

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成29年8月10日 (2017.8.10)

【公表番号】特表2016-523919(P2016-523919A)

【公表日】平成28年8月12日 (2016.8.12)

【年通号数】公開・登録公報2016-048

【出願番号】特願2016-524268(P2016-524268)

【国際特許分類】

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/22 (2006.01)

C 1 2 N 5/09 (2010.01)

C 1 2 N 5/18 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 38/43 (2006.01)

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/08 (2006.01)

A 6 1 K 47/50 (2017.01)

A 6 1 K 47/42 (2017.01)

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/22

C 1 2 N 5/09

C 1 2 N 5/18

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 7/04

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 37/465

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 19/08

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 47/36

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月27日 (2017.6.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

フォンヴィレブランド因子 (VWF) タンパク質と、異種部分 (H1) と、伸張された組  
み換えポリペプチド (XTEN) 配列と、前記 VWF タンパク質を前記異種部分と接続す  
る VWF リンカーとを含むキメラ分子であって、前記 VWF リンカーが、

i . 第 V I I I 因子 (F V I I I) からの a 2 領域、

i i . F V I I I からの a 1 領域、

i i i . F V I I I からの a 3 領域、

i v . X - V - P - R (配列番号 3) と P A R 1 非活性部位相互作用モチーフとを含むト  
ロンビン切断部位であって、X が脂肪族アミノ酸である、トロンビン切断部位、または、

v . それらの任意の組み合わせから選択されるポリペプチドを含み、

前記 X T E N 配列が、前記 VWF タンパク質、前記異種部分 (H1)、前記 VWF リンカ  
ー、またはそれらの任意の組み合わせに接続される、前記キメラ分子。

## 【請求項 2】

前記 X T E N 配列が、前記 VWF タンパク質を前記 VWF リンカーと、または前記 V  
WF リンカーを前記異種部分と接続する、請求項 1 に記載のキメラ分子。

## 【請求項 3】

F V I I I タンパク質を含む第 2 のポリペプチド鎖をさらに含む、請求項 1 または 2 に  
記載のキメラ分子。

## 【請求項 4】

前記 F V I I I タンパク質が追加の X T E N 配列をさらに含む、請求項 3 に記載のキメ  
ラ分子。

## 【請求項 5】

前記第 2 のポリペプチド鎖が、第 2 の異種部分 (H2) をさらに含む、請求項 3 または  
4 に記載のキメラ分子。

## 【請求項 6】

VWF タンパク質、異種部分 (H1)、及び前記 VWF タンパク質と前記異種部分 (H  
1) とを接続する VWF リンカーを含む第 1 のポリペプチド鎖と、F V I I I タンパク質  
及び X T E N 配列を含む第 2 のポリペプチド鎖と、を含むキメラ分子であって、前記第 1  
のポリペプチド鎖内の前記 VWF リンカーが、

i . F V I I I からの a 2 領域、

i i . F V I I I からの a 1 領域、

i i i . F V I I I からの a 3 領域、

i v . X - V - P - R (配列番号 3) と P A R 1 非活性部位相互作用モチーフとを含むト  
ロンビン切断部位であって、X が脂肪族アミノ酸である、トロンビン切断部位、または、

v . それらの任意の組み合わせ、を含み、

前記第 1 のポリペプチド鎖と前記第 2 のポリペプチド鎖とが互いに会合する、前記キメラ  
分子。

## 【請求項 7】

前記 VWF タンパク質、前記異種部分、前記 VWF リンカー、またはそれらの任意の組  
み合わせに接続される、追加の X T E N 配列をさらに含む、請求項 6 に記載のキメラ分子  
。

## 【請求項 8】

前記 F V I I I タンパク質、前記 X T E N 配列、または双方に接続される第 2 の異種部  
分 (H2) をさらに含む、請求項 6 または 7 に記載のキメラ分子。

## 【請求項 9】

前記 X T E N 配列 のうちの少なくとも 1 つが、約 42 個のアミノ酸、約 72 個のアミノ  
酸、約 108 個のアミノ酸、約 144 個のアミノ酸、約 180 個のアミノ酸、約 216 個  
のアミノ酸、約 252 個のアミノ酸、約 288 個のアミノ酸、約 324 個のアミノ酸、約  
360 個のアミノ酸、約 396 個のアミノ酸、約 432 個のアミノ酸、約 468 個のアミ

ノ酸、約 5 0 4 個のアミノ酸、約 5 4 0 個のアミノ酸、約 5 7 6 個のアミノ酸、約 6 1 2 個のアミノ酸、約 6 2 4 個のアミノ酸、約 6 4 8 個のアミノ酸、約 6 8 4 個のアミノ酸、約 7 2 0 個のアミノ酸、約 7 5 6 個のアミノ酸、約 7 9 2 個のアミノ酸、約 8 2 8 個のアミノ酸、約 8 3 6 個のアミノ酸、約 8 6 4 個のアミノ酸、約 8 7 5 個のアミノ酸、約 9 1 2 個のアミノ酸、約 9 2 3 個のアミノ酸、約 9 4 8 個のアミノ酸、約 1 0 4 4 個のアミノ酸、約 1 1 4 0 個のアミノ酸、約 1 2 3 6 個のアミノ酸、約 1 3 1 8 個のアミノ酸、約 1 3 3 2 個のアミノ酸、約 1 4 2 8 個のアミノ酸、約 1 5 2 4 個のアミノ酸、約 1 6 2 0 個のアミノ酸、約 1 7 1 6 個のアミノ酸、約 1 8 1 2 個のアミノ酸、約 1 9 0 8 個のアミノ酸、または約 2 0 0 4 個のアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 0】

