飾の結果として改変することができる活性または特性は、凝固もしくは血液凝固活性；凝血促進活性；第X因子（F X）活性化を達成するためのなどのようなタンパク質分解活性もしくは触媒活性；抗原性（抗F I 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 I I I a、アンチトロンビンI I I、ヘパリン、および／もしくは第X因子に結合するための能力；リン脂質に結合するための能力；3次元構造；p I；および／またはコンホメーションを含むが、これらに限定されない。本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドの中で、アンチトロンビンI I I（A T—I I I）に対する抵抗性の増加、ヘパリンに対する抵抗性の増加、グリコシル化の増加などのような、改変されたグリコシル化、触媒活性の増加、ならびにi）クリアランスの減少、i i）分布容積の改変、i i i）インビボにおける回収率の増強、i v）インビボにおける総タンパク質暴露の増強（つまりA U C）、v）血清半減期（ α —、 β —、および／もしくは γ —相）の増加、ならびに／またはv i）平均共鳴時間（M R T）の増加などのような改善された薬物動態学的特性を有するものが本明細書において提供される。 20
30

【0223】

いくつかの例では、修飾は、F I Xポリペプチドの2つまたはそれ以上の特性または活性に影響を及ぼすことができる。たとえば、修飾は、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、修飾F I XポリペプチドのA T—I I I抵抗性の増加および触媒活性の増加をもたらすことができる。他の例では、非天然N—グリコシル化部位を導入し、したがって、哺乳動物細胞などのような適切な細胞において発現される場合に、ポリペプチドのグリコシル化レベルを増加させることができる修飾もまた、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、修飾F I Xポリペプチドの触媒活性の増加をもたらすことができる。本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、修飾の効果の範囲を同定するために、それぞれの特性および活性についてアッセイすることができる。そのようなアッセイは、当技術分野において知られており、下記に記載される。典型的に、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドの特性および／または活性に対する変化は、F V I I I aに対する結合ならびに／またはF Xの結合および活性化などのような、しかし限定されない、他のF I X活性または特性を保持しながら、なされる。したがって、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、F I Xポリペプチドの野生型形態または出発形態と比較して、F V I I I a結合および／またはF X結合ならびに活性化を保持する。典型的に、そのような活性は、野生型タンパク質または出発タンパク質と比較して、実質的に不変である（1%、5%、または10%未満変化する）。他の例では、修飾F I Xポリペプチドの活性が、野生型ポリペプチドまたは出発F I Xポリペプチドと比較して、増加するまたは減少する。活性は、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、たと 40
50

えば成熟野生型天然 F I X ポリペプチド（配列番号 3）、野生型前駆体 F I X ポリペプチド（配列番号 2）、または出発物質として使用される当業者に知られている任意の他の F I X ポリペプチドなどのような未修飾 F I X ポリペプチドと比較することができる。

【0224】

本明細書において提供される修飾は、当業者にとってルーチン的なものなどのような標準的な組換え D N A 技術によってなすことができる。標的タンパク質における任意の 1 つまたは複数のアミノ酸の突然変異を達成するための、当技術分野において知られている任意の方法を利用することができる。方法は、コード核酸分子の標準的な部位特異的突然変異誘発または固相ポリペプチド合成法によるものを含む。

【0225】

炭水化物部分の追加、ポリエチレングリコール（P E G）部分の追加、F c ドメイン、血清アルブミン、および／または他のタンパク質の追加を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの一次配列にあるまたはない他の修飾は、修飾 F I X ポリペプチドまたはそのコンジュゲートにおいて含むことができる。たとえば、そのようなさらなる修飾は、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。

【0226】

結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、単鎖チモーゲンポリペプチドであるものおよび二重鎖チモーゲン様のポリペプチドであるもの（つまり、補因子、F V I I I a に結合していない F I X a ポリペプチド）を含む。単鎖ポリペプチドである、本明細書において提供される任意の修飾 F I X ポリペプチドは、修飾 F I X a（つまり二重鎖形態）を生成するために活性化することができる。修飾 F I X ポリペプチドの活性は、その二重鎖形態において典型的に示される。

【0227】

1. 例示的なアミノ酸置換

配列番号 3 のナンバリングに関する残基のナンバリングと共に本明細書において下記に記載される 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含有する修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。同じアミノ酸置換は、他の F I X ポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基においてなすことができる（たとえば、対応するアミノ酸残基の同定の例証のために図 3 を参照されたい）。アミノ酸置換は、改変されたグリコシル化（たとえば非天然グリコシル化部位の導入もしくは天然グリコシル化部位の排除によって）、A T - I I I および／もしくはヘパリンに対する抵抗性の増加、触媒活性の増加、L R P 結合の減少、ならびに／または翻訳後修飾の改変を付与する。結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、たとえば、改善された薬力学的または薬物動態学的活性による、改善された治療上の効能を示す。

【0228】

特に、本明細書において下記に提供される修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸置換の非限定的な例は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに関するナンバリングにより、任意の 1 つまたは複数のアミノ酸残基 155、318、338、343、403、および／または 410 のものである（キモトリプシンナンバリングによって、それぞれ、アミノ酸残基 [155]、150、170、175、233、および／または 240 に対応する）。他の F I X ポリペプチドにおける 155、318、338、343、403、および／または 410 のいずれかに対応する残基は、配列番号 3 との配列アライメントによって決定することができる（たとえば図 3 を参照されたい）。配列番号 3 に関するナンバリングによるアミノ酸残基 155、318、338、343、403、および／または 410 のいずれかでの本明細書において提供されるアミノ酸置換は、本明細書において別記されるように、他の F I X ポリペプチドにおいてなすことができることが理解される。本明細書において提供される他のアミノ酸置換のいずれかに対応する残基はまた、本明細書において例示されるように、他の F I X ポリペプチドにおいて同定することもできることもまた、理解される（たとえば図 3）。

【0229】

特に、アミノ酸残基Y155(Y155F)、Y155L、Y155H、R318A、R318Y、R318E、R318F、R318W、R318D、R318I、R318K、R318L、R318M、R318N、R318S、R318V、R318Y、R338A、R338E、T343R、T343E、T343D、T343F、T343I、T343K、T343L、T343M、T343Q、T343S、T343V、T343W、T343Y、R403A、R403E、E410Q、E410S、E410N、E410A、E410Dでのチロシンのアミノ酸置換または保存的アミノ酸置換（たとえば表2Bを参照されたい）が、本明細書において提供される。いくつかの例では、アミノ酸置換が、Y155F、R318Y、R318E、R338E、T343R、R403E、および／もしくはE410Nまたはその保存的アミノ酸置換である。

【0230】

たとえば、本明細書においてデータによって示されるように、配列番号3に関する位置R318（キモトリプシンナンバリングによる150）でのアミノ酸置換は、A T-I I I /ヘパリン複合体による阻害に対する抵抗性を付与する。位置R338（キモトリプシンナンバリングによる170）でのアミノ酸置換もまた、A T-I I I /ヘパリン複合体による阻害に対する抵抗性を付与する。この点において、アミノ酸位置R338は、インビトロ凝血アッセイにおいて5～10倍増強した凝血活性を示すことが報告されている自然突然変異の部位（R170L）である（国際特許出願公開WO2010029178）。記載されるアッセイは、精製タンパク質ではなく、条件培地を用いて実行され、タンパク質濃度は、ELISAアッセイを使用して測定された。その結果として、これらのデータは、野生型コンパレーター調製物と比較して、R338L（R170L）調製物における活性物質のより高度な画分または凝血アッセイにおいて活性な、より高度なレベルの混入物を反映することができた。しかしながら、本明細書において示されるように、位置338（170）にA、E、およびLを含有する変異体は、FX活性化に対する効率が3.5～4倍増加する。本明細書において見出されるように、R338E突然変異は、さらに、ヘパリン/A T-I I I 複合体による阻害に対して約88倍の抵抗性および補因子F V I I I aへの結合の2倍の増強を示した。

【0231】

位置342～345（キモトリプシンナンバリングによる174～177）からの、F I Xへの4アミノ酸トロンビンループ swap 突然変異は、s L R PへのF I X aの結合を低下させることが報告されている[Rohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 9394-9401を参照されたい]。位置T343（キモトリプシンナンバリングによる175）での残基の突然変異は、F I Xの薬物動態学的（PK）特性に有意な影響を付与しなかった。しかしながら、突然変異T343R（キモトリプシンナンバリングによる175R）は、約3.1の倍数までFXの活性化のための触媒効能を増加させ、ヘパリン/A T-I I I 複合体に対する約5.6倍の抵抗性をもたらし、約1.6倍の倍数までF V I I I aに対する親和性を増加させることが本明細書において見出される。

【0232】

また、本明細書において示されるように、位置R403（キモトリプシンナンバリングによる233）での突然変異は、ヘパリン/A T-I I I 複合体による阻害に対する抵抗性を付与する。E410Nなどのような位置E410（キモトリプシンナンバリングによる240）での突然変異は、FXの活性化のための触媒効能において、有意な、これまでに観察されていない1.3～2.8倍の増加をもたらす。

【0233】

また、その点で示されるように、補因子F V I I Iへの結合の増強では、R338およびT343（キモトリプシンナンバリングによる170および175）での突然変異、特にR338EおよびT343Rにおいて相乗効果がある。相乗効果はまた、位置R338およびE410での突然変異（キモトリプシンナンバリングによる170およびE240）、特にR338EおよびE410Nの間で観察された。本明細書において例示される2つの二重突然変異体、R338E/T343RおよびR338E/E410Nは、24～28倍改善された、F V I I I aへの結合を示すが、それぞれの単一突然変異は、単独で、1.6～2.2倍まで結合を増強する。

【0234】

下記に記載されるように改変された特性または活性を付与することが見出された、本明細書において提供される F I X ポリペプチドにおける他の例示的なアミノ酸置換は、配列番号 3 に関する 1、5、53、61、64、85、103、104、105、106、108、148、157、158、159、167、169、172、179、202、203、204、205、228、239、241、243、247、249、251、257、259、260、262、284、293、312、314、315、316、317、319、320、321、333、342、345、346、392、394、400、412、または 413 の中からの任意のアミノ酸残基または対応するアミノ酸残基でのものとすることができる。たとえば、本明細書において提供される F I X ポリペプチドにおける例示的なアミノ酸置換はまた、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける Y1N、K5A、S53A、S61A、S61C、S61D、S61E、S61F、S61G、S61I、S61K、S61L、S61P、S61R、S61V、S61W、S61Y、D64A、D64C、D64F、D64H、D64I、D64L、D64M、D64N、D64P、D64R、D64S、D64T、D64W、D85N、A103N、D104N、N105S、N105T、K106N、K106S、K106T、V108S、V108T、T148A、N157D、N157E、N157F、N157I、N157K、N157L、N157M、N157Q、N157R、N157V、N157W、N157Y、S158A、S158D、S158E、S158F、S158G、S158I、S158K、S158L、S158M、S158R、S158V、S158W、S158Y、T159A、N167D、N167Q、N167E、N167F、N167G、N167H、N167I、N167K、N167L、N167M、N167P、N167R、N167V、N167W、N167Y、T169A、T169D、T169E、T169F、T169G、T169I、T169K、T169L、T169M、T169P、T169R、T169S、T169V、T169W、T169Y、T172A、T172D、T172E、T172F、T172G、T172I、T172K、T172L、T172M、T172P、T172R、T172S、T172V、T172W、T172Y、T179A、V202M、V202Y、D203N、D203M、D203Y、D203F、D203H、D203I、D203K、D203L、D203R、D203V、D203W、A204M、A204Y、A204F、A204I、A204W、F205S、F205T、K228N、E239A、E239S、E239R、E239K、E239D、E239F、E239I、E239L、E239M、E239N、E239T、E239V、E239W、E239Y、T241N、H243S、H243T、K247N、N249S、N249T、I251S、H257F、H257E、H257D、H257I、H257K、H257L、H257M、H257Q、H257R、H257S、H257V、H257W、H257Y、N260S、A262S、A262T、Y284N、K293E、K293A、R312A、R312Y、R312L、R312C、R312D、R312E、R312F、R312I、R312K、R312L、R312M、R312P、R312Q、R312S、R312T、R312V、R312W、R312Y、F314N、H315S、K316M、K316D、K316F、K316H、K316I、K316L、K316M、K316R、K316S、K316T、K316V、K316W、K316Y、G317N、S319N、A320S、L321N、L321S、L321T、R333A、R333E、F342I、F342D、F342E、F342K、F342L、F342M、F342S、F342T、F342V、F342W、F342Y、Y345A、Y345T、N346D、N346Y、N346E、N346F、N346H、N346I、N346K、N346L、N346M、N346Q、N346R、N346T、N346V、N346W、K392N、K394S、K394T、K400A、K400E、K400C、K400D、K400F、K400G、K400L、K400M、K400P、K400S、K400T、K400V、K400Y、T412A、T412V、T412C、T412D、T412E、T412F、T412G、T412I、T412M、T412P、T412W、T412Y、K413N または対応するアミノ酸残基位置における同じ置換をも含むが、これらに限定されない。

【0235】

たとえば、本明細書において提供される修飾（たとえばアミノ酸置換）によって改変される、例示的な特性および活性は、以下のように記載される。

【0236】

a. グリコシル化の改変

本明細書において提供される修飾第 I X 因子ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、改変されたグリコシル化レベルおよび／または改変されたグリコシル化の種類を示すことができる。いくつかの例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化の増加を示す。したがって、修飾 F I X ポリペプチドの中で、本明細書において記載されるのは、高度にグリコシル化された F I X ポリペプチドである。

【0237】

i. グリコシル化の利点

多くの哺乳動物タンパク質は、多様な数の炭水化物鎖を用いてグリコシル化され、これらのそれぞれが、異なる炭水化物構造を有することができる。そのような炭水化物は、タンパク質の安定性、溶解性、活性、血清半減期、および免疫原性において重要な役割を有

することができる。したがって、タンパク質の特性および活性は、グリコシル化の量および／または種類を調整することによって改変することができる。たとえば、グリコシル化は、安定性、溶解性を増加させることによっておよびタンパク質の免疫原性を低下させることによって、ポリペプチドの血清半減期を増加させることができる。これは、治療用ポリペプチドについて特定に興味深く、治療用ポリペプチドの溶解性、血清半減期、および安定性の増加は、治療上の効能の増加をもたらすことができる。

【0238】

オリゴ糖は、認識、シグナル伝達、および粘着などのような細胞内および細胞間事象において重要である。炭水化物はまた、分泌タンパク質の折り畳みを支援する。ポリペプチドが、たとえばグリコシル化が可能な真核細胞において産生される場合、それが、グリコシル化されるように、グリコシル化部位は、グリコシド結合を介しての単糖およびオリゴ糖のポリペプチドへの付加のための部位を提供する。いくつかの種類のタンパク質グリコシル化がある。N結合型およびO結合型グリコシル化は、主なクラスであり、アスパラギン残基またはセリンもしくはトレオニン残基が、それぞれ、修飾される。他の種類のグリカンは、グリコサミノグリカンおよびグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）-アンカーを含む。グリコサミノグリカンは、セリンのヒドロキシ酸素に付加されるが、GPIアンカーは、グリカン鎖を介して、疎水性脂質アンカーにタンパク質を付加する。C-グリコシル化はまた、コンセンサス配列 Trp-X-X-Trp で起こり得、配列における第1のトリプトファン残基のインドール側鎖は、 α -マンノピラノシル基を用いて修飾される [Furmanek et al., (2000) *Acta Biochim. Pol.* 47:781-789]。

【0239】

しかしながら、潜在的な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の間にグリコシル化されるであろうということを保証するものではない。さらに、グリコシル化のレベルは、グリカン構造でのように、任意の所定の部位で変わり得る。特定の部位でのグリコシル化のレベルおよび種類における差異は、潜在的なグリコシル化部位のあたりの配列構成および二次構造に、少なくとも部分的に起因し得る。

【0240】

O結合型グリコシル化は、セリン、トレオニン、ヒドロキシリシン、またはヒドロキシプロリン残基のヒドロキシ基を介しての、N-アセチルガラクトサミンなどのような糖単位の付加を含む。それは、1つの単糖の付加によって開始され、この後に、他のものが追加され、成熟O-グリカン構造が形成される。O-グリコシル化は、高度な割合のセリン残基、トレオニン残基、およびプロリン残基を有する配列において、より可能性が高くなるが、O-グリコシル化について知られているモチーフはない。さらに、広がった β ターンなどのような二次構造エレメントもまた、O-グリコシル化を促し得る。O-グリコシル化は、共通のコア構造を欠く。その代わりに、いくつかの種類のグリカンは、O-N-アセチルガラクトサミン（O-GalNAc）、O-N-アセチルグルコサミン（O-GlcNAc）、O-フコース、およびO-グルコースを含めて、選択されるO-グリコシル化部位に付加することができる。

【0241】

O-グリコシル化とは対照的に、N結合型グリコシル化コンセンサス配列モチーフは、十分に特徴づけられている。N結合型グリコシル化の間に、14残基オリゴ糖は、 Asn-X-Ser/Thr/Cys コンセンサスモチーフ中のアスパラギン残基に移され、ここで、Xは、Pro以外の任意のアミノ酸である。次いで、グリコシルトランスフェラーゼは、酵素的にサッカライドを切り、マンノース残基にさらなる糖単位を付加する。コンセンサスモチーフに近接する配列もまた、グリコシル化がコンセンサス配列で起こるかどうかに影響を及ぼし得る。したがって、 Asn-X-Ser/Thr/Cys コンセンサス配列の存在は、N結合型グリコシル化が起こるのに必要とされるが、必ずしも十分でない。いくつかの場合では、近接配列に対する変化が、それまで1つもなかった、コンセンサスモチーフでのグリコシル化をもたらす [Elliot et al., (2004) *J. Biol. Chem.* 279:16854-16862]。

【0242】

N結合型オリゴ糖は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ の共通のコア構造を共有する。哺乳動物において3つの主要な種類のN結合型サッカライドがある：高マンノースオリゴ糖、複雑なオリゴ糖、およびハイブリッドオリゴ糖。高マンノースオリゴ糖は、本質的に、いくつかのマンノース残基を有する2つのN-アセチルグルコサミンを含有する。いくつかの場合では、最終のN結合型高マンノースオリゴ糖は、それがタンパク質に付加される前の前駆体オリゴ糖と同数のマンノース残基を含有する。複雑なオリゴ糖は、たいてい、コア構造において2つを超えるN-アセチルグルコサミンを含めて、任意の数のマンノース、N-アセチルグルコサミン、およびフコースサッカライドを含有することができる。

【0243】

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って、タンパク質の安定性を増加させることができ、熱分解、変性剤に対する暴露、酸素フリーラジカルによる損害、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。グリコシル化はまた、標的タンパク質が、細胞表面受容体を含む他のタンパク質への結合を伴うクリアランスメカニズムを回避することを可能にすることができる。炭水化物のシアル酸構成成分は、特に、タンパク質の血清半減期を増強することができる。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、溶解性を増加させ、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、タンパク質に対して産生されている免疫応答の可能性を減少させる。さらに、炭水化物は、免疫系から、免疫原性の配列を遮蔽することができ、炭水化物部分によって占められる空間の容量は、免疫系によって調査される、利用可能な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における低下に至り得る。

【0244】

治療用ポリペプチドのグリコシル化のレベルおよび／または種類の修飾は、ポリペプチドのインビボにおける活性に影響を及ぼし得る。グリコシル化のレベルを増加させることによって、組換えポリペプチドは、血清半減期の増加、血清クリアランスの低下、および免疫原性の低下により、より安定させることができる。これは、ポリペプチドのインビボにおける活性を増加させ、同等の治療効果を達成するために、投薬の用量および／または頻度の低下をもたらすことができる。たとえば、ダルベポエチンアルファ(DA)と呼ばれるリコンビナントヒトエリスロポエチン(rHuEPO)の高グリコシル化形態は、インビボにおける活性が増加しており、作用持続時間が長い。高グリコシル化DAポリペプチドの炭水化物およびシアル酸含有量の増加は、未修飾rHuEPOよりも3倍の血清半減期をもたらす。この血清半減期の増加は、生物学的利用率の増加およびクリアランスの低下をもたらす。これは、投薬をそれほど頻繁でないものにするおよび／または用量をより低くすることができ、患者にとっての、関連する利便性が増加し、副作用の危険性が低下し、患者コンプライアンスが改善される。

【0245】

i i. グリコシル化が改変された、例示的な修飾FI Xポリペプチド

未修飾FI Xポリペプチドと比較して、改変されたグリコシル化を示すように修飾される修飾FI Xポリペプチドが、本明細書において提供される。修飾FI Xポリペプチドは、それぞれ、非天然グリコシル化部位の組み込みまたは天然グリコシル化部位の欠失などによって、グリコシル化の増加または減少を示すことができる。たとえば、修飾FI Xポリペプチドは、1、2、3、4、またはそれ以上の非天然N-グリコシル化部位を含有することができる。非天然N-グリコシル化部位は、アミノ酸置換(複数可) [もしくは交換(複数可)]、挿入(複数可)、または欠失(複数可)またはその任意の組合せによって導入することができ、アミノ酸置換(複数可)、挿入(複数可)、および／または欠失(複数可)は、グリコシル化モチーフ $\text{Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys}$ の確立をもたらす。ここで、Xaaは、プロリンではない。他の例では、本明細書において提供される修飾FI Xポリペプチドが、未修飾FI Xポリペプチドと比較して、グリコシル化部位の数を減少させることができ、典型的に、未修飾FI Xポリペプチドと比較して、グリ

コシル化のレベルの低下をもたらす。さらなる例では、修飾 F I X ポリペプチドが、野生型 F I X と同じレベルのグリコシル化を示すが、異なる種類のグリコシル化を示す。たとえば、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと同数のグリコシル化部位および同じレベルのグリコシル化を示すことができるが、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、たとえば N-および O-グリコシル化の異なる相対量などのような、異なる種類のグリコシル化を有することができる。

【0246】

(a)．非天然グリコシル化部位（複数可）の導入

特定の例では、非天然 N-グリコシル化部位が、アミノ酸置換によって導入される。いくつかの場合では、アミノ酸置換による非天然 N-グリコシル化部位の生成が、たった 1 つのアミノ酸置換を必要とする。たとえば、未修飾 F I X ポリペプチドが G l y - A l a - S e r 配列を含有する場合、N-グリコシル化部位は、アスパラギンとのグリシンの単一のアミノ酸交換によって生成され、A s n - A l a - S e r N-グリコシル化モチーフを生成することができる。他の例では、未修飾 F I X ポリペプチドが A s n - T r p - M e t 配列を含有する場合、N-グリコシル化部位は、システイン（またはトレオニンまたはセリン）とのメチオニンの単一アミノ酸交換によって生成することができる。他の場合では、アミノ酸置換による非天然 N-グリコシル化部位の生成が、1 つ以上アミノ酸置換を必要とする。たとえば、未修飾 F I X ポリペプチドが G l y - A r g - P h e 配列を含有する場合、N-グリコシル化部位は、2 つのアミノ酸置換：アスパラギンとのグリシンのアミノ酸交換およびシステイン（またはトレオニンまたはセリン）とのフェニルアラニンのアミノ酸交換によって生成され、A s n - A r g - S e r / T h r / C y s N-グリコシル化モチーフを生成することができる。したがって、当業者は、F I X ポリペプチドにおける任意の位置に 1 つまたは複数の非天然 N-グリコシル化部位を導入することができる。

【0247】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドを生成するために、非天然グリコシル化部位が F I X ポリペプチドの中に導入される位置は、典型的に、その部位で連結される任意の炭水化物成分が、F I X ポリペプチドの構造、機能、および／もしくは凝血促進活性に不利に干渉しないようにまたは非天然グリコシル化部位を導入するためにポリペプチドに対してなされるアミノ酸修飾（複数可）が、F I X ポリペプチドの構造、機能、もしくは活性に不利に干渉しないように選択される。したがって、非天然グリコシル化部位は、F I X ポリペプチドにおける任意の位置の中に導入することができる、ただし、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドが、野生型または未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する。反対に、1 つまたは複数の非天然グリコシル化部位は、阻害分子との F I X の相互作用に参与し得る部位で、修飾 F I X ポリペプチドの中に導入することができる。新しいグリコシル化部位に連結される炭水化物成分は、阻害分子および修飾 F I X の間の相互作用を立体的に妨げることができる。そのような立体障害は、血液凝固活性が増加した修飾 F I X ポリペプチドをもたらすことができる。たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドにおいて含有される非天然グリコシル化部位に連結される炭水化物成分は、A T - I I I / ヘパリン複合体との修飾 F I X の相互作用を立体的に妨げることができる。これは、A T - I I I / ヘパリンの阻害効果に対する修飾 F I X ポリペプチドの抵抗性の増加をもたらすことができる。

【0248】

したがって、非天然グリコシル化部位は、G l a ドメイン、E G F 1 ドメイン、E G F 2 ドメイン、活性化ペプチド、および／またはプロテアーゼドメインの中に導入することができる、ただし、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドが、野生型または未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する。他の例では、非天然グリコシル化部位が、E G F 2 ドメインまたはプロテアーゼドメインの中に導入される。結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する。いくつかの例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの少

なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、またはそれ以上の触媒活性を保持する。他の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、またはそれ以上の F X に対する結合活性を保持する。他の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、またはそれ以上の F V I I I a に対する結合活性を保持する。いくつかのアッセイにおいておよび／またはいくつかの条件下において、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X タンパク質と比較して、活性の増加を示すことができる（たとえば、インビボにおける薬力学的活性および／または A T I I I /ヘパリンもしくは血漿の存在下における触媒活性）。

10

【0249】

表 3 は、非天然 N-グリコシル化部位を導入することによってグリコシル化レベルを増加させるために、修飾 F I X ポリペプチド中に含まれる、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドのアミノ酸位置に対応する、例示的なアミノ酸置換の非限定的な例を提供する。そのような突然変異に関して、第 1 のアミノ酸（1 文字略語）は、置換されるアミノ酸に対応し、番号は、配列番号 3 に関する成熟 F I X ポリペプチド配列における位置に対応し、第 2 のアミノ酸（1 文字略語）は、その位置の第 1 のアミノ酸と置換する、選択されるアミノ酸に対応する。突然変異のためのアミノ酸位置はまた、必要に応じて、キモトリプシンナンバリングスキームによっても参照される（つまり突然変異が F I X プロテアーゼドメイン内に位置する場合）。修飾アミノ酸位置が対応するキモトリプシン番号を有していない（つまり、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに対応するアミノ酸位置 181～415 内になく、上記の表 1 において記載されていない）場合、位置は、成熟 F I X ナンバリングを使用して、括弧中に表される。たとえば、キモトリプシンナンバリングを指す場合、A 103N は、対応するキモトリプシン番号を有しておらず、A [103]N として記載される。下記の表 3 において、修飾 F I X ポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。修飾によって生成される非天然グリコシル化部位の位置もまた、表 3 において同定される。

20

【0250】

いくつかの場合では、1 つのアミノ酸置換だけが、非天然 N-グリコシル化部位を生成するために必要とされる。たとえば、位置 85（配列番号 3 において記載された成熟 F I X ポリペプチドに対応する）でのアスパラギン酸（A s p、D）は、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸位置 85 で、E G F 2 ドメインにおける非天然グリコシル化部位を生成するためにアスパラギン（A s n、N）と置換することができる。他の例では、位置 251（配列番号 3 において記載された成熟 F I X ポリペプチドに対応する）でのイソロイシン（I l e、I）が、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸位置 249 で、プロテアーゼドメインにおける非天然 N-グリコシル化部位を生成するためにセリン（S e r、S）と置換することができる。他の場合では、2 つのアミノ酸置換が、新しいグリコシル化部位を生成するために必要とされる。たとえば、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸位置 103 で、E G F 2 ドメインにおいて非天然 N-グリコシル化部位を生成するために、位置 103（配列番号 3 において記載される成熟 F I X のナンバリングに基づく）でのアラニン（A l a、A）は、アスパラギン（A s n、N）と置換することができ、位置 105 でのアスパラギンは、セリン（S e r、S）と置換することができる。他の例では、アミノ酸位置 243 でプロテアーゼドメインにおいて非天然 N-グリコシル化部位を生成するために、位置 241 でのトレオニン（T h r、T）が、アスパラギンと置換され、位置 243 でのヒスチジン（H i s、H）が、セリンと置換される。

30

40

【0251】

表 3.

【表 3】

修飾 (成熟FIXナンバリング)	修飾 (キモトリプシンナンバリング)	非天然グリコシル化部位 (成熟FIXナンバリング)	非天然グリコシル化部位 (キモトリプシンナンバリング)	配列番号
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	N103	N[103]	77
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	N104	N[104]	78
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	N106	N[106]	79
D85N	D[85]N	N85	N[85]	80
D203N/F205T	D39N/F41T	N203	N39	99
K228N	K63N	N228	N63	101
I251S	I86S	N249	N84	103
A262S	A95bS	N260	N95	106
K413N	K243N	N413	N243	107
E410N	E240N	N410	N240	108
E239N	E74N	N239	N74	109
T241N/H243S	T76N/H78S	N241	N76	110
K247N/N249S	K82N/N84S	N247	N82	111
L321N	L153N	N321	N153	112
K392N/K394S	K222N/K224S	N392	N222	114
N260S	N95S	N258	N93	116
S319N/L321S	S151N/L153S	N319	N151	115
Y284N	Y117N	N284	N117	117
G317N	G149N	N317	N149	118
R318N/A320S	R150N/A152S	N318	N150	119
F314N/K316S	F145N/K148S	N314	N145	177

10

20

30

【0252】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、2つまたはそれ以上の非天然 N-グリコシル化部位の導入をもたらす修飾を含有することができる。たとえば、表 3 において記載される修飾は、組み合わせられ、2、3、4、5、6、またはそれ以上の非天然 N-グリコシル化部位を含有する修飾 F I X ポリペプチドをもたらすことができる。任意の 2つまたはそれ以上の、表 3 において記載される修飾は、組み合わせることができる。たとえば、アミノ酸交換 D 1 0 4 N / K 1 0 6 S / K 2 2 8 N を含有する修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドの中に含まれ、それぞれ、アミノ酸位置 1 0 4 および 2 2 8 (配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに対応するナンバリング) に 2 つの非天然グリコシル化部位を有する F I X ポリペプチドがもたらされる。他の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、アミノ酸交換 D 8 5 N / K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / K 3 9 2 N / K 3 9 4 S を含有することができ、それぞれアミノ酸位置 8 5、2 4 7、および 3 9 2 (配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに対応するナンバリング) に 3 つの非天然グリコシル化部位を有する F I X ポリペプチドがもたらされる。表 4 は、2つまたはそれ以上の非天然 N-グリコシル化部位を有する例示的な F I X ポリペプチドを記載する。

40

【0253】

表 4.

【表 4】

修飾(成熟FIXナンバリング)	修飾 (キモトリプシンナンバリング)	非天然グリコシル化部位 (成熟FIXナンバリング)	非天然グリコシル化部位 (キモトリプシンナンバリング)	配列番号
D85N/I251S	D[85]N/I86S	N85およびN149	N[85]およびN84	104
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	N85およびN203	N[85]およびN39	100
D85N/K228N	D[85]N/K63N	N85およびN228	N[85]およびN63	102
D85N/D104N/ K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/ K[106]S/I86S	N85, N104およびN249	N[85], N[104]およびN84	105
A103N/N105S/ K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/ K82N/N84S	N103およびN247	N[103]およびN82	178
D104N/K106S/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/ K82N/N84S	N104およびN247	N[104]およびN82	179
K228N/I251S	K63N/I86S	N228およびN249	N63およびN84	180
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	N103およびN249	N[103]およびN84	181
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	N104およびN249	N[104]およびN84	182
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	N228およびN247	N63およびN82	183
K228N/K247N/N249S/ D104N/K106S	K63N/K82N/N84S/ D[104]N/K[106]S	N228, N247およびN104,	N63, N82およびN[104]	184
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	N104およびN258	N[104]およびN93	185

【0254】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、1つまたは複数の非天然 N-グリコシル化部位などのような、1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を含有することができる。したがって、グリコシル化を促進する細胞において発現される場合または当技術分野においてよく知られているインビトロにおける技術を使用してグリコシル化される場合、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化のレベルの増加を示すことができる。グリコシル化のレベルは、未修飾または野生型 F I X ポリペプチドのグリコシル化のレベルと比較して、少なくともまたは少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上まで増加させることができる。

【0255】

1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を導入するために本明細書において記載される修飾は、本明細書において記載されるまたは当技術分野において知られている任意の他の突然変異と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。たとえば

、1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を導入する、1つまたは複数の修飾は、A T-I I I および／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、触媒活性を増加させる、内因活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、L R P への結合を減少させる、ならびに／または薬物動態学のおよび／もしくは薬力学的特性を改善する修飾（複数可）と組み合わせることができる。

【0256】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を含有し、グリコシル化のレベルの増加などのような改変されたグリコシル化を有し、たとえばその基質（F X）に対する触媒活性などのような、F I X の少なくとも1つの活性を保持する。典型的に、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドによって示される触媒活性の少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。95%、またはそれ以上を保持する。グリコシル化のレベルの増加は、未修飾 F I X と比較して、1つまたは複数の以下の特性を変異体に与えることによって、修飾 F I X ポリペプチドの薬物動態学的特性を改善することができる：i) クリアランスの減少、i i) 分布容積の改変、i i i) インビボにおける回収率の増強、i v) インビボにおける総タンパク質暴露の増強（つまりAUC）、v) 血清半減期（ α 、 β 、および／もしくは γ 相）の増加、ならびに／またはv i) 平均共鳴時間（MRT）の増加。改変されたグリコシル化を有する修飾 F V I I ポリペプチドの血液凝固活性は、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて、未修飾 F I X ポリペプチドまたは野生型 F I X ポリペプチドの凝固活性と比較して、少なくともまたは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで、増加させることができる。

【0257】

(b) . 天然グリコシル化部位の排除

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化部位の数を減少させることができる。典型的に、グリコシル化部位の数の低下は、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化のレベルの低下をもたらす。除去することができる天然グリコシル化部位は、たとえば、配列番号3において記載される成熟 F I X の位置157および167に対応するアミノ酸位置の天然N-グリコシル化部位ならびに配列番号3において記載される成熟 F I X の位置53、61、159、169、172、および179に対応するアミノ酸位置の天然O-グリコシル化部位を含む。

【0258】

任意の1つまたは複数の天然グリコシル化部位は、アミノ酸置換（複数可）、挿入（複数可）、もしくは欠失（複数可）またはその任意の組合せによって除去することができる。たとえば、アミノ酸置換、欠失、および／または挿入は、A s n / X a a / S e r / T h r / C y s モチーフ（ここでX a a はプロリンではない）を破壊するためになされ、それによって、位置157または167のN-グリコシル化部位を除去することができる。他の例では、O-グリコシル化部位が、位置53もしくは61でのセリン残基のアミノ酸置換もしくは欠失または位置159もしくは169でのトレオニン残基のアミノ酸置換もしくは欠失などによって、除去される。結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する。いくつかの例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上の触媒活性を保持する。他の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上のF X に対する結合活性を保持する。他の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、未修飾 F I X ポリペプチドの少なくとも5%、10%、20%

、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上のF V I I I aに対する結合活性を保持する。いくつかのアッセイにおいておよび／またはいくつかの条件下において、修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xと比較して、特性の増強を示すことができる（たとえば、インビボにおける回収率の増加、インビボにおけるA U Cの増加、および／またはインビボにおけるクリアランスの減少を含むが、これらに限定されない）。

【0259】

表5は、天然N-グリコシル化部位を除去するまたは排除することによってグリコシル化レベルを減少させるために、修飾F I Xポリペプチド中に含まれる、配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドのアミノ酸位置に対応する、例示的なアミノ酸置換の非限定的な例を提供する。下記の表5において、修飾F I Xポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。

【0260】

表5.

【表5】

突然変異 (成熟FIX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
S53A	S[53]A	88
S61A	S[61]A	87
N157D	N[157]D	75
N157Q	N[157]Q	98
T159A	T[159]A	89
N167D	N[167]D	85
N167Q	N[167]Q	86
T169A	T[169]A	90
T172A	T[172]A	91
T179A	T[179]A	92

【0261】

1つまたは複数の天然グリコシル化部位を排除するために本明細書において記載される修飾は、本明細書において記載されるまたは当技術分野において知られている任意の他の突然変異と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。たとえば、1つまたは複数の天然グリコシル化部位を排除する、1つまたは複数の修飾は、非天然グリコシル化部位を導入する、A T-I I Iおよび／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、触媒活性を増加させる、内因活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、または薬物動態学および／もしくは薬力学的特性を改善する修飾（複数可）と組み合わせることができる。

【0262】

1つまたは複数の天然グリコシル化部位を排除する本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、たとえばその基質F Xに対する触媒活性などのような、F I Xの少なくとも1つの活性を保持する。典型的に、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドによって示される触媒活性の少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上を保持する。いくつかの場合では、改変されたグリコシル化を有する修飾F V I Iポリペプチドの血液凝固活性は、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて、未修飾F I Xポリペプチドまたは野生型F I Xポリペプチドの凝固活性と比較して、少なくともまたは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7

%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで、増加させることができる。

【0263】

b. AT-IIIおよびヘパリンに対する抵抗性の増加

FIXの活性は、凝固プロセスの調節の一部として、血液中の因子によって阻害され得る。したがって、AT-IIIおよびヘパリンを含む阻害因子の阻害効果に対する抵抗性の増加を示す修飾FIXポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの例では、本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドが、ヘパリンに対する結合親和性の低下ならびに／またはAT-IIIのみおよび／もしくはAT-III／ヘパリン複合体による阻害に対する二次速度定数の減少を示す。さらなる例では、修飾FIXポリペプチドが、AT-IIIのみまたはヘパリンのみに対する抵抗性の増加を示す。したがって、AT-III、AT-III／ヘパリン複合体、および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加を示す修飾FIXポリペプチドが、本明細書において提供される。

【0264】

i. AT-III

アンチトロンビンIII（アンチトロンビンまたはAT-IIIとしても知られている）は、重要な抗凝固セルピン（セリンプロテアーゼ阻害因子）である。AT-IIIは、464アミノ酸残基を含有する前駆体タンパク質として合成される（配列番号21）。分泌の過程において、32残基シグナルペプチドは、切断されて、432アミノ酸成熟ヒトアンチトロンビン（配列番号22）を生成する。58kDa AT-III糖タンパク質は、血液中に循環し、セリンプロテアーゼ阻害因子（セルピン）として機能して、凝固系の多くのセリンプロテアーゼを阻害する。AT-IIIはまた、FXIa、FXIIa、および程度はより少ないが、FVIIaの活性をも阻害することが示されたが、AT-IIIの主要な標的は、トロンビン、第IXa因子、および第IXa因子である。

【0265】

AT-IIIの作用は、診療において抗凝固薬として広く使用される、天然に存在するヘパラン硫酸または様々な組織由来ヘパリンなどのようなグリコサミノグリカンによって非常に増強される。二次分子に結合することなく典型的に有効である他のセルピンと異なり、標的凝固因子との、ヘパリンの非存在下における、AT-IIIの反応は、非常にゆっくりとしている。ヘパリンの非存在下において、AT-IIIの反応性ループ配列は、ゆっくりとした反応性の決定因子を提供する。AT-IIIの反応性ループ中心における保存P2-P1'残基の突然変異誘発は、たとえば、ヘパリンの存在下ではなく非存在下において、プロテアーゼとのAT-IIIの相互作用に影響を及ぼす。

【0266】

AT-IIIは、反応性中心ループにおけるコンホメーションの変化を誘発する、ヘパリンにおける特有の五糖配列に対して高度に特異的な様式で結合する。そのようなコンホメーションにおいて、AT-IIIの反応性中心ループは、より効率的に、セリンプロテアーゼの反応部位と相互作用することができ、阻害を達成することができる。証拠は、AT-IIIへのヘパリンの結合が、AT-IIIとのFIXa、トロンビン、およびFIXaの相互作用を促す、新しいエキソサイトを生成することを示唆する。位置253のチロシンおよび位置255のグルタミン酸は、たとえば、ヘパリン結合によって生成され、AT-IIIのみにより観察される阻害と比較してAT-IIIによるFIXaの急速な阻害の増加を促す、AT-III上のエキソサイトの重要な決定因子であることが示されてきた [Izaguirre et al., (2006) J. Bio Chem 281:13424-13432]。

【0267】

突然変異の研究もまた、第IXa因子におけるどの残基がAT-III／ヘパリンとの相互作用に関与するかをいくらか示した。たとえば、成熟FIXポリペプチドの位置318（キモトリプシンナッキングによる位置150に対応する）でのアルギニンの修飾は、33倍～70倍まで、AT-III／ヘパリンとのこの突然変異体の反応性を低下させ

る [Yang, L. et al., (2003) J. Biol. Chem. 278(27):25032-8]。F I X a 突然変異体および A T - I I I の間の反応性の低下は、A T - I I I がヘパリンに結合していない場合ほど顕著ではないが、成熟 F I X a ポリペプチドの位置 3 1 8 のアルギニンおよび A T - I I I の間の相互作用が、A T - I I I がヘパリン活性化コンホメーションをしている場合に達成されることを示す。

【0268】

i i . ヘパリン

ヘパリンは、上記に議論される A T - I I I 依存性の様式および A T - I I I 非依存性の様式の両方で、内在性テナーゼ複合体において、F I X a の活性を阻害することができる。研究は、ヘパリンによる F I X a 活性の A T - I I I 非依存性の阻害が、F V I I I a - F I X a 相互作用を破壊する、F I X a 上のエキソサイトへのオリゴ糖結合の結果であることを示す [Yuan et al., (2005) Biochem. 44:3615-3625, Misenheimer et al., (2007) Biochem. 46:7886-7895, Misenheimer et al. (2010) Biochem. 49:9977-10005]。ヘパリンに結合するエキソサイトは、位置 3 3 8 (キモトリプシンナバリングによる位置 1 7 0 に対応する) のアルギニンから少なくとも位置 4 0 3 (キモトリプシンナバリングによる位置 2 3 3 に対応する) のアルギニンにわたる電気陽性領域における第 I X a 因子プロテアーゼドメイン中にある。このエキソサイトは、その補因子、F V I I I a との F I X a の相互作用に重大な F I X a の領域と重複する。したがって、F I X a へのヘパリンの結合は、F V I I I a との F I X a の相互作用を阻害し、したがって、内在性テナーゼ活性を低下させる。

【0269】

i i i . A T - I I I およびヘパリンに対する抵抗性が増加した、例示的な F I X ポリペプチド

A T - I I I、ヘパリン、および／または A T - I I I /ヘパリン複合体に対するその抵抗性を増加させる修飾を、F I X ポリペプチドに対してなすことができる。一般的に、そのような修飾 F I X ポリペプチドは、F I X ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する。典型的に、そのような修飾は、A T - I I I、ヘパリン、および／または A T - I I I /ヘパリン複合体との F I X a の相互作用に関与する、F I X ポリペプチドの任意の位置の 1 つまたは複数のアミノ酸交換を含む。そのような修飾は、たとえば、A T - I I I のみとの修飾 F I X a ポリペプチドの相互作用の速度の低下、A T - I I I /ヘパリン複合体に対する修飾 F I X a ポリペプチドの相互作用の速度の低下、および／またはヘパリンのみに対する修飾 F I X a ポリペプチドの結合親和性の低下をもたらすことができる。いくつかの例では、修飾 (複数可) が、1 つまたは複数の非天然グリコシル化部位を導入する。新しいグリコシル化部位に連結される炭水化物成分は、A T - I I I /ヘパリン複合体との修飾 F I X の相互作用を立体的に妨げ、A T - I I I /ヘパリンの阻害効果に対する修飾 F I X ポリペプチドの抵抗性の増加をもたらすことができる。そのため、修飾 F I X a ポリペプチドは、内在性テナーゼ活性に関して、A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパリンの天然阻害効果に対する抵抗性の増加を示す。凝血促進治療薬としての対象への投与の後などに、適切なインビトロアッセイまたはインビボアッセイにおいて評価した場合、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示すことができる。

【0270】

本明細書において下記に記載されるように、当業者は、A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパリンに対して増加した抵抗性を示す修飾 F I X a ポリペプチドを経験的にまたは合理的に設計することができる。そのような修飾 F I X ポリペプチドは、修飾 F I X ポリペプチドが A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパリンに対して抵抗性の増加を示すかどうかを決定するための、当業者に知られているアッセイにおいて試験することができる。たとえば、修飾 F I X ポリペプチドは、A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパリンへの結合について試験することができる。一般的に、A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパ

リンに対する抵抗性を増加させた修飾 F I X ポリペプチドは、ヘパリンへの結合の減少および／もしくは親和性の減少ならびに／または A T - I I I および／もしくは A T - I I I /ヘパリンとの相互作用の速度の減少を示すであろう。典型的に、そのようなアッセイは、F I X (F I X a) の活性化形態を用いてならびに補因子、F V I I I a およびリン脂質の非存在下または存在下において実行される。

【0271】

A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加を示す修飾 F I X 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 F I X ポリペプチド変異体は、1つまたは複数のアミノ酸位置 202、203、204、205、228、239、257、260、293、312、316、318、319、321、333、338、342、346、400、403、または410で修飾される(キモトリプシンナンバリングによるアミノ酸位置 38、39、40、41、63、74、92、95、126、143、145、148、150、151、153、165、170、174、178、230、233、および240にそれぞれ対応する)。これらのアミノ酸残基は、アミノ酸置換、アミノ酸欠失、またはアミノ酸交換によってなどのような修飾であってもよい。同定される残基は、任意の他のアミノ酸と置換または交換することができる。その代わりに、アミノ酸挿入は、標的アミノ酸残基の近傍における標的アミノ酸残基またはタンパク質構造のコンホメーションを改変するために使用することができる。

【0272】

任意のアミノ酸残基はまた、同定される位置の内因性アミノ酸残基と交換することができる。典型的に、置換アミノ酸は、それが、F I X および A T - I I I またはヘパリンの間の相互作用に干渉するように選ばれる。たとえば、修飾は、ヘパリンとの F I X ポリペプチドの相互作用に干渉するように、アミノ酸位置 260、293、333、338、346、400、および410でなすことができる(キモトリプシンナンバリングによるアミノ酸位置 95、126、165、170、178、230、233、および240にそれぞれ対応する)。他の例では、修飾が、A T - I I I との F I X ポリペプチドの相互作用に干渉するように、アミノ酸位置 203、204、205、228、239、312、314、316、318、319、321、および342でなされる(キモトリプシンナンバリングによるアミノ酸位置 39、40、41、63、74、143、145、148、150、151、153、および174にそれぞれ対応する)。

【0273】

いくつかの例では、新しいグリコシル化部位が、アミノ酸置換によって導入される。新しいグリコシル化部位に連結される炭水化物成分は、A T - I I I /ヘパリン複合体との修飾 F I X の相互作用を立体的に妨げ、A T - I I I /ヘパリンの阻害効果に対する修飾 F I X ポリペプチドの抵抗性の増加をもたらすことができる。たとえば、位置 410 (キモトリプシンナンバリングによる 240 位に対応する) のグルタミン酸 (G l u、E) は、位置 410 に新しいグリコシル化部位を導入するために、アスパラギン (A s n、N) と置換することができる。他の例では、位置 239 (キモトリプシンナンバリングによる位置 74 に対応する) のグルタミン酸 (G l u、E) が、位置 239 に新しいグリコシル化部位を導入するために、アスパラギン (A s n、N) と置換される。A T - I I I /ヘパリンに対する抵抗性を増加させるために新しいグリコシル化部位を導入する他の突然変異は、たとえば D 203 N / F 205 T、R 318 N / A 320 S、N 260 S、および F 314 N / K 316 S (キモトリプシンナンバリングによる D 39 N / F 41 T、R 150 N / A 152 S、N 95 S、および F 145 N / K 148 S に対応する) を含む。

【0274】

A T - I I I、A T - I I I /ヘパリン、および／またはヘパリンに対する抵抗性を増加させるために、修飾がなされる他の例では、位置 202 (キモトリプシンナンバリングによる位置 38 に対応する) のバリン残基が、メチオニン (M e t、M) もしくはチロシン (T y r、Y) と置換される；位置 203 (キモトリプシンナンバリングによる位置 3

9に対応する)のアスパラギン酸(A s p、D)が、メチオニン(M e t、M)もしくはチロシン(T y r、Y)と置換される；位置204(キモトリプシンナンバリングによる位置40に対応する)のアラニン(A l a、A)が、メチオニン(M e t、M)もしくはチロシン(T y r、Y)と置換される；位置239(キモトリプシンナンバリングによる74位に対応する)のグルタミン酸が、セリン(S e r、S)、アラニン(A l a、A)、アルギニン(A r g、R)、もしくはリシン(L y s、K)と置換される；位置257(キモトリプシンナンバリングによる位置92に対応する)のヒスチジンが、フェニルアラニン(P h e、F)、チロシン(T y r、Y)、グルタミン酸(G l u、E)、もしくはセリン(S e r、S)と置換される；位置293(キモトリプシンナンバリングによる位置143に対応する)のリシン(L y s、K)が、アラニン(A l a、A)もしくはグルタミン(G l n、Q)と置換される；位置312(キモトリプシンナンバリングによる位置143に対応する)のアルギニン(A r g、R)が、アラニン(A l a、A)もしくはグルタミン(G l n、Q)と置換される；位置316(キモトリプシンナンバリングによる148に対応する)のリシンが、アスパラギン(A s n、N)、アラニン(A l a、A)、グルタミン酸(G l u、E)、セリン(S e r、S)、もしくはメチオニン(M e t、M)と置換される；位置318(キモトリプシンナンバリングによる位置150に対応する)のアルギニン(A r g、R)が、アラニン(A l a、A)、グルタミン酸(G l u、E)、チロシン(T y r、Y)、フェニルアラニン(P h e、F)、もしくはトリプトファン(T r p、W)と置換される；位置333(キモトリプシンナンバリングによる位置165に対応する)のアルギニン(A r g、R)が、アラニン(A l a、A)もしくはグルタミン酸(G l u、E)と置換される；位置338(キモトリプシンナンバリングによる位置170に対応する)のアルギニン(A r g、R)が、アラニン(A l a、A)もしくはグルタミン酸(G l u、E)と置換される；位置400(キモトリプシンナンバリングによる位置230に対応する)のリシン(L y s、K)が、アラニン(A l a、A)もしくはグルタミン酸(G l u、E)と置換される；ならびに／または位置403(キモトリプシンナンバリングによる位置233に対応する)のアルギニン(A r g、R)が、アラニン(A l a、A)、グルタミン酸(G l u、E)、もしくはアスパラギン酸(A s p、D)と置換される。

【0275】

チロシンである、残基R318もしくは318に対応するF I Xポリペプチドにおける残基でのアミノ酸置換、たとえばR318Yまたはその保存的アミノ酸置換を含有する修飾F I Xポリペプチドが、本明細書において提供される。たとえば、チロシンについての保存的アミノ酸残基は、フェニルアラニン(F)またはトリプトファン(W)を含むが、これらに限定されない。グルタミン酸である、残基R403もしくは403に対応するF I Xポリペプチドにおける残基でのアミノ酸置換、たとえばR403Eまたはその保存的アミノ酸置換を含有する修飾F I Xポリペプチドもまた、提供される。たとえば、グルタミン酸についての保存的アミノ酸残基はアスパラギン酸(D)を含むが、これらに限定されない。

【0276】

さらなる実施形態において、組合せ突然変異体を生成することができる。アミノ酸位置202、203、204、257、239、293、312、316、318、333、338、400、403、および410(キモトリプシンナンバリングによるアミノ酸位置38、39、40、74、92、126、143、148、150、165、170、230、233、および240にそれぞれ対応する)に2つ以上の突然変異を有するものが、そのような組合せ突然変異体の中に含まれる。たとえば、修飾F I Xポリペプチドは、2、3、4、5、またはそれ以上の同定される位置にアミノ酸交換を有することができる。したがって、修飾ポリペプチドは、A T-I I I、A T-I I I／ヘパリン、および／またはヘパリンの阻害効果に対する修飾F I Vポリペプチドの抵抗性の増加をもたらすことができる1、2、3、4、5、またはそれ以上の突然変異を示すことができる。A T-I I I、A T-I I I／ヘパリン、および／またはヘパリンの阻害効果に対する修飾F

10

20

30

40

50

I Xポリペプチドの抵抗性を増加させるために本明細書において記載される、任意の1つまたは複数の突然変異は、組み合わせることができる。

【0277】

表6は、配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドのアミノ酸位置に対応する、同定される残基での例示的なアミノ酸置換の非限定的な例を提供する。これらの中に、例示的な組合せ突然変異が含まれる。述べられるように、そのようなF I Xポリペプチドは、A T—I I I、A T—I I I／ヘパリン、および／またはヘパリンに対する抵抗性を増加させるように設計され、そのため、A T I I I、ヘパリン／A T I I I、ヘパリン、血漿、血清、または血液を含むインビボ、エクスピボ、またはインビトロアッセイにおいて血液凝固活性が増加している。そのような突然変異に関して、第1のアミノ酸（1文字略語）は、置換されるアミノ酸に対応し、番号は、配列番号3に関する成熟F I Xポリペプチド配列における位置に対応し、第2のアミノ酸（1文字略語）は、その位置の第1のアミノ酸と置換する、選択されるアミノ酸に対応する。突然変異のためのアミノ酸位置はまたキモトリプシンナンバリングスキームによっても参照される。下記の表6において、修飾F I Xポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。

【0278】

表6.

【表6-1】

突然変異 (成熟FIX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
R318A	R150A	120
R318E	R150E	121
R318Y	R150Y	122
R318F	R150F	413
R318W	R150W	414
R312Q	R143Q	123
R312A	R143A	124
R312Y	R143Y	125
R312L	R143L	126
V202M	V38M	127
V202Y	V38Y	128
D203M	D39M	129
D203Y	D39Y	130
A204M	A40M	131
A204Y	A40Y	132
K400A/R403A	K230A/R233A	133

【表 6 - 2】

K400E/R403E	K230E/R233E	134
R403A	R233A	135
R403E	R233E	136
R403D	R233D	417
K400A	K230A	137
K400E	K230E	138
K293E	K126E	139
K293A	K126A	140
R333A	R165A	141
R333E	R165E	142
R333S	R165S	186
R338A	R170A	143
R338E	R170E	144
R338L	R170L	187
R338A/R403A	R170A/R233A	145
R338E/R403E	R170E/R233E	146
K293A/R403A	K126A/R233A	147
K293E/R403E	K126E/R233E	148
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	149
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	150
R318A/R403A	R150A/R233A	151
R318E/R403E	R150E/R233E	152
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	156
R318Y/R338E	R150Y/R170E	188
R318N/A320S	R150N/A152S	119

10

20

30

【表 6 - 3】

K316N	K148N	189
K316A	K148A	190
K316E	K148E	191
K316S	K148S	192
K316M	K148M	193
E239N	E74N	109
E239S	E74S	194
E239A	E74A	195
E239R	E74R	196
E239K	E74K	197
H257F	H92F	198
H257Y	H92Y	199
H257E	H92E	200
H257S	H92S	201
E410N	E240N	108
N260S	N95S	116
F314N/K316S	F145N/K148S	113

10

20

【 0 2 7 9 】

A T - I I I および／またはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させるための、本明細書において記載される修飾は、本明細書において記載されるまたは当技術分野において知られている任意の他の突然変異と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。たとえば、A T - I I I および／またはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、1つまたは複数の修飾は、非天然グリコシル化部位を導入する、1つもしくは複数の天然グリコシル化部位を排除する、1つもしくは複数の天然硫酸化、リン酸化、もしくはヒドロキシル化部位を排除する、触媒活性を増加させる、内因活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、または薬物動態学的および／もしくは薬力学的特性を改善する修飾（複数可）と組み合わせることができる。結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、典型的に、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。

30

【 0 2 8 0 】

A T - I I I のみ、A T - I I I ／ヘパリン複合体、および／またはヘパリンのみに対する抵抗性の増加を有する修飾 F I X ポリペプチドは、インビボまたはインビトロにおいて、未修飾または野生型 F I X ポリペプチドの親和性、阻害の程度、または阻害についての二次速度定数と比較して、少なくともまたは少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、99 %、またはそれ以上のヘパリンに対する親和性、特定の条件下での阻害の程度、または A T I I I もしくはヘパリン／A T I I I による阻害に対する二次速度定数の低下を示すことができる。したがって、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドによって示される抵抗性の少なくともまたは少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、300 %、400 %、500 %、またはそれ以上の A T - I I I のみ、A T - I I I ／ヘパリン複合体、および／またはヘパリンのみに対する抵抗性の増加を示すことができる。そのような修飾 F I X ポリペプチドによる A T - I I I 、A T - I I I ／ヘパリン複合体、および／またはヘパリンに対する抵抗性の増加はまた、A T - I I I 、A T - I I I ／ヘパリン複合体、

40

50

ヘパリン、血液、血漿、または血清の存在下において、インビボまたはインビトロにおいて、凝固活性の増加または凝固活性の持続時間の改善として明らかにすることもできる。修飾 F I X ポリペプチドの凝固活性は、インビボまたはインビトロにおいて、未修飾 F V I I ポリペプチドまたは野生型 F I X ポリペプチドの凝固活性と比較して、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 %、またはそれ以上まで増加させることができる。A T - I I I、ヘパリン / A T - I I I 複合体、および / またはヘパリンに対する抵抗性を増加させる修飾を含有する修飾 F I X ポリペプチドはまた、未修飾 F I X a と比較して、治療指数の増強を示すこともできる。

10

【0281】

c. 触媒活性を増加させるための突然変異

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X と比較して、ポリペプチドの触媒活性を増加させるために 1 つまたは複数の修飾を含有することができる。たとえば、修飾は、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドが、F V I I I a に対する親和性の増加を有するように、その補因子、F V I I I a との F I X の相互作用に関与するアミノ酸に対してなすことができ、それによって、F V I I I a が飽和濃度で存在しない条件下で F X に対する活性の増加を示す。修飾はまた、補因子 F V I I I a の存在下および / または非存在下における F X の活性化に対する修飾 F I X ポリペプチドの活性または触媒効率が未修飾ポリペプチドの活性または触媒効率と比較して増加するように、F I X ポリペプチドのプロテアーゼドメインに対してなすこともできる。

20

【0282】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチド中に含むことができる例示的な修飾は、位置 259、265、345、410、および 412（キモトリプシンナバリングによる 94、98、177、240、および 242 に対応する）でのアミノ酸置換を含む。これらの位置でのアミノ酸は、任意の他のアミノ酸残基と置換することができる。いくつかの例では、位置 259 のチロシンが、フェニルアラニンと置換される；位置 265 のリシンが、トレオニンと置換される；および / または位置 345 のチロシンが、トレオニンと置換される。さらなる例では、位置 410 のグルタミン酸が、グルタミン、セリン、アラニン、またはアスパラギン酸と置換される。一例では、位置 412 のトレオニンが、バリンまたはアラニンと置換される。

30

【0283】

上記挙げられる修飾は、単に例示的なものにすぎない。本明細書において記載される他の多くの修飾はまた、触媒活性の増加をももたらす。たとえば、A T - I I I および / もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、非天然グリコシル化部位を導入する、1 つもしくは複数の天然グリコシル化部位を排除する、1 つもしくは複数の天然硫酸化、リン酸化、もしくはヒドロキシル化部位を排除する、内因活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、L R P への結合を減少させる、ならびに / または薬物動態学のおよび / もしくは薬力学的特性を改善するために F I X ポリペプチドの中に導入される修飾はまた、活性の増加を示す修飾 F I X ポリペプチドをももたらすこともできる。

40

【0284】

表 7 は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドのアミノ酸位置に対応する、同定される残基での例示的なアミノ酸置換の非限定的な例を提供する。そのような突然変異に関して、第 1 のアミノ酸（1 文字略語）は、置換されるアミノ酸に対応し、番号は、配列番号 3 に関する成熟 F I X ポリペプチド配列における位置に対応し、第 2 のアミノ酸（1 文字略語）は、その位置の第 1 のアミノ酸と置換する、選択されるアミノ酸に対応する。突然変異のためのアミノ酸位置はまたキモトリプシンナバリングスキームによっても参照される。下記の表 7 において、修飾 F I X ポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。

50

【 0 2 8 5 】

表7.

【表 7】

突然変異 (成熟FIX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
T412A	T242A	202
T412V	T242V	203
E410Q	E240Q	174
E410S	E240S	175
E410A	E240A	176
E410D	E240D	206
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	216

10

【 0 2 8 6 】

触媒活性を増加させるために本明細書において記載される修飾は、本明細書において記載されるまたは当技術分野において知られている任意の他の突然変異と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。たとえば、触媒活性を増加させる 1 つまたは複数の修飾は、A T - I I I および／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、非天然グリコシル化部位を導入する、1 つもしくは複数の天然グリコシル化部位を排除する、1 つもしくは複数の天然硫酸化、リン酸化、もしくはヒドロキシ化部位を排除する、内因活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、または薬物動態学のおよび／もしくは薬力学的特性を改善する修飾（複数可）と組み合わせることができる。結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドは、典型的に、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。

20

【 0 2 8 7 】

触媒活性の増加を有する修飾 F I X ポリペプチドは、インビボまたはインビトロにおいて、未修飾または野生型 F I X 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 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、またはそれ以上の活性を示すことができる。そのような修飾 F I X ポリペプチドの触媒活性の増加はまた、凝固活性、凝固活性の持続時間の増加、および／または治療指数の増強として明らかにすることができる。修飾 F I X ポリペプチドの凝固活性は、インビボまたはインビトロにおいて、未修飾 F V I I ポリペプチドまたは野生型 F I X ポリペプチドの凝固活性と比較して、少なくともまたは少なくとも約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 %、またはそれ以上まで増加させることができる。

30

40

【 0 2 8 8 】

d. L R P 結合を減少させるための突然変異

F I X a は、肝臓、脳、胎盤、および肺を含む様々な組織上に発現される膜糖タンパク質である低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（L R P）への結合によって体循環から取り除かれ得る。したがって、L R P への結合の減少を示す修飾 F I X ポリペプチドが、本明細書において提供される。これは、たとえば、i）クリアランスの減少、i i）分布容積の改変、i i i）インビボにおける回収率の増強、i v）インビボにおける総タンパク質暴露の増強（つまり A U C）、v）血清半減期（ α 、 β 、および／もしくは γ 相）の増加、ならびに／または v i）平均共鳴時間（M R T）の増加を含む、修飾 F I X ポリペプチドの改善された薬物動態学的特性をもたらすことができる。そのような修飾 F I

50

Xポリペプチドは、血液凝固活性の増加を示すことができる。

【0289】

本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、L R P結合部位において1つまたは複数の修飾を含有することができる。この結合部位は、配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドの残基342～346にわたるプロテアーゼドメインにおけるループに位置することが想定される。アミノ酸置換、挿入、または欠失によってなどのような位置342～346（キモトリプシンナンバリングによる位置174～178に対応する）での1つまたは複数の修飾は、修飾F I XポリペプチドおよびL R Pの間の相互作用に干渉し、結合親和性の減少をもたらすことができる。L R Pへの修飾F I Xポリペプチドの結合は、当業者に知られているアッセイを使用して試験することができる [たとえばRohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:9394-9401を参照されたい]。結果として生じる改善された薬物動態学的特性はまた、下記に記載されるものを含む、よく知られているインビボアッセイを使用して試験することもできる。

10

【0290】

本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチド中に含むことができる例示的な修飾は、位置343、344、345、および346（キモトリプシンナンバリングによる175、176、177、および178に対応する）でのアミノ酸置換を含む。これらの位置でのアミノ酸は、任意の他のアミノ酸残基と置換することができる。いくつかの例では、位置343のトレオニンが、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、もしくはアルギニンと置換される；位置344のフェニルアラニンが、イソロイシンと置換される；位置345のチロシンが、トレオニン、アラニン、もしくはアラニンと置換される；および／または位置346のアスパラギンが、アスパラギン酸もしくはチロシンと置換される。任意の1つまたは複数のこれらの例示的なアミノ酸置換は、互いにまたは本明細書において記載される他の修飾と組み合わせることができる。

20

【0291】

アルギニンである、残基T343もしくは343に対応するF I Xポリペプチドにおける残基でのアミノ酸置換、たとえばT343Rまたはその保存的アミノ酸置換を含有する修飾F I Xポリペプチドが、本明細書において提供される。たとえば、アルギニンについての保存的アミノ酸残基は、リシン（K）を含むが、これらに限定されない。

【0292】

表8は、配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドのアミノ酸位置に対応する、同定される残基での例示的なアミノ酸置換の非限定的な例を提供する。そのような突然変異に関して、第1のアミノ酸（1文字略語）は、置換されるアミノ酸に対応し、番号は、配列番号3に関する成熟F I Xポリペプチド配列における位置に対応し、第2のアミノ酸（1文字略語）は、その位置の第1のアミノ酸と置換する、選択されるアミノ酸に対応する。突然変異のためのアミノ酸位置はまたキモトリプシンナンバリングスキームによっても参照される。下記の表8において、修飾F I Xポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。

30

【0293】

表8.

