

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4336771号
(P4336771)

(45) 発行日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月10日(2009.7.10)

(51) Int. Cl.	F I
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06 ZNA
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08
C07K 14/005 (2006.01)	C07K 14/005
A61K 38/55 (2006.01)	A61K 37/64
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02

請求項の数 31 (全 156 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-575002 (P2002-575002)	(73) 特許権者	504315886
(86) (22) 出願日	平成14年3月8日(2002.3.8)		モルフォシス アーゲー
(65) 公表番号	特表2004-535373 (P2004-535373A)		ドイツ連邦共和国 マルティンスリート
(43) 公表日	平成16年11月25日(2004.11.25)		82152 レナークリストーシュトラ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007271		セ 48
(87) 国際公開番号	W02002/076489	(74) 代理人	100095832
(87) 国際公開日	平成14年10月3日(2002.10.3)		弁理士 細田 芳徳
審査請求日	平成17年1月31日(2005.1.31)	(72) 発明者	サトー, アーロン, ケイ.
(31) 優先権主張番号	60/331, 352		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(32) 優先日	平成13年3月9日(2001.3.9)		143 サマヴィル, セントラル ストリ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ート ナンバー21 19
(31) 優先権主張番号	60/292, 975	(72) 発明者	レイ, アーサー, シー.
(32) 優先日	平成13年5月23日(2001.5.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(33) 優先権主張国	米国 (US)		465 ニュートン, アデナ ロード 1
			22

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清アルブミン結合部分

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式：

Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys (配列番号：1)、

式中、

Xaa₁がAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり；Xaa₂がAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり；Xaa₃がAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり；およびXaa₄がAsp、Leu、Phe、Ser、またはThrである

の amino 酸配列を含むポリペプチドを含む血清アルブミン結合部分。

10

【請求項2】

前記ポリペプチドが式：

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Cys-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀ (配列番号：2)、

式中、

Xaa₁がAsn、His、Leu、Phe、Trp、またはValであり；Xaa₂がAla、Glu、His、Lys、Trp、またはValであり；Xaa₃がAsp、Gly、Ile、His、Ser、Trp、またはValであり；Xaa₄がAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり；Xaa₅がAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり；Xaa₆がAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり；

20

Xaa₇がAsp、Leu、Phe、Ser、またはThrであり；
 Xaa₈がGlu、Ile、Leu、Met、Ser、またはValであり；
 Xaa₉がAsn、Asp、Gln、Gly、Met、Ser、またはTrpであり；および
 Xaa₁₀がAla、Asn、Asp、Pro、Tyr、またはValである
 のアミノ酸配列を含んでなる請求項1記載の結合部分。

【請求項3】

前記ポリペプチドが式：

Ala-Glu-Gly-Thr-Gly-Ser-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Cys-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Ala-Pro-Glu (配列番号：3)、

式中、

Xaa₁がAsn、His、Leu、Phe、Trp、またはValであり；
 Xaa₂がAla、Glu、His、Lys、Trp、またはValであり；
 Xaa₃がAsp、Gly、Ile、His、Ser、Trp、またはValであり；
 Xaa₄がAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり；
 Xaa₅がAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり；
 Xaa₆がAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₇がAsp、Leu、Phe、Ser、またはThrであり；
 Xaa₈がGlu、Ile、Leu、Met、Ser、またはValであり；
 Xaa₉がAsn、Asp、Gln、Gly、Met、Ser、またはTrpであり；および
 Xaa₁₀がAla、Asn、Asp、Pro、Tyr、またはValである

のアミノ酸配列を含んでなる請求項2記載の結合部分。

【請求項4】

前記ポリペプチドが：

CTIFLC (配列番号：7)、
 CDQWFC (配列番号：11)、
 CNNALC (配列番号：12)、
 CDHFFC (配列番号：13)、
 CWHFSC (配列番号：14)、
 CWLYDC (配列番号：184)、および
 CSKDTCC (配列番号：186)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる請求項1記載の結合部分。

【請求項5】

前記ポリペプチドが：

LWDCWLYDCEGN (配列番号：232)、
FEHC SKDTC SGN (配列番号：234)、
 VAWCTIFLCLDV (配列番号：239)、
 FKICDQWFCLMP (配列番号：240)、
 HVG C N N A L C M Q Y (配列番号：241)、
 WKVCDHFFCLSP (配列番号：242)、および
 NHGCW H F S C I W D (配列番号：243)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる請求項2記載の結合部分。

【請求項6】

前記ポリペプチドが：

Ac-AEGTGSVAWCTIFLCLDVAPEGGGK-NH₂ (配列番号：25)、
 Ac-AEGTGSFKICDQWFCLMPAPE-X-K-NH₂ (配列番号：26)、
 Ac-AEGTGSVHVCNNALCMQYAPE-X-K-NH₂ (配列番号：27)、
 Ac-AEGTGSWKVCDHFFCLSPAPE-X-K-NH₂ (配列番号：28)、
 Ac-AEGTGSNHGCWHFSCIWDAPE-X-K-NH₂ (配列番号：29)、および
 Ac-GSLWDCWLYDCEGNAPGGGK-NH₂ (配列番号：269)、

式中、-X-が6-アミノヘキサン酸であり、Ac-がアセチルであり、および-NH₂がC-末端ア

10

20

30

40

50

ミドである

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる請求項 2 記載の結合部分。

【請求項 7】

前記血清アルブミン結合部分が組み換えバクテリオファージである請求項 1 記載の結合部分。

【請求項 8】

セルロース、プラスチック、金属、ゴム、木、ナイロン、ガラス、アクリルアミド、アガロース、およびその組み合わせからなる群より選択される固体支持体材料に結合された請求項 1 ~ 6 いずれか 1 つに記載の結合部分を含む物質の組成物。

【請求項 9】

クロマトグラマトリクス材料に固定された請求項 1 ~ 6 いずれか 1 つに記載の結合部分を含む物質の組成物。

【請求項 10】

別の分子と結合体化された請求項 1 ~ 6 いずれか 1 つに記載の結合部分を含む物質の組成物であって、ここでコンジュゲートが血清アルブミンを結合する組成物。

【請求項 11】

前記別の分子が検出可能な標識である請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

前記検出可能な標識が放射性核種、検出可能なタンパク質、エピトープタグ、ビオチン、ストレプトアビジン、酵素、抗体、および蛍光標識からなる群より選択される、請求項 11 記載の組成物。

【請求項 13】

検出可能な標識がテクネチウム含有化合物である請求項 11 記載の組成物。

【請求項 14】

前記別の分子が目的の薬物、生物薬剤、またはポリペプチドである請求項 10 記載の組成物。

【請求項 15】

(a) 前記血清アルブミン結合部分が前記血清アルブミンと複合体を形成する条件下で溶液を請求項 11 記載の組成物と接触させる工程、および

(b) 該複合体を検出する工程

を含む、溶液中で血清アルブミンを検出するための方法。

【請求項 16】

溶液が血液である請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

(a) 請求項 1 ~ 6 いずれか 1 つに記載の結合部分を固体支持体上に固定化する工程；

(b) 血清アルブミン結合部分が血清アルブミンと複合体を形成する条件下で血清アルブミンを含む溶液を (a) の固体支持体と接触させる工程；および

(c) 該溶液の非結合成分から固体支持体を分離する工程

を含む、血清アルブミンを含む溶液から血清アルブミンを単離する方法。

【請求項 18】

前記固体支持体がクロマトグラマトリクス材料、フィルター、磁性ビーズ、およびプラスチックまたはガラス容器の表面からなる群より選択される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

(d) 前記支持体から血清アルブミンを溶離、回収する工程

をさらに含む、請求項 17 または 18 記載の方法。

【請求項 20】

溶液がトランスジェニックニワトリ卵白、組み換え真核または原核細胞抽出物、および全血からなる群より選択される、請求項 17 ~ 19 いずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 21】

(a) 血清アルブミンを含む溶液を請求項 1 ~ 6 いずれか 1 つに記載の血清アルブミン

10

20

30

40

50

結合部分と接触させる工程であって、該血清アルブミン結合部分が該結合部分と該血清アルブミンとの間での結合複合体の形成に好適な条件下で親和性リガンドと結合体化される工程；

(b) 親和性リガンドと結合パートナーとの間での結合複合体の形成に好適な条件下で工程(a)の溶液を該親和性リガンドに対する固定化結合パートナーと接触させる工程；

(c) 工程(b)で形成された任意の複合体から溶液中の非結合材料を除去する工程を含む、血清アルブミンを含む溶液から血清アルブミンを単離する方法。

【請求項22】

前記親和性リガンドがポリヒスチジンタグである請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記親和性リガンドがビオチンであり、前記親和性リガンドに対する固定化結合パートナーがストレプトアビジンである、請求項21記載の方法。

【請求項24】

検出可能に標識された請求項1～6いずれか1つに記載の血清アルブミン結合部分を含有してなる、被験体の血液循環を評価する方法において使用するための組成物であって、該方法が：

(a) 被験体の循環系に該組成物を導入すること、および

(b) 被験体において該組成物を検出すること

を含む、組成物。

【請求項25】

前記組成物が前記検出可能に標識された血清アルブミン結合部分と血清アルブミンとの複合体から本質的になる、請求項24記載の組成物。

【請求項26】

前記組成物の血清アルブミン結合部分が磁気共鳴画像化剤で検出可能に標識されている、請求項24または25記載の組成物。

【請求項27】

請求項1～6いずれか1つに記載の血清アルブミン結合部分および化合物のコンジュゲートを含む、被験体における前記化合物の血清半減期を増大する方法において使用するための組成物であって、該方法が：

被験体の循環系に該コンジュゲートを導入することを含む、組成物。

【請求項28】

前記化合物が診断化合物である請求項27記載の組成物。

【請求項29】

前記化合物が治療化合物である請求項27記載の組成物。

【請求項30】

前記診断化合物が放射能標識または磁気共鳴画像化剤を含む請求項28記載の組成物。

【請求項31】

前記治療化合物がトロンピンインヒビター、血栓崩壊剤、レニンインヒビター、ACEインヒビター、セレクチンリガンド、凝固カスケードのインヒビター、補体調節分子、セリンプロテアーゼ、GPIIb/IIIaアンタゴニスト、およびCRFアンタゴニストからなる群より選択される、請求項29記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、血清アルブミン、特にヒト血清アルブミン(HSA)に結合するポリペプチド、ならびに、例えば、精製および医療使用のためのその使用方法を提供する。

【0002】

発明の背景

哺乳動物種の循環血液中でも最も豊富なタンパク質成分は、血清アルブミンであり、これは通常、100ミリリットルの全血あたり約3～4.5グラムの濃度で存在する。血清アルブミ

10

20

30

40

50

ンは、約70,000ダルトンの血液タンパク質であり、循環系においていくつかの重要な機能を提供する。例えば、血液に見出される種々の有機分子のトランスポーターとして、血液を介する種々な代謝産物（例えば、脂肪酸およびビリルビン）の主なトランスポーターとして、およびその豊富さのために循環血液の浸透圧調節因子として機能する。ヒト血清アルブミン（HSA）は、タンパク質置換治療においておよび失血（例えば、手術、熱傷、外傷、またはショックにより生じる）を経験している患者の代用血漿として臨床的に使用されている。

【0003】

患者はしばしば、単一処置で大量のHSAを受けるので、市販のHSAは、治療に試用される多くの他のタンパク質より高度な純度を有していなければならない。タンパク質はまた、抗原性応答を避けるために正確な立体配座を有していなければならない。

10

【0004】

HSAは、ヒト血液ドナー由来のヒト血清からの精製により、または組み換え発現系（例えば、トランスジェニックマウス乳汁（Shaniら、*Transgenic Res.*, 1:195-208(1992)）、*Pichia pastoris*（Kobayashiら、*Ther. Apher.*, 2:257-262(1998)）、およびトランスジェニック広葉または塊茎植物（例えば、タバコおよびトマト植物）（Sijmonsら、*Biotechnology (NY)*, 8:217-221(1990)））からの発現および単離により有用な量で得られる。ヒト血清から集められたHSAはほんの少しでも可能性のあるヒト病原体を除去するように精製され、次いで厳正に試験されなければならないので、組み換え供給源は、かかる伝染性病原体がない点ですばらしい利点を有する。

20

【0005】

研究およびアッセイプロトコールにおいて、血清アルブミンは、種々の使用を見出している。例えば、血清アルブミンは、種々の組織培養増殖培地における成分として使用されて、真核性、および特に哺乳動物、細胞を増殖させる。血清アルブミンはまた、種々のアッセイプロトコール（例えば、酵素結合免疫吸着検定（ELISA）およびウエスタンブロット）においてブロックタンパク質として使用されて、他の分子による非特異的結合による潜在的な干渉を予防し得る。さらに、血清アルブミンはまた、抗原が吸着され得るキャリア分子として使用され得るか、または結合体化されて、特定の抗原に対する抗体産生を顕在化させる免疫原性化合物を形成し得る。血清アルブミンのサイズはまた、比較により他のタンパク質のサイズを評価するかまたは計算するために使用され得る標準的な分子量のマーカートンパク質として有用となる。

30

【0006】

明らかに、血清アルブミンは、幅広い種類の医学的、診断的、および研究適用における使用を見出し、かつ見出しつづけているタンパク質である。高度に精製された血清アルブミン、特に高度に精製されたHSAの要求が特に重要である。典型的に、HSAの高度に精製された調製物を得る方法は、マトリクスまたは樹脂に結合体化された色素（例えば、Cibacron Blueセファローズ親和性マトリクス（Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden））を用いる親和性クロマトグラフィーを使用する工程を含む。しかし、現在の色素ベースの親和性クロマトグラフィーは、高度に精製されたHSAを単一工程で提供することはできず、従って、産生時間およびコストを増加するさらなる工程を必要とする。

40

【0007】

従って、より少ない産生工程を使用して、高度に精製された状態でかつ高い収量で血清アルブミン、特にHSAを産生するための手段および方法が継続して必要である。さらに、種々のプロセスおよび産生方法において、より完全に、全血を含む溶液から血清アルブミンを除去または捕獲する手段および方法が必要なままである。

【0008】

発明の要旨

本明細書中に記載される本発明は、血清アルブミンの高度に純粋な調製物の製造方法または天然には存在しない血清アルブミン結合部分の群（これは、ヒト血清アルブミン（HSA）を含む1つ以上の型の哺乳動物血清アルブミンに結合する）を提供することによる血

50

清アルブミンの検出方法を提供する。本発明の血清アルブミン結合部分には、本明細書中に記載される血清アルブミン結合ポリペプチド；本明細書中に記載される血清アルブミン結合ポリペプチドを提示するファージ、ファージミド、細菌、宿主細胞または他の複製可能な遺伝子パッケージ、および他の分子（他のポリペプチド、検出可能な分子タグ等）にさらに連結（共有結合または非共有結合）される本明細書中に記載される血清アルブミン結合ポリペプチドを含む分子が含まれる。

【0009】

ファージディスプレイ技術を用いて、哺乳動物血清アルブミンに特異的に結合する非天然の、小さい環状ポリペプチド組み換えバクテリオファージが同定され、単離されている。ファージ産物および単離されたポリペプチドは、全血およびその画分を含む種々の溶液において血清アルブミンを特異的に結合するために役立つ試薬であることがわかっている。

10

【0010】

特定の態様では、本発明は、血清アルブミン結合ポリペプチド、アルブミン分離媒体、ならびに血清アルブミンを含有する溶液、特に全血、血液血清、他の血液画分、および他の混合物（例えば、馴化培地）に由来する哺乳動物血清アルブミンを検出し、単離し、生成する方法を提供する。本発明の好ましい特徴としては、血清アルブミン結合ポリペプチド（ファージ粒子の表面に提示される）をコードする外因性デオキシリボ核酸（DNA）を発現する組み換えバクテリオファージ（ファージミドを含む）、細菌、哺乳動物宿主細胞または他の複製可能な遺伝的パッケージが挙げられる。

20

【0011】

本発明はまた、
Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys（配列番号：1）、
式中、
Xaa₁はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり；
Xaa₂はAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり；
Xaa₃はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり；および
Xaa₄はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrである
のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

30

【0012】

本発明はまた、
Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Cys-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀（配列番号：2）、
式中、
Xaa₁はAsn、His、Leu、Phe、Trp、またはValであり；
Xaa₂はAla、Glu、His、Lys、Trp、またはValであり；
Xaa₃はAsp、Gly、Ile、His、Ser、Trp、またはValであり；
Xaa₄はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり；
Xaa₅はAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり；
Xaa₆はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり；
Xaa₇はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrであり；
Xaa₈はGlu、Ile、Leu、Met、Ser、またはValであり；
Xaa₉はAsn、Asp、Gln、Gly、Met、Ser、またはTrp；および
Xaa₁₀はAla、Asn、Asp、Pro、Tyr、またはValである
のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

40

【0013】

さらに別の態様では、本発明は、
Ala-Glu-Gly-Thr-Gly-Ser-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Cys-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Ala-Pro-Glu（配列番号：3）、

50

式中、

Xaa₁はAsn、His、Leu、Phe、Trp、またはValであり；
 Xaa₂はAla、Glu、His、Lys、Trp、またはValであり；
 Xaa₃はAsp、Gly、Ile、His、Ser、Trp、またはValであり；
 Xaa₄はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり；
 Xaa₅はAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり；
 Xaa₆はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₇はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrであり；
 Xaa₈はGlu、Ile、Leu、Met、Ser、またはValであり；
 Xaa₉はAsn、Asp、Gln、Gly、Met、Ser、またはTrpであり；および
 Xaa₁₀はAla、Asn、Asp、Pro、Tyr、またはValである

10

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

【0014】

本発明はまた、

Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Cys (配列番号：130)

式中、

Xaa₁はAla、Leu、His、Met、Phe、Ser、またはThrであり；
 Xaa₂はIle、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₃はAsp、Gln、Glu、Lys、Pro、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₄はAsp、Gln、Gly、Leu、Pro、またはTrpであり；
 Xaa₅はAsp、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Trp、またはTyrであり；および
 Xaa₆はGln、Gly、Ile、Phe、Thr、Trp、またはValである

20

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

【0015】

本発明はまた、

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Cys-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂ (配列番号：131)、

式中、

30

Xaa₁はAla、Gln、Leu、Lys、Phe、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₂はAsn、Gln、Glu、Ile、Thr、またはTrpであり；
 Xaa₃はAsn、Gly、Phe、Thr、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₄はAla、Leu、His、Met、Phe、Ser、またはThrであり；
 Xaa₅はIle、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₆はAsp、Gln、Glu、Lys、Pro、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₇はAsp、Gln、Gly、Leu、Pro、またはTrpであり；
 Xaa₈はAsp、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₉はGln、Gly、Ile、Phe、Thr、Trp、またはValであり；
 Xaa₁₀はAsp、Glu、Gly、Leu、Lys、Pro、またはSerであり；
 Xaa₁₁はGlu、His、Ile、Leu、Lys、Ser、Trp、またはValであり；および
 Xaa₁₂はAla、Asn、His、Ile、Met、Phe、Pro、またはSerである

40

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

【0016】

さらに別の態様では、本発明は、

Ala-Gly-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Cys-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Gly-Thr (配列番号：132)、

式中、

Xaa₁はAla、Gln、Leu、Lys、Phe、Trp、またはTyrであり；

50

Xaa₂はAsn、Gln、Glu、Ile、Thr、またはTrpであり；
 Xaa₃はAsn、Gly、Phe、Thr、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₄はAla、Leu、His、Met、Phe、Ser、またはThrであり；
 Xaa₅はIle、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₆はAsp、Gln、Glu、Lys、Pro、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₇はAsp、Gln、Gly、Leu、Pro、またはTrpであり；
 Xaa₈はAsp、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Trp、またはTyrであり；
 Xaa₉はGln、Gly、Ile、Phe、Thr、Trp、またはValであり；
 Xaa₁₀はAsp、Glu、Gly、Leu、Lys、Pro、またはSerであり；
 Xaa₁₁はGlu、His、Ile、Leu、Lys、Ser、Trp、またはValであり；および
 Xaa₁₂はAla、Asn、His、Ile、Met、Phe、Pro、またはSerである
 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部
 分を提供する。

【0017】

本発明はまた、

Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Cys (配列番号：133)、
 式中、

Xaa₁はGln、Glu、Phe、またはMetであり；
 Xaa₂はAsp、Pro、またはThrであり；
 Xaa₃はIle、Ser、またはTrpであり；
 Xaa₄はHis、Met、PheまたはProであり；
 Xaa₅はAsn、Leu、またはThrであり；
 Xaa₆はArg、Asn、His、またはThrであり；
 Xaa₇はArg、Met、Phe、またはTyrであり；および
 Xaa₈はAsp、Gly、Phe、またはTrpである
 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部
 分を提供する。

【0018】

別の態様では、本発明は、

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Cys-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa
₁₄ (配列番号：134)、
 式中、

Xaa₁はArg、Phe、またはTyrであり；
 Xaa₂はArg、Leu、Ser、またはTrpであり；
 Xaa₃はAsn、Asp、Phe、またはTyrであり；
 Xaa₄はGln、Glu、Phe、またはMetであり；
 Xaa₅はAsp、Pro、またはThrであり；
 Xaa₆はIle、Ser、またはTrpであり；
 Xaa₇はHis、Met、PheまたはProであり；
 Xaa₈はAsn、Leu、またはThrであり；
 Xaa₉はArg、Asn、His、またはThrであり；
 Xaa₁₀はArg、Met、Phe、またはTyrであり；
 Xaa₁₁はAsp、Gly、Phe、またはTrpであり；
 Xaa₁₂はAla、Asn、またはAspであり；
 Xaa₁₃はArg、Phe、Pro、またはTyrであり；および
 Xaa₁₄はArg、His、Phe、またはSerである
 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部
 分を提供する。

【0019】

さらに別の態様では、本発明は、

10

20

30

40

50

Gly-Ser-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Cys-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Ala-Pro (配列番号 : 135)、
式中、

Xaa₁はArg、Phe、またはTyrであり；

Xaa₂はArg、Leu、Ser、またはTrpであり；

Xaa₃はAsn、Asp、Phe、またはTyrであり；

Xaa₄はGln、Glu、Phe、またはMetであり；

Xaa₅はAsp、Pro、またはThrであり；

Xaa₆はIle、Ser、またはTrpであり；

Xaa₇はHis、Met、PheまたはProであり；

10

Xaa₈はAsn、Leu、またはThrであり；

Xaa₉はArg、Asn、His、またはThrであり；

Xaa₁₀はArg、Met、Phe、またはTyrであり；

Xaa₁₁はAsp、Gly、Phe、またはTrpであり；

Xaa₁₂はAla、Asn、またはAspであり；

Xaa₁₃はArg、Phe、Pro、またはTyrであり；および

Xaa₁₄はArg、His、Phe、またはSerである

の amino 酸配列を含むポリペプチドを含有してなる天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

【 0 0 2 0 】

20

本発明はまた、

Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Cys (配列番号 : 4)、
式中、

Xaa₁はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₂はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₃はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₄はAla、Arg、Asn、Asp、Ile、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；

30

Xaa₅はAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、またはTyrであり；

Xaa₆はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、またはTyrであり；

Xaa₇はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、またはTrpであり；

Xaa₈はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、またはValであり；

Xaa₉はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₁₀はAla、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValである

40

の amino 酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

【 0 0 2 1 】

別の態様では、本発明は、

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Cys-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆ (配列番号 : 5)、
式中、

Xaa₁はAla、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyrであり；

Xaa₂はAla、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Phe、Pro、Ser、またはTrpであり；

Xaa₃はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、また

50

はValであり；

Xaa₄はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₅はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₆はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₇はAla、Arg、Asn、Asp、Ile、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；

Xaa₈はAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、またはTyrであり；

Xaa₉はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、またはTyrであり；

10

Xaa₁₀はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、またはTrpであり；

Xaa₁₁はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、またはValであり；

Xaa₁₂はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₁₃はAla、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyrであり、またはVal；

Xaa₁₄はAla、Arg、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trpであり、またはTyr；

20

Xaa₁₅はAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trpであり、またはTyrであり；および

Xaa₁₆はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであるのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する天然には存在しないアルブミン結合部分を提供する。

【 0 0 2 2 】

配列番号：5の構造を有する特に好ましい態様は、

(A) Xaa₁-Arg-Xaa₂-Cys-Xaa₃-Thr-Xaa₄-Xaa₅-Pro-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Cys-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃(配列番号：270)、

式中、

30

Xaa₁はAsn、Leu、またはPhe、好ましくはLeuであり；

Xaa₂はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₃はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₄はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₅はPhe、Trp、またはTyr、好ましくはTrpであり；

Xaa₆はHisまたはPhe、好ましくはPheであり；

Xaa₇はAsp、Glu、またはThrであり；

40

Xaa₈はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、またはValであり；

Xaa₉はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyrであり、またはVal；

Xaa₁₀はAla、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyrであり、またはVal；

Xaa₁₁はProまたはSerであり；

Xaa₁₂はAsnまたはProであり；および

Xaa₁₃はAsnまたはProであり；または

(B) Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Ile-Thr-Xaa₄-Pro-Phe-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Cys-Xaa₁₀-

50

Asn-Xaa₁₁(配列番号：271)、
式中、

Xaa₁はAla、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyrであり；

Xaa₂はAla、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Phe、Pro、Ser、またはTrpであり；

Xaa₃はGlu、Leu、またはMet、好ましくはMetであり；

Xaa₄はTrpまたはTyr、好ましくはTrpであり；

Xaa₅はGln、Glu、またはLysであり；

Xaa₆はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、またはTrpであり；

Xaa₇はMet、Pro、またはSer、好ましくはProであり；

Xaa₈はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyrであり、またはValであり；

Xaa₉はHisまたはPro、好ましくはProであり；

Xaa₁₀はAla、Arg、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、またはTyrであり；および

Xaa₁₁はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrである
のアミノ酸配列(A)または(B)を含むポリペプチドを含む上記配列番号：5の構造を
有する。

【0023】

さらに別の態様では、本発明は、

Ala-Glu-Gly-Thr-Gly-Xaa₀-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-
Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Cys-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Pro-Glu(配列番号：6)、

式中、

Xaa₀はAlaまたはAspであり；

Xaa₁はAla、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyrであり；

Xaa₂はAla、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Phe、Pro、Ser、またはTrpであり；

Xaa₃はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₄はAla、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₅はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₆はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₇はAla、Arg、Asn、Asp、Ile、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；

