

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-517100
(P2025-517100A)

(43)公表日 令和7年6月3日(2025.6.3)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18		4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/64 (2006.01)	C 0 7 K	14/64		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全66頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-563866(P2024-563866)			(71)出願人	522226498
(86)(22)出願日	令和5年5月5日(2023.5.5)				北京拓界生物医薬科技有限公司
(85)翻訳文提出日	令和6年10月29日(2024.10.29)				BEIJING TUO JIE BIO
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/092214				PHARMACEUTICAL CO.
(87)国際公開番号	WO2023/216981				LTD.
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)				中華人民共和国102206北京市昌平区生命科学園医科路9号院4号楼7層
(31)優先権主張番号	202210491720.7				Level 7, No. 4 Build
(32)優先日	令和4年5月7日(2022.5.7)				ing, No. 9 Yi Ke Road
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				, ZGC Life Science P
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100145403
		最終頁に続く			弁理士 山尾 憲人
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 リラキシン又は類似体の融合タンパク質及びその医薬的使用

(57)【要約】
本開示は、リラキシン又は類似体の融合タンパク質及びその医薬的使用に関する。具体的に、本開示は、リラキシン又はその類似体と血清アルブミン結合ドメインとを含む融合タンパク質、及びその疾患（例えば、心不全）を治療するための医薬的使用に関する。また、本開示は、血清アルブミンに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメイン（例えば、VHH）を含み、良好な血漿安定性を有し、薬剤の血漿半減期の延長に使用可能である血清アルブミン結合分子に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血清アルブミン結合ドメインとリラキシン又はその類似体とを含む融合タンパク質であって、

前記血清アルブミン結合ドメインは、免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、1)～3)、即ち、

1) 配列番号 6、18～27 の何れか 1 つで示されるアミノ酸配列中の CDR 1、CDR 2 と CDR 3、

2) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列中の CDR 1、CDR 2 と CDR 3、及び

3) それぞれ配列番号 64、58、59 で示されるアミノ酸配列の CDR 1、CDR 2 と CDR 3、

から選ばれる何れか 1 つの CDR 1、CDR 2 と CDR 3 を含み、

そのうち、前記 CDR は、Kabat、IMGT、Chothia、AbM 又は Contact 番号付けシステムに従って定義され、

好ましくは、前記 CDR 1、CDR 2 と CDR 3 は、それぞれ配列番号 8、9 と 10 で示され、又は配列番号 11、12 と 13 で示される、融合タンパク質。

【請求項 2】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、ラクダ化又はヒト化、親和性成熟、T 細胞エпитオプの除去、抗体脱アミドの低減、抗体凝集の低減、抗体異性化の低減、又はその組み合わせから選ばれる何れか 1 つによって改変され、

好ましくは、前記ヒト化改変されたヒト生殖細胞系列遺伝子のフレームワーク領域のテンプレートは、IGHV 3-23 に由来する、

請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83 と 84 位という位置中の少なくとも 1 つでアミノ酸変異を含み、

前記位置は EU 番号付けシステムに基づき、

好ましくは、20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 又は 84P から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含み、

より好ましくは、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、

20V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、

23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、74A、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、78V、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、83Q、84P、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、84P、

30L、37F、44E、45R、47G、84P、又は

30L、37F、44E、45R、47G、

から選ばれる何れか 1 つのアミノ酸変異の組み合わせを含む、

請求項 1～2 の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、

配列番号 6、18～27 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは

配列番号 7 で示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む、

前記請求項の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは VHH である、

前記請求項の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記リラキシン又はその類似体は A 鎖及び B 鎖を含み、前記 A 鎖は、配列番号 31、50、52、54、56 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記 B 鎖は、配列番号 32、51、53、55、57 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、

10

好ましくは、前記 A 鎖及び B 鎖は、下記 1) ~ 7)、即ち、

- 1) 配列番号 31 で示される A 鎖と配列番号 32 で示される B 鎖、
- 2) 配列番号 50 で示される A 鎖と配列番号 51 で示される B 鎖、
- 3) 配列番号 52 で示される A 鎖と配列番号 53 で示される B 鎖、
- 4) 配列番号 54 で示される A 鎖と配列番号 55 で示される B 鎖、
- 5) 配列番号 31 で示される A 鎖と配列番号 53 で示される B 鎖、
- 6) 配列番号 52 で示される A 鎖と配列番号 32 で示される B 鎖、及び
- 7) 配列番号 56 で示される A 鎖と配列番号 57 で示される B 鎖、

から選ばれる何れか 1 つの組み合わせである、

20

前記請求項の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

式 (I) ~ 式 (IV)、即ち、

$B-L_1-A-L_2-VHH$

式 (I)

$A-L_1-B-L_2-VHH$

式 (II)

$VHH-L_2-B-L_1-A$

式 (III)、及び

$VHH-L_1-A-L_1-B$

式 (IV)

の何れか 1 つで示されるか又は任意の組み合わせのポリペプチドを含み、

そのうち、

A はリラキシン又はその類似体の A 鎖であり、

30

B はリラキシン又はその類似体の B 鎖であり、

L_1 と L_2 はリンカーであり、

L_1 と L_2 は、それぞれ独立的に存在するか又は存在しない、

請求項 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

L_1 は、 $(GGGGQ)_n$ 、 $(GGGQ)_n$ 、 $(PGPQ)_n$ 、 $(PGPA)_n$ 、 $(GXS_Y)_Z$ から選ばれるもので示されるアミノ酸配列を含み、前記 n は 1 ~ 10 の整数から選ばれ、前記 X 、 Y 、 Z は独立的に 1 ~ 10 の整数から選ばれ、

L_2 は、 $(GXS_Y)_Z$ 、KR、配列番号 60 ~ 63、65 ~ 66 から選ばれる何れか 1 つで示されるアミノ酸配列を含み、前記 X 、 Y 、 Z は独立的に 1 ~ 10 の整数から選ばれ、

40

好ましくは、 L_1 は配列番号 33 ~ 35 の何れか 1 つで示されるアミノ酸配列を含み、

好ましくは、 L_2 は配列番号 49 で示されるアミノ酸配列を含む、

請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

配列番号 36 ~ 43 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

前記請求項の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

一本鎖タンパク質、二量体又は多量体タンパク質である、

50

前記請求項の何れか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 1】

免疫グロブリン単一可変ドメインを含む血清アルブミン結合分子であって、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、1)～3)、即ち、

1) 配列番号 6、18～27 の何れか 1 つで示されるアミノ酸配列中の CDR 1、CDR 2 と CDR 3、

2) 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列中の CDR 1、CDR 2 と CDR 3、及び

3) それぞれ配列番号 64、58、59 で示されるアミノ酸配列の CDR 1、CDR 2 と CDR 3、

から選ばれる何れか 1 つの CDR 1、CDR 2 と CDR 3 を含み、

10

そのうち、前記 CDR は、Kabat、IMGT、Chothia、AbM 又は Contact 番号付けシステムに従って定義され、

好ましくは、前記 CDR 1、CDR 2 と CDR 3 は、それぞれ配列番号 8、9 と 10 で示され、又は配列番号 11、12 と 13 で示される、血清アルブミン結合分子。

【請求項 1 2】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、ラクダ化又はヒト化、親和性成熟、T 細胞エピトープの除去、抗体脱アミドの低減、抗体凝集の低減、抗体異性化の低減、又はその組み合わせから選ばれる何れか 1 つによって改変され、

好ましくは、前記ヒト化改変されたヒト生殖細胞系列遺伝子のフレームワーク領域のテンプレートは、IGHV 3-23 に由来する、請求項 1 1 に記載の血清アルブミン結合分子。

20

【請求項 1 3】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83 と 84 位という位置中の少なくとも 1 つでアミノ酸変異を含み、

前記位置は EU 番号付けシステムに基づき、

好ましくは、20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 又は 84P から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含み、

30

より好ましくは、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、

20V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、

23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、74A、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、78V、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、83Q、84P、

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、84P、

30L、37F、44E、45R、47G、84P、又は

40

30L、37F、44E、45R、47G、

から選ばれる何れか 1 つのアミノ酸変異の組み合わせを含む、

請求項 1 1～1 2 の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子。

【請求項 1 4】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、

配列番号 6、18～27 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは

配列番号 7 で示されるか又はそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項 1 1～1 3 の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子。

50

【請求項 15】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインはVHHである、
請求項 11～14の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子。

【請求項 16】

ヒト免疫グロブリンFc領域又はヒスチジントグを更に含み、
好ましくは、前記Fc領域はヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域である、

請求項 11～15の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子。

【請求項 17】

1種又は複数種の治療剤又は診断剤を更に含み、
好ましくは、前記治療剤又は診断剤は、前記免疫グロブリン単一可変ドメインに共有結合又は融合し、

好ましくは、前記治療剤又は診断剤は、治療用又は診断用タンパク質、ポリペプチド、核酸、低分子化合物から選ばれる何れか1つである、

請求項 11～16の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子。

【請求項 18】

(a) $\leq 1 \times 10^{-7}$ M、好ましくは $\leq 1 \times 10^{-8}$ Mの K_D 値でヒト血清アルブミンに結合すること、

(b) 血清アルブミンとFcRnの結合の遮断が検出されないこと、及び

(c) 治療剤又は診断剤を含む場合、前記治療剤又は診断剤の血漿半減期を延長すること、

から選ばれる少なくとも1つの活性を有する、

請求項 11～17の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子。

【請求項 19】

請求項 1～10の何れか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項 11～18の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項 19に記載のポリヌクレオチドを含むか又は発現する、ベクター。

【請求項 21】

請求項 20に記載のベクターを含むか又は発現する、宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 1～10の何れか一項に記載の融合タンパク質又は請求項 11～18の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子を産生又は調製する方法であって、

請求項 22に記載の宿主細胞を培養するステップと、

前記融合タンパク質又は血清アルブミン結合分子を回収するステップと、

任意選択的に、前記融合タンパク質又は血清アルブミン結合分子を精製及び／又は修飾するステップと、

を含む、方法。

【請求項 23】

治療剤又は診断剤の血漿半減期を延長する方法であって、

請求項 11～18の何れか一項に定義された免疫グロブリン単一可変ドメインを前記治療剤又は診断剤と連結又は融合すること、

を含む、方法。

【請求項 24】

医薬組成物であって、

請求項 1～10の何れか一項に記載の融合タンパク質、請求項 11～18の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子、請求項 19に記載のポリヌクレオチド又は請求項 20に記載のベクターを含み、

好ましくは、1種又は複数種の薬学的に許容されるベクター、希釈剤、緩衝剤又は賦形剤を更に含む、

10

20

30

40

50

医薬組成物。

【請求項 25】

疾患を治療・予防するための薬剤の調製における請求項 1～10 の何れか一項に記載の融合タンパク質の使用であって、

好ましくは、前記疾患は線維性疾患又は心臓血管疾患であり、

より好ましくは、前記心臓血管疾患は心不全又は心筋肥大である、

使用。

【請求項 26】

疾患を診断・治療・予防するための薬剤の調製における請求項 11～18 の何れか一項に記載の血清アルブミン結合分子の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、2022年5月7日に提出された中国特許出願（出願番号CN202210491720.7）の優先権を主張する。

【0002】

本開示は生物医薬分野に属し、具体的に、リラキシン又はその類似体と血清アルブミン結合ドメインとを含む融合タンパク質、及びその疾患（例えば、心不全）を治療するための医薬的使用に関する。また、血清アルブミンに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメイン（例えば、VHH）を含み、良好な血漿安定性を有し、薬剤の血漿半減期の延長に使用可能である血清アルブミン結合分子に関する。

20

【背景技術】

【0003】

リラキシン（relaxin）は、妊娠中に重要なホルモンとして、1926年にFrederick Hisawによって初めて発見され、それは、インスリン・スーパーファミリーに属するポリペプチドホルモンである。リラキシンは、ヒトにおいて、リラキシン1（RLN-1又はH1）、リラキシン2（RLN-2又はH2）、リラキシン3（RLN-3又はH3）を含む7つのポリペプチドメンバーを含む。これらのリラキシンは、一次配列で相同性が低い、類似の三次構造を有する。そのうち、リラキシン2は、RLN2遺伝子によってコードされる、人体循環における主なリラキシンである。リラキシンは、前駆体ホルモン（A鎖とB鎖とがCペプチドを介して線形に連結される）の形態で発現され、体内でエンドヌクレアーゼで加水分解してCペプチドを除去し、成熟したリラキシンを放出する。天然に成熟したリラキシン2は、2つの鎖間ジスルフィド結合を介して共有結合してヘテロ二量体を形成するA、Bという2つのポリペプチド鎖を含み、A鎖は内部に更に1対のジスルフィド結合を有する（Schwabe, et al. Science. 1977, 197, 914-915）。

30

【0004】

リラキシン2は、シグナル送達主に受容体RXFP1（LGR7ともいう）により実現される多機能性ホルモンであり、RXFP1は、ロイシン反復単位に富むGタンパク質共役受容体（GPCR）であり、RXFP2（LGR8ともいう）もリラキシン2に結合される。リラキシン2と受容体の結合は、cAMPとホスホイノシチド3-キナーゼ経路の活性化、一酸化窒素シグナル伝達経路の活性化などを含む複数種のカスケードシグナルを活性化することができる。リラキシン2と受容体の結合は、更に、Smad2/3のリン酸化を阻害することにより、細胞外マトリックス、コラーゲンの生成を阻害することができる。研究により、リラキシン2は、血管拡張の促進、抗炎症、血管抵抗の低減及び動脈コンプライアンスの増加、血管新生とリモデリングの促進、細胞外マトリックスの調節、抗線維化などの生理学的作用を有し、心不全と心筋線維症に有益な役割を果たすことが示されている（Chiara Sassoli, et al. Current Molecular Medicine 2022, 22, 196-208）。

40

【0005】

50

リラキシン2は半減期 ($t_{1/2}$) が非常に短く、天然のリラキシン2は体内における半減期 ($t_{1/2}$) が数分間しかないことで、治療薬としてのリラキシンに課題をもたらしている。既に市販されている天然の組換えリラキシン2 (serelaxin) は、臨床的に連続静脈内注入による治療を必要とするので、患者に不便をもたらし、効力が短いことも示している。研究者は、その半減期 ($t_{1/2}$) を向上させるためにリラキシン2を改変し、例えば、化学的カップリングの方式によりPEG、脂肪酸鎖などを導入し、或いは組換えの方法により、半減期が延長されたタンパク質、ポリペプチド又はFcなどを融合する。

【0006】

アルブミンは、血漿中の含有量が最も豊富なタンパク質であり、血漿タンパク質の40%～60%を占める。アルブミンは、多くの内因性と外因性リガンドに結合することができ、体内の天然の「多機能ベクター」である。アルブミンは免疫グロブリンG (IgG) と同様に、体内での保持時間が比較的長く、アルブミンは、ヒト体内での半減期が約19～21日間であると報告されており (Berson, S. A. et al, J. Clin. Invest. 1953, 32, 746-768)、その主な原因としては、アルブミン分子量が66.5KDで、且つその分子の流体力学半径が糸球体ろ過の閾値である3.5～6nmを超えることであり (Lin, J. H. Curr. Drug Metab. 2009, 10, 661-691)、アルブミンはFcRnに結合することができ、且つこの結合にpH依存性の特性があり、エンドソームにエンドサイトーシスして侵入した後、エンドソームの酸性pH (pH5.5又は6.0) で両者の結合が比較的強くなることで、アルブミンはリソソームによる分解から保護されるが、FcRnが細胞表面に転送されるにつれて、中性の生理学的pH条件下で、アルブミンはFcRnから解離することで、再循環を達成させ、この原理はIgGの再循環と類似であり、且つアルブミン及びIgGはそれぞれFcRn上の2つの独立した部位に結合して、互いに影響しない。

【0007】

本開示は、血清アルブミンに結合する新たな構造の単一ドメイン抗体を提供し、それは、薬物活性成分の体内半減期を顕著に向上させることができる。例えば、本開示の血清アルブミンに結合する単一ドメイン抗体を、活性成分であるリラキシン又はその類似体と融合タンパク質になるように融合した後、リラキシン又はその類似体の体内半減期を顕著に向上させることができる。本開示により提供される融合タンパク質は、活性が高く、安定性が高く、容易に産生され、臨床的使用に優れた潜在力を有する。

【発明の概要】

【0008】

本開示は、血清アルブミンと特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、良好な血漿安定性を有し、薬剤の血漿半減期を延長に使用可能である血清アルブミン結合分子を提供する。

血清アルブミン結合分子

【0009】

本開示は、血清アルブミン結合分子を提供する。

【0010】

幾つかの実施形態において、血清アルブミン結合分子は免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、下記1)～5)、即ち、

1) 配列番号6、18～27の何れか1つで示されるアミノ酸配列中のCDR1、CDR2とCDR3、

2) 配列番号7で示されるアミノ酸配列中のCDR1、CDR2とCDR3、

3) それぞれ配列番号8、9と10で示されるCDR1、CDR2とCDR3、

4) それぞれ配列番号11、12と13で示されるCDR1、CDR2とCDR3、及び

5) CDR1は X_1SCX_2G (配列番号64) であり、そのうち、 X_1 はT又はN、 X_2 はM又はLである、

10

20

30

40

50

という何れか一項に記載の C D R 1、C D R 2 と C D R 3 を含み、

C D R 2 は X₃ I Y X₄ V G G S T F Y X₅ X₆ S V K G (配列番号 58) であり、そのうち、X₃ は S 又は T、X₄ は T 又は M、X₅ は T 又は A、X₆ は N 又は D であり、

C D R 3 は G S P A R C X₇ X₈ R D P T T F X₉ Y (配列番号 59) であり、そのうち、X₇ は R 又は L、X₈ は L 又は R、X₉ は D 又は N であり、

そのうち、上記 X₁ ~ X₉ 中の 1 つ又は複数は、その選択的なアミノ酸の保存的アミノ酸変異であってもよい。

【0011】

上記 C D R は、K a b a t、I M G T、C h o t h i a、A b M 又は C o n t a c t 番号付けシステムに従って定義され、例えば、上記 C D R は K a b a t 番号付けシステムに従って定義される。

10

【0012】

幾つかの実施形態において、血清アルブミン結合分子は免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、上記 1) ~ 5) 中の C D R 1、C D R 2、C D R 3 中の何れか 1 つ又は何れか複数 (例えば、2 つ又は 3 つ) の組み合わせを含む。

【0013】

幾つかの実施形態において、血清アルブミン結合分子は免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、それに含まれる C D R 1 は上記何れか 1 つの C D R 1 に比べて、0、1、2、3、4 若しくは 5 個のアミノ酸変異を有し、及び／又は、上記免疫グロブリン単一可変ドメインに含まれる C D R 2 は上記何れか 1 つの C D R 2 に比べて、0、1、2、3、4 若しくは 5 個のアミノ酸変異を有し、及び／又は、上記免疫グロブリン単一可変ドメインに含まれる C D R 3 は上記何れか 1 つの C D R 3 に比べて、0、1、2、3、4 若しくは 5 個のアミノ酸変異を有する。幾つかの具体的な実施形態において、C D R 1、C D R 2 及び／又は C D R 3 中のアミノ酸変異は保存的置換である。

20

【0014】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインはラクダ由来のものである。

【0015】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト化、親和性成熟、T 細胞エпитープの除去、抗体脱アミドの低減、抗体凝集の低減、抗体異性化の低減、又はその組み合わせの何れか 1 つによって改変される。

30

【0016】

幾つかの実施形態において、上記ヒト化の免疫グロブリン単一可変ドメイン中のフレームワーク領域は、ヒト重鎖可変領域の生殖細胞系列遺伝子 I G H V 3 - 23 又は I G V H 3 - 66 に由来する。

【0017】

幾つかの具体的な実施形態において、上記ヒト化の免疫グロブリン単一可変ドメインは、20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83 と 84 位 (E U 番号付けシステムに基づく位置) という位置中の少なくとも 1 つでアミノ酸変異を含み、

40

例えば、20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 又は 84P から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含み、

例えば、

F 27N、F 29Y、S 30L、V 37F、G 44E、L 45R、W 47G、

L 20V、F 27N、F 29Y、S 30L、V 37F、G 44E、L 45R、W 47G

、

A 23V、F 27N、F 29Y、S 30L、V 37F、G 44E、L 45R、W 47G

、

50

F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、S 7 4 A
、
F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、L 7 8 V
、
F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、S 4 9 A
、
F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、R 8 3 Q
、A 8 4 P、
F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、A 8 4 P
、
S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、A 8 4 P、又は
S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、

