(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5936112号
(P5936112)

(45)発行日　平成28年6月15日(2016.6.15)　(24)登録日　平成28年5月20日(2016.5.20)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/765	(2006.01)	C07K	14/765	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48	
A61K 9/06	(2006.01)	A61K	9/06	

請求項の数 34　(全 97 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-549569 (P2011-549569)
(86)(22)出願日　平成22年2月11日(2010.2.11)
(65)公表番号　特表2012-517235 (P2012-517235A)
(43)公表日　平成24年8月2日(2012.8.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP2010/051751
(87)国際公開番号　WO2010/092135
(87)国際公開日　平成22年8月19日(2010.8.19)
審査請求日　平成25年1月30日(2013.1.30)
(31)優先権主張番号　09152625.1
(32)優先日　平成21年2月11日(2009.2.11)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　09152686.3
(32)優先日　平成21年2月12日(2009.2.12)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　509198343
アルブミディクス　アクティーゼルスカブ
デンマーク国，２８００　コンゲンス　リンビュー，ロデンボールバイ　２６
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルブミン変異体及び複合体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
結合コンピテントポリペプチドの調製方法であって、
ａ）ヒト血清アルブミン配列を含んでなる三次元モデルを提供する段階、
ｂ）上記モデルのアミノ酸配列又はアルブミンのアミノ酸配列のＮ若しくはＣ末端に関して２番目、３番目、４番目若しくは５番目の残基に相当する、アルブミン配列中のアミノ酸残基であって、三次元モデルに関して、以下の条件：
ｉ）少なくとも８０％の溶媒表面接触性；
ｉｉ）少なくとも３０のＢファクタースコア；
ｉｉｉ）熱不安定性を生じることが知られる、ヒト血清アルブミンの成熟配列に関する位置３５９のアミノ酸がリジンでないこと、
を満たすアミノ酸残基を選択する段階、
ｃ）選択残基をシステインで置換する、又は、選択残基のＮ側又はＣ側において、システインを挿入する段階、並びに、
ｄ）生じるアミノ酸配列を有するポリペプチドを調製する段階、
を含んでなる方法。
【請求項２】
前記三次元モデルのアミノ酸配列が、前記アルブミン配列である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

アミノ酸欠失、置換、及び／又は挿入であるさらなる変化を、アルブミン配列へ加えることを、段階ｃ）でさらに含んで成る、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

前記残基が、二次構造内に存在しない、又は二次構造にある、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】

前記残基が：

ａ）二次構造内に存在せず、Ｂファクターが少なくとも６０であり且つ／又は表面接触性が少なくとも９０％である；

ｂ）二次構造にあり、Ｂファクターが少なくとも４０であり且つ／又は表面接触性が少なくとも９０％である；

ｃ）二次構造内に存在せず、Ｂファクターが少なくとも５０である；或いは、

ｄ）二次構造内に存在し、Ｂファクターが少なくとも３０である、

請求項４に記載の方法。

【請求項６】

配列番号１の残基１～５８５と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列、又は１又は数個のアミノ酸残基が配列番号１のアミノ酸配列において欠失、置換若しくは付加されているアミノ酸配列、又は融合物を含んでなる結合コンピテントポリペプチドであって、ここで：

ａ）配列番号１の位置３４と等価な位置に、結合コンピテントシステイン残基が存在し；且つ、

ｂ）ＨＳＡ（配列番号１）の位置Ｄ３８、Ｅ４０、Ｅ４８、Ｔ５２、Ａ５５、Ｄ５６、Ｓ５８、Ｅ６０、Ｄ６３、Ｔ７６、Ｔ７９、Ｌ８０、Ｒ８１、Ｅ８２、Ｔ８３、Ｅ８６、Ｄ８９、Ａ９２、Ｑ９４、Ｐ９６、Ｑ１０４、Ｎ１０９、Ｎ１１１、Ｐ１１３、Ｒ１１４、Ｌ１１５、Ｖ１１６、Ｐ１１８、Ｅ１１９、Ｄ１２１、Ｖ１２２、Ｔ１２５、Ｄ１２９、Ｎ１３０、Ｑ１７０、Ａ１７２、Ｅ２２７、Ａ２２９、Ｅ２６６、Ｄ２６９、Ｓ２７０、Ｓ２７３、Ｅ２８０、Ｐ２８２、Ｌ２８３、Ｅ２９４、Ｅ２９７、Ｍ２９８、Ａ３００、Ｄ３０１、Ｐ３０３、Ｓ３０４、Ｄ３０８、Ｅ３１１、Ｋ３１３、Ｄ３１４、Ｎ３１８、Ａ３２０、Ｅ３２１、Ｄ３２４、Ｖ３２５、Ｔ３５５、Ｋ３５９、Ａ３６２、Ａ３６４、Ｄ３６５、Ｅ３６８、Ａ３７１、Ｄ３７５、Ｐ３７９、Ｎ３８６、Ｑ３９０、Ｅ３９６、Ｑ３９７、Ｋ４３９、Ｐ４４１、Ｅ４４２、Ａ４４３、Ｔ４６７、Ｐ４６８、Ｖ４６９、Ｄ４７１、Ｔ４７８、Ｅ４７９、Ｎ４８３、Ａ４９０、Ｅ４９２、Ｅ４９５、Ｔ４９６、Ｖ４９８、Ｐ４９９、Ｋ５００、Ｅ５０１、Ｎ５０３、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ５０６、Ｔ５０８、Ｈ５１０、Ｄ５１２、Ｔ５１５、Ｋ５３８、Ａ５３９、Ｋ５４１、Ｅ５４２、Ａ５４６、Ｄ５４９、Ｄ５５０、Ｋ５６０、Ｄ５６２、Ｋ５６４、Ｅ５６５、Ｔ５６６、Ｋ５７３、Ｋ５７４、Ａ５７７、Ａ５７８、Ｑ５８０、Ａ５８１、及びＡ５８２に相当する位置から選択される位置に、２個又はそれ以上の結合コンピテントシステイン残基が存在し、ここで、前記結合コンピテントポリペプチドがヒト血清アルブミンとして機能する、上記結合コンピテントポリペプチド。