Xaa₈はAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、またはTyrであり；

Xaa₉はAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、またはTyrであり；

Xaa₁₀はAla、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、またはTrpであり；

Xaa₁₁はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、またはValであり；

Xaa₁₂はAla、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₁₃はAla、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValであり；

Xaa₁₄はAla、Arg、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、またはTyrであり；

Xaa₁₅はAla、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；

Xaa₁₆はAla、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、またはTyrであり；および
Xaa₁₇はAlaまたはAspである

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有するアルブミン結合部分を提供する。

【 0 0 2 4 】

さらなる態様では、本発明は、

P T V V Q P K F H A F T H E D L L W I F (配列番号 : 136)、

L K S Q M V H A L P A A S L H D Q H E L (配列番号 : 137)、および

S Q V Q G T P D L Q F T V R D F I Y M F (配列番号 : 138)

からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む直鎖ポリペプチドを含有する天然には存在しない血清アルブミン結合部分を提供する。

【 0 0 2 5 】

本発明の好ましい血清アルブミン結合部分は、以下のアミノ酸配列 (20個の一般的なアミノ酸について標準的な一文字表記を用いて示される)

C T I F L C (配列番号 : 7)、

C E G K D M I D W V Y C (配列番号 : 8)、

C D R I A W Y P Q H L C (配列番号 : 9)、

C D R I A W Y P Q H A C (配列番号 : 72)、

C D R I A W Y P Q A L C (配列番号 : 73)、

C D R I A W Y P A H L C (配列番号 : 74)、

C D R I A W Y A Q H L C (配列番号 : 75)、

C D R I A W A P Q H L C (配列番号 : 76)、

C D R I A A Y P Q H L C (配列番号 : 77)、

C D R A A W Y P Q H L C (配列番号 : 78)、

C D A I A W Y P Q H L C (配列番号 : 79)、

C A R I A W Y P Q H L C (配列番号 : 80)、

C E P W M L R F G C (配列番号 : 10)、

C D Q W F C (配列番号 : 11)、

C N N A L C (配列番号 : 12)、

C D H F F C (配列番号 : 13)、

C W H F S C (配列番号 : 14)、

C V T R W A N R D Q Q C (配列番号 : 15)、

C V T D W A N R H Q H C (配列番号 : 16)、

C V K D W A N R R R G C (配列番号 : 17)、

C K F S W I R S P A F C (配列番号 : 18)、

C Q T T W P F T M M Q C (配列番号 : 139)、

C V T M W P F E Q I F C (配列番号 : 140)、

C F T Y Y P F T T F S C (配列番号 : 141)、

C W T K F P F D L V W C (配列番号 : 142)、

C V S Y W P H F V P V C (配列番号 : 143)、

C Y I S F P F D Q M Y C (配列番号 : 144)、

C S V Q Y P F E V V V C (配列番号 : 145)、

C W T Q Y P F D H S T C (配列番号 : 146)、

C I T W P F K R P W P C (配列番号 : 147)、

C I S W P F E M P F H C (配列番号 : 148)、

C I T W P F K R P W P C (配列番号 : 149)、

C I T Y P F H E M F P C (配列番号 : 150)、

C I T W P F Q T S Y P C (配列番号 : 151)、

C K F S W I R S P A F C (配列番号 : 152)、

C W I V D E D G T K W C (配列番号 : 153)、

C D S A Y W Q E I P A C (配列番号 : 154)、

C L W D P M L C (配列番号 : 155)、

C E H P Y W T E V D K C (配列番号 : 156)、

C D T P Y W R D L W Q C (配列番号 : 157)、

10

20

30

40

50

C Q L P Y M S T P E F C (配列番号 : 158)、
 C G R G F D K E S I Y C (配列番号 : 159)、
 C V T Y I G T W E T V C (配列番号 : 160)、
 C T D T N W S W M F D C (配列番号 : 161)、
 C T L E I G T W F V F C (配列番号 : 162)、
 C K I A L F Q H F E V C (配列番号 : 163)、
 C I K L Y G L G H M Y C (配列番号 : 164)、
 C E M Q S I I P W W E C (配列番号 : 165)、
 C V E K Y Y W D V L I C (配列番号 : 166)、
 C P H G R Y S M F P C (配列番号 : 167)、 10
 C N V R W T D T P Y W C (配列番号 : 168)、
 C T Y D P I A D L L F C (配列番号 : 169)、
 C M D W P N H R D C (配列番号 : 170)、
 C F P I H L T M F C (配列番号 : 171)、
 C Q T S F T N Y W C (配列番号 : 172)、
 C M E F G P D D C (配列番号 : 173)、
 C S W D P I F C (配列番号 : 174)、
 C A W D P L V C (配列番号 : 175)、
 C H I Y D W F C (配列番号 : 176)、
 C L W D P M I C (配列番号 : 177)、 20
 C S P P G K T C (配列番号 : 178)、
 C T F W Q Y W C (配列番号 : 179)、
 C M F E L P F C (配列番号 : 180)、
 C F S K P D Q C (配列番号 : 181)、
 C F Y Q W W G C (配列番号 : 182)、
 C T W D P I F C (配列番号 : 183)、
 C W L Y D C (配列番号 : 184)、
 C D K Y G C (配列番号 : 185)、および
 C S K D T C (配列番号 : 186)
 を含む天然には存在しないポリペプチドを含む。 30

【 0 0 2 6 】

本発明のさらに好ましい態様は、

A D F C E G K D M I D W V Y C R L Y (配列番号 : 58)、
 F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 59)、
 F W F C D R I A W Y P Q H L C E F A (配列番号 : 81)、
 F W F C D R I A W Y P Q H L C E A L (配列番号 : 82)、
 F W F C D R I A W Y P Q H L C A F L (配列番号 : 83)、
 F W F C D R I A W Y P Q H A C E F L (配列番号 : 84)、
 F W F C D R I A W Y P Q A L C E F L (配列番号 : 85)、
 F W F C D R I A W Y P A H L C E F L (配列番号 : 86)、 40
 F W F C D R I A W Y A Q H L C E F L (配列番号 : 87)、
 F W F C D R I A W A P Q H L C E F L (配列番号 : 88)、
 F W F C D R I A A Y P Q H L C E F L (配列番号 : 89)、
 F W F C D R A A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 90)、
 F W F C D A I A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 91)、
 F W F C A R I A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 92)、
 F W A C D R I A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 93)、
 F A F C D R I A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 94)、
 A W F C D R I A W Y P Q H L C E F L (配列番号 : 95)、
 D W D C V T R W A N R D Q Q C W G P (配列番号 : 60)、 50

- D W D C V T R W A N R D Q Q C W A L (配列番号 : 61)、
- D W D C V T D W A N R H Q H C W A L (配列番号 : 62)、
- D W Q C V K D W A N R R R G C M A D (配列番号 : 63)、
- R N M C K F S W I R S P A F C A R A (配列番号 : 64)、
- L R D C Q T T W P F M M Q C P N N (配列番号 : 187)、
- N R E C V T M W P F E Q I F C P W P (配列番号 : 188)、
- L R S C F T Y Y P F T T F S C S P A (配列番号 : 189)、
- L S H C W T K F P F D L V W C D S P (配列番号 : 190)、
- L R M C V S Y W P H F V P V C E N P (配列番号 : 191)、
- L R D C Y I S F P F D Q M Y C S H F (配列番号 : 192)、
- F R H C S V Q Y P F E V V V C P A N (配列番号 : 193)、
- L R N C W T Q Y P F D H S T C S P N (配列番号 : 194)、
- D S M C I T W P F K R P W P C A N (配列番号 : 195)、
- A F M C I S W P F E M P F H C S P D (配列番号 : 196)、
- D S M C I T W P F K R P W P C A N P (配列番号 : 197)
- W D L C I T Y P F H E M F P C E D G (配列番号 : 198)、
- G G E C I T W P F Q T S Y P C T N G (配列番号 : 199)、
- R N M C K F S W I R S P A F C A R A (配列番号 : 200)、
- F S L C W I V D E D G T K W C L P (配列番号 : 201)、
- R W F C D S A Y W Q E I P A C A R D (配列番号 : 202)、
- R W Y C L W D P M L C M S D (配列番号 : 203)、
- A W Y C E H P Y W T E V D K C H S S (配列番号 : 204)、
- S D F C D T P Y W R D L W Q C N S P (配列番号 : 205)、
- L P W C Q L P Y M S T P E F C I R P (配列番号 : 206)、
- Y H V C G R G F D K E S I Y C K F L (配列番号 : 207)、
- S F C V T Y I G T W E T V C K R S (配列番号 : 208)、
- N D G C T D T N W S W M F D C P P L (配列番号 : 209)、
- W R D C T L E I G T W F V F C K G S (配列番号 : 210)、
- S P Y C K I A L F Q H F E V C A A D (配列番号 : 211)、
- R H W C I K L Y G L G H M Y C N R S (配列番号 : 212)、
- D H A C E M Q S I I P W W E C Y P H (配列番号 : 213)、
- P R S C V E K Y Y W D V L I C G F F (配列番号 : 214)、
- F H T C P H G R Y S M F P C D Y W (配列番号 : 215)、
- H G W C N V R W T D T P Y W C A F S (配列番号 : 216)、
- Y R V C T Y D P I A D L L F C P F N (配列番号 : 217)、
- R S F C M D W P N H R D C D Y S (配列番号 : 218)、
- F W D C F P I H L T M F C D R F (配列番号 : 219)、
- Y L Y C Q T S F T N Y W C A F H (配列番号 : 220)、
- G L Y C M E F G P D D C A W H (配列番号 : 221)、
- K N F C S W D P I F C G I H (配列番号 : 222)、
- K W Y C A W D P L V C E I F (配列番号 : 223)、
- W T T C H I Y D W F C S S S (配列番号 : 224)、
- Q W Y C L W D P M I C G L I (配列番号 : 225)、
- Q T N C S P P G K T C D K N (配列番号 : 226)、
- A I C T F W Q Y W C L E P (配列番号 : 227)、
- F E W C M F E L P F C S W P (配列番号 : 228)、
- Q E G C F S K P D Q C K V M (配列番号 : 229)、
- L E Y C F Y Q W W G C P H A (配列番号 : 230)、
- Y Q F C T W D P I F C G W H (配列番号 : 231)、
- L W D C W L Y D C E G N (配列番号 : 232)、

10

20

30

40

50

V H S C D K Y G C V N A (配列番号 : 233)、
 F E H C S K D T C S G N (配列番号 : 234)、
 V A W C T I F L C L D V (配列番号 : 239)、
 F K I C D Q W F C L M P (配列番号 : 240)、
 H V G C N N A L C M Q Y (配列番号 : 241)、
 W K V C D H F F C L S P (配列番号 : 242)、
 N H G C W H F S C I W D (配列番号 : 243)、
 F R N C E P W M L R F G C N P R (配列番号 : 244)、
 A D F C E G K D M I D W V Y C R L Y (配列番号 : 245)、
 F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D (配列番号 : 246)、
 D W D C V T R W A N R D Q Q C W G P (配列番号 : 247)、
 D W D C V T R W A N R D Q Q C W A L (配列番号 : 248)、
 D W D C V T D W A N R H Q H C W A L (配列番号 : 249)、
 D W Q C V K D W A N R R R G C M A D (配列番号 : 250)、
 R N M C K F S W I R S P A F C A R A D P (配列番号 : 251)

10

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む血清アルブミン結合ポリペプチドである。

【 0 0 2 7 】

特に好ましい態様は、

A E G T G D A D F C E G K D M I D W V Y C R L Y D P E (配列番号 : 65)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 66)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L A P E (配列番号 : 96)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E F A D P E (配列番号 : 97)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E A L D P E (配列番号 : 98)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C A F L D P E (配列番号 : 99)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H A C E F L D P E (配列番号 : 100)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q A L C E F L D P E (配列番号 : 101)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y P A H L C E F L D P E (配列番号 : 102)、
 A E G T G D F W F C D R I A W Y A Q H L C E F L D P E (配列番号 : 103)、
 A E G T G D F W F C D R I A W A P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 104)、
 A E G T G D F W F C D R I A A Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 105)、
 A E G T G D F W F C D R A A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 106)、
 A E G T G D F W F C D A I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 107)、
 A E G T G D F W F C A R I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 108)、
 A E G T G D F W A C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 109)、
 A E G T G D F A F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 110)、
 A E G T G D A W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 111)、
 A E G T G A F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E (配列番号 : 112)、
 A E G T G D D W D C V T R W A N R D Q Q C W G P D P E (配列番号 : 67)、
 A E G T G D D W D C V T R W A N R D Q Q C W A L D P E (配列番号 : 68)、
 A E G T G D D W D C V T D W A N R H Q H C W A L D P E (配列番号 : 69)、
 A E G T G D D W Q C V K D W A N R R R G C M A D D P E (配列番号 : 70)、および
 A E G T G D R N M C K F S W I R S P A F C A R A D P E (配列番号 : 71)

20

30

40

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を含む血清アルブミン結合ポリペプチドである。

【 0 0 2 8 】

特に好ましい態様は、式：

Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂ (配列番号 : 19)

を有する血清アルブミン結合ペプチドであり、このペプチドはDX-236と呼ばれ、ここでAcはN-末端アセチルキャッピング基を示し、-NH₂はC-末端アミドキャッピング基を示す。DX-236は、哺乳動物血清アルブミンに結合し、適切な条件下で「パン哺乳動物」血清アルブ

50

ミン結合部分として有用である。さらなる好ましい態様は、

Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L A P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E F A D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C E A L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H L C A F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q H A C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P Q A L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y P A H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W Y A Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A W A P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R I A A Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D R A A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C D A I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W F C A R I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F W A C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D F A F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 Ac-A E G T G D A W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、 および
 Ac-A E G T G A F W F C D R I A W Y P Q H L C E F L D P E G G G K-NH₂、
 (それぞれ、配列番号： 113~129)

10

【 0 0 2 9 】

20

さらなる態様好ましい態様は、以下：

Ac-G D L R D C Q T T W P F T M M Q C P N N D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D N R E C V T M W P F E Q I F C P W P D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D L R S C F T Y Y P F T T F S C S P A D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D D S M C I T W P F K R P W P C A N D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D R N M C K F S W I R S P A F C A R A D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D F S L C W I V D E D G T K W C L P D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D R W F C D S A Y W Q E I P A C A R D D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D S D F C D T P Y W R D L W Q C N S P D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D S F C V T Y I G T W E T V C K R S D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D N D G C T D T N W S W M F D C P P L D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D S P Y C K I A L F Q H F E V C A A D D P G G G K-NH₂、
 Ac-G D P R S C V E K Y Y W D V L I C G F F D P G G G K-NH₂、
 Ac-G S R S F C M D W P N H R D C D Y S A P G G G K-NH₂、
 Ac-A G K W Y C A W D P L V C E I F G T G G G K-NH₂、
 Ac-A G W T T C H I Y D W F C S S S G T G G G K-NH₂、
 Ac-A G L E Y C F Y Q W W G C P H A G T G G G K-NH₂、
 Ac-A G Y Q F C T W D P I F C G W H G T G G G K-NH₂、 および
 Ac-G S L W D C W L Y D C E G N A P G G G K-NH₂、
 (それぞれ、配列番号： 252~269)

30

40

を含む。

【 0 0 3 0 】

本発明の別の特に好ましい態様は、式：

Ac-A E G T G D R N M C K F S W I R S P A F C A R A D P E-X-K-NH₂ (配列番号：20)
 を有する血清アルブミン結合部分であり、この結合部分は、命名されたペプチド化合物DX
 -321であり、AcはN-末端アセチルキAPPING基を示し、Xは6-アミノヘキサ酸基を示
 し、-NH₂はC-末端アミドキAPPING基を示す。DX-321は、適切な条件下で他の種類の血
 清アルブミンを上回って優先的にヒト血清アルブミン (HSA) に結合する。DX-321は、HSA
 を特異的に検出または単離するため、またはHSAに別の分子を特異的に連結するための試
 薬として有用である。

50

【 0 0 3 1 】

本発明の血清アルブミン結合部分は、本明細書中に記載される血清アルブミン結合ポリペプチド、本明細書中に記載される血清アルブミン結合ポリペプチドを提示するファージまたは他の複製可能な遺伝子パッケージ、および他の分子にさらに連結（共有結合または非共有結合）された本明細書中に記載される血清アルブミン結合ポリペプチドを含有する分子を含みうる。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、溶液中の血清アルブミンを検出または単離するために血清アルブミン結合部分の使用法を提供する。かかる方法に関して、本発明の血清アルブミンは、マルチウェルアッセイプレートのウェルの表面に吸着される等の固相表面に固定化されること、
10 N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）セファロースクロマトグラフィー粒子にコンジュゲートされるか、または例えば、目的の血清アルブミンを含有する全血またはその画分の溶液中に遊離非コンジュゲート部分として懸濁または分散される等の種々の様式で使用され得るが、これらに限定されない。

【 0 0 3 3 】

好ましい態様では、本発明は、固相表面に固定化された本発明の血清アルブミン結合部分を提供する工程；固定化された結合部分と溶液血清アルブミンを含有する溶液とを接触させ、溶液中の血清アルブミンに、固定化された結合部分との結合複合体を形成させる工程；固定化された結合部分から溶液の非結合部分を分離する工程；および任意に、固定化された結合部分から本発明の血清アルブミン結合部分を溶出または分離する工程を含む、
20 溶液から血清アルブミンを単離する方法を提供する。好ましくは、固定化された結合部分は、3mMリン酸バッファー、pH6.2等の比較的穏やかな酸性pHを有する緩衝液の存在下で血清アルブミンに結合する。本発明によれば、結合血清アルブミンは、次いで固定化ペプチド結合部分をpH2等の強い酸性pH、またはpH9等の塩基性pHを有する緩衝液を固定化されたペプチド結合部分に接触させるか、それで洗浄することにより固定化された結合部分から精製された形態で放出され得る。

【 0 0 3 4 】

本発明の血清アルブミン結合部分はまた、溶液中の血清アルブミン分子を標識または固定するために使用され得る。好ましい態様では、血清アルブミンは、検出可能な標識またはタグ分子に連結された血清アルブミン結合部分を提供する工程；結合部分に溶液中で血清アルブミン分子との複合体を形成させる工程；および連結した標識またはタグの存在を検出する工程を含んで溶液中で検出される。好ましくは、かかる検出アッセイは、サンプル中の血清アルブミンの定量的測定のために十分な感度であり、すなわち、検出されるタグまたは標識の強度は溶液中の結合した血清アルブミンの量に正比例する。
30

【 0 0 3 5 】

本発明の別の方法では、血清アルブミン結合部分は、ブロックされた血管、損傷した血管の出血、および内出血の診断において医用される等の個体の血液プール映像法において使用される。好ましい態様では、前記方法は、検出標識に連結された血清アルブミン結合部分を個体に投与することを含む。より好ましい態様では、標識は、磁気共鳴映像法（MRI）により検出可能であり、標識はテクネチウム（ Tc^{99} ）である。
40

【 0 0 3 6 】

さらに別の態様では、本発明は、治療用または本発明の診断用化合物を血清アルブミン結合部分に連結する工程および化合物/血清アルブミン結合部分を個体に投与する工程を含む、本発明の血清アルブミン結合部分目的の治療用または診断用化合物の血清の半減期を増大させる方法を提供する。血液中の化合物/結合部分コンジュゲートは、循環血清アルブミン分子と会合し、化合物が血清アルブミン結合部分の非存在下で投与された場合よりも長く血清中に残る。アルブミン結合部分は、コンジュゲートが使用される特定の治療または診断の必要に循環中のコンジュゲートの挙動を仕立てるために、血清アルブミンに対するその特定の親和性について選択され得る。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

さらに別の態様では、本発明は、血清アルブミン融合タンパク質を含有する溶液と本明細書中に記載される血清アルブミンとを接触させ、血清アルブミン融合タンパク質と血清アルブミン結合部分との間で複合体を形成させる工程；複合体から溶液の非結合成分を分離する工程；および、任意に、結合部分から血清アルブミン融合タンパク質を排除または分離する工程を含む、血清アルブミンが別のポリペプチドにインフレームで融合された血清アルブミン融合タンパク質を単離する方法を提供する。特に好ましい態様では、血清アルブミン融合タンパク質は別のポリペプチドに融合されたHSAを含有し、血清アルブミン結合部分は、DX-236（配列番号：19）またはそのアラニンバリエーション（例えば、配列番号：113～129参照）を含有する。

【0038】

10

さらなる態様では、本明細書中に開示されるアルブミン結合ポリペプチドは、個体における血流を評価するために使用され得る。この方法では、本発明の検出可能に標識されたHSA結合ポリペプチドが個体に投与され、標識ポリペプチドは、血清アルブミンに結合し、個体の循環系を通じて血清タンパク質の循環がモニターされ、追跡され得る。血流を評価するためのかかる方法は、例えば、バルーン血管形成術、プラーク除去またはバイパス手術の成功を測定することにおいて、または虚血の後の再灌流をモニターするために、または処置した血管を通して循環するか、または以前には拒否された血液循環を部位または器官に到達させる血液の能力をアッセイすることが重要である任意の場合に特に有用である。

【0039】

20

本発明のこれらおよび他の局面は、以下により詳細に記載されるであろう。

【0040】

発明の詳細な説明

本発明は、1つ以上の哺乳動物血清アルブミンタンパク質および血清アルブミン様ポリペプチド、すなわち全長血清アルブミンタンパク質の結合部位を含むアルブミン断片に特異的に結合するポリペプチドを提供する。本発明のポリペプチドは、ジスルフィド束縛(constrained)環状構造を含む非天然の多様なポリペプチドの集団を提示する組み換えフィラメントファージのライブラリーをスクリーニングすることにより最初に単離された。

【0041】

本発明の血清アルブミン結合ポリペプチドは、選択された条件下で、機能的な血清アルブミン結合部位を所有しない他のポリペプチドを除外して、血清アルブミンまたはその断片に特異的に結合する能力により同定され得る。

30

【0042】

本発明のペプチド化合物は、全血、血液画分、および血清アルブミンを含む他の溶液などの溶液に存在する1つ以上の哺乳動物種の血清アルブミンを検出または同定する方法に有用である。

【0043】

本発明がより十分に理解されるために、以下の用語を定義する。

【0044】

以下のセクションにおいて、「組み換え体」という用語は、非天然に変更されたかまたは操作された核酸、外因性核酸を用いてトランスフェクトされた宿主細胞、または単離された核酸、特にDNAの操作、および宿主細胞の形質転換を介して非天然に発現されるポリペプチドを記載するために使用される。組み換え体は、遺伝子工学技術を用いてインビトロで構築された核酸分子を特に包含する用語であり、分子、構築物、ベクター、細胞、ペプチド、またはポリヌクレオチドを記載するための形容詞としての「組み換え」という用語の使用は、特に天然の分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを排除する。

40

【0045】

「バクテリオファージ」または単に「ファージ」という用語は、多数の同じかまたは異なるタンパク質分子の凝集体を含有する核酸コアと保護殻とを含む細菌ウイルスとして定

50

義される。他の記載がなければ、「バクテリオファージ」および「ファージ」という用語はまた、「ファージミド」、すなわちそのゲノムが、ヘルパーファージと宿主の同時感染によって削除され得るプラスミドを含むバクテリオファージを包含する。ファージディスプレイ技術を介する本発明の代表的な血清アルブミン結合ペプチドの単離に有用な特定のファージは、組み換え1本鎖DNA繊維状M13ファージである。

【0046】

「結合」という用語は、結合部分が所定の標的を認識し、可逆的に結合することの標準技術による決定を言う。血清アルブミン結合を検出するかまたは測定するためのかかる標準技術としては、ELISA、平衡透析、ゲル濾過、および結合により生じる分光変化のモニタリング（例えば、直接の結合測定かまたは別のバインダーとの競合アッセイのいずれかによる蛍光異方性(anisotropy)を用いる）が挙げられる。

10

【0047】

本明細書で使用される場合、「結合ポリペプチド」という用語は、別の分子、ペプチド、ペプチド模倣体、または形質転換体との結合複合体を形成しうる任意の分子、ペプチドまたはペプチド模倣体のことを言う。「血清アルブミン結合部分」、「血清アルブミンバインダー」、および「血清アルブミンリガンド」という用語は、より広い用語であり、交換可能に使用され、本明細書に記載される血清アルブミン結合ポリペプチドを含有する分子、結合ポリペプチドを示すファージ、または結合ポリペプチドを発現する形質転換細胞のことを言う。「血清アルブミン結合部分」は、血清アルブミンまたは血清アルブミン様ペプチドと結合し、複合体を形成する。「血清アルブミン結合部分」はまた、血清アルブミンに特異的に結合する本明細書に記載された結合ポリペプチドの断片、血清アルブミンに結合する能力を残しながらより大きなポリペプチド中にポリペプチド（またはそのアルブミン結合断片）を取り込むことによって作製されたかかる結合ポリペプチドの改変体、置換が血清アルブミンに特異的に結合する能力を排除しない限り任意の位置での保存的アミノ酸置換により作製された結合ポリペプチドの誘導体を包含する。本発明の血清アルブミン結合部分の特定の例は、上記アミノ酸配列を含有するポリペプチド（例えば、配列番号：1~20）およびかかる血清アルブミン結合ポリペプチドを示すファージである。

20

【0048】

「特異性」という用語は、ある標的に対して別のものを超えてより高い結合親和性を有する結合部分のことを言う。「血清アルブミン特異性」という用語は、他のタンパク質、例えば他の血清タンパク質（例えば、フィブリノゲン）またはオボアルブミンと比較して血清アルブミンに対してより高い親和性を有する結合部分のことを言う。本明細書に記載される好ましい血清アルブミン結合部分は、他の血清タンパク質（例えば、フィブリノゲン、免疫グロブリン）よりも血清アルブミンに対して少なくとも10倍高い親和性を有する。

30

【0049】

「ポリペプチド」という用語は、アミド結合で連結された2つ以上のアミノ酸残基を含有するポリマーのことを言い、「ペプチド」という用語は、比較的短いポリペプチド、例えば30より少ないアミノ酸を有するもののことを言うために本明細書で使用される。「ポリペプチド」という用語はまた、「タンパク質」という用語を包含する。