から選ばれる何れか1つのアミノ酸変異の組み合わせを含む。

10

【0018】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子は免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号6若しくは7の何れか1つ又はそれと少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは上記アミノ酸配列である。幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインはラクダ由来のものである。

20

【0019】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子は免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号18～27の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは上記アミノ酸配列である。幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインはヒト化のものである。

【0020】

本開示において、「少なくとも90%の（配列）同一性」は、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の（配列）同一性をカバーし、「少なくとも80%の（配列）同一性」は、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の（配列）同一性、及び上記何れか2つの数値間の範囲をカバーし、整数及び小数を含む。

30

【0021】

幾つかの実施形態において、上記本開示により提供される血清アルブミン結合分子中の免疫グロブリン単一可変ドメインは、3つの相補性決定領域CDR1、CDR2とCDR3、及び4つのFRを含み、アミノ末端からカルボキシ末端へ、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に並んでいる。

40

【0022】

幾つかの実施形態において、上記本開示により提供される血清アルブミン結合分子は、血清アルブミンに結合する抗体又はその抗原結合断片であり、或いは上記抗体又はその抗原結合断片を含む複合体、融合タンパク質である。

【0023】

幾つかの実施形態において、上記抗体は、ラクダ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体である。

【0024】

幾つかの実施形態において、上記抗原結合断片は、sdAb又は二重特異性抗体、多重

50

特異性抗体である。

【0025】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインはVHHである。

【0026】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインはヒト化のVHHである。

【0027】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは親和性成熟したVHHである。

【0028】

幾つかの実施形態において、1つ又は複数（例えば2、3、4、5、6、7、8個）の上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含む血清アルブミン結合分子を提供し、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは同一であっても異なってもよく、何れか2つの免疫グロブリン単一可変ドメイン間は、直接的に連結されてもよく、又はリンカーを介して連結されてもよい。

【0029】

幾つかの実施形態において、上記本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインと同じエпитープに結合するか又は競合的に結合する血清アルブミン結合分子を提供する。

【0030】

幾つかの実施形態において、上記本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインと血清アルブミンの結合を遮断する血清アルブミン結合分子を提供する。

【0031】

幾つかの実施形態において、血清アルブミンに対する結合が上記本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインにより遮断される血清アルブミン結合分子を提供する。

【0032】

幾つかの実施形態において、上記本開示により提供される血清アルブミン結合分子は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4から選ばれるFc領域などの免疫グロブリンのFc領域を更に含み、又は(His)₆タグ若しくは(His)₈タグなどのヒスチジンタグを含む。

【0033】

本開示に使用可能なFc領域は、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソフォーム）、IgA1、IgA2、IgD、IgE又はIgMなどの異なるアイソフォームの免疫グロブリンに由来してもよい。幾つかの実施形態において、Fc領域は、定常領域のヒンジ領域又は一部のヒンジ領域、CH2領域とCH3領域を含む。

【0034】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインとFc領域又はヒスチジンタグとの間には、リンカーによって連結されてもよい。上記リンカーは、1～20又はそれ以上のアミノ酸長を有し、二次以上の構造がない非機能的アミノ酸配列であってもよい。例えば、上記リンカーは可撓性リンカーであり、例えば、G₄S（配列番号67）、GS、GAP、(G₄S)₂（配列番号68）、(G₄S)₃（配列番号69）、(G₄S)₄（配列番号70）、(G₄S)₅（配列番号71）、ASGS、G₃S又はその組み合わせである。幾つかの実施形態において、リンカーはGGGGSGGGG（配列番号72）である。

【0035】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子は、配列番号15若しくは16で示されるか又はそれと少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは上記アミノ酸配列である。

【0036】

幾つかの実施形態において、上記血清アルブミン結合分子中の免疫グロブリン単一可変ドメインは、血清アルブミンに特異的に結合するものであり、上記血清アルブミンは、げ

10

20

30

40

50

哺乳類動物血清アルブミン（例えば、マウス血清アルブミン（m S A））又は、霊長類動物血清アルブミン（例えば、マカクザル血清アルブミン（c y S A）、ヒト血清アルブミン（H S A））であってもよい。幾つかの具体的な実施形態において、上記血清アルブミンはH S Aである。

【0037】

幾つかの代替的な形態において、本開示の血清アルブミン結合分子は、上記何れか1つの完全な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよく、上記何れか1つの免疫グロブリン単一可変ドメインの機能部分又はその変異体、例えばC D R 3、C D R 3 - F R 4、C D R 2 - F R 3 - C D R 3、C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4、F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4、C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3を含んでもよい。

10

【0038】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインの機能部分の変異体は、C D R 3、C D R 3 - F R 4、C D R 2 - F R 3 - C D R 3、C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4、F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4、C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4、又はF R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3の血清アルブミン結合機能を保持すると共に、それと少なくとも80%、少なくとも90%の配列相同性を有するポリペプチドであってもよく、例えば、C D R 3の血清アルブミン結合機能を保持すると共に、それと一定の配列相同性を有するポリペプチドであってもよく、例えば、上記何れか1つのC D R 3と少なくとも80%、少なくとも90%の配列相同性を有するポリペプチドである。

20

【0039】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、半減期を延長するためのベクターとして任意の他の大分子又は低分子化合物と共有又は非共有結合することができる。

【0040】

幾つかの実施形態において、本開示の血清アルブミン結合分子は、上記免疫グロブリン単一可変ドメインと共有又は非共有結合する1種又は複数種の治療剤又は診断剤を含む。

【0041】

幾つかの実施形態において、上記治療剤又は診断剤は、治療用又は診断用タンパク質、核酸と低分子化合物から選ばれる。

30

【0042】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子又はその中の免疫グロブリン単一可変ドメインは、 $\leq 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、例えば $\leq 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 9 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、又は $\leq 1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、又は $\leq 9 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 7 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $\leq 1 \times 10^{-10} \text{ M}$ の K_D 値で血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミンに結合する。

40

【0043】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子は、ヒト血清アルブミンへの親和性 K_D 値が $10 \sim 100 \text{ nM}$ 、例えば $10 \sim 50 \text{ nM}$ である。上記 K_D 値の検出方法は、本分野でよく使用されているもので、例えば、本開示の実施例4に提供されるものである。

【0044】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子は、
(a) $\leq 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、例えば、 $\leq 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の K_D 値でH S Aに結合すること、
(b) 体内及び／又は体外で、H S Aなどの血清アルブミンとヒトF c R nなどのF c R nとの結合の遮断が検出されないこと、

50

(c) 治療剤又は診断剤を含む場合、上記治療剤又は診断剤の血漿半減期を延長すること、
から選ばれる少なくとも1つの活性を有する。

【0045】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される血清アルブミン結合分子は、単一ドメイン抗体（例えば、VHH）の有利な特性を保持すると共に、個体の循環において延長した寿命を有する。従って、そのような分子は、対象の血清中において数日間循環することで、治療の頻度や対象に与える不便性を低減し、且つ治療コストを低下させることができる。

【0046】

幾つかの実施形態において、本開示の血清アルブミン結合分子の半減期は、分子に存在する、血清タンパク質に特異的に結合する単一可変ドメインの数によって制御することができる。

【0047】

幾つかの実施形態において、本開示の血清アルブミン結合分子は、体内及び／又は体外で、血清アルブミンとFcRnの結合を促進する。

融合タンパク質

【0048】

本開示は、血清アルブミン結合ドメインとリラキシン又はその類似体とを含む融合タンパク質を提供し、上記血清アルブミン結合ドメインは、少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは上記本開示の何れか1つの免疫グロブリン単一可変ドメインである。

【0049】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、下記1)～5)、即ち、

1) 配列番号6、18～27の何れか1つで示されるアミノ酸配列中のCDR1、CDR2とCDR3、

2) 配列番号7で示されるアミノ酸配列中のCDR1、CDR2とCDR3、

3) 配列番号8、9と10で示されるCDR1、CDR2とCDR3、

4) 配列番号11、12と13で示されるCDR1、CDR2とCDR3、及び

5) CDR1は X_1SCX_2G （配列番号64）であり、そのうち、 X_1 はT又はN、 X_2 はM又はLである、

という何れか一項に記載のCDR1、CDR2とCDR3を含み、

CDR2は $X_3IYX_4VGGSTFYX_5X_6SVKG$ （配列番号58）であり、そのうち、 X_3 はS又はT、 X_4 はT又はM、 X_5 はT又はA、 X_6 はN又はDであり、

CDR3は $GSPARCX_7X_8RDP TTFX_9Y$ （配列番号59）であり、そのうち、 X_7 はR又はL、 X_8 はL又はR、 X_9 はD又はNであり、

そのうち、上記 $X_1 \sim X_9$ 中の1つ又は複数は、その選択的なアミノ酸の保存的アミノ酸変異であってもよい。

【0050】

上記CDRは、Kabat、IMGT、Chothia、AbM又はContact番号付けシステムに従って定義され、例えば、上記CDRはKabat番号付けシステムに従って定義される。

【0051】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、ラクダ由来又はヒト化、親和性成熟、T細胞エпитープの除去、抗体脱アミドの低減、抗体凝集の低減及び／又は抗体異性化の低減、又はその組み合わせから選ばれる何れか1つによって改変される。

【0052】

幾つかの実施形態において、上記ヒト化の免疫グロブリン単一可変ドメイン中のフレー

10

20

30

40

50

ムワーク領域は、ヒト重鎖可変領域の生殖細胞系列遺伝子IGHV3-23又はIGHV3-66に由来する。

【0053】

幾つかの具体的な実施形態において、上記ヒト化の免疫グロブリン単一可変ドメインは、20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83と84位（EU番号付けシステムに基づく位置）という位置中の少なくとも1つでアミノ酸変異を含み、

例えば、20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q又は84Pから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、

例えば、

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、

L20V、F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G

、

A23V、F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G

、

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、S74A

、

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、L78V

、

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、S49A

、

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、R83Q

、A84P、

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、A84P

、

S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、A84P、又は

S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、

から選ばれる何れか1つのアミノ酸変異の組み合わせを含む。

【0054】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号6、18～27の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは上記アミノ酸配列である。

【0055】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号7で示されるか又はそれと少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、或いは上記アミノ酸配列である。

【0056】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインはVHHであり、例えば、ラクダ由来、やヒト化のVHHである。

【0057】

幾つかの実施形態において、融合タンパク質中のリラキシン又はその類似体は、A鎖及びB鎖を含む。

【0058】

幾つかの実施形態において、A鎖は、配列番号31、50、52、54、56の何れか1つで示されるアミノ酸配列、又は配列番号31、50、52、54、56の何れか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は配列番号31、50、52、54、56の何れか1つに対して1つ又は複数のアミノ酸の添加、欠失、挿入若しくは置換を有するアミノ酸配列を有し、例えば、A鎖は、配列番号31若しくは50のN末端に1、2、3若しくは4個のアミノ酸が欠失してもよく、1、2、3、4個のアミノ酸が

10

20

30

40

50

添加されてもよい。

【0059】

幾つかの実施形態において、B鎖は、配列番号32、51、53、55、57の何れか1つで示されるアミノ酸配列、又は配列番号32、51、53、55、57の何れか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は配列番号32、51、53、55、57の何れか1つに対して1つ若しくは複数のアミノ酸の添加、欠失、挿入若しくは置換を有するアミノ酸配列を有し、例えば、B鎖は、配列番号51のN末端に1つのアミノ酸が欠失してもよい。

【0060】

幾つかの実施形態において、上記リラキシン又はその類似体のA鎖及びB鎖は、上記の任意の組み合わせである。

10

【0061】

幾つかの実施形態において、上記リラキシン又はその類似体は、下記1)～7)、即ち

- 1) 配列番号31で示されるA鎖と配列番号32で示されるB鎖、
- 2) 配列番号50で示されるA鎖と配列番号51で示されるB鎖、
- 3) 配列番号52で示されるA鎖と配列番号53で示されるB鎖、
- 4) 配列番号54で示されるA鎖と配列番号55で示されるB鎖、
- 5) 配列番号31で示されるA鎖と配列番号53で示されるB鎖、
- 6) 配列番号52で示されるA鎖と配列番号32で示されるB鎖、及び
- 7) 配列番号56で示されるA鎖と配列番号57で示されるB鎖、

20

というA鎖とB鎖の組み合わせの何れか1つを含む。

【0062】

>ヒトRLN2 A鎖

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (配列番号31)

>ヒトRLN2 B鎖 (deLB1)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (配列番号32)

>ヒトRLN1 A鎖

PYVALFEKCCLI GCTKRSLAKYC (配列番号50)

>ヒトRLN1 B鎖

VAAKWKDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

30

(配列番号51)

>ヒトRLN2 A鎖 (deLA1-4)

ALANKCCHVGCTKRSLARFC (配列番号52)

>ヒトRLN2 B鎖

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (配列番号53)

>ヒトRLN3 A鎖

DVLAGLSSSCCKWGCSEISSLC (配列番号54)

>ヒトRLN3 B鎖

RAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRW (配列番号55)

40

>ヒトRLN2 A鎖 (Z₁₀LYS)

X₁₀LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC、そのうち、X₁₀はQ又はDである

(配列番号56)

>ヒトRLN2 B鎖 (EからDへ変異)

DSWMEEVIKLCGRDLVRAQIAICGMSTWS (配列番号57)。

【0063】

幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は、1つの上記免疫グロブリン単一可変ドメインと、1つの上記リラキシン又はその類似体とを含む。幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は、1つの上記免疫グロブリン単一可変ドメインと、2つの上記

50

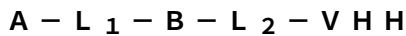
リラキシン又はその類似体とを含む。幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は、2つの上記免疫グロブリン単一可変ドメインと、1つの上記リラキシン又はその類似体とを含む。幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は、2つの上記免疫グロブリン単一可変ドメインと、2つの上記リラキシン又はその類似体とを含む。

【0064】

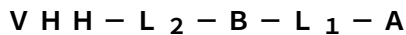
幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は、式(I)～式(IV)、即ち、



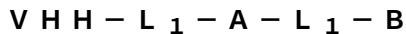
式(I)



式(II)



式(III)、及び



式(IV)

の何れか1つで示されるか又は任意の組み合わせのポリペプチドを含み、

そのうち、Aは上記何れか1つのリラキシンA鎖であり、Bは上記何れか1つのリラキシンB鎖であり、 L_1 と L_2 はリンカーであり、それぞれ独立的に存在しても存在しなくてもよい。

【0065】

幾つかの実施形態において、 L_1 は、(GGGQ) n (配列番号73)、(GGGQ) n 、(GGGS) n 、(PGPQ) n 及び(PGPA) n から選ばれるアミノ酸配列を含み、上記 n は1～10の整数から選ばれ、例えば、3、4、5、6、7、8である。

【0066】

幾つかの実施形態において、 L_1 は、配列番号33～35の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0067】

幾つかの実施形態において、 L_2 は($G_X S_Y$) Z のアミノ酸配列を含み、上記X、Y、Zは独立的に1～10の整数から選ばれ、例えば、 L_2 は(GGGGS) Z であり、上記Zは1～10の整数から選ばれ、例えば、3、4、5、6、7、8である。

【0068】

幾つかの実施形態において、 L_2 は、配列番号49で示されるか又はそれと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0069】

幾つかの実施形態において、 L_2 は、KR、KRKPTGYGSRKKR(配列番号65)、KRKPTGYGSRKR(配列番号66)、KRGGGPRR(配列番号60)、KRGGGPKR(配列番号61)、KRKPTGYGSKR(配列番号62)、KRS LKR(配列番号63)から選ばれる何れか1つ又はそれと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0070】

幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は一本鎖タンパク質である。

【0071】

幾つかの実施形態において、上記融合タンパク質は多量体、例えば、二量体タンパク質である。

【0072】

以下、例示的な実施形態を示す。

【0073】

融合タンパク質であって、血清アルブミン結合ドメインとリラキシン又はその類似体とを含み、上記血清アルブミン結合ドメインは免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは配列番号8、9と10で示されるCDR1、CDR2とCDR3、又は配列番号11、12と13で示されるCDR1、CDR2とCDR3を含み、上記リラキシン又はその類似体は配列番号31、32で示されるA鎖とB鎖、又は配列番号50、51で示されるA鎖とB鎖、又は配列番号52、53で示されるA鎖とB鎖、又は配列番号54、55で示されるA鎖とB鎖、又は配列番号31、53で示されるA鎖とB鎖、又は配列番号52、32で示されるA鎖とB鎖、又は配列番号56、57

10

20

30

40

50

で示される A 鎖と B 鎖を含む、融合タンパク質。

【0074】

融合タンパク質であって、血清アルブミン結合ドメインとリラキシン又はその類似体とを含み、上記血清アルブミン結合ドメインは免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは配列番号 6、18～27 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、或いは配列番号 7 で示されるか又はそれと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、上記リラキシン又はその類似体は配列番号 31、32 で示される A 鎖と B 鎖、又は配列番号 50、51 で示される A 鎖と B 鎖、又は配列番号 52、53 で示される A 鎖と B 鎖、又は配列番号 54、55 で示される A 鎖と B 鎖、又は配列番号 31、53 で示される A 鎖と B 鎖、又は配列番号 52、32 で示される A 鎖と B 鎖、又は配列番号 56、57 で示される A 鎖と B 鎖を含む、融合タンパク質。

10

【0075】

幾つかの実施形態において、配列番号 36～43 の何れか 1 つで示されるか又はそれと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む融合タンパク質を提供する。

【0076】

幾つかの実施形態において、RXFP1 受容体に対する本開示の融合タンパク質の結合親和性は、天然ヒトリラキシン 2（配列番号 31 と 53）の結合親和性と同等である。別の幾つかの実施形態において、RXFP1 受容体に対する本開示の融合タンパク質の結合親和性は、天然ヒトリラキシン 2（配列番号 31 と 53）の結合親和性よりも小さい。別の幾つかの実施形態において、RXFP1 受容体に対する本開示の融合タンパク質の結合親和性は、天然ヒトリラキシン 2（配列番号 31 と 53）の結合親和性よりも大きい。

20

【0077】

幾つかの実施形態において、本開示の融合タンパク質は天然ヒトリラキシン 2（配列番号 31 と 53）に比べて顕著に増加し、例えば、異なる種において十数時間から十数日間である、体内の血清アルブミンと同等の体内半減期（ $t_{1/2}$ ）を有する。

【0078】

幾つかの実施形態において、本開示の融合タンパク質は、 $\leq 1 \times 10^{-7}$ M、例えば、 $\leq 1 \times 10^{-8}$ M の K_D 値で HSA に結合する。

【0079】

幾つかの実施形態において、本開示の融合タンパク質は、体内及び／又は体外で血清アルブミンと FcRn の結合を遮断しない。

30

【0080】

本開示の融合タンパク質は、その薬学的に許容される塩をカバーする。

ポリヌクレオチド及びベクター

【0081】

幾つかの実施形態において、本開示の血清アルブミン結合分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0082】

幾つかの実施形態において、本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

40

【0083】

上記ポリヌクレオチドは、RNA、DNA 又は cDNA であってもよい。本開示の幾つかの実施形態によれば、本開示のポリヌクレオチドは単離したポリヌクレオチドである。

【0084】

本開示のポリヌクレオチドは、ベクターの形態であってもよく、ベクター中に存在してもよく、及び／又はベクターの一部であってもよく、当該ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、YAC 又はウイルスベクターである。ベクターは、特に発現ベクターであってもよく、即ち、血清アルブミン結合分子の体外及び／又は体内（即ち、適切な宿主細胞、宿主有機体及び／又は発現系で）における発現を可能にするベクターであってもよい

50

。当該発現ベクターは通常、少なくとも1種の本開示のポリヌクレオチドを含み、それは、1つ又は複数の適切な発現調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど）に操作可能に連結される。特定の宿主における発現に対して上記エレメント及びその配列を選択することは、当業者の常識である。本開示の血清アルブミン結合分子の発現に有用又は必須である調節エレメント及び他のエレメントは、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、組み込み因子、選択マーカー、リーダー配列、レポーター遺伝子である。

【0085】

本開示のポリヌクレオチドは、本開示のポリペプチドのアミノ酸配列についての情報に基づき、既知の方法（例えば、自動DNA合成及び／又は組換えDNA技術）により調製若しくは取得されてもよく、及び／又は適切な天然源から単離されてもよい。

