(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7459354号
(P7459354)

(45)発行日　令和6年4月1日(2024.4.1)

(24)登録日　令和6年3月22日(2024.3.22)

(51)国際特許分類

C07K 16/46 (2006.01)	C07K	16/46	ZNA	
C07K 16/36 (2006.01)	C07K	16/36		
A61K 39/395 (2006.01)	A61K	39/395	N	
A61P 7/04 (2006.01)	A61K	39/395	Y	
A61K 47/18 (2017.01)	A61P	7/04		

FI

請求項の数　7　外国語出願　（全115頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-111956(P2023-111956)
(22)出願日　令和5年7月7日(2023.7.7)
(65)公開番号　特開2024-20151(P2024-20151A)
(43)公開日　令和6年2月14日(2024.2.14)
審査請求日　令和6年2月2日(2024.2.2)
(31)優先権主張番号　22183825
(32)優先日　令和4年7月8日(2022.7.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　22183818
(32)優先日　令和4年7月8日(2022.7.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
早期審査対象出願

(73)特許権者　509091848
ノヴォ ノルディスク アー／エス
デンマーク，バウスヴェア ディーケー－２８８０，ノヴォ アレー １
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　アンドレアス・ヴェッゲ
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者　ダニエル・グラナタ
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＦＶＩＩＩ（ａ）の代わりとなることができる非常に効力があるＩＳＶＤ化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体であって、

第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、

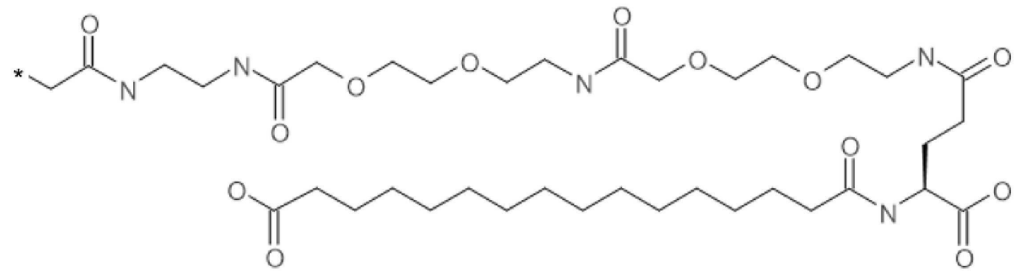
第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、

表面曝露アミノ酸残基に結合している少なくとも１つの延長部分と、を含み、

前記ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、配列番号６２９を含み、

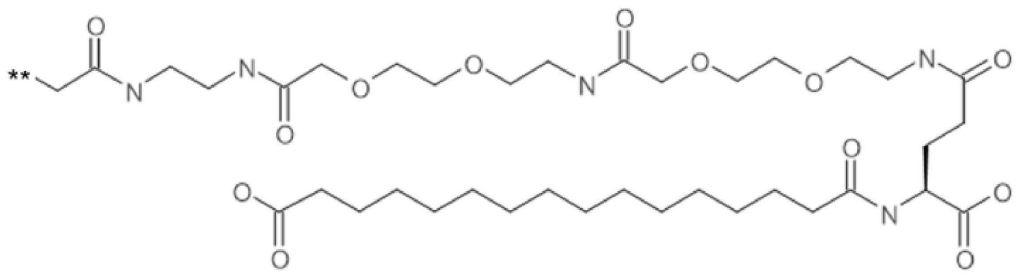
表面曝露アミノ酸残基に結合している第１の延長部分が、以下の構造を含み、

【化１】



かつ表面曝露アミノ酸残基に結合している第２の延長部分が、以下の構造を含み、

【化２】



式中、「＊」が、配列番号６２９の２５７位のＣｙｓであり、
式中、「＊＊」が、配列番号６２９の２５９位のＣｙｓである、
血液凝固促進ＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

【請求項２】

前記ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、二重特異性ＩＳＶＤポリペプチド誘導体または二重特異性V_HHポリペプチド誘導体である、請求項１に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

【請求項３】

請求項１または２に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体と、１つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項４】

前記組成物が、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩を含む、請求項３に記載の医薬組成物。

【請求項５】

前記Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩が、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）であり、かつ前記組成物が、ニコチンアミド（ＮＡＭ）をさらに含む、請求項４に記載の医薬組成物。

【請求項６】

インヒビターが存在する、もしくは存在しない血友病Ａの治療、または後天性血友病Ａの治療に使用するための、請求項３に記載の医薬組成物。

【請求項７】

経口投与される、請求項３に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、凝固第ＩＸ（ａ）因子および第Ｘ（ａ）因子に結合することができる化合物、ならびに血友病Ａを含む様々な形態の血友病などの血液凝固障害の治療におけるそれらの使用に関する。

【０００２】

配列表の参照による組み込み

本出願は、電子形式の配列表とともに提出される。配列表の内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００３】

血友病Ａ（ＨＡ）およびＢ（ＨＢ）を有するヒトなどの血液凝固障害を有する患者では、凝固カスケードの様々な工程が、例えば、機能的な凝固因子の非存在または存在が不十分であることに起因して、機能不全となる。そのような凝固カスケードの一部の機能不全は、不十分な血液凝固および潜在的に生命を脅かす出血、または関節などの内部器官への損傷をもたらす。

【０００４】

一般的に血友病Ａと呼ばれる凝固第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）欠損症は、世界中の約４２０，０００人に影響を及ぼす先天性出血障害であり、そのうち約１０５，０００人が現在診断されている。血友病Ａは、１％以下（重度）、２～５％（中等度）、および６～３０％（軽度）（［非特許文献１］）、またはＷＦＨの“Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ ｏｆ ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ”２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ；Ｅｐｕｂ ６ ＪＵＬ ２０１２に従って、５～＜４０％の第ＦＶＩＩＩ因子血漿レベルによって定義される３つの重症度のグレードを有する。出血は特発的に、または外傷後に現れ得る。血友病Ａを有する患者の約半数が、重度の血友病Ａを有すると分類され、小児期早期から始まる重度の出血を経験し、以後の人生で、特発性出血または過剰出血の頻繁なエピソードを経験する。出血は一般的に関節および筋肉内に起こり、適切な治療を行わなければ、再発性出血は不可逆的な血友病性関節症につながり得る（［非特許文献２］）。

【０００５】

血友病Ａを有する患者は、外因性ＦＶＩＩＩなどの凝固因子補充療法を受け得る。従来の治療は、出血エピソードの予防法または要求治療として提供される、補充療法から成る。最近まで、重度の血友病Ａを有する患者に対する予防処置には、血漿由来ＦＶＩＩＩもしくは組み換えＦＶＩＩＩ、またはその長時間作用型変異体のいずれかを用いた、１週間に最大３回の静脈注射が含まれた。

【０００６】

しかしながら、このような患者は、こうした外因性因子に対する中和抗体、いわゆる阻害物質を発生し、以前に効率的だった療法も無効にするリスクがある。阻害物質を有する血友病Ａ患者は、部分的に先天性であり、部分的に後天性である血液凝固障害の非限定的な例である。ＦＶＩＩＩに対する阻害物質が発生した患者は、従来の補充療法で治療することができない。外因性凝固因子は、静脈内にのみ投与される場合があり、これは患者にとってかなりの不便であり、また不快である。

【０００７】

ＦＶＩＩＩ活性の低減または不在によって引き起こされる不適切なＦＸａ形成およびトロンビン生成の低下は、血友病Ａ患者の出血素因の根底にある理由である。

【０００８】

ＦＸの酵素活性形態ＦＸａへのタンパク質分解変換は、ＦＩＸａおよびその補因子活性型ＦＶＩＩＩ（ＦＶＩＩＩａ）を含む固有のＦＸ活性化複合体によって達成することができる。補因子結合は、ＦＩＸａの酵素活性を約５桁増加させ、［非特許文献３］によって概説されているように複数のメカニズムを通して生じると考えられている。特に、ＦＶＩＩＩａは、ＦＸに対するタンパク質分解活性を増加させたＦＩＸａの構造を安定化させることがわかっている（［非特許文献４］、［非特許文献５］）。

【０００９】

近年、エミシズマブ（ＨＥＭＬＩＢＲＡ（登録商標））（ＡＣＥ９１０としても公知である）は、従来の補充療法の因子に対する阻害物質を伴うまたは伴わない血友病Ａの皮下予防処置について承認された。エミシズマブは血友病Ａの治療のためにＣｈｕｇａｉ Ｐ

ｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ／Ｒｏｃｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されたヒト化二重特異性抗完全長ＦＩＸ（ａ）／抗ＦＸ（ａ）モノクローナル抗体である。エミシズマブは、ＦＶＩＩＩ補因子機能（［非特許文献６］および［特許文献１］を参照）を模倣するように設計されている。ミリリットル血漿当たり３０～５０μｇのエミシズマブを用いた治療は、デシリットル血漿当たり、少なくとも１０～１５ＩＵの同等の第ＶＩＩＩ因子活性に相当すると推測されている（［非特許文献７］）。しかしながら、一部の患者は、エミシズマブに対する阻害物質（抗薬剤抗体）を発現し、この化合物による治療は無効であった。

【００１０】

エミシズマブに例示されるような阻害物質の生成に加えて、他の抗体特性も、患者に有効な抗体系の治療を達成するために重要である。特に、非特異的結合の高い傾向を伴う抗体が診療所の安全性の問題につながり得ることが示されている。一部の報告では、高いレベルの非特異的結合は、抗体の循環半減期を数倍低減し、患者にとって無効で面倒な投薬レジメンをもたらした（［非特許文献８］、および［非特許文献９］を参照）。

【００１１】

［特許文献２］、［特許文献３］（［特許文献４］）、［特許文献５］、および［特許文献６］は、抗ＦＩＸ（ａ）／抗ＦＸ（ａ）二重特異性完全長抗体、および皮下投与による血友病の治療に使用するための血液凝固促進としてのそれらの使用を開示している。１つのかかる二重特異性抗体は、Ｍｉｍ８と指定される（［非特許文献１０］および［特許文献７］を参照）。

【００１２】

しかしながら、血友病コミュニティ、特に血液凝固障害を有する対象者において、まだ多くの非常に重要な満たされていない医療ニーズがあり、特に、治療負担の低減、ならびに血友病Ａおよび関連する疾患などの血液凝固障害の治療における使用のためのＦＶＩＩＩ（ａ）の代わりとなることができる改善された化合物に対するニーズがある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１３】

【文献】国際公開第２０１２／０６７１７６号
【文献】国際公開第２０１８／１４１８６３号
【文献】国際公開第２０１９／０６５７９５号
【文献】米国特許第１０７５９８７０号
【文献】国際公開第２０２０／０２５６７２号
【文献】国際公開第２０２１／１５２０６６号
【文献】国際公開第２０２０／０２５６７２号

【非特許文献】

【００１４】

【文献】Ｗｈｉｔｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．８５：５６０
【文献】Ｍａｎｃｏ－Ｊｏｈｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３５７：５３５－４４
【文献】Ｓｃｈｅｉｆｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊ　Ｔｈｒｏｍｂ　Ｈａｅｍｏｓｔ，６：３１５－３２２
【文献】Ｋｏｌｋｍａｎ　ＪＡ，Ｍｅｒｔｅｎｓ　Ｋ（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３９：７３９８－７４０５
【文献】Ｚｏｇｇ　Ｔ，Ｂｒａｎｄｓｔｅｔｔｅｒ　Ｈ（２００９）Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，３９０：３９１－４００
【文献】Ｓａｍｐｅｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，８，ｅ５７４７９
【文献】Ｓｈｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　２０１６；３７４：２０４４－５３

【文献】Ｄｏｂｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，ｖｏｌｕｍｅ ６，ａｒｔ．ｎｏ．：３８６４４ （２０１６）
【文献】Ａｖｅｒｙ ｅｔ ａｌ．，ＭＡｂｓ ２０１８，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．２，２４４－２５５
【文献】Ｏｓｔｅｒｇａａｒｄ Ｈ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２０２１；１３８：１２５８－６８

【発明の概要】

【００１５】

本発明は、非常に効力があり、かつ効果的な皮下投与ならびに経口投与を可能にするのに十分な長い半減期を提供する、凝固第ＩＸ因子（ａ）および第Ｘ因子（ａ）を結合することができる、V_HHポリペプチド誘導体などの血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体を提供する。したがって、一態様では、本発明は、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性化型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、１つ以上の表面曝露残基に結合した１つ以上の延長部分（ｐｒｏｔｒａｃｔｉｏｎ ｍｏｉｅｔｙ（ｉｅｓ））と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ、ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ（ｓ））と、を含む、血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体に関する。

【００１６】

一態様では、本発明は、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、表面曝露残基に結合された少なくとも１つの延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含む血液凝固促進ＩＳＶＤポリペプチド誘導体に関し、当該第１のＩＳＶＤは、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができ、当該第２のＩＳＶＤは、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる。

【００１７】

ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、例えば、V_HHポリペプチド誘導体であり得る。

【００１８】

別の態様の本発明は、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチド誘導体を含む医薬組成物に関する。本発明の別の態様は、皮下および経口投与を含む様々な投与経路による、様々な形態の血友病の治療、ならびに特に血友病Ａの治療、インヒビターが存在する血友病Ａの治療、および後天性血友病Ａの治療のためのかかる化合物を含む、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチド誘導体、および組成物の使用に関する。

【００１９】

さらなる態様では、本発明は、特定の抗ＦＩＸ（ａ）V_HH断片またはその特定の抗ＦＸ（ａ）V_HH断片など、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体またはV_HHポリペプチド誘導体の一部である個々の構成要素（中間体）ＩＳＶＤまたはV_HH断片に関する。

【００２０】

本発明のさらなる態様は、ポリペプチド誘導体の経口バイオアベイラビリティを改善するために、ＦＩＸ（ａ）およびＦＸ（ａ）を結合することができるかかるＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点を修飾する方法を含む、本明細書に開示される化合物の構成要素（中間体）の製造に関する。

【図面の簡単な説明】

【００２１】
【図１ａ－ｈ】図１ａ～ｈは、抗ＦＸ（ａ）／ＦＩＸ（ａ）ＩＳＶＤポリペプチド誘導体の非限定的な例を示す。Ｅ：延長部、ＰＭ：延長部分、L_{1-2}：ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー。破線はジスルフィド結合を示す。
【図２ａ】図２ａは、延長部分リンカー（L_P）によってＣ末端延長部にコンジュゲートされた単一のＣ１８二酸脂肪酸に基づく延長部分を含む抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体の非限定的な例を示す、ＩＤ：L_P1。破線はジスルフィド結合を示す。
【図２ｂ】図２ｂは、延長部分リンカー（L_P）によってＣ末端延長部にコンジュゲートされた単一のテトラゾールに基づく延長部分を含む抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体の非限定的な例を示す、ＩＤ：L_P2。破線はジスルフィド結合を示す。
【図３ａ－ｆ】図３ａ～ｆは、化合物番号２０（ａ）、化合物番号１８（ｂ）、化合物番号１５（ｃ）、化合物番号１３（ｄ）、化合物番号１４（ｅ）、および化合物番号１２（ｆ）の化合物の詳細な比喩的説明を示しており、これらは、延長部分リンカー（L_P）、ＩＤ　L_P1によってＣ末端延長部（Ｅ）にコンジュゲートされた２つのＣ１６二酸脂肪酸に基づく延長部分を含む抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体の非限定的な例である。破線はジスルフィド結合を示す。延長部（Ｅ）（配列番号９）を、これらのV_HHポリペプチド誘導体に使用した。延長部は、２つのシステイン残基を、それぞれ４位および６位に含み、これは、延長部分（ＰＭ）の結合点としての役割を果たす。　ａ）$V_HH1.20$～L_{1-2}～$V_HH2.20$～Ｅの配列では、ポリペプチドは、配列番号６３４（化合物番号２０）によって表される。　ｂ）$V_HH1.18$～L_{1-2}～$V_HH2.18$～Ｅの配列では、ポリペプチドは、配列番号６３２（化合物番号１８）によって表される。　ｃ）$V_HH1.15$～L_{1-2}～$V_HH2.15$～Ｅの配列では、ポリペプチドは、配列番号６２９（化合物番号１５）によって表される。　ｄ）$V_HH1.13$～L_{1-2}～$V_HH2.13$～Ｅの配列では、ポリペプチドは、配列番号６２７（化合物番号１３）によって表される。　ｅ）$V_HH1.14$～L_{1-2}～$V_HH2.14$～Ｅの配列では、ポリペプチドは、配列番号６２８（化合物番号１４）によって表される。　ｆ）$V_HH1.12$～L_{1-2}～$V_HH2.12$～Ｅの配列では、ポリペプチドは、配列番号６２６（化合物番号１２）によって表される。
【図４】図４は、化合物番号６、Ｍｉｍ８、およびエミシズマブＳＩＡの滴定曲線（化合物濃度の結果としての活性）の例を示す。
【図５ａ－ｂ】図５ａおよび５ｂは、それぞれ抗ＦＩＸ（ａ）および抗ＦＸ　ＩＳＶＤ（V_HH断片）配列の配列アライメントを示し、ＣＤＲ配列は、太字および下線で強調表示されている。
【００２２】
配列の簡潔な説明
　配列番号１は、ヒト凝固第ＩＸ因子のアミノ酸配列を表す。
　配列番号２は、ヒト凝固第Ｘ因子のアミノ酸配列を表す。
　配列番号３～１３および６９０は、延長部（Ｅ）のアミノ酸配列を表す。
　配列番号１４～２６および６９１は、L_{1-2}およびL_Pリンカーのアミノ酸配列を表す。
　配列番号２７～６１４は、V_HH断片のアミノ酸配列およびその相補性決定領域（ＣＤＲ）を表す。
　配列番号６１５～６９１、７３４、および７３５は、任意のL_{1-2}リンカーおよび／または延長部を含むV_HHポリペプチドのアミノ酸配列を表す。
　配列番号６９２～７３３は、本明細書の実施例４に開示されるペプチド断片の配列を表す。
　配列番号７３６～７３９は、潜在的な延長因子（ｐｒｏｔｒａｃｔｏｒｓ）のアミノ酸配列を表す。
【発明を実施するための形態】
【００２３】

本発明は、非常に効力があり、かつ効果的な皮下投与ならびに経口投与を可能にするのに十分な長い半減期を提供する、ＦＩＸ（ａ）およびＦＸ（ａ）を結合することができるＩＳＶＤポリペプチド誘導体を提供する。したがって、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、皮下および経口投与を含む様々な投与経路による、血友病Ａの治療、インヒビターが存在する血友病Ａの治療、および後天性血友病Ａの治療など、様々な形態の血友病の治療に好適である。

【００２４】

特に、本発明は、凝固第ＶＩＩＩａ因子（ＦＶＩＩＩａ）の補因子活性を模倣する方法で、凝固ＦＩＸａおよび活性化凝固ＦＸ（ＦＸａ）の形成につながる凝固ＦＸを結合することができる、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体（またはV_HHポリペプチド誘導体）と呼ばれる、V_HHポリペプチドなどの二重特異性延長ＩＳＶＤポリペプチドに関する。本明細書に開示されるV_HHポリペプチド誘導体は、非常に高いインビトロ効力を示し、それは、例えば、二重特異性抗体エミシズマブ配列同一類似体（ＳＩＡ）よりも高い大きな規模である。V_HHポリペプチド誘導体はまた、ラット、イヌ、およびブタなどの動物モデルにおいて、導入した延長因子、例えば、脂肪酸コンジュゲーションおよびアルブミン結合ペプチド融合を介して半減期の延長も示す。非延長V_HHポリペプチドは、イヌおよびブタにおいて非常に急速なクリアランスを示す。さらに、V_HHポリペプチド誘導体は、表面曝露残基のｐＩ低下アミノ酸置換、ならびに賦形剤であるＮ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）および例えば、ニコチンアミド（ＮＡＭ）を使用した製剤を介した、経口投与後の臨床的に関連するバイオアベイラビリティを可能にするように操作されている。したがって、経口投与時に、製剤化された非常に効力があるV_HHポリペプチド誘導体は、ラットおよびイヌ動物モデルにおいて、臨床的に関連するバイオアベイラビリティのレベルを示す。従来、１０ｋＤａを超える分子量を有する、V_HHポリペプチド誘導体などのＩＳＶＤポリペプチド誘導体などの治療用ポリペプチドは、経口投与に好適であるとはみなされていない。しかしながら、本明細書に開示されるV_HHポリペプチド誘導体は、これらに限定されないが、インヒビターが存在する、または存在しない血友病Ａなどの血液凝固障害の新規経口治療に好適である。

【００２５】

したがって、本発明は、非常に効力があり、かつ効果的な皮下投与ならびに経口投与を可能にするのに十分な長い半減期を提供する、凝固第ＩＸ因子（ａ）および第Ｘ因子（ａ）を結合することができる、V_HHポリペプチド誘導体などの血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体を提供する。したがって　一態様では、本発明は、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、１つ以上の表面曝露残基に結合した１つ以上の延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含む、血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体に関する。図１ａ～ｆは、抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）ＩＳＶＤポリペプチド誘導体の非限定的な例を示す。

【００２６】

一態様では、本発明は、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、表面曝露残基に結合された少なくとも１つの延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含む血液凝固促進ＩＳＶＤポリペプチド誘導体に関し、当該第１のＩＳＶＤは、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができ、当該第２のＩＳＶＤは、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、およびＬ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバ

リング）のうちの少なくとも１つを含む第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる。

【００２７】

別の態様では、本発明は、血液凝固促進ＶＨＨポリペプチド誘導体に関し、

第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＶＨＨ（ＶＨＨ１）と、

第Ｘ因子（配列番号２）に結合することができる第２のＶＨＨ（ＶＨＨ２）と、

表面曝露残基に結合した少なくとも１つの延長部分と、

任意選択で、ＶＨＨ１およびＶＨＨ２を連結するリンカー（Ｌ$_{1-2}$）と、

任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含み、

ＶＨＨ１は、

ＶＨＨ－２．２０（配列番号１７１）、

ＶＨＨ－２．１８（配列番号１５５）、

ＶＨＨ－２．１５（配列番号１３１）、

ＶＨＨ－２．１３（配列番号１１５）、

ＶＨＨ－２．１４（配列番号１２３）、

ＶＨＨ－２．１２（配列番号１０７）、または

ＶＨＨ－２．２（配列番号３５）の配列を含み、

ＶＨＨ２は、

ＶＨＨ－１．２０（配列番号１６７）、

ＶＨＨ－１．１８（配列番号１５１）、

ＶＨＨ－１．１５（配列番号１２７）、

ＶＨＨ－１．１３（配列番号１１１）、

ＶＨＨ－１．１４（配列番号１１９）、

ＶＨＨ－１．１２（配列番号１０３）、

ＶＨＨ－１．３（配列番号３１）、または

ＶＨＨ－１．４（配列番号３９）の配列を含む。

【００２８】

かかる一実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．２０の配列（配列番号１６７）を含む。

【００２９】

別のかかる実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．１８の配列（配列番号１５１）を含む。

【００３０】

別のかかる実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．１５の配列（配列番号１２７）を含む。

【００３１】

別のかかる実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．１３の配列（配列番号１１１）を含む。

【００３２】

別のかかる実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．１２の配列（配列番号１０３）を含む。

【００３３】

別のかかる実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．３の配列（配列番号３１）を含む。

【００３４】

別のかかる実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含み、ＶＨＨ２は、ＶＨＨ－１．４の配列（配列番号３９）を含む。

【００３５】

かかる一実施形態では、ＶＨＨ１は、ＶＨＨ－２．２０の配列（配列番号１７１）を含

み、V_HH2は、$V_HH-1.20$の配列（配列番号１６７）を含む。
【００３６】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.18$の配列（配列番号１５５）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.18$の配列（配列番号１５１）を含む。
【００３７】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.15$の配列（配列番号１２７）を含む。
【００３８】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.13$の配列（配列番号１１１）を含む。
【００３９】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.12$の配列（配列番号１０３）を含む。
【００４０】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.3$の配列（配列番号３１）を含む。
【００４１】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.4$の配列（配列番号３９）を含む。
【００４２】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.15$の配列（配列番号１３１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.18$の配列（配列番号１５１）を含む。
【００４３】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.15$の配列（配列番号１２７）を含む。
【００４４】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.13$の配列（配列番号１１１）を含む。
【００４５】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.12$の配列（配列番号１０３）を含む。
【００４６】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.3$の配列（配列番号３１）を含む。
【００４７】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.4$の配列（配列番号３９）を含む。
【００４８】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.13$の配列（配列番号１１５）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.18$の配列（配列番号１５１）を含む。
【００４９】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.15$の配列（配列番号１２７）を含む。
【００５０】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.13$の配列（配列番号１１１）を含む。
【００５１】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.12$の配列（配列番号１０３）を含む。
【００５２】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.3$の配列（配列番号３１）を含む。

【００５３】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.4$の配列（配列番号３９）を含む。

【００５４】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.14$の配列（配列番号１２３）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.18$の配列（配列番号１５１）を含む。

【００５５】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.15$の配列（配列番号１２７）を含む。

【００５６】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.13$の配列（配列番号１１１）を含む。

【００５７】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.12$の配列（配列番号１０３）を含む。

【００５８】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.3$の配列（配列番号３１）を含む。

【００５９】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.4$の配列（配列番号３９）を含む。

【００６０】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.12$の配列（配列番号１０７）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.18$の配列（配列番号１５１）を含む。

【００６１】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.15$の配列（配列番号１２７）を含む。

【００６２】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.13$の配列（配列番号１１１）を含む。

【００６３】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.12$の配列（配列番号１０３）を含む。

【００６４】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.3$の配列（配列番号３１）を含む。

【００６５】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.4$の配列（配列番号３９）を含む。

【００６６】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.2$の配列（配列番号１３５）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.18$の配列（配列番号１５１）を含む。

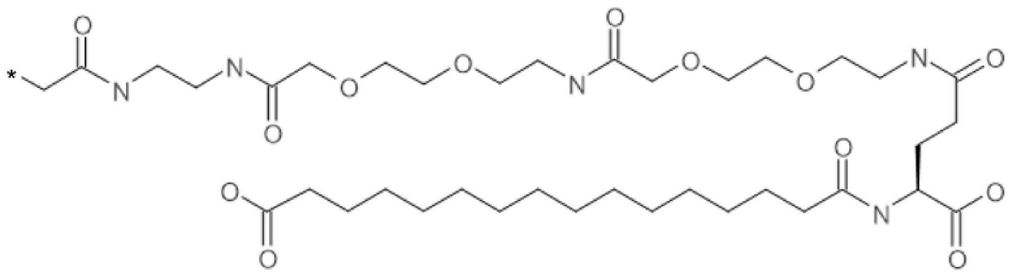
【００６７】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.15$の配列（配列番号１２７）を含む。

【００６８】

別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.13$の配列（配列番号１１１）を含む。

【００６９】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.12$の配列（配列番号１０３）を含む。
【００７０】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.3$の配列（配列番号３１）を含む。
【００７１】
別のかかる実施形態では、V_HH1は、$V_HH-2.20$の配列（配列番号１７１）を含み、V_HH2は、$V_HH-1.4$の配列（配列番号３９）を含む。
【００７２】
いくつかの実施形態では、延長部分は、以下の構造を含み、
【化１】



＊は、ＩＳＶＤポリペプチド上の結合点を示した。
【００７３】
ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、例えば、V_HHポリペプチド誘導体であり得る。
【００７４】
別の態様では、本発明は、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチド誘導体を含む医薬組成物に関する。本発明の別の態様は、皮下および経口投与を含むがこれらに限定されない、様々な投与経路による、様々な形態の血友病の治療、ならびに特に血友病Ａの治療、インヒビターが存在する血友病Ａの治療、および後天性血友病Ａの治療のためのかかる化合物を含む、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチド誘導体、および組成物の使用に関する。
【００７５】
さらなる態様では、本発明は、特定の抗ＦＩＸ（ａ）V_HH断片またはその特定の抗ＦＸ（ａ）V_HH断片など、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体またはV_HHポリペプチド誘導体の一部である個々の構成要素（中間体）ＩＳＶＤまたはV_HH断片に関する。
【００７６】
本発明のさらなる態様は、ポリペプチド誘導体の経口バイオアベイラビリティを改善するために、ＦＩＸ（ａ）およびＦＸ（ａ）を結合することができるかかるＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点を修飾する方法を含む、本明細書に開示される化合物の構成要素（中間体）の製造に関する。
【００７７】
定義
本発明がより容易に理解され得るように、特定の用語が以下に定義される。
【００７８】
ギリシャ文字は、それらの記号または対応する名称で表されてもよく、例えば、α＝アルファであり、β＝ベータであり、ε＝イプシロンであり、γ＝ガンマであり、ω＝オメガであるといった具合である。また、μのギリシャ文字は「ｕ」で表されてもよく、例えば、μｌ＝ｕｌ、またはμＭ＝ｕＭである。
【００７９】
化学式中のアスタリスク（＊）は、結合点を示す。

【００８０】
「ａ」または「ａｎ」という用語は、「１つ以上」を意味することを意図している。工程または要素の列挙に先行する場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という用語、および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などのその変形は、さらなる工程または要素の追加が任意選択であり、除外されないことを意味することを意図している。
【００８１】
「約」という用語は、本明細書では、およそ、大まかに、またはその周辺を意味するために使用される。「約」という用語が数値範囲と併せて使用される場合、記載された数値を上回るおよび下回る境界を拡張することによってその範囲を修正する。概して、約という用語は、１０パーセント上または下（より高いまたはより低い）で、記載値を上回るおよび下回る数値を修正することができる。
【００８２】
本明細書で使用される場合、「骨格」という用語は、任意のＬ$_{1-2}$リンカーおよび延長部を含むＩＳＶＤポリペプチドまたはＶ$_{H}$Ｈポリペプチドのアミノ酸配列を指すが、延長部分を除外し、かつ骨格に融合されるのに好適な任意の延長部分を除外する疑いの回避のためである。
【００８３】
「結合親和性」という用語は、Ｖ$_{H}$Ｈ断片および抗原など、２つの分子間、例えば、ＩＳＶＤ間の非共有相互作用の強度の尺度である。用語は、一価の相互作用を説明するために使用される。一価の相互作用による、Ｖ$_{H}$Ｈなど、２つの分子間、例えば、ＩＳＶＤ間の結合親和性は、平衡解離定数（Ｋ$_{D}$）を決定することによって定量化され得る。Ｋ$_{D}$ は、複合体形成および解離の動態を、例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）法または等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）法によって測定することによって決定することができる。一価の複合体の会合および解離に対応する速度定数は、それぞれ、会合速度定数ｋ$_{a}$（またはｋ$_{on}$）、および解離速度定数ｋ$_{d}$（またはｋ$_{off}$）と呼ばれる。Ｋ$_{D}$は、式Ｋ$_{D}$＝ｋ$_{d}$／ｋ$_{a}$を介して、ｋ$_{a}$およびｋ$_{d}$と関連する。
【００８４】
上記の定義に従って、所与の抗原に対する異なるＩＳＶＤの結合親和性など、異なる分子相互作用に関連する結合親和性は、個別の抗体／抗原複合体のＫ$_{D}$値の比較によって比較され得る。
【００８５】
解離定数の値は、周知の方法によって直接決定することができる。標的に向かうＩＳＶＤなどのリガンドの結合能力を評価するための標準アッセイは、当該技術分野で公知であり、例えば、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロット、ＲＩＡ、およびフローサイトメトリー解析を含む。ＩＳＶＤの結合動態および結合親和性も、ＳＰＲなどの当該技術分野で公知の標準アッセイによって評価することができる。
【００８６】
標的とのＶ$_{H}$ＨなどのＩＳＶＤの結合が別のＩＳＶＤなどのその標的の別のリガンドの存在下で標的の結合と比較される、競合結合アッセイを行うことができる。
【００８７】
文脈によって矛盾しない限り、Ｋ$_{D}$は、本明細書に記載の表面プラズモン共鳴によって決定されることが好ましい（実施例７を参照）。
【００８８】
好ましくは、ＦＩＸ（ａ）に結合することができるＩＳＶＤのＫ$_{D}$値は、３μＭ以下、例えば１５ｎＭ以下、例えば１１．７ｎＭ以下である。
【００８９】
好ましくは、ＦＸ（ａ）に結合することができるＩＳＶＤのＫ$_{D}$値は、３μＭ以下、例えば３５０ｎＭ以下、例えば３００ｎＭ以下である。
【００９０】

「交差種反応性」ＩＳＶＤ（またはＶ$_{H}$Ｈ断片）は、例えば、全ての示される種（例えば、ヒトおよびカニクイザル）からのＦＩＸに、同等の親和性で、特に、例えば、５０の係数の範囲内、２０の係数の範囲内、または１０の係数の範囲内などの１００の係数の範囲内のＫ$_{D}$で結合する。定義された係数ＸのＫ$_{D}$範囲内では、特定の列挙された種に対する最も高い親和性は、異なる列挙された種への結合に対して測定された最も低い親和性よりもＸ倍を超えないことを意味する。当業者であれば、親和性を測定するための任意の方法を使用して、異種間反応性ＩＳＶＤが、同じ条件が全ての列挙された種に対するＫ$_{D}$測定に適用される限り、本明細書に記載される所与のＫ$_{D}$係数範囲内の全ての列挙された種由来の標的抗原に結合することを検証することができることを理解されるであろう。好ましくは、Ｋ$_{D}$値は、特に２５℃で、ＳＰＲを使用して測定される。好ましくは、親和性は、Ｖ$_{H}$Ｈなどの異種間反応性ＩＳＶＤを使用して測定される。

【００９１】

アミノ酸は、アミン基およびカルボン酸基、ならびにしばしば側鎖と呼ばれる１つ以上の追加的な基を任意選択で含有する分子である。

【００９２】

「アミノ酸」という用語には、標準アミノ酸（遺伝的にコードされている）および非天然アミノ酸が含まれる。非天然アミノ酸の非限定的な例は、Ａｉｂ（α－アミノイソ酪酸）、デアミノヒスチジン（別名３－（イミダゾール－４－イル）プロパン酸、略称Ｉｍｐ（イミダゾプロピオニル）、および標準アミノ酸のｄ－異性体である。光学異性体が記載されていないポリペプチド内の全てのアミノ酸残基は、本明細書では、別段の指定がない限り、ｌ－異性体を意味すると理解されるべきである。

【００９３】

本明細書において「抗体」という用語は、抗原またはその一部分に結合することができる免疫グロブリン配列を含むか、またはそれに由来するタンパク質を指す。

【００９４】

「抗体」は、ジスルフィド結合によって連結される２つの重鎖（ＨＣ）および２つの軽鎖（ＬＣ）である少なくとも４つのポリペプチド鎖を含む完全長抗体、ならびにジスルフィド結合によって連結される２つの重鎖（ＨＣ）および１つの軽鎖（ＬＣ）である少なくとも３つのポリペプチド鎖を含む抗体を含むが、これらに限定されない。免疫グロブリンの１つのクラスは、ＩｇＧである。ヒトにおいて、ＩｇＧクラスは、それらの重鎖定常領域の配列に基づいて、４つのサブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４へと分割されてもよい。軽鎖は、それらの配列組成物の差異に基づいて、２つのタイプ、カッパ鎖およびラムダ鎖に分けることができる。ＩｇＧ分子は、２つ以上のジスルフィド結合によって連結された２つの重鎖、および各々がジスルフィド結合によって重鎖に付着した２つの軽鎖で構成されている。「抗体」という用語はまた、Ｖ$_{H}$Ｈ断片およびＶ－ＮＡＲ断片などの単一ドメイン抗体を包含する。

【００９５】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「ＣＤＲ」としても公知である「相補性決定領域」を含む。

【００９６】

「フレームワーク」または「ＦＲ」領域は、超可変領域残基以外の可変ドメイン領域である。したがって、抗体またはＩＳＶＤは、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、およびＦＲ４をＮからＣ末端に含む。重鎖のＣＤＲ３は、典型的には抗原結合に最も寄与する領域である。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体への特異的結合が可能であるタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面要素から成り、通常、特定の三次元構造的特性、ならびに特定の荷電特性を有する。構造エピソードおよび非構造エピトープは、後者ではないが前者への結合が、タンパ

