(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월06일
(11) 등록번호 10-2749341
(24) 등록일자 2024년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/36 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/22* (2017.01)
A61P 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/36 (2013.01)
A61K 47/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0088358
(22) 출원일자 2023년07월07일
심사청구일자 2024년01월22일
(65) 공개번호 10-2024-0007881
(43) 공개일자 2024년01월17일
(30) 우선권주장
22183825.3 2022년07월08일
유럽특허청(EPO)(EP)
22183818.8 2022년07월08일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
KR102172937 B1
KR102481704 B1

(73) 특허권자
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 박스바에르트 (우편번호 디케이-2880) 노보 알레 1
(72) 발명자
베게 안드레아스
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
그라나타 다니엘레
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **FVIII(a)를 치환할 수 있는 매우 강력한 ISVD 화합물**

(57) 요 약

본 발명은 응혈 인자 IX(a) 및 인자 X(a)에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 제공하며, 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 매우 강력하고, 효과적인 피하 투여뿐만 아니라 경구 투여를 가능하게 할 정도로 충분히 긴 반감기를 제공한다. 따라서, 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드 유도체는 피하 및 경구 투여를 포함하는 다양한 투여 경로에 의해 A형 혈우병, 억제제가 있는 A형 혈우병, 및 후천성 A형 혈우병을 치료하는 데 적합하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 47/22 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
(72) 발명자
요한슨 에바
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
젤크 자이스 로제
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
룬트 야콥
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
사센 필립 요나스
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
그라이센 페르 제이.
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
에게비에르 토마스
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
후발렉 프란티섹
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
플레 시몬
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
노르만 마티아스
덴마크 2880 박스바에르트 노보 알레 1
바이스 마리-앙게
벨기에 9820 메렐베케 부르크 이스트 론세스트라트 23
데 타베르니에 에블린
벨기에 9831 되를러 빈가르드 16
스테펜센 소렌
벨기에 1040 에테르비크 뤼 앙트완느 고티에 64

명 세 서

청구범위

청구항 1

응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인 (ISVD) 폴리펩타이드 유도체로서,

서열번호 1로 표시되는 인자 IX 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1),

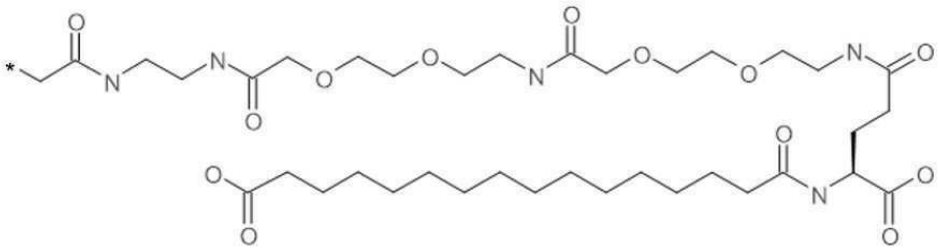
서열번호 2로 표시되는 인자 X 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 및

표면 노출된 아미노산 잔기에 부착된 적어도 하나의 연장 모이어티

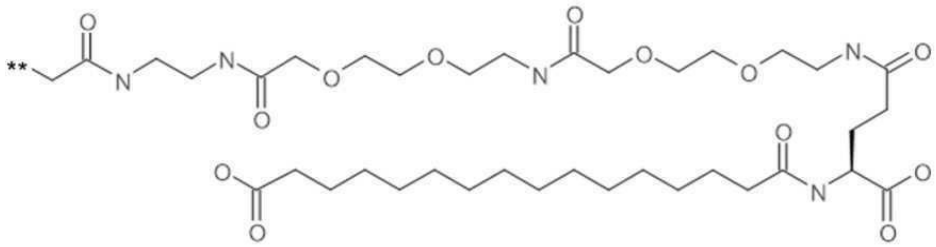
를 포함하며,

상기 ISVD 폴리펩타이드 유도체는 서열번호 629를 포함하고,

표면 노출된 아미노산 잔기에 부착된 제1 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하고:



표면 노출된 아미노산 잔기에 부착된 제2 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하고:



'*'는 서열번호 629의 위치 257에 있는 Cys이고,

'**'는 서열번호 629의 위치 259에 있는 Cys인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 ISVD 폴리펩타이드 유도체는 이중특이적 ISVD 폴리펩타이드 유도체 또는 이중특이적 V_HH 폴리펩타이드 유도체인 것을 특징으로 하는 ISVD 폴리펩타이드 유도체.

청구항 3

억제제가 있거나 없는 A형 혈우병 또는 후천적 A형 혈우병을 치료하는 데 사용하기 위한 약학적 조성물로서, 제1 항 또는 제2 항에 따르는 ISVD 폴리펩타이드 유도체 및 하나 이상의 약학적으로 서용 가능한 부형제(들)를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제3 항에 있어서, 상기 조성물은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제4 항에 있어서, 상기 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산나트륨(SNAC)이고,

상기 조성물은 니코틴아미드(NAM)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병 또는 후천적 A형 혈우병을 치료하는 데 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 ISVD 폴리펩타이드 유도체.

청구항 7

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드 유도체는 경구 투여되는 것을 특징으로 하는 ISVD 폴리펩타이드 유도체.

청구항 8

제3 항에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **기술분야**

[0002] 본 발명은 응고 인자 IX(a) 및 인자 X(a)에 결합할 수 있는 화합물 및 A형 혈우병을 포함하여 다양한 형태의 혈우병과 같은 응고병증을 치료하는 데 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

[0003] **참조에 의한 서열 목록의 통합**

[0004] 본 출원은 서열 목록과 함께 전자 형식으로 출원된다. 서열 목록의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

배 경 기 술

[0005] A형 혈우병(HA) 및 B형 혈우병(HB)을 가진 인간에서와 같이 응혈 이상을 가진 환자의 경우, 예를 들어, 기능성 응혈 인자가 없거나 불충분하게 존재함으로 인해 응고 연쇄반응의 다양한 단계들이 그 기능을 상실하게 된다. 응고 연쇄반응 중 한 부분의 이러한 기능 상실은 불충분한 혈액 응고 및 잠재적으로 생명을 위협하는 출혈을 초래하거나, 관절과 같은 내부 기관에 대한 손상을 초래한다.

[0006] A형 혈우병으로 흔히 지칭되는 응혈 인자 VIII(FVIII) 결핍은 전세계적으로 약 420,000명의 사람들에게 영향을 미치는 선천성 출혈 장애이며, 그 중 약 105,000명이 현재 이 병으로 진단된 상태이다. A형 혈우병은 인자 FVIII 혈장 수준이 1% 이하("중증"), 2~5%("중등도"), 및 6~30%("경증")(White 등의 문헌[(2001) Thromb. HAEMOST. 85:560]) 또는 WFH "Guidelines for the management of haemophilia" 2nd edition Haemophilia; Epub 6 JUL 2012에 따라 5~40%("경증")로 정의되는 3가지 중증도 등급을 갖는다. 출혈이 자발적으로 나타나거나 외상 후에 나타날 수 있다. 모든 A형 혈우병 환자의 약 절반은 중증 A형 혈우병을 앓고 있는 것으로 분류되며, 아동기 초기에 중증 출혈을 경험하고, 그 이후에는 자연적 출혈 또는 과도한 출혈의 빈번한 에피소드를 경험한다. 출혈은 관절과 근육으로 흔히 발생하며, 적절히 치료하지 않으면, 재발성 출혈이 비가역적인 혈액관절증(hemoarthropathy)으로 이어질 수 있다(Manco-Johnson 등의 문헌[(2007) N. Engl. J. Med. 357: 535-44]).

[0007] A형 혈우병 환자들은 외인성 FVIII과 같은 응혈 인자 대체 요법으로 치료를 받을 수 있다. 통상적인 치료는 출혈 사례의 예방 치료 또는 요구성 치료로서 제공되는 대체 요법으로 이루어진다. 최근까지 중증 A형 혈우병 환자에 대한 예방적 치료는 혈장 유래 FVIII 또는 재조합 FVIII, 또는 이들의 장기 작용성 변이체를 최대 주 3회 정맥 내 주입하는 것을 포함하였다.

[0008] 그러나, 이러한 환자들은 이러한 외인성 인자에 대한 중화 항체, 소위 억제제(inhibitor)를 생성하여, 이전에 효율적이던 치료법을 무효화시킬 위험에 놓인다. 억제제를 가진 A형 혈우병 환자는, 부분적으로 선천성이고 부분적으로 후천성인 응혈 이상의 비제한적인 예이다. FVIII에 대한 억제제를 생성한 적이 있는 환자는 종래의 대체 요법으로 치료될 수 없다. 외인성 응혈 인자는 정맥 내로만 투여될 수 있는데, 환자에게는 상당히 불편하고

불쾌한 일이다.

[0009] FVIII 활성의 감소 또는 부재로 인한 부적절한 FXa 형성 및 트롬빈 생성의 감소는 A형 혈우병 환자에서 출혈 소인의 기저 원인이다.

[0010] 단백질 가수분해에 의해 FX를 효소적으로 활성 형태인 FXa로 전환하는 것은 FIXa 및 이의 공인자인 활성화된 FVIIIa(FVIIIa)를 포함하는 고유 FX-활성화 복합체에 의해 달성될 수 있다. 공인자 결합(cofactor binding)은 FIXa의 효소 활성을 약 10만 배만큼 증가시키고, Scheiflinger 등에 의해 *J Thromb Haemost*, 6:315-322(2008년 문헌)에 개략적으로 기술된 바와 같이 다수의 기전을 통해 일어나는 것으로 여겨진다. 특히, FVIIIa는 FX에 대한 단백질 가수분해 활성을 증가시킨 FIXa의 형태를 안정화시키는 것으로 밝혀졌다(Kolkman JA, Mertens K *Biochemistry*, 39:7398-7405 (2000), Zogg T, Brandstetter H *Biol Chem*, 390:391-400 (2009) 참조).

[0011] 최근 몇년 동안, ACE910으로도 알려진 에미시주맙(HEMLIBRA®)은 종래의 대체 요법 인자에 대한 억제제를 가졌거나 가지지 않은 A형 혈우병의 예방적 치료제로서 피하 투여용으로 승인되었다. 에미시주맙은 Chugai Pharmaceuticals/Roche Pharmaceuticals에 의해 A형 혈우병의 치료용으로 개발된 인간화, 이중특이적 전장 항-FIX(a)/항-FX(a) 단클론 항체이다. 에미시주맙은 FVIII 공동인자 기능을 모방하도록 설계되었다(Sampei 등의 문헌[(2013) *PLoS One*, 8, e57479] 및 WO2012/067176 참조). 30~50 μg/mL(혈장)의 에미시주맙으로 치료하는 것이 적어도 10~15 IU/dL(혈장)의 동등한 인자 VIII 활성에 상응하는 것으로 추정되기도 했다(Shima 등의 문헌[N Engl J Med 2016; 374:2044-53]). 그러나, 일부 환자에서는 에미시주맙에 대한 항체(항약물 항체)가 발생하여, 화합물에 의한 이러한 치료의 효과를 떨어뜨리는 경우도 있었다.

[0012] 에미시주맙에 대해 예시된 바와 같은 억제제의 생성 이외에, 다른 항체 특성 또한 환자를 위한 효과적인 항체 기반 치료를 달성하는 데 중요하다. 특히, 비특이적 결합에 대한 경향성이 높은 항체는 임상에서 안전성 문제를 초래할 수 있음이 입증되었다. 일부 보고에서, 높은 수준의 비특이적 결합은 항체의 순환 반감기를 몇 배 감소시켰고, 이는 환자를 위한 비효과적이고 번거로운 투여 요법으로 이어졌다(Dobson 등의 문헌[*Nature*, volume 6, art. no.: 38644 (2016)] 및 Avery 등의 문헌[*MAbs* 2018, Vol.10, No.2, 244-255] 참조).

[0013] WO2018/141863, WO2019/065795 (US10759870), WO2020/025672, 및 WO2021/152066은 항-FIX(a)/항-FX(a) 이중특이적 전장 항체, 및 피하 투여에 의해 혈우병의 치료에 사용하기 위한 응혈촉진제로서 이들의 용도를 개시하고 있다. 하나의 이러한 이중특이적 항체는 Mim8로 명명된다(Ostergaard H 등의 문헌[Blood. 2021;138:1258-68] 및 WO2020/025672 참조).

[0014] 그러나 혈우병 커뮤니티, 특히 응혈 이상이 있는 대상체에서는 여전히 매우 유의한 충족되지 않은 의학적 요구가 많이 존재하며, 특히 치료 부담을 경감시키고 응혈 이상, 예컨대 A형 혈우병 및 관련 질환을 치료하는 데 사용하기 위해 FVIII(a)를 대체할 수 있는 개선된 화합물에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0015] 본 발명은 응혈 인자 IX(a) 및 응혈 인자 X(a)에 결합할 수 있는 응혈 인자 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 유도체를 제공하는데, 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 매우 강력하며, 효과적인 피하 투여뿐만 아니라 경구 투여도 가능하게 할 정도로 충분히 긴 반감기를 제공한다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 응혈 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD1), 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 하나 이상의 표면 노출된 잔기(들)에 부착된 하나 이상의 연장 모이어티(들), 임의로 ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는 응혈 인자 ISVD 폴리펩티드 유도체에 관한 것이다.

[0016] 일 양태에서, 본 발명은 응혈 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD1), 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 표면 노출된 잔기에 부착된 적어도 하나의 연장 모이어티, 임의로 ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는 응혈 인자 ISVD 폴리펩티드 유도체에 관한 것으로서, 상기 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 상기 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0017] ISVD 폴리펩티드 유도체는 예를 들어 V_HH 폴리펩티드 유도체일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 개시된 것과 같은 ISVD 폴리펩티드 유도체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 양태는 다양한 형태의 혈우병, 특히 A형 혈우병, 억제제가 있는 A형 혈우병, 및 후천성 A형 혈우병을 피하 투여 및 경구 투여를 포함하는 다양한 투여 경로에 의해 치료하기 위한, 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드 유도체 및 이러한 화합물을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0019] 추가의 양태에서, 본 발명은 ISVD 폴리펩티드 유도체 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 일부인 개별 성분(중간체) ISVD 단편 또는 V_HH 단편, 예컨대 이들 유도체의 특정 항-FIX(a) V_HH 단편 또는 특정 항-FX(a) V_HH 단편에 관한 것이다.

[0020] 본 발명의 추가의 양태는 본원에 개시된 것과 같은 화합물의 성분(중간체)의 제조에 관한 것으로서, 이러한 폴리펩티드 유도체의 경구 생체이용률을 개선하도록 FIX(a) 및 FX(a)에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점을 변형시키는 방법을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a 내지 도 1h는 항-FX(a)/FIX(a) ISVD 폴리펩티드 유도체의 비제한적인 예를 보여준다. E: 연장, PM: 연장 모이어티, L_{1-2}: ISVD1과 ISVD2를 연결하는 링커. 파선은 이황화 결합을 나타낸다.

도 2a는 연장 모이어티 링커(L_P)(링커 ID: L_P1)에 의해 C-말단 연장부에 접합된 단일 C18 이산 지방산-기반 연장 모이어티를 포함하는 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 비제한적인 예를 보여준다. 파선은 이황화 결합을 나타낸다.

도 2b는 연장 모이어티 링커(L_P)(링커 ID: L_P2)에 의해 C-말단 연장부에 접합된 단일 테트라졸-기반 연장 모이어티를 포함하는 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 비제한적인 예를 보여준다. 파선은 이황화 결합을 나타낸다.

도 3a~3f는 연장 모이어티 링커(L_P, ID L_P1)에 의해 C-말단 연장부(E)에 접합된 이중 C16 디산 지방산 기반 연장 모이어티를 포함하는 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 비제한적인 실시예인 화합물 #20 (a), 화합물 #18 (b), 화합물 #15 (c), 화합물 #13 (d), 화합물 #14 (e), 및 화합물 #12 (f)의 상세한 도식적 설명을 보여준다. 파선은 이황화 결합을 나타낸다. 연장부(E)(서열번호 9)를 이들 V_HH 폴리펩티드 유도체에 사용하였다. 연장부는 2개의 시스테인 잔기를 각각 위치 4 및 6에서 포함하는데, 이들은 연장 모이어티(PM)를 위한 부착 지점의 역할을 한다.

도 3a에서, $V_HH1.20$ - L_{1-2} - $V_HH2.20$ - E 폴리펩티드의 서열은 서열번호 634(화합물 #20)로 표시되어 있다.

도 3b에서, $V_HH1.18$ - L_{1-2} - $V_HH2.18$ - E 폴리펩티드의 서열은 서열번호 632(화합물 #18)로 표시되어 있다.

도 3c에서, $V_HH1.15$ - L_{1-2} - $V_HH2.15$ - E 폴리펩티드의 서열은 서열번호 629(화합물 #15)로 표시되어 있다.

도 3d에서, $V_HH1.13$ - L_{1-2} - $V_HH2.13$ - E 폴리펩티드의 서열은 서열번호 627(화합물 #13)로 표시되어 있다.

도 3e에서, $V_HH1.14$ - L_{1-2} - $V_HH2.14$ - E 폴리펩티드의 서열은 서열번호 628(화합물 #14)로 표시되어 있다.

도 3f에서, $V_HH1.12$ - L_{1-2} - $V_HH2.12$ - E 폴리펩티드의 서열은 서열번호 626(화합물 #12)으로 표시되어 있다.

도 4는 화합물 #6, Mim8, 및 에미시주맙 SIA에 대한 적정 곡선(화합물 농도의 결과로서 활성)의 예를 보여준다.

도 5a 및 도 5b는 항-FIX(a) 서열 및 항-FX ISVD(V_HH 단편) 서열의 서열 정렬을 각각 도시하는데, 여기서 CDR 서열은 밑줄이 쳐진 굵은 글씨체로 강조되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] **서열의 간단한 설명**

[0023] 서열번호 1은 인간 응혈 인자 IX의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0024] 서열번호 2는 인간 응혈 인자 X의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0025] 서열번호 3~13 및 690은 연장부(E)의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0026] 서열번호 14~26 및 691은 L_{1-2} 및 L_P 링커의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0027] 서열번호 27~614는 V_HH 단편 및 이의 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0028] 서열번호 615~691, 734, 및 735는 임의의 L_{1-2} 링커 및/또는 연장부를 포함하는 V_HH 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0029] 서열번호 692~733은 본원의 실시예 4에 개시된 것과 같은 펩티드 단편의 서열을 나타낸다.

[0030] 서열번호 736~739는 잠재적 연장기의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0031] **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0032] 본 발명은 FIX(a) 및 FX(a)에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 제공하는데, 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 매우 강력하며, 효과적인 피하 투여뿐만 아니라 경구 투여도 가능하게 할 정도로 충분히 긴 반감기를 제공한다. 따라서, 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드 유도체는 A형 혈우병, 억제제가 있는 A형 혈우병, 및 후천성 A형 혈우병과 같은 다양한 형태의 혈우병을 피하 및 경구 투여를 포함하는 다양한 투여 경로에 의해 치료하는 데 적합하다.

[0033] 특히, 본 발명은 응혈 FIXa에 결합할 수 있고 응혈 FX에 결합하여 응혈 인자 VIIIa(FVIIIa)의 공동 인자 활성을 모방하는 방식으로 활성화된 응혈 FX(FXa)를 형성할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체(또는 V_HH 폴리펩티드 유도체)로서 지칭되는 이중특이적 연장된 ISVD 폴리펩티드, 예컨대 V_HH 폴리펩티드에 관한 것이다. 본원에 개시된 것과 같은 V_HH 폴리펩티드 유도체는 매우 높은 시험관 내 효능을 나타내는데, 이는 예를 들어 이중특이적 항체 에미시주맙 서열 동일 유사체(SIA)의 효능보다 수십 내지 수백배 더 높다. V_HH 폴리펩티드 유도체는 랫트, 개, 및 돼지와 같은 동물 모델에서, 도입된 연장기, 예를 들어 지방산 접합 및 알부민-결합제 펩티드 융합을 통해 연장된 반감기를 또한 나타낸다. 연장되지 않은 V_HH 폴리펩티드는 개 및 돼지에서 매우 신속하게 제거되는 것으로 나타난다. 또한, V_HH 폴리펩티드 유도체는 표면 노출된 잔기의 pI 저하 아미노산 치환, 및 부형제 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산나트륨(SNAC) 및 예를 들어 니코틴아미드(NAM)를 사용하는 제형을 통한 경구 투여된 후 임상적으로 유관한 생체이용률을 가능하게 하도록 조작되었다. 따라서, 경구 투여 후, 제형화되고 매우 강력한 V_HH 폴리펩티드 유도체는 랫트 및 개 동물 모델에서 임상적으로 유관한 생체이용률 수준을 나타낸다. 지금까지, 분자량이 10 kDa를 초과하는 치료 폴리펩티드, 예컨대 ISVD 폴리펩티드 유도체, 예컨대 V_HH 폴리펩티드 유도체는 경구 투여에 적합한 것으로 간주되지 않았다. 그러나, 본원에 개시된 것과 같은 V_HH 폴리펩티드 유도체는 응혈 이상, 예컨대 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병(이에 한정되지는 않음)의 신규한 경구 치료에 적합하다.

[0034] 따라서, 본 발명은 응혈 인자 IX(a) 및 응혈 인자 X(a)에 결합할 수 있는 응혈 인자 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 유도체를 제공하는데, 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 매우 강력하며, 효과적인 피하 투여뿐만 아니라 경구 투여도 가능하게 할 정도로 충분히 긴 반감기를 제공한다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 응혈 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD1), 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 하나 이상의 표면 노출된 잔기(들)에 부착된 하나 이상의 연장 모이어티(들), 임의로 ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는 응혈 인자 ISVD 폴리펩티드 유도체에 관한 것이다. 도 1a 내지 도 1h는 항-FX/FIX(a) ISVD 폴리펩티드 유도체의 비제한적인 예를 보여준다.

[0035] 일 양태에서, 본 발명은 응혈 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD1), 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 표면 노출된 잔기에 부착된 적어도 하나의 연장 모이어티, 임의로 ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는 응혈 인자 ISVD 폴리펩티드 유도체에 관한 것으로서, 상기 제1

ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 상기 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, 및 L178, 및 D179(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은

[0037] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 V_HH(V_HH1),

[0038] 인자 X(서열번호 2)에 결합할 수 있는 제2 V_HH(V_HH2),

[0039] 표면 노출된 잔기에 부착된 적어도 하나의 연장 모이어티,

[0040] 임의로, V_HH1 및 V_HH2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및

[0041] 임의로, 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는 응혈촉진 VHH 폴리펩티드 유도체에 관한 것으로서,

[0042] 여기서 V_HH1은 다음 서열을 포함하고:

[0043] V_HH-2.20 (서열번호 171),

[0044] V_HH-2.18 (서열번호 155),

[0045] V_HH-2.15 (서열번호 131),

[0046] V_HH-2.13 (서열번호 115),

[0047] V_HH-2.14 (서열번호 123),

[0048] V_HH-2.12 (서열번호 107), 또는

[0049] V_HH-2.2 (서열번호 35),

[0050] V_HH2는 다음 서열을 포함한다:

[0051] V_HH-1.20 (서열번호 167),

[0052] V_HH-1.18 (서열번호 151),

[0053] V_HH-1.15 (서열번호 127),

[0054] V_HH-1.13 (서열번호 111),

[0055] V_HH-1.14 (서열번호 119),

[0056] V_HH-1.12 (서열번호 103),

[0057] V_HH-1.3 (서열번호 31), 또는

[0058] V_HH-1.4 (서열번호 39).

[0059] 하나의 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.20 (서열번호 167)의 서열을 포함한다.

[0060] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.18 (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0061] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.15 (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

[0062] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.13 (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0063] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.12 (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0064] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.3 (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0065] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.4 (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0066] 이러한 일 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.20 (서열번호 167)의 서열을 포함한다.

[0067] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.18 (서열번호 155)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.18 (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0068] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.15 (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

[0069] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.13 (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0070] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.12 (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0071] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.3 (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0072] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.4 (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0073] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.15 (서열번호 131)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.18 (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0074] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.15 (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

[0075] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.13 (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0076] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.12 (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0077] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.3 (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0078] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.4 (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0079] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.13 (서열번호 115)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.18 (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0080] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.15 (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

[0081] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.13$ (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0082] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.12$ (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0083] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.3$ (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0084] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.4$ (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0085] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.14$ (서열번호 123)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.18$ (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0086] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.15$ (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

[0087] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.13$ (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0088] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.12$ (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0089] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.3$ (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0090] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.4$ (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0091] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.12$ (서열번호 107)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.18$ (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0092] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.15$ (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

[0093] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.13$ (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0094] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.12$ (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0095] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.3$ (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0096] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.4$ (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0097] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.2$ (서열번호 135)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.18$ (서열번호 151)의 서열을 포함한다.

[0098] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.15$ (서열번호 127)의 서열을 포함한다.

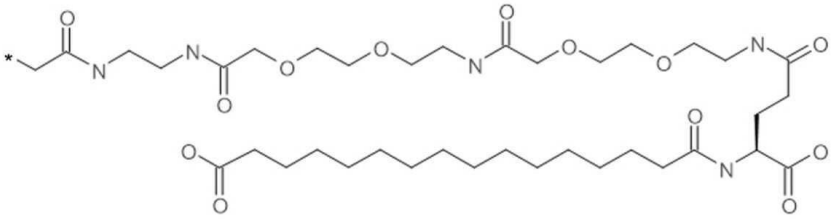
[0099] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 $V_HH-2.20$ (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 $V_HH-1.13$ (서열번호 111)의 서열을 포함한다.

[0100] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.12 (서열번호 103)의 서열을 포함한다.

[0101] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.3 (서열번호 31)의 서열을 포함한다.

[0102] 또 다른 이러한 구현예에서, V_HH1은 V_HH-2.20 (서열번호 171)의 서열을 포함하고 V_HH2는 V_HH-1.4 (서열번호 39)의 서열을 포함한다.

[0103] 일부 구현예에서, 연장 모이어티는 다음의 구조를 포함하며:

[0104] 

[0105] 여기서 *는 ISVD 폴리펩티드 상의 부착 지점을 나타낸다.

[0106] ISVD 폴리펩티드 유도체는 예를 들어 V_HH 폴리펩티드 유도체일 수 있다.

[0107] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 것과 같은 ISVD 폴리펩티드 유도체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 양태는 다양한 형태의 혈우병, 특히 A형 혈우병, 억제제가 있는 A형 혈우병, 및 후천성 A형 혈우병을 피하 투여 및 경구 투여를 포함하는(이에 한정되지는 않음) 다양한 투여 경로에 의해 치료하기 위한, 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드 유도체 및 이러한 화합물을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0108] 추가의 양태에서, 본 발명은 ISVD 폴리펩티드 유도체 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 일부인 개별 성분(중간체) ISVD 단편 또는 V_HH 단편, 예컨대 이들 유도체의 특정 항-FIX(a) V_HH 단편 또는 특정 항-FX(a) V_HH 단편에 관한 것이다.

[0109] 본 발명의 추가의 양태는 본원에 개시된 것과 같은 화합물의 성분(중간체)의 제조에 관한 것으로서, 이러한 폴리펩티드 유도체의 경구 생체이용률을 개선하도록 FIX(a) 및 FX(a)에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점을 변형시키는 방법을 포함한다.

[0110] **정의**

[0111] 본 발명이 보다 쉽게 이해될 수 있도록, 특정 용어를 아래에 정의한다.

[0112] 그리스 문자는 기호 또는 상응하는 명칭으로 표시될 수 있다(예를 들어, α = 알파; β = 베타; ε = 엡실론; η = 감마; ψ = 오메가 등). 또한, 그리스 문자 v는 "u"로 표시될 수 있다(예를 들어, vl = ul, 또는 vM = uM).

[0113] 화학식의 별표(*)는 부착 지점을 나타낸다.

[0114] 용어 "하나(a 또는 an)"는 "하나 이상"을 의미하도록 의도된다. 단계 또는 요소의 앞에서 이를 수식할 때의 용어 "포함하는(comprise 및 이의 변형된 표현인 comprises 및 comprising)"은 추가의 단계 또는 요소의 임의로 존재할 수 있고 이를 배재하지 않음을 의미하도록 의도된다.

[0115] 용어 "약"은 대략, 얼추, 또는 거의를 의미하도록 본원에서 사용된다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용될 때, 이는 제시된 수치 값의 위 아래로 경계를 연장시킴으로써 그 범위를 변경한다. 일반적으로, 용어 "약"은 수치 값을 표시된 값의 위 또는 아래로 약 10%만큼 (더 높이 또는 더 낮게) 수정할 수 있다.

[0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "백본(backbone)"은 ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드 아미노산 서열을 지칭하도록 본원에서 사용되는데, 여기에는 임의의 L_{1-2} 링커 및 연장부(들)가 포함되지만 연장 모이어티는 제외되며, 의심의 여지를 없애기 위해 백본에 융합되기에 적합한 임의의 연장 모이어티가 제외된다.

[0117] 용어 "결합 친화도"는 2개의 분자 간의, 예를 들어 ISVD, 예컨대 V_HH 단편과 항원 간의 비공유 상호작용의 강도

의 척도이다. 상기 용어는 1가 상호작용을 기술하도록 사용된다. 1가 상호작용을 통한 2개의 분자(예를 들어 ISVD, 예컨대 V_HH) 간의 결합 친화도는 평형 해리 상수(K_D)를 결정함으로써 정량화될 수 있다. K_D는 예를 들어 표면 플라스몬 공명(SPR) 방법 또는 등온 적정형 열량측정(Isothermal Titration Calorimetry, ITC) 방법에 의해 복합체의 형성 및 해리의 동역학을 측정함으로써 결정될 수 있다. 1가 복합체의 결합 및 해리에 상응하는 속도 상수는 각각 결합 속도 상수 k_a (또는 k_{on}) 및 해리 속도 상수 k_d (또는 k_{off})로서 지칭된다. K_D는 등식 $K_D = k_d / k_a$를 통해 k_a 및 k_d와 연관된다.

[0118] 상기 정의에 따르면, 상이한 분자 상호작용과 연관된 결합 친화되, 예컨대 주어진 항원에 대한 상이한 ISVD의 결합 친화도는, 개별 항체/항원 복합체에 K_D 값을 비교함으로써 비교할 수 있다.

[0119] 해리 상수의 값은 잘 알려진 방법에 의해 직접 결정될 수 있다. 표적에 대한 리간드(예: ISVD)의 결합 능력을 평가하기 위한 표준 분석법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, RIA, 및 유세포 계측 분석을 포함한다. ISVD의 결합 동역학 및 결합 친화도 또한 당업계에 공지된 표준 분석법, 예컨대 SPR에 의해 평가될 수 있다.

[0120] 표적에 대한 ISVD, 예컨대 V_HH의 결합을, 해당 항체의 또 다른 리간드(예: 또 다른 ISVD)가 존재하는 가운데 표적의 결합과 비교하는 경쟁 결합 검정이 수행될 수 있다.

[0121] 문맥에 의해 모순되지 않는 한, K_D는 바람직하게는 본원에 기술된 바와 같은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정된다(실시예 7 참조).

[0122] 바람직하게는, FIX(a)에 결합할 수 있는 ISVD의 K_D 값은 3 μM 이하, 예컨대 15 nM 이하, 예컨대 11.7 nM 이하이다.

[0123] 바람직하게는, FX(a)에 결합할 수 있는 ISVD의 K_D 값은 3 μM 이하, 예컨대 350 nM 이하, 예컨대 300 nM 이하이다.

[0124] "종간 반응성(cross-species reactive)" ISVD(또는 V_HH 단편)는 예를 들어 비슷한 친화도로, 특히 100배 범위의, 예컨대 50배 범위 이내의, 20배 범위 이내의, 또는 10배 범위 이내의 K_D로, 모든 표시된 종(예: 인간 및 시노몰구스 원숭이) 유래의 FIX에 결합한다. 정의된 X배의 K_D 범위 이내란, 열거된 특정 종에 대한 가장 높은 친화도가 열거된 상이한 종에 대한 결합에 대해 측정된 가장 낮은 친화도보다 X배 이하임을 의미한다. 당업자는, 열거된 모든 종에 대한 K_D 측정에 동일한 조건이 적용되는 한, 임의의 친화도 측정 방법이, 종간 반응성 ISVD가 본원에 기술된 것과 같은 주어진 K_D 배수 범위 이내에서 열거된 모든 종 유래의 표적 항원에 결합한다는 것을 검증하는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 바람직하게는, K_D 값은 SPR을 사용하여, 특히 25℃에서 측정된다. 바람직하게는, 친화도는 종간 반응성 ISVD, 예컨대 V_HH를 사용하여 측정된다.

[0125] 아미노산은 아민기 및 카르복실산기를 함유하는 분자이며, 그리고, 임의로, 종종 측쇄로서 지칭되는, 하나 이상의 추가적인 기를 함유한다.

[0126] 용어 "아미노산"은 (유전적으로 암호화된) 정준 아미노산 및 비천연 아미노산을 포함한다. 비천연 아미노산의 비제한적인 예는 Aib(α-아미노이소부티르산), 데아미노 히스티딘(대안적인 명칭: 3-(이미다졸-4-일)프로판산, 약칭: Imp (이미다조프로피오닐)), 및 정준 아미노산의 d-이성질체이다. 광학 이성질체가 언급되지 않는, 폴리펩티드 내의 모든 아미노산 잔기는, 달리 명시되지 않는 한 본원에서 l-이성질체를 의미하는 것으로 이해해야 한다.

[0127] 본원에서의 용어 "항체(antibody)"는 항원 또는 이의 일부에 결합할 수 있는 면역글로불린 서열을 포함하거나 이로부터 유래된 단백질을 지칭한다.

[0128] "항체"는 적어도 4개의 폴리펩티드 사슬(이황화 결합에 의해 연결된 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC))을 포함하는 전장 항체뿐만 아니라, 적어도 3개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 항체(이황화 결합에 의해 연결된 2개의 중쇄(HC) 및 1개의 경쇄(LC))도 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 면역글로불린의 한 부류는 IgG이다. 인간에서, IgG 클래스는 이의 중쇄 불변 영역 서열에 기초하여 4개의 하위-클래스 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 나누어질 수 있다. 경쇄는 이의 서열 성분 차이에 기초하여 2가지 유형, 즉 카파 및 람다 사슬로 나누어질 수 있다.

IgG 분자는 2개 이상의 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중쇄, 및 이황화 결합에 의해 중쇄에 각각 부착된 2개의 경쇄로 구성된다. 용어 "항체"는 V_HH 단편 및 V-NAR 단편과 같은 단일 도메인 항체를 또한 포함한다.

[0129] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "CDR"로도 알려진 "상보성 결정 영역"을 포함한다.

[0130] "프레임워크" 또는 "FR" 영역은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 영역이다. 따라서, 항체 또는 ISVD는 N-말단에서 C-말단 방향으로 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함한다. 중쇄의 CDR3은 일반적으로 항원 결합에 가장 기여하는 영역이다.

[0131] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 일반적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 표면 요소로 이루어지며, 일반적으로 특이적인 3차원 구조 특성뿐만 아니라 특이적인 전하 특성도 갖는다. 입체 에피토프와 비입체 에피토프는, 단백질의 구조를 파괴할 수 있는 변성제가 존재할 때 입체 에피토프에 대한 결합이 상실되지만 비입체 에피토프에 대한 결합은 상실되지 않는다는 점에서 구별된다.

[0132] ISVD, V_HH 단편, 및 이의 표적 사이에 있는 복합체의 공간적 좌표에 의해 정의된 X-선 유래 결정 구조의 맥락에서, 용어 에피토프는, 문맥에 의해 달리 명시되거나 반대로 표시되지 않는 한, FIX/FIXa 또는 FX/FXa 내의 중원자로부터 4 Å 이내의 거리에서 중원자(비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 ISVD 잔기로서 본원에서 구체적으로 정의된다.

[0133] 주어진 ISVD/항원 쌍에 대한 에피토프는 실시예에 기술된 것들과 같은 일상적인 방법에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, ISVD와 항원이 결합될 수 있고 ISVD/항원 복합체가 결정화될 수 있다. 복합체의 결정 구조는 ISVD와 이의 항원 간의 특이적 상호작용 부위를 식별하도록 결정되고 사용될 수 있다.

[0134] 일 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 ISVD 폴리펩티드 유도체는: 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260 중 적어도 하나를 포함하는 FIX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있는 제1 ISVD; 및 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, 및 L178(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 FX(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는 제2 ISVD를 포함한다.

[0135] 일 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 유도체는: 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있는 제1 ISVD; 및

[0136] 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하거나 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179 중 적어도 하나를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는 제2 ISVD를 포함한다.

[0137] 응혈 인자 IX(FIX)는 인자 VII, 프로트롬빈, 인자 X, 및 단백질 C와 구조적으로 유사한 비타민 K 의존성 응혈 인자이다. FIX는 단쇄 지모겐(서열번호 1)으로서 혈장에서 순환한다. FIX는 인자 VII, 프로트롬빈, 인자 X 및 단백질 C와 구조적 유사성을 갖는 비타민 K-의존성 응혈 인자이다. 순환 치모겐(zymogen) 형태는 N-말단 γ-카르복시글루탐산-풍부(Gla) 도메인, 2개의 EGF 도메인 및 C-말단 트립신-유사 세린 프로테아제 도메인을 포함하는 4개의 구분되는 도메인으로 나누어진 415개의 아미노산으로 구성된다. FIX의 활성화는 Arg145 및 Arg180에서 제한된 단백질 가수분해에 의해 발생하여 활성화 펩티드를 방출한다(서열번호 1의 잔기 146 내지 180). 따라서, 활성화된 FIX(FIXa)는 서열번호 1의 잔기 1-145(경쇄) 및 서열번호 1의 잔기 181-415(중쇄)로 구성된다.

[0138] 따라서, 순환 FIX 분자는 FIX 치모겐과 FIX의 활성화 형태를 포함하는데, 이들은 본원에서 서열번호 1을 참조하여 FIX 및 FIXa로서 일반적으로 지칭된다.

[0139] 활성화된 인자 IX는 인자 IXa 또는 FIXa로서 지칭된다. 용어 "FIX (서열번호 1) 및/또는 이의 활성화된 형태(FIXa)"는 "FIX/FIXa" 또는 간단히 "FIX(a)"로서 지칭될 수도 있다.

[0140] FIXa는, 응고 중에 적절한 트롬빈 형성을 뒷받침하기 위해 필요한 인자 Xa의 대부분을 테나제 복합체의 일부로서 생성함으로써, 지혈에 있어서 주된 역할을 하는 트립신-유사 세린 프로테아제이다.