40

【0050】

「ジスルフィド安定化環状ポリペプチド」、「ジスルフィド束縛環状ポリペプチド」、「環状ポリペプチド」、または単に「ペプチドループ」は、その長さに沿ったシステイン残基の少なくとも1つの空間対を有するポリペプチドのことを言うために交換可能に使用され、ここでシステイン対がポリペプチドの二次構造が環状ペプチド構造を含むように生理学的pHで安定なシステイン-システインジスルフィド結合形成することができる。本発明の最も好ましい態様は、6、10、または12アミノ酸長の環状ペプチドを含むかかるジスルフィド束縛環状またはループ構造を有するペプチドである（2つのジスルフィド形成システイン残基を含む）。

【0051】

50

「血清アルブミン様ペプチド」は、少なくとも血清アルブミンタンパク質の断片を含有するポリペプチドであり、断片は本発明の血清アルブミン結合部分により認識および結合され得る。したがって、「血清アルブミン様ポリペプチド」は、任意の血清アルブミン、その断片、その変異型、および本発明の血清アルブミン結合部分により結合される組み換え、非天然、または天然であってよい任意の他のポリペプチドを含む広い用語である。さらに、「血清アルブミン様ポリペプチド」は、血清アルブミンまたはその断片が別のポリペプチドとインフレイムで融合される血清アルブミン融合タンパク質を含む。血清アルブミン結合のスクリーニングまたは本発明の血清アルブミン結合部分の使用に関して、血清アルブミンまたは血清アルブミン様ポリペプチドは、しばしば「血清アルブミン標的」と呼ばれる。

10

【0052】

「検出可能に標識された」という用語は、本発明の血清アルブミン結合部分を化合物、または染料（フルオレセインなど）；放射性核種（ ^{131}I またはテクネチウム（ Tc^{99} ）含有化合物）；酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼなど）；または検出可能な金属（常磁性イオンなど）などの「標識」に連結し、ここで標識はその後、いくつかの適切な手段により検出され得るシグナルを提供すると記載するように理解される。「検出可能に標識された」という用語はまた、検出可能な放射性原子（ ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{14}C など）を同一元素の非放射性同位体の代わりに分子に取り込むことを含む。「検出可能に標識された」は、また結合パートナーの対の1つに連結または結合される任意の分子のことを言い、それにより結合パートナーが複合体を形成する場合、連結された（すなわち標識された）分子の検出がなされる。かかる結合パートナーの対の多くが当該分野で公知の標準の検出システムで使用され、かかる結合パートナーとしては、限定されないが、ビオチンおよびストレプトアビジン（そのいずれかがまた、HRPまたはガラクトシダーゼなどの酵素にコンジュゲートされ、順番に反応に使用され、検出可能なシグナルを生じうる）、抗体およびエピトープ結合パートナー（検出対象の分子上に存在するエピトープを含む）、ならびに酵素および基質結合パートナーが挙げられる。

20

【0053】

本発明に関して、本明細書に開示される血清アルブミン結合部分は、診断試薬、治療用ポリペプチドまたは他の薬物などの他の化合物に、例えば、かかる化合物に血清アルブミンに対する改善された親和性を与えるために有利に連結され得る。これに関連して、「連結された」という用語は、目的の化合物を本発明の血清アルブミン結合部分に付着またはコンジュゲートさせる任意の適切な手段を包含する広い用語である。多くの適切な連結手段が当該分野で公知であり、限定されないが、共有結合コンジュゲート、ヘテロニ官能性またはホモニ官能性架橋剤を介する化学的架橋、融合ポリペプチドの発現のために共にインフレイムで融合パートナー（すなわち、アルブミン結合部分および目的のポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを連結することによる融合タンパク質の設計、ビオチン標識などの親和性連結（すなわち、ストレプトアビジン保有基質への連結のため）、イオン性連結、または2つ以上の別々の実体が結合または凝集され単一の実体または複合体を形成する任意の他の手段が挙げられる。

30

【0054】

血清アルブミン結合ペプチドに使用されるファージディスプレイライブラリー

40

本発明の特異的な血清アルブミン結合ポリペプチドは、最初にファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより単離された。すなわち、組み換えバクリオファージの集団を形質転換し、その表面上に外因性環状ペプチドを発現させた。血清アルブミンなどの特定の標的に対する新しいポリペプチド結合部分を単離するために、例えばファージディスプレイ技術を用いる大きいペプチドライブラリーのスクリーニングが特に有利であり、非常に多数（例えば、 5×10^9 ）の潜在的なバインダーが試験され得、満足できるバインダーが短期間で単離され得る。

【0055】

組み換えファージまたは他の遺伝子パッケージ（細菌、酵母、他の宿主細胞）の表面上

50

に多様なヘテロロガスなペプチドを示すディスプレイライブラリーは、当該分野で公知の種々の方法で調製され得る。例えば、Kayら、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996) および U.S. 5,223,409 (Ladnerら) (両方が参照により本明細書に取り込まれる) を参照。

【0056】

本発明の特異的なペプチドの単離において、6個の異なるファージライブラリーがスクリーニングされ、各々、M13ファージの表面上に短く多様な外因性ペプチドを示した。5個のライブラリーのペプチドディスプレイは、それぞれシステイン残基に隣接する4、6、7、8または10アミノ酸のセグメントを有する親ドメインに基づいた。システインの対は、安定なジスルフィド結合を形成し、環状ディスプレイ(display)ペプチドを与えると考えられている。環状ペプチドは、ファージの表面上のプロテインIIIのアミノ末端にディスプレイされる。ライブラリーは、TN6/6、TN8/9、TN9/4、TN10/9およびTN12/1と呼ばれた。20アミノ酸直線ディスプレイを有するファージライブラリーがまた、スクリーニングされた。このライブラリーは、Lin20と呼ばれた。

【0057】

本発明のペプチド結合部分を得るために使用したTN6/6ライブラリーは、12個のアミノ酸の様々な鑄型に含まれる単一の環状ペプチドを示すために構築された。TN6/6ライブラリーは、Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Cys₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂ (配列番号: 21)、式中、鑄型のアミノ酸配列における各変更可能なアミノ酸の位置は、下付きの整数により示される、の鑄型配列を使用した。鑄型中の各変更可能なアミノ酸の位置(Xaa)は、独立して変更され、以下の置換を可能にした。残基Xaa₁およびXaa₁₂を以下の14アミノ酸を含むように変更した: Ala、Asp、Phe、Gly、His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpおよびTyr; ならびに残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₁₀およびXaa₁₁を独立して、システイン(Cys)を除く任意の一般のaアミノ酸を含むように変更した。潜在的な設計配列の数は、 3.3×10^{12} である; 2.0×10^8 個の独立した形質転換体がライブラリーに含まれた。

【0058】

TN8/9ライブラリーを、14アミノ酸鑄型に含まれる単一のマイクロプロテイン結合ループを提示するように構築した。TN8/9ライブラリーは、Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Cys-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄ (配列番号: 235)の鑄型配列を使用した。鑄型中の1、2、3、5、6、7、8、9、10、12、13および14位のアミノ酸は、システイン(Cys)を除く任意のアミノ酸に変更することが可能であった。

【0059】

TN9/4ライブラリーが、15アミノ酸鑄型に含まれる単一のマイクロプロテイン結合ループを示すように構築された。TN9/4ライブラリーは、鑄型配列Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Cys-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅ (配列番号: 236)を使用した。鑄型中の1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、13、14および15位のアミノ酸をシステイン(Cys)を除く任意のアミノ酸に変更することが可能であった。

【0060】

TN10/9ライブラリーが、16アミノ酸の様々な鑄型に含まれる単一の環状ペプチドを示すように構築された。TN10/9ライブラリーは、鑄型配列Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Cys₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆ (配列番号: 22)、式中、鑄型のアミノ酸配列における各変更可能なアミノ酸の位置は、下付きの整数により示される、を使用した。各変更可能なアミノ酸の位置(Xaa)は、独立して変更し、以下の置換が可能であった。鑄型のアミノ酸の位置Xaa₁、Xaa₂、Xaa₁₅およびXaa₁₆は、独立して変更し、Asp、Phe、His、Leu、Asn、Pro、Arg、Ser、TrpおよびTyrからなる10アミノ酸の群より選ばれる各アミノ酸が可能であった; 鑄型のアミノ酸の位置Xaa₃およびXaa₁₄のアミノ酸は、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpおよびTyrからなる14アミノ酸の群より選ばれる各アミノ酸が可能であった; アミノ酸の位置Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₁およびXaa₁₂のアミノ酸(すなわち、鑄型中の4位と13位の

10

20

30

40

50

変更しないシステイン残基の間)は、独立して変更し、システイン(Cys)を除く一般のaアミノ酸のそれぞれが可能であった。潜在的な設計配列の数は、 3.0×10^{16} である；約 2.5×10^8 個の独立した形質転換体がライブラリーに含まれた。

【0061】

TN12/1ライブラリーが、18アミノ酸鑄型に含まれる単一の環状ペプチドを示すように構築された。TN12/1ライブラリーは、Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Cys₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈(配列番号：23)、式中、鑄型のアミノ酸配列における各変更可能なアミノ酸の位置は、下付きの整数により示される、を使用した。鑄型のアミノ酸の位置Xaa₁、Xaa₂、Xaa₁₇およびXaa₁₈は、独立して変更し、Ala、Asp、Phe、Gly、His、Leu、Asn、Pro、Arg、Ser、TrpおよびTyrからなる12アミノ酸の群より選ばれる各アミノ酸が可能であった；鑄型のアミノ酸の位置Xaa₃、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂、Xaa₁₃、Xaa₁₄、Xaa₁₆は、独立して、システインを除く一般のaアミノ酸のそれぞれが可能であった。

10

【0062】

Lin20ライブラリーは、20アミノ酸鑄型に単一の直鎖状ペプチドを提示するように構築された。鑄型の各位置のアミノ酸を変更し、システイン(Cys)を除く任意のアミノ酸が可能であった。

【0063】

本明細書に記載される小さい血清アルブミン結合ペプチドは、大きなペプチドを超えるいくつかの利点を提供する。第1に、結合部位当たりの質量が低減される。例えば、かかる非常に安定でありかつ低分子量のポリペプチドドメインは、抗体(約150 kDa)または単鎖抗体(約30 kDa)よりもグラム当たり非常に高い結合を示しうる。第2に、非特異的結合の可能性が、より低い表面入手性があるために低減される。第3に、小さいタンパク質またはポリペプチドは、(それらが化学的に合成可能であるために)より大きなタンパク質または抗体に対しては実行不可能である方法で末端ポリリジンセグメントなどの特有のつなぐ部位を有するように操作され得る。第4に、小さいペプチドは、ハイブリッド結合または親和力効果のいずれかを与えるために、ホモまたはヘテロマルチマーに結合され得る。

20

【0064】

前記したように、Kayら、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual(Academic Press, Inc., San Diego 1996)およびU.S.特許第5,223,409号に論じられる技術は、選択された親の鑄型に対応する潜在的なバインダーのライブラリーの調製に特に有用である。上記ライブラリーを、かかる技術に従って調製し、それらを固体表面上に固定されているかまたは溶液中に遊離されているヒト血清アルブミン(HSA)標的に対する結合ペプチドに対してスクリーニングした。

30

【0065】

血清アルブミン結合ペプチドに対するファージディスプレイライブラリーのスクリーニング

典型的なスクリーニングにおいて、ファージライブラリーは、標的、この場合HASまたはその特定の断片またはサブコンポーネントと接触させ、それに結合させる。スクリーニングプロセスにおいてバインダーおよび非バインダーの分離を促進するために、固体支持体上に標的を固定化させることがしばしば都合がよいが、最初に溶液中での標的への結合を可能にし、次いで非バインダーからバインダーを分離してもよい(例えば、以下の実施例を参照のこと)。実例として、標的の存在下にインキュベートした場合、標的結合部分を保有するファージは、例えば固体支持体上に固定化された標的と複合体を形成し、一方、非結合ファージは溶液中に残り、バッファーを用いて洗い落とされ得る。次に、結合ファージは、バッファーを比較的高い酸性または塩基性pH(例えば、pH2またはpH10)に変更すること、バッファーのイオン強度を変更すること、変性剤を添加することまたは他の公知の手段などの多数の手段により標的から遊離され得る。

40

【0066】

50

例えば、HSAは、マルチ - ウェルアッセイプレート中のウェルのプラスチック表面などの固体表面に（受動固定化により）吸収され得、次にファージディスプレイライブラリーのアリコート、固定化HASおよびファージの構造を維持する適切な条件下（例えばpH6～7）でウェルに添加した。固定化HSAを結合するペプチドループ構造を提示するライブラリー中のファージは、ウェルの表面に付着しているHSAに結合したままであり、非結合ファージは除去され得る。次に、固定化HSAに結合したファージは、比較的強い酸pH（例えばpH2）またはアルカリpH（例えばpH8～9）を有するバッファー溶液を用いて洗浄することにより溶出され得る。次に、HSAから溶出される回収ファージの溶液は中性化され、所望であれば、ファージディスプレイ血清アルブミン結合ペプチドの富化された混合ライブラリー集団としてプールされ得る。代替的には、各ライブラリーに由来する溶出ファージは、HSAバインダーのライブラリー特異的富化集団として分離が保たれうる。血清アルブミン結合ペプチドディスプレイファージの富化集団は、次に、スクリーニングのさらなるラウンドおよび/またはファージのペプチドディスプレイの解析および/または提示された結合ペプチドをコードするDNAの配列決定に関する標準法により増殖され得る。

【0067】

多くの可能な代替的スクリーニングプロトコルの1つは、ビオチン標識されており、例えば粒子上で被覆されたストレプトアビジンに結合することにより捕捉され得るHSA標的分子を使用する。以下の実施例に記載されるように、ファージディスプレイHSA結合ペプチドは、温度誘導性変性およびタンパク質分解攻撃に対してHSAを安定化することが知られている0.1% Tween20非イオン性界面活性剤とまた0.1%のカプリル酸ナトリウムとが補充されたリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中pH7.4の溶液中で、ファージディスプレイHSA結合ペプチドがカプリル酸 - ビオチン標識 - HSAに結合されるようなプロトコルにおいてライブラリーから選択された。次に、溶液中のカプリル酸 - ビオチン標識 - HSA / ファージ複合体は、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズ上で捕捉された。ファージを次にさらなる研究のためにビーズから溶出した。

【0068】

次に、回収されたファージを細菌細胞の感染により増幅し、スクリーニングプロセスが、現在非HSAでバインダー中で枯渇し、かつHSAバインダー中で富化しているファージの新しいプールを用いて繰り返され得る。ほんのわずかなファージの回収であってさえ、プロセスを完成させるのに十分である。数回の選択後、結合プール中の選択ファージクローンに由来する結合部分をコードする遺伝子配列は、標的へのファージの結合親和性を与えるペプチド配列を明らかにする通常の方法により決定される。各ラウンドの選択後に回収されたファージの数における増加および密接に関連した配列の回収は、スクリーニングが所望の特徴を有するライブラリーの配列上に集まることを示す。

【0069】

結合ポリペプチドのセットが同定された後に、配列情報が、さらなる所望の特性を有するメンバーに対して偏向させた他の2番目のライブラリーを設計するために使用され得る。

【0070】

血清アルブミン結合ポリペプチドおよび部分

ライブラリースクリーニングから単離されたDNAのヌクレオチド配列の解析後、特定の血清アルブミン結合ペプチドのファミリーを規定した。

【0071】

TN6/6の様々な鑄型配列の解析により、血清アルブミン結合ポリペプチドのファミリーは、式I:

I. Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Cys-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀ (配列番号: 2)、
 式中、Xaa₁は、Asn、His、Leu、Phe、TrpまたはValであり; Xaa₂は、Ala、Glu、His、Lys、TrpまたはValであり; Xaa₃は、Asp、Gly、Ile、His、Ser、TrpまたはValであり; Xaa₄は、Asp、Asn、Ser、ThrまたはTrpであり; Xaa₅は、Asn、Gln、His、Ile、LeuまたはLysであり; Xaa₆は、Ala、Asp、Phe、TrpまたはTyrであり; Xaa₇は、Asp、Gly、Leu、Phe、Ser

10

20

30

40

50

またはThrであり；Xaa₈は、Glu、Ile、Leu、Met、SerまたはValであり；Xaa₉は、Asn、Asp、Gln、Gly、Met、SerまたはTrpであり；およびXaa₁₀は、Ala、Asn、Asp、Pro、TyrまたはValである、

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有すると規定される。

【 0 0 7 2 】

TN8/9の鑄型配列の解析は、式II：

II. Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Cys-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂(配列番号：131)、

式中、Xaa₁は、Ala、Gln、Leu、Lys、Phe、TrpまたはTyrであり；Xaa₂は、Asn、Gln、Glu、Ile、ThrまたはTrpであり；Xaa₃は、Asn、Gly、Phe、Thr、TrpまたはTyrであり；Xaa₄は、Ala、Leu、His、Met、Phe、SerまたはThrであり；Xaa₅は、Ile、Phe、Pro、Ser、TrpまたはTyrであり；Xaa₆は、Asp、Gln、Glu、Lys、Pro、TrpまたはTyrであり；Xaa₇は、Asp、Gln、Gly、Leu、ProまたはTrpであり；Xaa₈は、Asp、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、TrpまたはTyrであり；Xaa₉は、Gln、Gly、Ile、Phe、Thr、TrpまたはValであり；Xaa₁₀は、Asp、Glu、Gly、Leu、Lys、ProまたはSerであり；Xaa₁₁は、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Ser、TrpまたはValであり；およびXaa₁₂は、Ala、Asn、His、Ile、Met、Phe、ProまたはSerである、

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する血清アルブミン結合ポリペプチドのファミリーを規定する。

【 0 0 7 3 】

TN10/9の鑄型配列の解析は、式III：

III: Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Cys-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄(配列番号：134)、

式中、Xaa₁は、Arg、PheまたはTyrであり；Xaa₂は、Arg、Leu、SerまたはTrpであり；Xaa₃は、Asn、Asp、PheまたはTyrであり；Xaa₄は、Gln、Glu、PheまたはMetであり；Xaa₅は、Asp、ProまたはThrであり；Xaa₆は、Ile、SerまたはTrpであり；Xaa₇は、His、Met、PheまたはProであり；Xaa₈は、Asn、LeuまたはThrであり；Xaa₉は、Arg、Asn、HisまたはThrであり；Xaa₁₀は、Arg、Met、PheまたはTyrであり；Xaa₁₁は、Asp、Gly、PheまたはTrpであり；Xaa₁₂は、Ala、AsnまたはAspであり；Xaa₁₃は、Arg、Phe、ProまたはTyrであり；およびXaa₁₄は、Arg、His、PheまたはSerである、

のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する血清アルブミン結合ポリペプチドのファミリーを規定する。

【 0 0 7 4 】

TN12/1の鑄型配列の解析は、式IV：

IV. Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Cys-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆(配列番号：5)、

式中、Xaa₁は、Ala、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyrであり；Xaa₂は、Ala、Arg、Asp、Asn、Gly、His、Phe、Pro、SerまたはTrpであり；Xaa₃は、Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Leu、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₄は、Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₅は、Ala、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₆は、Ala、Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₇は、Ala、Arg、Asn、Asp、Ile、Leu、Phe、Pro、Ser、TrpまたはTyrであり；Xaa₈は、Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Met、Phe、Pro、Thr、TrpまたはTyrであり；Xaa₉は、Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、TrpまたはTyrであり；Xaa₁₀は、Ala、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、ThrまたはTrpであり；Xaa₁₁は、Ala、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、TrpまたはValであり；Xaa₁₂は、Ala、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₁₃は、Ala、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro

、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₁₄は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、TrpまたはTyrであり；Xaa₁₅は、Ala、Arg、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、TrpまたはTyrであり；およびXaa₁₆は、Ala、Asn、Asp、Gly、His、Leu、Phe、Pro、Ser、TrpまたはTyrである、
 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する血清アルブミン結合ポリペプチドのファミリーを規定する。

【0075】

提示されたヘテロロガスなペプチド構造のシステイン残基は、非還元条件下でペプチドに安定な環状構造を示させるジスルフィド結合を形成すると考えられている。したがって、TN6/6、TN8/9、TN10/9およびTN12/1ライブラリー由来の単離されたファミリーの解析は、以下のアミノ酸配列V、VI、VIIまたはVIII：

V. Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys(配列番号：1)、

式中、Xaa₁は、Asp、Asn、Ser、ThrまたはTrpであり；Xaa₂は、Asn、Gln、His、Ile、LeuまたはLysであり；Xaa₃は、Ala、Asp、Phe、TrpまたはTyrであり；およびXaa₄は、Asp、Gly、Leu、Phe、SerまたはThrである；または

VI. Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Cys(配列番号：130)

式中、Xaa₁は、Ala、Leu、His、Met、Phe、SerまたはThrであり；Xaa₂は、Ile、Phe、Pro、Ser、TrpまたはTyrであり；Xaa₃は、Asp、Gln、Glu、Lys、Pro、TrpまたはTyrであり；Xaa₄は、Asp、Gln、Gly、Leu、ProまたはTrpであり；Xaa₅は、Asp、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、TrpまたはTyrであり；Xaa₆は、Gln、Gly、Ile、Phe、Thr、TrpまたはValである；または

VII. Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Cys(配列番号：133)、

式中、Xaa₁は、Gln、Glu、PheまたはMetであり；Xaa₂は、Asp、ProまたはThrであり；Xaa₃は、Ile、SerまたはTrpであり；Xaa₄は、His、Met、PheまたはProであり；Xaa₅は、Asn、LeuまたはThrであり；Xaa₆は、Arg、Asn、HisまたはThrであり；Xaa₇は、Arg、Met、PheまたはTyrであり；Xaa₈は、Asp、Gly、PheまたはTrpである。

VIII. Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Cys(配列番号：4)、

式中、Xaa₁は、Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₂は、Ala、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₃は、Ala、Arg、Asp、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₄は、Ala、Arg、Asn、Asp、Ile、Leu、Phe、Pro、Ser、TrpまたはTyrであり；Xaa₅は、Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Met、Phe、Pro、Thr、TrpまたはTyrであり；Xaa₆は、Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、TrpまたはTyrであり；Xaa₇は、Ala、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Met、Phe、Pro、Ser、ThrまたはTrpであり；Xaa₈は、Ala、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、TrpまたはValであり；Xaa₉は、Ala、Arg、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValであり；Xaa₁₀は、Ala、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValである、

の1つを含むシステインで括られたポリペプチドを含有する特定の血清アルブミン結合部分を規定する。

【0076】

TN12/1ライブラリーから単離された血清アルブミン結合ポリペプチドのさらなるアラニン変異体は、アラニンがまた、上記式IVおよびVIIIにおける変更可能なアミノ酸位置に対して潜在的な値に付加されることを説明する（以下の実施例2を参照）。

【0077】

本発明のポリペプチドは、種々の方法において調製され得る。

【0078】

本発明のポリペプチドの直接の合成は、固相ペプチド合成、液相ペプチド合成などを含む通常の技術を用いて達成され得る。固相合成が好ましい。本明細書に参照により取り込

10

20

30

40

50

まれるStewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis(1989), W.H.Freeman Co., San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154(1963); BodanszkyおよびBodanszky, The Practice of Peptide Synthesis(Springer-Verlag, New York 1984)を参照のこと。

【0079】

本発明のポリペプチドはまた、サービスとしてペプチド合成を提供する会社により商業的に調製され得る(例えば、BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA)。

【0080】

Perkin-Elmer Applied Biosystemsにより製造されるものなどの自動ペプチド合成機もまた、入手可能である。

【0081】

組み換えDNA法を用いる結合ポリペプチドの製造のために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の挿入および発現を可能にする種々の発現ベクター系が、現在入手可能である。かかるベクターとしては、例えば、真核および原核生物発現プラスミド、組み換えバクテリオファージ、組み換え真核ウイルスベクター、人工染色体などが挙げられ、それらはまた適切な宿主細胞におけるポリペプチドの発現に必要な転写および翻訳制御シグナルを含む。このアプローチにおいて、本発明の血清アルブミン結合ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が、例えば自動化DNAシンセサイザーを用いて合成され、選択された発現ベクターに標準法を用いて挿入される。挿入されたポリヌクレオチドを含む得られた組み換え発現ベクターは、次に、例えば形質転換、エレクトロポレーション、マイクロ投射、リポソーム媒介形質転換、トランスフェクションなどを用いて適切な宿主細胞に挿入される。組み換え発現ベクターを含む宿主細胞は、次に血清アルブミン結合ペプチドの発現を可能にするために適切な条件でインキュベートされ、次に宿主細胞タンパク質から精製され得る。

【0082】

組み換えDNA法が異種ポリペプチドまたはタンパク質を発現させるために十分に開発されているが、比較的小さいサイズの本発明の血清アルブミン結合ポリペプチドは、自動化ペプチド合成機の使用がペプチドを作製するためのより好ましい方法として好都合である。さらに、インビトロペプチド合成法は、アミノおよび/またはカルボキシ末端キャッピング基の付加などの結合ペプチドにおいてなされ得る改変を可能にし、これは、変性または他の分子との所望でない反応から結合ペプチド保護しうる、および/または活性化N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)-セファロース親和性クロマトグラフィー樹脂粒子などの活性化親和性樹脂へのカップリングを可能にする官能基の取り込みなどのペプチドの多面性を追加するさらなる基を提供しうる。標準自動化ペプチド合成手順によって作製される結合ペプチドは、例えば有用な量で標準逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて容易に精製され得る。

【0083】

本発明の血清アルブミン結合部分の結合特性は、精製結合ペプチドまたはファージディスプレイ結合ペプチドのいずれかとして、当該分野で公知の様々なアッセイフォーマットを用いて容易に評価され得る。かかる方法としては、蛍光異方性が挙げられ、これは、1つ以上の異なる種に由来する血清アルブミンに対する結合部分の解離定数(K_D)を決定する便利で正確な方法を提供する。1つのかかる手順において、本明細書に記載される結合部分は、蛍光を用いて標識される。次に、蛍光標識結合部分は、種々の濃度の特定種の血清アルブミンを用いてマルチ-ウェルアッセイプレートのウェル中で混合され得る。蛍光異方性測定は、次に、蛍光偏光プレートリーダーを用いて行なわれる(実施例を参照)。

【0084】

溶液中の血清アルブミンへの結合を検出または測定するための別のフォーマットは、標準酵素結合免疫吸着検定(ELISA)に基づく構成を使用する。ここで標的血清アルブミンはマルチ-ウェルアッセイプレートのウェルの表面上に固定化され、血清アルブミン結合部