40

【表 8】

突然変異 (成熟FIX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
N346D	N178D	207
N346Y	N178Y	208
T343R	T175R	209
T343E	T175E	210
T343D	T175D	416
T343Q	T175Q	211
F342I	F174I	212
Y345A	Y177A	213
Y345T	Y177T	214
T343R/Y345T	T175R/Y177T	215
T343R/N346D	T175R/N178D	409
T343R/N346Y	T175R/N178Y	410

10

【0294】

L R Pへの結合を減少させるために本明細書において記載される修飾は、本明細書において記載されるまたは当技術分野において知られている任意の他の突然変異と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。たとえば、L R Pへの結合を減少させる1つまたは複数の修飾は、A T—I I Iおよび／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、触媒活性を増加させる、非天然グリコシル化部位を導入する、1つもしくは複数の天然グリコシル化部位を排除する、1つもしくは複数の天然硫酸化、リン酸化、もしくはヒドロキシル化部位を排除する、F V I I I aの存在下および／もしくは非存在下において活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、または薬物動態学および／もしくは薬力学的特性を改善する修飾（複数可）と組み合わせることができる。結果として生じる修飾F I Xポリペプチドは、典型的に、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。

20

30

【0295】

L R Pへの結合が減少した修飾F I Xポリペプチドは、インビトロにおいて、L R Pへの未修飾または野生型F I Xポリペプチドの結合と比較して、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%、95%、99%、またはそれ以上の減少を示すことができる。そのような修飾F I XポリペプチドによるL R Pへの結合の減少は、i) クリアランスの減少、i i) 分布容積の改変、i i i) インビボにおける回収率の増強、i v) インビボにおける総タンパク質暴露の増強（つまりA U C）、v) 血清半減期（ $\alpha \gamma$ 、 β 、および／もしくは γ 相）の増加、ならびに／またはv i) 平均共鳴時間（M R T）の増加などのような、改善された薬物動態学的特性をもたらすことができる。さらに、そのような改変は、血液凝固活性、凝固活性の持続時間の増加、および／または治療指数の増強をもたらすことができる。修飾F I Xポリペプチドの凝固活性は、インビボまたはインビトロにおいて、未修飾F V I I ポリペプチドまたは野生型F I Xポリペプチドの凝固活性と比較して、少なくともまたは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加させることができる。

40

【0296】

e. 翻訳後修飾を改変するための他の突然変異

野生型F I Xは、哺乳動物細胞における発現に際して翻訳後に修飾される。第I X因子

50

前駆体ポリペプチドは、血液の中に分泌される成熟チモーゲンになるように広範囲な翻訳後修飾を受ける。そのような翻訳後修飾は、 γ -カルボキシ化、 β -ヒドロキシ化、 O -および N 結合型グリコシル化、硫酸化、ならびにリン酸化を含む。上記に議論されるように、グリコシル化のレベルは、たとえば、新しい非天然グリコシル化部位を導入するおよび／または天然グリコシル化部位を排除することによって改変することができる。同様に、他の翻訳後修飾は、 γ -カルボキシ化、 β -ヒドロキシ化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を導入するおよび／または排除することなどによって改変することができる。

【0297】

任意の1つまたは複数の天然の γ -カルボキシ化、 β -ヒドロキシ化、硫酸化、またはリン酸化部位は、アミノ酸置換または欠失などによって排除することができる。たとえば、未修飾F I Xポリペプチドは、G l aドメイン中の任意の1つまたは複数の12のグルタミン酸残基（配列番号3において記載される成熟F I Xの位置7、8、15、17、20、21、26、27、30、33、36、および40に対応する）のアミノ酸置換によって修飾することができる。これらの残基は、典型的に、野生型F I Xにおいて、 γ -カルボキシグルタミル（またはG l a）に γ -カルボキシ化される。したがって、アミノ酸交換または欠失によってなどのようなグルタミン酸残基の除去は、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、修飾F I Xポリペプチドにおける γ -カルボキシ化のレベルを低下させることができる。同様に、野生型F I Xにおいて通常 β -ヒドロキシ化されている位置64のアスパラギン酸残基は、アミノ酸交換または欠失などによって除去することができる。排除することができるさらなる翻訳後修飾部位は、たとえば、野生型F I Xにおいて典型的に硫酸化されている位置155のチロシンおよび野生型F I Xにおいて典型的にリン酸化されている位置158のセリン残基を含む。

【0298】

他の例では、非天然翻訳後修飾部位が、アミノ酸置換または挿入などによって導入することができる。たとえば、さらなるグルタミン酸残基は、G l aドメインの中に導入することができる。そのようなグルタミン酸残基は、たとえば哺乳動物細胞における発現に際して、修飾F I Xポリペプチドにおいて γ -カルボキシグルタミル（またはG l a）に γ -カルボキシ化され得る。同様に、1つまたは複数の非天然 β -ヒドロキシ化、硫酸化、またはリン酸化部位は、導入することができる。

【0299】

1つまたは複数の天然翻訳後修飾部位が排除された、修飾F I Xポリペプチドが、本明細書において提供される。 γ -カルボキシ化、 β -ヒドロキシ化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を含む、1つまたは複数の翻訳後修飾部位を排除するために修飾された修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する。いくつかの例では、修飾F I Xポリペプチドが、未修飾F I Xポリペプチドの少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上の触媒活性を保持する。他の例では、修飾F I Xポリペプチドが、未修飾F I Xポリペプチドの少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上のF V I I I aに対する結合活性を保持する。いくつかのアッセイにおいておよび／またはいくつかの条件下において、修飾F I Xポリペプチドは、未修飾F I Xタンパク質と比較して、活性の増加を示すことができる（たとえば、インビボにおける薬力学的活性および／またはA T-I I I／ヘパリンもしくは血漿の存在下における活性の増加）。

【0300】

フェニルアラニンである、残基Y 155もしくは155に対応するF I Xポリペプチドにおける残基でのアミノ酸置換、たとえばY 155 Fまたはその保存的アミノ酸置換を含む修飾F I Xポリペプチドが、本明細書において提供される。たとえば、フェニルアラニンについての保存的アミノ酸残基は、メチオニン（M）、ロイシン（L）、またはチ

ロシン（Y）を含むが、これらに限定されない。

【0301】

表9は、それぞれ位置64、155、および158の天然β-ヒドロキシル化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を排除するために、修飾FIXポリペプチド中に含まれる、配列番号3において記載される成熟FIXポリペプチドのアミノ酸位置に対応する、例示的なアミノ酸置換の非限定的な例を提供する。下記の表9において、修飾FIXポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。

【0302】

表9.

【表9】

突然変異 (成熟FIX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
D64N	D[64]N	83
D64A	D[64]A	84
Y155F	Y[155]F	76
Y155H	Y[155]H	93
Y155Q	Y[155]Q	94
T155L	Y[155]L	415
S158A	S[158]A	95
S158D	S[158]D	96
S158E	S[158]E	97

【0303】

β-ヒドロキシル化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を排除するために本明細書において記載される修飾は、本明細書において記載されるまたは当技術分野において知られている任意の他の突然変異と組み合わせることができる。典型的に、結果として生じる修飾FIXポリペプチドは、未修飾FIXポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加を示す。たとえば、1つまたは複数の天然β-ヒドロキシル化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を排除する1つまたは複数の修飾は、AT-IIIおよび／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性を増加させる、グリコシル化の増加などのようなグリコシル化を改変する、触媒活性を増加させる、内因活性を増加させる、リン脂質への結合を増加させる、または薬物動態学および／もしくは薬力学的特性を改善する修飾（複数可）と組み合わせることができる。

【0304】

1つまたは複数の天然β-ヒドロキシル化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を排除する、本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドは、たとえばその基質FXに対する触媒活性または補因子FVIIaへの結合などのような、FIXの少なくとも1つの活性を保持する。典型的に、本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドは、未修飾FIXポリペプチドによって示される触媒活性の少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上を保持する。いくつかの場合では、修飾FIXポリペプチドの血液凝固活性は、インビボまたはインビトロにおいて、未修飾FVIIポリペプチドまたは野生型FIXポリペプチドの凝固活性と比較して、少なくともまたは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加する。

【0305】

2. 組合せの修飾

野生型FIXポリペプチドと比較して、1つもしくは複数の非天然グリコシル化部位を

含有する、1つもしくは複数の天然グリコシル化部位が排除されている、1つもしくは複数の天然 β -ヒドロキシ化、硫酸化、および／もしくはリン酸化部位が排除されている、またはA T-I I I、A T-I I I／ヘパリン、および／もしくはヘパリンなどのような阻害因子に対する抵抗性の増加をもたらすことができる修飾を有する、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドもまた、他の修飾を含有することができる。いくつかの例では、修飾F I Xポリペプチドが、1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を導入する修飾を含有し、また、F I XならびにA T-I I I、A T-I I I／ヘパリン複合体、および／またはヘパリンなどのような阻害因子の間の相互作用に干渉する修飾をも含有する。他の例では、1つまたは複数の天然 β -ヒドロキシ化、硫酸化、および／またはリン酸化部位を排除する修飾が、阻害因子に対する抵抗性を増加させる修飾および／または1つもしくは複数のグリコシル化部位を導入する修飾と組み合わせることができる。したがって、上記表3～9において記載される1つまたは複数の突然変異は、上記表3～9において記載される他の突然変異のいずれかと組み合わせることができる。したがって、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、N-グリコシル化などのようなグリコシル化の増加；A T-I I I、A T-I I I／ヘパリン、および／もしくはヘパリンに対する抵抗性の増加； β -ヒドロキシ化、硫酸化、および／もしくはリン酸化の減少；ならびに／または触媒活性の増加を示すものが、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドの中に含まれる。

10

【0306】

さらに、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドのいずれも、任意の1つまたは複数のさらなる修飾を含有することができる。いくつかの例では、さらなる修飾が、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、改変された特性および／または活性をもたらす。典型的に、そのようなさらなる修飾は、それら自体、修飾ポリペプチドの血液凝固活性の増加および／またはポリペプチドの安定性の増加をもたらすものである。したがって、結果として生じる修飾F I Xポリペプチドは、典型的に、血液凝固活性の増加を示す。

20

【0307】

さらなる修飾は、たとえば、当技術分野において知られている任意のアミノ酸交換、アミノ酸欠失、またはアミノ酸挿入、典型的に、F I Xポリペプチドの血液凝固活性および／または安定性を増加させる任意のものを含むことができる。本明細書において提供される任意の修飾F I X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、またはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾を含有することができる。典型的に、結果として生じる修飾F I Xポリペプチドは、たとえば触媒活性または補因子F V I I I aへの結合などのような、野生型または未修飾ポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する。

30

【0308】

一次配列におけるさらなる修飾は、翻訳後修飾を達成するためにF I Xポリペプチドになすことができる。たとえば、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、米国特許出願公開20080280818号において記載される非天然O結合型もしくはS結合型グリコシル化部位または国際特許出願公開WO20091300198およびWO2009137254において記載される非天然グリコシル化部位を含む、当技術分野において記載されるもののいずれかなどのような、上記に記載されるものを含むおよびそれ以外の非天然グリコシル化部位を含有することができる。

40

【0309】

他の例では、さらなる修飾が、他の因子、分子、およびタンパク質とのその相互作用が改変されるように、F I Xポリペプチド配列に対してなすことができる。たとえば、第X因子との相互作用に関与するアミノ酸残基は、F Xへの修飾F I Xポリペプチドの親和性および／または結合が増加するように修飾することができる。他の修飾は、F V I I I a、ヘパリン、アンチトロンビンI I I、およびリン脂質との相互作用に関与するアミノ酸の修飾を含むが、これらに限定されない。

【0310】

50

ポリペプチドのコンホメーションまたは折り畳みを改変するさらなる修飾もまた、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドに対してなすことができる。これらは、たとえば、新しいジスルフィド結合が形成されるような、システインとの 1 つもしくは複数のアミノ酸の置換または α -ヘリックスコンホメーションを安定化する修飾を含み、それによって、修飾 F I X ポリペプチドに対して活性の増加を与える。

【0311】

修飾はまた、修飾 F I X ポリペプチドの安定性を増加させるように作用するものなどのような部分に引き続いて連結することができるアミノ酸残基を導入するためになすことができる。たとえば、システイン残基は、ポリマー、そのようなポリエチレングリコール (P E G) へのコンジュゲーションを促進するために導入することができる (国際特許出願公開 W O 2 0 0 9 1 4 0 0 1 5)。F I X ポリペプチドの安定性はまた、潜在的なタンパク質分解部位を除去するなど、潜在的なタンパク質分解部位を修飾することによって改変し、それによって、プロテアーゼに対する修飾 F I X ポリペプチドの抵抗性を増加させることができる (たとえば米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 0 2 1 1 5 号を参照されたい)。

10

【0312】

さらに、アミノ酸交換、アミノ酸欠失、またはアミノ酸挿入は、修飾 F I X ポリペプチドが、リン脂質膜に対する結合性および／または親和性の増加を示すように、内因性 G l a ドメインにおいてなすことができる。そのような修飾は、単一のアミノ酸交換、アミノ酸欠失、および／もしくはアミノ酸挿入を含むことができるまたは複数のアミノ酸のアミノ酸交換、アミノ酸欠失、もしくはアミノ酸挿入を含むことができる。たとえば、内因性 G l a ドメインの全てまたは一部分は、異種 G l a ドメインの全てまたは一部分と置換することができる。他の例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、内因性 G l a ドメインにおける欠失または通常 γ -カルボキシル化される位置における交換を示すことができる。その代わりに、アミノ酸交換は、さらなる潜在的なガンマカルボキシル化部位を導入するようになすことができる。

20

【0313】

以下の部は、F I X ポリペプチドの安定性および／または血液凝固活性の増加を達成するための、当技術分野において記載される例示的な修飾の非限定的な例を記載する。上記に議論されるように、そのような修飾はまた、本明細書において提供される任意の修飾 F I X ポリペプチドにおいてさらに含むことができる。下記に言及されるアミノ酸位置は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに対応する。対応する突然変異は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドの対立遺伝子変異体、種変異体、またはスプライス変異体などのような他の F I X ポリペプチドにおいてなすことができる。

30

【0314】

a. 活性を増加させるための修飾

一例では、第 X 因子に対する触媒活性の増加をもたらすさらなる修飾が、本明細書において提供される修飾第 I X 因子ポリペプチドに対してなすことができる。たとえば、修飾は、結果として生じる修飾 F I X ポリペプチドが、F V I I I a が飽和していない条件下で、F V I I I a に対する親和性を増加させ、それによって F X に対する増加した活性を示すように、その補因子、F V I I I a との相互作用に関与するアミノ酸に対してなすことができる。基質 F X の活性化について、未修飾 F I X a ポリペプチドまたは F I X a / F V I I I a 複合体の活性と比較して、F I X a ポリペプチドおよび／または F I X a / F V I I I a 複合体の触媒効率を増加させる修飾もまた、F I X においてなすことができる。

40

【0315】

修飾 F I X ポリペプチドの内因活性を増加させるための、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドにおいて含むことができるさらなる修飾の例は、Hopfner et al., (1997) EMBO J. 16:6626-6635;Kolkman et al., (2000) Biochem. 39:7398-7405;Sichl

50

er et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:4121-4126; Begbie et al., (2005) Thromb. Haemost. 94(6):1138-47; 米国特許第 6 5 3 1 2 9 8 号、ならびに米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 6 7 2 1 9 号および第 2 0 0 8 0 2 1 4 4 6 1 号において記載されるものを含むが、これらに限定されない。修飾 F I X ポリペプチドの内因活性の増加をもたらすことができる、当技術分野において記載される例示的なアミノ酸修飾の非限定的な例は、1 つまたは複数の V86A、V86N、V86D、V86E、V86Q、V86G、V86H、V86I、V86L、V86M、V86F、V86S、V86T、V86W、V86Y、Y259F、A261K、K265T、E277V、E277A、E277N、E277D、E277Q、E277G、E277H、E277I、E277L、E277M、E277F、E277S、E277T、E277W、E277Y、R338A、R338V、R338I、R338F、R338W、R338S、R338T、Y345F、I383V、E388G を含む。たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、アミノ酸交換 Y259F/K265T、Y259F/K265T /Y345F、Y259F/A261K/K265T/Y345F、Y259F/K265T/Y345F/I383V/E388G または Y259F/A261K/K265T/Y345F/I383V/E388G を含有することができる。他の例では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドが、活性化ペプチドを除去する修飾 (Δ 1 5 5 ~ 1 7 7) を含有することができ [たとえば Begbie et al., (2005) Thromb. Haemost. 94(6):1138-47 を参照されたい]、これは、インビボにおいて活性を増加させることができるのみならず、クリアランスを減少させることもできる。

10

【0316】

b. リン脂質に対する親和性を増加させるまたはコラーゲンへの結合を低下させる修飾

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、リン脂質に対する親和性を増加させるための 1 つまたは複数のさらなる修飾を含有することができる。F I X の血液凝固活性は、活性化血小板の表面上に発現されるものなどのようなリン脂質に対するポリペプチドの結合性および/または親和性を増加させることによって増強することができる。これは、たとえば、内因性 F I X G l a ドメインを修飾することによって、達成することができる。修飾は、ホスファチジルセリンおよび他の負電荷リン脂質に結合するための能力が増加した修飾 F I X ポリペプチドをもたらす、F I X ポリペプチドの G l a ドメインにおける 1 つまたは複数の位置のアミノ酸交換によって達成することができる。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドに対してなすことができる、リン脂質結合および/または親和性を増加させるためのさらなる修飾の例は、米国特許第 6, 0 1 7, 8 8 2 号において記載されるものを含むが、これらに限定されない。たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、アミノ酸位置 1 1、1 2、2 9、3 3、および/または 3 4 (配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドに対応する) に 1 つまたは複数の修飾を含有することができる。例示的なそのような修飾は、アミノ酸交換 K 5 I、K 5 L、K 5 F、K 5 E、Q 1 1 E、Q 1 1 D、R 1 6 E、R 2 9 F、ならびに/または N 3 4 E、N 3 4 D、N 3 4 F、N 3 4 I、N 3 4 L、T 3 5 D、および T 3 5 E である。

20

30

【0317】

他の態様では、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、コラーゲンに対する親和性を低下させるための 1 つまたは複数のさらなる修飾を含有することもできる。F I X の血液凝固活性は、内皮細胞上の細胞外マトリックスの表面上に存在するコラーゲン I V に対するポリペプチドの結合および/または親和性を低下させることによって増強させることができる。コラーゲン I V への結合の低下は、修飾 F I X ポリペプチドの循環の増加、したがって、インビボにおける血液凝固活性の増加をもたらすことができる。これは、たとえば、コラーゲン I V との相互作用を担う、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドのアミノ酸残基 3 ~ 1 1 の F I X G l a ドメインを修飾することによって達成することができる [Cheung et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:20529-20531; Cheung et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:11068-11073]。修飾は、コラーゲン I V に結合する能力が減少した修飾 F I X ポリペプチドをもたらす、F I X ポリペプチドの G l a ドメインにおける 1 つまたは複数の位置でのアミノ酸交換によって達成することができる。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドに対してなすことができる、リン脂質結合および/または親和性を増加させるためのさらなる

40

50

修飾の例は、Schuettrumpf et al., (2005) Blood 105(6):2316-23; Melton et al., (2001) Blood Coagul. Fibrinolysis 12(4):237-43; および Cheung et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:11068-11073 において記載されるものを含むが、これらに限定されない。たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、アミノ酸交換 K 5 A および／または V 1 0 K を含有することができる。

【0318】

c. 阻害因子に対する抵抗性を増加させるためのさらなる修飾

たとえば、アンチトロンビン I I I (A T - I I I) / ヘパリンによる阻害などのような、阻害因子に対する修飾 F I X ポリペプチドの抵抗性を増加させることによって、F I X ポリペプチドの活性を増加させる、さらなる修飾を含むことができる。典型的に、これは、A T - I I I、ヘパリン、または A T - I I I / ヘパリン複合体との相互作用に關与する、1 つまたは複数の残基の修飾によって達成することができる。例示的なそのような修飾は、たとえば米国特許第 7, 1 2 5, 8 4 1 号; 米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 1 1 0 6 7 5 号; 国際特許出願公開 W O 2 0 0 2 0 4 0 5 4 4; Chang, J. et al., (1998) J. Biol. Chem. 273(20):12089-94; Yang, L. et al., (2002) J. Biol. Chem. 277(52):50756-60; Yang, L. et al., (2003) J. Biol. Chem. 278(27):25032-8; Rohlena et al., (2003) J. Biol. Chem. 278(11):9394-401; Sheehan et al., (2006) Blood 107(10):3876-82; Buyue et al. (2008) Blood 112:3234-3241 において記載されるものを含む。A T - I I I および／またはヘパリンによる阻害を減少させるために含むことができる修飾の非限定的な例は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドのアミノ酸位置 R 2 5 2、H 2 5 6、H 2 5 7、K 2 6 5、H 2 6 8、K 2 9 3、R 3 1 8、R 3 3 3、R 3 3 8、K 4 0 0、R 4 0 3、K 4 0 9、または K 4 1 1 に対応するアミノ酸位置での修飾を含むが、これらに限定されない。たとえば、本明細書において提供される F I X ポリペプチドは、アミノ酸交換 R 2 5 2 A、H 2 5 7 A、H 2 6 8 A、K 2 9 3 A、R 3 1 8 A、R 3 3 3 A、R 3 3 8 A、K 4 0 0 A、R 4 0 3 A、R 4 0 3 E、および／または K 4 1 1 A を含有することができる。

【0319】

d. グリコシル化を改変するためのさらなる修飾

修飾は、上記に記載されるものに加えて、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、修飾 F I X ポリペプチドのグリコシル化を改変するために、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドの中に組み込むことができる。たとえば、修飾 F I X ポリペプチドは、修飾 F I X ポリペプチドの中に 1 つまたは複数の非天然グリコシル化部位を導入する、1 つまたは複数の修飾を含有することができる。したがって、適切な系において発現される場合、修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、改変されたグリコシル化パターンを示すことができる。いくつかの例では、修飾 F I X ポリペプチドが、N-グリコシル化の増加または O-グリコシル化の増加などのような、未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、グリコシル化の増加を示す。

【0320】

F I X ポリペプチドのグリコシル化プロファイルを改変するために、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチド中に含むことができるさらなる修飾の例は、国際特許出願公開 W O 2 0 0 9 1 3 0 1 9 8、W O 2 0 0 9 0 5 1 7 1 7、および W O 2 0 0 9 1 3 7 2 5 4 において記載されるものを含むが、これらに限定されない。グリコシル化を増加させるために、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチド中に含むことができる例示的な修飾は、Y1N、Y1N+S3T、S3N+K5S/T、G4T、G4N+L6S/T、K5N+E7T、L6N+E8T、E7N+F9T、F9N+Q11S/T、V10N+G12S/T、Q11N+N13T、G12N+L14S/T、L14N+R16T、E15T、E15N+E17T、R16N+C18S/T、M19N+E21T、E20N+K22T、K22N、S24N+E26T、F25N+E27T、E26N+A28T、E27N+R29T、A28N+E30T、R29N+V31S/T、E30N+F32T、V31N+E33T、F32N+N34T、E33N、T35N+R37S/T、E36T、E36N、R37N、T39N+F41S/T、E40N+W42T、F41N+K43S/T、W42N+Q44S/T、K43N+Y45T、Q44N+V46S/T、Y45N+D47T、V46N+G48S/T、D47N+D49S/T、G48N+Q50S/T、D49N+C51S/T、Q50N+E52S/T、E52N+N54T、S53N+P55S/T、C56S/T、L57N+G59S/T、G59N+S61T、G60S/T、S61N+K63S/T、K6

3N+D65S/T、D65N+N67S/T、I66N+S68S/T、Y69S/T、Y69N+C71S/T、S68N+E70S/T、E70N+W72S/T、W72N+P74S/T、P74N+G76S/T、F75N、G76N+E78T、E78N+K80T、F77T、F77N+G79S/T、G79N+N81S/T、K80N+C82S/T、E83S/T、E83N+D85S/T、L84N+V86S/T、D85N、V86A、V86N+C88S/T、T87N+N89S/T、I90N+N92S/T、K91S/T、I90N+N92S/T、K91N+G93S/T、R94S/T、R94N+E96S/T、K100N、A103S/T、S102N+D104S/T、A103N+N105S/T、D104N+K106S/T、V107S/T、K106N+V108S/T、V108N+V110S/T、S111N、E113N+Y115S/T、G114N+R116S/T、R116N+A118S/T、E119N+Q121S/T、K122S/T、Q121N+S123S/T、K122N+C124S/T、S123N+E125S/T、E125N+A125S/T、P126N+V128S/T、A127N+P129T、V128N+F130S/T、P129N+P131S/T、F130N+C132S/T、R134N、V135N+V137S/T、S136N、S138N、V137N+Q139T;Q139N、T140N+L142S/T、S141N+L143S/T、K142N、A146N+A148S/T、E147N+V149S/T、T148N+F150S/T、V149N+P151S/T、F150N+D152S/T、P151N+V153S/T、D152N+D154S/T、V153N+Y155S/T、D154N+V156S/T、Y155N+N157S/T、V156N、S158N+E160S/T、T159N+A161S/T、E160N+E162S/T、A161N、E162N+I164S/T、T163N+L165S/T、I164N+D166S/T、L165N+N167S/T、D166N+I168S/T、I168N+Q170S/T、T169N、Q170N、S171N+Q173S/T、T172N、Q173N+F175S/T、S174N+N176S/T、F175N+D177S/T、F178S/T、D177N、D177E、F178N+R180S/T、T179N+V181S/T、R180N+V182S/T、G183+E185S/T、G184N+D186T、E185N+A187S/T、D186N+K188S/T、A187N+P189T、K188N+G190S/T、P189N+Q181S/T、G200N+V202T、K201N+D203S/T、K201T、V202N+A204S/T、D203N+F205S/T、E213N+W215S/T、K214T、V223T、E224N+G226S/T、T225N+V227S/T、G226N+K228S/T、V227N+I229T、K228N、H236N+I238T;I238N+E240T;E239N、E240N+E242S/T、E242N、T241N+H243S/T、H243N+E245S/T、K247N+N249S/T、V250N+R252T、I251S/T、I251N+I253S/T、R252N+I254S/T、I253N+P255S/T、P255N+H257S/T、H257N+Y259S/T、N260S/T、A262S/T、A261N+I263S/T、A262N+N264S/T、I263N+K265S/T、K265N+N267S/T、A266N+H268S/T、D276N+P278S/T、P278N+V280S/T、E277N+L279S/T、V280N+N282S/T、Y284S/T、S283N+V285S/T、Y284N、D292N+K294S/T、K293N+Y295S/T、E294N、F299S/T、I298N+L300S/T、K301N+G303S/T、F302N、G303N+G305S/T、S304N+Y306S/T、Y306N+S308S/T、R312N+F314S/T、V313N+H315T、F314N+K316S/T、H315N+G317S/T、K316N+R138S/T、G317N、R318N+A320S/T、S319N+L321S/T、A320N+V322T、L321N+L323S/T、V322N+Q324S/T、Y325N+R327S/T、R327N+P329S/T、P329N+V331S/T、L330N+D332S/T、D332N+A334S/T、R333N、A334N+C336S/T、T335N+L337S/T、L337N、R338N、S339N+K341T、T340N+F342T;K341N、F342N+I344S/T、T343N+Y345S/T、Y345N+N347S/T、M348S/T、G352N+H354T、F353N、F353N+E355T、H354N+G356S/T、H354V、H354I、E355T、E355N+G357S/T、G356N+R358T、G357N+D359S/T、R358N、Q362N+D364S/T、V370N;T371V;T371I;E372T、E372N+E374S/T、E374N、G375N、W385N+E387T;G386N+E388T、E388N+A390S/T、A390N+K392T、M391N+G393S/T、K392N+K394S/T、K392V、G393T、G393N+Y395S/T、K394N+G396S/T、R403N+V405S/T、I408S/T、K409N+K411S/T、E410N、K411N+K413S/T、およびK413Nを含むが、これらに限定されない。

【0321】

e. プロテアーゼに対する抵抗性を増加させるための修飾

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、プロテアーゼに対するポリペプチドの抵抗性の増加をもたらす、さらなる修飾を含有することができる。たとえば、1つまたは複数の潜在的なタンパク質分解性切断部位を除去するアミノ酸交換は、なすことができる。修飾 F I X ポリペプチドは、したがって、プロテアーゼに対してより抵抗性になり、それによって、修飾ポリペプチドの安定性および半減期を増加させることができる。

【0322】

プロテアーゼに対する抵抗性を増加させるために、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドにおいて含むことができるさらなる修飾の例は、米国特許出願公開第 20080102115 号および国際特許出願公開 WO 2007149406 において記載されるものを含むが、これらに限定されない。プロテアーゼ抵抗性を増加させるために、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチド中に含むことができる例示的な修飾は、Y1H、Y1I、S3Q、S3H、S3N、G4Q、G4H、G4N、K5N、K5Q、L6I、L6V、E7Q、E7H、E7N、E

8Q、E8H、E8N、F9I、F9V、V10Q、V10H、V10N、G12Q、G12H、G12N、L14I、L14V、E15Q、E1
 5H、E15N、R16H、R16Q、E17Q、E17H、E17N、M19I、M19V、E20Q、E20H、E20N、E21Q、E21H
 、E21N、K22N、K22Q、S24Q、S24H、S24N、F25I、F25V、E26Q、E26H、E26N、E27Q、E27H、
 E27N、A28Q、A28H、A28N、R29H、R29Q、E30Q、E30H、E30N、V31Q、V31H、V31N、F32I、F3
 2V、E33Q、E33H、E33N、T35Q、T35H、T35N、E36Q、E36H、E36N、R37H、R37Q、T38Q、T38H
 、T38N、T39Q、T39H、T39N、E40Q、E40H、E40N、F41I、F41V、W42S、W42H、K43N、K43Q、
 Y45H、Y45I、V46Q、V46H、V46N、D47N、D47Q、G48Q、G48H、G48N、D49N、D49Q、E52Q、E5
 2H、E52N、S53Q、S53H、S53N、P55A、P55S、L57I、L57V、N58Q、N58S、G59Q、G59H、G59N
 、G60Q、G60H、G60N、S61Q、S61H、S61N、K63N、K63Q、D64N、D64Q、D65N、D65Q、I66Q、
 I66H、I66N、S68Q、S68H、S68N、Y69H、Y69I、E70Q、E70H、E70N、W72S、W72H、P74A、P7
 4S、F75I、F75V、G76Q、G76H、G76N、F77I、F77V、E78Q、E78H、E78N、G79Q、G79H、G79N
 、K80N、K80Q、E83Q、E83H、E83N、L84I、L84V、D85N、D85Q、V86Q、V86H、V86N、T87Q、
 T87H、T87N、I90Q、I90H、I90N、K91N、K91Q、N92Q、N92S、G93Q、G93H、G93N、R94H、R9
 4Q、E96Q、E96H、E96N、F98I、F98V、K100N、K100Q、S102Q、S102H、S102N、A103Q、A103
 H、A103N、D104N、D104Q、K106N、K106Q、V107Q、V107H、V107N、V108Q、V108H、V108N、
 S110Q、S110H、S110N、T112Q、T112H、T112N、E113Q、E113H、E113N、G114Q、G114H、G11
 4N、Y115H、Y115I、R116H、R116Q、L117I、L117V、A118Q、A118H、A118N、E119Q、E119H
 、E119N、K122N、K122Q、S123Q、S123H、S123N、E125Q、E125H、E125N、P126A、P126S、A
 127Q、A127H、A127N、V128Q、V128H、V128N、P129A、P129S、P131A、P131S、G133Q、G133
 H、G133N、R134H、R134Q、V135Q、V135H、V135N、S136Q、S136H、S136N、V137Q、V137H、
 V137N、S138Q、S138H、S138N、T140Q、T140H、T140N、S141Q、S141H、S141N、K142N、K14
 2Q、L143I、L143V、T144Q、T144H、T144N、R145H、R145Q、A146Q、A146H、A146N、E147Q
 、E147H、E147N、T148Q、T148H、T148N、V149Q、V149H、V149N、P151A、P151S、D152N、D
 152Q、V153Q、V153H、V153N、D154N、D154Q、Y155H、Y155I、V156Q、V156H、V156N、S158
 Q、S158H、S158N、T159Q、T159H、T159N、E160Q、E160H、E160N、A161Q、A161H、A161N、
 E162Q、E162H、E162N、T163Q、T163H、T163N、I164Q、I164H、I164N、L165I、L165V、L16
 5Q、L165H、D166N、D166Q、I168Q、I168H、I168N、T169Q、T169H、T169N、S171Q、S171H
 、S171N、T172Q、T172H、T172N、S174Q、S174H、S174N、F175I、F175V、F175H、D177N、D
 177Q、F178I、F178V、F178H、T179Q、T179H、T179N、R180H、R180Q、V181Q、V181H、V181
 N、V182Q、V182H、V182N、G183Q、G183H、G183N、G184Q、G184H、G184N、E185Q、E185H、
 E185N、D186N、D186Q、A187Q、A187H、A187N、K188N、K188Q、P189A、P189S、G190Q、G19
 0H、G190N、F192I、F192V、F192IH、P193A、P193S、W194S、W194H、W194I、V196Q、V196H
 、V196N、V197Q、V197H、V197N、L198I、L198V、L198Q、L198H、N199Q、N199S、G200Q、G
 200H、G200N、K201N、K201Q、V202Q、V202H、V202N、D203N、D203Q、A204Q、A204H、A204
 N、F205I、F205V、G207Q、G207H、G207N、G208Q、G208H、G208N、S209Q、S209H、S209N、
 I210Q、I210H、I210N、V211Q、V211H、V211N、E213Q、E213H、E213N、K214N、K214Q、W21
 5S、W215H、I216Q、I216H、I216N、V217Q、V217H、V217N、T218Q、T218H、T218N、A219Q
 、A219H、A219N、A220Q、A220H、A220N、V223Q、V223H、V223N、E224Q、E224H、E224N、T
 225Q、T225H、T225N、G226Q、G226H、G226N、V227Q、V227H、V227N、K228N、K228Q、I229
 Q、I229H、I229N、T230Q、T230H、T230N、V231Q、V231H、V231N、V232Q、V232H、V232N、
 A233Q、A233H、A233N、G234Q、G234H、G234N、E235Q、E235H、E235N、I238Q、I238H、I23
 8N、E239Q、E239H、E239N、E240Q、E240H、E240N、T241Q、T241H、T241N、E242Q、E242H
 、E242N、T244Q、T244H、T244N、E245Q、E245H、E245N、K247N、K247Q、R248H、R248Q、V
 250Q、V250H、V250N、I251Q、I251H、I251N、R252H、R252Q、I253Q、I253H、I253N、I254
 Q、I254H、I254N、P255A、P255S、Y259H、Y259I、A261Q、A261H、A261N、A262Q、A262H、
 A262N、I263Q、I263H、I263N、K265N、K265Q、Y266H、Y266I、D269N、D269Q、I270Q、I27
 0H、I270N、A271Q、A271H、A271N、L272I、L272V、L273I、L273V、E274Q、E274H、E274N
 、L275I、L275V、D276N、D276Q、E277Q、E277H、E277N、P278A、P278S、L279I、L279V、V
 280Q、V280H、V280N、L281I、L281V、S283Q、S283H、S283N、Y284H、Y284I、V285Q、V285
 H、V285N、T286Q、T286H、T286N、P287A、P287S、I288Q、I288H、I288N、I290Q、I290H、

I290N、A291Q、A291H、A291N、D292N、D292Q、K293N、K293Q、E294Q、E294H、E294N、Y295H、Y295I、T296Q、T296H、T296N、I298Q、I298H、I298N、F299I、F299V、L300I、L300V、K301N、K301Q、F302I、F302V、G303Q、G303H、G303N、S304Q、S304H、S304N、G305Q、G305H、G305N、Y306H、Y306I、V307Q、V307H、V307N、S308Q、S308H、S308N、G309Q、G309H、G309N、W310S、W310H、G311Q、G311H、G311N、R312H、R312Q、V313Q、V313H、V313N、F314I、F314V、K316N、K316Q、G317Q、G317H、G317N、R318H、R318Q、S319Q、S319H、S319N、A320Q、A320H、A320N、L321I、L321V、V322Q、V322H、V322N、L323I、L323V、Y325H、Y325I、L326I、L326V、R327H、R327Q、V328Q、V328H、V328N、P329A、P329S、L330I、L330V、V331Q、V331H、V331N、D332N、D332Q、R333H、R333Q、A334Q、A334H、A334N、T335Q、T335H、T335N、L337I、L337V、R338H、R338Q、S339Q、S339H、S339N、T340Q、T340H、T340N、K341N、K341Q、F342I、F342V、T343Q、T343H、T343N、I344Q、I344H、I344N、Y345H、Y345I、M348I、M348V、F349I、F349V、A351Q、A351H、A351N、G352Q、G352H、G352N、F353I、F353V、E355Q、E355H、E355N、G356Q、G356H、G356N、G357Q、G357H、G357N、R358H、R358Q、D359N、D359Q、S360Q、S360H、S360N、G363Q、G363H、G363N、D364N、D364Q、S365Q、S365H、S365N、G366Q、G366H、G366N、G367Q、G367H、G367N、P368A、P368S、V370Q、V370H、V370N、T371Q、T371H、T371N、E372Q、E372H、E372N、V373Q、V373H、V373N、E374Q、E374H、E374N、G375Q、G375H、G375N、T376Q、T376H、T376N、S377Q、S377H、S377N、F378I、F378V、L379I、L379V、T380Q、T380H、T380N、G381Q、G381H、G381N、I382Q、I382H、I382N、I383Q、I383H、I383N、S384Q、S384H、S384N、W385S、W385H、G386Q、G386H、G386N、E387Q、E387H、E387N、E388Q、E388H、E388N、A390Q、A390H、A390N、M391I、M391V、K392N、K392Q、G393Q、G393H、G393N、K394N、K394Q、Y395H、Y395I、G396Q、G396H、G396N、I397Q、I397H、I397N、Y398H、Y398I、T399Q、T399H、T399N、K400N、K400Q、V401Q、V401H、V401N、S402Q、S402H、S402N、R403H、R403Q、Y404H、Y404I、V405Q、V405H、V405N、W407S、W407H、I408Q、I408H、I408N、K409N、K409Q、E410Q、E410H、E410N、K411N、K411Q、T412Q、T412H、T412N、K413N、K413Q、L414I、L414V、T415Q、T415H、およびT415N（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応するナンバリング）を含むが、これらに限定されない。

10

20

【0323】

f. 免疫原性を低下させるための修飾

30

本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドに対するさらなる修飾は、タンパク質由来の1つまたは複数のT細胞エピトープの活性における実質的な低下またはその排除、つまり、ポリペプチドの脱免疫化（*deimmunization*）をもたらす、少なくとも1つのアミノ酸残基の修飾を含むことができる。いずれかのMHCクラスIIリガンド内の特定の位置の1つまたは複数のアミノ酸修飾は、たとえばヒト対象などのような対象に治療薬として投与される場合に、免疫原性が低下した脱免疫化（*deimmunized*）F I Xポリペプチドをもたらすことができる。たとえば、米国特許出願公開第20040254106号において開示される任意の1つまたは複数の修飾は、免疫原性を低下させるために、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチド中に含むことができる。

【0324】

40

F I Xポリペプチドの免疫原性の低下に寄与することができる例示的なアミノ酸修飾は、配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応するナンバリングによる任意の1つまたは複数の以下の修飾：Y1A、Y1C、Y1D、Y1E、Y1G、Y1H、Y1K、Y1N、Y1P、Y1Q、Y1R、Y1S、Y1T、S3T、L6A、L6C、L6D、L6E、L6G、L6H、L6K、L6N、L6P、L6Q、L6R、L6S、L6T、L6M、F9A、F9C、F9D、F9E、F9G、F9H、F9K、F9N、F9P、F9Q、F9R、F9S、F9T、F9I、F9M、F9W、V10A、V10C、V10D、V10E、V10G、V10H、V10K、V10N、V10P、V10Q、V10R、V10S、V10T、V10F、V10I、V10M、V10W、V10Y、Q11A、Q11C、Q11G、Q11P、G12D、G12E、G12G、G12H、G12K、G12N、G12P、G12Q、G12R、G12S、G12T、N13A、N13C、N13G、N13H、N13P、N13T、L14A、L14C、L14D、L14E、L14G、L14H、L14K、L14N、L14P、L14Q、L14R、L14S、L14T、L14F、L14I、L14M、L14V、L14W、L14Y、E15D、E15H、E15P、R16A、R16C、R16G、R1

50

6P, R16T, E17A, E17C, E17G, E17P, E17T, C18D, C18E, C18G, C18H, C18K, C18N, C18P
、C18Q, C18R, C18S, C18T, M19A, M19C, M19D, M19E, M19G, M19H, M19K, M19N, M19P,
M19Q, M19R, M19S, M19T, M19F, M19I, M19M, M19V, M19W, M19Y, E20A, E20C, E20G, E2
0P, E20T, E21A, E21C, E21G, E21P, K22H, K22P, K22T, S24H, S24P, F25A, F25C, F25D
、F25E, F25G, F25H, F25K, F25N, F25P, F25Q, F25R, F25S, F25T, F25I, F25M, F25W,
F25Y, E26A, E26C, E26G, E26P, E27A, E27C, E27G, E27H, E27P, E27S, E27T, A28C, A2
8D, A28E, A28G, A28H, A28K, A28N, A28P, A28Q, A28R, A28S, A28T, R29A, R29C, R29G
、R29P, E30D, E30H, E30P, V31A, V31C, V31D, V31E, V31G, V31H, V31K, V31N, V31P,
V31Q, V31R, V31S, V31T, V31F, V31I, V31W, V31Y, F32A, F32C, F32D, F32E, F32G, F3
2H, F32K, F32N, F32P, F32Q, F32R, F32S, F32T, E33H, E33N, E33P, E33Q, E33S, E33T 10
、T35A, T35C, T35G, T35P, F41A, F41C, F41D, F41E, F41G, F41H, F41K, F41N, F41P,
F41Q, F41R, F41S, F41T, F41M, F41W, F41Y, W42A, W42C, W42D, W42E, W42G, W42H, W4
2K, W42N, W42P, W42Q, W42R, W42S, W42T, K43A, K43C, K43G, K43P, Q44P, Q44T, Q44
、Y45A, Y45C, Y45D, Y45E, Y45G, Y45H, Y45K, Y45N, Y45P, Y45Q, Y45R, Y45S, Y45T,
V46A, V46C, V46D, V46E, V46G, V46H, V46K, V46N, V46P, V46Q, V46R, V46S, V46T, V4
6F, V46I, V46M, V46W, V46Y, D47A, D47C, D47G, D47H, D47P, D47T, G48D, G48E, G48P
、G48T, D49H, D49P, D49Q, D49T, Q50A, Q50C, Q50D, Q50G, Q50H, Q50P, Q50T, C51D,
C51E, C51G, C51H, C51K, C51N, C51P, C51Q, C51R, C51S, C51T, E52P, E52T, S53A, S5
3C, S53G, S53H, S53P, S53T, N54H, N54P, N54T, L57A, L57C, L57D, L57E, L57G, L57H 20
、L57K, L57N, L57P, L57Q, L57R, L57S, L57T, L57F, L57I, L57M, L57W, L57Y, G60C,
G60D, G60H, G60P, G60T, C62D, C62H, C62P, K63T, D65H, D65T, I66A, I66C, I66D, I6
6E, I66G, I66H, I66K, I66N, I66P, I66Q, I66R, I66S, I66T, I66M, I66W, I66Y, Y69A
、Y69C, Y69D, Y69E, Y69G, Y69H, Y69K, Y69N, Y69P, Y69Q, Y69R, Y69S, Y69T, C71H,
C71P, W72A, W72C, W72D, W72E, W72G, W72H, W72K, W72N, W72P, W72Q, W72R, W72S, W7
2T, W72I, W72Y, F75A, F75C, F75D, F75E, F75G, F75H, F75K, F75N, F75P, F75Q, F75R
、F75S, F75T, F77A, F77C, F77D, F77E, F77G, F77H, F77K, F77N, F77P, F77Q, F77R,
F77S, F77T, L84A, L84C, L84D, L84E, L84G, L84H, L84K, L84N, L84P, L84Q, L84R, L8
4S, L84T, L84M, L84W, L84Y, V86A, V86C, V86D, V86E, V86G, V86H, V86K, V86N, V86P
、V86Q, V86R, V86S, V86T, I90A, I90C, I90D, I90E, I90G, I90H, I90K, I90N, I90P,
I90Q, I90R, I90S, I90T, I90M, I90W, K91A, K91C, K91G, K91P, N92A, N92C, N92G, N9 30
2P, N92T, G93D, G93E, G93H, G93K, G93N, G93P, G93Q, G93R, G93S, G93T, R94A, R94C
、R94G, R94P, C95D, C95E, C95G, C95H, C95K, C95N, C95P, C95Q, C95R, C95S, C95T,
E96P, E96T, Q97A, Q97C, Q97G, Q97P, F98A, F98C, F98D, F98E, F98G, F98H, F98K, F9
8N, F98P, F98Q, F98R, F98S, F98T, F98M, F98W, F98Y, K100A, K100C, K100G, K100P,
N101H, N101T, A103D, A103E, A103H, A103K, A103N, A103P, A103Q, A103R, A103S, A10
3T, D104T, K106H, K106P, K106T, V107A, V107C, V107D, V107E, V107G, V107H, V107K
、V107N, V107P, V107Q, V107R, V107S, V107T, V108A, V108C, V108D, V108E, V108G, V
108H, V108K, V108N, V108P, V108Q, V108R, V108S, V108T, V108F, V108M, V108W, V108
Y, S110A, S110C, S110G, S110P, C111D, C111E, C111H, C111K, C111N, C111P, C111Q, 40
C111R, C111S, C111T, T112A, T112C, T112G, T112P, E113D, E113H, E113P, G114D, G11
4E, G114H, G114K, G114N, G114P, G114Q, G114R, G114S, G114T, Y115A, Y115C, Y115D
、Y115E, Y115G, Y115H, Y115K, Y115N, Y115P, Y115Q, Y115R, Y115S, Y115T, Y115M, Y
115W, R116P, R116T, L117A, L117C, L117D, L117E, L117G, L117H, L117K, L117N, L117
P, L117Q, L117R, L117S, L117T, A118D, A118E, A118H, A118K, A118N, A118P, A118Q,
A118R, A118S, A118T, N120D, N120H, N120P, Q121T, S123H, S123T, V128A, V128C, V12
8D, V128E, V128G, V128H, V128K, V128N, V128P, V128Q, V128R, V128S, V128T, F130A
、F130C, F130D, F130E, F130G, F130H, F130K, F130N, F130P, F130Q, F130R, F130S, F
130T, V135A, V135C, V135D, V135E, V135G, V135H, V135K, V135N, V135P, V135Q, V135
R, V135S, V135T, V135W, V135Y, V137A, V137C, V137D, V137E, V137G, V137H, V137K,
V137N, V137P, V137Q, V137R, V137S, V137T, V137M, V137W, V137Y, S138H, S138T, T14 50

OD、T140H、S141T、K142H、K142P、L143A、L143C、L143D、L143E、L143G、L143H、L143K
、L143N、L143P、L143Q、L143R、L143S、L143T、L143F、L143I、L143M、L143V、L143W、L
143Y、R145H、R145P、R145T、A146P、A146T、T148H、T148P、V149A、V149C、V149D、V149
E、V149G、V149H、V149K、V149N、V149P、V149Q、V149R、V149S、V149T、V149F、V149I、
V149M、V149W、V149Y、F150A、F150C、F150D、F150E、F150G、F150H、F150K、F150N、F15
0P、F150Q、F150R、F150S、F150T、F150M、F150W、F150Y、D152A、D152C、D152G、D152P
、D152S、D152T、V153A、V153C、V153D、V153E、V153G、V153H、V153K、V153N、V153P、V
153Q、V153R、V153S、V153T、V153F、V153I、V153M、V153W、V153Y、D154A、D154C、D154
G、D154P、D154Q、D154S、Y155A、Y155C、Y155D、Y155E、Y155G、Y155H、Y155K、Y155N、
Y155P、Y155Q、Y155R、Y155S、Y155T、Y155M、Y155V、Y155W、V156A、V156C、V156D、V15
6E、V156G、V156H、V156K、V156N、V156P、V156Q、V156R、V156S、V156T、V156I、V156M
、V156W、V156Y、N157A、N157C、N157G、N157H、N157P、N157Q、N157T、S158H、S158P、S
158T、T159A、T159C、T159G、T159P、E160A、E160C、E160G、E160P、A161C、A161D、A161
E、A161H、A161K、A161N、A161P、A161Q、A161R、A161S、A161T、E162P、E162T、T163A、
T163C、T163G、T163P、I164A、I164C、I164D、I164E、I164G、I164H、I164K、I164N、I16
4P、I164Q、I164R、I164S、I164T、L165A、L165C、L165D、L165E、L165G、L165H、L165K
、L165N、L165P、L165Q、L165R、L165S、L165T、L165M、L165W、L165Y、I168A、I168C、I
168D、I168E、I168G、I168H、I168K、I168N、I168P、I168Q、I168R、I168S、I168T、F175
A、F175C、F175D、F175E、F175G、F175H、F175K、F175N、F175P、F175Q、F175R、F175S、
F175T、F178A、F178C、F178D、F178E、F178G、F178H、F178K、F178N、F178P、F178Q、F17
8R、F178S、F178T、F178M、F178W、F178Y、T179A、T179C、T179G、T179P、R180A、R180C
、R180D、R180G、R180H、R180P、V181A、V181C、V181D、V181E、V181G、V181H、V181K、V
181N、V181P、V181Q、V181R、V181S、V181T、V181F、V181I、V181M、V181W、V181Y、V182
A、V182C、V182D、V182E、V182G、V182H、V182K、V182N、V182P、V182Q、V182R、V182S、
V182T、V182F、V182I、V182M、V182W、V182Y、G183D、G183E、G183H、G183K、G183N、G18
3P、G183Q、G183S、G183T、G184D、G184E、G184H、G184K、G184N、G184P、G184Q、G184R
、G184S、G184T、E185A、E185C、E185G、E185H、E185P、E185T、D186A、D186C、D186G、D
186H、D186P、D186T、A187C、A187D、A187E、A187G、A187H、A187K、A187N、A187P、A187
Q、A187R、A187S、A187T、K188A、K188C、K188G、K188H、K188P、K188T、G190D、G190E、
G190H、G190K、G190N、G190P、G190Q、G190R、G190S、G190T、F192A、F192C、F192D、F19
2E、F192G、F192H、F192K、F192N、F192P、F192Q、F192R、F192S、F192T、F192W、F192Y
、W194A、W194C、W194D、W194E、W194G、W194H、W194K、W194N、W194P、W194Q、W194R、W
194S、W194T、Q195H、Q195P、Q195T、V196A、V196C、V196D、V196E、V196G、V196H、V196
K、V196N、V196P、V196Q、V196R、V196S、V196T、V196F、V196I、V196M、V196W、V196Y、
V197A、V197C、V197D、V197E、V197G、V197H、V197K、V197N、V197P、V197Q、V197R、V19
7S、V197T、V197F、V197I、V197M、V197W、V197Y、L198A、L198C、L198D、L198E、L198G
、L198H、L198K、L198N、L198P、L198Q、L198R、L198S、L198T、L198I、L198Y、N199A、N
199C、N199G、N199H、N199P、N199S、N199T、G200P、G200T、K201A、K201C、K201D、K201
E、K201G、K201H、K201N、K201P、K201Q、K201S、K201T、V202A、V202C、V202D、V202E、
V202G、V202H、V202K、V202N、V202P、V202Q、V202R、V202S、V202T、V202F、V202I、V20
2M、V202W、V202Y、D203A、D203C、D203G、D203P、D203T、A204C、A204D、A204E、A204G
、A204H、A204K、A204N、A204P、A204Q、A204R、A204S、A204T、F205A、F205C、F205D、F
205E、F205G、F205H、F205K、F205N、F205P、F205Q、F205R、F205S、F205T、F205M、F205
V、F205W、F205Y、G207H、G207P、G208C、G208D、G208E、G208H、G208K、G208N、G208P、
G208Q、G208R、G208S、G208T、S209A、S209C、S209G、S209P、I210A、I210C、I210D、I21
0E、I210G、I210H、I210K、I210N、I210P、I210Q、I210R、I210S、I210T、I210F、I210W
、I210Y、V211A、V211C、V211D、V211E、V211G、V211H、V211K、V211N、V211P、V211Q、V
211R、V211S、V211T、V211F、V211I、V211M、V211W、N212A、N212C、N212G、N212P、E213
H、E213P、E213S、E213T、K214T、W215A、W215C、W215D、W215E、W215G、W215H、W215K、
W215N、W215P、W215Q、W215R、W215S、W215T、I216A、I216C、I216D、I216E、I216G、I21

6H、I216K、I216N、I216P、I216Q、I216R、I216S、I216T、V217A、V217C、V217D、V217E、V217G、V217H、V217K、V217N、V217P、V217Q、V217R、V217S、V217T、V217I、V217Y、A219H、A219P、A219T、V223A、V223C、V223D、V223E、V223G、V223H、V223K、V223N、V223P、V223Q、V223R、V223S、V223T、V223M、V223W、V223Y、G226P、V227A、V227C、V227D、V227E、V227G、V227H、V227K、V227N、V227P、V227Q、V227R、V227S、V227T、V227F、V227I、V227M、V227W、V227Y、K228A、K228C、K228G、K228H、K228P、I229A、I229C、I229D、I229E、I229G、I229H、I229K、I229N、I229P、I229Q、I229R、I229S、I229T、I229M、I229W、I229Y、T230A、T230C、T230G、T230P、V231A、V231C、V231D、V231E、V231G、V231H、V231K、V231N、V231P、V231Q、V231R、V231S、V231T、V232A、V232C、V232D、V232E、V232G、V232H、V232K、V232N、V232P、V232Q、V232R、V232S、V232T、V232F、V232I、V232M、V232W、V232Y、A233C、A233D、A233E、A233G、A233H、A233K、A233N、A233P、A233Q、A233R、A233S、A233T、A233V、G234D、G234E、G234H、G234K、G234N、G234P、G234Q、G234R、G234S、G234T、E235H、E235N、E235P、E235Q、E235S、E235T、H236A、H236C、H236G、H236P、N237A、N237C、N237G、N237P、N237T、I238A、I238C、I238D、I238E、I238G、I238H、I238K、I238N、I238P、I238Q、I238R、I238S、I238T、E239A、E239C、E239G、E239P、E240H、E240T、V250A、V250C、V250D、V250E、V250G、V250H、V250K、V250N、V250P、V250Q、V250R、V250S、V250T、V250M、V250W、V250Y、I251A、I251C、I251D、I251E、I251G、I251H、I251K、I251N、I251P、I251Q、I251R、I251S、I251T、I253A、I253C、I253D、I253E、I253G、I253H、I253K、I253N、I253P、I253Q、I253R、I253S、I253T、I253M、I253W、I253Y、I254A、I254C、I254D、I254E、I254G、I254H、I254K、I254N、I254P、I254Q、I254R、I254S、I254T、P255H、H256P、H256T、H257A、H257C、H257G、H257P、N258P、N258T、Y259A、Y259C、Y259D、Y259E、Y259G、Y259H、Y259K、Y259N、Y259P、Y259Q、Y259R、Y259S、Y259T、Y259M、Y259W、N260A、N260C、N260G、N260P、A261D、A261E、A261H、A261K、A261N、A261P、A261Q、A261R、A261S、A261T、A262C、A262D、A262E、A262G、A262H、A262K、A262N、A262P、A262Q、A262R、A262S、A262T、I263A、I263C、I263D、I263E、I263G、I263H、I263K、I263N、I263P、I263Q、I263R、I263S、I263T、I263M、I263V、I263W、I263Y、N264A、N264C、N264D、N264G、N264H、N264P、K265A、K265C、K265G、K265H、K265P、Y266A、Y266C、Y266D、Y266E、Y266G、Y266H、Y266K、Y266N、Y266P、Y266Q、Y266R、Y266S、Y266T、Y266M、Y266W、N267A、N267C、N267G、N267H、N267P、N267T、H268P、D269A、D269C、D269E、D269G、D269H、D269N、D269P、D269Q、D269S、D269T、I270A、I270C、I270D、I270E、I270G、I270H、I270K、I270N、I270P、I270Q、I270R、I270S、I270T、I270M、I270W、A271C、A271D、A271E、A271G、A271H、A271K、A271N、A271P、A271Q、A271R、A271S、A271T、L272A、L272C、L272D、L272E、L272G、L272H、L272K、L272N、L272P、L272Q、L272R、L272S、L272T、L272F、L273A、L273C、L273D、L273E、L273G、L273H、L273K、L273N、L273P、L273Q、L273R、L273S、L273T、L273F、L273I、L273M、L273V、L273W、L273Y、E274A、E274C、E274G、E274P、E274T、L275A、L275C、L275D、L275E、L275G、L275H、L275K、L275N、L275P、L275Q、L275R、L275S、L275T、L275W、L275Y、D276P、D276S、D276T、E277A、E277C、E277G、E277P、P278T、L279A、L279C、L279D、L279E、L279G、L279H、L279K、L279N、L279P、L279Q、L279R、L279S、L279T、L279I、L279Y、V280A、V280C、V280D、V280E、V280G、V280H、V280K、V280N、V280P、V280Q、V280R、V280S、V280T、V280F、V280I、V280W、V280Y、L281A、L281C、L281D、L281E、L281G、L281H、L281K、L281N、L281P、L281Q、L281R、L281S、L281T、L281F、L281I、L281V、L281W、L281Y、S283A、S283C、S283G、S283P、Y284A、Y284C、Y284D、Y284E、Y284G、Y284H、Y284K、Y284N、Y284P、Y284Q、Y284R、Y284S、Y284T、Y284M、V285A、V285C、V285D、V285E、V285G、V285H、V285K、V285N、V285P、V285Q、V285R、V285S、V285T、V285M、V285W、V285Y、T286A、T286C、T286G、T286P、I288A、I288C、I288D、I288E、I288G、I288H、I288K、I288N、I288P、I288Q、I288R、I288S、I288T、C289D、C289H、C289P、I290A、I290C、I290D、I290E、I290G、I290H、I290K、I290N、I290P、I290Q、I290R、I290S、I290T、I290Y、A291D、A291E、A291H、A291K、A291N、A291P、A291Q、A291R、A291S、A291T、D292A、D292C、D292G、D292P

、D292T、K293H、K293P、K293T、Y295A、Y295C、Y295D、Y295E、Y295G、Y295H、Y295K、Y295N、Y295P、Y295Q、Y295R、Y295S、Y295T、Y295W、T296A、T296C、T296G、T296P、N297A、N297C、N297G、N297P、I298A、I298C、I298D、I298E、I298G、I298H、I298K、I298N、I298P、I298Q、I298R、I298S、I298T、F299A、F299C、F299D、F299E、F299G、F299H、F299K、F299N、F299P、F299Q、F299R、F299S、F299T、L300A、L300C、L300D、L300E、L300G、L300H、L300K、L300N、L300P、L300Q、L300R、L300S、L300T、L300F、L300I、L300M、L300V、L300W、L300Y、K301A、K301C、K301G、K301P、K301T、F302A、F302C、F302D、F302E、F302G、F302H、F302K、F302N、F302P、F302Q、F302R、F302S、F302T、G303H、G303P、G303T、S304A、S304C、S304G、S304P、S304T、G305D、G305E、G305H、G305N、G305P、G305Q、G305S、G305T、Y306A、Y306C、Y306D、Y306E、Y306G、Y306H、Y306K、Y306N、Y306P、Y306Q、Y306R、Y306S、Y306T、V307A、V307C、V307D、V307E、V307G、V307H、V307K、V307N、V307P、V307Q、V307R、V307S、V307T、S308P、S308T、W310A、W310C、W310D、W310E、W310G、W310H、W310K、W310N、W310P、W310Q、W310R、W310S、W310T、G311H、V313A、V313C、V313D、V313E、V313G、V313H、V313K、V313N、V313P、V313Q、V313R、V313S、V313T、F314A、F314C、F314D、F314E、F314G、F314H、F314K、F314N、F314P、F314Q、F314R、F314S、F314T、F314M、F314W、F314Y、H315A、H315C、H315G、H315P、K316A、K316C、K316G、K316P、G317C、G317D、G317E、G317H、G317K、G317N、G317P、G317Q、G317R、G317S、G317T、R318A、R318C、R318G、R318P、S319D、S319H、S319N、S319P、S319Q、A320C、A320D、A320E、A320G、A320H、A320K、A320N、A320P、A320Q、A320R、A320S、A320T、L321A、L321C、L321D、L321E、L321G、L321H、L321K、L321N、L321P、L321Q、L321R、L321S、L321T、V322A、V322C、V322D、V322E、V322G、V322H、V322K、V322N、V322P、V322Q、V322R、V322S、V322T、V322W、V322Y、L323A、L323C、L323D、L323E、L323G、L323H、L323K、L323N、L323P、L323Q、L323R、L323S、L323T、L323F、L323I、L323M、L323V、L323W、L323Y、Q324A、Q324C、Q324G、Q324P、Y325A、Y325C、Y325D、Y325E、Y325G、Y325H、Y325K、Y325N、Y325P、Y325Q、Y325R、Y325S、Y325T、Y325W、L326A、L326C、L326D、L326E、L326G、L326H、L326K、L326N、L326P、L326Q、L326R、L326S、L326T、L326F、L326I、L326M、L326V、L326W、L326Y、R327A、R327C、R327G、R327H、R327P、V328A、V328C、V328D、V328E、V328G、V328H、V328K、V328N、V328P、V328Q、V328R、V328S、V328T、V328F、V328I、V328M、V328W、V328Y、L330A、L330C、L330D、L330E、L330G、L330H、L330K、L330N、L330P、L330Q、L330R、L330S、L330T、L330F、L330I、L330V、L330W、L330Y、V331A、V331C、V331D、V331E、V331G、V331H、V331K、V331N、V331P、V331Q、V331R、V331S、V331T、V331F、V331I、V331M、V331W、V331Y、D332A、D332C、D332G、D332P、R333A、R333C、R333D、R333E、R333G、R333H、R333N、R333P、R333Q、R333R、R333S、R333T、A334C、A334D、A334E、A334G、A334H、A334K、A334N、A334P、A334Q、A334R、A334S、A334T、T335A、T335C、T335G、T335P、C336D、C336E、C336H、C336K、C336N、C336P、C336Q、C336R、C336S、C336T、L337A、L337C、L337D、L337E、L337G、L337H、L337K、L337N、L337P、L337Q、L337R、L337S、L337T、R338A、R338C、R338G、R338P、S339P、S339T、K341A、K341C、K341G、K341P、F342A、F342C、F342D、F342E、F342G、F342H、F342K、F342N、F342P、F342Q、F342R、F342S、F342T、F342M、F342W、T343A、T343C、T343G、T343P、I344A、I344C、I344D、I344E、I344G、I344H、I344K、I344N、I344P、I344Q、I344R、I344S、I344T、Y345A、Y345C、Y345D、Y345E、Y345G、Y345H、Y345K、Y345N、Y345P、Y345Q、Y345R、Y345S、Y345T、Y345M、Y345W、N346A、N346C、N346G、N346P、N347H、N347P、M348A、M348C、M348D、M348E、M348G、M348H、M348K、M348N、M348P、M348Q、M348R、M348S、M348T、F349A、F349C、F349D、F349E、F349G、F349H、F349K、F349N、F349P、F349Q、F349R、F349S、F349T、F349I、F349M、F349W、F349Y、C350D、C350H、C350P、C350T、A351E、A351H、A351N、A351P、A351Q、A351R、A351S、A351T、G352A、G352C、G352P、F353A、F353C、F353D、F353E、F353G、F353H、F353K、F353N、F353P、F353Q、F353R、F353S、F353T、F353I、F353M、F353W、H354A、H354C、H354G、H354P、E355A、E355C、E355D、E355G、E355H、E355K、E355N、E355P、E355Q、E355S、E355T、G356D、G356E、G356H、G356K、G356N、G356P、G356Q、G356R、G356S、G356T、G357D、G357E、G357H、G357K、G357N、G357P、G357Q

、G357R、G357S、G357T、R358D、R358E、R358H、R358K、R358N、R358P、R358Q、R358R、R358S、R358T、D359A、D359C、D359G、D359P、D359Q、D359S、D359T、S360A、S360C、S360G、S360P、C361D、C361E、C361H、C361K、C361N、C361P、C361Q、C361R、C361S、C361T、V370A、V370C、V370D、V370E、V370G、V370H、V370K、V370N、V370P、V370Q、V370R、V370S、V370T、V370W、V370Y、V373A、V373C、V373D、V373E、V373G、V373H、V373K、V373N、V373P、V373Q、V373R、V373S、V373T、V373F、V373I、V373M、V373W、E374A、E374C、E374G、E374P、G375H、S377A、S377C、S377G、S377P、F378A、F378C、F378D、F378E、F378G、F378H、F378K、F378N、F378P、F378Q、F378R、F378S、F378T、F378W、L379A、L379C、L379D、L379E、L379G、L379H、L379K、L379N、L379P、L379Q、L379R、L379S、L379T、L379I、L379M、L379W、L379Y、T380A、T380C、T380G、T380P、G381D、G381E、G381H、G381K、G381N、G381P、G381Q、G381R、G381S、G381T、I382A、I382C、I382D、I382E、I382G、I382H、I382K、I382N、I382P、I382Q、I382R、I382S、I382T、I382M、I382W、I382Y、I383A、I383C、I383D、I383E、I383G、I383H、I383K、I383N、I383P、I383Q、I383R、I383S、I383T、S384A、S384C、S384G、S384P、W385A、W385C、W385D、W385E、W385G、W385H、W385K、W385N、W385P、W385Q、W385R、W385S、W385T、W385M、E387A、E387C、E387G、E387H、E387P、E387T、E388H、E388N、E388P、E388Q、E388T、A390C、A390D、A390E、A390G、A390H、A390K、A390N、A390P、A390Q、A390R、A390S、M391A、M391C、M391D、M391E、M391G、M391H、M391K、M391N、M391P、M391Q、M391R、M391S、M391T、M391F、M391I、M391W、M391Y、K392A、K392C、K392G、K392P、G393C、G393D、G393E、G393H、G393K、G393N、G393P、G393Q、G393R、G393S、G393T、Y395A、Y395C、Y395D、Y395E、Y395G、Y395H、Y395K、Y395N、Y395P、Y395Q、Y395R、Y395S、Y395T、Y398A、Y398C、Y398D、Y398E、Y398G、Y398H、Y398K、Y398N、Y398P、Y398Q、Y398R、Y398S、Y398T、K400H、V401A、V401C、V401D、V401E、V401G、V401H、V401K、V401N、V401P、V401Q、V401R、V401S、V401T、V401F、V401I、V401M、V401W、V401Y、S402A、S402C、S402G、S402P、R403A、R403C、R403G、R403P、R403T、Y404A、Y404C、Y404D、Y404E、Y404G、Y404H、Y404K、Y404N、Y404P、Y404Q、Y404R、Y404S、Y404T、V405A、V405C、V405D、V405E、V405G、V405H、V405K、V405N、V405P、V405Q、V405R、V405S、V405T、V405W、V405Y、N406F、N406H、N406I、N406L、N406P、N406W、N406Y、W407D、W407E、W407F、W407H、W407I、W407K、W407N、W407P、W407Q、W407R、W407S、W407T、W407Y、I408D、I408E、I408H、I408K、I408N、I408P、I408Q、I408R、I408S、I408T、K409F、K409H、K409I、K409P、K409T、K409V、K409W、K409Y、E410H、K411A、K411C、K411G、K411I、K411P、K411T、K411V、K411W、K411YまたはK413Tに対応する任意の1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む。

【0325】

g. 例示的な組合せの修飾

未修飾F I Xポリペプチドの1つまたは複数の特性または活性に影響を及ぼすように設計される2つ以上の修飾を有する修飾F I Xポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの例では、2つまたはそれ以上の修飾が、F I Xポリペプチドの2つまたはそれ以上の特性または活性を改変する。修飾は、1つまたは複数のグリコシル化、A T—I I Iに対する抵抗性、A T—I I I／ヘパリンに対する抵抗性、ヘパリンに対する抵抗性、触媒活性、L R Pへの結合、内因活性、リン脂質結合および／または親和性、プロテアーゼに対する抵抗性、半減期、ならびにF V I I I aおよびF Xなどのような他の因子または分子との相互作用が改変されるように、F I Xポリペプチドに対してなすことができる。典型的に、2つまたはそれ以上の修飾は、結果として生じる修飾F I Xポリペプチドが、未修飾F I Xポリペプチドと比較して、血液凝固活性の増加、血液凝固活性の持続時間の増加、および／または治療指数の増強を有するように、組み合わせられる。修飾は、アミノ酸交換、アミノ酸挿入、またはアミノ酸欠失を含むことができる。2つまたはそれ以上の修飾を含有する修飾F I Xポリペプチドの血液凝固活性の増加、血液凝固活性の持続時間の増加、および／または治療指数の増強は、出発F I X aポリペプチドまたは未修飾F I X aポリペプチドの活性と比較して、少なくともまたは少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50

%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上まで増加させることができる。

【0326】

1つ、2つ、またはそれ以上の活性または特性を改変するために未修飾FIXポリペプチドの中に導入される、2つまたはそれ以上の修飾を含有する修飾FIXポリペプチドが、本明細書において提供される。修飾FIXポリペプチドは、2、3、4、5、6、またはそれ以上の修飾を含有することができる。たとえば、本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドは、位置203に非天然グリコシル化部位を導入するための、アミノ酸交換D203NおよびF205Tなどのような、一次配列の中に非天然グリコシル化部位を組み込むことによる、グリコシル化を増加させるための修飾ならびにR338Eなどのような、AT-I-I-I／ヘパリンに対する抵抗性を増加させるための修飾を含有することができる（残基は、配列番号3において記載される成熟FIXポリペプチドに対応する）。

10

【0327】

本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドは、もっぱら表3～9において記載されるものから選択される2つ以上の修飾を有することができる。他の例では、修飾FIXポリペプチドが、2つ以上の修飾を含有し、1つまたは複数の修飾が、表3～9において記載されるものから選択され、1つまたは複数の修飾が、たとえば当技術分野において記載される修飾などのような、表3～9において記載されていないさらなる修飾である。いくつかの例では、1つまたは複数のさらなる修飾が、触媒活性の増加、阻害因子に対する抵抗性の増加、血小板およびリン脂質に対する親和性および／または結合の増加、プロテアーゼ抵抗性の増加、免疫原性の減少、ならびにPEG成分などのような成分へのコンジュゲーションを促進するものをもたらすものなどのような、上記、部D. 3. a～fにおいて記載されるものから選択することができる。

20

【0328】

非限定的な例示的な組合せの修飾は、表10において提供される。これらの例示的な組合せの修飾は、AT-I-I-Iに対する抵抗性の増加、AT-I-I-I／ヘパリンに対する抵抗性の増加、ヘパリンに対する抵抗性の増加、触媒活性の増加、および改変されたグリコシル化を含むが、これらに限定されない、FIXポリペプチドの2つ以上の活性または特性を改変するように設計される、2つ以上の修飾を含む。そのような組合せの修飾を含有する修飾FIXポリペプチドは、血液凝固活性の増加、血液凝固活性の持続時間の増加、および／または治療指数の増強を有することができる。下記の表10において、修飾FIXポリペプチドの例示的なアミノ酸配列が記載される配列識別子（配列番号）が同定される。

30

【0329】

表10.