前記 X T E N 配列のうち少なくとも 1 つが、A E 4 2、A E 7 2、A E 8 6 4、A E 5 7 6、A E 2 8 8、A E 1 4 4、A G 8 6 4、A G 5 7 6、A G 2 8 8、A G 1 4 4、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 7、配列番号 4 5、配列番号 4 3、配列番号 4 1、配列番号 4 8、配列番号 4 6、配列番号 4 4 及び 配列番号 4 2 から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 1】

( i ) 前記 V W F リンカーが、全長 F V I I I に相当する G l u 7 2 0 ~ A r g 7 4 0 と少なくとも約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む前記 a 2 領域を含み、前記 a 2 領域がトロニンによって切断されることが可能である；

( i i ) 前記 V W F リンカーが、全長 F V I I I に相当する M e t 3 3 7 ~ A r g 3 7 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む前記 a 1 領域を含み、前記 a 1 領域がトロニンによって切断されることが可能である；

( i i i ) 前記 V W F リンカーが、全長 F V I I I に相当する G l u 1 6 4 9 ~ A r g 1 6 8 9 と少なくとも約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む前記 a 3 領域を含み、前記 a 3 領域がトロニンによって切断されることが可能である；

( i v ) 前記 V W F リンカーが、X - V - P - R ( 配列番号 3 ) 及び前記 P A R 1 非活性部位相互作用モチーフを含む前記トロニン切断部位を含み、前記 P A R 1 非活性部位相互作用モチーフが S - F - L - L - R - N ( 配列番号 7 ) を含む；または

( v ) それらの任意の組み合わせである、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 2】

前記 V W F リンカーが、

( i ) 配列番号 4 を含む前記 a 2 領域；

( i i ) 配列番号 5 を含む前記 a 1 領域；

( i i i ) 配列番号 6 を含む前記 a 3 領域；または

( i v ) それらの任意の組み合わせ

を含む、請求項 1 1 に記載のキメラ分子。

【請求項 1 3】

前記 P A R 1 非活性部位相互作用モチーフが、P、P - N、P - N - D、P - N - D - K ( 配列番号 8 )、P - N - D - K - Y ( 配列番号 9 )、P - N - D - K - Y - E ( 配列番号 1 0 )、P - N - D - K - Y - E - P ( 配列番号 1 1 )、P - N - D - K - Y - E - P - F ( 配列番号 1 2 )、P - N - D - K - Y - E - P - F - W ( 配列番号 1 3 )、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E ( 配列番号 1 4 )、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D ( 配列番号 2 0 )、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D - E ( 配列番号 2 1 )、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D - E - E ( 配列番号 2 2 )、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D - E - E - S ( 配列番号 2 3 )、及び

それらの任意の組み合わせからなる群から選択される配列をさらに含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 4】

前記 V W F リンカーが配列番号 2 4 を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 5】

前記 V W F リンカーが 1 個以上のアミノ酸をさらに含み、前記 1 個以上のアミノ酸が、G l y G l y または g l y / s e r ペプチドを含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 6】

前記 V W F タンパク質が、V W F の D ' ドメイン及び D 3 ドメインを含み、前記 D ' ドメイン及び D 3 ドメインが、F V I I I タンパク質に結合することが可能である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 7】

( a ) 前記 V W F タンパク質の前記 D ' ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 8 6 6 と少なくとも約 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む；( b ) 前記 V W F タンパク質の前記 D 3 ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸 8 6 7 ~ 1 2 4 0 と少なくとも約 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む；または ( a ) 及び ( b ) の双方である、請求項 1 6 に記載のキメラ分子。

【請求項 1 8】

前記 V W F タンパク質の前記配列が、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 4 0 を含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 1 9】

前記 V W F タンパク質が、D 1 ドメイン、D 2 ドメイン、前記 D 1 及び D 2 ドメイン、A 1 ドメイン、A 2 ドメイン、A 3 ドメイン、D 4 ドメイン、B 1 ドメイン、B 2 ドメイン、B 3 ドメイン、C 1 ドメイン、C 2 ドメイン、C K ドメイン、それらの 1 つ以上の断片、並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される V W F ドメインをさらに含む、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 2 0】

前記 V W F タンパク質が、( 1 ) V W F の前記 D ' 及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、( 2 ) V W F の前記 D 1、D '、及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、( 3 ) V W F の前記 D 2、D '、及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、( 4 ) V W F の前記 D 1、D 2、D '、及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、または ( 5 ) V W F の前記 D 1、D 2、D '、D 3、及び A 1 ドメイン、もしくはそれらの断片、から本質的になる、もしくはそれらからなる、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 2 1】

前記 V W F タンパク質が、P E G 化、グリコシル化、H E S 化、またはポリシアル酸化される、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 2 2】

前記異種部分 ( H 1 ) が、免疫グロブリン定常領域もしくはその一部を含むか、前記第 2 の異種部分 ( H 2 )、免疫グロブリン定常領域もしくはその一部を含むか、または H 1 及び H 2 の双方が、免疫グロブリン定常領域を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 2 3】

前記第 1 の異種部分 ( H 1 ) が、F c 領域を含むか、前記第 2 の異種部分 ( H 2 ) が、F c 領域を含むか、または H 1 及び H 2 の双方が F c 領域を含む、請求項 2 2 に記載のキメラ分子。

【請求項 2 4】

前記第 1 の異種部分 ( H 1 ) が F c 領域であり、前記第 2 の異種部分 ( H 2 ) が F c 領域であり、前記 H 1 及び前記 H 2 が、共有結合によって互いに会合する、請求項 5、及び 8 ~ 23 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