10

宿主細胞

【0086】

幾つかの実施形態において、1種又は複数種の本開示の血清アルブミン結合分子を発現するか又は発現可能な宿主細胞、及び／又は本開示のポリヌクレオチド若しくはベクターを含む組換え宿主細胞を提供する。

【0087】

幾つかの実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞又は哺乳動物細胞である。

【0088】

細菌細胞は、例えば、グラム陰性菌株（例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）菌株、プロテウス属（*Proteus*）菌株及びシュードモナス属（*Pseudomonas*）菌株）及びグラム陽性菌株（例えば、バシラス属（*Bacillus*）菌株、ストレプトミセス属（*Streptomyces*）菌株、ブドウ球菌属（*Staphylococcus*）菌株及びラクトコッカス属（*Lactococcus*）菌株）の細胞を含む。

20

【0089】

真菌細胞は、例えば、トリコデルマ属（*Trichoderma*）、ニューロスポラ属（*Neurospora*）及びアスペルギルス属（*Aspergillus*）の種の細胞を含み、又はサッカロミセス属（*Saccharomyces*）（例えば、サッカロミセスセレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*））、シゾサッカロミセス属（*Schizosaccharomyces*）（例えば、シゾサッカロミセスポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*））、ピキア属（*Pichia*）（例えば、ピキアパストリス（*Pichia pastoris*）及びピキアメタノリカ（*Pichia methanolic*））及びハンゼヌラ属（*Hansenula*）の種の細胞を含む。

30

【0090】

例示的に、哺乳動物細胞は、例えば、HEK293細胞、CHO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞などを含む。

【0091】

本開示は、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞及び本分野における異種タンパク質を発現するための任意の他の細胞を使用してもよい。

40

【0092】

本開示の細胞は、完成した植物又は動物個体に発達することができない。

産生又は調製方法

【0093】

本開示は、本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質を調製する方法を提供し、それは、

－ 本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質の発現を可能にする条件下で、本開示の宿主細胞を培養することと、

50

- － 培養物から上記宿主細胞で発現された血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質を回収することと、
- － 任意選択的に、本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質を更に精製及び／又は修飾することと、を含む。

【0094】

本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質は、上記のような細胞において細胞内方式で（例えば、細胞質において、ペリプラズムにおいて、又は封入体において）産生され、次に宿主細胞から単離され、且つ任意選択的に更に精製されてもよく、或いは、細胞外方式で（例えば、宿主細胞を培養する培地において）産生され、次に培地から単離され、且つ任意選択的に更に精製されてもよい。

【0095】

組換えてポリペプチド又はタンパク質を産生するための方法及び試薬、例えば、特定の適切な発現ベクター、形質転換又はトランスフェクション方法、選択マーカー、タンパク質の発現を誘導する方法、培養条件などは、本分野において既知のものである。同様に、本開示に係る結合分子又は抗体などの製造に適用される標的タンパク質の単離及び精製技術は、当業者に公知のものである。抗体を産生・精製する方法は、従来技術でよく知られており、且つ例えば、コールド・スプリング・ハーバーの抗体実験技術マニュアル（5～8章及び15章）で見出すことができる。本開示の工学的な抗体は、通常の方法により調製・精製されてもよい。例えば、重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列は、クローニングして発現ベクターに組換えてもよい。組換えた免疫グロブリン発現ベクターは、細胞を安定的にトランスフェクションすることができる。哺乳動物類の発現系は、特にFc領域の高度に保存的なN末端において、抗体のグリコシル化を引き起こすことになる。ヒト抗原に特異的に結合する抗体を発現することにより、安定的なクローンが得られる。陽性のクローンは、バイオリアクターの無血清培地において拡大培養することで、抗体を産生する。抗体が分泌された培養液は、通常の方法により精製して収集することができる。抗体は、通常の方法によりろ過して濃縮することができる。可溶性の混合物及び多量体は、分子ふるい、イオン交換などの通常の方法により除去されてもよい。得られた生成物は、直ちに－70℃などで冷凍し、又は凍結乾燥しなければならない。

【0096】

しかしながら、本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質は、本分野で既知のタンパク質を産生する他の方法、例えば、固相又は液相合成を含む化学合成により得られてもよい。

組成物

【0097】

幾つかの実施形態において、上記組成物は、予防若しくは治療有効量の上記の本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質、及び／又は上記血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、1種又は複数種の薬学的に許容されるベクター、希釈剤、緩衝剤又は賦形剤とを含む医薬組成物である。

【0098】

幾つかの具体的な実施形態において、上記医薬組成物の単位用量には、0.01～99重量%の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質を含んでもよい。別の幾つかの具体的な実施形態において、医薬組成物の単位用量に含まれる血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質の量は、0.1～2000mgであり、幾つかの具体的な実施形態においては1～1000mgである。

試薬キット及び検出

【0099】

本開示は、上記本開示の任意の血清アルブミン結合分子及び／又は本開示の血清アルブミン結合分子をコードする核酸分子を含む試薬キット又は製品を提供する。

【0100】

本開示は、血清アルブミンを検出する組成物を提供し、上記組成物は本開示の血清アルブミン結合分子を含む。本開示は、血清アルブミンを体内又は体外で検出するための方法、システム又は装置を更に提供し、それは本開示の血清アルブミン結合分子を使用することを含む。

【0101】

幾つかの実施形態において、体外検出方法、システム又は装置は、例えば、(1) 試料を本開示の血清アルブミン結合分子と接触することと、(2) 本開示の血清アルブミン結合分子と試料との間で形成された複合物を検出すること、及び／又は(3) 参照試料(例えば、対照試料)を抗体と接触することと、(4) 参照試料と比較することと、抗体と試料との間での複合物形成の程度を確認することとを含むことができる。例えば、対照試料又は対象におけるものと比べて、試料又は対象における複合物形成の変化(例えば、統計的に有意な変化)は、試料に血清アルブミンがあることを示す。

【0102】

別の幾つかの実施形態において、体内検出方法、システム又は装置は、(1) 対象に本開示の血清アルブミン結合分子を投与することと、(2) 本開示の血清アルブミン結合分子と対象との間での複合物形成を検出することとを含んでもよい。検出は、複合物を形成する位置又は時間を確認することを含んでもよい。血清アルブミン結合分子に結合する抗体は、結合するか又は結合しない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接的又は間接的に標識されてもよい。適切な検出可能な物質は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質を含む。血清アルブミン結合分子に結合するか又は結合しない抗体を測定又は可視化することにより、本開示の血清アルブミン結合分子と血清アルブミンとの間の複合物形成を検出することができる。通常の検出アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)又は組織免疫組織化学を使用することができる。幾つかの実施形態において、競合免疫アッセイによって試料における血清アルブミンの存在を分析し、上記競合免疫アッセイには、検出可能な物質で標識された標準物質及び標識されていない本開示の血清アルブミン結合分子が使用される。検出又は測定される生体試料は、組織細胞、血液、血漿、血清、唾液、尿、糞便、組織液又は培養液であってもよい。

【0103】

幾つかの実施形態において、検出の目的のために、本開示の血清アルブミン結合分子は蛍光団又は発色団で標識されてもよい。

疾患を治療、予防する方法及び製薬的使用

【0104】

本開示は、治療剤又は診断剤の血漿半減期を延長する方法であって、本開示の血清アルブミン結合分子又はその免疫グロブリン単一可変ドメインを上記治療剤又は診断剤と共有又は非共有結合することを含む、方法を提供する。連結するための方法は本分野で既知のものであり、又は任意の今後の方法であってもよく、例えば、化学的カップリングによりそれを融合し、DNAレベルで融合し、mRNAレベルで融合し、又はタンパク質レベルで融合することなどができる。

【0105】

幾つかの実施形態において、上記治療用又は診断用分子は、治療標的、診断標的であってもよい。標的は、治療又は診断用の任意のタンパク質、ペプチド、核酸、オリゴ核酸、糖、多糖、糖タンパク質であってもよい。実例としては、受容体、受容体リガンド、ウイルスコートタンパク質、免疫系タンパク質、ホルモン、酵素、抗原、細胞シグナルタンパク質又はそれらの断片を含むが、これらに限定されない。

【0106】

幾つかの実施形態において、本開示の血清アルブミン結合分子又はその免疫グロブリン単一可変ドメインに連結する治療剤又は診断剤の血漿半減期が連結前と比べて少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、例えば少なくとも5倍、例えば少なくとも10倍若しくは20倍以上向上し、例えば、連結前と比べて、増加した血漿半減期が1時間を超

えてもよく、好ましくは2時間を超え、より好ましくは6時間を超え、例えば12時間を超え、又は更に24、48若しくは72時間を超える。

【0107】

本開示は、疾患を治療及び／又は予防する方法であって、それを必要とする対象に治療及び／又は予防有効量の本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。

【0108】

本開示は、疾患を治療及び／又は予防するための血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質の方法であって、それを必要とする対象に治療及び／又は予防有効量の本開示の血清アルブミン結合分子又は融合タンパク質を投与することを含む方法を更に提供する。

10

【0109】

本開示は、疾患を治療及び／又は予防するための薬剤の調製における血清アルブミン結合分子の使用を更に提供する。

【0110】

幾つかの実施形態において、上記疾患は線維性疾患又は心臓血管疾患である。

【0111】

幾つかの具体的な実施形態において、上記心臓血管疾患は、心不全（HF）、心筋肥大である。

【図面の簡単な説明】

【0112】

20

【図1】血清アルブミン結合分子のELISA結合実験の結果である。図1Aは抗HSA抗体のヒト血清アルブミン（HSA）へのELISA結合実験の結果である。図1Bは抗HSA抗体のサル血清アルブミン（CySA）に結合するELISA結合実験の結果である。図1Cは抗HSA抗体のマウス血清アルブミン（mSA）に結合するELISA結合実験の結果である。

【図2】FcRnとHSAの結合に対する抗HSA抗体の影響の実験結果である。

【図3】抗HSA抗体のマウス薬物動態研究における静脈投与後の血漿中の血中濃度－時間曲線である。

【図4】抗HSA抗体のマウス薬物動態研究の結果である。図4Aはノンコンパートメントモデルにより抗HSA抗体の血漿中の $T_{1/2}$ パラメータを算出した比較結果である。

30

図4Bは Cl_{obs} （ $mL / (min \times kg)$ ）パラメータの比較結果である。

【図5】本開示の融合タンパク質（式（III））の構造模式図である。

【図6】図6AはTHP1細胞におけるHSAなしの条件下での融合タンパク質の体外活性を検出した結果である。図6BはTHP1細胞における、系に1%のHSAが含まれる条件下での融合タンパク質の体外活性を検出した結果である。

【図7】図7Aは融合タンパク質のマウスモデルにおける血漿中の血中濃度－時間曲線である。図7Bは融合タンパク質のラットモデルにおける血漿中の血中濃度－時間曲線である。

【図8】融合タンパク質のマウス心筋肥大への作用実験における、マウスISO心筋肥大モデルの心臓重量／脛骨長比である。

40

【発明を実施するための形態】

【0113】

定義

本開示が更に容易に理解されるように、以下、幾つかの技術・科学用語を具体的に定義する。本開示における別の箇所で別途明確に定義されていない限り、本開示に使用される他の技術・科学用語の全ては、当業者に通常理解されている意味を有する。

【0114】

本開示に使用されるアミノ酸の3文字コードと1文字コードは、J. biol. chem, 243, p 3558 (1968)に記載された通りである。

【0115】

50

「抗体」又は「免疫グロブリン」は、重鎖抗体を指しても、2つの重鎖と2つの軽鎖が鎖間ジスルフィド結合で連結してなる通常のテトラペプチド鎖抗体を指しても、全長抗体、その個々の鎖及びその全ての部分、ドメイン又は断片（抗原結合ドメイン又は断片、例えば、VHHドメイン又はVH/VLドメインを含むが、これらに限定されない）を含む一般的な用語として使用される。

【0116】

「配列」（例えば、「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「単一可変ドメイン配列」、「VHH配列」又は「タンパク質配列」などの用語において）は、本開示において更に限定的に解釈する必要がない限り、一般的に、関連するアミノ酸配列を含むだけでなく、上記配列をコードする核酸配列又はヌクレオチド配列も含むと理解すべきである。

10

【0117】

ポリペプチド又はタンパク質の「ドメイン」は、タンパク質の他の部分から独立してその三次構造を維持できる折り畳みタンパク質構造を指す。一般的に、ドメインは、タンパク質の単一の機能特性を担い、且つ多くの場合に、タンパク質の他の部分及び／又はドメインの機能を失うことなく、添加され、除去され、又は他のタンパク質に移されてもよい。

【0118】

「免疫グロブリンドメイン」は、抗体鎖の球状領域を指す。

【0119】

「免疫グロブリン可変ドメイン」とは、基本的に「フレームワーク領域1」（FR1）、「フレームワーク領域2」（FR2）、「フレームワーク領域3」（FR3）及び「フレームワーク領域4」（FR4）と、「相補性決定領域1」（CDR1）、「相補性決定領域2」（CDR2）及び「相補性決定領域3」（CDR3）とからなるドメインである。従って、可変ドメインの一般的な構造（又は配列）は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4と示されてもよい。可変ドメインは、抗原結合部位を有するため、抗原に対する特異性が付与される。

20

【0120】

「抗体フレームワーク（FR）」とは、可変ドメインの抗原結合ループ（CDR）のステントとして使用される可変ドメインの一部を指す。

【0121】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、通常、他の可変ドメインと相互作用しない場合（例えば、通常の4本鎖モノクローナル抗体のVHとVLドメインの間に必要なVH/VL相互作用がない場合）に機能的抗原結合部位を形成することができる免疫グロブリン可変ドメイン（重鎖又は軽鎖ドメインであってもよく、VH、VHH又はVLドメインを含む）を指すために使用される。「免疫グロブリン単一可変ドメイン」の実例は、ナノボディ（VHH、ヒト化VHH及び／又はラクダ化ヒトVHなどのラクダ化VHを含む）、IgNAR、ドメイン、VHドメインとして又はVHドメイン由来の（単一ドメイン）抗体（例えば、dAbsTM）及びVLドメインとして又はVLドメイン由来の（単一ドメイン）抗体（例えば、dAbsTM）を含む。重鎖可変ドメイン（例えば、VH又はVHHドメイン）に基づく及び／又は由来する免疫グロブリン単一可変ドメインは、通常好ましい。免疫グロブリン単一可変ドメインの一具体的な実例としては、下記のように定義される「VHHドメイン」（又は、「VHH」と略称）である。

30

【0122】

「VHHドメイン」は、重鎖単一ドメイン抗体、VHH、VHHドメイン、VHH抗体断片、VHH抗体、ナノボディとも呼ばれ、「重鎖抗体」（即ち、「軽鎖を欠く抗体」）と呼ばれる抗原結合免疫グロブリンの可変ドメインである（Hamers C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: 「Naturally occurring antibodies devoid of light chains」, Nature 363, 446~448 (1993)

40

50

）。「VHHドメイン」という用語は、通常のテトラペプチド鎖構造の抗体に存在するVH及びVLから上記可変ドメインを区別するために使用される。VHHドメインは、他の抗原結合ドメインを必要とすることなく、エピトープに特異的に結合する（通常のテトラペプチド鎖構造抗体におけるVH又はVLドメインについて、エピトープは、VLドメインとVHドメインと共によって認識される）。VHHドメインは、単一の免疫グロブリンドメインで形成された小さくて安定的且つ効率的な抗原認識ユニットである。「重鎖単ドメイン抗体」、「VHHドメイン」、「VHH」、「VHHドメイン」、「VHH抗体断片」、「VHH抗体」、「Nanobody（登録商標）」及び「Nanobody（登録商標）ドメイン」（「Nanobody」はAblynx N. V. 社、Ghent, Belgiumの商標である）という用語は、互換的に使用されてもよい。「VHHドメイン」は、ラクダ科動物により産生された天然抗体を含むが、これに限定されず、ラクダ科動物により抗体を産生した後にヒト化したものであってもよく、ファージディスプレイ技術によりスクリーニングしたものであってもよい。VHHドメインにおけるアミノ酸残基の総数は、通常110～120の範囲内であり、112～115の間にある場合が多い。しかし、比較的に小さい配列及び比較的に長い配列も本開示に記載の目的に適合することができることに留意すべきである。特定の抗原又はエピトープに結合するVHHを得る方法は、この前にR. van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240 (2000) 185-195, Li et al., J Biol Chem., 287 (2012) 13713-13721, Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol. 8 (12), pp. 2645-2652, 17 June, 2009及びWO 94/04678という文献に開示された。

10

20

30

40

50

【0123】

本分野でVHドメイン及びVHHドメインについて公知されているように、各CDRにおけるアミノ酸残基の総数は、異なる可能性があり、且つKabab番号で示されるアミノ酸残基の総数に対応しない可能性がある（即ち、Kabab番号に基づく1つ又は複数の位置は、実際の配列において占められていない可能性がある、又は実際の配列は、Kabab番号の許容する数よりも多いアミノ酸残基を含む可能性がある）。これは、一般的に、Kababに基づく番号は、実際の配列におけるアミノ酸残基の実際の番号に対応するか又は対応しない可能性があることを意味する。他の番号付けシステム又は番号付け規則は、Chothia、IMGT、AbMを含む。

【0124】

「ヒト化抗体（humanized antibody）」は、CDR移植抗体（CDR-grafted antibody）とも呼ばれ、非ヒトCDR配列をヒトの抗体可変領域フレームワークに移植して産生された抗体を指す。キメラ抗体が大量の非ヒトタンパク質成分を持つことにより誘導された強い免疫応答反応を克服することができる。免疫原性の低下に伴う活性の低下を回避するために、上記完全ヒト抗体可変領域に対して最も少ない逆変異を行うことにより、活性を維持することができる。「ヒト化」の例としては、ラクダ科に由来するVHHドメインを、ヒトの通常のテトラペプチド鎖構造抗体のVHドメインにおける対応する位置に存在する1つ又は複数のアミノ酸残基で元のVHH配列のアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸残基を置換することで、「ヒト化」することができることを含み、ヒト化VHHドメインは、1つ又は複数の完全なヒトフレームワーク領域配列を含んでもよく、且つ幾つかの具体的な実施形態においては、IGHV3のヒトフレームワーク領域配列を含んでもよい。ヒト化方法は、例えば、タンパク質表面アミノ酸のヒト化（resurfacing）及びCDRを他の「ステント」（ヒトステント又は非免疫グロブリンステントを含むが、これらに限定されない）に「移植」する抗体ヒト化ユニバーサルフレームワーク移植法（CDR grafting to a universal framework）である。上記CDR移植に適するステント及び技術は、本分野で既知のものである。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列DNA配列は、VBaseヒト生殖細胞系列配列データベースにおいて、及びKa

bat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th editionにおいて見出すことができる。本開示のヒト化抗体は、更にファージで提示される、CDRに対して親和性成熟を行ったヒト化抗体も含む。また、免疫原性の低下に伴う活性の低下を回避するために、上記ヒト抗体可変領域フレームワーク配列に対して最も少ない逆変異又は復帰変異を行うことにより、活性を維持することができる。

【0125】

当業者は、多くの既知の番号付け案の何れか1つによって抗体CDRのアミノ酸配列境界を決定することができ、既知の番号付け案は、Kabata et al., 上記参照（「Kabata」番号付け案）、Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948（「Chothia」番号付け案）、MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745（「Contact」番号付け案）、Lefran et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77（「IMGT」番号付け案）及びHoneggeとPluckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70（「AHO」番号付け案）という文献に記載された番号付け案を含み、それらは、それぞれ援用により全体として組み込まれている。