【表 10 - 1】

突然変異 (成熟FIX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
R318Y/E410N	R150Y/E240N	153
R338E/E410N	R170E/E240N	154
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	155
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	157
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	158
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	159
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	160
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	161
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	162
K228N/E410N	K63N/E240N	163
K228N/R338E	K63N/R170E	164
K228N/R338A	K63N/R170A	165
K228N/R318Y	K63N/R150Y	166
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	167
R403E/E410N	R233E/E240N	168
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	169
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	170
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	171
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	172
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	173
F314N/K316S	F145N/K148S	177
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	217
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	218
K228N/I251S	K63N/I86S	180
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	181
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	182

10

20

30

【表 10 - 2】

A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	219
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	220
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	221
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	222
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/ R403 E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	223
D104N/K106S/R318Y/R338E /E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ E240N	224
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E /E240N	225
D104N/K106S/I251S/R318Y/ R338E /E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E /E 240N	226
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	178
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	179
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	183
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	227
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	228
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	229
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	230
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	231
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R1 70E/R233E/E240N	232
D104N/K106S/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R1 70E/R233E/E240N	233
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	234
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/ R170E/R233E/E240N	235
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/ R40 3E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/ R170 E/R233E/E240N	236

10

20

30

【表 10 - 3】

Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E2 40N	237
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	238
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	239
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	240
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	241
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	242
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	243
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ E240N	244
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/ N2 49S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/ K82N /N84S	245
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/ N84S	246
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	247
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	248
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	184
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	249
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	250
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	251
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	252
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	253
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	254
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	255
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/ E240N	256
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	257
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	258
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	259

10

20

30

【表 10 - 4】

Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E 240N	260
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	261
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	262
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	263
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E /R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	264
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R 233E/E240N	265
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	266
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	267
R338E/T343R	R170E/T175R	268
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	269
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	270
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	271
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/ N2 60S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/ N84S/ N95S	272
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	185
T343R/Y345T	T175R/Y177T	215
R318Y/R338E	R150Y/R170E	188
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	216
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/ R31 8Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/ N84S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	326
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/ R3 18Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R15 0Y/R170E/R233E/E240N	327
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/ R17 0E/R233E/E240N	328
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/ R33 8E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/ R17 0E/R233E/E240N	329
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/ E41 0N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E 240N	330

10

20

30

【表 10 - 5】

D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	331
T343R/N346Y	T175R/N178Y	332
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	333
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/ E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/ E240N	334
T343R/N346D	T175R/N178D	335
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/ E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/ E240N	336
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	337
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/ E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	338
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E	339
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	340
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/ E240N	341
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	342
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/ E240N	343
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	344
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	345
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	346
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	347
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	348
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	349
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	350
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	351
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	352
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	353
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	354

10

20

30

40

【表 10 - 6】

K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	355
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	356
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/ E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	357
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	358
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	359
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/E240N	360
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	361
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	362
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	363
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	364
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	365
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	366
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	367
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E	368
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ R233E	369
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/ R233E/E240N	370
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/ E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/ E240N	371
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	372
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	373
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	374
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	375
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	376
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	377

10

20

30

【表 10 - 7】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/E240N	378
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ E240N	379
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E/E240N	380
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/ E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/ E240N	381
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	382
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E	383
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	384
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/ E240N	385
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	386
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/ R233E	387
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	388
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/ E240N	389
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	390
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/ E240N	391
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	392
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	393
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	394
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	395
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	396
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R	397
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	398
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	399
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	400

10

20

30

【表 10 - 8】

Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	401
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	402
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	403
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	404
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/ E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	405
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E	406
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/E240N	407
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E/E240N	408
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	409
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	410
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	411

10

【0330】

20

3. コンジュゲートおよび融合タンパク質

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、ポリマーなどのような、他のポリペプチドまたは他の成分に対してコンジュゲートするまたは融合することができる。いくつかの実例では、コンジュゲーションまたは融合は、血清半減期を増加させるために達成される。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドを融合することができる例示的なポリペプチドは、血清アルブミン、F c、F c R n、およびトランスフェリンを含むが、これらに限定されない [たとえば Sheffield, W.P. et al., (2004) Br. J. Haematol. 126(4):565-73; 米国特許出願公開第 20050147618 号; 国際特許出願公開 WO 2007112005、および WO 2004101740 を参照されたい]。

【0331】

30

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、デキストラン、ポリエチレングリコール（ペグ化（P E G））、もしくはシアリル成分または天然ポリマーもしくは糖ポリマーなどのような他のそのようなポリマーなどのようなポリマーに対してコンジュゲートすることができる。一例では、ポリペプチドが、別記されるように、デキストランに対してコンジュゲートされる [Zambaux et al., (1998) J. Protein Chem. 17(3):279-84]。P E G または P E G 誘導体を共有結合する（コンジュゲートする）こと（つまり「ペグ化」）によって、ポリペプチドを修飾する様々な方法は、当技術分野において知られている（たとえば U S 20060104968、U S 5672662、U S 6737505、および U S 20040235734 を参照されたい）。ペグ化のための技術は、特殊なリンカーおよびカップリング化学作用（たとえば Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:459-476, 2002 を参照されたい）、単一のコンジュゲーション部位への複数の P E G 成分の付加（分岐 P E G の使用を介してなど; たとえば Veronese et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:177-180, 2002 を参照されたい）、部位特異的ペグ化および／またはモノペグ化（たとえば Chapman et al., Nature Biotech. 17:780-783, 1999 を参照されたい）、部位特異的酵素的ペグ化（たとえば Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 54:487-504, 2002 を参照されたい）、ならびに糖 P E G 化（米国特許出願公開第 20080050772 号、第 20080146494 号、第 20080050772 号、第 20080187955 号、および第 20080206808 号）を含むが、これらに限定されない。当技術分野において記載される方法および技術は、単一のタンパク質分子に付加された 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の P E G または P E G 誘導体を有するタンパク

40

50

質を産生することができる（たとえばU. S. 2006/0104968を参照されたい）。したがって、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、米国特許第5,969,040号、第5,621,039号、第6,423,826号、米国特許出願公開第20030211094号、第20070254840号、第20080188414号、第2008000422号、第20080050772号、第20080146494号、第20080050772号、第20080187955号、および第20080206808号、国際特許出願公開WO2007112005、WO2007135182、WO2008082613、WO2008119815、WO2008119815において記載されるいづれかなどのような、当技術分野において知られている任意の方法を使用して、糖ペグ化（glycopegylation）を含めて、ペグ化することができる。

10

【0332】

いくつかの実例では、修飾F I Xポリペプチドが、他の成分へのコンジュゲーションを促進するためのアミノ酸置換を含む。たとえば、システイン残基は、ポリマーへのコンジュゲーションを促進するためにF I Xポリペプチドの中に組み込むことができる。この目的のための例示的なアミノ酸置換修飾は、D47C、Q50C、S53C、L57C、I66C、N67C、S68C、E70C、W72C、P74C、K80C、L84C、V86C、N89C、I90C、K91C、R94C、K100C、N101C、S102C、A103C、D104C、N105C、K106C、V108C、E114C、R116C、E119C、N120C、Q121C、S123C、E125C、P129C、S138C、T140C、S141C、K142C、A146C、E147C、E162C、T163C、I164C、L165C、D166C、N167C、I168C、T169C、Q170C、S171C、T172C、Q173C、S174C、F175C、N176C、D177C、F178C、T179C、R180C、E185C、D186C、K188C、P189C、K201C、V202C、D203C、E224C、T225C、K228C、E239C、E240C、T241C、H243C、K247C、N249C、R252C、H257C、N260C、A261C、A262C、I263C、K265C、E277C、F314C、R318C、L321C、K341C、E372C、E374C、M391C、K392C、N406C、K413CおよびT415C（配列番号3において記載される成熟F I Xポリペプチドに対応する）を含むが、これらに限定されない。

20

【0333】

E. F I Xポリペプチドの産生

F I Xのその修飾F I Xポリペプチドまたはドメインを含むF I X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、当技術分野においてよく知られている方法によって得ることができる。所望の遺伝子をコードする核酸の同定のための、当業者に知られている任意の方法を使用することができる。当技術分野において利用可能な任意の方法は、細胞源または組織源などから、たとえば肝臓などからF I Xポリペプチドまたは他のビタミンKポリペプチドをコードする完全長（つまり全コード領域を包含する）cDNAまたはゲノムDNAクローンを得るために使用することができる。本明細書において記載される修飾F I Xポリペプチドは、部位特異的突然変異誘発などによって操作することができる。

30

【0334】

F I Xは、核酸分子のクローニングおよび単離について、当技術分野において知られている任意の利用可能な方法を使用してクローニングするまたは単離することができる。そのような方法は、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、抗体ベースのスクリーニング、および活性ベースのスクリーニングを含む、ライブラリーのスクリーニングを含む。

40

【0335】

たとえばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を含む、核酸の増幅のための方法は、F I Xポリペプチドをコードする核酸分子を単離するために使用することができる。核酸含有物質は、F I Xコード核酸分子を単離することができる出発物質として使用することができる。たとえば、DNA調製物およびmRNA調製物、細胞抽出物、組織抽出物（たとえば、肝臓から）、流体試料（たとえば血液、血清、唾液）、健常および／または病気の対象に由来する試料は、増幅法において使用することができる。核酸ライブラリーもまた、出発物質の源として使用することができる。プライマーは、F I Xコード分子を増幅する

50

ために設計することができる。たとえば、プライマーは、F I Xが生成される発現配列に基づいて設計することができる。プライマーは、F I Xアミノ酸配列の逆翻訳に基づいて設計することができる。増幅により生成される核酸分子は、配列を決定し、F I Xポリペプチドをコードすることを確認することができる。

【0336】

ベクター、たと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配列の増幅のために設計されたベクターの中に合成遺伝子をクローニングする目的で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含む、さらなるヌクレオチド配列を、F I Xコード核酸分子に結合することができる。さらに、機能的DNAエレメントを特定するさらなるヌクレオチド配列は、F V I Iコード核酸分子に作動可能に連結することができる。そのような配列の例は、細胞内タンパク質発現を容易にするよう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よう設計された分泌配列を含むが、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などのようなさらなるヌクレオチド配列もまた、F I Xコード核酸分子に連結することができる。そのような領域は、特異的標的細胞の中へのF I Xの取り込みを容易にするまたは他の場合には合成遺伝子の薬物動態を増強させる配列を含むが、これらに限定されない。

10

【0337】

次いで、同定され、単離された核酸は、適切なクローニングベクターの中に挿入することができる。当技術分野において知られている多くのベクター宿主系を使用することができる。可能性として考えられるベクターは、プラスミドまたは修飾ウイルスを含むが、これらに限定されない、しかしベクター系は、使用される宿主細胞と適合性でなければならない。そのようなベクターは、ラムダ誘導体などのようなバクテリオファージまたはp B R 3 2 2プラスミド誘導体もしくはp U Cプラスミド誘導体などのようなプラスミドまたはBlue scriptベクター (Stratagene、La Jolla、CA)を含むが、これらに限定されない。クローニングベクターの中への挿入は、たとえば、相補的付着末端を有するクローニングベクターの中にDNA断片をライゲーションすることによって達成することができる。挿入は、T O P Oクローニングベクターを使用して達成することができる (Invitrogen、Carlsbad、CA)。DNAを断片化するために使用される相補的制限部位が、クローニングベクター中に存在しない場合、DNA分子の端は、酵素的に修飾することができる。その代わりに、所望される任意の部位は、DNA末端上にヌクレオチド配列 (リンカー) をライゲーションすることによって產生することができる; これらのライゲーションされたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特異的的化学合成オリゴヌクレオチドを含有することができる。代替方法では、切断されたベクターおよびF I Xタンパク質遺伝子は、ホモポリマーテーリングによって修飾することができる。組換え分子は、たとえば形質転換、トランスフェクション、感染、電気穿孔、および超音波穿孔 (sonoporation) を介して宿主細胞の中に導入することができ、遺伝子配列の多くのコピーが、生成される。

20

30

【0338】

特定の実施形態では、単離F I Xタンパク質遺伝子、cDNA、または合成DNA配列を組み込む組換えDNA分子を用いる宿主細胞の形質転換が、遺伝子の複数のコピーの生成を可能にする。したがって、遺伝子は、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、必要な場合には単離組換えDNAから、挿入された遺伝子を回収することによって、多量に得ることができる。

40

【0339】

1. ベクターおよび細胞

1つまたは複数のF I Xタンパク質の組換え発現のために、F I X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、

50

F I X 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。

【0340】

F I X または修飾 F I X 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。

【0341】

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 F I X 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 F I X タンパク質を回収することによって、F I X ポリペプチドまたはその修飾 F I X 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、F I X は、培地の中に分泌させることができる。

【0342】

一実施形態では、F I X 活性を有し、F I X 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 F I X ポリペプチドもしくは修飾 F I X 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 F I X 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。F I X 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。

【0343】

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。

【0344】

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体（遺伝的組換え）を含むことができる。F I X ポリペプチドもしくは修飾 F I X 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、F I X 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 et al. *Cell* 22:787-797 (1980)]、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター [Wagner et al., *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 et al., *Nature* 296:39-42 (1982)]； β -ラクタマーゼプロモーター [Jay et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5543] または tac プロモーター [DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983)] などのような原核生物発現ベ

10

20

30

40

50

クター；”Useful Proteins from Recombinant Bacteria”:Scientific American 242:79-94 (1980)) もまた参照されたい；ノバリン合成酵素プロモーター [Herrera-Estrella et al., 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 et al., 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 et al., Nature 310:115-120 (1984)] ；Gal 4 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 et al., Cell 38:639-646 (1984); Ornitz et al., 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 et al., 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 et al., Cell 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., 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 et al., 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 et al., 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 et al., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., 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 et al., 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 et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollas et al., Cell 46:89-94 (1986)] 、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 et al., 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 et al., Science 234:1372-1378 (1986)] を含むが、これらに限定されない。

【0345】

特定の実施形態では、FIX ポリペプチドもしくは修飾 FIX 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用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。FIX 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 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 (RBS II)、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マーゼ遺伝子を有する。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、T7lac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むpET11a；T7プロモーター、T7ターミネーター、およびイー・コリompT分泌シグナルを含む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での切断を可能にするトロンビン切断部位、T7-lacプロモーター領域、およびT7ターミネーターを含むpET15bおよびpET19b（NOVAGEN、Madison、WI）を含む。

【0346】

2. 発現系

FIX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、FIX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、FIX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。FIXおよび修飾FIX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FIX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。

【0347】

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・パストリス（*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。野生型FIXポリペプチドの産生のためのトランスジェニック動物は、当技術分野において知られており（米国特許出願公開第2002-0166130号および第2004-0133930号）、本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドの産生に適合し得る。

【0348】

FIX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。

【0349】

FIXまたは修飾FIX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 *his*₆ 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。

【0350】

一実施形態では、FIXポリペプチドまたは修飾FIXポリペプチドが、活性形態で発現することができ、それによって、活性化は、分泌の後に、ポリペプチド活性化第XI因子(FXIa)のインキュベーションによって達成される。他の実施形態では、プロテアーゼは、不活性なチモーゲン形態で発現させることができる。

【0351】

FIXポリペプチドの産生の方法は、FIXポリペプチドの生成を助けることができる1つまたは複数のさらなる異種ポリペプチドの同時発現を含むことができる。たとえば、そのようなポリペプチドは、FIXポリペプチドの翻訳後プロセシングに寄与することができる。例示的なポリペプチドは、プロペプチド配列などのようなFIX前駆体配列の切断を助けるペプチダーゼ、たとえばグリコシル化、ヒドロキシル化、カルボキシル化、またはリン酸化によってなどのような、FIXポリペプチドの修飾に参加する酵素を含むが、これらに限定されない。FIXと同時発現することができる例示的なペプチダーゼは、PACE／フューリン(またはPACE-SOL)であり、これは、FIXプロペプチド配列の切断を助ける。FIXポリペプチドのカルボキシル化を助ける例示的なタンパク質は、ワルファリン感受性酵素ビタミンK₂, 3-エポキシドレダクターゼ(VKOR)であり、これは、ビタミンK依存性γ-カルボキシラーゼによる補因子としての利用のための還元ビタミンKを産生する[Wajih et al., J. Biol. Chem. 280(36)31603-31607]。この酵素のサブユニット、VKORC1は、γカルボキシル化を増加させるために、修飾FIXポリペプチドと同時発現させることができる。1つまたは複数のさらなるポリペプチドは、FIXポリペプチドと同じ発現ベクターまたは異なるベクターから発現させることができる。

【0352】

a. 原核生物発現

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

【0353】

FIX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し得る。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FIX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、シグナルペプチダ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、ベ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、本明細書において提供される、高度にグリコシル化されたFIXポリペプチドの産生のために、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。

【0354】

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*)、クルイペロミセス・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、FIXのための有用な発現宿主である [たとえばSkoko et al. (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38(Pt3):257-65を参照されたい]。酵母は、エピソード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Agap2p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/Thrモチーフでのグリコシル化も可能である。

【0355】

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、FIX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 et al. (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、発現されることとな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。

【0356】

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 (キイ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ヒ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。

【0357】

d. 哺乳動物細胞

哺乳動物発現系は、FIX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)、およびポリアデ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、エラストアーゼ 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、ヒグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサントシン-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、これらに限定されない。TCR- ζ およびFc ϵ R I- 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。

【0358】

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、CHO Express (CHOX; Excelligene)、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 et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42]。血漿由来FIXと類似する構造および翻訳後修飾を示す組換えFIXポリペプチドの発現は、当技術分野において知られている。ビタミンK依存性タンパク質発現を最適化するための方法は、知られている。たとえば、培養液におけるビタミンKの補足またはビタミンK依存性 γ -カルボキシラーゼの同時発現 [Wajih et al., J. Biol. Chem. 280(36)31603-31607] は、FIXポリペプチドなどのようなビタミンK依存性タンパク質の翻訳後修飾を助けることができる。

【0359】

e. 植物

10

20

30

40

50

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、F I X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D N A移入およびプロトプラストの中へのP E G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U B Q 3プロモーターを含む。ヒグロマイシン、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F I X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 et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 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F I Xを産生するための選定に影響を及ぼし得る。

10

20

【0360】

2. 精製

宿主細胞に由来するF I X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液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発出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。

30

【0361】

F I Xは、S D S - P A G E、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、硫酸塩析、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、F I Xポリペプチドは、下記実施例1において記載されるような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。F I X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 d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、F I X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 -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。

40

【0362】

F I Xポリペプチドは、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、自己触媒などによって活性形態に精

50

製することができる。たとえば、R 1 4 5 および R 1 8 0 の後のタンパク質分解性の切断を介して活性化された F I X 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 F I X a ; 二重鎖形態）。F I X 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。F I X ポリペプチドの、活性プロテアーゼ形態、F I X a への切断は、第 X I a 因子とのインキュベーションによって達成することができる。いくつかの例では、これが、カルシウムおよびリン脂質の存在下において実行される。

【0363】

3. 融合タンパク質

修飾 F I X 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 F I X 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、F I X ポリペプチドの精製を容易にする、F I X 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 F I X 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 F I X 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%、またはそれ以上の血液凝固活性を含む、非融合 F I X 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% の血液凝固活性を保持する。

【0364】

F I X 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 F I X ポリペプチドの融合は、F I X 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 F I X 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、G S T（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 F c ドメイン、アルブミン、または異種シグナル配列を含む。融合タンパク質は、イー・コリマルトース結合タンパク質（M B P）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 P C T 出願 W O 0 1 / 3 2 7 1 1 を参照されたい）。

【0365】

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、異なるポリペプチド配列をコードする D N A 断片は、従来の技術に従って、インフレイムで、たとえば、ライゲーションのための平滑端または付着端の末端、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 D N A 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 P C R 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 et al. (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 G S T ポリペプチド）。F I X 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

。

【0366】

4. ポリペプチド修飾

修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾（もしくは裸の）ポリペプチド鎖または翻訳後修飾ポリペプチド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 F I X 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 F I X 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、特定の修飾は、所望されるものとなり得る。特に、本明細書における目的のために、高度にグリコシル化された F I X ポリペプチドを産生するための修飾 F I X ポリペプチドのグリコシル化は、好ましい。そのようなグリコシル化は、哺乳動物発現系などのような適切な発現系を使用してインビボにおいて、インビトロにおいて [たとえば Mikami et al. (2006) J. Biotechnol. 127:65-78 を参照されたい]、またはたとえば、F I X ポリペプチドが原核細胞において発現され、酵素的グリコシル転移を使用してインビトロにおいてさらに修飾されるインビボおよびインビトロ方法の組合せで [たとえば Schwarz et al., (2010) Nature Chem. Biol. 6:264-266 を参照されたい] 実行することができる。さらに、ペグ化、アルブミン化、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 F I X を産生することによってなすことができる。

10

20

【0367】

5. ヌクレオチド配列

F I X または修飾 F I X 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 F I X 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 75 ~ 272 のいずれかにおいて記載されるポリペプチド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 F I X 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 F I X 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。たとえば、本明細書において提供される核酸分子は、配列番号 1 において記載される核酸配列に対して、少なくともまたは少なくとも約 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。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 F I X 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

【0368】

F. 修飾 F I X ポリペプチド活性の評価

F I X 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、F I X 変異体が、未修飾 F I X および／または野生型 F I X 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、F V I I I a、リン脂質、および／またはカルシウム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、たとえば、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。インビボアッセイは、動物モデルにおける F I X 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、F I X ポリペプチドの活性は、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。本明細書において提供されるものなどのような

40

50

F I X 変異体もまた、治療効果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。

【0369】

典型的に、本明細書において記載されるアッセイは、F I X の二重鎖活性化形態、つまり F I X a に関してのものである。R 1 4 5 および R 1 8 0 の後のタンパク質分解性の切断を介して活性化された F I X 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。F I X 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。F I X ポリペプチドの、F I X の活性プロテアーゼ形態への切断は、活性化第 X 因子 (F X I a) とのインキュベーションによって達成することができる。活性化ポリペプチドは、本明細書において記載される、F I X 活性を測定するためのアッセイのいずれかにおいて使用することができる。そのようなアッセイはまた、単鎖チモーゲン形態を用いる実行することもできる。たとえば、単鎖チモーゲン F I X ポリペプチドは、そのような形態が、典型的に、F I X 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示さないので、陰性対照を提供することができる。さらに、そのようなアッセイはまた、F I X の活性を増大することができる、F V I I I a などのような補因子ならびにリン脂質および／またはカルシウムなどのような他の分子の存在下において実行することができる。

10

【0370】

1. インビトロアッセイ

20

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、グリコシル化、 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、F V I I I a および第 X 因子などのような他の凝固因子との F I X 相互作用の測定、F I X 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 F I X 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 F I X 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。

30

【0371】

修飾 F I X ポリペプチドの濃度は、酵素連結免疫吸着アッセイ (E L I S A)、S D S - P A G E ; B r a d f o r d 法、L o w r y 法、B C A 法 ; U V 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。

【0372】

F I X ポリペプチドの切断または F I X プロテアーゼ活性によって産生される産物を含む、タンパク質分解反応の切断産物の評価は、発色基質切断、H P L C、S D S - P A G E 分析、E L I S A、ウェスタンブロッティング、免疫組織化学的検査、免疫沈降、N H 2 - 末端配列決定、蛍光、およびタンパク質ラベル化を含むが、これらに限定されない方法を使用して実行することができる。

40

【0373】

修飾 F I X 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 F I X ポリペプチドの X 線結晶解析、核磁気共鳴 (N M R)、および低温電子顕微鏡 (c r y o - E M) は、F I X ポリペプチドの 3 次元構造および／または $C a^{2+}$ 結合性もしくは補因子結合性などのような F I X 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。

【0374】

さらに、F I X 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 (S D S - P A G E) および電気泳動にかけられた F I X 含有試料のウェス

50

タンブロット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F I Xポリペプチドはまた、修飾F I X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。

【0375】

a. グリコシル化

F I Xポリペプチドは、当技術分野においてよく知られている方法を使用して、グリコシル化の存在について評価することができる。ポリペプチドのグリコシル化は、高pHアニオン交換クロマトグラフィー [Townsend et al., (1991) *Glycobiology* 1:139-147] または蛍光体支援炭水化物電気泳動 (F A C E) [Kumar et al., (1996) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24:207-214.]、連続的なエキソグリコシダーゼ消化 [Watzlawick et al., (1992) *Biochemistry* 31:12198-12203; Tyagarajan et al., (1996) *Glycobiology*, 6:83-93]、質量分析 [Gillece-Castro et al., (1990) *Meth. Enzymol.* 193: 689-712; Duffin et al., (1992) *Anal. Chem.* 64:1440-1448; Papac et al., (1997) in *Techniques in Glycobiology* (Townsend R.R. and Hotchkiss A.T. eds.) Marcel Decker, Inc., New York, pp. 33-52; Fu et al., (1994) *Carbohydr. Res.* 261:173-186]、およびNMR [Fu et al., (1994) *Carbohydr. Res.* 261:173-186] などのような種々様々の方法を使用して、その酵素的にまたは化学的に放出された炭水化物プールから特徴づけることができる。

10

【0376】

たとえば、化学的放出は、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ヒドラジン分解によって達成することができる。酵素的放出は、エンドグリコシダーゼであるペプチドN-グリコシダーゼF (P N G a s e F) によって達成することができ、これは、もともとグリコシル化されているA s n残基をA s pに加水分解しながら、ポリペプチドから、もとのまもののほとんどの共通のN結合型炭水化物を取り出す。F I X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F I Xポリペプチドは、蛍光体支援炭水化物電気泳動 (F A C E) 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、H P L C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H P L C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ーブは、3-(アセチルアミノ)-6-アミノアクリジン (A A -A c) および2-アミノ安息香酸 (2-A A) 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F I X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。

20

30

【0377】

ある方法では、質量分析は、部位特異的な炭水化物異質性を評価するために使用される。これは、収集されたH P L C画分のマトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析 [Sutton et al., (1994) *Anal. Biochem.* 218:34-46; Ploug et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:13933-13943] またはエレクトロスプレーイオン化質量分析と直接的に接続された逆相H P L C (L C / E S I M S) [たとえばHuddleston et al., (1993) *Anal. Chem.* 65:877-884; Medzihradsky et al., (2008) *Methods Mol. Biol.* 446:293-316を参照されたい] を含むことができる。一例では、A s n - X - S e r / T h r / C y sモチーフ内のアスパラギン残基などのような潜在的なN-グリコシル化部位でのグリコシル化が、L C / E S I M Sによって評価される。F I Xポリペプチドにおける潜在的なN-グリコシル化部位は、同定することができ、個々のペプチド上のこれらの部位を分離するタンパク質分解酵素を、選択することができる。次いで、消化混合物は、衝突活性化によって診断上の炭水化物イオンを生成する方法であるL C / E S I M Sによって分析される (33)。たとえば、診断上の炭水化物イオンは、 m/z 204、274、および292、366、ならびに657に特徴的な非還元末端オキシニウムイオンを含み、これらは、そ

40

50

れぞれ、N-アセチルヘキソサミン、ノイラミン（シアル）酸、ヘキソシル-N-アセチルヘキソサミン、およびシアリル-ヘキソシル-N-アセチルヘキソサミンの存在を示す。選択的なイオンモニタリング（SIM）によるこれらのイオンの存在の同定に加えて、LC/ESI/MS方法はまた、分子量をも評価するためにペプチドを分析し、これは、どのペプチド、そのため、どの潜在的N-グリコシル化部位が炭水化物を含有するかを示すために使用することができる。

【0378】

b. 他の翻訳後修飾

FIXポリペプチドは、グリコシル化以外の翻訳後修飾の存在について評価することができる。そのようなアッセイは、当技術分野において知られており、ヒドロキシ化、硫酸化、リン酸化、およびカルボキシ化を測定するためのアッセイを含む。β-ヒドロキシ化を測定するための例示的なアッセイは、アルカリ性加水分解にかけられたFIXポリペプチドの逆相HPLC分析を含む [Przysiecki et al. (1987) PNAS 84:7856-7860]。FIXポリペプチドのカルボキシ化およびγ-カルボキシ化は、他のビタミンK依存性ポリペプチドについて記載されるように、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）分析を用いるマスマスペクトロメトリーを使用して評価することができる [たとえばHarvey et al. J Biol Chem 278:8363-8369, Maun et al. Prot Sci 14:1171-1180を参照されたい]。プロペプチド（プロFIX）を含有するFIXポリペプチドの、翻訳後γ-カルボキシレート修飾を担う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。カルボキシラーゼの、フルオレセインラベルプロFIXポリペプチドとのインキュベーションの後の解離定数（ K_d ）は、異方性によって結合カルボキシラーゼの量を決定することによって測定することができる [Lin et al. (2004) J Biol Chem 279:6560-6566]。カルボキシ化を測定するための他の例示的なアッセイは、アルカリ性加水分解にかけられたFIXポリペプチドの逆相HPLC分析を含む [Przysiecki et al. (1987) PNAS 84:7856-7860]。

【0379】

リン酸化を測定するための例示的なアッセイは、ホスホセリンおよび／もしくはホスホチロシンアミノ酸残基に対するまたはセリンリン酸化FIXポリペプチドに対するリン酸化部位特異的抗体の使用を含む。FIXポリペプチドを産生する細胞の ^{32}P の代謝ラベル化もまた、リン酸化を評価するために使用することができ、ラベルFIXポリペプチドは、精製し、放射性ホスフェートの組み込みについて分析することができる。チロシン硫酸化のための例示的なアッセイは、FIXポリペプチドを産生する細胞の ^{35}S ラベル化を含む。そのような方法において、細胞は、 $^{35}S-S_2SO_4$ または ^{35}S メチオニンとインキュベートされ、 ^{35}S の組み込みは、 ^{35}S メチオニン試料に対する標準化によって決定される。

【0380】

c. タンパク質分解活性

修飾FIXポリペプチドは、合成基質およびその天然基質、第X因子の両方に対するタンパク質分解活性について試験することができる。修飾FIXポリペプチド（FIXa）の活性化形態は、アッセイにおいて典型的に使用される。 $CH_3SO_2-LGR-pNA$ ペプチドなどのような合成基質を使用するアッセイは、FIXaポリペプチドの酵素的切断活性を測定するために用いることができる。FIXaの存在下における $CH_3SO_2-LGR-pNA$ の加水分解は、切断反応試料からのp-ニトロアニリン（pNA）の産生を評価することによって測定することができる。試料におけるpNAの量は、405 nmでの試料の吸光度に比例し、したがって、FIXa試料におけるタンパク質分解活性の程度を示す。FIXa切断活性を評価するために使用することができるさらなる例示的な蛍光発生基質は、 $Me s-D-CHD-Gly-Arg-AMC$ （ $Pe f a f l u o r F I X a 10148$ ）および $H-D-Leu-PHG-Arg-AMC$ （ $Pe f a f l u o r F I X a 3688$ ）を含むが、これらに限定されず、切断は、AMCおよび蛍光発生エステル基質、4-メチルウンベリフェリルp'-グアニジノベンゾエート（MUGB）

の放出によって評価され、切断は、4-メチルウンベリフェロン蛍光体（4-MU）の放出によって評価される（たとえば実施例3を参照されたい）。エチレングリコールなどのようなFIXa触媒活性を増強する分子は、そのようなアッセイにおいて用いることができる [Sturzebecher et al. (1997) FEBS Lett. (412) 295-300]。

【0381】

FIXaのタンパク質分解活性はまた、下記実施例4において記載されるように、活性化第X因子（FXa）への第X因子（FX）の変換を測定することによって評価することができる。本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドを含むFIXaポリペプチドは、FVIIa、リン脂質小胞（ホスファチジルセリンおよび／またはホスファチジルコリン）、ならびにCa²⁺の存在下において、FXポリペプチドとインキュベートすることができ、FXaを産生するためのFXの切断は、Spectrafluor FIXa（CH₃SO₂-D-CHA-Gly-Arg-AMC）などのような蛍光発生基質またはS2222もしくはS2765（Chromogenics AB、Molndal、Sweden）などのような発色基質を使用してアッセイすることができ、これらは、FIXaによって特異的に切断される。

【0382】

d. 凝固活性

FIX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 [Liebman et al., (1985) PNAS 82:3879-3883]；プロトロンビン時間アッセイ（PT、これは、外因性経路におけるFIXaのTF依存性活性を測定することができる）；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、これは、FIXaのTF非依存性活性を測定することができる）；活性化凝血時間（ACT）；再石灰化活性化凝血時間；リーホワイต์凝血時間；またはトロンボエラストグラフィー（TEG） [Pusateri et al. (2005) Critical Care 9:S15-S24] を含むが、これらに限定されない。たとえば、修飾FIX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、FIXは、FIX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組換えTF）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、FIX欠損血漿のみに対して比較される。下記に記載されるものなどのような動物モデルにおけるインビボ凝固アッセイもまた、FIXポリペプチドの凝固活性を評価するために実行することができる。

【0383】

e. 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、AT-III／ヘパリン複合体、p-アミノベンズアミジン、セリンプロテアーゼ阻害因子、およびFIX特異的抗体などのようなFIX阻害因子に対する修飾FIX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、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、FVIIaありおよび／またはなしでプレインキュベートされたFIXポリペプチドとの阻害因子のインキュベーションによって評価することができる。次いで、FIX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、阻害因子による阻害は、阻害因子とインキュベートされなかったFIX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FIX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。たとえば、AT-III／ヘパリンによる修飾FIXポリペプチドの阻害は、実施例5において記載されるように評価することができる。AT-III／ヘパリン複合体による野生型FIXaまたはFIXa変異体の阻害は、FIXaとAT-III／ヘパリンをインキュベートし、小分子基質、メシル-D-CHG-Gly-Arg-AMC（Pefluor FIXa；Pe

10

20

30

40

50

ntapharm) に対する F I X a の触媒活性を測定することによって評価される。そのようなアッセイは、F V I I I a 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。

【0384】

F I X 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、F V I I I a などのような補因子、F X および F I X などのような基質、ならびにアンチトロンビン I I I およびヘパリンなどのような阻害因子との F I X 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 S D S - P A G E、B I A c o r e (登録商標) アッセイ、表面プラズモン共鳴 (S P R)、蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T)、蛍光偏光 (F P)、等温滴定熱量測定 (I T C)、円二色性 (C D)、タンパク質断片補足性アッセイ (P C A)、核磁気共鳴 (N M R) 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トティング、蛍光偏光、ヒドロキシル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 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。

【0385】

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 I X 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。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 I X 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 S / P C 単独でのおよび P S / P C / F I X 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 [Harvey et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:8363-8369]。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 I X 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 [Sun et al., (2003) Blood 101:2277-2284]。

【0386】

2. 非ヒト動物モデル

非ヒト動物モデルは、修飾 F I X ポリペプチドの活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、疾患進行に対する効果をモニターするために、F I X 変異体の投与の前に、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。遺伝モデルもまた、有用である。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。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 I X 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、特に血友病のモデルを含むが、これらに限定されない。これらの非ヒト動物モデルは、野生型 F I X ポリペプチドと比較して、F I X 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。

【0387】

動物モデルはまた、修飾 F I X ポリペプチドの安定性、半減期、クリアランス、ならびに他の薬物動態学的および薬力学的特性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 I X 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。たとえば修飾 F I X ポリペプチドは、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、修飾 F I X ポリペプチドの薬物動態学的および薬力学的特性は、E L I S A またはラジ

オイムノアッセイによって、F I X a 活性およびタンパク質濃度について特定の時点で血清または血漿をモニターすることなどによって評価される（たとえば実施例 6 を参照されたい）。血液試料はまた、a P T T アッセイなどのような方法において凝固活性について試験することができる（たとえば実施例 6 を参照されたい）。

【0388】

修飾 F I X ポリペプチドは、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、F I X 欠損マウス（実施例 7 において利用されるものなど）および突然変異体 F I X ポリペプチドを発現するマウスを含み、修飾 F I X ポリペプチドを試験するために用いることができる [Wang et al., (1997) PNAS 94:11563-11566; Lin et al., (1997) Blood 90:3962-3966; Kundu et al., (1998) Blood 92: 168-174; Sabatino et al., (2004) Blood 104(9): 2767-2774; および Jin et al., (2004) Blood 104:1733-1739; 実施例 7 もまた、参照されたい]。

10

【0389】

F I X 欠乏症の他のモデルは、欠陥 F I X を発現するまたは肝臓が切除された血友病のイヌを含む [Evans et al., (1989) PNAS 86:10095; Mauser et al., (1996) Blood 88:3451; and Kay et al., (1994) PNAS 91:2353-2357]。

【0390】

3. 臨床アッセイ

20

多くのアッセイは、臨床的使用のための F I X の活性を評価するのに利用可能である。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 F I X 処置の治療効果を評価するためのアッセイは、F I X の血中レベルの評価 [たとえば、肥満度指数 (B M I) 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 F I X の測定]、未修飾 F I X および／もしくは野生型 F I X 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、F V I I 処置に対する表現型の応答を含む。F I X 活性を評価するための臨床アッセイの例は、Franchini et al., (2005) Thromb Haemost. 93(6):1027-1035; Shapiro et al., (2005) Blood 105(2):518-525; および White et al., (1997) Thromb. Haemost. 78(1):261-265 などにおいて見出すことができる。患者は、ルーチン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。

30

【0391】

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組成物は、本明細書において提供される。そのような組成物は、治療有効量の本明細書において記載される第 I X 因子ポリペプチドを含む。有効濃度の F I X 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。

40

【0392】

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、投与の特定のモードに適したものとなる。治療有効量の本明細書において記載される F I X ポリペプチドを含む医薬組成物は、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。

【0393】

1. 製剤

50

修飾 F I X 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、投与する医者の方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。本明細書において提供される医薬組成物は、単一投薬量（直接的）投与のためにまたは希釈もしくは他の修飾のために製剤することができる。製剤における化合物の濃度は、意図される処置に有効な、投与の際の量のデリバリーに有効である。典型的に、組成物は、単一投薬量の投与のために製剤される。組成物を製剤するために、化合物またはその混合物の重量分率は、処置される状態が軽減するまたは回復するような有効濃度で、選択される媒体において溶解される、懸濁される、分散される、または他の場合には混合される。

10

【0394】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、二重鎖 F I X a タンパク質として対象に対する投与のために製剤することができる。修飾 F I X ポリペプチドは、製剤前に、当技術分野において知られている任意の方法によって活性化することができる。たとえば、F I X は、ビーズ上に固定された F X I a などのような F X I a とのインキュベーションによって活性化することができる。カルシウムは、修飾 F I X a タンパク質の完全な活性化および正確な折り畳みを保証するためにこれらのプロセス中に含むことができる。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、単鎖タンパク質として投与のために製剤することもできる。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、単鎖形態および二重鎖形態が、自己活性化を排除するまたは制御するために、培地の適切な選択によって、任意の比において医薬組成物において含有されるように、製剤することができる。

20

【0395】

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。有効濃度は、標的とされる状態を回復させるのに十分であり、経験的に決定することができる。組成物を製剤するために、化合物の重量分率は、標的とされる状態が軽減するまたは回復するような有効濃度で、選択される媒体において溶解される、懸濁される、分散される、または他の場合には混合される。

30

40

【0396】

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、他のものは、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

50

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、アラビ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、ボーマンパーク阻害因子、コンジュゲーションボーマンパーク阻害因子、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。

【0397】

製剤は、投与のモードに適するはずである。たとえば、修飾FIX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。

【0398】

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екチン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 et al., (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

10

20

30

40

50

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、ステアリルアルコール、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。

【0399】

活性化化合物は、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。

10

【0400】

a. 投薬量

投与される治療剤の正確な量または用量は、特定のFIXポリペプチド、投与の経路、ならびにその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。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。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FIXポリペプチドおよび天然FIX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。たとえば、rFIXaに活性化された組換えFIX (rFIXa) ポリペプチド、BeneFIX (登録商標) 第IX因子は、様々な用量で、出血の処置のためにならびに予防的および手術背景において、血友病Bを有する患者に投与されてきた。組換えFIXを用いる処置の投薬量および持続時間は、第IX因子欠乏症の重症度、出血の位置および程度、ならびに患者の臨床状態、年齢、および第IX因子の回収率に依存する。たとえば重症の血友病Bを有する患者 ($< 1 \text{ IU/dL}$ のFIX活性; 正常活性の1% (1 IU は、 1 mL の正常なプールされた血漿における第IX因子の活性に相当する)) は、中程度の ($1 \sim 5 \text{ IU/dL}$ のFIX活性; 正常活性の1~5%) または軽度の ($> 5 \sim < 40 \text{ IU/mL}$ のFIX活性; 正常活性の $> 5 \sim < 40 \%$) 血友病Bを有する患者よりも、FIXの注入をより必要とするであろう。BeneFIX (登録商標) 第IX因子の初回推定用量は、以下の式を使用して決定することができる: 必要とされる単位 = 体重 (kg) $\times$ 所望される第IX因子の増加 (正常の IU/dL または%) $\times$ 観察される回収率の逆数 (IU/dL 当たりの IU/kg)。成人および小児 (< 15 歳) 患者による臨床研究において、1キログラムの体重当たりのBeneFIXの 1 IU は、第IX因子の循環活性を以下のように増加させた: 成人: $0.8 \pm 0.2 \text{ IU/dL}$ [範囲 $0.4 \sim 1.2 \text{ IU/dL}$]; 小児: $0.7 \pm 0.3 \text{ IU/dL}$ [範囲 $0.2 \sim 2.1 \text{ IU/dL}$]。したがって、成人患者については: 必要とされる第IX因子 IU の数 (IU) = 体重 (kg) $\times$ 所望される第IX因子の増加 (%または IU/dL) $\times 1.3$ (IU/dL 当たりの IU/kg) および小児患者については: 必要とされる第IX因子 IU の数 (IU) = 体重 (kg) $\times$ 所望される第IX因子の増加 (%または IU/dL) $\times 1.4$ (IU/dL 当たりの IU/kg)。表11は、様々な出血エピソードのために使用される典型的な投薬を記載する。

20

30

40

【0401】

表11.

【表 1 1】

出血の種類	必要とされる循環FIX活性(%またはIU/dL)	投薬間隔(時間)	療法の持続時間(日)
軽症: 無併発性の関節血症、表在性の筋肉、または軟部組織	20-30	12-24	1-2
中程度: 切開による筋肉内もしくは軟部組織、粘膜、抜歯、または血尿	25-50	12-24	出血が停止し、 治癒が始まるまで処置、約2~7日間
重度: 咽頭、咽頭後部、後腹膜腔、CNS、手術	50-100	12-24	7-10

10

【0 4 0 2】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、天然組換え F I X 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。たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間、またはそれ以上などのような、それほど頻繁でない投薬間隔で投与することができる。他の例では、より少ない用量の修飾 F I X ポリペプチドを投与することができる。たとえば、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、凝固を達成するために一度だけ投与することができる。いくつかの実施形態では、修飾 F I X の投薬量が、天然 F I X と比較して低下する。たとえば、投薬量は、1 I U / k g、2 I U / k g、3 I U / k g、4 I U / k g、5 I U / k g、6 I U / k g、7 I U / k g、8 I U / k g、9 I U / k g、10 I U / k g、20 I U / k g、30 I U / k g、40 I U / k g もしくは 50 I U / k g、60 I U / k g、70 I U / k g、80 I U / k g、90 I U / k g、または 100 I U / k g 未満またはそれくらいとすることができる。処置の用量、持続時間、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 F I X と比較した、修飾 F I X 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 F I X ポリペプチドよりも長い半減期を示す修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X 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 F I X 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 F I X ポリペプチドを使用する、治療効果に必要なとされる投薬量は、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。

20

30

【0 4 0 3】

40

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、滅菌した非経口液剤または非経口懸濁剤、経口液剤または懸濁剤、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

50

たとえば、F I X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F I Xポリペプチドをもたらしように、F I X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。

【0404】

10

2. 修飾F I Xポリペプチドの投与

本明細書において提供されるF I Xポリペプチド（つまり活性化合物）は、体液または他の組織試料などのような混合物をF I X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F I X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る。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F I X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、1時間ごと、2時間ごと、3時間ごと、4時間ごとに、またはそれ以上で投与することができる。

20

【0405】

投与に最も適した経路は、処置されることとなる疾患状態、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、F I Xポリペプチドは、約2～5分間の投与（注入）時間と共に、静脈内ボラス注射によって投与されるであろう。他の例では、F I X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、投薬量を下げするために、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）。他の例では、出血障害の場所が、F I X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。

30

40

【0406】

修飾F I X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。

【0407】

50

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。

【0408】

3. 修飾F I Xポリペプチドをコードする核酸の投与（遺伝子療法）

修飾F I X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。

【0409】

修飾F I X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F I Xポリペプチドは、修飾F I Xポリペプチドをコードする核酸分子として投与することができ、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レメントを指す。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。

【0410】

コード核酸分子の発現による修飾F I X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ムのままとでき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F I X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F I X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F I X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。

【0411】

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、エピソーム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F I X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F I X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F I X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、対象に局所的および／または全身的に投与される。代わりに、修飾F I X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^{14} 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。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。F I X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、F I X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 [Margaritis et al. (2004) J Clin Invest 113:1025-1031]。他の例では、F I X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。F I X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

【0412】

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。A C E Sなどのような人工染色体 [Lindenbaum et al., (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 (M A C) 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。M A Cの中で特有に、哺乳動物サテライト D N A ベースの人工染色体発現 (A C E) 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 A C E は、様々なレシピエント細胞株に再導入することができ、A C E は、長期間、選択圧の非存在下において A C E 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 L M T K (一) および C H O 細胞中で達成された。

20

【0413】

修飾 F I X 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 (Y A C) 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 [A d 2 ; Ketner et al. (1994) PNAS 91: 6186-6190] ならびに Y A C 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。Y A C 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 F I X 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

【0414】

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

【0415】

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 F I X 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

50

たは前駆細胞、特にたとえば、骨髄、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。

【0416】

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FIX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

【0417】

修飾FIX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FIX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、治療的効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FIX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

【0418】

修飾FIX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FIX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FIX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FIX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FIX発現を調節するために使用されてきた[Srouf et al., (2003) Thromb. Haemost. 90(3):398-405]。

30

【0419】

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。

40

【0420】

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FIX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FIX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FIX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。

【0421】

H. 治療上の使用

本明細書において提供される修飾FIXポリペプチドおよび核酸分子は、未修飾FIX

50

が利用される任意の状態の処置に使用することができる。したがって、たとえば、修飾 F I X ポリペプチドは、血友病などのような、先天性および後天性の出血障害を含む出血障害の処置のために凝血促進薬として使用することができる。典型的に、そのため、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、出血障害の処置において使用される凝血促進薬である。他の特定の例では、しかしながら、修飾 F I X ポリペプチドを、抗凝血薬として使用することができる。たとえば、その基質、F X に対する触媒活性の欠乏をもたらす、1 つまたは複数の修飾をも含有する、高度にグリコシル化された修飾 F I X ポリペプチドは、血栓症の障害を処置するために抗凝血薬として使用することができる。

【0422】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、単独でまたは他の作用物質と組み合わせて治療活性を有する。本明細書において提供される修飾ポリペプチドは、治療活性を保持するが、改善された薬物動態学および薬力学的特性、阻害因子に対する抵抗性の増加、ならびに／または改善された触媒活性などのような修飾された特性を示すように設計される。そのような修飾された特性および活性は、たとえば、ポリペプチドの治療有効性を改善することができる。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドおよびコード核酸分子は、未修飾 F I X が利用される任意の状態の処置に使用することができる。この部は、例示的な使用および投与方法を提供する。これらの記載される療方は、単に例示的なものであり、修飾 F I X ポリペプチドの適用を限定しない。

【0423】

本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、様々な治療薬および F I X が利用される診断法において使用することができる。そのような方法は、記載されるおよび以下に挙げられる生理学的状態および医学的状态の処置の方法を含むが、これらに限定されない。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、野生型 F I X と比較して、同じ効果を達成するためのより低い用量を含む、インビボ活性および治療効果の改善、より持続される治療効果、ならびに投与および処置における他の改善を示す。

【0424】

本明細書において記載される修飾 F I X ポリペプチドは、未修飾 F I X ポリペプチドと比較した、薬物動態学および薬力学的特性の改善、触媒活性の増加、阻害因子に対する抵抗性の増加、および／または血液凝固活性の増加を示すことができる。そのようなポリペプチドは、たとえば、先天性および後天性の出血障害を含む出血障害の処置のために凝血促進薬として使用することができる。いくつかの例では、非天然グリコシル化部位を有する、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドはまた、修飾 F I X ポリペプチドが抗凝固薬となり、たとえば、血栓症の疾患および障害を処置するために使用することができる、凝固を阻害する修飾 F I X ポリペプチドをもたらし修飾をも含有する。本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、より長く続く、より安定した療法を送達するために使用することができる。修飾 F I X ポリペプチドを使用する治療的改善の例は、より低い投薬量、より少ないおよび／またはより頻度が低い投与、副作用の減少、ならびに治療効果の増加を含むが、これらに限定されない。

【0425】

典型的に、本明細書において提供される修飾 F I X ポリペプチドは、凝血促進薬であり、先天性および後天性の出血障害を含む出血障害を処置するために使用することができる。特定の例では、修飾 F I X ポリペプチドが、他の修飾および未修飾 F I X ポリペプチドが処置のために使用されている治療方法における使用について意図される。単独でまたは他の凝血促進薬を含む他の作用物質と組み合わせて、修飾 F I X ポリペプチドを用いて処置す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、血液疾患、出血性障害、血友病、特に血友病 B、外傷および手術と関連する出血を含む後天性の血液障害を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、F I X ポリペプチドによって処置されることとなる出血が、脳、内耳領域、眼、肝臓、肺、腫瘍組織、胃腸管などのような器官において生じる。他の実施形態では、出血が、出血性胃炎および大量の子宮出血などにおいてびまん性である。

【0426】

血友病などのような出血障害を有する患者は、抜歯を含む手術または外傷の間に、出血および過度の出血のために危険にさらされることが多い。そのような患者は、修飾F I Xポリペプチドを用いて処置することができる急性出血性関節症（関節における出血）、慢性血友病性関節症、血腫（筋肉、腹膜後、舌下、および咽頭後方など）、他の組織における出血、血尿（腎管からの出血）、脳出血、ならびに消化管出血（U G I出血など）を有することが多い。したがって、いくつかの例では、修飾F I Xポリペプチドが、対象における、外傷または手術による出血エピソードまたは血小板の数もしくは活性の低下を処置するために使用される。手術を受ける患者のための例示的な方法は、出血を予防するための処置および手術の前、その間、またはその後の処置を含む。

10

【0427】

典型的に、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、修飾F I Xポリペプチドと比較して、改善された血液凝固活性を示すが、いくつかの例では、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドが、1つまたは複数の非天然グリコシル化部位を含有することができ、また、機能的なペプチダーゼ活性を欠く。そのような修飾F I Xポリペプチドは、血液凝固を阻害するための治療方法において使用することができる（たとえば米国特許第6, 315, 995号を参照されたい）。血液凝固を阻害する修飾F I Xポリペプチドは、虚血性および血栓症の障害のための処置の抗凝固方法において使用することができる。深部静脈血栓症（D V T）または浅静脈血栓症（S V T）を有する患者などのような、過度の凝固の危険性が増加している外科患者において、抗凝血薬である本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、手術における過度の凝固を予防するために投与することができる。いくつかの場合において、処置は、F I X単独で実行される。いくつかの場合において、F I Xは、処置されることとなる状態または疾患によって必要とされるように、さらなる抗凝固因子と共に投与される。

20

【0428】

修飾F I Xポリペプチドを用いる疾患および状態の処置は、注射、経肺、経口、および経皮投与を含むが、これらに限定されない、本明細書において記載される適した製剤を使用する、投与の任意の適したルートによって達成することができる。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、上記に記載されるB e n e F I X（登録商標）凝固因子I X（組換え体）の推奨される投薬量などのような、組換えF I Xポリペプチドおよび天然F I X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。高度にグリコシル化され、インビボにおける半減期が増加したまたは阻害因子に対する抵抗性が増加したもしくは触媒活性が増加した修飾F I Xポリペプチドは、投薬量および／または頻度の低下に有効になり得る。未修飾F I Xポリペプチドについての投薬量および投薬量レジメンは、本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドについての投薬量を決定するためのガイダンスとして使用することができる。未修飾F I Xと比較した、修飾F I Xの半減期および活性のレベルなどのような因子は、そのような決定をなす際に使用することができる。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。

30

40

【0429】

投薬量レベルおよびレジメンは、知られている投薬量およびレジメンに基づいて決定することができ、必要ならば、修飾ポリペプチドの特性の変化に基づいて推定することができるおよび／または様々な因子に基づいて経験的に決定することができる。そのような因子は、個人の体重、健康状態、年齢、利用される特異的な化合物の活性、性別、食事、投与の時間、排泄の速度、薬剤の組み合わせ、疾患の重症度および過程、ならびに疾患に対する患者の素因および処置する医師の判断を含む。有効成分、ポリペプチドは、典型的に、薬学的に有効な担体と組み合わせられる。単一剤形または多剤形を産生するために担体物質と組み合わせることができる有効成分の量は、処置される宿主および投与の特定のモードに依存して変わり得る。

50

【0430】

血液の凝固時間に対するF I Xポリペプチドの効果は、全血部分トロンボプラスチン時間（P T T）、活性化部分トロンボプラスチン時間（a P T T）、活性化凝固時間（A C T）、再石灰化活性化凝固時間、またはリーホワイト凝固時間を含むが、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凝固試験のいずれかを使用してモニターすることができる。

【0431】

患者の状態の改善に際して、必要であれば、維持用量の化合物または組成物を投与することができ、投与量、剤形、もしくは投与の回数またはそれらの組合せを修正することができる。いくつかの場合において、対象は、疾患症状のあらゆる再発に際してまたはスケ
10 ジューリングされた投薬量に基づいて、長期ベースでの断続的な処置を必要とし得る。他の場合において、さらなる投与は、出血、外傷、または手術手技などのような急性事象に応じて必要とされ得る。

【0432】

血友病

血友病は、1つまたは複数の血液凝固因子における欠乏症によって引き起こされる出血障害である。それは、組織損傷の部位に血餅を形成する能力の減少によって特徴づけられる。先天性のX連鎖血友病は、血友病Aおよび血友病Bまたはクリスマス病を含み、これらは、それぞれ、F V I I IおよびF I Xにおける欠乏症によって引き起こされる。血友病Aは、10, 0000人の男性のうち1人の割合で起こるが、血友病Bは、50, 00
20 0人の男性のうち1人に起こる。

【0433】

血友病を有する患者は、再発性の関節および筋肉出血に罹患し、これは、特発性のものまたは外傷に応じてのものとして行うことができる。出血は、重症の急性の痛みを引き起こし、移動を制限し、滑膜肥大を含む二次的合併症に至り得る。さらに、関節において再発する出血は、慢性滑膜炎を引き起こし得、これは、関節の損害を引き起こし、滑膜、軟骨、および硬骨を破壊し得る。

【0434】

本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドおよび本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドをコードする核酸は、血友病と関連する出血状態の処置を含め
30 て、血友病のための療法において使用することができる。本明細書において提供される修飾F I Xポリペプチドは、たとえば、特発性出血エピソードを制御するもしくは予防するためにまたは外傷もしくは手術手技に応じての出血を制御するもしくは予防するために使用することができる。

【0435】

本明細書における修飾F I Xポリペプチドは、改善された血清半減期、阻害因子に対する抵抗性の増加、触媒活性の増加、および／または血液凝固活性の増加などのような、薬物動態学および薬力学的特性の改善を示すことができる。したがって、修飾F I Xポリペプチドは、血友病のための、より長く続くまたは他の場合には改善された療法を送達するために使用することができる。修飾F I Xポリペプチドを使用する治療的改善の例は、
40 たとえば、より低い投薬量、より少ないおよび／またはより頻度が低い投与、副作用の減少、ならびに治療効果の増加を含むが、これらに限定されない。

【0436】

修飾F I Xポリペプチドは、たとえば、動物モデルを使用することによって、治療有効性について試験することができる。たとえば、F I X欠損マウスまたは血友病についての任意の他の知られている疾患モデルは、修飾F I Xポリペプチドを用いて処置することができる。疾患症状の進行および表現型は、修飾F I Xポリペプチドの効果を評価するためにモニターされる。修飾F I Xポリペプチドはまた、偽薬対照および／または未修飾F V I Iを使用する対照と比較した、インビボにおける有効性を評価するために、臨床試験などにおいて動物モデルおよび対象に投与することもできる。
50

【0437】

a 血友病B

血友病Bは、F I X治療薬の投与により有効に管理することができる。重症の血友病Bを有する患者は、 $<1\text{ IU/dL}$ のF I X活性（正常活性の1%）を有し、中程度の血友病Bを有する患者は、 $1\sim5\text{ IU/dL}$ のF I X活性（正常活性の1~5%）を有し、軽度の血友病Bを有する患者は、 $>5\sim<40\text{ IU/mL}$ のF I X活性（正常活性の $>5\sim<40\%$ ）を有する。適切な量のF I Xを用いる、特定の出血エピソードの適した予防的な代理の療法および／または処置を用いると、患者は、標準の寿命に達することができる。F I Xの投与は、手術、外傷の間の、抜歯の間の、または関節血症、血尿、鼻出血もしくは胃腸管出血などのような粘膜皮膚の出血、骨膜下骨もしくは軟部組織における囊胞性の病変、または頭蓋出血、脊柱管出血などのような神経学的合併症を引き起こす血腫と関連する出血を軽減するように、出血を制御するのを支援することができる。血友病を有する患者における死亡は、中枢神経系における出血の結果であることが多い。血友病患者における他の深刻な合併症は、凝固因子治療薬および疾患に対する阻害因子の発生を含む。

10

【0438】

血友病B患者におけるF I X遺伝子における最も頻繁な改変は、点突然変異、特にミスセンス突然変異である。同定されたF I X突然変異のほとんどは、F I X遺伝子のコード領域におけるアミノ酸残基において起こり、進化的に保存されたアミノ酸に影響を及ぼすことが多い。血友病の重症度は、突然変異の性質に依存する。コード領域における突然変異は、プロテアーゼ活性、補因子結合、シグナルペプチド、またはプロペプチド切断の改変、翻訳後修飾、およびその活性化形態へのF I Xの切断の阻害を含む、F I Xポリペプチドの多くの異なる特性または活性に影響を及ぼすことができる。他の種類の点突然変異は、不安定な切断F I Xポリペプチドを産生するナンセンス突然変異ならびに最終的に異常なF I X分子をもたらすフレームシフト突然変異（小さな欠失および挿入）を含む。さらに、F I X点突然変異は、プロモーター領域中に見出すことができ、これは、いくつかの特定の遺伝子調節タンパク質についての認識配列を破壊し、凝固因子I Xの転写の低下をもたらし得る。転写異常の結果としてのF I Xの減少は、血友病Bライデンと呼ばれる。プロモーター領域における例示的な突然変異は、HNF-4結合部位の崩壊を含み、これは、アンドロゲン受容体によるF I X転写の調節に影響を及ぼす。この種の血友病の重症度は、血液中のアンドロゲンのレベルによって決定され、これは、思春期の間に増加し、F I X転写欠乏症を部分的に軽減する [Kurachi et al. (1995)]。他のミスセンスヌクレオチド変化は、第I X因子一次RNA転写産物のプロセッシングに影響を及ぼす。たとえば、いくつかの突然変異は、進化的に保存されたドナースプライス（GT）およびアクセプタースプライス（AG）コンセンサス配列に起こり、これは、潜在性のスプライスジャンクションを生成し、スプライソソームのアセンブリーを破壊し得る。血友病のいくつかの重症の症例（約10%）は、F I X遺伝子における大きな欠失の症状を示す。

20

30

【0439】

F I X欠乏症、したがって血友病Bの処置は、ほとんどの場合、F I Xの組換え形態、精製血漿F I X調製物、または精製血漿濃縮物を含むF I Xの投与を伴う。したがって、同様に、本明細書における修飾F I Xポリペプチドおよび修飾F I Xポリペプチドをコードする核酸は、血友病Bの処置のために使用することができる。本明細書における修飾F I Xポリペプチドは、改善された血清半減期、阻害因子に対する抵抗性の増加、触媒活性の増加、および／または血液凝固活性の増加などのような、薬物動態学および薬力学的特性の改善を示すことができる。したがって、修飾F I Xポリペプチドは、血友病のための、改善された療法を送達するために使用することができる。修飾F I Xポリペプチドを使用する治療的改善の例は、たとえば、より低い投薬量、より少ないおよび／またはより頻度が低い投与、副作用の減少、ならびに治療効果の増加を含むが、これらに限定されない。

40

【0440】

b. 血友病A

50

血友病 A は、血友病の全ての症例の約 85% を占めるが、X 染色体上の第 VIII 因子遺伝子における（1 つまたは複数の）突然変異に起因し、FVIII タンパク質の欠乏症または機能障害に至る。BeneFIX（登録商標）凝固因子 IX（組換え体）などのような組換え FIX ポリペプチドまたは血漿精製 FIX ポリペプチドを含む天然 FIX ポリペプチドを用いる血友病 A の処置は、典型的に、天然 FIX ポリペプチドが凝固を達成するための触媒活性のために FVIIIa を必要とするので、推奨されない。しかしながら、FIX 内因活性を増加させるための 1 つまたは複数の修飾を含有する、本明細書において記載されるものなどのような修飾 FIX ポリペプチドは、血友病 B の処置において使用することができる。そのようなポリペプチドは、FVIII 非依存性活性を有し、したがって、血友病 A 患者における凝固薬として機能することができる。たとえば、1 つもしくは複数の非天然グリコシル化部位を導入するもしくは排除するための 1 つもしくは複数の修飾ならびに／または AT-III および／もしくはヘパリンに対する抵抗性を増加させるための 1 つもしくは複数の修飾を含有するならびに FVIIIa の非存在下において修飾 FIX ポリペプチドの活性を増加させるための 1 つもしくは複数の修飾をも含有するものなどのような上記に記載される修飾 FIX ポリペプチドは、血友病 A を有する患者における出血エピソードを処置するために使用することができる。

10

【0441】

FIX ポリペプチドが FVIII 非依存性の様式において作用することができるような、FIX ポリペプチドの内因活性を増加させるための修飾は、上記および他のところに記載されており [たとえば Hopfner et al., (1997) EMBO J. 16:6626-6635; Kolkman et al., (2000) Biochem. 39:7398-7405; Sichler et al., (2003) J. Biol. Chem 278:4121-4126; Begbie et al., (2005) Thromb Haemost. 94(6):1138-47、米国特許第 6,531,298 号ならびに米国特許出願公開第 20080167219 号および第 20080214461 号を参照されたい]、アミノ酸置換 V86A、V86N、V86D、V86E、V86Q、V86G、V86H、V86I、V86L、V86M、V86F、V86S、V86T、V86W、V86Y、Y259F、A261K、K265T、E277V、E277A、E277N、E277D、E277Q、E277G、E277H、E277I、E277L、E277M、E277F、E277S、E277T、E277W、E277Y、R338A、R338V、R338I、R338F、R338W、R338S、R338T、Y345F、I383V および E388G を含むが、これらに限定されない。たとえば、本明細書において提供される修飾 FIX ポリペプチドは、アミノ酸交換 Y259F/K265T、Y259F/K265T/Y345F、Y259F/A261K/K265T/Y345F、Y259F/K265T/Y345F/I383V/E388G または Y259F/A261K/K265T/Y345F/I383V/E388G を含み、内因活性の増加を示すことができる。そのため、そのような修飾 FIX ポリペプチドは、血友病 A の処置において使用することができる。

20

30

【0442】

J. 併用療法

修飾 FIX ポリペプチドおよび本明細書において記載される修飾 FIX ポリペプチドをコードする核酸分子のいずれも、他の生物学的製剤、小分子化合物、および手術を含むが、これらに限定されない他の治療剤または手技と組み合わせて、その前に、それと断続的に、またはそれに続いて、投与することができる。FIX が指示されるまたは使用されてきたならびに他の作用物質および処置が利用可能である、上記に例証されるものを全て含む任意の疾患または状態について、FIX は、それと組み合わせて使用することができる。したがって、本明細書において提供される修飾 FIX ポリペプチドは、同様に使用することができる。処置されることとなる疾患または状態に依存して、例示的な組合せは、他の血漿精製凝固因子または組換え凝固因子、凝血促進薬、抗凝血薬、抗凝固抗体、グリコサミノグリカン、ヘパリン、ヘパリノイド、ヘパリン誘導体、ヘパリン様の薬剤、ワルファリンおよびクマリン誘導体などのようなクマリンとの組合せを含むが、これらに限定されない。凝血促進特性を有する、本明細書において提供される修飾 FIX ポリペプチドとの併用療法において使用することができるさらなる凝血促進薬は、ビタミン K、ビタミン K 誘導体、他の凝固因子、およびプロテイン C 阻害因子を含むが、これらに限定されない。抗凝固特性を有する、本明細書において提供される修飾 FIX ポリペプチドとの併用療法において使用することができるさらなる抗凝血薬は、 β 2 アドレナリン受容体アンタゴ

40

50

ニスト、神経ペプチド V 2 アンタゴニスト、プロスタサイクリン類似体、トロンボキサシンターゼ阻害因子、カルシウムアゴニスト、エラスターゼ阻害因子、非ステロイド系炎症性分子、トロンビン阻害因子、リボキシゲナーゼ阻害因子、F V I I a 阻害因子、F X a 阻害因子、ホスホジエステラーゼ I I I 阻害因子、フィブリノゲン、ビタミン K アンタゴニスト、糖タンパク質 I I b / I I I a アンタゴニストを含むが、これらに限定されない。

【0443】

K. 製品およびキット

修飾 F I X ポリペプチドをコードする核酸についての修飾 F I X ポリペプチドまたはその誘導体もしくは生物学的活性部分の医薬化合物は、包装材料、F I X 媒介性の疾患または障害の処置に有効な医薬組成物、および修飾 F I X ポリペプチドまたは核酸分子が、F I X 媒介性の疾患または障害の処置について使用されることになっていること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。

10

【0444】

本明細書において提供される製品は、包装材料を含有する。医薬製品の包装における使用のための包装材料は、当業者らによく知られている。たとえば、それぞれ、その全体が本明細書において組み込まれる米国特許第 5, 323, 907 号、第 5, 033, 252 号、および第 5, 052, 558 号を参照されたい。医薬包装材料の例は、ブリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、容器、シリンジ、ボトル、ならびに選択される製剤ならびに投与および処置の意図されるモードに適した任意の包装材料を含むが、これらに限定されない。任意の F I X 媒介性の疾患または障害に対する様々な処置のように、本明細書において提供される化合物および組成物の多くの製剤が、意図される。

20

【0445】

修飾 F I X ポリペプチドおよび核酸分子はまた、キットとして提供することもできる。キットは、本明細書において記載される医薬組成物および投与のためのアイテムを含むことができる。たとえば、修飾 F I X は、シリンジ、吸入器、投薬カップ、ドロPPER、またはアプリケーションなどのような投与のためのデバイスと共に提供することができる。キットは、所望により、投薬量、投薬レジメン、および投与のモードのための説明書を含む、適用のための説明書を含むことができる。キットはまた、本明細書において記載される医薬組成物および診断のためのアイテムを含むことができる。たとえば、そのようなキットは、F I X の濃度、量、もしくは活性を測定するためのアイテムまたは対象の F I X 調節システムを含むことができる。

30

【0446】

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。

【実施例】

【0447】

【実施例 1】

【0448】

40

第 I X 因子ポリペプチドのクローニングおよび発現

A. F I X 遺伝子のクローニング

461 アミノ酸ヒト F I X 前駆体ポリペプチド (P00740; 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 型末端反復配列の 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 23) 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。

50

【0449】

インフュージョンプロセスのためにヒト免疫グロブリン1 (h I g G 1) F c 部分を含
 まないプラスミド p F U S E を、p F U S E - A c c - F 1 フォワードプライマー：G T
 G C T A G C T G G C C A G A C A T G A T A A G (配列番号24) および p F U S E -
 A c c - R 3 リバースプライマー：C A T G G T G G C C C T C C T T C G C C G G T G
 A T C (配列番号25) でのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いて直線化し、アクセ
 プターDNAとして用いた。F I X の全長コード配列を、F I X - w t s p - I n v i v
 o - F 1 フォワードプライマー：C G A A G G A G G G C C A C C A T G C A G C G C G
 T G A A C A T G A T C (配列番号26) および F I X - I n v i v o - R 1 リバースプ
 ライマー：T G T C T G G C C A G C T A G C A C T T A A G T G A G C T T T G T T T
 T T T C C (配列番号27) と共にヒト F I X c D N A (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 F I X 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 F I X 「A T G」開
 始および「T A A」終止コドンの相補配列の両方に下線をつけた。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す。標準的
 P C R 反応およびサーモサイクリング条件を P h u s i o n H i g h - F i d e l i t y
 M a s t e r M i x K i t (N e w E n g l a n d B i o l a b s) 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 P C R 産物の両方を
 、次いでイー・コリ由来 d a m メチル化 P C R 鋳型バックグラウンドを除去するために D
 p n I 制限酵素で消化した。次いでそれらを混合し、I n - F u s i o n 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。反応混合物をイー・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) に形質転換した。コロ
 ニーを 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。

【0450】

B. F I X 変異体の生成

F I X 変異体を、新たに合成する 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 I X c D N A 配列を鋳型として含有する精製した二
 重鎖スーパーコイル p F U S E 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 p F U S E 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 I X 遺
 伝子上の望まれる位置 (複数可) での突然変異 (複数可) の組み込みを検証するために配
 列決定した。

【0451】

F I 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表12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 A 1 0 3 N / N 1 0 5 S (キ
 モトリプシンナンバリングによる A [103] N / N [105] S ; 配列番号77) を含
 有する F I X 変異体を生成するために、A 1 0 3 N / N 1 0 5 S フォワードプライマーお
 よび A 1 0 3 N / N 1 0 5 S フォワードに相補的であるプライマーを 9 - b p 「G C T g
 a t A A C」野生型配列を 9 - b p 「A A T g a t A G C」突然変異配列で置き換えるた

めに用いた（変更したヌクレオチドトリプレットを大文字で記す）。

【 0 4 5 2 】

下の表 1 2 は、F I 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（キモトリブシンナンバリングによる）、突然変異体に対応する。

【 0 4 5 3 】

表 12.