【請求項７】

配列番号１の残基１～５８５と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列、又は１又は数個のアミノ酸残基が配列番号１のアミノ酸配列において欠失、置換若しくは付加されているアミノ酸配列、又は融合物を含んでなる結合コンピテントポリペプチドであって、ここで：

ａ）配列番号１の位置３４と等価な位置に、結合コンピテントシステイン残基が存在せず；且つ、

ｂ）ＨＳＡ（配列番号１）の位置Ｄ３８、Ｅ４０、Ｅ４８、Ｔ５２、Ａ５５、Ｄ５６、Ｓ５８、Ｅ６０、Ｄ６３、Ｔ７６、Ｔ７９、Ｌ８０、Ｒ８１、Ｅ８２、Ｔ８３、Ｅ８６、Ｄ８９、Ａ９２、Ｑ９４、Ｐ９６、Ｑ１０４、Ｎ１０９、Ｎ１１１、Ｐ１１３、Ｒ１１４、Ｌ１１５、Ｖ１１６、Ｐ１１８、Ｅ１１９、Ｄ１２１、Ｖ１２２、Ｔ１２５、Ｄ１２９、

Ｎ１３０、Ｑ１７０、Ａ１７２、Ｅ２２７、Ａ２２９、Ｅ２６６、Ｄ２６９、Ｓ２７０、Ｓ２７３、Ｅ２８０、Ｐ２８２、Ｌ２８３、Ｅ２９４、Ｅ２９７、Ｍ２９８、Ａ３００、Ｄ３０１、Ｐ３０３、Ｓ３０４、Ｄ３０８、Ｅ３１１、Ｋ３１３、Ｄ３１４、Ｎ３１８、Ａ３２０、Ｅ３２１、Ｄ３２４、Ｖ３２５、Ｔ３５５、Ｋ３５９、Ａ３６２、Ａ３６４、Ｄ３６５、Ｅ３６８、Ａ３７１、Ｄ３７５、Ｐ３７９、Ｎ３８６、Ｑ３９０、Ｅ３９６、Ｑ３９７、Ｋ４３９、Ｐ４４１、Ｅ４４２、Ａ４４３、Ｔ４６７、Ｐ４６８、Ｖ４６９、Ｄ４７１、Ｔ４７８、Ｅ４７９、Ｎ４８３、Ａ４９０、Ｅ４９２、Ｅ４９５、Ｔ４９６、Ｖ４９８、Ｐ４９９、Ｋ５００、Ｅ５０１、Ｎ５０３、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ５０６、Ｔ５０８、Ｈ５１０、Ｄ５１２、Ｔ５１５、Ｋ５３８、Ａ５３９、Ｋ５４１、Ｅ５４２、Ａ５４６、Ｄ５４９、Ｄ５５０、Ｋ５６０、Ｄ５６２、Ｋ５６４、Ｅ５６５、Ｔ５６６、Ｋ５７３、Ｋ５７４、Ａ５７７、Ａ５７８、Ｑ５８０、Ａ５８１、及びＡ５８２に相当する位置から選択される位置に、３個又はそれ以上の結合コンピテントシステイン残基が存在し、ここで、前記結合コンピテントポリペプチドがヒト血清アルブミンとして機能する、上記結合コンピテントポリペプチド。