【請求項 25】

( a ) V - L 1 - X 1 - H 1 : H 2 - L 2 - X 2 - C、  
 ( b ) V - X 1 - L 1 - H 1 : H 2 - L 2 - X 2 - C、  
 ( c ) V - L 1 - X 1 - H 1 : H 2 - X 2 - L 2 - C、  
 ( d ) V - X 1 - L 1 - H 1 : H 2 - X 2 - L 2 - C、  
 ( e ) V - L 1 - X 1 - H 1 : H 2 - L 2 - C ( X 2 )、  
 ( f ) V - X 1 - L 1 - H 1 : H 2 - L 2 - C ( X 2 )、  
 ( g ) C - X 2 - L 2 - H 2 : H 1 - X 1 - L 1 - V、  
 ( h ) C - X 2 - L 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V、  
 ( i ) C - L 2 - X 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V、  
 ( j ) C - L 2 - X 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V、  
 ( k ) C ( X 2 ) - L 2 - H 2 : H 1 - X 1 - L 1 - V、または  
 ( l ) C ( X 2 ) - L 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V から選択される式を含み、  
 式中、V が前記 V W F タンパク質であり、  
 L 1 が前記 V W F リンカーであり、  
 L 2 が任意の F V I I I リンカーであり、  
 H 1 が前記第 1 の異種部分であり、  
 H 2 が前記第 2 の異種部分であり、  
 C が前記 F V I I I タンパク質であり、  
 C ( X 2 ) が前記 X T E N 配列に融合される前記 F V I I I タンパク質であり、前記 X T E N 配列が互いに隣接する 2 個の F V I I I アミノ酸の間に挿入され、  
 ( - ) が、ペプチド結合または 1 個以上のアミノ酸であり、及び  
 ( : ) が、前記 H 1 と前記 H 2 との間の共有結合である、請求項 5 に記載のキメラ分子。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のキメラ分子またはその相補配列をコードする、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット、及び前記ポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドのセットに作動可能に結合された 1 つ以上のプロモーターを含む、ベクターまたはベクターのセット。

【請求項 28】

請求項 26 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または請求項 27 に記載のベクターもしくはベクターのセットを含む、宿主細胞。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のキメラ分子、請求項 26 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、請求項 27 に記載のベクターもしくはベクターのセット、または請求項 28 に記載の宿主細胞、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 30】

出血発症の頻度または程度の減少を必要とする対象における出血発症の頻度または程度の減少のため、あるいは出血発症の発生の予防を必要とする対象における出血発症の発生の予防のための、請求項 29 に記載の薬学的組成物、あるいは請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載のキメラ分子、請求項 26 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、請求項 27 に記載のベクターもしくはベクターのセット、または請求項 28 に記載の宿主細胞を含む、組成物。

【請求項 31】

キメラ分子の作製方法であって、1 つ以上の宿主細胞に請求項 26 に記載のポリヌクレ

オチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または請求項 27 に記載のベクターもしくはベクターのセットをトランスフェクトすること、及び前記宿主細胞内に前記キメラ分子を発現することを含む、前記方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

本開示はまた、キメラ分子の作製方法であって、1つ以上の宿主細胞に、本明細書に開示されるポリヌクレオチドまたは本明細書に開示されるベクターをトランスフェクトすること、及び宿主細胞内にキメラ分子を発現することを含む方法も含む。該方法は、キメラ分子を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態において、キメラ分子の F V I I I 活性は、a P T T アッセイまたは R O T E M アッセイによって測定され得る。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

フォンヴィレブランド因子 (VWF) タンパク質と、異種部分 (H1) と、X T E N 配列と、前記 VWF タンパク質を前記異種部分と接続する VWF リンカーとを含むキメラ分子であって、前記 VWF リンカーが、

i . 第 V I I I 因子 (F V I I I) からの a 2 領域、

i i . F V I I I からの a 1 領域、

i i i . F V I I I からの a 3 領域、

i v . X - V - P - R (配列番号 3) と P A R 1 非活性部位相互作用モチーフとを含むトロンビン切断部位であって、X が脂肪族アミノ酸である、トロンビン切断部位、または、v . それらの任意の組み合わせから選択されるポリペプチドを含み、

前記 X T E N 配列が、前記 VWF タンパク質、前記異種部分 (H1)、前記 VWF リンカー、またはそれらの任意の組み合わせに接続される、前記キメラ分子。

(項目 2)

前記 X T E N 配列が、前記 VWF タンパク質を前記 VWF リンカーと、または前記 VWF リンカーを前記異種部分と接続する、項目 1 に記載のキメラ分子。

(項目 3)

F V I I I タンパク質を含む第 2 のポリペプチド鎖をさらに含み、前記第 1 のポリペプチド鎖と前記第 2 のポリペプチド鎖とが互いに会合する、項目 1 または 2 に記載のキメラ分子。

(項目 4)

前記 F V I I I タンパク質が追加の X T E N 配列をさらに含む、項目 3 に記載のキメラ分子。

(項目 5)

前記追加の X T E N 配列が、前記 F V I I I タンパク質の N 末端もしくは C 末端に結合されるか、互いに隣接する 2 個の F V I I I アミノ酸の間に挿入される、項目 4 に記載のキメラ分子。

(項目 6)

前記第 2 のポリペプチド鎖が、第 2 の異種部分 (H2) をさらに含む、項目 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 7)

VWF タンパク質、異種部分 (H1)、及び前記 VWF タンパク質と前記異種部分 (H1) とを接続する VWF リンカーを含む第 1 のポリペプチド鎖と、F V I I I タンパク質及び X T E N 配列を含む第 2 のポリペプチド鎖と、を含むキメラ分子であって、前記第 1 のポリペプチド鎖内の前記 VWF リンカーが、

i . F V I I I からの a 2 領域、

i i . F V I I I からの a 1 領域、

i i i . F V I I I からの a 3 領域、

i v . X - V - P - R ( 配列番号 3 ) と P A R 1 非活性部位相互作用モチーフとを含むトロンピン切断部位であって、X が脂肪族アミノ酸である、トロンピン切断部位、または、v . それらの任意の組み合わせ、を含み、