ク質の構造を破壊することができる変性剤の存在下で失われるという点で区別される。
【００９８】
例えば、ＩＳＶＤ、ＶＨＨ断片、およびその標的の間の複合体の空間座標によって定義されるＸ線由来結晶構造の文脈では、本明細書におけるエピトープという用語は、文脈により別段の指定がない限りまたは矛盾しない限り、ＦＩＸ／ＦＩＸａまたはＦＸ／ＦＸａ内の重原子から４Åの距離以内に重原子（すなわち、非水素原子）を有することを特徴とするＩＳＶＤ残基として特異的に定義される。
【００９９】
所与のＩＳＶＤ／抗原対のエピトープは、実施例に記載されるものなど、日常的な方法によって特定され得る。例えば、ＩＳＶＤおよび抗原は組み合わせられてもよく、ＩＳＶＤ／抗原複合体は結晶化されてもよい。ＩＳＶＤとその抗原との間の相互作用の特異的部位を特定するために、複合体の結晶構造が決定されて、使用されてもよい。
【０１００】
一実施形態では、本明細書に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（配列番号１）のうちの少なくとも１つを含むＦＩＸまたはその活性型上のエピトープに結合することができる第１のＩＳＶＤ、ならびにアミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、およびＬ１７８（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含むＦＸ（配列番号２）上のエピトープに結合することができる第２のＩＳＶＤを含む。
【０１０１】
一実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができる第１のＩＳＶＤ、ならびに
アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含むか、またはアミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９のうちの少なくとも１つを含む第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる第２のＩＳＶＤを含む。
【０１０２】
凝固第ＩＸ因子（ＦＩＸ）は、第ＶＩＩ因子、プロトロンビン、第Ｘ因子、およびプロテインＣとの構造的類似性を有するビタミンＫ依存性凝固因子である。ＦＩＸは、単鎖酵素前駆体（配列番号１）として血漿中を循環する。循環する酵素前駆体型は、Ｎ末端γ－カルボキシグルタミン酸が豊富な（Ｇｌａ）ドメイン、２つのＥＧＦドメイン、およびＣ末端トリプシン様セリンプロテアーゼドメインを含む、４つの異なるドメインに分割された４１５個のアミノ酸から成る。ＦＩＸの活性化は、Ａｒｇ１４５およびＡｒｇ１８０での限られたタンパク質分解によって生じ、活性化ペプチドを放出する（配列番号１の残基１４６～１８０）。したがって、活性化ＦＩＸ（ＦＩＸａ）は、配列番号１の残基１～１４５（軽鎖）および配列番号１の残基１８１～４１５（重鎖）から構成される。
【０１０３】
したがって、循環ＦＩＸ分子は、ＦＩＸ酵素前駆体、および活性型のＦＩＸを含み、これは本明細書では一般に、配列番号１に関してＦＩＸおよびＦＩＸａと呼ばれる。
【０１０４】
活性型第ＩＸ因子は、第ＩＸａ因子またはＦＩＸａと呼ばれる。「ＦＩＸ（配列番号１）および／またはその活性型形態（ＦＩＸａ）」という用語は、「ＦＩＸ／ＦＩＸａ」または単に「ＦＩＸ（ａ）」とも呼ばれ得る。
【０１０５】
ＦＩＸａは、テナーゼ複合体の一部として、凝固中に適切なトロンビン形成を支持するために必要な第Ｘａ因子のほとんどを生成することにより、止血において重要な役割を果たす、トリプシン様セリンプロテアーゼである。

【０１０６】
ＦＩＸは、本明細書では、ヒトＦＩＸのＡｌａ１４８対立遺伝子型に対応する配列番号１によって表される（Ａｎｓｎ ｅｔ ａｌ．ＥＭＢＯ Ｊ．１９８４ ３：１０５３－１０６０、ＭｃＧｒａｗ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１９８５ ８２：２８４７－２８５１、Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．１９８８ ４２：５７３－５８０）。本発明では、ＦＩＸは、Ｔ１４８バリアント（Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ Ｐ００７４０）などのＦＩＸの全ての天然バリアントを網羅することを意図している。
【０１０７】
ＦＸは、第ＶＩＩ因子、プロトロンビン、ＦＩＸ、およびプロテインＣとの構造的類似性を有するビタミンＫ依存性凝固因子である。ＦＸは、配列番号２の残基１～１３９（軽鎖）および配列番号２の残基１４３～４４８（重鎖）を含む二本鎖酵素前駆体として血漿内を循環する。ヒトＦＸ酵素前駆体は、Ｎ末端ガンマカルボキシグルタミン酸が豊富な（Ｇｌａ）ドメイン（残基１～４５）、２つのＥＧＦドメイン、それぞれＥＧＦ１（残基４６～８２）とＥＧＦ２（残基８５～１２５）、およびＣ末端トリプシン様セリンプロテアーゼドメイン（残基１９５～４４８）を含む４つの別個のドメインを含む。ＦＸの活性化は、Ａｒｇ１９４での限られたタンパク質分解によって生じ、活性化ペプチドの放出をもたらす（残基１４３～１９４）。したがって、活性化ＦＸ（ＦＸａ）は、配列番号２の残基１～１３９（軽鎖）および配列番号２の残基１９５～４４８（活性化重鎖）から構成される。したがって、循環第Ｘ因子分子は、ＦＸ酵素前駆体、および活性型形態のＦＸを含み、これは本明細書では、配列番号２に関してそれぞれＦＸおよびＦＸａと呼ばれる。本発明では、ＦＸは、ＦＸの全ての天然バリアントを網羅することを意図している。「ＦＸ（配列番号２）および／またはその活性型形態（ＦＸａ）」という用語は、「ＦＸ／ＦＸａ」または「ＦＸ（ａ）」とも呼ばれ得る。
【０１０８】
本明細書で使用される場合、「保存的置換」という用語は、アミノ酸が、類似の生化学特性を有するアミノ酸へと置換されてもよく、例えば、塩基性アミノ酸は別の塩基性アミノ酸へと（例えば、リジンからアルギニンへと）置換されてもよく、酸性アミノ酸は別の酸性アミノ酸へと（例えば、グルタミン酸塩からアスパラギン酸塩へと）置換されてもよく、中性アミノ酸は別の中性アミノ酸へと（例えば、スレオニンからセリンへと）置換されてもよく、荷電アミノ酸は別の荷電アミノ酸へと（例えば、グルタミン酸塩からアスパラギン酸塩へと）置換されてもよく、親水性アミノ酸は別の親水性アミノ酸へと（例えば、アスパラギンからグルタミンへと）置換されてもよく、疎水性アミノ酸は別の疎水性アミノ酸へと（例えば、アラニンからバリンへと）置換されてもよく、極性アミノ酸は別の極性アミノ酸へと（例えば、セリンからスレオニンへと）置換されてもよく、芳香族アミノ酸は別の芳香族アミノ酸へと（例えば、フェニルアラニンからトリプトファンへと）置換されてもよく、脂肪族アミノ酸は別の脂肪族アミノ酸へと（例えば、ロイシンからイソロイシンへと）置換されてもよい場合を指す。
【０１０９】
本明細書で使用される場合、「賦形剤」という用語は、活性成分の投与をさらに促進するために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。
【０１１０】
限定されるものではないが、賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類およびデンプンのタイプ、Ｌ－アルギニン、ニコチンアミド、ＳＮＡＣ、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ならびにポリエチレングリコールが挙げられる。
【０１１１】
本明細書で使用される場合、「延長部」（Ｅ）という用語は、ＩＳＶＤポリペプチドに結合するのに好適なペプチドまたはポリペプチドを指す。
【０１１２】
延長部は、数個のアミノ酸、１～１０個のアミノ酸であってもよく、それはより長い、

１０～３０個のアミノ酸であってもよいか、または非常に長いアミノ酸、３０個を超えるアミノ酸であってもよい。延長部は、好ましくは、ＩＳＶＤポリペプチド、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HＨポリペプチド、またはV_HＨポリペプチド誘導体のＮ末端（Ｎ末端延長部）もしくはＣ末端（Ｃ末端延長部）、またはその両方に存在する。あるいは、延長部は、１つ以上のフレームワーク領域またはリンカーL_{1-2}など、ＣＤＲ配列の外側のＩＳＶＤポリペプチドのどこかに結合される。

【０１１３】

延長部は、好ましくは、ＩＳＶＤポリペプチドに組み換え融合される。他の実施形態では、延長部は、ＩＳＶＤポリペプチドにコンジュゲートされる。

【０１１４】

非限定的な例としては、ＧＱＡＣＰＣ（配列番号９）から構成される６アミノ酸のＣ末端延長部を有する化合物番号２２、ＧＧＧＧＣＳＣＨＨＨＨＨＨ（配列番号８）から構成される１３アミノ酸のＣ末端延長部を有する化合物番号６、およびＧＧＧＧＳＨＨＨＨＨＨ（配列番号７）から構成される１１アミノ酸のＣ末端延長部が挙げられる。

【０１１５】

延長部の目的は、延長部分の結合点を提供すること、および／または精製のための手段を提供することである。したがって、延長部という用語は、延長因子および延長部分を包含しない。

【０１１６】

例えば、ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に組み換え融合された任意の延長因子リンカー（L_P）を含む延長因子は、延長部とみなされない。

【０１１７】

本明細書で使用される場合、「融合」という用語は、元々別個のタンパク質もしくはペプチドまたはその断片をコードする２つ以上のＤＮＡ配列のインフレーム結合を指す。融合ポリペプチドＤＮＡ配列の翻訳は、元のタンパク質またはペプチドの各々から誘導された機能的特性を有し得る単一のポリペプチド配列をもたらす。融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列は、オーバーラップＰＣＲまたはＤＮＡライゲーションなどの標準的な分子生物学法によって人工的に作製されてもよい。得られた融合ポリペプチドＤＮＡ配列は、細菌、酵母、真菌、昆虫細胞、または哺乳類細胞などの宿主生物における異種融合タンパク質発現を支持する適切な発現ベクターに挿入されてもよい。延長部分は、例えば、ＩＳＶＤポリペプチドまたはV_HＨポリペプチド骨格のＣ末端またはＮ末端に融合されてもよい。

【０１１８】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本明細書に開示されるＩＳＶＤを生成するように操作され得る任意の種類の細胞系を包含する。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、ＣＨＯ細胞などの哺乳類培養細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳＯ細胞、ＳＰ２／０細胞、ＹＯ骨髄腫細胞、Ｐ３Ｘ６３マウス骨髄腫細胞、ＰＥＲ細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞またはハイブリドーマ細胞、酵母細胞、真菌細胞、および昆虫細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１９】

当該技術分野で公知の「同一性」という用語は、配列を比較することによって決定される、２つ以上のポリペプチドの配列間の関係を指す。当該技術分野では、「同一性」はまた、２つ以上のアミノ酸残基の文字列の間の一致の数によって決定されるような、ポリペプチド間の配列の関連性の程度も意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処された隙間調整（もしあれば）を有する２つ以上の配列の小さい方の間の完全一致の割合を測定する。関連するポリペプチドの同一性は、公知の方法によって容易に計算することができる。本発明では、ＥＭＢＯＳＳ－６．６．０からのＮｅｅｄｌｅｍａｎ（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９７０；４８：４４３－４５３）を使用し、ギャップ開始およびギャップ伸長　についてそれぞれパラメータ１０および０．５を使用して（ｇａｐ

ｏｐｅｎ＝１０、ｇａｐｅｘｔｅｎｄ＝０．５）、類似性および同一性が決定された。

【０１２０】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」または「ＩＳＶＤ」という用語は、それぞれ、ＶＨドメインおよびＶＬドメインなどの抗原結合ドメインまたは断片を含むための一般用語として使用される。

【０１２１】

したがって、ＩＳＶＤは、軽鎖可変ドメイン配列（例えば、ＶＬ配列）、または重鎖可変ドメイン配列（例えば、ＶＨ配列）、例えば、従来の４鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列、または従来の４鎖抗体に由来する軽鎖可変ドメイン配列であり得る。

【０１２２】

特定のタイプのＩＳＶＤは、単一の単量体可変抗体ドメインから成る抗体断片として定義される免疫グロブリンのタイプとして元々特定されたＶ$_{H}$Ｈ断片である。Ｖ$_{H}$Ｈ断片は、重鎖のみの抗体の抗原結合可変領域を包含する単一ドメイン抗体であり、ラクダ類から得ることができる。Ｖ$_{H}$Ｈ断片は、約１５ｋＤａのサイズを有する。それらは、単一ドメインを使用してその同族抗原を結合することができる単一鎖分子を含む。Ｖ$_{H}$Ｈ断片の抗原結合表面は、通常、平坦または凹面である従来の抗体の表面よりも、より凸状（または突出）である。Ｖ$_{H}$Ｈ断片は、その配列および構造が保存されたものとして定義される４つのフレームワーク領域（またはＦＲ）、および３つの相補性決定領域（またはＣＤＲ）から構成され、抗原結合に関与し、かつ抗原特異性を提供する、配列含量および構造立体配座の両方において高い可変性を示す。

【０１２３】

別のタイプのＩＳＶＤは、軟骨魚のＩｇＮＡＲから得ることができ、その単一ドメイン抗体は、「Ｖ－ＮＡＲ断片」と示される。

【０１２４】

Ｖ$_{H}$Ｈ断片およびＶ－ＮＡＲ断片は、定常ドメインを含まないため、典型的には部分／完全長および／または操作／天然の重鎖のみの抗体の一部であるＦｃ領域を有さない［Ｄｏｏｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｄｅｖ． Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：４３－５６、Ｍｕｙｌｄｅｒｍａｎｓ Ｓ．（２０１３）Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ．８２：７７５－９７］。

【０１２５】

ラクダＶ$_{H}$Ｈ断片ならびにそれらの産生および／または単離および／または使用のための方法の一般的な説明は、特に以下の参考資料国際公開第９４／０４６７８号および国際公開第９７／４９８０５号に見出される。軟骨魚由来の重鎖免疫グロブリンおよびその可変領域、ならびにそれらの生産および／または単離および／または使用のための方法の一般的な説明は、特に国際公開第２００５／１１８６２９号に見出される。

【０１２６】

Ｖ$_{H}$Ｈ断片中のアミノ酸残基の総数は、典型的には１１０～１４０の範囲内である。しかしながら、Ｖ$_{H}$Ｈの一部、断片、または類似体は、かかる一部、断片、または類似体が、本明細書の以下に概説されるさらなる要件を満たし、また好ましくは、本明細書に記載される目的にも好適である場合、その長さおよび／またはサイズに関して特に限定されないことに留意されるべきである。Ｖ$_{H}$Ｈ断片の分子量は、典型的には、１２～１５ｋＤａの範囲内である。Ｖ$_{H}$Ｈ断片のｐＩは、抗体が概してそうであるように、概して塩基性であり、ｐＩ値が概して７を上回り、しばしば７．５～８．５であることを意味する。Ｖ$_{H}$Ｈ断片は、通常、フレームワーク領域１および３に位置付けられた保存されたシステイン対によって典型的には形成される少なくとも１つのジスルフィド架橋を包含する。かかるジスルフィド架橋は、Ｖ$_{H}$Ｈ断片の正しい折り畳みおよび安定性を確実にし、例えば、Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチドにおける導入された非対のシステインを標的とするような方法で側鎖修飾および／またはコンジュゲーションが行われる場合、かかるジスルフィド架橋を保持することが望ましい。

【０１２７】

本文書では、V_HH断片などのＩＳＶＤのＣＤＲ配列を、Ｋａｂａｔ定義を使用して決定する（Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ ａｎｄ Ｄｕｂｅｌ，２０１０，Ｅｄｓ．，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｖｏｌ ２，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ Ｂｅｒｌｉｎ，Ｍａｒｔｉｎ，Ｃｈａｐｔｅｒ ３，ｐｐ．３３－５１）。この方法に従って、可変ドメインのＣＤＲは、３１～３５位（ＣＤＲ１）、５０～６５位（ＣＤＲ２）、および９５～１０２位（ＣＤＲ３）として定義される。しかしながら、別段の定めのない限り、ＩＳＶＤポリペプチドまたはV_HHポリペプチドの連続ナンバリングにおけるＣＤＲおよびフレームワーク（ＦＲ）領域を含む、本明細書に記載されるポリペプチド化合物における特定のアミノ酸残基位置を指す場合、使用される。

【０１２８】

本明細書で使用される場合、「ＩＳＶＤポリペプチド」という用語は、例えば、直接的なドメイン融合として、必要な場合に任意の適切な組成物および長さのリンカー（L_{1-2}）によって連結されるか、または任意のリンカーを全く有さない、第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）および第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）などの２つ以上のＩＳＶＤを含むポリペプチドを指す。

【０１２９】

本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、化学実体間で共有結合を形成する少なくとも１つの原子を指す。化学実体がペプチド結合を介してのみ連結される場合、リンカーは、「ペプチドリンカー」と呼ばれ得る。そうでなければ、リンカーは、「化学リンカー」と呼ばれ得る。

【０１３０】

ＩＳＶＤポリペプチドの一例は、リンカー（L_{1-2}）を介して連結された２つのＩＳＶＤである。

【０１３１】

ＩＳＶＤポリペプチドの別の例は、１つ以上の延長部をさらに含むリンカー（L_{1-2}）を介して連結された２つのＩＳＶＤである。

【０１３２】

ＩＳＶＤポリペプチドの別の例は、リンカー（L_{1-2}）なしで、Ｃ末端および／またはＮ末端延長部などであるがこれらに限定されない、１つ以上の延長部をさらに含む、連結された２つのＩＳＶＤである。

【０１３３】

リンカー（L_{1-2}）は、例えば、アミノ酸配列から構成されてもよく、反復を含まないか、または複数の反復を含む。

【０１３４】

例えば、リンカーは、２～５０個のアミノ酸、５～４０個のアミノ酸、または１０～３０個のアミノ酸を含み得る。

【０１３５】

リンカーの非限定的な例としては、＊－ＧＧＧＧＳ－＊リンカー、＊－ＧＱＡＰＧＱ－＊リンカー（配列番号２０）、＊－ＱＡＰＧＱＡ－＊リンカー（配列番号１６）、＊－ＧＩ－＊リンカー、＊－ＧＶ－＊リンカー、＊－ＧＴ－＊リンカー、＊－ＧＬ－＊リンカー、または別のアミノ酸複合リンカーが挙げられる。リンカーの２つの例は、ＧＧＧＧＳの２回および６回反復複合であり、それぞれ、１０および３０アミノ酸残基長である。

【０１３６】

疑義を避けるために付言すると、L_{1-2}の添字$_{1-2}$は、連結されているＩＳＶＤの特定の方向、すなわち、L_{1-2}は、ＩＳＶＤ１をＩＳＶＤ２に、またはＩＳＶＤ２をＩＳＶＤ１に（Ｎ末端からＣ末端）連結することができることを暗示するものではない。

【０１３７】

配列番号１４～２４は、L_{1-2}リンカーの非限定的な例を表す。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチドは、以下の式のうちのいずれかに概説

されるように、延長部（Ｅ）を含む。
ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ１－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ２
延長部（Ｅ）は、例えば、以下の式（Ｎ末端からＣ末端）のうちのいずれかに概説されるように、ＩＳＶＤポリペプチドに結合され得る。
ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ１－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ２

【０１３９】
ＩＳＶＤポリペプチドは、延長部分を含むことが好ましい。このような場合、ＩＳＶＤポリペプチドは、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体と呼ばれる。

【０１４０】
いくつかの実施形態では、第１のＩＳＶＤは、１つ以上の延長部分に対する結合点としての役割を果たす。

【０１４１】
いくつかの実施形態では、第２のＩＳＶＤは、１つ以上の延長部分に対する結合点としての役割を果たす。

【０１４２】
いくつかの実施形態では、$Ｌ_{1-2}$リンカーは、１つ以上の延長部分に対する結合点としての役割を果たす。

【０１４３】
疑義を避けるために付言すると、延長部分が、ＩＳＶＤ１－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ２への延長部（Ｅ）に結合したリンカー（$Ｌ_{p}$）を含む場合、リンカー$Ｌ_{P}$は、「延長部」の一部とはみなされない。

【０１４４】
いくつかの態様では、ＩＳＶＤポリペプチドは、非ＩＳＶＤ、例えば、小さな化学的非ポリペプチド分子、炭水化物、脂肪酸、またはオリゴペプチドもしくはポリペプチド、またはタンパク質、例えば、抗体または好ましくは抗体断片と化学的にコンジュゲートされる。

【０１４５】
一実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチドは、リンカーを使用することなく、ＩｇＧ抗体からＦｃドメインに連結される。

【０１４６】
別の実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチドは、リンカーによって、ＩｇＧ抗体からＦｃドメインまたはその断片に連結される。

【０１４７】
好ましい実施形態では、延長部は、ＩＳＶＤポリペプチドに融合され、したがって、化学コンジュゲーションよってＩＳＶＤポリペプチドに連結されない。

【０１４８】
いくつかの実施形態では、延長部分は、ＩＳＶＤポリペプチドに融合され、したがって、化学コンジュゲーションよってＩＳＶＤポリペプチドに連結されない。

【０１４９】
本明細書で使用される場合、「等電点」または「ｐＩ」という用語は、抗体などのタンパク質の全体的な正味電荷がゼロであるｐＨ値を指す。タンパク質には多くの荷電基があり、等電点では、これら全ての電荷の合計がゼロである。等電点を上回るｐＨでは、タンパク質の全体的な正味電荷は陰性となるが、等電点を下回るｐＨ値では、タンパク質の全体的な正味電荷は陽性となる。
【０１５０】
ｐＩは、理論上または実験的に決定された等電点のいずれかであってもよい。
【０１５１】
当業者は、タンパク質の等電点を決定する方法を認識している。最も一般的には、タンパク質の等電点は、タンパク質のアミノ酸配列に基づいて計算される。タンパク質の等電点の決定を可能にする多数の（オンライン）ツールが入手可能であり、例えば、「ＥｘＰＡＳｙ Ｃｏｍｐｕｔｅ ｐＩ／Ｍｗ」であり、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｔｏｏｌｓ ｏｎ ｔｈｅ ＥｘＰＡＳｙ Ｓｅｒｖｅｒ、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を参照されたい。好ましくは、Ｓｋｏｏｇ＆Ｗｉｃｈｍａｎ，１９８６のアルゴリズム。ｐＫａのアミノ酸残基が、ｐＩの計算に使用される。
【０１５２】
ｐｌはまた、実験的に決定されてもよく、電荷バリアントは、例えば、等電点電気泳動（ＩＥＦ）ゲル電気泳動、キャピラリー等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）ゲル電気泳動などの荷電ベース分離技法を使用して分離され得る。
【０１５３】
一実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチド中の第１および第２のＩＳＶＤは、Ｖ－ＮＡＲ断片であり、かかる化合物は、「Ｖ－ＮＡＲポリペプチド」と示される。
【０１５４】
別の実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチド中の第１および第２のＩＳＶＤは、V_HH断片であり、かかる化合物は、「V_HHポリペプチド」と示される。かかる一実施形態では、第１のV_HH断片は、ＦＩＸ／ＦＩＸａを結合することができ、第２のV_HH断片は、ＦＸ／ＦＸａを結合することができる。好ましい実施形態では、V_HHポリペプチドは、二重特異性V_HHポリペプチドである。
【０１５５】
疑義を避けるために付言すると、多重特異性、三重特異性、または二重特異性という用語は、V_HH断片など、ＩＳＶＤによって結合された抗原の数を反映するように意図されており、すなわち、アルブミンなどであるがこれに限定されない、延長部分（存在する場合）によって結合された分子を含まない。
【０１５６】
一実施形態では、延長部分を有さないV_HHポリペプチドの分子量は、２７～２９ｋＤａの範囲内である。
【０１５７】
好ましい実施形態では、１つ以上の延長部分（すなわち、V_HHポリペプチド誘導体）、および任意選択で、１つ以上の延長部を含むV_HHポリペプチドの分子量は、２８～３３ｋＤａの範囲内である。
【０１５８】
当業者は、上記の実施形態が、Ｖ－ＮＡＲポリペプチドに同様に適用可能であることを理解するであろう。
【０１５９】
本明細書で使用される場合、「遊離システイン」という用語は、例えば、化学コンジュ

ゲーションなどの反応に利用可能なポリペプチド鎖中のシステイン残基であり、したがって、天然または操作された内部ジスルフィド架橋の一部ではない。本質的に、遊離システインは、コンジュゲーションに使用され得るが、それは組み換え導入遊離システインを含む遊離システイン残基は、しばしば、宿主細胞におけるポリペプチドの組み換え発現中に、システイン、ホモシステイン、またはグルタチオンなどの小さなチオールで遮断される。これは、１つ以上の遊離システインが導入されているＩＳＶＤポリペプチドの組み換え産生でも観察される。したがって、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物またはトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩などの適切な還元剤を使用する還元反応を使用して、Ｃ１８二酸ガンマ－Ｇｌｕ　２ｘＯＥＧ脂肪酸部分などの延長部分などであるがこれらに限定されない、目的の部分へのコンジュゲーションのための遊離システインを放出および調製することができる。

【０１６０】

本明細書に開示されるV_HHポリペプチドなどのＩＳＶＤポリペプチドは、二重特異性または三重特異性などを含むがこれらに限定されない、多重特異性であってもよい。

【０１６１】

本明細書で使用される場合、「二重特異性ＩＳＶＤポリペプチド」または「二重特異性V_HHポリペプチド」という用語は、それぞれ、２つの異なる抗原または同じ抗原上の２つの異なるエピトープに結合することができる、ＩＳＶＤポリペプチドまたはV_HHポリペプチドを指す。

【０１６２】

本明細書で使用される場合、「三重特異性ＩＳＶＤポリペプチド」または「三重特異性V_HHポリペプチド」という用語は、それぞれ、３つの異なる抗原もしくは同じ抗原上の３つの異なるエピトープまたは２つの異なる抗原上に存在する３つの異なるエピトープに結合することができる、ＩＳＶＤポリペプチドまたはV_HHポリペプチドを指す。

【０１６３】

本明細書で使用される場合、「多重特異性ＩＳＶＤポリペプチド」または「多重特異性V_HHポリペプチド」という用語は、それぞれ、２つ以上の異なる抗原または同じ抗原上の２つ以上の異なるエピトープに結合することができる、ＩＳＶＤポリペプチドまたはV_HHポリペプチドを指す。多重性ＩＳＶＤポリペプチドまたは多重性V_HHポリペプチドは、したがって、それぞれ二重特異性ＩＳＶＤポリペプチドおよび三重特異性ＩＳＶＤポリペプチドまたはV_HHポリペプチドを含む。

【０１６４】

当業者であれば、上記がポリペプチド誘導体（すなわち、延長部分を含む）にも適用されることを理解するであろう。

【０１６５】

本明細書で使用される場合、「経口（ｏｒａｌ）バイオアベイラビリティ」または「経口（ｐｅｒｏｒａｌ）バイオアベイラビリティ」という用語は、当該薬剤の静脈内投与後の全身循環における投与された薬剤の量に対する、経口投与後の全身循環における投与された薬剤の量（投与された薬剤対時間曲線の血漿濃度下面積として推定される）を指す。

【０１６６】

したがって、本明細書で使用される場合、「パラトープ」という用語は、抗原が特異的に結合する、すなわち抗原と物理的接触をする、ＩＳＶＤ上の区域または領域を指す。

【０１６７】

例えば、ＩＳＶＤ、V_HH断片、およびその標的の間の複合体の空間座標によって定義されるＸ線由来結晶構造の文脈では、本明細書におけるパラトープという用語は、文脈により別途の指定がない限りまたは矛盾しない限り、ＦＩＸ／ＦＩＸａまたはＦＸ／ＦＸａ内の重原子から４Åの距離以内に重原子（すなわち、非水素原子）を有することを特徴とするＩＳＶＤ残基として特異的に定義される。

【０１６８】

所与のＩＳＶＤ／抗原対のパラトープ（およびエピトープ）は、実施例に記載されるも

のなど、日常的な方法によって特定され得る。例えば、ＩＳＶＤおよび抗原は組み合わせられてもよく、ＩＳＶＤ／抗原複合体は結晶化されてもよい。ＩＳＶＤとその抗原との間の相互作用の特異的部位を特定するために、複合体の結晶構造が決定されて、使用されてもよい

【０１６９】

「薬学的に許容可能な賦形剤」という用語は、概して安全、非毒性であり、かつヒトの医薬品使用に許容可能である賦形剤を含む、医薬組成物を調製するのに有用な賦形剤を意味する。かかる賦形剤は、例えば、固形、液体、または半固体であり得る。

【０１７０】

本明細書で使用される場合、「血漿半減期」という用語は、患者に投与された物質の量の半分が、正常な生物学的プロセスによって患者の血清もしくは血漿から代謝または除去されるのに必要な時間を指す。

【０１７１】

本明細書で使用される場合、「選択的に結合する」という用語は、V_HH断片などのＩＳＶＤ上の結合領域が、別の構成要素よりも優先して、またはそれを支持して、１つの構成要素（例えば、活性化ＦＩＸ）に結合することを意味するようにとされるべきである。したがって、「選択的結合」は、他の構成要素の排他的結合または非検出可能な結合を必ずしも必要としない。例えば、抗ＦＩＸ（ａ）V_HH断片などの抗ＦＩＸ（ａ）ＩＳＶＤは、非活性化ＦＩＸと比較して、活性化ＦＩＸに選択的に結合し得る。

【０１７２】

「血液凝固促進抗体」という用語は、例えば、血液凝固のプロセスを加速することによって、および／または１つ以上の凝固因子の酵素活性を増加させることによって、血液凝固を増強する抗体を指す。

【０１７３】

本明細書で使用される場合、「血液凝固促進活性」という用語は、例えば、血液凝固のプロセスを加速することによって、および／または１つ以上の凝固因子の酵素活性を増加させることによって、血液凝固を増強する抗体などの化合物の能力を指す。したがって、「血液凝固促進活性」という用語は、以下に列挙される活性のうちの１つ以上を包含する（ただし、これらに限定されない）。

【０１７４】

ＦＩＸａ媒介性ＦＸ活性化に基づくアミド分解（ａｍｉｄｏｌｙｔｉｃ）（発色性または蛍光性）アッセイによって測定される、第ＩＸａ因子媒介性因子Ｘ活性化の増強。アッセイは、ＦＸａ特異的ペプチド基質の切断を通してＦＸａを測定する。基質が産生され、吸光度によって光度測定され得る色が得られる。

【０１７５】

活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）などの凝固アッセイによって測定される、凝固時間の短縮は、凝固の固有および共通の経路の活性を測定する。血漿は、接触活性化因子、例えば、エラグ酸またはカオリン、およびリン脂質を含むＡＰＴＴ試薬でプレインキュベートされる。塩化カルシウムは、フィブリン血栓形成を促進するために添加される。可能性のある読み取りは、凝固時間または凝固波形である。

【０１７６】

較正された自動トロンボグラフィー（ＣＡＴ）などのトロンビン生成アッセイで測定される、トロンビン生成の増強。トロンボグラムは、凝固血漿中のトロンビンの濃度を記述し、したがって、止血系の機能試験である。アッセイは、経時的なトロンビンによる蛍光性基質ＺＧＲＡＭＣの切断によって生成される蛍光の測定に基づく。本明細書の実施例８で使用される方法も参照されたい。

【０１７７】

ＲＯＴＥＭ（回転トロンボエラストメトリー）などのアッセイにより、粘弾性止血法によって、例えば、せん断応力下で全血において測定される、血栓形成のグローバル粘弾性特性の増強。機器内では、ボールベアリングピンが固定カップ内で回転する。試料中のフ

ィブリン鎖は、凝固中のカップの壁とピンとの間に形成され、鎖の強度は、ピンの動きに影響を及ぼし、それは検出される。

【０１７８】

血小板活性化後のコラーゲンへのフォン・ヴィレブランド因子（ＶＷＦ）媒介性血小板接着に基づく、血小板機能アナライザーによって測定される全血閉鎖時間（ｗｈｏｌｅ ｂｌｏｏｄ ｃｌｏｓｕｒｅ ｔｉｍｅ）（ＷＢＣＴ）の短縮。高いせん断応力が生じ、これが血小板接着および血小板凝集につながる。血流の開始から終了までの時間が測定される。

【０１７９】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、好ましくは、１つ、２つ、３つ、または４つの「延長部分」（ＰＭ）を含む。より好ましくは、１つまたは２つの延長部分。

【０１８０】

本明細書で使用される場合、「延長部分」という用語は、半減期延長特性を有し、かつ「延長因子」（Ｐ）および任意選択の「リンカー」（Ｌｐ）を含む部分を指す。したがって、「延長」という用語は、半減期の延長を指し、したがって、延長因子または延長部分は、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドの半減期の延長の目的に役立つ。

【０１８１】

延長部分（ＰＭ）は、延長因子「Ｐ」および任意選択のリンカー（Ｌｐ）を含む。

【０１８２】

各延長部分は、好ましくは、化合物のポリペプチド骨格内の表面曝露リジンまたはシステイン残基と結合する。結合点は、一般にＲ１と呼ばれる（また、Ｒ１≠Ｒ２≠Ｒ３などである、１つを超える延長部分Ｒ２、Ｒ３などの結合の場合）。

【０１８３】

当業者は、結合に好適な他の表面曝露残基を特定することができるであろう。

【０１８４】

延長部分は、１個の延長因子から成り得る。

【０１８５】

延長部分は、１個のリンカー（Ｌｐ）および１個の延長因子（Ｐ）を含み得る。

【０１８６】

延長部分は、１個のリンカーおよび２個以上の延長因子を含み得る。

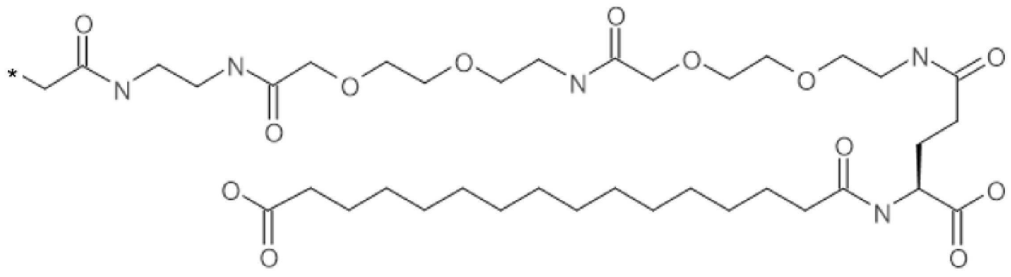
【０１８７】

リンカー（Ｌｐ）が存在する場合、延長部分は、Ｌｐを介してＩＳＶＤポリペプチド骨格と結合する。リンカー（Ｌｐ）が不在である場合、Ｐは、ポリペプチド骨格と結合する。

【０１８８】

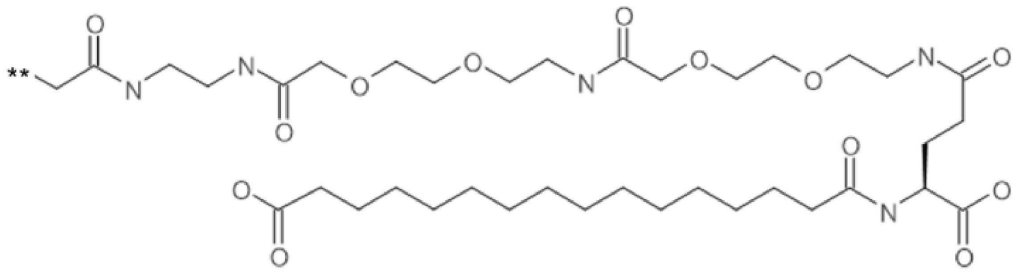
一実施形態では、第１延長部分および第２の延長部分が存在し、当該第１の延長部分は、以下の構造を含み、

【化２】



当該第２の延長部分は、以下の構造を含み、

【化３】



「＊」（Ｒ１）は、第１の延長部分に対するＩＳＶＤポリペプチド上の結合点を表し、
「＊＊」（Ｒ２）は、第２の延長部分に対するＩＳＶＤポリペプチド上の結合点を表し、
「＊」は、配列番号６２９の２５７位のＣｙｓであり、
「＊＊」は、配列番号６２９の２５９位のＣｙｓである。

【０１８９】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、単一システイン残基またはリジン残基を含んでもよく、これに対して単一延長部分が結合／コンジュゲートされている。

【０１９０】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、２個のリジン残基および２個の延長部分を含み得る。

【０１９１】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、２個のリジン残基および２個の同一の延長部分を含み得る。

【０１９２】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、２個のリジン残基および２個の非同一の延長部分を含み得る。

【０１９３】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、３個のリジン残基および３個の延長部分を含み得る。

【０１９４】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、３個のリジン残基および３個の同一の延長部分を含み得る。

【０１９５】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、３個のリジン残基および３個の非同一の延長部分を含み得る（例えば、第１および第２の延長部分は、同一であってもよく、第３の延長部分は、当該第１および第２の部分とは異なる）。