【0126】

「エピトープ」又は互換的に使用可能な「抗原決定基」という用語は、抗体が結合する抗原における任意の抗原決定基を指す。抗原決定基は、通常、例えばアミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的活性表面基を含み、且つ、通常、特定の3次元構造特性及び／又は特定の電荷特性を有する。例えば、エピトープは、通常、独特な空間立体配座で少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15個の連続又は非連続のアミノ酸を含み、「線状」エピトープ又は「立体配座」エピトープであってもよい。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻、G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい。線状エピトープにおいて、抗原と相互作用分子（例えば、抗体）との間の相互作用部位の全ては、抗原の一次アミノ酸配列に沿って線状に存在する。配座エピトープにおいて、相互作用部位は、互いに分離したアミノ酸残基に跨って存在する。本分野でよく知られている多くのエピトープマッピング技術により、所定の抗原のエピトープを同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻、G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい。例えば、線状エピトープは、固体支持体上に、タンパク質分子の各部分に対応する大量のペプチドを同時に合成し、且つこれらのペプチドを支持体に結合したまま抗体と反応させるというような方法により決定することができる。これらの技術は、本分野で既知のものであり、且つ例えば、米国特許第4,708,871号、Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998~4002、Geysen et al., (1986) Molec. Immunol. 23:709-715に記載されている。立体配座エピトープは、例えば、x線結晶学と二次元核磁気共鳴などによりアミノ酸の空間的配置を決定することで同定されてもよい。当業者に既知の通常の技術を使用して、同じエピトープとの結合に対する抗体を競合的にスクリーニングすることができる。例えば、競合及び交差競合研究を行うことにより、互いに競合したり、交差競合したりして抗原に結合する抗体を得ることができる。それらの交差競合によって同じエピトープと結合する抗体を得るハイスループット方法は、国際特許出願WO03/48731に記載されている。従って、当業者の既知の通常の技術を使用して、本開示に係る抗体分子と競合して血清アルブミンにおける同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片を得ることができる。

【0127】

一般的に、「特異性」という用語は、特定の抗原結合分子又は抗原結合タンパク質（例

えば、本開示の血清アルブミン結合分子)の結合可能な異なるタイプの抗原又はエピトープの数を指す。その特異性は、抗原結合分子の親和性 (a f f i n i t y) 及び／又は親和力 (a v i d i t y) に基づいて確認することができる。抗原と抗原結合タンパク質との解離平衡定数 (K_D) で示される親和性は、エピトープと抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との結合強度の目安であり、 K_D 値が小さいほど、エピトープと抗原結合タンパク質との結合強度が強くなる (又は、親和性は、 $1/K_D$ である結合定数 (K_a) で示されてもよい)。当業者に知られるように、具体的な関心のある抗原によっては、既知の方法で親和性を測定することができる。親和性は、抗原結合タンパク質 (例えば、免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン又はそれを含むポリペプチド) と関連抗原との結合強度の目安である。親和性は、その抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との親和性、及び抗原結合タンパク質に存在する関連結合部位の数に関係している。

10

【0128】

「血清アルブミン結合ドメイン」は、血清アルブミン又はそのエピトープに特異的に結合可能な任意のポリペプチドを指す。「血清アルブミン結合分子」は、血清アルブミン又はそのエピトープに特異的に結合可能な分子を指し、タンパク質、ポリペプチドを含むが、これらに限定されない。血清アルブミン結合分子は、血清アルブミン又はそのエピトープに対する本開示に定義されるような抗体又はその抗原結合断片を含み、或いは上記抗体、その抗原結合断片の複合体、融合タンパク質を含んでもよい。抗原結合断片は、例えば s d A b 又は二重特異性抗体、多重特異性抗体である。本開示の血清アルブミン結合分子は、血清アルブミンに結合する少なくとも1つ (例えば、2つ、3つ、4つ又はそれ以上) の免疫グロブリン単一可変ドメイン (例えば、V H H) を含んでもよい。本開示の血清アルブミン結合分子は免疫グロブリン単一可変ドメインの他に、リンカー及び／又はエフェクター分子の機能を有する部分を含んでもよく、上記エフェクター分子は、診断剤又は治療剤、例えば、抗腫瘍剤、免疫調節剤、発色団、蛍光団、化学発光化合物、酵素、金属イオン及びその任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。

20

【0129】

「親和性成熟」した血清アルブミン抗体 (例えば、V H H) は、1つ又は複数の C D R に1つ又は複数の変化があり、上記変化により、血清アルブミンへの親和性はその親血清アルブミン抗体に比べて増加される。親和性成熟した抗血清アルブミン抗体は、例えば、Marks et al., 1992, Biotechnology 10:779-783 又は Barbas et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813.、Shier et al., 1995, Gene 169:147-155、Yelton et al., 1995, Immunol. 155:1994-2004、Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154 (7):3310-9、及び Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226 (3):889896、KS Johnson & RE Hawkins, 「Affinity maturation of antibodies using phage display」, Oxford University Press 1996 に記載された本分野で既知の方法によって調製することができる。

30

40

【0130】

「復帰変異」とは、ヒト抗体由来の F R 領域のアミノ酸残基を、元の抗体の対応する位置におけるアミノ酸残基に変異させることを指し、通常、ヒト化抗体による免疫原性の低下と共に引き起こされる活性の低下を回避するために、上記ヒト化抗体の可変領域に対して最も少ない逆変異を行うことで、抗体の活性を維持することができる。

【0131】

通常、本開示の血清アルブミン結合分子は、B i a c o r e 又は K i n E x A 又は F o r t i b i o アッセイにおいて測定された、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-10}$ モル／リットル (M)、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-10}$ モル／リットル、更により好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-10}$ 又はそれ以下の解離定数 (K_D)、及び／又は少なくとも 10^{-7} M

50

、好ましくは少なくとも 10^{-8} M、より好ましくは少なくとも 10^{-9} M、更に好ましくは少なくとも 10^{-10} M の結合定数 (K_a) で結合しようとする抗原 (即ち、血清アルブミン) に結合する。何れの 10^{-4} M よりも大きい K_D 値も、一般的に非特異的結合を示すと見なされる。抗原結合タンパク質の抗原又はエピトープへの特異的結合は、例えば、本開示に記載の表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ、Scatchard アッセイ及び／又は競合結合アッセイ (例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素免疫アッセイ (ELISA) 及びサンドイッチ競合アッセイ) を含む既知の任意の適切な方法によって測定することができる。

【0132】

「阻害」又は「遮断」という用語は互換的に使用されてもよく、且つ部分的と完全な阻害／遮断の両方をカバーする。

【0133】

本開示において「相同性」、「同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列間又は2つのポリペプチド間の配列類似性を指す。2つの比較される配列における位置が何れも同じ塩基又はアミノ酸モノマーサブユニットに占められる場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンに占められる場合、上記分子は当該位置で相同である。2つの配列間の相同性百分率は、2つの配列の共有するマッチング又は相同位置数を、比較される位置数で割って100をかける関数である。例えば、配列の最適アラインメントを行う際に、2つの配列中の10個の位置のうち、6個がマッチングしており、又は相同である場合は、2つの配列が60%相同であり、2つの配列中の100個の位置のうち、95個がマッチングしており、又は相同である場合は、2つの配列が95%相同である。一般的には、2つの配列をアラインメントして最大の相同性百分率が得られる場合に比較する。

【0134】

「保存的アミノ酸変異」又は「保存的 (アミノ酸) 置換」は、タンパク質又はポリペプチドのある若しくは複数のアミノ酸残基に保存的アミノ酸置換を行い、置換前のアミノ酸残基と置換後のアミノ酸残基の化学構造が類似し、且つ置換によるタンパク質又はポリペプチドの機能、活性や他の生物学的特性への影響が比較的に少ないか、又は基本的でないことを意味する。上記保存的アミノ酸置換は、本分野で公知のものであり、例えば、保存的アミノ酸置換は、下記の群 (i) ~ (v) における1つのアミノ酸が同一の群における別のアミノ酸残基で置換されることが好ましい：

(i) 比較的小さい脂肪族非極性又は弱極性残基：Ala、Ser、Thr、ProとGly、

(ii) 極性負電荷残基及びその (非帯電) アミド：Asp、Asn、GluとGln、

(iii) 極性正電荷残基：His、ArgとLys、

(iv) 比較的大きい脂肪族非極性残基：Met、Leu、Ile、ValとCys、及び

(v) 芳香族残基：Phe、TyrとTrp。

【0135】

特に好ましくは、保存的アミノ酸置換は、AlaがGly又はSerで置換され、ArgがLysで置換され、AsnがGln又はHisで置換され、AspがGluで置換され、CysがSerで置換され、GlnがAsnで置換され、GluがAspで置換され、GlyがAla又はProで置換され、HisがAsn又はGlnで置換され、IleがLeu又はValで置換され、LeuがIle又はValで置換され、LysがArg、Gln又はGluで置換され、MetがLeu、Tyr又はIleで置換され、PheがMet、Leu又はTyrで置換され、SerがThrで置換され、ThrがSerで置換され、TrpがTyrで置換され、TyrがTrp又はPheで置換され、ValがIle又はLeuで置換されることである。

【0136】

「核酸」、「核酸分子」又は「ポリヌクレオチド」は、本開示において互換的に使用さ

10

20

30

40

50

れてもよく、一本鎖若しくは二本鎖の任意のDNA分子又はRNA分子、及び一本鎖の場合に、その相補配列の分子、好ましくは二本鎖DNAを指す。核酸が別の核酸配列と機能的な関係に置かれる場合、核酸は「効果的に連結されている」とする。例えば、プロモーター又はエンハンサーがコード配列の転写に影響を与えると、プロモーター又はエンハンサーは、上記コード配列に効果的に連結されている。

【0137】

「ベクター」という用語は、それに連結された別の核酸を輸送可能な核酸分子を指す。一実施形態において、ベクターは「プラスミド」であり、他のDNAセグメントをそれに連結可能な環状二本鎖DNA環を指す。別の実施形態において、ベクターはウイルスベクターであり、そのうち、別のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。本開示におけるベクターは、それらを導入した宿主細胞において自己複製することができ（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーマル哺乳動物ベクター）、又は、宿主細胞に導入された後、宿主細胞のゲノムに整合されることで、宿主ゲノムと共に複製することができる（例えば、非エピソーマル哺乳動物ベクター）。

【0138】

本開示に使用される「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養物」という表現は、互換的に使用されてもよく、且つこれらの名称は何れも子孫を含む。従って、「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、継代数を考慮せずに、初代被験細胞及びそれより誘導された培養物を含む。また、意図するかしないかの変異のために、あらゆる子孫は、DNA含有量において精確に同じであり得ないと理解すべきである。最初の形質転換細胞からスクリーニングされたものと同様の機能又は生物学的活性を有する変異子孫が含まれる。異なる名称を指す場合は、文脈から明らかになる。

【0139】

「宿主細胞」は、各細胞又は細胞培養物を含み、核酸挿入断片を組み込むためのベクターの受容体であってもよく、又は既にそれになっている。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子世代を含み、且つ天然、偶然の又は意図的な変異のために、子世代は、（形態学又はゲノムDNA補体において）元の親細胞と必ずしも完全に同じであるとは限らない。宿主細胞は、本開示に係る核酸により体内でトランスフェクション及び／又は形質転換された細胞を含む。「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養物」は、互換的に使用されてもよく、且つこのような名称は何れもその子孫を含む。また、意図するかしないかの変異のために、あらゆる子孫は、DNA含有量において精確に同じであり得ないと理解すべきである。最初の形質転換細胞からスクリーニングされたものと同様の機能又は生物学的活性を有する変異子孫が含まれる。

【0140】

「医薬組成物」は、1種又は複数種の本開示に記載の融合タンパク質、血清アルブミン結合分子、ポリヌクレオチド及び他の成分を含む混合物を示し、上記他の成分は、例えば、生理学的／薬学的に許容されるベクター、希釈剤、緩衝剤又は賦形剤である。医薬組成物は、生体への投与を促進し、活性成分の吸収に寄与して更に生物活性を発揮するためのものである。

【0141】

「与える」、「投与」及び「処理」は、動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器や生物流体に使用される場合に、外因性薬剤、治療剤、診断薬又は組成物の、動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器や生物流体との接触を指す。「与える」、「投与」及び「処理」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究及び実験方法を指してもよい。細胞の処理は、試薬の細胞との接触、及び試薬の流体との接触を含み、そのうち、上記流体は細胞と接触する。

「与える」、「投与」及び「処理」は、また、試薬、診断、結合組成物により、又は別種の細胞を通じて、体外及びエクスピボで細胞を処理することを指す。「処理」はヒト、獣医学又は研究対象に適用される場合に、治療的処理、予防又は予防的措置、研究と診断的使用を指す。

【0142】

「治療」は、経口又は外用治療剤（例えば、本開示の融合タンパク質）を対象に与えることを指し、上記患者は1種又は複数種の疾患症状を有するが、上記治療剤は、これらの症状に対して治療作用を有することが既知のものである。通常、治療される患者又は集団には、1種又は複数種の疾患症状を効果的に緩和する量で治療剤を与えることにより、これらの症状の解消を誘導し、又は臨床的に測定可能な任意の程度まで進行しないようにこれらの症状を阻害する。何れかの具体的な疾患症状を効果的に緩和する治療剤の量（「治療有効量」ともいう）は、患者の疾患状態、年齢と体重、及び薬剤の患者において必要な治療効果を発生させる能力など、種々の要因により変化することができる。当該症状の重症度又は進行状況の評価に医者又は他のプロのヘルスケアプロバイダによく用いられる何れかの臨床的検出方法により、疾患症状が低減されたか否かを評価することができる。本開示の実施形態（例えば、治療方法又は製品）は、それぞれの目標疾患症状の緩和において無効な可能性があるが、本分野で既知の任意の統計的検定方法、例えばStudent t検定、カイ二乗検定、Mann及びWhitneyによるU検定、Kruskal-Wallis検定（H検定）、Jonckheere-Terpstra検定及びWilcoxon検定により、統計的に有意な数の患者において目標疾患症状を低減するはずであることが確認される。

10

【0143】

「任意選択的」又は「任意選択的に」は、その後に説明される事象又は状況が生じてもよいが、必ずしも生じなくてもよいことを意味し、この説明は、当該事象又は状況が生じる場合と生じない場合を含む。「及び／又は」は、2つの指定された特徴又は成分のそれぞれが、他方を有するか有しないかを特定の示すものと見なすべきである。従って、本開示において「A及び／又はB」という語句で使用されるような「及び／又は」という用語は、「A及びB」、「A又はB」、「A」（単独）及び「B」（単独）を含む。文脈で特に明記のない限り、明細書及び特許請求の範囲の全体において、「含む」、「有する」、「含有する」などの言葉は、排他的又は網羅的な意味ではなく、包括的な意味、即ち、「含むが、これらに限定されない」という意味を持っていると理解すべきである。

20

【0144】

本開示の「対象」、「患者」は、哺乳動物、特に霊長類動物、特にヒトを指す。

【0145】

本開示における「第1」、「第2」、「L1」、「L2」などの序数詞は、単に異なる要素、ステップ、技術的特徴を区別するために使用され、数量、レベル、等級、順番を限定することを意図しない。

30

実施例

【0146】

以下、実施例と合わせて本開示を更に説明するが、これらの実施例は本開示の範囲を限定するものではない。本開示の実施例において具体的な条件が明記されていない実験方法は、通常、例えばコールド・スプリング・ハーバーの抗体技術実験マニュアル、分子クローニングマニュアルなどの通常の条件、或いは原料又は商品メーカーにより提案された条件に従う。具体的な供給源が明記されていない試薬は、市販される通常の試薬である。

40

【0147】

実施例1．血清アルブミン抗原及び検出用タンパク質の調製

1．ヒト血清アルブミンの設計と発現：

ヒト血清アルブミン（HSA）をテンプレートとして、一部のC-末端アミノ酸が欠失した検出用タンパク質のアミノ酸配列を設計した。

【0148】

ヒト血清アルブミンの全長アミノ酸配列：

50

【化 1】

*MKWVTFISLLFLFSSAYS**RGVFR**RD*DAHKSEVAHRFKDL
GEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTC
VADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
KQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNE
ETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQ
AADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHG
DLLECADDRADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS
HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL
LGMFLY EYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELF EQLGEYKFQ
NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEA
KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV
NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER
QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK
ADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGL

10

(配列番号 1)

(注：イタリック体の下線部分はシグナルペプチドであり、イタリック体の太字部分はプロペプチドである)。

20

【0149】

アルブミン及びFcRn結合領域はアルブミン分子の第3のドメインに分布し、分子シミュレーション構造によってC-末端の第3のドメインの一部のアミノ酸が欠失したアルブミン分子を設計した(同時にC-末端にAvi-hisタグが融合された)：

【化 2】

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFED
HVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTV
ATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLV
RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELL
FFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSA
KQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSK
LVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISS
SKLKECCEKPLLEKSHC IAEVENDEMPADLPSLAADFVE
SKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLLRLA
KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL IK
QNC ELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR
NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETGGGGSGLNDI
FEAQKIEWHEHHHHH

30

(配列番号 2)

40

(注：イタリック体はAvi-hisタグである)。

【0150】

2. サル血清アルブミンの全長アミノ酸配列：

50

【化 3】

MKWVTFISLLFLFSSAYS**RGVFR**RDTHKSEVAHRFKDL
GEEHFKGLVLVA FSQYLQQCPFEHVKLNVNEVTEFAKT
CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADC
CAKQEPERNECFLQHKDDNPPLVRPEVDVMCTA FH
DNEATFLKKYLYEVARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFAE
CCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCSLQK
FGDRAFKAWAVARLSQKFPKA EFAEVSKLVTDLT KVHT
ECCHGDLLECADDRADLAKYMCENQDSISSKLK ECCDK
PLEKSHCLA EVENDEMPADLPSLAADYVESKDVCKNYA
EAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVMLLLRLAKAYEATLE
KCCAAADPHECYAKVFDE FQPLVEEPQNLVKQNCLEFE
QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVG
AKCKKLPEAKRMPCAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSEKV
TKC CTESLVNRRPCFSALELDEAYVPKAFNAETFTFHA
DMCTLSEKEKQVKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKGVMD
NFAAFVEKCKADDKEACFAEEGPKFV AASQAALA

(配列番号3)

10

(注：イタリック体の下線部分はシグナルペプチドであり、イタリック体の太字部分はプロペプチドである)。

20

【0151】

3. マウス (mouse) 血清アルブミンの全長アミノ酸配列：

【化 4】

MKWVTFLLLLFVSGSAFS**RGVFR**REAHKSEIAHRYNDL
GEQHFKGLVLI AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKT
CVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCC
TKQEPERNECFLQHKDDNPSPPPFERPEAEAMCTSFKEN
PTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCC
AEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGE
RAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCH
GDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDKPLLKK
AHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDV
FLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEA
NPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGF
QNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPE
DQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSL
VERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKE
KQIKKQTALAE LVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCC
KAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA

(配列番号4)

30

40

(注：イタリック体の下線部分はシグナルペプチドであり、イタリック体の太字部分はプロペプチドである)。

【0152】

4. ラット (Rat) 血清アルブミンの全長アミノ酸配列：

50

【化 5】

MKWVTFLLLLFISGSAFS**RGVFR**REAHKSEIAHRFKDL
GEQHF~~KGLVLI~~AFS~~QYLQKCP~~YEEHI~~KL~~VQEVTDFAKTC
VADENAENC~~DKS~~IHTLFGDKLCAIPKLRDNYGELADCCA
KQEPERNECFLQHKDDNP~~NLP~~PPFQRPEAEAMCTSFQENP
TSFLGHYLHEVARRHPYFYAPELLY~~YAE~~KYNEVLTQCCT
ESDKAACLT~~PK~~LDAVKEKALVA~~AVR~~QRMKCS~~SM~~QRFGER
AFKAWAVARMSQRFPNAEFAEIT~~KL~~ATDVT~~KIN~~KECCHG
DLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQACCDK~~PVL~~QKS
QCLAEIEHDNIPADLPSIAAD~~F~~VEDKEVCKNYAEAKDV~~F~~
LGTFLYEYSRRHPDYSVSL~~LLRL~~LAKKYEATLEKCCAEGD
PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNC~~ELYE~~KLGEYGFQ
NAVLVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEA
QRLPCVEDYLSAILNRLC~~VL~~HEKTPVSEKVT~~KCC~~SGSLV
ERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPDKEK
QIKKQTALAE~~L~~VKHKPKATEDQLKTVMGDF~~AF~~QFVDKCK
AADKDNCFATEGPNLVAR~~SKE~~ALA

(配列番号5)