10

20

30

40

50

分（ポリペプチドまたはファージ）を含有する溶液がウェルに添加される。結合部分は、適切な条件下で固定化血清アルブミンに結合し、次に、溶液の非結合成分がウェルから除去され得る。ウェル中に残っている結合部分の存在は、次に、結合部分に結合する標識された抗体（または他の標識分子）を用いて検出され得る。抗体上の標識は、適切な基質（HRPの場合TMB）の存在下に検出可能なシグナルを生じうる好ましくはHRPなどの酵素である。シグナルの強度は、血清アルブミンに結合した結合部分の量に比例する。

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載される血清アルブミン結合部分としては、限定されないが、微細に分割されたクロマトグラフィー樹脂粒子の表面、磁性粒子またはマイクロスフェアの表面、放射性核種、磁気共鳴画像化合物、表面細胞上に存在する他のポリペプチド、酵素、タンパク質、ストレプトアビジン、ビオチン、抗体および治療用化合物を含む種々の分子および粒子に対して（共有結合または非共有結合により）連結され得る（すなわち、さらに血清アルブミンを結合する）。2つの分子を互いに連結するための種々の方法は、当該分野で公知である。かかる連結は、好ましくは共有結合であるが、ある配置において、本発明の血清アルブミン結合部分は、別の分子に疎水性結合もしくはイオン結合により、または種々の型の結合のある組み合わせによってさえ連結され得る。本明細書に記載される血清アルブミン結合部分の別の分子への結合に有用な共有結合としては、限定されないが、ペプチド結合、ジスルフィド結合、エステル結合、およびエーテル結合が挙げられる。例えば、本発明の血清アルブミン結合部分に存在するリジン残基の側鎖のアミノ基が使用され、ペプチド結合を形成するための縮合を介して結合部分を別のタンパク質、表面、または粒子に共有結合しうる。本発明の血清アルブミン結合ポリペプチドは、公知のアミノ酸配列の別のポリペプチドに連結される場合、次に2つの構成分子を含有する融合ポリペプチドが、自動化ペプチドシンセサイザーを用いるかまたは融合タンパク質を作製するための当該分野で公知の任意の種々の標準組み換えDNA法を用いることにより、直接合成され得る。

【 0 0 8 6 】

本発明の血清アルブミン結合ポリペプチドまたは部分の別の分子への共有結合はまた、当該分野で公知の任意の種々のカップリング剤およびプロトコルを用いて達成され得る。かかるカップリング剤としては、限定されないが、グルタルアルデヒドなどの非特異的なカップリング剤；2つの異なる分子を各成分分子に対して異なる化学反応を用いて連結することができるヘテロ二官能性カップリング剤；2つの異なる分子を各成分分子に対して同じ化学反応を用いて連結することができるホモ二官能性カップリング剤が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

本発明の血清アルブミン結合部分はまた、固体支持体材料の表面に固定化され得る。かかる固体支持体材料としては、限定されないが、紙、ガラス、プラスチック、木、ナイロン、ゴム、金属、アクリルアミド、セルロース、アガロースおよびその組み合わせが挙げられる。かかる固体表面は、限定されないが、マルチ-ウェルアッセイプレートのウェル、磁気粒子またはビーズ、クロマトグラフィー樹脂粒子、およびアッセイおよび保存のための種々のチューブおよび容器を含む種々の構成物中に見出され得る。血清アルブミン結合部分は、共有結合、疎水性相互作用、イオン結合、およびその組み合わせなどの任意の潜在的な型の公知の化学結合により、かかる表面に結合され得る。例えば、ある場合において、血清アルブミン結合ポリペプチドまたは部分は、マルチ-ウェルアッセイプレートのウェルの表面などの固体表面に単に付着しうる。代替的には、血清アルブミン結合部分は、固体支持体材料の表面に由来する結合部分をつなぎとめるリンカー分子を用いて固体表面に固定化され得る。さらに別の配置において、ストレプトアビジン-ビオチンパートナーが、固体支持体材料の表面に結合部分を固定化するために使用され得る（実施例を参照）。

【 0 0 8 8 】

磁性ビーズ、フィルター、またはクロマトグラフィー媒体などの固体支持体上に固定化される場合、本発明の結合部分は、組み換え血清アルブミンまたは血清アルブミン様ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを含む全血、血液画分、およびならし培地を含む溶液に由来する血清アルブミンまたは血清アルブミン様ポリペプチドの回収のための有用な別々の媒体を提供する。

【0089】

本明細書に記載される結合部分を別の分子に結合するためにどの手段が使用されても、所望の最終産物は、好ましくは各成分分子の所望の特性の有意な損失がない化合物である。血清アルブミン結合分子成分の場合、好ましくは血清アルブミンを結合する能力に有意な減少がない。より好ましくは、本明細書に記載される結合部分の別の分子との連結は、増強された検出能力、増大した血清半減期、増強された溶解性または増強された治療効力などの増強された特性を生じる。

【0090】

本発明の血清アルブミン結合部分の使用

血清アルブミンを含むことが推測される血液またはならし培地などの溶液中の血清アルブミンの検出のために、本明細書に記載される血清アルブミン結合部分は、標準法を用いて、例えば放射性同位元素または酵素により標識されるなど検出可能に標識され得、次に、溶液を接触させ、結合部分が血清アルブミンと結合し、複合体を形成する。その後、結合部分/血清アルブミン複合体の形成は、任意の種々の標準法により検出され得る。例えば、その表面上に血清アルブミン結合ポリペプチドを提示する組み換えファージは、反応チューブ中で沈降物として検出可能である血清アルブミンとの複合体を形成し得、これは沈降または遠心分離の後に視覚的に検出され得る。別の例として、本明細書中に記載される血清アルブミン結合部分がプラスチックチューブの壁、マルチウェルアッセイプレート中のウェルの表面、またはクロマトグラフィーマトリックス粒子等の固相支持体上に固定化されるサンドイッチ型アッセイが使用され得る。次いで、血清アルブミンを含有することが予想される溶液は、固定化された結合部分と接触させられ、溶液の非結合成分が除去されるか、または洗い落とされる。固定化された血清結合部分に結合した任意の血清アルブミンは、血清アルブミン標的を認識するモノクローナル抗体等の適切な検出試薬を用いて検出され、ここで試薬は、検出可能なシグナルを生成する放射標識またはコンジュゲート酵素等の当該分野で公知のいくつかの従来手段により検出可能である。

【0091】

本発明の血清アルブミン結合部分はまた、アフィニティークロマトグラフィーにより溶液から血清アルブミンを単離するために有用である。例えば、本発明の血清アルブミン結合部分は、当該分野で利用可能な方法により、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)-セファロースアフィニティ樹脂粒子等の細密に分けられたクロマトグラフィーマトリックス樹脂の表面に連結され、血清アルブミン特異的アフィニティークロマトグラフィー樹脂が作製される。次いで、固定化された結合部分は、結合部分/血清アルブミン複合体の形成に有利な条件下でフィード流動を負荷されるか、または接触され得る。非結合成分が除去または洗い落とされ、次いで血清アルブミンは、結合複合体の解離に有利な溶液条件を誘導することに溶出され得る。

【0092】

あるいは、血清アルブミンは、血清アルブミンを含む溶液と本明細書中に記載される血清アルブミン結合部分とを結合させ、次いで血清アルブミンと血清アルブミン結合部分との複合体を単離することにより単離または検出され得る。この型の分離のために、血清アルブミン結合部分が結合試薬として使用され得る多くの方法が公知である。例えば、本発明の血清アルブミン結合部分は、固相支持体上に固定化され、次いで濾過により結合部分に結合した任意の血清アルブミンとともにフィード流動から分離され得る。あるいは、本明細書中に記載される結合部分は、複合体が形成された後に金属アフィニティークロマトグラフィーを用いて結合部分を捕捉(結合)するために使用され得るポリHis尾部等のそれ自身のアフィニティタグで修飾され得る。一旦分離されると、血清アルブミン標的は、適切な溶出条件下で結合分子から放出され、純粋な形態で回収され得る。任意の他のアフィニティタグおよびその結合パートナー(例えば、ビオチン/ストレプトアビジン、Fc/プロテインA等)は、上記のように捕捉または固定化され得る本発明のアルブミン結合部

10

20

30

40

50

分を作製するためにこの方法で使用され得る。

【0093】

本明細書中に開示される血清アルブミン結合部分を得ることに於いて正確な結合条件が予め選択されたが、アフィニティ精製における引き続きの使用は、同一の単離されたアフィニティリガンドが作動する、より最適な結合および放出条件を示しうることは留意されるべきである。従って、本発明による単離後、結合部分が、常に、ライブラリーからその分離を導いた結合および放出条件でのみ使用されることは重要ではない。

【0094】

また、本明細書中に記載される血清アルブミンの検出および単離方法はまた、血清アルブミン様ポリペプチド、特に別のポリペプチドに連結した血清アルブミンまたはその一部を含有する血清アルブミン融合タンパク質を検出および単離するために使用され得ることが理解される（例えば、Hollon, Nature Biotechnology, 18: 1238-1239(2000); Yehら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89(5): 1904-1908(1992)に記載されるHSA融合タンパク質についてを参照）。

【0095】

血清アルブミンは血液中でも最も豊富なタンパク質マーカーであるので、本明細書中に記載される血清アルブミン結合部分は、個体中の血液を局在化および画像化するための試薬として使用され得る。かかる「血液プール画像化」法は、典型的には、種々の組織における血液の映像を得るため、例えば、血管における循環または循環の欠失を検出するため、または以前に血流がブロックされた器官の再灌流を検出するために磁気共鳴映像（MRI）を使用する。例えば、WO97/30734参照。本発明によれば、血清アルブミン結合部分は、検出可能標識に標準的方法により連結される。次いで、標識結合部分は個体に投与され、個体は、組織中の血液の映像を得るための適切な検出装置を用いてスキャンされる。かかる血液プール画像化は、循環する血液、循環する血液の妨害（虚血）、および個体の組織中の内出血または深静脈の血栓症の部位の位置づけにおける画像化に特に有用である。例えば、Seabold Semin.Nucl.Med., 31(2):124-128 (2001); Saeedら、J.Mag.Res.Imaging, 12(6):890-898 (2000)参照。

【0096】

本明細書中に記載される検出方法または単離方法を用いることにより、血清アルブミン（または血清アルブミン様タンパク質）が、血清アルブミンを含みうる任意の種々の溶液において検出されるか、またはそこから単離され得ることが理解される。かかる溶液としては、血液および血液画分、血清アルブミンを発現する真核生物細胞の抽出物、血清アルブミンを発現する組み換え原核細胞の抽出物、および血清アルブミンを発現するように遺伝子操作されたトランスジェニック動物由来の種々の溶液または細胞抽出物、例えば、トランスジェニックニワトリ（または他の家禽）由来の卵白が挙げられるがこれらに限定されない。

【0097】

本発明の結合部分に関する別の使用は、個体の循環系に投与または導入される治療用化合物または診断用化合物の半減期および全体の安定性を増大させることである。例えば、米国特許第5,116,944号; EP-A2-395 918; WO91/01743参照。かかる方法では、本明細書中に記載される血清アルブミン結合部分は、治療用化合物または診断用化合物と、治療用化合物または診断用化合物を受け取る個体の血液中で見出される血清アルブミンとを連結するために使用される。この態様では、本発明の血清アルブミン結合部分が、前記部分の血清アルブミン結合部位をインタクトに維持し、さらに所望の診断活性または治療活性を危うくすることなく、血清アルブミンに結合しうる部位で選択された治療用化合物または診断用化合物に共有結合または非共有結合（上記参照）で連結される。この方法では、前記結合部分は、目的の診断用/治療用化合物を、血液中を循環する血清アルブミンに連結させるためのリンカー分子として働く。診断用化合物または治療用化合物と循環血清アルブミンとを本発明の血清アルブミン結合部分を用いて連結させることは、通常、好ましくない迅速な速度の分解または循環からのクリアランスに曝される化合物の循環半減期および

10

20

30

40

50

／または全体の安定性を増大させることにおいて特に有用であることが予想される。循環系の化合物の半減期または全体の安定性を増大させることにより、所望の効果をj得るために個体に投与されなければならない用量の数および／またはサイズが減少されるようである。色素（フルオレセイン等）；¹³¹Iまたはテクネチウム（Tc⁹⁹）-含有化合物等の放射能標識；酵素（西洋ワサビペルオキシターゼ等）；または検出可能金属（常磁性イオン等）でありうる特に検出可能な標識を含む、任意の適切な診断用化合物が、この様式で血清アルブミンに連結され得る。目的の薬物、生物薬剤、および任意のポリペプチドを含む任意の適切な治療用化合物が、この様式で血清アルブミンに連結され得る。血清アルブミンへの連結に適切なかかる治療剤の例としては、レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト、特異的結合化合物、酵素インヒビター、金属キレーター、ビタミンE等の分子スカベンジャー等が挙げられるが、これらに限定されない。この使用のために特に重要なものは、トロンピンインヒビター、血栓溶解剤（tPAおよびウロキナーゼ等）、レニンインヒビター、ACEインヒビター、セレクチンリガンド、凝血カスケードのインヒビター、補体調節分子（DAF、CR1、CR2、CR4bp、H因子等）、セリンプロテアーゼ、GPIIb/IIIaアンタゴニスト、CRFアンタゴニスト等である。

10

【0098】

本発明に従って血清アルブミン結合部分の単離および特徴づけが以下にさらに説明される。以下の実施例に含まれる特定のパラメータは、本発明の実施を説明することを意図し、それらは決して本発明の範囲を限定するためではない。

【実施例】

20

【0099】

実施例1．ヒト血清アルブミン結合ポリペプチドの選択試薬

ヒト血清（AB型）を、Sigma Chemical Company（St.Louis, MO）から購入した。親和性精製したモノマーヒト血清アルブミン（HSA）をICNから購入した。全ての他の哺乳動物アルブミンをSigma Chemical Companyから画分V精製物として購入した。N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）活性化セファロースクロマトグラフィー樹脂をAmersham-Pharmacia Biotech（Piscataway, NJ）から購入した。全てのクロマトグラフィーカラムをOMNIFIT™ Inc.（Rockville Center, NY）から購入した。全ての他の化学薬品は入手可能な最も高い等級のものであった。レベル1血清-Magストレプトアビジン磁性ビーズをSeradyn（Indianapolis, IN）から購入した。HSAのビオチン化のためにNHS-LC-LC-ビオチンをPierce Chemical Company（Rockland, IL）から購入した。

30

【0100】

受動的に固定化されたHSAスクリーニングのためのHSA選択プロトコル

3つのファージライブラリー（TN6/6、TN10/9、およびTN12/1）を、Immulon 2HB 96-ウェルプレート（DYNEX Technologies, Inc.）中のカプリル酸塩結合HSA（100 μl/ウェルに10 μg/ml）に対して選択した。各ライブラリーに対して、PBS中のカプリル酸塩結合HSA（100 μl/ウェルに10 μg/ml）で4回一晩2つのウェルを被覆した。翌日、HSAを除去し、次いでこれらのウェルをPBS/0.1%カプリル酸塩/0.1%Tween-20非イオン性界面活性剤（PBSCT）で2時間室温にてブロックした。ウェルをPBSCTで6回洗浄した。次いで、各ファージライブラリーをPBSCTで10⁹pfu/μl中で希釈した。所定の希釈ファージライブラリーのアリコート（100 μl）を各HSA被覆ウェルに添加し、その結果、ウェル当たり10¹¹個の全ファージが存在した。ファージを室温で2時間ウェル中でインキュベートし、次いでPBSCTで6回洗浄した。各ウェルに100 μlのCBS（50mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH2）を5分間添加することにより結合ファージを溶出した。次いで、ウェル中の溶出したファージを250 μlの2 M Tris、pH8で中和した。全てのウェルを1.5ml全容積についてプールした。プールしたファージを、中央対数増殖期まで増殖させた後に氷上で冷却したXL1-Blue MRF'大腸菌細胞と混合した。次いで、ファージ感染細胞を大四角プレート（100 μg/mlアンピシリンを補充したNZCYM寒天を含有する243mm x 243mm x 18mm NUNC Bio-Assayプレート）に約1 × 10⁴個のコロニー/プレートの密度でプレーティングし

40

50

、37 で一晩増殖させた。コロニーを、ロボット (BioRobotics BioPick, Cambridge, UK) で100 μ l/ウェルのTEバッファー (pH8.5) を含有する96ウェル平底プレート (Greiner Labortechnik, Germany) に拾い上げた。これらのプレートから、ELISA研究のために10個の96ウェル一晩培養プレートを調製した。

【0101】

固相酵素免疫測定法 (ELISA)

標的としてのカプリル酸塩HSAの解析のため、5.6 μ g/mlのカプリル酸塩HSAを340 μ l/ウェルで添加することによりImmulon 2HBプレートを調製した。プレートを一晩4 でインキュベートした。次いで、HSA-コートプレートをPBSCTにより6回、自動装置 (BioTek 404, BioTek Instruments) で洗浄した。プレート結合体の説明をするため、空のプレートも洗浄した。等容量の各ファージクローン単離物を、標的プレートおよび対照プレートの両方の、70 μ l PBSCTを含有するプレートウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。BioTek 404 装置を用い、プレートをPBSCTで7回洗浄した。Pharmacia HR P-aM13抗体コンジュゲートのPBSCTでの1:10,000希釈物を各ウェルに100 μ l/ウェルで添加した。プレートを1時間インキュベートした。インキュベーション後、BioTek 404 装置を用い、プレートをPBSCTで6回洗浄した。洗浄後、二成分TMB基質溶液の1:1溶液100 μ lを各ウェルに添加し、プレートを30分間インキュベートした。次いで、自動BioTekプレートリーダーにより620 nmでプレートを読み取った。

【0102】

可溶性捕捉スクリーニングのためのHSA選択およびELISAプロトコル

TN6/6およびTN12/1ファージライブラリーを、カプリル酸塩ビオチン化-HSA溶液に対してスクリーニングした。この手順のため、レベル1 Sera-Magストレプトアビジン磁性ビーズ (Seradyn, Indianapolis, IN) をPBSCT中で5回洗浄した。ファージをまず処理し、カプリル酸塩ビオチン化 HSAの非存在下でストレプトアビジンをコートした磁性ビーズに直接結合しうるファージを除去した。100 μ lのPBSCTあたり、ライブラリー由来の約 $3 \sim 4 \times 10^{11}$ プラク形成単位 (pfu) をマイクロ遠心 (microfuge) チューブ内のPBSCT-洗浄ビーズのアリコート (100 μ l) に導入した。次いで、ビーズ-ファージ混合物を含有するマイクロ遠心チューブをLabquakeシェーカー (Labindustries, Berkeley, CA) に配置することにより、ビーズを懸濁状態に維持した。10分後、ビーズを14,000 \times gでペレット化し、ファージを含有する上清液を、別のPBSCT洗浄ビーズのアリコートを含有する新しいチューブに移した。合計5つのこのようなファージのビーズのアリコートへの10分間の曝露物を使用した。

【0103】

2 μ lのビオチン化 HSAストック溶液の添加により、処理したファージ溶液 (100 μ l) を、カプリル酸塩ビオチン化-HSA中において1 μ Mとした。1時間後、混合物を、予めPBSCTで5回洗浄しておいたレベル5 Sera-Magストレプトアビジン磁性ビーズのアリコート (100 μ l) に添加した。チューブをLabquakeシェーカーに5分間配置して、カプリル酸塩ビオチン化-HSAファージ複合体がビーズ上で捕捉されるようにした。カプリル酸塩ビオチン化-HSAもまたビーズ上で捕捉される。次いで、磁気スタンド (Promega, Madison, WI) を用い、5 \times 1ml PBSCT + 0.1mMビオチンによりできるだけ高速でビーズを洗浄し、廃棄するPBCT + 0.1mMビオチンからビーズを分離した。洗浄後、ビーズに結合したままのファージを、PBSの \times 250 μ l アリコート、pH 2で15分かけて溶出した。ファージを含有する溶出液を、100 μ lの2 M Tris、pH 8で中和した。溶出液を、対数期中期まで増殖させた後、氷上で冷却しておいたXL1-Blue MRF大腸菌細胞のアリコートと混合した。室温で約15分後、ファージ/細胞混合物を、50 μ g/mlのアンピシリンを加えた250mlのNZCYM寒天を含有するBio-Assay Dish (243mm \times 243mm \times 18mm, Nalge Nunc) 上に広げた。プレートを一晩37 でインキュベートした。翌日、ファージをプレートから回収した。

【0104】

マルチウェルアッセイプレートのウェルをまずストレプトアビジンでコートし、次いでカプリル酸塩ビオチン化-HSAを添加してHSAをウェルの表面に固定化させたこと以外は基

本的に上述のようにして、選択したファージについてカプリル酸塩HSAへの結合をELISAを用いてアッセイした。対照ウェルはストレプトアビジンでコートしただけで、カプリル酸塩ビオチン化-HSAは添加しなかった。

【 0 1 0 5 】

DNAシーケンシング

目的のペプチドを提示する単離ファージ由来のDNAを単離し、M13ファージのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) シーケンシングのための市販キット (TWO BIG DYE™, Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いてシーケンシングした。簡単には、一晚ファージ培養物を蒸留水で100倍に希釈し、3PCRUPおよび3PCRDNプライマーを用いるPCRにより増幅した。次いで、増幅産物を2回蒸留した水で、1:20に希釈し、PCR増幅核酸産物の3 μ lアリコート、基本的には製造業者の示す手順に従ってシーケンシングした。PCRB3DNおよび3Seq-80プライマー分子を用い、シーケンシング反応物を10 μ l容量にセットアップ (set up) した。シーケンシング反応産物を自動Applied Biosystems 3700蛍光シーケンシング装置で走らせ (run)、配列データを収集した。

10

【 0 1 0 6 】

ペプチド合成およびフルオレセイン標識

一旦ファージ単離物DNA配列を決定すると、標準9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) プロトコル (Bachem Bioscience, King of Prussia, PA) を用いる固相合成により、対応するペプチドを商業的に合成し、逆相クロマトグラフィーにより精製した。エレクトロスプレー (electrospray) 質量分析により質量を確認し、280 nmでの紫外線吸収によりペプチドを定量した。選択した各アミノ酸配列に隣接する不変 (unvaried) ファージ由来アミノ酸配列Ala-Glu-Gly-Thr-Gly-Ser (配列番号: 3のアミノ酸1-6) およびAsp (またはAla) -Pro-Gluを保持し、合成ポリペプチドをN-末端アセチル化した。C-末端基を各ポリペプチド、すなわち-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂ (配列番号: 24) リンカーまたは(6-アミノヘキサン酸) -Lys-NH₂カルボキシ末端キャッピング基のいずれかに付加した。内部リジン残基を有する選択したこれらのペプチドについて、内部リジンを1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキス-1-イリジン) -3-メチルブチル (ivDde) (Chan, Tetrahedron Lett., 39: 1603-1606 (1998)) で保護した。この保護基は、C末端リジンの選択的カップリングを許容し、ペプチド切断の際に除去されず、2%ヒドラジンを含むジメチルスルホキシド (DMF) または0.5 Mヒドロキシルアミン、pH 8を用いるC末端リジンの誘導体化後に除去され得る。

20

30

【 0 1 0 7 】

蛍光異方性測定

まずC末端のポリペプチドをNHS-フルオレセインで標識することにより親和性測定を行なった。Tecan Polarion蛍光分極プレートリーダーを用い、容量10 μ lの384-ウェルマイクロプレート内の結合バッファー中で蛍光異方性測定を行なった。フルオレセイン標識ペプチドの濃度を一定 (20 nM) に保持し、HSAの濃度を変化させた。pH 6.2、7.1および7.4結合条件では、3mMリン酸塩、0.01% Tween-20バッファーを使用した。pH 9.1結合条件では、3mM 重炭酸ナトリウムバッファー、0.01% Tween-20 非イオン性界面活性剤バッファーを使用した。一旦、これらのバッファーのいずれかにNaClを添加したものは、そのpHを再度調整してもとのpHにした。測定を行なう前に10分間、30 にてマイクロプレート内で結合混合物を平衡化した。観察された異方性における変化を非線形回帰による以下の等式に当てはめ、見かけ (apparent) K_D を得た。この等式は、ペプチドおよびHSAが、1:1化学量論で可逆的複合体を形成すると仮定している。

40

【 0 1 0 8 】

【数 1】

$$r_{obs} = r_{free} + \left(r_{bound} - r_{free} \right) \frac{\left(K_D + HSA + P \right) - \sqrt{\left(K_D + HSA + P \right)^2 - 4 \cdot HSA \cdot P}}{2 \cdot P}$$

式中、 r_{obs} は観察された異方性であり、 r_{free} は遊離ペプチドの異方性であり、 r_{bound} は結合ペプチドの異方性であり、 K_D は見かけ解離定数であり、HSAは全HSA濃度であり、Pは全フルオレセイン-標識ペプチド濃度である。

10

【0109】

NHS-セファロース樹脂上へのペプチド固定化

固定化ペプチド試験カラムを作製するため、5マイクロモルの各ペプチドを、最小容量のDMSOに溶解し、次いで、ジメチルスルホキシド（DMSO）で1回洗浄しておいたNHS-セファロースアフィニティークロマトグラフィー樹脂（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey）1mlに添加した。固定化反応を、ジイソプロピルエチルアミンを2%（vol/vol）まで添加することにより開始した。室温でシェーカーテーブル上でゆっくりと4時間混合した後、等容量の0.5 Mヒドロキシルアミン含有水、pH 8の添加により反応を停止させた。ivDde-保護内部リジンを有するペプチドでは、ヒドロキシルアミン停止処理でivDde-保護基も除去した。完全に保護基を除去するため、停止反応物を一晩、室温でインキュベートした。一旦停止し、脱保護した固定化ペプチド-セファロース樹脂を、水で少なくとも3回洗浄し、溶媒および非結合ペプチドを除去した。樹脂を30mMリン酸、pH 2中で少なくとも3回洗浄することにより非特異的結合ペプチドを樹脂から溶出した。加水分解後、NHS-セファロース樹脂表面は負に帯電するため、酸性洗浄液は該表面を中和し、静電相互作用により表面に非共有結合により結合したいずれのペプチドをも除去する。洗浄後、樹脂を50% v/v混合物として水中に再懸濁させた。50μlのアリコートを用いて、定量的アミノ酸解析により樹脂上のリガンド密度を測定した。最終的に、樹脂スラリーを分析試験用0.35ml容OMNIFIT™ガラス製カラム（3mm×50mm）に充填した。