【０１９６】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、２個のシステイン残基および２個の延長部分を含み得る。

【０１９７】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、２個のシステイン残基および２個の同一の延長部分を含み得る。

【０１９８】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、２個のシステイン残基および２個の非同一の延長部分を含み得る。

【０１９９】

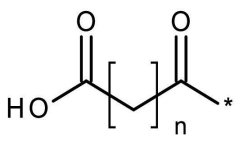
本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、３個のシステイン残基および３個の延長部分を含み得る。

【０２００】

本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、３個のシステイン残基および３個の同

一の延長部分を含み得る。
【０２０１】
本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、３個のシステイン残基および３個の非同一の延長部分を含み得る（例えば、第１および第２の延長部分は、同一であってもよく、第３の延長部分は、当該第１および第２の部分とは異なる）。
【０２０２】
ＩＳＶＤポリペプチドが２または３個の延長部分を含む場合、延長部分は、好ましくは、類似しており、より好ましくは、実質的に同一であり、または最も好ましくは、同一である。
【０２０３】
本明細書に開示される延長部分などの化学部分に関して、類似性および／または同一性は、当該技術分野において公知である任意の好適なコンピュータプログラムおよび／またはアルゴリズムを使用して決定され得る。
【０２０４】
延長部分を含む化合物は、「誘導体」と呼ばれ得る。例えば、「ＩＳＶＤポリペプチド誘導体」は、延長部分を含むＩＳＶＤポリペプチド、「V_HHポリペプチド誘導体」は、延長部分を含むV_HHポリペプチド、および「Ｖ－ＮＡＲポリペプチド誘導体」は、延長部分を含むＶ－ＮＡＲポリペプチドであると理解される。
【０２０５】
延長部分は、アルブミンと非共有結合することが可能であり得、それによって、血流中のＩＳＶＤポリペプチド誘導体の循環を促進し、その半減期を延長することができる。したがって、一実施形態では、延長部分は、アルブミン結合部分である。
【０２０６】
延長因子（Ｐ）は、アシル基を含み得る。アシル基は、分枝または非分枝であり得る。アシル基は、飽和または不飽和であり得る。延長因子は、脂肪アシル基を含み得る。アシル基は、分枝または非分枝であり得る。アシル基は、飽和または不飽和であり得る。
【０２０７】
延長因子は、遠位カルボン酸基を含み得る。
【０２０８】
延長因子は、脂肪酸基を含み得る。
【０２０９】
延長因子は、脂肪酸基およびアミド基を含み得る。
【０２１０】
延長因子は、遠位カルボン酸基およびアミド基を含み得る。
【０２１１】
延長因子は、アルキル基を含み得る。
【０２１２】
延長因子は、アリール基を含み得る。
【０２１３】
延長因子は、テトラゾール基を含み得る。
【０２１４】
延長因子は、スルホン酸基を含み得る。
【０２１５】
延長因子は、フェノキシ基を含み得る。
【０２１６】
延長因子は、安息香酸基を含み得る。
【０２１７】
延長因子は、８～３０個の炭素原子を含み得る。延長因子は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個の炭素原子を含み得る。

【０２１８】
延長因子は、６～３０個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。延長因子は、少なくとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含む炭素鎖を含み得る。
【０２１９】
延長因子は、１２～２６個の炭素原子を含み得る。「延長因子」は、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、または２６個の炭素原子を含み得る。
【０２２０】
延長因子は、１０～２６個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。延長因子は、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、または２６個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含む炭素鎖を含み得る。
【０２２１】
延長因子は、１６～２２個の炭素原子を含み得る。
【０２２２】
延長因子は、１４～２０個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。延長因子は、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含む炭素鎖を含み得る。
【０２２３】
延長因子は、１６～２２個の連続する炭素原子および１４～２０個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。
【０２２４】
延長因子は、１６個の連続する炭素原子および１４個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。
【０２２５】
延長因子は、１８個の連続する炭素原子および１６個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。
【０２２６】
延長因子は、２０個の連続する炭素原子および１８個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。
【０２２７】
延長因子は、２２個の連続する炭素原子および２０個の連続する－ＣＨ$_2$－基を含み得る。
【０２２８】
いくつかの実施形態では、延長因子は、以下：
化学式ａ：ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＯ－＊（式中、ｎが８～３０の範囲の整数である）によって定義される基を含み、これは、Ｃ（ｎ＋２）二酸、または
化学式ａ１：
【化４】



（式中、ｎが８～３０の範囲の整数である）とも呼ばれ得る。

【０２２９】
延長因子は、オリゴペプチドを含み得る。一実施形態では、延長因子オリゴペプチドは、１０～４０個のアミノ酸、例えば１０～３０個のアミノ酸、例えば１５～２５個のアミノ酸、および好ましくは２０個のアミノ酸である。延長因子オリゴペプチド配列組成物は、例えば、配列番号３および４の融合配列として例示される、ＱＲＬＭＥＤＩＣＬＰＲＷ

ＧＣＬＷＥＤＤＦ（配列番号７３６）であってもよい［国際公開第０１／４５７４６Ａ２号も参照］。化合物番号７１は、例えば、ＱＲＬＭＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤＦＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号４）から構成される５０アミノ酸Ｎ末端延長部分を含み、残基１～２０は、延長因子（Ｐ）であり、残基２１～５０は、リンカー（$Ｌ_{Ｐ}$）である。

【０２３０】

延長因子は、アミノ酸リンカー$Ｌ_{Ｐ}$を介してＩＳＶＤまたはＩＳＶＤポリペプチドに結合されてもよい。

【０２３１】

一実施形態では、$Ｌ_{Ｐ}$は、ＩＳＶＤポリペプチド骨格中のリジン残基またはシステイン残基の側鎖に、延長因子（Ｐ）を結合し得る。

【０２３２】

ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、２つの延長部分を含んでもよく、その各々は、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の炭素原子を含む。ＩＳＶＤポリペプチドは、２つの延長部分を含んでもよく、各延長因子（Ｐ）は、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個の連続する－$ＣＨ_{2}$－基を含む。

【０２３３】

ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、２つのＣ１４二酸、２つのＣ１６二酸、または２つのＣ１８二酸を含み得る。

【０２３４】

ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、３つの延長部分を含んでもよく、その各々は、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の炭素原子を含む延長因子を含む。ＩＳＶＤポリペプチドは、３つの延長部分を含んでもよく、延長因子は、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個の連続する－$ＣＨ_{2}$－基を含む。

【０２３５】

疑義を避けるために付言すると、例えば、アルブミンを結合することができるとしても、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドが二重特異性、三重特異性、または多重特異性であるかを定義するという点では、延長部分はバインダーとはみなされない。

【０２３６】

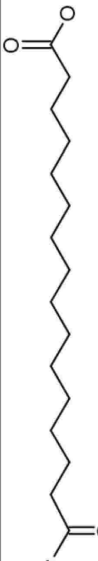
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチドは、表１に示されるもののうちのいずれか１つから選択される延長因子を含み得る。

【０２３７】

表２では、$Ｌ_{Ｐ}$は、示される延長因子（Ｐ）をＩＳＶＤポリペプチド骨格と接続する任意選択のリンカーを表す。Ｒ１は、ＩＳＶＤポリペプチドにおける結合部位を表す。

【表１－１】

表1：延長因子の例（P）（「*」は、L_PまたはR1への結合点を表す）

延長因子ID	構造	使用された化合物
P1	 C12二酸	化合物番号65
P2	 C16二酸	化合物番号6、番号7、番号8、番号9、番号10、番号11、番号12、番号13、番号14、番号15、番号16、番号17、番号18、番号19、番号20、番号21、番号22
P3	 C18二酸	化合物番号4、番号5、番号24、番号26、番号28、番号30、番号32、番号34、番号36、番号38、番号40、番号58、番号59、番号60、番号61、番号62、番号63、番号66
P4	 C20二酸	化合物番号67
P5	 テトラゾール	化合物番号68

【表１－２】

P6	QRLMEDICLPRWGCLWEDDF　アルブミンバインダーオリゴペプチドは、配列番号3および4の融合配列として例示される。配列番号3は、10アミノ酸長グリシン-セリンリンカーと一緒にアルブミンバインダーオリゴペプチドを記述するが、配列番号4は、30アミノ酸長グリシン-セリンリンカーと一緒にアルブミンバインダーオリゴペプチドを記述する。	化合物番号70、番号71、番号72、番号73

【０２３８】

一実施形態では、延長因子は、ＩＳＶＤポリペプチド上に直接コンジュゲートされ、すなわち、リンカーＬｐを使用しない（すなわち、共有結合による）。

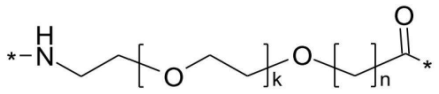
【０２３９】

他の実施形態では、延長因子は、リンカーＬｐを使用してＩＳＶＤポリペプチド上に直接コンジュゲートされる。非限定的な例を以下に提供する。

【０２４０】

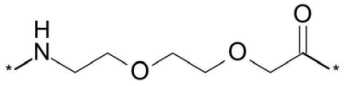
Ｌｐリンカーは、存在する場合、Ａｄｏ、Ａｅｅｐ、またはＡｅｅｅｐ、スルホンアミド、Ｔｒｘ、ε－Ｌｙｓ、Ａｈｘ、Ｇｌｕ、γＧｌｕ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ａｌａ、および

／またはＴｈｒを含み得る。
【０２４１】
ＬＰリンカーは、
化学式１：＊－ＮＨ－（ＣＨ２）２－（Ｏ－（ＣＨ２））ｋ－Ｏ－（ＣＨ２）ｎ－ＣＯ－＊
または
【化５】
化学式２：

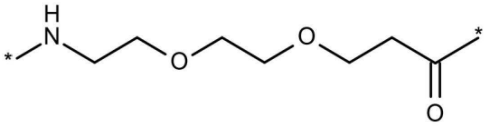


，

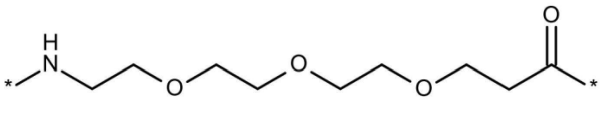
（式中、ｋは１～５の範囲の整数であり、ｎは１～５の範囲の整数である）の化学式によって表され得る少なくとも一部分を含み得る。
【０２４２】
ｋ＝１およびｎ＝１の場合、リンカー要素は、Ａｄｏ、または８－アミノ－３，６－ジオキサオクタノイルと指定され得、以下の化学式によって表され得る。
化学式３：＊－ＮＨ－（ＣＨ２）２－Ｏ－（ＣＨ２）２－Ｏ－ＣＨ２－ＣＯ－＊
または
【化６】
化学式４：



【０２４３】
ｋ＝１およびｎ＝２の場合、リンカー要素は、Ａｅｅｐと指定され得、以下の化学式によって表され得る。
化学式５：＊－ＮＨ－（ＣＨ２）２－Ｏ－（ＣＨ２）２－Ｏ－（ＣＨ２）２－ＣＯ－＊
または
【化７】
化学式６：



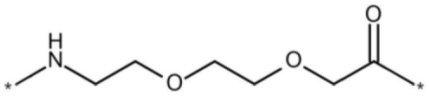
【０２４４】
ｋ＝２およびｎ＝２の場合、リンカー要素は、Ａｅｅｅｐと指定され得、以下の化学式によって表され得る。
化学式７：＊－ＮＨ－（ＣＨ２）２－Ｏ－（ＣＨ２）２Ｏ－（ＣＨ２）２－Ｏ－（ＣＨ２）２－ＣＯ－＊
または
【化８】
化学式８：



【０２４５】

任意のリンカー（Ｌｐ）は、以下の化学式を有する８－アミノ－３，６－ジオキサ－オクタン酸（ＯＥＧ）基を含み得る。

【化９】

化学式８ａ：

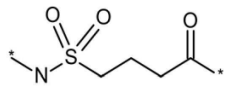
【０２４６】

任意選択のリンカー（Ｌｐ）は、スルホンアミド－Ｃ４部分を含み得る。スルホンアミド－Ｃ４基は、４－ブタノイル基と結合したスルホンアミド基であり、以下の化学式を有する。

化学式９：＊－ＮＨ－Ｓ（Ｏ）$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＯ－＊

または

【化１０】

化学式１０：

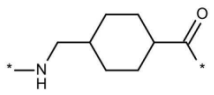
【０２４７】

任意選択のリンカーＬｐは、Ｔｒｘを含み得る。Ｔｒｘはまた、トラネキサム酸、トランス－４－（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸とも呼ばれ、以下の化学式を有する。

化学式１１：＊－ＮＨ－ＣＨ$_2$－（Ｃ$_6$Ｈ$_{10}$）－ＣＯ－＊

または

【化１１】

化学式１２：

【０２４８】

リンカーＬｐは、イプシロン－リジン（ε－Ｌｙｓ）を含み得る。

【０２４９】

リンカーＬｐは、リジン（Ｌｙｓ）を含み得る。

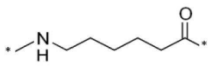
【０２５０】

リンカーＬｐは、Ａｈｘを含み得る。Ａｈｘは、アミノカプロン酸、６－アミノヘキサン酸とも呼ばれ、以下によって定義される。

化学物質１３：＊－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－＊

または

【化１２】

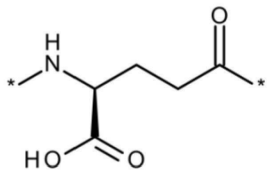
化学物質１４：

【０２５１】

リンカーＬｐは、

【化１３】

化学式１５：



（式中、Ｇｌｕジラジカルは、ｐ回含まれ得、ｐは１～３の範囲の整数である）などのＧｌｕジラジカルを含み得る。

【０２５２】

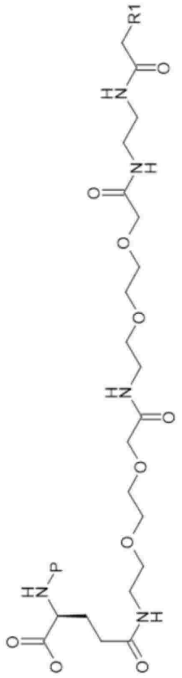
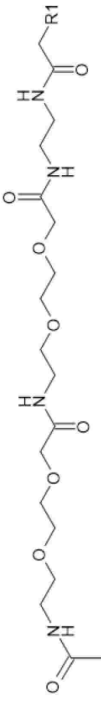
化学式１５はまた、本明細書では別のリジンのイプシロンアミノ基との連結のために使用されるアミノ酸グルタミン酸のガンマカルボキシ基であることから、ガンマ－Ｇｌｕ、または簡潔にγＧｌｕとも呼ばれる場合がある。上記に説明するように、他のリンカー要素は、例えば、別のＧｌｕ残基、またはＡｄｏ分子であってもよい。次にＧｌｕのアミノ基は、延長部分のカルボキシ基、または存在する場合は、例えば、Ａｄｏ分子のカルボキシ基と、または存在する場合は、例えば、別のＧｌｕのガンマカルボキシ基と、アミド結合を形成する。

【０２５３】

あるいは、本明細書に開示されるＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、以下の表２に示されるもののうちのいずれか１つから選択されるリンカー（L_P）を含み得る。Ｒ１は、延長部分が結合されるＩＳＶＤポリペプチド中の残基を表し、Ｐは、延長因子を表す。

【表２】

表2:(任意選択の)延長部分リンカー(「L_P」)の例

リンカー(L_P)ID	構造	誘導体で使用された化合物番号
L_P1		化合物番号4、番号5、番号24、番号26、番号28、番号30、番号32、番号34、番号36、番号38、番号40、番号58、番号59、番号60、番号61、番号62、番号63、番号65、番号66、番号67、番号6、番号7、番号8、番号9、番号10、番号11、番号12、番号13、番号14、番号15、番号16、番号17、番号18、番号19、番号20、番号21、番号22
L_P2		化合物番号68
L_P3	「R1」-GGGGSGGGGS(配列番号25)-「P」 または 「P」-GGGGSGGGGS(配列番号25)-「R1」	化合物番号70、番号72
L_P4	「R1」-GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(配列番号26)-「P」または 「P」-GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(配列番号26)-「R1」	化合物番号71、番号73

【０２５４】

本明細書の開示に基づいて、当業者は、任意選択で、いくつかの限定された日常的な実験の後に、本明細書に開示される特定のＩＳＶＤポリペプチド誘導体で使用するための最適なL_PおよびL_{1-2}リンカーを決定することができるであろう。例えば、リンカーは、好ましくは、ＩＳＶＤポリペプチド中のV_HＨ断片などの各ＩＳＶＤが、その標的に結合することを可能にするようなものである。また、本明細書の開示に基づいて、当業者は、任意選択で、いくつかの限定された日常的な実験の後に、本明細書に開示される特定のＩＳＶＤポリペプチド誘導体で使用するための最適なリンカーを決定することができるであろう。

【０２５５】
結合が生じるＩＳＶＤまたはＩＳＶＤポリペプチド骨格中のアミノ酸残基は、本明細書ではＲ１と示される。１個を超える延長部分が結合している場合、さらなる結合部位は、Ｒ２、Ｒ３などと示され得る。
【０２５６】
延長部分は、ＩＳＶＤポリペプチド骨格の第１のＩＳＶＤ部分のシステイン残基またはリジン残基と結合してもよい。
【０２５７】
延長部分は、ＩＳＶＤポリペプチド骨格の第２のＩＳＶＤ部分のシステイン残基またはリジン残基と結合してもよい。
【０２５８】
延長部分は、ＩＳＶＤポリペプチド骨格の任意選択のリンカー（L_{1-2}）部分のシステイン残基またはリジン残基と結合してもよい。
【０２５９】
延長部分は、ＩＳＶＤポリペプチド骨格内のリジン残基と共有結合し得る。延長部分は、延長部分におけるカルボン酸基とリジン残基のイプシロンアミノ基との間に形成されるアミド結合を介して結合され得る。
【０２６０】
延長部分は、ＩＳＶＤポリペプチド骨格内のシステイン残基と共有結合し得る。延長部分は、ポリペプチドにおける延長部分とシステイン残基の硫黄原子との間に形成されるチオエーテル結合を介して結合され得る。
【０２６１】
したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物は、１、２、もしくは３個のリジンまたはシステイン残基、１、２、もしくは３個の延長部分を含み得、各延長部分は、単一のリジンまたはシステイン残基の側鎖と結合する。
【０２６２】
結合がシステイン残基を介して生じる場合、システインは、好ましくは、遊離システインである。
【０２６３】
遊離システインは、いくつかの実施形態では、組み換えＤＮＡ技術によって導入され、１つ以上のＣ１６二酸、Ｃ１７二酸。またはＣ１８二酸ガンマ－Ｇｌｕ　２ｘＯＥＧ脂肪酸部分を結合するためのコンジュゲーション部位として機能し得る。
【０２６４】
好ましい実施形態では、遊離システインは、任意選択で、組み換えＤＮＡ技術によって導入され、１、２、または３つのＣ１８二酸ガンマ－Ｇｌｕ　２ｘＯＥＧ脂肪酸部分を結合するためのコンジュゲーション部位として機能し得る。
（ＩＵＰＡＣ名Ｓ｛ベーター－ＡＡ＃｝－［２－［２－［［２－［２－［２－［［２－［２－［２－［［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－（１７－カルボキシヘプタデカノイル－アミノ）ブタノイル］アミノ］エトキシ］エトキシ］アセチル］アミノ］エトキシ］エトキシ］アセチル］アミノ］－エチルアミノ］－２－オキソエチル］、ＡＡ＃アミノ酸結合）。
【０２６５】
別の実施形態では、遊離システインは、任意選択で、組み換えＤＮＡ技術によって導入され、１、２、または３つのＣ１７二酸ガンマ－Ｇｌｕ　２ｘＯＥＧ脂肪酸部分を結合するためのコンジュゲーション部位として機能し得る。
（ＩＵＰＡＣ名Ｓ｛ベーター－ＡＡ＃｝－［２－［２－［［２－［２－［２－［［２－［２－［２－［［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－（１６－カルボキシヘキサデカノイル－アミノ）ブタノイル］アミノ］エトキシ］エトキシ］アセチル］アミノ］エトキシ］エトキシ］アセチル］アミノ］－エチルアミノ］－２－オキソエチル］、ＡＡ＃アミノ酸結合）。

【０２６６】
最も好ましい実施形態では、遊離システインは、組み換えＤＮＡ技術によって導入され、１、２、または３つのＣ１６二酸ガンマ－Ｇｌｕ　２ｘＯＥＧ脂肪酸部分を結合するためのコンジュゲーション部位として機能し得る。
（ＩＵＰＡＣ名Ｓ｛ベーター－ＡＡ＃｝－［２－［２－［［２－［２－［２－［［２－［２－［［（４Ｓ）－４－カルボキシ－４－（１５－カルボキシペンタデカノイル－アミノ）ブタノイル］アミノ］エトキシ］エトキシ］アセチル］アミノ］エトキシ］エトキシ］アセチル］アミノ］－エチルアミノ］－２－オキソエチル］、ＡＡ＃アミノ酸結合）。
【０２６７】
本明細書で使用される場合、「標準クロマトグラフィー」という用語は、タンパク質Ａ、陽イオン交換、陰イオン交換、疎水性相互作用、およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの標準クロマトグラフィー方法を包含する。
【０２６８】
本明細書で使用される場合、「表面曝露アミノ酸残基」という用語は、その側鎖が溶媒分子（概して、ほとんど水分子であり得る）と接触し得るアミノ酸残基を指す。しかしながら、側鎖は、必ずしも溶媒分子と完全に接触している必要はなく、側鎖の一部でさえも溶媒分子と接触しているとき、アミノ酸残基は、「表面上に位置するアミノ酸」として定義される。ポリペプチドの表面上に位置するアミノ酸残基はまた、ＩＳＶＤ表面の近くに位置するアミノ酸残基を含んでもよく、それによって、側鎖が部分的にでも溶媒分子と接触している他のアミノ酸残基からの相互電荷の影響を有してもよい。当業者であれば、例えば、市販または公開されているソフトウェアを使用して相同性モデリングまたは機械学習を行うことによって、ポリペプチドまたは抗体の相同性モデルまたは機械学習に基づく三次元分子モデルを調製することができる。あるいは、三次元分子モデル生成のためのＸ線結晶構造解析などの方法を使用することが可能である。表面上に曝され得るアミノ酸残基は、例えば、ＭＯＥ（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ）またはＢｉｏｌｕｍｉｎａｔｅ（Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ）などのコンピュータプログラムを使用して、抗体の三次元分子モデルからの座標を使用して決定することができる。表面曝露部位は、技術分野で公知のアルゴリズムを使用して決定されてもよい（例えば、Ｌｅｅ　ａｎｄ　Ｒｉｃｈａｒｄｓ（１９７１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５５：３７９－４００、Ｃｏｎｎｏｌｌｙ，Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｃｒｙｓｔ．（１９８３）１６：５４８－５５８を参照）。表面曝露可能部位は、タンパク質モデリングおよび抗体から得られた三次元構造情報の分析に好適なソフトウェアを使用して決定することができる。かかる目的で入手可能なソフトウェアには、例えば、ＭＯＥ（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ）またはＢｉｏｌｕｍｉｎａｔｅ（Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ）が含まれる。溶媒にアクセス可能な表面（Å^{2}中）面積は、プローブ半径１．４Åの水プローブを使用して計算される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用して表面曝露領域および面積を決定する方法は、Ｐａｃｉｏｓ（Ｐａｃｉｏｓ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ｃｈｅｍ．１８（４）：３７７－３８６（１９９４）、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｏｄｅｌ．１：４６－５３（１９９５））によって記載されている。上述のような情報に基づいて、溶媒と接触する抗体の表面上に位置する適切なアミノ酸残基を選択することができる。
【０２６９】
医薬組成物
本明細書に開示されるＶ$_H$Ｈポリペプチド誘導体は、医薬組成物中で調製されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる組成物は、少なくとも１つの薬学的に許容可能な賦形剤を含む。
【０２７０】
本明細書で使用される場合、「賦形剤」という用語は、活性治療成分（ＡＰＩ）以外の任意の構成要素を幅広く指す。賦形剤は、例えば、担体、ビヒクル、充填剤、結合剤、潤滑剤、滑剤、崩壊剤、流量制御剤、結晶化阻害剤、可溶化剤、安定剤、着色剤、香味剤、

界面活性剤、乳化剤、送達剤、ヒドロトロープ、もしくはそれらの組み合わせとして、および／または活性医薬成分の投与および／または吸収を改善するために、様々な目的を果たし得る。

【０２７１】

使用される各賦形剤の量は、当該技術分野において慣行である範囲内で変化してもよい。経口剤形を製剤化するために使用され得る技法および賦形剤については、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，８ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｓｈｅｓｋｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｅｄｓ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ，ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ ｔｈｅ Ｒｏｙａｌ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｇｒｅａｔ Ｂｒｉｔａｉｎ（２０１７）、およびＲｅｍｉｎｇｔｏｎ：ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ａｌｌｅｎ，Ｅｄｓ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）に記載されている。

【０２７２】

好ましい実施形態では、V_HHポリペプチドを含む組成物は、送達剤およびハイドロトロープをさらに含む。

【０２７３】

好ましい送達剤は、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸（ＮＡＣ）の塩である。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、送達剤は、国際公開第２００７／１２１３１８号に記載されるように、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩である。いくつかの実施形態では、送達剤は、８－（サリチロイルアミノ）オクタン酸ナトリウムとしても公知である、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸ナトリウム（本明細書では「ＳＮＡＣ」と呼ばれる）である。

【０２７５】

医薬組成物は、好ましくは、１つ以上のハイドロトロープを含む。界面活性剤のように、ハイドロトロープは、親水性部分および疎水性の両方を含み、ミセルを形成し、自己凝集することができるが、ミセル可溶化することなく溶質を可溶化する。一実施形態では、ハイドロトロープは、ＳＮＡＣの溶解度を高めることができる。一実施形態では、ハイドロトロープは、ニコチンアミド（ＮＡＭ）である。

【０２７６】

一実施形態では、組成物は、固形組成物である。組成物は、錠剤、小袋、またはカプセルなど、経口投与に好適な形態であってもよい。かかる一実施形態では、組成物は錠剤として製剤化される。本明細書に提供される固形組成物は、溶解促進を可能にし、それによって活性医薬成分の迅速な取り込みを可能にする。

【０２７７】

投与および用量

本明細書に開示される化合物、例えばV_HHポリペプチド誘導体は、適切な医薬組成物で非経口的に、例えば静脈内、例えば筋肉内、例えば皮下に投与されてもよい。化合物は、非注射経路を介して投与されてもよく、好ましくは、経口（ＰＯ）投与されてもよい。化合物は、予防的に投与されてもよい。化合物は、（要求に応じて）治療的に投与されてもよい。

【０２７８】

皮下投与

皮下投与によって送達される化合物の用量は、状態の重症度に応じて、１日当たり約０．０１ｍｇ～１ｍｇの化合物、好ましくは１日当たり約０．０５ｍｇ～５ｍｇ、およびより好ましくは１日当たり約０．１ｍｇ～約１０ｍｇ、隔日、３日毎、４日毎、５日毎、６

日毎、または週１回であってもよい。また、好適な用量は、特定の化合物について、そのインビボ半減期または平均滞留時間およびその生物活性を含む、その化合物の特性に基づいて調整され得る。

【０２７９】

一実施形態では、本発明は当該組成物の内容物を有する注射装置に関する。

【０２８０】

経口（ＰＯ）投与

経口で送達される化合物の用量は、状態の重症度に応じて、１日毎、隔日、３日毎に、約１ｍｇ～約３００ｍｇの化合物であり得る。また、好適な用量は、特定の化合物について、そのインビボ半減期または平均滞留時間およびその生物活性を含む、その化合物の特性に基づいて調整され得る。

【０２８１】

本明細書に開示される化合物を含有する組成物は、予防的な処置のために、および／または一部の実施形態では治療的な処置のために投与することができる。治療的な用途では、組成物は、上述のような何らかの出血障害などの疾患を患っている対象者に、疾患およびその合併症を治癒、緩和、または部分的に阻止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療有効量」として定義される。当業者によって理解されるように、この目的のために有効な量は、疾患または傷害の重度、ならびに対象者の体重および全身状態に依存する。

【０２８２】

実施形態

１．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体であって、

第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、

第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、

少なくとも１つの延長部分と、

任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、

任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含む、血液凝固促進ＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

２．　以下の式を有する、実施形態１に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ１－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ２

３．　以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有する、実施形態１に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ２－ＩＳＶＤ１、または
ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または
ＩＳＶＤ２－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－ＩＳＶＤ２、または
Ｅ－ＩＳＶＤ２－ＩＳＶＤ１、または
ＩＳＶＤ１－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ２、または
ＩＳＶＤ２－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ１、または
ＩＳＶＤ１－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ２－Ｅ、または

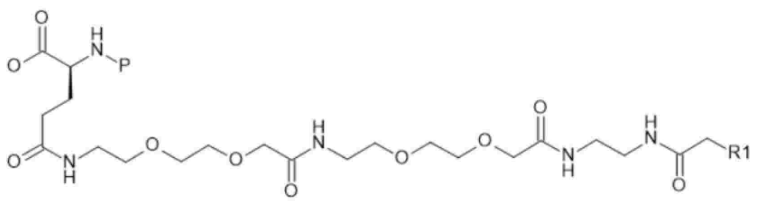
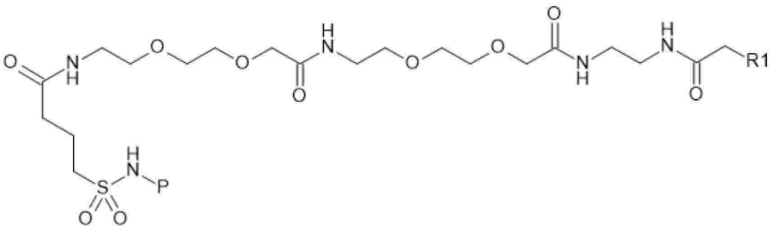
ＩＳＶＤ２－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ１－Ｅ、または
Ｅ－ＩＳＶＤ１－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ２、または
Ｅ－ＩＳＶＤ２－Ｌ１－２－ＩＳＶＤ１
４．　少なくとも１つの延長部分が、１つ以上の表面曝露アミノ酸残基に結合している、実施形態１～３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
５．　以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、
ＩＳＶＤ２－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ１－Ｅ
式中、１つ以上の延長部分が、１つ以上の表面曝露残基に結合している、実施形態１～４のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
６．　以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、
ＩＳＶＤ２－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ１－Ｅ
式中、２つの延長部分が、Ｅ上の１つ以上の表面曝露残基に結合している、実施形態１～５のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
７．　以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、
ＩＳＶＤ２－$Ｌ_{1-2}$－ＩＳＶＤ１－Ｅ
Ｅにおける第１の表面露出残基および第２の表面露出残基にそれぞれ結合している第１の延長部分および第２の延長部分をさらに含む、実施形態１～６のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
８．　$Ｌ_{1-2}$が、「４０～６０％」対「６０～４０％」の疎水性アミノ酸対親水性アミノ酸の比を含む、実施形態１～７のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
９．　第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができる、実施形態１～８のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１０．　第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）のうちの少なくとも４、５、６、７、または８個を含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができる、実施形態１～９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１１．　第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）を含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１０のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１２．　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１１のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１３．　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、およびＬ１７８（連続ナンバリング）を含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１２のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１４．　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１５．　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバリング）のうちの少なくとも３、４、５、または６個を含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１４のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

１６．　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバリング）を含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１５のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１７．　当該第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができ、
　当該第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、およびＬ１７８（連続ナンバリング）のうちの少なくとも１つを含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１６のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１８．　当該第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）を含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができ、
　当該第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９（連続ナンバリング）を含む、第Ｘ因子（配列番号２）上のエピトープに結合することができる、実施形態１～１７のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１９．　第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｆ２９、Ｎ３０、Ｙ３２、Ｔ５４、Ｄ９９、Ｒ１００、Ｓ１０１、Ｆ１０２、Ｌ１０３、Ｆ１０４、Ｑ１０６、Ａ１０７、およびＮ１１３（配列番号３５）を含むパラトープを含み、
　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基
　ａ）Ｄ３２、Ａ３３、Ｍ３４、Ｇ３５、Ｙ３７、Ｌ４７、Ｖ４８、Ａ４９、Ｇ５０、Ｉ５１、Ｍ５２、Ｎ５７、Ｔ５８、Ｎ５９、Ｙ６０、Ｔ６１、Ｋ９７、Ｖ９９、Ｒ１０１、およびＰ１０２（配列番号２７）、または
　ｂ）Ａ３３、Ｍ３４、Ｇ３５、Ｗ４７、Ｖ４８、Ａ４９、Ａ５０、Ｉ５１、Ｓ５２、Ｓ５７、Ｔ５８、Ｎ５９、Ｙ６０、Ａ６１、Ａ９７、Ａ９８、Ｄ９９、Ｇ１０５、Ｌ１０７、およびＹ１０９（配列番号７３４）
　（連続ナンバリング）を含むパラトープを含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２０．　当該第１のＩＳＶＤが、
　１）
　ＣＤＲ１：任意選択で、１つまたは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１７２）、
　ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１７３）、
　ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１７４）（Ｋａｂａｔ定義）を含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２１．　当該第２のＩＳＶＤが、
　（Ａ）
　ＣＤＲ１：任意選択で、１つまたは２つの置換を含むＲＹＡＭＧ（配列番号１６８）、
　ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１６９）、
　ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１７０）、または
　（Ｂ）
　ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含むＲＬＡＭＧ（配列番号１２８）、

ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２９）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１３０）（Ｋａｂａｔ定義）を含む、
実施形態１～９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２２．　当該第１のＩＳＶＤが、
１）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１７２）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１７３）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１７４）を含むか、または
当該第２のＩＳＶＤが、
（Ａ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＹＡＭＧ（配列番号１６８）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１６９）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１７０）、または
（Ｂ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＬＡＭＧ（配列番号１２８）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２９）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１３０）（Ｋａｂａｔ定義）を含む、
実施形態１～９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２３．　当該置換が、保存的置換である、実施形態２０～２２のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２４．　当該第１のＩＳＶＤの配列が、それぞれ配列番号１０７、１１５、１２３、１３１、１５５、または１７１によって特定される配列と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一である、実施形態１～２３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２５．　当該第２のＩＳＶＤの配列が、それぞれ配列番号１０３、１１１、１１９、１２７、１５１、または１６７によって特定される配列と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一である、実施形態１～２４のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２６．　当該第１のＩＳＶＤの配列が、それぞれ配列番号１０７、１１５、１２３、１３１、１５５、または１７１によって特定される配列と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一であり、当該第２のＩＳＶＤの配列が、それぞれ配列番号１０３、１１１、１１９、１２７、１５１、または１６７によって特定される配列と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一である、実施形態１～２５のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
２７．　当該第１のＩＳＶＤが、以下の配列を含む、実施形態１～２６のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
$V_HH-2.20$（配列番号１７１）、
$V_HH-2.18$（配列番号１５５）、
$V_HH-2.15$（配列番号１３１）、
$V_HH-2.13$（配列番号１１５）、