10

(注：イタリック体の下線部分はシグナルペプチドであり、イタリック体の太字部分はプロペプチドである)。

20

実施例2．ヒト血清アルブミン(HSA)に特異的に結合する抗体のスクリーニング

【0153】

ラクダ免疫

商品化されたヒト血から抽出した血清アルブミン(Sigma、Cat No. 126658)を使用して内蒙古の天然フタコブラクダを免疫した。免疫前のラクダ血清5mLを採取して血清を単離した。フロイント完全又は不完全アジュバントと抗原を体積1：1で混合した後、ラクダに対して複数の箇所皮下免疫を行った(免疫用量は100μgのタンパク質／匹／回である)。2週間に1回追加免疫を行い、4回の免疫後に力価を測定した。5μg/mLのヒト血清アルブミン(HSA)によりプレート(Costar、Cat. No. 9018)を100μL／ウェルでコーティングし、4℃で一晩放置した。翌日、PBST(0.05%のTween20)により300μL／ウェルで3回洗浄した後、4%の脱脂粉乳を加えて37℃で、2hブロッキングした。洗浄後に勾配希釈した免疫ラクダの血清を加え、37℃で、1hインキュベートした。陰性対照は、同様に勾配希釈した免疫前血清及びブランクPBS溶液である。インキュベート終了後にPBSTで3回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ラクダFcのポリクローナル抗体(Thermo、Cat No. A16060、1：5000で希釈)を加え、37℃で1時間インキュベートした。再び洗浄した後、TMB発色液を加えて発色し、1Mの硫酸で停止し、SpectraMax M5プレートリーダーを使用してOD450nmの波長下で吸収値を読み取った。1：51200倍で希釈した後に力価を検出した。力価が合格すると、ラクダ末梢血を採取してライブラリーを構築した。

30

40

【0154】

ファージライブラリーの確立

100～200mLのラクダ末梢血を取り、Ficoll方法を使用して末梢血リンパ球(PBMC)を分離し、細胞計数が 1.2×10^8 個であり、Trizol試薬を加えて再懸濁することで(1×10^7 細胞/mLのTrizol)、細胞を溶解し、氷上で5min放置し、13000rpmで3min遠心分離し、上清を取り、沈殿を捨て、1/5体積のクロロホルムを加え、30～60s激しく振とうし、氷浴で2min静置し、13000rpmで10min遠心分離し、上層の水相層を新しい1.5mLの管に吸引し、等体積のイソプロパノールを加え、均一に混合し、-20℃で30min静置し、13000rpmで10min遠心分離し、上清を除去し、沈殿を保持し、予冷した75%の

50

エタノールを加えて沈殿を洗浄し、室温で5～10min放置し、RNA酵素を除去した脱イオン水600μLを加え、再溶解し、RNAを得て、逆転写してcDNAを得て、ファージライブラリーの構築を行った。

【0155】

ファージライブラリーのスクリーニング

C-末端の第3のドメインの一部のアミノ酸が欠失したHSAタンパク質（切断したHSAとも呼ばれ、配列が配列番号2で示される）をHEK293細胞に発現して精製し、このタンパク質を使用してファージライブラリーのスクリーニングを行った。スクリーニングによりHSAと親和性を有する抗体を得た。

【0156】

10μgの上記切断したHSA-avi-ビオチンタンパク質で1mgのDynabeads M-280ストレプトアビジン（Invitrogen、Cat No. 11206D）に結合し、室温で1時間放置した後、1×PBSで3回洗浄し、2%の脱脂乳により室温で2時間ブロッキングし、ラクダ重鎖単一ドメイン抗体ファージディスプレイライブラリーを加え、室温で1時間作用させた。PBST（0.05%のTween-20）溶液で9回洗浄し、結合しないファージを除去した。1mg/mLのトリプシンにより、切断したHSAと特異的に結合するファージを溶離し、対数期増殖にある大腸菌TG1を感染させ、次のスクリーニングのためにファージを産生して精製した。同じスクリーニングプロセスを1～2回繰り返した後、陽性のクローン配列が富化された。

【0157】

ファージELISAの同定

最終回のスクリーニングから得られたクローンの中からモノクローナルコロニーを選び出してファージの一本鎖抗体にパッケージングし、ファージELISA試験に用いる。ELISAプレート上にそれぞれ2μg/mLのヒト、サル、マウス血清アルブミン（HSA、CySA、mSA）を一晩コーティングし、4%の脱脂乳により37℃で1時間ブロッキングした後、2%の脱脂乳を使用してブロッキングされたファージ上清を加え、常温で1時間作用させ、PBST（0.05%のTween20）で3回洗浄し、抗M13HRPを加えて検出した。ELISA結合試験における3種のアルブミンとのOD450値が何れも0.5を超えたクローンをシークエンシングし、50個の特異的配列を得た。ヒト及びサル血清アルブミンに対して高いOD450値を同時に示した一部の抗体のみをシークエンシングし、別の7個の新しい特異的配列を得た。ファージをスクリーニングして57個の新しい特異的配列を得た。

【0158】

実施例3．抗体哺乳動物細胞発現ベクターの構築

実施例2でファージライブラリーによりスクリーニングされて得られた57個の特異的配列を分類して整理し、その中の19個の配列をクローニングし、これら19個の抗HSA抗体のファージ上清のELISA結合を試験し、そのうち、#7と#9クローンのOD450値は表1に示す通りである。

【0159】

【表1】

表1．抗HSA抗体のファージ上清のELISA検出結果

番号	ヒトHSA O D450	マウスSA O D450	サルSA O D450
#7aHSA	1.6929	1.1185	1.7477
#9aHSA	1.5231	1.0871	1.8161

> #7aHSA

10

20

30

40

50

【化 6】

HVQLVESGGGSLVQAGGSLRVSCVASGNTYLTSCMGWFR
 QAPGKEREGVASIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNACKN
 TVYLMQNSLQPEDTAMYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTQVTVSS

(配列番号 6)

> # 9 a H S A

【化 7】

DVQLVESGGGSLVQAGGSLRLSCAAAEYTYLNSCLGWFR
 QAPGKEREGVATIYMVGGSTFYADSVKGRFTISRDNACKN
 TVYLMQNSLQPEDTAMYYCAAGSPARCRLRDPTTFNYWG
 QGTQVTVSS

(配列番号 7)。

【0160】

上記配列番号 6、7 という配列においては、順番が FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 であり、配列中のイタリック体が FR 配列であり、下線がそれぞれ CDR1、CDR2、CDR3 配列である。本開示により提供される抗 HSA 抗体は、Kabat に従ってコードされた CDR 配列によって表 2 のようにまとめられる。

【0161】

【表 2】

表 2. 抗 HSA 抗体の CDR 配列 (Kabat 番号付け規則)

抗体番号	CDR 配列及びその配列番号		
# 7 a H S A	CDR1	TSCMG	配列番号 8
	CDR2	SIYTVGGSTFYTNSVKG	配列番号 9
	CDR3	GSPARCRLRDPTTFDY	配列番号 10
# 9 a H S A	CDR1	NSCLG	配列番号 11
	CDR2	TIYMVGGSTFYADSVKG	配列番号 12
	CDR3	GSPARCRLRDPTTFNY	配列番号 13

【0162】

従って、下記抗 HSA 抗体の CDR が提供される：

CDR1 は X_1 SC X_2 G であり、そのうち、 X_1 は T 又は N、 X_2 は M 又は L であり、

CDR2 は X_3 IY X_4 VGGSTFY X_5 X_6 SVKG (配列番号 58) であり、そのうち、 X_3 は S 又は T、 X_4 は T 又は M、 X_5 は T 又は A、 X_6 は N 又は D であり、

CDR3 は GSPARC X_7 X_8 RDPTTF X_9 Y (配列番号 59) であり、そのうち、 X_7 は R 又は L、 X_8 は L 又は R、 X_9 は D 又は N である。

【0163】

VHH 配列を ヒト IgG1-Fc (CH2-CH3) に融合し、且つ PTT5 発現ベクターに構築し、連結された ヒト IgG1-Fc の配列は以下の通りである：

> ヒト IgG1-Fc

【化 8】

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号 14)

10

20

30

40

50

以下はVHH配列をヒトFc (CH2-CH3) セグメントに融合した全配列であり、一重下線はヒトIgG1-Fc (CH2-CH3) セグメント配列 (配列番号14で示される) であり、二重下線はリンカー配列である。全配列は以下の通りである：

> #7 aHSA-IgG1Fc：

【化9】

HVQLVESGGGGSVQAGGSLRVSCVASGNTYLTSCMGWFR
QAPGKEREGVASIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNACKN
TVYLLQMNSLQPEDTAMYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTQVTVSSASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

10

(配列番号15)

> #9 aHSA-IgG1Fc：

【0164】

DVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAAAEYTYLNSCLGWFR
QAPGKEREGVATIYMGVGSTFYADSVKGRFTISRDNACKN
TVYLLMMNSLKPEDTAMYYCAAGSPARCLRRDPTTFNYWG
QGTQVTVSSASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

20

(配列番号16)。

30

【0165】

実施例4. 抗HSA抗体の発現、スクリーニング及び検出

ヒトIgG1-Fcを融合した#7 aHSAと#9 a抗HSA抗体をそれぞれHEK293細胞において一過性発現及びProteinA親和性精製を行った。その後、ELISA結合実験により、Biacoreタンパク質相互作用実験により検出を行った。

【0166】

ELISA結合実験により#7 aHSA及び#9 a抗HSA抗体のヒト、サルとマウス血清アルブミンへの体外結合能力を検出し、試験用抗原は、ヒト血清アルブミン (Sigma、Cat No. 126658)、サル血清アルブミン (Abcam、Cat No. ab184894) 及びマウス血清アルブミン (Abcam、Cat No. ab183228) である。そのうち、陰性対照はPBSであり、陽性対照はヒトIgG1-Fcを融合したALB8 (可変領域配列はAblynx特許開示WO 2008/028977 A2におけるALB8の配列に由来) を使用し、配列は以下の通りである：

40

> ALB8-IgG1-Fc

50

【化 10】

EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVR
 QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT
 TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT~~LVTVSSA~~
~~SGSEPKSCDKTHTCP~~~~PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL~~
~~MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK~~
~~PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP~~
~~APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL~~
~~VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY~~
~~SKLTVDKSRWQQGNV~~~~FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG~~
~~K~~

10

(配列番号 17)

(注：一重下線は I g G 1 の F c 領域であり、二重下線はリンカー領域である)。

【0167】

pH 7.4 の PBS 緩衝液によりヒト、サル、マウスアルブミンを $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、 $100 \mu\text{L}$ / ウェルの体積で 96 ウェルマイクロプレート (Corning、Cat No. 9018) を加え、 4°C で一晚 16 ~ 20 時間放置した。液体を捨てた後、PBST (pH 7.4、0.05% の Tween-20) 緩衝液によりプレートを 3 回洗浄した後、PBS 緩衝液で希釈された 2% の脱脂粉乳ブロッキング液 ($300 \mu\text{L}$ / ウェル) を加え、 37°C で 1 時間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキング終了後、ブロッ

ッキング液を捨て、かつ PBST 緩衝液によりプレートを 3 回洗浄した後、初期濃度が $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 HSA 抗体を加え、PBS 緩衝液により 3 倍の比率で 11 個の勾配に希釈し、 25°C に置いて 1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、プレート中の反応液を捨て、PBST でプレートを 3 回洗浄し、HRP で標識されたヤギ抗ヒト I g G F c の二次抗体 (Jackson immu、109-035-190) (1:5000 で希釈) $100 \mu\text{L}$ を各ウェルに加え、 25°C で 1 時間インキュベートした。PBST によりプレートを 3 回洗浄した後、 $100 \mu\text{L}$ の TMB 発色基質を加えて発色させ、1M の硫酸を使用して反応を停止し、SpectraMax M5 プレートリーダーにより OD 450 nm で吸収値を読み取り、GraphPad prism を使用して吸収値及び抗体濃度を 4 パラメータでフィッティングしてプロットし、結果は図 1A ~ 図 1C に示す通りであり、抗体の抗原への結合 EC_{50} 値を算出し、結果は表 3 に示す通りである。

20

30

【0168】

【表 3】

表 3. 抗 HSA 抗体のヒト、サル、マウスアルブミンへの ELISA 結合 EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

抗体番号	HSA に結合する EC_{50}	サル SA に結合する EC_{50}	マウス SA に結合する EC_{50}
#7a HSA-I g G 1 F c	0.04552	0.04256	0.04502
#9a HSA-I g G 1 F c	0.04601	0.03865	0.04116
陽性対照 (ALB8-I g G 1 F c)	0.009926	0.010134	0.01061
陰性対照 (PBS)	/	/	/

40

注：「/」は結合が検出されないことを示す。

【0169】

更に、Biacore T200 (GE Healthcare) 機器によりヒト I g G 1 F c を融合した抗 HSA 抗体のヒト、サル、マウスアルブミン (HSA、CySA、mSA) への親和性定数を測定した。まず、protein A をアミンカップリングキ

50

ット (GE、Cat. BR-1000-50) により CM5 S series チップ (GE、Cat. 29-1049-88) に共有結合でカップリングし、抗 HSA 抗体を、protein A にカップリングしたチップに親和的に捕捉し、そしてチップ表面で異なる濃度のヒト、サル、マウスアルブミンを流し、Biacore 機器により反応シグナルをリアルタイムで検出することで結合解離曲線を得て、BIAevaluation version 4.1、GE ソフトウェアにより Langmuir 1:1 結合モデルでフィッティングし、親和性定数を得た。実験に使用された緩衝液は、HBS-E P 溶液 (10 mM の HEPES、150 mM の NaCl、3 mM の EDTA、0.05% の P20、pH 7.4、GE、Cat. # BR-1006-69) である。各循環の終了後、pH 1.5 のグリシン-塩酸 (GE、Cat. # BR-1003-54) を使用してチップを再生した。親和性の結果は表 4 に示す通りである。

10

【0170】

【表 4】

表 4. 抗 HSA 抗体のヒト、サル、マウスアルブミンへの親和性の結果

抗体番号	抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
#7a HSA-IgG1Fc	ヒト HSA	$4.29E+04$	$7.55E-05$	$1.76E-09$
	サル SA	$4.49E+04$	$5.70E-05$	$1.27E-09$
	マウス SA	$4.66E+04$	$3.47E-04$	$7.44E-09$
#9a HSA-IgG1Fc	ヒト HSA	$8.43E+04$	$2.64E-05$	$3.13E-10$
	サル SA	$8.92E+04$	$4.40E-05$	$4.93E-10$
	マウス SA	$2.21E+09$	$3.10E+01$	$1.40E-08$

20

【0171】

実施例 5. 抗 HSA 抗体のヒト化改変

選定された特異的抗 HSA 抗体分子 #7a HSA に対して 3 次元構造相同モデリングを行うことにより、V-base ヒト生殖細胞系列配列データベース、IMGT ヒト抗体重鎖可変領域生殖細胞系列遺伝子データベースと比較した結果に合わせて、スクリーニングされた抗体と相同性の高い重鎖可変領域生殖細胞系列遺伝子IGHV3-23 をテンプレートとして選択し、ラクダ由来の単ドメイン抗体の CDR を対応するヒトテンプレートに移植し、順番が FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 である可変領域配列を形成した。移植された単ドメイン抗体に対して再び 3 次元構造をシミュレーションして分析した。FR 領域における CDR 領域構造形態に影響を与える特定の部位を復帰変異した。改変された抗体は、より高い安定性を有する。そのうち、アミノ酸残基は、Kabab 番号付けシステムによって決定されて注釈されている。そのうち、#7_Hu-9 及び #7_Hu-10 の FR には、より低い免疫原性変異を有するように、ヒト生殖細胞系列配列がより多く保持されている。

30

【0172】

復帰変異部位及び変異方式の設計は、表 5 の通りである。

【0173】

40

【表 5】

表 5. 復帰変異部位及び変異方式

抗体番号	復帰変異
# 7__Hu__1	F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G
# 7__Hu__2	L 2 0 V、F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G
# 7__Hu__3	A 2 3 V、F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G
# 7__Hu__4	F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、S 7 4 A
# 7__Hu__5	F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、L 7 8 V
# 7__Hu__6	F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、S 4 9 A
# 7__Hu__7	F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、R 8 3 Q、A 8 4 P
# 7__Hu__8	F 2 7 N、F 2 9 Y、S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、A 8 4 P
# 7__Hu__9	S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G、A 8 4 P
# 7__Hu__10	S 3 0 L、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 G

10

20

【0174】

得られたヒト化の具体的な配列は以下の通りであり、CDR領域は下線で示され、番号付け規則はKabatによる番号付けである：

> # 7__Hu__1

【化11】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFR
 QAPGK**ERE****G**VSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTLVTVSS

30

(配列番号18)

> # 7__Hu__2

【化12】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGNTYLTSCMGWFR
 QAPGK**ERE****G**VSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTLVTVSS

(配列番号19)

40

> # 7__Hu__3

【化13】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGNTYLTSCMGWFR
 QAPGK**ERE****G**VSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTLVTVSS

(配列番号20)

> # 7__Hu__4

50

【化 1 4】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLT TSCMGWFR
QAPGKEREGVSS SIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAG SPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS

(配列番号 2 1)

> # 7 _ H u _ 5

【化 1 5】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLT TSCMGWFR
QAPGKEREGVSS SIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
TVYLQMNS LRAEDTAVYYCAAG SPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS

10

(配列番号 2 2)

> # 7 _ H u _ 6

【化 1 6】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLT TSCMGWFR
QAPGKEREGVAS SIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAG SPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS

20

(配列番号 2 3)

> # 7 _ H u _ 7

【化 1 7】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLT TSCMGWFR
QAPGKEREGVSS SIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNS LQPEDTAVYYCAAG SPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS

(配列番号 2 4)

30

> # 7 _ H u _ 8

【化 1 8】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLT TSCMGWFR
QAPGKEREGVSS SIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNS LRPEDTAVYYCAAG SPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS

(配列番号 2 5)

> # 7 _ H u _ 9

【化 1 9】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GFTFL TSCMGWFR
QAPGKEREGVSS SIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNS LRPEDTAVYYCAAG SPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS

(配列番号 2 6)

> # 7 _ H u _ 1 0

50

【化 2 0】

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFL TSCMGWFR
 QAPGKEREGVSS IYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTLVTVSS

(配列番号 27)。

【0175】

実施例 5 中の方法を使用してヒト化抗 HSA 抗体と h I g G 1 の F c (C H 2 - C H 3) セグメント融合タンパク質、又は 6 H i s タグを融合したタンパク質を構築し、一重下線は h I g G 1 - F c (C H 2 - C H 3) セグメント配列 (配列番号 14 で示される) であり、イタリック体は 6 H i s タグ配列であり、二重下線はリンカー配列である。タンパク質配列は以下の通りである (# 7 _ h u _ 1 - h I g G 1 F c と # 7 _ h u _ 10 - 6 H i s を例として、他のヒト化抗 HSA 抗体も同様である)。抗体の番号付け規則では、 # 7 _ h u _ 10 - 6 H i s は、 # 7 _ H u _ 10 (配列番号 26) の C 末端に
 「GGGGSGGGS *HHHHHH*」

10

が融合されたもので、他の抗体も同様である。

【0176】

> # 7 _ h u _ 1 - h I g G 1 F c :

20

【化 2 1】

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFR
 QAPGKEREGVSS IYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTLVTVSS ASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

30

(配列番号 28)

> # 7 _ H u _ 10 - 6 H i s

【化 2 2】

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFL TSCMGWFR
 QAPGKEREGVSS IYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
 QGTLVTVSS SGGGSGGGS *HHHHHH*

(配列番号 29)

40

> A L B 8 - 6 h i s

【化 2 3】

EVQLVES GGGLVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR
 QAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKT
 TLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS G
GGGSGGGS *HHHHHH*

(配列番号 30)。

【0177】

プラスミドを H E K 2 9 3 細胞に一過性トランスフェクションし、細胞を 5 日間培養し

50

た後、発現上清を収集し、4000rpmで15分間遠心分離して細胞を除去し、上清を得て0.45μMのフィルターを使用してろ過し、更にProtein Aカラム又はニッケルカラムなどの本分野通常の方法を使用して精製し、分離して得た。検出により、本開示の抗HSA抗体を得た。