[0141] FIX는 인간 FIX의 대립유전자 형태인 Ala148에 상응하는 서열번호 1로 표시된다(Anson 등의 EMBO J. 1984 3:1053-1060; McGraw 등의 Proc Natl Acad Sci USA. 1985 82:2847-2851; Graham 등의 Am. J. Hum. Genet. 1988 42:573-580 참조). 본 발명에서, FIX는 T148 변이체(Uniprot ID P00740)와 같은 FIX의 모든 천연 변이체

를 포함하도록 의도된다.

[0142] FX는 인자 VII, 프로트롬빈, FIX, 및 단백질 C와 구조적으로 유사한 비타민 K 의존성 응혈 인자이다. FX는 서열번호 2(경쇄)의 잔기 1-139 및 서열번호 2(중쇄)의 잔기 143-448을 포함하는 2-쇄 지모겐으로서 혈장에서 순환한다. 인간 FX 지모겐은, N-말단 감마-카르복시글루탐산 풍부(Gla) 도메인(잔기 1-45), 2개의 EGF 도메인인 EGF1(잔기 46-82) 및 EGF2(잔기 85-125) 각각, 및 C-말단 트립신-유사 세린 프로테아제 도메인(잔기 195-448)을 포함하는 4개의 구별되는 도메인을 포함한다. FX의 활성화는 Arg194에서의 제한된 단백질 가수분해에 의해 발생하며, 이는 활성화 펩티드(잔기 143-194)를 방출시킨다. 따라서, 활성화된 FX(FXa)는 서열번호 2의 잔기 1-139(경쇄) 및 서열번호 2의 잔기 195-448(활성화된 중쇄)로 구성된다. 따라서, 순환하는 인자 FX 분자는 FX 지모겐과 FX의 활성화 형태를 포함하는데, 이들은 본원에서 서열번호 2을 참조하여 FX 및 FXa로서 지칭된다. 본 발명에서, FX는 FX의 모든 천연 변이체를 포함하도록 의도된다. 용어 "FX (서열번호 2) 및/또는 이의 활성화 형태 (FXa)"는 "FX/FXa" 또는 "FX(a)"로서 지칭될 수도 있다.

[0143] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환될 수 있는 경우, 예를 들어 염기성 아미노산이 또 다른 염기성 아미노산으로(예를 들어, 리신에서 아르기닌으로) 치환될 수 있고, 산성 아미노산이 또 다른 산성 아미노산으로(예를 들어, 글루타메이트에서 아스파르테이트로) 치환될 수 있고, 중성 아미노산이 또 다른 중성 아미노산으로(예를 들어, 트레오닌에서 세린으로) 치환될 수 있고, 하전된 아미노산이 또 다른 하전된 아미노산으로(예를 들어, 글루타메이트에서 아스파르테이트로) 치환될 수 있고, 친수성 아미노산이 또 다른 친수성 아미노산으로(예를 들어, 아스파라긴에서 글루타민으로) 치환될 수 있고, 소수성 아미노산이 또 다른 소수성 아미노산으로(예를 들어, 알라닌에서 발린으로) 치환될 수 있고, 극성 아미노산이 또 다른 극성 아미노산으로(예를 들어, 세린에서 트레오닌으로) 치환될 수 있고, 방향족 아미노산이 또 다른 방향족 아미노산으로(예를 들어, 페닐알라닌에서 트립토판으로) 치환될 수 있으며, 지방족 아미노산이 또 다른 지방족 아미노산으로(예를 들어, 류신에서 이소류신으로) 치환될 수 있는 경우를 지칭한다.

[0144] 본원에서 사용되는 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더욱 용이하게 하기 위해 약학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다.

[0145] 부형제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 다양한 당류 및 전분류, L-아르기닌, 니코틴아미드, SNAC, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일, 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0146] 본원에서 사용되는 용어 "연장부"(E)는 ISVD 폴리펩티드에 부착되기에 적합한 펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0147] 연장부는 몇 개의 아미노산으로 이루어지거나(1~10개의 아미노산), 더 길거나(10~30개의 아미노산), 매우 길 수 있다(30개 초과의 아미노산). 연장부는 바람직하게는, ISVD 폴리펩티드, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드, 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 N-말단 단부(N-말단 연장부) 또는 C-말단 단부(C-말단 연장부)에 존재하거나, 둘 다에 존재한다. 대안적으로, 연장부는 CDR 서열 외부의 ISVD 폴리펩티드의 다른 곳에, 예컨대 하나 이상의 프레임워크 영역에 부착되거나 링커 L_{1-2}에 부착된다.

[0148] 연장부(들)는 바람직하게는 ISVD 폴리펩티드에 재조합적으로 융합된다. 다른 구현예에서, 연장부(들)는 ISVD 폴리펩티드에 접합된다.

[0149] 비제한적인 예는 GQACPC(서열번호 9)로 이루어진 6-아미노산 C-말단 연장부를 갖는 화합물 #22, GGGGCSCHHHHHH(서열번호 8)로 이루어진 13-아미노산 C-말단 연장부를 갖는 화합물 #6, 및 GGGGSHHHHHH(서열번호 7)로 이루어진 11-아미노산 C-말단 연장부를 포함한다.

[0150] 연장부의 목적은 연장 모이어티를 위한 부착 지점을 제공하고/하거나 정제 수단을 제공하는 것이다. 따라서, 연장부라는 용어는 연장기 및 연장 모이어티를 포함하지 않는다.

[0151] 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 말단에 재조합적으로 융합된 임의의 연장기 링커(L_P)를 포함하는 연장기는 연장부로서 간주되지 않는다.

[0152] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "융합"은 원래 별도의 단백질 또는 펩티드 또는 이들의 단편을 암호화하는 둘 이상의 DNA 서열이 프레임 내에서 결합하는 것을 지칭한다. 융합 폴리펩티드 DNA 서열을 번역하면 단일 폴리펩티드 서열이 생성되는데, 이들은 원래 단백질 또는 펩티드 각각으로부터 유래된 기능적 특성을 가질 수 있다. 융합 단백질을 암호화하는 DNA 서열은 중첩 PCR 또는 DNA 결찰과 같은 표준 분자 생물학 방법에 의해 인공적으

로 생성될 수 있다. 생성된 융합 폴리펩티드 DNA 서열은 박테리아, 효모, 진균, 곤충 세포, 또는 포유류 세포와 같은 숙주 유기체에서 이종 융합 단백질 발현을 뒷받침하는 적절한 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 연장 모이어티는 예를 들어 ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드 백본의 C-말단 또는 N-말단에 융합될 수 있다.

[0153] 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 본원에 개시된 ISVD를 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 포괄한다. 숙주 세포는 배양된 세포, 예를 들어 포유류 배양된 세포, 예컨대 CHO 세포, HEK293T 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 진균 세포, 및 곤충 세포를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0154] 당업계에 공지된 바와 같이, 용어 "동일성(identity)"은 서열을 비교함으로써 결정된 바와 같이, 2개 이상의 폴리펩티드의 서열 간의 관계를 지칭한다. 당업계에서, "동일성"은 또한 2개 이상의 아미노산 잔기의 스트링 간의 일치의 수에 의해 결정된 바와 같이, 폴리펩티드들 간의 서열 관련성의 정도를 의미한다. "동일성"은 특정 수학 모델 또는 컴퓨터 프로그램("알고리즘(algorithm)")에 의해 다루어지는 gap 정렬(존재하는 경우)을 사용해 둘 이상의 서열 중 더 작은 것들 간의 동일한 일치 백분율을 측정하는 것이다. 관련 폴리펩티드의 동일성은 공지된 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 본 발명에서, 유사성 및 동일성은 갭 개방 및 연장에 대해 각각 10 및 0.5의 파라미터를 사용하여(gapopen=10, gapextend=0.5) EMBOSS-6.6.0의 Needleman을 사용해 결정하였다(Needleman 등의 문헌[J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453]).

[0155] 용어 "면역글로불린 단일 가변 도메인" 또는 "ISVD"는 항원 결합 도메인 또는 단편, 예컨대 VH 및 VL 도메인을 각각 포함하는 일반적인 용어로서 사용된다.

[0156] 따라서, ISVD는 경쇄 가변 도메인 서열(예: VL-서열), 또는 중쇄 가변 도메인 서열(예: VH-서열)일 수 있고; 예를 들어, 종래의 4쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열 또는 종래의 4쇄 항체로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 서열일 수 있다.

[0157] 특정 유형의 ISVD는 단일 단량체 가변 항체 도메인으로 이루어진 항체 단편으로서 정의된 일종의 면역글로불린으로서 원래 식별된 V_HH 단편이다. V_HH 단편은 카멜리드로부터 수득될 수 있는 중쇄 단독 항체의 항원 결합 가변 영역을 포함하는 단일 도메인 항체이다. V_HH 단편은 약 15 kDa의 크기를 갖는다. 이들은 단일 도메인을 사용하여 동족 항원에 결합할 수 있는 단쇄 분자를 함유한다. V_HH 단편의 항원 결합 표면은, 일반적으로 평평하거나 오목한 종래의 항체보다 더 볼록하다(또는 돌출함). V_HH 단편은: 보존적 서열 및 구조로서 정의된 서열 및 구조를 가진 4개의 프레임워크 영역(또는 FR); 및 항원 결합에 관여하고 항원 특이성을 제공하며, 서열 성분 및 구조 형태 모두에서 높은 변동성을 나타내는 3개의 상보성 결정 영역(또는 CDR)으로 구성된다.

[0158] 또 다른 유형의 ISVD는 연골 어류의 IgNAR로부터 수득될 수 있고, 이의 단일 도메인 항체는 "V-NAR 단편"으로 지정된다.

[0159] V_HH 단편 및 V-NAR 단편은 불변 도메인을 포함하지 않으므로 일반적으로 부분/전장 및/또는 조작된/천연 중쇄-단독 항체의 일부인 Fc-영역을 갖지 않는다[Dooley 등의 문헌[(2006) Dev. Comp. Immunol. 30:43-56]; Muyldermans S.의 문헌[(2013) Annu Rev Biochem. 82:775-97]].

[0160] 카멜리드 V_HH 단편 및 이들의 생산 및/또는 단리 및/또는 사용을 위한 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 참조 문헌 WO94/04678 및 WO97/49805에서 확인할 수 있다. 연골성 어류 유래의 중쇄 면역글로불린 및 이의 가변 영역, 및 이들의 생산 및/또는 단리 및/또는 사용을 위한 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 WO2005/118629에서 확인할 수 있다.

[0161] V_HH 단편 내 아미노산 잔기의 총 수는 일반적으로 110~140개의 범위이다. 그러나, V_HH의 일부분, 단편, 또는 유사체가 아래에 개략된 추가 요건을 충족하면서 바람직하게는 본원에 기술된 목적에 적합한 경우, V_HH의 일부분, 단편, 또는 유사체는 이들의 길이 및/또는 크기에 특히 제한되지 않는다는 점에 주목해야 한다. V_HH 단편의 분자량은 일반적으로 12~15 kDa 범위이다. V_HH 단편에 대한 pI는 항체가 일반적으로 그런 것처럼 일반적으로 염기성인데, 이는 pI 값이 일반적으로 7을 초과하고, 종종 7.5 내지 8.5임을 의미한다. V_HH 단편은 일반적으로, 프레임워크 영역 1 및 3에 위치된 보존된 시스테인 쌍에 의해 일반적으로 형성되는 적어도 하나의 이황화 브릿지를 포함한다. 이러한 이황화 브릿지(들)는 V_HH 단편의 올바른 접힘 및 안정성을 보장하며, 예를 들어 측쇄 변형 및

/또는 접합이 V_HH 폴리펩티드에서 도입된 쌍을 형성하지 않은 시스테인(들)을 표적화하는 방식으로 수행되는 경우, 이러한 이황화 브릿지(들)를 보유하는 것이 바람직하다.

[0162] 본 명세서에서, V_HH 단편과 같은 ISVD의 CDR 서열은 Kabat 정의를 사용하여 결정된다(Kontermann 및 Dubel의 문헌[2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51]). 이 방법에 따르면, 가변 도메인의 CDR은 위치 31~35(CDR1), 위치 50~65(CDR2), 및 위치 95~102(CDR3)로서 정의된다. 그러나, ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드 내의 CDR 및 프레임워크(FR) 영역을 포함하여, 본원에 기술된 폴리펩티드 화합물 내 특정 아미노산 잔기 위치를 지칭할 때는, 달리 언급되지 않는 한, 연속 넘버링이 사용된다.

[0163] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ISVD 폴리펩티드"는 2개 이상의 ISVD, 예컨대 제1 ISVD(ISVD1) 및 제2 ISVD(ISVD2)를 포함하는 폴리펩티드를 지칭하며, ISVD1과 ISVD2는 예를 들어 요구되는 임의의 적절한 조성과 길이를 가진 링커(L_{1-2})에 의해 연결되거나 아무런 링커 없이 직접 도메인 융합에 의해 연결된다.

[0164] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "링커"는 화학적 엔티티 사이에 공유 결합을 형성하는 적어도 하나의 원자를 지칭한다. 화학적 엔티티가 펩티드 결합을 통해서만 연결되는 경우, 링커는 "펩티드 링커"로서 지칭될 수 있다. 그렇지 않은 경우, 링커는 "화학적 링커"로서 지칭될 수 있다.

[0165] ISVD 폴리펩티드의 예는 링커(L_{1-2})를 통해 연결된 2개의 ISVD이다.

[0166] ISVD 폴리펩티드의 또 다른 예는 하나 이상의 연장부를 추가로 포함하는 링커(L_{1-2})를 통해 연결된 2개의 ISVD이다.

[0167] ISVD 폴리펩티드의 또 다른 예는 링커(L_{1-2}) 없이 연결되고 하나 이상의 연장부, 예컨대 C-말단 및/또는 N-말단 연장부(이에 한정되지는 않음)를 추가로 포함하는 2개의 ISVD이다.

[0168] 링커(L_{1-2})는 예를 들어 반복을 포함하지 않거나 다중 반복을 포함하는 아미노산 서열로 구성될 수 있다.

[0169] 예를 들어, 링커는 2 내지 50개의 아미노산, 5 내지 40개의 아미노산, 또는 10 내지 30개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0170] 링커의 비제한적인 예는 *-GGGGS-* 링커, *-GQAPGQ-* 링커(서열번호 20), *-QAPGQA-* 링커(서열번호 16), *-GI-* 링커, *-GV-* 링커, *-GT-* 링커, *-GL-* 링커, 또는 다른 아미노산 복합 링커를 포함한다. 링커의 2가지 예는 아미노산 잔기의 길이가 각각 10개 및 30개인 GGGGS의 x2 및 x6 반복 복합체이다.

[0171] 의심의 여지를 없애기 위해, L_{1-2}의 아래 첨자인 $_{1-2}$는 연결되어 있는 ISVD의 특정 방향을 의미하지 않는다. 즉, L_{1-2}는 (N-말단에서 C-말단 방향으로) ISVD1을 ISVD2에 연결하거나, ISVD2를 ISVD1에 연결할 수 있다.

[0172] 서열번호 14~24는 L_{1-2} 링커의 비제한적인 예를 나타낸다.

[0173] 일부 구현예에서, ISVD 폴리펩티드는 하기 식 중 어느 하나에 개략된 것과 같은 연장부(E)를 포함한다.

[0174] ISVD1 - ISVD2, 또는

[0175] ISVD1 - ISVD2 - E, 또는

[0176] ISVD2 - ISVD1 - E, 또는

[0177] E - ISVD1 - ISVD2, 또는

[0178] ISVD1 - L_{1-2} - ISVD2 - E, 또는

[0179] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E, 또는

[0180] E - ISVD1 - L_{1-2} - ISVD2,

[0181] 연장부(E)는, 예를 들어, 하기 식(N-말단에서 C-말단 방향) 중 어느 하나에 개략된 것과 같이 ISVD 폴리펩티드에 부착될 수 있다:

[0182] ISVD1 - ISVD2, 또는

[0183] ISVD1 - ISVD2 - E, 또는

[0184] ISVD2 - ISVD1 - E, 또는

[0185] E - ISVD1 - ISVD2, 또는

[0186] ISVD1 - L_{1-2} - ISVD2 - E, 또는

[0187] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E, 또는

[0188] E - ISVD1 - L_{1-2} - ISVD2

[0189] ISVD 폴리펩티드는 바람직하게는 연장 모이어티를 포함한다. 이러한 경우, ISVD 폴리펩티드는 ISVD 폴리펩티드 유도체로서 지칭된다.

[0190] 일부 구현예에서, 제1 ISVD는 하나 이상의 연장 모이어티에 대한 부착 지점의 역할을 한다.

[0191] 일부 구현예에서, 제2 ISVD는 하나 이상의 연장 모이어티에 대한 부착 지점의 역할을 한다.

[0192] 일부 구현예에서, L_{1-2} 링커는 하나 이상의 연장 모이어티에 대한 부착 지점의 역할을 한다.

[0193] 의심의 여지를 없애기 위해, 연장 모이어티가 ISVD1-L_{1-2}-ISVD2에 대한 연장부(E)에 부착된 링커(L_P)를 포함하는 경우, 링커 L_P는 "연장부"의 일부로서 간주되지 않는다.

[0194] 일부 양태에서, ISVD 폴리펩티드는 비-ISVD, 예를 들어 작은 화학적 비-폴리펩티드 분자, 탄수화물, 지방산, 또는 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 또는 단백질, 예컨대 항체 또는 바람직하게는 항체 단편과 화학적으로 접합된다.

[0195] 일 구현예에서, ISVD 폴리펩티드는 링커를 사용하지 않고 IgG 항체로부터 Fc 도메인에 연결된다.

[0196] 또 다른 구현예에서, ISVD 폴리펩티드는 링커에 의해 IgG 항체로부터 Fc 도메인 또는 이의 단편에 연결된다.

[0197] 바람직한 구현예에서, 연장부(들)는 ISVD 폴리펩티드에 융합되며, 따라서 화학적 접합에 의해 ISVD 폴리펩티드에 연결되지 않는다.

[0198] 일부 구현예에서, 연장 모이어티(들)는 ISVD 폴리펩티드에 융합되며, 따라서 화학적 접합에 의해 ISVD 폴리펩티드에 연결되지 않는다.

[0199] 본원에서 사용되는 용어 "등전점" 또는 "pI"는 단백질(예: 항체)의 전체 순전하가 0인 pH 값을 지칭한다. 단백질에는 많은 하전된 기가 있을 수 있으며, 등전점에서는 이러한 모든 전하의 합이 0이다. 등전점을 초과하는 pH에서, 단백질의 전체 순전하는 음인 반면, 등전점 미만의 pH 값에서, 단백질의 전체 순전하가 양일 것이다.

[0200] pI는 이론적인 등전점이거나 실험적으로 결정된 등전점일 수 있다.

[0201] 당업자는 단백질의 등전점를 결정하는 방법을 알고 있다. 가장 일반적으로, 단백질의 등전점은 단백질의 아미노산 서열에 기반하여 연산된다. 단백질의 등전점을 결정할 수 있는 다수의 (온라인) 도구를 이용할 수 있으며, 여기에는 "ExPASy Compute pI/Mw"; ExPASy 서버 상의 Protein Identification and Analysis Tools 참조; Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), pp. 571-607 등이 있다. 바람직하게는, Skoog 및 Wichman의 알고리즘(1986)에서, 아미노산 잔기의 pKa가 pI를 계산하기 위해 사용된다.

[0202] pI는 실험적으로 결정될 수도 있고, 전하 변이체는, 예를 들어 등전점 전기영동(IEF) 겔 전기영동, 모세관 등전점 전기영동(cIEF) 겔 전기영동과 같은 전하 기반 분리 기술을 사용하여 분리될 수 있다.

[0203] 일 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 내의 제1 및 제2 ISVD는 V-NAR 단편이고, 이러한 화합물은 "V-NAR 폴리펩티드"로서 불린다.

[0204] 또 다른 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 내의 제1 및 제2 ISVD는 V_HH 단편이고, 이러한 화합물은 "V_HH 폴리펩티드"로서 불린다. 하나의 이러한 구현예에서, 제1 V_HH 단편은 FIX/FIXa에 결합할 수 있고 제2 V_HH 단편은 FX/FXa

에 결합할 수 있다. 바람직한 구현예에서, V_HH 폴리펩티드는 이중 특이적 V_HH 폴리펩티드이다.

[0205] 의심의 여지를 없애기 위해, 다중-, 삼중- 또는 이중특이적이라는 용어는, V_HH 단편과 같은 ISVD에 결합된 항원의 수를 반영하도록 의도되며, 알부민과 같은(이에 한정되지는 않음) 연장 모이어티(존재하는 경우)에 결합된 분자는 포함하지 않는다.

[0206] 일 구현예에서, 연장 모이어티가 없는 V_HH 폴리펩티드의 분자량은 27 내지 29 kDa 범위이다.

[0207] 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 연장 모이어티(들)를 포함하고 임의로 하나 이상의 연장부를 포함하는 V_HH 폴리펩티드(V_HH 폴리펩티드 유도체)의 분자량은 28 내지 33 kDa 범위이다.

[0208] 당업자는 상기 구현예가 V-NAR 폴리펩티드에도 유사하게 적용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0209] 본원에서 사용되는 용어 "유리 시스테인"은 반응, 예를 들어 화학적 접합에 이용할 수 있는 폴리펩티드 사슬 내 시스테인 잔기이며, 따라서 천연 또는 조작된 내부 이황화 브릿지의 일부가 아니다. 본질적으로, 유리 시스테인이 접합에 사용될 수 있지만, 재조합적으로 도입된 유리 시스테인을 포함하는 유리 시스테인 잔기는 숙주 세포에서 폴리펩티드를 재조합 발현시키는 동안 시스테인, 호모시스테인, 또는 글루타티온과 같은 작은 티올로 종종 차단된다. 이는 하나 이상의 유리 시스테인(들)이 도입된 ISVD 폴리펩티드의 재조합 생산에서도 관찰된다. 따라서, 비스(p-설포나토페닐)페닐포스핀 이수화물 또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염과 같은 적절한 환원제를 사용하는 환원 반응을 사용하여 관심 모이어티, 예컨대 C18 이산 감마-2xOEG 지방산 모이어티와 같은 연장 모이어티(이에 한정되지는 않음)에 접합하기 위한 유리 시스테인을 유리시키고 제조할 수 있다.

[0210] 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 폴리펩티드, 예컨대 V_HH 폴리펩티드는 다중특이적, 예컨대 이중특이적 또는 삼중특이적(이에 한정되지는 않음)일 수 있다.

[0211] 본원에서 사용되는 용어 "이중특이적 ISVD 폴리펩티드" 또는 "이중특이적 V_HH 폴리펩티드"는 동일한 항원 상의 2개의 상이한 항원 또는 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드를 각각 지칭한다.

[0212] 본원에서 사용되는 용어 "삼중특이적 ISVD 폴리펩티드" 또는 "삼중특이적 V_HH 폴리펩티드"는 동일한 항원 상의 3개의 상이한 항원 또는 3개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있거나 상이한 2개의 항원 상에 존재하는 3개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드를 각각 지칭한다.

[0213] 본원에서 사용되는 용어 "다중특이적 ISVD 폴리펩티드" 또는 "다중특이적 V_HH 폴리펩티드"는 동일한 항원 상의 2개 이상의 상이한 항원 또는 2개 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드를 각각 지칭한다. 따라서, 다중특이적 ISVD 폴리펩티드 또는 다중특이적 V_HH 폴리펩티드는 이중특이적 및 삼중특이적 ISVD 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드를 각각 포함한다.

[0214] 당업자는 전술한 내용이 (연장 모이어티를 포함하는) 폴리펩티드 유도체에도 적용된다는 것을 이해할 것이다.

[0215] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "구강 생체이용률" 또는 "경구 생체이용률"은 약물의 정맥내 투여 후 전신 순환에 존재하는 투여된 약물의 양 대비 상기 약물의 경구 투여 후 전신 순환에 존재하는 투여된 약물의 양(시간 대비 투여된 약물의 혈장 농도 곡선 아래 면적으로서 추정함)을 지칭한다.

[0216] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "파라토프(paratope)"는 항원이 특이적으로 결합하는, 즉 항원과 물리적으로 접촉하는 ISVD 상의 면적 또는 영역을 지칭한다.

[0217] ISVD, V_HH 단편, 및 이의 표적 사이에 있는 복합체의 공간적 좌표에 의해 정의된 X-선 유래 결정 구조의 맥락에서, 용어 파라토프는, 문맥에 의해 달리 명시되거나 반대로 표시되지 않는 한, FIX/FIXa 또는 FX/FXa 내의 중원자로부터 4 Å 이내의 거리에서 중원자(비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 ISVD 잔기로서 본원에서 구체적으로 정의된다.

[0218] 주어진 ISVD/항원 쌍에 대한 파라토프(및 에피토프)는 실시예에 기술된 것들과 같은 일상적인 방법에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, ISVD와 항원이 결합될 수 있고 ISVD/항원 복합체가 결정화될 수 있다. 복합체의 결정 구조는 ISVD와 이의 항원 간의 특이적 상호작용 부위를 식별하도록 결정되고 사용될 수 있다.

[0219] 용어 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 일반적으로 안전하고, 비독성이며, 인간 약학적 용도로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 데 유용한 부형제를 의미한다. 이러한 부형제는 예를 들어 고상, 액상, 또는 반고상일 수 있다.

[0220] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "혈장 반감기"는 환자에게 투여된 물질의 양의 절반이 정상적인 생물학적 과정에 의해 환자의 혈청 또는 혈장으로부터 대사되거나 제거되는데 필요한 시간을 지칭한다.

[0221] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "우선적으로 결합하는"은 V_HH 단편과 같은 ISVD 상의 결합 영역이 또 다른 성분에 우선하여, 또는 다른 성분보다 유리하게 하나의 성분(예: 활성화된 FIX)에 결합하는 것을 의미하는 것으로 이해해야 한다. 이와 같이, "우선적 결합"은 배타적 결합 또는 다른 성분의 검출가능하지 않는 결합을 반드시 요하는 것은 아니다. 예를 들어, 항-FIX(a) V_HH 단편과 같은 항-FIX(a) ISVD는 활성화되지 않은 FIX와 비교했을 때 활성화된 FIX에 우선적으로 결합할 수 있다.

[0222] 용어 "응혈 촉진 항체(procoagulant antibody)"는, 예를 들어, 혈액 응고 과정을 가속화하고/하거나 하나 이상의 응혈 인자의 효소 활성을 증가시킴으로써 혈액 응고를 강화시키는 항체를 지칭한다.

[0223] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "응혈 촉진 활성(procoagulant activity)"는, 예를 들어, 혈액 응고 과정을 가속화하고/하거나 하나 이상의 응혈 인자의 효소 활성을 증가시킴으로써 혈액 응고를 강화시키는 화합물, 예컨대 항체의 능력을 지칭한다. 따라서, 용어 "응혈 촉진 활성"은 아래에 열거된 활성 중 하나 이상을 포함한다(이에 한정되지는 않음):

[0224] FIXa-매개 FX 활성화에 기초한 비색 (발색성 또는 형광성) 검정에 의해 측정했을 때, 인자 IXa-매개 인자 X 활성화를 강화함. 상기 검정은 FXa 특이적 펩티드 기질의 절단을 통해 FXa를 측정한다. 기질이 생산되면, 흡광도에 의해 광학적으로 측정될 수 있는 색상이 나타난다.

[0225] 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(APTT)과 같은 응고 검정에 의해 측정했을 때, 응고 시간의 단축은 응혈의 고유한 공통 경로의 활성을 측정한다. 혈장을 접촉 활성화제(예를 들어 엘라그산 또는 카올린) 및 인지질을 함유하는 APTT 시약과 함께 미리 인큐베이션한다. 염화칼슘을 첨가하여 피브린 혈전 형성을 촉진한다. 가능한 판독은 응고 시간 또는 혈전 파형이다.

[0226] 교정된 자동 혈전촬영술(CAT)과 같은 트롬빈 생성 검정에서 측정했을 때, 트롬빈 생성을 강화함. 트롬보그램은 응고 혈장 내 트롬빈의 농도를 기술하므로, 지혈 시스템의 기능적 시험이다. 검정은 시간 경과에 따라 트롬빈에 의한 형광성 기질 Z G R AMC의 절단에 의해 생성된 형광을 측정하는 것에 기초한다. 본원의 실시예 8에 사용된 방법을 또한 참조한다.

[0227] 예를 들어, ROTEM(회전성 혈전탄성 계측법)과 같은 검정에 의해 전단 응력 하에 전혈에서, 점탄성 지혈 방법에 의해 측정했을 때, 혈전 형성의 전체적인 점탄성 특성을 강화함. 기기에서 볼 베어링 핀은 고정 컵 내에서 회전한다. 샘플이 응고되는 동안, 샘플의 피브린 가닥이 컵의 벽과 핀 사이에 형성되고, 가닥의 강도는 검출된 핀의 운동에 영향을 미친다.

[0228] 혈소판 활성화 후, 폰 빌레브란트 인자(Von Willebrand Factor, VWF)에 의해 매개된 콜라겐에 대한 혈소판 부착을 기반으로 하여 혈소판 기능 분석기에 의해 측정했을 때, 전혈 응고 시간(WBCT)을 단축시킴. 높은 전단 응력이 생성되고, 이는 혈소판 부착 및 혈소판 응집을 초래한다. 혈류의 시작에서 종료까지의 시간이 측정된다.

[0229] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 바람직하게는 1, 2, 3, 또는 4개의 "연장 모이어티"(PM)를 포함한다. 보다 바람직하게는 1개 또는 2개의 연장 모이어티를 포함한다.

[0230] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "연장 모이어티"는 반감기 연장 특성을 갖고 "연장기"(P) 및 임의 "링커"(L_P)를 포함하는 모이어티를 지칭한다. 따라서, 용어 "연장"은 반감기 연장을 지칭하고, 따라서 연장기 또는 연장 모이어티는 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드의 반감기를 연장시키는 것을 목적으로 작용한다.

[0231] 연장 모이어티(PM)는 연장기 "P" 및 임의 링커(L_P)를 포함한다.

[0232] 각각의 연장 모이어티는 바람직하게는 화합물의 폴리펩티드 백본 내 표면 노출된 리신 또는 시스테인 잔기에 부착된다. 부착 지점은 일반적으로 R1로 지칭된다(둘 이상의 연장 모이어티가 부착되는 경우, R2, R3 등으로 지칭되며, 여기서 R1 ≠ R2 ≠ R3 등임).

[0233] 당업자는 부착에 적합한 다른 표면 노출된 잔기(들)를 식별할 수 있을 것이다.

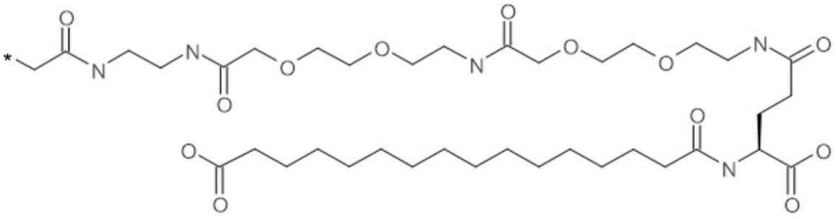
[0234] 연장 모이어티는 하나의 연장기로 이루어질 수 있다.

[0235] 연장 모이어티는 하나의 링커(L_P) 및 하나의 연장기(P)를 포함할 수 있다.

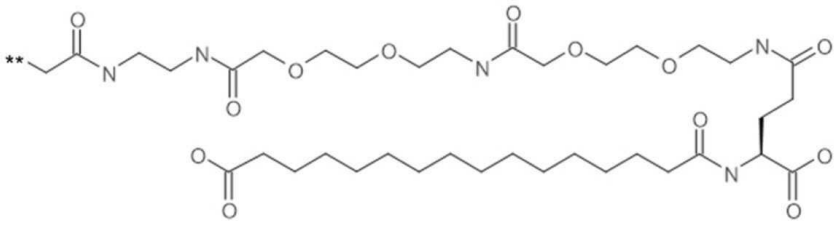
[0236] 연장 모이어티는 하나의 링커 및 2개 이상의 연장기를 포함할 수 있다.

[0237] 링커(L_P)가 존재할 때, 연장 모이어티는 L_P를 통해 ISVD 폴리펩티드 백본에 부착된다. 링커(L_P)가 없을 때, P는 폴리펩티드 백본에 부착된다.

[0238] 일 구현예에서, 제1 및 제2 연장 모이어티가 존재하며, 여기서 상기 제1 연장 모이어티는 다음의 구조를 포함하고:

[0239] 

[0240] 제2 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하되:

[0241] 

[0242] 여기서 '*' (R1)는 제1 연장 모이어티에 대한 ISVD 폴리펩티드 상의 부착 지점을 나타내고,

[0243] '**' (R2)는 제2 연장 모이어티에 대한 ISVD 폴리펩티드 상의 부착 지점을 나타내고,

[0244] '*'는 서열번호 629의 위치 257에 있는 Cys이고,

[0245] '**'는 서열번호 629의 위치 259에 있는 Cys이다.

[0246] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 단일 연장 모이어티가 부착/접합되는 단일 시스테인 또는 리신 잔기를 포함할 수 있다.

[0247] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 2개의 리신 잔기 및 2개의 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0248] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 2개의 리신 잔기 및 2개의 동일한 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0249] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 2개의 리신 잔기 및 2개의 동일하지 않은 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0250] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 3개의 리신 잔기 및 3개의 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0251] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 3개의 리신 잔기 및 3개의 동일한 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0252] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 3개의 리신 잔기 및 3개의 동일하지 않은 연장 모이어티를 포함할 수 있다(예를 들어, 제1 및 제2 연장 모이어티는 동일할 수 있고, 제3 연장 모이어티는 상기 제1 및 제2 모이어티와 다를 수 있음).

[0253] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 2개의 시스테인 잔기 및 2개의 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0254] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 2개의 시스테인 잔기 및 2개의 동일한 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0255] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 2개의 시스테인 잔기 및 2개의 동일하지 않은 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0256] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 3개의 시스테인 잔기 및 3개의 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0257] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 3개의 시스테인 잔기 및 3개의 동일한 연장 모이어티를 포함할 수 있다.

[0258] 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드는 3개의 시스테인 잔기 및 3개의 동일하지 않은 연장 모이어티를 포함할 수 있다(예를 들어, 제1 및 제2 연장 모이어티는 동일할 수 있고, 제3 연장 모이어티는 상기 제1 및 제2 모이어티와 다를 수 있음).

[0259] ISVD 폴리펩티드가 2개 또는 3개의 연장 모이어티를 포함하는 경우, 연장 모이어티는 바람직하게는 유사하거나, 더 바람직하게는 실질적으로 동일하거나, 가장 바람직하게는 동일하다.

[0260] 본원에 개시된 연장 모이어티와 같은 화학적 모이어티의 맥락에서, 유사성 및/또는 동일성은 당업계에 알려진 임의의 적합한 컴퓨터 프로그램 및/또는 알려진 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.

[0261] 연장 모이어티를 포함하는 화합물은 "유도체"로서 지칭할 수 있다. 예를 들어, "ISVD 폴리펩티드 유도체"는 연장 모이어티를 포함하는 ISVD 폴리펩티드이고, "V_HH 폴리펩티드 유도체"는 연장 모이어티를 포함하는 V_HH 폴리펩티드이며, "V-NAR 폴리펩티드 유도체"는 연장 모이어티를 포함하는 V-NAR 폴리펩티드인 것으로 이해된다.

[0262] 연장 모이어티는 알부민에 비공유적으로 결합하여, 혈류에서 ISVD 폴리펩티드 유도체의 순환을 촉진하고 이의 반감기를 연장할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 연장 모이어티는 알부민 결합 모이어티이다.

[0263] 연장기(P)는 아실기를 포함할 수 있다. 아실기는 분지형 또는 비분지형 아실기일 수 있다. 아실기는 포화 또는 불포화 아실기일 수 있다. 연장기는 지방 아실기를 포함할 수 있다. 아실기는 분지형 또는 비분지형 아실기일 수 있다. 아실기는 포화 또는 불포화 아실기일 수 있다.

[0264] 연장기는 원위 카르복시산기를 포함할 수 있다.

[0265] 연장기는 지방산기를 포함할 수 있다.

[0266] 연장기는 지방산기 및 아미드기를 포함할 수 있다.

[0267] 연장기는 원위 카르복시산기 및 아미드기를 포함할 수 있다.

[0268] 연장기는 알킬기를 포함할 수 있다.

[0269] 연장기는 아릴기를 포함할 수 있다.

[0270] 연장기는 테트라졸기를 포함할 수 있다.

[0271] 연장기는 설폰산기를 포함할 수 있다.

[0272] 연장기는 페녹시기를 포함할 수 있다.

[0273] 연장기는 벤조산기를 포함할 수 있다.

[0274] 연장기는 8~30개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 연장기는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0275] 연장기는 6~30개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다. 연장기는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함하는 탄소 사슬을 포함할 수 있다.

[0276] 연장기는 12~26개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. "연장기"는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0277] 연장기는 10~26개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다. 연장기는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함하는 탄소 사슬을 포함할 수 있다.

[0278] 연장기는 16~22개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0279] 연장기는 14~20개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다. 연장기는 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함하는 탄소 사슬을 포함할 수 있다.

[0280] 연장기는 16~22개의 연속 탄소 원자 및 14~20개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다.

[0281] 연장기는 16개의 연속 탄소 원자 및 14개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다.

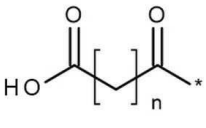
[0282] 연장기는 18개의 연속 탄소 원자 및 16개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다.

[0283] 연장기는 20개의 연속 탄소 원자 및 18개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다.

[0284] 연장기는 22개의 연속 탄소 원자 및 20개의 연속 $-CH_2-$ 기를 포함할 수 있다.

[0285] 일부 구현예에서, 연장기는 다음에 의해 정의되는 기를 포함하며:

[0286] 화학식 a: $HOOC-(CH_2)_n-CO-^*$ (식 중 n은 8~30 범위의 정수임), 이는 C(n+2) 이산으로서 지칭되거나

[0287] 화학식 a1:  로서 정의될 수 있다(식 중 n은 8~30 범위의 정수임).

[0288] 연장기는 올리고펩티드를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 연장기 올리고펩티드는 10 내지 40개 아미노산, 예컨대 10 내지 30개 아미노산, 예컨대 15 내지 25개 아미노산, 및 바람직하게는 20개 아미노산이다. 연장기 올리고펩티드 서열 조성은 예를 들어, 서열번호 3 및 4에서 융합 서열로서 예시된 QRLMEDICLPRWGCLWEDDF(서열번호 736)일 수 있다[WO01/45746 A2 참조]. 화합물 #71은, 예를 들어 QRLMEDICLPRWGCLWEDDFGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 4)로 구성된 50-아미노산 N-말단 연장 모이어티를 포함하며, 여기서 잔기 1~20은 연장기(P)이고 잔기 21~50은 링커(L_P)이다.