【 表 1 2 - 1 】

プライマー名	プライマー配列(5'から3')	配列番号
F9-A[103]N/ N[105]S-For	gtaaaaatagtAATgatAGCaaggtggttg	28
F9-D[104]N/ K[106]S-For	gtaaaaatagtctAATaacAGTgtggttgctcctgtactg	29
F9-K[106]N/ V[108]S-For	gtgctgataacAATgtgAGTgtgctcctgtactg	30
F9-D[85]N-For	gaactgtgaattaAATgtaacatgtaac	31
F9-T[148]A-For	ctcacccgtgctgagGCTgttttctctgatgtg	32
F9-D39N/F41T-For	gaatggtaaagttAATgcaACCTgtggaggctctatc	33
F9-K63N-For	gaaactggtgttAACattacagttgtcgc	34
F9-I86S-For	gcgaaatgtgAGTcgaattattcctc	35
F9-A95bS-For	caactacaatgcaAGTattaataagtacaac	36
F9-K243N-For	aaggaaaaaacaAATctcacttaagtctagctg	37
F9-E240N-For	ctggattaagAATaaaacaaagctc	38
F9-E74N-For	caggtgaacataatattAACgagacagaaacatacag	39
F9-T76N/H78S-For	gaacataatattgaggagAACgaaAGTAcagagcaaaag	40
F9-K82N/N84S-For	cagaacatacagagcaaAATcgaTCTgtgattcgaattattc	41
F9-L153N-For	gggagatcagctAATgttcttcagtac	42
F9-F145N/H147S-For	ctggggaagagtcAACTCCaaaggagatcag	43
F9-K222N/K224S-For	gagtggtcaatgAACggcTCAtatggaatatatac	44
F9-S151N/L153S-For	cttcacaaagggagaAATgctTCAGttcttca	45
F9-N95S-For	cctcaccacaactacAGTgcagctattaataagtacaacc	46
F9-Y117N-For	cttagtgctaacagcAACgttacacctatttgc	47
F9-G149N-For	ggaagagtcttcacaaaAACagatcagcttagttc	48
F9-R150N/A152S-For	gtcttcacaaagggAACtcaTCTttagttcttcagtac	49
F9-R150A-For	gtcttcacaaagggGCAtcagcttagttcttcag	50
F9-R150E-For	gtcttcacaaagggGAAtcagcttagttcttcag	51
F9-R150Y-For	gtcttcacaaagggTACttagcttagttcttcag	52
F9-R143Q-For	gtaagtggctggggaCAAgcttcacaaaggg	53

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

F9-R143A-For	gtaagtggctggggaGCAgtcttcacaaaggg	54
F9-R143Y-For	gtaagtggctggggaTACgtcttcacaaaggg	55
F9-R143L-For	gtaagtggctggggaCTGgtcttcacaaaggg	56
F9-V38M-For	gttttgaatggtaaaATGgatgcattctgtggaggc	57
F9-V38Y-For	gttttgaatggtaaaTACgatgcattctgtggaggc	58
F9-D39M-For	gttttgaatggtaaagttATGgcattctgtggaggc	59
F9-D39Y-For	gttttgaatggtaaagttTACgcattctgtggaggc	60
F9-A40M-For	gttttgaatggtaaagttgatATGttctgtggaggctctatc	61
F9-A40Y-For	gttttgaatggtaaagttgatTACttctgtggaggctctatc	62
F9-R233A/K230A-For	caaatatggaatatataaccGCAgtatccGCAatgtcaactggattaag	63
F9-R233E/K230E-For	caaatatggaatatataaccGAAgtatccGAAatgtcaactggattaag	64
F9-R233A-For	gaatatataccaaggtatccGCAatgtcaactggattaag	65
F9-R233E-For	gaatatataccaaggtatccGAAatgtcaactggattaag	66
F9-K230A-For	caaatatggaatatataaccGCAgtatcccggtatgtc	67
F9-K230E-For	caaatatggaatatataaccGAAgtatcccggtatgtc	68
F9-K126E-For	cctatttgattgctgacGAAgaatacacgaacatc	69
F9-K126A-For	cctatttgattgctgacGCAgaatacacgaacatc	70
F9-R165A-For	gttccacttggtgacGCAgcccacatgtcttcgatct	71
F9-R165E-For	gttccacttggtgacGAAgcccacatgtcttcgatct	72
F9-R170A-For	cgagccacatgtcttGCActacaaaagttcacc	73
F9-R170E-For	cgagccacatgtcttGAActacaaaagttcacc	74
F9-D[64]N-For	ggcggcagttgcaagAACgacattaattcctatG	273
F9-D[64]A-For	ggcggcagttgcaagGCTgacattaattcctatG	274
F9-N[157]Q-For	cctgatgtggactatgtaCAGtctactgaagctgaaacc	275
F9-N[157]D-For	cctgatgtggactatgtaGACtctactgaagctgaaacc	276
F9-N[167]Q-For	gaaaccattttggatCAGatcactcaaagcacc	277
F9-N[167]D-For	gaaaccattttggatGACatcactcaaagcacc	278
F9-S[61]A-For	ccatgtttaaatggcggcGCTtgcaaggatgacattaattcc	279
F9-S[53]A-For	gatggagatcagtgtgagGCTaatccatgtttaaatggc	280

10

20

30

【表 1 2 - 3】

F9-T[159]A-For	gtggactatgtaaattctGCTgaagctgaaaccattttg	281
F9-T[169]A-For	CattttggataacatcGCTcaaagcacccaatcatttaataatgac	282
F9-T[172]A-For	gataacatcactcaaaagcGCTcaatcatttaataatgac	283
F9-T[179]A-For	caatcatttaataatgacttcGCTcgggttggtggagaaG	284
F9-Y[155]F-For	gtttttcctgatgtggacTTCgtaaattctactgaagctG	285
F9-Y[155]H-For	gtttttcctgatgtggacCACgtaaattctactgaagctG	286
F9-Y[155]Q-For	gtttttcctgatgtggacCAGgtaaattctactgaagctG	287
F9-S[158]A-For	gtggactatgtaaattGCTactgaagctgaaacc	288
F9-S[158]D-For	gtggactatgtaaattGACactgaagctgaaacc	289
F9-S[158]E-For	gtggactatgtaaattGAGactgaagctgaaacc	290
F9-R165S-For	gttccacttggtgacAGCgccacatgtcttcgatct	291
F9-R170L-For	cgagccacatgtcttCTGtctacaagtccacc	292
F9-K148N-For	ggaagagtcttccacAACgggagatcagctttaG	293
F9-K148A-For	ggaagagtcttccacGCTgggagatcagctttaG	294
F9-K148E-For	ggaagagtcttccacGAGgggagatcagctttaG	295
F9-K148S-For	ggaagagtcttccacAGCgggagatcagctttaG	296
F9-K148M-For	ggaagagtcttccacATGgggagatcagctttaG	297
F9-E74S-For	ggtgaacataatattAGCgagacagaacatacaG	298
F9-E74A-For	ggtgaacataatattGCTgagacagaacatacaG	299
F9-E74R-For	ggtgaacataatattAGGgagacagaacatacaG	300
F9-E74K-For	ggtgaacataatattAAGgagacagaacatacaG	301
F9-H92F-For-Corr	cgaattattcctcacTTCaactacaatgcaGC	302
F9-H92Y-For-Corr	cgaattattcctcacTACaactacaatgcaGC	303
F9-H92E-For-Corr	cgaattattcctcacGAAaactacaatgcaGC	304
F9-H92S-For-Corr	cgaattattcctcacAGCaactacaatgcaGC	305
F9-T242A-For	CtggattaaggaaaaGCTaagctcacttaagtg	306
F9-T242V-For	CtggattaaggaaaaGTGagctcacttaagtg	307
F9-E240N/T242A-For	gtcaactggattaagAACaaaGCTaagctcacttaagtg	308
F9-E240N/T242V-For	gtcaactggattaagAACaaaGTGagctcacttaagtg	309

10

20

30

【表 1 2 - 4】

F9-E240Q-For	gtcaactggattaagCAGaaaacaaagctcacttaaG	310
F9-E240S-For	gtcaactggattaagAGCaaaacaaagctcacttaaG	311
F9-E240A-For	gtcaactggattaagGCTaaaacaaagctcacttaaG	312
F9-E240D-For	gtcaactggattaagGACaaaacaaagctcacttaaG	313
F9-N178D-For	CAaagttcaccatctatGACaacaatgttctgtgtggtgc	314
F9-N178Y-For	CAaagttcaccatctatTACaacaatgttctgtgtggtgc	315
F9-Y177A-For	CTacaaagttcaccatcGCTaacaacaatgttctgtGC	316
F9-Y177T-For	CTacaaagttcaccatcACCaacaacaatgttctgtGC	317
F9-T175R-For	cttcgatctacaaagttcAGGatctataacaacaatgttc	318
F9-T175E-For	cttcgatctacaaagttcGAAatctataacaacaatgttc	319
F9-T175Q-For	cttcgatctacaaagttcCAGatctataacaacaatgttc	320
F9-F174I-For	GTcttcgatctacaaagATCaccatctataacaacaatg	321
F9-T175R/Y177T-For	cgatctacaaagttcAGGatcACCaacaacaatgttctgtG	322
	GAattattcctcaccacaacTTCaatgcagctattaatACCTacaaccatga cattG	323
F9-Y94F/K98T-For		
F9-F145N/K148S-For	ggctggggaagagtcAACcacAGCgggagatcagctttaG	324

10

【 0 4 5 4】

下の表 1 3 は、配列番号 3 において記載される成熟 F I X ポリペプチドと比較したナン
 バリングおよびキモトリプシンナンバリングを用いて示す突然変異を有する生成された F
 I X 変異体を記載する。

20

【 0 4 5 5】

表13. FIX変異体

【表 1 3 - 1】

突然変異(成熟FIX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
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	3
N157D	N[157]D	75
Y155F	Y[155]F	76
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	77
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	78
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	79
D85N	D[85]N	80
T148A	T[148]A	81
K5A	K[5]A	82
D64N	D[64]N	83
D64A	D[64]A	84
N167D	N[167]D	85
N167Q	N[167]Q	86
S61A	S[61]A	87
S53A	S[53]A	88
T159A	T[159]A	89
T169A	T[169]A	90
T172A	T[172]A	91
T179A	T[179]A	92
Y155H	Y[155]H	93
Y155Q	Y[155]Q	94
S158A	S[158]A	95
S158D	S[158]D	96
S158E	S[158]E	97
N157Q	N[157]Q	98
D203N/F205T	D39N/F41T	99
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	100
K228N	K63N	101
D85N/K228N	D[85]N/K63N	102
I251S	I86S	103

10

20

30

【表 1 3 - 2】

D85N/I251S	D[85]N/I86S	104
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	105
A262S	A95bS	106
K413N	K243N	107
E410N	E240N	108
E239N	E74N	109
T241N/H243S	T76N/H78S	110
K247N/N249S	K82N/N84S	111
L321N	L153N	112
F314N/H315S	F145N/H147S	113
K392N/K394S	K222N/K224S	114
S319N/L321S	S151N/L153S	115
N260S	N95S	116
Y284N	Y117N	117
G317N	G149N	118
R318N/A320S	R150N/A152S	119
R318A	R150A	120
R318E	R150E	121
R318Y	R150Y	122
R312Q	R143Q	123
R312A	R143A	124
R312Y	R143Y	125
R312L	R143L	126
V202M	V38M	127
V202Y	V38Y	128
D203M	D39M	129
D203Y	D39Y	130
A204M	A40M	131
A204Y	A40Y	132
K400A/R403A	K230A/R233A	133
K400E/R403E	K230E/R233E	134

10

20

30

【表 1 3 - 3】

R403A	R233A	135
R403E	R233E	136
K400A	K230A	137
K400E	K230E	138
K293E	K126E	139
K293A	K126A	140
R333A	R165A	141
R333E	R165E	142
R338A	R170A	143
R338E	R170E	144
R338A/R403A	R170A/R233A	145
R338E/R403E	R170E/R233E	146
K293A/R403A	K126A/R233A	147
K293E/R403E	K126E/R233E	148
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	149
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	150
R318A/R403A	R150A/R233A	151
R318E/R403E	R150E/R233E	152
R318Y/E410N	R150Y/E240N	153
R338E/E410N	R170E/E240N	154
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	155
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	156
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	157
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	158
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	159
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	160
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	161
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	162
K228N/E410N	K63N/E240N	163
K228N/R338E	K63N/R170E	164
K228N/R338A	K63N/R170A	165

10

20

30

【表 1 3 - 4】

K228N/R318Y	K63N/R150Y	166
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	167
R403E/E410N	R233E/E240N	168
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	169
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	170
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	171
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	172
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	173
R333S	R165S	186
R338L	R170L	187
K316N	K148N	189
K316A	K148A	190
K316E	K148E	191
K316S	K148S	192
K316M	K148M	193
E239S	E74S	194
E239A	E74A	195
E239R	E74R	196
E239K	E74K	197
H257F	H92F	198
H257Y	H92Y	199
H257E	H92E	200
H257S	H92S	201
T412A	T242A	202
T412V	T242V	203
E410N/T412A	E240N/T242A	204
E410N/T412V	E240N/T242V	205
E410Q	E240Q	174
E410S	E240S	175
E410A	E240A	176

10

20

30

【表 1 3 - 5】

E410D	E240D	206
N346D	N178D	207
N346Y	N178Y	208
F314N/K316S	F145N/K148S	177
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	217
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	218
K228N/I251S	K63N/I86S	180
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	181
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	182
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	219
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	220
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	221
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	222
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/ R4 03E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	223
D104N/K106S/R318Y/E410N/R338E	D[104]N/K[106]S/R150Y/E240N/ R170E	224
I251S/R318Y/E410N/R338E	I86S/R150Y/E240N/R170E	225
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/ E4 10N/	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/ R170E /E240N	226
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	178
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	179
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	183
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	227
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	228
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	229
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	230
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	231

10

20

30

【表 1 3 - 6】

A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/ R150Y /R170E/R233E/E240N	232
D104N/K106S/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/ R150Y /R170E/R233E/E240N	233
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	234
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/ R170E/R233E/E240N	235
D104N/K106S/ Y155F/R318Y/R338E/R 403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/ R170E/R233E/E240N	236
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/ R233E/ E240N	237
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/I86S//R150Y/R170E/ R233E/ E240N	238
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	239
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	240
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	241
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	242
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	243
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ E240N	244
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N 249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K63N/K82 N/N84S	245
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/ N84 S	246
D104N/K106S/Y155F/K228N/	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	247
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	248
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	184
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	249
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	250

10

20

30

【表 1 3 - 7】

R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	251
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	252
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	253
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	254
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	255
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E 240N	256
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	257
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	258
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	259
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E4 10N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/ R233E /E240N	260
Y155F/N260S/N346D/	Y[155]F/N95S/N178D	261
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	262
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	185
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	263
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E /R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/ R23 3E/E240N	264
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/ R170 E/R233E/E240N	265
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/ R233E/ E240N	266
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	267
R338E/T343R	R170E/T175R	268
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	269
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	270
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	271
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N2 60S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84 S/N95S	272
Y345A	Y177A	213
Y345T	Y177T	214
T343R	T175R	209

10

20

【表 1 3 - 8】

T343E	T175E	210
T343Q	T175Q	211
F342I	F174I	212
T343R/Y345T	T175R/Y177T	215
R318Y/R338E	R150Y/R170E	188
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	216
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/ R 318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/ N84 S/R150Y/R170E/R233E/E240N	326
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R 150Y/R170E/R233E/E240N	327
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/ R 338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/ R 170E/R233E/E240N	328
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/ R 338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/ R1 70E/R233E/E240N	329
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/ E 410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	330
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/ R 403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ T175 R/R233E/E240N	331
T343R/N346Y	T175R/N178Y	332
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	333
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/ E 410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/ E240N	334
T343R/N346D	T175R/N178D	335
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/ E 410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/ E240N	336
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	337
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/ E 410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E 240N	338
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ R 403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R 233E	339
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	340

10

20

30

【表 1 3 - 9】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/ E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/ E 240N	341
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	342
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/ E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/ E 240N	343
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	344
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	345
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	346
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	347
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	348
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	349
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	350
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	351
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	352
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	353
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ R 403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ R2 33E/E240N	354
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/ E4 10N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/ E24 0N	355
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/ R4 03E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/ R 233E/E240N	356
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/ E 410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/ E 240N	357
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/ R 403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R 233E/E240N	358
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T17 5R/R233E/E240N	359
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/ R 338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/ R 170E/T175R/R233E/E240N	360
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	361
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	362

10

20

【表 1 3 - 1 0】

Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	363
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	364
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	365
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	366
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	367
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E	368
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ R 403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ R2 33E	369
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ R 403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/ R 233E/E240N	370
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/ E 410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/ E2 40N	371
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	372
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	373
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	374
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	375
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	376
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	377
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/E240N	378
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ E 410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/ E2 40N	379
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R 403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E/E240N	380
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/ E 410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/ E2 40N	381
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	382
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R 403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E	383
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	384
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/ E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/ E240N	385

10

20

30

【表 1 3 - 1 1】

K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	386
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ R 403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/ R 233E	387
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	388
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/ E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/ E 240N	389
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	390
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/ E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/ E 240N	391
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	392
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	393
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	394
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	395
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	396
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R	397
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	398
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	399
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	400
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	401
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	402
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	403
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	404
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/ E 410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/ E 240N	405

【表 1 3 - 1 2】

K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T17 5R/R233E	406
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/ T 343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/ T17 5R/E240N	407
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/ R 403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/ R23 3E/E240N	408
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	409
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	410
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	411
Y1N	Y[1]N	412

【0 4 5 6】

C. F I 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 I X ポリペプチドを CHO 発現 (CHOX) 細胞 (E x c e l l g e n e) 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、産生種培地に接種するために用いた。種培地を同じ培地で生存細胞 (vc) 1 mL 当たりおよそ 1.4×10^7 個まで増殖させ、およそ 100 mL を DM204B Complete media およそ 1.0 L に接種するために用い、したがって接種密度は 1.2×10^6 vc/mL であった。この培養物をトランスフェクションの日 $1.3 \sim 1.6 \times 10^6$ vc/mL に達するように 3 日間増殖させた。F I X プラスミド DNA (3.2 mg) をポリエチレンイミン「MAX」 [PEI-20.5 mg (Polyscience)] と混合し、serum-free TfMAX2 transfection medium (Mediatech) で 1.0 L に希釈することによってトランスフェクション複合体

10

20

30

40

50

を形成した。次いでこの混合物を産生培地 1.0 L に添加した。細胞にトランスフェクション混合物を加えたもの 1.0 L アリコートをして 2 個の 3 L バッフル付きフェルンバッハフラスコに分割し、粗 F I X を回収する前に 4 日間発現させた。次いで培養上清を濾過によって回収し、F I X を精製した。

【0457】

10 L 以上の大規模培養物を WAVE bioreactor (GE Healthcare) において産生した。DM204B Complete media 4.6 L で接種密度 1.2×10^6 vc/mL まで上に記載のとおり増殖させた種培養物およそ 400 mL を 20 L wave bag に接種した。細胞が 3 日後に細胞密度 $1.3 \sim 1.6 \times 10^6$ vc/mL に達するように WAVE bioreactor を揺動角度 6 度、揺動速度 24 rpm、 37.1°C に設定した。F I X プラスミド DNA 16 mg および P E I

102.5 mg をトランスフェクション複合体を形成するように合わせ、最初の接種の 3 日後に WAVE bioreactor 内の培養物に添加する前に T f M A X 2 5.0 L 中に希釈した。トランスフェクション複合体に T f M A X 培地を加えたものを wave bag に添加し、WAVE Bioreactor の揺動角度を 8°C に、温度を 33°C に (他の設定は同じままで) 設定した。培養物を粗 F I X を回収する前に 4 日間発現させた。wave bag の内容物を C U N O デプスフィルターを通じて培養上清を回収する前に 3 時間、 4°C で静置し、次いで F I X を精製した。

【0458】

機能的 G l a d メインを有する F I X ポリペプチドが吸着し、カルシウム溶出工程が続く C a p t o Q column (GE Healthcare) を用いて F I X ポリペプチドを精製した。典型的には E D T A (10 mM)、T r i s (25 mM、pH 8.0) および T w e e n - 8 0 (0.001%) をトランスフェクトした細胞由来の培養上清に添加した。試料を、緩衝液 B (25 mM T r i s pH 8、1 M N a C l、0.001% T w e e n - 8 0) で予め平衡化した C a p t o Q column にロードし、緩衝液 A (25 mM T r i s pH 8、0.15 M N a C l、0.001% T w e e n - 8 0) での平衡化が続いた。試料のロードの完了直後にカラムを 14% 緩衝液 B (86% 緩衝液 A) で 20 カラム容量洗浄した。次いで緩衝液 C (25 mM T r i s pH 8、0.2 M N a C l、0.001% T w e e n - 8 0、10 mM C a C l ₂) をプールとして採取する F I X ポリペプチドを溶出するためにカラムに添加した。

【0459】

溶出プールを Q Sepharose HP column (GE Healthcare) を用いてさらに精製した。試料を緩衝液 D (25 mM T r i s pH 8、0.001% T w e e n - 8 0) 2 容量で希釈することによって添加のために調製した。希釈試料を緩衝液 F (25 mM T r i s pH 8、1 M N a C l、2.5 mM C a C l ₂、0.001% T w e e n - 8 0) に続いて緩衝液 E (25 mM T r i s pH 8、2.5 mM C a C l ₂、0.001% T w e e n - 8 0) で予め平衡化した Q Sepharose HP column にロードした。4% 緩衝液 F (96% 緩衝液 E) での洗浄後、4~40% 緩衝液 F の勾配をカラムに適用し、画分を採取した。次いで F I X ポリペプチドを含有する画分をプールした。

【0460】

D. グリコシル化ポリペプチドを濃縮するための精製

修飾 F I X ポリペプチドのグリコシル化の程度を S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて推定した。過剰グリコシル化を修飾 F I X ポリペプチドの移動パターンの野生型 F I X、B e n e f i x (登録商標) C o a g u l a t i o n F I X との比較によって評価した。酵素の過剰グリコシル化形態は遅く移動し、野生型ポリペプチドよりも高い見かけの分子量を示す。E 240N 突然変異 (240 位に非天然 N-グリコシル化部位を導入する) を含有するポリペプチドは部分的にしかグリコシル化されていないこと (およそ 20% グリコシル化) が認められた。過剰グリコシル化形態を濃縮するために、上に記載の精製プロセスの変更を実施した。

10

20

30

40

50

【0461】

精製の最初の工程は、上に記載のとおりC a p t o Q c o l u m nを用いて実施した。このカラムからの溶出プールを緩衝液D（上に記載のとおり）2容量で希釈し、試料を緩衝液F（上に記載のとおり）に続いて緩衝液E（上に記載のとおり）で予め平衡化したH e p a r i n S e p h a r o s eカラムにロードした。次いでカラムを0%から70%緩衝液Fの勾配で展開し、画分を採取した。E 4 1 0 N変異体の過剰グリコシル化形態はカラムからおよそ35%緩衝液F中に溶出し、非グリコシル化形態はおよそ50%緩衝液F中に溶出した。採取した各プールをQ S e p h a r o s e H P c o l u m n上で上に記載のとおりさらに精製した。この方法によりE 4 1 0 N変異体のおよそ80%過剰グリコシル化形態を含有するプールを得た。過剰グリコシル化の程度をS D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を目視検査によって推定した。

10

【実施例2】

【0462】

F Xの活性化および活性部位滴定剤（A c t i v e S i t e T i t r a n t）フルオレセインーモノーp'ーグアニジノベンゾエート（F M G B）を用いる触媒的に活性なプロテアーゼ（F X a）濃度の決定

第X因子（F X）の保存物中で触媒的に活性になり得るF Xの濃度を決定した。次いでF Xのこの保存物をF Xに対するF I X変異体の触媒活性を算出するための次の研究で用いた。F XのF X aへの活性化に続いて、活性部位滴定アッセイを本質的にBock et al. (Archives of Biochemistry and Biophysics(1989)273:375-388)によって記載のとおり、

20

【0463】

A. F X aへのF Xの活性化

触媒的に活性になり得るF Xの保存液中の濃度をラッセルクサリヘビ毒（R u s s e l l ' s V i p e r V e n o m）でのF X試料の活性化によって決定し、F M G Bでの活性F X（F X a）の滴定を続けた。F X酵素前駆体保存物はバックグラウンドF X a活性を減少させるために供給者によってD F P（ジイソピルフルオロホスフェート）およびE G R-c m kで最初に予備処理された。F X a活性化反応物は、最終濃度10 μM F X（A₂₈₀吸光度および吸光係数1.16に基づく）で、100 mM T r i s、50 mM N a C l、5 mM C a C l₂、0.1% P E G 8 0 0 0を含有する反応緩衝液pH 8.1中、最終容量50~100 μLに調製した。活性化は、R u s s e l l ' s V i p e r V e n o m（R V V-X a s e；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.）の最終濃度5 μg/mL（反応物100 μL当たり98 μg/mL希釈物を5 μL、または反応物50 μL当たり2.5 μL）の37℃、45~60分間の活性化時間での添加によって開始した（15分ごとに試料を採取することおよびS p e c t r a f l u o r F X a蛍光発生基質の切断における増加を検査することによって完全な活性化を表すことが既に決定されている）。反応を100 mM T r i s、50 mM N a C l、5 mM、100 mM E D T A、0.1% P E G 8 0 0 0を含有する1/10容量のクエンチ緩衝液pH 8.1でクエンチした。

30

40

【0464】

B. 活性部位滴定

活性部位滴定アッセイを、0.4 cm x 1 cmの石英キュベット中の反応容量1 mLで継続的に攪拌しながら実施した。反応物は、30 mM H e p e s、135 mM N a C l、1 mM E D T Aおよび0.1% P E G 8 0 0 0を含有するアッセイ緩衝液pH 7

50

． 4 中 に 1 0 0 ～ 4 0 0 n M の 新 鮮 活 性 化 F X a お よ び 5 μ M F M G B を 含 有 し た 。 F M G B を 乾 燥 重 量 に 基 づ い て 保 存 濃 度 0 . 0 1 M で D M F 中 に 調 製 し 、 濃 度 を リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 (P B S) に お け る 吸 光 係 数 1 9 , 4 9 8 M ⁻¹ c m ⁻¹ を 用 い て 4 5 2 n m で の 吸 光 分 光 法 に よ っ て 確 認 し た 。 ア ッ セ イ は 1 m M F M G B (最 終 濃 度 5 μ M) 5 μ L を 1 × ア ッ セ イ 緩 衝 液 1 m L に 添 加 す る こ と に よ っ て 開 始 し 、 F X a の 最 終 濃 度 約 1 0 0 ～ 4 0 0 n M で の 添 加 の 前 に F M G B の バ ッ ク グ ラ ウ ン ド 加 水 分 解 を 約 1 5 0 ～ 2 0 0 秒 間 最 初 に 測 定 し た 。 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 さ ら に 3 6 0 0 秒 間 追 跡 し た 。

【 0 4 6 5 】

F X a に よ る F M G B の 触 媒 作 用 に 続 い て 放 出 さ れ る フ ル オ レ セ イ ン の 量 は 、 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 保 存 濃 度 約 7 0 ～ 1 5 0 m M で D M F 中 に 新 鮮 調 製 し 、 正 確 な 濃 度 を 0 . 1 N N a O H に お け る 吸 光 係 数 8 9 , 1 2 5 M ⁻¹ c m ⁻¹ を 用 い る 4 9 6 n m で の 標 準 条 件 下 の 吸 光 分 光 法 に よ っ て 確 認 し た 。 次 い で 遊 離 フ ル オ レ セ イ ン の 標 準 曲 線 を 吸 光 度 較 正 済 フ ル オ レ セ イ ン 標 準 物 の 1 × ア ッ セ イ 緩 衝 液 へ の 2 0 n M か ら 最 終 濃 度 2 6 0 ～ 3 0 0 n M へ の 滴 定 に よ っ て 作 成 し た 。

【 0 4 6 6 】

デ ー タ 分 析 の た め に 、 反 応 ト レ ー ス を G r a p h p a d P r i s m s o f t w a r e p a c k a g e に 導 入 し 、 自 発 的 F M G B 加 水 分 解 の 初 期 測 定 速 度 の 外 挿 に よ っ て バ ッ ク グ ラ ウ ン ド 加 水 分 解 の 寄 与 を 曲 線 か ら 減 算 し た (典 型 的 に は 総 蛍 光 バ ー ス ト の 5 % 未 満) 。 補 正 曲 線 を 、 Δ 蛍 光 = A m p (1 - e ^{- K t}) + B t [式 中 A m p = 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 は ア シ ル 酵 素 形 成 に 関 し て 観 察 さ れ た 一 次 速 度 定 数 、 お よ び B は F M G B の 完 全 代 謝 回 転 に 関 す る バ ル ク 速 度 定 数 (b u l k r a t e c o n s t a n t) 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 (s i n g l e e x p o n e n t i a l e q u a t i o n) に フ ィ ッ ト さ せ た 。 活 性 F X a プ ロ テ ア ー ゼ の 濃 度 を 振 幅 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 。 複 数 の ア ッ セ イ か ら 値 を 測 定 し 、 平 均 を と り 、 標 準 偏 差 を 決 定 し た 。 調 製 物 中 の 活 性 F X a の 量 は 、 F I X a に よ っ て 活 性 化 さ れ 得 る 保 存 調 製 物 中 の F X の 濃 度 を 直 接 表 す 。 こ の 活 性 部 位 滴 定 値 を 下 の 実 施 例 4 に お い て 記 載 す る 補 因 子 依 存 ア ッ セ イ (c o f a c t o r - d e p e n d e n t a s s a y) などの間接アッセイにおいて用いる F X の 濃 度 を 算 出 す る 場 合 に 使 用 し た 。

【 実 施 例 3 】

【 0 4 6 7 】

F I X の 活 性 化 お よ び 活 性 部 位 滴 定 剤 4 - メ チ ル ウ ン ベ リ フ ェ リ ル - p ' - グ ア ニ ジ ノ ベ ン ズ エ ー ト (M U G B) を 用 い る 触 媒 的 に 活 性 な プ ロ テ ア ー ゼ (F I X a) 濃 度 の 決 定
第 I X 因 子 (F I X) 酵 素 前 駆 体 の 保 存 溶 液 中 で 触 媒 的 に 活 性 に な り 得 る F I X の 濃 度 を 、 F I X 変 異 体 を 含 む F I X 試 料 の 第 X I a 因 子 (F X I 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 .) で の 活 性 化 に 続 く 、 活 性 第 I X 因 子 (F I X a) の 4 - メ チ ル ウ ン ベ リ フ ェ リ ル - p ' - グ ア ニ ジ ノ ベ ン ズ エ ー ト (M U G B) で の 滴 定 に よ っ て 決 定 し た 。

【 0 4 6 8 】

A . F I X の F I X a へ の 活 性 化

F I X ポ リ ペ プ チ ド 調 製 物 中 の 総 タ ン パ ク 質 濃 度 を 各 変 異 体 に 固 有 の 吸 光 係 数 (す な わ ち 、 ε ₂₈₀ = T r y 残 基 数 × 1 4 9 0 + T r p 残 基 数 × 5 5 0 0 + C y s 残 基 数 × 1 2 5) を 用 い て A ₂₈₀ 吸 光 度 に よ っ て 決 定 し た 。 F I X の F I X a へ の 活 性 化 反 応 物 を 、 1 0 0 m M T r i s 、 5 0 m M N a C l 、 5 m M C a C l ₂ 、 0 . 1 % P E G 8 0 0 0 を 含 有 す る 反 応 緩 衝 液 p H 8 . 1 中 の 最 終 容 量 2 0 0 ～ 5 0 0 μ L に 最 終 濃 度 1 0 μ M F I X で 調 製 し た 。 活 性 化 は 、 3 7 ° C 、 6 0 分 間 の 活 性 化 時 間 で の F I X a ま た は ビ オ チ ン 化 F X I a の 最 終 濃 度 2 0 n M へ の 添 加 に よ っ て 開 始 し た 。 6 0 分 間 の 活 性 化 時 間 は 、 1 5 分 ご と に 試 料 を 採 取 す る こ と お よ び S D S - P A G E に よ っ て 総 切 断 を ア ッ

10

20

30

40

50

セイすることによって完全な活性化を表すことが予め決定されていた。

【0469】

次いで活性化反応において用いた遊離 F X I a またはビオチン化 F X I a を、同じ結果をもたらす2つの方法（それぞれ95～97%を超える触媒 F X I a を除去する）の内の1つを用いて試料から除去した。遊離 F X I a を除去するために用いた第一の方法では、F X I a で開始した活性化反応物を最終濃度50 nMの抗 F X I a モノクローナル抗体（A b c a m 2 0 3 7 7）と60分間、37℃で混合した。遊離 F X I a の抗体捕捉には、追加的120分間、室温での洗浄済 p r o t e i n G D y n a l B e a d s（30 mg/mL、I n v i t r o g e n）の最終濃度25%容量：容量への添加が続いた。D y n a l B e a d s を製造者の説明書に従って溶液から除去した。ビオチン化 F X I a を除去するために用いた第二の方法では、ビオチン化 F X I a を用いた活性化反応物を、最終濃度10%容量：容量の S t r e p t a v i d i n e D y n a l B e a d s（10 mg/mL；I n v i t r o g e n）と60分間、室温で混合した。次いで D y n a l B e a d s を製造者の説明書に従って除去した。F X I a の除去に続いて、活性化 F I X a 試料の総タンパク質濃度を各変異体に固有の吸光係数（上に記載のとおり）を用いて A₂₈₀ 吸光度によって決定した。

【0470】

B. F I X a の活性部位滴定

活性化保存溶液中の触媒的に活性な F I X a の濃度を、F I X a 試料を蛍光発生エステル基質、4-メチルウンベリフェリル-p'-グアニジノベンゾエート（M U G B）での滴定によって決定した。原則的な滴定アッセイは、M U G B の F I X a との緩徐な反応性を考慮するためのいくつかの若干の変更を伴って本質的に Payne et al.（Biochemistry(1996)35:7100-7106）によって記載のとおり実施した。M U G B は F I X a と直ちに反応し（しかし F I X または不活性プロテアーゼとは反応せず）、M U G B 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 F I X a プロテアーゼは、一回の触媒代謝回転を受け、4-メチルウンベリフェロンフルオロフォア（4-MU）を放出する。蛍光の最初のバーストを4-MU 蛍光の外部濃度標準曲線で較正すると、活性部位の濃度を算出できる。

【0471】

アッセイを、0.4 cm x 1 cm の石英キュベット中の反応容量1 mL で継続的に攪拌しながら50 mM H e p e s、100 mM N a C l、5 mM C a C l₂ および0.1% P E G 8 0 0 0 を含有するアッセイ緩衝液 pH 7.6 で実施した。M U G B を乾燥重量に基づいて保存濃度0.04 M で D M S O 中に調製し、D M S O 中2 mM の実施濃度に希釈した。滴定アッセイを1×アッセイ緩衝液に2 mM M U G B 4 μL を最終濃度8 μM で添加することによって開始し、F I X a または F I X a 変異体の最終濃度約100～200 nM（F X I a 除去後に活性化反応物について決定した総タンパク質濃度に基づく）での添加の前に M U G B のバックグラウンド加水分解を最初に約200～300秒間測定した。反応のバースト相における4-MU 蛍光の放出を初期バーストおよび続く定常状態相から十分なデータを得るために合計2時間追跡した。

【0472】

F I X a による M U G B の触媒作用に続いて放出される4-MUの量を4-MUの標準曲線を用いて決定した。4-MU 標準溶液は D M S O 中に0.5 M の保存濃度で調製し、濃度を50 mM T r i s 緩衝液 pH 9.0 における吸光係数19,000 M⁻¹ cm⁻¹ を用いる360 nm での吸光分光法によって確認した。遊離4-MUの標準曲線を吸光度較正済4-MUの1×アッセイ緩衝液への20 nM から最終濃度260～300 nM 4-MU への滴定によって作成した。

【0473】

データ分析のために、反応トレースを G r a p h p a d P r i s m s o f t w a r e p a c k a g e に導入し、自発的 M U G B 加水分解の初期測定速度の外挿によってバックグラウンド加水分解の寄与を曲線から減算した（典型的には総蛍光バーストの5%未

10

20

30

40

50

満)。補正された曲線を、 $\Delta \text{蛍光} = A \text{mp} (1 - e^{-Kt}) + Bt$ (式中 $A \text{mp}$ = 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 はアシル酵素形成に関して観察された一次速度定数、および B は $MUGB$ の完全代謝回転に関するバルク速度定数である) の形の線形成分 (定常状態相における脱アシル化の低速を表すため) を有する単一指数方程式にフィットさせた。活性 $FIXa$ プロテアーゼの濃度を振幅に関するフィットパラメーターの $4 - MU$ 標準曲線との比較によって算出した。複数のアッセイから値を測定し、平均をとり、標準偏差を決定した。次いで活性化され得る保存溶液中の FIX 酵素前駆体の濃度を、 FIX 酵素前駆体の A_{280} 決定総濃度に、完全に活性化された試料に関して実験的に決定された活性割合値 ($fraction \ active \ value$) (活性 $FIXa$ の濃度 / $FIXa$ の総濃度) を掛けることによって決定した。

10

【実施例 4】

【0474】

基質、第 X 因子に対する $FIXa$ の触媒活性の決定

基質、第 X 因子 (FX) に対する $FIXa$ 変異体の触媒活性を、合成基質 $Spectrafluor \ FXa$ について、 $FIXa$ による活性化において生成される FXa 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。活性化プロテアーゼ ($FIXa$) の濃度より基質プロテアーゼ (FX) が少なくとも 1000 倍を超えて過剰であった場合の動学的速度定数を算出するために様々な FX 濃度を用いた。簡潔には活性化され、活性部位滴定された $FIXa$ を組換え $FVII$ 、リン脂質小胞およびアルファートロンビン ($FVII$ を $FVIIa$ に活性化する) を含むカルシウム含有緩衝液中でインキュベートし、テナーゼ ($Xase$) 複合体を形成させた。次にアッセイ開始前にアルファートロンビンの活性を高度に特異的なトロンビン阻害物質、ヒルジンの添加によってクエンチした。 $FIXa$ 変異体 ($Xase$ 複合体の部分として) を次にアッセイを開始するために様々な濃度の FX および蛍光基質 $Spectrafluor \ FXa$ ($CH_3SO_2-D-CHA-Gly-Arg-AMC$) と混合した。 FXa による $Spectrafluor \ FXa$ 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) の放出を次に一定期間連続的に評価し、 $FIXa$ 変異体の動学的速度定数を決定した。

20

【0475】

A. アッセイプロトコール

30

$FVIIa$ およびリン脂質の存在下での $FIXa$ による FX 活性化の動学的速度を評価するアッセイのために、最初に組換え $FVII$ ($Kogenate \ FS$ (登録商標); $Bayer \ healthcare$) を製造者の説明書に従って添付の希釈剤 5 mL 中に懸濁した。次いで $FVII$ のモル濃度を吸光係数 $1.567 \text{ mg}^{-1} \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ および分子量 163.6 kDa を用いて 280 nm での吸光度によって決定した。 FIX 変異体を上の実施例 1~3 において記載されるとおり発現、精製、活性化および活性部位滴定した。次いで $FIXa$ 変異体を $1 \times$ 緩衝液 A ($20 \text{ mM Hepes} / 150 \text{ mM NaCl} / 5 \text{ mM CaCl}_2 / 0.1\% \text{ BSA} / 0.1\% \text{ PEG-8000}$, $\text{pH} 7.4$) $200 \mu\text{L}$ 容量中へ 16 pM の濃度に系列希釈した。 $FIXa$ およびリン脂質の存在下での $FVII$ の $FVIIa$ への活性化のための調製物において、アルファートロンビン ($Heamatologic \ Technologies, Inc.$) およびヒルジン ($American \ Diagnostica$) をそれぞれ $1 \times$ 緩衝液 A 1.0 mL 容量中へ 64 nM および 640 nM にそれぞれ希釈した。再構成 $FVII$ を、 $267 \mu\text{M}$ の新鮮再懸濁リン脂質 ($75\% \text{ ホスファチジルコリン (PC)} / 25\% \text{ ホスファチジルセリン (PS)}$; PS/PC 小胞直径約 120 nm ; $Avanti \ Polar \ Lipids$) を含有する $1 \times$ 緩衝液 A 1.0 mL 容量中へ濃度 267 nM にさらに希釈した。上の $FVII/PC/PS$ 溶液 $600 \mu\text{L}$ と 16 pM 野生型 $FIXa$ または $FIXa$ 変異体希釈物 $100 \mu\text{L}$ および 64 nM アルファートロンビン溶液 $50 \mu\text{L}$ とを混合し、続いて 15 分間、 25°C でのインキュベーションによって $FVII$ を $FVIIa$ に活性化した。次に FX 活性化についての動学的アッセイを開始する前に活性化反応を

40

50

上の640 nMヒルジン溶液50 μ Lの5分間、25℃での添加によってクエンチした。Xase複合体溶液800 μ L中の試薬の最終濃度は、以下のとおりであった：2 pM FIXa変異体、200 nM FVIIa、200 μ M PC/PS小胞、4 nMアルファートロンビン（阻害剤）および40 nMヒルジン。

【0476】

各Xase複合体溶液（FIXa/FVIIa/リン脂質/ Ca^{2+} ）合計25 μ Lを予め定義したプレートマップ（FIXa変異体4種/プレート）に従って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。活性部位滴定し、DFP/EGRCmk処理したFX（上の実施例2を参照されたい）の900 nM溶液を1.0 mM Spectrafluor Xa基質を含有する1×緩衝液A 5.6 ml中に調製した。これは、検査したFXの最高濃度および4種のアッセイのための十分な容量を表した。次いでFX/Spectrafluor Xa溶液を1.0 mM Spectrafluor Xaを含有する1×緩衝液A 最終容量2.5 mlで8チャンネルディ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、900 nM、500 nM、277.8 nM、154.3 nM、85.7 nM、47.6 nM、25.6 nMおよび0 nM FXの最終希釈物を得た。代替的にいくつかのアッセイにおいては、FX/Spectrafluor Xa溶液を1.0 mM Spectrafluor Xaを含有する1×緩衝液A 最終容量2.5 mlで12チャンネルディープウェルポリプロピレンプレート中に1.5倍系列希釈し、900 nM、600 nM、400 nM、266.7 nM、177.8 nM、118.5 nM、79.0 nM、52.7 nM、35.1 nM、23.4 nM、15.6 nM および0 nM FXの最終希釈物を得た。典型的にはアッセイ反応は、FX/Spectrafluor Xa希釈物25 μ Lを、各FIXa変異体（Xase複合体）25 μ Lを含む4つ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、次のとおりであった：1 pM FIXa、100 nM FVIIa、100 μ M PC/PS小胞、0.5 mM Spectrafluor Xa、2 nMアルファートロンビン（阻害剤）、20 nMヒルジンおよび0 nMから450 nMのFX希釈物。反応をSpectraMax fluorescence plate readerにおいて30分間、37℃でモニターした。遊離AMCの標準曲線を0 μ Mから100 μ M 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 μ Mへの変換係数として利用した。

【0477】

B. データ分析

FIXaによるFX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, et al. (1985) Biochem. J. 225:149-158の“Zymogen-Activation 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。スキームA（下を参照されたい）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（1）の表現によって記載される。

【0478】

10

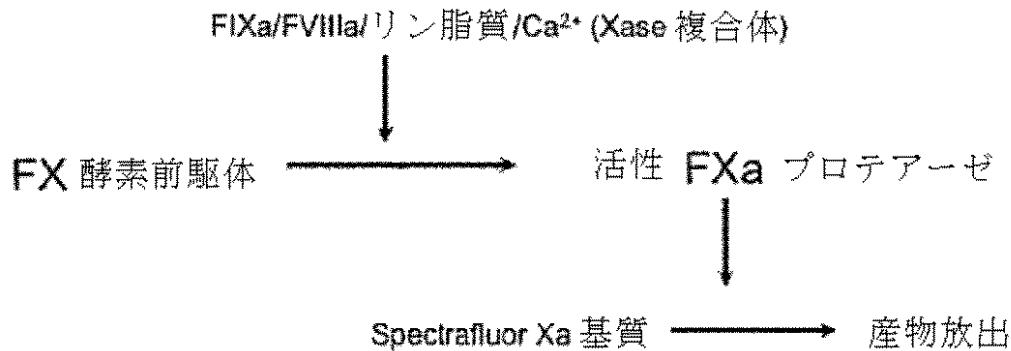
20

30

40

【化 1】

スキーム A:



10

【0479】

スキーム A の機序により、 a_0 は活性化プロテアーゼ (F I X a) の濃度であり、 z_0 は酵素前駆体 (F X) の濃度であり、 K_a および K_z は酵素前駆体の活性酵素 (F X a) への活性化因子触媒転換に関する $K_{c a t}$ 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 F X a による基質から産物への転換に関する $K_{c a t}$ および K_M を示す：

20

方程式 (1)

【0480】

【数 1】

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

プログレス曲線の分析のために方程式 (1) を、蛍光発生基質の F x a 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 (2) の形に再計算した。

30

方程式 (2)

【0481】

【数 2】

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

1 × 緩衝液 A 中の S p e c t r o f l u o r F X a で F X a 活性が $313.0 \mu M$ の K_M および $146.4 s^{-1}$ の $K_{c a t}$ 値を有すると非依存的に決定した。これらの値の方程式 (3) への代入は、 $90 s^{-1}$ の K_2 補正係数を与えた。

40

方程式 (3)

【0482】

【数 3】

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

50

【0483】

F I X a触媒活性の程度を決定するために、S o f t M a x P r o a p p l i c a t i o n (M o l e c u l a r D e v i c e s) で集めた生データを、XMLファイルまたは、T X Tファイルとして出力した。さらなる非線形データ分析を自動化曲線フィッティングおよびM i c r o s o f t E x c e l s p r e a d s h e e t e n v i r o n m e n t (I D B S S o f t w a r e)での統計分析のためのソフトウェアパッケージX L f i t 4で実施、またはX E R u n n e r d a t a a n a l y s i s m o d u l e (I D B S S o f t w a r e)を用いるA c t i v i t y B a s e s o f t w a r e p a c k a g eで直接実施した。集計表テンプレートを、各F X濃度で検査したF I X a変異体の放物型反応速度 (p a r a b o l i c r e a c t i o n v e l o c i t i e s) ($\mu\text{M}/\text{秒}^2$)を方程式(4)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。

方程式(4)

【0484】

【数4】

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

次いで検査したF I X a変異体についての K_{cat} 値を方程式(5)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。

方程式(5)

【0485】

【数5】

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

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(5)の計算から生じる)算出された K_{cat} から直接算出した。

【0486】

表14~19は、アッセイしたF I X a変異体それぞれについての触媒活性を記載する。同様にアッセイしたのは組換え野生型F I X a (C a t a l y s t B i o s c i e n c e s W Tと称する; 上の実施例1に記載のとおり生成した)、血漿精製F I X a (H a e 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B e n e F I X (登録商標) [C o a g u l a t i o n F a c t o r I X (R e c o m b i n a n t W y e t h)]であった。表14~15は、触媒活性についての動力学定数 K_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)としておよび野生型F I X aの活性の百分率として[活性は各F I X a変異体のその基質、F Xに対する触媒活性、 K_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)である]表した結果を示す。個々の速度定数 K_{cat} および K_M を表16~17および表18~19にそれぞれ示す。表15、17および19は追加的F I X a変異体についてのデータを示し、表14、16および18におけるF I X a変異体についての追加的反復実験(n)を含んで算出された新たな総平均を提供する。F I X a変異体の活性を野生型F I X a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(複数可)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 I 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 I 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 I X a ポリペプチドは、配列番号 1 において記載される F I X 遺伝子のクローニングから生成され、C H O X 細胞から配列番号 3 において記載され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 において記載される組換え野生型 F I X a (すなわち C a t a l y s t B i o s c i e n c e s W T F I X p o l y p e p t i d e) 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) も各動力学的パラメーターについて提供する。

【0487】

F I X a 変異体の観察された触媒活性は、いくつかの変異体 (たとえば、F I X a - F 3 1 4 N / H 3 1 5 S、F I X a - G 3 1 7 N、F I X a - R 3 1 8 N / A 3 2 0 S および F I X a - K 4 0 0 E / R 4 0 3 E) での検出不可能な X a s e 活性から、野生型 F I X a と比較して F X の活性化についての K_{cat} / K_M における 10 倍を超える増加までの範囲であった。触媒活性における最も大きな増加のいくつかを示した F I X a - R 3 3 8 E、F I X a - R 3 3 8 A、F I X a - T 3 4 3 R、F I X a - E 4 1 0 N ならびに、これらの組合せ F I X a - R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / E 4 1 0 N、F I X a - R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / R 4 0 2 E / E 4 1 0 N、F I X a - R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 2 E / E 4 1 0 N、F I X a - R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / E 4 1 0 N および F I X a - R 3 3 8 E / T 3 4 3 R などを含むいくつかの変異体は、野生型 F I X a と比較して顕著に増加した触媒活性を示した。単一または複数の追加的グリコシル化部位を有するいくつかの F I X a 変異体は野生型活性に近いもの (たとえば F I X a - I 2 5 1 S、F I X a - D 8 5 N / I 2 5 1 S、F I X a - K 6 3 N、F I X a - K 2 4 7 N / N 2 4 9 S および F I X a - K 6 3 N / K 2 4 7 N / N 2 4 9 S) または、他の突然変異と組み合わせられた場合に改善された活性 (たとえば F I X a - K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E および F I X a - K 2 4 7 N / N 2 4 9 S / R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N) を示したが、他は低下した触媒活性を示した。増加した触媒活性は、 K_{cat} もしくは K_M またはより頻繁には両方のパラメーターにおける改善のためであった。

【0488】

表14. F I X a 変異体の触媒活性 (K_{cat} / K_M)

10

20

【表 1 4 - 1】

突然変異(成熟FIX ナンバリング)	突然変異(キモトリブ シンナンバリング)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$\pm$ S. D. ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	%CV	% of WT $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	n
BeneFIX Benefix(登 録商標) Coagulation FIX(T1 48A)	BeneFIX Benefix(登 録商標) Coagulation FIX(T[1 48]A)	4. 1E+07	2. 1E+07	51%	91%	125
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	5. 2E+07	2. 2E+07	41%	117%	120
Catalyst Bioscienc es WT	Catalyst Bioscience s WT	4. 5E+07	2. 5E+07	56%	100%	31
N157D	N[157]D	2. 9E+07	8. 1E+06	28%	64%	2
Y155F	Y[155]F	4. 1E+07	1. 3E+05	0%	93%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[1 55]F	3. 9E+07	1. 4E+06	4%	88%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F	3. 6E+07	1. 0E+06	3%	81%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3. 7E+07	1. 4E+07	38%	82%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3. 8E+07	1. 3E+07	34%	86%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2. 8E+07	6. 7E+06	24%	62%	7
D85N	D[85]N	7. 3E+07	2. 8E+07	38%	164%	15
T148A	T[148]A	4. 0E+07	2. 5E+07	62%	89%	30
T148A †	T[148]A †	2. 3E+07	7. 6E+06	33%	52%	7
K5A	K[5]A	5. 6E+07	4. 5E+06	8%	125%	2
D64N	D[64]N	1. 0E+07	1. 9E+06	19%	22%	2
D64A	D[64]A	2. 5E+06	1. 1E+06	47%	5%	2
N167D	N[167]D	3. 1E+07	1. 1E+07	34%	69%	2
N167Q	N[167]Q	3. 5E+07	1. 9E+07	53%	79%	4
S61A	S[61]A	4. 8E+07	2. 5E+07	52%	108%	4
S53A	S[53]A	3. 5E+07	1. 7E+07	48%	78%	3
T159A	T[159]A	3. 7E+07	1. 2E+07	33%	82%	3
T169A	T[169]A	4. 7E+07	2. 0E+07	43%	106%	3
T172A	T[172]A	5. 0E+07	2. 6E+07	52%	112%	3

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

T179A	T[179]A	5.5E+07	1.3E+07	23%	122%	3
Y155H	Y[155]H	5.0E+07	1.4E+07	27%	113%	3
Y155Q	Y[155]Q	5.4E+07	2.0E+07	36%	121%	3
S158A	S[158]A	3.6E+07	1.1E+06	3%	81%	2
S158D	S[158]D	4.0E+07	9.3E+05	2%	89%	2
S158E	S[158]E	3.7E+07	3.5E+06	9%	82%	2
N157Q	N[157]Q	3.2E+07	2.8E+06	9%	72%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	2.2E+07	1.2E+07	53%	50%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	3.0E+07	6.4E+06	22%	66%	5
K228N	K63N	3.6E+07	1.7E+07	49%	80%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	4.6E+07	1.5E+07	32%	104%	6
A103N/N105S/K228 N	A[103]N/N[105]S/K63 N	2.9E+07	1.0E+07	35%	64%	3
D104N/K106S/K228 N	D[104]N/K[106]S/K63 N	2.6E+07	7.6E+06	29%	59%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	4.5E+07	2.4E+06	5%	101%	2
D104N/K106S/Y155 F/ K228N	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/ K63N	5.9E+07	1.1E+07	19%	132%	2
I251S	I86S	5.9E+07	1.2E+07	21%	132%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	5.6E+07	1.1E+07	20%	124%	5
D85N/D104N/K106S /I251S	D[85]N/D[104]N/K[10 6]S/ I86S	3.3E+07	6.4E+06	19%	75%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86 S	3.9E+07	2.6E+07	67%	87%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86 S	2.9E+07	1.1E+06	4%	66%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	6.7E+07	5.9E+06	9%	149%	2
A262S	A95bS	2.4E+07	1.0E+07	42%	54%	8
K413N	K243N	2.9E+07	1.7E+07	58%	64%	5
E410N	E240N	1.3E+08	8.6E+07	65%	297%	21
E410N*	E240N*	3.0E+07	1.1E+07	36%	66%	11
E239N	E74N	2.0E+07	1.1E+07	58%	44%	9

10

20

30

【表 1 4 - 3】

T241N/H243S	T76N/H78S	1.9E+07	5.7E+05	3%	42%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	5.4E+07	1.7E+07	32%	122%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	5.1E+07	9.6E+06	19%	113%	4
A103N/N105S/K247N/ N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/ N84S	4.0E+07	5.2E+06	13%	90%	6
D104N/K106S/K247N/ N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/ N84S	3.2E+07	3.3E+06	10%	72%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S	3.2E+07	1.1E+07	36%	71%	3
L321N	L153N	1.6E+07	2.0E+06	13%	35%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	活性なし	n.d.	n.d.	0%	4
S319N/L321S	S151N/L153S	2.8E+07	2.2E+07	78%	64%	3
N260S	N95S	1.8E+07	1.2E+07	66%	39%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.3E+07	6.6E+06	51%	29%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9E+07	1.6E+07	83%	43%	2
D104N/K106S/Y155F/ N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ N95S	4.3E+06	2.0E+06	46%	10%	2
Y284N	Y117N	3.5E+07	1.5E+07	42%	78%	8
G317N	G149N	活性なし	n.d.	n.d.	0%	5
R318N/A320S	R150N/A152S	活性なし	n.d.	n.d.	0%	8
R318A	R150A	4.9E+07	7.4E+06	15%	108%	3
R318E	R150E	1.7E+07	4.2E+06	25%	38%	3
R318Y	R150Y	7.0E+07	7.0E+06	10%	156%	3
R312Q	R143Q	1.1E+07	1.8E+06	17%	23%	3
R312A	R143A	4.6E+06	9.3E+05	20%	10%	2
R312Y	R143Y	1.2E+07	4.2E+06	36%	27%	2
R312L	R143L	2.4E+07	9.4E+06	39%	54%	2

10

20

【表 1 4 - 4】

V202M	V38M	6.6E+07	2.6E+07	39%	148%	2
V202Y	V38Y	2.5E+07	1.6E+06	6%	56%	2
D203M	D39M	4.5E+07	1.9E+07	42%	101%	5
D203Y	D39Y	3.0E+07	2.8E+06	9%	67%	4
A204M	A40M	1.8E+07	1.2E+07	67%	40%	5
A204Y	A40Y	4.6E+07	7.6E+06	16%	103%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	5.3E+06	6.9E+05	13%	12%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	活性なし	n.d.	n.d.	0%	4
R403A	R233A	1.4E+07	3.0E+06	22%	31%	7
R403E	R233E	5.5E+06	1.5E+06	28%	12%	6
K400A	K230A	2.0E+07	3.1E+06	16%	44%	2
K400E	K230E	9.5E+06	1.1E+06	12%	21%	2
K293E	K126E	8.1E+06	5.4E+05	7%	18%	2
K293A	K126A	2.1E+07	4.4E+06	21%	46%	2
R333A	R165A	活性なし	n.d.	n.d.	0%	2
R333E	R165E	活性なし	n.d.	n.d.	0%	2
R338A	R170A	1.6E+08	2.5E+07	15%	361%	2
R338E	R170E	1.8E+08	8.3E+07	45%	408%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	5.3E+07	1.3E+07	24%	119%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6.2E+07	8.8E+06	14%	138%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	5.7E+06	1.4E+06	25%	13%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	1.3E+06	8.5E+04	6%	3%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	2.5E+07	9.5E+06	39%	55%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	1.7E+07	5.7E+05	3%	37%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	1.5E+07	1.3E+06	9%	33%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	1.2E+06	3.8E+05	33%	3%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	7.5E+07	2.7E+07	35%	168%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	4.6E+08	1.7E+08	38%	1018%	8

10

20

30

【表 1 4 - 5】

R338E/R403E/E410 N	R170E/R233E/E240N	7.8E+07	3.7E+07	47%	175%	7
R318Y/R338E/R403 E	R150Y/R170E/R233E	6.5E+07	4.6E+06	7%	145%	2
D203N/F205T/K228 N	D39N/F41T/K63N	1.4E+07	2.5E+06	18%	31%	2
D203N/F205T/E410 N	D39N/F41T/E240N	4.2E+07	1.7E+07	40%	94%	6
D203N/F205T/R338 E	D39N/F41T/R170E	1.0E+08	2.3E+07	22%	234%	2
D203N/F205T/R338 A	D39N/F41T/R170A	6.2E+07	1.4E+07	22%	139%	3
D203N/F205T/R318 Y	D39N/F41T/R150Y	2.0E+07	2.5E+06	12%	45%	4
D203N/F205T/R338 E/ R403E	D39N/F41T/R170E/R 233E	1.9E+07	4.8E+06	25%	42%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	8.5E+07	3.4E+07	40%	190%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	2.1E+08	6.1E+07	29%	469%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	2.1E+08	4.6E+07	22%	473%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	4.7E+07	6.5E+06	14%	105%	5
K228N/R338E/R403 E	K63N/R170E/R233E	4.8E+07	8.6E+06	18%	108%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.1E+07	1.7E+06	8%	47%	2
R318Y/R338E/E410 N	R150Y/R170E/E240N	3.4E+08	1.4E+08	39%	770%	26
D104N/K106S/R318 Y/ R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R15 0Y/ R170E/E240N	2.6E+08	5.9E+07	23%	581%	4

10

20

30

【表 1 4 - 6】

Y155F/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ E240N	3.7E+08	1.3E+08	33%	835%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	1.2E+08	2.6E+07	22%	272%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.7E+07	3.8E+06	14%	59%	3
R318Y/R338E/R403E/ E410N	R150Y/R170E/R233E/ E240N	1.2E+08	8.1E+07	69%	262%	14
A103N/N105S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.5E+08	7.3E+07	50%	327%	5
D104N/K106S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.7E+08	7.9E+07	47%	377%	3
Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.9E+08	5.0E+07	27%	418%	4

【表 1 4 - 7】

A103N/N105S/Y155 F/R318Y/R338E/R4 03E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[1 55]F/R150Y/R170E/R 233E/E240N	1.3E+08	1.8E+06	1%	283%	2
D104N/K106S/Y155 F/R318Y/R338E/R4 03E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/R150Y/R170E/R 233E/E240N	1.8E+08	9.1E+06	5%	394%	2
D203N/F205T/R318 Y/ E410N	D39N/F41T/R150Y/E 240N	3.9E+07	2.0E+07	52%	88%	6
R333S	R165S	1.1E+05	5.5E+04	51%	0.2%	3
R338L	R170L	2.0E+08	2.3E+07	11%	444%	3
K316N	K148N	6.2E+06	4.2E+06	69%	14%	3
K316A	K148A	6.1E+06	8.2E+05	13%	14%	3
K316E	K148E	7.1E+05	1.4E+05	19%	2%	3
K316S	K148S	3.9E+06	6.2E+05	16%	9%	3
K316M	K148M	3.1E+07	1.4E+07	46%	70%	3
E239S	E74S	3.4E+07	1.8E+07	52%	75%	3
E239A	E74A	4.9E+07	6.2E+06	13%	110%	3
E239R	E74R	5.6E+07	1.1E+07	19%	126%	3
E239K	E74K	5.1E+07	5.1E+06	10%	114%	3
H257F	H92F	4.8E+07	6.6E+06	14%	108%	3
H257Y	H92Y	3.4E+07	9.1E+06	27%	75%	3
H257E	H92E	2.7E+07	1.5E+07	57%	60%	3
H257S	H92S	3.5E+07	1.3E+07	36%	78%	3
T412A	T242A	4.6E+07	2.8E+07	62%	103%	5
T412V	T242V	5.8E+07	3.2E+07	55%	130%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	8.0E+07	1.7E+07	21%	178%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	8.8E+07	2.7E+07	30%	197%	4
E410Q	E240Q	1.2E+08	7.6E+07	63%	269%	4
E410S	E240S	1.1E+08	6.6E+07	60%	246%	12
E410A	E240A	1.1E+08	5.6E+07	50%	248%	10
E410D	E240D	6.0E+07	1.6E+07	27%	134%	4
N346D	N178D	1.9E+07	8.5E+06	44%	43%	4

10

20

30

【表 1 4 - 8】

Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3E+07	6.8E+06	53%	29%	2
N346Y	N178Y	9.8E+07	2.3E+07	24%	218%	8
Y345A	Y177A	1.5E+07	6.3E+06	43%	32%	4
Y345T	Y177T	5.0E+07	2.5E+07	50%	112%	4
T343R	T175R	1.7E+08	1.1E+08	66%	372%	9
T343E	T175E	4.0E+07	2.3E+07	58%	88%	4
T343Q	T175Q	7.1E+07	2.2E+07	30%	159%	3
F342I	F174I	5.4E+07	2.9E+07	54%	121%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	9.3E+07	1.8E+07	19%	208%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	1.5E+08	5.3E+07	36%	331%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	5.6E+07	1.2E+07	21%	126%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.2E+07	5.7E+05	3%	50%	2
K228N/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.6E+08	6.1E+07	39%	349%	3
Y155F/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/ R170E/R233E/E240N	2.0E+08	9.3E+06	5%	453%	2
D85N/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.6E+08	2.3E+07	15%	346%	2
I251S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	1.5E+08	4.2E+07	27%	344%	4
D104N/K106S/I251S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	2.0E+07	16%	271%	8
Y155F/I251S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.7E+08	9.2E+06	6%	374%	2
I251S/R318Y/R338E/ E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	3.8E+08	6.1E+07	16%	851%	7
D104N/K106S/I251S/ R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	1.3E+08	3.2E+07	24%	300%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	8.8E+04	8.2E+04	94%	0.2%	2
K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.5E+08	4.7E+07	30%	341%	6

10

20

30

40

【表 1 4 - 9】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.8E+08	6.1E+07	33%	408%	6
A103N/N105S/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/ N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.0E+08	7.6E+06	7%	232%	2
D104N/K106S/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/ N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.8E+07	6.5E+06	7%	197%	2
K247N/N249S/R318Y/ R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ E240N	2.3E+08	6.6E+07	28%	516%	6
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.0E+08	1.3E+08	42%	674%	7
R318Y/R338E/R403E/ E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	1.8E+08	6.2E+07	34%	401%	4
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	3.3E+08	1.2E+08	37%	730%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.8E+07	1.2E+07	32%	86%	2
D104N/K106S/Y155F/ K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K63N/K82N/N84S	6.3E+07	3.3E+06	5%	142%	2
D104N/K106S/K228N/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/ K82N/N84S	2.3E+07	1.1E+07	48%	51%	5
Y155F/K228N/K247N/ N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	5.3E+07	5.5E+06	10%	118%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.2E+08	3.8E+07	33%	258%	3
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	1.9E+08	5.0E+07	26%	424%	4
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	2.6E+08	7.4E+07	29%	577%	4
R318Y/R338E/R403E/ T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	8.0E+07	3.4E+07	42%	178%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	3.0E+08	8.3E+07	28%	661%	6

10

20

30

40

【表 14 - 10】

R318Y/R338E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/E240N/ T242V	2.4E+08	1.4E+08	60%	536%	4
N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	5.3E+07	6.6E+05	1%	117%	2
D104N/K106S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	8.8E+07	7.9E+06	9%	196%	2
Y155F/N260S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	7.0E+07	2.4E+07	35%	156%	2
R318Y/R338E/N346D/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/ R233E/E240N	3.1E+07	9.1E+06	30%	68%	2
Y155F/R318Y/R338E/ N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ N178D/R233E/E240N	6.2E+07	1.8E+07	30%	139%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	2.9E+07	2.6E+06	9%	64%	2
Y155F/K247N/N249S/ N260S	Y[155]F/K82N/N84S/ N95S	1.9E+07	4.2E+06	22%	43%	2
D104N/K106S/K247N/ N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/ N84S/N95S	9.8E+06	3.0E+06	30%	22%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S/N95S	8.2E+06	3.9E+06	47%	18%	2
K247N/N249S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	9.7E+07	8.7E+06	9%	217%	2
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	2.2E+06	7.4E+05	34%	5%	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	5.4E+08	1.6E+08	29%	1217%	3
R338E/T343R	R170E/T175R	6.0E+08	1.7E+08	29%	1329%	4

10

20

30

† BHK-21細胞において産生；* E410Nの80%グリコシル化形態

【0489】

表15. FIXa変異体の触媒活性 (K_{cat}/K_M)