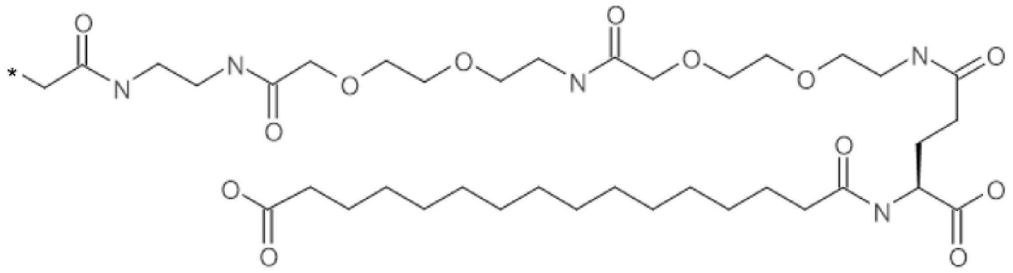
ＶＨＨ－２．１４（配列番号１２３）、または
ＶＨＨ－２．１２（配列番号１０７）
２８．　当該第２のＩＳＶＤが、以下の配列を含む、実施形態１～２７のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
ＶＨＨ－１．２０（配列番号１６７）、
ＶＨＨ－１．１８（配列番号１５１）、
ＶＨＨ－１．１５（配列番号１２７）、
ＶＨＨ－１．１３（配列番号１１１）、
ＶＨＨ－１．１４（配列番号１１９）、または
ＶＨＨ－１．１２（配列番号１０３）
２９．　当該第１のＩＳＶＤが、以下の配列を含み、
ＶＨＨ－２．２０（配列番号１７１）、
ＶＨＨ－２．１８（配列番号１５５）、
ＶＨＨ－２．１５（配列番号１３１）、
ＶＨＨ－２．１３（配列番号１１５）、
ＶＨＨ－２．１４（配列番号１２３）、または
ＶＨＨ－２．１２（配列番号１０７）
当該第２のＩＳＶＤが、以下の配列を含む、実施形態１～２８のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
ＶＨＨ－１．２０（配列番号１６７）、
ＶＨＨ－１．１８（配列番号１５１）、
ＶＨＨ－１．１５（配列番号１２７）、
ＶＨＨ－１．１３（配列番号１１１）、
ＶＨＨ－１．１４（配列番号１１９）、または
ＶＨＨ－１．１２（配列番号１０３）
３０．　当該第１のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－２．２０（配列番号１７１）の配列を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－１．２０（配列番号１６７）の配列を含む、実施形態２９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３１．　当該第１のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－２．１８（配列番号１５５）の配列を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－１．１８（配列番号１５１）の配列を含む、実施形態２９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３２．　当該第１のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－２．１５（配列番号１３１）の配列を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－１．１５（配列番号１２７）の配列を含む、実施形態２９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３３．　当該第１のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－２．１３（配列番号１１５）の配列を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－１．１３（配列番号１１１）の配列を含む、実施形態２９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３４．　当該第１のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－２．１４（配列番号１２３）の配列を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－１．１４（配列番号１１９）の配列を含む、実施形態２９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３５．　当該第１のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－２．１２（配列番号１０７）の配列を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、ＶＨＨ－１．１２（配列番号１０３）の配列を含む、実施形態２９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３６．　延長部分が、以下から成る群から選択される延長因子を含む、実施形態１～３５のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
ａ）Ｃ１６二酸、Ｃ１７二酸、Ｃ１８二酸、Ｃ１９二酸、Ｃ２０二酸、Ｃ２１二酸、またはＣ２２二酸、
ｂ）テトラゾール、
ｃ）ＲＬＩＥＤＩＣＬＰＲＷＧＣＬＷＥＤＤ（配列番号７３７）などのアルブミンバインダーペプチド、

ｄ）ＱＲＦＣＴＧＨＦＧＧＬＹＰＣＮＧ（配列番号７３８）などのＦｃＲｎバインダーペプチド、および
ｅ）ＦＮＭＱＱＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＫＩＫＳＩＲＤＤＮ（配列番号７３９）などのＦｃバインダーペプチド
３７．　延長部分が、Ｃ１６二酸、Ｃ１７二酸、Ｃ１８二酸、Ｃ１９二酸、およびＣ２０二酸から成る群から選択される延長因子を含む、実施形態１～３６のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３８．　延長因子が、Ｃ１６二酸延長因子である、実施形態３４に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
３９．　延長部分が、ＩＳＶＤ１、L_{1-2}、ＩＳＶＤ２、またはＥに延長因子を結合するリンカーL_Pを含む、実施形態１～３８のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４０．　L_Pが、以下から成る群から選択される、実施形態３９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
【表３】

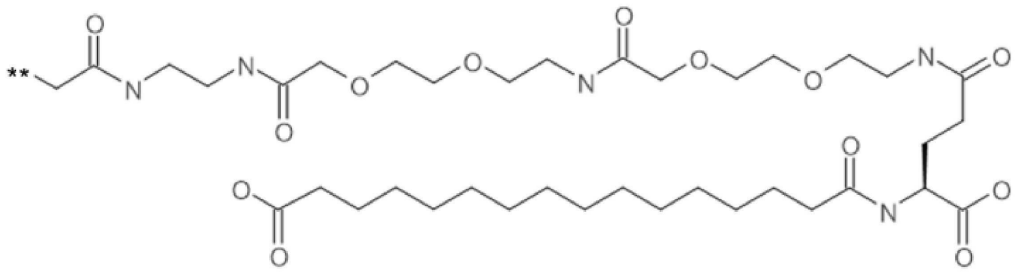
L_P1	
L_P2	
L_P3	「R1」-GGGGSGGGGS(配列番号25)-「P」 または 「P」-GGGGSGGGGS(配列番号25)-「R1」
L_P4	「R1」-GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(配列番号26)-「P」 または 「P」-GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(配列番号26)-「R1」

４１．　延長部分が、ＩＳＶＤ２の１３位、および／またはＩＳＶＤ１の１２位、１４位、１５位、４２位、４４位、６３位、および／または８５位（連続番ナンバリング）のうちの１つ以上に結合されている、実施形態１～４０のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４２．　ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、Ｃ末端延長部を含み、延長部分が、当該Ｃ末端延長部に結合されている、実施形態１～４０のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４３．　ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、第１および第２の延長部分ならびにＣ末端延長部を含み、第１の延長部分および第２の延長部分が、Ｃ末端延長部に結合されている、実施形態１～４２のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４４．　Ｃ末端延長部が、ＩＳＶＤ１に結合されている、実施形態４３に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４５．　Ｃ末端延長部が、ＩＳＶＤ２に結合されている、実施形態４３に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４６．　当該延長部分が、同一である、実施形態１～４５のいずれか１つに記載のＩＳＶ

Ｄポリペプチド誘導体。
４７．　１つ以上の延長部分が、表面曝露残基に結合している、実施形態１～４６のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４８．　１つ以上の延長部分が、表面曝露残基に結合しており、当該表面曝露残基が、ＣＤＲ領域の残基ではない、実施形態１～４７のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
４９．　１つ以上の延長部分が、１つ以上のシステインまたはリジン残基で結合している、実施形態１～４８のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
５０．　当該ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、配列番号６２９を含み、
　当該第１の延長部分が、以下の構造を含み、
【化１４】



　当該第２の延長部分が、以下の構造を含み、
【化１５】



　「＊」（Ｒ１）が、第１の延長部分に対するＩＳＶＤポリペプチド上の結合点を表し、
　「＊＊」（Ｒ２）が、第２の延長部分に対するＩＳＶＤポリペプチド上の結合点を表し、
　「＊」が、配列番号６２９の２５７位のＣｙｓであり、
　「＊＊」が、配列番号６２９の２５９位のＣｙｓである、実施形態４３に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
５１．　当該ポリペプチドの等電点が、等電点電気泳動を使用して決定された場合、６．５以下である、実施形態１～５０のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
５２．　当該ポリペプチド誘導体が、二重特異性または三重特異性ポリペプチド誘導体などの多重特異性ポリペプチド誘導体である、実施形態１～５１のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
５３．　当該ポリペプチド誘導体が、二重特異性ポリペプチド誘導体である、実施形態１～５２のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
５４．　当該ポリペプチド誘導体が、１２～５０ｋＤａの範囲内、例えば１２～４８ｋＤａ、例えば１２～４３ｋＤａ、例えば１２～３７ｋＤａ、例えば１２～３５ｋＤａ、例えば１２～３２ｋＤａ、例えば１２～２７ｋＤａ、例えば１２～２２ｋＤａ、例えば１２～１８ｋＤａ、例えば１４～５０ｋＤａ、例えば１４～４８ｋＤａ、例えば１４～４３ｋＤａ、例えば１４～３７ｋＤａ、例えば１４～３５ｋＤａ、１４～３２ｋＤａ、例えば１４～２７ｋＤａ、例えば１４～２２ｋＤａ、例えば１４～１８ｋＤａ、例えば２２～５０ｋＤａ、２２～４８ｋＤａ、例えば２２～４３ｋＤａ、例えば２２～３７ｋＤａ、例えば２

２～３５ｋＤａ、例えば２２～３２ｋＤａ、例えば２２～３１ｋＤａ、例えば２２～３０ｋＤａ、例えば２２～２９ｋＤａ、例えば２２～２８ｋＤａ、例えば２２～２７ｋＤａ、例えば２４～５０ｋＤａ，２４～４８ｋＤａ、例えば２４～４３ｋＤａ、例えば２４～３７ｋＤａ、例えば２４～３５、例えば２４～３２ｋＤａ、例えば２４～３１ｋＤａ、２４～３０ｋＤａ、２４～２９ｋＤａ、２４～２８ｋＤａ、例えば２４～２７ｋＤａ、例えば３６～４８ｋＤａ、例えば３６～４３ｋＤａ、例えば３６～３７ｋＤａ、例えば２８～３６ｋＤａ、例えば２９～３３ｋＤａ、例えば２９～３０、例えば約２９、例えば２９、例えば約３０、例えば３０、例えば３０～３２ｋＤａ、または例えば３１ｋＤａの分子量を有する、実施形態１～５３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

５５．　膜標的化ＩＳＶＤポリペプチド誘導体ではない、実施形態１～５４のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

５６．　当該延長部分が、ホスファチジルセリンおよび／またはホスファチジルエタノールアミンなど、アミノリン脂質などの形質膜の構成要素を結合することができない、実施形態１～５５のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

５７．　当該延長部分が、ＧＰｌｂ－ｌＸ、コラーゲンシャペロンＨＳＰ４７、エフリンＢ１、チオールイソメラーゼタンパク質ＥＲＰ５、５５の造血前駆キナーゼ１－相互作用タンパク質（ＨＩＰ－５５）、糖タンパク質Ｖｌ、血小板糖タンパク質１ｂ、血小板由来増殖因子受容体、血小板内皮凝集受容体Ｉ、ＣＤ３１、ＣＤ３６、ＭＡＲＫＳ、マルチメリン、インテグリンアルファｌＩｂ／ベータ３、骨髄細胞に発現するトリガ受容体（ＴＲＥＭ）様転写産物－１（ＴＬＴ－１）、インテグリン結合キナーゼ（ＩＬＫ）、ジキシン、コラーゲン、Ｐ－セレクチン、第ＸＩＩＩ因子、Ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド－１、インテグリンアルファ６ベータ１、トロンボスポンジン、フォン・ヴィレブランド因子、Ｇ６Ｂ、ＣＤ４２ｂ、シンタキシン結合タンパク質２、ホスファチジルエタノールアミン、フィブリノゲン／フィブリン、フィラミン、ストマチン、スフィンゴ脂質、ＣＤ３１、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４１、ＣＤ４２ｃ、ＣＤ４２、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ６１、ＣＤ６２Ｐ、ＣＤ６３、ＣＤ６９、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ１０７ｂ、ＣＤ１０９、ＣＤ１５４、ＰＥＣＡＭ－１、および／またはＥＲＰＳなどの血小板表面タンパク質を結合することができない、実施形態１～５６のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

５８．　当該延長部分が、糖タンパク質、ＧＰＩＩｂ／ＩＩＩａ、β２ＧＰ１、ＴＬＴ－１、セレクチン、凝固因子もしくは凝固因子複合体、および／またはセレクチンなどの膜関連ポリペプチドを結合することができない、実施形態１～５７のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

５９．　血液中の平均滞留時間終末相半減期が、当該延長部分を有さないＩＳＶＤポリペプチドと比較して、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも４８時間、少なくとも３、４、５、または７日間延長される、実施形態１～５８のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

６０．　当該第１および／または第２のＩＳＶＤが、V_HH断片である、実施形態１～５９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

６１．　当該第１および／または第２のＩＳＶＤが、Ｖ－ＮＡＲ断片である、実施形態１～５９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

６２．　当該ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、V_HHポリペプチド誘導体である、実施形態１～６０のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

６３．　血液凝固促進V_HHポリペプチド誘導体であって、

第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のV_HHと、

第Ｘ因子（配列番号２）に結合することができる第２のV_HHと、

当該第１のV_HHおよび当該第２のV_HHを連結するリンカー（L_{1-2}）と、

Ｃ末端延長部（Ｅ）と、

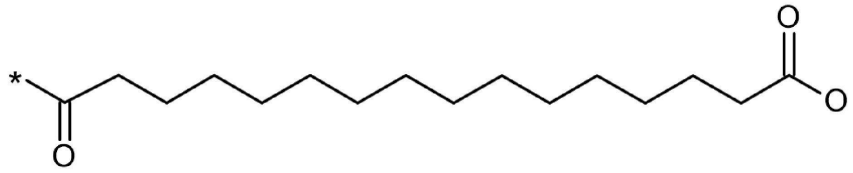
１つまたは２つの延長部分と、を含み、

以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、

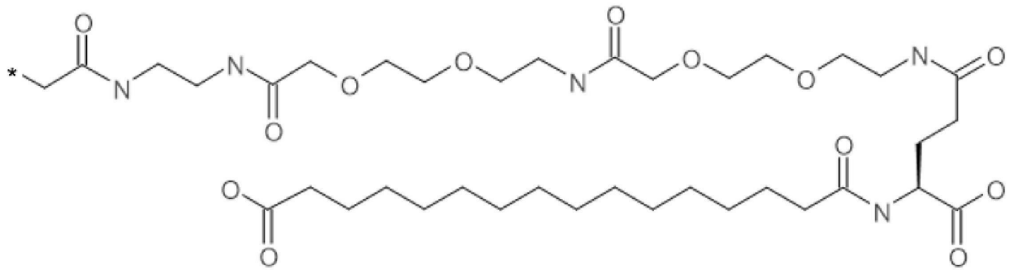
「第２のV_HH」－L_{1-2}－「第１のV_HH」－Ｅ

Ｉ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１７２）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１７３）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１７４）を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、
ＣＤＲ１：ＲＹＡＭＧ（配列番号１６８）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１６９）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１７０）を含むか、または
ＩＩ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１３２）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１３３）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１３４）を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、
ＣＤＲ１：ＲＬＡＭＧ（配列番号１２８）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２９）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１３０）を含むか、または
（Ｋａｂａｔ定義）を含む、血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。
６４．
Ｉ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－２．２０（配列番号１７１）の配列を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－１．２０（配列番号１６７）の配列を含み、
ＩＩ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－２．１８（配列番号１５５）の配列を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－１．１８（配列番号１５１）の配列を含み、
ＩＩＩ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－２．１５（配列番号１３１）の配列を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－１．１５（配列番号１２７）の配列を含み、
ＩＶ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－２．１３（配列番号１１５）の配列を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－１．１３（配列番号１１１）の配列を含み、
Ｖ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－２．１４（配列番号１２３）の配列を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－１．１４（配列番号１１９）の配列を含み、
ＶＩ）
当該第１のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－２．１２（配列番号１０７）の配列を含み、
当該第２のＶ$_{H}$Ｈが、Ｖ$_{H}$Ｈ－１．１２（配列番号１０３）の配列を含む、実施形態６３に記載の血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。
６５．　当該Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体が、二重特異性Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体である、実施形態１～６０および６２～６４のいずれか１つに記載の血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。
６６．　リンカーＬ$_{1-2}$が、アミノ酸残基ＧＱＡＰＧＱ（配列番号２０）を含む、実施形態６３～６５のいずれか１つに記載の血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。
６７．　延長部（Ｅ）が、アミノ酸残基ＧＱＡＣＰＣ（配列番号９）を含む、実施形態６３～６５のいずれか１つに記載の血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。
６８．　２つの延長部分が、それぞれ４位および６位（配列番号９）でＥに結合されている、実施形態６３～６７のいずれか１つに記載の血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。
６９．　当該２つの延長部分が、同一である、実施形態６３～６８のいずれか１つに記載の血液凝固促進Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体。

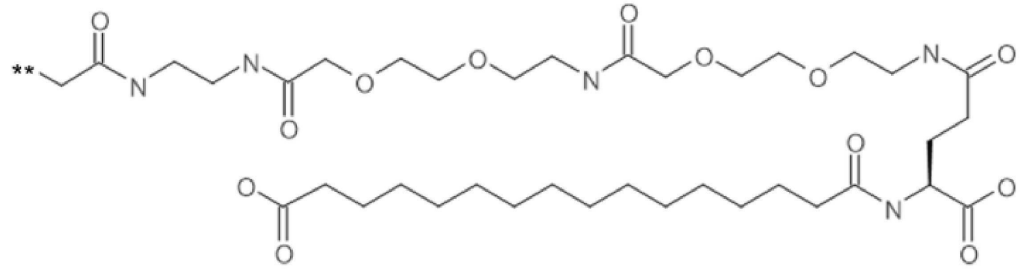
７０．　当該２つの延長部分が、以下の構造を含む、実施形態６３～６９のいずれか１つに記載の血液凝固促進V_HHポリペプチド誘導体。
【化１６】



７１．　第１および第２の延長部分を含み、
　前記第１の延長部分が、以下の構造を含み、
【化１７】



　当該第２の延長部分が、以下の構造を含み、
【化１８】



　「＊」（Ｒ１）が、第１の延長部分に対するV_HHポリペプチド誘導体上の結合点を表し、
　「＊＊」（Ｒ２）が、第２の延長部分に対するV_HHポリペプチド誘導体上の結合点を表し、
　「＊」が、配列番号６２９の２５７位のＣｙｓであり、
　「＊＊」が、配列番号６２９の２５９位のＣｙｓである、実施形態６３～７０のいずれか１つに記載の血液凝固促進V_HHポリペプチド誘導体。
７２．　実施形態１～７１のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体またはV_HHポリペプチド誘導体を含む、医薬組成物。
７３．　実施形態１～７１のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体またはV_HHポリペプチド誘導体を含む、経口投与のための医薬組成物。
７４．　ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、V_HHポリペプチド誘導体である、実施形態７２または７３に記載の医薬組成物。
７５．　ＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、Ｖ－ＮＡＲポリペプチド誘導体である、実施形態７２または７３に記載の医薬組成物。
７６．　当該組成物が、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩を含む、実施形態７２～７５のいずれか１つに記載の医薬組成物。
７７．　当該Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩が、Ｎ－

（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）である、実施形態７６に記載の医薬組成物。
７８．　ニコチンアミド（ＮＡＭ）をさらに含む、実施形態７６または７７に記載の医薬組成物。
７９．　当該組成物が、V_HHポリペプチド誘導体、Ｎ－（８－［２－ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）、ニコチンアミド（ＮＡＭ）、およびステアリン酸マグネシウムを含む、実施形態７４～７８のいずれか１つに記載の医薬組成物。
８０．　当該組成物が、約７％ｗ／ｗの$_V$ＨＨポリペプチド誘導体、約５５％ｗ／ｗのＮ－（８－［２－ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）、約３６％ｗ／ｗのニコチンアミド（ＮＡＭ）、および約０．５％ｗ／ｗのステアリン酸マグネシウムを含む、実施形態７４～７８のいずれか１つに記載の医薬組成物。
８１．　当該組成物が、液体組成物である、実施形態７３～８０のいずれか１つに記載の医薬組成物。
８２．　当該組成物が、固形組成物である、実施形態７３～８０のいずれか１つに記載の医薬組成物。
８３．　当該組成物が、錠剤、トローチ、またはカプセルである、実施形態８２に記載の医薬組成物。
８４．　治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、実施形態１～８３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または医薬組成物を投与することを含む、方法。
８５．　患者が、インヒビターが存在する、もしくは存在しない血友病Ａまたは後天性血友病Ａを患う患者である、実施形態８４に記載の治療方法。
８６．　治療が、予防処置である、実施形態８４または８５に記載の治療方法。
８７．　ＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または医薬組成物が、経口投与される、実施形態８４～８６のいずれか１つに記載の治療方法。
８８．　ＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または医薬組成物が、皮下注射によって投与される、実施形態８４～８６のいずれか１つに記載の治療方法。
８９．　医薬品において使用するための、実施形態１～８３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または医薬組成物。
９０．　インヒビターが存在する、もしくは存在しない血友病Ａなど、または後天性血友病Ａなどの血友病の治療に使用するための、実施形態１～８３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または組成物。
９１．　インヒビターが存在する、もしくは存在しない血友病Ａの治療に使用するための、実施形態１～８３のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または組成物。
９２．　治療が、予防処置である、実施形態８９～９２のいずれか１つに記載の使用のためのＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または組成物。
９３．　当該誘導体または組成物が、経口投与される、実施形態８９～９２のいずれか１つに記載の使用のためのＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または組成物。
９４．　当該誘導体または組成物が、皮下注射によって投与される、実施形態８９～９２のいずれか１つに記載の使用のためのＩＳＶＤポリペプチド誘導体、V_HHポリペプチド誘導体、または組成物。
９５．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体を産生する方法であって、
　第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、
　第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、

１つ以上の延長部分と、
任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（Ｌ$_{1-2}$）と、
任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含み、
ａ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体のアミノ酸残基をコードする核酸を、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点が低減されるように修飾する工程と、
ｂ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体をコードする核酸を発現するように宿主細胞を培養する工程と、
ｃ．宿主細胞からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を収集する工程と、
ｄ．標準クロマトグラフィーを使用して宿主細胞培養からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を精製する工程と、
ｅ．延長部分を、かかる部分が既に存在していない限り、ＩＳＶＤポリペプチドに結合する工程と、を含む、方法。
９６．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を産生するための方法であって、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結することができるリンカー（Ｌ$_{1-2}$）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含み、
ａ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体のアミノ酸残基をコードする核酸を、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点が６．５以下であるように修飾する工程と、
ｂ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体をコードする核酸を発現するように宿主細胞を培養する工程と、
ｃ．宿主細胞からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を収集する工程と、
ｄ．標準クロマトグラフィーを使用して宿主細胞培養からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を精製する工程と、
ｅ．延長部分を、かかる部分が既に存在していない限り、ＩＳＶＤポリペプチドに結合する工程と、を含む、方法。
９７．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の経口バイオアベイラビリティを増加させるための方法であって、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結することができるリンカー（Ｌ$_{1-2}$）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含み、
ａ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体のアミノ酸残基をコードする核酸を、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点が低減されるように修飾する工程と、
ｂ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体をコードする核酸を発現するように宿主細胞を培養する工程と、
ｃ．宿主細胞からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を収集する工程と、
ｄ．標準クロマトグラフィーを使用して宿主細胞培養からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を精製する工程と、
ｅ．延長部分を、かかる部分が既に存在していない限り、ＩＳＶＤポリペプチドに結合する工程と、を含む、方法。
９８．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチドまたは

ＩＳＶＤポリペプチド誘導体の経口バイオアベイラビリティを増加させるための方法であって、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結することができるリンカー（$Ｌ_{１－２}$）と、任意選択で、１つ以上の延長部分（Ｅ）と、を含み、

ａ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体のアミノ酸残基をコードする核酸を、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点が６．５以下であるように修飾する工程と、

ｂ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体をコードする核酸を発現するように宿主細胞を培養する工程と、

ｃ．宿主細胞からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を収集する工程と、

ｄ．標準クロマトグラフィーを使用して宿主細胞培養からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を精製する工程と、

ｅ．延長部分を、かかる部分が既に存在していない限り、ＩＳＶＤポリペプチドに結合する工程と、を含む、方法。

９９．　等電点が、少なくとも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、または４ｐＨ単位など、少なくとも０．５ｐＨ単位だけ低減される、実施形態９５～９８のいずれかに１つに記載の方法。

１００．　工程ｅ）が、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の等電点の増加につながらない、実施形態９５～９９のいずれか１つに記載の方法。

１０１．　等電点が、等電点電気泳動を使用して決定される、実施形態９５～１００のいずれか１つに記載の方法。

１０２．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、単一の核酸によってコードされる、実施形態９５～１０１のいずれか１つに記載の方法。

１０３．　ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、第１および第２のＩＳＶＤのコンジュゲートであり、当該第１および第２のＩＳＶＤが、別個の核酸によってコードされる、実施形態９５～１０１のいずれか１つに記載の方法。

１０４．　ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体が、$Ｖ_{Ｈ}$Ｈポリペプチドまたは$Ｖ_{Ｈ}$Ｈポリペプチド誘導体である、実施形態９５～１０３のいずれか１つに記載の方法。

１０５．　実施形態９５～１０３のいずれか１つに記載の方法を使用して産生される、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

１０６．　実施形態９５～１０３のいずれか１つに記載の方法を使用して得ることが可能である、ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

１０７．　実施形態９５～１０４のいずれか１つに記載の方法を使用して産生される、$Ｖ_{Ｈ}$Ｈポリペプチドまたは$Ｖ_{Ｈ}$Ｈポリペプチド誘導体。

１０８．　ＦＩＸ（配列番号１）またはその活性型（ＦＩＸａ）に結合することができる$Ｖ_{Ｈ}$Ｈ断片であって、

ａ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１７２によって特定され、

ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１７３によって特定され、

ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１７４によって特定されるか、または

ｂ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１５６によって特定され、

ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１５７によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１５８によって特定されるか、または
ｃ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１３２によって特定され、
ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１３３によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１３４によって特定されるか、または
ｄ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１１６によって特定され、
ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１１７によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１１８によって特定されるか、または
ｅ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１２４によって特定され、
ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１２５によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１２６によって特定されるか、または
ｆ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１０８によって特定され、
ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１０９によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１１０によって特定される（Ｋａｂａｔ定義）、V_HH断片。
１０９．　ＦＸ（配列番号２）に結合することができるV_HH断片であって、
ａ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１５２によって特定され、
ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１５３によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１５４によって特定されるか、または
ｂ．ＣＤＲ１配列が、任意選択で、１つもしくは２つのアミノ酸置換を含む配列番号１２８によって特定され、
ＣＤＲ２配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１２９によって特定され、
ＣＤＲ３配列が、任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つのアミノ酸置換を含む配列番号１３０によって特定される、V_HH断片。
１１０．　当該置換が、保存的置換である、実施形態１０８または１０９に記載のV_HH断片。
１１１．　当該V_HH断片が、ＦＩＸ（配列番号１）またはその活性型（ＦＩＸａ）に結合することができ、かつＦＸ（配列番号２）またはその活性型（ＦＸａ）に結合することができる、V_HHポリペプチドまたはV_HHポリペプチド誘導体の製造において使用するための中間体である、実施形態１０８～１１０のいずれか１つに記載のV_HH断片。
１１２．　当該V_HHポリペプチドが、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体の製造において使用するための中間体である、実施形態１０８～１１０のいずれか１つに記載のV_HHポリペプチド。

１１３．　活性が、国際公開第２０１９／０９６８７４号に記載されるような抗ＦＸ　ＩＳＶＤ化合物のうちのいずれかと比較して、ＦＸをＦＩＸａによるタンパク質分解がより起こり易くするという点で改善される、実施形態１０９または１１０に記載のＩＳＶＤまたはＶＨＨ。
１１４．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体であって、
　第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、
　第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、
　少なくとも１つの延長部分と、
　任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、
　任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含み、
　当該ＩＳＶＤポリペプチドが、配列番号６１５～６９１、７３４、または７３５から成る群から選択される、血液凝固促進ＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１１５．　配列番号２７～６１４のいずれか１つ記載の配列を含む、ＶＨＨ断片。
１１６．　配列番号６１５～６９１または７３４～７３５のうちのいずれかの配列を含む、ＶＨＨポリペプチド誘導体。
１１７．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチド誘導体であって、
　第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、
　第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、
　少なくとも１つの延長部分と、
　任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結するリンカー（L_{1-2}）と、
　任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含む、血液凝固促進ＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１１８．　以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、
　　ＩＳＶＤ２－L_{1-2}－ＩＳＶＤ１－Ｅ
　式中、１つ以上の延長部分が、１つ以上の表面曝露残基に結合している、実施形態１１７に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１１９．　以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、
　　ＩＳＶＤ２－L_{1-2}－ＩＳＶＤ１－Ｅ
　式中、２つの延長部分が、Ｅ上の１つ以上の表面曝露残基に結合しており、
　誘導体の分子量が、２０～３５ｋＤａの範囲内である、実施形態１１８または１１９に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１２０．　当該第１のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０（連続ナンバリング）を含む、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型上のエピトープに結合することができ、
　第２のＩＳＶＤが、アミノ酸残基Ｎ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、およびＬ１７８（連続ナンバリング）を含む、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型上のエピトープに結合することができる、実施形態１１７～１１９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
１２１．　当該第１のＩＳＶＤが、
　１）
　ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１７２）、
　ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１７３）、

ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１７４）、または
２）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１５６）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１５７）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１５８）、または
３）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１３２）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１３３）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１３４）、または
４）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１１６）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１１７）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１１８）、または
５）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１２４）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２５）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１２６）、または
６）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＩＹＴＭＳ（配列番号１０８）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１０９）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１１０）を含み、
当該第２のＩＳＶＤが、
（Ａ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＹＡＭＧ（配列番号１６８）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１６９）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１７０）、または
（Ｂ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＹＡＭＧ（配列番号１５２）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１５３）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１５４）、または
（Ｃ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＬＡＭＧ（配列番号１２８）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２９）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤ

Ｙ（配列番号１３０）、または
（Ｄ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＬＡＭＧ（配列番号１１２）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１１３）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１１４）、または
（Ｅ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＬＡＭＧ（配列番号１２０）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２１）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１２２）、または
（Ｆ）
ＣＤＲ１：任意選択で、１つもしくは２つの置換を含むＲＬＡＭＧ（配列番号１０４）、
ＣＤＲ２：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１０５）、
ＣＤＲ３：任意選択で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を含むＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１０６）（Ｋａｂａｔ定義）を含む、実施形態１１７～１１９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

１２２．　当該置換が、保存的置換である、実施形態１２１に記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。

１２３．　当該第１のＩＳＶＤが、以下の配列を含み、
V_HH－２．２０（配列番号１７１）、
V_HH－２．１８（配列番号１５５）、
V_HH－２．１５（配列番号１３１）、
V_HH－２．１３（配列番号１１５）、
V_HH－２．１４（配列番号１２３）、または
V_HH－２．１２（配列番号１０７）
当該第２のＩＳＶＤが、以下の配列を含む、実施形態１１７～１２２のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体。
V_HH－１．２０（配列番号１６７）、
V_HH－１．１８（配列番号１５１）、
V_HH－１．１５（配列番号１２７）、
V_HH－１．１３（配列番号１１１）、
V_HH－１．１４（配列番号１１９）、または
V_HH－１．１２（配列番号１０３）

１２４．　血液凝固促進V_HHポリペプチド誘導体であって、
第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のV_HHと、
第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のV_HHと、
当該第１のV_HHおよび当該第２のV_HHを連結するリンカー（L_{1-2}）と、
Ｃ末端延長部（Ｅ）と、
１つまたは２つの延長部分と、を含み、
以下の式（Ｎ末端からＣ末端）を有し、
「第２のV_HH」－L_{1-2}－「第１のV_HH」－Ｅ
Ｉ）
当該第１のV_HHが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１７２）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１７３）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１７４）を含み、

当該第２のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＲＹＡＭＧ（配列番号１６８）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１６９）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１７０）を含むか、または
ＩＩ）
当該第１のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１５６）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１５７）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１５８）を含み、
当該第２のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＲＹＡＭＧ（配列番号１５２）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１５３）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１５４）を含むか、または
ＩＩＩ）
当該第１のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１３２）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１３３）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１３４）を含み、
当該第２のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＲＬＡＭＧ（配列番号１２８）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２９）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１３０）を含むか、または
ＩＶ）
当該第１のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１１６）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１１７）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１１８）を含み、
当該第２のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＲＬＡＭＧ（配列番号１１２）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１１３）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１１４）を含むか、または
Ｖ）
当該第１のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１２４）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２５）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１２６）を含み、
当該第２のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＲＬＡＭＧ（配列番号１２０）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１２１）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１２２）を含むか、または
ＶＩ）
当該第１のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＩＹＴＭＳ（配列番号１０８）、
ＣＤＲ２：ＧＬＲＷＴＤＳＳＴＥＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１０９）、
ＣＤＲ３：ＤＲＳＦＬＦＡＱＡＬＧＡＴＫＮＹＥＹ（配列番号１１０）を含み、
当該第２のＶＨＨが、
ＣＤＲ１：ＲＬＡＭＧ（配列番号１０４）、
ＣＤＲ２：ＡＩＳＲＲＧＧＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号１０５）、
ＣＤＲ３：ＤＤＳＶＧＤＧＹＬＤＹ（配列番号１０６）（Ｋａｂａｔ定義）を含む、血液凝固促進ＶＨＨポリペプチド誘導体。

１２５．　実施形態１１７～１２４のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体またはＶ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体を含む、医薬組成物。
１２６．　前記組成物が、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩を含む、実施形態１２５に記載の医薬組成物。
１２７．　当該Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸の塩が、Ｎ－（８－（２－ヒドロキシベンゾイル）アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）である、実施形態１２６に記載の医薬組成物。
１２８．　ニコチンアミド（ＮＡＭ）をさらに含む、実施形態１２５～１２７のいずれか１つに記載の医薬組成物。
１２９．　当該組成物が、固形組成物である、実施形態１２５～１２８のいずれか１つに記載の医薬組成物。
１３０．　インヒビターが存在する、もしくは存在しない血友病Ａなど、または後天性血友病Ａなどの血友病の治療に使用するための、実施形態１１７～１２９のいずれか１つに記載のＩＳＶＤポリペプチド誘導体、Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体、または組成物。
１３１．　当該ポリペプチド誘導体または組成物が、経口投与される、実施形態１～１３０のいずれか１つに記載の使用のためのＩＳＶＤポリペプチド誘導体、Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体、または組成物。
１３２．　血液凝固促進免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）ポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体の経口バイオアベイラビリティを増加させるための方法であって、第ＩＸ因子（配列番号１）またはその活性型に結合することができる第１のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ１）と、第Ｘ因子（配列番号２）またはその活性型に結合することができる第２のＩＳＶＤ（ＩＳＶＤ２）と、延長部分と、任意選択で、ＩＳＶＤ１およびＩＳＶＤ２を連結することができるリンカー（Ｌ$_{1-2}$）と、任意選択で、１つ以上の延長部（Ｅ）と、を含み、
　ａ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体のアミノ酸残基をコードする核酸を、その等電点が低減されるように修飾する工程と、
　ｂ．ＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体をコードする核酸を発現するように宿主細胞を培養する工程と、
　ｃ．宿主細胞からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を収集する工程と、
　ｄ．標準クロマトグラフィーを使用して宿主細胞培養からＩＳＶＤポリペプチドまたはＩＳＶＤポリペプチド誘導体を精製する工程と、
　ｅ．延長部分を、かかる部分が既に存在していない限り、ＩＳＶＤポリペプチドに結合する工程と、を含む、方法。
【０２８３】
　好ましい実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、Ｎ末端からＣ末端方向（Ｎ末端からＣ末端）で抗ＦＩＸ（ａ）　Ｖ$_{H}$Ｈ　ＩＳＶＤに接続された抗ＦＸ　ＩＳＶＤを含む。
【０２８４】
　かかる好ましい一実施形態では、ＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、Ｎ末端からＣ末端方向（Ｎ末端からＣ末端）で抗ＦＩＸ（ａ）Ｖ$_{H}$Ｈ断片に接続された抗ＦＸ　Ｖ$_{H}$Ｈ断片を含み、例えば、図２ａ、２ｂ、および３ａ～ｆを参照されたい。
【０２８５】
　好ましい実施形態では、ＦＩＸ（ａ）に結合することができるＩＳＶＤまたはＶ$_{H}$Ｈ断片は、活性化ＦＩＸ（ＦＩＸａ）に選択的に結合する。
【０２８６】
　好ましい実施形態では、ＦＸに結合することができるＩＳＶＤまたはＶ$_{H}$Ｈ断片は、ＦＸ酵素前駆体、すなわち、活性化されていないＦＸに選択的に結合する。
【０２８７】
　一実施形態では、本発明のＩＳＶＤポリペプチド（誘導体）またはＶ$_{H}$Ｈポリペプチド（誘導体）は、ＦＸに対するＦＩＸａの酵素活性を刺激することができる。かかる一実施

形態では、当該ＩＳＶＤポリペプチド（誘導体）またはV_HHポリペプチド（誘導体）の刺激特性は、ＦＩＸ（ａ）を結合することができるＩＳＶＤまたはV_HHに由来する。

【０２８８】

図５ａおよび５ｂは、それぞれ好ましい抗ＦＩＸ（ａ）および抗ＦＸ　ＩＳＶＤ（V_HH断片）配列の配列アライメントを示し、ＣＤＲ配列は、太字および下線で強調表示されている。