[0289] 연장기는 아미노산 링커 L_P를 통해 ISVD 또는 ISVD 폴리펩티드에 부착될 수 있다.

[0290] 일 구현예에서, L_P는 ISVD 폴리펩티드 백본 내 리신 또는 시스테인 잔기의 측쇄에 연장기(P)를 결합시킬 수 있다.

[0291] ISVD 폴리펩티드 유도체는 2개의 연장 모이어티를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 탄소 원자를 포함한다. ISVD 폴리펩티드는 2개의 연장 모이어티를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 연장기(P)는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18개의 연속 $-CH_2-$기를 포함한다.

[0292] ISVD 폴리펩티드 유도체는 2개의 C14 이산, 2개의 C16 이산, 또는 2개의 C18 이산을 포함할 수 있다.

[0293] ISVD 폴리펩티드 유도체는 3개의 연장 모이어티를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 탄소 원자를 포함하는 연장기를 포함한다. ISVD 폴리펩티드는 3개의 연장 모이어티를 포함할 수 있으며, 여기서 연장기는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18개의 연속 $-CH_2-$기를 포함한다.

[0294] 의심의 여지를 없애기 위해, 예를 들어, 연장 모이어티가 알부민에 결합할 수 있더라도, 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드가 이중특이적, 삼중특이적, 또는 다중특이적인지 여부를 정의하는 측면에서, 연장 모이어티는 결합제로 간주되지는 않는다.

[0295] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 폴리펩티드는 표 1에 도시된 것들 중 어느 하나로부터 선택되는 연장기를 포함할 수 있다.

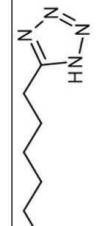
[0296] 표 2에서, L_P는 예시된 연장기(P)를 ISVD 폴리펩티드 백본에 연결하는 임의 링커를 나타낸다. R1은 ISVD 폴리펩티드에서의 부착 부위를 나타낸다.

표 1

[표 1] 연장기(P)의 예(*'는 L_P 또는 R1에 대한 부착 지점을 나타냄)

연장기 ID	구조	사용된 화합물
P1	C12 이산	화합물 #65
P2	C16 이산	화합물 #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #21, #22
P3	C18 이산	화합물 #4, #5, #24, #26, #28, #30, #32, #34, #36, #38, #40, #58, #59, #60, #61, #62, #63, #66

[0297]

P4	 C20 이산	화합물 #67
P5	테트라졸	화합물 #68
P6	서열번호 3 및 4에서 융합 서열로서 예시된 것과 같은 QRLMEDICLPRWGCLWEDDF 알부민-결합제 올리고펩티드. 서열번호 3은 10개 아미노산의 긴 글리신-세린 링커와 함께 알부민-결합제 올리고펩티드를 기술하는 반면, 서열번호 4는 30개 아미노산의 긴 글리신-세린 링커와 함께 알부민-결합제 올리고펩티드를 기술한다.	화합물 #70, #71, #72, #73

[0298]

[0299] 일 구현예에서, 연장기는 직접, 즉 링커 L_P를 사용하지 않고(즉, 공유 결합을 통해) ISVD 폴리펩티드 상에 접합된다.

[0300] 다른 구현예에서, 연장기는 링커 L_P를 사용하여 ISVD 폴리펩티드 상에 직접 접합된다. 비제한적인 예가 아래에 제공된다.

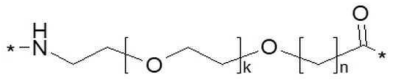
[0301] L_P 링커가 존재하는 경우, 이는 Ado, Aeep 또는 Aeeep, 설폰아미드, Trx, ε-Lys, Ahx, Glu, γGlu, Gly, Ser, Ala, 및/또는 Thr을 포함할 수 있다.

[0302] L_P 링커는 다음의 화학식으로 표시될 수 있는 적어도 하나의 모이어티를 포함할 수 있으며:

[0303] 화학식 1: $*\text{-NH-}(CH_2)_2\text{-}(O\text{-}(CH_2))_k\text{-O-}(CH_2)_n\text{-CO-}*$

[0304] 또는

[0305] 화학식 2:

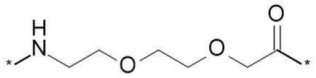
[0306] ,

[0307] 식 중 k는 1~5의 범위 내 정수이고, n은 1~5 범위 내 정수이다.

[0308] k=1이고 n=1일 때, 링커 요소는 Ado, 또는 8-아미노-3,6-디옥사옥타노일로 지정될 수 있고, 이는 다음 화학식으로 표시될 수 있다:

[0309] 화학식 3: *-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-CO-*

[0310] 또는

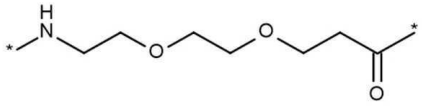
[0311] 화학식 4: 

[0312] k=1이고 n=2일 때, 링커 요소는 Aeep로 지정될 수 있고, 이는 다음 화학식으로 표시될 수 있다:

[0313] 화학식 5: *-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-CO-*

[0314] 또는

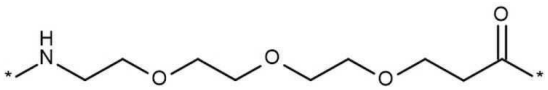
[0315] 화학식 6:

[0316] 

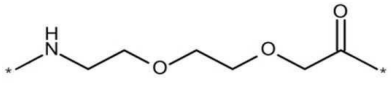
[0317] k=2이고 n=2일 때, 링커 요소는 Aeeep로 지정될 수 있고, 이는 다음 화학식으로 표시될 수 있다:

[0318] 화학식 7: *-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-CO-*

[0319] 또는

[0320] 화학식 8: 

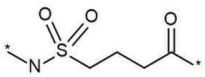
[0321] 임의 링커(L_P)는 다음의 화학식을 갖는 8-아미노-3,6-디옥사-옥탄산(OEG) 기를 포함할 수 있다:

[0322] 화학식 8a: 

[0323] 임의 링커(L_P)는 설폰아미드-C4 모이어티를 포함할 수 있다. 설폰아미드-C4 기는 4-부타노일 기에 부착되고 다음 화학식을 갖는 설폰아미드 기이다:

[0324] 화학식 9: *-NH-S(O)$_2$-CH_2-CH_2-CH_2-CO-*

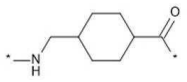
[0325] 또는

[0326] 화학식 10: 

[0327] 임의 링커는 L_P는 Trx를 포함할 수 있다. Trx는 다음 화학식을 갖는 트라넥삼산, 트랜스-4-(아미노메틸)시클로헥산카르복시산으로도 지칭된다:

[0328] 화학식 11: *-NH-CH_2-(C_6H_{10})-CO-*

[0329] 또는

[0330] 화학식 12: 

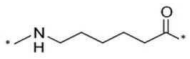
[0331] 링커 L_P는 엡실론-리신(ε-Lys)을 포함할 수 있다.

[0332] 링커 L_P는 리신(Lys)을 포함할 수 있다.

[0333] 링커 L_P는 Ahx를 포함할 수 있다. Ahx는 다음에 의해 정의되는 아미노카프로산, 6-아미노헥사논산으로도 지칭된다:

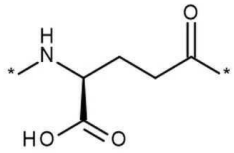
[0334] 화학식 13: *-NH-$(CH_2)_5$-CO-*

[0335] 또는

[0336] 화학식 14:  .

[0337] 링커 L_P는 다음과 같은 Glu 디-라디칼을 포함할 수 있으며:

[0338] 화학식 15:

[0339] 

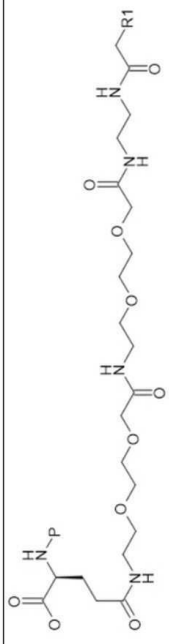
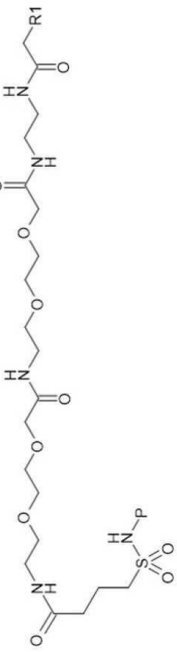
[0340] 여기서 Glu 디-라디칼은 p번 포함될 수 있고, p는 1~3 범위의 정수이다.

[0341] 화학식 15는 감마-Glu 또는 간단히 γGlu로서 지칭될 수도 있는데, 이는 화학식 15가 리신의 엡실론-아미노기에 대한 연결을 위해 사용되는 아미노산 글루탐산의 감마 카르복시기라는 사실 때문이다. 전술한 바와 같이, 다른 링커 요소는 예를 들어 다른 Glu 잔기, 또는 Ado 분자일 수 있다. Glu의 아미노기는 연장 모이어티의 카르복시기와, 또는 예를 들어 Ado 분자(존재하는 경우)의 카르복시기와, 또는 예를 들어 또 다른 Glu(존재하는 경우)의 감마-카르복시기와 아미드 결합을 차례로 형성한다.

[0342] 대안적으로, 본원에 개시된 ISVD 폴리펩티드 유도체는 아래 표 2에 도시된 것들 중 어느 하나로부터 선택된 링커(L_P)를 포함할 수 있다. R1은 연장 모이어티가 부착되는 ISVD 폴리펩티드의 잔기를 나타내고, P는 연장기를 나타낸다.

표 2

[표 21(임의의) 연장 모이어티 링커("L_P")의 예]

링커(L_P) ID	구조	사용된 유도체 화합물#
L_P1		화합물 #4, #5, #24, #26, #28, #30, #32, #34, #36, #38, #40, #58, #59, #60, #61, #62, #63, #65, #66, #67, #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #21, #22
L_P2		화합물 #68
L_P3	"R1" - GGGGSGGGGS (서열번호 25) - "P" 또는 "P" - GGGGSGGGGS (서열번호 25) - "R1"	화합물 #70, #72
L_P4	"R1" - GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 26) – "P" 또는 "P" - GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 26) – "R1"	화합물 #71, #73

[0343]

[0344] 본원의 개시에 기초하여, 당업자는 본원에 개시된 바와 같은 특정 ISVD 폴리펩티드 유도체에 사용하기 위한 최적의 L_P 및 L_{1-2} 링커(들)를 결정할 수 있고, 임의로 일부 제한된 일상적인 실험 후에 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 링커는 바람직하게는 ISVD 폴리펩티드 내 각각의 ISVD, 예컨대 V_HH 단편이 이의 표적에 결합할 수 있도록 한다. 다시, 본원의 개시에 기초하여, 당업자는 본원에 개시된 바와 같은 특정 ISVD 폴리펩티드 유도체에 사용하기 위한 최적의 링커(들)를 결정할 수 있고, 임의로 일부 제한된 일상적인 실험 후에 결정할 수 있을 것이다.

[0345] 부착이 발생하는 ISVD 또는 ISVD 폴리펩티드 백본 내 아미노산 잔기는 본원에서 R1로 지정된다. 둘 이상의 연장 모이어티가 부착되는 경우, 추가 부착 부위(들)는 R2, R3 등으로 지정될 수 있다.

[0346] 연장 모이어티는 ISVD 폴리펩티드 백본의 제1 ISVD 부분 내 시스테인 또는 리신 잔기에 부착될 수 있다.

[0347] 연장 모이어티는 ISVD 폴리펩티드 백본의 제2 ISVD 부분 내 시스테인 또는 리신 잔기에 부착될 수 있다.

[0348] 연장 모이어티는 ISVD 폴리펩티드 백본의 임의의 링커(L_{1-2}) 내 시스테인 또는 리신 잔기에 부착될 수 있다.

[0349] 연장 모이어티는 ISVD 폴리펩티드 백본 내 리신 잔기에 공유 부착될 수 있다. 연장 모이어티는, 연장 모이어티 내의 카르복시산기와 리신 잔기의 엡실론 아미노기 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 부착될 수 있다.

[0350] 연장 모이어티는 ISVD 폴리펩티드 백본 내 시스테인 잔기에 공유 부착될 수 있다. 연장 모이어티는 폴리펩티드 내 시스테인 잔기의 황 원자와 연장 모이어티 사이에 형성된 티오에테르 결합을 통해 부착될 수 있다.

[0351] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 개시된 화합물은 1개, 2개, 또는 3개의 리신 또는 시스테인 잔기 및 1개, 2개, 또는 3개의 연장 모이어티를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 연장 모이어티는 단일 리신 또는 시스테인 잔기의 측쇄에 부착된다.

[0352] 시스테인 잔기를 통해 부착이 발생하는 경우, 시스테인은 바람직하게는 유리 시스테인이다.

[0353] 일부 구현예에서, 재조합 DNA 기술에 의해 도입된 유리 시스테인은 하나 이상의 C16-, C17-, 또는 C18 이산 감마-Glu 2xOEG 지방산 모이어티를 부착하기 위한 접합 부위로서의 역할을 할 수 있다.

[0354] 바람직한 구현예에서, 재조합 DNA 기술에 의해 임의로 도입된 유리 시스테인은 1개, 2개, 또는 3개의 C18 이산 감마-Glu 2xOEG 지방산 모이어티

[0355] (IUPAC 명칭 S{베타-AA#}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-카르복시-4-(17-카르복시헵타데칸오일-아미노)부탄오일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]-에틸아미노]-2-옥소에틸], AA# 아미노산 부착)를 부착하기 위한 접합 부위로서의 역할을 할 수 있다.

[0356] 또 다른 바람직한 구현예에서, 재조합 DNA 기술에 의해 임의로 도입된 유리 시스테인은 1개, 2개, 또는 3개의 C17 이산 감마-Glu 2xOEG 지방산 모이어티

[0357] (IUPAC 명칭 S{베타-AA#}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-카르복시-4-(16-카르복시헥사데칸오일-아미노)부탄오일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]아세틸]아미노]-에틸아미노]-2-옥소에틸], AA# 아미노산 부착)를 부착하기 위한 접합 부위로서의 역할을 할 수 있다.

[0358] 가장 바람직한 구현예에서, 재조합 DNA 기술에 의해 도입된 유리 시스테인은 1개, 2개, 또는 3개의 C16 이산 감마-Glu 2xOEG 지방산 모이어티

[0359] (IUPAC 명칭 S{베타-AA#}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-카르복시-4-(15-카르복시펜타데칸오일-아미노)부탄오일]아미노]에톡시]에톡시]아세틸]아미노]에톡시]아세틸]아미노]-에틸아미노]-2-옥소에틸], AA# 아미노산 부착)를 부착하기 위한 접합 부위로서의 역할을 할 수 있다.

[0360] 본원에서 사용되는 용어 "표준 크로마토그래피"는 단백질 A, 양이온 교환, 음이온 교환, 소수성 상호작용, 및 수산화인회석 크로마토그래피와 같은 표준 크로마토그래피 방법을 포함한다.

[0361] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표면 노출된 아미노산 잔기"는 용매 분자(일반적으로, 이는 대부분 물 분자일 수 있음)와 접촉할 수 있는 측쇄를 가진 아미노산 잔기를 지칭한다. 그러나, 측쇄가 용매 분자와 완전히 접촉해야하는 것은 아니며, 측쇄의 일부가 용매 분자와 접촉할 때에도, 아미노산 잔기는 "표면에 위치한 아미노산"으로서 정의된다. 폴리펩티드의 표면에 위치된 아미노산 잔기는 ISVD 표면에 가깝게 위치한 잔기를 포함할 수도 있는데, 이러한 잔기는 용매 분자와 (비록 부분적이라도) 접촉하는 측쇄를 가진 다른 아미노산 잔기(들)와 상호 전하 영향을 주고 받을 수 있다. 당업자는, 예를 들어 상업적으로 또는 공개적으로 이용 가능한 소프트웨어를 사용하는 상동성 모델링 또는 머신 러닝에 의해, 폴리펩티드 또는 항체의 상동성 모델 또는 머신 러닝 기반 3차원 분자 모델을 제작할 수 있따. 대안적으로, 3차원 분자 모델 생성을 위해 X-선 결정학과 같은 방법을 사용하는 것이 가능하다. 표면 상에서 노출될 수 있는 아미노산 잔기는, MOE(Chemical Computing Group) 또는 Bioluminate(Schrodinger)와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 항체의 3차원 분자 모델의 좌표를 사용해 결정할 수 있다. 표면 노출된 부위는 당 기술 분야에 알려진 알고리즘을 사용해 결정할 수 있다(예를 들어, Lee 및 Richards의 문헌[(1971) J. Mol. Biol. 55:379-400]; Connolly, J. Appl. Cryst.의 문헌[(1983) 16:548-558]). 표면 노출 가능한 부위는 항체로부터 수득한 3차원 구조 정보의 단백질 모델링 및 분석에 적합한 소프트웨어를 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 목적을 위해 이용할 수 있는 소프트웨어는, 예를 들어 MOE(Chemical Computing Group) 또는 Bioluminate(Schrodinger)를 포함한다. 용매가 접근할 수 있는 표면적($Å^2$ 단위)은 프로브 반경이 1.4 Å인 물 프로브를 사용하여 계산된다. 또한, 퍼스널 컴퓨터용 소프트웨어를 사용하여 표면 노출된 영역 및 면적을 결정하는 방법은 Pacios에 의해 기술된 적이 있다(Pacios의 문헌[Comput. Chem. 18(4):377-

386 (1994)]; [J. Mol. Model. 1:46-53 (1995)]). 전술한 것과 같은 이러한 정보에 기초하여, 용매와 접촉하는 항체의 표면에 위치한 적절한 아미노산 잔기를 선택할 수 있다.

[0362] **약학적 조성물**

[0363] 본원에 개시된 것과 같은 V_HH 폴리펩티드 유도체는 약학적 조성물로 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함한다.

[0364] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "부형제"는 활성 치료 성분(API) 이외의 임의의 성분을 광범위하게 지칭한다. 부형제는 다양한 목적으로, 예를 들어, 담체, 비히클, 필러, 결합제, 윤활제, 활택제, 붕해제, 유동 조절제, 결정화 억제제, 가용화제, 안정화제, 착색제, 향미제, 계면활성제, 유화제, 전달제, 하이드로트로프, 또는 이들의 조합으로서 사용될 수 있고/있거나 활성 약학적 성분(들)의 투여 및/또는 흡수를 개선하는 데 사용될 수 있다.

[0365] 사용된 각각의 부형제의 양은 당업계의 통상적인 범위 내에서 다양할 수 있다. 경구 투여 형태를 제형화하는 데 사용될 수 있는 기술 및 부형제는 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 8th edition, Sheskey 등(Eds.)의 문헌[American Pharmaceuticals Association and the Pharmaceutical Press, publications department of the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain (2017)]; 및 Remington 및 Allen(Eds.) 등의 문헌 [Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press (2013)]에 기술되어 있다.

[0366] 바람직한 구현예에서, V_HH 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 전달제 및 향수성 물질을 추가로 포함한다.

[0367] 바람직한 전달제는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산(NAC)의 염이다.

[0368] 일부 구현예에서, 전달제는 WO2007/121318에 기술된 것과 같이 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염이다. 일부 구현예에서, 전달제는 8-(살리실로일아미노)옥타논산나트륨으로도 알려져 있는 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산나트륨(본원에서 "SNAC"로 지칭됨)이다.

[0369] 약학적 조성물은 바람직하게는 하나 이상의 향수성 물질(hydrotrope)을 포함한다. 계면활성제와 같은 향수성 물질은 친수성 부분 및 소수성 부분 모두를 포함하고 미셀(micelles) 및 자가-응집체를 형성할 수 있지만, 이들은 미셀의 가용화 없이 용질을 용해시킨다. 일 구현예에서, 향수성 물질은 SNAC의 용해도를 증가시킬 수 있다. 일 구현예에서, 향수성 물질은 니코틴아미드이다.

[0370] 일 구현예에서, 조성물은 고형 조성물이다. 조성물은 경구 투여에 적합한 형태, 예컨대 정제, 봉지, 또는 캡슐일 수 있다. 하나의 이러한 구현예에서, 조성물은 정제로서 제형화된다. 본원에 제공된 고형 조성물은 가속화된 용해를 가능하게 하므로, 활성 약학적 성분의 신속한 흡수를 가능하게 한다.

[0371] **투여 및 투여량**

[0372] 본원에 개시된 바와 같은 화합물, 예컨대 V_HH 폴리펩티드 유도체는 적절한 약학적 조성물로 비경구적으로, 예컨대 정맥 내, 예컨대 근육 내, 예컨대 피하 투여될 수 있다. 화합물은 비경구가 아닌 경로를 통해 투여될 수 있고, 바람직하게는 경구 투여(PO)될 수 있다. 화합물은 예방적으로 투여될 수 있다. 화합물은 치료적으로(요구시) 투여될 수 있다.

[0373] **피하 투여**

[0374] 피하 투여에 의해 전달되는 화합물의 투여량은, 병태의 중증도에 따라 매일 약 0.01 mg 내지 1 mg의 화합물이거나, 바람직하게는 매일 약 0.05 mg 내지 5 mg, 더욱 바람직하게는 매일, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 또는 매주 약 0.1 mg 내지 10 mg일 수 있다. 적절한 투여량은 특정 화합물의 경우 이의 생체 내 반감기 또는 평균 체류 시간 및 생물학적 활성을 포함하는 해당 화합물의 특성에 따라 조정될 수도 있다.

[0375] 일 구현예에서, 본 발명은 상기 조성물의 함량을 갖는 주사 장치에 관한 것이다.

[0376] **경구(PO) 투여**

[0377] PO로 전달될 화합물의 투여량은 병태의 중증도에 따라 매일, 2일마다, 3일마다 약 1 mg 내지 약 300 mg의 화합물일 수 있다. 적절한 투여량은 특정 화합물의 경우 이의 생체 내 반감기 또는 평균 체류 시간 및 생물학적 활성을 포함하는 해당 화합물의 특성에 따라 조정될 수도 있다.

[0378] 본원에 개시된 바와 같은 화합물을 함유하는 조성물은 예방적 치료를 위해 투여될 수 있고/있거나 일부 실시예에서는 치료적 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료적 용도에서, 조성물은 전술한 임의의 출혈 장애와 같은 질환을 이미 앓고 대상체에게 질환 또는 이의 합병증을 치료, 완화 또는 부분적으로 저지하는 데 충분한 양으로 투여된다. 이를 달성하기에 적절한 양은 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"으로서 정의된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이러한 목적을 위해 유효한 양은 질환 또는 부상의 중증도뿐만 아니라 대상체의 체중 및 전반적인 상태에 따라 달라지게 된다.

[0379] **구현예**

[0380] 1. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 유도체로서,

[0381] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1),

[0382] 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2),

[0383] 적어도 하나의 연장 모이어티,

[0384] 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및

[0385] 임의로, 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0386] 2. 구현예 1에 있어서, 다음 식을 갖는 ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0387] ISVD1 - ISVD2, 또는

[0388] ISVD1 - ISVD2 - E, 또는

[0389] ISVD2 - ISVD1 - E, 또는

[0390] E - ISVD1 - ISVD2, 또는

[0391] ISVD1 - L1-2 - ISVD2 - E, 또는

[0392] ISVD2 - L1-2 - ISVD1 - E, 또는

[0393] E - ISVD1 - L1-2 - ISVD2.

[0394] 3. 구현예 1에 있어서, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖는 ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0395] ISVD1 - ISVD2, 또는

[0396] ISVD2 - ISVD1, 또는

[0397] ISVD1 - ISVD2 - E, 또는

[0398] ISVD2 - ISVD1 - E, 또는

[0399] E - ISVD1 - ISVD2, 또는

[0400] E - ISVD2 - ISVD1, 또는

[0401] ISVD1 - L1-2 - ISVD2, 또는

[0402] ISVD2 - L1-2 - ISVD1, 또는

[0403] ISVD1 - L1-2 - ISVD2 - E, 또는

[0404] ISVD2 - L1-2 - ISVD1 - E, 또는

[0405] E - ISVD1 - L1-2 - ISVD2, 또는

[0406] E - ISVD2 - L1-2 - ISVD1.

[0407] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 연장 모이어티(들)가 하나 이상의 표면 노출된 잔기(들)에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0408] 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖되:

[0409] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E

[0410] 하나 이상의 연장 모이어티(들)가 하나 이상의 표면 노출된 아미노산 잔기에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0411] 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖되:

[0412] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E

[0413] 2개의 연장 모이어티가 E 상의 하나 이상의 표면 노출된 잔기(들)에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0414] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖고:

[0415] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E

[0416] 추가로 다음을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0417] E 내의 제1 표면 노출된 잔기 및 제2 표면 노출된 잔기에 각각 부착되는 제1 연장 모이어티 및 제2 연장 모이어티.

[0418] 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, L_{1-2}는 "40 대 60%" 내지 "60 대 40%"의 소수성 아미노산 대 친수성 아미노산의 비율을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0419] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0420] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링) 중 적어도 4, 5, 6, 7, 또는 8개를 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0421] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링)을 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0422] 12. 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0423] 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, 및 L178(연속 넘버링)을 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0424] 14. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0425] 15. 구현예 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179(연속 넘버링) 중 3, 4, 5, 또는 6개를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0426] 16. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179(연속 넘버링)을 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0427] 17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서,

[0428] 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있고,

[0429] 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, 및 L178(연속 넘버링) 중 적어도 하나를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0430] 18. 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서,

[0431] 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링)을 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있고,

[0432] 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179(연속 넘버링)를 포함하는 인자 X(서열번호 2) 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0433] 19. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 제1 ISVD는 아미노산 잔기 F29, N30, Y32, T54, D99, R100, S101, F102, L103, F104, Q106, A107, 및 N113을 포함하는 파라토프(서열번호 35)를 포함하고,

[0434] 제2 ISVD는

[0435] a) D32, A33, M34, G35, Y37, L47, V48, A49, G50, I51, M52, N57, T58, N59, Y60, T61, K97, V99, R101, 및 P102를 포함하는 파라토프(서열번호 27), 또는

[0436] b) A33, M34, G35, W47, V48, A49, A50, I51, S52, S57, T58, N59, Y60, A61, A97, A98, D99, G105, L107, 및 Y109(연속 넘버링)를 포함하는 파라토프(서열번호 734)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0437] 20. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD는

[0438] 1)

[0439] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 IYTMS(서열번호 172),

[0440] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 173),

[0441] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 174)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0442] 21. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 ISVD는

[0443] (A)

[0444] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RYAMG(서열번호 168),

[0445] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 169),

[0446] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 170)를 포함하거나;

[0447] (B)

[0448] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RLAMG(서열번호 128),

[0449] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 129),

[0450] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 130)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0451] 22. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD는

[0452] 1)

[0453] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환(Kabat 정의)을 포함하는 IYTMS(서열번호 172),

[0454] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 173),

[0455] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 174)를 포함하거나;

[0456] 상기 제2 ISVD는

[0457] (A)

[0458] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RYAMG(서열번호 168),

[0459] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 169),

[0460] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 170)를 포함하거나;

[0461] (B)

[0462] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RLAMG(서열번호 128),

[0463] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 129),

[0464] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 DDSVGDGDYDY(서열번호 130)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0465] 23. 구현예 20 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 치환(들)은 보존적 치환(들)인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0466] 24. 구현예 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD의 서열은 서열번호 107, 115, 123, 131, 155, 또는 171에 의해 식별된 서열과 각각 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0467] 25. 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 ISVD의 서열은 서열번호 103, 111, 119, 127, 151, 또는 167에 의해 식별된 서열과 각각 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0468] 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD의 서열은 서열번호 107, 115, 123, 131, 155, 또는 171에 의해 식별된 서열과 각각 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일하고, 상기 제2 ISVD의 서열은 서열번호 103, 111, 119, 127, 151, 또는 167에 의해 식별된 서열과 각각 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0469] 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD는 다음 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0470] V_HH-2.20 (서열번호 171),

[0471] V_HH-2.18 (서열번호 155),

[0472] V_HH-2.15 (서열번호 131),

[0473] V_HH-2.13 (서열번호 115),

[0474] V_HH-2.14 (서열번호 123), 또는

[0475] V_HH-2.12 (서열번호 107).

[0476] 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 ISVD는 다음 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0477] V_HH-1.20 (서열번호 167),

[0478] V_HH-1.18 (서열번호 151),

[0479] V_HH-1.15 (서열번호 127),

[0480] V_HH-1.13 (서열번호 111),

[0481] V_HH-1.14 (서열번호 119), 또는

[0482] V_HH-1.12 (서열번호 103).

[0483] 29. 구현예 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD는 다음 서열을 포함하고:

[0484] V_HH-2.20 (서열번호 171),

[0485] V_HH-2.18 (서열번호 155),

[0486] V_HH-2.15 (서열번호 131),

[0487] V_HH-2.13 (서열번호 115),

[0488] V_HH-2.14 (서열번호 123), 또는

[0489] V_HH-2.12 (서열번호 107);

[0490] 상기 제2 ISVD는 다음 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0491] V_HH-1.20 (서열번호 167),

[0492] V_HH-1.18 (서열번호 151),

[0493] V_HH-1.15 (서열번호 127),

[0494] V_HH-1.13 (서열번호 111),

[0495] V_HH-1.14 (서열번호 119), 또는

[0496] V_HH-1.12 (서열번호 103).

[0497] 30. 구현예 29에 있어서,

[0498] 상기 제1 ISVD는 V_HH-2.20(서열번호 171)의 서열을 포함하고,

[0499] 상기 제2 ISVD는 V_HH-1.20(서열번호 167)의 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0500] 31. 구현예 29에 있어서,

[0501] 상기 제1 ISVD는 V_HH-2.18(서열번호 155)의 서열을 포함하고,

[0502] 상기 제2 ISVD는 V_HH-1.18(서열번호 151)의 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0503] 32. 구현예 29에 있어서,

[0504] 상기 제1 ISVD는 V_HH-2.15(서열번호 131)의 서열을 포함하고,

[0505] 상기 제2 ISVD는 V_HH-1.15(서열번호 127)의 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0506] 33. 구현예 29에 있어서,

[0507] 상기 제1 ISVD는 V_HH-2.13(서열번호 115)의 서열을 포함하고,

[0508] 상기 제2 ISVD는 V_HH-1.13(서열번호 111)의 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0509] 34. 구현예 29에 있어서,

[0510] 상기 제1 ISVD는 V_HH-2.14(서열번호 123)의 서열을 포함하고,

[0511] 상기 제2 ISVD는 V_HH-1.14(서열번호 119)의 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0512] 35. 구현예 29에 있어서,

[0513] 상기 제1 ISVD는 V_HH-2.12(서열번호 107)의 서열을 포함하고,

[0514] 상기 제2 ISVD는 V_HH-1.12(서열번호 103)의 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0515] 36. 구현예 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 연장 모이어티(들)는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 연장 기를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0516] a) C16 이산, C17 이산, C18 이산, C19 이산, C20 이산, C21 이산, 또는 C22 이산,

[0517] b) 테트라졸,

[0518] c) 알부민-결합제 펩티드, 예컨대 RLIEDICLPRWGCLWEDD (서열번호 737)

[0519] d) FcRn-결합제 펩티드, 예컨대 QRFCTGHFGGLYPCNG (서열번호 738), 및

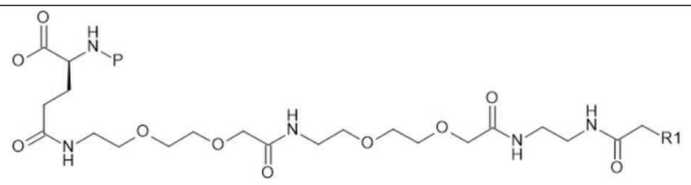
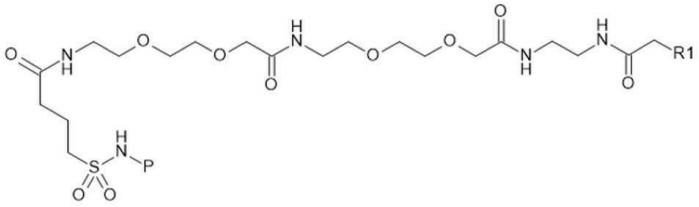
[0520] e) Fc-결합제 펩티드, 예컨대 FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDN (서열번호 739).

[0521] 37. 구현예 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 연장 모이어티(들)는 C16 이산, C17 이산, C18 이산, C19 이산, 및 C20 이산으로 이루어진 군으로부터 선택된 연장기를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0522] 38. 구현예 34에 있어서, 연장기(들)는 C16 이산 연장기인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0523] 39. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 연장 모이어티는 연장기를 ISVD1, L_{1-2}, ISVD2, 또는 E에 부착하는 링커 L_P를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0524] 40. 구현예 39에 있어서, L_P는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

L_P1	
L_P2	
L_P3	"R1" - GGGGSGGGGS (서열번호 25) - "P" 또는 "P" - GGGGSGGGGS (서열번호 25) - "R1"
L_P4	"R1" - GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 26) – "P" 또는 "P" - GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 26) – "R1"

[0525]

[0526] 41. 구현예 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 연장 모이어티(들)는 ISVD2의 위치 13 및/또는 ISVD1의 위치 12, 14, 15, 42, 44, 63, 및/또는 85(연속 넘버링) 중 하나 이상에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0527] 42. 구현예 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 유도체는 C-말단 연장부를 포함하고, 연장 모이어티(들)는 상기 C-말단 연장부에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0528] 43. 구현예 1 내지 42 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 유도체는 제1 및 제2 연장 모이어티 및 C-말단 연장부를 포함하고, 제1 연장 모이어티 및 제2 연장 모이어티는 C-말단 연장부에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0529] 44. 구현예 43에 있어서, C-말단 연장부는 ISVD1에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0530] 45. 구현예 43에 있어서, C-말단 연장부는 ISVD2에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0531] 46. 구현예 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 연장 모이어티들은 동일한, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0532] 47. 구현예 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 연장 모이어티(들)가 표면 노출된 잔기에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

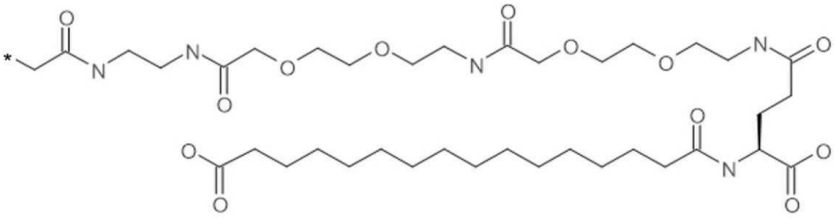
[0533] 48. 구현예 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 연장 모이어티(들)가 표면 노출된 잔기에 부착되고, 상기 표면 노출된 잔기는 CDR 영역에 있는 잔기가 아닌, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0534] 49. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 연장 모이어티(들)가 하나 이상의 시스테인 또는 리신 잔기(들)에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

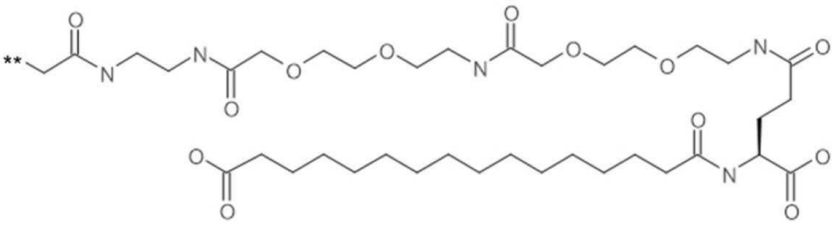
[0535] 50. 구현예 43에 있어서,

[0536] 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 서열번호 629를 포함하고,

[0537] 상기 제1 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하고:

[0538] 

[0539] 제2 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하되:

[0540] 

[0541] 여기서 '*' (R1)는 제1 연장 모이어티에 대한 ISVD 폴리펩티드 상의 부착 지점을 나타내고,

[0542] '**' (R2)는 제2 연장 모이어티에 대한 ISVD 폴리펩티드 상의 부착 지점을 나타내고,

[0543] '*'는 서열번호 629의 위치 257에 있는 Cys이고,

[0544] '**'는 서열번호 629의 위치 259에 있는 Cys인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0545] 51. 구현예 1 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 등전점 전기영동을 사용해 결정했을 때, 상기 폴리펩티드의 등전점은 6.5 이하인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0546] 52. 구현예 1 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩티드 유도체는 이중 특이적 또는 삼중 특이적 폴리펩티드 유도체와 같은 다중 특이적 폴리펩티드 유도체인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0547] 53. 구현예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 이중특이적 폴리펩티드 유도체인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0548] 54. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩티드 유도체는 12~50 kDa 범위의 분자량, 예컨대 12~48 kDa, 예컨대 12~43 kDa, 예컨대 12~37 kDa, 예컨대 12~35 kDa, 예컨대 12~32 kDa, 예컨대 12~27 kDa, 예컨대 12~22 kDa, 예컨대 12~18 kDa, 예컨대 14~50 kDa, 예컨대 14~48 kDa, 예컨대 14~43 kDa, 예컨대 14~37 kDa, 예컨대 14~35 kDa, 14~32 kDa, 예컨대 14~27 kDa, 예컨대 14~22 kDa, 예컨대 14~18 kDa, 예컨대 22~50 kDa, 22~48 kDa, 예컨대 22~43 kDa, 예컨대 22~37 kDa, 예컨대 22~35 kDa, 예컨대 22~32 kDa, 예컨대 22~31 kDa, 예컨대 22~30 kDa, 예컨대 22~29 kDa, 예컨대 22~28 kDa, 예컨대 22~27 kDa, 예컨대 24~50 kDa, 24~48 kDa, 예컨대 24~43 kDa, 예컨대 24~37 kDa, 예컨대 24~35, 예컨대 24~32 kDa, 예컨대 24~31 kDa, 24~30 kDa, 24~29 kDa, 24~28 kDa, 예컨대 24~27 kDa, 예컨대 36~48 kDa, 예컨대 36~43 kDa, 예컨대 36~37 kDa, 예컨대 28~36 kDa, 예컨대 29~33 kDa, 예컨대 29~30, 예컨대 약 29, 예컨대 29, 예컨대 약 30, 예컨대 30, 예컨대 30~32 kDa, 또는 예컨대 31 kDa의 분자량을 갖는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0549] 55. 구현예 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 막 표적화된 ISVD 폴리펩티드 유도체가 아닌, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0550] 56. 구현예 1 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 연장 모이어티는 원혈질 막의 성분, 예컨대 아미노인지질, 예컨대 포스파티딜세린 및/또는 포스파티딜에탄올아민에 결합할 수 없는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0551] 57. 구현예 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 상기 연장 모이어티는 혈소판 표면 단백질, 예컨대 GP1b-IX, 콜라겐 샤페론 HSP47, 에프린 B1, 티올 이성화 효소 단백질 ERP5, 조혈 전구 키나아제 1-상호작용 단백질 55(HIP-55), 당단백질 V1, 혈소판 당단백질 1b, 혈소판 유래 성장 인자 수용체, 혈소판 내피 응집 수용체 I, CD31, CD36, MARKS, 멀티머린(multimerin), 인테그린 알파 IIb/베타 3, 전사체-1(TLT-1)과 같은 골수 세포 상에서 발현되는 유발 수용체(TREM), 인테그린-연결된 키나아제(ILK), 직신(zyxin), 콜라겐, P-셀렉틴, 인자 XIII, P-셀렉틴 당단백질 리간드-1, 인테그린 알파 6 베타 1, 트롬보스폰딘, 폰빌레브란트 인자, G6B, CD42b, 신탁신 결합 단백질 2, 포스파티딜에탄올아민, 피브리노겐/피브린, 필라민, 스토마틴, 스핑고지질, CD31, CD36, CD40, CD41, CD42c, CD42, CD49b, CD61, CD62P, CD63, CD69, CD107a, CD107b, CD109, CD154, PECAM-1, 및/또는 ERPS에 결합할 수 없는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0552] 58. 구현예 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 연장 모이어티는 막 결합 폴리펩티드, 예컨대 당단백질, GPIIb/IIIa, β2GP1, TLT-1, 셀렉틴, 응혈 인자 또는 응고 인자 복합체, 및/또는 셀렉틴에 결합할 수 없는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0553] 59. 구현예 1 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 혈액 내 평균 체류 시간 최종 반감기는 상기 연장 모이어티가 없는 ISVD 폴리펩티드와 비교했을 때 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 3, 4, 5, 또는 7일만큼 연장되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0554] 60. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 ISVD는 V_HH 단편인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0555] 61. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 및/또는 제2 ISVD는 V-NAR 단편인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0556] 62. 구현예 1 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 ISVD 폴리펩티드 유도체는 V_HH 폴리펩티드 유도체인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0557] 63. 응혈촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체로서,

[0558] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 V_HH,

[0559] 인자 X(서열번호 2)에 결합할 수 있는 제2 V_HH,

[0560] 상기 제1 V_HH 및 상기 제2 V_HH를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및

[0561] C-말단 연장부(E), 및

[0562] 1개 또는 2개의 연장 모이어티(들)를 포함하고,

[0563] (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖되:

[0564] "제2 V_HH" - L_{1-2} - "제1 V_HH" - E

[0565] I)

[0566] 상기 제1 V_HH는

[0567] CDR1: IYTMS (서열번호 172)(Kabat 정의),

[0568] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 173),

[0569] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 174)를 포함하고,

[0570] 상기 제2 V_HH는

[0571] CDR1: RYAMG (서열번호 168),

[0572] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 169),

[0573] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 170)를 포함하거나;

[0574] II)

[0575] 상기 제1 V_HH는

[0576] CDR1: IYTMS (서열번호 132),

[0577] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 133),

[0578] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 134)를 포함하고,

[0579] 상기 제2 V_HH는

[0580] CDR1: RLAMG (서열번호 128),

[0581] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 129),

[0582] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 130)를 포함하는, 응혈촉진 VHH 폴리펩티드 유도체.