前記第 1 のポリペプチド鎖と前記第 2 のポリペプチド鎖とが互いに会合する、前記キメラ分子。

( 項目 8 )

前記 X T E N 配列が、前記 F V I I I タンパク質の N 末端もしくは C 末端に接続されるか、互いに隣接する 2 個の F V I I I アミノ酸の間に挿入される、項目 7 に記載のキメラ分子。

( 項目 9 )

前記 V W F タンパク質、前記異種部分、前記 V W F リンカー、またはそれらの任意の組み合わせに接続される、追加の X T E N 配列をさらに含む、項目 7 または 8 に記載のキメラ分子。

( 項目 1 0 )

第 2 の異種部分 ( H 2 ) をさらに含む、項目 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 1 1 )

前記第 2 の異種部分が、前記 F V I I I タンパク質、前記 X T E N 配列、または双方に接続される、項目 1 0 に記載のキメラ分子。

( 項目 1 2 )

前記 X T E N 配列が、約 4 2 個のアミノ酸、約 7 2 個のアミノ酸、約 1 0 8 個のアミノ酸、約 1 4 4 個のアミノ酸、約 1 8 0 個のアミノ酸、約 2 1 6 個のアミノ酸、約 2 5 2 個のアミノ酸、約 2 8 8 個のアミノ酸、約 3 2 4 個のアミノ酸、約 3 6 0 個のアミノ酸、約 3 9 6 個のアミノ酸、約 4 3 2 個のアミノ酸、約 4 6 8 個のアミノ酸、約 5 0 4 個のアミノ酸、約 5 4 0 個のアミノ酸、約 5 7 6 個のアミノ酸、約 6 1 2 個のアミノ酸、約 6 2 4 個のアミノ酸、約 6 4 8 個のアミノ酸、約 6 8 4 個のアミノ酸、約 7 2 0 個のアミノ酸、約 7 5 6 個のアミノ酸、約 7 9 2 個のアミノ酸、約 8 2 8 個のアミノ酸、約 8 3 6 個のアミノ酸、約 8 6 4 個のアミノ酸、約 8 7 5 個のアミノ酸、約 9 1 2 個のアミノ酸、約 9 2 3 個のアミノ酸、約 9 4 8 個のアミノ酸、約 1 0 4 4 個のアミノ酸、約 1 1 4 0 個のアミノ酸、約 1 2 3 6 個のアミノ酸、約 1 3 1 8 個のアミノ酸、約 1 3 3 2 個のアミノ酸、約 1 4 2 8 個のアミノ酸、約 1 5 2 4 個のアミノ酸、約 1 6 2 0 個のアミノ酸、約 1 7 1 6 個のアミノ酸、約 1 8 1 2 個のアミノ酸、約 1 9 0 8 個のアミノ酸、または約 2 0 0 4 個のアミノ酸を含む、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 1 3 )

前記 X T E N 配列が、A E 4 2、A E 7 2、A E 8 6 4、A E 5 7 6、A E 2 8 8、A E 1 4 4、A G 8 6 4、A G 5 7 6、A G 2 8 8、または A G 1 4 4 から選択される、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 1 4 )

前記 X T E N 配列が、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 7、配列番号 4 5、配列番号 4 4、配列番号 4 1、配列番号 4 8、配列番号 4 6、配列番号 4 4、または配列番号 4 2 から選択される、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 1 5 )

前記追加の X T E N 配列が、約 4 2 個のアミノ酸、約 7 2 個のアミノ酸、約 1 0 8 個のアミノ酸、約 1 4 4 個のアミノ酸、約 1 8 0 個のアミノ酸、約 2 1 6 個のアミノ酸、約 2 5 2 個のアミノ酸、約 2 8 8 個のアミノ酸、約 3 2 4 個のアミノ酸、約 3 6 0 個のアミノ酸、約 3 9 6 個のアミノ酸、約 4 3 2 個のアミノ酸、約 4 6 8 個のアミノ酸、約 5 0 4 個のアミノ酸、約 5 4 0 個のアミノ酸、約 5 7 6 個のアミノ酸、約 6 1 2 個のアミノ酸、約 6 2 4 個のアミノ酸、約 6 4 8 個のアミノ酸、約 6 8 4 個のアミノ酸、約 7 2 0 個のアミ

ノ酸、約 7 5 6 個のアミノ酸、約 7 9 2 個のアミノ酸、約 8 2 8 個のアミノ酸、約 8 3 6 個のアミノ酸、約 8 6 4 個のアミノ酸、約 8 7 5 個のアミノ酸、約 9 1 2 個のアミノ酸、約 9 2 3 個のアミノ酸、約 9 4 8 個のアミノ酸、約 1 0 4 4 個のアミノ酸、約 1 1 4 0 個のアミノ酸、約 1 2 3 6 個のアミノ酸、約 1 3 1 8 個のアミノ酸、約 1 3 3 2 個のアミノ酸、約 1 4 2 8 個のアミノ酸、約 1 5 2 4 個のアミノ酸、約 1 6 2 0 個のアミノ酸、約 1 7 1 6 個のアミノ酸、約 1 8 1 2 個のアミノ酸、約 1 9 0 8 個のアミノ酸、または約 2 0 0 4 個のアミノ酸を含む、項目 4 ~ 6 及び 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 1 6)

前記追加の X T E N 配列が、A E 4 2、A E 7 2、A E 8 6 4、A E 5 7 6、A E 2 8 8、A E 1 4 4、A G 8 6 4、A G 5 7 6、A G 2 8 8、または A G 1 4 4 から選択される、項目 4 ~ 6、9 ~ 1 1、及び 1 5 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 1 7)

前記追加の X T E N 配列が、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 7、配列番号 4 5、配列番号 4 3、配列番号 4 1、配列番号 4 8、配列番号 4 6、配列番号 4 4、または配列番号 4 2 から選択される、項目 4 ~ 6、9 ~ 1 1、及び 1 5 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 1 8)