【0178】

実施例6. ヒト化抗HSA抗体のヒト、サル、マウス血清アルブミンへの親和性の測定
Biacore T200 (GE Healthcare) 機器により、6Hisタグを融合したヒト化抗HSA抗体のヒト、サル、マウスアルブミンへの親和性定数を測定した。まず、アミンカップリングキット (GE、Cat. BR-1000-50) 及びHis捕捉試薬キット (GE、Cat. 28-9950-56) を使用して試薬キットの説明書に従ってCM5 S seriesチップ (GE、Cat. 29-1049-88) をアミノカップリングし、表面応答値が約10000RUに達し、エタノールアミンでブロッキングした後に使用に備え、6Hisタグを融合したヒト化抗HSA抗体を抗hisのチップに親和的に捕捉し、そしてチップ表面で異なる濃度のヒト、サル、マウスアルブミンを流し、Biacore機器により反応シグナルをリアルタイムで検出することで結合解離曲線を得て、BIAevaluation version 4.1、GEソフトウェアによりLangmuir 1:1結合モデルでフィッティングし、親和性定数を得た。実験に使用された緩衝液は、HBS-EP溶液 (10mMのHEPES、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%のP20、pH7.4、GE、Cat. #BR-1006-69) である。各循環の終了後、pH1.5のグリシン塩酸 (GE、Cat. #BR-1003-54) を使用してチップを再生した。一部のヒト化抗体の親和性の結果は、表6に示す通りである。その結果、本開示のスクリーニングして得た抗体が、HSAへの親和性が陽性対照に対して同等又はやや良好であることが示している。

【0179】

【表6】

表6. ヒト化抗HSA抗体のヒト、サル、マウスアルブミンへの親和性

抗体番号		ALB8-6his	#7_hu_1-6his	#7_hu_5-6his	#7_hu_6-6his	#7_hu_7-6his	#7_hu_10-6his
ヒトHSA	ka (1/Ms)	2.62E+04	3.60E+04	3.55E+04	3.71E+04	3.74E+04	3.01E+04
	kd (1/s)	1.72E-03	6.53E-04	5.34E-04	6.40E-04	6.68E-04	3.47E-04
	K _D (M)	6.57E-08	1.81E-08	1.51E-08	1.73E-08	1.79E-08	1.15E-08
サルSA	ka (1/Ms)	2.30E+04	3.30E+04	3.31E+04	3.41E+04	3.49E+04	1.76E+04
	kd (1/s)	1.46E-03	5.54E-04	4.80E-04	5.45E-04	5.47E-04	5.45E-04
	K _D (M)	6.34E-08	1.68E-08	1.45E-08	1.60E-08	1.57E-08	3.10E-08
マウスSA	ka (1/Ms)	2.25E+04	4.55E+04	3.93E+04	4.83E+04	4.61E+04	5.97E+04
	kd (1/s)	1.95E-02	2.62E-02	2.60E-02	2.81E-02	2.29E-02	1.96E-02
	K _D (M)	8.67E-07	5.77E-07	6.62E-07	5.82E-07	4.97E-07	3.28E-07

【0180】

HEK293E細胞を使用して抗HSA抗体7_Hu_10-6hisを一過的に発現し、ニッケルカラムで親和性精製した後、Biacore T200 (GE Healthcare) 機器によりそのヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウサギアルブミンへの親和性定数を測定した。まず、アミンカップリングキット (GE、Cat. BR-1000-50) 及びHis捕捉試薬キット (GE、Cat. 28~9950-56) を使用して試薬キットの説明書に従ってCM5 S seriesチップ (GE、Cat. 29-1049-88) をアミノカップリングし、表面応答値が約10000RUに達し、エタ

ノールアミンでブロッキングした後に使用に備え、6Hisタグを融合したヒト化抗HSA抗体を抗hisのチップに親和的に捕捉し、そしてチップ表面で異なる濃度のヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ウサギアルブミンを流し、Biacore機器により反応シグナルをリアルタイムで検出することで結合解離曲線を得て、BIAevaluation version 4.1、GEソフトウェアによりLangmuir 1:1結合モデルでフィッティングし、親和性定数を得た。実験に使用された緩衝液は、HBS-EP溶液（10mMのHEPES、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%のP20、pH7.4、GE、Cat.#BR-1006-69）である。各循環の終了後、pH1.5のグリシン-塩酸（GE、Cat.#BR-1003-54）を使用してチップを再生した。親和性の結果は表7に示す通りである。

10

【0181】

【表7】

表7. #7_Hu_10-6hisの異なる種のアльブミンへの親和性

試料	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
ヒトHSA	$6.47E+04$	$6.83E-04$	$1.06E-08$
サルSA	$4.79E+04$	$6.97E-04$	$1.45E-08$
マウスSA	$3.89E+04$	$2.54E-02$	$6.53E-07$
ラットSA	$2.92E+04$	$4.61E-03$	$1.58E-07$
イヌSA	$6.17E+04$	$2.11E-02$	$3.42E-07$
ウサギSA	結合が検出されなかった		

20

【0182】

実施例7. hFcRnを安定的に発現した細胞における、FcRnとビオチン-HSAの結合に対する抗HSA抗体の影響

HSAとFcRnの結合に対する抗HSA抗体の遮断効果は、hFcRn変異体を安定的に発現したHEK293細胞（293-hFcRn-mut細胞）の表面に結合したランダムビオチン化HSAに対する抗体の蛍光量の変化の方式で検出された。本実験では、hFcRn変異体（L320A、L321A）を安定的に発現したHEK293細胞が使用され、当該hFcRn変異体は細胞膜表面に比較的によく定位して維持することができる。hFcRn変異体を発現した細胞を異なる濃度の抗HSA抗体及びBiotin-HSAと共にインキュベートしてから、SA-FITC二次抗体を加えてインキュベートし、二次抗体蛍光シグナル（MFI）の低下程度を、ビオチン-HSAとFcRnの結合に対する抗HSA抗体の遮断作用の強さを測定するものとした。具体的な実験方法は以下の通りである。

30

【0183】

293-hFcRn-mut細胞をpH5.5のPBSで2回洗浄した後、U型ウェル96ウェルプレートにおいて各ウェルに 5×10^5 個の細胞を加えた。遠心分離して上清を除去した後、PBS（pH5.5）で希釈した抗HSA抗体90μL及びビオチン-HSA（最終濃度が250μg/mL）10μLを各ウェルに加え、氷上で40分間共インキュベートした。200μLのPBS（pH5.5）で2回洗浄した後、各ウェルにPBS（pH5.5）で希釈したストレプトアビジン-FITC二次抗体（eBioscience、Cat.No.11-4317-87）100μLを加え、希釈比が1:200であり、氷上で40分間インキュベートした。200μLのPBS（pH5.5）で2回洗浄した後、各ウェルに200μLのPBS（pH5.5）を加え、フローサイトメーター（BD Biosciences、BD Accuri C6）及びFL1チャンネルにより蛍光値を測定し、Flowjoソフトウェアを使用してデータを分析し、Prism6ソフトウェアにより分析結果をプロットした。一部の抗体の阻害作用の試験結果を図2A及び図2Bに示す。

40

【0184】

結果の分析：蛍光シグナル値（MFI）によって、抗HSA抗体とHSAの結合がHS

50

AとFcRnの結合を遮断するか否かを判定し、蛍光シグナルが低下すると、結合を遮断することを示す。

【0185】

図2Aに示すように、ビオチン-HSA+FcRn安定形質転換細胞+SA-FITC群（非遮断群）を基線とし、ビオチン-HSA+HSA+FcRn安定形質転換細胞+SA-FITC群（HSA自己競合群）を陽性対照として、Ncはアイソタイプ対照抗体である。その結果、本開示の抗HSA抗体#7__Hu__6-6his及び#7__Hu__7-6hisは、HSAとFcRnの結合を遮断しなかったことが示されている。

【0186】

図2Bに示すように、#7__Hu__10-6his及び#7__Hu__10は、HSAとFcRnの結合を遮断しなかった（1mg/mLの濃度で検出）。

10

【0187】

これにより、本開示の抗HSA抗体は、FcRnとHSAのPH依存的な結合に影響を与えず、FcRn仲介性の血清アルブミン再循環機構を良く維持することができることを示されている。

【0188】

実施例8．抗HSA抗体のマウスでの薬物動態

本開示の抗HSA抗体（#7__Hu__6-6his、#7__Hu__7-6his、#7__Hu__10-6his）、陽性対照抗体（ALB8-6his）及びアイソタイプ対照抗体（Isotype、非HSA結合のVHH分子）に対してCD-1雄マウス（北京維通利華実験動物技術有限公司）において薬物動態的特徴を研究した。各群3匹のマウスに、0日目に4mg/kgの用量で尾静脈内注射により投与し、投与前、投与後の5分間、1時間、7時間、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間に血液試料を採取し、EDTAを使用して抗凝固し、遠心分離して血漿を調製し、薬物動態測定に用いて行った。

20

【0189】

PK測定：5μg/mLの抗hisの抗体（Thermo、MAI-21315-1mg）を使用してコーティングし、100μL/ウェルの体積で96ウェルマイクロプレート（Corning、Cat No. 9018）に加え、4℃で一晩16~20時間放置した。液体を捨てた後、PBST（pH7.4、0.05%のTween-20）緩衝液でプレートを3回洗浄した後、Casin Blocker（Thermo、37528）ブロッキング液（300μL/ウェル）を加え、37℃でインキュベーターにて2時間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキング終了後、ブロッキング液を捨て、PBST緩衝液でプレートを3回洗浄した後、希釈液（1%のCD1マウス血漿を含むCasin Blocker）で適当に希釈された異なる時点でのマウス血漿を加え、37℃で1.5時間インキュベートした。インキュベート終了後、プレート中の反応液を捨て、PBSTでプレートを3回洗浄し、HRPで標識されたウサギ抗ラクダCocktail VHHの二次抗体（Genescript、A02016、BSAなし）（1:5000で希釈）100μLを各ウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。PBSTでプレートを3回洗浄した後、100μLのTMB発色基質を加えて発色させ、1Mの硫酸を使用して反応を停止し、SpectraMax M5プレートリーダーによりOD450nmで吸収値を読み取った。血漿試料中のVHH抗体の濃度を標準曲線に従って算出し、結果は図3に示す通りである。算出された濃度をPK solverを使用して半減期を算出し、結果は図4及び表8に示す通りである。

30

40

【0190】

【表 8】

表 8. 抗HSA抗体のマウス血漿半減期

パラメーター (単位)	ALB8-6 his	#7__Hu__6 -6his	#7__Hu__7 -6his	#7__Hu__10 -6his	I s p t y p e
	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg
T _{1/2} (h)	7.16	9.0*	10.7**	9.83**	1.12***
AUC _{0-inf} __obs/用量 (μg/mL×h/ mg/kg)	63	177	123	113	33.79
C _{l__obs} (mL/(min× kg))	0.285	0.095	0.114	0.148	0.493

(注：*、p<0.05、**、p<0.01、***、p<0.0001、****、p<0.00001は、何れも陽性対照ALB8-6hisと比較したものである)

【0191】

その結果、本開示の各抗HSA抗体#7__Hu__6-6his、#7__Hu__7-6his、#7__Hu__10-6hisは、類似のpK曲線を有し、半減期がマウス血清アルブミンの半減期範囲内にあり、且つ陽性対照ALB8-6his抗体よりも優れ、クリアランスもALB8-6his抗体よりも低いことが示されている。

【0192】

実施例9. 融合タンパク質の設計及び調製

リンカーを介してリラキシンA鎖及びB鎖を連結して一本鎖のリラキシン分子を形成したと共に、半減期を向上させるために、一本鎖のリラキシン分子と抗HSAの単ドメイン抗体を更に融合して融合タンパク質を形成し、構造模式図は図5の通りである。

【0193】

>ヒトRLN2 A鎖

【化24】

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号31)

>ヒトRLN2 B鎖 (delB1)

【化25】

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

(配列番号32)

>リンカーa

【化26】

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

(配列番号33)

>リンカーb

【化27】

PGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPA

(配列番号34)

>リンカーc

【化28】

PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ

(配列番号35)

> リンカー d

【化 2 9】

GGGSGGSGGG

(配列番号 4 9)

> 0 0 5 1

【化 3 0】

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWMEE**
VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSAL**
ANKCCHVGCTKRSLARFC

10

(配列番号 3 6)

> 0 0 5 2

【化 3 1】

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPG
PA **SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS** GGGSGGSGGG
G **QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC**

20

(配列番号 3 7)

> 0 0 5 3

【化 3 2】

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPG
PQ **SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS** GGGSGGSGGG
G **QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC**

30

(配列番号 3 8)

> 0 0 6 2

【化 3 3】

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWMEE**
VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSAL**
ANKCCHVGCTKRSLARFC

40

(配列番号 3 9)

> 0 0 6 3

【化 3 4】

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFR
QAPGKEREGVASIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWMEE**
VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSAL**
ANKCCHVGCTKRSLARFCC

(配列番号 4 0)

50

> 0 0 6 4

【化 3 5】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWMEE**
VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSAL**
ANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号 4 1)

> 0 0 6 5

【化 3 6】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GFTFLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWMEE**
VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSAL**
ANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号 4 2)

> 0 0 6 6

【化 3 7】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLTSCMGWFR
QAPGKEREGVSSIYTVGGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYWG
QGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWMEE**
VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSAL**
ANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号 4 3)

【0 1 9 4】

そのうち、イタリック体は抗HSA単ドメイン抗体、一重下線はリンカー1、二重下線はリンカー2、太字はリラキシン2のB鎖、イタリック太字はリラキシン2のA鎖である。リンカー1はリンカーa、b、cを選択してもよく、そのうち、aは可撓性リンカーであり、b、cは剛性リンカーである。

【0 1 9 5】

本実施例の陽性対照0054配列は、WO2021022139A1の実施例7に由来するものである。

> 0 0 5 4

【化 3 8】

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GRYIDETA VAWFR
QAPGKGREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW
GQGTLVTVSS SGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ **SWME**
EVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS GGGSGGSGGG **QLYSA**
LANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号 4 4)。

【0 1 9 6】

1. 融合タンパク質の調製：

融合タンパク質（配列番号36～44）をコードするDNA配列にコドン最適化を行い、pTT5発現ベクターに合成してクローニングし、発現プラスミドをexp i CHO (ThermoFisher、Cat No. A29127) 細胞に一過性トランスフェクションし、ExpiFectamine CHO Transfection Kit (

10

20

30

40

50

ThermoFisher、Cat No. A29133)を使用し、試薬キットの説明書に従ってトランスフェクションした。説明書中の「High protocol」を採用し、トランスフェクション後の翌日に細胞を32℃のシェーカーに置いて懸濁振とう培養した(5%のCO₂、110rpm、75%湿度)。トランスフェクション後の10～12日目に、細胞培養液の上清を収集し、4000rpmで20分間遠心分離し、上清を取って0.45μmのフィルターでろ過して使用した。

【0197】

2. 融合タンパク質の精製:

(1) A3親和性クロマトグラフィーによる融合タンパク質の捕捉: 融合タンパク質を発現した細胞培養上清を高速で遠心分離して上清を収集し、0.22μmのろ過膜でろ過した。A3(JSR Life Sciences、Cat No. BP-AMS-A3-0100)アフィニティークラムを5倍のカラム体積である0.1MのNaOH(Sigma、Cat No. 71687)で再生し、そして5倍のカラム体積である1×PBS(pH7.4)(Sangon Biotech(Shanghai)co., Ltd.: Cat No. E607016-0500)により洗浄して平衡した。アフィニティークラムに結合するために、ろ過された上清を低流速でローディングし、保持時間が約1min以上になるように流速を制御し、結合完了後に5倍のカラム体積である1×PBS(pH7.4)、5倍のカラム体積である1×PBS(pH7.4)、0.8MのNaCl(Vetec、Cat No. V900058)及び5倍のカラム体積である1×PBS(pH7.4)をそれぞれ利用して紫外線吸収が基線レベルに戻るまでクロマトグラフィーカラムを洗浄した。0.1MのGlycine(pH3.0)(Sigma、Cat No. 410225)緩衝液により試料を溶離し、紫外線検出によって溶離ピークを収集し、溶離生成物を1MのTris-HCl(pH7.5)(Vetec、Cat No. V900483)によりpHを7～8に速く調整し、暫く保存した。溶離生成物に対して、例えば、限外ろ過管による限外ろ過濃縮、溶液の所望の緩衝系への置換、又は分子排除クロマトグラフィー(例えば、G-25脱塩)による所望の緩衝系への取替など、当業者によく知られている方法により溶液を置換することができる。

【0198】

(2) 疎水性クロマトグラフィーによる融合タンパク質の精製: まず、緩衝液である20mMのTris pH7.5(Vetec、Cat No. V900483)、1MのNa₂SO₄(Sigma、Cat No. 239313)により等体積で試料を希釈し、疎水性クロマトグラフィーカラムPhenyl 650M(Toyopearl、Cat No. 0014478)を5倍のカラム体積である0.5MのNaOH(Sigma、Cat No. 71687)で再生し、そして10倍のカラム体積である20mMのTris pH7.5(Vetec、Cat No. V900483)、0.5MのNa₂SO₄(Sigma、Cat No. 239313)により洗浄して平衡した。疎水性カラムに結合するために、希釈された試料を低流速でローディングし、保持時間が約2min又はそれ以上になるように流速を制御し、結合完了後に5倍のカラム体積である20mMのTris pH7.5(Vetec、Cat No. V900483)、0.5MのNa₂SO₄(Sigma、Cat No. 239313)を利用して紫外線吸収が基線レベルに戻るまでクロマトグラフィーカラムを洗浄した。溶離緩衝液である20mMのTris pH7.5(Vetec、Cat No. V900483)により0%～100%の勾配溶離を行い、SEC-HPLC(Column: TSKgel G3000SWXL、5μm、Cat No. 008541)の純度によって、溶離ピークを検出して収集した。2段階精製後、融合タンパク質の収量は表9の通りである。溶離生成物に対して、例えば、限外ろ過管による限外ろ過濃縮、溶液の所望の緩衝系への置換、又は分子排除クロマトグラフィー(例えば、G-25脱塩)による所望の緩衝系への取替など、当業者によく知られている方法により溶液を置換することができる。

【0199】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. 2段階精製後の融合タンパク質の質量パラメータ

融合タンパク質	発現収量 (mg/L)	純度 (%) (SEC-HPLC)	理論分子量 (Da)	全分子量 (Da) (LC/MS)
0051	150	99.7	21754.3	21755
0052	122	99.5	22551.6	22553
0053	156	99.	23008	23009
0054	70	99.7	21797.5	21798

10

【0200】

2段階精製後、完全な高純度の融合タンパク質を得て、且つ本開示の0051及び0053分子は、exp iCHOにおける一過性トランスフェクションした収量が同じ条件下で陽性対照分子0054の2倍である。

【0201】

実施例10. 融合タンパク質の異なる種の血清アルブミンへの親和性の測定 Biacore T200 (GE Healthcare) 機器により0051のヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ブタ、ウサギとウシの血清アルブミンへの親和性を測定した。陽性対照は0054である。ヒトアルブミンHSA (Sigma, Cat No. 126658)、サルアルブミン (Abcam, Cat No. ab184894)、ラットアルブミン (Abcam, Cat No. ab198656)、マウスアルブミン (Abcam, Cat No. ab183228)、ウサギアルブミン (Abcam, Cat No. ab188055) 及びウシアルブミン (Sigma, Cat No. B2064) を使用して実験を行った。

20

【0202】

1. 抗VHH抗体カップリングチップによる親和性の測定

アミンカップリングキット (GE, Cat No. BR-1000-50) を使用してSシリーズのCM5センサーチップ (GE, Cat No. 29-1049-88) に対して抗VHH抗体 (MonoRab (商標) Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail, Genescript, Cat No. A02014) のカップリングを行った。10mMの酢酸ナトリウムpH4.5 (GE, Cat No. BR-1003-50) を使用して抗体を10µg/mLに希釈した。CM5チップをEDC/NHSで活性化した後、表面応答値が約5000RUになるように、希釈された抗VHH抗体に流し、更にエタノールアミンでブロックした後に使用に備えた。

30

【0203】

様々な種のアブミンを1×HBS-EP (10mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%のSurfactant P20) を使用してシリーズ勾配希釈した。カップリングした抗VHH抗体チップを使用して測定待ちの融合タンパク質分子を捕捉し、応答値が30RU程度であり、そしてチップ表面で異なる濃度の血清アルブミンを3分間流し、流速50µL/min、解離時間1~10分間であり (アルブミンの種によって解離時間が異なる)、各循環終了後に10mMのグリシン塩酸pH1.5 (GE, Cat No. BR-1003-54) によりチップを再生した。Biacore T200 (GE) により反応シグナルをリアルタイムで検出することで結合・解離曲線を得て、得られたデータは適切な濃度点を選択してBIAevaluation version 4.1ソフトウェアを使用してLangmuir 1:1結合モデルでフィッティングし、親和性の値を取得し、結果を表10に示す。