[0583] 64. 구현예 63에 있어서,

[0584] I)

[0585] 상기 제1 V_HH는 V_HH-2.20(서열번호 171)의 서열을 포함하고,

[0586] 상기 제2 V_HH는 V_HH-1.20(서열번호 167)의 서열을 포함하고;

[0587] II)

[0588] 상기 제1 V_HH는 V_HH-2.18(서열번호 155)의 서열을 포함하고,

[0589] 상기 제2 V_HH는 V_HH-1.18(서열번호 151)의 서열을 포함하고;

[0590] III)

[0591] 상기 제1 V_HH는 V_HH-2.15(서열번호 131)의 서열을 포함하고,

[0592] 상기 제2 V_HH는 V_HH-1.15(서열번호 127)의 서열을 포함하고;

[0593] IV)

[0594] 상기 제1 V_HH는 V_HH-2.13(서열번호 115)의 서열을 포함하고,

[0595] 상기 제2 V_HH는 V_HH-1.13(서열번호 111)의 서열을 포함하고;

[0596] V)

[0597] 상기 제1 V_HH는 V_HH-2.14(서열번호 123)의 서열을 포함하고,

[0598] 상기 제2 V_HH는 V_HH-1.14(서열번호 119)의 서열을 포함하고;

[0599] VI)

[0600] 상기 제1 V_HH는 V_HH-2.12(서열번호 107)의 서열을 포함하고,

[0601] 상기 제2 V_HH는 V_HH-1.12(서열번호 103)의 서열을 포함하는, 응혈촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0602] 65. 구현예 1 내지 60 및 62 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 V_HH 폴리펩티드 유도체는 이중특이적 V_HH 폴리펩티드 유도체인, 응혈촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0603] 66. 구현예 63 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 링커 L_{1-2}는 아미노산 잔기 GQAPGQ(서열번호 20)를 포함하는, 응혈 촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

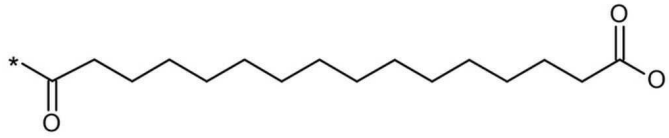
[0604] 67. 구현예 63 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 연장부(E)는 아미노산 잔기 GQACPC(서열번호 9)를 포함하는, 응

혈 촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0605] 68. 구현예 63 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 2개의 연장 모이어티가 위치 4 및 6(서열번호 9)에서 E에 각각 부착되는, 응혈 촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

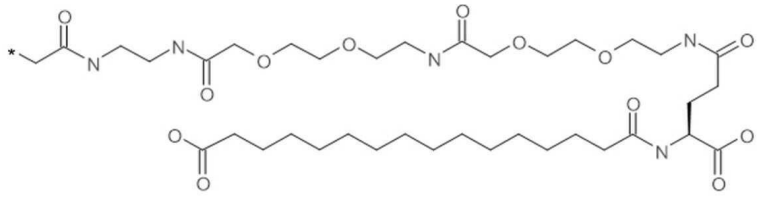
[0606] 69. 구현예 63 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 상기 2개의 연장 모이어티는 동일한, 응혈 촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0607] 70. 구현예 63 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 상기 2개의 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하는, 응혈 촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체:

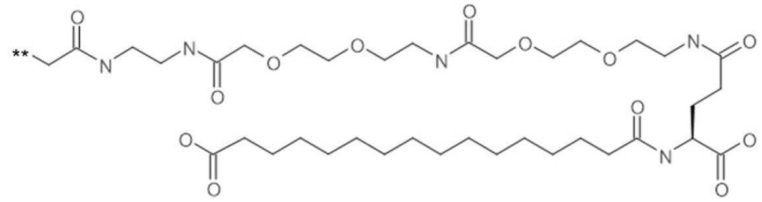
[0608] 

[0609] 71. 구현예 63 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 연장 모이어티를 포함하되,

[0610] 상기 제1 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하고:

[0611] 

[0612] 제2 연장 모이어티는 다음 구조를 포함하되:

[0613] 

[0614] 여기서 '*' (R1)는 제1 연장 모이어티에 대한 V_HH 폴리펩티드 유도체 상의 부착 지점을 나타내고,

[0615] '**' (R2)는 제2 연장 모이어티에 대한 V_HH 폴리펩티드 유도체 상의 부착 지점을 나타내고,

[0616] '*'는 서열번호 629의 위치 257에 있는 Cys이고,

[0617] '**'는 서열번호 629의 위치 259에 있는 Cys인, 응혈 촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0618] 72. 구현예 1 내지 71 중 어느 하나에 따른 ISVD 폴리펩티드 유도체 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체를 포함하는 약학적 조성물.

[0619] 73. 구현예 1 내지 71 중 어느 하나에 따른 ISVD 폴리펩티드 유도체 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체를 포함하는 경구 투여용 약학적 조성물.

[0620] 74. 구현예 72 또는 73에 있어서, ISVD 폴리펩티드 유도체는 V_HH 폴리펩티드 유도체인, 약학적 조성물.

[0621] 75. 구현예 72 또는 73에 있어서, ISVD 폴리펩티드 유도체는 V-NAR 폴리펩티드 유도체인, 약학적 조성물.

[0622] 76. 구현예 72 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노) 카프릴산의 염을 포함하는, 약학적 조성물.

[0623] 77. 구현예 76에 있어서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산나트륨(SNAC)인, 약학적 조성물.

[0624] 78. 구현예 76 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 니코틴아미드(NAM)를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

[0625] 79. 구현예 74 내지 78 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 V_HH 폴리펩티드 유도체, N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노) 카프릴산나트륨(SNAC), 니코틴아미드(NAM), 및 스테아린산 마그네슘을 포함하는, 약학적 조성물.

[0626] 80. 구현예 74 내지 78 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 약 7% w/w V_HH 폴리펩티드 유도체, 약 55% w/w N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노)카프릴산나트륨(SNAC), 약 36% w/w 니코틴아미드(NAM), 및 약 0.5% w/w 스테아린산 마그네슘을 포함하는, 약학적 조성물.

[0627] 81 구현예 73 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 액체 조성물인, 약학적 조성물.

[0628] 82. 구현예 73 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 고형 조성물인, 약학적 조성물.

[0629] 83. 구현예 82에 있어서, 상기 조성물은 정제, 약용 캔디, 또는 캡슐인, 약학적 조성물.

[0630] 84. 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법으로서, 구현예 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 ISVD 폴리펩티드 유도체 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0631] 85. 구현예 84에 있어서, 환자는 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병 또는 후천성 A형 혈우병을 앓고 있는 환자인, 치료 방법.

[0632] 86. 구현예 84 또는 85에 있어서, 치료는 예방적 치료인, 치료 방법.

[0633] 87. 구현예 84 내지 86 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 약학적 조성물은 경구 투여되는, 치료 방법.

[0634] 88. 구현예 84 내지 86 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 약학적 조성물은 피하 주사에 의해 투여되는, 치료 방법.

[0635] 89. 의약에 사용하기 위한 구현예 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 약학적 조성물.

[0636] 90. 혈우병, 예컨대 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병 또는 후천적 A형 혈우병을 치료하는 데 사용하기 위한 구현예 1 내지 83 중 어느 하나의 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0637] 91. 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병을 치료하는 데 사용하기 위한 구현예 1 내지 83 중 어느 하나의 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0638] 92. 구현예 89 내지 92 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물로서, 치료는 예방적 치료인, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0639] 93. 구현예 89 내지 92 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물로서, 상기 유도체 또는 조성물은 경구 투여되는, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0640] 94. 구현예 89 내지 92 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물로서, 상기 유도체 또는 조성물은 피하 주사에 의해 투여되는, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0641] 95. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 유도체를 생산하는 방법으로서, ISVD 폴리펩티드 유도체는

[0642] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1),

[0643] 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2),

[0644] 하나 이상의 연장 모이어티(들),

[0645] 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결할 수 있는 링커("L_{1-2}"), 및

[0646] 임의로, 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하고,

[0647] 상기 방법은 다음 단계를 포함하는, 방법:

[0648] a. ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점이 감소되도록, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 변형시키는 단계,

[0649] b. 숙주 세포를 배양하여 상기 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 암호화하는 상기 핵산을 발현시키는 단계,

[0650] c. 상기 숙주 세포 배양물로부터 상기 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 수집하는 단계,

[0651] d. 표준 크로마토그래피를 사용하여 상기 숙주 세포 배양물로부터 상기 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 정제하는 단계, 및

[0652] e. 연장 모이어티가 이미 존재하지 않는 한, 연장 모이어티를 ISVD 폴리펩티드에 부착하는 단계.

[0653] 96. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 생산하는 방법으로서, ISVD는 인자 IX(서열 번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1), 인자 X(서열 번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 연장 모이어티, 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결할 수 있는 링커("L_{1-2}"), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)("E")를 포함하고, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는, 방법:

[0654] a. ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점이 6.5 이하가 되도록, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 변형시키는 단계,

[0655] b. 숙주 세포를 배양하여 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 암호화하는 핵산을 발현시키는 단계,

[0656] c. 숙주 세포 배양물로부터 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 수집하는 단계,

[0657] d. 표준 크로마토그래피를 사용하여 숙주 세포 배양물로부터 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 정제하는 단계, 및

[0658] e. 연장 모이어티가 이미 존재하지 않는 한, 연장 모이어티를 ISVD 폴리펩티드에 부착하는 단계.

[0659] 97. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 경구 생체이용율을 증가시키기 위한 방법으로서, ISVD는 인자 IX(서열 번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1), 인자 X(서열 번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 연장 모이어티, 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결할 수 있는 링커("L_{1-2}"), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)("E")를 포함하고, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는, 방법:

[0660] a. ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점이 감소되도록, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 변형시키는 단계,

[0661] b. 숙주 세포를 배양하여 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 암호화하는 핵산을 발현시키는 단계,

[0662] c. 숙주 세포 배양물로부터 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 수집하는 단계,

[0663] d. 표준 크로마토그래피를 사용하여 숙주 세포 배양물로부터 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 정제하는 단계, 및

[0664] e. 연장 모이어티가 이미 존재하지 않는 한, 연장 모이어티를 ISVD 폴리펩티드에 부착하는 단계.

[0665] 98. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 경구 생체이용율을 증가시키기 위한 방법으로서, ISVD는 인자 IX(서열 번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1), 인자 X(서열 번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 연장 모이어티, 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결할 수 있는 링커("L_{1-2}"), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)("E")를 포함

하고, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는, 방법:

[0666] a. ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점이 6.5 이하가 되도록, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 변형시키는 단계,

[0667] b. 숙주 세포를 배양하여 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 암호화하는 핵산을 발현시키는 단계,

[0668] c. 숙주 세포 배양물로부터 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 수집하는 단계,

[0669] d. 표준 크로마토그래피를 사용하여 숙주 세포 배양물로부터 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 정제하는 단계, 및

[0670] e. 연장 모이어티가 이미 존재하지 않는 한, 연장 모이어티를 ISVD 폴리펩티드에 부착하는 단계.

[0671] 99. 구현예 95 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 등전점은 적어도 0.5 pH 단위만큼, 예컨대 적어도 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4 pH 단위만큼 감소되는, 방법.

[0672] 100. 구현예 95 내지 99 중 어느 하나에 있어서, 단계 e)는 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점을 증가시키지 않는, 방법.

[0673] 101. 구현예 95 내지 100 중 어느 하나에 있어서, 등전점은 등전점 전기영동을 사용하여 결정되는, 방법.

[0674] 102. 구현예 95 내지 101 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체는 단일 핵산에 의해 암호화되는, 방법.

[0675] 103. 구현예 95 내지 101 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체는 제1 및 제2 ISVD의 접합체이고, 상기 제1 및 제2 ISVD는 별도의 핵산에 의해 암호화되는, 방법.

[0676] 104. 구현예 95 내지 103 중 어느 하나에 있어서, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체는 V_HH 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체인, 방법.

[0677] 105. 구현예 95 내지 103 중 어느 하나에 따른 방법을 사용하여 생산된 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0678] 106. 구현예 95 내지 103 중 어느 하나에 따른 방법을 사용하여 수득될 수 있는 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0679] 107. 구현예 95 내지 104 중 어느 하나에 따른 방법을 사용하여 생산된 V_HH 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0680] 108. 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태(FIXa)에 결합할 수 있는 V_HH 단편으로서,

[0681] a. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환(Kabat 정의)을 포함하는 서열번호 172에 의해 식별되고,

[0682] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 173에 의해 식별되고,

[0683] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 174에 의해 식별되거나,

[0684] b. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 156에 의해 식별되고,

[0685] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 157에 의해 식별되고,

[0686] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 158에 의해 식별되거나,

[0687] c. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 132에 의해 식별되고,

[0688] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 133에 의해 식별되고,

[0689] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 134에 의해 식별되거나,

[0690] d. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 116에 의해 식별되고,

[0691] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 117에 의해 식별되고,

[0692] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 118에 의해 식별되거나,

[0693] e. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 124에 의해 식별되고,

[0694] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 125에 의해 식별되고,

[0695] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 126에 의해 식별되거나,

[0696] f. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 108에 의해 식별되고,

[0697] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 109에 의해 식별되고,

[0698] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 110에 의해 식별되는, V_HH 단편.

[0699] 109. FX(서열번호 2)에 결합할 수 있는 V_HH 단편으로서,

[0700] a. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 152에 의해 식별되고,

[0701] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 153에 의해 식별되고,

[0702] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 154에 의해 식별되거나,

[0703] b. CDR1 서열은 임의로 1개 또는 2개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 128에 의해 식별되고,

[0704] CDR2 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 129에 의해 식별되고,

[0705] CDR3 서열은 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 130에 의해 식별되는, V_HH 단편.

[0706] 110. 구현예 108 또는 109에 있어서, 상기 치환(들)은 보존적 치환(들)인, V_HH 단편.

[0707] 111. 구현예 108 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 상기 V_HH 단편은 FIX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태(FIXa)에 결합할 수 있고, FX(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태(FXa)에 결합할 수 있는 V_HH 폴리펩티드 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 제조에 사용하기 위한 중간체인, V_HH 단편.

[0708] 112. 구현예 108 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 상기 V_HH 폴리펩티드는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 제조에 사용하기 위한 중간체인, V_HH 폴리펩티드.

[0709] 113. 구현예 109 또는 110에 있어서, WO2019/096874에 기술된 것과 같은 항-FX ISVD 화합물 중 어느 하나와 비교했을 때 FIXa에 의해 FX가 단백질분해가 더 잘되게 만든다는 측면에서 활성이 개선되는, ISVD 또는 V_HH.

[0710] 114. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 유도체로서,

[0711] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1),

[0712] 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2),

[0713] 적어도 하나의 연장 모이어티,

[0714] 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및

[0715] 임의로, 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하되,

[0716] 상기 ISVD 폴리펩티드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, ISVD 폴리펩티드 유도체: 서열번호 615~691, 734, 또는 735.

[0717] 115. 서열번호 27~614 중 어느 하나의 서열을 포함하는 V_HH 단편.

[0718] 116. 서열번호 615~691 또는 734~735 중 어느 하나의 서열을 포함하는 V_HH 폴리펩티드 유도체.

[0719] 117. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 유도체로서,

[0720] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1),

[0721] 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2),

[0722] 적어도 하나의 연장 모이어티,

[0723] 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및

[0724] 임의로, 하나 이상의 연장부(들)(E)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0725] 118. 구현예 117에 있어서, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖고:

[0726] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E

[0727] 여기서 하나 이상의 연장 모이어티(들)가 하나 이상의 표면 노출된 아미노산 잔기에 부착되는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0728] 119. 구현예 118 또는 119에 있어서, (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖고:

[0729] ISVD2 - L_{1-2} - ISVD1 - E

[0730] 여기서 2개의 연장 모이어티가 E 상의 하나 이상의 표면 노출된 잔기(들)에 부착되고,

[0731] 유도체의 분자량은 20~35 kDa 범위인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0732] 120. 구현예 117 내지 119 중 어느 하나에 있어서,

[0733] 제1 ISVD는 아미노산 잔기 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링)을 포함하는 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있고,

[0734] 제2 ISVD는 아미노산 잔기 N173, P174, F175, L177, 및 L178(연속 넘버링)을 포함하는 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태 상의 에피토프에 결합할 수 있는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0735] **121.** 구현예 117 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD는

[0736] 1)

[0737] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 IYTMS(서열번호 172),

[0738] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 173),

[0739] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 174)를 포함하거나;

[0740] 2)

[0741] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환을 포함하는 IYTMS(서열번호 156),

[0742] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 157),

[0743] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 158)를 포함하거나;

[0744] 3)

[0745] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환을 포함하는 IYTMS(서열번호 132),

[0746] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 133),

[0747] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 134)를 포함하거나;

[0748] 4)

[0749] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환을 포함하는 IYTMS(서열번호 116),

[0750] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 117),

[0751] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 118)를 포함하거나;

[0752] 5)

[0753] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환을 포함하는 IYTMS(서열번호 124),

[0754] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 125),

[0755] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 126)를 포함하거나;

[0756] 6)

[0757] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환을 포함하는 IYTMS(서열번호 108),

[0758] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 GLRWTDSSTEYADSVKG(서열번호 109),

[0759] CDR3: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 110)를 포함하고;

[0760] 상기 제2 ISVD는

[0761] (A)

[0762] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RYAMG(서열번호 168),

[0763] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 169),

[0764] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 170)를 포함하거나;

[0765] (B)

[0766] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RYAMG(서열번호 152),

[0767] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 153),

[0768] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 154)를 포함하거나;

[0769] (C)

[0770] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RLAMG(서열번호 128),

[0771] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 129),

[0772] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 130)를 포함하거나;

[0773] (D)

[0774] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RLAMG(서열번호 112),

[0775] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 113),

[0776] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 114)를 포함하거나;

[0777] (E)

[0778] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RLAMG(서열번호 120),

[0779] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 121),

[0780] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 122)를 포함하거나;

[0781] (F)

[0782] CDR1: 임의로 1개 또는 2개의 치환(Kabat 정의)을 포함하는 RLAMG(서열번호 104),

[0783] CDR2: 임의로 1개, 2개, 또는 3개의 치환을 포함하는 AISRRGGSTNYADSVKG(서열번호 105),

[0784] CDR3: 임의로 1개, 2개 또는 3개의 치환을 포함하는 DDSVGDGYLDY(서열번호 106)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0785] **122.** 구현예 121에 있어서, 상기 치환(들)은 보존적 치환(들)인, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0786] **123.** 구현예 117 내지 122 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 ISVD는 다음 서열을 포함하고:

[0787] V_HH-2.20 (서열번호 171),

[0788] V_HH-2.18 (서열번호 155),

[0789] V_HH-2.15 (서열번호 131),

[0790] V_HH-2.13 (서열번호 115),

[0791] V_HH-2.14 (서열번호 123), 또는

[0792] V_HH-2.12 (서열번호 107);

[0793] 상기 제2 ISVD는 다음 서열을 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체:

[0794] V_HH-1.20 (서열번호 167),

[0795] V_HH-1.18 (서열번호 151),

[0796] V_HH-1.15 (서열번호 127),

[0797] V_HH-1.13 (서열번호 111),

[0798] V_HH-1.14 (서열번호 119), 또는

[0799] V_HH-1.12 (서열번호 103).

[0800] **124.** 응혈촉진 V_HH 폴리펩티드 유도체로서,

[0801] 인자 IX(서열번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 V_HH,

[0802] 인자 X(서열번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 V_HH,

[0803] 상기 제1 V_HH 및 상기 제2 V_HH를 연결하는 링커(L_{1-2}), 및

[0804] C-말단 연장부(E), 및

[0805] 1개 또는 2개의 연장 모이어티(들)를 포함하고,

[0806] (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음 식을 갖고:

[0807] "제2 V_HH" - L_{1-2} - "제1 V_HH" - E

[0808] 여기서

[0809] I)

[0810] 상기 제1 V_HH는

[0811] CDR1: IYTMS (서열번호 172)(Kabat 정의),

[0812] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 173),

[0813] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 174)를 포함하고,

[0814] 상기 제2 V_HH는

[0815] CDR1: RYAMG (서열번호 168),

[0816] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 169),

[0817] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 170)를 포함하거나;

[0818] II)

[0819] 상기 제1 V_HH는

[0820] CDR1: IYTMS (서열번호 156),

[0821] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 157),

[0822] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 158)을 포함하고,

[0823] 상기 제2 V_HH는

[0824] CDR1: RYAMG (서열번호 152),

[0825] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 153),

[0826] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 154)를 포함하거나;

[0827] III)

[0828] 상기 제1 V_HH는

[0829] CDR1: IYTMS (서열번호 132),

[0830] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 133),

[0831] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 134)를 포함하고,

[0832] 상기 제2 V_HH는

[0833] CDR1: RLAMG (서열번호 128),

[0834] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 129),

[0835] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 130)를 포함하거나;

[0836] IV)

[0837] 상기 제1 V_HH는

[0838] CDR1: IYTMS (서열번호 116),

[0839] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 117),

[0840] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY(서열번호 118)를 포함하고,

[0841] 상기 제2 V_HH는

[0842] CDR1: RLAMG (서열번호 112),

[0843] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 113),

[0844] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 114)를 포함하거나;

[0845] V)

[0846] 상기 제1 V_HH는

[0847] CDR1: IYTMS (서열번호 124),

[0848] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 125),

[0849] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 126)를 포함하고,

[0850] 상기 제2 V_HH는

[0851] CDR1: RLAMG (서열번호 120),

[0852] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 121),

[0853] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 122)를 포함하거나;

[0854] VI)

[0855] 상기 제1 V_HH는

[0856] CDR1: IYTMS (서열번호 108),

[0857] CDR2: GLRWTDSSTEYADSVKG (서열번호 109),

[0858] CDR3: DRSFLFAQALGATKNYEY (서열번호 110)를 포함하고,

[0859] 상기 제2 V_HH는

[0860] CDR1: RLAMG (서열번호 104),

[0861] CDR2: AISRRGGSTNYADSVKG (서열번호 105),

[0862] CDR3: DDSVGDGYLDY (서열번호 106)를 포함하는, ISVD 폴리펩티드 유도체.

[0863] **125.** 구현예 117 내지 124 중 어느 하나에 따른 ISVD 폴리펩티드 유도체 또는 V_HH 폴리펩티드 유도체를 포함하는 약학적 조성물.

[0864] **126.** 구현예 125에 있어서, 상기 조성물은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노) 카프릴산의 염을 포함하는, 약학적 조성물.

[0865] **127.** 구현예 126에 있어서, N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산의 염은 N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산나트륨(SNAC)인, 약학적 조성물.

[0866] **128.** 구현예 125 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 니코틴아미드(NAM)를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

[0867] **129.** 구현예 125 내지 128 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 고형 조성물인, 약학적 조성물.

[0868] **130.** 혈우병, 예컨대 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병 또는 후천적 A형 혈우병을 치료하는 데 사용하기 위한 구현예 117 내지 129 중 어느 하나의 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0869] **131.** 구현예 130에 따라 사용하기 위한 ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물로서, 상기 폴리펩티드 유도체 또는 조성물은 경구 투여되는, ISVD 폴리펩티드 유도체, V_HH 폴리펩티드 유도체, 또는 조성물.

[0870] 132. 응혈촉진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD) 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 경구 생체이용율을 증가시키기 위한 방법으로서, ISVD는 인자 IX(서열 번호 1) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제1 ISVD(ISVD1), 인자 X(서열 번호 2) 또는 이의 활성화된 형태에 결합할 수 있는 제2 ISVD(ISVD2), 연장 모이어티, 임의로, ISVD1 및 ISVD2를 연결할 수 있는 링커("L_{1-2}"), 및 임의로 하나 이상의 연장부(들)("E")를 포함하고, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는, 방법:

[0871] a. ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 등전점이 감소되도록, ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체의 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산을 변형시키는 단계,

[0872] b. 숙주 세포를 배양하여 상기 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 암호화하는 상기 핵산을 발현시키는 단계,

[0873] c. 상기 숙주 세포 배양물로부터 상기 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 수집하는 단계,

[0874] d. 표준 크로마토그래피를 사용하여 상기 숙주 세포 배양물로부터 상기 ISVD 폴리펩티드 또는 ISVD 폴리펩티드 유도체를 정제하는 단계, 및

[0875] e. 연장 모이어티가 이미 존재하지 않는 한, 연장 모이어티를 상기 ISVD 폴리펩티드에 부착하는 단계.

[0877] 바람직한 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 유도체는 N-말단에서 C-말단 방향으로(N-말단에서 C-말단을 향해) 항-FIX(a) V_HH ISVD에 연결된 항-FX ISVD를 포함한다.

[0878] 하나의 이러한 바람직한 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 유도체는 N-말단에서 C-말단 방향으로(N-말단에서 C-말단을 향해) 항-FIX(a) V_HH 단편에 연결된 항-FX V_HH 단편을 포함한다. 예를 들어 도 2a, 도 2b, 및 도 3a~3f 참조.

[0879] 바람직한 구현예에서, FIX(a)에 결합할 수 있는 ISVD 단편 또는 V_HH 단편은 활성화된 FIX(FIXa)에 우선적으로 결합한다.

[0880] 바람직한 구현예에서, FX에 결합할 수 있는 ISVD 단편 또는 V_HH 단편은 FX 효소원(zymogen), 즉 활성화되지 않은 FX에 우선적으로 결합한다.

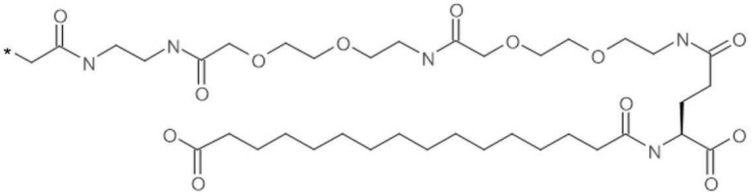
[0881] 일 구현예에서, 본 발명의 ISVD 폴리펩티드(유도체) 또는 V_HH 폴리펩티드(유도체)는 FX를 향해 FIXa의 효소 활성을 자극할 수 있다. 하나의 이러한 구현예에서, 상기 ISVD 폴리펩티드(유도체) 또는 V_HH 폴리펩티드(유도체)의 자극 특성은 FIX(a)에 결합할 수 있는 ISVD 또는 V_HH로부터 유래된다.

[0882] 도 5a 및 도 5b는 바람직한 항-FIX(a) 서열 및 항-FX ISVD(V_HH 단편) 서열의 서열 정렬을 각각 도시하는데, 여기서 CDR 서열은 밑줄이 쳐진 굵은 글씨체로 강조되어 있다.

[0883] 본 발명은 본원에 개시된 것과 같은 ISVD 단편 또는 V_HH 단편의 치환 변이체를 포함하는데, 이들 변이체는 본원에 개시된 개별 서열에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입은 본원에 개시된 것과 같은 CDR 서열 중 하나 이상에서의 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입이다. 일부 구현예에서, CDR 서열 중 하나 이상은 아미노산 치환을 거친다. 일부 구현예에서, 개별 CDR 서열은 각각 0, 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 559에 따른 V_HH 단편에서, CDR1은 치환을 포함하지 않을 수 있고, CDR2는 3개의 치환을 포함할 수 있고, CDR3은 1개의 치환을 포함할 수 있다. 치환 변이체는 바람직하게는 하나 이상의 아미노산(들)을 동일한 수의 아미노산(들)으로 치환하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 치환은 보존적 치환이다.

[0884] 일 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 유도체, 예컨대 V_HH 폴리펩티드 유도체는, 원형질 막의 성분, 예컨대 아미노인지질, 예컨대 포스파티딜세린, 및/또는 포스파티딜에탄올아민에 결합할 수 없는 적어도 하나의 연장 모이어티를 포함한다.

[0885] 일 구현예에서, 연장 모이어티는 다음의 구조를 포함하며:

[0886] 

[0887] 여기서 '*'는 V_HH 폴리펩티드에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0888] 일 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 유도체, 예컨대 V_HH 폴리펩티드 유도체는 혈소판 표면 단백질/마커, 예컨대 GP1b-IX, 콜라겐 샤페론 HSP47, 에프린 B1, 티올 이성화 효소 단백질 ERP5, 조혈 전구 키나아제 1-상호작용 단백질 55(HIP-55), 당단백질 V1, 혈소판 당단백질 1b, 혈소판 유래 성장 인자 수용체, 혈소판 내피 응집 수용체 I, CD31, CD36, MARKS, 멀티머린(multimerin), 인테그린 알파 IIb/베타 3, 전사체-1(TLT-1)과 같은 골수 세포 상에서 발현되는 유발 수용체(TREM), 인테그린-연결된 키나아제(ILK), 직신(zyxin), 콜라겐, P-셀렉틴, 인자 XIII, P-셀렉틴 당단백질 리간드-1, 인테그린 알파 6 베타 1, 트롬보스폰딘, 폰빌레브란트 인자, G6B, CD42b, 신탁신 결합 단백질 2, 포스파티딜에탄올아민, 피브리노겐/피브린, 필라민, 스토마틴, 스핑고지질, CD31, CD36, CD40, CD41, CD42c, CD42, CD49b, CD61, CD62P, CD63, CD69, CD107a, CD107b, CD109, CD154, PECAM-1, 및/또는 ERPS에 결합할 수 없는 연장 모이어티를 포함한다.

[0889] 일 구현예에서, ISVD 폴리펩티드 유도체, 예컨대 V_HH 폴리펩티드 유도체는 막 결합 폴리펩티드, 예컨대 당단백질, GPIIb/IIIa, β2GP1, TLT-1, 셀렉틴, 응혈 인자 또는 응고 인자 복합체, 및/또는 셀렉틴에 결합할 수 없는

연장 모이어티를 포함한다.

[0890] 일 구현예에서, 본 발명의 ISVD 폴리펩티드 유도체, 예컨대 V_HH 폴리펩티드 유도체는, 상기 폴리펩티드 유도체가 A형 혈우병의 치료에 있어서 임상적으로 관련된 투여량으로 사용될 때, A형 혈우병을 앓고 있는 환자에게 투여되는 FVIII, 예컨대 재조합 FVIII의 효과를 방해하지 않는다.

[0891] 본 발명의 특정 특징들이 본원에 예시되고 기술되었지만, 많은 변형, 치환, 변경 및 균등물이 이제 당업자에게 발생할 것이다. 따라서, 첨부된 청구범위는 본 발명의 진정한 사상 내에 속하는 모든 이러한 수정 및 변경을 포함하도록 의도된 것임을 이해해야 한다.

[0892] **실시예**

[0893] **약어 목록**

[0894] AIEX: 음이온-교환

[0895] CC: 피어슨 상관 계수

[0896] CDR: 상보성 결정 영역

[0897] CHO: 차이니즈 햄스터 난소

[0898] CMK: 클로로메틸케톤

[0899] EC_{50}: 반수 최대 유효 농도

[0900] EDTA: 에틸렌디아민테트라아세트산

[0901] ELISA: 효소 결합 면역흡착 검정

[0902] FACS: 형광-활성화 세포 분류

[0903] FIX: 응혈 인자 IX

[0904] FIXa: 응혈 인자 IXa

[0905] FX: 응혈 인자 X

[0906] FXa: 응혈 인자 Xa

[0907] FR: 프레임워크 영역

[0908] GS: 글루타민 합성효소

[0909] HA: A형 혈우병

[0910] HB: B형 혈우병

[0911] ISVD: 면역글로불린 단일 가변 도메인

[0912] IV: 정맥 내

[0913] KO: 녹아웃

[0914] MSX: L-메티오닌 설폭시민

[0915] MRTHL: 평균 체류 시간 최종 반감기

[0916] NAM: 니코틴아미드

[0917] OEG: 8-아미노-3,6-디옥사-옥탄산

[0918] PBMC: 말초 혈액 단핵 세포

[0919] PCR: 중합효소 연쇄 반응

[0920] pI: 등전점

[0921] PK: 약동학

[0922] PO: 경구

[0923] ROUT: 강력한 회귀 및 이상치 제거(GraphPad Prism 함수)

[0924] RMS: 제곱 평균 제곱근

[0925] RT-PCR: 역전사효소 중합효소 연쇄 반응

[0926] RP-UPLC: 역상 고성능 액체 크로마토그래피

[0927] SIA: 서열이 동일한 유사체

[0928] SC: 피하

[0929] SNAC: N-(8-(2-하이드록시벤조일)아미노)카프릴산나트륨

[0930] SPR: 표면 플라스몬 공명

[0931] TGT: 트롬빈 생성 시험

[0932] TLS: 병진-진동-나선회전

[0933] TVT: 꼬리 정맥 횡절단

[0934] UPLC: 초고성능 액체 크로마토그래피

[0935] **실시예 1: 일반 방법 및 V_HH 단편 및 다른 재조합 단백질의 제조**

[0936] **일반 분자 생물학**

[0937] 일반 분자 생물학 기법은 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th Edition, 2014, Sambrook, Fritsch and Maniatis eds., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY USA)을 참조한다.

[0938] **면역화 및 라이브러리**

[0939] Ablynx Camelid Facility의 윤리위원회의 승인(LA1400575) 후, 2마리의 라마와 2마리의 알파카를 인간 FIX 및 FX(Haemotologic Technologies, VT USA)로 각각 면역화하였다.

[0940] 중쇄 단독 항체 단편 레파토리의 클로닝 및 파지 면역 라이브러리의 제조를 다음과 같이 수행하였다.

[0941] 최종 면역원 주입 후, 혈액 샘플을 채취하였다. 제조사(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, US)의 지침에 따라 Ficoll-Hypaque를 사용하여, 이들 혈액 샘플로부터 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조하였다. 본질적으로 WO2005/044858에 기술된 바와 같이, PBMC로부터 총 RNA를 추출하고, V_HH 단편 암호화 DNA 분절을 증폭시키기 위한 RT-PCR을 위한 출발 물질로서 사용하였다. 요컨대, V_HH 단편 암호화 DNA 단편을 파지미드 벡터 pAX212에 클로닝하여, His_6-태그 및 $FLAG_3$-태그와 융합된 V_HH 단편을 나타내는 파지 입자를 생산할 수 있게 하였다. 이어서, 파지를 제조하고 표준 프로토콜에 따라 보관하였다.

[0942] **합성 라이브러리**

[0943] 합성 라이브러리는, 면역화로부터 수득하고 클로닝한 합성 V_HH 유전자 단편을, 전술한 pAX212와 동일한 특징을 갖지만 다중 클로닝 부위가 상이한 파지미드 벡터 pAX190 내로 클로닝하여 생성하였다.

[0944] **FX 또는 FIX에 결합하는 V_HH 단편의 라이브러리 스크리닝**

[0945] 생성된 면역 라이브러리 및 합성 라이브러리를 사용해 V_HH 단편 파지 디스플레이 선택을 수행하였다. 클론 스크리닝이 풍부해지도록, 상이한 농도의 고정화된 인간 FIX 및 FX에 대한 라이브러리를 1회 내지 4회 연속으로 농축시켜, FIX 및 FX(Haemotologic Technologies, VT USA) 및 시노몰구스 FIX 및 FX(Novo Nordisk 자체 생성)에 대한 더 양호한 결합제를 수득하였다.

[0946] FIX 및 FXa 대비 FIXa 및 FX에 선택적인 V_HH 단편을 특이적으로 풍부하게 하기 위해, 소정의 실험에서, 고정화

된 FIXa 및 FX와 라이브러리를 인큐베이션 동안, 과량의 가용성 FIX 및 FXa를 경쟁에 사용하였다.