【表 15 - 1】

突然変異(成熟FIX 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}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	$\pm$ S. D. ($M^{-1}s^{-1}$)	%CV	% of WT k_{cat}/K_M	n
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T 148A)	BeneFIX Benefix(登録 商標) Coagulation FIX(T[14 8]A)	4.3E+07	2.3E+07	54%	92%	140
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	5.6E+07	2.6E+07	46%	122%	200
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	4.6E+07	2.5E+07	54%	100%	33
N157D	N[157]D	2.9E+07	8.1E+06	28%	62%	2
Y155F	Y[155]F	4.1E+07	1.3E+05	0%	90%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[15 5]F	3.9E+07	1.4E+06	4%	85%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[15 5]F	3.6E+07	1.0E+06	3%	78%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.7E+07	1.4E+07	38%	80%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3.8E+07	1.3E+07	34%	83%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.8E+07	6.7E+06	24%	60%	7
D85N	D[85]N	7.0E+07	2.7E+07	39%	153%	17
T148A	T[148]A	4.0E+07	2.2E+07	54%	88%	44
T148A †	T[148]A †	2.3E+07	7.6E+06	33%	50%	7
K5A	K[5]A	5.5E+07	9.3E+06	17%	120%	4
D64N	D[64]N	1.0E+07	1.9E+06	19%	22%	2
D64A	D[64]A	2.5E+06	1.1E+06	47%	5%	2
N167D	N[167]D	3.1E+07	1.1E+07	34%	67%	2
N167Q	N[167]Q	3.5E+07	1.9E+07	53%	76%	4
S61A	S[61]A	4.8E+07	2.5E+07	52%	105%	4
S53A	S[53]A	3.5E+07	1.7E+07	48%	76%	3
T159A	T[159]A	3.7E+07	1.2E+07	33%	80%	3
T169A	T[169]A	4.7E+07	2.0E+07	43%	103%	3
T172A	T[172]A	5.0E+07	2.6E+07	52%	109%	3
T179A	T[179]A	5.5E+07	1.3E+07	23%	119%	3

10

20

30

40

【表 15 - 2】

Y155H	Y[155]H	5.0E+07	1.4E+07	27%	109%	3
Y155Q	Y[155]Q	5.4E+07	2.0E+07	36%	117%	3
S158A	S[158]A	3.6E+07	1.1E+06	3%	79%	2
S158D	S[158]D	4.0E+07	9.3E+05	2%	86%	2
S158E	S[158]E	3.7E+07	3.5E+06	9%	80%	2
N157Q	N[157]Q	3.2E+07	2.8E+06	9%	70%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	2.2E+07	1.2E+07	53%	49%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	3.0E+07	6.4E+06	22%	64%	5
K228N	K63N	3.6E+07	1.7E+07	49%	77%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	4.6E+07	1.5E+07	32%	101%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2.9E+07	1.0E+07	35%	63%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.6E+07	7.6E+06	29%	57%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	4.5E+07	2.4E+06	5%	98%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	5.9E+07	1.1E+07	19%	129%	2
I251S	I86S	5.9E+07	1.2E+07	21%	128%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	5.6E+07	1.1E+07	20%	121%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	3.3E+07	6.4E+06	19%	73%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	3.9E+07	2.6E+07	67%	84%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2.9E+07	1.1E+06	4%	64%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	6.7E+07	5.9E+06	9%	145%	2
A262S	A95bS	2.4E+07	1.0E+07	42%	52%	8
K413N	K243N	2.8E+07	1.4E+07	51%	60%	7
E410N	E240N	1.3E+08	7.7E+07	60%	277%	27
E410N*	E240N*	3.0E+07	1.1E+07	36%	65%	10
E239N	E74N	2.0E+07	1.1E+07	58%	43%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	1.9E+07	5.7E+05	3%	41%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	5.4E+07	1.7E+07	32%	118%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	5.1E+07	9.6E+06	19%	110%	4
A103N/N105S/K247N/ N249S	A[103]N/N[105]S/K82N / N84S	4.0E+07	5.2E+06	13%	87%	6

10

20

30

40

【表 1 5 - 3】

D104N/K106S/K247N/ N249S	D[104]N/K[106]S/K82N / N84S	3.2E+07	3.3E+06	10%	69%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S	3.2E+07	1.1E+07	36%	69%	3
L321N	L153N	1.6E+07	2.0E+06	13%	34%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	4.4E+05	3.7E+04	8%	1%	2
K392N/K394S	K222N/K224S	0.0E+00	n.d.	n.d.	0%	0
S319N/L321S	S151N/L153S	2.8E+07	2.2E+07	78%	62%	3
N260S	N95S	1.8E+07	1.2E+07	66%	38%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.3E+07	6.6E+06	51%	28%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9E+07	1.6E+07	83%	42%	2
D104N/K106S/Y155F/ N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ N95S	4.3E+06	2.0E+06	46%	9%	2
Y284N	Y117N	3.5E+07	1.5E+07	42%	76%	8
G317N	G149N	4.6E+04	n.d.	n.d.	0%	1
R318N/A320S	R150N/A152S	2.3E+05	2.1E+05	89%	1%	3
R318A	R150A	4.5E+07	6.4E+06	14%	98%	2
R318E	R150E	1.7E+07	4.2E+06	25%	37%	3
R318Y	R150Y	7.0E+07	7.0E+06	10%	151%	3
R312Q	R143Q	1.1E+07	1.8E+06	17%	23%	3
R312A	R143A	4.6E+06	9.3E+05	20%	10%	2
R312Y	R143Y	1.2E+07	4.2E+06	36%	26%	2
R312L	R143L	2.4E+07	9.4E+06	39%	53%	2
V202M	V38M	6.6E+07	2.6E+07	39%	143%	2
V202Y	V38Y	2.5E+07	1.6E+06	6%	55%	2
D203M	D39M	4.5E+07	1.9E+07	42%	98%	5
D203Y	D39Y	3.0E+07	2.8E+06	9%	65%	4
A204M	A40M	1.8E+07	1.2E+07	67%	39%	5
A204Y	A40Y	4.6E+07	7.6E+06	16%	100%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	5.3E+06	6.9E+05	13%	12%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	4.3E+05	3.1E+04	7%	1%	3
R403A	R233A	1.4E+07	3.0E+06	22%	30%	7
R403E	R233E	5.5E+06	1.5E+06	28%	12%	6

10

20

30

40

【表 15 - 4】

K400A	K230A	2.0E+07	3.1E+06	16%	43%	2
K400E	K230E	9.5E+06	1.1E+06	12%	21%	2
K293E	K126E	8.1E+06	5.4E+05	7%	17%	2
K293A	K126A	2.1E+07	4.4E+06	21%	45%	2
R333A	R165A	1.6E+05	1.1E+04	7%	0%	2
R333E	R165E	1.3E+04	n.d.	n.d.	0%	1
R338A	R170A	1.6E+08	2.5E+07	15%	350%	2
R338E	R170E	1.8E+08	8.3E+07	45%	396%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	5.3E+07	1.3E+07	24%	115%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6.2E+07	8.8E+06	14%	134%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	5.7E+06	1.4E+06	25%	12%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	1.3E+06	8.5E+04	6%	3%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	2.5E+07	9.5E+06	39%	53%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	1.7E+07	5.7E+05	3%	36%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	1.5E+07	1.3E+06	9%	32%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	1.2E+06	3.8E+05	33%	3%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	7.5E+07	2.7E+07	35%	163%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	4.4E+08	1.5E+08	33%	950%	12
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	1.9E+08	1.4E+08	72%	411%	17
Y155F/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/R170E/R233E / E240N	1.8E+08	6.0E+07	32%	401%	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	6.2E+07	6.3E+06	10%	134%	3
Y155F/R318Y/R338E/ R403E	Y[155]F/R150Y/R170E / R233E	8.7E+07	5.1E+07	58%	189%	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	1.4E+07	2.5E+06	18%	30%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	4.2E+07	1.7E+07	40%	91%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1.0E+08	2.3E+07	22%	228%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	6.2E+07	1.4E+07	22%	135%	3

10

20

30

40

【表 15 - 5】

D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	2.0E+07	2.5E+06	12%	44%	4
D203N/F205T/R338E/ R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	1.9E+07	4.8E+06	25%	41%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	8.5E+07	3.4E+07	40%	184%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	2.1E+08	6.1E+07	29%	455%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	2.1E+08	4.6E+07	22%	459%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	4.7E+07	6.5E+06	14%	102%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	4.8E+07	8.6E+06	18%	105%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.1E+07	1.7E+06	8%	46%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	3.4E+08	1.2E+08	37%	727%	42
D104N/K106S/R318Y/ R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/ R170E/E240N	2.6E+08	5.9E+07	23%	564%	4
Y155F/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R170E / E240N	3.7E+08	1.3E+08	33%	810%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	1.2E+08	2.6E+07	22%	264%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.5E+07	4.7E+06	19%	54%	5
Y155F/R318Y/R403E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R233E / E240N	3.6E+07	2.9E+07	82%	78%	2
R318Y/R338E/R403E/ E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	1.5E+08	8.2E+07	56%	320%	26
A103N/N105S/R318Y/ R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.5E+08	7.3E+07	50%	318%	5
D104N/K106S/R318Y/ R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.7E+08	7.9E+07	47%	366%	3
Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E / R233E/E240N	1.9E+08	5.0E+07	27%	406%	4

10

20

30

【表 1 5 - 6】

A103N/N105S/Y15 5F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[15 5]F/ R150Y/R170E/R2 33E/E240N	1.3E+08	1.8E+06	1%	274%	2
D104N/K106S/Y15 5F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[15 5]F/ R150Y/R170E/R2 33E/E240N	1.8E+08	9.1E+06	5%	382%	2
D203N/F205T/R31 8Y/ E410N	D39N/F41T/R150Y/E2 40N	3.9E+07	2.0E+07	52%	85%	6
R333S	R165S	1.1E+05	5.5E+04	51%	0%	3
R338L	R170L	2.0E+08	2.3E+07	11%	431%	3
K316N	K148N	6.2E+06	4.2E+06	69%	13%	3
K316A	K148A	6.1E+06	8.2E+05	13%	13%	3
K316E	K148E	7.1E+05	1.4E+05	19%	2%	3
K316S	K148S	3.9E+06	6.2E+05	16%	9%	3
K316M	K148M	3.1E+07	1.4E+07	46%	68%	3
E239S	E74S	3.4E+07	1.8E+07	52%	73%	3
E239A	E74A	4.9E+07	6.2E+06	13%	107%	3
E239R	E74R	5.6E+07	1.1E+07	19%	122%	3
E239K	E74K	5.1E+07	5.1E+06	10%	111%	3
H257F	H92F	4.8E+07	6.6E+06	14%	105%	3
H257Y	H92Y	3.4E+07	9.1E+06	27%	73%	3
H257E	H92E	2.7E+07	1.5E+07	57%	58%	3
H257S	H92S	3.5E+07	1.3E+07	36%	76%	3
T412A	T242A	4.6E+07	2.8E+07	62%	100%	5
T412V	T242V	5.8E+07	3.2E+07	55%	126%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	8.0E+07	1.7E+07	21%	173%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	8.8E+07	2.7E+07	30%	192%	4
E410Q	E240Q	1.2E+08	7.6E+07	63%	261%	4
E410S	E240S	1.1E+08	6.6E+07	60%	239%	12
E410A	E240A	1.1E+08	5.6E+07	50%	241%	10
E410D	E240D	6.0E+07	1.6E+07	27%	130%	4
N346D	N178D	1.9E+07	8.5E+06	44%	42%	4

10

20

30

【表 15 - 7】

Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3E+07	6.8E+06	53%	28%	2
N346Y	N178Y	9.8E+07	2.3E+07	24%	212%	8
Y345A	Y177A	1.5E+07	6.3E+06	43%	32%	4
Y345T	Y177T	5.0E+07	2.5E+07	50%	108%	4
T343R	T175R	1.4E+08	1.0E+08	70%	313%	12
T343E	T175E	4.0E+07	2.3E+07	58%	86%	4
T343Q	T175Q	7.1E+07	2.2E+07	30%	154%	3
F342I	F174I	5.4E+07	2.9E+07	54%	118%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	9.3E+07	1.8E+07	19%	202%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	1.5E+08	5.3E+07	36%	322%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	5.6E+07	1.2E+07	21%	122%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.2E+07	5.7E+05	3%	48%	2
K228N/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/ E240N	1.6E+08	6.1E+07	39%	339%	3
Y155F/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.6E+08	4.1E+07	25%	356%	5
D85N/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.6E+08	2.3E+07	15%	336%	2
I251S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	1.5E+08	4.2E+07	27%	334%	4
D104N/K106S/I251S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	1.2E+08	2.0E+07	16%	263%	8
Y155F/I251S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	1.7E+08	9.2E+06	6%	363%	2
I251S/R318Y/R338E/ E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	3.9E+08	7.4E+07	19%	849%	10
D104N/K106S/I251S/ R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/ R150Y/R170E/E240N	1.3E+08	3.2E+07	24%	291%	3

10

20

30

40

【表 15 - 8】

F314N/K316S	F145N/K148S	8.8E+04	8.2E+04	94%	0%	2
K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.5E+08	4.7E+07	30%	331%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.9E+08	5.7E+07	30%	405%	10
A103N/N105S/K247N/ N249S/R318Y/ R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N / N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.5E+08	4.2E+07	28%	324%	6
D104N/K106S/K247N/ N249S/R318Y/ R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N / N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	8.8E+07	6.5E+06	7%	192%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S /R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	1.3E+08	7.3E+07	54%	292%	6
K247N/N249S/R318Y/ R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	2.3E+08	6.6E+07	28%	501%	6
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.3E+08	1.3E+08	39%	717%	9
R318Y/R338E/R403E/ E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	2.1E+08	6.1E+07	29%	458%	7
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	3.3E+08	1.2E+08	37%	708%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.8E+07	1.2E+07	32%	83%	2
D104N/K106S/Y155F/ K228N/K247N /N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K63N/K82N/N84S	6.3E+07	3.3E+06	5%	137%	2
D104N/K106S/K228N/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N / K82N/N84S	2.3E+07	1.1E+07	48%	49%	5

10

20

30

40

【表 15 - 9】

Y155F/K228N/K247N/ N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	5.3E+07	5.5E+06	10%	115%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	1.6E+08	8.4E+07	51%	352%	17
D104N/K106S/K228N/ K247N/N249S /R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N / K82N/N84S/R150Y/ R170E/ R233E/E240N	1.1E+08	4.4E+07	40%	239%	7
Y155F/K228N/K247N/ N249S/R318Y/ R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	1.2E+08	5.3E+07	44%	263%	5
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	1.6E+08	6.3E+07	40%	342%	6
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	2.5E+08	9.2E+07	37%	538%	6
R318Y/R338E/R403E/ T412A	R150Y/R170E/R233E/ T242A	8.0E+07	3.4E+07	42%	173%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	3.0E+08	8.3E+07	28%	642%	6
R318Y/R338E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/E240N/ T242V	2.6E+08	1.2E+08	46%	571%	11
N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3E+07	6.6E+05	1%	114%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S /R150Y/R170E/R233E/ E240N	8.8E+07	7.9E+06	9%	190%	2
Y155F/N260S/R318Y/ R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	7.0E+07	2.4E+07	35%	152%	2
R318Y/R338E/N346D/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/ R233E/E240N	3.1E+07	9.1E+06	30%	66%	2

10

20

30

40

【表 15 - 10】

Y155F/R318Y/R338E/ N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ N178D/R233E/E240N	6.2E+07	1.8E+07	30%	135%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	2.9E+07	2.6E+06	9%	62%	2
Y155F/K247N/N249S/ N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.9E+07	4.2E+06	22%	42%	2
D104N/K106S/K247N/ N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/ N84S/N95S	9.8E+06	3.0E+06	30%	21%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S/N95S	8.2E+06	3.9E+06	47%	18%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	6.7E+07	2.6E+07	38%	145%	6
Y155F/K247N/N249S/ N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7E+07	3.6E+07	64%	124%	5
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	2.2E+06	7.4E+05	34%	5%	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	4.2E+08	1.4E+08	33%	907%	13
Y155F/R318Y/R338E/ T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	3.0E+08	8.3E+07	28%	640%	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/E240N	2.2E+08	1.2E+08	52%	487%	5
R338E/T343R	R170E/T175R	5.2E+08	1.6E+08	31%	1120%	7
T343R/N346Y	T175R/N178Y	9.6E+07	4.4E+07	46%	208%	11
R318Y/R338E/N346Y/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/ R233E/E240N	1.2E+08	2.1E+07	16%	270%	3
R318Y/R338E/T343R/ N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/ N178Y/R233E/E240N	3.1E+08	1.1E+08	37%	663%	5

10

20

30

40

【表 1 5 - 1 1】

T343R/N346D	T175R/N178D	1.6E+07	2.6E+06	16%	36%	2
R318Y/R338E/T343R/ N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	8.2E+07	3.2E+06	4%	177%	2
R318Y/R338E/Y345A/ R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	8.3E+07	3.6E+07	44%	180%	6
R318Y/R338E/Y345A/ N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	2.3E+07	7.6E+06	33%	49%	3
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	9.5E+07	6.6E+07	69%	206%	5
K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E	2.3E+08	1.6E+08	71%	496%	2
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	1.0E+07	4.5E+06	45%	22%	3
K247N/N249S/R318Y/ R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/ E240N	2.7E+07	1.2E+07	44%	58%	10
Y155F/K247N/N249S/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	1.1E+08	2.4E+07	23%	229%	3

10

20

【表 1 5 - 1 2】

K247N/N249S/R338E/ R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/ E240N	1.9E+08	2.9E+07	15%	422%	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	1.6E+08	7.4E+07	45%	357%	4
Y155F/R318Y/R338E/ T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/ T175R/R233E	2.6E+08	1.7E+08	65%	563%	4
R318Y/R338E/T343R/ E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	3.4E+08	1.6E+08	48%	728%	16
Y155F/R318Y/R338E/ T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ T175R/E240N	3.7E+08	1.2E+08	32%	794%	4
R318Y/T343R/R403E/ E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	5.8E+07	1.8E+07	31%	125%	3
Y155F/R318Y/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/ R233E/E240N	2.6E+08	5.0E+07	19%	571%	2
R338E/T343R/R403E/ E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	3.0E+08	8.2E+07	27%	650%	2
Y155F/R338E/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/ R233E/E240N	2.4E+08	1.0E+08	42%	524%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	4.0E+08	1.5E+08	37%	864%	11

30

40

50

【表 1 5 - 1 3】

K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	3.8E+08	1.5E+08	40%	824%	5
K228N/I251S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	2.1E+08	7.2E+07	34%	463%	7
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.4E+08	5.0E+07	37%	296%	5
N260S/R318Y/R338E/ T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.9E+08	1.1E+08	38%	638%	7
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	1.5E+08	6.0E+07	39%	335%	5
K228N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/E240N	4.1E+08	1.4E+08	34%	880%	12
Y155F/K228N/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/ R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3.0E+08	1.1E+08	37%	646%	5
Y155F/R338E/T343R/ R403E	Y[155]F/R170E/T175R/ R233E	2.0E+08	7.7E+07	39%	429%	5

10

20

【表 1 5 - 1 4】

R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	3.1E+08	9.6E+07	31%	663%	2
Y155F/R338E/T343R/ R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/ R233E/E240S	2.9E+08	1.0E+08	35%	629%	6
Y155F/N260S/R338E/ T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/ T175R/R233E	9.4E+07	3.1E+07	33%	203%	6
Y155F/I251S/R338E/ T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	3.0E+08	1.6E+07	5%	651%	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240S	4.4E+08	1.7E+08	39%	962%	14
Y155F/K247N/N249S/ T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	8.5E+07	2.7E+07	31%	184%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.9E+08	5.0E+06	2%	630%	2
K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R/R233E	4.1E+08	2.2E+08	55%	886%	4

30

40

【表 1 5 - 1 5】

Y155F/K247N/N24 9S/R338E/T343R/R 403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R 170E/T175R/R233E/E2 40N	3.7E+08	1.1E+07	3%	805%	2
K247N/N249S/R33 8E/ T343R/R403E/ E410N	K82N/N84S/R170E/T1 75R/ R233E/E240N	4.3E+08	1.2E+07	3%	930%	2
Y155F/K247N/N24 9S/ R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R 150Y/R170E	2.9E+08	4.1E+07	14%	632%	2
Y155F/K247N/N24 9S/ R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R 150Y/T175R	2.5E+08	9.4E+07	37%	549%	4
Y155F/K247N/N24 9S/ R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R 150Y/R233E	1.6E+07	5.4E+06	35%	34%	3
Y155F/K247N/N24 9S/ R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R 150Y/E240N	7.2E+07	2.5E+07	35%	155%	3
Y155F/K247N/N24 9S/ R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R 170E/R233E	1.4E+08	5.7E+07	41%	299%	2
Y155F/K247N/N24 9S/ R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R 170E/T175R	7.3E+08	2.6E+08	36%	1579%	2
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/T 343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R 150Y/R170E/T175R/E2 40N	5.0E+08	2.8E+08	57%	1091%	4
K247N/N249S/R31 8Y/ R338E/T343R/ E410N	K82N/N84S/R150Y/R1 70E/ T175R/E240N	3.2E+08	1.6E+08	50%	687%	6

10

20

【表 15 - 16】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	1.6E+08	6.2E+07	38%	350%	2
K247N/N249S/R318Y/ T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E/E240N	1.3E+08	3.9E+07	30%	279%	7
Y155F/K247N/N249S/ R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	4.7E+08	3.1E+08	66%	1009%	8
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	1.3E+08	5.1E+07	40%	276%	2
K247N/N249S/R318Y/ T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233E	3.9E+07	2.2E+07	57%	84%	9
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	3.1E+08	2.1E+08	67%	668%	4
K247N/N249S/R318Y/ T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/ E240N	2.0E+08	1.6E+08	77%	439%	4
Y155F/K247N/N249S/ R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	5.9E+08	5.8E+07	10%	1269%	2

10

20

【表 15 - 17】

K247N/N249S/R338E/ T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/ R233E	5.6E+08	8.8E+07	16%	1215%	2
Y155F/K247N/N249S/ R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	1.8E+08	1.1E+07	6%	391%	2
K247N/N249S/R338E/ T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/ E240N	3.1E+08	1.0E+08	33%	676%	5
Y155F/K247N/N249S/ T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	2.9E+08	8.8E+07	30%	635%	2
K247N/N249S/T343R/ R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/ E240N	1.3E+08	1.7E+07	13%	285%	2
Y155F/R318Y/R338E/ T343R	Y[155]F/R150Y/R170E / T175R	3.6E+08	1.5E+08	41%	771%	7
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	1.5E+08	3.3E+07	22%	324%	2
Y155F/R318Y/T343R/ R403E	Y[155]F/R150Y/T175R / R233E	7.1E+07	1.4E+07	20%	154%	2
Y155F/T343R/R403E/ E410N	Y[155]F/T175R/R233E / E240N	1.5E+08	2.4E+07	17%	321%	2
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	3.6E+08	1.6E+08	45%	772%	7
K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175R	3.9E+08	1.6E+08	43%	840%	4

10

20

30

【表 15 - 18】

Y155F/K247N/N249S/ T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	2.8E+08	1.1E+08	38%	599%	5
Y155F/K247N/N249S/ R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	2.4E+07	1.4E+07	59%	53%	7
Y155F/R338E/T343R/ E410N	Y[155]F/R170E/T175R/ E240N	3.5E+08	2.2E+08	62%	761%	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	9.3E+07	2.8E+07	30%	201%	2
Y155F/R318Y/T343R/ E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/ E240N	1.5E+08	6.6E+07	44%	326%	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	6.2E+07	1.1E+07	17%	135%	2
K228N/R318Y/R338E/ T343R/R403E/ E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.7E+08	8.8E+07	32%	593%	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E	2.9E+08	1.3E+08	46%	636%	3

10

20

【表 15 - 19】

K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/E240N	1.3E+08	4.5E+07	35%	278%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ T175R/R233E/E240N	7.1E+07	3.3E+07	46%	153%	3

30

† BHK-21細胞において産生； * E410Nの80%グリコシル化形態

【0490】

表16. FIXa変異体の触媒活性 (K_{cat})

【表 16-1】

突然変異(成熟FIX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
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T[148]A)	2.8	1.1	39%	125
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	3.6	1.2	34%	120
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	3.1	1.4	46%	31
N157D	N[157]D	3.3	0.5	16%	2
Y155F	Y[155]F	3.7	0.4	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	3.2	0.0	0%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	2.9	0.1	4%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.1	1.0	31%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3.1	1.1	34%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.5	0.5	21%	7
D85N	D[85]N	4.2	0.8	19%	15
T148A	T[148]A	2.2	0.9	42%	30
T148A †	T[148]A †	1.6	0.2	14%	7
K5A	K[5]A	3.1	0.2	8%	2
D64N	D[64]N	1.2	0.4	31%	2
D64A	D[64]A	0.3	0.2	70%	2
N167D	N[167]D	2.9	0.8	27%	2
N167Q	N[167]Q	2.3	0.7	32%	4
S61A	S[61]A	3.6	1.5	41%	4
S53A	S[53]A	3.7	1.7	44%	3
T159A	T[159]A	3.7	1.2	34%	3
T169A	T[169]A	4.6	1.6	36%	3
T172A	T[172]A	4.4	1.5	34%	3
T179A	T[179]A	5.1	0.6	12%	3
Y155H	Y[155]H	4.6	0.9	18%	3
Y155Q	Y[155]Q	4.4	1.0	24%	3

10

20

30

【表 16 - 2】

S158A	S[158]A	3.9	0.1	3%	2
S158D	S[158]D	3.5	0.3	8%	2
S158E	S[158]E	3.5	0.2	5%	2
N157Q	N[157]Q	3.5	0.1	4%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	1.6	0.6	40%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	1.2	0.5	40%	5
K228N	K63N	2.7	1.2	43%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	2.7	0.8	29%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2.1	0.5	22%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.4	0.1	6%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	3.3	0.3	10%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	4.6	1.2	27%	2
I251S	I86S	3.8	1.1	30%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	2.8	0.6	22%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	1.5	0.3	19%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	2.9	1.0	36%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2.9	0.5	18%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	3.7	0.8	22%	2
A262S	A95bS	2.3	0.7	32%	8
K413N	K243N	2.6	0.5	19%	5
E410N	E240N	5.0	2.2	45%	21
E410N*	E240N*	2.2	0.5	25%	11
E239N	E74N	1.4	0.5	36%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	2.0	0.0	0%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	3.9	1.0	26%	11

10

20

30

【表 16-3】

Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	3.3	0.7	21%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	3.4	0.5	15%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	3.3	1.1	32%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	2.8	1.1	40%	3
L321N	L153N	1.9	0.1	4%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	活性なし	n.d.	n.d.	4
S319N/L321S	S151N/L153S	1.4	0.9	61%	3
N260S	N95S	1.3	0.5	42%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.2	0.7	58%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9	0.6	32%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	0.4	0.1	28%	2
Y284N	Y117N	2.0	0.9	45%	8
G317N	G149N	活性なし	n.d.	n.d.	5
R318N/A320S	R150N/A152S	活性なし	n.d.	n.d.	8
R318A	R150A	2.4	0.8	32%	3
R318E	R150E	0.6	0.2	35%	3
R318Y	R150Y	2.9	0.7	26%	3
R312Q	R143Q	0.3	0.1	26%	3
R312A	R143A	0.3	0.0	8%	2
R312Y	R143Y	0.4	0.3	73%	2
R312L	R143L	0.7	0.3	41%	2
V202M	V38M	2.6	1.0	37%	2
V202Y	V38Y	1.8	0.2	10%	2
D203M	D39M	1.8	0.8	42%	5
D203Y	D39Y	1.7	0.5	27%	4

10

20

30

【表 16 - 4】

A204M	A40M	0.6	0.5	84%	5
A204Y	A40Y	1.9	0.8	42%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	0.3	0.0	5%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	活性なし	n.d.	n.d.	4
R403A	R233A	0.6	0.2	24%	7
R403E	R233E	0.4	0.1	25%	6
K400A	K230A	1.4	0.2	14%	2
K400E	K230E	0.6	0.0	4%	2
K293E	K126E	0.5	0.1	15%	2
K293A	K126A	1.4	0.4	28%	2
R333A	R165A	活性なし	n.d.	n.d.	2
R333E	R165E	活性なし	n.d.	n.d.	2
R338A	R170A	5.4	0.3	5%	2
R338E	R170E	4.7	1.0	21%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	3.8	0.9	24%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	3.3	1.2	37%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	0.4	0.0	9%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	0.1	0.0	37%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	1.6	0.7	41%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	0.8	0.2	27%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	0.7	0.1	12%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	0.1	0.0	35%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	3.5	0.9	27%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	5.2	0.8	16%	8
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	3.3	1.3	39%	7
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	3.5	0.4	11%	2

10

20

30

【表 16 - 5】

D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	0.6	0.2	27%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	1.7	0.3	16%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	2.5	0.0	2%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	2.3	0.5	23%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	0.9	0.1	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	0.9	0.0	5%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	3.5	0.9	27%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	4.8	0.8	17%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	6.5	0.5	7%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	2.9	0.6	19%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	2.8	0.3	9%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.0	0.2	9%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	4.6	1.3	29%	26
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	4.8	0.6	12%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	5.6	1.4	25%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	5.0	0.5	10%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.3	0.3	15%	3
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5.0	3.1	63%	14
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.9	16%	5

10

20

【表 16-6】

D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7	1.1	20%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3	0.7	12%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.4	0.5	7%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.5	0.8	10%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1.6	0.6	36%	6
R333S	R165S	0.05	0.01	22%	3
R338L	R170L	9.5	1.9	21%	3
K316N	K148N	0.3	0.1	39%	3
K316A	K148A	0.3	0.1	21%	3
K316E	K148E	0.1	0.0	9%	3
K316S	K148S	0.2	0.0	10%	3
K316M	K148M	0.7	0.1	15%	3

10

20

【表 16-7】

E239S	E74S	0.7	0.1	19%	3
E239A	E74A	2.8	1.2	43%	3
E239R	E74R	3.4	1.4	42%	3
E239K	E74K	3.0	1.1	36%	3
H257F	H92F	3.0	1.4	46%	3
H257Y	H92Y	2.0	1.1	55%	3
H257E	H92E	1.3	0.4	28%	3
H257S	H92S	1.8	0.3	18%	3
T412A	T242A	2.6	0.3	13%	5
T412V	T242V	2.6	0.6	25%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	2.9	0.4	13%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	2.9	0.5	16%	4
E410Q	E240Q	6.0	2.8	46%	4
E410S	E240S	4.9	1.6	32%	12
E410A	E240A	4.8	1.6	32%	10
E410D	E240D	4.0	0.7	19%	4
N346D	N178D	0.8	0.2	29%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3	0.5	41%	2
N346Y	N178Y	2.6	0.2	9%	8
Y345A	Y177A	0.7	0.6	83%	4
Y345T	Y177T	1.3	0.3	27%	4
T343R	T175R	4.3	1.2	27%	9
T343E	T175E	1.0	0.7	72%	4
T343Q	T175Q	2.5	0.3	11%	3
F342I	F174I	1.3	0.2	16%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	2.4	0.3	14%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	3.4	0.5	14%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	1.7	0.1	5%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.7	1.1	41%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.1	0.7	14%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	9.7	1.6	16%	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.0	0.6	10%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.8	0.6	12%	4
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.5	0.9	17%	8
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.2	0.8	11%	2

10

20

30

40

【表 16 - 8】

I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	6.2	1.2	20%	7
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	3.1	0.6	19%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	0.0	0.0	7%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.1	19%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.5	1.1	17%	6
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.1	0.8	18%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.2	0.3	6%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.8	1.6	41%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	4.3	1.4	33%	7
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	5.8	0.6	10%	4
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5.1	1.7	33%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.5	0.1	4%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.7	1.4	30%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	1.7	0.9	54%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.3	1.9	44%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.1	0.7	12%	3
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	7.9	2.1	26%	4
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	8.4	1.5	18%	4
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	5.1	1.1	21%	4

10

20

30

40

【表 16 - 9】

R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7.0	2.8	39%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	6.3	2.3	37%	4
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.8	1.1	29%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.5	9%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.7	30%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	2.5	1.3	54%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	6.4	2.8	44%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	3.3	0.3	9%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.8	0.3	16%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	0.6	0.0	7%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	0.5	0.0	2%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.0	0.5	9%	2
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	0.3	0.1	29%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	11.8	2.4	20%	3
R338E/T343R	R170E/T175R	7.7	1.3	17%	4

10

20

30

† BHK-21細胞において産生；* E410Nの80%グリコシル化形態

【0491】

表17. FIXa変異体の触媒活性(K_{cat})

【表 17-1】

突然変異(成熟FIX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
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T[148]A)	2.9	1.1	39%	140
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	3.7	1.3	36%	200
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	3.1	1.4	46%	33
N157D	N[157]D	3.3	0.5	16%	2
Y155F	Y[155]F	3.7	0.4	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	3.2	0.0	0%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	2.9	0.1	4%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	3.1	1.0	31%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	3.1	1.1	34%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2.5	0.5	21%	7
D85N	D[85]N	4.1	0.8	20%	17
T148A	T[148]A	2.5	1.0	39%	44
T148A †	T[148]A †	1.6	0.2	14%	7
K5A	K[5]A	3.5	0.8	23%	4
D64N	D[64]N	1.2	0.4	31%	2
D64A	D[64]A	0.3	0.2	70%	2
N167D	N[167]D	2.9	0.8	27%	2
N167Q	N[167]Q	2.3	0.7	32%	4
S61A	S[61]A	3.6	1.5	41%	4
S53A	S[53]A	3.7	1.7	44%	3
T159A	T[159]A	3.7	1.2	34%	3
T169A	T[169]A	4.6	1.6	36%	3
T172A	T[172]A	4.4	1.5	34%	3
T179A	T[179]A	5.1	0.6	12%	3
Y155H	Y[155]H	4.6	0.9	18%	3
Y155Q	Y[155]Q	4.4	1.0	24%	3

10

20

30

40

【表 17 - 2】

S158A	S[158]A	3.9	0.1	3%	2
S158D	S[158]D	3.5	0.3	8%	2
S158E	S[158]E	3.5	0.2	5%	2
N157Q	N[157]Q	3.5	0.1	4%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	1.6	0.6	40%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	1.2	0.5	40%	5
K228N	K63N	2.7	1.2	43%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	2.7	0.8	29%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	2.1	0.5	22%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	2.4	0.1	6%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	3.3	0.3	10%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	4.6	1.2	27%	2
I251S	I86S	3.8	1.1	30%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	2.8	0.6	22%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	1.5	0.3	19%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	2.9	1.0	36%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	2.9	0.5	18%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	3.7	0.8	22%	2
A262S	A95bS	2.3	0.7	32%	8
K413N	K243N	2.5	0.5	19%	7
E410N	E240N	4.9	2.0	41%	27
E410N*	E240N*	2.3	0.5	22%	10
E239N	E74N	1.4	0.5	36%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	2.0	0.0	0%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	3.9	1.0	26%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	3.3	0.7	21%	4

10

20

30

【表 1 7 - 3】

A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	3.4	0.5	15%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	3.3	1.1	32%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	2.8	1.1	40%	3
L321N	L153N	1.9	0.1	4%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	0.0	0.0	7%	2
K392N/K394S	K222N/K224S	0.0	n.d.	n.d.	0
S319N/L321S	S151N/L153S	1.4	0.9	61%	3
N260S	N95S	1.3	0.5	42%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	1.2	0.7	58%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	1.9	0.6	32%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	0.4	0.1	28%	2
Y284N	Y117N	2.0	0.9	45%	8
G317N	G149N	0.0	n.d.	n.d.	1

10

20

【表 1 7 - 4】

R318N/A320S	R150N/A152S	0.0	0.0	95%	3
R318A	R150A	2.7	0.9	32%	2
R318E	R150E	0.6	0.2	35%	3
R318Y	R150Y	2.9	0.7	26%	3
R312Q	R143Q	0.3	0.1	26%	3
R312A	R143A	0.3	0.0	8%	2
R312Y	R143Y	0.4	0.3	73%	2
R312L	R143L	0.7	0.3	41%	2
V202M	V38M	2.6	1.0	37%	2
V202Y	V38Y	1.8	0.2	10%	2
D203M	D39M	1.8	0.8	42%	5
D203Y	D39Y	1.7	0.5	27%	4
A204M	A40M	0.6	0.5	84%	5
A204Y	A40Y	1.9	0.8	42%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	0.3	0.0	5%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	0.1	0.0	50%	3
R403A	R233A	0.6	0.2	24%	7
R403E	R233E	0.4	0.1	25%	6
K400A	K230A	1.4	0.2	14%	2
K400E	K230E	0.6	0.0	4%	2
K293E	K126E	0.5	0.1	15%	2
K293A	K126A	1.4	0.4	28%	2
R333A	R165A	0.1	0.0	35%	2
R333E	R165E	0.0	n.d.	n.d.	1
R338A	R170A	5.4	0.3	5%	2

10

20

30

【表 17 - 5】

R338E	R170E	4.7	1.0	21%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	3.8	0.9	24%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	3.3	1.2	37%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	0.4	0.0	9%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	0.1	0.0	37%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	1.6	0.7	41%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	0.8	0.2	27%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	0.7	0.1	12%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	0.1	0.0	35%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	3.5	0.9	27%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	5.2	1.1	22%	12
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	5.8	3.0	52%	17
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	5.9	0.4	7%	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	3.6	0.4	10%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	5.1	1.0	19%	2

10

20

【表 17-6】

D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	0.6	0.2	27%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	1.7	0.3	16%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	2.5	0.0	2%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	2.3	0.5	23%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	0.9	0.1	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	0.9	0.0	5%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	3.5	0.9	27%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	4.8	0.8	17%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	6.5	0.5	7%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	2.9	0.6	19%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	2.8	0.3	9%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	2.0	0.2	9%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	4.4	1.2	27%	42
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	4.8	0.6	12%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	5.6	1.4	25%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	5.0	0.5	10%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.3	0.3	11%	5
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	2.9	0.6	20%	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	2.8	48%	26
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.9	16%	5

10

20

30

【表 17-7】

D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7	1.1	20%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3	0.7	12%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.4	0.5	7%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	8.5	0.8	10%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	1.6	0.6	36%	6
R333S	R165S	0.1	0.0	22%	3
R338L	R170L	9.5	1.9	21%	3
K316N	K148N	0.3	0.1	39%	3
K316A	K148A	0.3	0.1	21%	3
K316E	K148E	0.1	0.0	9%	3
K316S	K148S	0.2	0.0	10%	3
K316M	K148M	0.7	0.1	15%	3

10

20

【表 17 - 8】

E239S	E74S	0.7	0.1	19%	3
E239A	E74A	2.8	1.2	43%	3
E239R	E74R	3.4	1.4	42%	3
E239K	E74K	3.0	1.1	36%	3
H257F	H92F	3.0	1.4	46%	3
H257Y	H92Y	2.0	1.1	55%	3
H257E	H92E	1.3	0.4	28%	3
H257S	H92S	1.8	0.3	18%	3
T412A	T242A	2.6	0.3	13%	5
T412V	T242V	2.6	0.6	25%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	2.9	0.4	13%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	2.9	0.5	16%	4
E410Q	E240Q	6.0	2.8	46%	4
E410S	E240S	4.9	1.6	32%	12
E410A	E240A	4.8	1.6	32%	10
E410D	E240D	4.0	0.7	19%	4
N346D	N178D	0.8	0.2	29%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	1.3	0.5	41%	2
N346Y	N178Y	2.6	0.2	9%	8
Y345A	Y177A	0.7	0.6	83%	4
Y345T	Y177T	1.3	0.3	27%	4
T343R	T175R	4.1	1.1	27%	12
T343E	T175E	1.0	0.7	72%	4
T343Q	T175Q	2.5	0.3	11%	3
F342I	F174I	1.3	0.2	16%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	2.4	0.3	14%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	3.4	0.5	14%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	1.7	0.1	5%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	2.7	1.1	41%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.1	0.7	14%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.7	3.0	45%	5
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.0	0.6	10%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.8	0.6	12%	4
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.5	0.9	17%	8
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.2	0.8	11%	2

10

20

30

40

【表 17-9】

I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	6.4	2.0	31%	10
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	3.1	0.6	19%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	0.0	0.0	7%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.1	19%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.2	1.0	16%	10
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.9	0.4	11%	6
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.2	0.3	6%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.9	4.7	67%	6
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3.8	1.6	41%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	4.5	1.3	28%	9
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	7.4	2.3	31%	7
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5.1	1.7	33%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	3.5	0.1	4%	2

10

20

30

【表 17 - 11】

D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.7	1.4	30%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	1.7	0.9	54%	5
Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	4.3	1.9	44%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.1	2.2	31%	17
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	6.1	3.7	61%	7
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.1	1.8	34%	5
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	7.0	2.1	30%	6
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	7.8	1.6	20%	6
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	5.1	1.1	21%	4

10

20

【表 17 - 12】

R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7.0	2.8	39%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	5.2	1.7	33%	11
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.8	1.1	29%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.4	0.5	9%	2
Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.8	1.7	30%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	2.5	1.3	54%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	6.4	2.8	44%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	3.3	0.3	9%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	1.8	0.3	16%	2
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	0.6	0.0	7%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	0.5	0.0	2%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.4	2.1	62%	6
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.6	1.2	33%	5
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	0.3	0.1	29%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.7	2.6	27%	13
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	7.8	1.9	24%	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	5.7	2.3	41%	5
R338E/T343R	R170E/T175R	7.1	1.4	20%	7

10

20

30

40

【表 17 - 13】

T343R/N346Y	T175R/N178Y	2.3	0.5	21%	11
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	3.4	0.3	9%	3
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	4.6	1.2	26%	5
T343R/N346D	T175R/N178D	1.9	0.4	21%	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	5.4	2.0	36%	2
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	1.4	0.5	36%	6
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	1.2	0.3	26%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	5.7	3.2	55%	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	10.5	3.6	34%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	1.2	0.5	40%	3
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	2.9	1.6	55%	10
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	5.0	0.6	13%	3
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	4.8	0.8	17%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	6.7	1.6	24%	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	8.2	4.1	50%	4

10

20

30

【表 17 - 14】

R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	4.9	1.2	24%	16
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	9.2	3.1	33%	4
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	5.3	0.9	17%	3
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	8.8	0.3	4%	2
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	9.8	1.4	15%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	5.7	1.1	20%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.7	3.4	35%	11
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10.6	3.6	34%	5

10

20

【表 17 - 15】

K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	7.5	3.3	44%	7
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.3	1.9	36%	5
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	8.9	3.6	40%	7
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	5.8	1.6	28%	5
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.9	3.2	32%	12
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.4	2.3	25%	5
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	5.2	0.9	18%	5
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	6.9	0.3	4%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	6.8	2.4	34%	6
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	6.4	3.8	59%	6
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	5.9	0.7	12%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	7.6	1.7	22%	14
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	4.7	0.2	5%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	10.6	0.8	8%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	9.2	3.3	36%	4

10

20

30

【表 17 - 16】

Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	9.8	0.7	8%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	10.8	1.6	15%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	7.5	1.5	20%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	10.3	3.3	32%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	1.7	0.7	42%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	3.4	0.9	26%	3
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	5.3	0.6	11%	2

【表 17 - 17】

Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	10.6	1.1	10%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	7.7	2.3	30%	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	8.8	4.4	50%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	9.0	0.4	5%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	9.5	1.6	17%	7
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	7.3	3.5	48%	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	7.5	2.1	28%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	3.7	1.6	44%	9
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	8.1	4.1	51%	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	6.1	2.6	42%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	14.6	0.2	1%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	14.6	0.4	3%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	4.8	1.0	20%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	7.9	1.4	18%	5
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	15.0	3.0	20%	2
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	8.0	2.8	36%	2
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	7.9	3.0	38%	7

10

20

30

40

【表 17 - 18】

R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	4.5	1.2	27%	2
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	5.0	1.1	22%	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	6.6	1.4	21%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	8.5	3.3	39%	7
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	8.0	1.7	22%	4
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	7.9	1.6	20%	5

10

【表 17 - 19】

Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	2.7	1.4	52%	7
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	6.0	2.2	37%	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	3.1	0.5	16%	2
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	5.0	1.3	25%	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	3.2	0.4	13%	2
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	10.5	0.7	6%	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	10.9	1.4	13%	3
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	4.7	0.4	8%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	8.1	2.1	26%	3

20

30

† BHK-21細胞において産生；* E410Nの80%グリコシル化形態

【0492】

表18. FIXa変異体の触媒活性(K_M)

【表 18 - 1】

突然変異 (成熟FIX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)	$\pm$ S. D. (nM)	%CV	n
BeneFIX Benefix(登録 商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録 商標) Coagulation FIX(T[14 8]A)	76.9	27.5	36%	12 5
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	74.5	25.5	34%	12 0
Catalyst Bioscience s WT	Catalyst Bioscienc es WT	74.7	23.1	31%	31
N157D	N[157]D	121.8	53.0	44%	2
Y155F	Y[155]F	90.3	10.3	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	80.4	2.5	3%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	81.5	5.2	6%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	88.0	22.5	26%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	83.2	18.2	22%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	91.9	20.2	22%	7
D85N	D[85]N	64.5	23.1	36%	15
T148A	T[148]A	64.5	25.1	39%	30
T148A†	T[148]A†	74.6	16.1	22%	7
K5A	K[5]A	55.0	0.3	1%	2
D64N	D[64]N	121.4	58.8	48%	2
D64A	D[64]A	129.4	36.3	28%	2
N167D	N[167]D	94.6	7.0	7%	2
N167Q	N[167]Q	77.1	35.8	46%	4
S61A	S[61]A	84.6	35.6	42%	4
S53A	S[53]A	109.9	11.6	11%	3

10

20

30

40

【表 18 - 2】

T159A	T[159]A	100.9	1.2	1%	3
T169A	T[169]A	99.7	10.8	11%	3
T172A	T[172]A	96.2	22.1	23%	3
T179A	T[179]A	94.5	16.7	18%	3
Y155H	Y[155]H	93.9	15.8	17%	3
Y155Q	Y[155]Q	87.6	29.8	34%	3
S158A	S[158]A	107.7	0.4	0%	2
S158D	S[158]D	87.0	9.0	10%	2
S158E	S[158]E	96.0	14.1	15%	2
N157Q	N[157]Q	107.8	5.5	5%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	74.3	19.5	26%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	40.6	9.1	22%	5
K228N	K63N	72.5	25.5	35%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	60.1	13.4	22%	6

10

【表 18 - 3】

A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	76.5	15.8	21%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	96.8	21.2	22%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	73.7	3.7	5%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	76.2	6.4	8%	2
I251S	I86S	64.3	13.3	21%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	51.5	15.3	30%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	46.4	19.0	41%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	90.9	41.2	45%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	97.5	13.8	14%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	56.4	17.5	31%	2
A262S	A95bS	99.2	19.9	20%	8
K413N	K243N	109.6	41.0	37%	5
E410N	E240N	46.2	21.5	47%	21
E410N*	E240N*	83.3	36.9	44%	11
E239N	E74N	78.3	29.5	38%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	104.5	3.5	3%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	75.0	15.4	21%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	67.1	23.6	35%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	84.0	9.7	12%	6

20

30

40

【表 18 - 4】

D104N/K106S/K247N/ N249S	D[104]N/K[106]S/K8 2N/N84S	102.3	23.0	23%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	89.3	10.3	12%	3
L321N	L153N	118.5	10.6	9%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	活性な し	n.d.	n.d.	4
S319N/L321S	S151N/L153S	54.2	14.8	27%	3
N260S	N95S	83.4	27.5	33%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N9 5S	94.3	6.8	7%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	130.6	78.1	60%	2
D104N/K106S/Y155F/ N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	107.7	74.8	69%	2
Y284N	Y117N	59.8	23.5	39%	8
G317N	G149N	活性な し	n.d.	n.d.	5
R318N/A320S	R150N/A152S	活性な し	n.d.	n.d.	8

10

20

【表 18 - 5】

R318A	R150A	52.8	25.8	49%	3
R318E	R150E	33.6	10.3	31%	3
R318Y	R150Y	40.7	7.6	19%	3
R312Q	R143Q	29.9	5.0	17%	3
R312A	R143A	61.6	16.9	27%	2
R312Y	R143Y	27.2	11.4	42%	2
R312L	R143L	28.8	0.6	2%	2
V202M	V38M	40.2	1.0	2%	2
V202Y	V38Y	70.6	2.3	3%	2
D203M	D39M	40.6	7.9	19%	5
D203Y	D39Y	58.0	19.5	34%	4
A204M	A40M	34.0	9.2	27%	5
A204Y	A40Y	39.5	10.3	26%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	56.7	10.0	18%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	活性なし	n.d.	n.d.	4
R403A	R233A	46.4	5.2	11%	7
R403E	R233E	67.0	19.4	29%	6
K400A	K230A	74.6	22.1	30%	2
K400E	K230E	61.3	9.3	15%	2
K293E	K126E	63.2	13.9	22%	2
K293A	K126A	73.7	35.2	48%	2
R333A	R165A	活性なし	n.d.	n.d.	2
R333E	R165E	活性なし	n.d.	n.d.	2

10

20

30

【表 18 - 6】

R338A	R170A	33.7	3.7	11%	2
R338E	R170E	28.7	9.0	31%	10
R338A/R403A	R170A/R233A	73.6	18.1	25%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	51.9	11.9	23%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	69.2	10.2	15%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	104.1	31.0	30%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	65.4	1.3	2%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	50.0	15.1	30%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	45.7	1.6	3%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	75.3	47.7	63%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	49.6	14.3	29%	21

40

【表 18 - 7】

R338E/E410N	R170E/E240N	12.6	4.2	33%	8
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	45.5	12.8	28%	7
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	53.7	1.9	4%	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	39.9	3.8	9%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	45.5	12.0	26%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	24.1	5.6	23%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	38.5	9.9	26%	3

【表 18 - 8】

D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	47.5	6.4	13%	4
D203N/F205T/R338E/ R403E	D39N/F41T/R170E/ R233E	51.1	10.7	21%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	44.3	13.0	29%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	23.1	3.0	13%	2
K228N/R338A	K63N/R170A	31.2	4.5	14%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	61.3	5.4	9%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	59.2	4.9	8%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	93.7	1.0	1%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	14.2	4.3	30%	26
D104N/K106S/R318Y/ R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R1 50Y/R170E/E240N	18.9	4.1	22%	4
Y155F/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R170 E/E240N	16.0	4.8	30%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	42.0	4.7	11%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	88.3	12.4	14%	3
R318Y/R338E/R403E/ E410N	R150Y/R170E/R233E /E240N	45.5	12.2	27%	14

10

20

30

【表 18 - 9】

A103N/N105S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R1 50Y/R170E/R233E/E 240N	44.7	20.9	47%	5
D104N/K106S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R1 50Y/R170E/R233E/E 240N	38.5	16.1	42%	3
Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170 E/R233E/E240N	30.4	10.5	35%	4
A103N/N105S/Y155F/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/Y[1 55]F/R150Y/R170E/ R233E/E240N	50.7	4.5	9%	2
D104N/K106S/Y155F/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E /R233E/E240N	48.0	2.1	4%	2
D203N/F205T/R318Y/ E410N	D39N/F41T/R150Y/ E240N	45.7	13.4	29%	6
R333S	R165S	605.9	317.5	52%	3
R338L	R170L	47.9	9.0	19%	3
K316N	K148N	62.5	15.6	25%	3
K316A	K148A	55.2	4.1	7%	3
K316E	K148E	110.5	25.1	23%	3
K316S	K148S	57.3	4.6	8%	3
K316M	K148M	26.0	16.7	64%	3
E239S	E74S	28.5	19.2	67%	3
E239A	E74A	55.4	18.4	33%	3
E239R	E74R	58.3	13.9	24%	3
E239K	E74K	59.2	25.5	43%	3

10

20

30

【表 18 - 10】

H257F	H92F	62.0	30.1	49%	3
H257Y	H92Y	59.3	25.0	42%	3
H257E	H92E	59.7	39.6	66%	3
H257S	H92S	56.0	24.7	44%	3
T412A	T242A	76.1	44.7	59%	5
T412V	T242V	51.2	18.9	37%	8
E410N/T412A	E240N/T242A	37.2	3.6	10%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	33.3	4.9	15%	4
E410Q	E240Q	56.1	18.0	32%	4
E410S	E240S	50.0	11.9	24%	12
E410A	E240A	47.7	11.7	24%	10
E410D	E240D	71.9	26.9	37%	4
N346D	N178D	45.7	7.8	17%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	104.4	14.5	14%	2
N346Y	N178Y	27.4	4.2	15%	8
Y345A	Y177A	50.8	32.4	64%	4
Y345T	Y177T	28.6	7.9	28%	4
T343R	T175R	31.3	10.9	35%	9
T343E	T175E	27.3	10.0	37%	4
T343Q	T175Q	37.0	9.1	25%	3
F342I	F174I	30.0	19.1	64%	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	26.5	6.8	26%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	24.6	5.5	22%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	30.9	4.8	16%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	122.6	53.5	44%	2

10

20

30

【表 18 - 11】

K228N/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	36.1	14.0	39%	3
Y155F/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150 Y/R170E/R233E/E24 0N	48.0	9.8	21%	2
D85N/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y /R170E/R233E/E240 N	39.3	9.8	25%	2
I251S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	33.4	10.2	30%	4
D104N/K106S/I251S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/I86 S/R150Y/R170E/R23 3E/E240N	46.2	7.7	17%	8
Y155F/I251S/R318Y/R 338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y /R170E/R233E/E240 N	43.3	7.0	16%	2
I251S/R318Y/R338E/E 410N	I86S/R150Y/R170E/ E240N	16.2	1.8	11%	7
D104N/K106S/I251S/ R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86 S/R150Y/R170E/E24 0N	24.3	8.6	35%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	635.1	569.9	90%	2

10

20

【表 18 - 12】

K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	39.2	8.3	21%	6
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S /R150Y/R170E/R233 E/E240N	39.1	14.7	38%	6
A103N/N105S/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K8 2N/N84S/R150Y/R17 0E/R233E/E240N	39.7	4.5	11%	2
D104N/K106S/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K8 2N/N84S/R150Y/R17 0E/R233E/E240N	59.0	0.6	1%	2
K247N/N249S/R318Y/ R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/E240N	16.6	3.7	22%	6
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S /R150Y/R170E/E240 N	15.3	4.1	27%	7
R318Y/R338E/R403E/ E410S	R150Y/R170E/R233E /E240S	35.1	12.4	35%	4
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	16.4	4.0	25%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	94.5	27.0	29%	2
D104N/K106S/Y155F/ K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N 84S	75.3	26.4	35%	2
D104N/K106S/K228N/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K6 3N/K82N/N84S	77.1	18.3	24%	5
Y155F/K228N/K247N/ N249S	Y[155]F/K63N/K82N /N84S	79.2	27.6	35%	2

10

20

30

【表 18 - 13】

K228N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K63N/K82N/N84S/R 150Y/R170E/R233E/ E240N	55.8	15.8	28%	3
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E /E240N/T242V	44.3	19.2	43%	4
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E /E240N/T242A	33.5	4.8	14%	4
R318Y/R338E/R403E/ T412A	R150Y/R170E/R233E /T242A	67.5	11.6	17%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	23.5	5.3	22%	6
R318Y/R338E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/E240N /T242V	29.7	10.9	37%	4
N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	72.4	20.2	28%	2
D104N/K106S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/N9 5S/R150Y/R170E/R2 33E/E240N	61.1	0.0	0%	2
Y155F/N260S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y /R170E/R233E/E240 N	83.9	4.4	5%	2

10

20

【表 18 - 14】

R318Y/R338E/N346D/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D /R233E/E240N	77.7	20.9	27%	2
Y155F/R318Y/R338E/ N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170 E/N178D/R233E/E24 0N	100.0	15.6	16%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	114.1	0.0	0%	2
Y155F/K247N/N249S/ N260S	Y[155]F/K82N/N84S /N95S	96.5	5.5	6%	2
D104N/K106S/K247N/ N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K8 2N/N84S/N95S	61.2	14.1	23%	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N 95S	68.5	33.2	49%	2
K247N/N249S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K82N/N84S/N95S/R1 50Y/R170E/R233E/E 240N	62.2	0.0	0%	2
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178 D	127.9	6.2	5%	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R /R233E/E240N	22.3	5.0	23%	3
R338E/T343R	R170E/T175R	13.6	3.7	27%	4

30

40

† BHK-21細胞において産生；* E410Nの80%グリコシル化形態

【0493】

表19. FIXa変異体の触媒活性(K_M)

50

【表 19 - 1】

突然変異(成熟FIX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)	$\pm S.D.$ (nM)	%CV	n
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T[148]A)	75.8	27.2	36%	140
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	73.3	26.8	37%	200
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	72.3	24.3	34%	33
N157D	N[157]D	121.8	53.0	44%	2
Y155F	Y[155]F	90.3	10.3	11%	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	80.4	2.5	3%	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	81.5	5.2	6%	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	88.0	22.5	26%	9
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	83.2	18.2	22%	9
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	91.9	20.2	22%	7
D85N	D[85]N	64.5	21.9	34%	17
T148A	T[148]A	70.1	26.9	38%	44
T148A †	T[148]A †	74.6	16.1	22%	7
K5A	K[5]A	65.4	26.8	41%	4
D64N	D[64]N	121.4	58.8	48%	2
D64A	D[64]A	129.4	36.3	28%	2
N167D	N[167]D	94.6	7.0	7%	2
N167Q	N[167]Q	77.1	35.8	46%	4
S61A	S[61]A	84.6	35.6	42%	4
S53A	S[53]A	109.9	11.6	11%	3

10

20

30

【表 19 - 2】

T159A	T[159]A	100.9	1.2	1%	3
T169A	T[169]A	99.7	10.8	11%	3
T172A	T[172]A	96.2	22.1	23%	3
T179A	T[179]A	94.5	16.7	18%	3
Y155H	Y[155]H	93.9	15.8	17%	3
Y155Q	Y[155]Q	87.6	29.8	34%	3
S158A	S[158]A	107.7	0.4	0%	2
S158D	S[158]D	87.0	9.0	10%	2
S158E	S[158]E	96.0	14.1	15%	2
N157Q	N[157]Q	107.8	5.5	5%	2
D203N/F205T	D39N/F41T	74.3	19.5	26%	12
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	40.6	9.1	22%	5
K228N	K63N	72.5	25.5	35%	13
D85N/K228N	D[85]N/K63N	60.1	13.4	22%	6
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	76.5	15.8	21%	3
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	96.8	21.2	22%	3
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	73.7	3.7	5%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	76.2	6.4	8%	2
I251S	I86S	64.3	13.3	21%	13
D85N/I251S	D[85]N/I86S	51.5	15.3	30%	5
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	46.4	19.0	41%	5
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	90.9	41.2	45%	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	97.5	13.8	14%	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	56.4	17.5	31%	2

【表 19 - 3】

A262S	A95bS	99.2	19.9	20%	8
K413N	K243N	106.3	40.4	38%	7
E410N	E240N	45.9	19.1	42%	27
E410N*	E240N*	85.2	38.1	45%	10
E239N	E74N	78.3	29.5	38%	9
T241N/H243S	T76N/H78S	104.5	3.5	3%	2
K247N/N249S	K82N/N84S	75.0	15.4	21%	11
Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	67.1	23.6	35%	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	84.0	9.7	12%	6
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	102.3	23.0	23%	2

【表 19 - 4】

D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	89.3	10.3	12%	3
L321N	L153N	118.5	10.6	9%	2
F314N/H315S	F145N/H147S	93.0	14.3	15%	2
K392N/K394S	K222N/K224S	0.0	n.d.	n.d.	0
S319N/L321S	S151N/L153S	54.2	14.8	27%	3
N260S	N95S	83.4	27.5	33%	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	94.3	6.8	7%	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	130.6	78.1	60%	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	107.7	74.8	69%	2
Y284N	Y117N	59.8	23.5	39%	8
G317N	G149N	104.6	n.d.	n.d.	1
R318N/A320S	R150N/A152S	84.5	21.2	25%	3
R318A	R150A	62.3	28.2	45%	2
R318E	R150E	33.6	10.3	31%	3
R318Y	R150Y	40.7	7.6	19%	3
R312Q	R143Q	29.9	5.0	17%	3
R312A	R143A	61.6	16.9	27%	2
R312Y	R143Y	27.2	11.4	42%	2
R312L	R143L	28.8	0.6	2%	2
V202M	V38M	40.2	1.0	2%	2
V202Y	V38Y	70.6	2.3	3%	2

10

20

【表 19 - 5】

D203M	D39M	40.6	7.9	19%	5
D203Y	D39Y	58.0	19.5	34%	4
A204M	A40M	34.0	9.2	27%	5
A204Y	A40Y	39.5	10.3	26%	2
K400A/R403A	K230A/R233A	56.7	10.0	18%	2
K400E/R403E	K230E/R233E	137.1	68.4	50%	3
R403A	R233A	46.4	5.2	11%	7
R403E	R233E	67.0	19.4	29%	6
K400A	K230A	74.6	22.1	30%	2
K400E	K230E	61.3	9.3	15%	2
K293E	K126E	63.2	13.9	22%	2
K293A	K126A	73.7	35.2	48%	2
R333A	R165A	406.7	117.5	29%	2
R333E	R165E	437.3	n.d.	n.d.	1
R338A	R170A	33.7	3.7	11%	2
R338E	R170E	28.7	9.0	31%	10

30

40

【表 19 - 6】

R338A/R403A	R170A/R233A	73.6	18.1	25%	6
R338E/R403E	R170E/R233E	51.9	11.9	23%	2
K293A/R403A	K126A/R233A	69.2	10.2	15%	2
K293E/R403E	K126E/R233E	104.1	31.0	30%	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	65.4	1.3	2%	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	50.0	15.1	30%	2
R318A/R403A	R150A/R233A	45.7	1.6	3%	2
R318E/R403E	R150E/R233E	75.3	47.7	63%	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	49.6	14.3	29%	21
R338E/E410N	R170E/E240N	12.6	3.5	28%	12
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	36.7	12.2	33%	17
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	33.6	8.6	26%	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	59.7	10.4	17%	3
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	67.1	27.9	42%	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	39.9	3.8	9%	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	45.5	12.0	26%	6
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	24.1	5.6	23%	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	38.5	9.9	26%	3
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	47.5	6.4	13%	4
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	51.1	10.7	21%	2
K228N/E410N	K63N/E240N	44.3	13.0	29%	10
K228N/R338E	K63N/R170E	23.1	3.0	13%	2

10

20

30

【表 19 - 7】

K228N/R338A	K63N/R170A	31.2	4.5	14%	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	61.3	5.4	9%	5
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	59.2	4.9	8%	2
R403E/E410N	R233E/E240N	93.7	1.0	1%	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	13.9	4.0	29%	42
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	18.9	4.1	22%	4
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	16.0	4.8	30%	5
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	42.0	4.7	11%	4
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	94.2	21.1	22%	5
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	111.4	74.7	67%	2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	43.2	13.8	32%	26
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	44.7	20.9	47%	5
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	38.5	16.1	42%	3

10

20

【表 19 - 8】

Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	30.4	10.5	35%	4
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	50.7	4.5	9%	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	48.0	2.1	4%	2
D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	45.7	13.4	29%	6
R333S	R165S	605.9	317.5	52%	3
R338L	R170L	47.9	9.0	19%	3
K316N	K148N	62.5	15.6	25%	3
K316A	K148A	55.2	4.1	7%	3
K316E	K148E	110.5	25.1	23%	3
K316S	K148S	57.3	4.6	8%	3
K316M	K148M	26.0	16.7	64%	3
E239S	E74S	28.5	19.2	67%	3
E239A	E74A	55.4	18.4	33%	3
E239R	E74R	58.3	13.9	24%	3
E239K	E74K	59.2	25.5	43%	3
H257F	H92F	62.0	30.1	49%	3
H257Y	H92Y	59.3	25.0	42%	3
H257E	H92E	59.7	39.6	66%	3
H257S	H92S	56.0	24.7	44%	3
T412A	T242A	76.1	44.7	59%	5
T412V	T242V	51.2	18.9	37%	8

【表 19 - 9】

E410N/T412A	E240N/T242A	37.2	3.6	10%	4
E410N/T412V	E240N/T242V	33.3	4.9	15%	4
E410Q	E240Q	56.1	18.0	32%	4
E410S	E240S	50.0	11.9	24%	12
E410A	E240A	47.7	11.7	24%	10
E410D	E240D	71.9	26.9	37%	4
N346D	N178D	45.7	7.8	17%	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	104.4	14.5	14%	2
N346Y	N178Y	27.4	4.2	15%	8
Y345A	Y177A	50.8	32.4	64%	4
Y345T	Y177T	28.6	7.9	28%	4
T343R	T175R	34.5	11.8	34%	12
T343E	T175E	27.3	10.0	37%	4
T343Q	T175Q	37.0	9.1	25%	3
F342I	F174I	30.0	19.1	64%	3

【表 19 - 10】

T343R/Y345T	T175R/Y177T	26.5	6.8	26%	3
R318Y/R338E	R150Y/R170E	24.6	5.5	22%	4
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	30.9	4.8	16%	2
K228N/I251S	K63N/I86S	122.6	53.5	44%	2
K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.1	14.0	39%	3
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	40.8	15.0	37%	5
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.3	9.8	25%	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	33.4	10.2	30%	4
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	46.2	7.7	17%	8
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	43.3	7.0	16%	2

10

【表 19 - 11】

I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	16.1	2.7	17%	10
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	24.3	8.6	35%	3
F314N/K316S	F145N/K148S	635.1	569.9	90%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.2	8.3	21%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.3	12.8	35%	10

20

30

【表 19 - 12】

A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	28.0	9.5	34%	6
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	59.0	0.6	1%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	51.8	16.7	32%	6
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	16.6	3.7	22%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	14.7	3.9	27%	9
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	36.4	9.5	26%	7
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	16.4	4.0	25%	8
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	94.5	27.0	29%	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	75.3	26.4	35%	2
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S	77.1	18.3	24%	5

10

20

【表 19 - 13】

Y155F/K228N/K247N/N249S	Y[155]F/K63N/K82N/N84S	79.2	27.6	35%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	49.7	15.6	31%	17
D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	53.3	12.2	23%	7
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	45.4	17.7	39%	5
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242V	48.3	16.2	33%	6
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/T242A	34.4	10.0	29%	6
R318Y/R338E/R403E/T412A	R150Y/R170E/R233E/T242A	67.5	11.6	17%	4
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	23.5	5.3	22%	6
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	23.6	12.3	52%	11
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	72.4	20.2	28%	2
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	61.1	0.0	0%	2

【表 19 - 14】

Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	83.9	4.4	5%	2
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	77.7	20.9	27%	2
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	100.0	15.6	16%	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	114.1	0.0	0%	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	96.5	5.5	6%	2

【表 19 - 15】

D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	61.2	14.1	23%	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	68.5	33.2	49%	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	47.4	12.1	26%	6
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	95.4	73.0	77%	5
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	127.9	6.2	5%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	24.7	7.2	29%	13
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	27.2	5.7	21%	4
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	26.6	5.0	19%	5

10

【表 19 - 16】

R338E/T343R	R170E/T175R	14.3	3.6	25%	7
T343R/N346Y	T175R/N178Y	26.0	7.3	28%	11
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	28.1	7.5	27%	3
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	15.8	4.0	25%	5
T343R/N346D	T175R/N178D	118.5	42.9	36%	2
R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/R233E/E240N	67.0	26.8	40%	2
R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/R233E/E240N	18.8	8.8	47%	6
R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177A/N178D/R233E/E240N	56.5	16.1	28%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	67.3	17.7	26%	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E	53.6	22.1	41%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	125.4	9.1	7%	3
K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R233E/E240N	110.9	29.5	27%	10

20

30

40

【表 19 - 17】

Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	48.7	11.4	23%	3
K247N/N249S/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/R233E/E240N	25.0	7.9	31%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	44.3	11.0	25%	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E	34.0	8.7	26%	4

10

【表 19 - 18】

R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	16.4	5.9	36%	16
Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/E240N	25.6	5.4	21%	4
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	93.9	14.0	15%	3
Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/E240N	34.0	7.7	23%	2
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	34.7	14.3	41%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	25.9	8.2	32%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	25.7	8.4	33%	11
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	29.2	7.9	27%	5
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	36.4	10.8	30%	7