前記 V W F リンカーが、全長 F V I I I に相当する G l u 7 2 0 ~ A r g 7 4 0 と少なくとも約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む前記 a 2 領域を含み、前記 a 2 領域がトロニンによって切断されることが可能である、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 1 9)

前記 a 2 領域が配列番号 4 を含む、項目 1 8 に記載のキメラ分子。

(項目 2 0)

前記 V W F リンカーが、全長 F V I I I に相当する M e t 3 3 7 ~ A r g 3 7 2 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む前記 a 1 領域を含み、前記 a 1 領域がトロニンによって切断されることが可能である、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 2 1)

前記 a 1 領域が配列番号 5 を含む、項目 2 0 に記載のキメラ分子。

(項目 2 2)

前記 V W F リンカーが、全長 F V I I I に相当する G l u 1 6 4 9 ~ A r g 1 6 8 9 と少なくとも約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む前記 a 3 領域を含み、前記 a 3 領域がトロニンによって切断されることが可能である、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 2 3)

前記 a 3 領域が配列番号 6 を含む、項目 2 2 に記載のキメラ分子。

(項目 2 4)

前記 V W F リンカーが、X - V - P - R (配列番号 3) 及び前記 P A R 1 非活性部位相互作用モチーフを含む前記トロニン切断部位を含み、前記 P A R 1 非活性部位相互作用モチーフが S - F - L - L - R - N (配列番号 7) を含む、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 2 5)

前記 P A R 1 非活性部位相互作用モチーフが、P、P - N、P - N - D、P - N - D - K (配列番号 8)、P - N - D - K - Y (配列番号 9)、P - N - D - K - Y - E (配列番号 1 0)、P - N - D - K - Y - E - P (配列番号 1 1)、P - N - D - K - Y - E - P - F (配列番号 1 2)、P - N - D - K - Y - E - P - F - W (配列番号 1 3)、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E (配列番号 1 4)、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D (配列番号 2 0)、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D - E (配列番号 2 1)、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D - E - E (配列番号 2 2

)、P - N - D - K - Y - E - P - F - W - E - D - E - E - S (配列番号23)、またはそれらの任意の組み合わせから選択される配列をさらに含む、項目1～17、及び24のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目26)

前記脂肪族アミノ酸が、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシンから選択される、項目1～17、24、及び25のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目27)

前記VWFリンカーが、L - V - P - R (配列番号25)からなる前記トロンビン切断部位がトロンビンによって切断されるよりも速くトロンビンによって切断される、項目1～26のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目28)

前記VWFリンカーが配列番号24を含む、項目1～27のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目29)

前記VWFリンカーが、L - V - P - R (配列番号25)からなる前記トロンビン切断部位がトロンビンによって切断されるよりも、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約60倍、少なくとも約70倍、少なくとも約80倍、少なくとも約90倍、または少なくとも約100倍速く、トロンビンによって切断される、項目27に記載のキメラ分子。

(項目30)

前記VWFリンカーが1個以上のアミノ酸をさらに含み、前記VWFリンカーが、少なくとも約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1200、1400、1600、1800、または2000アミノ酸の長さを有する、項目1～29のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目31)

前記1個以上のアミノ酸がglyペプチドを含む、項目30に記載のキメラ分子。

(項目32)

前記1個以上のアミノ酸がGlyGlyを含む、項目30または31に記載のキメラ分子。

(項目33)

前記1個以上のアミノ酸がgly / serペプチドを含む、項目30に記載のキメラ分子。

(項目34)

前記gly / serペプチドが、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>またはS(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>の式を有し、式中、nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、または100から選択される正整数である、項目33に記載のキメラ分子。

(項目35)

前記(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>リンカーが、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>(配列番号89)または(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>(配列番号90)である、項目34に記載のキメラ分子。

(項目36)

前記VWFタンパク質が、VWFのD'ドメイン及びD3ドメインを含み、前記D'ドメイン及びD3ドメインが、FVIIITタンパク質に結合することが可能である、項目1～35のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目37)

前記VWFタンパク質の前記D'ドメインが、配列番号2のアミノ酸764～866と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の

アミノ酸配列を含む、項目 3 6 に記載のキメラ分子。

( 項目 3 8 )

前記 V W F タンパク質の前記 D 3 ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸 8 6 7 ~ 1 2 4 0 と少なくとも約 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、項目 3 6 または 3 7 に記載のキメラ分子。

( 項目 3 9 )

前記 V W F タンパク質が、配列番号 2 の残基 1 0 9 9、残基 1 1 4 2、または残基 1 0 9 9 と 1 1 4 2 の双方に相当する残基において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含有する、項目 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 0 )

前記 V W F タンパク質の前記配列内で、システイン以外のアミノ酸が、配列番号 2 の残基 1 0 9 9、残基 1 1 4 2、または残基 1 0 9 9 と 1 1 4 2 の双方に相当する残基と置換される、項目 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 1 )

前記 V W F タンパク質の前記配列が、配列番号 2 のアミノ酸 7 6 4 ~ 1 2 4 0 を含む、項目 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 2 )

前記 V W F タンパク質が、V W F の D 1 ドメイン、D 2 ドメイン、または前記 D 1 及び D 2 ドメインをさらに含む、項目 3 6 ~ 4 1 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 3 )

前記 V W F タンパク質が、A 1 ドメイン、A 2 ドメイン、A 3 ドメイン、D 4 ドメイン、B 1 ドメイン、B 2 ドメイン、B 3 ドメイン、C 1 ドメイン、C 2 ドメイン、C K ドメイン、それらの 1 つ以上の断片、またはそれらの任意の組み合わせから選択される V W F ドメインをさらに含む、項目 3 6 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 4 )