40

【0204】

50

【表 10】

表 10. 融合タンパク質の異なる種の血清アルブミンへの親和性

アルブミンの種類	融合タンパク質	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
HSA	0051	$5.45E+04$	$1.10E-03$	$2.02E-08$
	0052	$8.99E+04$	$8.67E-04$	$9.65E-09$
	0053	$9.23E+04$	$7.88E-04$	$8.54E-09$
	0062	$1.45E+05$	$7.90E-04$	$5.44E-09$
	0063	$1.47E+05$	$7.45E-04$	$5.07E-09$
	0064	$1.54E+05$	$8.60E-04$	$5.59E-09$
	0065	$8.23E+04$	$7.97E-04$	$9.68E-09$
	0066	$1.45E+05$	$7.78E-04$	$5.38E-09$
	0054	$3.57E+04$	$5.63E-04$	$1.58E-08$
ラットアルブミン	0051	$3.72E+04$	$5.81E-03$	$1.56E-07$
	0052	$4.13E+04$	$5.99E-03$	$1.45E-07$
	0053	$4.08E+04$	$5.91E-03$	$1.45E-07$
	0062	$9.15E+04$	$7.23E-03$	$7.91E-08$
	0063	$9.41E+04$	$6.48E-03$	$6.88E-08$
	0064	$9.89E+04$	$5.79E-03$	$5.85E-08$
	0065	$3.57E+04$	$5.67E-03$	$1.59E-07$
	0066	$8.34E+04$	$6.95E-03$	$8.34E-08$
	0054	$6.15E+04$	$1.13E-02$	$1.83E-07$

10

20

【0205】

本開示で設計された異なる融合タンパク質は、ヒト、サル、ラット及びウシの血清アルブミンへの親和性が陽性対照分子0054と同等であり（データは示せず）、表10にHSAとラットアルブミンの結合結果が例示的に示されている。

【0206】

2. アルブミンカップリングチップによる親和性の測定

アミンカップリングキット（GE、Cat No. BR-1000-50）を使用してSシリーズCM5センサーチップ（GE、Cat. 29-1049-88）に対して異なる種の血清アルブミンのカップリングを行った。様々な種のアルブミンを $2\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。CM5チップをEDC/NHSで活性化した後、表面応答値が約200（180～230）RUになるように、希釈されたアルブミンに流し、更にエタノールアミンでブロッキングした。ブランク対照チャンネルは同様に、EDC/NHS活性化及びエタノールアミンによるブロッキングを行う必要がある。

30

【0207】

0051と0054分子は、 $1\times\text{HBS-EP}$ （10mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%のSurfactant P20）を使用して一連の勾配希釈を行った：2000、666.66、222.22、74.074、24.69、8.23、2.74、0.91、0.305nM。0051と0054の異なる濃度の試料は、それぞれアルブミンカップリングチャンネル及びブランクチャンネルに3分間流し、流速 $50\mu\text{L}/\text{min}$ 、解離時間4分間であり、各循環終了後に10mMのグリシン塩酸pH1.5（GE、Cat. #BR-1003-54）を使用してチップを再生した。Biacore T200（GE）により反応シグナルをリアルタイムで検出することで結合・解離曲線を得て、得られたデータは適切な濃度点を選択してBIAevaluation version 4.1ソフトウェアを使用してLangmuir 1:1結合モデルでフィッティングし、親和性の値を取得した。

40

【0208】

50

【表 1 1】

表 1 1. 異なる種のアルブミンへの親和性

アルブミンの種類	分子	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
HSA	0051	4.91E+06	2.07E-04	4.22E-11
	0054	1.83E+06	1.81E-04	9.90E-11
ラットアルブミン	0051	2.25E+06	4.39E-03	1.95E-09
	0054	2.31E+06	2.46E-03	1.06E-09
マウスアルブミン	0051	1.24E+06	4.71E-02	3.79E-08
	0054	1.97E+06	2.70E-03	1.37E-09

【0209】

0051分子は、ヒト、サル、ラットのアルブミンへの親和性が陽性対照分子0054と同等であり、マウスとイヌのアルブミンへの親和性が陽性対照分子0054よりも弱い（データは示せず）。表11には、HSA、ラット、マウスの結果が例示的に示されている。

【0210】

実施例11. 融合タンパク質の体外における細胞の生物活性 1、融合タンパク質のTHP-1細胞における生物活性

THP-1は、ヒト末梢血単核細胞（Procell、Cat No. CL-0233）で、内因的に発現するRXFP1受容体であり、リラキシンがTHP-1細胞における受容体に結合すると、THP-1細胞がcAMPを産生するように誘導される。従って、本実施例は、cAMPの産生量を検出することにより融合タンパク質の体外活性を測定した。本実施例は、ホモジニアス時間分解蛍光（HTRF）cAMP-Gs Dynamic 試薬キット（Cisbio、Cat No. 62AM4PEB）を使用し、メーカーの方案に基づいてcAMPレベルを測定した。0054、800814（WO2015067113A1による）と0060（WO2021255127A1、RELAX0023）を陽性対照として使用した。

【0211】

>800814のA鎖

【化39】

DLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号45)

>800814のB鎖

【化40】

DSWMEEVIKLCGRDLVRAQIAICGMSTWS

(配列番号46)

>0060のA鎖

【化41】

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGG
GGSGGGGGSGGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(配列番号47)

>0060のB鎖

【化 4 2】

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI
 SKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGG
 GSGSGGGSGGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMS
 TWS

(配列番号 48)。

10

【0 2 1 2】

実験方法は以下の通りである：細胞 T H P - 1 を 3 7 ℃、5 % C O ₂ の条件下で培養し、培地が R P M I 1 6 4 0 + 0 . 0 5 m M の b - メルカプトエタノール + 1 0 % F B S + 1 % ペニシリン-ストレプトマイシン二重抗体である。実験当日に、対数増殖期の T H P - 1 細胞を遠心分離して収集した後、無血清培地において再懸濁し、細胞密度を 4 × 1 0 ⁶ 細胞 / m L に調整し、各ウェルに 5 0 μ L の体積 (2 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル) で 9 6 ウェル測定プレート (C i s b i o , C a t N o . 6 6 P L 9 6 0 2 5) に移した。測定待ちの融合タンパク質試料及び陽性対照としての 0 0 5 4、0 0 6 0、8 0 0 8 1 4 を個別の U 底 9 6 ウェルプレートにおいて試薬キット中の S t i m u l a t i o n B u f f e r 1 を使用して 1 0 倍の倍率でシリーズ希釈し、そして各ウェルに 5 μ L の体積で、T H P - 1 細胞を含む 9 6 ウェル測定プレートに移し、3 7 ℃、5 % C O ₂ の条件下で 3 0 分間培養し、測定待ちの試料を含まない細胞を参照対照とした。試薬キット中の L y s i s & D e t e c t i o n B u f f e r 1 を使用して c A M P - d 2 (受容体蛍光基) 及び a n t i - c A M P - c r y p t a t (供与体蛍光基) を希釈し、c A M P - d 2 を各ウェルに 5 μ L の体積で 9 6 ウェル測定プレートにおけるブランク対照ウェル以外の全てのウェルに加えた後、a n t i - c A M P - c r y p t a t を全てのウェルに加え、暗所にて室温で 1 時間インキュベートした。その後、T e c a n (I n f i n i t e 2 0 0 P R O) にて 6 2 0 n m と 6 6 5 n m の波長で数値を読み取り、6 6 5 n m での蛍光強度 / 6 2 0 n m での蛍光強度 × 1 0 , 0 0 0 の比率でシグナル強度を示し、G r a p h p a d P r i s m を使用して非線形フィッティングを行って c A M P 濃度曲線をプロットし、測定待ちの試料及び対照が T H P - 1 細胞を c A M P を産生するように誘導する E C ₅₀ 値 (n M) を得た。結果を表 1 2、図 6 A 及び図 6 B に示す。

20

30

【0 2 1 3】

【表 1 2】

表 1 2 . 融合タンパク質の体外活性 (T H P 1 細胞の検出)

分子	HSAなし	1 % HSA
	E C ₅₀ (n M)	E C ₅₀ (n M)
8 0 0 8 1 4	0 . 2	0 . 3 2
0 0 6 0	0 . 3 2	0 . 6 1
0 0 5 4	1 0 . 3	1 5 . 8 2
0 0 5 1	3 . 8 3	2 8 . 3 8
0 0 5 2	5 . 2 2	2 1 . 5 2
0 0 5 3	4 . 2 3	2 5 . 7 6
0 0 6 2	4 . 0 2	2 3 . 0 6
0 0 6 3	4 . 1 5	3 9 . 3 5
0 0 6 4	8 . 5	1 9 . 7 5
0 0 6 5	2 . 0 8	2 3 . 0 1
0 0 6 6	3 . 4 9	2 3 . 4 7

40

【0 2 1 4】

50

その結果、本開示の各融合タンパク質の体外活性が陽性対照分子 0054 と同等であることが示されている。

【0215】

2、RXFP 受容体を過剰発現した CHO-K1 細胞における融合タンパク質の生物活性

(1) RXFP1 と RXFP2 受容体を一過性トランスフェクションした CHO-K1 細胞の調製

Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher、Cat No. 11668019) を使用して CHO-K1 細胞 (CCTCC、Cat No. GDC0018) を一過性トランスフェクションし、CHO-K1 細胞を 6×10^5 細胞/ウェルの濃度で 6 ウェルプレートにおいて再懸濁しておき、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 12 時間培養した後、元の培地を除去し、1.5 mL の無血清 Ham's F-12K (Kaighn's) 培地 (Gibco、Cat No. 21127030) を加えた。各ウェルの細胞に対しては、2 本の試験管を取り、試験管 1 では、 $3 \mu\text{g}$ の対応するプラスミド DNA (ヒト、イヌ、カニクイザル、ラット、マウスの RXFP1 受容体又はヒト RXFP2 受容体の DNA プラスミド) を $250 \mu\text{L}$ の Opti-MEM I 血清低減培地 (Gibco、Cat No. 31985070) に溶かし、試験管 2 では、 $3 \mu\text{L}$ の Lipofectamine 2000 試薬を $250 \mu\text{L}$ の Opti-MEM I 血清低減培地に溶かし、室温で 5 分間インキュベートした後、試験管 1 中の試薬を試験管 2 に加え、よく均一に混合し、室温で 20 分間インキュベートし、6 ウェルプレートに 1 滴ずつ加え ($500 \mu\text{L}$ /ウェル)、6 時間トランスフェクションした後、完全培地に変え、24 時間培養し続け、その後の実験を行った。

【0216】

(2) 融合タンパク質のその受容体に対する体外活性化作用

本実施例は、ホモジニアス時間分解蛍光 (HTRF) cAMP-Gs Dynamic 試薬キット (Cisbio、Cat No. 62AM4PEB) を使用し、メーカーの方案に基づいて cAMP レベルを測定した。具体的な方法は以下の通りである：

実験当日に、ヒト、イヌ、カニクイザル、ラット又はマウスの RXFP1 受容体をトランスフェクションした CHO-K1 細胞を遠心分離して収集した後、無血清培地において再懸濁し、細胞密度を 4×10^6 細胞/mL に調整し、各ウェルに $50 \mu\text{L}$ の体積 ($20,000$ 細胞/ウェル) で 96 ウェル測定プレート (Cisbio、Cat No. 66PL96025) に移した。測定待ちの試料 0051 及び陽性対照としての 0054、0060、800814 を個別の U 底 96 ウェルプレートにおいて試薬キット中の Stimulation Buffer 1 を使用して 10 倍の倍率でシリーズ希釈し、そして各ウェルに $5 \mu\text{L}$ の体積で、THP-1 細胞を含む 96 ウェル測定プレートに移し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 30 分間培養し、測定待ちの試料を含まない細胞を参照対照とした。試薬キット中の Lysis & Detection Buffer 1 を使用して cAMP-d2 (受容体蛍光基) 及び anti-cAMP-cryptat (供与体蛍光基) を希釈し、cAMP-d2 を各ウェルに $5 \mu\text{L}$ の体積で 96 ウェル測定プレートにおけるブランク対照ウェル以外の全てのウェルに加えた後、anti-cAMP-cryptat を全てのウェルに加え、暗所にて室温で 1 時間インキュベートした。その後、Tecan (Infinite 200 PRO) にて 620 nm と 665 nm の波長で数値を読み取り、 665 nm での蛍光強度 / 620 nm での蛍光強度 $\times 10,000$ の比率でシグナル強度を示し、Graphpad Prism を使用して非線形フィッティングして cAMP 濃度曲線をプロットし、融合タンパク質及び対照が CHO-K1 受容体過剰発現細胞を cAMP を産生するように誘導する EC_{50} 値 (μM) を得た。結果を表 13 及び図 6 B に示す。

【0217】

10

20

30

40

50

【表 13】

表 13. 融合タンパク質の体外活性 (CHO-K1 受容体過剰発現細胞)

EC ₅₀ (nM)	ヒトRxfp1	イヌRxfp1	カニクイザル Rxfp1	ラットRxfp1	マウスRxfp1	ヒトRxfp2
800814	5.621	156.5	5.864	1.878	4.729	252.3
0054	25.65	3039	21.78	10.48	23.41	1347
0051	28.34	2207	25.12	21.11	21.67	1246
0060	39.46	1067	19.38	20.02	38.78	活性なし

【0218】

その結果、0051分子の体外活性が対照分子0054及び0060と同等であることが示されている。

【0219】

実施例12. 融合タンパク質のラットにおける薬物動態

【0220】

4～6週齢、体重200～250gで、北京維通利華実験動物技術有限公司から購入された雄SDラットである。飼育期間に食事や水を自由に摂取させ、12/12時間の明/暗周期で調節し、温度16～26℃、相対湿度40～70%とした。動物が施設に到着した後、適応性飼育を7日間以上行った。実験開始の前日に、実験動物に番号を付け、ランダムで群分けし、合計4群、1群あたり3匹である。実験当日、4群の実験動物にそれぞれ被験薬0051と0054を静脈内注射又は皮下注射した。投与量は4mg/kg、注射体積は何れも5mL/kgである。

【0221】

静脈内注射による投与方式は、投与前及び投与後の0.5、1、3、6、24、48、72、96、120、168、192及び240時間の各時点で採血した。皮下注射による投与方式は、投与前及び投与後の3、6、24、48、72、96、120、168、192及び240時間の各時点で採血した。各動物から全血0.03mLを採取し、EDTA-K2で抗凝固し、採血後、直ちに4500rpmで5min遠心分離し、上清をEP管に取り、-20℃で保存し、実験終了後に-80℃に移して保存した。

【0222】

血漿中の0051と0054の薬物濃度はELISA方法を使用して検出された：0.4μg/mLのAnti-Relaxin 2/RLN2抗体(Abcam、Cat No. EPR21832-15)によりコーティングし、100μL/ウェルの体積で96ウェルマイクロプレート(Corning、Cat No. 9018)に加え、4℃で一晩16～20時間放置した。液を捨てた後、PBST(pH7.4、0.05%のTween-20)緩衝液でプレートを3回洗浄した後、4%のウシ血清アルブミン溶液(300μL/ウェル)を加え、室温で1時間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキング終了後、ブロッキング液を捨て、PBST緩衝液でプレートを3回洗浄した後、1%のラット血漿を含むCasin Blocker(Thermo、Cat No. 37528)という希釈液を使用して適当に希釈された異なる時点でのラット血漿を加え、37℃で1時間インキュベートした。インキュベート終了後、プレートにおける反応液を捨て、PBSTでプレートを3回洗浄し、HRPで標識されたウサギ抗ラクダCocktail VHHの二次抗体(Genescript、Cat No. A02016、BSAなし)(1:5000で希釈)100μLを各ウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。PBSTでプレートを3回洗浄した後、100μLのTMB(Sigma、Cat No. T0440)発色基質を加えて発色させ、1Mの硫酸を使用して反応を停止し、SpectraMax M5プレートリーダーによりOD450nmで吸収値を読み取った。

【0223】

データ結果をGraphpad Prismソフトウェアにより分析し、血漿試料にお

ける0051と0054分子の濃度を標準曲線に従って算出し、ラットの結果は図7Aに示す通りである。算出された濃度をPK solverを使用して半減期を算出し、結果は図14に示す通りである。更に、同様の方法でマウスの薬物動態を検出したが、その結果、図7Bに示すように、0051分子のAUC暴露量及び $t_{1/2}$ が陽性対照分子0054と同等であることが示されている。

【0224】

【表14】

表14. ラットにおける薬物動態パラメータ

PKパラメータ	ラット			
	IV		SC	
	0051	0054	0051	0054
AUC (0-t) (h*nmol/L)	153397	327981	78268	97492
AUC (inf) (h*nmol/L)	157174	331235	83492	100424
CLp (mL/min/kg)	0.02	0.01	/	/
T1/2 (h)	44.3	40.4	54.4	45
AUClast/用量	767	1640	/	/
MRT (inf) (h)	57.5	34.7	96	77
MRTlast	51.4	32	81	70
Vdss (L/kg)	0.07	0.02	/	/
Tmax	/	/	48	32
Cmax	/	/	948	1536
生物学的利用能%	/	/	53.1	30.3

10

20

【0225】

ラットのPK結果から、IV投与後に、0054のAUCが0051の約2倍で、両分子の $t_{1/2}$ の差が小さく、SC投与後に、0051の生物学的利用能が0054よりも高いことが示されている。0054分子に比べて、0051は見かけの分布容積(Vdss)がより大きいため、分子がより優れた組織細胞バリア透過性を持つことを示し、更に、0051は見かけの滞留時間(MRT)がより長いため、分子の体内で薬効作用を発揮する時間がより長いことが予想され、更に、皮下注射によるSC投与後、0051は、生物学的利用能(Bioavailability%)が0054よりも明らかに高い。従って、0051は、より優れた薬物動態特性を有する。

【0226】

30

実施例13. 融合タンパク質のマウス心筋肥大への作用

【0227】

微小浸透圧ポンプ(Alzet 1002)を皮下に植え込んでイソプレナリン(ISO, Sigma, Cat. #I5627)を注入することによりC57BL/6Jマウス(Charles River Laboratories)心筋肥大モデルを調製し、ISOを濃度が146mg/mL(マウスの平均体重25.8gによって算出)になるように、0.002%のアスコルビン酸ナトリウム(Sigma, Cat. #11140)を含むPBS緩衝液(Servicebio, Cat. #G4202)に溶かし、注入濃度15mg/kg/dで、14日間連続注入して病理モデルを調製し、14日目に浸透圧ポンプを取り出し、モデル対照群1を安楽死させて取材し、残りのマウスをランダムで群分けし、融合タンパク質又は対照分子の皮下注射を開始し、投与量及び群分けは表15の通りである。

40

【0228】

50

【表 1 5】

表 1 5. 投与量及び群分けの情報

群分け	数量	心筋肥大モデルの調製	投与量
偽手術	5	偽手術のみを行う	—
ブランク対照	5	ブランク対照 (PBSに0.002%アスコルビン酸が含まれる)	PBS (S. C, Q3d)
モデル対照 1	5	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	—
モデル対照 2	16	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	PBS (S. C, Q3d)
0051低用量	17	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	2.5mg/kg (S. C, Q3d)
0051高用量	12	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	7.4mg/kg (S. C, Q3d)
0054低用量	5	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	2.5mg/kg (S. C, Q3d)
0054高用量	12	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	7.4mg/kg (S. C, Q3d)
0060高用量	12	15mg/kg/dでISOをブランク対照に	20mg/kg (S. C, Q7d)

10

【0229】

研究終了時、動物を6時間絶食させた後、マウス体重を測定し、そしてマウスを安楽死させ、心臓重量及び脛骨の長さを測定した。心臓重量の脛骨の長さに対する比率によって心筋肥大の状況を判定した。図8及び表16の通りである。

【0230】

【表 1 6】

20

表 1 6. マウスISO心筋肥大モデルの心臓重量の脛骨の長さに対する比率

群分け	平均値	P 値
偽手術	7.38	/
ブランク対照	7.34	/
モデル対照 1	8.98	0.0129
モデル対照 2	7.34	/
0051低用量	6.83	0.0345
0051高用量	6.63	0.0078
0054低用量	7.36	0.9548
0054高用量	6.86	0.05
0060高用量	6.87	0.0563

30

【0231】

上記の計測データは平均数±標準偏差 (mean±SD) で示され、2群の比較はStudent t test検定を採用し、*p<0.05、**p<0.01 vs モデル対照2群、#p<0.05 vs ブランク対照群である。