20

30

【0110】

より大きな分取カラムでは、ペプチドおよびセファロースの量を比例して増加し、最終ペプチドセファロースパッチをより大きな10ml容Omnifitカラム（10mm直径）に充填した。

【0111】

HSAカラム試験

解析用アフィニティークロマトグラフィーカラム試験では、アルブミンを1mg/ml濃度で3mM リン酸ナトリウム、pH 6.2、0.01% Tween-20非イオン性界面活性剤（平衡バッファー）に溶解した。1ミリリットルのアルブミン溶液を、予め平衡バッファーで平衡化しておいた各カラム（0.35 ml）に通した。カラムを同じ平衡バッファーで洗浄し、次いで、100mM Tris、pH 9.1で溶出（すべての工程で流速0.5ml/min）した。BIO-RAD BIOLOGIC™ モニターシステム（Hercules, CA）を用いてカラム クロマトグラフィーを行ない、本試験を通して吸光度は280 nmでモニターした。

40

【0112】

分取DX-236-セファロースアフィニティークロマトグラフィーカラム（10ml）試験では、ヒト血清を、3mMリン酸塩、pH 6.2、20mM NaCl、0.01% Tween-20非イオン性界面活性剤（平衡バッファー）に対して透析した。100マイクロリットル（100μl）の透析血清を、予めバッファーで平衡化しておいた分取DX-236-セファロースクロマトグラフィーカラムに注入した。カラムを同じバッファーで、次いで、20~44mM NaClの勾配で洗浄し、最終的にHSAを100mM Tris、pH 9.1で溶出した。すべての工程で、流速を5ml/minとした。

50

【 0 1 1 3 】

Cibacron Blueセファロースアフィニティークロマトグラフィー試験 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) では、ヒト血清をPBS、pH 7、0.01% Tween-20非イオン性界面活性剤 (平衡バッファー) 中に透析した。100マイクロリットル (100 μ l) の透析血清を、予め平衡バッファーで平衡化しておいた1ml Cibacron Blueセファロースカラムに注入した。カラムを同じ平衡バッファーで洗浄し、次いで、HSAをPBS、1 M NaCl、pH 7で溶出した。すべての工程で流速を1ml/分とした。

【 0 1 1 4 】

HSA結合ペプチドの単離

一連のファージディスプレイライブラリーからのHSA結合ポリペプチドの選択を、固定化HSA標的を用いて行なった。ポリスチレンプレート上での受動固定化およびストレプトアビジンビーズまたはプレート上のビオチン化アルブミン標的を用いる能動固定化の両方を選択に使用した。一旦、標的に対して多数回ライブラリーを選択したものは、単一ファージ単離物をプレートから取り出し、ELISA形式において標的結合について解析した。ELISA陽性単離物をシーケンシングし、蛍光異方性を用いる親和性測定用の対応する合成ペプチドを調製した。HSAに良好に結合したペプチドをセファロースクロマトグラフィー樹脂に固定化し、HSA結合に関して試験した。

10

【 0 1 1 5 】

最初のファージライブラリー選択では、種々の大きさのペプチドを提示するファージライブラリーのプールを、ポリスチレンマイクロタイタープレート上の受動的固定化HSAに対してインキュベートした。このプールは、それぞれ6、10および12個のアミノ酸の環状セグメントを有する多彩なペプチドを提示する3つのファージライブラリー (TN6/6、TN10/9、およびTN12/1) の均等混合物から構成された。

20

【 0 1 1 6 】

TN6/6ライブラリーを、12-アミノ酸鋳型に含有される単一微小タンパク質 (microprotein) 結合ループを示すように構築した。TN6/6ライブラリーを、Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Cys-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂ (配列番号: 237) の鋳型配列を利用した。鋳型の2、3、5、6、7、8、10および11位のアミノ酸を、システイン (Cys) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。鋳型の1および12位のアミノ酸を、システイン (Cys)、グルタミン酸 (Glu)、イソロイシン (Ile)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、およびトレオニン (Thr) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

30

【 0 1 1 7 】

TN10/9ライブラリーを、16-アミノ酸鋳型に含有される単一微小タンパク質結合ループを示すよう構築した。TN10/9ライブラリーを、鋳型配列Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Cys-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆ (配列番号: 238) を利用した。鋳型の1、2、15および16位のアミノ酸を、10個のアミノ酸: D、F、H、L、N、P、R、S、W、またはY) の群より選ばれる任意のアミノ酸が可能となるように改変した。鋳型の3および14位のアミノ酸を、14個のアミノ酸: A、D、F、G、H、L、N、P、Q、R、S、V、W、またはY) の群より選ばれる任意のアミノ酸が可能となるように改変した。鋳型の5、6、7、8、9、10、11および12位のアミノ酸を、システイン (Cys) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

40

【 0 1 1 8 】

TN12/1ライブラリーを、18-アミノ酸鋳型に含有される単一微小タンパク質結合ループを示すよう構築した。TN12/1ライブラリーを、鋳型配列Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Cys-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈ (配列番号: 42) を利用した。鋳型の1、2、17および18位のアミノ酸を、12個のアミノ酸: A、D、F、G、H、L、N、P、R、S、WまたはY) の群より選ばれる任意のアミノ酸が可能となるように改変した。3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14および16位のアミノ酸を、システイン (Cys) を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

【 0 1 1 9 】

50

ポリペプチド鑄型のコード配列内に設計した一連の変異または改変 (variation) をなすことによりファージディスプレイライブラリーを作製し、各変異配列は、鑄型の配列において1つ以上のアミノ酸改変を有する以外は、全体的に構造が鑄型に対応するペプチドアナログをコードした。新規な多彩な (変異) DNAは、配列多様性を提供し、各形質転換体ファージは、DNAによりコードされる当初の鑄型アミノ酸配列のバリエーションの1つを示し、これは、異なるが構造的には関連する膨大な数のアミノ酸配列を示すファージ集団 (ライブラリー) をもたらす。

【0120】

ファージライブラリーをPBS、0.1%カプリル酸ナトリウム、0.1% Tween-20界面活性剤、pH 7.4中でHSAとともにインキュベートした。カプリル酸塩は、最適にC末端ドメインの固定を促進することにより、温度誘導性変性およびタンパク質分解性消化に対してHSAを安定化させることが知られている。その結果、カプリル酸ナトリウムをインキュベーションバッファーに添加し、構造を、より均一な集団とした (Arakawaら、Biochim. Biophys. Acta, 1479: 32-36 (2000) ; Rossら、Vox Sang, 47: 19-27 (1984) ; Shrakeら、Vox Sang, 47: 7-18 (1984))。FDA-承認HSA調製物では、調製物を安定化させるため低温殺菌の直前に、しばしばカプリル酸ナトリウムおよび/またはアセチル-L-トリプトファン酸 (tryptophanate) ナトリウムが添加される。カプリル酸ナトリウムはまた、血清-精製アルブミンからのHSA-結合代謝物の放出を促進する (Cheruvallathら、Pharm. Res., 13: 173-178 (1996) ; Kragh-Hansen, Biochem. J., 273: 641-644 (1991))。カプリル酸ナトリウムにより阻害されなかったアフィニティーカラムでは、プロテアーゼおよび熱誘導性変性に対する安定化を強化するため、精製の前の添加が可能となりうる。

【0121】

最初の選択は、ELISAにより陽性HSA結合を示した数個のファージ単離物をもたらした (例えば、図1参照)。初回のファージ単離物由来のディスプレイポリペプチドのシーケンシングにより以下のHSA結合ポリペプチドが明らかとなった。

【0122】

【化1】

VAWCTIFLCLDV (配列番号:239)

FKICDQWFCLMP (配列番号:240)

HVGCNNALCMQY (配列番号:241)

WKVCDHFFCLSP (配列番号:242)

NHGCWHFSCIWD (配列番号:243)

FRNCEPWMLRFGCNPR (配列番号:244)

ADFCEGKDMIDWVYCRLY (配列番号:245)

FWFCDRIAWYPQHLCEFLD (配列番号:246)

DWDCVTRWANRDQQCWGP (配列番号:247)

DWDCVTRWANRDQQCWAL (配列番号:248)

DWDCVTDWANRHHQHCWAL (配列番号:249)

DWQCVKDWANRRRGCMAD (配列番号:250)

RNMCKFSWIRSPAFCARADP (配列番号:251)

10

20

30

40

50

【 0 1 2 3 】

前記アミノ酸 (amin acid) 配列では、単離物を選択したライブラリーを同定する、推定ジスルフィド-拘束環状ペプチドに下線を付している。

【 0 1 2 4 】

ELISA型アッセイから、ファージ単離物232は、最大ELISAシグナルを示した(図1参照)。さらなる試験および種々の条件下でのHSAの解離定数(K_D)の測定のために、上述のようにしてファージ単離物由来のポリペプチドを合成した。合成ポリペプチドの結合データおよび配列を以下の表1に示す。

【 0 1 2 5 】

【表 1】

10

表 1: 種々の条件下での HSA 結合性ペプチドの解離定数(μM)

ペプチド	配列	カプリン酸塩 ($\pm 0.1\%$)	pH					
			6.2	6.2	7.1	7.4	7.4	9.1
			NaCl ($\pm 0.14\text{ M}$)					
			-	+	-	+	+	+
DX-232	Ac-AEGTGSVAWCTIFLCLDVAPEGGGK-NH ₂ (配列番号:25)	-	0.22	0.5	N.A.	0.18	1.05	N.A.
DX-295	Ac-AEGTGSFKICDQWFCLMPAPE-X-K-NH ₂ (配列番号:26)	-	1.8	>100	N.A.	86	210	N.A.
DX-296	Ac-AEGTGSHVGCNNALCMQYAPE-X-K-NH ₂ (配列番号:27)	-	17	>100	N.A.	76	> 200	N.A.
DX-297	Ac-AEGTGSWKVCDHEFCLSPAPE-X-K-NH ₂ (配列番号:28)	-	18	>200	N.A.	>200	> 200	N.A.
DX-298	Ac-AEGTGSNHGCVWFHFCIWDPAPE-X-K-NH ₂ (配列番号:29)	-	1.9	>200	22	127	73	>200
DX-238	Ac-AEGTGSFRNCEPWMLRFGCNPRAPE-GGGK-NH ₂ (配列番号:30)	-	4.8	61	N.A.	79	110	N.A.
DX-234	Ac-AEGTGDADFCEGKDMIDWVYCRLY-DPEGGGK-NH ₂ (配列番号:31)	-	2.5	85	N.A.	109	118	N.A.
DX-236	Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCEFL-DPEGGGK-NH ₂ (配列番号:32)	-	1.9	8.7	5.6	11	26.8	99
DX-313	Ac-AEGTGDDWDCVTRWANRDQQCWG-PDPE-X-K-NH ₂ (配列番号:33)	-	9.5	80	37	>200	121	90
DX-315	Ac-AEGTGDDWDCVTRWANRDQQCWALDPE-X-K-NH ₂ (配列番号:34)	-	13	>200	N.A.	113	> 100	N.A.
DX-317	Ac-AEGTGDDWDCVTDWANRHQHCWALDPE-X-K-NH ₂ (配列番号:35)	-	6.7	>200	N.A.	74	45	N.A.
DX-319	Ac-AEGTGDDWQCVKDWANRRRGCMADDPE-X-K-NH ₂ (配列番号:36)	-	17	>200	N.A.	>200	26	N.A.

20

30

40

表1(続き)

		pH	6.2	6.2	7.1	7.4	7.4	9.1
		NaCl (± 0.14 M)	-	+	-	+	+	+
ペプチド	配列	カプリン酸塩 ($\pm 0.1\%$)	-	-	-	-	+	-
DX-321	Ac-AEGTGDRNMCKFSWIRSPAFCARA-		0.9	9	N.A.	84	75	N.A.
	DPE-X-K-NH ₂ (配列番号:37)							
	フルオレセイン		30	>200	N.A.	>200	>200	N.A.
Cyt	X-GAQQHTVEK-NH ₂ (配列番号:38)		335	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

-X- = 6-アミノヘキサ酸; K または X (太字) = フルオレセイン標識の部位; -NH₂ = C-末端アミド;

N.A. = アッセイせず.

10

【 0 1 2 6 】

受動的に吸着されたタンパク質の選択は、プラスチックに結合させた場合にのみ存在するタンパク質型へのファージ結合体を選択することがあるため (Nordeら, J. Biotechnol., 79: 259-268 (2000))、ビオチン化HSA (bioHSA) および磁性ストレプトアビジンビーズを用いて別の選択を行なった。特に、その環境 (pH、塩、温度) の関数としてコンホメーションが変化するタンパク質、例えば、HSAは、プラスチック表面上に固定化されると、しばしば異なるコンホメーションを採用することがわかっている。この選択では、磁性ストレプトアビジンビーズの15分間添加による、HSA結合ファージ捕捉前に、溶液中でファージライブラリーとともに1時間bioHSAをインキュベートした。先の選択の場合のように、すべてのインキュベーションは、PBS、0.1%カプリル酸ナトリウム、および0.1% Tween-20界面活性剤中で行なった。しかしながら、最初の選択とは異なり、ライブラリーはプールされず、TN6/6およびTN12/1ライブラリーが、この溶液相捕捉プロトコルを用いて別々に選択された。これらの選択の各々から、数個の陽性単離物を、ELISA作業から同定した (図2および3、表1)。TN6/6スクリーニングから、ファージ298は、最大ELISA結合シグナルを示したが、TN12/1スクリーニングではファージ321が最大シグナルを示した。

20

30

【 0 1 2 7 】

一旦、すべての陽性ファージ単離物をシーケンシングした後、ディスプレイペプチドに対応するペプチドを合成した。各改変アミノ酸配列領域の周囲の少量の一定のファージ配列を保持し、-GGGK-NH₂ (配列番号: 24) アミノ酸配列または-X-K-NH₂ C末端テイル (式中、Xは6-アミノヘキサ酸であり、かつK-NH₂はアミド化末端リジン残基である) のいずれかを、各ペプチドに添加した。これらの残基はしばしば標的結合においてある役割を果たし得るので、一定のファージ配列を保持した。HSAに対するその親和性を調べるため、各ペプチドのC末端リジン側鎖をフルオレセインで標識した。蛍光異方性を用い、各ペプチドの親和性を、PBS、0.1%カプリル酸ナトリウム、0.01% Tween-20界面活性剤において測定した。表1に示すように、この条件下ではDX-232のみが10 μ M未満のK_Dを有した。また、ペプチドのほとんどが、PBS中における結合に関してカプリン酸塩に対する劇的な依存性を示さなかった。スクリーニングバッファー (カプリン酸塩ありまたはなし) 中におけるHSAに対するペプチド親和性のほとんどが期待より低かったので、各ペプチドのHSA結合をある範囲のpH、塩濃度 (± 0.14 M NaCl) および $\pm 1\%$ カプリン酸塩で評価した。ペプチドの多くは低pH (例えば、3mMリン酸塩、pH 6.2) および塩の非存在下 (例えば、NaCl添加なしのバッファーのみ) で、より良好に結合した (表1)。HSAが異なるpH条件下で劇的な構造変化を受けることも観察されている (Luikら, Spectrochim. Acta A Mol. Bio mol. Spectrosc., 54A: 1503-1507 (1998))。HSAはまた、この同じバッファー中で、遊離フルオレセインに30 μ MのK_Dで結合したので、これを、HSAに特異的な結合体と本実験の

40

50

目的にあまりにも非特異的であるとみなされる結合体とを識別するための実質的な標準として使用した。

【 0 1 2 8 】

pH 6.2では、塩濃度が0.14Mに増加するにつれてHSAに対するペプチド親和性は低下することが表1に示されたデータから明らかである。DX-232、DX-236およびDX-321は、塩の非存在下、pH 6.2で5 μ M未満の K_D 値を有し、塩濃度が140mMまで増加するにつれて K_D において10倍を超える増加を示さなかった唯一のペプチドであった(表1)。塩の非存在下、pH6.2でのDX-236およびDX-321によるHSA結合に対する異方性測定のグラフをそれぞれ図4および5に示す。詳細に検討することにより、DX-236 K_D は、140mM NaClまで滴定すると、約1.9から約8.7 μ Mまで直線的に増加することが明らかになった。(図6の白データ点参照)。対照的に、DX-321 K_D は、10mM NaClを添加すると、約0.9から約9 μ Mまで急激に増加した(図6の黒データ点参照)。DX-236は、塩に対してこのような劇的な感受性を示さないの

10

【 0 1 2 9 】

DX-236ペプチドによるHSA結合の塩およびpH依存性の調査の他に、該ペプチドの切断型バリエーションを合成してDX-236ペプチド内の最小HSA結合部位を調べた。結果を表2にまとめる。

【 0 1 3 0 】

【表 2】

20

表2. DX-236 の切断型ポリペプチドの K_D

ポリペプチド	K_D (μ M)	配列 番号
Ac-AEGTGDFWFC <u>CDRIA</u> WYPQHLC <u>EF</u> LDPEGGGK-NH ₂	1.9	19
Ac-FWFC <u>CDRIA</u> WYPQHLC <u>EF</u> LDPEGGGK-NH ₂	8.9	39
Ac- <u>CDRIA</u> WYPQHLC <u>EF</u> LDPEGGGK-NH ₂	8.7	40
Ac-AEGTGDFWFC <u>CDRIA</u> WYPQHLC <u>EF</u> LGGGK-NH ₂	9.9	41
Ac-AEGTGDFWFC <u>CDRIA</u> WYPQHLC <u>CG</u> GGK-NH ₂	8.9	42
Ac- <u>CDRIA</u> WYPQHLC <u>CG</u> GGK-NH ₂	16.0	43
Ac-DRIA <u>WYPQH</u> LG <u>GG</u> K-NH ₂	125	44

30

【 0 1 3 1 】

解析(表2)から、C末端およびN末端隣接配列の存在は、HSA標的に対する結合ペプチドの親和性を向上させると思われた。C-またはN末端アミノ酸単独の切断では、 K_D において約4倍の増加がもたらされた(表2の配列番号:39~42参照)。C-およびN-末端の両方の切断は、 K_D において約8倍の増加がもたらされた(表2の配列番号:19および配列番号:43参考)。隣接システインのないコア配列(配列番号:44)は、最小結合親和性(K_D 125 μ M)を示した。これらのデータは、拘束構造が高親和性でのHSAへの結合を許容するという概念に一致する。

40

【 0 1 3 2 】

K_D 測定に基づいて(表1)、DX-232、DX-236およびDX-321結合ペプチドをアフィニティークロマトグラフィー開発のために調査(pursue)した。各ペプチドを、先に概略を述べた手順を用い、NHS-セファロース樹脂上に高密度で固定化した。ペプチドを、蛍光異方性測定においてフルオレセイン標識に使用したのと同じC末端リジンにより固定化した。定量的アミノ酸解析で測定すると、DX-321-セファロース、DX-236-セファロースおよびDX-2

50

32-セファロースカラムでのリガンド密度は、それぞれ、3.2、0.8および2.4 $\mu\text{mol/ml}$ であった。各カラムを、結合バッファー：3mMリン酸ナトリウム、0.1% Tween-20界面活性剤、pH 6.2中でのHSA結合（1mg注入）について試験した。該ペプチドの一部は、pHが9.1まで増加するにつれて K_D の急激な増加を示したので（表1）、100mM Tris、pH 9.1バッファーは、これらのカラムからHSAを効果的に溶出すると推測された。

【0133】

各カラムは、初期HSA結合試験において異なる性能を示した。可溶性ペプチドDX-232は最も高い親和性でHSAを結合したが、セファロースカラム上に固定化されたDX-232は検出可能なHSAを捕捉しなかった。他方において、DX-236-セファロースは最も良好な性能を示し、1mgの注入物すべて（全容量 2.7mg/ml）を定量的に結合した（以下の表3参照）。

10

【0134】

【表3】

表3. HSA アフィニティーカラムの解析

アフィニティーカラム内のペプチド	画分	$\mu\text{g HSA}$	% 初期負荷	全容量
DX-321	通過	554	55.4	
	溶出	370	37.0	>1.1 mg/ml
DX-236	通過	0	0	
	溶出	947	94.7	$\geq 2.7 \text{ mg/ml}$

20

【0135】

高HSA負荷では、同じDX-236カラムは、11mg/mlより大きな全容量に相当する少なくとも4mgのHSAを結合することができた（データ示さず）。DX-321-セファロースは、中程度の性能を示し、全物質の一部（全容量 > 1.1mg/ml）に結合した。Tris溶出バッファーは、DX-236-およびDX-321-セファロースカラム両方に由来するすべての結合HSAを溶出した。

【0136】

単離したHSA結合体の種特異性

他のアルブミンに関してDX-236およびDX-321のHSAに対する結合特異性を試験するため、3mMリン酸ナトリウム、pH 6.2およびPBS（10mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、PH 7.4）の両方における一群の哺乳動物アルブミンに対するその解離定数（ K_D ）を調べた。結果を表4に示す。

30

【0137】

【表4】

表4. アフィニティーカラムの種特異性データ

種	pI	ヒトに対する同一性 %	DX-236 リン酸塩, pH 6.2, 0 M NaCl	DX-236 PBS, pH 7.4, 0.14 M NaCl	DX-321 リン酸塩, pH 6.2, 0 M NaCl	DX-321 PBS, pH 7.4, 0.14 M NaCl
			K _D (μM)	K _D (μM)	K _D (μM)	K _D (μM)
ヒト	5.67	100	1.9	11.0	0.9	84
アカゲザル	5.67	93.2	1.1	23	38	82
ウシ	5.60	75.6	1.1	13.3	21	>200
ヤギ	N.D.	N.D.	1.6	23	95	83
ブタ	5.75	75.0	0.5	12	21	>200
ウサギ	5.65	75.0	0.5	18	32	>200
ラット	5.80	73.2	1.6	25	23	117
マウス	5.53	72.0	5.5	32	>200	>200
ニワトリ (卵)	5.19	N.D.	>200	>200	>200	>200

N.D. = 測定せず

【0138】

3mMリン酸塩、pH 6.2バッファー中では、標識DX-236は、マウス血清アルブミン (MSA) 以外の試験したすべてのアルブミンに高親和性で結合した。PBS中では、すべてのK_D値が低塩、pH 6.2条件での場合よりも高かった以外は、DX-236について同じ親和性傾向があるようであった。

【0139】

標識DX-321は、低塩、pH 6.2バッファー中において、HSAと比べてかなり高いK_Dで各哺乳動物アルブミンと結合した。特に、MSAは、マイクロモル未満のK_DでDX-321と結合したHSAと比べて、200 μMより大きなK_DでDX-321と結合した。また、その他のすべての非ヒトアルブミンもDX-321と弱く結合し、HSAよりも少なくとも10倍大きいK_D値を有した。しかしながら、PBSでは、HSAとその他のDX-321親和性の差は、pH 6.2での結果と比べるとあまり明白ではなかった。また、陰性対照として各ペプチド (DX-236およびDX-321) を、両セットのバッファーにおけるニワトリオボアルブミンに対する結合についても試験し、いずれのペプチドも有意な結合を示さないことがわかった (表4)。ニワトリオボアルブミンは、配列アラインメント解析で測定する場合、HSAに相同でない。この解析は、pH 6.2バッファーにおいて、固定化DX-236は他の哺乳動物アルブミンを精製するのに使用され得るがDX-321は異なる哺乳動物アルブミンに対して示差的結合を示し得ることを示した。

【0140】

この性質を実証するため、pH 6.2バッファーにおいて、同じDX-236-およびDX-321-セファロースカラムを、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヤギ血清アルブミン (GSA) およびマウス血清アルブミン (MSA) に対して試験した。1mgの各種のアルブミンを、予め3mMリン酸塩、pH 6.2、0.01% Tween-20で平衡化しておいた各カラム (0.35ml) に注入した。カラムを平衡バッファーで洗浄し、次いで、100mM Tris、pH 9.1で (流速、1ml/min) 溶出した。以下の表5に示すように、DX-236-セファロースは、HSAと同様に、すべての3種のアルブミンを定量的に捕捉した。

【0141】

【表5】

表5. DX-236 および DX-321 を用いた哺乳動物血清アルブミン試験

アルブミン	タンパク質 負荷	DX-236 カラム		DX-321 カラム	
		FT (mg)	溶出 (mg)	FT (mg)	溶出 (mg)
ウシ	1 mg	0	0.72	0.86	0.15
ヤギ	1 mg	0	0.79	0.93	0.11
マウス	0.5 mg	0.05	0.59	0.49	0.13

FT = 通過

10

【0142】

Cibacron Blueセファロース樹脂は、すべての哺乳動物アルブミンを等しく良好に結合するわけではないので (Mahanyら、Comp. Biochem. Physiol., 68B: 319-323 (1981))、DX-236-セファロースが、血清由来のほぼすべての哺乳動物アルブミンの親和性精製のための「パン(pan)-アルブミン」結合体として有用であることが証明されるべきである。これらの結果は、DX-236もまた、他の分析の前に血清試料からアルブミンを枯渇させるために使用され得ることを示す。しかしながら、このDX-236リガンドカラムは、例えば、トランスジェニック哺乳動物発現系において他の非ヒト哺乳動物血清アルブミンからマウス乳において発現されたHSAなどのHSAを精製するのに使用することはできなかった。しかしながら、この結果はまた、DX-236が、限定されないが、組み換え家禽 (例えば、組み換えニワトリ卵白)、組み換え細菌種、*Pichia pastoris* および *Saccharomyces cerevisiae* などの組み換え真菌種ならびにタバコおよびジャガイモなどの種々の葉または塊茎植物種などの、他の哺乳動物アルブミンを欠く組み換え系においてHSAを精製するのに使用され得ることを示す。

20

【0143】

表5に示すデータはまた、表4に示される溶液親和性データに基づいて予期した通り、DX-321-セファロースが3種の非ヒトアルブミンをあまり良好に捕捉しないことを示す。3種の非ヒトアルブミンのうち、BSAは、最も効果的にDX-321-セファロース樹脂により捕捉された。出発物質中に存在するBSAの約15%が捕捉され、続いて、DX-236-セファロース樹脂の定量的捕捉を可能にする同じクロマトグラフィー条件下で溶出した。ヤギ血清アルブミン (GSA) およびマウス血清アルブミン (MSA) は、BSAよりもいっそう低い効果性でDX-321-セファロースカラムにより捕捉された。したがって、DX-321-セファロースカラムは、非ヒト血清アルブミンを含有する溶液からHSAを精製するのに有利に使用され得る。