前記 V W F タンパク質が、( 1 ) V W F の前記 D ' 及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、( 2 ) V W F の前記 D 1、D '、及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、( 3 ) V W F の前記 D 2、D '、及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、( 4 ) V W F の前記 D 1、D 2、D '、及び D 3 ドメイン、もしくはそれらの断片、または ( 5 ) V W F の前記 D 1、D 2、D '、D 3、及び A 1 ドメイン、もしくはそれらの断片、から本質的になる、もしくはそれらからなる、項目 3 6 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子

。

( 項目 4 5 )

V W F のシグナルペプチドをさらに含む、項目 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 6 )

前記 V W F タンパク質が、P E G 化、グリコシル化、H E S 化、またはポリシアル酸化される、項目 1 ~ 4 5 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 7 )

前記異種部分 ( H 1 ) が、前記キメラ分子の半減期を延長することが可能である、項目 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 4 8 )

前記異種部分 ( H 1 ) が、免疫グロブリン定常領域もしくはその一部、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、P A S、ヒト絨毛性ゴナドトロピン サブユニットの C 末端ペプチド ( C T P )、ポリエチレングリコール ( P E G )、ヒドロキシエチルデンプン ( H E S )、アルブミン結合小分子、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 4 7 に記載のキメラ分子。

( 項目 4 9 )

前記免疫グロブリン定常領域またはその一部が、F c R n 結合パートナーを含む、項目 4 8 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 0 )

前記免疫グロブリン定常領域またはその一部が、F c 領域を含む、項目 4 8 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 1 )

前記異種部分 ( H 1 ) が、クリアランス受容体またはその断片を含み、前記クリアランス受容体が F V I I I タンパク質の F V I I I クリアランス受容体への結合を遮断する、項目 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 5 2 )

前記クリアランス受容体が、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 ( L R P 1 )、またはその F V I I I 結合断片である、項目 5 1 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 3 )

前記第 2 の異種部分が、免疫グロブリン定常領域もしくはその一部、アルブミン、アルブミン結合ポリペプチド、P A S、ヒト絨毛性ゴナドトロピン サブユニットの C 末端ペプチド ( C T P )、ポリエチレングリコール ( P E G )、ヒドロキシエチルデンプン ( H E S )、アルブミン結合小分子、またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目 6、及び 1 0 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 5 4 )

前記第 2 の異種部分 ( H 2 ) が、前記 F V I I I タンパク質の半減期を延長することが可能である、項目 6、及び 1 0 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 5 5 )

前記第 2 の異種部分 ( H 2 ) が、ポリペプチド、非ポリペプチド部分、または双方を含む、項目 5 4 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 6 )

前記第 2 の異種部分 ( H 2 ) が、免疫グロブリン定常領域またはその一部を含む、項目 5 4 または 5 5 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 7 )

前記第 2 の異種部分が、F c R n 結合パートナーを含む、項目 5 6 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 8 )

前記第 2 の異種部分が第 2 の F c 領域を含む、項目 5 6 に記載のキメラ分子。

( 項目 5 9 )

前記第 1 の異種部分と前記第 2 の異種部分とが互いに会合する、項目 6、及び 1 0 ~ 5 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 6 0 )

前記第 1 のポリペプチド鎖と前記第 2 のポリペプチドとの間の会合が共有結合である、項目 5 9 に記載のキメラ分子。

( 項目 6 1 )

前記第 1 の異種部分と前記第 2 の異種部分との間の会合が、ジスルフィド結合である、項目 5 9 に記載のキメラ分子。

( 項目 6 2 )

前記第 1 の異種部分が F c R n 結合パートナーであり、前記第 2 の異種部分が F c R n 結合パートナーである、項目 6、及び 1 0 ~ 5 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 6 3 )

前記第 1 の異種部分が F c 領域であり、前記第 2 の異種部分が F c 領域である、項目 6、及び 1 0 ~ 5 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 6 4 )

前記 F V I I I タンパク質が、F V I I I リンカーによって前記第 2 の異種部分に結合される、項目 6、及び 1 0 ~ 5 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 6 5 )

前記 F V I I I リンカーが切断可能リンカーである、項目 6 4 に記載のキメラ分子。

( 項目 6 6 )

前記 F V I I I リンカーが前記 V W F リンカーと同一である、項目 6 4 または 6 5 に記載のキメラ分子。

( 項目 6 7 )

前記 F V I I I リンカーが前記 V W F リンカーと異なる、項目 6 4 または 6 5 に記載のキメラ分子。

( 項目 6 8 )

( a ) V - L 1 - X 1 - H 1 : H 2 - L 2 - X 2 - C 、  
 ( b ) V - X 1 - L 1 - H 1 : H 2 - L 2 - X 2 - C 、  
 ( c ) V - L 1 - X 1 - H 1 : H 2 - X 2 - L 2 - C 、  
 ( d ) V - X 1 - L 1 - H 1 : H 2 - X 2 - L 2 - C 、  
 ( e ) V - L 1 - X 1 - H 1 : H 2 - L 2 - C ( X 2 ) 、  
 ( f ) V - X 1 - L 1 - H 1 : H 2 - L 2 - C ( X 2 ) 、  
 ( g ) C - X 2 - L 2 - H 2 : H 1 - X 1 - L 1 - V 、  
 ( h ) C - X 2 - L 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V 、  
 ( i ) C - L 2 - X 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V 、  
 ( j ) C - L 2 - X 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V 、  
 ( k ) C ( X 2 ) - L 2 - H 2 : H 1 - X 1 - L 1 - V 、または  
 ( l ) C ( X 2 ) - L 2 - H 2 : H 1 - L 1 - X 1 - V から選択される式を含み、  
 式中、V が前記 V W F タンパク質であり、  
 L 1 が前記 V W F リンカーであり、  
 L 2 が任意の F V I I I リンカーであり、  
 H 1 が前記第 1 の異種部分であり、  
 H 2 が前記第 2 の異種部分であり、  
 C が前記 F V I I I タンパク質であり、  
 C ( X 2 ) が前記 X T E N 配列に融合される前記 F V I I I タンパク質であり、前記 X T E N 配列が互いに隣接する 2 個の F V I I I アミノ酸の間に挿入され、  
 ( - ) が、ペプチド結合または 1 個以上のアミノ酸であり、及び  
 ( : ) が、前記 H 1 と前記 H 2 との間の共有結合である、項目 6 、及び 1 0 ~ 6 7 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 6 9 )