【０２８９】

本発明は、本明細書に開示されるＩＳＶＤまたはV_HH断片の置換バリアントを包含し、それらは、本明細書に開示される個々の配列に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換および／または欠失および／または挿入を含み得る。いくつかの実施形態では、当該置換および／または欠失および／または挿入は、本明細書に開示されるＣＤＲ配列のうちの１つ以上にある。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ配列のうちの１つ以上を、アミノ酸置換に供する。いくつかの実施形態では、個々のＣＤＲ配列は、それぞれ０、１、２、または３個のアミノ酸置換を含み得る。例えば、配列番号５５９によるV_HH断片において、ＣＤＲ１は、置換を含まない場合があり、ＣＤＲ２は、３個の置換を含んでもよく、ＣＤＲ３は、１個の置換を含んでもよい。「置換」バリアントは、同数のアミノ酸を有する１つ以上のアミノ酸の置換を含むことが好ましい。いくつかの実施形態では、置換は、保存的置換である。

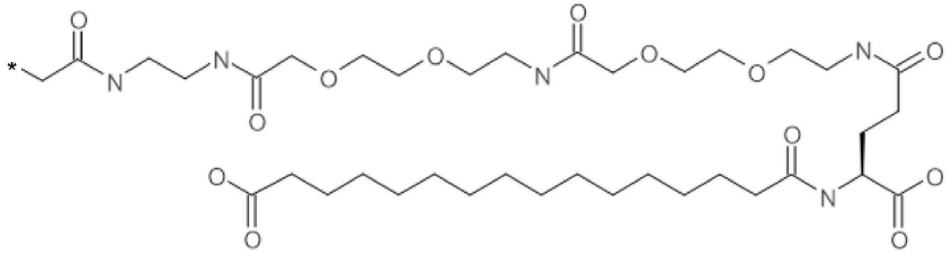
【０２９０】

一実施形態では、V_HHポリペプチド誘導体などのＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、ホスファチジルセリンおよび／またはホスファチジルエタノールアミンなど、アミノリン脂質などの形質膜の構成要素を結合することができない、少なくとも１つの延長部分を含む。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、延長部分は、以下の構造を含み、

【化１９】



「＊」は、V_HHポリペプチドへの結合点を表す。

【０２９２】

一実施形態では、V_HHポリペプチド誘導体などのＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、ＧＰｌｂ－ｌＸ、コラーゲンシャペロンＨＳＰ４７、エフリンＢ１、チオールイソメラーゼタンパク質ＥＲＰ５、５５の造血前駆キナーゼ１－相互作用タンパク質（ＨＩＰ－５５）、糖タンパク質Ｖｌ、血小板糖タンパク質１ｂ、血小板由来増殖因子受容体、血小板内皮凝集受容体Ｉ、ＣＤ３１、ＣＤ３６、ＭＡＲＫＳ、マルチメリン、インテグリンアルファｌＩｂ／ベータ３、骨髄細胞に発現するトリガ受容体（ＴＲＥＭ）様転写産物－１（ＴＬＴ－１）、インテグリン結合キナーゼ（ＩＬＫ）、ジキシン、コラーゲン、Ｐ－セレクチン、第ＸＩＩＩ因子、Ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド－１、インテグリンアルファ６ベータ１、トロンボスポンジン、フォン・ヴィレブランド因子、Ｇ６Ｂ、ＣＤ４２ｂ、シンタキシン結合タンパク質２、ホスファチジルエタノールアミン、フィブリノゲン／フィブリン、フィラミン、ストマチン、スフィンゴ脂質、ＣＤ３１、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４１、ＣＤ４２ｃ、ＣＤ４２、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ６１、ＣＤ６２Ｐ、ＣＤ６３、ＣＤ６９、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ１０７ｂ、ＣＤ１０９、ＣＤ１５４、ＰＥＣＡＭ－１、および／またはＥＲＰＳなどの血小板表面タンパク質を結合することができない、延長部分を含

む。
【０２９３】
一実施形態では、V_HＨポリペプチド誘導体などのＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、糖タンパク質、ＧＰＩＩｂ／ＩＩＩａ、β２ＧＰ１、ＴＬＴ－１、セレクチン、凝固因子もしくは凝固因子複合体、および／またはセレクチンなどの膜関連ポリペプチドを結合することができない、延長部分を含む。
【０２９４】
一実施形態では、V_HＨポリペプチド誘導体などのＩＳＶＤポリペプチド誘導体は、血友病Ａの治療において臨床的に関連する用量で当該抗体が使用されるとき、血友病Ａを患う患者に投与された組み換えＦＶＩＩＩなどのＦＶＩＩＩの効果に干渉しない。
【０２９５】
本発明のある特定の特徴が本明細書に例証および記載されているが、ここで、多くの修正、代用、変更、および均等物が当業者に想到されるであろう。したがって、添付の特許請求の範囲が、本発明の真の趣旨の範囲内にあるそのような全ての修正および変更を網羅することを意図していることが理解されるべきである。
【実施例】
【０２９６】
略語リスト

【表４】

ＡＩＥＸ：	陰イオン交換
ＣＣ：	ピアソン相関係数
ＣＤＲ：	相補性決定領域
ＣＨＯ：	チャイニーズハムスター卵巣
ＣＭＫ：	クロロメチルケトン
EC_{50}：	５０％有効濃度
ＥＤＴＡ：	エチレンジアミン四酢酸
ＥＬＩＳＡ：	酵素結合免疫吸着測定法
ＦＡＣＳ：	蛍光活性化セルソーター
ＦＩＸ：	凝固第ＩＸ因子
ＦＩＸａ：	凝固第ＩＸａ因子
ＦＸ：	凝固第Ｘ因子
ＦＸａ：	凝固第Ｘａ因子
ＦＲ：	フレームワーク地域
ＧＳ：	グルタミンシンテターゼ
ＨＡ：	血友病Ａ
ＨＢ：	血友病Ｂ
ＩＳＶＤ：	免疫グロブリン単一可変ドメイン
ＩＶ：	静脈内
ＫＯ：	ノックアウト
ＭＳＸ：	Ｌ－メチオニンスルホキシミン
ＭＲＴＨＬ：	平均滞留時間終末相半減期
ＮＡＭ：	ニコチンアミド
ＯＥＧ：	８－アミノ－３，６－ジオキサ－オクタン酸
ＰＢＭＣ：	末梢血単核細胞
ＰＣＲ：	ポリメラーゼ連鎖反応
ｐＩ：	等電点
ＰＫ：	薬物動態学的
ＰＯ：	経口
ＲＯＵＴ：	ロバスト回帰および外れ値除去（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ関数）
ＲＭＳ：	二乗平均平方根
ＲＴ－ＰＣＲ：	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
ＲＰ－ＵＰＬＣ：	逆相超高速液体クロマトグラフィー
ＳＩＡ：	配列同一類似体
ＳＣ：	皮下
ＳＮＡＣ：	Ｎ－（８－［２－ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリル酸ナトリウム
ＳＰＲ：	表面プラズモン共鳴
ＴＧＴ：	トロンビン生成試験
ＴＬＳ：	並進－回転－振動－運動
ＴＶＴ：	尾静脈切断
ＵＰＬＣ：	超高速液体クロマトグラフィー

【０２９７】

実施例１：一般的な方法ならびにV_HH断片および他の組み換えタンパク質の調製

一般分子生物学

一般的な分子生物学技法については、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（4th　Ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１４，Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ　ａｎｄ　Ｍａｎｉａｔｉｓ　ｅｄｓ．，ＣＳＨＬ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ　ＵＳＡ）を参照されたい。

【０２９８】

免疫化およびライブラリ

Ｅｔｈｉｃａｌ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆ ｔｈｅ Ａｂｌｙｎｘ Ｃａｍｅｌｉｄ Ｆａｃｉｌｉｔｙ（ＬＡ１４００５７５）の承認後、２頭のラマおよび２頭のアルパカを、それぞれヒトＦＩＸおよびＦＸ（Ｈａｅｍｏｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＶＴ ＵＳＡ）で免疫化した。

【０２９９】

重鎖のみの抗体断片レパートリーのクローニングおよびファージ免疫ライブラリの調製を以下のように実施した。

【０３００】

最終免疫原注射後、血液試料を収集した。これらの血液試料から、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、製造業者（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，ＵＳ）の指示に従ってＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅを使用して調製した。ＰＢＭＣから全ＲＮＡを抽出し、ＲＴ－ＰＣＲの出発材料として使用して、本質的に国際公開第２００５／０４４８５８号に説明されるように、V_HH断片コードＤＮＡセグメントを増幅した。要するに、V_HH断片コードＤＮＡ断片を、ファージミドベクターｐＡＸ２１２にクローニングし、His_6およびＦＬＡＧ$_3$タグで融合されたV_HH断片を表示するファージ粒子の生成を可能にした。その後、ファージを標準プロトコルに従って調製し、保管した。

【０３０１】

合成ライブラリ

合成ライブラリは、免疫化から得られ、かつクローニングされた合成V_HH遺伝子断片をファージミドベクターｐＡＸ１９０にクローニングすることによって生成され、これは上述のｐＡＸ２１２と同一の特徴を有するが、複数のクローニング部位において差異を有した。

【０３０２】

ＦＸまたはＦＩＸに結合するV_HH断片のライブラリスクリーニング

V_HH断片ファージディスプレイの選択は、生成された免疫および合成ライブラリで実施した。ライブラリは、ＦＩＸおよびＦＸへのバインダーを得るためのクローンスクリーニングを富化する固定化ヒトＦＩＸおよびＦＸ（Ｈａｅｍｏｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＶＴ ＵＳＡ）ならびにカニクイザルＦＩＸおよびＦＸ（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ自社で生成）の異なる濃度に対して、１～４個の連続した富化ラウンドを受けた。

【０３０３】

ＦＩＸおよびＦＸａに対しＦＩＸａおよびＦＸに選択的なV_HH断片を特異的に富化するために、ある特定の実験では、固定化ＦＩＸａおよびＦＸを用いたライブラリのインキュベーション中の競合のために過剰な可溶性ＦＩＸおよびＦＸａを使用した。

【０３０４】

他の構造的に関連する凝固因子に対しＦＩＸおよびＦＸに選択的なV_HH断片を特異的に富化するために、ある特定の実験では、固定化ＦＩＸおよびＦＸを用いたライブラリのインキュベーション中の競合のために過剰な可溶性ＦＸおよびＦＩＸをそれぞれ使用した。

【０３０５】

選択出力からの約４５００個の個別のクローンを、ヒトおよびカニクイザルＦＸ、ＦＸａ、ＦＩＸ、およびＦＩＸａに対して、ＥＬＩＳＡで結合するためにスクリーニングした（V_HH断片を発現するＥ．ｃｏｌｉ細胞からのペリプラズム抽出物を使用した）。ヒトＦＸおよびＦＩＸａ／ＦＩＸへの特異的結合を示した約１５００個のクローンを特定し、その大部分はカニクイザルＦＸおよびＦＩＸへの交差結合を示した。一部のクローンは、ＦＸａに対してＦＸへの、およびＦＩＸに対してＦＩＸａへの選択的結合を示した。ＥＬＩＳＡ陽性クローンの配列解析は、ＦＩＸａ／ＦＩＸまたはＦＸ／ＦＸａに結合するV_HH断片の約７００個のユニーク配列を特定した。化合物をさらに最適化するために、延長因子の付加、リンカー、および延長部の組み合わせと組み合わせた、激烈なV_HH ＣＤＲおよびＦＲの変異誘発を、トロンビン生成アッセイを使用した変異スクリーニングを介

して、止血効力の増強に焦点を当てて実施し、親和性が変化した化合物のスクリーニングを介して標的介在性の薬剤消失を回避し、ＭＨＣ関連ペプチドプロテオミクスアッセイを使用したリスク部位のスクリーニングを介して免疫原性の低減し、表面曝露残基の置換を低下させるｐＩを介したインビボでの経口バイオアベイラビリティを増強する。

【０３０６】

ＦＸまたはＦＩＸに結合するV_HH断片の発現構築物生成

ファージディスプレイ選択出力からのV_HH断片の配列解析を、一般的に公知の手順に従って行った（Ｐａｒｄｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ　９：６７４）。

【０３０７】

各々が固有の制限部位を担持するフォワードＦＲ１およびリバースＦＲ４プライマーの特定の組み合わせを有するＰＣＲによって得られた、V_HH断片含有ＤＮＡ断片を、適切な制限酵素で消化し、Ｅ．ｃｏｌｉまたはＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓ発現のためのHis_6－および／または$FLAG_3$タグ付きフォーマットとして、V_HHポリペプチド発現ベクターの一致するクローニングカセット内にライゲーションした。次いで、ライゲーション混合物を、エレクトロコンピテントＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＴＧ１（６０５０２、Ｌｕｃｉｇｅｎ、Ｍｉｄｄｌｅｔｏｎ，ＷＩ）またはＴＯＰ１０（Ｃ４０４０５２、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）に形質転換し、それらは次いで、適切な抗生物質選択圧（カナマイシンまたはゼオシン）下で増殖させた。耐性クローンを、プラスミドＤＮＡのサンガー配列決定（ＬＧＣ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）により検証した。

【０３０８】

Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＦＸまたはＦＩＸに結合するV_HH断片の一般的な発現

V_HH断片を、ｌａｃプロモータを含有するプラスミド発現ベクターからのＥ．ｃｏｌｉ　ＴＧ１、カナマイシンの耐性遺伝子、Ｅ．ｃｏｌｉ複製元、およびＯｍｐＡシグナルペプチドのコード配列によって先行されるV_HH断片クローニング部位において発現させた。V_HHポリペプチドコード配列とインフレームで、ベクターはＣ末端$FLAG_3$およびHis_6タグをコードする。シグナルペプチドは、発現されたV_HH断片を細菌宿主のペリプラズム区画に導く。

【０３０９】

目的のV_HH断片構築物を含有するＥ．ｃｏｌｉ　ＴＧ－１細胞を、３７℃で２時間、その後、３０℃で２９時間、「５０５２」自動誘発培地（０．５％グリセロール、０．０５％グルコース、０．２％ラクトース＋３ｍＭの$MgSO_4$）を含有するバッフル付き振盪装置フラスコ中で増殖させた。一晩凍結させたＥ．ｃｏｌｉ発現培養物からの細胞ペレットを、次いでＰＢＳ（元の培養物の体積の１／１２．５　）中に溶解し、穏やかに撹拌しながら４℃で１時間インキュベーションした。最後に、細胞をもう一度ペレット化し、ペリプラズム空間内に分泌されたタンパク質を含有する上清を保管した。

【０３１０】

Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓにおけるV_HH断片の一般的な発現

目的のV_HH断片構築物を含有するＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓ細胞を、ＢＧＣＭ培地中で２日間（３０℃で、２００ｒｐｍ）増殖させた。３日目に、培地をＢＭＣＭに切り替え、構築物をさらに増殖させて（３０℃、２００ｒｐｍ）、８時間後に０．５％ｖ／ｖメタノールを用いて誘導した。翌日、構築物を、０．５％ｖ／ｖメタノールを用いて、午前中、正午、および夕方に誘導した。５日目に、細胞を遠心分離し、上清（分泌されたV_HH断片を含有する）を収集した。

【０３１１】

ＨＥＫ細胞において、ＦＸまたはＦＩＸおよび他の組み換え型タンパク質に結合するV_HHおよび抗体の一般的な発現

ＨＥＫ２９３細胞における一過性発現のための発現プラスミドを、Ｔｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓまたは Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃのいずれかか

ら購入した。Ｔｗｉｓｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓからのプラスミドは、Ｄｕｒｏｃｈｅｒ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．，（２００２）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ，３０：Ｅ９に記載のｐＴＴベクターに基づくが、一方で、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃからのプラスミドは、ｐｃＤＮＡ３４－Ｔｏｐｏベクター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に基づいていた。$Ｈｉｓ_{6}$タグ付きまたは非タグ付き$Ｖ_{Ｈ}$Ｈポリペプチド化合物を、$Ｖ_{Ｈ}$Ｈポリペプチド化合物を一過性に発現するために、ＨＥＫ２９３懸濁細胞にトランスフェクトした。抗ＧＬＡ　ＦＩＸ抗体および抗ＧＬＡ　ＦＸ抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ社内生成）、エミシズマブ（Ｈｏｆｆｍａｎｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ　Ｌｔｄ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）配列同一類似体（ＳＩＡ）、およびＭｉｍ８（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）をコードする配列を担持する等価発現構築物も、以下に記載される方法を使用してＨＥＫ２９３で発現された。

【０３１２】

ＨＥＫ２９３懸濁細胞の一過性トランスフェクション（Ｅｘｐｉ２９３発現系、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ａ１４６３５）は、製造業者の指示に従って本質的に行った。ＨＥＫ２９３細胞は典型的には、１％のＰ／Ｓ（ＧＩＢＣＯ、カタログ番号１５１４０－１２２）を補充したＥｘｐｉ２９３発現培地（（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号Ａ１４３５１－０１）で、３～４日毎に継代培養した。ＨＥＫ２９３細胞を、Ｅｘｐｉｆｅｃｔａｍｉｎｅを使用して２．５～３ｍｉｌｌ／ｍＬの細胞密度で導入した。ＨＥＫ２９３細胞の各１リットルに対して、合計１ｍｇのプラスミドＤＮＡを、５０ｍＬのＯｐｔｉｍｅｍ（ＧＩＢＣＯ、カタログ番号５１９８５－０２６、希釈物Ａ）へと希釈することによって、および２．７ｍＬのＥｘｐｉｆｅｃｔａｍｉｎｅを５０ｍＬのＯｐｔｉｍｅｍ（希釈物Ｂ）へと希釈することによって、トランスフェクションを実施した。共トランスフェクション（すなわち、抗体）については、プラスミドを１：１の比率で使用した。希釈ＡおよびＢを混合し、室温で１０～２０分間インキュベートした。この後、トランスフェクション混合物をＨＥＫ２９３細胞に加え、細胞を軌道回転（８５～１４０ｒｐｍ）を備えた加湿インキュベーター中で、３７℃でインキュベートした。導入から１日後、導入された細胞に、５ｍｌのＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ２９３トランスフェクション促進剤１および５０ｍｌのＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ２９３トランスフェクション促進剤２を補充した。細胞培養上清は、遠心分離によって導入から４～５日後に典型的に採取し、その後濾過した。

【０３１３】

ＣＨＯ細胞におけるＦＸおよびＦＩＸ（ａ）に結合する$Ｖ_{Ｈ}$Ｈ断片および抗体の一般的な発現

抗ＦＩＸおよび抗ＦＸ　$Ｖ_{Ｈ}$Ｈ化合物ならびに抗体は、グルタミン合成酵素（ＧＳ）選択を使用して、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生された。ＣＨＯ細胞を、エレクトロポレーションを使用してＧＳ発現プラスミドでトランスフェクトし、その後、ＣＤ－ＣＨＯ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１０７４３０２９）中のＭＳＸサプリメントとともに、グルタミン除去を使用して選択に供した。安定したＣＨＯ細胞プールは、典型的には、３週間の培養後に得られ、プールは、その後、３８４ウェルプレートに単一細胞クローニングを行った。３８４ウェルプレートで生じるＣＨＯクローンは、典型的には、９６ウェルプレートに増殖され、生産性についてスクリーニングした。予め定義された専有の細胞培養培地（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ　Ａ／Ｓ）を使用して、選択された産生クローンを、１－Ｌから１５－Ｌスケールで、バイオリアクター中での培養のためにスケールアップした。培養中、細胞生存率は高く維持され、その後、細胞培養の採取まで段階的減少があった。ここで、細胞上清を、培養スケールに応じて、ＭＤ０ＨＣ２３ＣＬ３およびＭＸ０ＨＣ０１ＦＳ１フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用した遠心分離および／またはデプスフィルター濾過により除去した後、クロマトグラフィーベースのタンパク質精製を進めた。

【０３１４】

ＦＸまたはＦＩＸに結合する$Ｖ_{Ｈ}$Ｈ断片の一般的な精製および特徴付け

Ｈｉｓ６タグ付きまたは非タグ付きＶ$_{H}$Ｈ化合物を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕｒｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ－Ａ樹脂（Ｃｙｔｉｖａ）または固定化金属親和性クロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）により、イミダゾール（後者の場合）または酸性溶出（前者の場合）を有するＮｉ－Ｅｘｃｅｌ（Ｃｙｔｉｖａ）樹脂のいずれかで精製し、続いて、脱塩工程（Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５樹脂を用いたＰＤカラム、Ｃｙｔｉｖａ）を行い、必要な場合、ＰＢＳまたはＨＢＳ中でゲル濾過クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム、Ｃｙｔｉｖａ）を行った。非Ｈｉｓ６タグ付きＶ$_{H}$Ｈ化合物、ならびにそれぞれＦＩＸおよびＦＸのＧＬＡドメイン（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ社内生成）　を標的とする抗体、ならびにエミシズマブＳＩＡ（Ｈｏｆｆｍａｎｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ　Ｌｔｄ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を、酸性溶出を伴うＰｒｏｔｅｉｎ－Ａ樹脂ＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕｒｅ（Ｃｙｔｉｖａ）またはマルチモーダル樹脂（Ｃｙｔｉｖａ社）によって精製し、続いて、脱塩工程（例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５樹脂を含むＰＤカラム、Ｃｙｔｉｖａ）を行い、必要な場合、ＰＢＳまたはＨＢＳ中でゲル濾過クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム、Ｃｙｔｉｖａ）を行った。タンパク質の完全性を、ＢＩＯＳＥＰ（分離生体分子のためのカラム）－ＳＥＣ－５３０００　３００×７．８mmカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ、カタログ番号ＯＯＨ－２１４６－Ｋ０）、ならびに２００mMのリン酸ＮａｐＨ６．９、３００mMのＮａＣｌ、および１０　％のイソプロパノールで構成されるランニング緩衝液を用いた、Ａｇｉｌｅｎｔ　ＬＣ　１１００／１２００システム上のサイズ排除高速液体クロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）法を使用して分析した。精製されたＶ$_{H}$Ｈポリペプチドバッチの分子質量は、段階溶出のために、ＭＱ－Ｈ２Ｏ／０．１％のギ酸で構成されたＡ緩衝液、およびアセトニトリル／０．１％のギ酸で構成されたＢ緩衝液中で０．４ｍｌ／分で実行されるＭａｓｓＰＲＥＰ　Ｄｅｓａｌｔ（Ｗａｔｅｒｓ）カラムを有する６２８０Ａｇｉｌｅｎｔシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上のエレクトロスプレーイオン化と飛行時間型質量分析（ＥＳＩ－ＴＯＦ－ＭＳ）を使用して分析した。最終的なタンパク質濃度を測定するために、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、理論的に計算された吸光係数を用いて使用した。

【０３１５】

実施例２：Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチドシステイン残基への延長部分のコンジュゲーション

薬物動態特性を改善するためにＶ$_{H}$Ｈポリペプチドを延長するために、Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド化合物を、以下にさらに説明されるように、様々な骨格位置、例えば、１つ以上の脂肪酸延長部分とのコンジュゲーションに使用される１つまたは２つの導入されたＣｙｓ残基を有するＮ末端またはＣ末端延長部にシステイン（Ｃｙｓ）置換基を含むように操作した。

【０３１６】

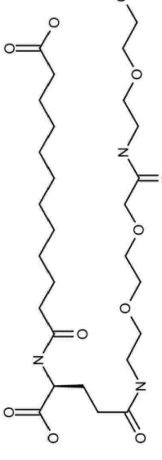
延長部分をＶ$_{H}$Ｈポリペプチド化合物に結合するために、修飾された延長部分の形態の中間体試薬を使用した。

【０３１７】

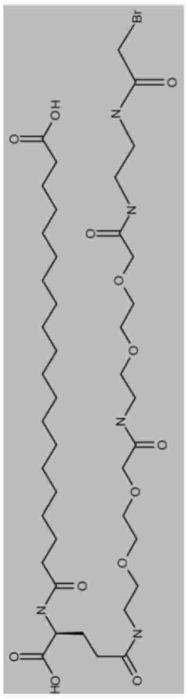
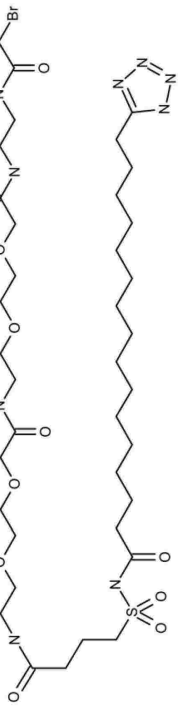
延長部分を含む中間体試薬を、国際公開第２０１６／１０２５６２号に記載されるように調製し、かかる中間体試薬の非限定的な例を以下の表３に示す。

【表５－１】

表3：延長部分（リンカー（L_P）を含む）を含む中間体試薬の例

ID	中間体試薬構造およびIUPAC名（短縮名）	V_HHポリペプチド誘導体ID
C1	 11-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{[2-(2-ブロモアセチル-アミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ウンデカン酸（C12二酸リンカー試薬）	化合物番号65
C2	 15-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{[2-(2-ブロモアセチル-アミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ペンタデカン酸（C16二酸リンカー試薬）	化合物番号6、番号7、番号8、番号9、番号10、番号11、番号12、番号13、番号14、番号15、番号16、番号17、番号18、番号19、番号20、番号21、番号22
C3	 17-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{[2-(2-ブロモアセチル-アミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]プロピルカルバモイル}ヘプタデカン酸（C18二酸リンカー試薬）	化合物番号4、番号5、番号24、番号26、番号28、番号30、番号32、番号34、番号36、番号38、番号40、番号58、番号59、番号60、番号61、番号62、番号63、番号66

【表５－２】

C4	化合物番号67
	19-{(S)-1-カルボキシ-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-ブロモアセチル-アミノ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチルカルバモイル]メトキシ}エトキシ)エチル-カルバモイル]プロピルカルバモイル}ノナデカン酸(C20二酸リンカー試薬)
C5	化合物番号68
	N-[4-[2-[2-[2-[2-[(2-ブロモアセチル)アミノ]エチルアミノ]-2-オキソ-エトキシ]エトキシ]エチルアミノ]-2-オキソ-エトキシ]エチルアミノ]-4-オキソ-ブチル]スルホニル-16-(1H-テトラゾール-5-イル)ヘキサデカンアミド(テトラゾールリンカー試薬)

【０３１８】

コンジュゲーション、精製、および分析

コンジュゲーションのため１つ以上の導入されたシステイン残基を有するV_HHポリペプチドを含有する水溶液に、キャッピングされたシステイン当たり５当量の　ＢＳＰＰ（ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物ジカリウム塩）または１．１当量のＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩）を添加した。１～２時間の撹拌の後、ｐＨを、ＮａＯＨ水溶液で８．５に調整し、それぞれのV_HHポリペプチド中の遊離システイン当たり、例えば、０．１Ｍの$NaHCO_3$（水溶液）中の５当量の中間体試薬Ｃ１を添加した。混合物を暗所で１．５～１６時間穏やかに撹拌した。

反応混合物を、Ａｋｔａシステムを使用して、陰イオン交換（ＡＩＥＸ）法によって精製する前に水で希釈した。側鎖コンジュゲーションを含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチドを、ＡＩＥＸクロマトグラフィー分離法を使用して精製した。したがって、好適なカラムに充填されたＡＩＥＸ樹脂Ｓｏｕｒｃｅ　３０Ｑを、Ａｋｔａ　Ａｖａｎｔクロマトグラフィーシステムでセットアップした塩化ナトリウム勾配プログラムと一緒に使用した。使用した緩衝液系は、２０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５）から構成される平衡緩衝液、および２０ｍＭのＴｒｉｓ、１ＭのＮａＣｌ（ｐＨ８．５）から構成される溶出緩衝液であった。反応混合物を、ｐＨ８．５に調整し、ＭｉｌｌｉＱ－Ｈ$_{2}$Ｏまたは平衡緩衝液を使用して、導電率４ｍＳ／ｃｍ未満に希釈した。試料をカラムに適用し、カラムを５～１０カラム体積の平衡緩衝液で適用後に洗浄した。次いで、３０～５０カラム体積の浅い勾配を使用して分離クロマトグラフィーを行った。使用した勾配は、精製されたＶ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体のｐＩに応じて、０％から最大５０％であった。一般的に、コンジュゲートされていない親Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチドは、勾配の早期に溶出され、単一コンジュゲーションを含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチドは、勾配の最中に溶出され、Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチド分子当たり１つを超える側鎖コンジュゲートを意味する多重コンジュゲーションを含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチドは、勾配の後期に溶出された。メインピーク上の画分のプーリングをある方法で行ったため、９０～９９％の高い純度の、単一または二重コンジュゲート調製物を含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチドを得た。純度分析は、ＵＶおよびＦＬＤ検出器を有するＷａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣシステムでセットアップした、ＨＡＬＯ　ＤｉＰｈｅｎｙｌカラム１０００Å、２．７μｍ、１５０×２．１ｍｍ（Ｓｃａｎｔｅｃ　Ｎｏｒｄｉｃ　ＵＳＤＰＦ００１３１６）ならびにＡ）水中の０．１％ｖ／ｖ　ＴＦＡおよびＢ）アセトニトリル中の０．０９％ｖ／ｖＴＦＡから構成されるランニング緩衝液に基づく、逆相超高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＵＰＬＣ）法を使用して行った。カラム温度を６０℃に設定した。勾配プログラムは、以下であった：１）０．０～８．０分：２０～５０％Ｂ、２）８．０～８．１分：５０～８０％Ｂ、３）８．１～９．０分：８０％Ｂ、４）９．０～９．１分：８０～２０％Ｂ、および５）９．１～１１．０分：２０％Ｂ。コンジュゲートされていない親Ｖ$_{H}$Ｈポリペプチドは、４．６～４．８分の間に溶出された。単一コンジュゲーションを含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体は、５．１～５．６分の間に溶出され、約５．３分でメインピークを有した。二重コンジュゲーションを有するＶ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体は、オフサイトの多重コンジュゲートされたＶ$_{H}$Ｈポリペプチドに対して、５．７～５．８以降に溶出された。コンジュゲーションを含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチドの完全性は、Ａｇｉｌｅｎｔ　ＬＣ　１１００／１２００システムと、ＢＩＯＳＥＰ－ＳＥＣ－３０００　３００×７．８ｍｍカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ、カタログ番号ＯＯＨ－２１４６－Ｋ０）ならびに２００ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．９）、３００ｍＭのＮａＣｌ、および１０％のイソプロパノールで構成されたランニング緩衝液で準備したＳＥ－ＨＰＬＣ方法に基づいて分析した。コンジュゲーションを含むＶ$_{H}$Ｈポリペプチドの分子質量は、段階溶出のために、ＭｉｌｌｉＱ－Ｈ$_{2}$Ｏ／０．１％のギ酸で構成されたＡ緩衝液、およびアセトニトリル／０．１％のギ酸で構成されたＢ緩衝液中で０．４ｍｌ／分で実行されるＭａｓｓＰＲＥＰ　Ｄｅｓａｌｔ（Ｗａｔｅｒｓ）カラムを有する６２８０Ａｇｉｌｅｎｔシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上のＥＳＩ－ＴＯＦ－ＭＳを使用して分析した。キモトリプシンおよびトリプシンベースの消化物の組み合わせを使用して、配列検証のためのペプチドマッピングを行った。ＬＣ－ＭＳシステムは、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｏｒｂｉｔｒａｐ　Ｆｕｓｉｏｎ機器に組み合わせたｗａｔｅｒｓのＡｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣから成っていた。消化物のオンラインＬＣ－ＭＳ分析を、ＣＳＨ　Ｃ－１８カラム１．７μｍ、１５０×２．１ｍｍ、およびアセトニトリル／ギ酸勾配を使用して行った。カラム温度は６０Ｃであった。緩衝液Ａ：０，１％ＦＡ水および緩衝液Ｂ：０，１％ＦＡアセトニトリル。勾配プログラムは以下であった：１）０．０～２．０分：１％Ｂ、２）２～５０分：１～３５％Ｂ、３）５０～５１分：１００％Ｂ、および４）５１～６０分：１００～１％Ｂ、１２０μｌ／分の流量。Ｇｅｎｅｄａｔａ　Ｒｅｆｉｎｅｒペプチドマッピングワークフローを使用してデータを分析した。一次配列の完全なカバレッジが得られた。コンジュゲ

ーションを用いたＶＨＨポリペプチド誘導体のバッチ調製物のタンパク質濃度を測定するために、ＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を理論的に計算された吸光係数を用いて使用した。

【０３１９】

図１、２、および３は、ＩＳＶＤ－およびＶＨＨポリペプチド誘導体の非限定的な例を、増加するレベルの詳細とともに示す。

【０３２０】

実施例３：配列表および抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド

【表６－１】

表4:延長因子を有さない化合物および配列番号（V_HHおよびCDR配列）の概説

	N末端延長部	抗FX V_HH (N末端)		リンカー(L_{1-2})	抗FIX(a)V_HH (C末端)		C末端延長部
V_HHポリペプチドID	配列番号	V_HH ID	V_HH(CDR1、2、3)(Kabat定義)配列番号	配列番号	V_HH ID	V_HH(CDR1、2、3)(Kabat定義)配列番号	配列番号
化合物番号1（一価）	なし	VHH-1.1	27(28、29、30)	なし	なし	なし	5
化合物番号2（一価）	なし	なし	なし	なし	VHH-2.2	35(36、37、38)	6
化合物番号3（一価）	なし	VHH-1.3	31(32、33、34)	なし	なし	なし	6
化合物番号4	なし	VHH-1.4	39(40、41、42)	14	VHH-2.4	43(44、45、46)	7
化合物番号5	なし	VHH-1.5	47(48、49、50)	14	VHH-2.5	51(52、53、54)	7
化合物番号6	なし	VHH-1.6	47(48、49、50)	14	VHH-2.6	51(52、53、54)	8
化合物番号7	なし	VHH-1.7	63(64、65、66)	20	VHH-2.7	67(68、69、70)	9
化合物番号8	なし	VHH-1.8	63(64、65、66)	20	VHH-2.8	51(52、53、54)	9
化合物番号9	なし	VHH-1.9	79(80、81、82)	20	VHH-2.9	83(84、85、86)	9
化合物番号10	なし	VHH-1.10	87(88、89、90)	20	VHH-2.10	67(68、69、70)	9
化合物番号11	なし	VHH-1.11	95(96、97、98)	20	VHH-2.11	83(84、85、86)	9
化合物番号12	なし	VHH-1.12	103(104、105、106)	20	VHH-2.12	107(108、109、110)	9
化合物番号13	なし	VHH-1.13	111(112、113、114)	20	VHH-2.13	115(116、117、118)	9
化合物番号14	なし	VHH-1.14	119(120、121、122)	20	VHH-2.14	123(124、125、126)	9
化合物番号15	なし	VHH-1.15	127(128、129、130)	20	VHH-2.15	131(132、133、134)	9
化合物番号16	なし	VHH-1.16	111(112、113、114)	20	VHH-2.16	139(140、141、142)	9
化合物番号17	なし	VHH-1.17	143(144、145、146)	20	VHH-2.17	107(108、109、110)	9

【表６－２】

	N末端延長部	抗FX V_HH (N末端)		リンカー(L_{1-2})	抗FIX(a)V_HH (C末端)		C末端延長部
V_HHポリペプチドID	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3) (Kabat定義)	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3) (Kabat定義)	配列番号
化合物番号18	なし	VHH-1.18	151(152、153、154)	20	VHH-2.18	155(156、157、158)	9
化合物番号19	なし	VHH-1.19	159(160、161、162)	20	VHH-2.19	51(52、53、54)	9
化合物番号20	なし	VHH-1.20	167(168、169、170)	20	VHH-2.20	171(172、173、174)	9
化合物番号21	なし	VHH-1.21	79 (80、81、82)	20	VHH-2.21	107(108、109、110)	9
化合物番号22	なし	VHH-1.22	111(112、113、114)	20	VHH-2.22	83(84、85、86)	9
化合物番号23	690	VHH-1.23	191(192、193、194)	14	VHH-2.23	43(44、45、46)	10
化合物番号24	690	VHH-1.24	191(192、193、194)	14	VHH-2.24	43(44、45、46)	10
化合物番号25	690	VHH-1.25	207(208、209、210)	14	VHH-2.25	43(44、45、46)	11
化合物番号26	690	VHH-1.26	207(208、209、210)	14	VHH-2.26	43(44、45、46)	11
化合物番号27	690	VHH-1.27	223(224、225、226)	14	VHH-2.27	227(228、229、230)	11
化合物番号28	690	VHH-1.28	223(224、225、226)	14	VHH-2.28	227(228、229、230)	11
化合物番号29	690	VHH-1.29	223(224、225、226)	14	VHH-2.29	243(244、245、246)	11
化合物番号30	690	VHH-1.30	223(224、225、226)	14	VHH-2.30	243(244、245、246)	11