20

30

【表 19 - 19】

Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	39.3	7.3	19%	5
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	32.1	10.3	32%	7
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	40.2	11.6	29%	5
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	25.1	5.4	21%	12
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	36.8	18.8	51%	5
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	28.9	9.1	31%	5
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	23.5	6.5	28%	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	23.9	3.1	13%	6
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	69.2	27.8	40%	6
Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	19.6	3.4	17%	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	19.0	6.4	33%	14
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	59.6	20.3	34%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	36.5	3.5	10%	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	28.4	17.8	63%	4

10

20

30

【表 19 - 20】

Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	26.4	1.3	5%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	25.1	3.0	12%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	26.3	8.8	33%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	42.1	12.8	30%	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	108.6	22.3	21%	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	48.8	12.8	26%	3
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	40.9	12.9	31%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	15.3	4.0	26%	2

10

【表 19 - 21】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	17.7	6.0	34%	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	32.8	22.9	70%	6
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	60.6	26.0	43%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	80.5	31.3	39%	7
Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/E240N	17.7	7.6	43%	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	60.5	7.5	12%	2
K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E	105.3	25.8	25%	9
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	38.1	29.6	78%	4
K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/E240N	40.1	25.9	64%	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	25.1	2.8	11%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E	26.3	3.5	13%	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	27.0	7.1	26%	2
K247N/N249S/R338E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/E240N	27.5	11.1	40%	5

20

30

40

【表 19-22】

Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	52.0	5.4	10%	2
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	60.0	13.9	23%	2
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	24.2	8.8	36%	7
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	30.0	1.5	5%	2
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	72.7	29.5	41%	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	44.6	1.9	4%	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	27.6	13.2	48%	7
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	24.4	13.5	55%	4
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	34.4	20.0	58%	5

10

【表 19-23】

Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	131.3	53.1	40%	7
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	22.4	13.8	62%	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	35.5	15.9	45%	2
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	40.3	22.9	57%	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	52.3	2.4	5%	2
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	40.3	9.6	24%	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	44.4	23.7	53%	3
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	38.1	10.4	27%	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	125.1	36.4	29%	3

20

30

† BHK-21細胞において産生；* E410Nの80%グリコシル化形態

40

【実施例 5】

【0494】

アンチトロンビン／ヘパリン複合体によるF I X aの阻害の決定

アンチトロンビン／ヘパリン複合体（A T－I I I／ヘパリン）による野生型F I X aまたはF I X a変異体の阻害を、小分子基質、メシル－D－C H G－G l y－A r g－A M C（P e f a f l u o r F I X a；P e n t a p h a r m）に対するF I X aの触媒活性についての種々の濃度のA T－I I I／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F I X a変異体の触媒活性の50%阻害（I C₅₀）のために必要であったA T－I I Iのモル濃度に相当するK_{0.5}値を検査した各F I X a変異体について決定する。阻害反応を低分子量ヘパリン（L M W H；

50

Calbiochem) または全長未分画ヘパリン (UFH; Calbiochem) の存在下で実施した、後者は阻害速度の増加を考慮して変更したプロトコル条件を必要とする。AT-I II /UFH複合体による野生型FIXaまたはFIXa変異体の阻害についての見かけの二次速度定数 (K_{app}) も変更したプロトコル (AT-I II /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。

【0495】

A. アンチトロンビン/LMWH複合体によるFIXaの阻害

LMWH存在下での阻害反応のために、1×緩衝液A (50mM Tris、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.01% Tween-20、pH7.4) 1.2mL容量中の2μM LMWHの溶液中への血漿精製ヒトAT-I II (Molecular Innovations) の20μM保存物の希釈によってAT-I II /LMWH (最終2μM LMWH) の200nM溶液を調製した。AT-I II /LMWHのこの溶液をアッセイにおける最高濃度として用いた。AT-I II /LMWH溶液を少なくとも30分間、室温でインキュベートし、次いで2μM LMWHを含有する1×緩衝液Aの最終容量400μLで96ディープウェルポリプロピレンプレート中に1.5倍系列希釈し、200nM、133.3nM、88.9nM、59.3nM、39.5nM、26.3nM、17.6nMおよび0nM (すなわちA-H列) の希釈物を得た。合計25μLを96ウェルV底保存プレートのそれらそれぞれの列に分注し、全ての行 (すなわち1~12) を満たした。FIXa変異体を最初に1×緩衝液A中に100nMへ希釈した。次に各100nM FIXa変異体36μLを1×緩衝液A 2mL中、1.8nMの濃度へ希釈し、次いで予め定義したプレートマップ (プレート1枚当たりFIXa変異体4種) に従ってこの溶液60μLを96ウェルV底保存プレートに分注した。

【0496】

アッセイ反応は、各FIXa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-I II /LMWHの各希釈物25μLを含有するプレートにFIXa溶液25μL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: 0.9nM FIXaおよび、1μM LMWH中の0から100nMまでの範囲のAT-I II 希釈物であった。反応物25μLアリコートをし、アッセイ緩衝液B (50mM Tris、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.01% Tween-20、pH7.4、60%エチレングリコール) 中に1.6mMメシル-D-CHG-Gly-Arg-AMCを1ウェル当たり25μL含有する96ウェル黒色ハーフエリアプレートにBioMek FXによって移す前に、阻害反応物を1分間、室温 (約25℃) でさらにインキュベートした。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AT-I II /LMWH反応をクエンチするために緩衝液Bに添加した。FIXa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、50mM Tris、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.01% Tween-20、pH7.4中の0.45nM FIXa変異体、0.8mMメシル-D-CHG-Gly-Arg-AMC、30%エチレングリコールおよび5mg/mLポリブレンである。

【0497】

AT-I II /LMWHによるFIXaまたはFIXa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、XMLファイルとして出力した。さらなる非線形データ分析を、自動化曲線フィッティングおよびMicrosoft Excel spreadsheet environment (IDBS Software) での統計分析のためのソフトウェアパッケージXLfit4で実施した、または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-I II 濃度で各FIXa反復についてのAT-I II 希釈系

列、AT-IIIのFIXaに対する比および V_i/V_o 比を算出するために用いた。集計表テンプレートを、各実験AT-III濃度で各FIXa反復についてのAT-III希釈系列、AT-IIIのFIXaに対する比および V_i/V_o 比を算出するために用いた。残存FIXa活性（ V_i/V_o として表す）対AT-III濃度の非線形回帰分析をX_Lfit 4ならびに、 $((C + (Amp * (1 - (X / (K_{0.5} + X))))))$ ；式中C＝オフセット（アッセイの経過において100%阻害に達しない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-III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。いくつかのFIXa変異体について、AT-III/LMWHはAT-III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、999nM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-III抵抗性を有すると予測される。

10

【0498】

表20は、AT-III/LMWH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FIXaと比較した各変異体についてのAT-III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の両方で表す。FIXa変異体の $K_{0.5}$ パラメーターを野生型FIXaと比較する場合、活性におけるいかなる差異も突然変異（複数可）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FIXa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FIXa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FIXaポリペプチドは、配列番号1において記載されるFIX遺伝子のクローニングから生成され、配列番号3において記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドとしてCHOX細胞から発現された実施例1において記載される組換え野生型FIXa（すなわちCatalyst Biosciences WT FIX polypeptide）であった。いくつかのFIXa変異体は、野生型FIXa（Catalyst Biosciences WT FIXa）と比較して20倍を超えて増加したAT-IIIに対する抵抗性を示した。たとえばFIXa-R318A/R403A、FIXa-R318E/R340E、FIXa-R318A、FIXa-R318E、FIXa-K400E、FIXa-R338E/R403EおよびFIXa-K400A/R403Aは、AT-IIIに顕著な抵抗性を示す群に含まれる。

20

30

【0499】

表20. AT-III/LMWHによるFIXa変異体の阻害

【表 20-1】

突然変異 (成熟FIX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
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	20.2	6.7	33%	0.7	3
BeneFIX (T148A)	BeneFIX (T[148]A)	27.3	4.7	17%	0.9	2
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	29.4	7.3	25%	1.0	10
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	31.1	n/a	n/a	1.1	1
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	26.1	n/a	n/a	0.9	1
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	47.7	n/a	n/a	1.6	1
D85N	D[85]N	33.1	n/a	n/a	1.1	1
T148A	T[148]A	22.9	1.7	8%	0.8	4
D203N/F205T	D39N/F41T	154.1	50.1	33%	5.2	4
I251S	I86S	22.6	n/a	n/a	0.8	1
D85N/I251S	D[85]N/I86S	28.3	n/a	n/a	1.0	1
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	32.1	n/a	n/a	1.1	1
A262S	A95bS	25.3	n/a	n/a	0.9	1
K413N	K243N	34.2	n/a	n/a	1.2	1
E410N	E240N	24.8	7.8	31%	0.8	3
E239N	E74N	191.8	61.0	32%	6.5	3
T241N/H243S	T76N/H78S	35.4	n/a	n/a	1.2	1
K247N/N249S	K82N/N84S	23.1	n/a	n/a	0.8	1
L321N	L153N	39.0	n/a	n/a	1.3	1
F314N/H315S	F145N/H147S	191.8	59.8	31%	6.5	3
S319N/L321S	S151N/L153S	113.4	n/a	n/a	3.9	1
N260S	N95S	64.6	n/a	n/a	2.2	1
Y284N	Y117N	36.7	n/a	n/a	1.2	1
R318A	R150A	896.2	189.2	21%	30.5	2
R318E	R150E	861.1	21.8	3%	29.3	2
R318Y	R150Y	395.1	6.3	2%	13.5	2

10

20

30

【表 20-2】

R312Q	R143Q	52.7	5.1	10%	1.8	2
R312A	R143A	51.9	1.3	3%	1.8	2
R312Y	R143Y	323.0	13.7	4%	11.0	2
R312L	R143L	25.5	2.9	11%	0.9	2
V202M	V38M	20.3	5.1	25%	0.7	2
V202Y	V38Y	27.2	6.9	25%	0.9	2
D203M	D39M	18.6	6.9	37%	0.6	2
D203Y	D39Y	31.1	0.3	1%	1.1	2
A204M	A40M	45.8	11.1	24%	1.6	2
A204Y	A40Y	43.4	22.3	51%	1.5	2
K400A/R403A	K230A/R233A	585.0	160.5	27%	19.9	2
K400E/R403E	K230E/R233E	299.0	206.5	69%	10.2	2
R403A	R233A	164.3	88.7	54%	5.6	2
R403E	R233E	264.2	80.9	31%	9.0	2
K400A	K230A	384.0	121.1	32%	13.1	2
K400E	K230E	614.8	71.4	12%	20.9	2
K293E	K126E	290.2	42.1	15%	9.9	2
K293A	K126A	194.1	38.0	20%	6.6	2

10

20

【表 20-3】

R333A	R165A	225.7	72.7	32%	7.7	2
R333E	R165E	345.6	1.7	0%	11.8	2
R338A	R170A	56.2	8.4	15%	1.9	2
R338E	R170E	238.4	n/a	n/a	8.1	1
R338A/R403A	R170A/R233A	418.5	150.9	36%	14.2	2
R338E/R403E	R170E/R233E	601.6	241.5	40%	20.5	2
K293A/R403A	K126A/R233A	486.3	114.9	24%	16.6	2
K293E/R403E	K126E/R233E	342.0	4.9	1%	11.6	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	497.1	85.9	17%	16.9	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	418.5	150.9	36%	14.2	2
R318A/R403A	R150A/R233A	999.0	n/a	n/a	34.0	2
R318E/R403E	R150E/R233E	999.0	n/a	n/a	34.0	2

30

* A 999nM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。

40

【0500】

B. アンチトロンビン／UFH複合体によるFIXaの阻害

AT-III／UFH複合体（未分画全長ヘパリン）によるFIXa変異体の阻害を評価するために上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追加的実験を実施した。全長、未分画ヘパリン（Calbiochem）を、長いヘパリン鎖によって提供される「鋳型」効果によるFIXa変異体突然変異の阻害反応の速度増加への影響を観察するために低分子量ヘパリン（LMWH）の代わりに用いた[たとえばOlson et al.(2004)Thromb Haemost 92(5),929-939を参照されたい]。

【0501】

UFHの存在下での阻害反応のために、AT-III／UFH（最終1 μ M UFH）

50

の70 nM、600 nM、2000 nM、6000または10000 nM溶液を、1×緩衝液A（50 mM Tris、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂、0.01 % Tween-20、pH 7.4）1.4 mL中の過剰量UFH（2から20 μM）溶液中への血漿精製ヒトAT-I I I（Molecular Innovations）20 μM保存物の希釈によって調製した。AT-I I I /UFH溶液も、1 μM UFHを含有する1×緩衝液Aの最終容量460 μLで96ウェルディーブウェルポリプロピレンプレートにおいて1.5倍系列希釈する前に30分間、室温でインキュベートした。変更したアッセイのためのAT-I I Iの最終希釈は、AT-I I Iの開始濃度に依存して、70 nM～0 nM、600 nM～0 nM、100 nM～0 nMまたは5000 nM～0 nM（すなわち列A～H）の範囲であった。標準条件下でAT-I I I阻害への増加した抵抗性を示したこれらの変異体を、さらに高い濃度のAT-I I Iを用いてさらに検査した。各AT-I I I希釈物の合計35 μLを96ウェルV底保存プレートのそれらそれぞれの列に全ての行を満たすように（すなわち1～12）分注した。FIXa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 FIXa変異体の15 μLを1×緩衝液A 2.0 mL中で濃度0.6 nMへ希釈し、次いで同様に予め定義したプレートマップ（プレート1枚当たりFIXa変異体4種）に従ってこの溶液70 μLを96ウェルV底保存プレートに分注した。

【0502】

アッセイ反応は、各FIXa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-I I I /LMWHの各希釈物35 μLを含有するプレートにFIXa溶液35 μL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：0.3 nM FIXaおよび、1 μMから10 μMの範囲のUFH中に最も高いAT-I I I濃度に依存して35 nMから0 nM、300 nMから0 nM、1000 nMから0 nM、3000 nMから0 nMまたは5000 nMから0 nMの範囲のAT-I I I希釈物であり、ヘパリンは過剰のままであった。反応物40 μLアリコートをし、アッセイ緩衝液C（50 mM Tris、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂、0.01 % Tween-20、pH 7.4、82 % エチレングリコールおよび5 mg/mLポリブレン）中に2.5 mMメシル-D-CHG-Gly-Arg-AMCを1ウェル当たり20 μL含有する96ウェル黒色ハーフエリアプレートにBioMek FXによって移す前に、阻害反応物を10秒間、室温（約25℃）でさらにインキュベートした。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-I I I /UFH反応をクエンチするために緩衝液Cに添加した。FIXa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、50 mM Tris、100 mM NaCl、10 mM CaCl₂、0.01 % Tween-20、pH 7.4中の0.2 nM FIXa変異体、0.83 mMメシル-D-CHG-Gly-Arg-AMC、30 % エチレングリコールおよび5 mg/mLポリブレンであった。データ分析をAT-I I I /LMWH阻害アッセイについて上に記載したとおりに実施した。

【0503】

LMWHで見出されたとおりAT-I I I /UFHは、検査した最高濃度のAT-I I I Iで多数のFIXa変異体について総プロテアーゼ活性の10～15 %未満を阻害し、それにより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これらの変異体は、999 nM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-I I I抵抗性を有すると予測される。999 nMのK_{0.5}値を最初に示したいくつかのFIXa変異体を、より高いAT-I I I濃度で再検査し、アッセイの感度を上げ、AT-I I I抵抗性の明確なレベルを提供した。これらの変異体が、最も高い検査AT-I I I濃度（1000 nMから5000 nM）で10 %未満の最大阻害をまだ維持した場合、9999 nMの下限K_{0.5}値に帰され、これらの変異体は報告された値よりも大きなAT-I I I抵抗性を有すること

が予測される。

【0504】

表21～22は、AT-III/UFHを用いて実施したアッセイの結果を提供する。表22は、追加的FIXa変異体についてのデータを表し、表21中のFIXa変異体についての追加的反復実験(n)を含んで算出した新たな総平均を提供する。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FIXaと比較した各変異体についてのAT-III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の両方で表される。いくつかのFIXa変異体は、野生型FIXaと比較して100から500倍を超えて増加したAT-IIIに対する抵抗性を示した。たとえばFIXa-R318A/R403A、FIXa-R318A、FIXa-R318Y、FIXa-R338A/R403A、FIXa-D203N/F205T/R318Y、FIXa-R318Y/R338E/R403E、FIXa-R318Y/R338E/R403E、FIXa-R318Y/R338E/E410N、R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410NおよびFIXa-R318Y/R403E/E410Nは、AT-IIIに顕著な抵抗性を示すこの群に含まれる。

10

【0505】

表21. AT-III/UFHによるFIXa変異体の阻害

【表 2 1 - 1】

突然変異 (成熟FIX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
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	18	8	44%	0.9	51
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	30	4	14%	1.6	5
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	19	7	34%	1.0	15
N157D	N[157]D	17	4	23%	0.9	2
Y155F	Y[155]F	13	0	1%	0.7	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	11	6	49%	0.6	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	6	2	33%	0.3	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	20	3	14%	1.0	2
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	20	2	9%	1.0	2
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	24	0	1%	1.2	2
D85N	D[85]N	17	3	15%	0.9	4
T148A	T[148]A	21	8	39%	1.1	10
K5A	K[5]A	22	3	15%	1.2	2
D64N	D[64]N	18	0	1%	0.9	2
D64A	D[64]A	16	2	12%	0.8	2
N167D	N[167]D	12	2	14%	0.6	2
N167Q	N[167]Q	12	1	8%	0.6	2
S61A	S[61]A	19	3	18%	1.0	2
S53A	S[53]A	27	4	16%	1.4	2
T159A	T[159]A	33	7	23%	1.7	2
T169A	T[169]A	17	6	36%	0.9	2
T172A	T[172]A	16	3	21%	0.8	2
T179A	T[179]A	24	2	7%	1.2	2

10

20

30

【表 2 1 - 2】

Y155H	Y[155]H	25	4	15%	1.3	2
Y155Q	Y[155]Q	23	0	1%	1.2	2
S158A	S[158]A	20	1	5%	1.0	2
S158D	S[158]D	15	2	16%	0.8	2
S158E	S[158]E	14	1	10%	0.7	2
N157Q	N[157]Q	16	2	11%	0.8	2
D203N/F205T	D39N/F41T	271	51	19%	14.0	5
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	587	65	11%	30.3	2
K228N	K63N	29	13	46%	1.5	6
D85N/K228N	D[85]N/K63N	34	3	7%	1.7	2
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	46	17	36%	2.4	2
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	41	21	52%	2.1	2
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	15	n.d.	n.d.	0.8	1

10

20

【表 2 1 - 3】

D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	49	5	9%	2.5	2
I251S	I86S	28	8	28%	1.4	4
D85N/I251S	D[85]N/I86S	19	6	30%	1.0	2
D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	28	11	41%	1.4	2
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	42	14	33%	2.2	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	32	5	16%	1.6	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	18	3	19%	0.9	2
A262S	A95bS	25	5	21%	1.3	2
K413N	K243N	27	13	48%	1.4	2
E410N	E240N	9	2	27%	0.5	4
E239N	E74N	132	21	16%	6.8	2
T241N/H243S	T76N/H78S	21	12	56%	1.1	2
K247N/N249S	K82N/N84S	22	4	18%	1.1	4

30

40

【表 2 1 - 4】

Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	13	3	24%	0.7	4
A103N/N105S/K247N/ N249S	A[103]N/N[105]S/K82 N/N84S	53	29	55%	2.7	4
D104N/K106S/K247N/ N249S	D[104]N/K[106]S/K82 N/N84S	19	2	9%	1.0	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/K82N/N84S	27	2	9%	1.4	2
L321N	L153N	25	6	25%	1.3	2
F314N/H315S	F145N/H147S	104	27	26%	5.4	4
S319N/L321S	S151N/L153S	65	11	17%	3.4	2
N260S	N95S	312	283	91%	16.1	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95 S	228	82	36%	11.8	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	77	16	21%	4.0	2
D104N/K106S/Y155F/ N260S	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/N95S	292	37	13%	15.1	2
Y284N	Y117N	41	25	63%	2.1	5
R318N/A320S	R150N/A152S	999	0	0%	51.7	2
R318A	R150A	4145	1297	31%	214.3	2
R318E	R150E	10000	0	0%	517.0	2
R318Y	R150Y	1976	430	22%	102.2	2
R312Q	R143Q	33	9	26%	1.7	2
R312A	R143A	31	0	1%	1.6	2

10

20

【表 2 1 - 5】

R312Y	R143Y	2499	350	14%	129.2	2
R312L	R143L	17	1	5%	0.9	2
V202M	V38M	14	2	14%	0.7	2
V202Y	V38Y	18	3	14%	0.9	2
D203M	D39M	11	0	1%	0.6	2
D203Y	D39Y	16	3	21%	0.8	2
A204M	A40M	29	3	9%	1.5	2
A204Y	A40Y	24	1	3%	1.2	2

30

【表 2 1 - 6】

K400A/R403A	K230A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K400E/R403E	K230E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R403A	R233A	190	34	18%	9.8	4
R403E	R233E	731	14	2%	37.8	2
K400A	K230A	114	3	3%	5.9	2
K400E	K230E	301	27	9%	15.6	2
K293E	K126E	187	25	13%	9.7	2
K293A	K126A	82	1	1%	4.2	2
R333A	R165A	235	54	23%	12.1	2
R333E	R165E	999	0	0%	51.7	2
R338A	R170A	33	3	10%	1.7	2
R338E	R170E	222	124	56%	11.5	8
R338A/R403A	R170A/R233A	328	106	32%	17.0	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6000	1089	18%	310.2	2
K293A/R403A	K126A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R403E	K126E/R233E	999	0	0%	51.7	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318A/R403A	R150A/R233A	999	0	0%	51.7	2
R318E/R403E	R150E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	607	164	27%	31.4	4
R338E/E410N	R170E/E240N	92	14	15%	4.7	4

【表 2 1 - 7】

R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	2351	168	7%	121.5	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	10000	0	0%	517.0	7
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	822	69	8%	42.5	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	377	20	5%	19.5	2
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1170	180	15%	60.5	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	423	61	14%	21.9	2
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	7226	133	2%	373.6	2
D203N/F205T/R338E/ R403E	D39N/F41T/R170E/R 233E	1520	162	11%	78.6	2

【表 2 1 - 8】

K228N/E410N	K63N/E240N	36	7	20%	1.9	2
K228N/R338E	K63N/R170E	108	8	7%	5.6	2
K228N/R338A	K63N/R170A	51	7	14%	2.7	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	3414	73	2%	176.5	2
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	1679	239	14%	86.8	2
R403E/E410N	R233E/E240N	279	26	9%	14.4	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	3458	1033	30%	178.8	5
D104N/K106S/R318Y/ R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R15 0Y/R170E/E240N	6328	4241	67%	327.2	4
Y155F/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R170 E/E240N	1098	1095	100%	56.8	7
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	475	83	17%	24.6	2
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	7072	1387	20%	365.6	2

10

【表 2 1 - 9】

R318Y/R338E/R403E/ E410N	R150Y/R170E/R233E /E240N	5881	4757	81%	304.1	4
A103N/N105S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R15 0Y/R170E/R233E/E2 40N	9193	1037	11%	475.3	4
D104N/K106S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R15 0Y/R170E/R233E/E2 40N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170 E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
A103N/N105S/Y155F/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/Y[1 55]F/R150Y/R170E/R 233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2

20

【表 2 1 - 1 0】

D104N/K106S/Y155F/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/R150Y/R170E/R 233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D203N/F205T/R318Y/ E410N	D39N/F41T/R150Y/E 240N	1280	220	17%	66.2	2
R333S	R165S	720	67	9%	37.2	2
R338L	R170L	121	6	5%	6.3	2
K316N	K148N	56	2	4%	2.9	2
K316A	K148A	63	15	24%	3.2	2
K316E	K148E	183	2	1%	9.5	2
K316S	K148S	77	15	19%	4.0	2
K316M	K148M	9	2	24%	0.5	2

30

40

【表 2 1 - 1 1】

E239S	E74S	101	12	12%	5.2	2
E239A	E74A	30	14	47%	1.6	3
E239R	E74R	65	17	26%	3.3	2
E239K	E74K	19	4	22%	1.0	2
H257F	H92F	12	1	11%	0.6	2
H257Y	H92Y	20	2	12%	1.0	2
H257E	H92E	25	12	48%	1.3	3
H257S	H92S	23	21	89%	1.2	3

10

【表 2 1 - 1 2】

T412A	T242A	25	3	14%	1.3	4
T412V	T242V	23	4	16%	1.2	4
E410N/T412A	E240N/T242A	10	1	7%	0.5	2
E410N/T412V	E240N/T242V	11	3	24%	0.6	2
E410Q	E240Q	24	14	60%	1.2	4
E410S	E240S	26	16	63%	1.3	7
E410A	E240A	42	24	58%	2.2	6
E410D	E240D	41	2	5%	2.1	2
N346D	N178D	222	176	79%	11.5	5
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	223	102	46%	11.5	2
N346Y	N178Y	36	2	7%	1.9	4
Y345A	Y177A	96	87	90%	5.0	13
Y345T	Y177T	16	0	0%	0.8	2
T343R	T175R	7	1	10%	0.4	2
T343E	T175E	55	8	15%	2.8	2
T343Q	T175Q	13	3	25%	0.7	2
F342I	F174I	98	10	11%	5.1	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	6	0	4%	0.3	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	397	50	12%	20.5	2
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	6	0	2%	0.3	2
K228N/I251S	K63N/I86S	73	16	22%	3.8	2

20

30

【表 2 1 - 1 3】

K228N/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y /R170E/R233E/E240 N	10000	0	0%	517.0	2
D85N/K228N/R318Y/R 338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y /R170E/R233E/E240 N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R 233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/I251S/R 318Y/R338E/R403E/E 410N	D[104]N/K[106]S/I86 S/R150Y/R170E/R233 E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
Y155F/I251S/R318Y/R 338E/R403E/E410N	Y[155]F/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/E 410N	I86S/R150Y/R170E/E 240N	5855	3889	66%	302.7	7

【表 2 1 - 1 4】

D104N/K106S/I251S/R 318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86 S/R150Y/R170E/E240 N	8985	1436	16%	464.5	2
F314N/K316S	F145N/K148S	1221	505	41%	63.1	4
K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R 170E/R233E/E240N	8076	2967	37%	417.6	9
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233E /E240N	10000	0	0%	517.0	3
A103N/N105S/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82 N/N84S/R150Y/R170 E/R233E/E240N	2497	772	31%	129.1	4
D104N/K106S/K247N/ N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82 N/N84S/R150Y/R170 E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2

【表 2 1 - 1 5】

K247N/N249S/R318Y/ R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R 170E/E240N	1514	631	42%	78.3	3
Y155F/K247N/N249S/ R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/ R150Y/R170E/E240N	3875	846	22%	200.4	2
R318Y/R338E/R403E/ E410S	R150Y/R170E/R233E /E240S	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5402	2785	52%	279.3	5
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	85	19	22%	4.4	2
D104N/K106S/Y155F/ K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/K63N/K82N/N8 4S	32	12	37%	1.6	4

10

【表 2 1 - 1 6】

D104N/K106S/K228N/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K63 N/K82N/N84S	41	18	45%	2.1	10
Y155F/K228N/K247N/ N249S	Y[155]F/K63N/K82N /N84S	27	6	22%	1.4	2
K228N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K63N/K82N/N84S/R1 50Y/R170E/R233E/E 240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412V	R150Y/R170E/R233E /E240N/T242V	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412A	R150Y/R170E/R233E /E240N/T242A	10000	0	0%	517.0	2

20

【表 2 1 - 1 7】

R318Y/R338E/R403E/ T412A	R150Y/R170E/R233E /T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242A	7661	3243	42%	396.1	9
R318Y/R338E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/E240N /T242V	10000	0	0%	517.0	2
N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2

30

【表 2 1 - 1 8】

D104N/K106S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/N95 S/R150Y/R170E/R233 E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
Y155F/N260S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y /R170E/R233E/E240 N	9696	527	5%	501.3	3
R318Y/R338E/N346D/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178D /R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/ N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170 E/N178D/R233E/E24 0N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	157	38	24%	8.1	3
Y155F/K247N/N249S/ N260S	Y[155]F/K82N/N84S/ N95S	152	39	26%	7.9	3

10

【表 2 1 - 1 9】

D[104]N/K[106]S/K247 N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82 N/N84S/N95S	1262	40	3%	65.3	2
D[104]N/K[106]S/Y[15 5]F/K247N/N249S/N26 0S	D[104]N/K[106]S/Y[1 55]F/K82N/N84S/N9 5S	692	84	12%	35.8	2
K247N/N249S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K82N/N84S/N95S/R1 50Y/R170E/R233E/E 240N	5560	3872	70%	287.5	3
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178D	1382	477	35%	71.4	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R /R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R338E/T343R	R170E/T175R	16	6	38%	0.8	2

20

30

* 999nMの $K_{0.5}$ 値は、標準アッセイ条件下(35nM~0nM AT-III)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。

* 50%超の $WT K_{cat} / K_M$ (実施例4、表14を参照されたい)および初めに999nMの $K_{0.5}$ 値を付された変異体はアッセイの感度を上げるより高いAT-III濃度で再検査された。

* 9999nMの $K_{0.5}$ 値は感度を上げたアッセイ条件下(1000nM~0nM AT-IIIおよび5000~0nM AT-III)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。

【0 5 0 6】

表22. AT-III/UFHによるFIXa変異体の阻害

40

【表 2 2 - 1】

突然変異 (成熟FIX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
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T[148]A)	17	8	47%	0.9	55
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	30	4	14%	1.6	5
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	19	7	34%	1.0	15
N157D	N[157]D	17	4	23%	0.9	2
Y155F	Y[155]F	13	0	1%	0.7	2
A103N/N105S/Y155F	A[103]N/N[105]S/Y[155]F	11	6	49%	0.6	2
D104N/K106S/Y155F	D[104]N/K[106]S/Y[155]F	6	2	33%	0.3	2
A103N/N105S	A[103]N/N[105]S	20	3	14%	1.0	2
D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	20	2	9%	1.0	2
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	24	0	1%	1.2	2
D85N	D[85]N	17	3	15%	0.9	4
T148A	T[148]A	17	10	56%	0.9	13
K5A	K[5]A	22	3	15%	1.2	2
D64N	D[64]N	18	0	1%	0.9	2
D64A	D[64]A	16	2	12%	0.8	2
N167D	N[167]D	12	2	14%	0.6	2
N167Q	N[167]Q	12	1	8%	0.6	2
S61A	S[61]A	19	3	18%	1.0	2
S53A	S[53]A	27	4	16%	1.4	2
T159A	T[159]A	33	7	23%	1.7	2
T169A	T[169]A	17	6	36%	0.9	2
T172A	T[172]A	16	3	21%	0.8	2
T179A	T[179]A	24	2	7%	1.2	2

10

20

30

40

【表 2 2 - 2】

Y155H	Y[155]H	25	4	15%	1.3	2
Y155Q	Y[155]Q	23	0	1%	1.2	2
S158A	S[158]A	20	1	5%	1.0	2
S158D	S[158]D	15	2	16%	0.8	2
S158E	S[158]E	14	1	10%	0.7	2
N157Q	N[157]Q	16	2	11%	0.8	2
D203N/F205T	D39N/F41T	271	51	19%	14.0	5
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	587	65	11%	30.3	2
K228N	K63N	29	13	46%	1.5	6
D85N/K228N	D[85]N/K63N	34	3	7%	1.7	2
A103N/N105S/K228N	A[103]N/N[105]S/K63N	46	17	36%	2.4	2
D104N/K106S/K228N	D[104]N/K[106]S/K63N	41	21	52%	2.1	2
Y155F/K228N	Y[155]F/K63N	15	n.d.	n.d.	0.8	1
D104N/K106S/Y155F/K228N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N	49	5	9%	2.5	2
I251S	I86S	28	8	28%	1.4	4
D85N/I251S	D[85]N/I86S	19	6	30%	1.0	2

【表 2 2 - 3】

D85N/D104N/K106S/I251S	D[85]N/D[104]N/K[106]S/I86S	28	11	41%	1.4	2
A103N/N105S/I251S	A[103]N/N[105]S/I86S	42	14	33%	2.2	3
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	32	5	16%	1.6	2
Y155F/I251S	Y[155]F/I86S	18	3	19%	0.9	2
A262S	A95bS	25	5	21%	1.3	2
K413N	K243N	27	13	48%	1.4	2
E410N	E240N	8	2	25%	0.4	6
E239N	E74N	132	21	16%	6.8	2
T241N/H243S	T76N/H78S	21	12	56%	1.1	2
K247N/N249S	K82N/N84S	22	4	18%	1.1	4

10

20

30

【表 2 2 - 4】

Y155F/K247N/N249S	Y[155]F/K82N/N84S	13	3	24%	0.7	4
A103N/N105S/K247N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S	53	29	55%	2.7	4
D104N/K106S/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S	19	2	9%	1.0	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S	27	2	9%	1.4	2
L321N	L153N	25	6	25%	1.3	2
F314N/H315S	F145N/H147S	104	27	26%	5.4	4
S319N/L321S	S151N/L153S	65	11	17%	3.4	2
N260S	N95S	312	283	91%	16.1	13
D104N/K106S/N260S	D[104]N/K[106]S/N95S	228	82	36%	11.8	2
Y155F/N260S	Y[155]F/N95S	77	16	21%	4.0	2
D104N/K106S/Y155F/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/N95S	292	37	13%	15.1	2
Y284N	Y117N	41	25	63%	2.1	5

10

20

【表 2 2 - 5】

R318N/A320S	R150N/A152S	999	0	0%	51.7	2
R318A	R150A	4145	1297	31%	214.3	2
R318E	R150E	9999	0	0%	517.0	2
R318Y	R150Y	1976	430	22%	102.2	2
R312Q	R143Q	33	9	26%	1.7	2
R312A	R143A	31	0	1%	1.6	2
R312Y	R143Y	2499	350	14%	129.2	2
R312L	R143L	17	1	5%	0.9	2
V202M	V38M	14	2	14%	0.7	2
V202Y	V38Y	18	3	14%	0.9	2
D203M	D39M	11	0	1%	0.6	2
D203Y	D39Y	16	3	21%	0.8	2
A204M	A40M	29	3	9%	1.5	2

30

【表 2 2 - 6】

A204Y	A40Y	24	1	3%	1.2	2
K400A/R403A	K230A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K400E/R403E	K230E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R403A	R233A	190	34	18%	9.8	4
R403E	R233E	731	14	2%	37.8	2
K400A	K230A	114	3	3%	5.9	2
K400E	K230E	301	27	9%	15.6	2
K293E	K126E	187	25	13%	9.7	2
K293A	K126A	82	1	1%	4.2	2
R333A	R165A	235	54	23%	12.1	2
R333E	R165E	999	0	0%	51.7	2
R338A	R170A	33	3	10%	1.7	2
R338E	R170E	222	124	56%	11.5	8
R338A/R403A	R170A/R233A	328	106	32%	17.0	6
R338E/R403E	R170E/R233E	6000	1089	18%	310.2	2

10

【表 2 2 - 7】

K293A/R403A	K126A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R403E	K126E/R233E	999	0	0%	51.7	2
K293A/R338A/R403A	K126A/R170A/R233A	999	0	0%	51.7	2
K293E/R338E/R403E	K126E/R170E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318A/R403A	R150A/R233A	999	0	0%	51.7	2
R318E/R403E	R150E/R233E	999	0	0%	51.7	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	607	164	27%	31.4	4
R338E/E410N	R170E/E240N	92	14	15%	4.7	4
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	2351	168	7%	121.5	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	10000	0	0%	517.0	7
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	822	69	8%	42.5	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	377	20	5%	19.5	2
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	1170	180	15%	60.5	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	423	61	14%	21.9	2

20

30

【表 2 2 - 8】

D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	7226	133	2%	373.6	2
D203N/F205T/R338E/ R403E	D39N/F41T/R170E/ R233E	1520	162	11%	78.6	2
K228N/E410N	K63N/E240N	36	7	20%	1.9	2
K228N/R338E	K63N/R170E	108	8	7%	5.6	2
K228N/R338A	K63N/R170A	51	7	14%	2.7	2
K228N/R318Y	K63N/R150Y	3414	73	2%	176.5	2
K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	1679	239	14%	86.8	2
R403E/E410N	R233E/E240N	279	26	9%	14.4	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240 N	3458	1033	30%	178.8	5
D104N/K106S/R318Y/ R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R 150Y/R170E/E240N	6328	4241	67%	327.2	4

10

【表 2 2 - 9】

Y155F/R318Y/R338E/ E410N	Y[155]F/R150Y/R17 0E/E240N	1098	1095	100%	56.8	7
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	475	83	17%	24.6	2
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240 N	7072	1387	20%	365.6	2
R318Y/R338E/R403E/ E410N	R150Y/R170E/R233 E/E240N	5881	4757	81%	304.1	4
A103N/N105S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R 150Y/R170E/R233E /E240N	9193	1037	11%	475.3	4
D104N/K106S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R 150Y/R170E/R233E /E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R17 0E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
A103N/N105S/Y155F/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170 E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2

20

30

【表 2 2 - 1 0】

D104N/K106S/Y155F/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170 E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D203N/F205T/R318Y/ E410N	D39N/F41T/R150Y/ E240N	1280	220	17%	66.2	2
R333S	R165S	720	67	9%	37.2	2
R338L	R170L	121	6	5%	6.3	2
K316N	K148N	56	2	4%	2.9	2
K316A	K148A	63	15	24%	3.2	2
K316E	K148E	183	2	1%	9.5	2
K316S	K148S	77	15	19%	4.0	2
K316M	K148M	9	2	24%	0.5	2

10

【表 2 2 - 1 1】

E239S	E74S	101	12	12%	5.2	2
E239A	E74A	30	14	47%	1.6	3
E239R	E74R	65	17	26%	3.3	2
E239K	E74K	19	4	22%	1.0	2
H257F	H92F	12	1	11%	0.6	2
H257Y	H92Y	20	2	12%	1.0	2
H257E	H92E	25	12	48%	1.3	3
H257S	H92S	23	21	89%	1.2	3
T412A	T242A	25	3	14%	1.3	4
T412V	T242V	23	4	16%	1.2	4

20

【表 2 2 - 1 2】

E410N/T412A	E240N/T242A	10	1	7%	0.5	2
E410N/T412V	E240N/T242V	11	3	24%	0.6	2
E410Q	E240Q	24	14	60%	1.2	4
E410S	E240S	26	16	63%	1.3	7
E410A	E240A	42	24	58%	2.2	6
E410D	E240D	41	2	5%	2.1	2

30

【表 2 2 - 1 3】

N346D	N178D	222	176	79%	11.5	5
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	223	102	46%	11.5	2
N346Y	N178Y	36	2	7%	1.9	4
Y345A	Y177A	96	87	90%	5.0	13
Y345T	Y177T	16	0	0%	0.8	2
T343R	T175R	7	1	10%	0.4	2
T343E	T175E	55	8	15%	2.8	2
T343Q	T175Q	13	3	25%	0.7	2
F342I	F174I	98	10	11%	5.1	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	6	0	4%	0.3	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	397	50	12%	20.5	2
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	6	0	2%	0.3	2
K228N/I251S	K63N/I86S	73	16	22%	3.8	2
K228N/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E /R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2

10

【表 2 2 - 1 4】

Y155F/K228N/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150 Y/R170E/R233E/E2 40N	10000	0	0%	517.0	2
D85N/K228N/R318Y/R 338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150 Y/R170E/R233E/E2 40N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/I251S/R 318Y/R338E/R403E/E 410N	D[104]N/K[106]S/I8 6S/R150Y/R170E/R 233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3

20

30

【表 2 2 - 1 5】

Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	5855	3889	66%	302.7	7
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	8985	1436	16%	464.5	2
F314N/K316S	F145N/K148S	1221	505	41%	63.1	4
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8076	2967	37%	417.6	9
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2497	772	31%	129.1	4

10

20

【表 2 2 - 1 6】

D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	1514	631	42%	78.3	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/E240N	3875	846	22%	200.4	2
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	5402	2785	52%	279.3	5
K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	85	19	22%	4.4	2
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K63N/K82N/N84S	32	12	37%	1.6	4

30

40

【表 2 2 - 1 7】

D104N/K106S/K228N/ K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/K 63N/K82N/N84S	41	18	45%	2.1	10
Y155F/K228N/K247N/ N249S	Y[155]F/K63N/K82 N/N84S	27	6	22%	1.4	2
K228N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K63N/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233 E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412V	R150Y/R170E/R233 E/E240N/T242V	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/ E410N/T412A	R150Y/R170E/R233 E/E240N/T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/R403E/ T412A	R150Y/R170E/R233 E/T242A	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/T412A	R150Y/R170E/T242 A	7661	3243	42%	396.1	9

10

【表 2 2 - 1 8】

R318Y/R338E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/E240 N/T242V	4871	4173	86%	251.8	9
N260S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E /R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
D104N/K106S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/N 95S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	3
Y155F/N260S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150 Y/R170E/R233E/E2 40N	9696	527	5%	501.3	3
R318Y/R338E/N346D/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178 D/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
Y155F/R318Y/R338E/ N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R17 0E/N178D/R233E/E 240N	10000	0	0%	517.0	2
K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	157	38	24%	8.1	3

20

30

【表 2 2 - 1 9】

Y155F/K247N/N249S/ N260S	Y[155]F/K82N/N84 S/N95S	152	39	26%	7.9	3
D104N/K106S/K247N/ N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K 82N/N84S/N95S	1262	40	3%	65.3	2
D104N/K106S/Y155F/ K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/ N95S	692	84	12%	35.8	2
K247N/N249S/N260S/ R318Y/R338E/R403E/ E410N	K82N/N84S/N95S/R 150Y/R170E/R233E /E240N	5560	3872	70%	287.5	3
Y155F/N260S/N346D	Y[155]F/N95S/N178 D	1382	477	35%	71.4	2
R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175 R/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	4

10

【表 2 2 - 2 0】

R338E/T343R	R170E/T175R	12	6	46%	0.6	4
T343R/N346Y	T175R/N178Y	3	1	32%	0.1	4
R318Y/R338E/N346Y/ R403E/E410N	R150Y/R170E/N178 Y/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/T343R/ N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175 R/N178Y/R233E/E2 40N	10000	0	0%	517.0	2
T343R/N346D	T175R/N178D	22	4	18%	1.1	2
R318Y/R338E/T343R/ N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175 R/N178D/R233E/E2 40N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/Y345A/ R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177 A/R233E/E240N	10000	0	0%	517.0	2
R318Y/R338E/Y345A/ N346D/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177 A/N178D/R233E/E2 40N	10000	0	0%	517.0	2

20

30

* 999nMの $K_{0.5}$ 値は、標準アッセイ条件下(35nM~0nM AT-III)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。

* 50%超の $WT K_{cat} / K_M$ (実施例4、表14を参照されたい)および初めに999nMの $K_{0.5}$ 値を付された変異体はアッセイの感度を上げるより高いAT-III濃度で再検査された。

40

* 10000nMの $K_{0.5}$ 値は感度を上げたアッセイ条件下(1000nM~0nM AT-IIIおよび5000~0nM AT-III)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。

【0 5 0 7】

C. アンチトロンビン／UFH複合体によるFIXaの阻害についての二次速度定数 (K_{app}) の決定

上の実施例5Bにおける記載と同じアッセイを若干の変更を伴って用いてAT-III／UFHによるFIXa変異体の阻害についての二次速度定数 (K_{app}) を測定するために追加的実験を実施した。この方法は、伝統的である競合的な動力学的方法または不連続な方法よりも複数の変異体について同時に二次速度定数を評価するためにより適している [たとえばOlson et al.(2004)Thromb Haemost 92(5),929-939を参照されたい]。

50

【0508】

UFH存在下での阻害反応のために、1×緩衝液A（50mM Tris、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.01% Tween-20、pH7.4）1.0mL容量中の過剰量UFH溶液（2μM）中への血漿精製ヒトAT-III（Molecular Innovations）の20μM保存物の希釈によってAT-III/UFHの1000nM溶液を調製した。AT-III/UFH溶液を、2μM UFHを含有する1×緩衝液Aの最終容量500μLで96ディープウェルポリプロピレンプレートにおいて2.0倍系列希釈する前に30分間、室温でインキュベートした。変更したK_{app} アッセイのためのAT-IIIの最終希釈物は500mM～0mM（すなわち列A～H）の範囲であった。各AT-III希釈物の合計35μLを96ウェルV底保存プレートのそれらそれぞれの列に全ての行を満たすように（すなわち1～12）分注した。FIXa変異体を最初に1×緩衝液A中に100nMへ希釈した。次に各100nM FIXa変異体の50μLを1×緩衝液A 2.5mL中に濃度2.0nMへ希釈し、次いで上記と同様に予め定義したプレートマップ（プレート1枚当たりFIXa変異体4種）に従ってこの溶液70μLを96ウェルV底保存プレートに分注した。

【0509】

アッセイ反応は、各FIXa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-III/UFHの各希釈物35μLを含有するプレートにFIXa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 FIXaおよび、1μM UFH中の500nMから0nMまでの範囲のAT-III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、予測される阻害速度定数に応じて室温（約25℃）で種々の時間さらにインキュベートし、アッセイにおけるAT-IIIの最高濃度（500nM）で90%超阻害が達成され得るように調節した。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、一般的には表23に概説したインキュベーション時間に従った。

【0510】

表23. 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23】

予測されるK _{app} (M ⁻¹ s ⁻¹)	FIXa/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

【0511】

望まれるインキュベーション時間後、アッセイ緩衝液C（50mM Tris、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.01% Tween-20、pH7.4、82%エチレングリコールおよび5mg/mLポリブレン）中に2.5mMメシル-D-CHG-Gly-Arg-AMCを1ウェル当たり20μL含む96ウェル黒色ハーフエリアプレートに反応物の40μLアリコート BioMek FXによって移した。最終濃度5mg/mLのポリブレン（ヘキサジメトリンプロミド）をAT-III/UFH反応をクエンチするために緩衝液Cに添加した。FIXa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、50mM Tris、100mM NaCl、10mM CaCl₂、0.01% Tween-20、pH7.4中の0.67nM FIXa変異体、0.83mMメシル-D-CHG-Gly-Arg-AMC、30%エチレングリコールおよび5mg/mLポリブレンであった。ActivityBase s

oftware packageおよびXE Runner data analysis module (IDBS Software) を用いた実施例BにおいてAT-I I I /UFH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5B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：

【0512】

方程式 (1)

【数6】

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

10

【0513】

方程式 (2)

【数7】

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

を用いてAT-I I I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。

20

【0514】

$t_{1/2}$ (アッセイの時間によって定義される) での $K_{0.5} = [AT-I I I]$ についてのフィット値を仮定すると、AT-I I Iによる所与のFIXa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の一定値をもたらす阻害の化学量論 (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 et al.(2004)Thromb Haemost 92(5),929-939を参照されたい]。

【0515】

表24は、AT-I I I /UFH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FIXaと比較した各変異体についてのAT-I I I抵抗性の程度をそれらのフィットされた K_{app} 値の比 ($K_{app} \text{ 野生型} / K_{app} \text{ 変異体}$) として表す表現としての両方で表す。いくつかのFIXa変異体は、野生型FIXaと比較して10,000~20,000倍を超えて増加したAT-I I Iに対する抵抗性を示した。たとえば、FIXa-R318A、FIXa-R318Y、FIXa-R338A/R403A、FIXa-R318Y/R338E/R403E、FIXa-R318Y/R338E/R403E、FIXa-K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E、FIXa-R318Y/R338E/R403E、FIXa-K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、FIXa-R318Y/R338E/E410NおよびFIXa-R318Y/R338E/R403E/E410Nは、AT-I I Iに顕著な抵抗性を示すこの群に含まれる。

30

【0516】

表24. AT-III/UFHによる阻害についての二次速度定数

40

【表 2 4 - 1】

突然変異 (成熟FIX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
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T [148]A)	1. 6E+07	1. 7E+07	105%	1	8
Catalyst Bioscie nces WT	Catalyst Bioscien ces WT	2. 4E+07	8. 0E+06	33%	1	4
T148A	T[148]A	1. 6E+07	1. 1E+07	69%	1	4
D203N/F205T	D39N/F41T	8. 1E+05	5. 3E+05	66%	30	3
D85N/D203N/F205T	D[85]N/D39N/F41T	2. 7E+06	4. 5E+05	17%	9	2
N260S	N95S	1. 1E+06	2. 1E+04	2%	21	2
D104N/K106S/N260 S	D[104]N/K[106]S/N 95S	7. 0E+06	1. 9E+06	27%	3	3
R318A	R150A	6. 9E+05	5. 6E+04	8%	35	2
R318E	R150E	1. 6E+04	1. 2E+03	7%	1, 452	2
R318Y	R150Y	6. 4E+05	3. 5E+05	55%	37	5
R312Y	R143Y	2. 3E+05	4. 5E+04	19%	102	3
R403A	R233A	1. 4E+06	3. 1E+05	23%	18	2
R403E	R233E	1. 1E+05	2. 4E+04	21%	209	2
K400E	K230E	4. 1E+05	3. 3E+04	8%	58	2
K293E	K126E	1. 2E+06	8. 4E+04	7%	20	2
R338E	R170E	2. 7E+05	1. 7E+05	64%	88	3
R338A/R403A	R170A/R233A	8. 4E+05	4. 6E+04	5%	28	2
R338E/R403E	R170E/R233E	6. 8E+04	1. 9E+04	28%	353	2
K293A/R403A	K126A/R233A	8. 1E+04	1. 5E+04	18%	294	2
K293A/R338A/R403 A	K126A/R170A/R233A	4. 7E+04	7. 9E+03	17%	511	2
K293E/R338E/R403 E	K126E/R170E/R233E	3. 1E+04	6. 3E+03	20%	768	2
R318A/R403A	R150A/R233A	1. 7E+04	4. 7E+03	27%	1, 390	2
R318Y/E410N	R150Y/E240N	1. 1E+06	7. 9E+03	1%	22	2

10

20

30

【表 2 4 - 2】

R338E/E410N	R170E/E240N	6.3E+06	7.4E+06	117%	4	10
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	1.3E+05	1.5E+05	115%	180	14
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	3.2E+04	1.7E+03	5%	755	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	1.2E+03	9.9E+02	80%	19,396	7
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	1.0E+03	5.4E+01	5%	23,242	2
D203N/F205T/K228N	D39N/F41T/K63N	1.1E+06	3.7E+05	33%	21	2
D203N/F205T/E410N	D39N/F41T/E240N	2.0E+06	2.1E+05	10%	12	2
D203N/F205T/R338E	D39N/F41T/R170E	3.6E+05	2.8E+04	8%	66	2
D203N/F205T/R338A	D39N/F41T/R170A	8.6E+05	1.6E+05	18%	28	2
D203N/F205T/R318Y	D39N/F41T/R150Y	6.1E+04	2.0E+04	33%	391	2
D203N/F205T/R338E/R403E	D39N/F41T/R170E/R233E	2.0E+03	n.d.	n.d.	12,250	1
K228N/R318Y	K63N/R150Y	1.2E+06	2.1E+05	17%	19	2

【表 2 4 - 3】

K228N/R338E/R403E	K63N/R170E/R233E	4.2E+04	1.3E+04	31%	567	2
R403E/E410N	R233E/E240N	4.8E+06	2.5E+06	53%	5	5
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	2.8E+05	2.4E+05	85%	84	8
D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	2.1E+05	4.2E+04	20%	113	2
Y155F/R318Y/R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	4.5E+05	6.9E+04	15%	53	2
K228N/R318Y/E410N	K63N/R150Y/E240N	1.9E+06	n.d.	n.d.	12	1
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	2.8E+04	1.8E+04	63%	856	6
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	8.1E+03	1.4E+02	2%	2,963	2

【表 2 4 - 4】

R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	3.2E+03	2.0E+03	63%	7,385	6
A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.6E+03	1.7E+02	7%	9,060	2
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.9E+03	1.6E+01	0%	6,154	2
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.2E+03	8.1E+02	25%	7,464	3
A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.2E+03	6.7E+00	0%	7,531	2
D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.9E+03	1.8E+02	6%	8,147	2

10

【表 2 4 - 5】

D203N/F205T/R318Y/E410N	D39N/F41T/R150Y/E240N	5.3E+04	5.8E+03	11%	454	3
N346D	N178D	3.4E+06	1.6E+06	48%	7	4
Y155F/N346D	Y[155]F/N178D	4.0E+06	5.4E+05	13%	6	2
N346Y	N178Y	8.4E+05	n.d.	n.d.	28	1
Y345T	Y177T	1.8E+06	7.8E+03	0%	13	2
T343R	T175R	4.2E+06	1.0E+04	0%	6	2
T343Q	T175Q	2.1E+06	5.4E+05	25%	11	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	5.0E+06	1.8E+05	4%	5	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	6.2E+05	5.4E+04	9%	39	2

20

【表 2 4 - 6】

K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	2.9E+03	2.2E+02	7%	8,212	2
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.6E+03	6.1E+02	13%	5,161	2
D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[85]N/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.0E+03	3.2E+02	11%	7,932	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.0E+03	3.5E+02	12%	7,940	2
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	5.7E+03	8.4E+02	15%	4,225	2
Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	3.3E+03	1.4E+02	4%	7,306	2
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	2.4E+05	2.1E+05	89%	100	6

30

40

50

【表 2 4 - 7】

D104N/K106S/I251 S/R318Y/R338E/E4 10N	D[104]N/K[106]S/I8 6S/R150Y/R170E/E 240N	3.2E+03	4.5E+02	14%	7,567	2
K247N/N249S/R318 Y/R338E/R403E/E4 10N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240 N	2.0E+03	1.0E+03	53%	12,122	2
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/R170E/R2 33E/E240N	1.6E+03	5.9E+02	37%	15,058	4
A103N/N105S/K247 N/N249S/R318Y/R3 38E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K 82N/N84S/R150Y/R 170E/R233E/E240N	1.7E+03	2.4E+02	14%	14,063	3

10

【表 2 4 - 8】

D104N/K106S/K24 7N/N249S/R318Y/R 338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K 82N/N84S/R150Y/R 170E/R233E/E240N	3.1E+03	7.6E+02	24%	7,646	3
D104N/K106S/Y155 F/K247N/N249S/R 318Y/R338E/R403E /E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233 E/E240N	1.0E+03	2.8E+02	28%	23,776	6
K247N/N249S/R318 Y/R338E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/E240N	8.6E+05	1.2E+05	14%	28	2
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/E 410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/R170E/E2 40N	1.8E+05	2.2E+04	13%	136	2
R318Y/R338E/R403 E/E410S	R150Y/R170E/R233 E/E240S	1.6E+03	1.1E+03	64%	14,483	7

20

30

【表 2 4 - 9】

R318Y/R338E/E410 S	R150Y/R170E/E240 S	7.2E+05	4.8E+05	66%	33	2
K228N/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	K63N/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233 E/E240N	1.1E+03	4.5E+02	41%	21,766	12
D104N/K106S/K22 8N/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403 E/E410N	D[104]N/K[106]S/K 63N/K82N/N84S/R1 50Y/R170E/R233E/ E240N	6.8E+02	3.3E+02	48%	35,018	4
Y155F/K228N/K24 7N/N249S/R318Y/R 338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82 N/N84S/R150Y/R17 0E/R233E/E240N	1.1E+03	3.9E+01	4%	21,856	4
R318Y/R338E/R403 E/E410N/T412V	R150Y/R170E/R233 E/E240N/T242V	2.9E+03	5.4E+02	19%	8,296	5
R318Y/R338E/R403 E/E410N/T412A	R150Y/R170E/R233 E/E240N/T242A	3.8E+03	1.2E+03	31%	6,322	5
R318Y/R338E/R403 E/T412A	R150Y/R170E/R233 E/T242A	1.6E+03	3.8E+02	23%	14,529	2

【表 2 4 - 1 0】

R318Y/R338E/T412 A	R150Y/R170E/T242 A	3.5E+05	7.2E+04	21%	69	3
R318Y/R338E/E410 N/T412V	R150Y/R170E/E240 N/T242V	3.9E+05	2.6E+04	7%	61	2
N260S/R318Y/R338 E/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E /R233E/E240N	4.4E+03	8.5E+02	19%	5,407	2
D104N/K106S/N26 0S/R318Y/R338E/R 403E/E410N	D[104]N/K[106]S/N 95S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	2.1E+03	3.9E+02	18%	11,173	2
Y155F/N260S/R318 Y/R338E/R403E/E4 10N	Y[155]F/N95S/R150 Y/R170E/R233E/E2 40N	2.1E+03	2.4E+02	11%	11,456	2
R318Y/R338E/N346 D/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178 D/R233E/E240N	1.1E+03	5.5E+02	49%	21,504	6

【表 2 4 - 1 1】

Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/N178D/R233E/E240N	1.6E+03	6.6E+02	41%	14,831	3
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/N95S	1.7E+06	8.7E+04	5%	14	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K82N/N84S/N95S	3.2E+06	2.1E+05	6%	7	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+03	3.8E+02	30%	18,567	2
Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/R150Y/R170E/R233E/E240N	4.3E+02	3.8E+00	1%	55,342	4
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	3.2E+04	2.2E+04	69%	749	6

10

【表 2 4 - 1 2】

Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	8.6E+03	5.4E+03	63%	2,774	6
D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	9.1E+03	2.4E+03	27%	2,636	4
R338E/T343R	R170E/T175R	3.4E+06	4.8E+05	14%	7	2
T343R/N346Y	T175R/N178Y	4.2E+06	4.0E+06	95%	6	4
R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/E240N	2.8E+03	4.4E+02	16%	8,498	2
R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/R233E/E240N	1.1E+04	4.3E+03	37%	2,086	4
T343R/N346D	T175R/N178D	1.3E+06	2.3E+05	18%	18	2

20

30

【表 2 4 - 1 3】

R318Y/R338E/T343 R/N346D/R403E/E 410N	R150Y/R170E/T175 R/N178D/R233E/E2 40N	5.1E+03	3.7E+01	1%	4,726	2
R318Y/R338E/Y345 A/R403E/E410N	R150Y/R170E/Y177 A/R233E/E240N	7.9E+03	1.2E+03	16%	3,015	2
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/R 403E	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/R170E/R2 33E	8.1E+02	1.6E+02	20%	29,512	4
K247N/N249S/R318 Y/R338E/R403E	K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E	3.1E+02	2.1E+02	67%	76,373	4
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R403E/E 410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/R233E/E2 40N	7.3E+03	2.0E+01	0%	3,291	2

10

【表 2 4 - 1 4】

K247N/N249S/R318 Y/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R233E/E240N	2.7E+03	9.3E+02	35%	8,942	6
Y155F/K247N/N24 9S/R338E/R403E/E 410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R170E/R233E/E2 40N	4.2E+04	4.3E+02	1%	572	2
K247N/N249S/R338 E/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/ R233E/E240N	2.1E+04	1.5E+03	7%	1,148	2
R318Y/R338E/T343 R/R403E	R150Y/R170E/T175 R/R233E	5.8E+03	8.6E+02	15%	4,118	2
Y155F/R318Y/R338 E/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/R17 0E/T175R/R233E	2.8E+03	3.8E+02	14%	8,515	6
R318Y/R338E/T343 R/E410N	R150Y/R170E/T175 R/E240N	5.4E+05	3.2E+05	58%	44	8
Y155F/R318Y/R338 E/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/R17 0E/T175R/E240N	7.8E+05	6.1E+05	79%	31	4

20

30

【表 2 4 - 1 5】

R318Y/T343R/R403 E/E410N	R150Y/T175R/R233 E/E240N	9.3E+04	1.2E+04	13%	257	2
Y155F/R318Y/T343 R/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/T17 5R/R233E/E240N	5.5E+04	7.8E+03	14%	436	4
R338E/T343R/R403 E/E410N	R170E/T175R/R233 E/E240N	3.4E+05	2.7E+03	1%	70	2
Y155F/R338E/T343 R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T17 5R/R233E/E240N	2.8E+05	1.7E+04	6%	85	4
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/T 343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/R170E/T1 75R/R233E/E240N	8.7E+03	1.9E+03	22%	2,733	8
K247N/N249S/R318 Y/R338E/T343R/R4 03E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233 E/E240N	9.6E+03	2.4E+03	25%	2,499	4

40

【表 2 4 - 1 6】

K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	9.0E+02	2.2E+02	25%	26,598	4
Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/R170E/R233E/E240N	1.3E+03	2.8E+02	21%	17,778	6
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.6E+03	5.6E+02	22%	9,317	4
Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.6E+03	6.6E+02	25%	9,148	4
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	5.3E+03	1.8E+03	34%	4,468	10

10

【表 2 4 - 1 7】

Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	2.2E+03	1.4E+03	62%	10,758	4
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	9.3E+04	1.2E+04	13%	257	4
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	1.9E+05	7.1E+02	0%	125	2
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240S	2.2E+05	2.6E+04	12%	110	6
Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/R233E	4.0E+04	7.6E+03	19%	601	4

20

30

【表 2 4 - 1 8】

Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/R233E	1.6E+05	1.5E+04	9%	146	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/E240S	9.9E+03	2.9E+03	30%	2,417	22
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E	1.4E+05	2.3E+04	16%	168	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	2.3E+03	1.7E+02	8%	10,415	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	1.7E+03	2.0E+02	12%	14,156	4
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	8.9E+04	1.1E+04	13%	268	4
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/R233E/E240N	8.6E+04	1.1E+04	13%	276	4

10

20

【表 2 4 - 1 9】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E	2.7E+04	1.4E+04	50%	889	4
Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/T175R	4.0E+05	2.9E+05	72%	60	8
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R233E	2.1E+03	5.3E+01	2%	11,125	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/E240N	1.3E+05	9.5E+04	75%	188	6
Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/R233E	1.3E+04	1.0E+03	8%	1,819	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/T175R	1.2E+07	6.2E+06	51%	2	4

30

【表 2 4 - 2 0】

Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/R338E/T 343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/R170E/T1 75R/E240N	2.2E+05	1.0E+05	45%	107	4
K247N/N249S/R318 Y/R338E/T343R/E4 10N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/E240 N	2.1E+05	8.2E+04	39%	114	4
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/T343R/R 403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/T175R/R2 33E/E240N	2.8E+04	5.6E+03	20%	842	4
K247N/N249S/R318 Y/T343R/R403E/E4 10N	K82N/N84S/R150Y/ T175R/R233E/E240 N	2.5E+04	8.0E+03	32%	962	6
Y155F/K247N/N24 9S/R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R170E/E240N	2.9E+06	2.2E+06	77%	8	6

10

【表 2 4 - 2 1】

Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/T343R/R 403E	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/T175R/R2 33E	1.2E+04	1.0E+03	9%	2,011	4
K247N/N249S/R318 Y/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/ T175R/R233E	9.8E+03	2.5E+03	26%	2,430	12
Y155F/K247N/N24 9S/R318Y/T343R/E 410N	Y[155]F/K82N/N84 S/R150Y/T175R/E2 40N	3.6E+05	1.2E+05	32%	66	4
K247N/N249S/R318 Y/T343R/E410N	K82N/N84S/R150Y/ T175R/E240N	4.9E+04	6.5E+03	13%	487	4
Y155F/K247N/N24 9S/R338E/T343R/R 403E	Y[155]F/K82N/N84 S/R170E/T175R/R2 33E	4.4E+04	1.1E+04	26%	549	4
K247N/N249S/R338 E/T343R/R403E	K82N/N84S/R170E/ T175R/R233E	5.0E+04	1.7E+04	35%	482	4
K247N/N249S/R338 E/T343R/E410N	K82N/N84S/R170E/ T175R/E240N	1.4E+07	7.2E+06	53%	2	5

20

30

【表 2 4 - 2 2】

Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	6.2E+05	5.6E+04	9%	39	4
K247N/N249S/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/T175R/R233E/E240N	4.2E+05	8.1E+04	19%	58	4
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	4.4E+05	1.9E+05	43%	55	6
R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	1.8E+06	8.6E+05	48%	13	4
Y155F/R318Y/T343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E	1.1E+04	9.1E+02	8%	2,114	2
Y155F/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/T175R/R233E/E240N	8.8E+05	3.3E+03	0%	27	2

10

【表 2 4 - 2 3】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	3.7E+05	1.1E+05	28%	64	6
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R	3.2E+05	1.4E+05	44%	74	6
Y155F/K247N/N249S/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/E240N	3.5E+06	4.8E+05	14%	7	2
Y155F/K247N/N249S/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R233E/E240N	1.3E+05	3.3E+04	26%	191	14

20

【表 2 4 - 2 4】

Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	1.3E+07	1.0E+07	78%	2	6
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	2.0E+07	6.3E+06	31%	1	4
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	2.0E+05	5.9E+04	29%	118	4
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	1.2E+06	1.1E+05	9%	20	2

30

【表 2 4 - 2 5】

K228N/R150Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	7.1E+03	3.3E+02	5%	3,343	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E	1.0E+03	2.3E+02	22%	23,389	2
K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/E240N	6.3E+05	1.0E+05	17%	38	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/T175R/R233E/E240N	1.7E+04	2.4E+03	14%	1,422	2

10

【実施例 6】

【0 5 1 7】

F I X a ポリペプチドの薬物動態学的および薬力学的分析

F I X a 変異体ポリペプチドの薬物動態学的 (P K) および薬力学的 (P D) 特性を静脈内投与後の種々の時点でのマウス血漿中の変異体 F I X の量を測定することによって評価した。2 種のアッセイを血漿中の F I X a を定量するために用いた。薬物動態学的特性を評価するために E L I S A をマウス血漿中の総 F I X タンパク質を定量するために用い、F I X 依存凝固アッセイ (F I X 欠失血漿を用いる活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) アッセイ) を血漿中の F I X ポリペプチドの血液凝固活性を定量するために用い、薬力学的特性を評価した。

20

【0 5 1 8】

動物。Charles River Laboratories (Hollister, CA) によって供給されたオス CD-1 マウス (30 ~ 40 g m) を処理前の少なくとも 3 日間隔離した。系列 P K 研究のために、オス CD-1 マウス (30 ~ 37 g m) に留置頸動脈血管カニューレを装着した。P D または P K 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。

30

【0 5 1 9】

A. 投与および血液採取

マウス (1 時点当たり N = 3) に F I X ポリペプチドを尾静脈を介して静脈内投与 (P K 研究用に約 1.4 m g / k g および P D 研究用に約 400 I U / k g、用量容量 2 m l / k g) した。投与後の適切な時点で動物を麻酔し、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 m L)。十分な量のタンパク質が得られなかったいくつかの実験では、ずらして配置した時点での系列採血のために合計 4 ~ 6 匹だけの動物を用い、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。血液は、0.9 % 生理食塩水を含む 0.1 m L 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 μ L を含むシリンジを取り付け、血液 0.05 m L をシリンジに抜き、血液を 1.5 m L 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 m L 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。全ての研究に関して血液試料を採取 15 分間以内に遠心分離し (9000 r p m、8 分間、4 °C)、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 °C) した。

40

【0 5 2 0】

A. P K 評価

クエン酸処理血液試料を投与後 1440 分までの種々の時点 (すなわち、投与前、2、

50

4、10、30、60、120、240、360、480、960および1440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。rFIXの血漿濃度を、検出および捕捉の抗体(#FIX-EIA、Affinity Biologicals、Ancaster、ON)の対応する対を利用する第X因子特異的ELISAを用いて決定した。簡潔には、FIXに対するアフィニティー精製ポリクローナル抗体をプレートのウェルにコートする。プレートを洗浄し、FIXを含有する血漿試料を添加する。血漿試料をプレート上で1:750および1:1500に希釈する。未結合物質を除去するためにプレートを洗浄後、FIXに対するペルオキシダーゼコンジュゲート検出抗体を捕捉されたFIXに結合させるためにプレートに添加する。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発現され、EnVision plate reader上、425nmで読み取る。標準曲線は、濃度範囲全体にわたって直線的であり、濃度0.82pg/mlから30ng/mlに及ぶ。抗体親和性における差異を排除するためにFIX変異体それぞれ自体を標準曲線のために用いる。各試料を2枚の別々のアッセイプレートで測定し、標準曲線の範囲内の測定値を血漿試料中のFIX変異体の濃度を算出するために用いる。