前記 V W F タンパク質が、内因性 V W F の前記 F V I I I タンパク質への結合を抑制または防止する、項目 6 、及び 1 0 ~ 6 8 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 7 0 )

前記 F V I I I タンパク質が第 3 の異種部分 ( H 3 ) を含む、項目 6 、及び 1 0 ~ 6 9 のいずれか一項に記載のキメラ分子。

( 項目 7 1 )

前記第 3 の異種部分 ( H 3 ) が X T E N 配列である、項目 7 0 に記載のキメラ分子。

( 項目 7 2 )

前記 F V I I I タンパク質が第 4 の異種部分 ( H 4 ) を含む、項目 7 0 または 7 1 に記載のキメラ分子。

( 項目 7 3 )

前記第 4 の異種部分 ( H 4 ) が X T E N 配列である、項目 7 2 に記載のキメラ分子。

( 項目 7 4 )

前記 F V I I I タンパク質が第 5 の異種部分 ( H 5 ) を含む、項目 7 2 または 7 3 に記載のキメラ分子。

( 項目 7 5 )

前記第 5 の異種部分が X T E N 配列である、項目 7 4 に記載のキメラ分子。

( 項目 7 6 )

前記 F V I I I タンパク質が前記第 6 の異種部分 ( H 6 ) を含む、項目 7 4 または 7 5

に記載のキメラ分子。

(項目 77)

前記第6の異種部分がX T E N配列である、項目76に記載のキメラ分子。

(項目 78)

前記第3の異種部分(H3)、前記第4の異種部分(H4)、前記第5の異種部分(H5)、及び前記第6の異種部分(H6)のうちの1つ以上が、前記キメラ分子の半減期を延長することが可能である、項目76または77に記載のキメラ分子。

(項目 79)

前記第3の異種部分(H3)、前記第4の異種部分(H4)、前記第5の異種部分(H5)、及び前記第6の異種部分(H6)が、F V I I IのC末端もしくはN末端に結合されるか、前記F V I I Iタンパク質の2個のアミノ酸の間に挿入される、項目76または77に記載のキメラ分子。

(項目 80)

前記X T E N配列の1つ以上が、約42アミノ酸、約72アミノ酸、約108アミノ酸、約144アミノ酸、約180アミノ酸、約216アミノ酸、約252アミノ酸、約288アミノ酸、約324アミノ酸、約360アミノ酸、約396アミノ酸、約432アミノ酸、約468アミノ酸、約504アミノ酸、約540アミノ酸、約576アミノ酸、約612アミノ酸、約624アミノ酸、約648アミノ酸、約684アミノ酸、約720アミノ酸、約756アミノ酸、約792アミノ酸、約828アミノ酸、約836アミノ酸、約864アミノ酸、約875アミノ酸、約912アミノ酸、約923アミノ酸、約948アミノ酸、約1044アミノ酸、約1140アミノ酸、約1236アミノ酸、約1318アミノ酸、約1332アミノ酸、約1428アミノ酸、約1524アミノ酸、約1620アミノ酸、約1716アミノ酸、約1812アミノ酸、約1908アミノ酸、または約2004アミノ酸のうちの1つ以上から選択される長さを含む、項目71、73、75、及び77のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 81)

前記X T E N配列が、A E 42、A E 72、A E 864、A E 576、A E 288、A E 144、A G 864、A G 576、A G 288、またはA G 144から選択される、項目71、73、75、77、及び80のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 82)

前記X T E N配列が、配列番号39、配列番号40、配列番号47、配列番号45、配列番号44、配列番号41、配列番号48、配列番号46、配列番号44、または配列番号42から選択される、項目81に記載のキメラ分子。

(項目 83)

前記キメラ分子の半減期が、野生型F V I I Iよりも少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、少なくとも約10倍、少なくとも約11倍、または少なくとも約12倍長く延長される、項目1～82のいずれか一項に記載のキメラ分子。

(項目 84)

項目1～83のいずれか一項に記載のキメラ分子またはその相補配列をコードする、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。

(項目 85)

P C 5またはP C 7をコードするポリヌクレオチド鎖をさらに含む、項目84に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。

(項目 86)

項目84または85に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット、及び前記ポリヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドのセットに作動可能に結合された1つ以上のプロモーターを含む、ベクターまたはベクターのセット。

(項目 87)

P C 5 または P C 7 をコードする追加のポリヌクレオチド鎖をさらに含む、項目 8 6 に記載のベクターまたはベクターのセット。

( 項目 8 8 )

項目 8 6 もしくは 8 7 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または項目 8 6 もしくは 8 7 に記載のベクターもしくはベクターのセットを含む、宿主細胞。

( 項目 8 9 )

哺乳動物細胞である、項目 8 8 に記載の宿主細胞。

( 項目 9 0 )

前記哺乳動物細胞が、H E K 2 9 3 細胞、C H O 細胞、または B H K 細胞から選択される、項目 8 9 に記載の宿主細胞。

( 項目 9 1 )

項目 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子、項目 8 4 もしくは 8 5 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド、項目 8 6 もしくは 8 7 に記載のベクターもしくはベクターのセット、または項目 8 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の宿主細胞、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

( 項目 9 2 )