【表６－３】

	N末端延長部	抗FX V_HH (N末端)		リンカー(L_{1-2})	抗FIX(a)V_HH (C末端)		C末端延長部
V_HHポリペプチドID	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3) (Kabat定義)	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3) (Kabat定義)	配列番号
化合物番号31	690	VHH-1.31	223(224、225、226)	14	VHH-2.31	259(260、261、262)	11
化合物番号32	690	VHH-1.32	223(224、225、226)	14	VHH-2.32	259(260、261、262)	11
化合物番号33	690	VHH-1.33	223(224、225、226)	14	VHH-2.33	275(276、277、278)	11
化合物番号34	690	VHH-1.34	223(224、225、226)	14	VHH-2.34	275(276、277、278)	11
化合物番号35	690	VHH-1.35	223(224、225、226)	14	VHH-2.35	291(292、293、294)	11
化合物番号36	690	VHH-1.36	223(224、225、226)	14	VHH-2.36	291(292、293、294)	11
化合物番号37	690	VHH-1.37	223(224、225、226)	14	VHH-2.37	307(308、309、310)	11
化合物番号38	690	VHH-1.38	223(224、225、226)	14	VHH-2.38	307(308、309、310)	11
化合物番号39	690	VHH-1.39	223(224、225、226)	14	VHH-2.39	323(324、325、326)	11
化合物番号40	690	VHH-1.40	223(224、225、226)	14	VHH-2.40	323(324、325、326)	11
化合物番号41	なし	VHH-1.41	335(336、337、338)	16	VHH-2.41	51(52、53、54)	7
化合物番号42	なし	VHH-1.42	335(336、337、338)	17	VHH-2.42	51(52、53、54)	7
化合物番号43	なし	VHH-1.43	335(336、337、338)	18	VHH-2.43	51(52、53、54)	7

【表６－４】

	N末端延長部	抗FX V_HH (N末端)		リンカー(L_{1-2})	抗FIX(a)V_HH (C末端)		C末端延長部
V_HHポリペプチドID	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3)(Kabat定義)	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3)(Kabat定義)	配列番号
化合物番号44	なし	VHH-1.44	335(336、337、338)	19	VHH-2.44	51(52、53、54)	7
化合物番号45	なし	VHH-1.45	335(336、337、338)	20	VHH-2.45	51(52、53、54)	7
化合物番号46	なし	VHH-1.46	335(336、337、338)	14	VHH-2.46	379(380、381、382)	7
化合物番号47	なし	VHH-1.47	335(336、337、338)	16	VHH-2.47	379(380、381、382)	7
化合物番号48	なし	VHH-1.48	335(336、337、338)	21	VHH-2.48	379(380、381、382)	7
化合物番号49	なし	VHH-1.49	335(336、337、338)	18	VHH-2.49	379(380、381、382)	7
化合物番号50	なし	VHH-1.50	335(336、337、338)	19	VHH-2.50	379(380、381、382)	7
化合物番号51	なし	VHH-1.51	335(336、337、338)	14	VHH-2.51	419(420、421、422)	7
化合物番号52	なし	VHH-1.52	335(336、337、338)	16	VHH-2.52	419(420、421、422)	7
化合物番号53	なし	VHH-1.53	335(336、337、338)	23	VHH-2.53	419(420、421、422)	7
化合物番号54	なし	VHH-1.54	335(336、337、338)	21	VHH-2.54	419(420、421、422)	7
化合物番号55	なし	VHH-1.55	335(336、337、338)	18	VHH-2.55	419(420、421、422)	7
化合物番号56	なし	VHH-1.56	335(336、337、338)	19	VHH-2.56	419(420、421、422)	7

【表６－５】

	N末端延長部	抗FX V_HH (N末端)		リンカー(L_{1-2})	抗FIX(a)V_HH (C末端)		C末端延長部
V_HHポリペプチドID	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3) (Kabat定義)	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3) (Kabat定義)	配列番号
化合物番号57	なし	VHH-1.57	335(336、337、338)	20	VHH-2.57	419(420、421、422)	7
化合物番号58	なし	VHH-1.58	471(472、473、474)	14	VHH-2.58	475(476、477、478)	7
化合物番号59	なし	VHH-1.59	479(480、481、482)	14	VHH-2.59	51(52、53、54)	7
化合物番号60	なし	VHH-1.60	487(488、489、490)	14	VHH-2.60	475(476、477、478)	7
化合物番号61	なし	VHH-1.61	495(496、497、498)	14	VHH-2.61	499(500、501、502)	7
化合物番号62	なし	VHH-1.62	503(504、505、506)	14	VHH-2.62	507(508、509、510)	7
化合物番号63	なし	VHH-1.63	511(512、513、514)	14	VHH-2.63	507(508、509、510)	7
化合物番号64	690	VHH-1.64	223(224、225、226)	14	VHH-2.64	43(44、45、46)	10
化合物番号65	690	VHH-1.65	223(224、225、226)	14	VHH-2.65	43(44、45、46)	10
化合物番号66	690	VHH-1.66	223(224、225、226)	14	VHH-2.66	43(44、45、46)	10
化合物番号67	690	VHH-1.67	223(224、225、226)	14	VHH-2.67	43(44、45、46)	10
化合物番号68	690	VHH-1.68	223(224、225、226)	14	VHH-2.68	43(44、45、46)	10
化合物番号69	なし	VHH-1.69	39(40、41、42)	14	VHH-2.69	43(44、45、46)	7
化合物番号70	3	VHH-1.70	223(224、225、226)	14	VHH-2.70	43(44、45、46)	11

【表６－６】

	N末端延長部	抗FX V_HH (N末端)		リンカー(L_{1-2})	抗FIX(a)V_HH (C末端)		C末端延長部
V_HHポリペプチドID	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3)(Kabat定義)	配列番号	V_HH ID	配列番号 V_HH(CDR1、2、3)(Kabat定義)	配列番号
化合物番号71	4	VHH-1.71	223(224、225、226)	14	VHH-2.71	43(44、45、46)	11
化合物番号72	なし	VHH-1.72	223(224、225、226)	14	VHH-2.72	43(44、45、46)	12
化合物番号73	なし	VHH-1.73	223(224、225、226)	14	VHH-2.73	43(44、45、46)	13
化合物番号74	690	VHH-1.74	599(600、601、602)	691	VHH-2.74	603(604、605、606)	7
化合物番号75	なし	VHH-1.75	607(608、609、610)	14	VHH-2.75	35(36、37、38)	なし
化合物番号76(一価)	なし	VHH-1.15	127(128、129、130)	なし	なし	なし	11
化合物番号77(一価)	なし	VHH-1.13	111(112、113、114)	なし	なし	なし	11

【表７－１】

表5：抗FX/抗FIX(a)V_HHポリペプチド誘導体（延長部分を含む）の概説

V_HHポリペプチドID	延長因子(P)	延長部分リンカー(L_P)	延長部分結合部位（「R1(/R2)」）	化合物番号-骨格配列番号（延長部分なし）
化合物番号1	なし	なし	なし	615
化合物番号2	なし	なし	なし	616
化合物番号3	なし	なし	なし	617
化合物番号4	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6（配列番号7）	618
化合物番号5	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6（配列番号7）	619
化合物番号6	P2	L_P1	C末端延長部中のCys5およびCys7（配列番号8）	620
化合物番号7	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	621
化合物番号8	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	622
化合物番号9	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	623
化合物番号10	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	624
化合物番号11	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	625
化合物番号12	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	626
化合物番号13	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	627
化合物番号14	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	628
化合物番号15	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	629
化合物番号16	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6（配列番号9）	630

【表７－２】

V_HHポリペプチドID	延長因子(P)	延長部分リンカー(L_P)	延長部分結合部位(「R1(/R2)」)	化合物番号骨格配列番号(延長部分なし)
化合物番号17	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6(配列番号9)	631
化合物番号18	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6(配列番号9)	632
化合物番号19	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6(配列番号9)	633
化合物番号20	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6(配列番号9)	634
化合物番号21	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6(配列番号9)	635
化合物番号22	P2	L_P1	C末端延長部中のCys4およびCys6(配列番号9)	636
化合物番号23	なし	なし	なし	637
化合物番号24	P3	L_P1	C末端延長部中のCys10(配列番号10)	638
化合物番号25	なし	なし	なし	639
化合物番号26	P3	L_P1	化合物番号26中のCys30(配列番号640)	640
化合物番号27	なし	なし	なし	641
化合物番号28	P3	L_P1	化合物番号28中のCys158(配列番号642)	642
化合物番号29	なし	なし	なし	643
化合物番号30	P3	L_P1	化合物番号30中のCys160(配列番号644)	644
化合物番号31	なし	なし	なし	645
化合物番号32	P3	L_P1	化合物番号32中のCys161(配列番号646)	646
化合物番号33	なし	なし	なし	647
化合物番号34	P3	L_P1	化合物番号34中のCys188(配列番号648)	648

【表７－３】

V_HHポリペプチドID	延長因子(P)	延長部分リンカー(L_P)	延長部分結合部位(「R1(/R2)」)	化合物番号骨格配列番号(延長部分なし)
化合物番号35	なし	なし	なし	649
化合物番号36	P3	L_P1	化合物番号36中のCys190 (配列番号650)	650
化合物番号37	なし	なし	なし	651
化合物番号38	P3	L_P1	化合物番号38中のCys209 (配列番号652)	652
化合物番号39	なし	なし	なし	653
化合物番号40	P3	L_P1	化合物番号40中のCys231 (配列番号654)	654
化合物番号41	なし	なし	なし	655
化合物番号42	なし	なし	なし	656
化合物番号43	なし	なし	なし	657
化合物番号44	なし	なし	なし	658
化合物番号45	なし	なし	なし	659
化合物番号46	なし	なし	なし	660
化合物番号47	なし	なし	なし	661
化合物番号48	なし	なし	なし	662
化合物番号49	なし	なし	なし	663
化合物番号50	なし	なし	なし	664
化合物番号51	なし	なし	なし	665
化合物番号52	なし	なし	なし	666
化合物番号53	なし	なし	なし	667
化合物番号54	なし	なし	なし	668
化合物番号55	なし	なし	なし	669
化合物番号56	なし	なし	なし	670
化合物番号57	なし	なし	なし	671
化合物番号58	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6 (配列番号7)	672
化合物番号59	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6 (配列番号7)	673

【表７－４】

V_HHポリペプチドID	延長因子(P)	延長部分リンカー(L_P)	延長部分結合部位(「R1(/R2)」)	化合物番号骨格配列番号(延長部分なし)
化合物番号60	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6 (配列番号7)	674
化合物番号61	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6 (配列番号7)	675
化合物番号62	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6 (配列番号7)	676
化合物番号63	P3	L_P1	C末端延長部中のCys6 (配列番号7)	677
化合物番号64	なし	なし	なし	678
化合物番号65	P1	L_P1	C末端延長部中のCys10 (配列番号10)	679
化合物番号66	P3	L_P1	C末端延長部中のCys10 (配列番号10)	680
化合物番号67	P4	L_P1	C末端延長部中のCys10 (配列番号10)	681
化合物番号68	P5	L_P2	C末端延長部中のCys10 (配列番号10)	682
化合物番号69	なし	なし	なし	683
化合物番号70	P6(「P」－「R1」)	L_P3(「P」－「L_P」－「R1」)	VHH-1.70中のAsp1 (配列番号567)	684
化合物番号71	P6(「P」－「R1」)	L_P4(「P」－「L_P」－「R1」)	VHH-1.71中のAsp1 (配列番号575)	685
化合物番号72	P6(「R1」－「P」)	L_P3(「R1」－「L_P」－「P」)	VHH-2.72中のSer127 (配列番号587)	686
化合物番号73	P6(「R1」－「P」)	L_P4(「R1」－「L_P」－「P」)	VHH-2.73中のSer127 (配列番号595)	687
化合物番号74	なし	なし	なし	688
化合物番号75	なし	なし	なし	689

【０３２１】

実施例４：ＥＬＩＳＡ実験に基づく抗ＦＸ　V_HHポリペプチドのエピトープ

「化合物番号１」と示される抗ＦＸ　V_HHポリペプチドの結合エピトープが、ヒトＦＸ（配列番号２）の活性化ペプチド（ＡＰ）の内側に位置するかどうかを判定するために、ＥＬＩＳＡアッセイをセットアップした。１個のアミノ酸間隔を有する活性化ペプチドの５２残基にわたる４１個の固有の１２－ｍｅｒペプチド断片を、マイクロタイタープレートウェル中で固定化し、続いて、試験されるV_HHポリペプチドとともにインキュベーションし、　結合したリガンドの検出を、二次ＨＲＰ標識化抗体の添加によって行った。

【０３２２】

ペプチドをビオチンにＣ末端結合し、５０μＬの１μｇ／ｍＬペプチド溶液を使用して、１μｇ／ｍＬのストレプトアビジンで予め被覆されたマイクロタイタープレートの個別ウェル中に固定した。各ウェルを洗浄緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２．５ｍＭ　$CaCl_2$、０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０、ｐＨ８．６０）で洗浄し、続いて、試験される５０μＬの２μｇ／ｍＬのＦＬＡＧタグ付き抗ＦＸ　V_HHポリペプチドまたはＩｇＧ抗体を添加した。１時間後、非結合V_HHポリペプチドを、洗浄緩衝液を使用して洗浄した。

【０３２３】

最初にＨＲＰ標識化二次抗体（ＦＬＡＧタグ付きV_HHポリペプチド：抗ＦＬＡＧ　ｍＡｂ　Ｍ２－ペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、ＵＳ）を１時間結合し、次いで、１００μＬのＴＭＢ－１　ＥＬＩＳＡ基質（Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を添加することによって、結合した抗ＦＸ活性化ペプチドリガンドを検出した。

【０３２４】

次いで、各ＦＸバインダーによって結合した一組のペプチド（表６）によって被覆された共通配列を特定することにより、ベースラインを上回るシグナルを生じさせる一組のペプチドから最小エピトープを推定した。エピトープの第１の残基を、第１の連続的なＥＬＩＳＡ陽性ペプチドにおける最後のアミノ酸により定義し、一方で、エピトープの最後の残基を、最後の連続的なＥＬＩＳＡ陽性ペプチドの第１の残基として定義した。

【０３２５】

したがって、以下の表は、化合物番号１に対応する試験された初期抗ＦＸ　V_HHポリペプチドについて、ＦＸ　ＡＰ全体に及ぶ連続ペプチドからのＥＬＩＳＡシグナルを示す。ＥＬＩＳＡシグナルは、バックグラウンドシグナルに対して正規化されている。

【０３２６】

灰色の領域は、配列ＮＰＦＤＬＬＤＦ（配列番号６９２）として特定された最小エピトープを決定するために使用される陽性結合シグナルをマークする。

【０３２７】

化合物番号１に対するＦＸ活性化ペプチドの特定されたエピトープ配列を、実施例６に概説されるように、エピトープ：パラトープ相互作用の実験を決定する高分解能構造に使用した。

【表８】

表6:エピトープ特定

エピトープ残基(配列番号)	化合物番号1
空	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
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

【０３２８】

実施例５：抗ＦＩＸ　V_HH断片（化合物番号２）の結晶化およびパラトープ／エピトープマッピング

本研究の目的は、化合物番号２と指定されたV_HH断片のパラトープ残基およびエピトープ残基を決定することであった。

【０３２９】

結晶化

ヒトＥＧＲ－ＣＭＫ阻害第ＩＸａ因子ＧｌａドメインレスＤ（野生型）（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＰｒｏｔｅｉｎＷｏｒｋｓから購入、ロット番号ｈＧＤＦＩＸＡＷＴＥＧＲ＿１１

）と１：１のモル比で混合したＶ$_H$Ｈポリペプチドの結晶（化合物番号２）を、１８℃でシッティングドロップ蒸気拡散技法を使用して成長させた。２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５０ｍＭのＮａＣｌ、および２．５ｍＭのＣａＣｌ$_2$中の１００ｎｌの８．４ｍｇ／ｍｌ複合体のタンパク質溶液を、１００ｎｌの０．２Ｍの硫酸Ｌｉ、０．１ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、３０％（ｗ／ｖ）のＰＥＧ　４０００（沈殿剤として）と混合して、６０μｌの沈殿剤上でインキュベートした。結晶は２週間以内に現れた。

【０３３０】

回折データ収集

結晶は、液体窒素でフラッシュ冷却する前に、結晶化ドロップに２０％のエチレングリコールを加えた１μｌの沈殿剤の添加により凍結保護した。回折データを、ＤｅｃｔｒｉｓのＰｉｌａｔｕｓ２Ｍ画素検出器を使用して、Ｓｗｉｓｓ　Ｌｉｇｈｔ　ＳｏｕｒｃｅビームラインＸ０６ＤＡ（１．０００００Å波長）で１００Ｋで収集した。データの自動インデックス、統合、およびスケーリングは、ＸＤＳパッケージからのプログラムを用いて実施された（回析データ統計を表７に要約する）。

【０３３１】

構造の決定および精緻化

非対称単位は、マシューズ係数分析によって判定された、２つの化合物番号２：ＥＧＲ－ＣＭＫ阻害第ＩＸａ因子ＧｌａドメインレスＶ$_H$Ｈ：ＦＩＸａ複合体の構造を使用して、プログラムスイートＰｈｅｎｉｘ内に実装されたＰｈａｓｅｒを使用する分子置換によって決定された。正しいアミノ酸配列はＣＯＯＴを使用してモデル構築され、その後構造はＣＯＯＴでのＰｈｅｎｉｘ精緻化工程および手動再建工程を使用して精緻化された。精緻化統計が表７に示される。

【表９】

表7:データ収集および精緻化統計

波長(Å)	1.0000
分解能範囲(Å)	43.26～2.7(2.797～2.7)
空間群	P1
単位セル(Å、度)	56.51　64.47　64.72　76.115　87.449　85.761
全反射	42366(4277)
特有の反射	23473(2340)
多重度	1.8(1.8)
完全性(%)	96.66(96.77)
平均I/シグマ(I)	6.44(1.40)
ウィルソンB-因子(Å^2)	40.75
R-merge	0.1042(0.5247)
R-meas	0.1473(0.7416)
R-pim	0.1041(0.5241)
CC1/2	0.986(0.594)
CC*	0.997(0.863)
精緻化で使用される反射	23455(2340)
R-freeに対して使用される反射	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)
非水素原子数	6622
高分子	6394
リガンド	54
溶媒	174
タンパク質残基	823
RMS(結合)(Å)	0.004
RMS(角度)(度)	0.87
ラマチャンドラン支持値(%)	94.82
ラマチャンドラン許容値(%)	5.18
ラマチャンドラン外れ値(%)	0.00
回転異性体外れ値(%)	6.39
クラッシュスコア	9.91
平均B-因子(Å^2)	42.93
高分子	43.06
リガンド	42.44
TLS群の数	38.49

最高分解能シェルに対する統計が、括弧内に示される。

【０３３２】

エピトープおよびパラトープの決定

V_HＨポリペプチド内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子（すなわち、非水素原子）を有することによって特徴付けられるＦＩＸ（ａ）残基として定義される化合物番号２のエピトープは、ＦＩＸ配列によるＦＩＸ（ａ）のプロテアーゼドメインからの以下の残基：

Ｅ２２４、Ｔ２２５、Ｇ２２６、Ｖ２５０、Ｉ２５１、Ｒ２５２、Ｉ２５３、Ｐ２５５、Ｈ２５７、およびＮ２６０を含む（連続ナンバリング）（配列番号１）。

【０３３３】

ＦＩＸ（ａ）内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子（すなわち、非水素原子）を

有することによって特徴付けられる残基として定義される化合物番号２のパラトープは、化合物番号２からの以下の残基：
Ｆ２９、Ｎ３０、Ｙ３２、Ｔ５４、Ｄ９９、Ｒ１００、Ｓ１０１、Ｆ１０２、Ｌ１０３、Ｆ１０４、Ｑ１０６、Ａ１０７、およびＮ１１３（配列番号３５）（連続番ナンバリング）を含む。

【０３３４】

実施例６：結晶化およびパラトープ／エピトープマッピング抗ＦＸ　ＶＨＨ断片（化合物番号１）

本研究の目的は、化合物番号１と指定されたＶＨＨ断片のパラトープ残基およびエピトープ残基を決定することであった。

【０３３５】

結晶化

実施例４で特定されたヒトＦＸ（Ｓｃｈａｆｅｒ－Ｎ　ＡｐＳから購入）の活性化ペプチド配列ａａ３１～３７に対応する、合成ペプチドＮ－ｔｅｒｍ－ＮＰＦＤＬＬＤ－Ｃ－ｔｅｒｍと１：１４のモル比で混合されたＶＨＨポリペプチド（化合物番号１）の結晶を、１８℃で、シッティングドロップ蒸気拡散技法を使用して成長させた。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５０ｍＭ　ＮａＣｌ中の１５０ｎｌの４．０ｍｇ／ｍｌ複合体のタンパク質溶液を、５０ｎｌの０．２Ｍ　ＮａＣｌ、２Ｍ硫酸アンモニウム、０．１Ｍカコジル酸ナトリウム（ｐＨ６．５）（沈殿剤として）と混合し、６０μｌの沈殿剤でインキュベートした。結晶は１週間以内に現れた。

【０３３６】

回折データ収集

結晶は、液体窒素でフラッシュ冷却する前に、結晶化ドロップに２０％のエチレングリコールを加えた１μｌの沈殿剤の添加により凍結保護した。回折データを、ＤｅｃｔｒｉｓのＰｉｌａｔｕｓ２Ｍ画素検出器を使用して、Ｓｗｉｓｓ　Ｌｉｇｈｔ　ＳｏｕｒｃｅビームラインＸ０６ＤＡ（１．０００００Å波長）で１００Ｋで収集した。データの自動インデックス、統合、およびスケーリングは、ＸＤＳパッケージからのプログラムを用いて実施された（回折データ統計を表８に要約する）。

【０３３７】

構造の決定と精緻化

非対称単位は、１つの化合物番号１：ペプチド複合体を含む。構造は、探索モデルとしてタンパク質構造データバンクＩＤ　４Ｂ４１（鎖Ａ）で指定されたＶＨＨポリペプチド構造を使用して、プログラムスイートＰｈｅｎｉｘ内に実装されたＰｈａｓｅｒを使用する分子置換によって決定された。化合物番号１の正しいアミノ酸配列を導入し、合成ペプチドの電子密度の違いを特定し、全てＣＯＯＴを使用して手動でモデル構築した。その後、構造は、ＣＯＯＴにおいて、Ｐｈｅｎｉｘ精緻化および手動再建工程を使用して精緻化された。精緻化統計が表８に示される。

【表１０】

表8:データ収集および精緻化統計

波長(Å)	1.0000
分解能範囲(Å)	47.61～3.183(3.297～3.183)
空間群	$P6_122$
単位セル(Å、度)	83.65　83.65　126.32　90　90　120
全反射	80989(3197)
特有の反射	4667(353)
多重度	17.4(9.1)
完全性(%)	97.57(76.08)
平均I/シグマ(I)	8.69(1.55)
ウィルソンB-因子($Å^2$)	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)
精緻化で使用される反射	4664(353)
R-freeに対して使用される反射	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)
非水素原子数	986
高分子	981
リガンド	5
溶媒	0
タンパク質残基	130
RMS(結合)(Å)	0.003
RMS(角度)(度)	0.59
ラマチャンドラン支持値(%)	96.83
ラマチャンドラン許容値(%)	3.17
ラマチャンドラン外れ値(%)	0.00
回転異性体外れ値(%)	0.00
クラッシュスコア	8.68
平均B-因子($Å^2$)	44.41
高分子	44.18
リガンド	88.79
TLS群の数	1

最高分解能シェルに対する統計が、括弧内に示される。

【０３３８】

エピトープおよびパラトープの決定

V_HHポリペプチド（化合物番号１）内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子を有することによって特徴付けられるＦＸ活性化ペプチド残基として定義される合成ペプチドのエピトープは、連続ナンバリングに基づく対応するＦＸ活性化ペプチド配列（配列番号２）による、合成ペプチドＮ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、およびＬ１７８からの以下の残基を含む。

【０３３９】

合成ペプチド内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子（すなわち、非水素原子）を有することによって特徴付けられる化合物番号１の残基として定義されるV_HHポリペプチドのパラトープ（化合物番号１）は、化合物番号１からの以下の残基：

Ｄ３２、Ａ３３、Ｍ３４、Ｇ３５、Ｙ３７、Ｌ４７、Ｖ４８、Ａ４９、Ｇ５０、Ｉ５１、Ｍ５２、Ｎ５７、Ｔ５８、Ｎ５９、Ｙ６０、Ｔ６１、Ｋ９７、Ｖ９９、Ｒ１０１、およびＰ１０２（配列番号２７）（連続ナンバリング）を含む。

【０３４０】

合成ペプチドと複合体化されたV_HＨポリペプチド（化合物番号３）の相同性モデルの構築を行い、その理由は、化合物番号３を合理的な配列ベースおよび構造ベースの最適化のための親V_HＨポリペプチド配列として使用したためである。

【０３４１】

上記の実験からの合成ペプチドと複合体化された化合物番号１の結晶構造を、合成ペプチドと複合体化された化合物番号３の相同性モデルの出発モデルとして使用した。化合物番号１および化合物番号３のアミノ酸配列をアライメントし、２つの配列間で異なるアミノ酸残基をＣＯＯＴで変異させて、化合物番号３の出発モデルを作成した。化合物番号３を含むこのモデルは、前処理され、最適化され、ＳＣＨＲＯＤＩＮＧＥＲからのＭＡＥＳＴＲＯにおける抑制された最小化を通して実行された。

【０３４２】

このモデルは、配列がこれらの位置で同一であったため、上記のように同じエピトープ残基およびパラトープ残基を示した。

【０３４３】

実施例７：抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）V_HＨポリペプチドの ＳＰＲ解析

本研究の目的は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）解析により、ヒト血漿由来ＦＸおよびＢｅｎｅｆｉｘ（登録商標）を有する選択された抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）V_HＨポリペプチド化合物の結合定数を推定することであった。

【０３４４】

精製された抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HＨポリペプチド化合物のヒト血漿由来ＦＸ（Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ、ＵＳＡ）への結合を、ＳＰＲによってプローブした。

【０３４５】

簡潔に述べると、上記のように組み換え的に調製された抗ＧＬＡ－ＦＸを、ｐＨ５で標準アミンカップリング化学を使用してＣＭ４センサーチップまたはＸａｎｔｅｃ ＨＬＣ２００Ｍ上に固定化した。１０ｎＭ ＦＸ（Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＵＳＡ）を、１０μＬ／分の流量で３０秒間注射した。その後、表９による１０００、１００、１０、１、０．１、および０ｎＭのV_HＨポリペプチド化合物を、５０μＬ／分の流量で２００秒間注射し、ＦＸへの結合を許容し、続いて、ランニング緩衝液（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、５ｍＭ $CaCl_2$、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ Ｐ２０、１ｍｇ／ｍＬのウシ血清アルブミン、Ｐｈ７．４）注射を１０分間の流れで行い、ＦＸからの解離を許容した。ランニング緩衝液はまた、抗ＦＸ V_HＨポリペプチド化合物の希釈にも使用された。チップの再生を、ランニング緩衝液中の５０ｍＭ ＥＤＴＡから成る再生緩衝液、３０秒間の接触時間、および３０μＬ／分の流量を使用して達成した。結合データを２５℃で収集し、製造者（ＢｉａｃｏｒｅＡＢ、ＵｐｐｓａｌａまたはＢｒｕｋｅｒ Ａｎａｌｙｓｅｒ）により供給されたＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎ ４．１を使用する１：１モデルにより分析した。

【０３４６】

全ての場合において、結合センソグラムは、運動分析に基づくK_D決定を除外する運動プロファイルに結合する迅速なオンおよび迅速なオフを示した。したがって、報告されたK_D値を、定常状態分析に基づいて決定する。分析により、以下の表９に報告された結合定数を得た。

【０３４７】

精製された抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HＨポリペプチド化合物のＢｅｎｅｆｉｘ（登録商標）（Ｐｆｉｚｅｒ Ｉｎｃ、ＵＳＡ）への結合を、ＳＰＲによりプローブした。簡潔に述べると、上記のように組み換え的に調製された抗ＧＬＡ－ＦＩＸを、ｐＨ５で標準アミ

ンカップリング化学を使用してＣＭ４センサーチップまたはＸａｎｔｅｃ　ＨＬＣ２００Ｍ上に固定化した。ＦＩＸ（１０ｎＭ）を、１０μＬ／分の流量で１分間注射した。その後、１０００、１００、１０、１、０．１、および０ｎＭのＶＨＨポリペプチド化合物を、３０μＬ／分の流量で４分間注射し、ＦＩＸ（Ｂｅｎｅｆｉｘ（登録商標））への結合を許容し、続いて、ランニング緩衝液（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$CaCl_2$、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　Ｐ２０、１ｍｇ／ｍＬのウシ血清アルブミン、Ｐｈ７．４）注射を５分間の流れで行い、ＦＩＸからの解離を許容した。ランニング緩衝液はまた、抗ＦＩＸ　ＶＨＨポリペプチド化合物の希釈にも使用された。チップの再生を、ランニング緩衝液中の５０ｍＭ　ＥＤＴＡから成る再生緩衝液、３０秒間の接触時間、および３０μＬ／分の流量を使用して達成した。結合データを２５℃で収集し、製造者（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ）により供給されたＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎ　４．１を使用する１：１モデルにより分析した。

【０３４８】

全ての場合において、結合センソグラムは、運動分析に基づくK_D決定を除外する運動プロファイルに結合する迅速なオンおよび迅速なオフを示した。したがって、報告されたK_D値を、定常状態分析に基づいて決定する。

【０３４９】

一連の化合物の結合定常分析を表９に報告する。ＦＩＸの結合親和性は、概して、全ての化合物について低ｎＭ　K_Dであり、一方で、ある範囲の化合物は、ＦＸの結合について高ｎＭ　K_Dを示した。したがって、標的媒介性薬剤配置は、ＦＸ中に不在であると予想され、一方で、ＦＩＸ相互作用は予想されるが、概説される化合物の必要な定常状態血漿濃度に限定される。したがって、列挙された化合物に対して有意な止血カバレッジを得るために期待される必要な血漿濃度は、列挙された化合物に対して高い効力があることを考えると、低いｎＭ濃度であることが予想される。

【表１１】

表9:選択されたV_HHポリペプチド化合物の推定結合定数
SPR解析により決定された場合の、選択された抗FX/抗FIX(a)V_HHポリペプチド化合物のヒト血漿由来FXおよびBenefix(登録商標)との相互作用についての定常状態分析に基づく推定結合定数

化合物ID	FXバインダーK_D(nM)	FIXバインダーK_D(nM)
化合物番号4	229	11.7
化合物番号5	199	2.7
化合物番号6	232	4.8
化合物番号7	82	2.3
化合物番号8	96	2.5
化合物番号9	70	1.1
化合物番号10	190	5.5
化合物番号11	42	6.4
化合物番号12	26	7.8
化合物番号13	300	2.0
化合物番号14	42	1.6
化合物番号15	350	3.0

【０３５０】

実施例８：トロンビン生成試験（ＴＧＴ）アッセイにおける抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（Ａ）ＶＨＨポリペプチドの活性

抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド誘導体の血液凝固促進活性は、Ｈｅｍｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐａｔｈｏｐｈｙｓｉｏｌ　Ｈａｅｍｏｓｔ　Ｔｈｒｏｍｂ，２００２；３２：２４９－２５３）によって記載される原理による血液凝固促進合成リン脂質膜の

存在下でトロンビン生成を促進するそれらの能力に基づいて決定された。比較のために、エミシズマブ配列同一類似体（ＳＩＡ）を含めた。各V_HHポリペプチド誘導体を、中和抗ＦＶＩＩＩポリクローナル抗体（以下、ＨＡ－ＰＰＰと称する）で補充された正常ヒト血小板欠乏血漿（ＮＨＰ）を使用して、ＴＧＴアッセイで試験した。

【０３５１】

ヒツジ抗ヒトＦＶＩＩＩポリクローナル抗体（ｐＡｂ、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、ＶＴ，ＵＳＡ）を補充したＮＨＰ（健康なボランティアからの）におけるＴＧＴを、９６ウェルプレート蛍光光度計（Ｆｌｕｏｒｏｓｃａｎ Ａｓｃｅｎｔ ＦＬ、Ｔｈｅｒｍｏｌａｂｓｙｓｔｅｍｓ、Ｈｅｌｓｉｎｋｉ，Ｆｉｎｌａｎｄ）を使用した標準的な較正された自動トロンボグラフィーによって実施した。反応混合物は、０．１μｇ／ｍｌの抗ＦＶＩＩＩ ｐＡｂ、４μｌの試験化合物希釈液（２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．４、２％ＢＳＡで希釈）、１０μｌの１ｐＭ組織因子（ＴＦ、ｐｐｐＬｏｗ、Ｔｈｒｏｍｂｉｎｏｓｃｏｐｅ ＢＶ、Ｍａａｓｔｒｉｃｈｔ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓから）、または１～８．３Ｕ／ｍｌヒト第ＸＩａ因子（Ｅｎｚｙｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＩＮ，ＵＳＡ）のいずれか、および１０μｌのＦｌｕＣａ基質（Ｔｈｒｏｍｂｉｎｏｓｃｏｐｅ ＢＶ、Ｍａａｓｔｒｉｃｈｔ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）とプレインキュベートした３６μｌのＮＨＰを含む。ＴＧＴアッセイを、トロンビンキャリブレーター（Ｔｈｒｏｍｂｉｎｏｓｃｏｐｅ ＢＶ、Ｍａａｓｔｒｉｃｈｔ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を使用してキャリブレーションし、１０μｌのトロンビンキャリブレーターを、０．１μｇ／ｍｌの抗ＦＶＩＩＩ ｐＡｂ、４μｌ緩衝液（２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．４、２％ＢＳＡ）とプレインキュベートした３６μｌのＮＨＰと混合した。概して、ＴＧＴは、８つの濃度の試験化合物（０．１、０．３、１、３、１０、３０、１００、および３００ｎＭ、最終血漿濃度または類似のもの）または添加緩衝液（２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．４、２％ＢＳＡ）のみ（対照を表す）で行った。ＴＧＴ中の正常な対照レベルは、ＮＨＰ添加緩衝液（２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１４０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．４、２％ＢＳＡ）のみを使用して測定した。ＴＧＴを合計６０分間進行させ、ＴＧＴパラメータのピークトロンビン高さ（ｎＭ）をＴｈｒｏｍｂｉｎｏｓｃｏｐｅソフトウェア（Ｔｈｒｏｍｂｉｎｏｓｃｏｐｅ ＢＶ）で分析した。選択された試験V_HHポリペプチド誘導体、化合物番号６、ならびにコンパレータエミシズマブＳＩＡおよびＭｉｍ８の代表的な滴定曲線については、図４を参照されたい。活性レベルの差の評価は、コンパレータ、例えば、エミシズマブＳＩＡに対するEC_{50}の差、またはエミシズマブＳＩＡに対する最大トロンビンピーク高さに対する所与のV_HHポリペプチド化合物に対する最大トロンビンピーク高さの差として実施した。後者のアプローチを、より多くのV_HHポリペプチド誘導体をスクリーニングするために使用した。

【０３５２】

V_HHポリペプチド誘導体の活性をブーストするために、ＣＤＲ変異の最適な組み合わせを最大活性効果を生成するため特定した。実施例５および６に記載されるものなどの結晶構造モデルを使用して、重要なパラトープ残基を特定し、ならびにシステインで置換されるのに適した表面曝露残基をコンジュゲーション部位として特定し、バイオアベイラビリティを増強するためにｐＩ低下置換した。異なるリンカーおよび異なるコンジュゲーションタイプも調査した。以下の表では、これらのパラメータの各々を扱う一連のV_HHポリペプチド誘導体の活性プロファイルが概説され、個別に説明される。

【０３５３】

表１０では、活性ブースト変異に対して最適化された、最適化されたV_HHポリペプチド誘導体から得られた効力EC_{50}値を示す。主要な構成要素の計算アルゴリズムおよびランダムフォレストアルゴリズムを、変異の組み合わせに使用して、活性をブーストした。V_HHポリペプチド（化合物番号２４）は、ブースト変異を有さない初期誘導体であり、このV_HHポリペプチド誘導体およびエミシズマブＳＩＡと比較して、それぞれ最大４０倍および最大７６倍の効力が、開発された最良のV_HHポリペプチド誘導体の中で得ら