30

【0144】

血清からのHSAの精製

HSAを、分取DX-236-セファロースカラム (10ml、0.3 μmol/ml) を用いて血清から精製した。カラムおよび血清試料の両方を3mMリン酸ナトリウム、20mM NaCl、0.1% Tween-20、pH 6.2に交換した。カラムへの非特異的タンパク質結合を最小にするため、20mM NaClを結合バッファーに添加した。100 μlのアリコート (約 5mg HSA) を、透析で使用したものと同一バッファーにて予め平衡化しておいたDX-236-セファロースカラムに負荷した。20~44mMの塩勾配を行ない、次いで、HSAを100mM Tris、pH 9.1で溶出した。精製処理の結果を表6に示す。

40

【0145】

【表6】

表6. DX-236 セファロースアフィニティーカラムを用いる HAS の精製

画分	μg HSA	初期に対する%
初期負荷	4805	100
通過	565	12
洗浄/勾配	88	1.8
溶出	4003	83
合計	4656	96.8

10

【0146】

表6に示すように、カラムは、0.1ml血清インジェクション（合計約5mg HSA）中の本質的にすべてのHSAを結合し、100mM Tris、pH 9.1での洗浄により本質的にすべての結合HSAを放出した（表6）。最終精製物は、逆相クロマトグラフィーおよびSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の両方により99%を超える純度であった。精製された物質を、Cibacron Blueセファロースカラムを用いて精製したHSAと比べ、より高純度であることがわかった（図7Aおよび7B参照）。

20

【0147】

シトクロムC由来HSA結合ペプチドとの比較

HSAを精製するためにCibacron Blueセファロースを用いることに加えて、Pingaliら（J. Mol. Reconit., 9: 426-436（1996））は、最初にAdamsら（J. Inorg. Biochem., 37: 91-103（1989））により特徴付けられたペプチドのCysからGlyへの（下線部の残基）変異体である固定化シトクロムc由来ペプチドGAQGH^uVEK（配列番号：45）のHSA精製特性を報告した。彼らの研究では、単一C末端6-アミノヘキサン酸リンカーを用い、本研究においてDX-236-セファロースについて使用したリガンド密度（約0.3~0.8 μmol/ml）よりも100倍を超えて高い93 μmol/g樹脂のペプチド負荷で、POROS-アミン樹脂（Applied Biosystems）上で線状ペプチドを直接合成した。

30

【0148】

Pingaliらのシトクロムc由来変異ペプチドの親和性は報告されなかったので、フルオレセイン標識ペプチドを合成した。このペプチドは、同じバッファー中でのDX-236 K_Dより100倍を超えて大きい約335 μMのK_DでHSAに弱く結合する（表1）。高リガンド密度で固定化されたPingaliらのペプチドは、ヒト血清由来のHSAを効果的に結合する。本明細書に記載のDX-236 HSA結合部分は、シトクロムcペプチドと比べてずっと高い親和性で結合する。しかもPingaliらのシトクロムc由来ペプチドを用いて調製したカラムと同じレベルの性能を得るのに必要とされるクロマトグラフィーカラム上のDX-236結合部分はかなり少ない。

40

【0149】

実施例2. DX-236のアラニンスキャン

一連のアラニン変異体を、DX-236ポリペプチド（配列番号：19）に基づいて、固相合成（Advanced Chemtech, Inc.）により合成した：

【0150】

ポリペプチド配列

配列番号:

Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCEFLAPEGGGK-NH ₂ ,	113	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCEFADPEGGGK-NH ₂ ,	114	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCEALDPEGGGK-NH ₂ ,	115	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCAFLDPEGGGK-NH ₂ ,	116	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQHACEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	117	10
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPQALCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	118	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYPAHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	119	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWYAQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	120	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAWAPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	121	
Ac-AEGTGDFWFCDRIAAYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	122	
Ac-AEGTGDFWFCDRAAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	123	
Ac-AEGTGDFWFCDAIAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	124	20
Ac-AEGTGDFWFCARIAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	125	
Ac-AEGTGDFWACDRIAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	126	
Ac-AEGTGDFAFCDRIAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	127	
Ac-AEGTGDAWFCDRIAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	128	
Ac-AEGTGAFWFCDRIAWYPQHLCEFLDPEGGGK-NH ₂ ,	129	

【0151】

30

ポリペプチドのそれぞれをフルオレセイン標識 (fluoresceinate) し、上述のようにして固定化HSA標的に対する結合について試験した。3mMリン酸塩バッファー、pH 6.2、塩なし中、およびPBS中での解離定数 (K_D) を測定し、PBS解離定数を用い、DX-236 (配列番号: 19) の値と比較して結合親和性を推測した。「+」はDX-236と比べて約25%高い親和性結合を示し、「++」は約50%高い親和性を示し、「-」は約25%低い親和性を示す。

【0152】

結果を表7に示す。

【0153】

【表7】

表7: DX-236のアラニン変異体の解離定数			
配列番号:	K _D (μM) pH 6.2	K _D (μM) PBS	結合
19	1.7	35.0	
113	1.7	10.5	++
114	2.1	47.0	-
115	1.7	44.0	-
116	1.7	6.6	++
117	2.0	34.5	
118	1.7	4.2	++
119	2.2	22.5	+
120	1.3	43.0	
121	1.4	26.0	+
122	1.4	44.0	-
123	1.1	4.5	++
124	1.5	17.5	++
125	1.6	5.0	++
126	1.1	43.0	
127	2.3	36.5	
128	5.1	26.5	
129	5.1	27.0	

10

20

【0154】

驚いたことに、アラニン変異ポリペプチドの多くがDX-236ペプチド（配列番号：19）より高い親和性でHSAと結合した。配列番号：113、116、118、123、124および125は、DX-236より少なくとも50%高い親和性でHSAと結合した（DX-236のK_Dの0.5倍）。

30

【0155】

実施例3: さらにHSA結合ポリペプチドの選択

実施例1の手順に従って、能動固定化HSAビーズに対してTN6/6、TN10/9およびTN12/1ライブラリーを選択した。また、HSAビーズ標的に対してさらにライブラリー：TN8/9、TN9/4および線状ライブラリーLin20を選択した。

【0156】

TN8/9ライブラリーを、14-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループを示すように構築した。TN8/9ライブラリーを、Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Cys-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄（配列番号：235）の鑄型配列を利用した。鑄型内の1、2、3、5、6、7、8、9、10、12、13および14位のアミノ酸を、システイン（Cys）を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

40

【0157】

TN9/4ライブラリーを、15-アミノ酸鑄型に含有される単一微小タンパク質結合ループを示すように構築した。TN9/4ライブラリーを、鑄型配列Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Cys-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅（配列番号：236）を利用した。鑄型内の1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、13、14および15位のアミノ酸を、システイン（Cys）を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

【0158】

50

Lin20ライブラリーを、20-アミノ酸鑄型内に単一線状ペプチドを示すように構築した。鑄型の各位でのアミノ酸を、システイン(Cys)を除く任意のアミノ酸が可能となるように改変した。

【0159】

ファージ単離物を取り出し、自動でシーケンシングした。同定された配列および測定した K_D 値を表8に示す。

【0160】

【表8】

表 8.

配列 番号:	アミノ酸配列
	TN12/1
187	LRDCQTTWPFTMMQCPNN
188	NRECVTMWPFQIFCPWP
189	LRSCFTYYPFPTTFSCSPA
190	LSHCWTKFPFDLVWCDSP
191	LRMCVSYWPHFVPVCENP
192	LRDCYISFPFDQMYCSHF
193	FRHCSVQYPFEVVCPAN
194	LRNCWTQYPFDHSTCSPN
195	DSMCITWPFKRPWPCAN *
196	AFMCISWPFEMPFCSPD
197	DSMCITWPFKRPWPCANP
198	WDLCITYPFHEMFPCEDG
199	GGECITWPFQTSYPCTNG
200	RNMCKFSWIRSPAFCARA
201	FSLCWIVDEEDGTKWCLP *
202	RWFCDSAYWQEIPACARD
203	RWYCLWDPMLCMSD *
204	AWYCEHPYWTEVDKCHSS
205	SDFCDTPYWRDLWQCNSP
206	LPWCQLPYMSTPEFCIRP
207	YHVCGRGFDKESIYCKFL
208	SFCVITYIGTWETVCKRS *
209	NDGCTDTNWSWMFDCPPL

10

20

30

210	WRDCTLEIGTWVFCCKGS
211	SPYCKIALFQHFVCAAD
212	RHWCIKLYGLGHMYCNRS
213	DHACEMQSIIPWWECPH
214	PRSCVEKYYWDLICGFF
215	FHTCPHGRYSMFPCDYW *
216	HGWCNVRWTDTPYWCAFS
217	YRVCTYDPIADLLFCPFN
	TN10/9
218	RSFCMDWPNHRDCDYS
219	FWDCFP IHLTMFCDRF
220	YLYCQTSFTNYWCAFH
	TN9/4
221	GLYCMFEGPDDCAWH
	TN8/9
222	KNFCSWDP IFCGIH
223	KWYCAWDPLVCEIF
224	WTTCHIYDWFCS
225	QWYCLWDFMICGLI
226	QTNCSPPGKTCDKN
227	AICTFWQYWCLEP *
228	FEWCMFELPFCSWP
229	QEGCFSKPDQCKVM
230	LEYCFYQWWGCPHA
231	YQFCTWDP IFCGWH
	TN6/6
232	LWDCWLYDCEGN
233	VHSCDKYGCVNA
234	FEHCSKDTCSGN
	Lin20
136	PTVVQPKFHAFTHEDLLWIF
137	LKSQMVHALPAASLHDQHEL
138	SQVQGTPDLQFTVRDFIYMF

10

20

30

【0161】

*DNA合成過程の間、各サイクルにおいて常に低率の不完全カップリングがある。使用したライブラリーを、単一ヌクレオチドの代わりにトリヌクレオチド(コドン)をカップリングさせることにより構築したので、ライブラリー鑄型DNAは、しばしば、低率の欠失コドン

40

【0162】

これらのさらなるライブラリー選択物からの選択されたHSA結合ポリペプチドを、実施例1のようにして合成、フルオレセイン-標識し、PBS中でのHSAの見かけ K_D を測定するために試験した。それぞれのファージディスプレイライブラリー内のファージ上で発現されるディスプレイペプチドに直に隣接する定常隣接アミノ酸に対応するアセチルN末端ジペプチドおよびC末端ジペプチドを含むようにポリペプチドを合成した。また、C末端-Gly-Gly-Gly-Lys(配列番号:24)を有するポリペプチドを合成した。末端Lys残基をアミド化し

50

た。合成された選択ポリペプチドおよび測定された K_D 値を以下の表9に示す。

【0163】

【表9】

配列番号:	アミノ酸配列	DX-#	K_D (PBS) (μM)
TN12/1			
252	Ac-GDLRDCQTTWPFTMMQCPNNDPGGGK-NH ₂	DX-1002	4
253	Ac-GDNRECVTMWPFQIFCPWDPGGGK-NH ₂	DX-999	12
254	Ac-GDLRSCFTYYPF ^T TFSCSPADPGGGK-NH ₂	DX-1091	>10
255	Ac-GDDSMCITWPFKRPWPCANDPGGGK-NH ₂	DX-1163	42
256	Ac-GDRNMCKFSWIRSPAFCARADPGGGK-NH ₂	DX-321	>10
257	Ac-GDFSLCWIVDEDEG ^T KWCLPDPGGGK-NH ₂	DX-997	>10
258	Ac-GDRWFCDSAYWQEIPACARDDPGGGK-NH ₂	DX-1085	NB
259	Ac-GSDFC ^D TPYWRDLWQCNSPDPGGGK-NH ₂	DX-1087	NB
260	Ac-GDSFCVTYIGTWETVCKRSDPGGGK-NH ₂	DX-1089	>10
261	Ac-GDNDGCTDTNWSWMFDCPPLDPGGGK-NH ₂	DX-1165	>10
262	Ac-GDSPYCKIALFQHFVCAADDPGGGK-NH ₂	DX-1167	>10
263	Ac-GDPRSCVEKYYWDV ^L ICGFFDPGGGK-NH ₂	DX-1169	NB
TN10/9			
264	Ac-GSRSFCMDWPNHRDCDYSAPGGGK-NH ₂	DX-1171	165
TN8/9			
265	Ac-AGKWYCAWDPLVCEIFGTGGGK-NH ₂	DX-1173	>10
266	Ac-AGWTTCHIYDWF ^C SSSGTGGGK-NH ₂	DX-1175	30
267	Ac-AGLEYCFYQWWGCPHAGTGGGK-NH ₂	DX-1177	153
268	Ac-AGYQFCTWDPIFCGWHGTGGGK-NH ₂	DX-1179	185
TN6/6			
269	Ac-GSLWDCWLYDCEGNAPGGGK-NH ₂	DX-1093	>10

「Ac-」はN-末端アセチル化を表す

「-NH₂」はC-末端アミド化を表す

「NB」は有意な結合がないことを表す($K_D > 30 \mu\text{M}$)

【0164】

前記実施例は、マイクロモルレベルの親和性でHSAなどの哺乳動物血清アルブミンと結合する新しい非天然の単離されたペプチドを示す。一旦クロマトグラフィー樹脂上に固定化されると本発明の代表的な血清アルブミン結合ペプチドは、HSAを結合し、穏やかな溶出条件下で放出することができる。特にDX-236-セファローズ親和性樹脂は、ヒト血清から非常に効果的にHSAを捕捉し、最終HSA純度の点でCibacron Blueセファローズ親和性樹脂よりも性能が良好である。したがって、この知見は、高特異性で血清アルブミン標的に結合するペプチドを単離するためのファージディスプレイの能力を強調する。この技術を血清アルブミン用の高特異的親和性媒体の設計に応用し得るだけでなく、先に説明したように、本明細書に記載のようなペプチドおよびかかるペプチドを含有する分子を血清アルブミンが治療または検出プロトコルの標的である場合の治療および診断用途にも使用し得る。

【0165】

前記特許公報および刊行物は、参照により本明細書に取り込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0166】

【図1】図1は、酵素結合免疫固着アッセイ（ELISA）において結合ペプチドDX-232、DX-234、DX-236、およびDX-238を提示するファージ単離物によるヒト血清アルブミン（HSA）への結合（620nmでの吸収）を示す。ファージを3つのファージライブラリーのプール（TN6/6、TN10/9、TN12/1）から以下に記載のように選択した。ファージをカプリル酸塩結合HSA（マイクロタイターアッセイプレートのウェルの表面上に受動的に固定化された）を用いるELISA様式においてHSAに結合する能力についてファージを試験した。固定化されたHSAへのファージの結合を、HRP結合抗M13抗体を添加することにより検出した。TMB基質の添加後、620nmでの吸収を自動化されたプレートリーダーで読み取った。HSAに結合したファージを斜線の入ったバーで示し、対照ウェル（HSAなし）を白バーで示す。

10

【図2】図2は、酵素結合免疫固着アッセイ（ELISA）において結合ペプチドDX-232、DX-234、DX-236、およびDX-238を提示するファージ単離物によるヒト血清アルブミン（HSA）への結合（620nmでの吸収）を示す。ファージを以下に記載のようにTN6/6ファージライブラリーから選択した。ファージを、カプリル酸ピオチン化HSA（マイクロタイターアッセイプレートのストレプトアビジン被覆ウェル上に固定された）を用いるELISA様式でHSAに結合する能力について試験した。固定化HSAへのファージの結合は、HRP-結合抗M13抗体を用いる図1と同様であった。TMB基質の添加後、620nmでの吸収を自動化されたプレートリーダーを用いて読み取った。HSAに結合したファージを斜線の入ったバーで示し；対照ウェル（ストレプトアビジン被覆ウェルのみ、HSAなし）を白バーで示す。

20

【図3】図3は、酵素結合免疫固着アッセイ（ELISA）において結合ペプチドDX-313、DX-315、DX-317、DX-319、およびDX-321を提示するファージによるヒト血清アルブミン（HSA）への結合（620nmでの吸収）を示す。ファージを文章に記載のようにTN12/1ファージライブラリーから選択した。ファージを図に記載のようにHSAに結合する能力について試験した。HSAに結合したファージを斜線の入ったバーで示し；対照ウェル（ストレプトアビジン被覆ウェル、添加HSAなし）を白バーで示す。

【図4】図4は、pH6.2、NaClなしでのHSA濃度（[HSA] μ M）の関数としての蛍光標識HSA結合ポリペプチドDX-236による直接的なHSA結合に関する蛍光異方性（anisotropy）のグラフを示す。

30

【図5】図5は、pH6.2、NaClなしでのHSA濃度（[HSA] μ M）の関数としての蛍光標識HSA結合ポリペプチドDX-321による直接的なHSA結合に関する蛍光異方性のグラフを示す。

【図6】図6は、DX-236（白データ点）に対する、およびDX-321（黒データ点）の濃度の関数としての蛍光異方性から計算された解離定数（ K_D ）のグラフを示す。s

【図7】図7Aおよび7Bは、それぞれ、DX-236セファロースアフィニティークラムおよびCibacron セファロースアフィニティークラムを用いる全ヒト血清から精製されたHSAの逆相HPLC画分において純度を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DYAX CORP.
 Sato, Aaron K.
 5 Ley, Arthur C.
 Cohen, Edward H.
 <120> SERUM ALBUMIN BINDING MOIETIES
 10 <130> DYX-026.2 PCT; DYX-026.2 US
 <150> 60/331,352
 <151> 2001-03-09
 15 <150> 60/292,975
 <151> 2001-05-23 10
 <160> 271
 20 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Thr, Asp, Asn or Trp 20
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Ile, Gln, Asn or His
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 45 <223> Phe, Trp or Ala
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (5)..(5) 30
 <223> Leu, Phe or Ser
 <400> 1
 55 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5
 60 <210> 2

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

5 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (1)..(1)
 <223> Val, Phe, His, Trp, or Asn

<220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala, Lys, Val, or His 10

<220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Trp, Ile, Gly, or Val

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Thr, Asp, Asn, or Trp

30 <220> 20
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 35 <223> Ile, Gln, Asn, or His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (7)..(7)
 <223> Phe, Trp, or Ala

<220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Leu, Phe, or Ser 30

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Leu, Met, or Ile

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Asp, Met, Gln, Ser, or Trp

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 5 <223> Val, Pro, Tyr, or Asp

 <400> 2
 10 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

 <210> 3
 15 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10

 <220>
 20 <223> albumin binding peptide

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 25 <223> Val, Phe, His, Trp, or Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 30 <223> Ala, Lys, Val, or His

 <220> 20
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 35 <223> Trp, Ile, Gly, or Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 40 <223> Thr, Asp, Asn, or Trp

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 45 <223> Ile, Gln, Asn, or His

 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Phe, Trp, or Ala

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 60 <223>

```

    <223> Leu, Phe, or Ser

5    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (16)..(16)
    <223> Leu, Met, or Ile

10   <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (17)..(17)
    <223> Asp, Met, Gln, Ser, or Trp

15   <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (18)..(18)
    <223> Val, Pro, Tyr, or Asp
20

    <400> 3

25   Ala Glu Gly Thr Gly Ser Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
     1          5          10          15

    Xaa Xaa Ala Pro Glu
     20

30   <210> 4
    <211> 12
    <212> PRT
35   <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> albumin binding peptide

40   <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (2)..(2)
    <223> Glu, Asp, Val, or Lys

45   <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (3)..(3)
    <223> Gly, Arg, Thr, Lys, or Phe
50

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (4)..(4)
55   <223> Lys, Ile, Arg, Asp, or Ser

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (5)..(5)
60

```

10

20

30

```

    <223> Asp, Ala, or Trp

    <220>
5   <221> MISC_FEATURE
    <222> (6)..(6)
    <223> Met, Trp, Ala, or Ile

10  <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (7)..(7)
    <223> Ile, Tyr, Asn, or Arg

15  <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (8)..(8)
    <223> Asp, Pro, Arg, or Ser
20  <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (9)..(9)
25  <223> Trp, Gln, Asp, His, Arg, or Pro

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
30  <222> (10)..(10)
    <223> Val, His, Gln, Arg, or Ala

    <220>
35  <221> MISC_FEATURE
    <222> (11)..(11)
    <223> Tyr, Leu, Gln, His, Gly, or Phe

40  <400> 4

    Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
    1           5           10

45  <210> 5
    <211> 18
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

50  <220>
    <223> albumin binding peptide

    <220>
55  <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(1)
    <223> Ala, Phe, Asp, or Arg

60  <220>

```

10

20

30

	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2)..(2)	
	<223> Asp, Trp, or Asn	
5	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3)..(3)	
10	<223> Phe, Asp, Gln, or Met	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(5)	
15	<223> Glu, Asp, Val, or Lys	10
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
20	<222> (6)..(6)	
	<223> Gly, Arg, Thr, Lys, or Phe	
	<220>	
25	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (7)..(7)	
	<223> Lys, Ile, Arg, Asp, or Ser	
	<220>	
30	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (8)..(8)	
	<223> Asp, Ala, or Trp	20
35	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
40	<223> Met, Trp, Ala, or Ile	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (10)..(10)	
45	<223> Ile, Tyr, Asn, or Arg	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (11)..(11)	
50	<223> Asp, Pro, Arg, or Ser	30
	<220>	
55	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (12)..(12)	
	<223> Trp, Gln, Asp, His, Arg, or Pro	
60	<220>	

<221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Val, His, Gln, Arg, or Ala
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Tyr, Leu, Gln, His, Gly, or Phe
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Arg, Glu, Trp, Met, or Ala
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Leu, Phe, Gly, Ala, or Arg
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Tyr, Leu, Pro, Asp, or Ala
 25
 <400> 5
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15
 20
 35 Xaa Xaa
 40 <210> 6
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Ala, Phe, Asp, or Arg
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Asp, Trp, or Asn
 55
 60 <220>

10

20

30

	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9)..(9)	
	<223> Phe, Asp, Gln, or Met	
5	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (11)..(11)	
10	<223> Glu, Asp, Val, or Lys	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (12)..(12)	
15	<223> Gly, Arg, Thr, Lys, or Phe	10
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (13)..(13)	
20	<223> Lys, Ile, Arg, Asp, or Ser	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (14)..(14)	
25	<223> Asp, Ala, or Trp	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (15)..(15)	
30	<223> Met, Trp, Ala, or Ile	20
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (16)..(16)	
35	<223> Ile Tyr, Asn, or Arg	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (17)..(17)	
45	<223> Asp, Pro, Arg, or Ser	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (18)..(18)	
50	<223> Trp, Gln, Asp, His, Arg, or Pro	30
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (19)..(19)	
55	<223> Val, His, Gln, Arg, or Ala	
60	<220>	

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide

 10 <400> 9

 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys
 1 5 10

 15
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 10
 25
 Cys Glu Pro Trp Met Leu Arg Phe Gly Cys
 1 5 10

 30
 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 11
 40
 Cys Asp Gln Trp Phe Cys
 1 5

 45
 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 50 <223> albumin binding peptide
 30
 <400> 12

 Cys Asn Asn Ala Leu Cys
 55 1 5

 <210> 13
 <211> 6
 60 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 13
 Cys Asp His Phe Phe Cys
 1 5
 10
 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 20 <400> 14
 Cys Trp His Phe Ser Cys
 1 5
 25
 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 15
 35 Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn Arg Asp Gln Gln Cys
 1 5 10
 40 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 16
 50 Cys Val Thr Asp Trp Ala Asn Arg His Gln His Cys
 1 5 10
 55 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 60 <223> albumin binding peptide

10

20

30

```

<400> 17
Cys Val Lys Asp Trp Ala Asn Arg Arg Arg Gly Cys
5 1 5 10

<210> 18
<211> 12
10 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> albumin binding peptide
15 <400> 18

Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg Ser Pro Ala Phe Cys
20 1 5 10
10

<210> 19
<211> 31
25 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> albumin binding peptide

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLTATION
20

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> AMIDATION
40

<400> 19

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
45 1 5 10 15

Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
50 20 25 30
30

<210> 20
<211> 29
55 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> albumin binding peptide

60 <220>

```

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> AMIDATION

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group

15

<400> 20

20 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Ser Pro Ala Phe Cys Ala Arg Ala Asp Pro Glu Xaa Lys
 25 20 25

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> variegated display library template

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val,
 Trp o
 r Tyr

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> any amino acid, except Cys

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(8)
 <223> X is any amino acid, except Cys

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(11)
 <223> X is any amino acid, except Cys

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(11)
 <223> X is any amino acid, except Cys

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 5 <223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val,
 Trp,
 and Tyr

10 <400> 21
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

15 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> variegated display library template

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> Asp, Phe, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Trp, and Tyr

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Val,
 Trp,
 35 and Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (5)..(12)
 <223> any amino acid except Cys

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Val,
 Trp,
 50 and Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 55 <223> Asp, Phe, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Trp, and Tyr

<400> 22
 60 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa

	1	5	10	15	
5	<210> 23				
	<211> 18				
	<212> PRT				
	<213> Artificial Sequence				
10	<220>				
	<223> variegated display library template				
	<220>				
	<221> MISC_FEATURE				
	<222> (1)..(2)				
15	<223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Trp, and Tyr				10
20	<220>				
	<221> MISC_FEATURE				
	<222> (3)..(3)				
	<223> any amino acid, except for Cys				
25	<220>				
	<221> MISC_FEATURE				
	<222> (5)..(14)				
	<223> any amino acid, except for Cys				
30	<220>				
	<221> MISC_FEATURE				
	<222> (16)..(16)				20
	<223> any amino acid, except for Cys				
35	<220>				
	<221> MISC_FEATURE				
	<222> (17)..(18)				
40	<223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Trp, Tyr				
	<400> 23				
45	Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa				
	1 5 10 15				
50	Xaa Xaa				30
55	<210> 24				
	<211> 4				
	<212> PRT				
	<213> Artificial Sequence				
60	<220>				
	<223> peptide linker				

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (23)..(23)
 <223> AMIDATION

<400> 26
 10 Ala Glu Gly Thr Gly Ser Phe Lys Ile Cys Asp Gln Trp Phe Cys Leu
 1 5 10 15