前記キメラ分子が、野生型 F V I I I タンパク質と比較して延長された半減期を有する、項目 9 1 に記載の組成物。

( 項目 9 3 )

前記キメラ分子の半減期が、野生型 F V I I I よりも少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 6 倍、少なくとも約 7 倍、少なくとも約 8 倍、少なくとも約 9 倍、少なくとも約 1 0 倍、少なくとも約 1 1 倍、または少なくとも約 1 2 倍長く延長される、項目 9 1 または 9 2 に記載の組成物。

( 項目 9 4 )

出血発症の頻度または程度の減少を必要とする対象における出血発症の頻度または程度の減少方法であって、有効な量の項目 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子、項目 8 4 もしくは 8 5 に記載のポリヌクレオチド、項目 8 6 もしくは 8 7 に記載のベクター、項目 8 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の宿主細胞、または項目 9 1 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

( 項目 9 5 )

出血発症の発生の予防を必要とする対象における出血発症の発生の予防方法であって、有効な量の項目 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子、項目 8 4 もしくは 8 5 に記載のポリヌクレオチド、項目 8 6 もしくは 8 7 に記載のベクター、項目 8 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の宿主細胞、または項目 9 1 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

( 項目 9 6 )

前記出血発症が、出血凝固障害、関節血症、筋肉出血、口内出血、大出血、筋内への大出血、口腔内出血、外傷、頭部外傷、胃腸の出血、頭蓋内出血、腹腔内出血、胸腔内出血、骨折、中枢神経系の出血、咽頭後隙における出血、腹膜後隙における出血、腸腰筋鞘における出血、またはそれらの任意の組み合わせからである、項目 9 4 または 9 5 に記載の方法。

( 項目 9 7 )

項目 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載のキメラ分子、項目 8 4 もしくは 8 5 に記載のポリヌクレオチド、項目 8 6 もしくは 8 7 に記載のベクター、項目 8 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の宿主細胞、または項目 9 1 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の組成物が、局所投与、眼内投与、非経口投与、髄腔内投与、硬膜下投与、経口投与、及びそれらの任意の組み合わせから選択される経路で投与される、項目 9 5 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 9 8 )

キメラ分子の作製方法であって、１つ以上の宿主細胞に項目８４もしくは８５に記載のポリヌクレオチド、または項目８６もしくは８７に記載のベクターをトランスフェクトすること、及び前記宿主細胞内に前記キメラ分子を発現することを含む、前記方法。

(項目９９)

前記キメラ分子を単離することをさらに含む、項目９８に記載の方法。

(項目１００)

VWFタンパク質、異種部分(H１)、及び前記VWFタンパク質と前記異種部分(H１)とを接続するVWFリンカーを含むキメラFVIIIタンパク質、ならびにFVIIIタンパク質とXTEN配列とを含む第２のポリペプチド鎖のFVIII活性の改善方法であって、前記第１のポリペプチド鎖内の前記VWFリンカーが、

i．FVIIIからのa２領域、

ii．FVIIIからのa１領域、

iii．FVIIIからのa３領域、

iv．X-V-P-R(配列番号３)とPAR１非活性部位相互作用モチーフとを含むトロンビン切断部位であって、Xが脂肪族アミノ酸である、トロンビン切断部位、または、v．それらの任意の組み合わせ、を含む、前記方法、

(項目１０１)

前記FVIII活性が、aPTTアッセイまたはROTEMアッセイによって測定される、項目１００に記載の方法。

(項目１０２)

２つのポリペプチド配列を含むキメラ分子であって、第１のポリペプチド配列がFVIII 169(配列番号８８)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含み、第２のポリペプチド配列がVWF 059(配列番号８２)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含む、前記キメラ分子。

(項目１０３)

２つのポリペプチド配列を含むキメラ分子であって、第１のポリペプチド配列がFVIII 286(配列番号８６)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含み、第２のポリペプチド配列がVWF 059(配列番号８２)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含む、前記キメラ分子。

(項目１０４)

２つのポリペプチド配列を含むキメラ分子であって、第１のポリペプチド配列がFVIII 286(配列番号８６)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含み、第２のポリペプチド配列がVWF 062(配列番号８４)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含む、前記キメラ分子。

(項目１０５)

２つのポリペプチド配列を含むキメラ分子であって、第１のポリペプチド配列がFVIII 286(配列番号８６)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含み、第２のポリペプチド配列がVWF 057(配列番号８０)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のアミノ酸配列を含む、前記キメラ分子。

(項目１０６)

項目１０２～１０５のいずれか一項に記載のキメラ分子をコードする、ポリヌクレオチド(複数可)。

(項目１０７)

VWF 057(配列番号７９)と少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、または１００％同一のヌクレオチド配列をコードする、ポリヌクレオチド。

(項目１０８)

F V I I I 1 6 9 ( 配列番号 8 7 ) と少なくとも約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一の第 2 のヌクレオチド配列を含む第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、項目 1 0 7 に記載のポリヌクレオチド。

( 項目 1 0 9 )

F V I I I 2 8 6 ( 配列番号 8 5 ) と少なくとも約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 %、または 1 0 0 % 同一の第 2 のヌクレオチド配列を含む第 2 のポリヌクレオチドをさらに含む、項目 1 0 7 に記載のポリヌクレオチド。

( 項目 1 1 0 )

前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記第 2 のポリヌクレオチドが、同じベクター上にあるか、2 つの異なるベクター上にある、項目 1 0 8 または 1 0 9 に記載のポリヌクレオチド。

( 項目 1 1 1 )

出血発症の頻度または程度を必要とする対象における出血発症の頻度または程度の方法であって、有効な量の項目 1 0 2 ~ 1 0 5 のいずれか一項に記載のキメラ分子、または項目 1 0 6 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド ( 複数可 ) を投与することを含む、前記方法。