れた。

【表１２】

表10:V_HHポリペプチド誘導体のTGT活性、活性の最適化

化合物ID	延長部分PおよびLp (延長部分の数)	pI	TGT活性EC_{50}効力 (nM)
エミシズマブSIA	-	-	113.9
Mim8	-	-	7.8
化合物番号4	P3およびLp1(1)	8.36	4.1
化合物番号6	P2およびLp1(2)	6.56	4.4
化合物番号7	P2およびLp1(2)	5.38	2.4
化合物番号8	P2およびLp1(2)	5.05	2.3
化合物番号9	P2およびLp1(2)	4.97	2.1
化合物番号10	P2およびLp1(2)	5.69	2.7
化合物番号11	P2およびLp1(2)	5.08	2.0
化合物番号12	P2およびLp1(2)	4.89	2.2
化合物番号13	P2およびLp1(2)	4.89	2.7
化合物番号14	P2およびLp1(2)	5.20	2.2
化合物番号15	P2およびLp1(2)	5.20	2.5
化合物番号16	P2およびLp1(2)	5.08	4.5
化合物番号17	P2およびLp1(2)	4.80	4.2
化合物番号18	P2およびLp1(2)	4.97	4.6
化合物番号19	P2およびLp1(2)	5.05	3.8
化合物番号20	P2およびLp1(2)	5.38	3.6
化合物番号21	P2およびLp1(2)	4.80	2.5
化合物番号22	P2およびLp1(2)	5.08	2.6
化合物番号24	P3およびLp1(1)	7.31	87.0
化合物番号69	なし	8.36	1.5

【０３５４】

表１１では、システインとの置換（リンカーＬｐ１を介して結合されたＣ１８二酸脂肪酸延長部分Ｐ３とのコンジュゲーションありおよびなし）後に、ＶＨＨポリペプチドの活性を保持したＶＨＨポリペプチド（ＣＤＲ１－３の外側）上の最適なコンジュゲート部位のスクリーニングが行われた。

【０３５５】

合計９５の表面曝露部位を、Ｃｙｓ置換の導入を用いて試験した。化合物番号２３／２４を基準として使用した連続ナンバリング（ＣＤＲにおけるいかなるブースト変異を含まないＶＨＨポリペプチドを表す）に基づいて、最適なコンジュゲーション部位のスクリーニングを実施した。以下の残基置換を試験した：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、およびＣ末端延長部に導入されたＣｙｓ。

【０３５６】

これらのうち、以下の４１個のＶ$_{H}$Ｈポリペプチドは、ＨＥＫ２９３発現系を使用して発現され、Ｃ１８二酸延長部分を含む試薬Ｃ３と首尾よくコンジュゲートされ得る：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、Ｃ末端延長部に導入されたＣｙｓ。コンジュゲーションありおよびなしのこれら４１個のＶ$_{H}$Ｈポリペプチドを、ＴＧＴアッセイで活性について試験した。コンジュゲーションありおよびなしのＶ$_{H}$Ｈポリペプチド（誘導体）のエミシズマブＳＩＡの最大トロンビンピーク高さに対するＶ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体の最大トロンビンピーク高さとして表される相対活性レベルは、表１１に示す。したがって、以下の９個の部位を、コンジュゲーションの前後に保持された活性に基づいて、例えば、試薬としてＣ３を使用して、延長部分とのコンジュゲーションのための遊離Ｃｙｓの導入に最適であると特定した：Ｃ末端延長部に導入されたＣｙｓ（化合物番号２３／２４）、Ｑ３０Ｃ（化合物番号２５／２６）、Ｖ１５８Ｃ（化合物番号２７／２８）、Ｐ１６０Ｃ（化合物番号２９／３０）、Ｇ１６１Ｃ（化合物番号３１／３２）、Ｇ１８８Ｃ（化合物番号３３／３４）、Ｅ１９０Ｃ（化合物番号３５／３６）、Ｓ２０９Ｃ（化合物番号３７／３８）、およびＳ２３１Ｃ（化合物番号３９／４０）。

【表１３－１】

表11:V_HHポリペプチド誘導体のTGT活性、延長部分コンジュゲーション部位スクリーニング

V_HHポリペプチド誘導体(C末端延長部なしの化合物番号23/24バリアント)Cysコンジュゲーション部位(連続ナンバリング)	TGT活性、最大ピーク比（エミシズマブSIAに対する）
エミシズマブSIA、参照対照	1.0
V_HHポリペプチド_1、C末端リンカー延長部におけるCys　SGGGGSGGGSCHHHHHH(配列番号23)	1.4
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_1	1.3
V_HHポリペプチド_2、Cys置換Q30C	1.8
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_2	1.5
V_HHポリペプチド_3、Cys置換P31C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_3	1.0
V_HHポリペプチド_4、Cys置換E58C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_4	0.5
V_HHポリペプチド_5、Cys置換A78C	2.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_5	0.3
V_HHポリペプチド_6、Cys置換K82C	1.7
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_6	0.4
V_HHポリペプチド_7、Cys置換N91C	2.3
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_7	0.9
V_HHポリペプチド_8、Cys置換S92C	2.3
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_8	0.7
V_HHポリペプチド_9、Cys置換Q99C	2.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_9	1.2
V_HHポリペプチド_10、Cys置換R104C	1.7
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_10	0.6
V_HHポリペプチド_11、Cys置換G156C	0.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_11	0.2
V_HHポリペプチド_12、Cys置換V158C	1.6
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_12	1.4
V_HHポリペプチド_13、Cys置換Q159C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_13	1.4
V_HHポリペプチド_14、Cys置換P160C	2.0

【表１３－２】

C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_14	1.9
V_HHポリペプチド_15、Cys置換G161C	1.8
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_15	1.6
V_HHポリペプチド_16、Cys置換G162C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_16	1.3
V_HHポリペプチド_17、Cys置換S163C	1.8
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_17	1.4
V_HHポリペプチド_18、Cys置換A169C	2.0
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むVHV_HH　Hポリペプチド_18	1.0
V_HHポリペプチド_19、Cys置換S171C	2.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_19	0.8
V_HHポリペプチド_20、Cys置換Q185C	1.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_20	0.3
V_HHポリペプチド_21、Cys置換A186C	1.0
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_21	0.4
V_HHポリペプチド_22、Cys置換P187C	2.2
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_22	1.6
V_HHポリペプチド_23、Cys置換G188C	2.0
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_23	1.8
V_HHポリペプチド_24、Cys置換K189C	1.7
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_24	0.4
V_HHポリペプチド_25、Cys置換E190C	1.8
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_25	1.5
V_HHポリペプチド_26、Cys置換A207C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_26	1.4
V_HHポリペプチド_27、Cys置換D208C	2.3
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_27	1.5
V_HHポリペプチド_28、Cys置換S209C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_28	1.7
V_HHポリペプチド_29、Cys置換V210C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_29	1.5
V_HHポリペプチド_30、Cys置換T215C	1.9

【表１３－３】

C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_30	1.2
V_HHポリペプチド_31、Cys置換S217C	1.8
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_31	1.2
V_HHポリペプチド_32、Cys置換D219C	1.8
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_32	1.0
V_HHポリペプチド_33、Cys置換N220C	2.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_33	0.8
V_HHポリペプチド_34、Cys置換S221C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_34	0.7
V_HHポリペプチド_35、Cys置換K222C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_35	1.1
V_HHポリペプチド_36、Cys置換S231C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_36	1.9
V_HHポリペプチド_37、Cys置換R233C	1.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_37	1.4
V_HHポリペプチド_38、Cys置換Q56C	1.1
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_38	0.3
V_HHポリペプチド_39、Cys置換A57C	0.9
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_39	0.4
V_HHポリペプチド_40、Cys置換K60C	1.7
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_40	0.4
V_HHポリペプチド_41、Cys置換D79C	1.7
C18二酸脂肪酸コンジュゲーションを含むV_HHポリペプチド_41	0.7

【０３５７】

２つの抗ＦＩＸおよび抗ＦＸ　V_HH断片の間に組み換え的に融合された異なるリンカーＬ$_{1-2}$の試験を行って、組成物を最適化した（表１２を参照）。V_HHポリペプチドのエミシズマブＳＩＡの最大トロンビンピーク高さに対するV_HHポリペプチドの最大トロンビンピーク高さとして表される相対活性レベルを、表１２に示す。これらのデータから、疎水性組成物のリンカーを有するV_HHポリペプチドは、概して最も高い相対活性を示したが、酸性または親水性組成物のリンカーを有するV_HHポリペプチドは、最も低い活性を示した。ＱＡＰＧＱＡ、ＧＱＡＰＧＱ、または類似のものから構成される混合組成物のリンカーを有するV_HHポリペプチドは、中級の相対活性を示した。最適なリンカー組成物は、好ましくは、親水性アミノ酸および疎水性アミノ酸の両方を含有するため、ＱＡＰＧＱＡリンカーを、例えば、等張性緩衝液および中性ｐＨで、３７℃で２週間、加速ストレス条件下で、高い安定性を示すＭＳ分析を使用して、化学的安定性についてさらに調査した。

【０３５８】

したがって、「４０～６０％」対「６０～４０％」の疎水性アミノ酸対親水性アミノ酸の比が好ましい。示されるV_HHポリペプチドは全て、ＣＤＲ変異をブーストする活性の同じセットを含んでいたが、ＣＤＲの外側のｐＩ低下変異の異なるセットを含んでいた。

【表１４】

表12:異なるリンカーL_{1-2}特性を有するV_HHポリペプチド配列のTGT活性

V_HHポリペプチドID	リンカー(L_{1-2})配列	TGT活性、最大ピーク比 (エミシズマブSIAに対する)
エミシズマブSIA		1.0
化合物番号41	QAPGQA	5.2
化合物番号42	GIGIGIGIGI	5.5
化合物番号43	GTGTGTGTGT	3.7
化合物番号44	GVGVGVGVGV	5.7
化合物番号45	GQAPGQ	4.9
化合物番号46	GGGGSGGGS	5.0
化合物番号47	QAPGQA	5.4
化合物番号48	GLGLGLGLGL	7.0
化合物番号49	GTGTGTGTGT	4.4
化合物番号50	GVGVGVGVGV	5.6
化合物番号51	GGGGSGGGS	4.1
化合物番号52	QAPGQA	4.9
化合物番号53	GEGEGEGEGE	3.1
化合物番号54	GLGLGLGLGL	5.6
化合物番号55	GTGTGTGTGT	4.9
化合物番号56	GVGVGVGVGV	5.6
化合物番号57	GQAPGQ	6.9

【０３５９】

実施例９：経口投与に好適な剤形のＳＮＡＣおよびＮＡＭを有する抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（Ａ）V_HHポリペプチド誘導体の製剤化

賦形剤として、Ｎ－（８－［２－ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリル酸ナトリウム（ＳＮＡＣ）およびニコチンアミド（ＮＡＭ）を含む液体製剤を使用する経口研究のために調製するために、以下の手順に従った。ＳＮＡＣを計量して２００ｍｇ／ｍｌの濃度が得られ、ＮＡＭを計量して１Ｍの濃さが得られ、ＨＥＰＥＳ緩衝液を計量して５ｍＭの最終濃度が得られた。粉末をガラスバイアルに移し、それに応じてＭｉｌｌｉＱ－H_2Oを添加した。溶液を、ＳＮＡＣ、ＮＡＭ、およびステアリン酸マグネシウムが溶解されるまで、マグネチックスターラーで撹拌した。ｐＨを測定し、２Ｍ　ＮａＯＨでｐＨ８に調整した。したがって、精製およびコンジュゲートされた２～５ｍｇ／ｍｌのV_HHポリペプチド誘導体のバッチは、２００ｍｇ／ｍｌのＳＮＡＣおよび１Ｍ　ＮＡＭ最終濃度で製剤化された液体であった。

【０３６０】

ＳＮＡＣおよびＮＡＭを有する錠剤を使用した経口研究のために準備するために、以下の手順に従った。脂肪酸延長因子コンジュゲーションありまたはなしの精製されたV_HHポリペプチド（誘導体）のバッチを、ＭｉｌｌｉＱ－H_2Oに緩衝液交換し、０．１Ｍ　ＮａＯＨまたは０．１Ｍギ酸のいずれかを用いて８．０にｐＨを調整した。ＭｉｌｌｉＱ－H_2O中に溶解されたV_HHポリペプチド（誘導体）は、０．５～４ｍｇ／ｍｌの濃度であった。V_HHポリペプチド（誘導体）の噴霧乾燥を、Ｍｉｎｉ　Ｓｐｒａｙ　Ｄｒｙｅｒ　Ｂ２９０（ＢＵＣＨＩ）を使用して、以下で実施した：ポンプ設定５～６、供給流量：２ｍｌ／分、入口温度：８０～８５℃、出口温度：４５～５０℃、ノズル：１．５ｍｍ、および吸引：１００％。

【０３６１】

錠剤を調製するために、粉末を混合して所望の組成物を得た。以下の錠剤製剤を調製した。

【表１５】

製剤番号1	
V_HHポリペプチド(誘導体):	10～20mg
SNAC:	300mg
NAM:	0mg
ステアリン酸マグネシウム:	5.5mg

【表１６】

製剤番号2	
V_HHポリペプチド誘導体:	10～20mg
SNAC:	300mg
NAM:	200mg
ステアリン酸マグネシウム:	5.5mg

【表１７】

製剤番号3	
V_HHポリペプチド誘導体:	20mg
SNAC:	150mg
NAM:	100mg
ステアリン酸マグネシウム:	1.25mg

【０３６２】
混合した粉末を計量し、Ｋｉｌｉａｎ　Ｓｔｙｌｅ　Ｏｎｅ（Ｒｏｍａｃｏ）を使用して、パンチ設定で均質な錠剤にパンチして、回転プレスをシミュレートした。
【０３６３】
実施例１０：異なるＰＩ変化変異を有する抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体を使用したラットにおける経口および静脈内薬物動態研究
本研究の目的は、経口バイオアベイラビリティなどの薬物動態パラメータに対する、抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体におけるｐＩ変化変異の効果を調査することであった。
【０３６４】
抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体の液体製剤を、静脈内（ＩＶ）（ＩＶ製剤：２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）に投与するか、または実施例９に従って調製し、研究の少なくとも１週間前に社内で順化させ、かつ標準的な食品および水への自由なアクセスを有するグループケージで維持したスプラーグドーリーラットの並行群に経口強制飼養により投与した。経口投与のためのラットを、投与前日の午後２時頃から（合計１８時間）、グリッド底ケージ内で、水への自由なアクセスとともに絶食させた。投与日に、全てのラットを処置室で３０分間順化させた。
【０３６５】
血液試料は、投与の直前に、およびその後、投与後のいくつかの異なる時点で収集した。経口（ＰＯ）投与された動物は、投与後４時間までグリッド底ケージ内で絶食を維持した。V_HHポリペプチド誘導体の血漿濃度は、ガンマ－Ｇｌｕに基づく免疫アッセイを使用して測定され、そこで、試験分子の延長部分に対する抗V_HH抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）および抗ガンマ－Ｇｌｕ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を使用した。ここで、９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（Ｎｕｎｃ、４３９４５４）を、２μｇ／ｍｌの抗ガンマ－Ｇｌｕ抗体で被覆し、ＰＢＳ、０．０５％ｔｗｅｅｎ２０、１％ＢＳＡ（ｐＨ７．４）を使用して洗浄および遮断した。洗浄工程後、１％ラットＥＤＴＡ血漿および最小希釈１００倍でのラットＥＤＴＡ血漿試料中の化合物特異的キャリブレーター（０、２．７、８．２、２４．７、７４、２２２、６６７、２００ｐＭ）をプレート上でインキュベートし、ここで、V_HHポリペプチド誘導体をガン

マ－Ｇｌｕ延長部分を介して捕捉した。追加の洗浄工程の後、社内ビオチン化ＶＨＨ特異的抗体をプレートに添加し（０．５ｎＭ）、サンドイッチＥＬＩＳＡを作り出した。最後の洗浄工程の後、検出試薬としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）－ストレプトアビジンをプレートに添加した。ＶＨＨポリペプチド誘導体に結合したビオチン標識化抗体の量は、発色基質（例えば、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）を添加した後に検出された。光学密度を、分光計（例えば、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）Ｍ２分光計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ））を使用して測定した。応答は、ペルオキシダーゼの濃度に比例し、これは再びＶＨＨポリペプチド誘導体の濃度に比例した。これらの曝露データに基づいて、Ｐｈｏｅｎｉｘ　ＷｉｎＮｏｎｌｉｎまたはオープンソースの統計解析ソフトウェアＲ（パッケージ「ＮｏｎＣｏｍｐａｒｔ」）のいずれかを使用して、ノンコンパートメント薬物動態パラメータを計算した。

【０３６６】

ＣＤＲの外側の表面曝露残基で導入された以下のｐＩ低下置換Ｔ２８Ｄ、Ｋ４３Ｑ、Ｋ６５Ｑ、Ｎ８４Ｄ、Ｒ１４８Ｑ、Ｎ１５９Ｄ、Ｋ１７２Ｑ、Ｋ１９４Ｑ、およびＮ２１３Ｄ（テンプレートとして化合物番号４を使用した連続ナンバリングに基づく）を、異なる組み合わせで試験し（ＶＨＨポリペプチド誘導体（化合物番号５９～６４および化合物番号５）につながる）、非ｐＩ調整ＶＨＨポリペプチド誘導体（化合物番号４）を比較した。

【０３６７】

結果は、以下の表１３および１４にＶＨＨ誘導体について示し、経口バイオアベイラビリティに対するｐＩ低下の効果を示す。

【０３６８】

ｐＩを約８．３６から５．８５まで低下させることで、バイオアベイラビリティが５～１０倍増加した（表１３を参照）。

【０３６９】

半減期に対するｐＩ低下の効果は観察されなかった（表１４を参照）。

【表１８】

表13:POラットモデルで試験された操作されたpI変異を有するVHHポリペプチド誘導体の経口バイオアベイラビリティデータ

誘導体ID	延長因子、コンジュゲーション部位	pI	N (PO群)	PO用量 (nmol/kg)	POバイオアベイラビリティ (%)
化合物番号4	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	8.36	6	338	0.02
化合物番号59	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.57	7	214～230	0.04
化合物番号5	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.56	7	215～233	0.07
化合物番号60	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.42	7	166～167	0.14
化合物番号61	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.42	7	166～167	0.10
化合物番号62	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.09	7	190～208	0.19
化合物番号63	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.09	7	166～167	0.15
化合物番号64	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	5.85	6	338	0.12

【表１９】

表14:IVラットモデルで試験された操作されたpI変異を有するVHHポリペプチド誘導体のPKデータ

誘導体ID	延長因子、コンジュゲーション部位	pI	N (IV群)	IV用量 (nmol/kg)	IV MRTHL* (日)
化合物番号4	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	8.36	3	6.7	0.51
化合物番号59	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.57	3	6.6	0.51
化合物番号5	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.56	3	6.6	0.53
化合物番号60	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.42	3	6.6	0.57
化合物番号61	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.42	3	6.6	0.57
化合物番号62	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.09	3	6.6	0.72
化合物番号63	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.09	3	6.6	0.43
化合物番号64	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	5.85	3	6.7	0.48

*MRTHL:平均滞留時間終末相半減期。MRTHLは、MRT*ln(2)として計算される。

【０３７０】

実施例１１：ラットにおける静脈内薬物動態研究：異なる延長因子を有する抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド（誘導体）

本研究の目的は、V_HHポリペプチド誘導体上の半減期などの薬物動態パラメータに対する、異なる延長因子の効果を調査することであった。

【０３７１】

実施例９に従って調製された抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）V_HHポリペプチド誘導体の液体製剤を、研究の少なくとも１週間前に社内で順化させ、かつ標準的な食品および水への自由なアクセスを有するグループケージで維持したスプラーグドーリーラットの並行群に静脈

内（ＩＶ）投与した。経口投与のためのラットを、投与前日の午後２時頃から（合計１８時間）、グリッド底ケージ内で、水への自由なアクセスとともに絶食させた。投与日に、全てのラットを処置室で３０分間順化させた。血液試料は、投与の直前に、およびその後、投与後のいくつかの異なる時点で収集した。V_HHポリペプチド（誘導体）の血漿濃度は、Ｈｉｓタグまたはガンマ－Ｇｌｕに基づく免疫アッセイを使用して測定し、ここで、V_HHポリペプチド誘導体に対する抗V_HH抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ）を、試験分子に融合されたＨｉｓタグに対する抗Ｈｉｓタグ抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ＭＡＢ０５０）、または試験分子の延長部分に対する抗ガンマ－Ｇｌｕ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）と一緒に使用した。２つの免疫アッセイセットアップは、同様の感受性を有し、後者は、V_HHポリペプチド化合物が分子にＨｉｓタグを融合していない場合に使用した。９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（Ｎｕｎｃ、４３９４５４）を、Ｈｉｓタグまたは抗ガンマ－Ｇｌｕ抗体で被覆し、ＰＢＳ、０．０５％ｔｗｅｅｎ２０、１％ＢＳＡ（ｐＨ７．４）を使用して洗浄および遮断した。洗浄工程後、１％ラットＥＤＴＡ血漿および最小希釈１００倍でのラットＥＤＴＡ血漿試料中の誘導体特異的キャリブレーター（０、２．７、８．２、２４．７、７４、２２２、６６７、２０００ｐＭ）をプレート上でインキュベートし、ここで、V_HHポリペプチド誘導体をそのＨｉｓタグまたはガンマ－Ｇｌｕ延長部分を介して捕捉した。追加の洗浄工程の後、社内ビオチン化V_HH特異的抗体をプレートに添加し（０．５ｎＭ）、サンドイッチＥＬＩＳＡを作り出した。最後の洗浄工程の後、検出試薬としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）－ストレプトアビジンをプレートに添加した。V_HHポリペプチド誘導体に結合したビオチン標識化抗体の量は、発色基質（例えば、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）を添加した後に検出された。光学密度読み取りを、分光計（例えば、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）Ｍ２分光計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ））を使用して測定した。応答は、ペルオキシダーゼの濃度に比例し、これは再びV_HHポリペプチド誘導体の濃度に比例した。これらの曝露データに基づいて、Ｐｈｏｅｎｉｘ　ＷｉｎＮｏｎｌｉｎまたはオープンソースの統計解析ソフトウェアＲ（パッケージ「ＮｏｎＣｏｍｐａｒｔ」）のいずれかを使用して、ノンコンパートメント薬物動態パラメータを計算した。

【０３７２】

異なる延長因子タイプを有するV_HHポリペプチド誘導体の結果を、以下の表１５に示す。結果は、平均滞留時間終末相半減期（ＭＲＴＨＬ）に対して異なる脂肪酸およびアルブミン結合ペプチドを延長因子として使用する効果を示す。

【０３７３】

Ｃ１８、Ｃ２０、およびテトラゾール脂肪酸側鎖コンジュゲーションを有するV_HHポリペプチド誘導体（化合物番号６６、化合物番号６７、および化合物番号６８：３～４倍増加）について、ならびにアルブミンバインダーペプチドとV_HHポリペプチドとの間にＣ末端融合した３０残基長のＧｌｙＳｅｒ　Ｌｐリンカーを使用する最適な効果を伴うアルブミンバインダーペプチド延長因子融合を有するV_HHポリペプチド誘導体（化合物番号７０、化合物番号７１、化合物番号７２、および化合物番号７３：１．９～３．６倍増加）について、非延長ポリペプチドと比較して増加された半減期が観察された。短いＣ１２脂肪酸を有するV_HHポリペプチド誘導体（化合物番号６５）は、最も低い半減期を示した。これは、V_HHポリペプチド誘導体の最適な延長を得るために、延長された半減期の循環のために、Ｃ１２よりも長い脂肪酸が好ましいことを示す（例えば、Ｃ１６、Ｃ１８、またはＣ２０など）。

【表２０】

表15:IVラットモデルで試験された異なる延長因子を有するVHHポリペプチドのPKデータ

誘導体ID	延長因子およびコンジュゲーション部位	pI	N (IV群)	IV用量 (nmol/kg)	IV MRTHL* (日)
化合物番号64	延長因子なし	7.11	5	6.5	0.19
化合物番号65	C12二酸、C末端Cysコンジュゲーション	7.74	5	6.6	0.11
化合物番号66	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	7.74	5	6.6	0.63
化合物番号67	C20二酸、C末端Cysコンジュゲーション	7.74	5	6.6	0.75
化合物番号68	テトラゾール二酸、C末端Cysコンジュゲーション	7.74	5	6.6	0.71
化合物番号69	延長因子なし	8.36	3	6.9	0.13
化合物番号4	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	8.36	3	6.7	0.51
化合物番号70	アルブミン結合ペプチド、10-GlySerリンカー、N末端融合	7.11	2	6.7	0.36
化合物番号71	アルブミンバインダーペプチド、30-GlySerリンカー、N末端融合	7.11	2	6.7	0.34
化合物番号72	アルブミンバインダーペプチド、10-GlySerリンカー、C末端融合	7.18	2	6.7	0.36
化合物番号73	アルブミンバインダーペプチド、30-GlySerリンカー、C末端融合	7.18	2	6.7	0.70

*MRTHL：平均滞留時間終末相半減期。MRTHLは、MRT*ln(2)として計算される。

【０３７４】

実施例１２：イヌにおける経口および静脈内薬物動態研究：ＳＮＡＣおよびＮＡＭで製剤化された抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド（誘導体）

本研究の目的は、半減期に対する脂肪酸延長の増殖の効果と、ｐＩの低下が経口バイオアベイラビリティの増強につながるかどうかを調査することであった。

【０３７５】

抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド（誘導体）の適切な製剤を、静脈内に投与するか、または錠剤として調製し、それぞれビーグル犬の群に経口投与した。イヌに、一晩の絶食後に朝に投与し、単回投与後３～５時間絶食を維持させた。経口研究のサブセット

§において、イヌに、経口投与の１０分前に約３ｎｍｏｌ／ｋｇのグルカゴンの皮下投与を与えた。血液試料は、投与の直前に、およびその後、投与後のいくつかの異なる時点で収集した。V_HHポリペプチドの血漿濃度は、Ｈｉｓタグに基づくまたはガンマ－Ｇｌｕ－リンカーに基づく免疫アッセイを使用して測定し、ここで、V_HHポリペプチドに対する抗V_HH抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を、試験分子に融合されたＨｉｓタグに対する抗Ｈｉｓタグ抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ＭＡＢ０５０）、または試験分子の延長部分に対する抗ガンマ－Ｇｌｕ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）と一緒に使用した。２つの免疫アッセイセットアップは、同様の感受性を有し、後者は、V_HHポリペプチド化合物が分子にＨｉｓタグを融合していない場合に使用した。９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（Ｎｕｎｃ、４３９４５４）を、抗体で被覆し、ＰＢＳ、０．０５％ｔｗｅｅｎ２０、１％ＢＳＡ（ｐＨ７．４）を使用して洗浄および遮断した。洗浄工程後、１％イヌＥＤＴＡ血漿および最小希釈１００倍でのイヌＥＤＴＡ血漿試料中の化合物特異的キャリブレーター（０、２．７、８．２、２４．７、７４、２２２、６６７、２０００ｐＭ）をプレート上でインキュベートし、ここで、V_HHポリペプチド化合物をそのＨｉｓタグまたはガンマ－Ｇｌｕリンカーモチーフを介して捕捉した。追加の洗浄工程の後、社内ビオチン化V_HH特異的抗体をプレートに添加し（０．５ｎＭ）、サンドイッチＥＬＩＳＡを作り出した。最後の洗浄工程の後、検出試薬としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）－ストレプトアビジンをプレートに添加した。V_HHポリペプチド化合物に結合したビオチン標識化抗体の量は、発色基質（例えば、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）を添加した後に検出された。光学密度読み取りを、分光計（例えば、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）Ｍ２分光計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ））を使用して測定した。応答は、ペルオキシダーゼの濃度に比例し、これは再びV_HHポリペプチド化合物の濃度に比例した。これらの曝露データに基づいて、Ｐｈｏｅｎｉｘ　ＷｉｎＮｏｎｌｉｎまたはオープンソースの統計解析ソフトウェアR（パッケージ「ＮｏｎＣｏｍｐａｒｔ」）のいずれかを使用して、ノンコンパートメント薬物動態パラメータを計算した。

【０３７６】

§は、イヌに、経口投与の１０分前に約３ｎｍｏｌ／ｋｇのグルカゴンの皮下投与を示す。

【０３７７】

結果は、３つのＣ１８二酸コンジュゲートV_HHポリペプチド誘導体について以下の表１６および１７に示され、

ａ）半減期に対する脂肪酸延長の効果、および

ｂ）ｐＩの低下が経口バイオアベイラビリティの増強につながることを確認する。

【０３７８】

したがって、V_HHポリペプチド誘導体が非延長化合物と比較して示された脂肪酸とコンジュゲートされたときに、イヌにおいて観察された半減期は、３７０～７１０倍増加した。Ｃ末端リンカー中の２つのＣ１６二酸脂肪酸コンジュゲーションを有する化合物（化合物番号６）は、約７．６日の半減期の最も高い増加を示した。

【０３７９】

イヌでは、ＳＮＡＣ：ＮＡＭ製剤は、ＳＮＡＣ製剤単独と比較して、経口バイオアベイラビリティを２～８倍増加させた。したがって、ＮＡＭを経口製剤に添加することは、経口バイオアベイラビリティを臨床的に関連するレベル、すなわち約０．１％以上のレベルにすることを可能にする顕著な効果を有した。

【０３８０】

全体として、効力、平均滞留時間、および経口バイオアベイラビリティを考慮すると、本明細書に開示されるV_HHポリペプチド誘導体は、経口投与されたときに、インヒビターが存在する、もしくは存在しない血友病Ａの治療、および後天性血友病Ａの治療に有用であることが予想されるであろう。

【表２１】

表16:イヌモデルで試験された操作されたpI変異および脂肪酸側鎖コンジュゲーションを有するV_HHポリペプチド(誘導体)の経口バイオアベイラビリティデータ

誘導体ID	延長因子、コンジュゲーション部位	pI	N (PO群)	PO製剤	PO用量 (nmol/kg)	POバイオアベイラビリティ(%)
化合物番号4	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	8.36	7	「製剤番号1」	83～216	0.02
化合物番号74§	延長因子なし	7.74	6	「製剤番号1」	86	0.05
化合物番号61	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.09	7	「製剤番号2」	114～225	0.16
化合物番号63	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	5.85	7	「製剤番号2」	132～249	0.13
化合物番号6§	x2 C16二酸、C末端Cysコンジュゲーション	5.61	5	「製剤番号2」	99～152	0.09
化合物番号15§	x2 C16二酸、C末端Cysコンジュゲーション	4.89	6	「製剤番号3」	54～71	0.24

【表２２】

表17:IVイヌモデルで試験された操作されたpI変異および脂肪酸側鎖コンジュゲーションを有するVHHポリペプチドのPKデータ

誘導体ID	延長因子、コンジュゲーション部位	pI	N (IV群)	IV用量(nmol/kg)	IV MRTHL* (日)
化合物番号4	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	8.36	2	6.5～6.9	3.7
化合物番号74	延長因子なし	7.74	3	1.9～2.0	<0.01
化合物番号61	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	6.09	2	6.5～6.6	4.5
化合物番号63	C18二酸、C末端Cysコンジュゲーション	5.85	2	6.6～6.7	4.5
化合物番号6	x2 C16二酸、C末端Cysコンジュゲーション	5.61	3	1.7～2.3	7.1
化合物番号15	x2 C16二酸、C末端Cysコンジュゲーション	4.89	2	2.6	4.1

*MRTHL：平均滞留時間終末相半減期。MRTHLは、MRT*ln(2)として計算される。

【０３８１】

実施例１３：ブタにおける静脈内薬物動態研究：Ｃ１８コンジュゲート抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド（誘導体）

本研究の目的は、Ｃ１８二酸延長因子基を有するかまたは有さないＶＨＨポリペプチド（誘導体）の薬物動態効果を調査することであった。

【０３８２】

抗ＦＸ／ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド（誘導体）の適切な製剤を、ミニブタ（Ｓｕｓ ｓｃｒｏｆａ ｄｏｍｅｓｔｉｃｕｓ）群にそれぞれ静脈内（ＩＶ）および皮下（ＳＣ）投与した。血液試料は、投与の直前に、およびその後、投与後のいくつかの異なる時点

で収集した。V_HHポリペプチド（誘導体）の血漿濃度は、Ｈｉｓタグに基づくまたはガンマ－Ｇｌｕに基づく免疫アッセイを使用して測定し、ここで、V_HHポリペプチド（誘導体）に対する抗V_HH抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ）を、試験分子に融合されたＨｉｓタグに対する抗Ｈｉｓタグ抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、ＭＡＢ０５０）、または試験分子の延長部分に対する抗ガンマ－Ｇｌｕ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）と一緒に使用した。２つの免疫アッセイセットアップは、同様の感受性を有し、後者は、V_HHポリペプチド化合物が分子にＨｉｓタグを融合していない場合に使用した。９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレート（Ｎｕｎｃ、４３９４５４）を、Ｈｉｓタグまたは抗ガンマ－Ｇｌｕ抗体で被覆し、ＰＢＳ、０．０５％ｔｗｅｅｎ２０、１％ＢＳＡ（ｐＨ７．４）を使用して洗浄および遮断した。洗浄工程後、１％ブタＥＤＴＡ血漿および最小希釈１００倍でのブタＥＤＴＡ血漿試料中の誘導体特異的キャリブレーター（０、２．７、８．２、２４．７、７４、２２２、６６７、２０００ｐＭ）をプレート上でインキュベートし、ここで、V_HHポリペプチド誘導体をそのＨｉｓタグまたはガンマ－Ｇｌｕ延長部分を介して捕捉した。追加の洗浄工程の後、社内ビオチン化V_HH特異的抗体をプレートに添加し（０．５ｎＭ）、サンドイッチＥＬＩＳＡを作り出した。最後の洗浄工程の後、検出試薬としてセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）－ストレプトアビジンをプレートに添加した。V_HHポリペプチド誘導体に結合したビオチン標識化抗体の量は、発色基質（例えば、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）を添加した後に検出された。光学密度読み取りを、分光計（例えば、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）Ｍ２分光計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ））を使用して測定した。応答は、ペルオキシダーゼの濃度に比例し、これは再びV_HHポリペプチド誘導体の濃度に比例した。オープンソースの統計解析ソフトウェアＲ（パッケージ「ＮｏｎＣｏｍｐａｒｔ」）を使用して、ノンコンパートメント薬物動態パラメータを計算した。実施例１１、１２、および１３で観察されたように、半減期延長について脂肪酸延長因子コンジュゲーションの半減期に対する効果を確認する脂肪酸延長因子を有するおよび有さないV_HHポリペプチドについて、結果を以下の表１８に示す。

【０３８３】

したがって、V_HHポリペプチドが非延長V_HH化合物と比較して脂肪酸Ｃ１８二酸延長因子とコンジュゲートされたときに、ブタにおいて観察された半減期は、約１５～２０倍増加した。

【表２３】

表18:ブタモデルで試験された操作されたpI変異および脂肪酸延長因子コンジュゲーションを有するVHHポリペプチドのPKデータ

誘導体ID	延長因子、コンジュゲーション部位	pI	N (IV群またはSC群)	用量 (nmol/kg)	IV MRTHL* (日)
化合物番号75	延長因子なし	8.95	3(SC)	30	0.59
化合物番号75	延長因子なし	8.95	2(IV)	30	0.24
化合物番号4	C18二酸、C末端Cys	8.36	3(IV)	5.3	3.6
化合物番号63	C18二酸、C末端Cys	5.85	3(IV)	4.8	4.7

*MRTHL：平均滞留時間終末相半減期。MRTHLは、MRT*ln(2)として計算される。

【０３８４】

実施例１４：マウス尾静脈切断（ＴＶＴ）出血モデルにおける最適化された抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）ポリペプチド誘導体の薬力学効果

インビボ有効性を、中等度出血のＨＡマウスモデルで試験した。ＴＶＴモデルでは、ＦＶＩＩＩ投与が野生型マウスで観察されたのと同じレベルに出血を低減することが以前に示されている。化合物の精巣のマウス交差種反応性の欠如を克服するために、ＨＡマウスに、出血実験の前にヒトＦＩＸおよびＦＸを補充した。出血期間の終了時に、総失血を、分光光度ヘモグロビン測定によって決定した。示されたＶ$_{H}$Ｈポリペプチド誘導体およびＦＩＸの血漿レベルは、それぞれ抗Ｖ$_{H}$Ｈ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ

）および抗ガンマＧｌｕ－リンカー抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）および抗ＦＩＸ抗体（ＬＳ－Ｂ７２２６、ＬＳＢｉｏ、およびＦＩＸ－２Ｆ２４、社内クローン）を使用した発光酸素チャンネリングアッセイによって定量化した。ＦＸレベルを、市販のＦＸ　ＥＬＩＳＡ（ＫＳＰ１３４、Ｎｏｒｄｉｃ　Ｂｉｏｓｉｔｅ）によって定量化した。示されたＶＨＨポリペプチド誘導体を用いた用量応答試験から、共有プラトー値（＞０）を有する３パラメータ逆対数（用量）応答方程式にデータを適合させることによって、ＥＣ５０値を決定した。１％のＲＯＵＴ係数を有する自動外れ値除去を適用し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン９．０．１）を使用すること（失血）によって、平方和を加重した。

【０３８５】

用量応答試験は、表１９に示されるように、それぞれビヒクル群および野生型非血友病群と比較して、試験されたＶＨＨポリペプチド誘導体について野生型マウスで観察された失血レベルに達する、失血の有意な低減を示した。ＥＣ５０有効用量範囲の推定値は、表２０に掲示され、試験した３つの化合物全てについて、１ｋｇ用量当たりの低ｎモルで５０％の効果が観察されたため、高い効力を示す。

【表２４】

表19:TVT出血マウスモデルにおける抗FX/抗FIX(a)ポリペプチド誘導体の効果

誘導体番号/用量(μモル/kg)	出血時間（分、平均±標準偏差、n=6）	失血（nモル、平均±標準偏差、n=6）
ビヒクル	21.0±3.5	4594±1326
野生型、非血友病	5.4±0.4	879±438
化合物番号4		
0.003μモル/kg	25.8±3.0	6979±1281
0.005μモル/kg	23.2±6.7	6204±1496
0.006μモル/kg	19.7±11.2	5232±3698
0.010μモル/kg	13.9±8.7	2973±2973
0.013μモル/kg	11.0±8.6	2264±2264
化合物番号6		
0.003μモル/kg	26.4±4.4	7445±1053
0.005μモル/kg	18.4±6.7	5143±1861
0.006μモル/kg	11.8±9.6	3771±3374
0.010μモル/kg	19.2±10.9	4532±3277
0.013μモル/kg	7.1±4.3	1024±1050
化合物番号15		
0.0065μモル/kg	9.5±7.3	2408±2391
0.0065μモル/kg	14.8±8.3	4545±2417
0.0097μモル/kg	7.0±4.7	1223±1163
0.0129μモル/kg	6.9±1.7	1438±798

【表２５】

表20:TVT出血マウスモデルからの抗FX/抗FIX(a)ポリペプチド誘導体のEC_{50}推定値

誘導体ID	出血時間EC_{50}（μモル/kg）	失血EC_{50}（μモル/kg）
化合物番号4	0.0097	0.0094
化合物番号6	0.0077	0.0087
化合物番号15	0.0047	0.0060

【０３８６】

実施例１５：経口投与後の最適化された抗ＦＸ／抗ＦＩＸ（ａ）ＶＨＨポリペプチド誘導体のエクスビボ活性の決定

化合物番号６のＰＯ投与を特徴付けるための実施例１２からの野生型イヌにおける薬物

動態（ＰＫ）研究に続いて、投与後３０分および９０分で、２つの別個の時点で発色活性を決定した。測定されたＦＶＩＩＩ模倣発色活性を、化合物番号６の血漿曝露と比較し、ＰＯ投与後の血清中の活性V_HHポリペプチド誘導体の割合を決定した。

【０３８７】

化合物番号６の発色活性を、市販のＦＶＩＩＩ発色活性アッセイ（ＦＶＩＩＩ：Ｃ、Ｈｙｐｈｅｎ　Ｂｉｏｍｅｄ、Ｆｒａｎｃｅ）を使用して決定し、イヌ血清試料を分析した。較正曲線については、化合物番号６を１０％イヌ血清にスパイク、血清試料を、同じアッセイを使用して１０倍希釈で分析した。最終活性の結果を、１０倍希釈に対して１０倍で補正した。化合物番号６の血漿曝露レベルを、抗V_HH（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）および抗ガンマＧｌｕ－リンカー抗体（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を使用した発光酸素チャンネリング（ＬＯＣＩ）アッセイによって定量化した。データを表２１に要約する。ＦＶＩＩＩ：Ｃ発色活性は、投与後３０分および９０分で、血清で測定可能であり、発色活性に基づく化合物番号６の定量化は、ＬＯＣＩアッセイを使用した化合物番号６の血漿曝露測定値に基づく推定と類似している。化合物番号６の定量化におけるいかなる不一致も、アッセイ感度の差異によって引き起こされると予測される。データは、ＰＯ投与されたV_HHポリペプチド誘導体が、イヌにおける経口取り込み時に完全に活性であることを示し、例えば、血友病Ａを患う患者を治療するための経口的に利用可能なＦＶＩＩＩ模倣薬を作製する概念が可能であることを示す。

【表２６】

表21:PO投与後の抗FX/抗FIX(a)ポリペプチド誘導体のエクスビボ活性

経口投与後の時間	動物	FVIII:C発色活性（pM、血清）	化合物番号6の曝露（pM、血漿）	活性/曝露比%
30分	動物1	633	414	153%
	動物2	1740	905	192%
	動物3	445	247	180%
	動物4	1930	1490	129%
90分	動物1	1640	1290	127%
	動物2	3820	3130	122%
	動物3	2470	2110	117%
	動物4	7920	6550	121%

【０３８８】

実施例１６：抗ＦＸ　ＶＨＨ断片（化合物番号７６）の結晶化およびパラトープ／エピトープマッピング

本研究の目的は、化合物番号７６と指定されたV_HH断片（ＶＨＨ－１．１５）のパラトープ残基およびエピトープ残基を決定することであった。

【０３８９】

結晶化

実施例４で特定されたヒトＦＸ（Ａｐｉｇｅｎｅｘから購入）の活性化ペプチド配列ａａ３１～３７に対応する、合成ペプチドＮ末端－ＮＰＦＤＬＬＤ－Ｃ末端と１：４のモル比で混合されたＣＨＯを使用して生産されたV_HH断片（化合物番号７６）の結晶を、シッティングドロップ蒸気拡散技法を使用して成長させた。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５０ｍＭ　ＮａＣｌ中の２５０ｎｌの５．７５ｍｇ／ｍｌ複合体のタンパク質溶液を、２５０ｎｌの４％（ｖ／ｖ）Ｔａｃｓｉｍａｔｅ（１．８３０５Ｍマロン酸、０．２５Ｍ三塩基性クエン酸アンモニウム、０．１２Ｍコハク酸、０．３Ｍ　ＤＬ－リンゴ酸、０．４Ｍ酢酸ナトリウム三水和物、０．５Ｍギ酸ナトリウム、および０．１６Ｍ二塩基性酒石酸アンモニウム）（ｐＨ５．０）、１２％（ｗ／ｖ）　ポリエチレングリコール３３５０（沈殿剤として）と混合し、８０μｌの沈殿剤でインキュベートした。１８℃で５日間のインキュベーション後、結晶化プレートを５℃に移した。結晶は３か月以内に現れた。

【０３９０】
回折データ収集
結晶は、液体窒素中でフラッシュ冷却する前に、２０％のエチレングリコールを加えた沈殿剤中で凍結保護した。回折データを、ＤｅｃｔｒｉｓのＥｉｇｅｒ２　１６Ｍ画素検出器を使用して、Ｓｗｉｓｓ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｏｕｒｃｅビームライン Ｘ１０ＳＡ（１．０００Å波長）で１００Ｋで収集した。データの自動インデックス、統合、およびスケーリングは、ＸＤＳパッケージからのプログラムを用いて実施された（回析データ統計を表２２に要約する）。
【０３９１】
構造の決定と精緻化
非対称単位は、２つの化合物番号７６：ＦＸ　ＡＰ　３１－３７複合体を含む。構造は、探索モデルとして関連するV_HHの以前に決定された結晶構造を使用して、プログラムスイートＰｈｅｎｉｘ内に実装されたＰｈａｓｅｒを使用する分子置換によって決定した（実施例６を参照）。化合物番号７６の正しいアミノ酸配列を導入し、ＦＸ　ＡＰ　３１－３７は、全てＣＯＯＴを使用して、差分電子密度マップで手動で構築されたモデルであった。Ｐｈｅｎｉｘでの精密化およびＣＯＯＴでの手動再建のラウンド中、スレオニン残基１１７上のＯ－グリコシル化およびチロシン残基１０９の硫酸化が観察され、モデル化された。精緻化統計が表２２に示される。

【表２７】

表22:データ収集および精緻化統計

波長(Å)	1
分解能範囲(Å)	41.89～1.7(1.761～1.7)
空間群	P 4_1 2_1 2
単位セル(Å、度)	66.54 66.54 161.74 90 90 90
全反射	534639(54552)
特有の反射	40883(4000)
多重度	13.1(13.6)
完全性(%)	99.59(99.48)
平均I/シグマ(I)	17.03(0.83)
ウィルソンB-因子(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)
精緻化で使用される反射	40750(3981)
R-freeに対して使用される反射	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)
非水素原子数	2225
高分子	1958
リガンド	84
溶媒	217
タンパク質残基	254
RMS(結合)	0.010
RMS(角度)	1.15
ラマチャンドラン支持値(%)	96.67
ラマチャンドラン許容値(%)	2.92
ラマチャンドラン外れ値(%)	0.42
回転異性体外れ値(%)	0.50
クラッシュスコア	3.59
平均B-因子(Å^2)	47.24
高分子	46.21
リガンド	71.05
溶媒	51.13
TLS群の数	1

最高分解能シェルに対する統計が、括弧内に示される。

【０３９２】

エピトープおよびパラトープの決定

V_HHポリペプチド（化合物番号７６）内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子を有することによって特徴付けられるＦＸ活性化ペプチド残基として定義される合成ペプチドのエピトープは、連続ナンバリングに基づく対応するＦＸ活性化ペプチド配列（配列番号２）による、合成ペプチドＮ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９からの以下の残基を含む。

【０３９３】

合成ペプチド内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子（すなわち、非水素原子）を有することによって特徴付けられる化合物番号７６の残基として定義されるV_HH断片（

化合物番号７６）のパラトープは、化合物番号７６からの以下の残基：Ａ３３、Ｍ３４、Ｇ３５、Ｗ４７、Ｖ４８、Ａ４９、Ａ５０、Ｉ５１、Ｓ５２、Ｓ５７、Ｔ５８、Ｎ５９、Ｙ６０、Ａ６１、Ａ９７、Ａ９８、Ｄ９９、Ｇ１０５、Ｌ１０７、Ｙ１０９（配列番号７３４）
（連続ナンバリング）を含む。

【０３９４】

実施例１７：抗ＦＸ　ＶＨＨ断片（化合物番号７７）の結晶化およびパラトープ／エピトープマッピング

本研究の目的は、化合物番号７７と指定されたＶ$_{H}$Ｈ断片（Ｖ$_{H}$Ｈ１．１３）のパラトープ残基およびエピトープ残基を決定することであった。

【０３９５】

結晶化

ヒトＦＸ（Ａｐｉｇｅｎｅｘによって合成）の活性化ペプチド配列ａａ３１～３７に対応する、合成ペプチドＮ末端－ＮＰＦＤＬＬＤ－Ｃ末端と１：４のモル比で混合されたＣＨＯから生産されたＶ$_{H}$Ｈ断片（化合物番号７７）の結晶を、シッティングドロップ蒸気拡散技法を使用して成長させた。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５０ｍＭＮａＣｌ中の２５０ｎｌの６．１ｍｇ／ｍｌ複合体のタンパク質溶液を、２５０ｎｌの３％（ｖ／ｖ）Ｔａｃｓｉｍａｔｅ（１．８３０５Ｍマロン酸、０．２５Ｍ三塩基性クエン酸アンモニウム、０．１２Ｍコハク酸、０．３Ｍ　ＤＬ－リンゴ酸、０．４Ｍ酢酸ナトリウム三水和物、０．５Ｍギ酸ナトリウム、および０．１６Ｍ二塩基性酒石酸アンモニウム）（ｐＨ４．０）、１１％（ｗ／ｖ）　ＰＥＧ　３３５０（沈殿剤として）と混合し、８０μｌの沈殿剤でインキュベートした。結晶は、５℃で、４日間のインキュベーションで現れた。

【０３９６】

回折データ収集

結晶は、液体窒素中でフラッシュ冷却する前に、２０％のエチレングリコールを加えた沈殿剤中で凍結保護した。回折データを、ＤｅｃｔｒｉｓのＥｉｇｅｒ２　１６Ｍ画素検出器を使用して、Ｓｗｉｓｓ　Ｌｉｇｈｔ　ＳｏｕｒｃｅビームラインＸ１０ＳＡ（１．０００Å波長）で、１００Ｋで収集した。データの自動インデックス、統合、およびスケーリングは、ＸＤＳパッケージからのプログラムを用いて実施された（回析データ統計を表２３に要約する）。

【０３９７】

構造の決定と精緻化

非対称単位は、２つの化合物番号７７：ＦＸ　ＡＰ　３１－３７複合体を含む。構造は、探索モデルとして実施例１６の化合物番号７６：ＦＸ　ＡＰ　３１－３７の結晶構造からの完全非対称単位を使用して、プログラムスイートＰｈｅｎｉｘ内に実装されたＰｈａｓｅｒを使用する分子置換によって決定した。化合物番号７７の正しいアミノ酸配列を導入し、Ｐｈｅｎｉｘでの精緻化およびＣＯＯＴでの手動再建のラウンドを適用した。精緻化統計が表２３に示される。

【表２８】

表23:データ収集および精緻化統計

波長(Å)	1.0000
分解能範囲(Å)	32.88～1.7(1.761～1.7)
空間群	P 4_1 2_1 2
単位セル(Å、度)	58.99 58.99 160.25 90 90 90
全反射	418459(41888)
特有の反射	31790(3080)
多重度	13.2(13.6)
完全性(%)	98.90(97.90)
平均I/シグマ(I)	16.44(1.79)
ウィルソンB-因子(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)
精緻化で使用される反射	31765(3079)
R-freeに対して使用される反射	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)
非水素原子数	2253
高分子	1971
リガンド	50
溶媒	232
タンパク質残基	254
RMS(結合)	0.011
RMS(角度)	1.03
ラマチャンドラン支持値(%)	98.33
ラマチャンドラン許容値(%)	1.67
ラマチャンドラン外れ値(%)	0.00
回転異性体外れ値(%)	0.49
クラッシュスコア	3.83
平均B-因子(Å^2)	35.30
高分子	33.83
リガンド	66.50
溶媒	41.00
TLS群の数	1

最高分解能シェルに対する統計が、括弧内に示される。

【０３９８】

エピトープおよびパラトープの決定

V_HH断片（化合物番号７７）内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子を有することによって特徴付けられるＦＸ活性化ペプチド残基として定義される合成ペプチドのエピトープは、連続ナンバリングに基づく対応するＦＸ活性化ペプチド配列（配列番号２）による、合成ペプチドＮ１７３、Ｐ１７４、Ｆ１７５、Ｌ１７７、Ｌ１７８、およびＤ１７９からの以下の残基を含む。

【０３９９】

合成ペプチド内の重原子から４．０Å以内の距離に重原子（すなわち、非水素原子）を有することによって特徴付けられる化合物番号７７の残基として定義されるV_HH断片（

化合物番号７７）のパラトープは、化合物番号７７からの以下の残基：
Ａ３３、Ｍ３４、Ｇ３５、Ｗ４７、Ｖ４８、Ａ４９、Ａ５０、Ｉ５１、Ｓ５２、Ｓ５７、Ｔ５８、Ｎ５９、Ｙ６０、Ａ６１、Ａ９７、Ａ９８、Ｄ９９、Ｇ１０５、Ｌ１０７、Ｙ１０９（配列番号７３５）
（連続ナンバリング）を含む。

【０４００】

実施例１８：二重特異性V_HHポリペプチド誘導体の定常状態のＦＸＡ生成動態

本研究の目的は、血液凝固促進リン脂質膜の存在下で、ＦＩＸａによるＦＸ活性化を促進する能力に基づいて、抗ＦＩＸａ／ＦＸ二重特異性V_HHポリペプチド誘導体の血液凝固促進活性を決定することであった。試験した化合物を表２４に列挙し、エミシズマブＳＩＡを比較のために含めた。

【０４０１】

各化合物の定常状態のＦＸａ生成活性は、所与の化合物濃度でのミカエリス・メンテン動態（ミカエリス定数（K_M）および一次速度定数（k_{cat}/K_M））のパラメータとして報告される。表２４に最終アッセイ濃度が示される化合物は、アッセイ緩衝液（５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１００ｍＭ ＮａＣｌ、５ｍＭ $CaCl_2$、０．１％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ８０００（ｐＨ７．３）＋１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ） 中で、０．１ｎＭヒト血漿由来ＦＩＸａ（Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ、ＵＳＡ）および２０μＭ ２５：７５のホスファチジルセリン：ホスファチジルコリンリン脂質ベシクル（ｖｅｓｉｃｌｅｓ）（Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ、ＵＳＡ）とともに５分間プレインキュベーションした。次いで、５００ｎＭで開始するヒト血漿由来ＦＸ（Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ、ＵＳＡ）の２倍連続希釈を添加することによって活性化を開始した。室温で７分の活性化の後、反応物（５０μｌ）を２５μｌのクエンチ緩衝液（５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１００ｍＭ ＮａＣｌ、６０ｍＭ ＥＤＴＡ、０．１％ＰＥＧ８０００（ｐＨ７．３）＋１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ）の添加によりクエンチした。２５μｌの２ｍＭ Ｓ－２７６５発色基質（Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｘ， Ｓｗｅｄｅｎ）を添加し、マイクロプレートリーダーで４０５ｎｍにおける吸光度測定（ΔＯＤ／分）によって発色基質変換を測定することによって、生成されるＦＸａの量を判定した。同様に、遊離ＦＩＸａによるＦＸ活性化を、１０ｎＭのＦＩＸａ濃度および５～１０分の反応時間で決定した。４０５ｎｍで測定された吸収を対応するＦＸａ濃度に変換するために、０～５ｎＭ（５０μｌ）のＦＸａ標準曲線に、２５μｌのクエンチ緩衝液および２５μｌの２ｍＭ Ｓ－２７６５発色基質を添加した後、４０５ｎｍでの吸収を上記のように記録した。ＦＸａ濃度の関数としてのΔＯＤ／分の線形回帰は、測定されたΔＯＤ／分をＦＸａ生成速度に変換するために使用され得るスロープを生成する。

ＦＸａ生成速度＝（ΔＯＤ／分）／（スロープ$_{FXa標準曲線}$＊反応時間）

ミカエリス・メンテン定常状態動態パラメータは、ＦＸａ生成速度をＦＸ（基質）濃度の関数として、以下の式に適合させることによって決定され、

ＦＸａ生成速度＝（k_{cat}＊［ＦＩＸａ］$_t$＊［ＦＸ］$_t$）／（K_M＋［ＦＸ］$_t$）

式中、k_{cat}は、酵素効率（分$^{-1}$）であり、［ＦＩＸａ］$_t$は、総ＦＩＸａ（酵素）濃度（ｎＭ）であり、［ＦＸ］$_t$、総ＦＸ（基質）濃度（ｎＭ）であり、K_Mは、ミカエリス定数（ｎＭ）である。表２４は、試験された各化合物について決定された定常状態の動態定数ならびに試験された濃度を列挙する。

【表２９】

表24:決定された定常状態の酵素動態定数

V_HHポリペプチド誘導体ID/抗体名	試験された濃度(nM)	K_M(nM)	k_{cat}/K_M(1/(分*nM))
化合物番号21	5	3.9	0.27
化合物番号8	5	4.8	0.27
化合物番号17	5	9.0	0.15
化合物番号19	5	8.2	0.30
化合物番号16	5	7.1	0.14
化合物番号15	5	6.9	0.25
化合物番号13	5	6.2	0.18
化合物番号6	5	5.9	0.33
エミシズマブ-SIA	300	53.5	0.03
遊離FIXa(10nM)	N/A	281.5	0.00012

【０４０２】

結論

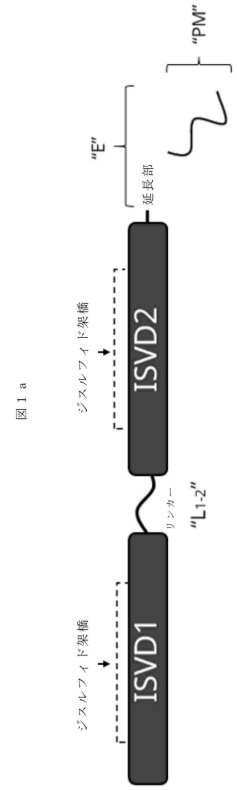
試験された抗ＦＩＸａ／ＦＸ二重特異性V_HＨポリペプチド誘導体は全て、５ｎＭの最終濃度に補充された場合、K_Mを、遊離ＦＩＸａの２８１．５ｎＭから３．９～９．０ｎＭに減少させ、触媒効率を０．０００１２分$^{-1}$ｎＭ$^{-1}$から０．１４～０．３３分$^{-1}$ｎＭ$^{-1}$にさらに増加させる。比較すると、３００ｎＭのエミシズマブ－ＳＩＡは、K_Mを５３．５ｎＭに減少させる。

【０４０３】

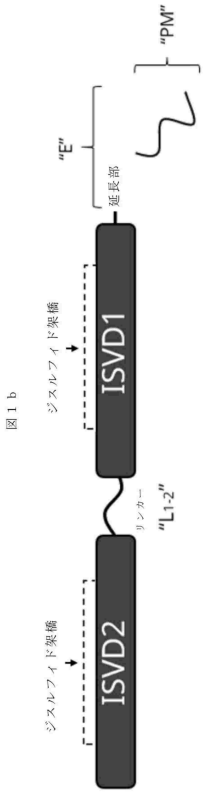
低減されたK_M値は、V_HＨポリペプチド誘導体の有意な効力増加をもたらす、ＦＩＸ（ａ）／ＦＸの改善されたアセンブリ（空間配置）を反映する。全ての化合物を、期待される薬理学的関連濃度で試験する。

【図面】

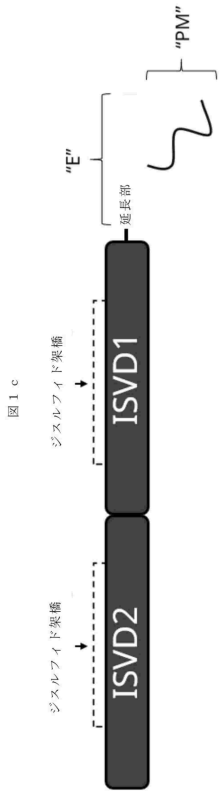
【図１ａ】



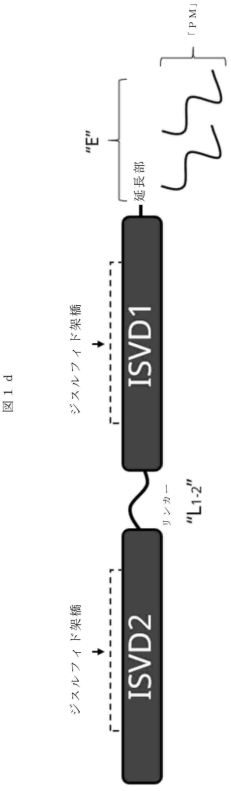
【図１ｂ】



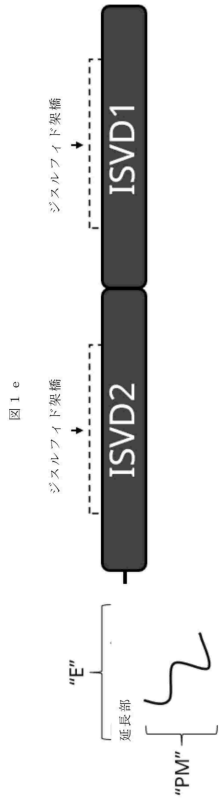
【図１ｃ】



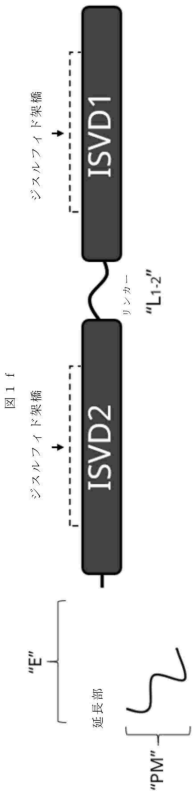
【図１ｄ】



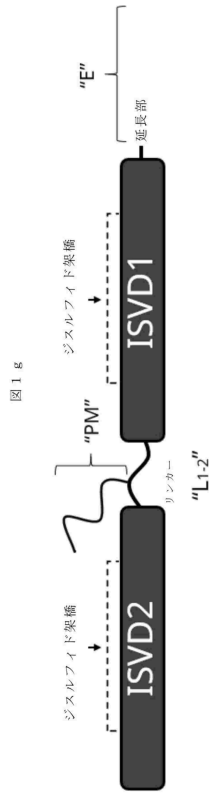
【図１ｅ】



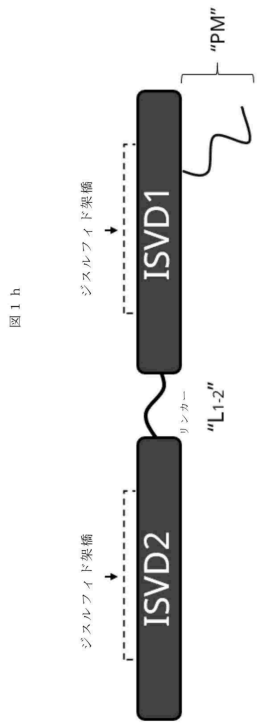
【図１ｆ】



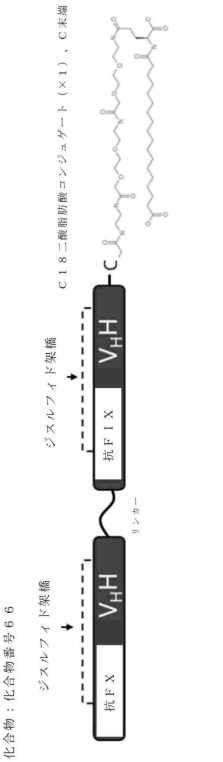
【図１ｇ】



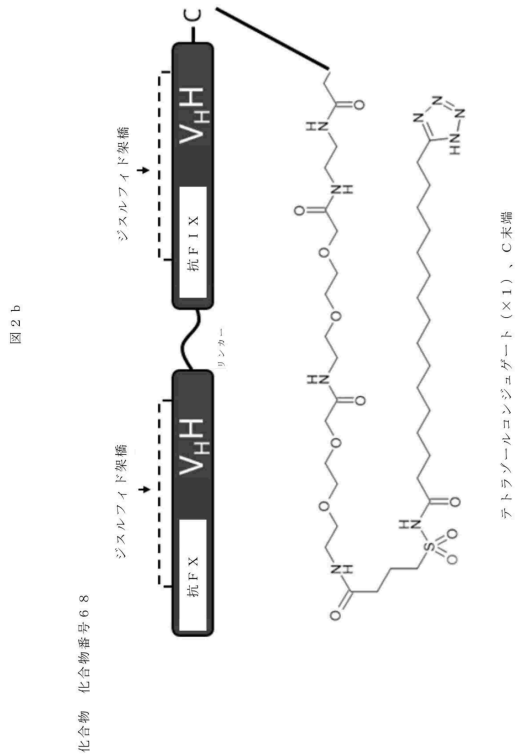
【図１ｈ】



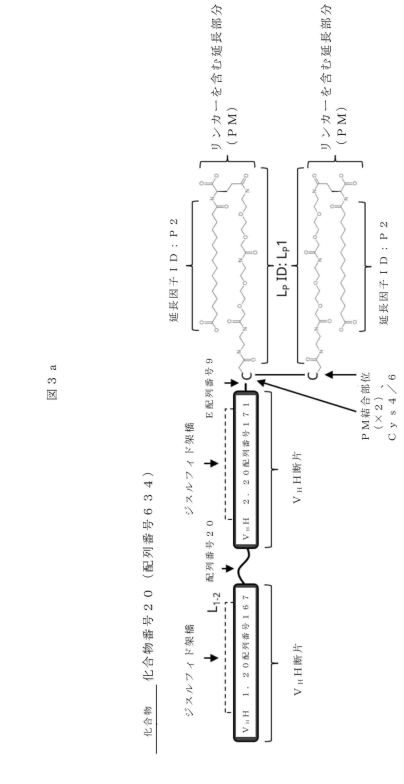
【図２ａ】



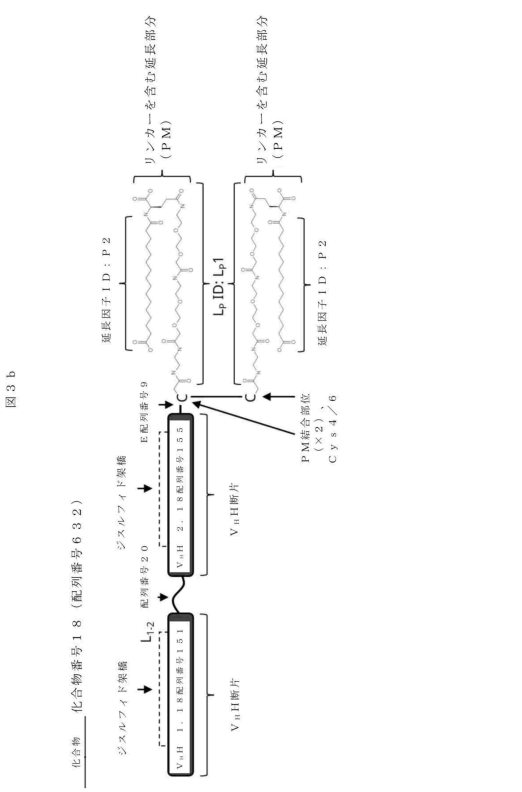
【図２ｂ】



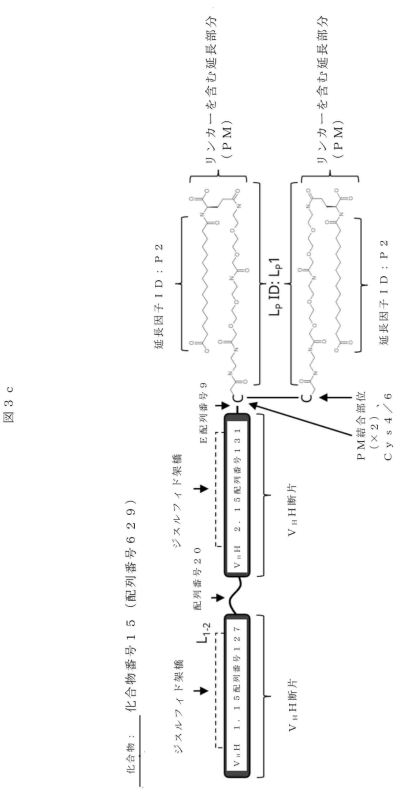
【図３ａ】



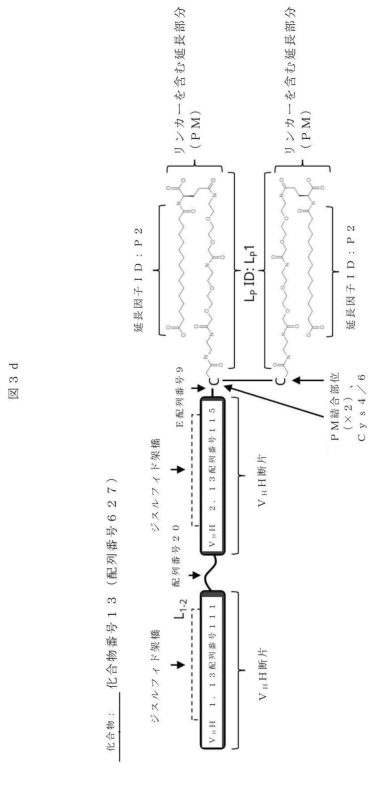
【図３ｂ】



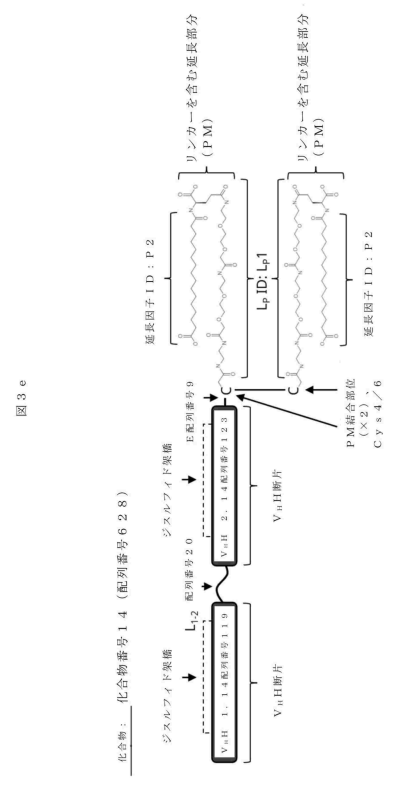
【図３ｃ】



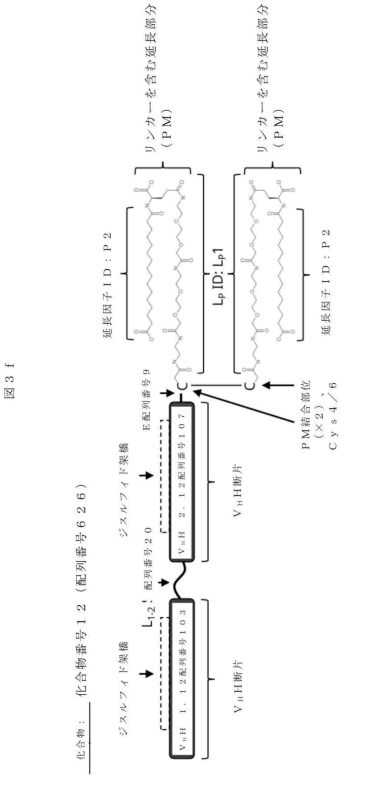
【図３ｄ】



【図３ｅ】

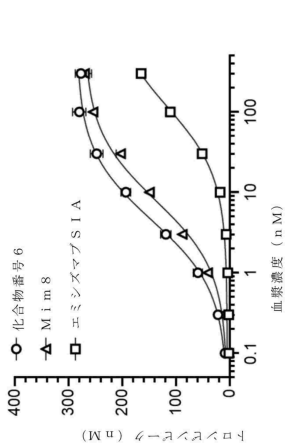


【図３ｆ】



【図４】

図４



【図５ａ】

図５ａ

ＣＤＲ配列とＦＩＸ（ａ）を結合するＩＳＶＤ配列のアラインメントを、太字および下線で示す。



【図５ｂ】

図５ｂ

ＣＤＲ配列とＦＸを結合するＩＳＶＤ配列のアラインメントを、太字および下線で示す。



【配列表】

0007459354000001.xml

フロントページの続き

(51)国際特許分類
A61K 47/22 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)

FI
A61K 47/18
A61K 47/22
C12N 15/13
C12N 15/62 Z
C12P 21/08
A61K 38/37

ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 エヴァ・ヨハンソン
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 ヤイス・ローズ・ビエルケ
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 ヤコブ・ルンド
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 フィリップ・ヨナス・サッセーネ
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 ピア・ジェイ・グライセン
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 トマス・イーイビェア
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 フランティセク・フバレク
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 シモーネ・フュレ
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 マティアス・ノーマン
デンマーク・２８８０・バウスヴェア・ノヴォ・アレー・１
(72)発明者 マリー－アンジュ・ビュイセ
ベルギー・９８２０・メレルベーケ・ブルゲ・エー・ロンセストラート・２３
(72)発明者 エヴリン・デ・タヴェルニエ
ベルギー・９８３１・ドゥールレ・ヴェインハールト・１６
(72)発明者 ソレン・ステフェンセン
ベルギー・１０４０・エテルベーク・リュ・アントワーヌ・ゴーティエ・６４

審査官 上村 直子
(56)参考文献
特表２０２１－５０２９８４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０２１／１５２０６６（WO，Ａ１）
特表２０２２－５１５７７０（ＪＰ，Ａ）
特表２０２０－５２４５１０（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０２１／０２８４７１５（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０２０／１１４６１５（WO，Ａ１）
国際公開第２０２０／１１４６１４（WO，Ａ１）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｐ ２１／０８
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