10

【0521】

PD評価。rFIXの血漿薬力学的活性を活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)アッセイおよびFIX欠乏ヒト血漿(STACLOT C. K. PREST kit、Diagnostica Stago、Asnieres、France)を製造者の説明書に従って用いて定量した。簡潔には、aPTTアッセイには、セファリン(血小板代替物)および活性化因子[コアリン(koalin)]存在下での血漿のカルシウム再加(recalcification)が関与する。FIX欠乏ヒト血漿を用いる場合、aPTTアッセイはFIXに対して特異的である。aPTTアッセイを製造者の製品挿入物に記載のとおり実施した。簡潔にはクエン酸処理血液試料をPK評価について記載したのと同じ時点で採取した。血漿試料を、0.1%ウシ血清アルブミン(Probumin、Millipore、Billerica、MA)を含有するTris緩衝生理食塩水中に1:100で希釈した。希釈血漿または標準物をFIX欠乏ヒト血漿およびセファリン/カオリン試薬と合わせ、180秒間インキュベートした。血液凝固をカルシウム(CaCl₂)の添加によって開始させた。秒数での血液凝固時間をSTArt 4 instrument(Diagnostica Stago、Asnieres、France)を用いて測定した。既知の濃度のrFIXから作成した標準曲線を用いて血漿FIX濃度を対数濃度対対数時間標準曲線プロットから内挿し、次いでバックグラウンドFIX活性(投与前動物から)を減算した。第IX因子活性についての定量の下限は約10ng/mLであった。

20

30

【0522】

PDおよびPKデータ分析。rFIX変異体でのマウス研究からのPD(aPTT)および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。rFIX変異体のPDおよびPKの両方は、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PD(aPTTアッセイを用いた)に関しては表25に、PK(ELISAアッセイを用いた)に関しては表26~27に提供する。表26は、追加的FIXa変異体に関するデータを示し、表26のFIXa変異体についての追加的実験反復(n)を含んで算出された新たな総平均を提供する。PDパラメーターは、ハーフタイム(終末、分)、MRT(MRT_{0-inf}、分)、曲線下面積(AUC)_{0~最終}(分μg/mL)/用量(mg/kg);最大濃度(C_{max}; (μg/mL)/用量(μg/kg)、Vd(mL/kg)およびクリアランス(Cl、mL/min/kg)を含んだ。

40

【0523】

50

薬物動態学的パラメーターを算出するために用いた定義および式

血漿半減時間（血漿 F I X 濃度対時間プロファイルの終末相での F I X ポリペプチドの半減期； $T_{1/2} \cdot \beta$ （血漿 F I X 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）； $MRT_{0-1 \text{ last}}$ は身体に存在する F I X ポリペプチドの平均時間であり； $AUMC_{0-1 \text{ last}} / AUC_{0-1 \text{ last}}$ として算出される（式中 $AUMC_{0-1 \text{ last}}$ 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）； $AUC_{0-1 \text{ last}} / \text{用量}$ は $[AUC_{(0-t)}]$ として算出され、式中 t は I V 用量（ mg / kg ）で割った F I X ポリペプチドの測定可能な血漿濃度での最終時点であり； $AUC_{0-inf} / \text{用量}$ は $[AUC_{(0-t)} + Ct / (\ln 2 / T_{1/2} \cdot \beta)]$ として算出され、式中 t は I V 用量（ mg / kg ）で割った F I X 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り； $C_{max} / \text{用量}$ （ mg / kg 当たり ug / mL ）、 C_{max} は最大に測定された血漿 F I X 濃度に対応する投与後時間であり； Cl は（ $\text{用量} / AUC_{0-inf}$ ）として算出される全身クリアランスであり； V_{ss} は定常状態分布容積であり； $MRT \cdot Cl$ として算出され； V_z は終末排出定数（terminal elimination constant）（ β ）に基づく分布容積であり； $Cl / (\ln 2 / T_{1/2} \cdot \beta)$ として算出される。

10

【0524】

表25. aPTT アッセイによって評価したFIX変異体のPD特性

【表25】

突然変異(成熟FIXナンバリング)	N	$T_{1/2}$	MRT_{0-inf}	$C_{max} / \text{用量}$	AUC_{0-inf}	Cl	Vz	Vss
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	2	296	354	19.3	2641	0.41	169	142

20

【0525】

表26. ELISAによって評価したFIX変異体のPK特性

【表 2 6 - 1】

突然変異	N	T1/2 _β	MRT 0-inf	C _{max} / 用量	AUC/ 用量 0-last	AUC/ 用量 0-inf	Vz	Cl
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	3	314 ± 12 8	366 ± 10 5	9.1 ± 1.5	1298 ± 29 8	1522 ± 15 8	308 ± 16 0	0.74 ± 0.0 6
T148A	8	383 ± 10 9	435 ± 12 8	10.2 ± 2.1	1620 ± 19 5	1747 ± 23 4	317 ± 82	0.58 ± 0.0 8
Catalyst Biosciences WT	2	329	360	11.9	2036	2121	229	0.48
A103N/N105S	2	375	481	12.5	2841	3068	177	0.33
D104N/K106S	2	428	558	13.9	3379	3786	164	0.26
K106N/V108S	2	510	629	12.8	2748	3202	234	0.32
D85N	2	528	607	9.5	1798	2046	372	0.49
D64N	2	447	519	11.8	1933	2152	304	0.47
D64A	2	364	372	11.5	1351	1466	359	0.68
N167D	2	334	318	8.9	1129	1176	410	0.85
N167Q	3	337 ± 8.8	323 ± 4.2	8.2 ± 1.2	1495 ± 25 8	1554 ± 26 8	318 ± 42	0.66 ± 0.1 0

10

20

【表 2 6 - 2】

S61A	2	397	412	10.0	1685	1800	325	0.57
S53A	2	382	462	11.2	2146	2321	238	0.43
T159A	2	232	227	10.5	1036	1048	315	0.97
T169A	2	348	319	8.3	836	889	567	1.15
T172A	3	494 ± 18 7	571 ± 21 4	11.2 ± 2.9	2055 ± 40 8	2366 ± 67 6	295 ± 31	0.45 ± 0.1 3
T179A	2	377	431	12.5	2291	2458	223	0.42
Y155H	2	465	552	11.6	2365	2638	253	0.38
Y155Q	1	552	645	13.6	2583	3045	262	0.33
S158E	2	433	471	14.5	2029	2222	291	0.46
N157Q	2	335	352	11.3	1185	1238	395	0.83
N157D	2	290	265	9.9	1166	1211	393	0.93

30

40

【表 2 6 - 3】

Y155F	2	443	567	18.1	3941	4375	149	0.23
A103N/N105S/Y155F	2	562	619	13.1	2427	2496	325	0.40
D104N/K106S/Y155F	3	514 ± 80	581 ± 81	13.8 ± 1.0	3057 ± 10 32	3181 ± 98 9	243 ± 47	0.34 ± 0.1 3
D203N/F205T	3	481 ± 69	566 ± 29	9.4 ± 1.9	2028 ± 44 8	2289 ± 48 9	314 ± 91	0.45 ± 0.0 9
D203N/F205T/D85N	1	291	406	12.4	1538	2044	205	0.49
K228N/D85N	2	459	565	11.3	2616	2926	227	0.35
K228N/A103N/N105S	2	583	701	14.4	3032	3301	255	0.30
K228N/D104N/K106S	2	801	913	13.6	2050	2238	513	0.45
K228N/Y155F	2	626	679	8.6	2073	2149	431	0.47
K228N/D104N/K106S/Y155 F	2	551	614	14.0	3730	3822	211	0.27
I251S	2	565	718	10.1	2646	3137	260	0.32
I251S/A103N/N105S	2	444	542	14.3	2445	2719	241	0.38

10

20

【表 2 6 - 4】

I251S/D104N/K106S	2	692	802	13.9	2533	2664	375	0.38
I251S/Y155F	2	572	660	12.2	2591	2790	291	0.37
A262S	3	373 ± 87	453 ± 91	14.4 ± 3.8	2716 ± 73 2	2926 ± 90 8	188 ± 29	0.36 ± 0.1 0
E410N*	2	439	551	7.4	893	1365	469	0.75
E239N	2	338	416	10.7	1657	1908	257	0.54
K247N/N249S	6	627 ± 17 4	734 ± 24 4	10.8 ± 3.4	2196 ± 73 7	2545 ± 79 5	387 ± 15 4	0.42 ± 0.1 1
Y155F/K247N/N249S	2	538	608	10.6	1752	1880	420	0.53
K247N/N249S/A103N/N105S	2	736	852	21.5	4369	4699	226	0.21

30

【表 2 6 - 5】

K247N/N249S/D104N/K106S/Y155F	2	603	714	16.8	3744	3889	233	0.27
S319N/L321S	2	351	427	11.4	2270	2409	210	0.42
N260S	3	496 ± 15 7	619 ± 17 0	11.5 ± 3.8	3364 ± 13 00	3687 ± 14 57	231 ± 15 6	0.30 ± 0.1 1
D104N/K106S/N260S	2	805	1001	16.1	4736	5248	220	0.20
Y155F/N260S	2	607	682	18.4	3408	3530	257	0.27
Y284N	2	400	478	9.0	2052	2210	270	0.46
R318Y/E410N	1	428	474	6.1	575	686	900	1.46
R338E/E410N	2	334	376	6.2	718	844	570	1.18
R338E/R403E/E4100N	5	436 ± 24	507 ± 29	13.4 ± 2.0	3052 ± 52 2	3302 ± 65 6	196 ± 49	0.31 ± 0.0 6
D203N/F205T/E240N	2	600	679	6.8	671	799	1080	1.25
D203N/F205T/R338E	2	307	419	9.3	1186	1586	281	0.63
D203N/F205T/R338A	2	317	403	9.0	1063	1397	327	0.72

10

20

【表 2 6 - 6】

D203N/F205T/R318Y	2	258	286	8.7	508	601	732	1.91
D203N/F205T/R338E/R403E	2	303	419	11.3	2105	2804	156	0.36
K228N/E410N	2	373	479	6.0	721	1025	522	0.98
K228N/R338E	2	248	340	10.4	1403	1736	207	0.58
R318Y/R338E/E410N	5	424 ± 30 6	515 ± 37 8	5.8 ± 1.6	645 ± 31 0	774 ± 45 4	778 ± 27 2	1.6 ± 0.73
R318Y/R338E/E410N/D104N/K106S	2	502	531	8.9	2008	2041	355	0.49
R318Y/R338E/E410N/Y155F	2	555	584	6.5	678	721	1136	1.53
K228N/R318Y/E410N	1	304	408	6.0	686	906	485	1.10
R318Y/R338E/R403E/E410N	5	442 ± 22	534 ± 28	16.4 ± 3.7	3902 ± 86 7	4232 ± 99 6	157 ± 38	0.25 ± 0.0 5

30

【表 2 6 - 7】

A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	421	527	16.2	3605	3935	157	0.26
D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	417	517	15.1	3114	3392	183	0.30
Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	565	649	12.4	3687	3772	226	0.27
R318Y/R338E/R403E/E410N/A103N/N105S/Y155F	3	669 ± 14 5	819 ± 22 3	17.2 ± 2.0	5844 ± 10 64	6204 ± 13 93	156 ± 8.7	0.17 ± 0.0 4
R318Y/R338E/R403E/E410N/D104N/K106S/Y155F	2	472	575	14.4	5885	5967	114	0.17
D203N/F205T/R318Y/E410N	1	431	475	8.0	637	761	816	1.31
R338L	2	368	377	11.2	1761	1861	285	0.54
K316M	2	527	665	7.9	1846	2142	356	0.47

10

【表 2 6 - 8】

E239S	2	462	542	11.3	2184	2416	278	0.41
E239A	2	538	544	13.1	1973	2209	353	0.45
E239R	2	431	709	8.9	1668	2020	307	0.50
E239K	2	400	370	14.4	2107	2222	278	0.48
H257F	2	328	357	10.3	1689	1820	273	0.70
H257Y	2	352	353	13.6	1971	2063	245	0.49
H257E	2	491	520	10.9	2185	2411	294	0.42
H257S	2	435	511	8.2	1630	1769	358	0.57
T412A	2	473	539	7.1	1561	1756	379	0.58
T412V	2	579	665	8.3	1258	1454	565	0.69
E410N/T412A	2	461	514	2.8	364	398	1679	2.51
E410N/T412V	2	340	390	3.7	431	487	906	2.27
E410Q	2	276	283	7.2	445	484	836	2.19
E410S	2	310	286	7.2	753	775	587	1.32
E410A	2	363	328	8.6	528	554	946	1.81
E410D	2	348	377	9.2	1473	1596	320	0.63
N346D	2	349	395	13.3	2817	2956	170	0.34

20

30

【表 2 6 - 9】

Y155F/N346D	2	472	478	17.0	3934	3986	176	0.26
N346Y	2	329	325	11.7	1246	1297	365	0.77
Y345T	2	359	453	6.1	1124	1200	438	0.85
T343R	2	402	504	6.5	1143	1234	487	0.85
T343E	2	414	461	12.6	1740	1877	318	0.53
T343Q	2	434	442	9.0	1626	1737	408	0.63
F342I	2	400	476	8.3	1133	1224	491	0.88
T343R/Y345T	2	325	324	9.1	1094	1130	422	0.90
R318Y/R338E	2	340	313	11.2	1402	1452	336	0.69
K228N/I251S	2	586	657	11.3	1473	1588	551	0.65
K228N/R318Y/R338E/R403E/ /E410N	2	476	647	9.1	2400	2726	261	0.37
K228N/R318Y/R338E/R403E/ /E410N/Y155F	3	615 ± 13 5	750 ± 19 1	18.6 ± 2.1	5496 ± 20 44	5970 ± 22 60	158 ± 50	0.18 ± 0.0 6

10

【表 2 6 - 1 0】

K228N/R318Y/R338E/R403E/ /E410N/D85N	2	587	713	24.8	6153	6725	125	0.15
I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	3	412 ± 14 0	542 ± 18 1	15.7 ± 4.9	2306 ± 88 4	2636 ± 12 61	242 ± 89	0.44 ± 0.1 7
D104N/K106S/I251S/R318Y/ /R338E/R403E/E410N	4	687 ± 60	874 ± 82	17.2 ± 2.2	7653 ± 45 6	8127 ± 52 0	122 ± 10	0.12 ± 0.0 1
I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N/Y155F	2	492	620	19.9	5704	6510	110	0.15
I251S/R318Y/R338E/E410N	2	591	630	7.5	1245	1292	664	0.78
D104N/K106S/D104N/K106 S/I251S/R318Y/R338E/E410 N/	2	726	819	16.4	1512	1612	650	0.62

20

30

【表 2 6 - 1 1】

K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	637	807	15.4	5283	5541	170	0.18
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	613	758	13.8	5335	5549	160	0.18
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	615	783	18.6	7319	7612	117	0.13
D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	626	754	19.4	6332	6580	140	0.15
K228N/N84S/R318Y/R338E/E410N	2	512	539	18.1	1925	1967	396	0.54
Y155F/K228N/N84S/R318Y/R338E/E410N	2	617	685	8.1	1170	1221	745	0.83
R318Y/R338E/R403E/E410S	2	382	395	14.7	2897	2971	184	0.34
R318Y/R338E/E410S	2	356	326	7.7	488	511	1066	2.08
K228N/K247N/N249S	2	662	753	19.6	3390	3578	268	0.28

10

20

【表 2 6 - 1 2】

K228N/K247N/N249S/D104N/K106S/Y155F	3	781 ± 55	939 ± 48	18.5 ± 3.8	6111 ± 1900	6606 ± 1949	183 ± 63	0.16 ± 0.04
K228N/K247N/N249S/D104N/K106S	2	758	838	17.9	3792	4035	271	0.25
K228N/K247N/N249S/Y155F	2	549	643	17.2	3002	3269	246	0.31
I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N/Y155F	3	599 ± 89	753 ± 121	21.7 ± 3.2	8567 ± 2834	9233 ± 2860	96.6 ± 15.4	0.11 ± 0.03
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V	2	424	456	20.0	4730	4892	124	0.20
R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A	2	380	439	17.5	4994	5115	107	0.20
R318Y/R338E/R403E/T412A	3	399 ± 88	477 ± 108	19.7 ± 0.7	4320 ± 2385	4505 ± 2357	144 ± 48	0.27 ± 0.15
R318Y/R3380E/T412A	2	462	401	13.6	1674	1691	398	0.60
N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	583	743	23.9	6821	7488	111	0.13
D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	779	999	17.2	7100	7728	145	0.12

30

40

【表 2 6 - 1 3】

Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	628	758	21.4	5214	5465	167	0.21
R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	2	474	575	25.2	7623	8140	86	0.12
Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N	2	540	641	18.2	5039	5172	154	0.20
K247N/N249S/N260S	2	549	632	17.4	4156	4262	186	0.23
Y155F/K247N/N249S/N260S	2	691	814	24.0	3857	4085	244	0.22
D104N/K106S/K247N/N249S/N260S	2	712	859	16.5	4187	4458	235	0.23
D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S	2	680	856	23.3	7026	7423	134	0.14
K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N	2	691	875	18.9	6353	6737	149	0.13
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	2	531	560	20.5	3766	3862	200	0.27
R338E/T343R	2	534	453	12.8	798	813	949	1.23

10

20

* E410Nの80%グリコシル化形態

【 0 5 2 6】

表27. ELISAによって評価したFIX変異体のPK特性

【表 2 7 - 1】

突然変異 (成熟FIX ナンバリ ング)	突然変異 (キモトリ プシンナ ンバリ ング)	N	終末 T 1/ 2	AUC/ 月量 (0-last)	AUC/ 月量 (0-inf)	MRT (0- inf)	C _{max} / 月量	V _z	Cl
N157D	N[157]D	2	290	1166	1211	265	9.9	393	0.93
Y155F	Y[155]F	2	443	3941	4375	567	18.1	149	0.23
A103N/N1 05S/Y155 F	A[103]N/N [105]S/ Y[155]F	2	562	2427	2496	619	13.1	325	0.40
D104N/K1 06S/Y155 F	D[104]N/K [106]S/ Y[155]F	3	514 ± 79 .8	3060 ± 103 0	3180 ± 989	581 ± 8 1.0	13.8 ± 1. 02	243 ± 4 7.4	0.34 1 ± 0.1 28
WT	Catalyst B iosciences WT	2	329	2036	2121	360	11.9	229	0.48
A103N/N1 05S	A[103]N/N [105]S	2	375	2841	3068	481	12.5	177	0.33

30

40

【表 2 7 - 2】

D104N/K106S	D[104]N/K[106]S	2	428	3379	3786	558	13.9	164	0.26
K106N/V108S	K[106]N/V[108]S	2	510	2748	3202	629	12.8	234	0.32
D85N	D[85]N	4	575 ± 89 .3	1530 ± 321	1680 ± 83.3	623 ± 8 3.3	9.10 ± 0.5 18	528 ± 1 84	0.61 9 ± 0.1 56
T148A	BeneFIX, T [148]A	3	314 ± 12 8	1300 ± 298	1520 ± 158	366 ± 1 05	9.12 ± 1.5 2	308 ± 1 60	0.66 2 ± 0.0 71
T148A	T[148]A	8	383 ± 10 9	1620 ± 195	1750 ± 234	435 ± 1 28	10.2 ± 2.0 9	317 ± 8 2.3	0.58 2 ± 0.0 84

10

【表 2 7 - 3】

K5A	K[5]A	2	271	1548	1583	311	10.5	251	0.64
D64N	D[64]N	2	447	1933	2152	519	11.8	304	0.47
D64A	D[64]A	2	364	1351	1466	372	11.5	359	0.68
N167D	N[167]D	2	334	1129	1176	318	8.9	410	0.85
N167Q	N[167]Q	3	337 ± 8. 75	1500 ± 258	1550 ± 268	323 ± 4 .25	8.20 ± 1. 17	318 ± 4 2.5	0.65 5 ± 0.1 03
S61A	S[61]A	2	397	1685	1800	412	10.0	325	0.57

20

30

【表 2 7 - 4】

S53A	S[53]A	2	382	2146	2321	462	11.2	238	0.43
T159A	T[159]A	2	232	1036	1048	227	10.5	315	0.97
T169A	T[169]A	2	348	836	889	319	8.3	567	1.15
T172A	T[172]A	3	494 ± 18 7	2050 ± 408	237 ± 676	571 ± 2 14	11.2 ± 2. 89	295 ± 3 1.5	0.44 7 ± 0.1 32
T179A	T[179]A	2	377	2291	2458	431	12.5	223	0.42
Y155H	Y[155]H	2	465	2365	2638	552	11.6	253	0.38
Y155Q	Y[155]Q	1	552	2583	3045	645	13.6	262	0.33
S158E	S[158]E	2	433	2029	2222	471	14.5	291	0.46
N157Q	N[157]Q	2	335	1185	1238	352	11.3	395	0.83

10

【表 2 7 - 5】

D203N/F205T	D39N/F41T	3	481 ± 69 .0	2030 ± 448	2290 ± 489	566 ± 2 8.6	9.43 ± 1. 93	314 ± 9 1.3	0.44 9 ± 0.0 87
D85N/D203N/ F205T	D[85]N/ D39N/F41T	1	291	1538	2044	406	12.4	205	0.49
K228N	K63N	3	490 ± 57 .8	2340 ± 519	2570 ± 682	570 ± 2 7.9	12.3 ± 1. 58	296 ± 1 19	0.41 0 ± 0.1 18
A103N/N105S/ K228N	A[103]N/ N[105]S/ K63N	2	583	3032	3301	701	14.4	255	0.30

20

30

【表 2 7 - 6】

D104N/K1 06S/ K22 8N	D[104]N/ K[106]S/K 63N	2	801	2050	2238	913	13.6	513	0.45
Y155F/K2 28N	Y[155]F/K 63N	2	626	2073	2149	679	8.6	431	0.47
D104N/K1 06S/Y155 F/K228N	D[104]N/K [106]S/Y[1 55]F/K63N	2	551	3730	3822	614	14.0	211	0.27
I251S	I86S	2	565	2646	3137	718	10.1	260	0.32
A103N/N1 05S/I251S	A[103]N/ N[105]S/ I 86S	2	444	2445	2719	542	14.3	241	0.38
D104N/K1 06S/I251S	D[104]N/ K[106]S/ I 86S	2	692	2533	2664	802	13.9	375	0.38

10

【表 2 7 - 7】

Y155F/I25 1S	Y[155]F/I86 S	2	572	2591	2790	660	12.2	291	0.37
A262S	A95bS	2	373	2716	2926	453	14.4	188	0.36
E410N	E240N	2	439	893	1365	551	7.4	469	0.75
E239N	E74N	2	338	1657	1908	416	10.7	257	0.54
K247N/N2 49S	K82N/N84S	6	627 ± 17 4	2200 ± 737	2540 ± 795	734 ± 2 44	10.8 ± 3.4 1	387 ± 1 54	0.42 0 ± 0.1 06
Y155F/K24 7N/ N249S	Y[155]F/K8 2N/N84S	2	538	1752	1880	608	10.6	420	0.53
A103N/N1 05S/ K247 N/N249S	A[103]N/N[105]S/K82N /N84S	2	736	4369	4699	852	21.5	226	0.21
D104N/K1 06S/ K247 N/N249S	D[104]N/K[106]S/K82N /N84S	2	571	2052	2109	632	16.2	426	0.51
D104N/K1 06S/ Y155 F/K247N/ N249S	D[104]N/K[106]S/Y[15 5]F/ K82N /N84S	2	603	3744	3889	714	16.8	233	0.27

20

30

40

【表 2 7 - 8】

S319N/L3 21S	S151N/L15 3S	2	351	2270	2409	427	11.4	210	0.42
N260S	N95S	3	496 ± 15 7	3360 ± 130 0	3690 ± 146 0	619 ± 1 70	11.5 ± 3. 18	231 ± 1 56	0.29 5 ± 0.1 05
D104N/K1 06S/ N26 0S	D[104]N/ K[106]S/N 95S	2	805	4736	5248	1001	16.1	220	0.20
Y155F/N2 60S	Y[155]F/N 95S	2	607	3408	3530	682	18.4	257	0.27
Y284N	Y117N	2	400	2052	2210	478	9.0	270	0.46
R318Y/E4 10N	R150Y/E2 40N	1	428	575	686	474	6.1	900	1.46
R338E/E4 10N	R170E/E2 40N	2	334	718	844	376	6.2	570	1.18

10

20

【表 2 7 - 9】

R338E/R40 3E/ E410N	R170E/R23 3E/ E240N	5	436 ± 24 .4	3050 ± 522	3300 ± 656	507 ± 2 8.9	13.4 ± 2.0 3	196 ± 4 9.2	0.31 2 ± 0.0 63
D203N/F2 05T/ E410 N	D39N/F41T / E240N	2	600	671	799	679	6.8	1080	1.25
D203N/F2 05T/ R338 E	D39N/F41T / R170E	2	307	1186	1586	419	9.3	281	0.63
D203N/F2 05T/ R338 A	D39N/F41T / R170A	2	317	1063	1397	403	9.0	327	0.72
D203N/F2 05T/ R318 Y	D39N/F41T / R150Y	2	258	508	601	286	8.7	732	1.91
D203N/F2 05T/ R338 E/R403E	D39N/F41T / R170E/ R233E	2	303	2105	2804	419	11.3	156	0.36
K228N/E41 0N	K63N/E240 N	2	373	721	1025	479	6.0	522	0.98

30

40

【表 27-10】

K228N/R338E	K63N/R170E	2	248	1403	1736	340	10.4	207	0.58
R318Y/R338E/ E410N	R150Y/E240N/ R170E	5	424 ± 30 6	645 ± 310	774 ± 454	515 ± 378	5.78 ± 1.56	778 ± 272	1.62 ± 0.73 0
D104N/K106S/ R318Y/R338E / E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/ E240N /	2	502	2008	2041	531	8.9	355	0.49
Y155F/R318Y/ R338E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/ E240N	2	555	678	721	584	6.5	1136	1.53
K228N/R318Y/ E410N	K63N/R150Y/ E240N	1	304	686	906	408	6.0	485	1.10
R318Y/R338E/ R403E/E410N	R150Y/R170E/ R233E/E240N	5	442 ± 22 .1	3900 ± 867	4230 ± 996	534 ± 28.0	16.4 ± 3.72	157 ± 38.3	0.24 6 ± 0.0 51

10

20

【表 2 7 - 1 1】

A103N/N1 05S/ R31 8Y/R338E / R403E/ E410N	A[103]N/N [105]S/R1 50Y/R170 E/ R233E /E240N	2	421	3605	3935	527	16.2	157	0.26
D104N/K1 06S/ R31 8Y/R338E / R403E/ E410N	D[104]N/K [106]S/R1 50Y/R170 E/ R233E /E240N	2	417	3114	3392	517	15.1	183	0.30
Y155F/R3 18Y/ R33 8E/R403E / E410N	Y[155]F/R 150Y/ R17 0E/R233E / E240N	2	565	3687	3772	649	12.4	226	0.27
A103N/N1 05S/ Y15 5F/R318Y / R338E/ R403E/ E 410N	A[103]N/ N[105]S/Y [155]F/R1 50Y/R170 E/ R233E /E240N	3	669 ± 14 5	5840 ± 106 0	6200 ± 139 0	819 ± 2 23	17.2 ± 2. 02	156 ± 8 .74	0.16 7 ± 0.0 39
D104N/K1 06S/ Y15 5F/R318Y / R338E/ R403E/ E 410N	D[104]N/ K[106]S/Y [155]F /R 150Y/R170 E/ R233E /E240N	2	472	5885	5967	575	14.4	114	0.17

10

20

30

【表 2 7 - 1 2】

D203N/F2 05T/ R318 Y/E410N	D39N/F41T / R150Y/E 240N	1	431	637	761	475	8.0	816	1.31
R338L	R170L	2	368	1761	1861	377	11.2	285	0.54
K316M	K148M	2	527	1846	2142	665	7.9	356	0.47
E239S	E74S	2	462	2184	2416	542	11.3	278	0.41
E239A	E74A	2	538	1973	2209	544	13.1	353	0.45
E239R	E74R	2	431	1668	2020	709	8.9	307	0.50
E239K	E74K	2	400	2107	2222	370	14.4	278	0.48
H257F	H92F	2	328	1689	1820	357	10.3	273	0.70
H257Y	H92Y	2	352	1971	2063	353	13.6	245	0.49
H257E	H92E	2	491	2185	2411	520	10.9	294	0.42
H257S	H92S	2	435	1630	1769	511	8.2	358	0.57
T412A	T242A	2	473	1561	1756	539	7.1	379	0.58
T412V	T242V	2	579	1258	1454	665	8.3	565	0.69
E410N/T41 2A	E240N/T24 2A	2	461	364	398	514	2.8	1679	2.51

10

20

【表 2 7 - 1 3】

E410N/T4 12V	E240N/T2 42V	2	340	431	487	390	3.7	906	2.27
E410Q	E240Q	2	276	445	484	283	7.2	836	2.19
E410S	E240S	2	310	753	775	286	7.2	587	1.32
E410A	E240A	2	363	528	554	328	8.6	946	1.81
E410D	E240D	2	348	1473	1596	377	9.2	320	0.63
N346D	N178D	2	349	2817	2956	395	13.3	170	0.34
Y155F/N3 46D	178D/Y[15 5]F	2	472	3934	3986	478	17.0	176	0.26
N346Y	N178Y	2	329	1246	1297	325	11.7	365	0.77
Y345T	Y177T	2	359	1124	1200	453	6.1	438	0.85
T343R	Y175R	2	402	1143	1234	504	6.5	487	0.85
T343E	T175E	2	414	1740	1877	461	12.6	318	0.53
T343Q	Y175Q	2	434	1626	1737	442	9.0	408	0.63
F342I	F174I	2	400	1133	1224	476	8.3	491	0.88
T343R/Y3 45T	T175R/Y1 77T	2	325	1094	1130	324	9.1	422	0.90

30

40

【表 2 7 - 1 4】

R318Y/R338E	R150Y/R170E	2	340	1402	1452	313	11.2	336	0.69
K228N/I251S	K63N/I86S	2	586	1473	1588	657	11.3	551	0.65
K228N/R318Y/ R338E/ /R403E/ E410N	K63N/R150Y/ R170E/ R233E/ E240N	2	476	2400	2726	647	9.1	261	0.37
Y155F/K228N/ R318Y/ /R338E/ R403E/ E410N	Y[155]F/K63N/ R150Y/ /R170E/ R233E/ E240N	3	615 ± 13 5	5500 ± 204 0	5970 ± 22 60	750 ± 1 91	18.6 ± 2.1 4	158 ± 5 0.1	0.18 3 ± 0.0 62
D85N/K228N/ R318Y/ /R338E/ R403E/ E410N	D[85]N/K63N/ R150Y/ R170E/ R233E/ E240N	2	587	6153	6725	713	24.8	125	0.15

10

20

【表 2 7 - 1 5】

I251S/R318Y/ R338E/ /R403E/ E410N	I86S/R150Y/ R170E/ /R233E/ E240N	3	412 ± 14 0	2310 ± 884	2640 ± 126 0	542 ± 1 81	15.7 ± 4. 89	242 ± 8 9.4	0.43 8 ± 0.1 71
D104N/K106S/ I251S/ R318Y/ /R338E/ R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/ I86S/ R150Y/ R170E/ R233E/ E240N	4	687 ± 60 .2	7650 ± 456	8130 ± 520	874 ± 8 1.7	17.2 ± 2. 24	122 ± 1 0.1	0.12 3 ± 0.0 08
Y155F/I251S/ R318Y/ R338E/ / R403E/ E410N	Y[155]F/I86S/ R150Y/ /R170E/ R233E/ E240N	2	492	5704	6510	620	19.9	110	0.15
I251S/R318Y/ R338E/ E410N	I86S/R150Y/ R170E/ /E240N	2	591	1245	1292	630	7.5	664	0.78

30

40

【表 2 7 - 1 6】

D104N/K1 06S/ I251 S/R318Y/ R338E/E 410N	D[104]N/K [106]S I86 S/R150Y/ R170E/E2 40N	2	726	1512	1612	819	16.4	650	0.62
K247N/N2 49S/ R31 8Y/R338E / R403E/ E410N	K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ R 233E/E240 N	2	637	5283	5541	807	15.4	170	0.18
Y155F/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E/ R403E/ E 410N	Y[155]F / K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ R 233E/E240 N	2	613	5335	5549	758	13.8	160	0.18

10

【表 2 7 - 1 7】

A103N/N1 05S/ K24 7N/N249S / R318Y/ R338E/ R 403E/E41 0N	A[103]N/N [105]S K8 2N/N84S/ R150Y/R 170E/ R23 3E/E240N /	2	615	7319	7612	783	18.6	117	0.13
D104N/K1 06S/ K24 7N/N249S / R318Y/ R338E/ R 403E/E41 0N	D[104]N/K [106]S K8 2N/N84S/ R150Y/R 170E/ R23 3E/E240N /	2	626	6332	6580	754	19.4	140	0.15
D104N/K1 06S/ Y15 5F/K247N / N249S/ R318Y/ R 338E/R40 3E/ E410 N	D[104]N/K [106]S/Y[1 55]F/K82N /N84S/R15 0Y/ R170 E/R233E/ E240N	2	846	8069	8807	1020	18.4	139	0.11
K247N/N2 49S/ R31 8Y/R338E / E410N	K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ E 240N	2	512	1925	1967	539	18.1	396	0.54

20

30

40

【表 2 7 - 1 8】

Y155F/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E/ E410N	Y[155]F / K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ E 240N/	2	617	1170	1221	685	8.1	745	0.83
R318Y/R3 38E/ R40 3E/E410S	R150Y/R1 70E/ R233 E/E240S	2	382	2897	2971	395	14.7	184	0.34
R318Y/R3 38E /E41 0S	R150Y/R1 70E/ E240 S	2	356	488	511	326	7.7	1066	2.08
K228N/K2 47N/ N24 9S	K63N/K82 N/ N84S	2	662	3390	3578	753	19.6	268	0.28
D104N/K1 06S/ Y15 5F/K228N / K247N/ N249S	D[104]N/K [106]S/Y[1 55]F/K63N / K82N/N 84S	3	781 ± 55 .2	6110 ± 190 0	6610 ± 195 0	939 ± 4 8.2	18.5 ± 3. 84	183 ± 6 3.3	0.16 0 ± 0.0 45

10

20

【表 2 7 - 1 9】

D104N/K1 06S/ K22 8N/K247N / N249S	D[104]N/K [106]S /K 63N/K82N / N84S	2	758	3792	4035	838	17.9	271	0.25
Y155F/K2 28N/ K24 7N/N249S	Y[155]F/K 63N/ K82 N/N84S	2	549	3002	3269	643	17.2	246	0.31
K228N/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E/ R403E/ E 410N	Y[155]F /I 86S/ R150 Y/R170E/ R233E/E 240N/	3	599 ± 88 .6	8570 ± 283 0	9230 ± 286 0	753 ± 1 20	21.7 ± 3. 19	96.6 ± 15.4	0.11 5 ± 0.0 30
D104N/K1 06S/ K22 8N/K247N / N249S/ R318Y/ R 338E/R40 3E/ E410 N	D[104]N/K [106]S/K6 3N/K82N/ N84S/R15 0Y/ R170 E/R233E/ E240N	3	806 ± 88 .6	9330 ± 283 0	9990 ± 286 0	912 ± 1 20	24.4 ± 3. 19	116 ± 1 5.4	0.10 0 ± 0.0 30

30

40

【表 2 7 - 2 0】

Y155F/K2 28N/ K24 7N/N249S / R318Y/ R338E/ R 403E/E41 0N	Y[155]F/K 63N/ K82 N/N84S/ R150Y/R1 70E/ R233 E/E240N	1	559	10704	11042	710	27.3	73	0.09
R318Y/R3 38E/ R40 3E/E410N / T412V	R150Y/R1 70E/ R233 E/E240N/ T242V	2	424	4730	4892	456	20.0	124	0.20
R318Y/R3 38E/ R40 3E/E410N / T412A	R150Y/R1 70E/ R233 E/E240N/ T242A	2	380	4994	5115	439	17.5	107	0.20
R318Y/R3 38E/ R40 3E/T412A	R150Y/R1 70E/ R233 E/T242A	3	399 ± 88 .1	4320 ± 238 0	4500 ± 236 0	477 ± 1 08	19.7 ± 0. 684	144 ± 4 7.8	0.27 0 ± 0.1 45
R318Y/R3 38E/ T41 2A	R150Y/R1 70E/ T242 A	2	462	1674	1691	401	13.6	398	0.60

10

20

【表 2 7 - 2 1】

R318Y/R338E/ E410N /T412V	150Y/R170E/ E240N/ T242V	2	251	524	555	226	16.3	772	2.31
N260S/R318Y/ R338E /R403E/ E410N	N95S/R150Y/ R170E/ R233E/ E240N	2	583	6821	7488	743	23.9	111	0.13
D104N/K106S/ N260S/R318Y/ R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S /N95S/R150Y/ R170E/R233E/ E240N	2	779	7100	7728	999	17.2	145	0.12
Y155F/N260S/ R318Y /R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/ N95S/ R150Y/R170E/ R233E/E240N	2	628	5214	5465	758	21.4	167	0.21
R318Y/R338E/ N346D/R403E / E410N	R150Y/R170E/ N178D /R233E/ E240N	2	474	7623	8140	575	25.2	86	0.12

10

20

【表 2 7 - 2 2】

Y155F/R318Y/ R338E/N346D / R403E/ E410N	Y[155]F/R150Y /R170E/N178D / R233E/ E240N	2	540	5039	5172	641	18.2	154	0.20
K247N/N249S/ N260S	K82N/N84S/ N95S	2	549	4156	4262	632	17.4	186	0.23
Y155F/K247N/ N249S/N260S	Y[155]F /K82N/ N84S/N95S	2	691	3857	4085	814	24.0	244	0.22
D104N/K106S/ K247N/N249S / N260S	D[104]N/K[106]S /K82N/N84S / N95S	2	712	4187	4458	859	16.5	235	0.23

30

40

【表 2 7 - 2 3】

D104N/K1 06S/ Y15 5F/K247N / N249S/ N260S	D[104]N/K [106]S/Y[1 55]F/K82N N84S/N9 5S/	2	680	7026	7423	856	23.3	134	0.14
K247N/N2 49S/ N26 0S/R318Y / R338E/ R403E/ E 410N	K82N/N84 S/ N95S/ R150Y/ R 170E/R233 E/ E240N	2	691	6353	6737	875	18.9	149	0.13
Y155F/K2 47N/ N24 9S/N260S / R318Y/ R338E/ R 403E/E41 0N	Y[155]F/K 82N/ N84 S/N95S/ R150Y/R1 70E/ R233 E/E240N	1	1038	8401	9376	1068	21.0	160	0.11
R318Y/R3 38E/ T34 3R/R403E / E410N	T175R/R2 33E/ E240 N/R150Y/ R170E	2	531	3766	3862	560	20.5	200	0.27
Y155F/R3 18Y/ R33 8E/T343R / R403E/ E410N	Y[155]F/R 150Y/R170 E/T175R/ R233E/E 240N	1	182	3223	4335	259	20.5	61	0.23

10

20

30

【表 2 7 - 2 4】

D104N/K1 06S/ R31 8Y/R338E / T343R/ R403E/ E 410N	D[104]N/K [106]S/R1 50Y/R170 E/ T175R /R233E/ E240N	3	666 ± 89 .9	7270 ± 729	7550 ± 708	699 ± 8 8.0	21.7 $\pm 4.$ 71	128 ± 2 1.1	0.13 3 $\pm$ 0.0 13
R338E/T3 43R	R170E/T1 75R	2	534	798	813	453	12.8	949	1.23
T343R/N3 46Y	T175R/N1 78Y	3	276 ± 19 .9	1080 ± 331	1100 ± 333	228 ± 7 .76	12.3 $\pm 5.$ 14	394 ± 1 56	0.98 9 $\pm$ 0.3 60
R318Y/R3 38E/ N34 6Y/R403E / E410N	R150Y/R1 70E/ N178 Y/R233E/ E240N	2	324	2394	2487	335	24.7	189	0.40

10

20

【表 2 7 - 2 5】

R318Y/R3 38E/ T34 3R/N346Y / R403E/ E410N	R150Y/R1 70E/ T175 R/N178Y/ R233E/E 240N	2	303	3569	3691	329	22.2	118	0.27
T343R/N3 46D	T175R/N1 78D	2	388	2903	2917	356	17.0	192	0.34
R318Y/R3 38E/ T34 3R/N346D / R403E/ E410N	R150Y/R1 70E/ T175 R/N178D/ R233E/E 240N	2	450	6645	6717	506	20.7	97	0.15
R318Y/R3 38E/ Y34 5A/R403E / E410N	R150Y/R1 70E/ Y177 A/R233E/ E240N	1	475	4989	5058	511	22.3	135	0.20
R318Y/R3 38E/ Y34 5A/N346D / R403E/ E410N	R150Y/R1 70E/ Y177 A/N178D/ R233E/E 240N	2	492	6249	6347	607	22.1	112	0.16

30

40

【表 2 7 - 2 6】

Y155F/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E/ R403E	Y[155]F/K 82N/ N84 S/R150Y/ R170E/R2 33E	2	622	10477	10973	791	26.9	85	0.10
K247N/N2 49S/ R31 8Y/R338E / R403E	K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ R 233E	2	805	8099	8569	814	20.0	137	0.12
Y155F/K2 47N/ N24 9S/R338E / R403E/ E410N	Y[155]F/K 82N/ N84 S/R170E/ R233E/E2 40N	2	618	9233	9709	801	22.4	92	0.10
R318Y/R3 38E/ T34 3R/R403E	R150Y/R1 70E/ T175 R/R233E	2	421	6107	6153	473	19.9	99	0.16

10

20

【表 2 7 - 2 7】

R318Y/R3 38E/ T34 3R/E410N	R150Y/R1 70E/ T175 R/E240N	2	529	793	815	391	5.6	931	1.23
R150Y/T3 43R/ R40 3E/E410N	R150Y/T1 75R/ R233 E/E240N	2	431	5020	5060	434	20.7	130	0.21
R170E/T3 43R/ R40 3E/E410N	R170E/T1 75R/ R233 E/E240N	2	484	5008	5060	450	19.8	141	0.20
Y155F/R3 38E/ T34 3R/R403E / E410N	Y[155]F/R 170E/ T17 5R/R233E / E240N	2	628	5406	5509	521	17.9	164	0.18
Y155F/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E/ T343R/ R 403E/E41 0N	K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ T 175R/R233 E/ E240N	2	513	9067	9267	642	24.7	82	0.11

30

40

【表 2 7 - 2 8】

K247N/N2 49S/ R31 8Y/R338E / T343R/ R403E/ E 410N	K82N/N84 S/ R150Y/ R170E/ T 175R/R233 E/ E240N	2	536	8604	8824	672	24.4	89	0.12
Y155F/K2 28N/ I251 S/R318Y/ R338E/R 403E/ E4 10N	Y[155]F/K 63N/ I86S /R150Y/ R170E/R2 33E/ E240 N	2	780	9033	9557	854	20.5	123	0.11
N260S/R3 18Y/ R33 8E/T343R / R403E/ E410N	Y[155]F/N 95S/ R150 Y/R170E/ T175R/R 233E/ E24 0N	2	539	8325	8537	675	24.0	92	0.12

10

20

【表 2 7 - 2 9】

Y155F/N2 60S/ R31 8Y/R338E / T343R/ R403E/ E 410N	Y[155]F/N 95S/ R150 Y/R170E/ T175R/R 233E/ E24 0N	1	578	3266	6295	733	20.4	133	0.16
K228N/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E/ T343R/ R 403E/E41 0N	K63N/K82 N/ N84S/ R150Y/ R 170E/T175 R/ R233E /E240N	2	753	8972	9391	757	26.0	117	0.11
Y155F/R3 38E/ T34 3R/R403E	Y[155]F/R 170E/ T17 5R/R233E	2	503	5350	5412	506	16.7	135	0.19
Y155F/R3 38E/ T34 3R/R403E / E410S	Y[155]F/R 170E/ T17 5R/R233E / E240S	2	589	5447	5546	526	22.9	156	0.18
Y155F/N2 60S/ R33 8E/T343R / R403E	Y[155]F/N 95S/R170E /T175R/ R233E	2	485	9590	9749	619	24.0	74	0.10

30

40

【表 2 7 - 3 0】

Y155F/I2 51S/ R33 8E/T343R / R403E	Y[155]F/I8 6S/ R170E /T175R/ R233E	2	732	7531	7926	807	21.0	134	0.13
R318Y/R3 38E/ T34 3R/R403E / E410S	R150Y/R1 70E/ T175 R/R233E/ E240S	2	618	4657	4728	466	19.9	199	0.23
Y155F/K2 47N/ N24 9S/T343R / R403E	Y[155]F/K 82N/ N84 S/T175R/ R233E	2	866	7007	7391	751	18.3	169	0.14
K247N/N2 49S/ R33 8E/T343R / R403E/ E410N	K82N/N84 S/ R170E/ T175R/ R 233E/E240 N	2	804	9554	10051	776	20.4	116	0.10

10

20

【表 2 7 - 3 1】

Y155F/K2 47N/ N24 9S/R318Y / R338E	Y[155]F/K 82N/ N84 S/R150Y/ R170E	2	662	2965	3048	578	13.6	313	0.33
Y155F/K2 47N/ N24 9S/R338E / R403E	Y[155]F/K 82N/ N84 S/R170E/ R233E	1	717	8404	8790	783	16.9	118	0.11
Y155F/K2 47N/ N24 9S/R338E / T343R/ R403E	Y[155]F/K 82N/ N84 S/R170E/ T175R/R2 33E	2	676	7455	7702	676	20.3	131	0.13
K247N/N2 49S/ T34 3R/R403E / E410N	K82N/N84 S/ T175R/ R233E/ E 240N	2	680	7758	8085	747	18.0	122	0.13

30

40

【実施例 7】

【0 5 2 7】

F I X ポリペプチドの凝血促進活性のインビボ評価

F I X 欠損マウス (F I X^{-/-}マウス) を用いる血友病 B のマウスモデルを F I X 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 I X ポリペプチドで処理し、20 分間に失われた血液量を F I X 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。

【0 5 2 8】

50

A. 野生型 F I X 凝血促進活性のインビボ評価

オス F I X^{-/-}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℃）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℃）。7 から 15 匹のマウスに組換えヒト F I X [B e n e f i x（登録商標）C o a g u l a t i o n F a c t o r I X（R e c o m b i n a n t）、W y e t h] または B e n e f i x（登録商標）C o a g u l a t i o n F a c t o r I X（R e c o m b i n a n t）と同じである緩衝液（0.234% 塩化ナトリウム、8 mM L-ヒスチジン、0.8% ショ糖、208 mM グリシン、0.004% p o l y s o r b a t e 80）に希釈した修飾 F I X ポリペプチド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。

【0529】

F I X 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 を滅菌水中、1 対 4 に希釈し、100 μL 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 0 で上のおと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。

【0530】

1. 野生型 F I X 血液凝固活性を評価する用量反応研究

F I X^{-/-}マウスにおいて B e n e f i x（登録商標）C o a g u l a t i o n F a c t o r I X（R e c o m b i n a n t）の 0.03、0.1、0.3 および 1 mg/kg での血液凝固活性を評価するための用量反応研究を実施した。この実験において、緩衝液のみの群における失血は 835.42 ± 24.55 μL であり、0.1、0.3 および 1 mg/kg での B e n e f i x（登録商標）C o a g u l a t i o n F a c t o r I X（R e c o m b i n a n t）処理によって顕著に減少した [558.59 ± 56.63 μL、415.81 ± 66.72 μL および 270.75 ± 57.48 μL へ；クラスカル-ワリスに続くダンポストテスト（D u n n ' s p o s t t e s t）を用いて p < 0.05]。0.03 mg/kg の検査した最低用量では値は 731.66 ± 59.16 μL であった。非線形回帰を用いて算出した E D₅₀ 値を下の表 28 に示す。

【0531】

2. F I X a-R 318 Y/R 338 E/R 403 E/E 410 N、F I X a-R 318 Y/R 338 E/E 410 N および F I X a-Y 155 F/K 247 N/N 249 S/R 318 Y/R 338 E/R 403 E/E 410 N の血液凝固活性を評価する用量反応

F I X a-R 318 Y/R 338 E/R 403 E/E 410 N（キモトリプシンナンバリリングによる R 150 Y/R 170 E/R 233 E/E 240 N）、F I X a-R 318 Y/R 338 E/E 410 N（キモトリプシンナンバリリングによる R 150 Y/R 170 E/E 240 N）および F I X a-Y 155 F/K 247 N/N 249 S/R 318 Y/R 338 E/R 403 E/E 410 N（キモトリプシンナンバリリングによる Y [155] F/K 82 N/N 84 S/R 150 Y/R 170 E/R 233 E/E 240 N）の血液凝固活性を様々な用量で評価した用量反応研究を実施した。

【0532】

F I X a-R 318 Y/R 338 E/R 403 E/E 410 N での処理は、失血の顕著な抑制を 0.01、0.03、0.1、0.3 および 1 mg/kg（それぞれ 434.65 ± 73.75 μL、497.28 ± 50.92 μL、230.81 ± 39.67 μL、

261.94±58.79 μLおよび251.56±41.81 μL)において緩衝液のみの対照と比較して(811.45±26.63 μL; クラスカルーワリスに続くダンポストテストを用いて $p < 0.05$)もたらした。0.003 mg/kgに用量を減少させると、失血値は対照レベルに近い786.83±44.39 μLになった。

【0533】

FIXa-R318Y/R338E/E410Nでの処理も失血の顕著な抑制を0.03、0.1、0.3および1 mg/kg(それぞれ571.67±50.45 μL、425.42±43.65 μL、263.47±42.66 μLおよび78.19±13.42 μL)において緩衝液のみの対照と比較して(845.14±23.63 μL; クラスカルーワリスに続くダンポストテストを用いて $p < 0.05$)もたらした。0.001 mg/kgに用量を減少させると、失血値は対照レベルに近い777.16±53.72 μLになった。

【0534】

FIXa-Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410Nでの処理は、検査した突然変異体での失血の最も顕著な抑制: 0.01、0.03および0.1 mg/kgにおいてそれぞれ460.03±74.60 μL、393.48±75.16 μLおよび157.28±28.89 μLを、緩衝液のみの対照と比較して(851.44±44.25 μL; クラスカルーワリスに続くダンポストテストを用いて $p < 0.05$)もたらした。非線形回帰を用いて算出したED₅₀値を下の表28に示す。

【0535】

表28.

【表28】

突然変異 (成熟FIXナンバリング)	突然変異(キモトリブシンナンバリング)	n/群	n (expts)	失血;ED50 (mg/kg)
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T[148]A)	7-20	2	0.2
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	19-38	3	0.02
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	8 - 42	4	0.06
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	18 - 21	2	0.01

【0536】

3. 野生型FIX血液凝固活性を評価する反応持続時間

Benefix(登録商標)Coagulation Factor IX(Recombinant)の0.5 mg/kgでの効果の持続時間を評価する研究をFIX-/-マウスで実施した。尾部切断の48時間、24時間、16時間、8時間、2時間、30分および5分前にマウスに静脈投与した。この実験において対照群を0%抑制と設定して対照群からの抑制を決定した。失血の抑制は5分、30分、2、4、8、16、24および48時間においてそれぞれ、媒体対照から59.7±11.9%、48.25±12.84%、57.74±9.10%、56.04±8.46%、32.09±7.92%、12.94±7.33%、38.75±11.47%および0.64±11.3%であった(平均値およびSEM、n=マウス8~33匹、実験3回から)。

【0537】

4. FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N血液凝固活性を評価する反応持続時間

FIXa-R318Y/R338E/R403E/E410Nの0.5 mg/kgでの効果の持続時間を評価する研究をFIX-/-マウスで実施した。尾部切断の96時間、72時間、48時間、32時間、24時間、16時間、8時間、4時間、2時間、30分および5分前にマウスにi.v.投与した。この実験において対照群を0%抑制と設定し

て対照群からの抑制を決定した。失血の抑制は、5分、30分、2、4、8、16、24、32、48、72および96時間においてそれぞれ媒体対照から93.26±2.04%、96.30±3.70%、85.86±6.52%、69.4±9.92%、89.05±3.69%、78.48±8.71%、63.33±6.70%、47.97±10.07%、3.1±8.22%、-13.52±10.59%および-12.82±7.31%であった（平均値およびSEM、n=マウス8~45匹、実験4回から）。

【0538】

F I X^{-/-}マウスについての注：

マウスのF I Xノックアウト群体はオスF I Xノックアウトマウス由来の凍結保存精子を用いたインビトロ受精によって作製した。F I Xノックアウト対立遺伝子を有する動物を選択するためにP C Rに基づくプロトコルを用いて全ての子孫を遺伝子型同定した。これらの動物のさらなる交配およびそれらの子孫（P C Rに基づく遺伝子型同定後）は、P C Rによって確認されたとおりF I Xノックアウト動物（すなわち、F I X遺伝子がX染色体上にあることからヘミ接合性のオスおよびホモ接合性のメス）を産生した。この初期F I X群体の全てのメンバーの遺伝子型のP C R確認後、真のノックアウト動物はノックアウト子孫だけを産生できることから、全群体の子孫のP C R確認を終了した。しかし群体から「引退した種畜」を何度か遺伝子型同定した。全ての群体の子孫の遺伝子型同定を終了したおよそ7カ月後、引退した種畜の遺伝子型同定は、群体における非ノックアウト（または野生型）動物の存在を明確に示した。この結果に基づいて、ノックアウト群体の全てのメンバーを遺伝子型同定し、全ての非ノックアウト動物を同定し、群体から排除した。群体遺伝子型同定の結果は、不十分なD N A調製のためにオスマウスの19%が野生型であり、オスマ動物の4%が不明確であることを示した。野生型および「不明確な」オス（およびメス）の両方を群体から排除した。

【0539】

したがってF I Xノックアウト群体にはある時点で1匹または複数匹の非ノックアウト動物が混入し、したがって群体のオスの19~23%の間まで時間と共に増加した野生型F I X遺伝子を含むわずかな非ノックアウト動物が含まれていた（インビボ実験はオスマウスだけを用いる）。この応用において作成および報告されたF I Xデータに関して、全てのインビトロデータは影響を受けない。インビボデータに関しては、混入が全ての化合物に同様に影響し、したがって変異体の序列またはそれらのB e n e F I Xとの比較のいずれにも影響しないことが推定および予測される。混入した動物が内在性F I Xを既に有したことから、有効性および持続時間実験においてそれらは、真の血友病動物よりも少ない血液を失い、外来性F I Xの投与からより少ない利益を得ており、したがって全ての化合物に関するデータの「拡散」または可変性を増加させた。混入は、全ての化合物を実際よりもわずかに低い強度に見せた場合もあったが、B e n e F I Xに対するそれらの比は変更されない（すなわち本発明者らのリード分子の強度および持続時間の利点は影響されない）。

【0540】

B. 野生型F I X凝血促進活性のインビボ評価—新規群体データ

下に記載するデータは、上に記載の確認済F I X^{-/-}マウスから再構築した新規群体由来である。マウスを種畜として用いる前に遺伝子型同定によって二重に確認した。下に記載する全てのデータは、両親が二重に確認された繁殖単位から生まれたマウス由来である。全ての交替用種畜も新たな繁殖単位の開始前にF I X^{-/-}として二重確認される。

【0541】

オスF I X^{-/-}マウスをケタミン/キシラジンカクテル（生理食塩水中45mg/mlおよび3.6mg/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℃）上に置いた。処置室を温度82F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、10mLに浸漬した（15mL遠心管；39℃）。7から15匹のマウスに、組換えヒトF I X [B e n e f i x（登録商標）C o a g u l a t i o n F a c t o r I X（R e c o m b i n a n t）、W y e

th] または BeneFIX (登録商標) Coagulation Factor IX (Recombinant) と同じである緩衝液 (0.234% 塩化ナトリウム、8mM L-ヒスチジン、0.8% ショ糖、208mM グリシン、0.004% polysorbate 80) に希釈した修飾 FIX ポリペプチド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。

【0542】

FIX 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5mmで行い、血液をPBS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1mL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。Triton-Xを滅菌水中、1対4に希釈し、100μLを1mL試料に添加して溶血させた。次いで試料の吸光度を546nmの波長で測定した。失血量を算出するために、PBS中に希釈し、Triton-X100で上のおり溶血させた既知の容量のマウス血液の546nm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±SEMとして表す。

【0543】

1. FIX 血液凝固活性を評価する用量反応研究

BeneFIX (登録商標) Coagulation Factor IX (Recombinant) および FIX ポリペプチドの血液凝固活性を FIX^{-/-} マウスにおいて用量を変化させて評価するための用量反応研究を実施した。これらの実験における ED₅₀ 値を非線形回帰を用いて算出し、下の表29に示す。

【0544】

表29. 用量反応 ED₅₀ 値

【表29-1】

突然変異	突然変異(キモトリプシンナンバリング)	n/群 /expt	N (expts)	平均 ED50 (mg/kg)
BeneFIX	BeneFIX	10-14	2	0.4
WT	Catalyst Biosciences WT	8-15	4	1.6
T148A	T[148]A	10-15	2	1.0
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	10-13	2	0.14
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	13-15	2	0.095
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	7-14	6	0.02
D104N/K106S/Y155F/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ R150Y/R170E/R233E/E240N	9-14	4	0.05
T343R	T175R	9-15	4	0.9
Y155F/K228N/R318Y/R338E /R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	10-14	2	0.08
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	9-18	3	1.0
K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	9-14	4	0.06

【表 2 9 - 2】

Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	9-15	4	0.03
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/E240N	8-10	2	0.08
D104N/K106S/Y155F/K247N/ N249S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	12-15	2	0.055
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	10-15	2	0.055
D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K63N/K82N/N84S	10-12	1	1.64
K228N/K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	8-15	5	0.08

10

【表 2 9 - 3】

D104N/K106S/K228N/K247N/ N249S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	D[104]N/K[106]S/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	13-15	2	0.125
Y155F/K228N/ K247N/N249S/ R318Y/R338E /R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	12-15	2	0.035
R318Y/R338E/R403E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/ T242V	8-14	3	0.03
R318Y/R338E/R403E/E410N/ T412A	R150Y/R170E/R233E/E240N/ T242A	11-15	2	0.04
K247N/N249S/N260S/R318Y/ R338E /R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	8-15	4	0.26
Y155F/ K247N/N249S/N260S/ R318Y/R338E /R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/N95S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	13-15	3	0.06
R318Y/R338E/T343R/R403E/ E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	7-15	5	0.025
Y155F/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	10-14	2	0.0045

20

30

【表 2 9 - 4】

D104V/K106S/R318Y/R338E/ T3 43R/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E / T175R/R233E/E240N	10-15	3	0.07
R338E/T343R	R170E/T175R	11-14	2	0.83
R318Y/R338E/T343R/N346Y/ R4 03E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/ R2 33E/E240N	9-13	3	0.03
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R1 70E/R233E	11-15	2	0.145
Y155F/K247N/N249S/R338E/ R4 03E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ R2 33E/E240N	12-15	3	0.08
R318Y/R338E/T343R/R403E	R150Y/R170E/T175R/R233E	10-15	2	0.025

10

【表 2 9 - 5】

Y155F/R318Y/R338E/T343R/ R4 03E	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/ R233E	10-14	2	0.007
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	11-15	5	0.13
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	10-15	2	0.03
Y155F/R318Y/T343R/R403E/ E4 10N	Y[155]F/R150Y/T175R/R233E/ E240N	13-15	2	0.07
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	11-15	2	0.045
Y155F/R338E/T343R/R403E/E41 0N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/ E240N	10-15	2	0.055
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E /T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R1 70E/T175R/R233E/E240N	11-15	2	0.04
K247N/N249S/ R318Y/R338E/ T 343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175 R/R233E/E240N	11-15	2	0.035
K228N/I251S/R318Y/R338E /R4 03E/E410N	K63N/I86S/R150Y/R170E/ R233 E/ E240N	10-15	3	0.01
Y155F/K228N/I251S/R318Y/ R3 38E /R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/ R1 70E/R233E/E240N	13-15	2	0.04

20

30

【表 2 9 - 6】

N260S/R318Y/R338E/T343R/ R4 03E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/ R23 3E/E240N	12-15	2	0.03
Y155F/N260S/ R318Y/R338E /T 343R/R403E/E410N	Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/ T 175R/R233E/E240N	10-15	2	0.02
K228N/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E /T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E / T175R/R233E/E240N	12-15	3	0.03
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	12-15	1	0.06
R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	10-15	2	0.195
Y155F/R338E/T343R/R403E /E4 10S	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/ E240S	12-15	3	0.06
Y155F/N260S/R338E/T343R/ R4 03E	Y[155]F/N95S/R170E/T175R/ R 233E	12-15	1	0.1
Y155F/I251S/R338E/T343R/ R4 03E	Y[155]F/I86S/R170E/T175R/ R 233E	13-15	2	0.145
R318Y/R338E/T343R/R403E/ E4 10S	R150Y/R170E/T175R/R233E/ E2 40S	11-15	2	0.015

10

20

【表 2 9 - 7】

Y155F/K247N/N249S/T343R/ R4 03E	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/ R2 33E	12-14	2	0.26
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E /T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R1 70E/T175R/R233E	10-14	2	0.006
K247N/N249S/R318Y/R338E/ T3 43R/R403E	K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175 R/R233E	10-13	2	0.009
Y155F/K247N/N249S/R338E/ T3 43R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ T1 75R/R233E/E240N	12-13	1	0.2
K247N/N249S/R338E/T343R/ R4 03E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/ R233 E/ E240N	11-14	1	0.01
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E	13-15	2	0.04
K247N/N249S/R338E/T343R/ R4 03E/E410N	K82N/N84S/R170E/T175R/ R233 E/ E240N	10-15	2	0.18

30

【表 29-8】

Y155F/K247N/N249S/R338E/ R4 03E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ R2 33E	12-15	2	0.22
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R1 70E/T175R/E240N	12-15	2	0.12
K247N/N249S/R318Y/R338E/ T3 43R/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E/ T175 R/E240N	11-14	2	0.12
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ T3 43R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ T1 75R/R233E/E240N	10-15	2	0.07
K247N/N249S/R318Y/T343R/ R4 03E/E410N	K82N/N84S/R150Y/T175R/ R233 E/E240N	14-15	1	0.02
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ T3 43R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ T1 75R/R233E	11-14	2	0.065
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ T 343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ T175R/E240N	12-15	1	0.25

10

【表 29-9】

Y155F/K247N/N249S/R338E/ T3 43R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ T1 75R/R233E	10-15	2	0.125
Y155F/K247N/N249S/T343R/ R4 03E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/ R2 33E/E240N	13-14	1	0.1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R3 38E /T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R1 70E/T175R	13-14	2	0.07
Y155F/K247N/N249S/T343R/ E 410N	Y[155]F/K82N/N84S/T175R/ E240N	11-15	1	0.11

20

【0545】

2. 野生型 F I X 血液凝固活性を評価する反応持続時間

B e n e f i x (登録商標) C o a g u l a t i o n F a c t o r I X (R e c o m b i n a n t) の 0. 5 m g / k g での効果の持続時間を評価するための研究を F I X - / - マウスで実施した。尾部切断の 48 時間、32 時間、24 時間、16 時間、8 時間、4 時間、2 時間および 5 分前にマウスに静脈投与した。この実験において対照群を 0 % 抑制と設定して対照群からの抑制を決定した。失血の抑制は、5 分、2、4、8、16、24、32 および 48 時間においてそれぞれ媒体対照から 68. 6 ± 5. 8 %、64 ± 6. 98 %、54. 7 ± 6. 13 %、43. 4 ± 6. 86 %、13. 7 ± 5. 53 %、24. 9 ± 6. 11 %、11. 7 ± 4. 88 % および 5. 6 ± 4. 17 % であった (平均値および S E M、n = マウス 10 ~ 35 匹、実験 3 回から)。

30

【0546】

3. F I X ポリペプチド凝血促進活性を評価する反応持続時間

F I X ポリペプチドの 0. 5 m g / k g での効果の持続時間を評価するための研究を F I X - / - マウスで実施した。尾部切断の 72 時間、48 時間、32 時間、24 時間、8 時間および 5 分前にまたは尾部切断の 72 時間、48 時間、および 1 時間前にマウスに i . v . 投与した。これらの実験において対照群を 0 % 抑制と設定して対照群からの抑制を決定した。失血の抑制は、% 抑制 (平均値および S E M) として表 30 に示す。

40

【0547】

表30. 失血の抑制

【表 30-1】

突然変異(キモトリプシンナ ンパリング)	n/群	N (expt)	各時点(時間)での抑制(媒体(0))の%+/-SEM						
			0.08	1	8	24	32	48	72
R150Y/R170E/R233E	24-3 0	2	85+/ -3.2		88.8+ /-2.8	59.5+ /-7.3	71.8+ /-7.0	40.2+ /-7.8	7.8+/- 5.2
R150Y/R170E/E240N	37-4 4	3	71.6+ /-3.9		85.0+ /-3.8	59.4+ /-6.8	55.3+ /-6.1	21.0+ /-6.2	27.7+/ -7.3
Y[155]F/R150Y/R170E/E240N	26-2 9	2		74.2+ /-6.5				56.8+ /-9.0	15.6+/ -8.2
R150Y/R233E/E240N	23-2 9	2	71.0+ /-3.7		71.4+ /-6.6	31.1+ /-6.1	15.8+ /-4.3	4.8+/ -5.4	-0.4+/ -2.9
R150Y/R170E/R233E/E240N	75-8 6	7	75.9+ /-2		82.7+ /-2.6	58+/ -4.8	63.6+ /-4.4	31.1+ /-4.9	3.5+/- 2.7
Y[155]F/R150Y/R170E/R233E / E240N	25-3 0	2		88.5+ /-1.7				22.2+ /-8.2	-17.6 +/-3.6
D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ R150Y/R170E/R233E/E240N	35-4 4	3	70.8+ /-3.0		85.5+ /-3.5	55.1+ /-5.4	48.3+ /-7.2	27.3+ /-5.7	12.1+/ -3.0

10

20

【表 30-2】

T175R	23-2 8	2	43.7+ /-6.3		30.9+ /-6.6	23.8+ /-3.8	12.3+ /-6.1	14.8+ /-7.1	3.4+/- 3.1
Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	36-4 3	3	65.2+ /-3.0		72.2+ /-4.5	59.2+ /-6.5	42.4+ /-8.3	41.2+ /-7.6	4.7+/- 5.6
K82N/N84S/R150Y/R170E/ R2 33E/E240N	37-4 1	3	78.7+ /-2.5		85.9+ /-2.6	52.5+ /-5.5	49.9+ /-6.8	31.4+ /-5.9	5.0+/- 4.2
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	57-6 5	5	79.1+ /-2.2		79.5+ /-2.7	66.7+ /-4.0	61.1+ /-4.8	38.2+ /-5.2	17.1+/ -4.0
D[104]N/K[106]S/Y[155]F/K 82N/N84S/R150Y/R170E/R233 E/ E240N	20-2 9	2	71.2+ /-4.5		74.2+ /-6.6	61.2+ /-7.2	48.7+ /-8.2	54.1+ /-7.7	12.3+/ -6.5

30

【表 30-3】

K82N/N84S/R150Y/R170E/ E2 40N	23-2 8	2		76.0+ /-6.6				26.2+ /-8.7	22.3+/ -7.1
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/E240N	26-3 0	2		77.7+ /-5.1				16.0+ /-7.3	-2.2+/ -4.3
R150Y/R170E/R233E/E240S	35-4 2	3	79.3+ /-1.9		75.6+ /-4.6	51.0+ /-5.4	48.3+ /-6.5	12.3+ /-5.3	-5.6+/ -2.4
K63N/K82N/N84S/R150Y/ R17 0E/R233E/E240N	32-3 8	3	72.6+ /-2.9		78.6+ /-3.7	44.2+ /-7	53.9+ /-7.1	42.9+ /-6.9	10.4+/ -5.4
D[104]N/K[106]S/K63N/K82N / N84S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	26-2 8	2	81.6+ /-3.5		86.0+ /-3.6	46.8+ /-8.0	59.7+ /-7.7	33.8+ /-8.3	26.2+/ -5.8
Y[155]F/K63N/K82N/N84S/ R 150Y/R170E/R233E/E240N	23-2 9	2	85.5+ /-2.2		75.6+ /-4.0	70.6+ /-6.5	58.4+ /-6.3	27.0+ /-7.7	14.1+/ -7.8