15 Met Pro Ala Pro Glu Xaa Lys
 20

10

<210> 27
 20 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 25 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 30 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (22)..(22)
 <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group

20

<220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> AMIDATION

<400> 27
 45 Ala Glu Gly Thr Gly Ser His Val Gly Cys Asn Asn Ala Leu Cys Met
 1 5 10 15

50 Gln Tyr Ala Pro Glu Xaa Lys
 20

30

<210> 28
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

60 <220>

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> AMIDATION
 5

<400> 24
 Gly Gly Gly Lys
 10 1

<210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15

<220>
 <223> albumin binding peptide
 20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> AMIDATION
 30

<400> 25
 20

35 Ala Glu Gly Thr Gly Ser Val Ala Trp Cys Thr Ile Phe Leu Cys Leu
 1 5 10 15

40 Asp Val Ala Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 26
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45

<220>
 <223> albumin binding peptide
 50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group
 60

```

    <223> albumin binding peptide

    <220>
    <221> MOD_RES
5  <222> (1)..(1)
    <223> ACETYLATION

    <220>
10 <221> MISC_FEATURE
    <222> (22)..(22)
    <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group

    <220>
15 <221> MOD_RES
    <222> (23)..(23)
    <223> AMIDATION
                                     10

    <400> 28

Ala Glu Gly Thr Gly Ser Trp Lys Val Cys Asp His Phe Phe Cys Leu
1      5      10      15

25 Ser Pro Ala Pro Glu Xaa Lys

    <210> 29
    <211> 23
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
                                     20

35 <220>
    <223> albumin binding peptide

    <220>
40 <221> MOD_RES
    <222> (1)..(1)
    <223> ACETYLATION

    <220>
45 <221> MISC_FEATURE
    <222> (22)..(22)
    <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group
                                     30

50 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (23)..(23)
    <223> AMIDATION

55 <400> 29

Ala Glu Gly Thr Gly Ser Asn His Gly Cys Trp His Phe Ser Cys Ile
60 1      5      10      15

```

Trp Asp Ala Pro Glu Xaa Lys
 20
 5
 <210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION 10
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> AMIDATION
 25
 <400> 30
 Ala Glu Gly Thr Gly Ser Phe Arg Asn Cys Glu Pro Trp Met Leu Arg
 1 5 10 15
 30
 Phe Gly Cys Asn Pro Arg Ala Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25
 35 20
 <210> 31
 <211> 31
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 50
 <220> 30
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION
 55
 <400> 31
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Ala Asp Phe Cys Glu Gly Lys Asp Met Ile
 1 5 10 15
 60

```

Asp Trp Val Tyr Cys Arg Leu Tyr Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
      20          25          30
5
  <210> 32
  <211> 31
  <212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
    <220>
    <223> albumin binding peptide
15 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (1)..(1)
    <223> ACETYLATION
20
    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (31)..(31)
    <223> AMIDATION
25
    <400> 32
30 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
    1          5          10          15

Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
      20          25          30
35
  <210> 33
  <211> 29
  <212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
    <220>
    <223> albumin binding peptide
45 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (1)..(1)
    <223> ACETYLATION
50
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (28)..(28)
    <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group
55
    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (29)..(29)
60 <223> AMIDATION

```

<400> 33

5 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn
1 5 10 15

10 Arg Asp Gln Gln Cys Trp Gly Pro Asp Pro Glu Xaa Lys
20 25

<210> 34
<211> 29
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> albumin binding peptide 10

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
30 <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group

<220>
<221> MOD_RES 20
35 <222> (29)..(29)
<223> AMIDATION

<400> 34

40 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn
1 5 10 15

45 Arg Asp Gln Gln Cys Trp Ala Leu Asp Pro Glu Xaa Lys
20 25

<210> 35
50 <211> 29 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> albumin binding peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
60 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (28)..(28)
 <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> AMIDATION

15 <400> 35
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Asp Cys Val Thr Asp Trp Ala Asn
 1 5 10 15 10

20 Arg His Gln His Cys Trp Ala Leu Asp Pro Glu Xaa Lys
 20 25

25 <210> 36
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION 20

<220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> AMIDATION

50 <400> 36 30
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Gln Cys Val Lys Asp Trp Ala Asn
 1 5 10 15 15

55 Arg Arg Arg Gly Cys Met Ala Asp Asp Pro Glu Xaa Lys
 20 25

60

```

<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> albumin binding peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION
10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group
15
10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> AMIDATION
20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> AMIDATION
25

<400> 37
Ala Glu Gly Thr Gly Asp Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg
30 1 5 10 15

Ser Pro Ala Phe Cys Ala Arg Ala Asp Pro Glu Xaa Lys
35 20 25
20

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
40
<220>
<223> cytochrome c fragment

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> AMIDATION
45

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> peptide linked 6 aminohexanoic acid group
50
30

<400> 38
Xaa Gly Ala Gln Gly His Thr Val Glu Lys
60 1 5 10

```

5 <210> 39
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 10 <223> albumin binding peptide

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 15 <223> ACETYLATION

 <220>
 <221> MOD_RES 10
 <222> (25)..(25)
 20 <223> AMIDATION

 <400> 39
 25 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

 Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 30 20 25

 <210> 40
 <211> 22 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 40

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 45 <223> ACETYLATION

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 50 <223> AMIDATION 30

 <400> 40
 55 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp
 1 5 10 15

 Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 60 20

<210> 41
 <211> 28
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 15

 <220> 10
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 20 <223> AMIDATION

 <400> 41
 25 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

 30 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Gly Gly Gly Lys
 20 25

 <210> 42 20
 <211> 25
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> variegated display library template
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 45

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 50 <223> AMIDATION 30

 <400> 42
 55 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

 60 Pro Gln His Leu Cys Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 43
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 15

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16) 10
 <223> AMIDATION
 20

 <400> 43
 25 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15

 <210> 44
 30 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide 20

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 40

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> AMIDATION
 45

 <400> 44
 50 Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Gly Gly Gly Lys 30
 1 5 10

 55 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

<223> cytochrome c fragment
 <400> 45
 5 Gly Ala Gln Gly His Thr Val Glu Lys
 1 5

<210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 15 <223> albumin binding peptide
 <400> 46 10

Phe Arg Asn Cys Glu Pro Trp Met Leu Arg Phe Gly Cys Asn Pro Arg
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 30 <223> albumin binding peptide
 <400> 47

Ala Glu Gly Thr Gly Ser Phe Arg Asn Cys Glu Pro Trp Met Leu Arg
 1 5 10 15 20

Phe Gly Cys Asn Pro Arg Ala Pro Glu
 20 25

<210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 45 <223> albumin binding peptide
 <400> 48 30

Val Ala Trp Cys Thr Ile Phe Leu Cys Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220> 60

<223> albumin binding peptide
 <400> 49
 5 Phe Lys Ile Cys Asp Gln Trp Phe Cys Leu Met Pro
 1 5 10

 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 15 <223> albumin binding peptide

 <400> 50
 His Val Gly Cys Asn Asn Ala Leu Cys Met Gln Tyr
 20 1 5 10

 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 30
 <400> 51
 Trp Lys Val Cys Asp His Phe Phe Cys Leu Ser Pro
 35 1 5 10

 <210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 45
 <400> 52
 Asn His Gly Cys Trp His Phe Ser Cys Ile Trp Asp
 50 1 5 10

 <210> 53
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 55
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 53
 60

10

20

30

<210> 57
 <211> 21
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <400> 57

 Ala Glu Gly Thr Gly Ser Asn His Gly Cys Trp His Phe Ser Cys Ile
 1 5 10 15
 15 Trp Asp Ala Pro Glu 10
 20
 <210> 58
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 58
 30
 Ala Asp Phe Cys Glu Gly Lys Asp Met Ile Asp Trp Val Tyr Cys Arg
 1 5 10 15 20
 35 Leu Tyr

 <210> 59
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 45
 <400> 59

 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15 30
 50 Phe Leu

 55
 <210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

5 <400> 60
 Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn Arg Asp Gln Gln Cys Trp
 1 5 10 15

10
 Gly Pro

15 <210> 61
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10

20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 61

25 Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn Arg Asp Gln Gln Cys Trp
 1 5 10 15

30
 Ala Leu

35 <210> 62
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20

40 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 62

45 Asp Trp Asp Cys Val Thr Asp Trp Ala Asn Arg His Gln His Cys Trp
 1 5 10 15

50
 Ala Leu 30

55 <210> 63
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

60 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 63

Asp Trp Gln Cys Val Lys Asp Trp Ala Asn Arg Arg Arg Gly Cys Met
 1 5 10 15

5 Ala Asp

10 <210> 64
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 64

20 Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg Ser Pro Ala Phe Cys Ala
 1 5 10 15

Arg Ala

25

30 <210> 65
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide 20
 <400> 65

35 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Ala Asp Phe Cys Glu Gly Lys Asp Met Ile
 1 5 10 15

40 Asp Trp Val Tyr Cys Arg Leu Tyr Asp Pro Glu
 20 25

45 <210> 66
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide 30
 <400> 66

55 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

60 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25

<210> 67
 <211> 27
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <400> 67

 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn
 1 5 10 15
 15
 Arg Asp Gln Gln Cys Trp Gly Pro Asp Pro Glu
 20 25 10
 20
 <210> 68
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 68
 30
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn
 1 5 10 15
 35 Arg Asp Gln Gln Cys Trp Ala Leu Asp Pro Glu 20
 20
 <210> 69
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 45
 <400> 69

 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Asp Cys Val Thr Asp Trp Ala Asn
 50 1 5 10 15 30

 Arg His Gln His Cys Trp Ala Leu Asp Pro Glu
 20 25
 55
 <210> 70
 <211> 27
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 70
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Asp Trp Gln Cys Val Lys Asp Trp Ala Asn
 1 5 10 15
 10 Arg Arg Arg Gly Cys Met Ala Asp Asp Pro Glu
 20 25
 15 <210> 71
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10
 20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 71
 25 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15
 30 Ser Pro Ala Phe Cys Ala Arg Ala Asp Pro Glu
 20 25
 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 40 <400> 72
 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Ala Cys
 1 5 10
 45 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <400> 73
 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln Ala Leu Cys
 1 5 10
 60

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 74
 10
 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Ala His Leu Cys
 1 5 10

 15 <210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 75
 25 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Ala Gln His Leu Cys
 1 5 10

 30 <210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 76
 40 Cys Asp Arg Ile Ala Trp Ala Pro Gln His Leu Cys
 1 5 10

 45 <210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 50
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 77
 55 Cys Asp Arg Ile Ala Ala Tyr Pro Gln His Leu Cys
 1 5 10

 60 <210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

20

30

<220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 78
 Cys Asp Arg Ala Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys
 1 5 10
 10
 <210> 79
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 79
 20
 Cys Asp Ala Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys
 1 5 10
 25 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 80 20
 35 Cys Ala Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys
 1 5 10
 <210> 81
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> albumin binding peptide
 <400> 81
 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 50 1 5 10 15 30
 Phe Ala
 55
 <210> 82
 <211> 18
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

5 <400> 82
 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15
 10 Ala Leu

15 <210> 83
 <211> 18
 <212> PRT 10
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 83

25 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Ala
 1 5 10 15
 30 Phe Leu

<210> 84
 <211> 18 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 40 <400> 84

Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Ala Cys Glu
 1 5 10 15
 45 Phe Leu

50 <210> 85 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 85

60

Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln Ala Leu Cys Glu
 1 5 10 15

5 Phe Leu

10 <210> 86
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide 10

<400> 86

20 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Ala His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Phe Leu

25

<210> 87
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide 20

35 <400> 87

Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Ala Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

40 Phe Leu

45 <210> 88
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 88

55 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Ala Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

60 Phe Leu

<210> 89
 <211> 18
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

10 <400> 89

Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Ala Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

15 Phe Leu 10

20 <210> 90
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> albumin binding peptide

30 <400> 90

Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ala Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

35 Phe Leu 20

40 <210> 91
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 91

Phe Trp Phe Cys Asp Ala Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 50 1 5 10 15 30

Phe Leu

55 <210> 92
 <211> 18
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 92
 Phe Trp Phe Cys Ala Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15
 10 Phe Leu
 15 <210> 93
 <211> 18
 <212> PRT 10
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 93
 25 Phe Trp Ala Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15
 Phe Leu
 30
 <210> 94
 <211> 18 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 40 <400> 94
 Phe Ala Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15
 45 Phe Leu
 50 <210> 95 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 55 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 95
 60

Ala Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

5 Phe Leu

10 <210> 96
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 96 10

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Ala Pro Glu
 20 25

25 <210> 97
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> albumin binding peptide 20

35 <400> 97

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

40 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Ala Asp Pro Glu
 20 25

45 <210> 98
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide 30

<400> 98

55 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

60 Pro Gln His Leu Cys Glu Ala Leu Asp Pro Glu
 20 25

5 <210> 99
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <400> 99

 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 15
 Pro Gln His Leu Cys Ala Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25 10
 20
 <210> 100
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 100
 30
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 35 Pro Gln His Ala Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu 20
 20 25
 40 <210> 101
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> albumin binding peptide
 <400> 101
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 50 1 5 10 15 30
 Pro Gln Ala Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25
 55
 <210> 102
 <211> 27
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 102
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 10 Pro Ala His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25
 15 <210> 103
 <211> 27
 <212> PRT 10
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 103
 25 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 Ala Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 30 20 25
 <210> 104
 <211> 27 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 104
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Ala
 1 5 10 15
 45 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25
 50 <210> 105 30
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 55 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 105
 60

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Ala Tyr
 1 5 10 15

5 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25

10 <210> 106
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 106

20 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ala Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

25 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25

30 <210> 107
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> albumin binding peptide 20
 <400> 107

40 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Ala Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

45 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25

50 <210> 108
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> albumin binding peptide 30
 <400> 108

60 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Ala Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

65 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25

5 <210> 109
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <400> 109

 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Ala Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 15
 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25 10
 20
 <210> 110
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 110
 30
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Ala Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 35 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu 20
 20
 <210> 111
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 45
 <400> 111
 50 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Ala Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15 30
 55 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25
 <210> 112
 <211> 27
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

5 <400> 112
 Ala Glu Gly Thr Gly Ala Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

10 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu
 20 25

15 <210> 113
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10

20 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION 20

35 <400> 113
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

40 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Ala Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 114
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide 30

<220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

60 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

5 <400> 114
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

10 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Ala Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 115
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 115
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

40 Pro Gln His Leu Cys Glu Ala Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 116
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 60 <221> MOD_RES

10

20

30

<222> (31)..(31)
<223> ACETYLATION

5 <400> 116

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
1 5 10 15

10

Pro Gln His Leu Cys Ala Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20 25 30

15

<210> 117
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

20

<220>
<223> albumin binding peptide

25

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> AMIDATION

20

35

<400> 117

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
1 5 10 15

40

Pro Gln His Ala Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20 25 30

45

<210> 118
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30

50

<220>
<223> albumin binding peptide

55

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION

60

<220>
<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

5 <400> 118
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

10 Pro Gln Ala Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 119
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 119
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

40 Pro Ala His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 120
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 60 <221> MOD_RES

10

20

30

<222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

5 <400> 120
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

10
 Ala Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 121
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 121
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Ala
 1 5 10 15

40
 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 122
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 60 <221> MOD_RES

<222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

5 <400> 122
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Ala Tyr
 1 5 10 15
 10 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 123
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 123
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ala Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 40 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 124
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

60 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
 <223> AMIDATION

5 <400> 124

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Asp Ala Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

10 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 125
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 125

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Phe Cys Ala Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

40 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 126
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 60 <221> MOD_RES

10

20

30

<222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

5 <400> 126
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Trp Ala Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 10 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 127
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 127
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Phe Ala Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15
 40 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 128
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

60 <220>
 <221> MOD_RES

10

20

30

<222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

5 <400> 128
 Ala Glu Gly Thr Gly Asp Ala Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

10 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

15 <210> 129
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <220>
 <221> MOD_RES

25 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> AMIDATION

35 <400> 129
 Ala Glu Gly Thr Gly Ala Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr
 1 5 10 15

40 Pro Gln His Leu Cys Glu Phe Leu Asp Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25 30

45 <210> 130
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

55 <222> (2)..(2)
 <223> Ala, Leu, His, Met, Phe, Ser, or Thr

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)
 <223> Ile, Phe, Pro, Ser, Trp, or Tyr

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Asp, Gln, Glu, Lys, Pro, Trp, or Tyr

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Asp, Gln, Gly, Leu, Pro, or Trp

15 <220> 10
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 20 <223> Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Trp, or Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (7)..(7)
 <223> Gln, Gly, Ile, Phe, Thr, Trp, or Val

<400> 130
 30 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 20

35 <210> 131
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> albumin binding peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (1)..(1)
 <223> Ala, Gln, Leu, Lys, Phe, Trp, or Tyr

<220> 30
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Asn, Gln, Glu, Ile, Thr, or Trp

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Asn, Gly, Phe, Thr, Trp, or Tyr

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala, Leu, His, Met, Phe, Ser, or Thr
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Ile, Phe, Pro, Ser, Trp, or Tyr
 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Asp, Gln, Glu, Lys, Pro, Trp, or Tyr
 15 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Asp, Gln, Gly, Leu, Pro, or Trp
 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Trp, or Tyr
 25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Gln, Gly, Ile, Phe, Thr, Trp, or Val
 30 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Asp, Glu, Gly, Leu, Lys, Pro, or Ser
 35 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Glu, His, Ile, Leu, Lys, Ser, Trp, or Val
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Ala, Asn, His, Ile, Met, Phe, Pro, or Ser
 50 30

<400> 131
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 60

<210> 132
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Ala, Gln, Leu, Lys, Phe, Trp, or Tyr

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4) 10
 <223> Asn, Gln, Glu, Ile, Thr, or Trp

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Asn, Gly, Phe, Thr, Trp, or Tyr
 25

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 30 <223> Ala, Leu, His, Met, Phe, Ser, or Thr

 <220> 20
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (8)..(8)
 <223> Ile, Phe, Pro, Ser, Trp, or Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 40 <223> Asp, Gln, Glu, Lys, Pro, Trp, or Tyr

 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Asp, Gln, Gly, Leu, Pro, or Trp

 50 <220> 30
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Trp, or Tyr
 55

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 60 <223> Gln, Gly, Ile, Phe, Thr, Trp, or Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (14)..(14)
 <223> Asp, Glu, Gly, Leu, Lys, Pro, or Ser

<220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Glu, His, Ile, Leu, Lys, Ser, Trp, or Val

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Ala, Asn, His, Ile, Met, Phe, Pro, or Ser 10

20 <400> 132
 Ala Gly Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

25 Gly Thr

30 <210> 133
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20

35 <220>
 <223> albumin binding peptide

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Gln, Glu, Phe, or Met

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Asp, Pro, or Thr

50 <220> 30
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Ile, Ser, or Trp

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 60 <223> His, Met, Phe or Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (6)..(6)
 <223> Asn, Leu, or Thr

<220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Arg, Asn, His, or Thr

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Arg, Met, Phe, or Tyr 10

20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Asp, Gly, Phe, or Trp

25
 <400> 133

30 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10

<210> 134
 <211> 16
 35 <212> PRT 20
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Arg, Phe, or Tyr
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 50 <223> Arg, Leu, Ser, or Trp 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (3)..(3)
 <223> Asn, Asp, Phe, or Tyr

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE

	<222> (5)..(5)	
	<223> Gln, Glu, Phe, or Met	
5	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (6)..(6)	
	<223> Asp, Pro, or Thr	
10	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (7)..(7)	
	<223> Ile, Ser, or Trp	
15	<220>	10
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (8)..(8)	
20	<223> His, Met, Phe or Pro	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
25	<222> (9)..(9)	
	<223> Asn, Leu, or Thr	
	<220>	
30	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (10)..(10)	
	<223> Arg, Asn, His, or Thr	20
35	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (11)..(11)	
	<223> Arg, Met, Phe, or Tyr	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (12)..(12)	
	<223> Asp, Gly, Phe, or Trp	
45	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (14)..(14)	
50	<223> Ala, Asn, or Asp	30
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
55	<222> (15)..(15)	
	<223> Arg, Phe, Pro, or Tyr	
	<220>	
60	<221> MISC_FEATURE	

<222> (16)..(16)
 <223> Arg, His, Phe, or Ser

5 <400> 134
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

10
 <210> 135
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15
 <220>
 <223> albumin binding peptide 10

20
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Arg, Phe, or Tyr

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Arg, Leu, Ser, or Trp

30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5) 20
 <223> Asn, Asp, Phe, or Tyr

35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 40 <223> Gln, Glu, Phe, or Met

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Asp, Pro, or Thr

50
 <220> 30
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Ile, Ser, or Trp

55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> His, Met, Phe or Pro

60

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
5 <223> Asn, Leu, or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (12)..(12)
<223> Arg, Asn, His, or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
15 <222> (13)..(13)
<223> Arg, Met, Phe, or Tyr 10

<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Asp, Gly, Phe, or Trp

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Ala, Asn, or Asp

30
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
35 <223> Arg, Phe, Pro, or Tyr 20

<220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (18)..(18)
<223> Arg, His, Phe, or Ser

<400> 135
45 Gly Ser Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Pro 30
50 20