[0947] 다른 구조적으로 관련된 응혈 인자 대비 FIX 및 FX에 선택적인 V_HH 단편을 특이적으로 풍부하게 하기 위해, 소정의 실험에서, 고정화된 FIX 및 FX와 라이브러리를 인큐베이션하는 동안, 과량의 가용성 FX 및 FIX를 각각 경쟁에 사용하였다.

[0948] 선택 결과물 중 약 4500개의 개별 클론을 인간 및 시노몰구스 FX, FXa, FIX, 및 FIXa에 대한 ELISA(V_HH 단편을 발현하는 대장균 세포 유래의 세포질 추출물을 사용함)에서 결합에 대해 스크리닝하였다. 인간 FX 및 FIXa/FIX에 대한 특이적 결합을 각각 나타낸 약 1500개의 클론을 식별하였는데, 이중 대부분은 시노몰구스 FX 및 FIX에 대한 교차 결합을 나타냈다. 일부 클론은 FXa 대비 FX에 대한 우선적 결합 및 FIX 대비 FIXa에 대한 우선적 결합을 나타났다. ELISA 양성 클론의 서열 분석을 통해 FIXa/FIX 또는 FX/FXa에 결합하는 V_HH 단편의 약 700개의 고유 서열을 식별하였다. 화합물을 추가로 최적화하기 위해, 연장기 첨가, 링커 및 연장부 조합과 결합된 집중적인 V_HH CDR 및 FR 돌연변이 유발을 수행하였는데, 돌연변이 유발은 트롬빈 생성 검정을 사용한 돌연변이 스크리닝을 통해 지혈 효능을 향상시키고, 친화도가 변경된 화합물에 대한 스크리닝을 통해 표적 매개 약물 소실(target-mediated drug-disposition)을 회피하고, MHC 결합된 펩티드의 단백질체학 검정을 사용하여 위험 부위를 스크리닝하여 면역원성을 감소시키고, 표면 노출된 잔기의 pI 저하 치환을 통해 생체내 경구 생체이용율을 향상시키는 것에 중점을 두어 수행하였다.

[0949] **FX 또는 FIX에 결합하는 V_HH 단편의 발현 작제물 생성**

[0950] 파지 디스플레이 선택 결과로부터 V_HH 단편의 서열 분석은 일반적으로 알려진 절차에 따라 수행하였다(Pardon 등의 문헌[(2014) Nat Protoc 9: 674]).

[0951] 고유한 제한 부위를 각각 갖는 순방향 FR1 및 역방향 FR4 프라이머의 특이적 조합을 사용해 PCR에 의해 수득한 V_HH 단편-함유 DNA 단편을 적절한 제한 효소와 함께 분해하고, 대장균(*E. coli*) 또는 피치아 파스토리스(*P. pastoris*) 발현을 위한 His_6-태그된 및/또는 $FLAG_3$-태그된 포맷으로서, V_HH 폴리펩티드 발현 벡터의 매칭 클로닝 카세트 내에 결합시켰다. 그런 다음, 결합 혼합물(ligation mixture)을 전기천공에 적합한 대장균 TG1(60502, Lucigen, Middleton, WI) 또는 TOP10(C404052, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 세포로 형질전환시킨 다음, 적절한 항생물질 선택 압력(카나마이신 또는 제오신) 하에 성장시켰다. 저항성 클론은 플라스미드 DNA(LGC Genomics, Berlin, Germany)의 생거 시퀀싱으로 확인하였다.

[0952] **대장균에서 FX 또는 FIX에 결합하는 V_HH 단편의 일반적인 발현**

[0953] *Lac* 프로모터, 카나마이신에 대한 내성 유전자, *대장균* 복제 기원, 및 OmpA 신호 펩티드에 대한 코딩 서열에 선행하는 V_HH 단편 클로닝 부위를 함유하는 플라스미드 발현 벡터에서, 대장균 TG1에서 V_HH 단편을 발현시켰다. V_HH 폴리펩티드 코딩 서열과 같은 프레임 내에서, 벡터는 C-말단 $FLAG_3$ 및 His_6 태그를 암호화한다. 신호 펩티드는 발현된 V_HH 단편을 박테리아 숙주의 세포질 구획으로 유도한다.

[0954] 관심 V_HH 단편 작제물을 함유하는 대장균 TG-1 세포를 37℃에서 2시간 동안 성장시키고, 이어서 "5052" 자동 유도 배지(0.5% 글리세롤, 0.05% 포도당, 0.2% 락토오스 + 3 mM $MgSO_4$)가 담긴 30℃의 칸막이식 진탕 플라스크에서 29시간 동안 성장시켰다. 그런 다음, 대장균 발현 배양물로부터의 밤새 동결시킨 세포 펠릿을 PBS에 용해시키고(원래 배양물의 1/12.5의 부피), 부드럽게 회전시키면서 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, 세포를 한 번 더 펠릿화하고, 세포질 공간 내로 분비된 단백질이 포함된 상청액을 저장하였다.

[0955] **피치아 파스토리스에서 V_HH 단편의 일반적인 발현**

[0956] 관심 V_HH 단편 작제물을 함유하는 피치아 파스토리스 세포를 BGCM 배지에서 2일 동안 (30℃, 200rpm에서) 성장시켰다. 3일차에, 배지를 BMCM으로 바꾸고 작제물을 (30℃, 200rpm에서) 추가로 성장시키고, 8시간 후 0.5% v/v 메탄올로 유도하였다. 다음 날, 아침, 정오, 및 저녁에 0.5% v/v 메탄올로 작제물을 유도하였다. 5일차에, 세포를 회전시키고 (분비된 V_HH 단편을 함유하는) 상청액을 수집하였다.

[0957] **HEK 세포에서, FX 또는 FIX에 결합하는 항체 및 다른 재조합 단백질의 일반적인 발현**

[0958] HEK293 세포에서의 일시적인 발현을 위한 발현 플라스미드를 Twist Biosciences 또는 Thermo Fisher Scientific로부터 구입하였다. Twist Biosciences의 플라스미드는 Durocher, Y. 등의 문헌[(2002) Nucleic Acid Res, 30: E9]에 기술된 pTT 벡터를 기반으로 하고, ThermoFisherScientific의 플라스미드는 pcDNA34-Topo 벡터(Thermo Fisher Scientific)를 기반으로 한다. V_HH 폴리펩티드 화합물을 일시적으로 발현시키기 위해, His_6-태그되었거나 태그되지 않은 V_HH 폴리펩티드 화합물을 HEK293 현탁 세포 내로 형질감염시켰다. 항-GLA FIX 및 항-GLA FX 항체(Novo Nordisk 자체 생성), 에미시주맙(Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland) 서열 동일 유사체(SIA), 및 Mim8(Novo Nordisk, Denmark)을 암호화하는 서열을 갖는 동등한 발현 작제물도 아래에 기술된 방법을 사용하여 HEK293에서 발현시켰다.

[0959] HEK293 현탁 세포의 일시적 형질감염(Expi293 발현 시스템, Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 A1463 5)을 본질적으로 제조사의 지침에 따라 수행하였다. HEK293 세포는 1% P/S(GIBCO, 카탈로그 번호 15140-122)로 보충된 Expi293F 발현 배지(Gibco, 카탈로그 번호 A14351-01)에서 3~4일마다 일반적으로 계대배양하였다. Expifectamine을 사용하여 HE293 세포를 2.5~3백만 개/mL의 세포 밀도로 형질감염시켰다. HEK293 세포 1리터마다, 총 1 mg의 플라스미드 DNA를 50 mL Optimem(GIBCO, 카탈로그 번호 51985-026, 희석물 A)에 희석시키고 2.7 mL Expifectamine을 50 mL Optimem(희석물 B)에 희석하여 형질감염을 수행하였다. (항체에 대한) 동시 형질감염 시키는 경우, 플라스미드를 1:1 비율로 사용하였다. 희석물 A 및 B를 혼합하고 실온에서 10~20분 동안 배양하였다. 여기서부터, 형질감염 혼합물을 HEK293 세포에 첨가하고, 세포를 37℃의 습윤된 인큐베이터 내에서 궤도 회전(85~140 rpm)시키면서 인큐베이션하였다. 형질감염 후 1일차에, 형질감염 세포를 5 ml의 ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 1 및 50 ml의 ExpiFectamine 293 Transfection Enhancer 2로 보충하였다. 세포 배양 상청액은 통상적으로 형질감염 후 4~5일차에 원심분리 후 여과에 의해 수확하였다.

[0960] **CHO 세포에서 FX 및 FIX(a)에 결합하는 V_HH 단편 및 항체의 일반적인 발현**

[0961] 글루타민 합성효소(GS) 선택을 사용하여 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에서 항-FIX 및 항-FX V_HH 화합물 및 항체를 생산하였다. 전기천공을 사용하여 CHO 세포를 GS 발현 플라스미드로 형질감염시킨 후, CD-CHO 배지(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 10743029)에서 MSX 보충제와 함께 글루타민 박탈을 사용하여 선택을 수행하였다. 일반적으로 3주간 배양한 후에 안정한 CHO 세포 풀을 수득한 후, 풀을 384 웰 플레이트 내로 단세포 클로닝하였다. 384 웰 플레이트에서 발생하는 CHO 클론을 일반적으로 96 웰 플레이트 내로 증식시키고, 생산성에 대해 스크리닝하였다. 미리 정의된 독점 세포 배양 배지(Novo Nordisk A/S)를 사용하여 1-L 내지 15-L 규모의 바이오리액터에서 배양하기에 맞도록, 선택된 생산자 클론의 규모를 확장하였다. 세포 생존력은 배양하는 동안 높게 유지되었고, 그 이후 세포 배양물을 수확할 때까지 점진적으로 감소하였다. 여기서, 배양 규모에 따라 원심분리에 의해 및/또는 MDOHC23CL3 및 MXOHC01FS1 필터(Millipore)를 사용하는 심층 여과에 의해 세포 상청액을 제거한 후, 크로마토그래피 기반 단백질 정제를 진행하였다.

[0962] **FX 또는 FIX에 결합하는 V_HH 단편의 일반적인 정제 및 특성 분석**

[0963] His6-태그되었거나 태그되지 않은 V_HH 화합물을 MabSelectSure 단백질-A 수지(Cytiva)(이미다졸과 함께 Ni-Excel(Cytiva) 수지를 이용함) 또는 고정화된 금속 친화도 크로마토그래피(IMAC)(산성 용리제를 이용함)로 정제하고 이어서, 탈염 단계(PD 컬럼 및 Sephadex G25 수지 이용, Cytiva)를 수행하고, 필요에 따라 PBS 또는 HBS에서 여과 크로마토그래피(Superdex200 컬럼, Cytiva)로 정제하였다. FIX 및 FX의 GLA 도메인을 표적으로 하는 His6-태그되지 않은 V_HH 화합물 및 항체(Novo Nordisk 자체 생성) 및 에미시주맙 SIA(Hoffmann-La Roche LtdG25, Switzerland)를 단백질-A 수지인 MabSelecture(Cytiva) 또는 다중모드 수지(Cytiva, 산성 용리제 사용)로 정제하고, 이어서 탈염 단계(예: PD 컬럼 및 Sephadex G25 수지, Cytiva)를 수행하고, 필요에 따라 PBS 또는 HBS에서 여과 크로마토그래피(예: Superdex200 컬럼, Cytiva)로 정제하였다. Agilent LC 1100/1200 시스템을 이용해 설정된 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피(SE-HPLC) 방법을 사용하고, BIOSEP(생체분자 분리용 컬럼)-SEC-53000 300x7.8 mm 컬럼(Phenomenex, 카탈로그 번호 OOH-2146-K0) 및 200 mM의 인산나트륨(pH 6.9), 300 mM 염화나트륨, 및 10% 이소프로판올로 구성된 런닝 완충액(running buffer)을 사용해 단백질 무결성을 분석하였다. MassPREP 탈염 컬럼(Waters)이 구비된 6280 Agilent 시스템(Agilent Technologies)(런 속도: 0.4 ml/분; 단계 용리를 위한 A-완충액: MQ-H2O/0.1% 포름산; 및 B-완충액: 아세토니트릴/0.1% 포름산) 상에서 전기분무 이온화 비행 시간 질량 분광분석(ESI-TOF-MS)을 사용해, 정제된 V_HH 폴리펩티드 배치의 분자 질량을 분석하였다. 최종 단백질 농도를 측정하기 위해, NanoDrop™ 분광 광도계(Thermo Scientific)를 이론적으로 계산된

소광 계수와 함께 사용하였다.

[0964] **실시예 2: V_HH 폴리펩티드 시스테인 잔기에 대한 연장 모이어티의 접합**

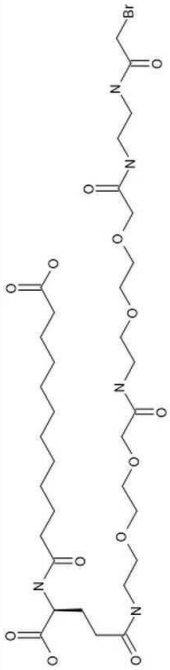
[0965] V_HH 폴리펩티드를 연장시켜 약동학적 특성을 개선하기 위해, 다양한 백본 위치에서, 예를 들어 후술된 것과 같은 하나 이상의 지방산 연장 모이어티(들)와 접합에 사용되는 하나 이상의 도입된 Cys 잔기가 포함된 N-말단 또는 C-말단 연장부에서 시스테인(Cys) 치환을 포함하도록, V_HH 폴리펩티드 화합물을 조작하였다.

[0966] 연장 모이어티를 V_HH 폴리펩티드 화합물에 부착하기 위해, 변형된 연장 모이어티 형태의 중간 시약을 사용하였다.

[0967] 연장 모이어티를 포함하는 중간체 시약은 WO2016/102562에 기술된 바와 같이 제조하였고, 이러한 중간체 시약의 비제한적인 예는 아래 표 3에 나타나 있다:

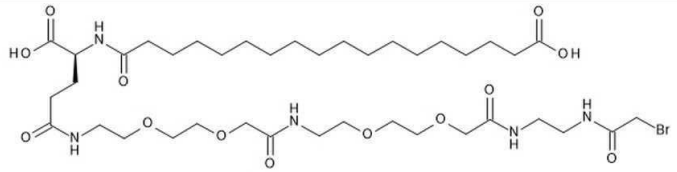
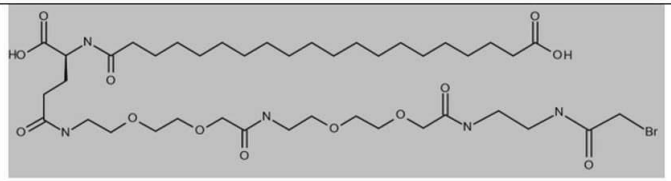
표 3

[표 3] 연장 모이어티(링커(L_p) 포함)를 포함하는 중간체 시약의 예

ID	*중간체 시약의 구조 및 IUPAC 명칭(짧은 명칭)*	*V_HH 폴리펩티드 유도체 ID*
C1	 11-{(S)-1-카르복시-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-브로모아세틸-아미노)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸-카르바모일]프로필카르바모일}운데칸산(C12 이산 링커 시약)	화합물 #65
C2	 15-{(S)-1-카르복시-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-브로모아세틸-아미노)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸-카르바모일]프로필카르바모일}펜타데칸산(C16 이산 링커 시약)	화합물 #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #21, #22

[0968]

[6960]

C3	 17-{(S)-1-카르복시-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-브로모아세틸-아미노)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸-카르바모일]프로필카르바모일}헵타데칸산(C18 이산 링커 시약)	화합물 #4, #5, #24, #26, #28, #30, #32, #34, #36, #38, #40, #58, #59, #60, #61, #62, #63, #66
C4	 19-{(S)-1-카르복시-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-브로모아세틸-아미노)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸카르바모일]메톡시}에톡시)에틸-카르바모일]프로필카르바모일}노나데칸산(C20 이산 링커 시약)	화합물 #67

C5	 N-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-브로모아세틸)아미노]에틸아미노]-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-2-옥소-에톡시]에톡시]에틸아미노]-4-옥소-부틸]설포닐-16-(1H-테트라졸-5-일)헥사데칸아미드(테트라졸 링커 시약)

화합물 #68

[0970]

[0971] *접합, 정제, 및 분석*

[0972] 접합을 위해 하나 이상의 시스테인 잔기(들)가 도입된 V_HH 폴리펩티드를 함유하는 수용액에, 캡핑된 시스테인마다 5당량의 BSPP(비스(p-설포나토페닐)페닐포스핀 이수화물 이칼륨 염) 또는 1.1당량의 TCEP(트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염산염)를 첨가하였다. 1~2시간 교반한 후, 각각의 V_HH 폴리펩티드 내 유리 시스테인 당 0.1 M $NaHCO_3$(수성) 중 수성 NaOH 및 5당량의 중간체 시약 C1을 첨가하여 pH를 8.5로 조절하였다. 혼합물을 암소에서 1.5~16시간 동안 부드럽게 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석한 후, Akta 시스템을 사용하여 음이온 교환(AIEX) 방법에 의해 정제하였다. 측쇄가 접합된 V_HH 폴리펩티드를 AIEX 크로마토그래피 분리 방법을 사용하여 정제하였다. 따라서, Akta Avant 크로마토그래피 시스템 상에서 적절한 컬럼에 충진된 AIEX 수지 공급원 30Q를 염화나트륨 구배 프로그램 설정과 함께 사용하였다. 사용된 완충액 시스템은 20 mM 트리스, pH 8.5로 이루어진 평형 완충액 및 20 mM 트리스, 1 M NaCl, pH 8.5로 이루어진 용리 완충액이었다. 반응 혼합물의 pH를 8.5로 조절하고, MilliQ-H_2O 또는 평형화 완충액을 사용하여 4 mS/cm 미만의 전도도가 되도록 희석하였다. 샘플을 컬럼에 도포하고, 도포된 컬럼은 5 내지 10 컬럼 부피의 평형화 완충액으로 세척하였다. 그런 다음, 30 내지 50 컬

럼 부피의 얕은 구배를 사용하여 분리 크로마토그래피를 수행하였다. 사용된 구배는 정제된 V_HH 폴리펩티드 유도체의 pI에 따라 0%에서 최대 50%까지였다. 일반적으로, 접합되지 않은 부모 V_HH 폴리펩티드는 구배 초기에 용리되고, 단일 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드는 구배의 중간에 용리되며, 다중 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드(즉 V_HH 폴리펩티드 분자당 둘 이상의 측쇄가 접합되었음을 의미함)는 구배의 후반에 용리된다. 단일 또는 이중 접합 제제를 갖는 90 내지 99%의 고순도 V_HH 폴리펩티드가 수득되도록, 메인 피크 위에 있는 분획을 풀링하였다. 순도 분석은 UV 및 FLD 검출기가 구비된 Waters Acquity UPLC 시스템을 이용한 역상 초고성능 액체 크로마토그래피(RP-UPLC) 방법(컬럼: HALO 디페닐 컬럼 1000 Å, 2.7 μm, 150x2.1 mm (Scantec Nordic USDPF001316); 실행 완충액 A): 0.1% v/v TFA/물; 실행 완충액 B): 0.09% v/v TFA/아세토니트릴)을 사용해 수행하였다. 컬럼 온도를 60℃로 설정하였다. 구배 프로그램은 1) 0.0~8.0분: 20~50% B, 2) 8.0~8.1분: 50~80% B, 3) 8.1~9.0분: 80% B, 4) 9.0~9.1분: 80~20% B, 및 5) 9.1~11.0분: 20% B였다. 접합되지 않은 부모 V_HH 폴리펩티드는 4.6~4.8분에 용리되었다. 단일 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체는 5.1~5.6분에 용리되었고, 주요 피크는 약 5.3분이었다. 이중 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체는 5.7~5.8분에 용리되었고, 다중 접합된 V_HH 폴리펩티드는 이를 벗어나 더 나중에 용리되었다. 접합(들)을 갖는 V_HH 폴리펩티드의 온전성은 Agilent LC 1100/1200 시스템을 이용하여 (컬럼: BIOSEP-SEC-3000 300×7.8 mm 컬럼(Phenomenex, 카탈로그 번호 00H-2146-K0); 실행 완충액: 200 mM 인산나트륨 pH 6.9, 300 mM NaCl, 및 10% 이소프로판올) SE-HPLC 방법을 사용해 분석하였다. 접합(들)을 갖는 V_HH 폴리펩티드의 분자 질량은 6280 Agilent 시스템(Agilent Technologies)(컬럼: MasPREP Desalt(Waters) 컬럼; 용리 속도: 0.4 ml/분; 단계 용리용 완충액 A: MilliQ-H_2O/0.1% 포름산; 완충액 B: 아세토니트릴/0.1% 포름산)을 이용하여 ESI-TOF-MS를 사용하여 분석하였다. 서열 확인을 위한 펩티드 맵핑은 키모트립신 및 트립신 기반 분해물의 조합을 사용하여 수행하였다. LC-MS 시스템은 Thermo Orbitrap Fusion 기기에 결합된 Waters Aquity UPLC로 구성되었다. 분해물의 온라인 LC-MS 분석은 CSH C-18 컬럼 1.7 μm, 150x2.1 mm 및 아세토나이트릴/포름산 구배를 사용하여 수행하였다. 컬럼 온도는 60℃였다. 완충액 A: 0.1% FA 물; 및 완충액 B: 0.1% FA 아세토니트릴. 구배 프로그램은 :1) 0.0~2.0분: 1% B, 2) 2~50분: 1~35% B, 3) 50~51분: 100% B, 및 4) 51~60분: 100~1% B였고, 유속은 120 μl/분이었다. 데이터는 Genedata Refiner 펩티드 맵핑 워크플로우를 사용하여 분석하였다. 전체 범위의 일차 서열을 수득하였다. 접합(들)을 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 회분 제조물의 단백질 농도를 측정하기 위해, NanoDrop™ 분광광도계(Thermo Scientific)를 이론적으로 계산된 흡광 계수와 함께 사용하였다.

[0973] 도 1, 2, 및 3은 ISVD 및 V_HH 폴리펩티드 유도체의 비제한적인 예를 세부 사항의 수준을 증가시키면서 보여준다.

[0974] **실시예 3: 서열 및 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드의 표**

표 4

[표 4] 연장기가 없는 화합물의 개요 및 서열번호(V_HH 및 CDR 서열)

	N-말단 연장부		항-FX V_HH (N-말단)			링커 (L_{1-2})	항-FIX(a) V_HH (C-말단)			C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호		V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) (*Kabat 정의*)		서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) (*Kabat 정의*)		서열번호
화합물 #1 (1가)	없음		VHH-1.1	27 (28,29,30)		없음	없음	없음		5
화합물 #2 (1가)	없음		없음	없음		없음	VHH-2.2	35 (36,37,38)		6
화합물 #3 (1가)	없음		VHH-1.3	31 (32,33,34)		없음	없음	없음		6
화합물 #4	없음		VHH-1.4	39 (40,41,42)		14	VHH-2.4	43 (44,45,46)		7
화합물 #5	없음		VHH-1.5	47 (48,49,50)		14	VHH-2.5	51 (52,53,54)		7
화합물 #6	없음		VHH-1.6	47 (48,49,50)		14	VHH-2.6	51 (52,53,54)		8
화합물 #7	없음		VHH-1.7	63 (64,65,66)		20	VHH-2.7	67 (68,69,70)		9

[0975]

[0976]

	N-말단 연장부	항-FX V_HH (N-말단)		링커 ($L_{1,2}$)	항-FIX(a) V_HH (C-말단)		C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) (*Kabat 정의*)	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) (*Kabat 정의*)	서열번호
화합물 #8	없음	VHH-1.8	63 (64,65,66)	20	VHH-2.8	51 (52,53,54)	9
화합물 #9	없음	VHH-1.9	79 (80,81,82)	20	VHH-2.9	83 (84,85,86)	9
화합물 #10	없음	VHH-1.10	87 (88,89,90)	20	VHH-2.10	67 (68,69,70)	9
화합물 #11	없음	VHH-1.11	95 (96,97,98)	20	VHH-2.11	83 (84,85,86)	9
화합물 #12	없음	VHH-1.12	103 (104,105,106)	20	VHH-2.12	107 (108,109,110)	9
화합물 #13	없음	VHH-1.13	111 (112,113,114)	20	VHH-2.13	115 (116,117,118)	9
화합물 #14	없음	VHH-1.14	119 (120,121,122)	20	VHH-2.14	123 (124,125,126)	9
화합물 #15	없음	VHH-1.15	127 (128,129,130)	20	VHH-2.15	131 (132,133,134)	9
화합물 #16	없음	VHH-1.16	111 (112,113,114)	20	VHH-2.16	139 (140,141,142)	9
화합물 #17	없음	VHH-1.17	143 (144,145,146)	20	VHH-2.17	107 (108,109,110)	9
화합물 #18	없음	VHH-1.18	151 (152,153,154)	20	VHH-2.18	155 (156,157,158)	9
화합물 #19	없음	VHH-1.19	159 (160,161,162)	20	VHH-2.19	51 (52,53,54)	9
화합물 #20	없음	VHH-1.20	167 (168,169,170)	20	VHH-2.20	171 (172,173,174)	9
화합물 #21	없음	VHH-1.21	79	20	VHH-2.21	107 (108,109,110)	9

[0977]

	N-말단 연장부	항-FX V_HH (N-말단)		링커 (L_{1-2})	항-FIX(a) V_HH (C-말단)		C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호
			(80,81,82)				
화합물 #22	없음	VHH-1.22	111 (112,113,114)	20	VHH-2.22	83 (84,85,86)	9
화합물 #23	690	VHH-1.23	191 (192,193,194)	14	VHH-2.23	43 (44,45,46)	10
화합물 #24	690	VHH-1.24	191 (192,193,194)	14	VHH-2.24	43 (44,45,46)	10
화합물 #25	690	VHH-1.25	207 (208,209,210)	14	VHH-2.25	43 (44,45,46)	11
화합물 #26	690	VHH-1.26	207 (208,209,210)	14	VHH-2.26	43 (44,45,46)	11
화합물 #27	690	VHH-1.27	223 (224,225,226)	14	VHH-2.27	227 (228,229,230)	11
화합물 #28	690	VHH-1.28	223 (224,225,226)	14	VHH-2.28	227 (228,229,230)	11
화합물 #29	690	VHH-1.29	223 (224,225,226)	14	VHH-2.29	243 (244,245,246)	11
화합물 #30	690	VHH-1.30	223 (224,225,226)	14	VHH-2.30	243 (244,245,246)	11
화합물 #31	690	VHH-1.31	223 (224,225,226)	14	VHH-2.31	259 (260,261,262)	11
화합물 #32	690	VHH-1.32	223 (224,225,226)	14	VHH-2.32	259 (260,261,262)	11
화합물 #33	690	VHH-1.33	223 (224,225,226)	14	VHH-2.33	275 (276,277,278)	11
화합물 #34	690	VHH-1.34	223 (224,225,226)	14	VHH-2.34	275 (276,277,278)	11

[0978]

	N-말단 연장부	항-FX V_HH (N-말단)		링커 (L_{1-2})	항-FIX(a) V_HH (C-말단)		C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호
화합물 #35	690	VHH-1.35	223 (224,225,226)	14	VHH-2.35	291 (292,293,294)	11
화합물 #36	690	VHH-1.36	223 (224,225,226)	14	VHH-2.36	291 (292,293,294)	11
화합물 #37	690	VHH-1.37	223 (224,225,226)	14	VHH-2.37	307 (308,309,310)	11
화합물 #38	690	VHH-1.38	223 (224,225,226)	14	VHH-2.38	307 (308,309,310)	11
화합물 #39	690	VHH-1.39	223 (224,225,226)	14	VHH-2.39	323 (324,325,326)	11
화합물 #40	690	VHH-1.40	223 (224,225,226)	14	VHH-2.40	323 (324,325,326)	11
화합물 #41	없음	VHH-1.41	335 (336,337,338)	16	VHH-2.41	51 (52,53,54)	7
화합물 #42	없음	VHH-1.42	335 (336,337,338)	17	VHH-2.42	51 (52,53,54)	7
화합물 #43	없음	VHH-1.43	335 (336,337,338)	18	VHH-2.43	51 (52,53,54)	7
화합물 #44	없음	VHH-1.44	335 (336,337,338)	19	VHH-2.44	51 (52,53,54)	7
화합물 #45	없음	VHH-1.45	335 (336,337,338)	20	VHH-2.45	51 (52,53,54)	7
화합물 #46	없음	VHH-1.46	335 (336,337,338)	14	VHH-2.46	379 (380,381,382)	7
화합물 #47	없음	VHH-1.47	335 (336,337,338)	16	VHH-2.47	379 (380,381,382)	7
화합물 #48	없음	VHH-1.48	335 (336,337,338)	21	VHH-2.48	379 (380,381,382)	7

[0979]

	N-말단 연장부	항-FX V_HH (N-말단)		링커 ($L_{1,2}$)	항-FIX(a) V_HH (C-말단)		C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) (*Kabat 정의*)	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) (*Kabat 정의*)	서열번호
화합물 #49	없음	VHH-1.49	335 (336,337,338)	18	VHH-2.49	379 (380,381,382)	7
화합물 #50	없음	VHH-1.50	335 (336,337,338)	19	VHH-2.50	379 (380,381,382)	7
화합물 #51	없음	VHH-1.51	335 (336,337,338)	14	VHH-2.51	419 (420,421,422)	7
화합물 #52	없음	VHH-1.52	335 (336,337,338)	16	VHH-2.52	419 (420,421,422)	7
화합물 #53	없음	VHH-1.53	335 (336,337,338)	23	VHH-2.53	419 (420,421,422)	7
화합물 #54	없음	VHH-1.54	335 (336,337,338)	21	VHH-2.54	419 (420,421,422)	7
화합물 #55	없음	VHH-1.55	335 (336,337,338)	18	VHH-2.55	419 (420,421,422)	7
화합물 #56	없음	VHH-1.56	335 (336,337,338)	19	VHH-2.56	419 (420,421,422)	7
화합물 #57	없음	VHH-1.57	335 (336,337,338)	20	VHH-2.57	419 (420,421,422)	7
화합물 #58	없음	VHH-1.58	471 (472,473,474)	14	VHH-2.58	475 (476,477,478)	7
화합물 #59	없음	VHH-1.59	479 (480,481,482)	14	VHH-2.59	51 (52,53,54)	7
화합물 #60	없음	VHH-1.60	487 (488,489,490)	14	VHH-2.60	475 (476,477,478)	7
화합물 #61	없음	VHH-1.61	495 (496,497,498)	14	VHH-2.61	499 (500,501,502)	7
화합물 #62	없음	VHH-1.62	503 (504,505,506)	14	VHH-2.62	507 (508,509,510)	7

[0980]

	N-말단 연장부	항-FX V_HH (N-말단)		링커 ($L_{1,2}$)	항-FIX(a) V_HH (C-말단)		C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호
화합물 #63	없음	VHH-1.63	511 (512,513,514)	14	VHH-2.63	507 (508,509,510)	7
화합물 #64	690	VHH-1.64	223 (224,225,226)	14	VHH-2.64	43 (44,45,46)	10
화합물 #65	690	VHH-1.65	223 (224,225,226)	14	VHH-2.65	43 (44,45,46)	10
화합물 #66	690	VHH-1.66	223 (224,225,226)	14	VHH-2.66	43 (44,45,46)	10
화합물 #67	690	VHH-1.67	223 (224,225,226)	14	VHH-2.67	43 (44,45,46)	10
화합물 #68	690	VHH-1.68	223 (224,225,226)	14	VHH-2.68	43 (44,45,46)	10
화합물 #69	없음	VHH-1.69	39 (40,41,42)	14	VHH-2.69	43 (44,45,46)	7
화합물 #70	3	VHH-1.70	223 (224,225,226)	14	VHH-2.70	43 (44,45,46)	11
화합물 #71	4	VHH-1.71	223 (224,225,226)	14	VHH-2.71	43 (44,45,46)	11
화합물 #72	없음	VHH-1.72	223 (224,225,226)	14	VHH-2.72	43 (44,45,46)	12
화합물 #73	없음	VHH-1.73	223 (224,225,226)	14	VHH-2.73	43 (44,45,46)	13
화합물 #74	690	VHH-1.74	599 (600,601,602)	691	VHH-2.74	603 (604,605,606)	7
화합물 #75	없음	VHH-1.75	607 (608,609,610)	14	VHH-2.75	35 (36,37,38)	없음

[0981]

	N-말단 연장부	항-FX V_HH (N-말단)		링커 ($L_{1:2}$)	항-FIX(a) V_HH (C-말단)		C-말단 연장부
V_HH 폴리펩티드 ID	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호	V_HH ID	서열번호 V_HH (CDR1, 2, 3) *(Kabat 정의)*	서열번호
화합물 #76 (1가)	없음	VHH-1.15	127 (128,129,130)	없음	없음	없음	11
화합물 #77 (1가)	없음	VHH-1.13	111 (112,113,114)	없음	없음	없음	11

표 5

[표 5] 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체(연장 모이어티 포함)의 개요

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #1	없음	없음	없음	615
화합물 #2	없음	없음	없음	616
화합물 #3	없음	없음	없음	617

[0982]

[0983]

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #4	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	618
화합물 #5	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	619
화합물 #6	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys5 및 Cys7 (서열번호 8)	620
화합물 #7	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	621
화합물 #8	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	622
화합물 #9	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	623
화합물 #10	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	624
화합물 #11	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	625
화합물 #12	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6	626

[0984]

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
			(서열번호 9)	
화합물 #13	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	627
화합물 #14	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	628
화합물 #15	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	629
화합물 #16	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	630
화합물 #17	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	631
화합물 #18	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	632
화합물 #19	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	633
화합물 #20	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	634

[0985]

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #21	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	635
화합물 #22	P2	L_P1	C-말단 연장부의 Cys4 및 Cys6 (서열번호 9)	636
화합물 #23	없음	없음	없음	637
화합물 #24	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys10 (서열번호 10)	638
화합물 #25	없음	없음	없음	639
화합물 #26	P3	L_P1	화합물 #26의 Cys30 (서열번호 640)	640
화합물 #27	없음	없음	없음	641
화합물 #28	P3	L_P1	화합물 #28의 Cys158 (서열번호 642)	642
화합물 #29	없음	없음	없음	643
화합물 #30	P3	L_P1	화합물 #30의 Cys160 (서열번호 644)	644
화합물 #31	없음	없음	없음	645

[0986]

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #32	P3	L_P1	화합물 #32의 Cys161 (서열번호 646)	646
화합물 #33	없음	없음	없음	647
화합물 #34	P3	L_P1	화합물 #34의 Cys188 (서열번호 648)	648
화합물 #35	없음	없음	없음	649
화합물 #36	P3	L_P1	화합물 #36의 Cys190 (서열번호 650)	650
화합물 #37	없음	없음	없음	651
화합물 #38	P3	L_P1	화합물 #38의 Cys209 (서열번호 652)	652
화합물 #39	없음	없음	없음	653
화합물 #40	P3	L_P1	화합물 #40의 Cys231 (서열번호 654)	654
화합물 #41	없음	없음	없음	655
화합물 #42	없음	없음	없음	656
화합물 #43	없음	없음	없음	657

[0987]

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #44	없음	없음	없음	658
화합물 #45	없음	없음	없음	659
화합물 #46	없음	없음	없음	660
화합물 #47	없음	없음	없음	661
화합물 #48	없음	없음	없음	662
화합물 #49	없음	없음	없음	663
화합물 #50	없음	없음	없음	664
화합물 #51	없음	없음	없음	665
화합물 #52	없음	없음	없음	666
화합물 #53	없음	없음	없음	667
화합물 #54	없음	없음	없음	668
화합물 #55	없음	없음	없음	669
화합물 #56	없음	없음	없음	670
화합물 #57	없음	없음	없음	671
화합물 #58	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	672

[0988]

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #59	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	673
화합물 #60	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	674
화합물 #61	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	675
화합물 #62	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	676
화합물 #63	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys6 (서열번호 7)	677
화합물 #64	없음	없음	없음	678
화합물 #65	P1	L_P1	C-말단 연장부의 Cys10 (서열번호 10)	679
화합물 #66	P3	L_P1	C-말단 연장부의 Cys10 (서열번호 10)	680
화합물 #67	P4	L_P1	C-말단 연장부의 Cys10 (서열번호 10)	681

V_HH 폴리펩티드 ID	연장기 (P)	연장 모이어티 링커 (L_P)	연장 모이어티 부착 부위(들)("R1(/R2)")	화합물 # 백본 서열번호 (연장 모이어티 없음)
화합물 #68	P5	L_P2	C-말단 연장부의 Cys10 (서열번호 10)	682
화합물 #69	없음	없음	없음	683
화합물 #70	P6 ("P"-"R1")	L_P3 ("P"-"L_P"-"R1")	VHH-1.70의 Asp1 (서열번호 567)	684
화합물 #71	P6 ("P"-"R1")	L_P4 ("P"-"L_P"-"R1")	VHH-1.71의 Asp1 (서열번호 575)	685
화합물 #72	P6 ("R1"-"P")	L_P3 ("R1"-"L_P"-"P")	VHH-2.72의 Ser127 (서열번호 587)	686
화합물 #73	P6 ("R1"-"P")	L_P4 ("R1"-"L_P"-"P")	VHH-2.73의 Ser127 (서열번호 595)	687
화합물 #74	없음	없음	없음	688
화합물 #75	없음	없음	없음	689

[0989]

[0990] **실시예 4: ELISA 실험에 기초한 항-FX V_HH 폴리펩티드의 에피토프**

[0991] "화합물 #1"로 지정된 항-FX V_HH 폴리펩티드의 결합 에피토프가 인간 FX(서열번호 2)의 활성화 펩티드(AP) 내부에 위치하는지 여부를 결정하기 위해, ELISA 검정을 설정하였다. 1개 아미노산의 간격으로 활성화 펩티드의 52개 잔기에 걸쳐 있는 41개의 고유한 12량체 펩티드 단편을 마이크로역가 플레이트 웰에 고정시킨 다음, 시험 대상 V_HH 폴리펩티드와 함께 인큐베이션하고, 제2 HRP-표지된 항체를 첨가하여 결합된 리간드의 검출을 수행하였다.

[0992] 펩티드를 C-말단 방향으로 비오틴에 접합시키고, 1 μg/mL 스트렙트아비딘으로 사전 코팅된 마이크로역가 플레이트의 이산된 웰에서 1 μg/mL의 펩티드 용액 50 μL를 사용하여 고정시켰다. 각각의 웰을 세척 완충액(10 mM 트리스, 150mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 0.05% Tween 20, pH 8.60)으로 세척한 다음, 50 μL의 2 μg/mL FLAG-태그된 시험 대상 항-FX V_HH 폴리펩티드 또는 IgG 항체를 첨가하였다. 1시간 후, 결합되지 않은 V_HH 폴리펩티드를 세척 완충액을 사용하여 세척하였다.