40

【表 3 0 - 4】

R150Y/R170E/R233E/E240N/ T242V	40-4 4	3	69.5+ /-3.2		85.5+ /-2.6	37.5+ /-5.1	42.8+ /-6.2	9.0+/ -6.6	-3.8+/ -3.4
R150Y/R170E/R233E/E240N/ T242A	29-3 8	3	81.3+ /-2.5		85.6+ /-3.3	45.2+ /-6.2	35.6+ /-6.3	29.3+ /-6.0	3.7+/- 3.1
K82N/N84S/N95S/R150Y/R170 E/R233E/E240N	20-2 8	2	46.4+ /-6.6		37.7+ /-7.5	4.0+/ -2.6	16.0+ /-4.7	0.08+ /-3.8	-6.1+/ -2.4
Y[155]F/K82N/N84S/N95S/ R 150Y/R170E/R233E/E240N	37-4 3	3	72.2+ /-4.4		69.1+ /-5.4	47.0+ /-6.1	44.3+ /-6.2	27.0+ /-6.4	8.1+/- 5.3
R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	32-3 8	3	80.3+ /-2.6		78.2+ /-3.8	68.3+ /-5.5	69.4+ /-6.0	23.2+ /-7.2	4.9+/- 5.8
Y[155]F/R150Y/R170E/T175R / R233E/E240N	21-2 7	2	84.8+ /-2.5		87.8+ /-2.8	76.6+ /-4.2	66.7+ /-6.6	56.8+ /-8.0	8.2+/- 8.0
D[104]N/K[106]S/R150Y/R17 0E/T175R/R233E/E240N	26-3 0	2	80.4+ /-2.8		81.5+ /-4.8	69.5+ /-7.6	60.4+ /-7.9	54.8+ /-6.7	12.8+/ -6.3

10

【表 3 0 - 5】

R150Y/R170E/T175R/N178Y/ R233E/E240N	35-4 3	3	76.6+ /-3.1		85.1+ /-3.3	43.9+ /-5.7	47.9+ /-6.8	14.9+ /-6.2	-12.1 +/-2.9
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E	24-3 0	2	76.2+ /-3.0		85.6+ /-4.7	49.6+ /-6.5	61.1+ /-7.4	46.0+ /-6.9	0.4+/- 4.9
K82N/N84S/R150Y/R170E/ R2 33E	27-2 9	2		70.0+ /-5.8				18.8+ /-6.3	2.1+/- 2.7
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ R233E/E240N	38-4 4	3	69.8+ /-4.7		78.4+ /-4.1	56.4+ /-5.9	58.4+ /-5.8	51.1+ /-6.6	26.9+/ -5.4
K82N/N84S/R170E/R233E/ E2 40N	28-3 0	2		63.9+ /-7.2				16.7+ /-6.3	-7.0+/ -2.0
R150Y/R170E/T175R/R233E	37-4 3	3	80.0+ /-2.1		83.5+ /-3.5	62.1+ /-5.6	62.6+ /-5.3	50.5+ /-5.9	1.9+/- 4.0
Y[155]F/R150Y/R170E/T175R / R233E	24-2 8	2	80.4+ /-3.0		90.7+ /-2.1	65.7+ /-6.6	67.2+ /-7.3	52.2+ /-8.2	41.1+/ -8.3

20

30

【表 3 0 - 6】

R150Y/R170E/T175R/E240N	35-4 4	3	65.5+ /-4.7		74.1+ /-5.3	55.8+ /-5.6	53.1+ /-6.8	46.4+ /-6.7	34.9+/ -6.0
R150Y/T175R/R233E/E240N	29-3 0	2	74.1+ /-3.6		77.7+ /-3.9	55.3+ /-7.5	39.4+ /-8.1	24.5+ /-7.6	6.8+/- 4.8
Y[155]F/R150Y/T175R/R233E / E240N	25-2 9	2		92.7+ /-2.1				29.3+ /-6.1	7.7+/- 3.2
R170E/T175R/R233E/E240N	26-3 0	2	67+/ -5.3		87.4+ /-4.2	55.9+ /-8.7	47.2+ /-8.6	33.0+ /-8.4	9.2+/- 5.3
Y[155]F/R170E/T175R/R233E / E240N	34-4 3	3	77.8+ /-4.2		90.8+ /-2.8	68.6+ /-5.2	61.3+ /-5.8	35.6+ /-8.3	5.9+/- 5.0
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/E240N	39-4 3	3	76.0+ /-3.0		80.4+ /-3.3	72.7+ /-3.8	64.2+ /-5.4	51.4+ /-5.7	33.1+/ -7.3

10

【表 3 0 - 7】

K82N/N84S/R150Y/R170E/ T1 75R/R233E/E240N	42-4 4	3	83.0+ /-2.4		81.0+ /-2.4	73.8+ /-5.2	57.1+ /-5.7	48.5+ /-6.1	16.9+/ -6.8
K63N/I86S/R150Y/R170E/R23 3E/E240N	21-2 6	2	71.9+ /-3.6		85.8+ /-4.0	71.3+ /-6.8	54.8+ /-7.3	40.3+ /-10. 3	23.1+/ -10.4
Y[155]F/K63N/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	26-2 9	2	82.1+ /-2.7		83.6+ /-3.7	65.6+ /-5.5	57.2+ /-7.9	38.4+ /-8.9	16.5+/ -7.7
N95S/R150Y/R170E/T175R/ R 233E/E240N	24-2 9	2	75.5+ /-4.5		76.6+ /-4.3	82.2+ /-5.8	84.7+ /-3.9	41.6+ /-8.6	20.1+/ -6.0
Y[155]F/N95S/R150Y/R170E/ T175R/R233E/E240N	21-2 7	2	85.2+ /-2.5		89.7+ /-3.6	46.5+ /-7.0	63.3+ /-8.0	41.6+ /-8.8	9.1+/- 6.5
K63N/K82N/N84S/R150Y/ R17 0E/T175R/R233E/E240N	34-4 5	3	83.9+ /-1.8		79.8+ /-3.6	75.2+ /-4.9	80.9+ /-3.0	73.0+ /-4.4	43.8+/ -6.6
Y[155]F/K63N/K82N/N84S/ R 150Y/R170E/T175R/R233E/ E 240N	24-2 6	2		84.6+ /-3.4				70.6+ /-7.5	50.9 +/-8.6
Y[155]F/R170E/T175R/R233E	22-3 0	2	81.9+ /-3.6		79.2+ /-6.2	55.0+ /-8.0	44.4+ /-9.9	26.8+ /-6.8	-6.5+/ -2.7

20

30

【表 3 0 - 8】

R170E/T175R/R233E	23-2 8	2	60.6+ /-6.4		86.5+ /-4.3	35.6+ /-8.3	35.8+ /-8.5	18.9+ /-6.8	12.1+/ -6.0
Y[155]F/R170E/T175R/R233E / E240S	24-2 7	2	71.2+ /-4.5		77.8+ /-5.3	54.6+ /-8.2	58.3+ /-8.1	21.9+ /-7.1	-11.0 +/-3.4
Y[155]F/N95S/R170E/T175R/ R233E	25-2 9	2	58.2+ /-7.9		65.5+ /-8.3	48.2+ /-10. 0	29.3+ /-9.3	21.0+ /-6.7	-14.8 +/-5.3
Y[155]F/I86S/R170E/T175R/ R233E	23-3 0	2	84.1+ /-5.1		90.9+ /-2.7	76.6+ /-6.4	62.4+ /-6.7	55.2+ /-7.9	23.7+/ -6.5
R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240S	27-4 3	3	80.2+ /-2.5		87.1+ /-3.2	76.9+ /-4.0	67.9+ /-5.6	48.3+ /-5.5	21.0+/ -5.0

40

【表 3 0 - 9】

Y[155]F/K82N/N84S/T175R/ R233E	12-2 9	2	70.5+ /-6.9	84.2+ /-5.4	53.2+ /-12. 3	39.5+ /-11. 1	18.0+ /-7.3	17.0+ /-5.4	-7.4+/ -3.1
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E	36-4 1	3	79.6+ /-3.2		90.5+ /-2.4	73.8+ /-4.6	75.0+ /-5.0	74.4+ /-4.7	27.5+/ -6.5
K82N/N84S/R150Y/R170E/ T1 75R/R233E	22-2 8	2	84.3+ /-3.1		91.8+ /-1.4	60.1+ /-6.7	54.0+ /-8.1	43.6+ /-8.8	35.7+/ -8.7
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ T175R/R233E/E240N	25-3 0	2		91.1+ /-1.8				22.7+ /-6.6	12.8+/ -6.2
K82N/N84S/R170E/T175R/ R2 33E/E240N	25-2 8	2		82.7+ /-4.5				67.1+ /-7.7	21.6+/ -8.0
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y / R170E	20-2 9	2		83.3+ /-3.9				47.8+ /-7.0	19.4+/ -6.2
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ T175R	24-2 8	2		43.6+ /-6.5				4.9+/ -4.6	7.2+/- 1.9

10

【表 3 0 - 1 0】

Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ R233E	15-3 0	2	47.2+ /-8.0	64.7+ /-9.7	90.8+ /-4.5	78.4+ /-7.5	49.2+ /-11. 5	19.7+ /-7.9	-5.8+/ -4.2
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ T175R	25-2 7	2		70.5+ /-7.0				34.0+ /-7.4	27.9+/ -6.4
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/E240N	28-3 0	2		73.7+ /-6.7				30.1+ /-8.4	43.1+/ -7.9
K82N/N84S/R150Y/R170E/ T1 75R/E240N	25-2 9	2		77.2+ /-6.0				29.5+ /-7.2	29.0+/ -5.5
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ T175R/R233E/E240N	26-2 8	2		87.6+ /-2.4				42.6+ /-8.6	14.5+/ -6.4
K82N/N84S/R150Y/T175R/ R2 33E/E240N	28-3 0	2		91.3+ /-2.6				52.4+ /-7.7	6.6+/- 4.5

20

30

【表 3 0 - 1 1】

Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ E240N	25-3 0	2		74.6+ /-6.4				30.1+ /-7.1	12.4+/ -6.3
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ T175R/R233E	27-3 0	2		85.2+ /-4.4				31.1+ /-7.8	-7.9+/ -2.6
K82N/N84S/R150Y/T175R/ E2 40N	25-3 0	2		51.9+ /-8.2				9.4+/ -4.9	3.2+/- 4.5
Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ T175R/R233E	27-2 9	2		84.6+ /-5.0				26.8+ /-8.5	10.9+/ -6.9
K82N/N84S/R170E/T175R/ R2 33E	27-2 9	2		73.0+ /-6.6				27.3+ /-7.7	23.4+/ -5.6
K82N/N84S/R170E/T175R/ E2 40N	24-2 9	2		59.1+ /-8.0				29.6+ /-7.4	12.2+/ -5.2
Y[155]F/K82N/N84S/T175R/ R233E/E240N	28-3 0	2		86.5+ /-3.9				34.6+ /-8.1	-2.3+/ -4.0

10

【表 3 0 - 1 2】

K82N/N84S/T175R/R233E/ E2 40N	25-2 9	2		59.2+ /-8.2				1.0+/ -4.0	-7.3+/ -2.8
Y[155]F/T175R/R233E/E240N	24-2 8	2		78.7+ /-4.9				-5.7+ /-2.8	-4.2+/ -3.7
Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R	28-3 0	2		82.3+ /-5.4				64.6+ /-7.4	41.4+/ -7.7
K82N/N84S/R150Y/R170E/ T1 75R	37-4 3	3		79.3+ /-4.2				47.7+ /-5.3	20.9+/ -5.5
R170E/T175R/E240N	37-4 1	3		66.6+ /-5.9				31.5+ /-6	10.4+/ -3.6
R150Y/T175R/E240N	24-2 8	2		83.5+ /-5.1				36.7+ /-8.9	20.0+/ -6.7
K63N/R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	23-2 9	2		84.5+ /-3.1				66.3+ /-7.8	41.2+/ -8.5
K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E	22-2 8	2		81.9+ /-4.1				62.2+ /-8.2	28.6+/ -8.0

20

30

【実施例 8】

【0 5 4 8】

F I X a のその補因子第 V I I I a 因子への機能性補因子結合 ($K_{D-a p p}$) の決定
 基質第 X 因子 (F X) の存在下またはその飽和での補因子第 V I I I a 因子 (F V I I I a) に対する F I X a 変異体の機能性補因子結合 ($K_{D-a p p}$) を、F I X a による活性化で生じる F X a の合成基質 S p e c t r a f l u o r F X a 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 I I I a) が活性化プロテアーゼ (F I X a) の濃度より少なくとも 1 0 0 0 倍過剰である F V I I I 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。実験は、基質 F X の飽和レベルで触媒活性を評価する前に、テナーゼ (X a s e) 複合体を形成するリン脂質小胞の存在下で F I X a と補因子 (F V I I I 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、第 X 因子に対する F I X a の触媒活性の決定) に記

40

50

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 I X a をカルシウム含有緩衝液中でリン脂質小胞とインキュベートし、別に組換え F V I I I をアルファートロンビンで活性化する (F V I I I a に)。次いでアッセイ開始前に、アルファートロンビンの活性を高度に特異的なトロンビン阻害物質、ヒルジンの添加によってクエンチした。次いで F I X a 変異体を X a s e 複合体を形成するように様々な濃度の F V I I I a と混合し、次にアッセイを開始するために飽和濃度の F X および蛍光基質 S p e c t r a f l u o r F X a (C H ₃ S O ₂ - D - C H A - G l y - A r g - A M C) と混合した。F X a による S p e c t r a f l u o r F X a 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) の放出を次いで連続的経時的に評価し、F I X a 変異体の動力学的速度定数を決定した。

10

【0549】

A. アッセイプロトコール

種々の F V I I I a 濃度およびリン脂質の存在下で F I X a による F X 活性化の動力学的速度を評価するアッセイのために、最初に組換え F V I I I (K o g e n a t e F S (登録商標); Bayer health care) を添付の希釈剤 1 m L 中に再懸濁した。次いで F V I I I のモル濃度を吸光係数 $1.567 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ および分子量 163.6 k D a を用いて 280 nm での吸光度によって決定した。F I X 変異体を上の実施例 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。次いで F I X a 変異体を 1×緩衝液 A (20 mM H e p e s / 150 mM N a C l / 5 mM C a C l ₂ / 0.1% B S A / 0.1% P E G - 8000、p H 7.4) 1 m L 容量中に 8 p M (4×) の濃度に系列希釈した。リン脂質の存在下での F V I I I の F V I I I a への活性化のための調製物において、アルファートロンビン (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.) およびヒルジン (A m e r i c a n D i a g n o s t i c a) を製造者の保存濃度から 1:100 に 1×緩衝液 A 中へそれぞれ希釈した。再構成した F V I I I を、400 μ M の新鮮再懸濁リン脂質 [75% ホスファチジルコリン (P C) / 25% ホスファチジルセリン (P S); P S / P C 小胞直径約 120 nm; 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 1.6 m L 容量中に濃度 1600 n M (最高用量の 4×) へさらに希釈した。上の F V I I I / P C / P S 溶液を最終濃度 15 n M のアルファートロンビン溶液と混合し、続く 15 分間、25 °C でのインキュベーションによって F V I I I を F V I I I a に活性化した。次に、400 μ M P C / P S 小胞を含有する 1×緩衝液 A 中への活性化 F V I I I a 最終用量 0.5 m L の 12 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 1.5 倍系列希釈を開始する前に活性化反応を最終濃度 150 n M へのヒルジンの 5 分間、25 °C での添加によってクエンチした。F V I I I a (×4) の最終濃度は、12 点アッセイについて 1600 n M、1066.7 n M、711.1 n M、474.1 n M、316.1 n M、210.7 n M、140.5 n M、93.6 n M、62.43 n M、41.6 n M、27.8 n M および 0 n M であり、代替的な 2 倍希釈系列での 8 点アッセイについて; 1600 n M、600 n M、400 n M、200 n M、100 n M、50 n M、25 n M および 0 n M であった。F V I I I a の希釈系列を、次に 4×F I X a 希釈物 (各 12.5 μ L) と 1:1 で 96 ウェルハーフエリア黒色アッセイプレートにおいて、予め定義したプレートマップ (F I X a 変異体 4 種 / プレート) に従って混合し、種々の濃度の F V I I I a と X a s e 複合体を形成するように 15 分間、25 °C で予めインキュベートした。最終 2×溶液 (25 μ L) は次のとおり: 4 p M F I X a 変異体、1600~0 n M F V I I I a、200 μ M P C / P S 小胞、7.5 n M アルファートロンビン (阻害剤) および 75 n M ヒルジン。

20

30

40

【0550】

活性部位滴定し、D F P / E G R - c m k 処理した F X (上の実施例 2 を参照されたい) の 1000 n M (×2) の溶液を 1.0 mM S p e c t r a f l u o r X a 基質を含有する 1×緩衝液 A 20 m L 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 16 に報告した K_M 値より少なくとも 5~20 倍高い F X の 2

50

×飽和濃度を示した。典型的にはアッセイ反応は、FX/Spectrafluor Xa希釈物25μLを、各FIXa変異体およびFVIIa希釈物(Xase複合体)25μL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、次のとおりであった：2pM FIXa、400~0nM FVIIa、100μM PC/PS小胞、0.5mM Spectrafluor Xa、3.8nMアルファートロンビン(阻害剤)、38nMヒルジンおよび500nMのFX。反応を、SpectraMax fluorescence plate readerにおいて30分間、37℃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。

【0551】

B. データ分析

FIXa変異体のFVIIa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4Bにおいて記載のとおりであった。Aベーステンプレートを、各FVIIaX濃度で検査したFIXa変異体の放物型反応速度(μM/秒²)を方程式(1)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。

【0552】

方程式(1)

【数8】

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

【0553】

表31は、アッセイしたFIXa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。同様にアッセイしたのは組換え野生型FIXa(Catalyst Biosciences WTと称する；上の実施例1に記載のとおり生成した)、血漿精製FIXa(Haematologic Technologies, Inc.)およびBeneFIX(登録商標)[Coagulation Factor IX(Recombinant)、Wyeth]であった。表XXは、親和性に関する動力学的定数K_{D-app}(nM)として、およFIXa変異体と比較した野生型FIXaの機能的親和性の比として(各FIXa変異体の機能的親和性は、基質FX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。FIXa変異体の活性を野生型FIXa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(複数可)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FIXa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FIXa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FIXaポリペプチドは、配列番号1において記載されるFIX遺伝子のクローニングから生成され、CHOX細胞から配列番号3において記載され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において記載される組換え野生型FIXa(すなわちCatalyst Biosciences WT FIX polypeptide)であった。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。

【 0 5 5 4 】

いくつかの変異体は、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、FIXa-R318Y/R338EおよびFIXa-R318Y/R338E/R403E/E410N）、いくつかの変異体は、 K_{D-app} における6～10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。突然変異R338E、T343RおよびE410Nの組合せを有する変異体は、機能的親和性において最も大きな改善を示した。たとえば、FIXa-R338E/T343R、FIXa-R318Y/R338E/T343R/E410N、FIXa-R318Y/R338E/E410N、FIXa-Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、FIXa-R338E/E410NおよびFIXa-K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410Nはこの群に含まれる。

10

【 0 5 5 5 】

表31. FIXa変異体の機能的補因子親和性 (K_{D-app})

【 表 3 1 - 1 】

突然変異 (成熟FIX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
BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX(T[148]A)	90.2	13.5	15%	1.1	4
血漿精製FIXa	血漿精製FIXa	101.6	5.8	6%	0.9	3
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	95.5	4.6	5%	1.0	2
T148A	T[148]A	79.7	27.1	34%	1.2	2
D104N/K106S/I251S	D[104]N/K[106]S/I86S	305.5	119.5	39%	0.3	2
A262S	A95bS	94.1	18.3	19%	1.0	2
E410N	E240N	74.2	0.6	1%	1.3	2
E239N	E74N	77.3	40.6	53%	1.2	2
T241N/H243S	T76N/H78S	75.5	26.2	35%	1.3	2
S319N/L321S	S151N/L153S	52.4	0.7	1%	1.8	2
R318E	R150E	67.0	5.2	8%	1.4	2

20

【 表 3 1 - 2 】

R318Y	R150Y	192.0	55.2	29%	0.5	2
R312Q	R143Q	45.2	5.6	12%	2.1	2
R312A	R143A	52.9	5.9	11%	1.8	2
R312Y	R143Y	85.2	36.5	43%	1.1	2
R312L	R143L	68.9	15.6	23%	1.4	2
V202Y	V38Y	61.5	3.5	6%	1.6	2
D203Y	D39Y	77.4	11.8	15%	1.2	2
A204M	A40M	60.6	9.0	15%	1.6	2
K400A/R403A	K230A/R233A	129.5	13.4	10%	0.7	2
K400E/R403E	K230E/R233E	298.0	58.0	19%	0.3	2
R403E	R233E	654.0	131.6	20%	0.1	3
K400A	K230A	98.9	7.2	7%	1.0	2
K293A	K126A	86.6	4.0	5%	1.1	2
R338E	R170E	43.0	7.2	17%	2.2	2

30

40

【表 3 1 - 3】

R338E/R403E	R170E/R233E	183.0	42.4	23%	0.5	2
R338E/E410N	R170E/E240N	4.1	1.4	33%	23.5	3
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	54.9	3.0	6%	1.7	2
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	340.0	244.7	72%	0.3	2
R403E/E410N	R233E/E240N	910.5	197.3	22%	0.1	2
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	7.7	4.6	60%	12.4	17
D104N/K106S/R318Y/R338E/ E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	12.4	n.d.	n.d.	7.7	1
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	47.0	12.4	26%	2.0	12
D104N/K106S/Y155F/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/Y[155]F / R150Y/R170E/R233E/E240N	61.6	n.d.	n.d.	1.6	1
K316N	K148N	66.4	8.3	13%	1.4	2
H257E	H92E	81.3	2.5	3%	1.2	2
E410S	E240S	99.6	2.0	2%	1.0	2
N346D	N178D	126.5	3.5	3%	0.8	2
N346Y	N178Y	65.7	n.d.	n.d.	1.5	1
Y345A	Y177A	29.6	2.3	8%	3.2	2
T343R	T175R	58.4	16.2	28%	1.6	3
T343R/Y345T	T175R/Y177T	68.1	n.d.	n.d.	1.4	1
R318Y/R338E	R150Y/R170E	28.9	n.d.	n.d.	3.3	1
Y259F/K265T/Y345T	Y94F/K98T/Y177T	115.2	n.d.	n.d.	0.8	1

10

20

【表 3 1 - 4】

K228N/I251S	K63N/I86S	89.7	1.3	1%	1.1	2
Y155F/K228N/R318Y/R338E/ R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/ R233E/E240N	31.2	4.8	15%	3.1	2
I251S/R318Y/R338E/R403E/ E410N	I86S/R150Y/R170E/R233E / E240N	62.7	0.6	1%	1.5	2
D104N/K106S/I251S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	54.7	19.9	36%	1.7	5
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/E240N	5.7	1.1	20%	16.7	3
D104N/K106S/I251S/R318Y/ R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/ R170E/E240N	12.4	1.1	9%	7.7	2
K247N/N249S/R318Y/R338E/ R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/R170E / R233E/E240N	68.6	17.3	25%	1.4	3
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	45.8	4.6	10%	2.1	7

30

40

【表 3 1 - 5】

A103N/N105S/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	93.1	8.4	9%	1.0	2
D104N/K106S/K247N/N249S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233E/E240N	87.4	10.3	12%	1.1	2
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R338E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/E240N	7.4	n.d.	n.d.	12.8	1
R318Y/R338E/R403E/E410S	R150Y/R170E/R233E/E240S	53.1	10.4	20%	1.8	3
R318Y/R338E/E410S	R150Y/R170E/E240S	6.8	0.2	3%	14.1	3

10

【表 3 1 - 6】

K228N/K247N/N249S	K63N/K82N/N84S	113.0	0.0	0%	0.8	2
K228N/K247N/N249S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	100.5	n.d.	n.d.	0.9	1
R318Y/R338E/R403E/E410N/ T412V	R150Y/R170E/R233E/E240N/ T242V	55.0	n.d.	n.d.	1.7	1
R318Y/R338E/E410N/T412V	R150Y/R170E/E240N/T242V	8.9	n.d.	n.d.	10.7	1
R318Y/R338E/N346D/R403E/ E410N	R150Y/R170E/N178D/R233E/ E240N	109.7	44.3	40%	0.9	2

20

【表 3 1 - 7】

K247N/N249S/N260S	K82N/N84S/N95S	147.0	60.8	41%	0.6	2
Y155F/K247N/N249S/N260S	Y[155]F/K82N/N84S/N95S	167.0	97.7	58%	0.6	2
D104N/K106S/K247N/N249S/ N260S	D[104]N/K[106]S/K82N/N84S/ N95S	330.0	319.6	97%	0.3	2
D104N/K106S/Y155F/K247N/ N249S/N260S	D[104]N/K[106]S/Y[155]F/ K82N/N84S/N95S	142.0	73.5	52%	0.7	2
K247N/N249S/N260S/R318Y/ R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/N95S/R150Y/ R170E/R233E/E240N	65.0	10.8	17%	1.5	2
R318Y/R338E/T343R/R403E/ E410N	R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240N	14.5	4.0	28%	6.6	7

30

40

【表 3 1 - 8】

R338E/T343R	R170E/T175R	3.4	0.6	18%	28.0	2
T343R/N346Y	T175R/N178Y	38.6	n.d.	n.d.	2.5	1
R318Y/R338E/N346Y/R403E/ E410N	R150Y/R170E/N178Y/R233E/ E240N	39.6	n.d.	n.d.	2.4	1
R318Y/R338E/T343R/N346Y/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178Y/ R233E/E240N	15.6	0.1	1%	6.1	2
T343R/N346D	T175R/N178D	78.4	n.d.	n.d.	1.2	1
R318Y/R338E/T343R/N346D/ R403E/E410N	R150Y/R170E/T175R/N178D/ R233E/E240N	76.2	n.d.	n.d.	1.3	1
R318Y/R338E/T343R/E410N	R150Y/R170E/T175R/E240N	6.1	n.d.	n.d.	15.7	1

10

【表 3 1 - 9】

Y155F/R318Y/R338E/T343R/ E410N	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R/ E240N	7.4	n.d.	n.d.	12.8	1
R318Y/T343R/R403E/E410N	R150Y/T175R/R233E/E240N	84.1	17.8	21%	1.1	2
R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/E240N	29.4	n.d.	n.d.	3.2	1
Y155F/R338E/T343R/R403E/ E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/ E240N	28.5	n.d.	n.d.	3.3	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/ E240N	15.3	1.3	9%	6.3	3
K228N/K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/E240N	29.1	0.3	1%	3.3	2
Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	Y[155]F/K63N/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	37.0	5.7	16%	2.6	2
Y155F/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/R170E/T175R/R233E	72.1	n.d.	n.d.	1.3	1

20

30

【表 3 1 - 1 0】

R338E/T343R/R403E	R170E/T175R/R233E	55.0	n.d.	n.d.	1.7	1
R318Y/R338E/T343R/R403E/ E410S	R150Y/R170E/T175R/R233E/ E240S	23.2	n.d.	n.d.	4.1	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/ T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ T175R	15.4	n.d.	n.d.	6.2	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/E240N	13.9	n.d.	n.d.	6.9	1
Y155F/K247N/N249S/R338E/ E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R170E/ E240N	24.9	n.d.	n.d.	3.8	1
K247N/N249S/R338E/T343R/ E410N	K82N/N84S/R170E/T175R / E240N	14.0	n.d.	n.d.	6.8	1
Y155F/R318Y/R338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R170E/T175R	8.4	n.d.	n.d.	11.3	1

10

【表 3 1 - 1 1】

R318Y/R338E/T343R	R150Y/R170E/T175R	9.8	n.d.	n.d.	9.7	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R	14.0	n.d.	n.d.	6.8	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/ T343R	K82N/N84S/R150Y/R170E / T175R	14.7	n.d.	n.d.	6.5	1
Y155F/R338E/T343R/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/E240N	8.5	n.d.	n.d.	11.2	1
R338E/T343R/E410N	R170E/T175R/E240N	7.5	n.d.	n.d.	12.8	1
Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	38.0	n.d.	n.d.	2.5	1
K228N/R150Y/R338E/T343R/ R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240N	17.5	n.d.	n.d.	5.4	1
K228N/247N/N249S/R318Y/ R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/E240N	7.8	n.d.	n.d.	12.2	1

20

30

【実施例 9】

【0 5 5 6】

血友病 B 血漿中の F I X 変異体の凝固活性の決定

F I X 変異体についての凝固活性を、製造者の説明書に従って、1 %未満凝固活性を有する単一のドナー由来のヒト血友病 B 血漿 (George King Bio-Medical, Inc.、Overland Park、Kansas) における活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T) アッセイによって決定した。簡潔には、a P T T アッセイには、精製リン脂質 (血小板代替物) ならびに活性化因子 [カオリンおよびスルファチド (sulphatide)] の混合物の存在下での血漿のカルシウム再加が関与する。最終濃度 1 0 0 nM、1 0 nM または 1 nM で F I X 変異体を血友病 B 血漿に添加した F I X 変異体と共に D a p t t i n (登録商標) T C a P T T r e a g e n t (Technoclone GmbH、Vienna、Austria) を本質的に製造者の製品挿入物に記載のとおり用いて a P T T アッセイを実施した。簡潔には、F I X 変異体を活性部位滴定した酵素前駆体濃度 (実施例 2) に基づいて 1 × 緩衝液 A (2 0 m M H e p e s / 1 5 0 m M N a C l / 0 . 5 % B S A、p H 7 . 4) 中に 1 μ M へ希釈した。次に F I X 変異体をクエン酸処理ヒト血友病 B 血漿 (George King Bio-

40

50

Medical) 中へ 100 nM、10 nM および 1 nM に直接系列希釈した。血漿中の各 FIX 希釈物の 100 μ L 容量を Dapptin (登録商標) TC aPTT reagent 100 μ L と混合し、37 $^{\circ}$ C、180 秒間インキュベートした。血液凝固を 25 mM カルシウム (Diagnostica Stago、Asnieres、France) 100 μ L の添加によって開始した。秒数での血液凝固時間を STArt 4 instrument (Diagnostica Stago、Asnieres、France) を用いて測定した。各実験は、典型的には 5 % CV 未満を示す 2 種の独立した凝固時間測定値の平均を示す。

【0557】

表 32 は、アッセイした各 FIX 変異体についての凝固活性を記載する。同様にアッセイしたのは組換え野生型 FIXa (Catalyst Biosciences WT と称する；上の実施例 1 に記載のとおり生成した) および BeneFIX (登録商標) [Coagulation Factor IX (Recombinant)、Wyeth] であった。表 XX は、検査した 3 種の FIX 濃度；100 nM、10 nM および 1 nM [各 FIX 濃度はプールされた正常血漿 (PNP) における FIX の正常濃度の約 100 %、約 10 % および約 1 % を表す] それぞれにおいて凝固するまでの時間として表す結果を示す。同一のアッセイ条件下で、100 % PNP は、 31.3 ± 2.0 秒の凝固時間を示し、血友病 B 血漿中の PNP の 10 % および 1 % 希釈物についての凝固時間は、それぞれ 42.7 ± 1.7 および 55.0 ± 4.7 秒である ($n = 4$)。これらの分析において用いられた血友病 B 血漿について凝固までの時間は、 83.2 ± 9.2 秒と評価された ($n = 5$)。検査した変異体の多くは、野生型 FIXa と比較して類似のまたはわずかに延長した凝固時間を実証し、ここで比較のために用いられた野生型 FIXa ポリペプチドは、CHO 細胞から配列番号 3 において記載され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 において記載される組換え野生型 FIXa (すなわち Catalyst Biosciences WT FIX polypeptide) であった。一方いくつかの変異体は、顕著に短縮された凝固時間を示した。この群に含まれる変異体は、FIXa-R318Y/R338E/T343R、FIXa-R318Y/R338E/E410N、FIXa-R338E/T343R/E410N、FIXa-R318Y/R338E/T343R/E410N、FIXa-K247N/N249S/R338E/T343R/E410N および FIXa-K228N/247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N である。

【0558】

表 32. 血友病 B 血漿における FIX 変異体の凝固活性 (aPTT)

10

20

30

【表 3 2 - 1】

突然変異(成熟FIX Xナンバリング)	突然変異(キモトリ プシンナンバリング)	aPTT (100 n M) (s)	±S.D .	aPTT (10 n M) (s)	±S.D .	aPTT (1.0 nM) (s)	±S.D .	n
BeneFIX Benefix (登録商標) Coagulation FIX (T148A)	BeneFIX Benefix(登録商標) Coagulation FIX (T[148]A)	35.2	n.d.	47.4	n.d.	63.5	n.d.	1
Catalyst Biosciences WT	Catalyst Biosciences WT	35.5	n.d.	46.9	n.d.	60.6	n.d.	1
T148A	T[148]A	33.2	n.d.	43.1	n.d.	59.2	n.d.	1
R338E/R403E	R170E/R233E	34.3	n.d.	46.2	n.d.	58.8	n.d.	1
R338E/R403E/E410N	R170E/R233E/E240N	35.6	n.d.	46.6	n.d.	57.1	n.d.	1
Y155F/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/R233E/E240N	31.1	n.d.	41.2	n.d.	52.6	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E	R150Y/R170E/R233E	41.7	n.d.	52.7	n.d.	68.4	n.d.	1
Y155F/R318Y/R338E/R403E	Y[155]F/R150Y/R170E/R233E	38.6	n.d.	48.6	n.d.	64.1	n.d.	1
R318Y/R338E/E410N	R150Y/R170E/E240N	21.2	n.d.	24.8	n.d.	34.3	n.d.	1

【表 3 2 - 2】

D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/R150Y/R170E/E240N	24.5	n.d.	30.8	n.d.	40.0	n.d.	1
R318Y/R403E/E410N	R150Y/R233E/E240N	46.1	n.d.	61.7	n.d.	78.3	n.d.	1
Y155F/R318Y/R403E/E410N	Y[155]F/R150Y/R233E/E240N	42.3	n.d.	57.1	n.d.	74.5	n.d.	1
R318Y/R338E/R403E/E410N	R150Y/R170E/R233E/E240N	25.4	1.2	33.0	2.1	43.0	1.1	3

10

20

30

【表 3 2 - 3】

T343R	T175R	41.3	2.1	53.3	2.9	67.2	6.2	2
T343R/Y345T	T175R/Y177T	46.8	2.8	56.3	9.6	75.5	1.8	2
R318Y/R338E	R150Y/R170E	26.7	n.d.	31.5	n.d.	45.3	n.d.	1
Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/R150Y/R170E/R233E/E240N	35.6	n.d.	45.1	n.d.	60.1	n.d.	1
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/R233E/ E240N	36.0	n.d.	46.8	n.d.	61.8	n.d.	1
I251S/R318Y/R338E/E410N	I86S/R150Y/R170E/ E240N	28.0	n.d.	30.1	n.d.	40.7	n.d.	1
D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N	D[104]N/K[106]S/I86S/R150Y/R170E/E240N	25.0	n.d.	31.0	n.d.	43.1	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/R233E/ E240N	33.7	n.d.	43.8	n.d.	58.4	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	34.1	n.d.	46.2	n.d.	62.4	n.d.	1
A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N	A[103]N/N[105]S/K82N/N84S/R150Y/R170E/ R233E/ E240N	36.1	n.d.	48.1	n.d.	62.6	n.d.	1

10

20

30

【表 3 2 - 4】

D104N/K106S/Y 155F/K247N/N2 49S/R318Y/R338 E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/ Y[155]F/K82N/N8 4S/R150Y/R170E/ R233E/E240N	34.8	n.d.	45.6	n.d.	59.3	n.d.	1
K247N/N249S/R 318Y/R338E/E4 10N	K82N/N84S/R150 Y/ R170E/E240N	26.1	n.d.	34.3	n.d.	44.7	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/R33 8E/E410N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/R170E /E240N	24.0	n.d.	29.2	n.d.	41.1	n.d.	1
R318Y/R338E/R 403E/E410S	R150Y/R170E/R23 3E/ E240S	26.9	n.d.	34.7	n.d.	47.0	n.d.	1
K228N/K247N/N 249S	K63N/K82N/N84S	44.4	n.d.	57.2	n.d.	70.2	n.d.	1
D104N/K106S/Y 155F/K228N/K2 47N/N249S	D[104]N/K[106]S/ Y[155]F/K63N/K8 2N/N84S	46.9	n.d.	60.0	n.d.	73.6	n.d.	1

【表 3 2 - 5】

K228N/K247N/N 249S/R318Y/R33 8E/R403E/E410 N	K63N/K82N/N84S / R150Y/R170E/R 233E/ E240N	35.3	5.1	46.1	8.0	60.6	8.9	2
D104N/K106S/K 228N/K247N/N2 49S/R318Y/R338 E/R403E/E410N	D[104]N/K[106]S/ K63N/K82N/N84S /R150Y/ R170E/R 233E/E240N	38.4	n.d.	50.1	n.d.	67.1	n.d.	1
Y155F/K228N/K 247N/N249S/R3 18Y/R338E/R40 3E/E410N	Y[155]F/K63N/K8 2N/ N84S/R150Y/ R170E/ R233E/E2 40N	34.9	n.d.	44.7	n.d.	59.1	n.d.	1
R318Y/R338E/R 403E/E410N/T4 12V	R150Y/R170E/R23 3E/ E240N/T242 V	28.7	n.d.	37.6	n.d.	47.6	n.d.	1
R318Y/R338E/R 403E/E410N/T4 12A	R150Y/R170E/R23 3E/ E240N/T242 A	30.5	n.d.	40.6	n.d.	52.8	n.d.	1
R318Y/R338E/E 410N/T412V	R150Y/R170E/E24 0N/ T242V	25.5	n.d.	30.7	n.d.	40.3	n.d.	1
R318Y/R338E/N 346D/R403E/E4 10N	R150Y/R170E/N17 8D/ R233E/E240 N	42.5	n.d.	54.2	n.d.	68.9	n.d.	1

【表 3 2 - 6】

Y155F/R318Y/R 338E/N346D/R4 03E/E410N	Y[155]F/R150Y/R 170E/N178D/R233 E/E240N	37.8	n.d.	48.9	n.d.	65.2	n.d.	1
K247N/N249S/N 260S/R318Y/R33 8E/R403E/E410 N	K82N/N84S/N95S / R150Y/R170E/R 233E/ E240N	44.7	n.d.	56.9	n.d.	75.7	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/N260S/R31 8Y/R338E/R403 E/E410N	Y[155]F/K82N/N8 4S/N95S/R150Y/R 170E/R233E/E240 N	49.3	n.d.	59.6	n.d.	75.5	n.d.	1
R318Y/R338E/T 343R/R403E/E4 10N	R150Y/R170E/T17 5R/R233E/E240N	23.7	2.7	29.7	3.3	39.7	6.5	4
Y155F/R318Y/R 338E/T343R/R4 03E/E410N	Y[155]F/R150Y/R 170E/T175R/R233 E/E240N	26.2	3.6	32.0	3.9	42.4	1.8	2
D104N/K106S/R 318Y/R338E/T3 43R/R403E/E41 0N	D[104]N/K[106]S/ R150Y/R170E/T17 5R/R233E/E240N	27.3	n.d.	34.9	n.d.	48.0	n.d.	1
R338E/T343R	R170E/T175R	27.9	n.d.	33.8	n.d.	45.1	n.d.	1
T343R/N346Y	T175R/N178Y	40.8	3.8	54.9	0.8	74.9	2.2	2

10

20

【表 3 2 - 7】

R318Y/R338E/N 346Y/R403E/E4 10N	R150Y/R170E/N17 8Y /R233E/E240N	28.8	n.d.	41.0	n.d.	54.4	n.d.	1
R318Y/R338E/T 343R/N346Y/R4 03E/E410N	R150Y/R170E/T17 5R/N178Y/R233E/ E240N	24.5	n.d.	32.5	n.d.	41.7	n.d.	1
T343R/N346D	T175R/N178D	39.9	1.4	51.3	4.8	65.0	4.1	2
R318Y/R338E/T 343R/N346D/R4 03E/E410N	R150Y/R170E/T17 5R/ N178D/R233 E/E240N	34.8	n.d.	45.1	n.d.	57.9	n.d.	1
R318Y/R338E/Y 345A/R403E/E4 10N	R150Y/R170E/Y17 7A/ R233E/E240N	41.2	n.d.	47.9	n.d.	61.9	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/R33 8E/R403E	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/R170E /R233E	40.2	n.d.	51.6	n.d.	62.2	n.d.	1
K247N/N249S/R 318Y/R338E/R4 03E	K82N/N84S/R150 Y/ R170E/R233E	42.0	n.d.	55.6	n.d.	70.3	n.d.	1
K247N/N249S/R 318Y/R403E/E4 10N	K82N/N84S/R150 Y/ R233E/E240N	44.6	3.0	57.2	4.2	71.5	6.1	3
Y155F/K247N/N 249S/R338E/R40 3E/E410N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R170E/R233E /E240N	31.0	n.d.	42.1	n.d.	55.6	n.d.	1

10

20

【表 3 2 - 8】

K247N/N249S/R 338E/R403E/E4 10N	K82N/N84S/R170 E/ R233E/E240N	32.7	n.d.	42.2	n.d.	56.2	n.d.	1
R318Y/R338E/T 343R/R403E	R150Y/R170E/T17 5R/ R233E	30.1	n.d.	37.9	n.d.	51.4	n.d.	1
Y155F/R318Y/R 338E/T343R/R4 03E	Y[155]F/R150Y/R 170E/T175R/R233 E	32.0	n.d.	41.5	n.d.	53.7	n.d.	1
R318Y/R338E/T 343R/E410N	R150Y/R170E/T17 5R/E240N	24.7	2.9	27.2	2.9	36.5	3.8	5
Y155F/R318Y/R 338E/T343R/E4 10N	Y[155]F/R150Y/R 170E/T175R/E240 N	25.9	2.1	28.8	3.5	38.5	4.2	2
R318Y/T343R/R 403E/E410N	R150Y/T175R/R23 3E/ E240N	31.7	n.d.	43.3	n.d.	60.7	n.d.	1
Y155F/R318Y/T 343R/R403E/E4 10N	Y[155]F/R150Y/T 175R/R233E/E240 N	40.3	n.d.	52.0	n.d.	68.7	n.d.	1

30

40

50

【表 3 2 - 9】

R338E/T343R/R403E/E410N	R170E/T175R/R233E/ E240N	25.5	n.d.	30.4	n.d.	41.9	n.d.	1
Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/R170E/T175R/R233E/E240N	27.5	n.d.	33.3	n.d.	42.3	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	24.2	0.9	29.7	1.4	40.5	2.4	5
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E/ E240N	28.7	n.d.	36.2	n.d.	50.2	n.d.	1
K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N	K63N/I86S/R150Y / R170E/R233E/E240N	34.5	n.d.	44.9	n.d.	58.2	n.d.	1
Y155F/K228N/I251S/ R318Y/R338E/R403E/E410N	Y[155]F/K63N/I86S/ R150Y/R170E/R233E/ E240N	34.5	n.d.	46.5	n.d.	60.3	n.d.	1
N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	N95S/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	31.4	n.d.	41.1	n.d.	55.4	n.d.	1

10

20

【表 3 2 - 1 0】

Y155F/N260S/R 318Y/R338E/T3 43R/R403E/E41 0N	Y[155]F/N95S/R1 50Y/ R170E/T175 R/R233E/ E240N	35.3	0.6	45.3	2.5	59.1	3.2	2
K228N/K247N/N 249S/R318Y/R33 8E/T343R/R403 E/E410N	K63N/K82N/N84S /R150Y/R170E/T1 75R/R233E/E240N	28.0	2.0	35.5	3.9	47.7	6.0	8
Y155F/K228N/K 247N/N249S/R3 18Y/R338E/T34 3R/R403E/E410 N	Y[155]F/K63N/K8 2N/ N84S/R150Y/ R170E/ T175R/R2 33E/E240N	30.7	2.3	40.6	2.0	53.5	2.5	2
Y155F/R338E/T 343R/R403E	Y[155]F/R170E/T 175R/R233E	29.8	n.d.	37.9	n.d.	50.1	n.d.	1
R338E/T343R/R 403E	R170E/T175R/R23 3E	29.4	n.d.	37.0	n.d.	49.8	n.d.	1
Y155F/R338E/T 343R/R403E/E4 10S	Y[155]F/R170E/T 175R/R233E/E240 S	28.3	n.d.	33.3	n.d.	44.4	n.d.	1
Y155F/N260S/R 338E/T343R/R4 03E	Y[155]F/N95S/R1 70E/ T175R/R233 E	40.5	n.d.	52.9	n.d.	70.1	n.d.	1

10

20

【表 3 2 - 1 1】

Y155F/I251S/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/I86S/R170E/ T175R/R233E	31.9	n.d.	40.1	n.d.	54.5	n.d.	1
R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S	R150Y/R170E/T175R/ R233E/E240S	27.4	n.d.	34.0	n.d.	43.3	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/ T175R/R233E	43.2	n.d.	58.6	n.d.	74.2	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	Y[155]F/K82N/N84S/ R150Y/R170E/T175R/ R233E	32.5	n.d.	41.4	n.d.	55.4	n.d.	1
K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K82N/N84S/R150Y/ R170E/T175R/R233E	30.8	4.2	39.1	6.9	52.5	9.1	2
Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	Y[155]F/K82N/N84S/ R170E/T175R/R233E/ E240N	27.3	n.d.	34.9	n.d.	47.7	n.d.	1
K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N	K82N/N84S/R170E/ T175R/R233E/E240N	28.2	n.d.	35.1	n.d.	47.3	n.d.	1
Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E	Y[155]F/K82N/N84S/ R150Y/R170E	29.6	n.d.	37.4	n.d.	48.7	n.d.	1

10

20

30

【表 3 2 - 1 2】

Y155F/K247N/N 249S/R318Y/T3 43R	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/T175R	39.6	n.d.	49.7	n.d.	65.0	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/R40 3E	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/R233E	52.2	n.d.	67.9	n.d.	79.9	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/E41 0N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/E240N	32.9	n.d.	43.8	n.d.	55.8	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R338E/R40 3E	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R170E/R233E	39.2	n.d.	50.4	n.d.	62.6	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R338E/T34 3R	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R170E/T175R	27.4	n.d.	31.5	n.d.	41.8	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/R33 8E/T343R/E410 N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/R170E /T175R/ E240N	28.7	0.4	32.7	0.1	41.8	0.9	2

10

20

【表 3 2 - 1 3】

K247N/N249S/R 318Y/R338E/T3 43R/E410N	K82N/N84S/R150 Y/ R170E/T175R/ E240N	28.0	0.8	32.7	0.8	42.4	0.3	2
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/T3 43R/R403E/E41 0N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/T175R /R233E/ E240N	38.9	n.d.	50.4	n.d.	65.5	n.d.	1
K247N/N249S/R 318Y/T343R/R4 03E/E410N	K82N/N84S/R150 Y/ T175R/R233E/ E240N	35.9	4.2	46.6	6.0	60.9	7.8	2
Y155F/K247N/N 249S/R338E/E41 0N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R170E/E240N	27.1	1.9	31.8	2.0	41.2	0.8	2
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/T3 43R/R403E	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/T175R /R233E	44.3	n.d.	60.7	n.d.	75.5	n.d.	1
K247N/N249S/R 318Y/T343R/R4 03E	K82N/N84S/R150 Y/ T175R/R233E	45.3	n.d.	57.5	n.d.	75.7	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/T3 43R/E410N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/T175R /E240N	44.9	0.1	52.5	3.7	64.9	0.5	2
K247N/N249S/R 318Y/T343R/E4 10N	K82N/N84S/R150 Y/ T175R/E240N	42.7	n.d.	50.2	n.d.	64.6	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R338E/T34 3R/R403E	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R170E/T175R /R233E	31.1	n.d.	40.9	n.d.	56.2	n.d.	1
K247N/N249S/R 338E/T343R/R4 03E	K82N/N84S/R170 E/ T175R/R233E	32.0	n.d.	43.2	n.d.	56.1	n.d.	1

10

20

30

【表 3 2 - 1 4】

Y155F/K247N/N 249S/R338E/T34 3R/E410N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R170E/T175R /E240N	28.5	n.d.	32.2	n.d.	45.9	n.d.	1
K247N/N249S/R 338E/T343R/E4 10N	K82N/N84S/R170 E/ T175R/E240N	25.1	3.9	29.9	5.0	41.1	8.0	2
Y155F/K247N/N 249S/T343R/R40 3E/E410N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ T175R/R233E /E240N	36.7	n.d.	49.3	n.d.	65.4	n.d.	1
Y155F/R318Y/R 338E/T343R	Y[155]F/R150Y/R 170E/T175R	27.4	1.0	31.4	1.7	40.7	0.4	2
R318Y/R338E/T 343R	R150Y/R170E/T17 5R	20.5	n.d.	24.3	n.d.	32.2	n.d.	1
Y155F/R318Y/T 343R/R403E	Y[155]F/R150Y/T 175R/R233E	43.4	n.d.	56.1	n.d.	71.3	n.d.	1

10

【表 3 2 - 1 5】

Y155F/T343R/R 403E/E410N	Y[155]F/T175R/R 233E/E240N	36.1	n.d.	47.5	n.d.	63.0	n.d.	1
Y155F/K247N/N 249S/R318Y/R33 8E/T343R	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R150Y/R170E /T175R	28.0	1.4	32.9	0.8	42.6	0.4	2
K247N/N249S/R 318Y/R338E/T3 43R	K82N/N84S/R150 Y/ R170E/T175R	27.4	1.2	32.7	0.2	42.4	3.1	2
Y155F/K247N/N 249S/T343R/E41 0N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ T175R/E240N	36.2	4.5	44.8	5.9	54.4	4.2	5
Y155F/K247N/N 249S/R403E/E41 0N	Y[155]F/K82N/N8 4S/ R233E/E240N	47.2	n.d.	60.7	n.d.	74.2	n.d.	1
Y155F/R338E/T 343R/E410N	Y[155]F/R170E/T 175R/E240N	24.9	4.4	27.5	4.4	34.9	4.4	4
R338E/T343R/E 410N	R170E/T175R/E24 0N	19.8	n.d.	23.9	n.d.	34.7	n.d.	1

20

30

【表 3 2 - 1 6】

Y155F/R318Y/T343R/E410N	Y[155]F/R150Y/T175R/E240N	41.3	5.7	49.5	6.0	63.4	6.0	2
R318Y/T343R/E410N	R150Y/T175R/E240N	34.5	n.d.	44.8	n.d.	61.0	n.d.	1
K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N	K63N/R150Y/R170E/T175R/R233E/E240N	23.4	n.d.	28.8	n.d.	38.9	n.d.	1
K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E	K63N/K82N/N84S / R150Y/R170E/T175R/ R233E	28.6	n.d.	37.3	n.d.	47.9	n.d.	1
K228N/247N/N249S/ R318Y/R338E/T343R/E410N	K63N/K82N/N84S /R150Y/R170E/T175R/E240N	21.4	n.d.	25.8	n.d.	34.3	n.d.	1
K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N	K63N/K82N/N84S / R150Y/T175R/R233E/ E240N	35.4	n.d.	44.0	n.d.	61.4	n.d.	1

10

20

【 0 5 5 9 】

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。

【图 1】

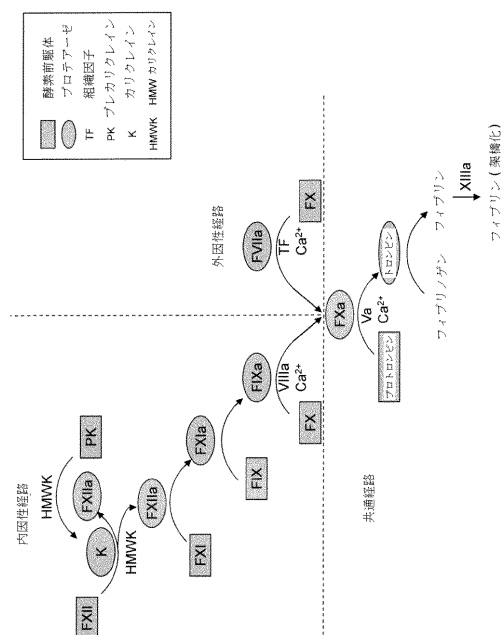


Figure 1. 血液凝固カスケード

【图 2】

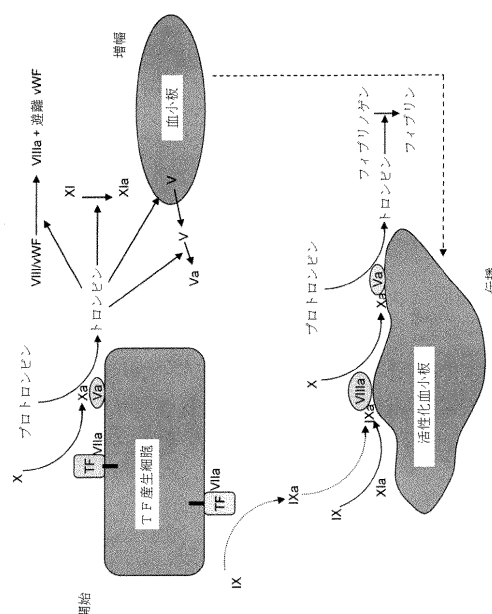


Figure 2. 細胞に基づいた血液凝固のモデル

【図 3-2】

Figure 3

Figure 3

【図 3 - 4】

Figure 3

【配列表】

2013545457000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年6月27日(2013.6.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸置換を含む修飾 F I X ポリペプチドであって、アミノ酸置換が、配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける 1 つまたは複数の R318Y、R318E、R318F、R318W、Y155F、Y155L、T343R、T343E、T343D、T343F、T343I、T343K、T343L、T343M、T343S、T343V、T343W および T343Y に対応する、または未修飾 F I 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の中から選択され、

対応するアミノ酸残基が、配列番号 3 のポリペプチドとの未修飾 F I X ポリペプチドのアライメントによって同定され、

修飾 F I X ポリペプチドが T343R を含むとき、該ポリペプチドは修飾 F342I/T343R/Y345T を含有せず、

修飾 F I X ポリペプチドは、修飾を含有しない未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、少なくとも 1 つの改善された F I X 活性または特性を示し、

該活性または特性は、1 つまたは複数の A T - I I I の阻害効果に対する抵抗性の増加、A T - I I I /ヘパリンの阻害効果に対する抵抗性の増加、ヘパリンの阻害効果に対する抵抗性の増加および凝血促進活性の増加の中から選択される、修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項2】

1 つまたは複数のアミノ酸置換 R318Y、Y155F、T343R のの中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項3】

R 3 1 8 または 3 1 8 に対応する残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項4】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y を含む、請求項 3 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項5】

R 3 3 8 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける 3 3 8 に対応する残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 3 または請求項 4 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項6】

アミノ酸置換 R 3 3 8 D もしくは R 3 3 8 E または未修飾 F I 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、請求項 3 ～ 5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項7】

アミノ酸置換 R 3 3 8 E を含む、請求項 3 ～ 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項8】

残基 R 3 1 8 および R 3 3 8 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 R 3 1 8 および R 3 3 8 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3 ～ 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項9】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E または未修飾 F I 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、請求項 3 ～ 8 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 0】

T 3 4 3 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 T 3 4 3 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項 3 または請求項 4 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 1】

アミノ酸置換 T 3 4 3 R、T 3 4 3 E、もしくは T 3 4 3 D または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 1 0 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 2】

アミノ酸置換 T 3 4 3 R を含む、請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 3】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R を含む、請求項 1 2 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 4】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / T 3 4 3 R または未修飾 F I 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、請求項 3 ～ 1 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 5】

N もしくは S である、残基 E 4 1 0 でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおけるアミノ酸残基 E 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 3 ～ 1 4 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 6】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / E 4 1 0 N または未修飾 F I 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、請求項 3 ～ 1 5 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 7】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y ならびに配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドの残基 3 3 8、3 4 3、4 0 3、および 4 1 0 の中から選択されるアミノ酸残基でのまたは未修飾 F I X ポリペプチドにおける残基 3 3 8、3 4 3、4 0 3、もしくは 4 1 0 に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 8】

配列番号 3 において記載される配列を有する成熟 F I X ポリペプチドにおける R 3 3 8 E、T 3 4 3 R、R 4 0 3 E、および E 4 1 0 N の中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1 ～ 1 7 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 1 9】

置換 R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E、Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、R318Y/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/R403E、R318Y/R338E/R403E、R318Y/R338E/E410N、K228N/R318Y/E410N、R318Y/R403E/E410N、D203N/F205T/R318Y/E410N、A103N/N105S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/R318Y/R338E/R

403E/E410N、I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/E410N、I251S/R318Y/E410N/R338E、D104N/K106S/I251S/R318Y/R338E/E410N、A103N/N105S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、A103N/N105S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/E410N、R318Y/R338E/R403E/E410S、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412V、R318Y/R338E/R403E/E410N/T412A、R318Y/R338E/R403E/T412A、R318Y/R338E/E410S、R318Y/R338E/T412A、R318Y/R338E/E410N/T412V、D85N/K228N/R318Y/R338E/R403E/E410N、N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/N346D/R403E/E410N、K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/N260S/R318Y/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、R318Y/R338E/N346Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/N346Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/N346D/R403E/E410N、R318Y/R338E/Y345A/R403E/E410N、K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/Y345A/N346D/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E、K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E、Y155F/R318Y/R338E/T343R/E410N、R318Y/T343R/R403E/E410N、Y155F/R318Y/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K228N/I251S/R318Y/R338E/R403E/E410N、N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/N260S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R403E、Y155F/K247N/N249S/R318Y/E410N、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N、K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E、K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N、K247N/N249S/R318Y/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R、Y155F/R318Y/T343R/R403E、Y155F/R318Y/T343R/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/T343R、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/T343R/R403E/E410NおよびY155F/R318Y/R403E/E410Nの中から選択されるアミノ酸置換または未修飾 F I 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、請求項 1～18 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 20】

アミノ酸置換 R318Y/R338E/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、R318Y/R338E/T343R/E410N、Y155F/R318Y/R338E/T343R/R403E、Y155F/K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、K228N/R318Y/R338E/T343R/R403E/E410N、K228N/K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R/R403E、R318Y/R338E/T343R/R403E/E410S、Y155F/K247N/N249S/R318Y/R338E、K247N/N249S/R318Y/R338E/T343R、R318Y/T343R/E410NまたはY155F/R318Y/R338E/R403Eを含む、請求項 1～19 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 21】

アミノ酸置換 R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N、R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / R 4 0 3 E / E 4 1 0 N または R 3 1 8 Y / R 3 3 8 E / T 3 4 3 R / E 4 1 0 N を含む、請求項 1～20 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 22】

FまたはLから選択される、アミノ酸位置Y155でのまたは155に対応する残基でのアミノ酸置換を含む、請求項1～21のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項23】

アミノ酸置換Y155Fまたは未修飾F I 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、請求項1～22のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項24】

Y155F/K228N、Y155F/I251S、D104N/K106S/Y155F/K228N、Y155F/N346D、Y155F/N260S、Y155F/N260S/N346D、D104N/K106S/Y155F/N260S、D104N/K106S/Y155F/K228N、A103N/N105S/Y155FおよびD104N/K106S/Y155Fの中から選択されるアミノ酸置換または未修飾F I 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、請求項1～23のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項25】

配列番号3において記載される配列を有する成熟F I Xポリペプチドの338、403、および410の中から選択される残基でのまたは未修飾F I Xポリペプチドにおける338、403、もしくは410に対応するアミノ酸残基でのアミノ酸置換をさらに含む、請求項22～24のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項26】

R338E、R403E、およびE410Nの中から選択されるアミノ酸置換または未修飾F I 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、請求項1～25のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項27】

Y155F/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/R338E/T343R/R403E、Y155F/R338E/T343R/R403E/E410S、Y155F/N260S/R338E/T343R/R403E、Y155F/T343R/R403E/E410N、Y155F/R338E/T343R/E410NおよびY155F/R338E/R403E/E410Nの中から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項1～26のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項28】

アミノ酸置換Y155Fならびに配列番号3において記載される配列を有する成熟F I Xポリペプチドのアミノ酸位置247および／または249でのアミノ酸置換を含む、請求項1～27のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項29】

アミノ酸置換Y155F／K247N／N249Sを含む、請求項1～28のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項30】

アミノ酸置換Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E/E410N、D104N/K106S/Y155F/K228N/K247N/N249S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、Y155F/K228N/K247N/N249S、Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S/N260S、D104N/K106S/Y155F/K247N/N249S、Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R338E/R403E、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R、Y155F/K247N/N249S/R338E/E410N、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/R403E、Y155F/K247N/N249S/R338E/T343R/E410N、Y155F/K247N/N249S/T343R/R403E/E410N、Y155F/K247N/N249S/T343R/E410NおよびY155F/K247N/N249S/R403E/E410Nまたは未修飾F I 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、請求項1～29のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項31】

未修飾F I Xポリペプチドが、配列番号2、3、20、または325のいずれかにおいて記載されるアミノ酸の配列、または配列番号2、3、20、または325のいずれかにおいて記載されるF I Xポリペプチドと少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有する配列、または前記F I Xポリペプチドのいずれかの活性断片である配列を含む、請求項1～30のいずれかに記載の修飾F I Xポリペプチド。

【請求項32】

未修飾 F I X ポリペプチドが、配列番号 2、3、20 または 325 において記載されるアミノ酸の配列を有する、請求項 1～31 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 33】

配列番号 76、84-87、90-91、95-97、100、102、104-105、113、121、122、125、126、129-134、138、146-173、175-176、178-185、188、193-194、196-198、200、202-206、208-210、212、215-272、326-41 および 413-417 のいずれかに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 76、84-87、90-91、95-97、100、102、104-105、113、121-122、125-126、129-134、138、146-173、175-176、178-185、188、193-194、196-198、200、202-206、208-210、212、215-272、326-41 および 413-417 のいずれかに記載されるアミノ酸の配列と少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% のアミノ酸配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、請求項 1～32 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 34】

ヒトポリペプチドである、請求項 1～32 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 35】

非ヒトポリペプチドである、請求項 1～32 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 36】

成熟ポリペプチドである、請求項 1～35 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 37】

二重鎖ポリペプチドである、請求項 1～36 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 38】

単鎖ポリペプチドである、請求項 1～36 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 39】

活性であるまたは活性化されている、請求項 1～38 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 40】

化学修飾および／または翻訳後修飾を含む、請求項 1～39 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 41】

修飾が、1つまたは複数のグリコシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、硫酸化、リン酸化、アルブミン化、およびポリエチレングリコール（PEG）部分へのコンジュゲートを含む、請求項 40 に記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 42】

最大 4、5、6、7、8、9、10、20 または 30 個のアミノ酸置換を含む、請求項 1～41 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 43】

未修飾 F I X ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のグリコシル化部位を導入および／または排除する、1つまたは複数の修飾を含む、請求項 1～42 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 44】

請求項 1～43 のいずれかに記載の修飾 F I 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 45】

請求項 44 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 46】

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 4 5 に記載のベクター。

【請求項 4 7】

哺乳動物ベクターである、請求項 4 5 または請求項 4 6 に記載のベクター。

【請求項 4 8】

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中から選択される、請求項 4 5 に記載のベクター。

【請求項 4 9】

請求項 4 5 ～ 4 8 のいずれかに記載のベクターを含む細胞。

【請求項 5 0】

真核細胞である、請求項 4 9 に記載の細胞。

【請求項 5 1】

真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 5 0 に記載の細胞。

【請求項 5 2】

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細胞の中から選択される、請求項 5 1 に記載の細胞。

【請求項 5 3】

薬学的に許容される媒体中に請求項 1 ～ 4 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 5 4】

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 5 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 5】

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、請求項 5 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

徐放性用に製剤されている、請求項 5 3 ～ 5 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

単一投薬量投与用に製剤されている、請求項 5 3 ～ 5 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5 8】

F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態の処置における使用のための請求項 1 ～ 4 3 のいずれかに記載の修飾 F I X ポリペプチドであって、処置されることとなる疾患または状態が、血液凝固障害、血液障害、出血性障害、血友病、および出血障害の中から選択される、修飾 F I X ポリペプチド。

【請求項 5 9】

F I X または凝血促進薬の投与によって処置される疾患または状態の処置のための薬剤の調製における請求項 5 3 ～ 5 7 のいずれかに記載の医薬組成物の使用であって、処置されることとなる疾患または状態が、血液凝固障害、血液障害、出血性障害、血友病、および出血障害の中から選択される、使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/059233

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/64 C12N15/55 A61K38/43
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/137254 A2 (BAYER HEALTHCARE LLC [US]; BAYER HEALTHCARE AG [DE]; BROOKS ALAN [US];) 12 November 2009 (2009-11-12) the whole document	1-50, 66-90, 94-148
X	WO 2007/149406 A2 (NAUTILUS TECHNOLOGY LLC [US]; OYHENART JORGE [AR]; GALLET XAVIER [FR];) 27 December 2007 (2007-12-27) the whole document	1-50, 66-90, 94-148
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 March 2012

Date of mailing of the international search report

26/03/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel: (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheffzyk, Irmgard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/059233

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. ROHLENA: "Residues Phe342-Asn346 of Activated Coagulation Factor IX Contribute to the Interaction with Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 11, 7 March 2003 (2003-03-07), pages 9394-9401, XP55021632, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M209097200 the whole document -----	1-50, 66-90, 94-148

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/059233**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-50, 66-90, 94-148

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2011/ 059233

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3-10, 13-17, 23(completely); 1, 2, 11, 12, 18-22, 24-50, 66-90, 94-148(partially)

modified FIX polypeptide comprising an amino acid replacement at amino acid residue R318 in SEQ.ID.No. 3

- 2-22. claims: 1, 2, 11, 12, 18-22, 24-50, 66-90, 94-148(all partially)

modified FIX polypeptide comprising a modification at a position corresponding to
S61,D64,Y155,N157,S158,N167,T169,T172,D203,A204,E239,H257,R312, K316, F342, T343, N346, K400, R403, E410 or T412 in
SEQ.ID.No. 3

23. claims: 51-65(completely); 66-90, 94-148(partially)

modified FIX polypeptide as defined in claims 51-74

24. claims: 91-93(completely); 94-148(partially)

modified FIX polypeptide as defined in claims 91-93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/059233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009137254 A2	12-11-2009	AU 2009244633 A1	12-11-2009
		CA 2721683 A1	12-11-2009
		CN 102083856 A	01-06-2011
		CO 6311000 A2	22-08-2011
		DO P2010000311 A	28-02-2011
		EC SP10010551 A	30-11-2010
		EP 2288622 A2	02-03-2011
		JP 2011517951 A	23-06-2011
		KR 20110005862 A	19-01-2011
		SV 2010003704 A	21-02-2011
		WO 2009137254 A2	12-11-2009
WO 2007149406 A2	27-12-2007	EP 2084274 A2	05-08-2009
		EP 2423305 A1	29-02-2012
		EP 2423306 A1	29-02-2012
		EP 2423307 A1	29-02-2012
		PE 03392008 A1	06-06-2008
		TW 200804416 A	16-01-2008
		US 2008102115 A1	01-05-2008
		WO 2007149406 A2	27-12-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K	47/20	(2006.01)	A 6 1 K 47/20
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K	47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100157956
弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520
弁理士 澤本 真奈美

(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

(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 グラント・エルスワース・ブラウズ
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、ユニット・ナンバー 1 2、イレブ
ンス・アベニュー 2 0 1 番

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA80 CA05 CA06 DA02 DA03 EA02
4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C076 BB01 BB13 BB15 BB16 BB21 BB22 BB25 BB27 BB31 CC14
CC29 CC41 DD41 DD55 DD63 DD67 EE23 EE41 EE59 FF31
4C084 AA02 AA07 BA31 BA44 DC16 MA05 MA52 MA55 MA59 MA63
MA65 MA67 NA12 NA14 ZA53
4H045 AA10 AA30 BA10 BA53 BA57 CA40 CA42 DA65 EA24 FA74