<210> 136
<211> 20
55 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> albumin binding peptide

```

<400> 136

Pro Thr Val Val Gln Pro Lys Phe His Ala Phe Thr His Glu Asp Leu
 1 5 10 15

5 Leu Trp Ile Phe
 20

10 <210> 137
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide 10

<400> 137

20 Leu Lys Ser Gln Met Val His Ala Leu Pro Ala Ala Ser Leu His Asp
 1 5 10 15

25 Gln His Glu Leu
 20

30 <210> 138
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20

35 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 138

40 Ser Gln Val Gln Gly Thr Pro Asp Leu Gln Phe Thr Val Arg Asp Phe
 1 5 10 15

Ile Tyr Met Phe
 20

45

<210> 139
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30

50 <220>
 <223> albumin binding peptide

55 <400> 139

Cys Gln Thr Thr Trp Pro Phe Thr Met Met Gln Cys
 1 5 10

60

<210> 140
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 140
 10
 Cys Val Thr Met Trp Pro Phe Glu Gln Ile Phe Cys
 1 5 10
 15 <210> 141 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 141
 25 Cys Phe Thr Tyr Tyr Pro Phe Thr Thr Phe Ser Cys
 1 5 10
 30 <210> 142
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 35 <223> albumin binding peptide
 <400> 142
 40 Cys Trp Thr Lys Phe Pro Phe Asp Leu Val Trp Cys
 1 5 10
 45 <210> 143
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide 30
 50 <400> 143
 55 Cys Val Ser Tyr Trp Pro His Phe Val Pro Val Cys
 1 5 10
 60 <210> 144
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 144
 Cys Tyr Ile Ser Phe Pro Phe Asp Gln Met Tyr Cys
 1 5 10
 10
 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 145
 20
 Cys Ser Val Gln Tyr Pro Phe Glu Val Val Val Cys
 1 5 10
 25 <210> 146
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 146 20
 35 Cys Trp Thr Gln Tyr Pro Phe Asp His Ser Thr Cys
 1 5 10
 40 <210> 147
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> albumin binding peptide
 <400> 147
 50 Cys Ile Thr Trp Pro Phe Lys Arg Pro Trp Pro Cys 30
 1 5 10
 <210> 148
 <211> 12
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 60 <223> albumin binding peptide

<400> 148

Cys Ile Ser Trp Pro Phe Glu Met Pro Phe His Cys
 1 5 10

5

<210> 149
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

15 <400> 149

Cys Ile Thr Trp Pro Phe Lys Arg Pro Trp Pro Cys
 1 5 10

10

20 <210> 150
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> albumin binding peptide

30 <400> 150

Cys Ile Thr Tyr Pro Phe His Glu Met Phe Pro Cys
 1 5 10

20

35 <210> 151
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 151

45 Cys Ile Thr Trp Pro Phe Gln Thr Ser Tyr Pro Cys
 1 5 10

50 <210> 152
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

55 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 152

60 Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg Ser Pro Ala Phe Cys
 1 5 10

<210> 153
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <400> 153

 Cys Trp Ile Val Asp Glu Asp Gly Thr Lys Trp Cys
 1 5 10
 15

 <210> 154
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <400> 154

 Cys Asp Ser Ala Tyr Trp Gln Glu Ile Pro Ala Cys
 1 5 10
 30
 <210> 155
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 40 <400> 155

 Cys Leu Trp Asp Pro Met Leu Cys
 1 5
 45
 <210> 156
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 50 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 156
 55 Cys Glu His Pro Tyr Trp Thr Glu Val Asp Lys Cys
 1 5 10

 <210> 157
 60 <211> 12

10

20

30

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> albumin binding peptide

 <400> 157

 Cys Asp Thr Pro Tyr Trp Arg Asp Leu Trp Gln Cys
 10 1 5 10

 <210> 158
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 20
 <400> 158

 Cys Gln Leu Pro Tyr Met Ser Thr Pro Glu Phe Cys
 25 1 5 10

 <210> 159
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide 20
 35 <400> 159

 Cys Gly Arg Gly Phe Asp Lys Glu Ser Ile Tyr Cys
 1 5 10
 40
 <210> 160
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 160 30
 50
 Cys Val Thr Tyr Ile Gly Thr Trp Glu Thr Val Cys
 1 5 10

 55 <210> 161
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

<223> albumin binding peptide
 <400> 161
 5 Cys Thr Asp Thr Asn Trp Ser Trp Met Phe Asp Cys
 1 5 10

<210> 162
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 15 <223> albumin binding peptide
 <400> 162
 10

Cys Thr Leu Glu Ile Gly Thr Trp Phe Val Phe Cys
 20 1 5 10

<210> 163
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 30
 <400> 163

Cys Lys Ile Ala Leu Phe Gln His Phe Glu Val Cys
 35 1 5 10
 20

<210> 164
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 45
 <400> 164

Cys Ile Lys Leu Tyr Gly Leu Gly His Met Tyr Cys
 50 1 5 10
 30

<210> 165
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide
 55
 <400> 165

60

Cys Glu Met Gln Ser Ile Ile Pro Trp Trp Glu Cys
 1 5 10

5 <210> 166
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 166

15 Cys Val Glu Lys Tyr Tyr Trp Asp Val Leu Ile Cys
 1 5 10 10

20 <210> 167
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 167

30 Cys Pro His Gly Arg Tyr Ser Met Phe Pro Cys
 1 5 10

35 <210> 168
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 168

45 Cys Asn Val Arg Trp Thr Asp Thr Pro Tyr Trp Cys
 1 5 10

50 <210> 169
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 169

60 Cys Thr Tyr Asp Pro Ile Ala Asp Leu Leu Phe Cys
 1 5 10

<210> 170
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 170
 10
 Cys Met Asp Trp Pro Asn His Arg Asp Cys
 1 5 10
 15 <210> 171
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 171
 25 Cys Phe Pro Ile His Leu Thr Met Phe Cys
 1 5 10
 30 <210> 172
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 172
 40 Cys Gln Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Cys
 1 5 10
 45 <210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 50 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 173
 Cys Met Glu Phe Gly Pro Asp Asp Cys
 1 5
 55
 <210> 174
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Artificial Sequence

10

20

30

<220>
 <223> albumin binding peptide
 5 <400> 174
 Cys Ser Trp Asp Pro Ile Phe Cys
 1 5
 10
 <210> 175
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 175
 20
 Cys Ala Trp Asp Pro Leu Val Cys
 1 5
 25
 <210> 176
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 176 20
 35 Cys His Ile Tyr Asp Trp Phe Cys
 1 5
 40
 <210> 177
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 177
 50 Cys Leu Trp Asp Pro Met Ile Cys
 1 5 30
 55
 <210> 178
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60
 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 178
 Cys Ser Pro Pro Gly Lys Thr Cys
 1 5
 5
 <210> 179
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 15 <400> 179
 Cys Thr Phe Trp Gln Tyr Trp Cys
 1 5
 20
 <210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 180
 30
 Cys Met Phe Glu Leu Pro Phe Cys
 1 5
 35
 <210> 181
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 181
 45
 Cys Phe Ser Lys Pro Asp Gln Cys
 1 5
 50
 <210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 55
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 182
 60
 Cys Phe Tyr Gln Trp Trp Gly Cys
 1 5

10

20

30

<210> 183
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 10
 <400> 183

 Cys Thr Trp Asp Pro Ile Phe Cys
 1 5
 15

 <210> 184
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <400> 184

 Cys Trp Leu Tyr Asp Cys
 1 5
 30
 <210> 185
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 40 <400> 185

 Cys Asp Lys Tyr Gly Cys
 1 5
 45
 <210> 186
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 50
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 186
 55 Cys Ser Lys Asp Thr Cys
 1 5

 <210> 187
 60 <211> 18

10

20

30

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> albumin binding peptide

 <400> 187

 Leu Arg Asp Cys Gln Thr Thr Trp Pro Phe Thr Met Met Gln Cys Pro
 10 1 5 10 15

 Asn Asn
 15

 <210> 188
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide

 25 <400> 188

 Asn Arg Glu Cys Val Thr Met Trp Pro Phe Glu Gln Ile Phe Cys Pro
 1 5 10 15

 30 Trp Pro

 35 <210> 189
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 40 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 189

 45 Leu Arg Ser Cys Phe Thr Tyr Tyr Pro Phe Thr Thr Phe Ser Cys Ser
 1 5 10 15

 Pro Ala
 50

 <210> 190
 <211> 18
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 60

10

20

30

<400> 190
 Leu Ser His Cys Trp Thr Lys Phe Pro Phe Asp Leu Val Trp Cys Asp
 1 5 10 15
 5 Ser Pro

10 <210> 191
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide 10

<400> 191
 Leu Arg Met Cys Val Ser Tyr Trp Pro His Phe Val Pro Val Cys Glu
 1 5 10 15
 20 Asn Pro

<210> 192
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 192
 Leu Arg Asp Cys Tyr Ile Ser Phe Pro Phe Asp Gln Met Tyr Cys Ser
 1 5 10 15
 40 His Phe

45 <210> 193
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> albumin binding peptide

55 <400> 193
 Phe Arg His Cys Ser Val Gln Tyr Pro Phe Glu Val Val Val Cys Pro
 1 5 10 15
 60

Ala Asn

5 <210> 194
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 194

15 Leu Arg Asn Cys Trp Thr Gln Tyr Pro Phe Asp His Ser Thr Cys Ser
 1 5 10 15

10

Pro Asn

20
 <210> 195
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 195

35 Asp Ser Met Cys Ile Thr Trp Pro Phe Lys Arg Pro Trp Pro Cys Ala
 1 5 10 15

20

Asn

40 <210> 196
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

45 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 196

30

50 Ala Phe Met Cys Ile Ser Trp Pro Phe Glu Met Pro Phe His Cys Ser
 1 5 10 15

Pro Asp

60 <210> 197
 <211> 18

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 5 <223> albumin binding peptide

 <400> 197

 Asp Ser Met Cys Ile Thr Trp Pro Phe Lys Arg Pro Trp Pro Cys Ala
 10 1 5 10 15

 Asn Pro
 15

 <210> 198
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide

 25 <400> 198

 Trp Asp Leu Cys Ile Thr Tyr Pro Phe His Glu Met Phe Pro Cys Glu
 1 5 10 15
 30
 Asp Gly

 35 <210> 199
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 40 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 199

 45 Gly Gly Glu Cys Ile Thr Trp Pro Phe Gln Thr Ser Tyr Pro Cys Thr
 1 5 10 15

 Asn Gly
 50

 <210> 200
 <211> 18
 55 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 60

10

20

30

<400> 200
 Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg Ser Pro Ala Phe Cys Ala
 1 5 10 15
 5 Arg Ala
 10
 <210> 201
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 201
 20 Phe Ser Leu Cys Trp Ile Val Asp Glu Asp Gly Thr Lys Trp Cys Leu
 1 5 10 15
 25 Pro
 30
 <210> 202
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 35 <223> albumin binding peptide
 <400> 202
 40 Arg Trp Phe Cys Asp Ser Ala Tyr Trp Gln Glu Ile Pro Ala Cys Ala
 1 5 10 15
 Arg Asp
 45
 <210> 203
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <400> 203
 Arg Trp Tyr Cys Leu Trp Asp Pro Met Leu Cys Met Ser Asp
 1 5 10
 60

<210> 204
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 204
 10 Ala Trp Tyr Cys Glu His Pro Tyr Trp Thr Glu Val Asp Lys Cys His
 1 5 10 15
 15 Ser Ser 10
 <210> 205
 20 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> albumin binding peptide
 <400> 205
 30 Ser Asp Phe Cys Asp Thr Pro Tyr Trp Arg Asp Leu Trp Gln Cys Asn
 1 5 10 15 20
 Ser Pro
 35
 <210> 206
 <211> 18
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 45 <400> 206
 Leu Pro Trp Cys Gln Leu Pro Tyr Met Ser Thr Pro Glu Phe Cys Ile
 1 5 10 15 30
 50 Arg Pro
 55 <210> 207
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

<223> albumin binding peptide
 <400> 207

5 Tyr His Val Cys Gly Arg Gly Phe Asp Lys Glu Ser Ile Tyr Cys Lys
 1 5 10 15

Phe Leu
 10

<210> 208
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10

<220>
 <223> albumin binding peptide
 20 <400> 208

Ser Phe Cys Val Thr Tyr Ile Gly Thr Trp Glu Thr Val Cys Lys Arg
 1 5 10 15
 /

Ser
 25

<210> 209
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> albumin binding peptide
 35 <400> 209

Asn Asp Gly Cys Thr Asp Thr Asn Trp Ser Trp Met Phe Asp Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Leu
 45

<210> 210
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <400> 210

Trp Arg Asp Cys Thr Leu Glu Ile Gly Thr Trp Phe Val Phe Cys Lys
 1 5 10 15
 60

Gly Ser

5

<210> 211
 <211> 18
 <212> PRT

10 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

15 <400> 211

Ser Pro Tyr Cys Lys Ile Ala Leu Phe Gln His Phe Glu Val Cys Ala
 1 5 10 15 10

20 Ala Asp

25 <210> 212
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> albumin binding peptide

<400> 212

35 Arg His Trp Cys Ile Lys Leu Tyr Gly Leu Gly His Met Tyr Cys Asn
 1 5 10 15 20

40 Arg Ser

<210> 213
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

50 <400> 213 30

Asp His Ala Cys Glu Met Gln Ser Ile Ile Pro Trp Trp Glu Cys Tyr
 1 5 10 15

55 Pro His

60

<210> 214
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 214
 10 Pro Arg Ser Cys Val Glu Lys Tyr Tyr Trp Asp Val Leu Ile Cys Gly
 1 5 10 15

 15 Phe Phe 10

 <210> 215
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25
 <400> 215

 Phe His Thr Cys Pro His Gly Arg Tyr Ser Met Phe Pro Cys Asp Tyr
 30 1 5 10 15

 Trp 20
 35
 <210> 216
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 216
 45
 His Gly Trp Cys Asn Val Arg Trp Thr Asp Thr Pro Tyr Trp Cys Ala
 1 5 10 15
 50 Phe Ser 30

 55 <210> 217
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 60 <220>

<223> albumin binding peptide
 <400> 217
 5 Tyr Arg Val Cys Thr Tyr Asp Pro Ile Ala Asp Leu Leu Phe Cys Pro
 1 5 10 15
 Phe Asn
 10
 <210> 218
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 20
 <400> 218
 Arg Ser Phe Cys Met Asp Trp Pro Asn His Arg Asp Cys Asp Tyr Ser
 1 5 10 15
 25
 <210> 219
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide 20
 35 <400> 219
 Phe Trp Asp Cys Phe Pro Ile His Leu Thr Met Phe Cys Asp Arg Phe
 1 5 10 15
 40
 <210> 220
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 220 30
 50 Tyr Leu Tyr Cys Gln Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Cys Ala Phe His
 1 5 10 15
 55 <210> 221
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

<223> albumin binding peptide
 <400> 221

5 Gly Leu Tyr Cys Met Glu Phe Gly Pro Asp Asp Cys Ala Trp His
 1 5 10 15

<210> 222
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 222 10

20 Lys Asn Phe Cys Ser Trp Asp Pro Ile Phe Cys Gly Ile His
 1 5 10

<210> 223
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> albumin binding peptide

30 <400> 223

35 Lys Trp Tyr Cys Ala Trp Asp Pro Leu Val Cys Glu Ile Phe
 1 5 10 20

<210> 224
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> albumin binding peptide

45 <400> 224

Trp Thr Thr Cys His Ile Tyr Asp Trp Phe Cys Ser Ser Ser
 1 5 10

50 <210> 225
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> albumin binding peptide

60 <400> 225 30

Gln Trp Tyr Cys Leu Trp Asp Pro Met Ile Cys Gly Leu Ile
 1 5 10

5 <210> 226
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 226

15 Gln Thr Asn Cys Ser Pro Pro Gly Lys Thr Cys Asp Lys Asn
 1 5 10 10

20 <210> 227
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 227

30 Ala Ile Cys Thr Phe Trp Gln Tyr Trp Cys Leu Glu Pro
 1 5 10

35 <210> 228
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 228

45 Phe Glu Trp Cys Met Phe Glu Leu Pro Phe Cys Ser Trp Pro
 1 5 10

50 <210> 229
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 229

60 Gln Glu Gly Cys Phe Ser Lys Pro Asp Gln Cys Lys Val Met
 1 5 10

<210> 230
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 230
 10
 Leu Glu Tyr Cys Phe Tyr Gln Trp Trp Gly Cys Pro His Ala
 1 5 10

 15 <210> 231
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> albumin binding peptide

 <400> 231
 25 Tyr Gln Phe Cys Thr Trp Asp Pro Ile Phe Cys Gly Trp His
 1 5 10

 30 <210> 232
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 35 <223> albumin binding peptide

 <400> 232
 40 Leu Trp Asp Cys Trp Leu Tyr Asp Cys Glu Gly Asn
 1 5 10

 45 <210> 233
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 50 <223> albumin binding peptide
 30
 <400> 233
 55 Val His Ser Cys Asp Lys Tyr Gly Cys Val Asn Ala
 1 5 10

 60 <210> 234
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

5 <400> 234
 Phe Glu His Cys Ser Lys Asp Thr Cys Ser Gly Asn
 1 5 10

10
 <210> 235
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15
 <220>
 <223> variegated display library template 10

20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> any amino acid except Cys

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(10)
 <223> any amino acid except Cys

30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(14)
 <223> any amino acid except Cys 20

35
 <400> 235

40 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

45
 <210> 236
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50
 <220>
 <223> variegated display library template 30

55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> any amino acid except Cys

60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(11)
 <223> any amino acid except Cys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (13)..(15)
 <223> any amino acid except Cys

<400> 236

10 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

15 <210> 237
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 10

20 <220>
 <223> variegated display library template

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (1)..(1)
 <223> any amino acid except Cys, Glu, Ile) Lys, Met, and Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> any amino acid except Cys

30 <220> 20
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(8)
 <223> any amino acid except Cys

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(11)
 <223> any amino acid except Cys

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 50 <223> any amino acid except Cys, Glu, Ile) Lys, Met, and Thr 30

<400> 237

55 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

60 <210> 238
 <211> 16

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

5 <220>
  <223> variegated display library template

  <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (1)..(2)
10 <223> Asp, Phe, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Trp, or Tyr

  <220>
  <221> MISC_FEATURE
15 <222> (3)..(3)
  <223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val,
  Trp,
  or Tyr
  10

20 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (5)..(12)
25 <223> any amino acid except Cys

  <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (14)..(14)
30 <223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val,
  Trp,
  or Tyr
  20

35 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (15)..(16)
  <223> Asp, Phe, His, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Trp, or Tyr

40 <400> 238

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

45 <210> 239
  <211> 12
  <212> PRT
50 <213> Artificial Sequence
  30

  <220>
  <223> albumin binding peptide

55 <400> 239

Val Ala Trp Cys Thr Ile Phe Leu Cys Ieu Asp Val
1 5 10

60

```

<210> 240
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 240
 10 Phe Lys Ile Cys Asp Gln Trp Phe Cys Leu Met Pro
 1 5 10
 15 <210> 241
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 241
 25 His Val Gly Cys Asn Asn Ala Leu Cys Met Gln Tyr
 1 5 10
 30 <210> 242
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 242
 40 Trp Lys Val Cys Asp His Phe Phe Cys Leu Ser Pro
 1 5 10
 45 <210> 243
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 243
 50 Asn His Gly Cys Trp His Phe Ser Cys Ile Trp Asp
 1 5 10
 55
 60 <210> 244
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

20

30

<220>
 <223> albumin binding peptide

5 <400> 244

Phe Arg Asn Cys Glu Pro Trp Met Leu Arg Phe Gly Cys Asn Pro Arg
 1 5 10 15

10
 <210> 245
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15
 <220>
 <223> albumin binding peptide 10
 <400> 245

20
 Ala Asp Phe Cys Glu Gly Lys Asp Met Ile Asp Trp Val Tyr Cys Arg
 1 5 10 15

25 Leu Tyr

30
 <210> 246
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

35
 <220> 20
 <223> albumin binding peptide
 <400> 246

40
 Phe Trp Phe Cys Asp Arg Ile Ala Trp Tyr Pro Gln His Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Asp

45

50
 <210> 247
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide

55 <400> 247

Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn Arg Asp Gln Gln Cys Trp
 1 5 10 15

60

Gly Pro

5 <210> 248
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 248

15 Asp Trp Asp Cys Val Thr Arg Trp Ala Asn Arg Asp Gln Gln Cys Trp 10
 1 5 10 15

Ala Leu

20

25 <210> 249
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 249

35 Asp Trp Asp Cys Val Thr Asp Trp Ala Asn Arg His Gln His Cys Trp 20
 1 5 10 15

Ala Leu

40

45 <210> 250
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> albumin binding peptide
 <400> 250 30

55 Asp Trp Gln Cys Val Lys Asp Trp Ala Asn Arg Arg Arg Gly Cys Met
 1 5 10 15

Ala Asp

60 <210> 251
 <211> 20

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

5 <220>
  <223> albumin binding peptide

  <400> 251

10 Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg Ser Pro Ala Phe Cys Ala
   1           5           10           15

   Arg Ala Asp Pro
   15           20

   <210> 252
   <211> 26
   <212> PRT
20 <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> albumin binding peptide

25 <220>
   <221> MOD_RES
   <222> (1)..(1)
   <223> ACETYLATION

30

   <220>
   <221> MOD_RES
   <222> (26)..(26)
   <223> AMIDATION
35

   <400> 252

40 Gly Asp Leu Arg Asp Cys Gln Thr Thr Trp Pro Phe Thr Met Met Gln
   1           5           10           15

   Cys Pro Asn Asn Asp Pro Gly Gly Gly Lys
   20           25

45

   <210> 253
   <211> 26
   <212> PRT
50 <213> Artificial Sequence

   <220>
   <223> albumin binding peptide

55 <220>
   <221> MOD_RES
   <222> (1)..(1)
   <223> ACETYLATION

60

```

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 253
 Gly Asp Asn Arg Glu Cys Val Thr Met Trp Pro Phe Glu Gln Ile Phe
 10 1 5 10 15

Cys Pro Trp Pro Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 15 20 25

<210> 254
 <211> 26
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION

<400> 254
 Gly Asp Leu Arg Ser Cys Phe Thr Tyr Tyr Pro Phe Thr Thr Phe Ser
 40 1 5 10 15

Cys Ser Pro Ala Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 45 20 25

<210> 255
 <211> 25
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

60

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 255
 Gly Asp Asp Ser Met Cys Ile Thr Trp Pro Phe Lys Arg Pro Trp Pro
 10 1 5 10 15
 Cys Ala Asn Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 15 20 25
 <210> 256 10
 <211> 26
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 30 <220>
 <221> MOD_RES 20
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION
 35 <400> 256
 Gly Asp Arg Asn Met Cys Lys Phe Ser Trp Ile Arg Ser Pro Ala Phe
 40 1 5 10 15
 Cys Ala Arg Ala Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 45 20 25
 <210> 257
 <211> 25
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 257
 10 Gly Asp Phe Ser Leu Cys Trp Ile Val Asp Glu Asp Gly Thr Lys Trp
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 20 25
 15

<210> 258
 <211> 26
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION

35
 <400> 258
 40 Gly Asp Arg Trp Phe Cys Asp Ser Ala Tyr Trp Gln Glu Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Cys Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 20 25
 45

<210> 259
 <211> 26
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

60

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 259
 Gly Asp Ser Asp Phe Cys Asp Thr Pro Tyr Trp Arg Asp Leu Trp Gln
 10 1 5 10 15
 Cys Asn Ser Pro Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 15 20 25
 <210> 260
 <211> 25
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> AMIDATION
 35
 <400> 260
 Gly Asp Ser Phe Cys Val Thr Tyr Ile Gly Thr Trp Glu Thr Val Cys
 40 1 5 10 15
 Lys Arg Ser Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 45 20 25
 <210> 261
 <211> 26
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 60

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 261
 Gly Asp Asn Asp Gly Cys Thr Asp Thr Asn Trp Ser Trp Met Phe Asp
 10 1 5 10 15
 Cys Pro Pro Leu Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 15 20 25
 <210> 262
 <211> 26
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION
 35
 <400> 262
 Gly Asp Ser Pro Tyr Cys Lys Ile Ala Leu Phe Gln His Phe Glu Val
 40 1 5 10 15
 Cys Ala Ala Asp Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 45 20 25
 <210> 263
 <211> 26
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 60

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 263
 Gly Asp Pro Arg Ser Cys Val Glu Lys Tyr Tyr Trp Asp Val Leu Ile
 10 1 5 10 15

Cys Gly Phe Phe Asp Pro Gly Gly Gly Lys
 15 20 25

<210> 264
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> AMIDATION

<400> 264
 Gly Ser Arg Ser Phe Cys Met Asp Trp Pro Asn His Arg Asp Cys Asp
 40 1 5 10 15

Tyr Ser Ala Pro Gly Gly Gly Lys
 45 20

<210> 265
 <211> 22
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

60

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 265
 Ala Gly Lys Trp Tyr Cys Ala Trp Asp Pro Leu Val Cys Glu Ile Phe
 10 1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Gly Lys
 20
 15

<210> 266
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> AMIDATION

<400> 266
 Ala Gly Trp Thr Thr Cys His Ile Tyr Asp Trp Phe Cys Ser Ser Ser
 40 1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Gly Lys
 20
 45

<210> 267
 <211> 22
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> albumin binding peptide

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION

60

10

20

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 267
 Ala Gly Leu Glu Tyr Cys Phe Tyr Gln Trp Trp Gly Cys Pro His Ala
 10 1 5 10 15
 Gly Thr Gly Gly Gly Lys
 15 20
 <210> 268 10
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22) 20
 <223> AMIDATION
 35 <400> 268
 Ala Gly Tyr Gln Phe Cys Thr Trp Asp Pro Ile Phe Cys Gly Trp His
 40 1 5 10 15
 Gly Thr Gly Gly Gly Lys
 45 20
 <210> 269
 <211> 20
 <212> PRT
 50 <213> Artificial Sequence 30
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLTATION
 60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> AMIDATION
 5
 <400> 269
 Gly Ser Leu Trp Asp Cys Trp Leu Tyr Asp Cys Glu Gly Asn Ala Pro
 10 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Lys
 15 20 10
 <210> 270
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> albumin binding peptide
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Asn, Leu, or Phe, preferably Leu
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE 20
 <222> (3)..(3)
 <223> Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Ser, Thr,
 35 Trp,
 Tyr, or Val
 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser,
 Thr,
 45 Trp, Tyr, or Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE 30
 <222> (7)..(7)
 50 <223> Ala, Arg, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser,
 Thr,
 Trp, Tyr, or Val
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Phe, Trp, or Tyr, preferably Trp
 60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> His or Phe, preferably Phe
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Asp, Glu, or Thr
 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Ala, Arg, Asp, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser,
 Thr, Trp, or Val
 15 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Ala, Arg, Asp, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro,
 Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val
 20 25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser,
 Thr, Trp, Tyr, or Val
 30 20 35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Pro or Ser
 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Asn or Pro
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Asn or Pro
 50 30

<400> 270
 55

Xaa Arg Xaa Cys Xaa Thr Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15
 60

Xaa Xaa

- 5 <210> 271
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
- 10 <220>
 <223> albumin binding peptide
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Ala, Arg, Asp, Asn, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr 10
- <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala, Arg, Asp, Asn, Gly, His, Phe, Pro, Ser, or Trp
- 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Glu, Leu, or Met, preferably Met
- 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7) 20
 <223> Trp or Tyr, preferably Trp
- 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 40 <223> Gln, Glu, or Lys
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (11)..(11)
 <223> Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, or Trp
- 50 <220> 30
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Met, Pro, or Ser, preferably Pro
- 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Ala, Arg, Asp, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro,
 60 Ser,

Thr, Trp, Tyr, or Val

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> His or Pro, preferably Pro

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser,
 15 Thr, Trp, or Tyr

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Ala, Asn, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, or Tyr

25 <400> 271
 Xaa Xaa Xaa Cys Ile Thr Xaa Pro Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

30 Asn Xaa

10

【 図 1 】

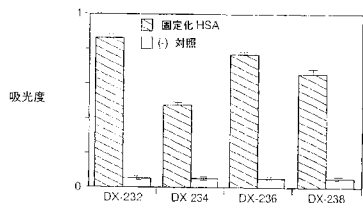


FIG. 1

【 図 2 】

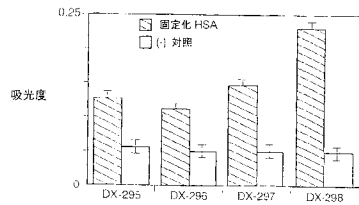


FIG. 2

【 図 3 】

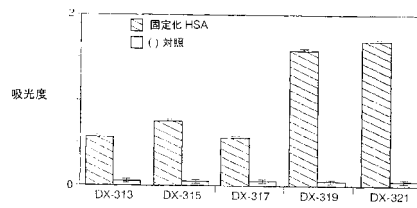


FIG. 3

【 図 4 】

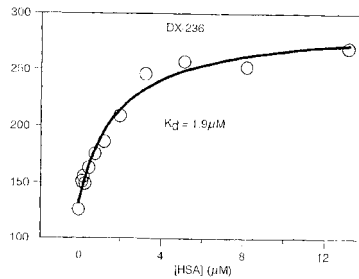


FIG. 4

【 5 】

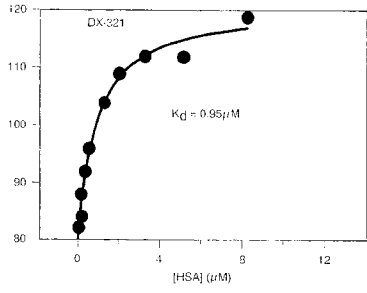


FIG. 5

【 6 】

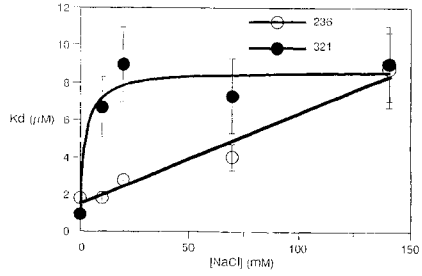


FIG. 6

【 7 】

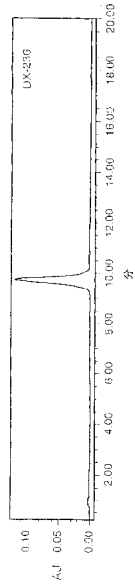


FIG. 7A

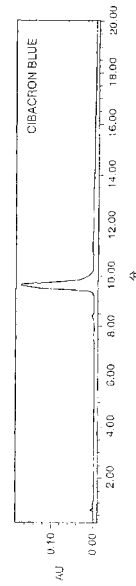


FIG. 7B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K 47/48	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D

(72)発明者 コーエン, エドワード, エイチ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 8 ベルモント, ヒル ロード アpartment
 2 0 0 5 5

審査官 引地 進

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 0 9 1 8 8 (W O , A 1)
 国際公開第 0 0 / 0 2 3 5 8 0 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 3 - 5 1 8 0 7 5 (J P , A)
 FEBS Lett. , 1 9 9 2 年 , Vol.311, No.3, pp.203-205
 Cell , 1 9 8 9 年 , Vol.59, pp.1115-1125
 Gene , 1 9 9 3 年 , Vol.128, pp.29-36
 Trends Biotechnol. , 1 9 9 5 年 , Vol.13, pp.426-430

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 1/00-19/00
 C12N 15/00-15/90
 JSTPlus(JDreamII)
 PubMed
 Science Direct
 CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 CA/REGISTRY(STN)