[0993] 결합된 항-FX 활성화 펩티드 리간드는 먼저 HRP-표지된 이차 항체를 결합시켜 검출하였다(FLAG-표지된 V_HH 폴리펩티드의 경우: 항-FLAG mAb M2-퍼옥시다아제(HRP)(Sigma Aldrich, US)에 1시간 동안 결합시킨 다음, 100 μL TMB-1 ELISA 기질(Kem-En-Tec Diagnostics, Denmark)을 첨가함).

[0994] 그런 다음, 각각의 FX 결합제가 결합된 펩티드 세트(표 6)로 덮인 공통 서열을 식별함으로써 베이스라인을 초과

하는 신호를 생성하는 최소 에피토프를 펩티드 세트로부터 추론하였다. 에피토프의 첫 번째 잔기는 첫 번째 연속 ELISA-양성 펩티드의 마지막 아미노산으로 정의하고, 에피토프의 마지막 잔기는 마지막 연속 ELISA-양성 펩티드의 첫 번째 잔기로서 정의하였다.

[0995] 따라서, 아래 표는 화합물 #1에 상응하는 시험된 초기 항-FX V_HH 폴리펩티드에 대해, 전체 FX AP에 걸쳐 있는 연속 펩티드로부터의 ELISA 신호를 보여준다. ELISA 신호를 배경 신호에 대해 정규화하였다.

[0996] 회색 영역은 서열 NPFDLLDF(서열번호 692)로서 식별된, 최소 에피토프를 결정하는 데 사용된 양의 결합 신호를 나타낸다.

[0997] 화합물 #1에 대한 FX 활성화 펩티드의 식별된 에피토프 서열은, 실시예 6에 개략된 것과 같은, 에피토프:파라토프 상호작용의 고-해상도 구조 결정 실험에 사용하였다.

표 6

에피토프 식별

[0998]

에피토프 잔기 (서열번호)	화합물 #1
비어 있음	1.00
SVAQATSSSGEA (693)	0.96
VAQATSSSGEAP (694)	1.02
AQATSSSGEAPD (695)	0.97
QATSSSGEAPDS (696)	0.96
ATSSSGEAPDSI (697)	0.98
TSSSGEAPDSIT (698)	0.77
SSSGEAPDSITW (699)	0.86

에피토프 잔기 (서열번호)	화합물 #1
SSGEAPDSITWK (700)	0.88
SGEAPDSITWKP (701)	0.88
GEAPDSITWKPY (702)	0.93
EAPDSITWKPYD (703)	0.97
APDSITWKPYDA (704)	1.06
PDSITWKPYDAA (705)	1.05
DSITWKPYDAAD (706)	1.08
SITWKPYDAADL (707)	1.08
ITWKPYDAADLD (708)	1.10
TWKPYDAADLDP (709)	1.13
WKPYDAADLDPT (710)	0.89
KPYDAADLDPTE (711)	0.80
PYDAADLDPTEN (712)	0.83
YDAADLDPTENP (713)	0.87
DAADLDPTENPF (714)	0.88
AADLDPTENPFD (715)	0.88
ADLDPTENPFDL (716)	0.91
DLDPTENPFDLL (717)	1.00
LDPTENPFDLLD (718)	1.11
DPTENPFDLLDF (719)	4.16
PTENPFDLLDFN (720)	4.58
TENPFDLLDFNQ (721)	4.84
ENPFDLLDFNQT (722)	4.00
NPFDLLDFNQTQ (723)	3.13
PFDLLDFNQTQP (724)	4.95
FDLLDFNQTQPE (725)	4.38
DLLDFNQTQPER (726)	3.08
LLDFNQTQPERG (727)	1.88
LDFNQTQPERGD (728)	0.97
DFNQTQPERGDN (729)	0.94
FNQTQPERGDNN (730)	1.00
NQTQPERGDNNL (731)	0.92
QTQPERGDNNLT (732)	0.88
TQPERGDNNLTR (733)	1.05

[0999]

[1000] **실시예 5: 항-FIX V_HH 단편 화합물 #2의 결정화 및 파라토프/에피토프 맵핑**

[1001] 본 연구의 목적은 화합물 #2로 지정된 V_HH 단편의 파라토프 및 에피토프 잔기를 결정하는 것이었다.

[1002] 결정화

[1003] EGR-CMK-억제된 인자 IXa Gla-도메인-결여(야생형)(Cambridge ProteinWorks로부터 구입함, 로트# hGDFIXAWTEGR_11)와 1:1의 몰비로 혼합된 VHH 폴리펩티드 화합물 #2의 결정을 좌적 증기 확산 기술을 사용해 18 ℃에서 성장시켰다. 20mM 트리스-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 및 2.5mM $CaCl_2$ 중 A protein solution of 100 nl 8.4 mg/ml 복합체의 단백질 용액을 침강제인 100 nl의 0.2 M 황산리튬, 0.1 M 트리스-HCl, pH 8.5, 30% (w/v) PEG 4000와 혼합하고, 60 μl 초과하는 침강이 이루어지도록 인큐베이션하였다. 2주 내에 결정들이 나타났다.

[1004] 회절 데이터 수집

[1005] 액체 질소 중에서 급속 냉각하기 전에, 20%의 에틸렌 글리콜이 첨가된 1 μl의 침전물을 결정화 방울에 첨가함으로써 결정을 극저온보호(cryo-protected) 처리를 하였다. 회절 데이터를 Dectris의 Pilatus 2M 픽셀 검출기를 사용하여 Swiss Light Source beamline X06DA(1.0000 Å 파장)에서 100K로 수집하였다. 데이터 자동 색인, 통합 및 스케일링은 XDS 패키지의 프로그램을 사용해 수행하였다(회절 데이터 통계는 표 7에 요약되어 있음).

[1006] 구조 결정 및 정제

[1007] Matthews 계수 분석에 의해 판단했을 때, 비대칭 유닛은 2개의 화합물 #2:EGR-CMK-억제된 인자 IXa Gla-도메인 결여 복합체를 함유한다. 구조는, 소정의 V_HH:FIXa 복합체의 구조를 검색 모델로서 사용해 프로그램 세트 Phenix에 구현된 바와 같은 페이저(Phaser)를 사용해 분자 치환에 의해 결정하였다. COOT를 사용하여 올바른 아미노산 서열을 모형으로 제작하고, 그 후, COOT에서 Phenix의 정제 단계 및 수동 재구성 단계를 사용해 구조를 정제하였다. 정제 통계는 표 7에서 확인할 수 있다.

표 7

데이터 수집 및 정제 통계	
파장 (Å)	1.0000
해상도 범위 (Å)	43.26~2.7 (2.797 ~ 2.7)
공간군	P 1
단위 셀 (Å, 도)	56.51 64.47 64.72 76.115 87.449 85.761
총 반사	42366 (4277)
고유 반사	23473 (2340)
다중도	1.8 (1.8)
완성도 (%)	96.66 (96.77)
평균 I/시그마(I)	6.44 (1.40)
Wilson B-인자 (Å^2)	40.75
R-merge	0.1042 (0.5247)
R-meas	0.1473 (0.7416)
R-pim	0.1041 (0.5241)

[1008]

CC1/2	0.986 (0.594)
CC*	0.997 (0.863)
정제에 사용된 반사	23455 (2340)
R-free에 사용된 반사	1176 (115)
R-work	0.2260 (0.2951)
R-free	0.2825 (0.3665)
CC(work)	0.922 (0.745)
CC(free)	0.829 (0.421)
비-수소 원자 수	6622
거대분자	6394
리간드	54
용매	174
단백질 잔기	823
RMS(결합) (Å)	0.004
RMS(각도)(도)	0.87
라마찬드란 선호도 (%)	94.82
라마찬드란 허용도 (%)	5.18
라마찬드란 이상치 (%)	0.00
회전이성질체 이상치 (%)	6.39
클래시스코어(Clashscore)	9.91
평균 B-인자 (Å^2)	42.93
거대분자	43.06
리간드	42.44
TLS 군의 수	38.49

[1009] 가장 높은 해상도 셸에 대한 통계는 괄호 안에 도시되어 있다.

[1010] 에피토프 및 파라토프의 결정

[1011] V_HH 폴리펩티드 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에서 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 FIX(a) 잔기로서 정의된 화합물 #2의 에피토프는 FIX(a)의 프로테아제 도메인으로부터의 다음 잔기를 포함한다:

[1012] FIX 서열(서열번호 1)에 따른 E224, T225, G226, V250, I251, R252, I253, P255, H257, 및 N260(연속 넘버링).

[1013] FIX(a) 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에서 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 잔기로서 정의된 화합물 #2의 파라토프는 화합물 #2로부터의 다음 잔기를 포함한다:

[1014] F29, N30, Y32, T54, D99, R100, S101, F102, L103, F104, Q106, A107, 및 N113(서열번호 35)(연속 넘버링).

[1015] **실시예 6: 항-FX V_HH 단편 화합물 #1의 결정화 및 파라토프/에피토프 맵핑**

[1016] 본 연구의 목적은 화합물 #1로 지정된 V_HH 단편의 파라토프 및 에피토프 잔기를 결정하는 것이었다.

[1017] 결정화

[1018] 실시예 4에서 식별된 것과 같이, 인간 FX(Schafer-N ApS로부터 구매함)의 활성화 펩티드 서열 aa31~37에 상응하는 합성 펩티드 N-말단-NPFDLLD-C-말단과 1:14의 몰비로 혼합된 V_HH 폴리펩티드 화합물 #1의 결정을 좌적 증기 확산 기술을 사용해 18℃에서 성장시켰다. 20mM 트리스-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl 중 150 nl 4.0 mg/ml 복합체의 단백질 용액을 침강제로서의 50 nl의 0.2 M NaCl, 2 M 황산암모늄, 0.1 M 카코딜산나트륨, pH 6.5와 혼합하고, 60 μl를 초과하는 침강이 이루어질 때까지 인큐베이션하였다. 일주일 이내에 결정들이 나타났다.

[1019] 회절 데이터 수집

[1020] 액체 질소 중에서 급속 냉각하기 전에, 1 μl의 침전제가 첨가된 20%의 에틸렌 글리콜을 결정화 방울에 첨가함

으로써 결정의 동결을 방지하였다. 회절 데이터를 Dectris의 Pilatus 2M 픽셀 검출기를 사용하여 Swiss Light Source beamline X06DA(1.0000 Å 파장)에서 100K로 수집하였다. 데이터의 자동 색인(autoindexing), 통합 및 스케일링은 XDS 패키지의 프로그램을 사용해 수행하였다(회절 데이터 통계는 표 8에 요약되어 있음).

[1021] 구조 결정 및 정제

[1022] 비대칭 유닛은 하나의 화합물 #1:펩티드 복합체를 함유한다. 구조는 단백질 데이터 뱅크 ID 4B41(사슬 A)로 지정된 V_HH 폴리펩티드 구조를 검색 모델로서 사용하여 프로그램 세트 Phenix에서 구현된 것과 같은 페이저(Phaser)를 사용한 분자 치환에 의해 결정하였다. 화합물 #1의 올바른 아미노산 서열을 도입하고, 합성 펩티드에 대한 차이 전자 밀도를 식별하여, 모두 COOT를 사용하여 수동으로 모델을 제작하였다. 그 후, Phenix 정제 단계 및 COOT에서의 수동 재구성 단계를 사용해 구조를 정제하였다. 정제 통계는 표 8에서 확인할 수 있다.

표 8

데이터 수집 및 정제 통계	
파장 (Å)	1.0000
해상도 범위 (Å)	47.61~3.183 (3.297~3.183)
공간군	$P6_122$
단위 셀 (Å, 도)	83.65 83.65 126.32 90 90 120
총 반사	80989 (3197)
고유 반사	4667 (353)
다중도	17.4 (9.1)
완성도 (%)	97.57 (76.08)
평균 I/시그마(I)	8.69 (1.55)
Wilson B-인자 ($Å^2$)	50.39
R-merge	0.4146 (1.447)
R-meas	0.4271 (1.516)
R-pim	0.1004 (0.4227)
CC1/2	0.985 (0.651)
CC*	0.996 (0.888)
정제에 사용된 반사	4664 (353)
R-free에 사용된 반사	234 (18)
R-work	0.1948 (0.2689)
R-free	0.2500 (0.3981)
CC(work)	0.957 (0.685)
CC(free)	0.934 (0.389)
비-수소 원자 수	986
거대분자	981
리간드	5
용매	0
단백질 잔기	130
RMS(결합) (Å)	0.003
RMS(각도)(도)	0.59
라마찬드란 선호도 (%)	96.83
라마찬드란 허용도 (%)	3.17

[1023]

라마찬드란 이상치 (%)	0.00
회전이성질체 이상치 (%)	0.00
클래시스코어(Clashscore)	8.68
평균 B-인자 (Å^2)	44.41
거대분자	44.18
리간드	88.79
TLS 군의 수	1

가장 높은 해상도 셸에 대한 통계는 괄호 안에 도시되어 있다.

[1024]

[1025] 에피토프 및 파라토프의 결정

[1026] V_HH 폴리펩티드 화합물 #1 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 FX 활성화 펩티드 잔기로서 정의되는, 합성 펩티드의 에피토프는, 연속 넘버링에 기초한 상응하는 FX 활성화 펩티드 서열(서열번호 2)에 따른 합성 펩티드로부터의 다음 잔기를 포함한다: N173, P174, F175, L177, 및 L178.

[1027] 합성 펩티드 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 화합물 #1 잔기로서 정의되는, V_HH 폴리펩티드 화합물 #1의 파라토프는 화합물 #1로부터의 다음 잔기를 포함한다:

[1028] D32, A33, M34, G35, Y37, L47, V48, A49, G50, I51, M52, N57, T58, N59, Y60, T61, K97, V99, R101, 및 P102(서열번호 27)(연속 넘버링).

[1029] 합리적인 서열 및 구조 기반 최적화를 위한 부모 VHH 폴리펩티드 서열로서 화합물 #3을 사용하였기 때문에, 합성 펩티드와 복합체를 형성한 V_HH 폴리펩티드 화합물 #3의 상동성 모델을 작제하였다.

[1030] 전술한 실험에서의 합성 펩티드와 복합체를 형성한 화합물 #1의 결정 구조를 합성 펩티드와 복합체를 형성한 화합물 #3의 상동성 모델을 위한 시작 모델로서 사용하였다. 화합물 #1 및 화합물 #3의 아미노산 서열을 정렬하고, 두 서열 간의 상이한 아미노산 잔기를 COOT에서 돌연변이시켜 화합물 #3에 대한 시작 모델을 생성하였다. 화합물 #3을 포함하는 이 모델을 미리 가공하고, 최적화시키고, SCHRODINGER의 MAESTRO에서 제한된 최소화를 수행하였다.

[1031] 서열이 이들 위치에서 동일했기 때문에, 상기 모델은 전술한 것과 동일한 에피토프 및 파라토프 잔기를 나타냈다.

[1032] **실시예 7: 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드의 SPR 분석**

[1033] 본 연구의 목적은 표면 플라스몬 공명(SPR) 분석에 의해 인간 혈장 유래 FX 및 Benefix®와 선택된 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 화합물의 결합 상수를 추정하는 것이었다.

[1034] 정제된 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 화합물이 인간 혈장 유래 FX(Haematology Technologies Inc, USA)에 결합하는 것은 SPR에 의해 프로브하였다.

[1035] 간략하게, 전술한 것과 같이 재조합적으로 제조한 항-GLA-FX를 pH 5의 표준 아민 커플링 화학물질을 사용하여 CM4 센서 칩 또는 Xantec HLC200M 상에 고정시켰다. 10 nM FX(Haematology Technologies, USA)를 10 μL/분의 유속으로 30초 동안 주입하였다. 이어서, 아래 표 9에 따라 1000, 100, 10, 1, 0.1, 및 0 nM의 V_HH 폴리펩티드 화합물을 50 μL/분의 유속으로 200초 동안 주입하여 FX에 결합시키고, 이어서 실행 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, 1 mg/mL 소 혈청 알부민, pH 7.4)을 10분 동안 흘려서 주입하여 FX로부터 해리시켰다. 항-FX V_HH 폴리펩티드 화합물의 희석에도 실행 완충액을 사용하였다. 실행 완충액 중 50 mM EDTA로 이루어진 재생 완충액을 30초의 접촉 시간 및 30 μL/분의 유속으로 사용해 칩을 재생시켰다. 결합 데이터를 25℃에서 수집하고, 제조사(Biacore AB, Uppsala 또는 Bruker Analyser)가 공급한 BiaEvaluation 4.1을 사용하여 1:1 모델에 따라 분석하였다.

[1036] 모든 경우에, 결합 센서그램은 동역학 분석에 기초한 K_D 결정을 할 수 없을 정도로 신속한 결합 및 신속한 해리 동역학 프로파일을 나타냈다. 따라서, 보고된 K_D 값은 항정 상태 분석에 기초하여 결정된다. 분석에 의한 결합 상수는 아래 표 9에 보고되어 있다.

[1037] 정제된 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 화합물이 Benefix®(Pfizer Inc, USA)에 결합하는 것은 SPR에 의해 프로브하였다. 간략하게, 전술한 것과 같이 재조합적으로 제조한 항-GLA-FIX를 pH 5의 표준 아민 커플링 화학물질을 사용하여 CM4 센서 칩 또는 Xantec HLC200M 상에 고정시켰다. 10 μL/분의 유속으로 FIX(10 nM)를 1분 동안 주입하였다. 이어서, 1000, 100, 10, 1, 0.1, 및 0 nM의 V_HH 폴리펩티드 화합물을 30 μL/분의 유속으로 4분 동안 주입하여 FIX(Benefix®)에 결합시키고, 이어서 실행 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, 1 mg/mL 소 혈청 알부민, pH 7.4)을 5분 동안 흘려서 주입하여 FIX로부터 해리시켰다. 항-FIX V_HH 폴리펩티드 화합물의 희석에도 실행 완충액을 사용하였다. 실행 완충액 중 50 mM EDTA로 이루어진 재생 완충액을 30초의 접촉 시간 및 30 μL/분의 유속으로 사용해 칩을 재생시켰다. 결합 데이터를 25℃에서 수집하고, 제조사(Biacore AB, Uppsala)가 공급한 BiaEvaluation 4.1을 사용하여 1:1 모델에 따라 분석하였다.

[1038] 모든 경우에, 결합 센서그램은 동역학 분석에 기초한 K_D 결정을 할 수 없을 정도로 신속한 결합 및 신속한 해리 동역학 프로파일을 나타냈다. 따라서, 보고된 K_D 값은 항정 상태 분석에 기초하여 결정된다.

[1039] 일련의 화합물의 결합 상수 분석은 표 9에 보고되어 있다. FIX의 결합 친화도는 모든 화합물에 전체적으로 낮은 nM의 K_D를 나타낸 반면, FX의 결합에 대해서는 많은 화합물이 높은 nM의 K_D를 나타냈다. 따라서, 표적 매개 약물 소실은 FX에 대해 없을 것으로 예상되는 반면, FIX 상호작용이 예상되지만, 표시된 화합물의 요구되는 항정 상태 혈장 농도로 제한될 것으로 예상된다 따라서, 열거된 화합물에 대한 유의미한 지혈 커버리지를 얻기 위해 요구되는 예상 혈장 농도는, 열거된 화합물에 대한 높은 효능을 감안할 때 낮은 nM 농도가 될 것으로 예상된다.

표 9

[1040] **선택된 V_HH 폴리펩티드 화합물의 추정 결합 상수**

SPR 분석에 의해 결정했을 때, 선택된 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 화합물과 인간 혈장 유래 FX 및 Benefix®의 상호작용에 대한 항정 상태 분석에 기초하여 추정된 결합 상수.

화합물 ID	FX 결합제 K_D (nM)	FIX 결합제 K_D (nM)
화합물 #4	229	11.7
화합물 #5	199	2.7
화합물 #6	232	4.8
화합물 #7	82	2.3
화합물 #8	96	2.5
화합물 #9	70	1.1
화합물 #10	190	5.5
화합물 #11	42	6.4
화합물 #12	26	7.8
화합물 #13	300	2.0
화합물 #14	42	1.6
화합물 #15	350	3.0

[1041] **실시예 8: 트롬빈 생성 시험(TGT) 검정에서 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드의 활성**

[1042] 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 응혈 촉진 활성은, Hemker 등의 문헌[Pathophysiol Haemost Thromb, 2002;32:249-253]에 기술된 원리에 따라 응혈 촉진 합성 인지질 막이 존재하는 가운데 트롬빈 생성을 촉진하는 이들의 능력에 기초하여 결정하였다. 비교를 위해 에미시주맙 서열 동일 유사체(SIA)를 포함시켰다. TGT 검정에서 중화 항-FVIII 다클론 항체로 보충된 정상 인간 혈소판-부족 혈장(NHP)(이하, HA-PPP라 함)을 사용하여 각 V_HH 폴리펩티드 유도체를 시험하였다.

[1043] 양 항-인간 FVIII 다클론 항체(pAb, Haematologic Technologies Inc., VT, USA)로 보충된 (건강한 자원자 유래의) NHP에서의 TGT는 96-웰 플레이트 형광계(Fluorocan Ascan Ascen FL, Thermolabsystems, Helsinki, Finland)를 사용하여 표준 교정된 자동화된 혈전촬영술에 의해 수행하였다. 반응 혼합물은 0.1 μg/ml 항-FVIII pAb와 사전 인큐베이션한 36 μl NHP, 4 μl 시험 화합물 희석물(20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.4, 2% BSA에 희석함), 10 μl의 1 pM 조직 인자(TF, pppLow, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) 또는 1 내지 8.3 U/ml의 인간 인자 XIa(Enzyme Research Laboratories, IN, USA), 및 10 μl FluCa 기질(Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands)을 함유하였다. TGT 검정은, 0.1 μg/ml 항-FVIII pAb, 4 μl 완충액(20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.4, 2% BSA)과 사전 인큐베이션한 36 μl NHP와 10 μl 트롬빈 교정자를 혼합한, 트롬빈 교정자(Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands)를 사용하여 교정하였다. 일반적으로, TGT는 8가지 농도의 시험 화합물(0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 및 300 nM, 최종 혈장 농도 또는 이와 유사한 농도)로 수행하거나, 첨가된 완충액(20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.4, 2% BSA)만으로 수행하였다(대조군). TGT에서 정상 대조군 수준은 NHP 첨가 완충액(20 mM HEPES, 140 mM NaCl, pH 7.4, 2% BSA)만을 사용하여 측정하였다. TGT를 총 60분 동안 진행시켰으며, TGT 파라미터인 피크 트롬빈 높이(nM)는 Thrombinoscope 소프트웨어(Thrombinoscope BV)에 의해 분석하였다. 선택된 시험 V_HH 폴리펩티드 유도체, 화합물 #6, 및 비교자 에미시주맙 SIA 및 Mim8에 대한 대표적인 적정 곡선에 대해서는 도 4를 참조한다. 활성 수준 차이에 대한 평가는 비교자(예: 에미시주맙 SIA) 대비 EC_{50}의 차이로서 수행하거나, 에미시주맙 SIA에 대한 최대 트롬빈 피크 높이 대비 주어진 V_HH 폴리펩티드 화합물에 대한 최대 트롬빈 피크 높이의 차이로서 수행하였다. 많은 수의 V_HH 폴리펩티드 유도체의 스크리닝에는 후자의 접근법을 사용하였다.

[1044] V_HH 폴리펩티드 유도체의 활성을 부스팅하기 위해, CDR 돌연변이의 최적 조합을 식별하여 최대 활성 효과를 생성하였다. 실시예 5 및 6에 기술된 것들과 같은 결정 구조 모델을 사용하여 중요한 파라토프 잔기를 식별하고, 접합 부위로서 시스테인과 치환하기에 적합한 표면 노출 잔기, 및 생체이용률을 향상시키기 위한 pI-저하 치환도 식별하였다. 상이한 링커 및 상이한 접합 유형도 조사하였다. 다음 표에서, 이들 파라미터의 각각에 대한 일련의 V_HH 폴리펩티드 유도체의 활성 프로파일이 개략되어 있으며, 이들은 개별적으로 기술될 것이다.

[1045] 표 10에는, 활성 부스팅 돌연변이에 대해 최적화된, 최적화된 V_HH 폴리펩티드 유도체로부터 수득된 효능 EC_{50} 값이 나타나 있다. 주 성분 연산 및 랜덤 포레스트 알고리즘을 돌연변이 조합에 사용하여 활성을 부스팅하였다. V_HH 폴리펩티드 화합물 #24는 부스팅 돌연변이가 없는 초기 유도체였으며, 이러한 V_HH 폴리펩티드 유도체 및 에미시주맙 SIA와 비교했을 때, 개발된 최선의 V_HH 폴리펩티드 유도체들로부터 최대 40배 및 최대 76배 더 양호한 효능의 증가를 얻었다.

표 10

[1046] V_HH 폴리펩티드 유도체의 TGT 활성, 활성의 최적화

화합물 ID	**연장 모이어티 P 및 L_P** (연장 모이어티의 수)	**pI**	**TGT 활성 EC_{50} 효능 (nM)**
에미시주맙 SIA	-	-	113.9
Mim8	-	-	7.8
화합물 #4	P3 및 L_P 1 (1)	8.36	4.1
화합물 #6	P2 및 L_P1 (2)	6.56	4.4
화합물 #7	P2 및 L_P1 (2)	5.38	2.4
화합물 #8	P2 및 L_P1 (2)	5.05	2.3
화합물 #9	P2 및 L_P1 (2)	4.97	2.1
화합물 #10	P2 및 L_P1 (2)	5.69	2.7
화합물 #11	P2 및 L_P1 (2)	5.08	2.0
화합물 #12	P2 및 L_P1 (2)	4.89	2.2
화합물 #13	P2 및 L_P1 (2)	4.89	2.7
화합물 #14	P2 및 L_P1 (2)	5.20	2.2
화합물 #15	P2 및 L_P1 (2)	5.20	2.5

화합물 #16	P2 및 L_P1 (2)	5.08	4.5
화합물 #17	P2 및 L_P1 (2)	4.80	4.2
화합물 #18	P2 및 L_P1 (2)	4.97	4.6
화합물 #19	P2 및 L_P1 (2)	5.05	3.8
화합물 #20	P2 및 L_P1 (2)	5.38	3.6
화합물 #21	P2 및 L_P1 (2)	4.80	2.5
화합물 #22	P2 및 L_P1 (2)	5.08	2.6
화합물 #24	P3 및 L_P 1 (1)	7.31	87.0
화합물 #69	없음	8.36	1.5

[1047] 표 11에서, 시스테인(링커 L_P1을 통해 부착된 C18 이산 지방산 연장 모이어티 P3과의 접합을 수반하거나 수반하지 않음)과의 치환 후 V_HH 폴리펩티드의 활성을 유지한 V_HH 폴리펩티드 상의 (CDR1~3 외부의) 최적의 접합 부위에 대한 스크리닝을 수행하였다.

[1048] Cys 치환이 도입된 총 95개의 표면 노출 부위를 시험하였다. 기준으로서 화합물 #23/24(CDR에서 임의의 부스팅 돌연변이가 없는 대표적인 V_HH 폴리펩티드)를 사용하는 연속 넘버링에 기초하여, 최적의 접합 부위에 대한 스크리닝을 수행하였다. 다음 잔기 치환을 시험하였다: C-말단 연장부에 도입된 G27C, V28C, V29C, Q30C, P31C, G32C, S34C, L35C, R36C, S38C, A40C, S42C, R55C, Q56C, A57C, P58C, G59C, K60C, E61C, R62C, Y77C, A78C, D79C, V81C, K82C, G83C, R84C, F85C, T86C, S88C, D90C, N91C, S92C, K93C, T95C, Y97C, Q99C, M100C, N101C, S102C, L103C, R104C, P105C, E106C, D107C, T108C, G156C, V157C, V158C, Q159C, P160C, G161C, G162C, S163C, L164C, R165C, S167C, A169C, S171C, R184C, Q185C, A186C, P187C, G188C, K189C, E190C, R191C, Y206C, A207C, D208C, S209C, V210C, K211C, G212C, R213C, F214C, T215C, S217C, D219C, N220C, S221C, K222C, T224C, Y226C, Q228C, M229C, N230C, S231C, L232C, R233C, P234C, E235C, D236C, T237C, 및 Cys.

[1049] 이들 중, 다음 41개의 V_HH 폴리펩티드는 HEK293 발현 시스템을 사용하여 발현시킬 수 있었고, C18 이산 연장기 모이어티를 포함하는 시약 C3과 성공적으로 접합할 수 있었다: C-말단 연장부에 도입된 Q30C, P31C, Q56C, A57C, K60C, E61C, A78C, D79C, K82C, N91C, S92C, Q99C, R104C, G156C, V158C, Q159C, P160C, G161C, G162C, S163C, A169C, S171C, Q185C, A186C, P187C, G188C, K189C, E190C, A207C, D208C, S209C, V210C, T215C, S217C, D219C, N220C, S221C, K222C, S231C, R233C, 및 Cys. 접합이 있거나 없는 이들 41개의 V_HH 폴리펩티드를 TGT 검정에서 활성에 대해 시험하였다. 접합이 있거나 없는 V_HH 폴리펩티드(유도체)의, 에미시주맙 SIA의 최대 트롬빈 피크 높이 대비 V_HH 폴리펩티드 유도체의 최대 트롬빈 피크 높이로서 표현되는, 상대 활성 수준은 표 11에 제시되어 있다. 따라서, 접합 전후에 유지된 활성에 기초하여 다음의 9개 부위가, 예를 들어 C3을 시약으로 사용하여, 연장 모이어티와의 접합하기 위해 유리 Cys를 도입하기에 최적인 것으로 식별하였다: C-말단 연장부 내에 도입된 Cys (화합물 #23/24), Q30C (화합물 #25/26), V158C (화합물 #27/28), P160C (화합물 #29/30), G161C (화합물 #31/32), G188C (화합물 #33/34), E190C (화합물 #35/36), S209C (화합물 #37/38), 및 S231C (화합물 #39/40).

표 11

[1050]

V_HH 폴리펩티드 유도체의 TGT 활성, 연장 모이어티 접합 부위 스크리닝	
V_HH 폴리펩티드 유도체(C-말단 연장부가 없는 화합물 #23/24 변이체) Cys 접합 부위(연속 넘버링)	**TGT 활성, 최대 피크 비율 (에미시주맙 SIA 대비)**
에미시주맙 SIA, 기준 대조군	1.0
V_HH 폴리펩티드_1, C-말단 링커 연장부 SGGGGSGGGSCHHHHHH (서열번호 23)의 Cys	1.4
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_1	1.3
V_HH 폴리펩티드_2, Cys 치환 Q30C	1.8
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_2	1.5
V_HH 폴리펩티드_3, Cys 치환 P31C	1.9

C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_3	1.0
V_HH 폴리펩티드_4, Cys 치환 E58C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_4	0.5
V_HH 폴리펩티드_5, Cys 치환 A78C	2.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_5	0.3
V_HH 폴리펩티드_6, Cys 치환 K82C	1.7
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_6	0.4
V_HH 폴리펩티드_7, Cys 치환 N91C	2.3
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_7	0.9
V_HH 폴리펩티드_8, Cys 치환 S92C	2.3
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_8	0.7
V_HH 폴리펩티드_9, Cys 치환 Q99C	2.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_9	1.2
V_HH 폴리펩티드_10, Cys 치환 R104C	1.7
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_10	0.6
V_HH 폴리펩티드_11, Cys 치환 G156C	0.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_11	0.2
V_HH 폴리펩티드_12, Cys 치환 V158C	1.6
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_12	1.4
V_HH 폴리펩티드_13, Cys 치환 Q159C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_13	1.4
V_HH 폴리펩티드_14, Cys 치환 P160C	2.0
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_14	1.9
V_HH 폴리펩티드_15, Cys 치환 G161C	1.8
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_15	1.6
V_HH 폴리펩티드_16, Cys 치환 G162C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_16	1.3
V_HH 폴리펩티드_17, Cys 치환 S163C	1.8
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_17	1.4
V_HH 폴리펩티드_18, Cys 치환 A169C	2.0
C18 이산 지방산 접합을 갖는 VHV_HH 폴리펩티드_18	1.0
V_HH 폴리펩티드_19, Cys 치환 S171C	2.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_19	0.8
V_HH 폴리펩티드_20, Cys 치환 Q185C	1.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_20	0.3
V_HH 폴리펩티드_21, Cys 치환 A186C	1.0
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_21	0.4
V_HH 폴리펩티드_22, Cys 치환 P187C	2.2
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_22	1.6
V_HH 폴리펩티드_23, Cys 치환 G188C	2.0
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_23	1.8
V_HH 폴리펩티드_24, Cys 치환 K189C	1.7
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_24	0.4
V_HH 폴리펩티드_25, Cys 치환 E190C	1.8
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_25	1.5
V_HH 폴리펩티드_26, Cys 치환 A207C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_26	1.4
V_HH 폴리펩티드_27, Cys 치환 D208C	2.3

C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_27	1.5
V_HH 폴리펩티드_28, Cys 치환 S209C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_28	1.7
V_HH 폴리펩티드_29, Cys 치환 V210C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_29	1.5
V_HH 폴리펩티드_30, Cys 치환 T215C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_30	1.2
V_HH 폴리펩티드_31, Cys 치환 S217C	1.8
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_31	1.2
V_HH 폴리펩티드_32, Cys 치환 D219C	1.8
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_32	1.0
V_HH 폴리펩티드_33, Cys 치환 N220C	2.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_33	0.8
V_HH 폴리펩티드_34, Cys 치환 S221C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_34	0.7
V_HH 폴리펩티드_35, Cys 치환 K222C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_35	1.1
V_HH 폴리펩티드_36, Cys 치환 S231C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_36	1.9
V_HH 폴리펩티드_37, Cys 치환 R233C	1.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_37	1.4
V_HH 폴리펩티드_38, Cys 치환 Q56C	1.1
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_38	0.3
V_HH 폴리펩티드_39, Cys 치환 A57C	0.9
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_39	0.4
V_HH 폴리펩티드_40, Cys 치환 K60C	1.7
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_40	0.4
V_HH 폴리펩티드_41, Cys 치환 D79C	1.7
C18 이산 지방산 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드_41	0.7

[1051] 조성물을 최적화하기 위해, 2개의 항-FIX 및 항-FX V_HH 단편 사이에 재조합적으로 융합된 상이한 링커 L_{1-2}를 시험하였다(표 12 참조). V_HH 폴리펩티드의, 에미시주맙 SIA의 최대 트롬빈 피크 높이 대비 V_HH 폴리펩티드의 최대 트롬빈 피크 높이로서 표현되는 상대 활성 수준은 표 12에 제시되어 있다. 이들 데이터로부터, 소수성 조성의 링커를 갖는 V_HH 폴리펩티드는 일반적으로 가장 높은 상대 활성을 나타낸 반면, 산성 또는 친수성 조성의 링커를 갖는 V_HH 폴리펩티드는 가장 낮은 활성을 나타냈다. QAPGQA, GQAPGQ, 또는 유사한 것으로 구성된 혼합 조성의 링커를 갖는 V_HH 폴리펩티드는 중간 정도의 상대 활성을 나타냈다. 최적의 링커 조성은 바람직하게는 친수성 아미노산과 소수성 아미노산 둘 다를 함유할 것이므로, 등장성 완충액 및 중성 pH에서 2주 동안 37℃의 가속 응력 조건 하에서 높은 안정성을 나타내는 예를 들어 QAPGQA 링커를, MS 분석을 사용해 화학적 안정성에 대해 추가로 조사하였다.

[1052] 따라서, 소수성 아미노산 대 친수성 아미노산의 비는 "40 대 60%" 대 "60 대 40%"가 바람직하다. 표시된 V_HH 폴리펩티드는 모두 동일한 활성 부스팅 CDR 돌연변이 세트를 포함하였지만, CDR 외부에서 상이한 세트의 pI-저하 돌연변이를 포함하였다.

표 12

[1053]

상이한 링커 L_{1-2} 특성을 갖는 V_HH 폴리펩티드 서열의 TGT 활성		
V_HH 폴리펩티드 ID	링커 (L_{1-2}) 서열	TGT 활성, 최대 피크 비율 (에미시주맙 SIA 대비)
에미시주맙 SIA		1.0
화합물 #41	QAPGQA	5.2
화합물 #42	GIGIGIGIGI	5.5
화합물 #43	GTGTGTGTGT	3.7
화합물 #44	GVGVGVGVGV	5.7
화합물 #45	GQAPGQ	4.9
화합물 #46	GGGGSGGGS	5.0
화합물 #47	QAPGQA	5.4
화합물 #48	GLGLGLGLGL	7.0
화합물 #49	GTGTGTGTGT	4.4
화합물 #50	GVGVGVGVGV	5.6
화합물 #51	GGGGSGGGS	4.1
화합물 #52	QAPGQA	4.9
화합물 #53	GEGEGEGEGE	3.1
화합물 #54	GLGLGLGLGL	5.6
화합물 #55	GTGTGTGTGT	4.9
화합물 #56	GVGVGVGVGV	5.6
화합물 #57	GQAPGQ	6.9

[1054] **실시예 9: 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체와 SNAC 및 NAM를 경구 투여에 적합한 투여 형태로 제형화하기**

[1055] 부형제로서 N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노) 카프릴산나트륨(SNAC) 및 니코틴아미드(NAM)를 포함하는 액체 제형을 사용하여 경구 연구를 준비하기 위해, 다음 절차를 따랐다. SNAC를 칭량하여 200 mg/ml의 농도를 수득하고, NAM을 칭량하여 1 M의 농도를 수득하고, HEPES 완충액을 칭량하여 5 mM의 최종 농도를 수득하였다. 분말을 유리 바이알에 옮기고, 이어서 MilliQ-H_2O를 첨가하였다. SNAC, NAM, 및 스테아린산 마그네슘이 용해될 때까지 자성 교반기로 용액을 교반하였다. pH를 측정하고 2 M NaOH로 pH 8로 조정하였다. 따라서, 2~5 mg/ml의 정제되고 접합된 V_HH 폴리펩티드 유도체의 배치를 200 mg/ml의 SNAC 및 1 M의 NAM 최종 농도와 함께 액체 제형화하였다.

[1056] SNAC 및 NAM이 포함된 정제를 사용하여 경구 연구를 준비하기 위해, 다음 절차를 따랐다. 지방산 연장기 접합이 있거나 없는 정제된 V_HH 폴리펩티드(유도체)의 배치를 MilliQ-H_2O로 완충액 교환하고, 0.1 M NaOH 또는 0.1 M 포름산을 사용해 pH를 8.0으로 조정하였다. MilliQ-H_2O에 용해된 V_HH 폴리펩티드(유도체)는 0.5 내지 4 mg/ml의 농도로 존재하였다. V_HH 폴리펩티드(유도체)의 분무 건조는 다음 조건으로 미니 분무 건조기 B290을 사용하여 수행하였다: 펌프 설정 5~6, 공급 유속: 2 ml/분, 유입 온도: 80~85℃, 배출 온도: 45~50℃, 노즐: 1.5 mm, 및 흡입: 100%.