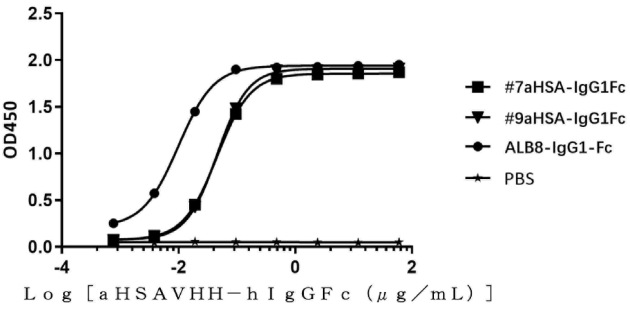
【0232】

マウスへのISOの注入は、心筋肥大を顕著に引き起こすことができ、本開示の融合タンパク質を投与して治療することにより、ISOによる心筋肥大を基線レベルまで回復させることができ、必要な用量が対照0060よりも顕著に低い。

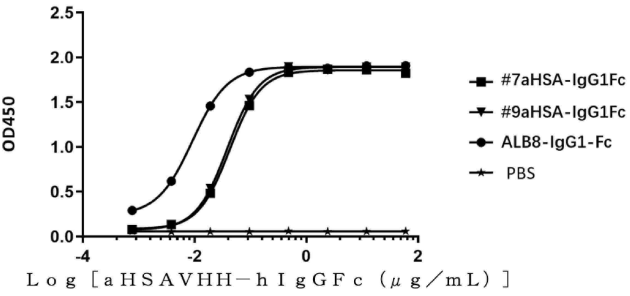
40

【図面】

【図 1 A】

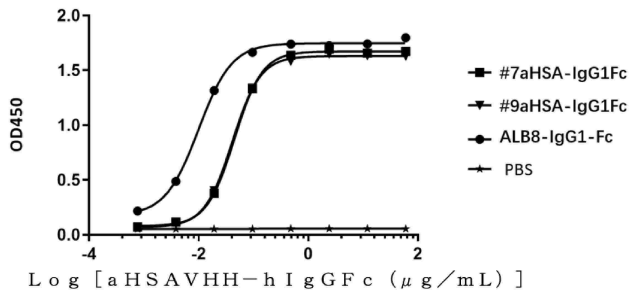


【図 1 B】

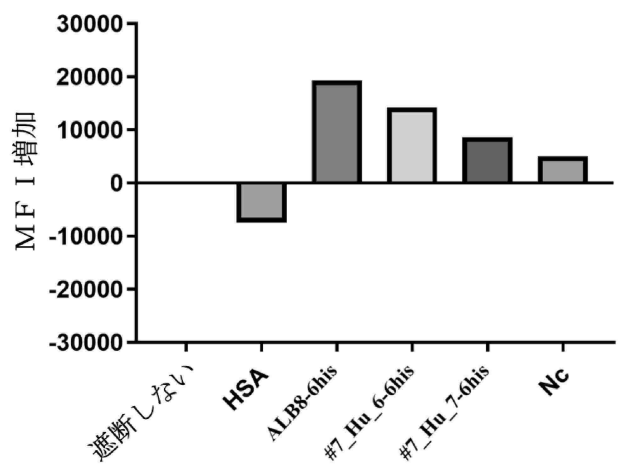


10

【図 1 C】



【図 2 A】



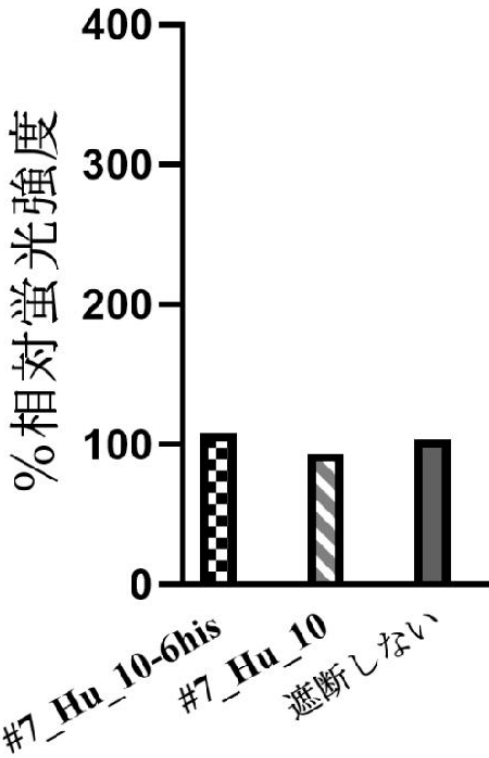
20

30

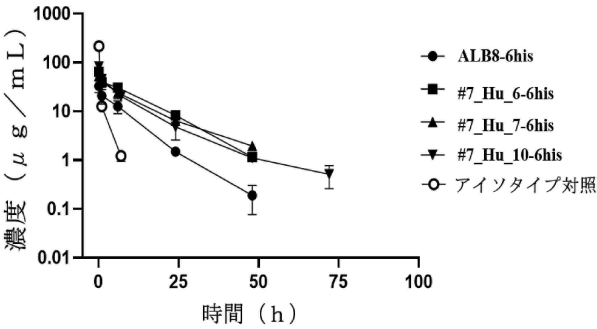
40

50

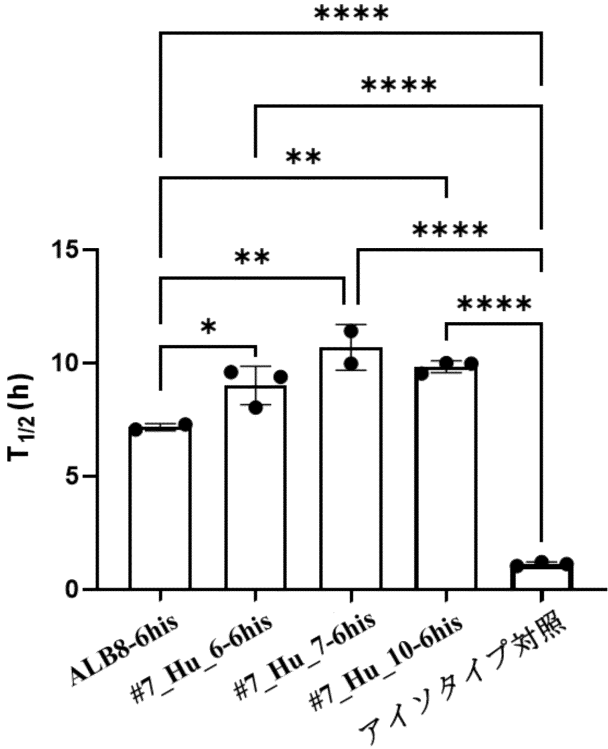
【 図 2 B 】



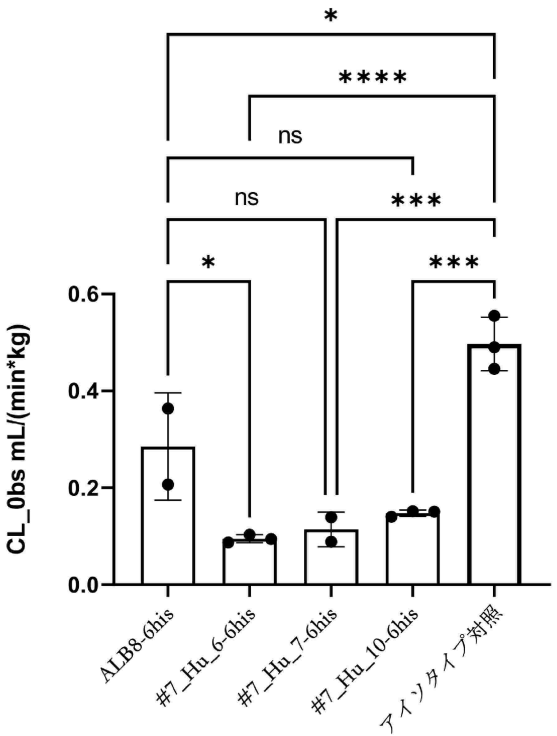
【 図 3 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



10

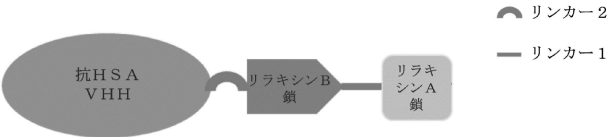
20

30

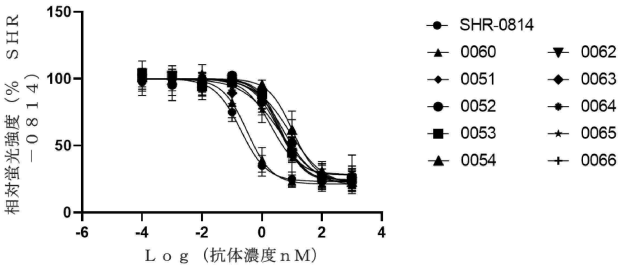
40

50

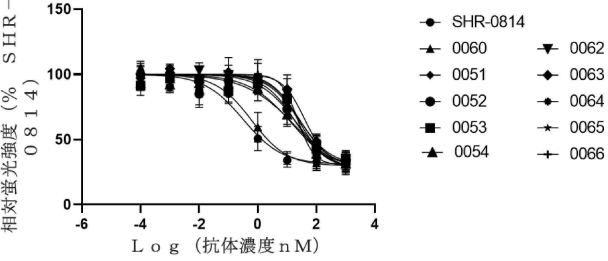
【図 5】



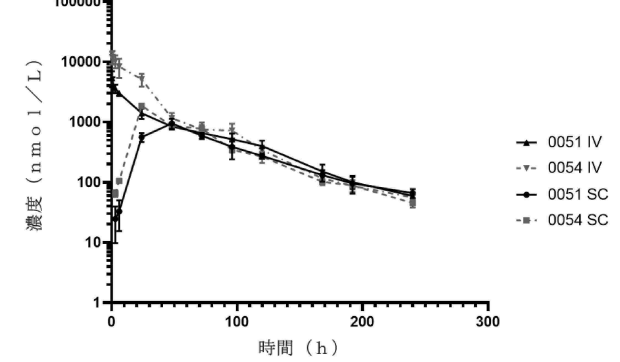
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7 A】



10

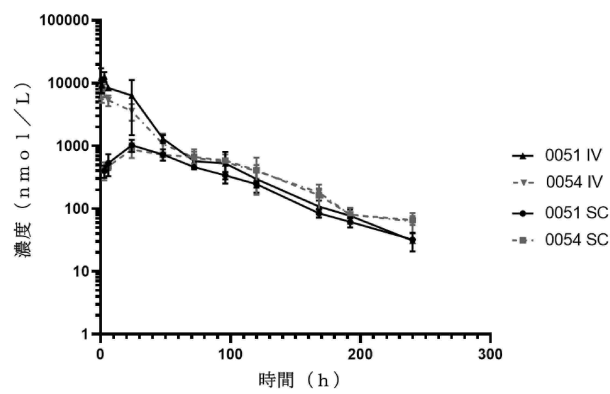
20

30

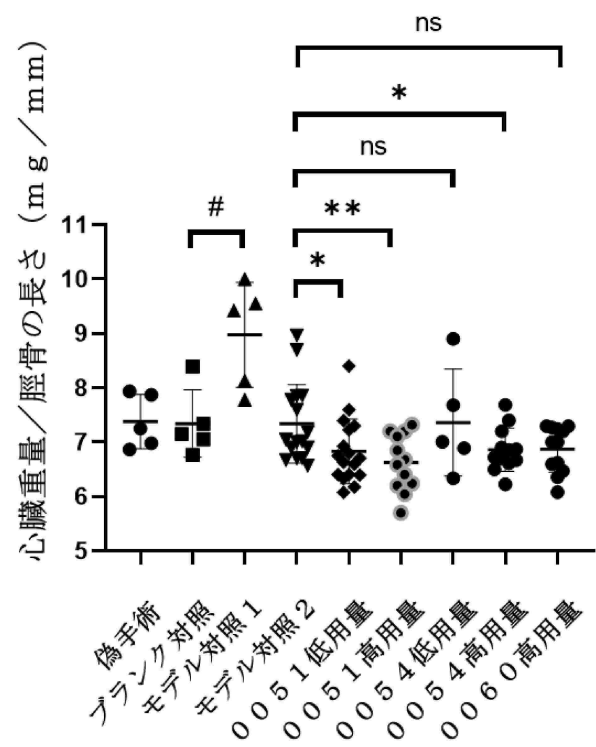
40

50

【図 7 B】



【図 8】



【配列表】

2025517100000001.xml

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/092214
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P9/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, OETXT, VEN, VCN, WPABS, WPABSC, CNKI, 万方资源数据库, WANFANG Resource Database, Web of Science, Pubmed: 血清白蛋白, 抗体, HSA, 松弛素, relaxin, 融合蛋白, 重组蛋白; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, STN, Genbank, EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 8-13, 58-59, 60, EMBL and searched sequences: SEQ ID NOs: 8-13, 58-59 and 60.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103649116 A (BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH) 19 March 2014 (2014-03-19) claims 1-15	1-26
A	CN 112851805 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 28 May 2021 (2021-05-28) claims 1-40	1-26
A	CN 112409480 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 26 February 2021 (2021-02-26) abstract, and claims 1-29	1-26
A	CA 2766160 A1 (MEDIMMUNE LLC AND BOARD OF REGENTS) 08 August 2002 (2002-08-08) claims 1-51	1-26
A	US 2008260757 A1 (DOMANTIS LTD.) 23 October 2008 (2008-10-23) claims 1-53	1-26
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 July 2023		Date of mailing of the international search report 13 August 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/092214

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019352366 A1 (MEDIMMUNE, LLC; MEDIMMUNE LTD.) 21 November 2019 (2019-11-21) claims 1-14	1-26
A	JP 2014529293 A (BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH) 06 November 2014 (2014-11-06) abstract	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/092214
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.		
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.		
3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/092214

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103649116	A	19 March 2014	IL	229753	A0	30 January 2014
				CA	2840944	A1	17 January 2013
				BR	112014000474	A2	21 February 2017
				WO	2013007563	A1	17 January 2013
				KR	20140039257	A	01 April 2014
				AU	2012283235	A1	09 January 2014
				JP	2014529293	A	06 November 2014
				TW	201317259	A	01 May 2013
				MX	2014000316	A	19 February 2014
				RU	2014104302	A	20 August 2015
				AR	087070	A1	12 February 2014
				EP	2729494	A1	14 May 2014
				US	2014148390	A1	29 May 2014
CN	112851805	A	28 May 2021	None			
CN	112409480	A	26 February 2021	None			
CA	2766160	A1	08 August 2002	ES	2357756	T3	29 April 2011
US	2008260757	A1	23 October 2008	WO	2005118642	A2	15 December 2005
				WO	2005118642	A3	23 March 2006
				AU	2005250216	A1	15 December 2005
				AU	2005250216	B2	10 December 2009
				CA	2569240	A1	15 December 2005
				BRPI	0511755	A	02 January 2008
				IL	179633	A0	15 May 2007
				KR	20070039911	A	13 April 2007
				US	8921528	B2	30 December 2014
				KR	20120133403	A	10 December 2012
				EP	1784427	A2	16 May 2007
				JP	2012135311	A	19 July 2012
				JP	2008500830	A	17 January 2008
				TW	200607523	A	01 March 2006
				EP	2740743	A2	11 June 2014
				EP	2740743	A3	19 August 2015
				EA	200602183	A1	29 June 2007
				EA	012622	B1	30 October 2009
				MXPA	06014031	A	08 October 2007
				US	2015064185	A1	05 March 2015
US	2019352366	A1	21 November 2019	WO	2018138170	A1	02 August 2018
				US	11192931	B2	07 December 2021
				EP	3574004	A1	04 December 2019
				US	2022073584	A1	10 March 2022
				JP	2020505029	A	20 February 2020
JP	2014529293	A	06 November 2014	None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/092214
A. 主题的分类 C07K16/18(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P9/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, OETXT, VEN, VCN, WPABS, WPABSC, CNKI, 万方资源数据库, Web of Science, Pubmed和关键词: 血清白蛋白, 抗体, HSA, 松弛素, relaxin, 融合蛋白, 重组蛋白; 中国专利生物序列检索系统, STN, Genbank, EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 8-13, 58-59, 60。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103649116 A (拜耳知识产权有限责任公司) 2014年3月19日 (2014 - 03 - 19) 权利要求1-15	1-26
A	CN 112851805 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2021年5月28日 (2021 - 05 - 28) 权利要求1-40	1-26
A	CN 112409480 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 摘要, 权利要求1-29	1-26
A	CA 2766160 A1 (MEDIMMUNE LLC AND BOARD OF REGENTS) 2002年8月8日 (2002 - 08 - 08) 权利要求1-51	1-26
A	US 2008260757 A1 (DOMANTIS LTD) 2008年10月23日 (2008 - 10 - 23) 权利要求1-53	1-26
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年7月3日		国际检索报告邮寄日期 2023年8月13日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		受权官员 李颖 电话号码 (+86) 010-62412262

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/092214
G. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2019352366 A1 (MEDIMMUNE LLC;MEDIMMUNE LTD;) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 权利要求1-14	1-26
A	JP 2014529293 A (Bayer Intellectual Property Gmb H) 2014年11月6日 (2014 - 11 - 06) 摘要	1-26

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/092214
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)), ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。 2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。 3. 补充意见:		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/092214

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103649116	A	2014年3月19日	IL	229753	A0	2014年1月30日
				CA	2840944	A1	2013年1月17日
				BR	112014000474	A2	2017年2月21日
				WO	2013007563	A1	2013年1月17日
				KR	20140039257	A	2014年4月1日
				AU	2012283235	A1	2014年1月9日
				JP	2014529293	A	2014年11月6日
				TW	201317259	A	2013年5月1日
				MX	2014000316	A	2014年2月19日
				RU	2014104302	A	2015年8月20日
				AR	087070	A1	2014年2月12日
				EP	2729494	A1	2014年5月14日
				US	2014148390	A1	2014年5月29日
CN	112851805	A	2021年5月28日	无			
CN	112409480	A	2021年2月26日	无			
CA	2766160	A1	2002年8月8日	ES	2357756	T3	2011年4月29日
US	2008260757	A1	2008年10月23日	WO	2005118642	A2	2005年12月15日
				WO	2005118642	A3	2006年3月23日
				AU	2005250216	A1	2005年12月15日
				AU	2005250216	B2	2009年12月10日
				CA	2569240	A1	2005年12月15日
				BR-PI	0511755	A	2008年1月2日
				IL	179633	A0	2007年5月15日
				KR	20070039911	A	2007年4月13日
				US	8921528	B2	2014年12月30日
				KR	20120133403	A	2012年12月10日
				EP	1784427	A2	2007年5月16日
				JP	2012135311	A	2012年7月19日
				JP	2008500830	A	2008年1月17日
				TW	200607523	A	2006年3月1日
				EP	2740743	A2	2014年6月11日
				EP	2740743	A3	2015年8月19日
				EA	200602183	A1	2007年6月29日
				EA	012622	B1	2009年10月30日
				MXPA	06014031	A	2007年10月8日
				US	2015064185	A1	2015年3月5日
US	2019352366	A1	2019年11月21日	WO	2018138170	A1	2018年8月2日
				US	11192931	B2	2021年12月7日
				EP	3574004	A1	2019年12月4日
				US	2022073584	A1	2022年3月10日
				JP	2020505029	A	2020年2月20日
JP	2014529293	A	2014年11月6日	无			

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)
A 6 1 K 38/24 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/08
C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K 38/24
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 47/68
A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/04

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
 ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
 O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
 R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW
 ,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL
 ,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 杜 延平

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

(72)発明者 王 雷

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

(72)発明者 劉 瀟

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

(72)発明者 高 紅

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

(72)発明者 申 晨曦

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

(72)発明者 張 琳爽

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

(72)発明者 姜 鵬

中華人民共和國 1 0 2 2 0 6 北京市昌平区生命科学園医科路 9 号院 4 号楼 7 層

F ターム (参考) 4B064 AG15 AG27 CA19 CC24 CE09 CE10 CE12 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

4C076 AA94 CC11 CC26 EE41 EE59 FF31 FF63

4C084 AA02 AA07 BA01 BA41 BA44 DB48 DB51 NA03 NA05 NA12
ZA36 ZB21

4C085 AA13 AA14 AA21 BB31 BB36 BB42 CC21 DD61 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA30 DA76 EA23

FA74