[1057] 정제를 제조하기 위해, 분말을 혼합하여 원하는 조성물을 수득하였다. 다음의 정제 제형을 제조하였다.

[1058] 제형 #1

[1059] V_HH 폴리펩티드(유도체): 10~20 mg

[1060] SNAC: 300 mg

[1061] NAM: 0 mg

[1062] 스테아린산 마그네슘: 5.5 mg

[1063] 제형 #2

[1064] V_HH 폴리펩티드 유도체: 10~20 mg

[1065] SNAC: 300 mg

[1066] NAM: 200 mg

[1067] 스테아린산 마그네슘: 5.5 mg

[1068] 제형 #3

[1069] V_HH 폴리펩티드 유도체: 20 mg

[1070] SNAC: 150 mg

[1071] NAM: 100 mg

[1072] 스테아린산 마그네슘: 1.25 mg

[1073] 혼합된 분말을 칭량하고, 균질한 정제를 위해, 회전식 프레스를 시뮬레이션하도록 펀치가 설정된 Kilian Style One(Romaco)을 사용해 펀칭하였다..

[1074] **실시예 10: 상이한 pI-변화 돌연변이를 갖는 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체를 사용하여 랫트를 대상으로 한 경구 및 정맥내 투여의 약동학 연구**

[1075] 본 연구의 목적은 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 내 pI-변화 돌연변이가 경구 생체이용률과 같은 약동학적 파라미터에 미치는 혀과를 조사하는 것이었다.

[1076] 연구 전 적어도 1주일 동안 시설 내에서 순화시키고, 그룹 케이지에 유지시키고, 표준 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있게 한 스프래그 다울리 랫트의 병렬 군에게, 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 액체 제형을 정맥내(IV) 투여하거나(IV 제형: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4), 동 제형을 실시예 9에 따라 제조하고 경구 섭식에 의해 투여하였다. 경구 투여용 랫트의 경우, 격자 바닥 케이지에서 투여 전날 대략 오후 2시부터 금식시켰고(총 18시간 동안), 물은 자유롭게 마실 수 있게 하였다. 투여 당일, 모든 랫트를 30분 동안 시술실에서 순화시켰다.

[1077] 혈액 샘플은 투여 직전에 채취하고, 이어서 투여 후 다수의 상이한 시점에 채취하였다. 경구(PO) 투여한 동물을 격자 바닥 케이지에서 투여 후 4시간이 될 때까지 금식시켰다. V_HH 폴리펩티드 유도체의 혈장 농도를 감마-Glu-기반 면역검정을 사용하여 측정하였는데, 여기서 시험 분자의 연장 모이어티에 대해 항-V_HH 항체(Novo Nordisk, Denmark) 및 항-감마-Glu(Novo Nordisk, Denmark)를 사용하였다. 여기서, 96-웰 MaxiSorp 플레이트(Nunc, 439454)를 2 μg/ml 항-감마-Glu 항체로 코팅하고, PBS; 0.05% tween 20; 1% BSA; pH 7.4를 사용해 세척하고 차단하였다. 세척 단계 후, 1% 랫트 EDTA 혈장 중 화합물 특이적 교정자(0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2000 pM) 및 랫트 EDTA 혈장 샘플의 100x의 최소 희석물을 플레이트 상에서 인큐베이션하였는데, 여기서 V_HH 폴리펩티드 유도체를 감마-Glu 연장 모이어티를 통해 포획하였다. 추가의 세척 단계 후, 비오티닐화된 자체 V_HH 특이적 항체를 플레이트에 첨가하여(0.5 nM) 샌드위치 ELISA를 구성하였다. 최종 세척 단계 후, 검출 시약으로서 서양 고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)-스트렙트아비딘을 플레이트에 첨가하였다. V_HH 폴리펩티드 유도체에 결합된 비오틴 표지된 항체의 양은 발색 기질(예: TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)을 첨가한 후 검출하였다. 분광계(예: SpectraMax® M2 분광계(Molecular Devices))를 사용하여 광학 밀도를 측정하였다. 반응은 퍼옥시다아제의 농도에 비례하였으며, 이는 다시 V_HH 폴리펩티드 유도체의 농도에 비례하였다. 이들 노출 데이터에 기초하여, Phoenix WinNonlin 또는 오픈 소스 통계 분석 소프트웨어 R(패키지 'NonCompart')을 사용해 비구획적 약동학 파라미터를 계산하였다.

[1078] CDR 외부의 표면 노출 잔기에 도입된 다음 pI-저하 치환 T28D, K43Q, K65Q, N84D, R148Q, N159D, K172Q, K194Q, 및 N213D(화합물 #4를 템플릿으로 사용한 연속 넘버링에 기초함)를 상이한 조합(V_HH 폴리펩티드 유도체 화합물 #59 내지 64 및 화합물 #5를 생성함)으로 시험하고, pI 비조정 V_HH 유도체 화합물 #4와 비교하였다.

[1079] 결과는 V_HH 유도체에 대한 아래 표 13 및 14에 제시되어 있으며, 이는 pI 저하가 경구 생체이용률에 미치는 효

과를 보여준다.

[1080] pI를 약 8.36에서 5.85로 낮추자 생체이용률이 5배 내지 10배 증가하였다(표 13 참조).

[1081] pI 저하가 반감기에 미치는 효과는 관찰되지 않았다(표 14 참조).

표 13

【표 13】 PO 랫트 모델에서 시험된, 조작된 pI 돌연변이를 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 경구 생체이용률 데이터

유도체 ID	연장기, 접합 부위	pI	N (PO군)	PO 투여량 (nmol/kg)	PO 생체이용률 (%)
화합물 #4	C18 이산, C-말단 Cys 접합	8.36	6	338	0.02
화합물 #59	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.57	7	214-230	0.04
화합물 #5	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.56	7	215-233	0.07
화합물 #60	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.42	7	166-167	0.14
화합물 #61	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.42	7	166-167	0.10
화합물 #62	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.09	7	190-208	0.19
화합물 #63	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.09	7	166-167	0.15
화합물 #64	C18 이산, C-말단 Cys 접합	5.85	6	338	0.12

[1082]

표 14

【표 14】 IV 랫트 모델에서 시험된, 조작된 pI 돌연변이를 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 PK 데이터

유도체 ID	연장기, 접합 부위	pI	N (IV군)	IV 투여량 (nmol/kg)	IV MRTHL* (일)
화합물 #4	C18 이산, C-말단 Cys 접합	8.36	3	6.7	0.51
화합물 #59	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.57	3	6.6	0.51

[1083]

화합물 #5	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.56	3	6.6	0.53
화합물 #60	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.42	3	6.6	0.57
화합물 #61	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.42	3	6.6	0.57
화합물 #62	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.09	3	6.6	0.72
화합물 #63	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.09	3	6.6	0.43
화합물 #64	C18 이산, C-말단 Cys 접합	5.85	3	6.7	0.48

* MRTHL: 평균 체류 시간 최종 반감기. MRTHL은 MRT*ln(2)로서 계산된다.

[1084]

[1085] **실시예 11: 랫트를 대상으로 한 정맥내 약동학 연구: 상이한 연장기를 갖는 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드(유도체)**

[1086] 본 연구의 목적은 V_HH 폴리펩티드 유도체 상의 상이한 연장기가 반감기와 같은 약동학적 파라미터에 미치는 효과를 조사하는 것이었다.

[1087] 연구 전 적어도 1주일 동안 시설 내에서 순화시키고, 그룹 케이지에 유지시키고, 표준 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있게 한 스프래그 다울리 랫트의 병렬 군에게, 실시예 9에 따라 제조한 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 액체 제형을 정맥 내(IV) 투여하였다. 경구 투여용 랫트의 경우, 격자 바닥 케이지에서 투여 전날 대략 오후 2시부터 금식시켰고(총 18시간 동안), 물은 자유롭게 마실 수 있게 하였다. 투여 당일, 모든 랫트를 30분 동안 시술실에서 순화시켰다. 혈액 샘플은 투여 직전에 채취하고, 이어서 투여 후 다수의 상이한 시점에 채취하였다. V_HH 폴리펩티드(유도체)의 혈장 농도는 His-태그 기반 면역검정 또는 감마-Glu-기반 면역검정을 사용하여 측정하였으며, 여기서 V_HH 폴리펩티드 유도체에 대한 항-V_HH 항체(Novo Nordisk)와 시험 분자에 융합된 His-태그에 대한 항-His-태그 항체(R&D systems, MAB050) 또는 연장 모이어티에 대한 항-감마-Glu(Novo Nordisk,

Denmark)를 함께 사용하였다. 2개의 면역검정 설정은 유사한 감도를 제공하였는데, V_HH 폴리펩티드 화합물이 분자에 융합된 His-태그를 갖지 않았을 때는 후자를 사용하였다. 96-웰 MaxiSorp 플레이트(Nunc, 439454)를 His-태그 또는 항-감마-Glu 항체로 코팅하고, PBS; 0.05% tween20; 1% BSA; pH 7.4를 사용해 세척하고 차단하였다. 세척 단계 후, 1% 랫트 EDTA 혈장 중 유도체 특이적 교정자(0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2000 pM) 및 랫트 EDTA 혈장 샘플의 100x의 최소 희석물을 플레이트 상에서 인큐베이션하였는데, 여기서 V_HH 폴리펩티드 유도체를 이의 His-태그 또는 감마-Glu 연장 모이어티를 통해 포획하였다. 추가의 세척 단계 후, 비오티닐화된 자체 V_HH 특이적 항체를 플레이트에 첨가하여(0.5 nM) 샌드위치 ELISA를 구성하였다. 최종 세척 단계 후, 검출 시약으로서 서양 고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)-스트렙트아비딘을 플레이트에 첨가하였다. V_HH 폴리펩티드 유도체에 결합된 비오틴 표지된 항체의 양은 발색 기질(예: TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)을 첨가한 후 검출하였다. 분광계(예: SpectraMax® M2 분광계(Molecular Devices))를 사용하여 광학 밀도 판독을 측정하였다. 반응은 퍼옥시다아제의 농도에 비례하였으며, 이는 다시 V_HH 폴리펩티드 유도체의 농도에 비례하였다. 이들 노출 데이터에 기초하여, Phoenix WinNonlin 또는 오픈 소스 통계 분석 소프트웨어 R(패키지 'NonCompart')을 사용해 비구획적 약동학 파라미터를 계산하였다.

[1088] 상이한 연장기 유형을 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체에 대한 결과는 아래 표 15에 나타나 있다. 결과는 연장기로서 상이한 지방산 및 알부민-결합 펩티드를 사용하는 것이 체류 시간 최종 반감기(MRTHL) 중앙값에 미치는 영향을 보여준다.

[1089] C18, C20, 및 테트라졸 지방산 측쇄 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 경우, 연장되지 않은 폴리펩티드와 비교하여 증가된 반감기가 관찰되었을 뿐 아니라(화합물 #66, 화합물 #67, 및 화합물 #68: 3~4배 증가), 알부민-결합 펩티드 연장기 융합을 갖는 VHH 폴리펩티드 유도체의 경우에서도 관찰되었는데(화합물 #70, 화합물 #71, 화합물 #72, 및 화합물 #73: 1.9 내지 3.6배 증가), 이는 알부민 결합제 펩티드와 V_HH 폴리펩티드 사이에서 C-말단 방향으로 융합된 30개 잔기 길이의 GlySer L_P 링커를 사용했을 때 효과가 최적임을 나타낸다. 짧은 C12 지방산을 갖는 V_HH 폴리펩티드 유도체인 화합물 #65는 가장 낮은 반감기를 나타냈다. 이는, 반감기 순환을 연장하기 위해 V_HH 폴리펩티드 유도체를 최적으로 연장하기 위해서는 C12보다 긴 지방산(예를 들어, C16, C18, 또는 C20)이 바람직함을 나타낸다.

표 15

【표 15】 IV 랫트 모델에서 시험된, 상이한 연장기를 갖는 V_HH 폴리펩티드의 PK 데이터

유도체 ID	연장기 및 접합 부위	pI	N (IV군)	IV 투여량 (nmol/kg)	IV MRTHL* (일)
화합물 #64	연장기 없음	7.11	5	6.5	0.19
화합물 #65	C12 이산, C-말단 Cys 접합	7.74	5	6.6	0.11
화합물 #66	C18 이산, C-말단 Cys 접합	7.74	5	6.6	0.63
화합물 #67	C20 이산, C-말단 Cys 접합	7.74	5	6.6	0.75
화합물 #68	테트라졸 이산, C-말단 Cys 접합	7.74	5	6.6	0.71
화합물 #69	연장기 없음	8.36	3	6.9	0.13
화합물 #4	C18 이산, C-말단 Cys 접합	8.36	3	6.7	0.51
화합물 #70	알부민-결합제 펩티드, 10-GlySer 링커, N-말단 융합	7.11	2	6.7	0.36
화합물 #71	알부민-결합제 펩티드, 30-GlySer 링커, N-말단 융합	7.11	2	6.7	0.34
화합물 #72	알부민-결합제 펩티드, 10-GlySer 링커, C-말단 융합	7.18	2	6.7	0.36
화합물 #73	알부민-결합제 펩티드, 30-GlySer 링커, C-말단 융합	7.18	2	6.7	0.70

* MRTHL: 평균 체류 시간 최종 반감기. MRTHL은 MRT*ln(2)로서 계산된다.

[1090]

[1091] **실시예 12: 개를 대상으로 한 경구 및 정맥내 투여의 약동학 연구: SNAC 및 NAM과 함께 제형화된 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드(유도체)**

[1092] 본 연구의 목적은 지방산 연장이 반감기에 미치는 영향을 조사하고, pI의 저하가 경구 생체이용률을 향상시키는지 여부를 조사하는 것이었다.

[1093] 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드(유도체)의 적절한 제형을 비글견의 군에게 정맥 내 투여하거나, 이를 정제로서 제조하여 경구 투여하였다. 비글견을 밤새 금식시킨 후, 아침에 투여하고, 1회 투여 후 3~5시간 동안 금식시켰다. 경구 연구의 하위 집합[$]에서는, 비글견에게 경구 투여하기 10분 전에 약 3 nmol/kg의 글루카곤을 피하 투여하였

다. 혈액 샘플은 투여 직전에 채취하고, 이어서 투여 후 다수의 상이한 시점에 채취하였다. V_HH 폴리펩티드의 혈장 농도는 His-태그 기반 면역검정 또는 감마-Glu-링커 기반 면역검정을 사용하여 측정하였으며, 여기서 V_HH 폴리펩티드 유도체에 대한 항-V_HH 항체(Novo Nordisk)와 시험 분자에 융합된 His-태그에 대한 항-His-태그 항체(R&D systems, MAB050) 또는 시험 항체의 연장 모이어티에 대한 항-감마-Glu(Novo Nordisk, Denmark)를 함께 사용하였다. 2개의 면역검정 설정은 유사한 감도를 제공하였는데, V_HH 폴리펩티드 화합물이 분자에 융합된 His-태그를 갖지 않았을 때는 후자를 사용하였다. 96-웰 MaxiSorp 플레이트(Nunc, 439454)를 항체로 코팅하고, PBS; 0.05% tween20; 1% BSA; pH 7.4를 사용해 세척하고 차단하였다. 세척 단계 후, 1% 비글견 EDTA 혈장 중 화합물 특이적 교정자(0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2000 pM) 및 비글견 EDTA 혈장 샘플의 100x의 최소 희석물을 플레이트 상에서 인큐베이션하였는데, 여기서 V_HH 폴리펩티드 화합물을 이의 His-태그 또는 감마-Glu 링커 모티프를 통해 포획하였다. 추가의 세척 단계 후, 비오티닐화된 자체 V_HH 특이적 항체를 플레이트에 첨가하여(0.5 nM) 샌드위치 ELISA를 구성하였다. 최종 세척 단계 후, 검출 시약으로서 서양 고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)-스트렙트아비딘을 플레이트에 첨가하였다. V_HH 폴리펩티드 화합물에 결합된 비오틴 표지된 항체의 양은 발색 기질(예: TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)을 첨가한 후 검출하였다. 분광계(예: SpectraMax® M2 분광계(Molecular Devices))를 사용하여 광학 밀도 판독을 측정하였다. 반응은 퍼옥시다아제의 농도에 비례하였으며, 이는 다시 V_HH 폴리펩티드 화합물의 농도에 비례하였다. 이들 노출 데이터에 기초하여, Phoenix WinNonlin 또는 오픈 소스 통계 분석 소프트웨어 R(패키지 'NonCompart')을 사용해 비구획적 약동학 파라미터를 계산하였다.

[1094] § 는 경구 투여 10분 전에 약 3 nmol/kg의 글루카곤을 피하 투여함을 나타낸다.

[1095] 3개의 C18 이산 접합된 V_HH 폴리펩티드 유도체에 대한 결과가 아래 표 16 및 17에 제공되어 있는데, 이들 결과는 다음을 확인시켜 준다:

[1096] a) 지방산 연장이 반감기에 미치는 효과, 및

[1097] b) pI의 저하가 경구 생체이용률을 향상시킴.

[1098] 따라서, 연장되지 않은 화합물과 비교했을 때, VHH 폴리펩티드 유도체를 표시된 지방산과 접합시킨 경우, 비글견에서 관찰된 반감기는 370배 내지 710배만큼 증가하였다. C-말단 링커에서 2개의 C16 이산 지방산 접합을 갖는 화합물인 화합물 #6은 약 7.6일의 가장 높은 반감기 증가를 나타냈다.

[1099] 비글견에서, SNAC:NAM 제형은 SNAC 제형 단독과 비교하여 경구 생체이용율을 2배 내지 8배 증가시켰다. 따라서, 경구 제형에 NAM을 첨가하는 것은 임상적으로 관련된 수준, 즉 약 0.1% 또는 그 이상의 경구 생체이용률을 가능하게 하는 현저한 효과가 있었다.

[1100] 효능, 평균 체류 시간, 및 경구 생체이용률을 전반적으로 고려했을 때, 본원에 개시된 것과 같은 V_HH 폴리펩티드 유도체는 경구 투여될 때, 억제제가 있거나 없는 A형 혈우병 및 후천성 A형 혈우병의 치료에 유용할 것으로 예상된다.

표 16

[표 16] 개 모델에서 시험된, 조작된 pI 돌연변이 및 지방산 측쇄 접합체를 갖는 V_HH 폴리펩티드(유도체)의 경구 생체이용률 데이터

유도체 ID	연장기, 접합 부위	pI	N (PO군)	PO 제형	PO 투여량 (nmol/kg)	PO 생체이용률 (%)
화합물 #4	C18 이산, C-말단 Cys 접합	8.36	7	"제형 #1"	83-216	0.02
화합물 #74§	연장기 없음	7.74	6	"제형 #1"	86	0.05
화합물 #61	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.09	7	"제형 #2"	114-225	0.16
화합물 #63	C18 이산, C-말단 Cys 접합	5.85	7	"제형 #2"	132-249	0.13
화합물 #6§	x2 C16 이산, C-말단 Cys 접합	5.61	5	"제형 #2"	99-152	0.09
화합물 #15§	x2 C16 이산, C-말단 Cys 접합	4.89	6	"제형 #3"	54-71	0.24

[1101]

표 17

【표 17】 IV 개 모델에서 시험된, 조작된 pI 돌연변이 및 지방산 측쇄 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드의 PK 데이터

유도체 ID	연장기, 접합 부위	pI	N (IV군)	IV 투여량 (nmol/kg)	IV MRTHL* (일)
화합물 #4	C18 이산, C-말단 Cys 접합	8.36	2	6.5-6.9	3.7
화합물 #74	연장기 없음	7.74	3	1.9-2.0	< 0.01
화합물 #61	C18 이산, C-말단 Cys 접합	6.09	2	6.5-6.6	4.5
화합물 #63	C18 이산, C-말단 Cys 접합	5.85	2	6.6-6.7	4.5
화합물 #6	x2 C16 이산, C-말단 Cys 접합	5.61	3	1.7-2.3	7.1
화합물 #15	x2 C16 이산, C-말단 Cys 접합	4.89	2	2.6	4.1

* MRTHL: 평균 체류 시간 최종 반감기. MRTHL은 MRT*ln(2)로서 계산된다.

[1102]

[1103] **실시예 13: 돼지를 대상으로 한 정맥 내 약동학 연구: C18 접합된 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드(유도체)**

[1104] 본 연구의 목적은 C18 이산 연장기가 있거나 없는 V_HH 폴리펩티드(유도체)의 약동학적 효과를 조사하는 것이었다.

[1105] 항-FX/FIX(a) V_HH 폴리펩티드(유도체)의 적절한 제형을 미니피그 군(*Sus scrofa hosticus*)에 각각 정맥 내(IV) 및 피하(SC) 투여하였다. 혈액 샘플은 투여 직전에 채취하고, 이어서 투여 후 다수의 상이한 시점에 채취하였다. $_V$HH 폴리펩티드(유도체)의 혈장 농도는 His-태그 기반 면역검정 또는 감마-Glu-기반 면역검정을 사용하여 측정하였으며, 여기서 V_HH 폴리펩티드(유도체)에 대한 항-V_HH 항체(Novo Nordisk)와 시험 분자에 융합된 His-태그에 대한 항-His-태그 항체(R&D systems, MAB050) 또는 연장 모이어티에 대한 항-감마-Glu(Novo

Nordisk, Denmark)를 함께 사용하였다. 2개의 면역검정 설정은 유사한 감도를 제공하였는데, V_HH 폴리펩티드 화합물이 분자에 융합된 His-태그를 갖지 않았을 때는 후자를 사용하였다. 96-웰 MaxiSorp 플레이트(Nunc, 439454)를 His-태그 또는 항-감마-Glu 항체로 코팅하고, PBS; 0.05% tween20; 1% BSA; pH 7.4를 사용해 세척하고 차단하였다. 세척 단계 후, 1% 기니피그 EDTA 혈장 중 유도체 특이적 교정자(0, 2.7, 8.2, 24.7, 74, 222, 667, 2000 pM) 및 기니피그 EDTA 혈장 샘플의 100x의 최소 희석물을 플레이트 상에서 인큐베이션하였는데, 여기서 V_HH 폴리펩티드 유도체를 이의 His-태그 또는 감마-Glu 연장 모이어티를 통해 포획하였다. 추가의 세척 단계 후, 비오티닐화된 자체 V_HH 특이적 항체를 플레이트에 첨가하여(0.5 nM) 샌드위치 ELISA를 구성하였다. 최종 세척 단계 후, 검출 시약으로서 서양 고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)-스트렙트아비딘을 플레이트에 첨가하였다. V_HH 폴리펩티드 유도체에 결합된 비오틴 표지된 항체의 양은 발색 기질(예: TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)을 첨가한 후 검출하였다. 분광계(예: SpectraMax® M2 분광계(Molecular Devices))를 사용하여 광학 밀도 판독을 측정하였다. 반응은 퍼옥시다아제의 농도에 비례하였으며, 이는 다시 V_HH 폴리펩티드 유도체의 농도에 비례하였다. 오픈 소스 통계 분석 소프트웨어 R(패키지 'NonCompart')을 사용해 비구획적 약동학 파라미터를 계산하였다. 지방산 연장기가 있거나 없는 VHH 폴리펩티드에 대한 결과는 아래 표 18에 나타나 있으며, 이 결과는, 실시예 11, 12, 및 13에서 관찰된 바와 같이, 반감기 연장을 위한 지방산 연장기 접합이 반감기에 미치는 효과를 확인시켜 준다.

[1106] 따라서, 기니피그에서 관찰된 반감기는, V_HH 폴리펩티드를 지방산 C18 이산 연장기와 접합시켰을 때, 연장되지 않은 V_HH 폴리펩티드 화합물과 비교해 약 15배 내지 20배 증가하였다.

표 18

【표 18】 돼지 모델에서 시험된, 조작된 pI 돌연변이 및 지방산 연장기 접합을 갖는 V_HH 폴리펩티드의 PK 데이터.

유도체 ID	연장기, 접합 부위	pI	N (IV군 또는 SC군)	투여량 (nmol/kg)	IV MRTHL* (일)
화합물 #75	연장기 없음	8.95	3 (SC)	30	0.59
화합물 #75	연장기 없음	8.95	2 (IV)	30	0.24
화합물 #4	C18 이산, C-말단 Cys	8.36	3 (IV)	5.3	3.6
화합물 #63	C18 이산, C-말단 Cys	5.85	3 (IV)	4.8	4.7

* MRTHL: 평균 체류 시간 최종 반감기. MRTHL은 MRT*ln(2)로서 계산된다.

[1107]

[1108] **실시예 14: 마우스 꼬리-정맥 횡절단(TVT) 출혈 모델에서, 최적화된 항-FX/항-FIX(a) 폴리펩티드 유도체의 약력학 효과**

[1109] 중등도 출혈의 HA 마우스 모델에서 생체 내 효능을 시험하였다. TVT 모델에서는, FVIII 투여가 야생형 마우스에서 관찰된 것과 동일한 수준으로 출혈을 감소시키는 것으로 이전에 나타난 적이 있다. 시험된 화합물의 마우스 종간 교차 반응성의 결여를 극복하기 위해, 출혈 실험 전에 HA 마우스에게 인간 FIX 및 FX를 보충하였다. 출혈 기간 종료 후, 총 혈액 손실을 분광광도계 헤모글로빈 측정에 의해 결정하였다. 표시된 V_HH 폴리펩티드 유도체 및 FIX의 혈장 수준을 항-V_HH(Novo Nordisk, Denmark) 및 항-감마Glu-링커 항체(Novo Nordisk, Denmark), 및 항-FIX 항체(LS-B7226, LSBio, 및 FIX-2F24, 자체 클로닝)를 각각 사용하여 발광 산소 채널링 검정에 의해 정량화하였다. FX 수준은 상업적 FX ELISA(KSP134, Nordic Biosite)에 의해 정량화하였다. 표시된 V_HH 폴리펩티드 유도체를 사용한 투여량-반응 연구에서, 공유 안정값(shared plateau values)(> 0)을 갖는 3-파라미터 역 로그(투여량) 반응 방정식에 데이터를 피팅하여 EC_{50} 값을 결정하였다. 1% ROUT 계수를 사용하여 자동 이상치 제거럴

적용하고, GraphPad Prism 소프트웨어(버전 9.0.1)를 사용하여 제곱의 합을 (실혈에 따라) 가중하였다.

[1110] 표 19에 나타낸 바와 같이, 투여량-반응 연구는, 비히클 군 및 야생형, 비-혈우병 군과 각각 비교하여, 시험한 V_HH 폴리펩티드 유도체에서 실혈의 유의한 감소가 나타났고, 이는 야생형 마우스에서 관찰된 실혈 수준에 상당함을 보여주었다. EC_{50} 유효 투여량 범위의 추정치가 표 20에 제시되어 있고, 높은 효능을 나타내는데, 이는 50% 효과가 시험된 3개의 화합물 모두에 대해 낮은 nmole/kg(투여량)에서 관찰되었기 때문이다.

표 19

[1111]

TVT 출혈 마우스 모델에서 항-FX/항-FIX(a) 폴리펩티드 유도체가 미치는 효과		
유도체 # / 투여량 (μmole/kg)	**출혈 시간** (분, 평균 ± SD, n = 6)	**실혈** (nmole, 평균 ± SD, n = 6)
비히클	21.0 ± 3.5	4594 ± 1326
야생형, 비-혈우병	5.4 ± 0.4	879 ± 438
화합물 #4		
0.003 μmole/kg	25.8 ± 3.0	6979 ± 1281
0.005 μmole/kg	23.2 ± 6.7	6204 ± 1496
0.006 μmole/kg	19.7 ± 11.2	5232 ± 3698
0.010 μmole/kg	13.9 ± 8.7	2973 ± 2973
0.013 μmole/kg	11.0 ± 8.6	2264 ± 2264
화합물 #6		
0.003 μmole/kg	26.4 ± 4.4	7445 ± 1053
0.005 μmole/kg	18.4 ± 6.7	5143 ± 1861
0.006 μmole/kg	11.8 ± 9.6	3771 ± 3374
0.010 μmole/kg	19.2 ± 10.9	4532 ± 3277
0.013 μmole/kg	7.1 ± 4.3	1024 ± 1050
화합물 #15		
0.0065 μmole/kg	9.5 ± 7.3	2408 ± 2391
0.0065 μmole/kg	14.8 ± 8.3	4545 ± 2417
0.0097 μmole/kg	7.0 ± 4.7	1223 ± 1163
0.0129 μmole/kg	6.9 ± 1.7	1438 ± 798

표 20

[1112]

TVT 출혈 마우스 모델에서 항-FX/항-FIX(a) 폴리펩티드 유도체의 EC_{50} 추정치		
유도체 ID	**출혈 시간 EC_{50}** (μmole/kg)	**실혈 EC_{50}** (μmole/kg)
화합물 #4	0.0097	0.0094
화합물 #6	0.0077	0.0087
화합물 #15	0.0047	0.0060

[1113] **실시예 15: 경구 투여 후 최적화된 항-FX/항-FIX(a) V_HH 폴리펩티드 유도체의 생체 외 활성 결정**

[1114] 화합물 #6의 PO 투여를 특성화하기 위한 실시예 12에서의 야생형 개를 대상으로 한 약동학(PK) 연구 후, 투여 후 30분 및 90분의 2가지 별도 시점에 발색 활성을 결정하였다. 측정된 FVIII-모사 발생 활성을 화합물 #6의 혈장 노출과 비교하여, PO 투여 후 혈청에서 활성 V_HH 폴리펩티드 유도체의 분획을 결정하였다.

[1115] 상업적 FVIII 발색 활성 검정(FVIII:C, Hyphen Biomed, France)을 사용하여 화합물 #6의 발색 활성을 결정하여, 비글견 혈청 샘플을 분석하였다. 검량 곡선의 경우, 화합물 #6을 10% 비글견 혈청에 첨가하고, 동일한 검정을 사용하여 10배 희석물로 혈청 샘플을 분석하였다. 최종 활성 결과를 10배 희석물에 맞게 10배로 보정

하였다. 화합물 #6의 혈장 노출 수준을 항-V_HH(Novo Nordisk, Denmark) 및 항-감마Glu-링커 항체(Novo Nordisk, Denmark)를 사용하여 발광 산소 채널링(LOCI) 검정에 의해 정량화하였다. 데이터는 표 21에 요약되어 있다. FVIII:C 발색 활성은 투여 후 30분 및 90분 시점에 혈청에서 측정할 수 있었고, 발색 활성에 기초한 화합물 #6의 정량화는 LOCI 검정을 사용한 화합물 #6의 혈장 노출 측정에 기초한 추정치와 유사하다. 화합물 #6 정량화에 있어서의 불일치는 검정 민감도의 차이에 기인하는 것으로 예측된다. 데이터는, PO 투여된 V_HH 폴리펩티드 유도체가 비글견에서 경구 흡수 후 완전히 활성임을 보여주는데, 이는 예를 들어 혈우병 A를 앓고 있는 환자를 치료하기 위해 경구 이용 가능한 FVIII 모방 약물을 만드는 개념이 가능함을 나타낸다.

표 21

[1116]

PO 투여 후 항-FX/항-FIX(a) 폴리펩티드 유도체의 생체 외 활성				
경구 투여 후 경과 시간	**동물**	**FVIII:C 발색 활성 (pM, 혈청)**	**화합물 #6 노출 (pM, 혈장)**	**활성/노출 비율 (%)**
30분	동물 1	633	414	153%
	동물 2	1740	905	192%
	동물 3	445	247	180%
	동물 4	1930	1490	129%
90분	동물 1	1640	1290	127%
	동물 2	3820	3130	122%
	동물 3	2470	2110	117%
	동물 4	7920	6550	121%

[1117] **실시예 16: 항-FX VHH 단편 화합물 #76의 결정화 및 파라토프/에피토프 맵핑**본 연구의 목적은 화합물 #76(VHH-1.15)로 지정된 V_HH 단편의 파라토프 및 에피토프 잔기를 결정하는 것이었다.

[1118] 결정화

[1119] 실시예 4에서 식별된 바와 같이, 인간 FX(Apigenex로부터 구입)의 활성화 펩티드 서열 aa31~37에 상응하는 합성 펩티드 N-말단-NPFDLLD-C-말단과 1:4의 몰비로 혼합된 CHO를 사용하여 생산된 V_HH 단편 화합물 #76의 결정을 좌적 증기 확산 기술을 사용하여 성장시켰다. 20mM 트리스-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl 중 250 nl 5.75 mg/ml 복합체의 단백질 용액을 침강제로서 250 nl의 4% (v/v) 타시메이트(1.8305 M 말론산, 0.25 M 구연산3암모늄, 0.12 M 숙신산, 0.3 M DL-말산, 0.4 M 아세트산 나트륨 삼수화물, 0.5 M 포름산나트륨, 0.16 M 타르타르산2암모늄) pH 5.0, 12% (w/v) 폴리에틸렌 글리콜 3350과 혼합하고, 80 μl 초과하는 침강이 이루어지도록 인큐베이션하였다. 18℃에서 5일 동안 인큐베이션한 후, 결정화 플레이트를 5℃로 옮겼다. 3개월 이내에 결정들이 나타났다.

[1120] 회절 데이터 수집

[1121] 액체 질소 중에서 급속 냉각하기 전에, 20%의 에틸렌 글리콜을 첨가하여 결정의 동결을 방지하였다. 회절 데이터는 Dectris의 Eiger2 16M 픽셀 검출기를 사용해 Swiss Light Source의 빔라인X10SA(1.0000 Å 파장)에서 100K로 수집하였다. 데이터 자동 색인, 통합 및 스케일링은 XDS 패키지의 프로그램을 사용해 수행하였다(회절 데이터 통계는 표 22에 요약되어 있음).

[1122] 구조 결정 및 정제

[1123] 비대칭 유닛은 2개의 화합물 #76:FX AP 31-37 복합체를 함유한다. 구조는, 관련된 V_HH의 이전에 결정된 결정 구조를 검색 모델로서 사용해 프로그램 세트 Phenix에 구현된 바와 같은 페이저(Phaser)를 사용해 분자 치환에 의해 결정하였다(실시예 6 참조). 화합물 #76의 올바른 아미노산 서열을 도입하고, FX AP 31~37을 모두 COOT를 사용하여 차이 전자 밀도 맵에서 수동으로 모델을 제작하였다. Phenix에서 정제 라운드를 수행하고 COOT에서 수동으로 재구성하는 동안, 트레오닌 잔기 117 상의 O-글리코실화 및 티로신 잔기 109의 황산화를 관찰하고 모델링하였다. 정제 통계는 표 22에서 확인할 수 있다.

표 22

[1124]

데이터 수집 및 정제 통계	
파장 (Å)	1

해상도 범위 (Å)	41.89 ~ 1.7 (1.761 ~ 1.7)
공간군	P 4_1 2_1 2
단위 셀 (Å, 도)	66.54 66.54 161.74 90 90 90
총 반사	534639 (54552)
고유 반사	40883 (4000)
다중도	13.1 (13.6)
완성도 (%)	99.59 (99.48)
평균 I/시그마(I)	17.03 (0.83)
Wilson B-인자 ($Å^2$)	35.51
R-merge	0.07098 (3.508)
R-meas	0.07398 (3.642)
R-pim	0.0206 (0.9736)
CC1/2	0.999 (0.72)
CC*	1 (0.915)
정제에 사용된 반사	40750 (3981)
R-free에 사용된 반사	1993 (193)
R-work	0.1828 (0.3798)
R-free	0.2077 (0.4038)
CC(work)	0.963 (0.862)
CC(free)	0.949 (0.702)
비-수소 원자 수	2225
거대분자 수	1958
리간드 수	84
용매 수	217
단백질 잔기	254
RMS(결합)	0.010
RMS(각도)	1.15
라마찬드란 선호도 (%)	96.67
라마찬드란 허용도 (%)	2.92
라마찬드란 이상치 (%)	0.42
회전이성질체 이상치 (%)	0.50
클래시스코어(Clashscore)	3.59
평균 B-인자 ($Å^2$)	47.24
거대분자 평균	46.21
리간드 평균	71.05
용매 평균	51.13
TLS 군의 수	1
가장 높은 해상도 셸에 대한 통계는 괄호 안에 도시되어 있다	

[1125] 에피토프 및 파라토프의 결정

[1126] V_HH 폴리펩티드 화합물 #76 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 FX 활성화 펩티드 잔기로서 정의되는, 합성 펩티드의 에피토프는, 연속 넘버링에 기초한 상응하는 FX 활성화 펩티드 서열(서열번호 2)에 따른 합성 펩티드로부터의 다음 잔기를 포함한다: N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179.

[1127] 합성 펩티드 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 화합물 #76 잔기로서 정의되는, V_HH 단편 화합물 #76의 파라토프는 화합물 #76으로부터의 다음 잔기를 포함한다: A33, M34, G35, W47, V48, A49, A50, I51, S52, S57, T58, N59, Y60, A61, A97, A98, D99, G105, L107, Y109 (연속 넘버링)(서열번호 734).

[1128] **실시예 17: 항-FX V_HH 단편 화합물 #77의 결정화 및 파라토프/에피토프 맵핑**

[1129] 본 연구의 목적은 화합물 #77(V_HH1.13)로 지정된 V_HH 단편의 파라토프 및 에피토프 잔기를 결정하는 것이었다.

[1130] 결정화

[1131] 인간 FX(Apigenex에서 합성함)의 활성화 펩티드 서열 aa31~37에 상응하는 합성 펩티드 N-말단-NPFDLLD-C-말단과 1:4의 몰비로 혼합된 CHO를 사용하여 생산된 V_HH 단편 화합물 #77의 결정을 좌적 증기 확산 기술을 사용하여 성장시켰다. 20mM 트리스-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl 중 250 nl 6.1 mg/ml 복합체의 단백질 용액을 침강제로서 250 nl의 3% (v/v) 타시메이트(1.8305 M 말론산, 0.25 M 구연산3암모늄, 0.12 M 숙신산, 0.3 M DL-말산, 0.4 M 아세트산 나트륨 삼수화물, 0.5 M 포름산나트륨, 0.16 M 타르타르산2암모늄) pH 4.0, 11% (w/v) PEG 3350과 혼합하고, 80 μl 초과하는 침강이 이루어지도록 인큐베이션하였다. 5℃에서의 인큐베이션 4일차에 결정들이 나타났다.

[1132] 회절 데이터 수집

[1133] 액체 질소 중에서 급속 냉각하기 전에, 20%의 에틸렌 글리콜을 첨가하여 결정의 동결을 방지하였다. 회절 데이터는 Dectris의 Eiger2 16M 픽셀 검출기를 사용해 Swiss Light Source의 빔라인X10SA(1.0000 Å 파장)에서 100K로 수집하였다. 데이터 자동 색인, 통합 및 스케일링은 XDS 패키지의 프로그램을 사용해 수행하였다(회절 데이터 통계는 표 23에 요약되어 있음).

[1134] 구조 결정 및 정제

[1135] 비대칭 유닛은 2개의 화합물 #77:FX AP 31-37 복합체를 함유한다. 구조는, 실시예 16에서의 화합물 #76:FX AP 31~37의 결정 구조로부터의 전체 비대칭 단위를 검색 모델로서 사용하여 프로그램 세트 Phenix에서 구현된 바와 같은 페이저를 사용해 분자 치환에 의해 결정하였다. 화합물 #77의 올바른 아미노산 서열을 도입하고, Phenix에서의 정제 및 COOT에서의 수동 재구축을 적용하였다. 정제 통계는 표 23에서 확인할 수 있다.

표 23

데이터 수집 및 정제 통계	
파장 (Å)	1.0000
해상도 범위 (Å)	32.88 ~ 1.7 (1.761 ~ 1.7)
공간군	P 4_1 2_1 2
단위 셀 (Å, 도)	58.99 58.99 160.25 90 90 90
총 반사	418459 (41888)
고유 반사	31790 (3080)
다중도	13.2 (13.6)
완성도 (%)	98.90 (97.90)
평균 I/시그마(I)	16.44 (1.79)
Wilson B-인자 (Å^2)	26.81
R-merge	0.08787 (1.558)
R-meas	0.09151 (1.618)
R-pim	0.02521 (0.4322)
CC1/2	0.999 (0.762)
CC*	1 (0.93)
정제에 사용된 반사	31765 (3079)
R-free에 사용된 반사	1588 (154)
R-work	0.1717 (0.2765)
R-free	0.2112 (0.3009)
CC(work)	0.960 (0.903)
CC(free)	0.935 (0.883)
비-수소 원자 수	2253
거대분자 수	1971
리간드 수	50
용매 수	232
단백질 잔기	254
RMS(결합)	0.011
RMS(각도)	1.03
라마찬드란 선호도 (%)	98.33

[1136]

라마찬드란 허용도 (%)	1.67
라마찬드란 이상치 (%)	0.00
회전이성질체 이상치 (%)	0.49
클래시스코어(Clashscore)	3.83
평균 B-인자 (Å^2)	35.30
거대분자 평균	33.83
리간드 평균	66.50
용매 평균	41.00
TLS 군의 수	1

[1137] 가장 높은 해상도 셀에 대한 통계는 괄호 안에 도시되어 있다.

[1138] 에피토프 및 파라토프의 결정

[1139] V_HH 단편 화합물 #77 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 FX 활성화 펩티드 잔기로서 정의되는, 합성 펩티드의 에피토프는, 연속 넘버링에 기초한 상응하는 FX 활성화 펩티드 서열(서열번호 2)에 따른 합성 펩티드로부터의 다음 잔기를 포함한다: N173, P174, F175, L177, L178, 및 D179.

[1140] 합성 펩티드 내 중원자로부터 4.0 Å 이내의 거리에 중원자(즉, 비-수소 원자)를 갖는 것을 특징으로 하는 화합물 #77 잔기로서 정의되는, V_HH 단편 화합물 #77의 파라토프는 화합물 #77으로부터의 다음 잔기를 포함한다:

[1141] A33, M34, G35, W47, V48, A49, A50, I51, S52, S57, T58, N59, Y60, A61, A97, A98, D99, G105, L107, Y109 (연속 넘버링)(서열번호 735).

[1142] **실시예 18: 이중특이적 V_HH 폴리펩티드 유도체의 항정 상태 FXa 생성 동역학**

[1143] 본 연구의 목적은, 응혈 촉진 인지질 막이 존재하는 가운데 FIXa에 의한 FX 활성화를 촉진하는 항-FIXa/FX 이중특이적 V_HH 폴리펩티드 유도체의 능력에 기초하여 항-FIXa/FX 이중 특이적 V_HH 폴리펩티드 유도체의 응혈 촉진 활성을 결정하는 것이었다. 시험된 화합물은 표 24에 나열되어 있고, 비교를 위해 에미시주맙 SIA를 포함시켰다.

[1144] 각 화합물의 항정 상태 FXa 생성 활성은 주어진 화합물 농도에서 Michaelis-Menten 동역학(Michaelis 상수(K_M) 및 1차 속도 상수(k_{cat}/K_M))의 파라미터로서 보고되어 있다. 화합물(최종 검정 농도는 표 24에 표시되어 있음)을 검정 완충액(50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.1% (w/v) PEG8000, pH 7.3 + 1 mg/ml BSA) 중 0.1 nM 인간 혈장 유래 FIXa(Haematologic Technologies Inc, USA) 및 20 μM 25:75 포스파티딜 세린:포스파티딜 콜린 인지질 소포(Haematologic Technologies Inc, USA)와 함께 5분 동안의 사전 인큐베이션하였다. 그런 다음, 인간 혈장 유래 FX(Haematologic Technologies Inc, USA)의 2배 연속 희석물을 500 nM에서 시작하여 첨가하여 활성화를 개시하였다. 실온에서 7분의 활성화 후, 25 μl 퀀칭 완충액(50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 60 mM EDTA, 0.1% PEG8000, pH 7.3 + 1 mg/ml BSA)을 첨가하여 반응물(50 μl)을 퀀칭시켰다. FXa의 생성량은 25μl 2 mM S-2765 발색 기질(Chromogenix, 스웨덴)을 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기에서 405 nm(ΔOD/min)에서의 흡광 측정치에 의해 발색 기질 변환의 측정함으로써 결정하였다. 유사하게, 유리 FIXa에 의한 FX 활성화를 10 nM의 FIXa 농도 및 5 내지 10분의 반응 시간으로 결정하였다. 405 nm에서 측정된 흡광도를 상응하는 FXa 농도로 변환하기 위해, 전술한 것과 같이 405 nm에서의 흡광도를 기록하기 전에, 0~5 nM(50 μl)의 FXa 표준 곡선에 25 μl의 퀀칭 완충액 및 25 μl의 2 mM S-2765 발색 기질을 첨가하였다. FXa 농도의 함수로서 ΔOD/분의 선형 회귀로 기울기를 생성하는는데, 이는 측정된 ΔOD/분을 FXa 생성 속도로 변환하는 데 사용될 수 있다:

[1145] FXa 생성 속도= (ΔOD/분) / ($기울기_{FXa\ 표준\ 곡선}$ * 반응 시간)

[1146] Michaelis-Menten 항정 상태 동역학 파라미터는 FX(기질) 농도의 함수로서 FXa 생성 속도를 다음 식에 피팅하여 결정하며:

[1147] FXa 생성 속도 = (k_{cat} * $[FIXa]_t$ * $[FX]_t$) / (K_M + $[FX]_t$)

[1148] 여기서, k_{cat}는 효소 효율($분^{-1}$), $[FIXa]_t$는 총 FIXa(효소) 농도(nM), $[FX]_t$는 총 FX(기질) 농도(nM) ,및 K_M은 Michaelis 상수(nM)이다. 표 24에는 시험된 각 화합물에 대해 결정된 항정 상태 동역학 상수뿐만 아니라 시험된 농도도 열거되어 있다.

표 24

[1149]

결정된 항정 상태 효소 동역학 상수

V_HH 폴리펩티드 유도체 ID / 항체 명칭	시험 농도 (nM)	K_M (nM)	k_{cat}/K_M (1/(분*nM))
화합물 #21	5	3.9	0.27
화합물 #8	5	4.8	0.27
화합물 #17	5	9.0	0.15
화합물 #19	5	8.2	0.30

화합물 #16	5	7.1	0.14
화합물 #15	5	6.9	0.25
화합물 #13	5	6.2	0.18
화합물 #6	5	5.9	0.33
에미시주맙-SIA	300	53.5	0.03
유리 FIXa (10 nM)	N/A	281.5	0.00012

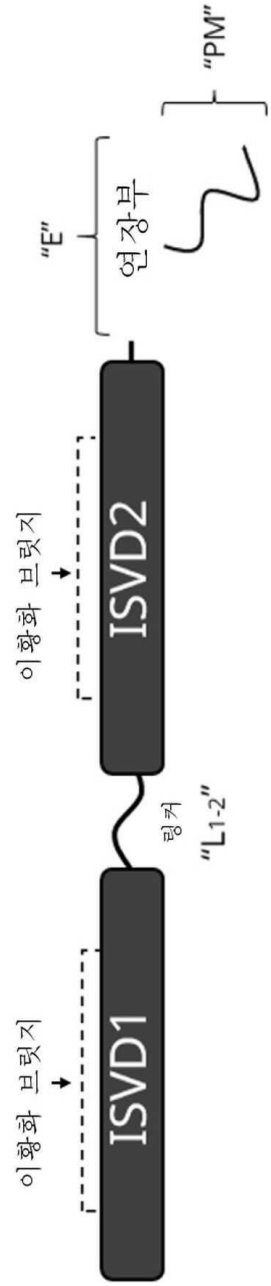
[1150] 결론

[1151] 시험된 항-FIXa/FX 이중특이적 V_HH 폴리펩티드 유도체 모두는 5 nM의 최종 농도로 보충되었을 때 유리 FIXa의 K_M을 281.5 nM에서 3.9~9.0 nM으로 감소시키고, 추가로 촉매 효율을 0.00012 $min^{-1}nM^{-1}$에서 0.14~0.33 $min^{-1}nM^{-1}$로 증가시킨다. 대조적으로, 300 nM의 에미시주맙-SIA는 K_M을 53.5 nM으로 감소시킨다.

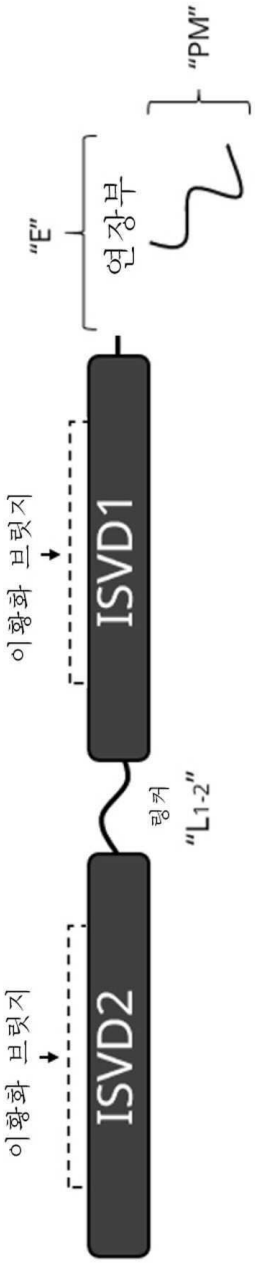
[1152] 감소된 K_M 값은 FIX(a)/FX의 개선된 조립(공간 배열)을 반영하며, 이는 V_HH 폴리펩티드 유도체의 상당한 효능 증가로 이어진다. 모든 화합물은 예상되는 약리학적 관련 농도에서 시험된다.

도면

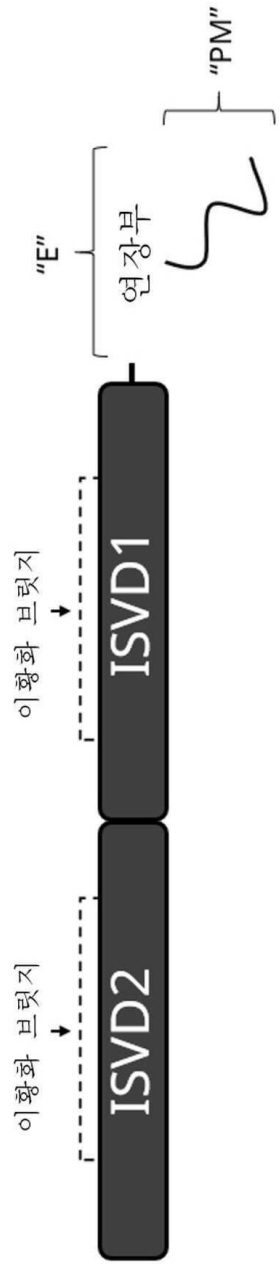
도면1a



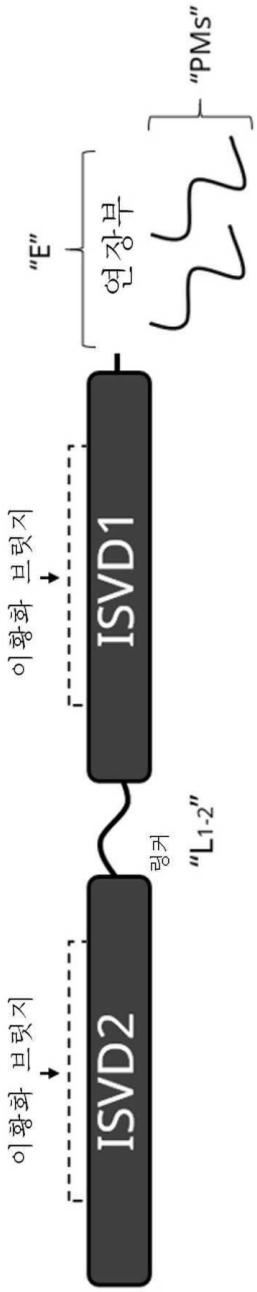
도면1b



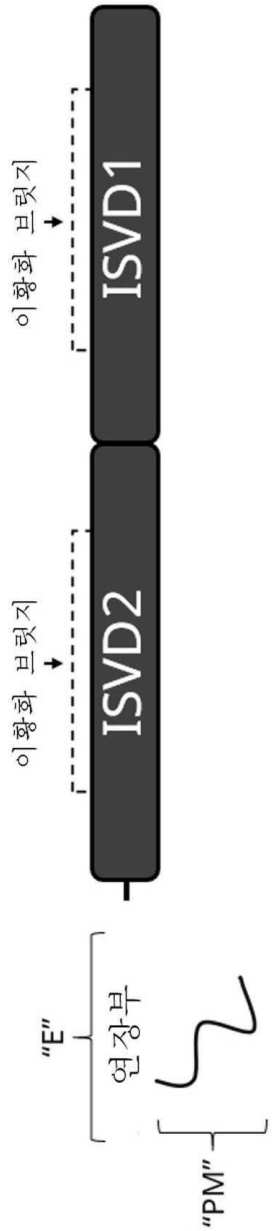
도면1c



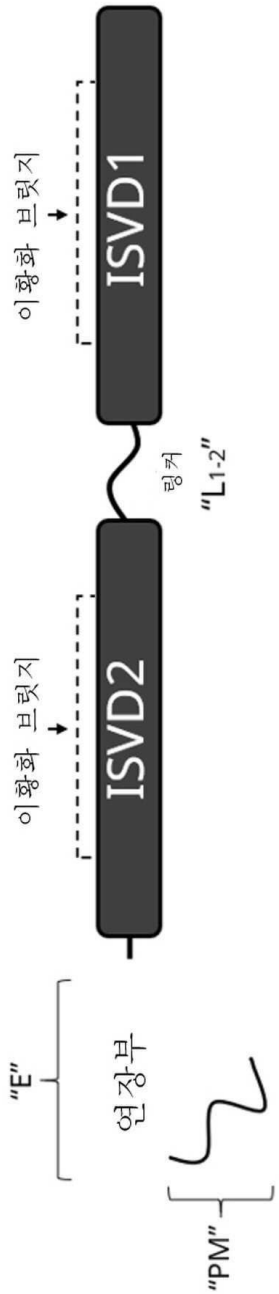
도면1d



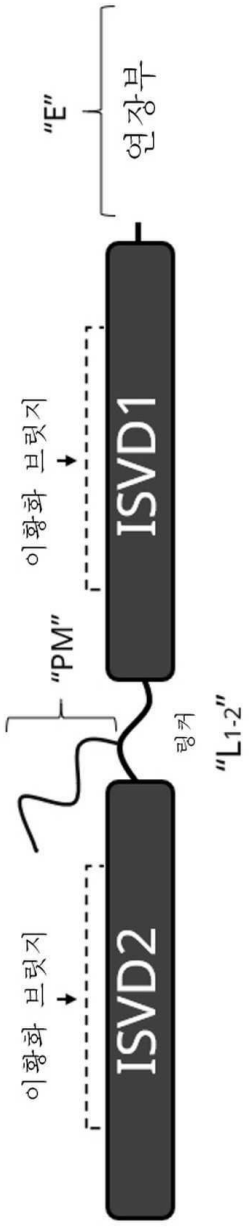
도면1e



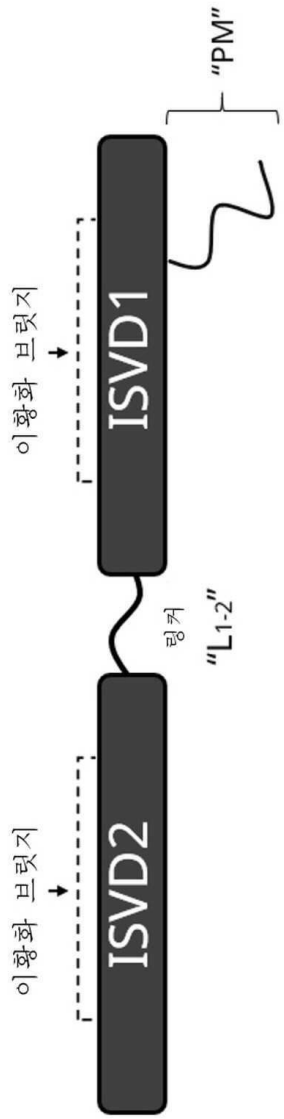
도면1f



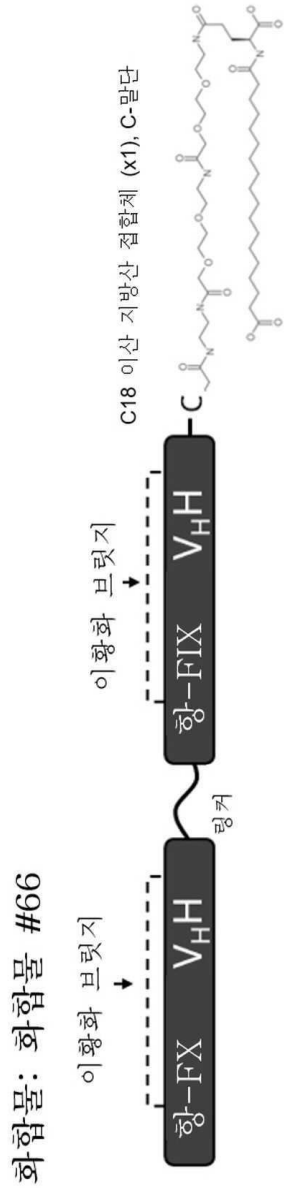
도면1g



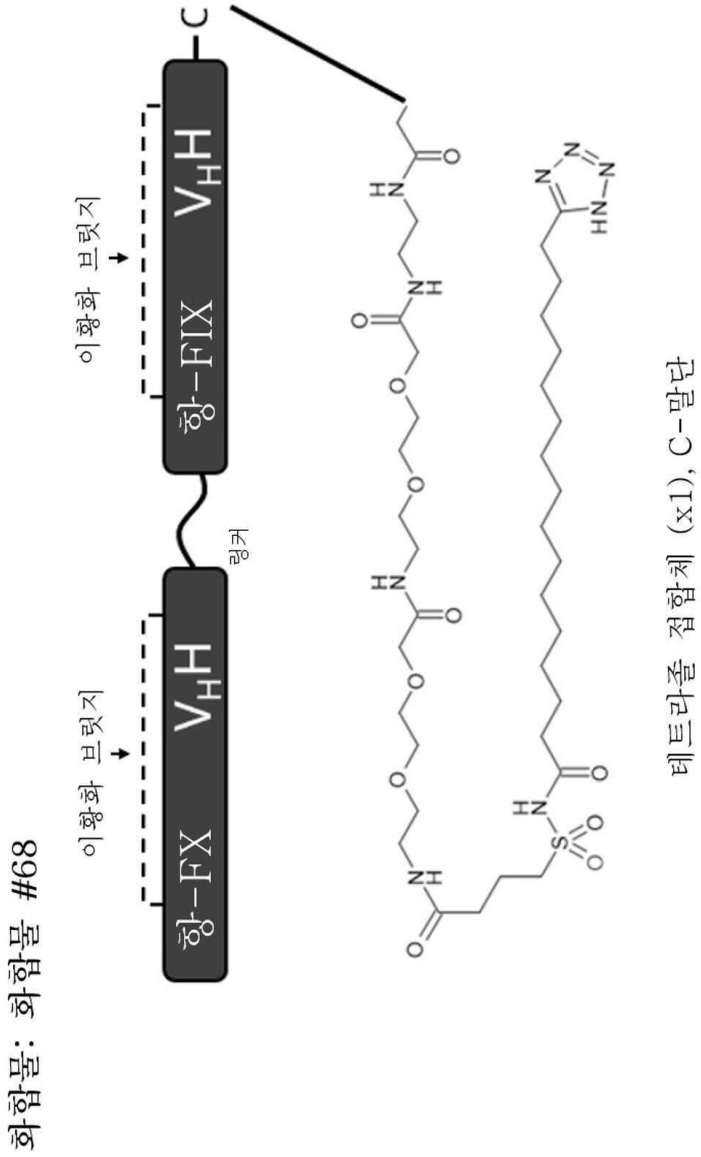
도면1h



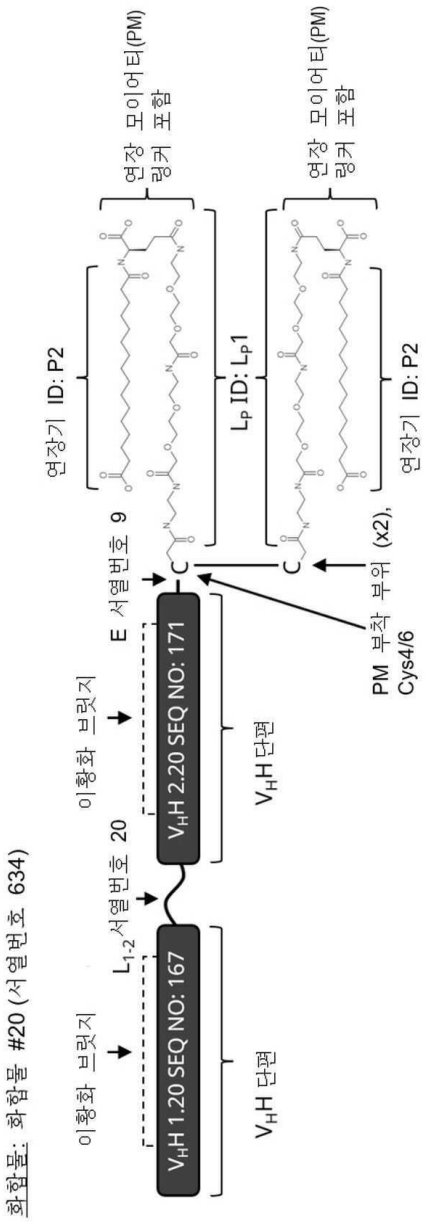
도면2a


화합물: 화합물 #66
이황화 브릿지
항-FX
V_HH
링커
이황화 브릿지
항-FIX
V_HH
C
C18 이산 지방산 접합체 (x1), C-말단

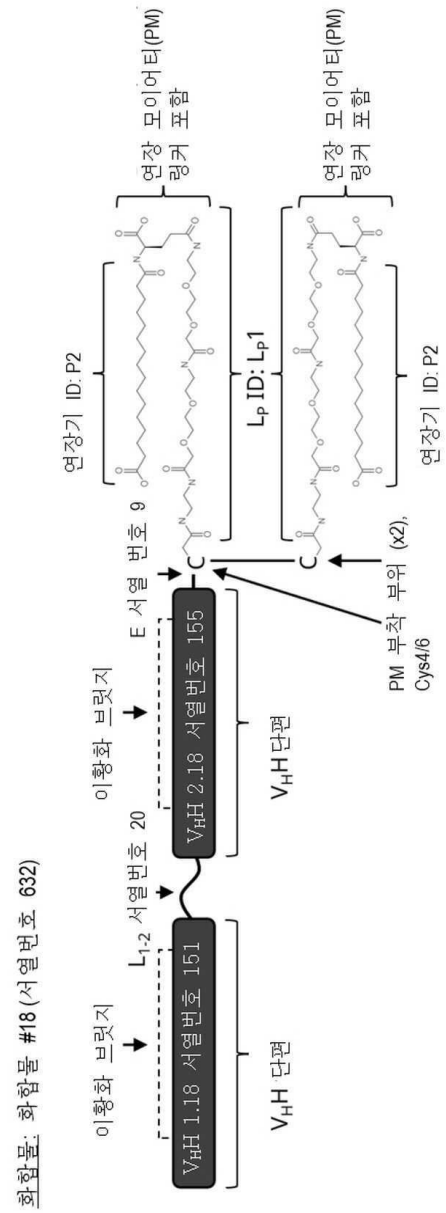
도면2b



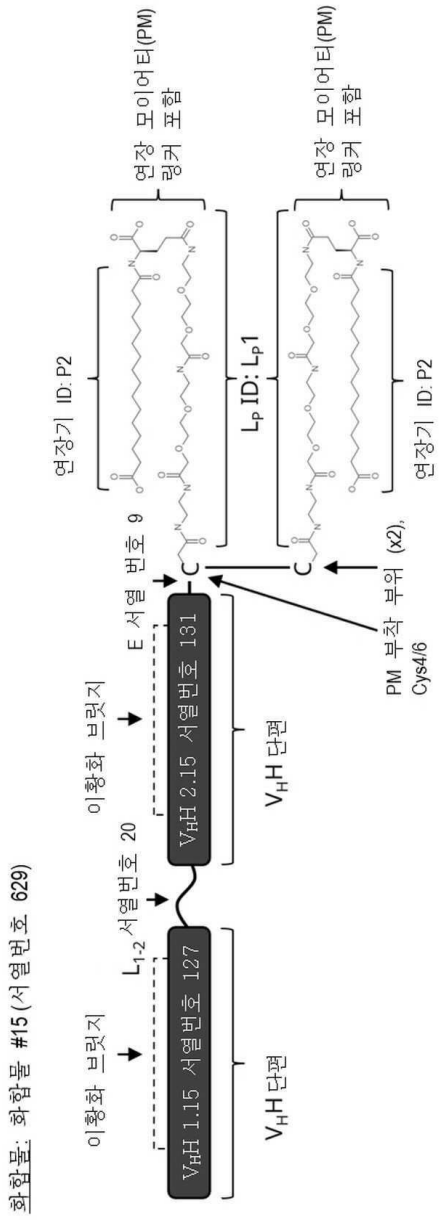
도면3a


화합물: 화합물 #20 (서열번호 634)
이황화 브릿지
L_{1-2} 서열번호 20
이황화 브릿지
E 서열번호 9
연장기 ID: P2
연장 모이어티(PM) 링커 포함
V_HH 1.20 SEQ NO: 167
V_HH 단편
V_HH 2.20 SEQ NO: 171
V_HH 단편
L_P ID: L_P1
C
C
PM 부착 부위 (x2), Cys4/6
연장 모이어티(PM) 링커 포함
연장기 ID: P2

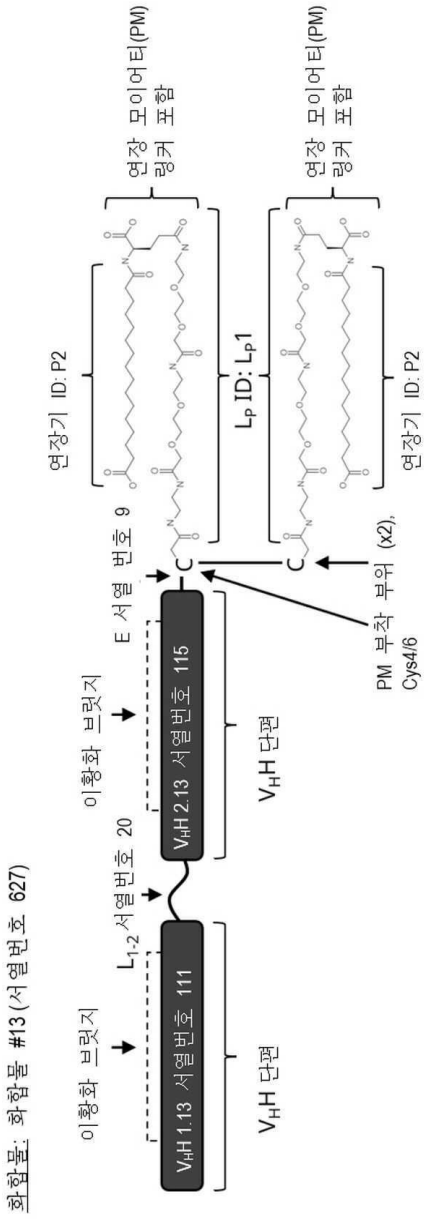
도면3b


화합물: 화합물 #18 (서열번호 632)
이황화 브릿지
VHH 1.18 서열번호 151
VHH 단편
L1-2 서열번호 20
이황화 브릿지
VHH 2.18 서열번호 155
VHH 단편
E 서열 번호 9
연장기 ID: P2
연장 모이어티(PM) 링커 포함
LP ID: LP1
PM 부착 부위 (x2), Cys4/6
연장 모이어티(PM) 링커 포함
연장기 ID: P2

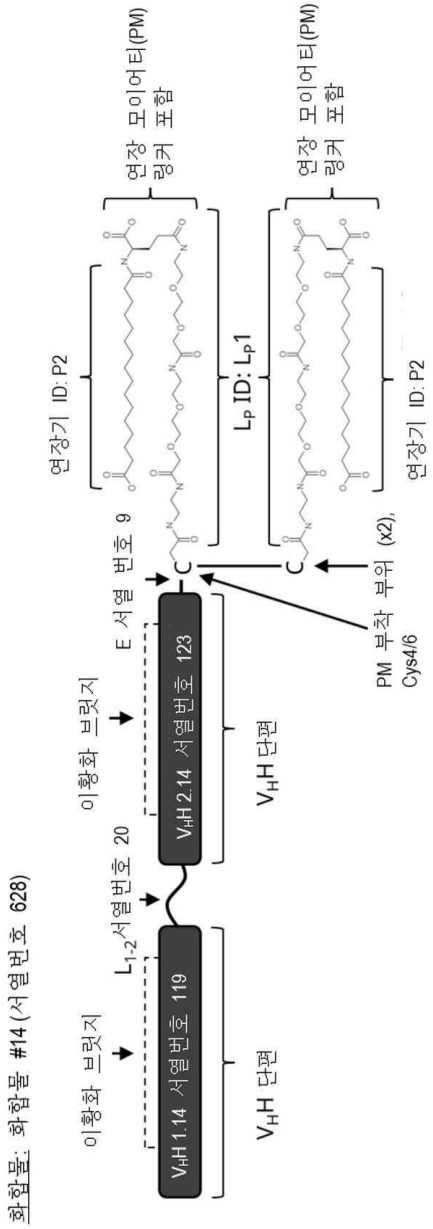
도면3c


화합물: 화합물 #15 (서열번호 629)
이황화 브릿지
VHH 1.15 서열번호 127
VHH 단편
L1-2 서열번호 20
이황화 브릿지
VHH 2.15 서열번호 131
VHH 단편
E 서열 번호 9
연장기 ID: P2
LP ID: LP1
연장 모이어티(PM) 링커 포함
PM 부착 부위 (x2), Cys4/6
연장 모이어티(PM) 링커 포함
연장기 ID: P2

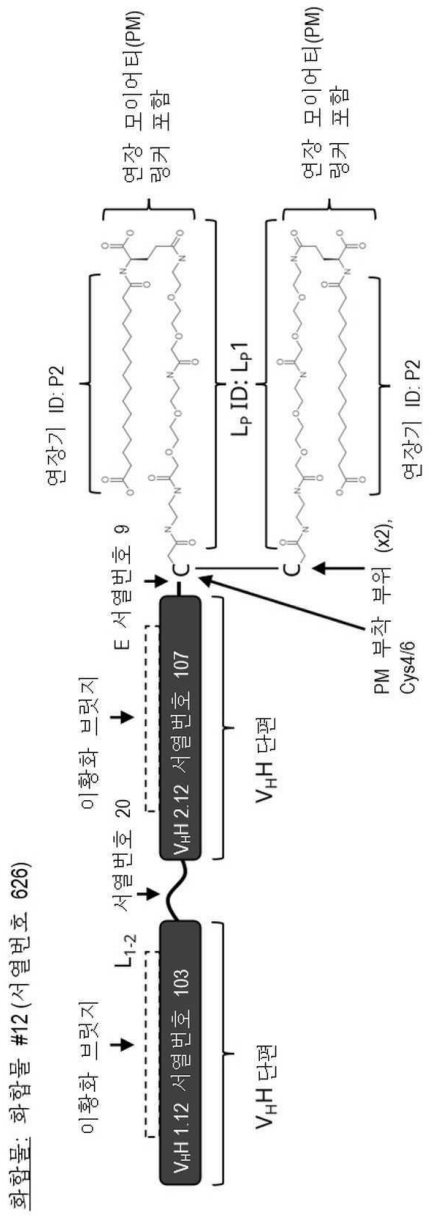
도면3d


화합물: 화합물 #13 (서열번호 627)
이황화 브릿지
VHH 1.13 서열번호 111
VHH 단편
L1-2 서열번호 20
이황화 브릿지
VHH 2.13 서열번호 115
VHH 단편
E 서열 번호 9
연장기 ID: P2
연장 모이어티(PM) 링커 포함
LP ID: LP1
PM 부착 부위 (x2), Cys4/6
연장 모이어티(PM) 링커 포함
연장기 ID: P2

도면3e

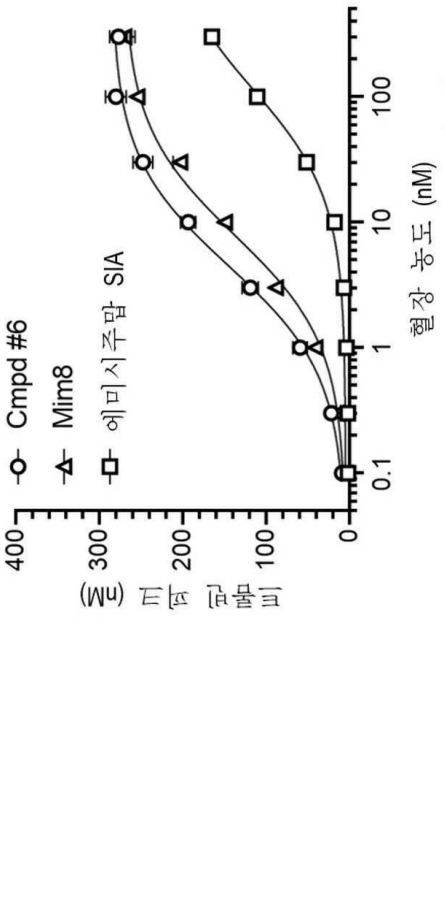

화합물: 화합물 #14 (서열번호 628)
이황화 브릿지
VHH 1.14 서열번호 119
VHH 단편
L1-2 서열번호 20
이황화 브릿지
VHH 2.14 서열번호 123
VHH 단편
E 서열 번호 9
연장기 ID: P2
연장 모이어티(PM) 링커 포함
LP ID: LP1
PM 부착 부위 (x2), Cys4/6
연장 모이어티(PM) 링커 포함
연장기 ID: P2

도면3f


화합물: 화합물 #12 (서열번호 626)
이황화 브릿지
VHH 1.12 서열번호 103
L1-2
서열번호 20
이황화 브릿지
E 서열번호 9
VHH 2.12 서열번호 107
VHH 단편
VHH 단편
연장기 ID: P2
연장 모이어티(PM) 링커 포함
LP ID: LP1
PM 부착 부위 (x2), Cys4/6
연장 모이어티(PM) 링커 포함
연장기 ID: P2

도면4

TGT 검정: 선택된 시험 화합물 및 비교자에 대한 적정 곡선의 예



도면5a

FIX(a)에 결합하는 ISVD 서열의 서열 정렬 (CDR 서열은 밑줄 처진 굵은 글씨로 표시됨)

Cmpd20_aFIX	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFNIYTMSWFRQAPGQEREFVAGLRWTDSSTEYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADRSFLFAQALGATKNYEYWGQGTLVTVSS
Cmpd18_aFIX	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFNIYTMSWFRQDPGQEREFVAGLRWTDSSTEYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADRSFLFAQALGATKNYEYWGQGTLVTVSS
Cmpd15_aFIX	EVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGRTFNIYTMSWFRQAPGQEREFVAGLRWTDSSTEYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADRSFLFAQALGATKNYEYWGQGTLVTVSS
Cmpd13_aFIX	EVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGRTFNIYTMSWFRQDPGQEREFVAGLRWTDSSTEYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADRSFLFAQALGATKNYEYWGQGTLVTVSS
Cmpd14_aFIX	EVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGRTFNIYTMSWFRQAPGQEREFVAGLRWTDSSTEYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADRSFLFAQALGATKNYEYWGQGTLVTVSS
Cmpd12_aFIX	EVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGRTFNIYTMSWFRQDPGQEREFVAGLRWTDSSTEYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADRSFLFAQALGATKNYEYWGQGTLVTVSS

도면5b

FX에 결합하는 ISVD 서열의 서열 정렬 (CDR 서열은 밑줄 처진 굵은 글씨로 표시됨)

Cmpd20_aFX	DVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGGTKSRYAMGWFRQAPGQERDWVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADDSVGDGYLDYWGQGTLVTVSS
Cmpd18_aFX	DVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGGTKSRYAMGWFRQAPGQEREWVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLDMDDLRPEDTALYYCAADDSVGDGYLDYWGQGTLVTVSS
Cmpd15_aFX	DVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGGTKRRLAMGWFRQAPGQEREWVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADDSVGDGYLDYWGQGTLVTVSS
Cmpd13_aFX	DVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGGTKRRLAMGWFRQAPGQEREWVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLDMDDLRPEDTALYYCAADDSVGDGYLDYWGQGTLVTVSS
Cmpd14_aFX	DVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGGTKRRLAMGWFRQAPGQEREFVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMDSLRPEDTALYYCAADDSVGDGYLDYWGQGTLVTVSS
Cmpd12_aFX	DVQLVESGGGVVQPGGSLQLSCAASGGTKRRLAMGWFRQAPGQEREFVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLDMDDLRPEDTALYYCAADDSVGDGYLDYWGQGTLVTVSS

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.