【請求項８】

配列番号１の位置２及び５８５と等価な位置に、結合コンピテントシステイン残基を含んでなる、請求項６又は７に記載のポリペプチド。

【請求項９】

４個又はそれ以上の結合コンピテントシステイン残基を含んでなる、請求項６～８のいずれか１項に記載のポリペプチド。

【請求項１０】

ａ）配列番号１の位置２及び５８５と等価な位置の結合コンピテントシステイン残基；並びに、

ｂ）配列番号１の位置３６４及び５６２と等価な位置の一方又は両方における結合コンピテントシステイン残基、

を含んでなる、請求項９に記載のポリペプチド。

【請求項１１】

前記ポリペプチドが、１又は複数の：

ａ）配列番号１の残基Ｌ５８５、Ｄ１、Ａ２、Ｄ５６２、Ａ３６４、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ７９、Ｅ８６、Ｄ１２９、Ｄ５４９、Ａ５８１、Ｄ１２１、Ｅ８２、Ｓ２７０、Ｑ３９７及びＡ５７８のいずれかと等価な位置に相当する位置における、システイン以外のアミノ酸のシステインでの置換；

ｂ）配列番号１の残基Ｌ５８５、Ｄ１、Ａ２、Ｄ５６２、Ａ３６４、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ７９、Ｅ８６、Ｄ１２９、Ｄ５４９、Ａ５８１、Ｄ１２１、Ｅ８２、Ｓ２７０、Ｑ３９７及びＡ５７８のいずれかと等価な位置に相当するアミノ酸のＮ又はＣ側に隣接する位置におけるシステインの挿入；

ｃ）Ｃ３６９、Ｃ３６１、Ｃ９１、Ｃ１７７、Ｃ５６７、Ｃ３１６、Ｃ７５、Ｃ１６９、Ｃ１２４及びＣ５５８のいずれかにおいて結合コンピテントシステインを生じるための、配列番号１のＣ３６０、Ｃ３１６、Ｃ７５、Ｃ１６８、Ｃ５５８、Ｃ３６１、Ｃ９１、Ｃ１２４、Ｃ１６９及びＣ５６７のいずれかに相当する位置におけるシステインの欠失；

ｄ）アルブミン配列のＮ末端残基のＮ側又はアルブミン配列のＣ末端残基のＣ側へのシステインの付加、

を含んでなるポリペプチドであって、

これにより、ａ）、ｂ）、ｃ）及びｄ）の置換、欠失、付加又は挿入事象は、ポリペプチド配列の結合コンピテントシステイン残基数を、当該置換、挿入、欠失及び付加事象前のポリペプチドに対して増加する結果となる、請求項６～１０のいずれか１項に記載のポリペプチド。

【請求項１２】

少なくとも１個のシステイン残基が、異なるアミノ酸残基で置換された、請求項６～１１のいずれか１項に記載のポリペプチド。

【請求項１３】
前記異なるアミノ酸残基が、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａｌ又はＡｌａである、請求項１２に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の結合コンピテントシステイン残基を含んでなる、請求項６～１３のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記ポリペプチドが３個又はそれ以上の結合コンピテントシステイン残基を含んでなる場合に、ポリペプチドが折り畳まれると、２個又はそれ以上の結合コンピテントシステイン残基の間に少なくとも１０Åの距離が存在する、請求項６～１４のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
１又は複数の結合コンピテントシステインが、生物活性分子に結合される、請求項６～１５のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
前記ポリペプチドが、配列番号１と少なくとも９５％の同一性を有する、請求項６～１６のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
前記ポリペプチドが、配列番号１と少なくとも９５％の配列同一性を有し、（ａ）Ａ２＋Ｌ５８５、（ｂ）Ａ２＋Ａ３６４＋Ｄ５６２＋Ｌ５８５Ｃ、（ｃ）Ａ２及びアルブミンのＣ末端のＣ側の隣接部位（ｄ）Ｔ７９＋Ａ３６４；（ｅ）Ａ３６４＋Ｄ１；（ｆ）Ｔ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４；（ｇ）Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｄ１；（ｈ）Ｔ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ａ５０４；（ｉ）Ｔ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｌ５８５；Ｃ）Ｔ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｄ１；（ｋ）Ｔ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｌ５８５＋Ｄ１；（Ｉ）Ｅ８６＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ａ５０４＋Ａ２；（ｍ）Ｓ２７０＋Ａ５８１；（ｎ）Ｓ２７０＋Ｄ１２９；（ｏ）Ｓ２７０＋Ａ５８１＋Ｅ８２；（ｐ）Ｓ２７０＋Ａ５８１＋Ｄ１２９；（ｑ）Ｓ２７０＋Ａ５８１＋Ｅ８２＋Ｄ１２９；（ｒ）Ｓ２７０＋Ａ５８１＋Ｅ８２＋Ｄ１２９＋Ｑ３９７；（ｓ）Ｃ３６９＋Ｃ１７７；（ｔ）Ａ３６４＋Ａ５８１；（ｕ）Ｔ７９＋Ａ３６４＋Ａ５８１；（ｖ）Ａ３６４＋Ａ５８１＋Ｄ１２９；（ｗ）Ａ３６４＋Ｃ１７７；（ｘ）Ｄ５６２＋Ｃ３６９；（ｙ）Ｄ１２９＋Ｃ３６９；（ｚ）Ａ５８１＋Ｃ３６９；又は（ａｉ）Ｄ５６２＋Ｄ１２９＋Ｃ３６９に位置する結合コンピテント残基を含んでなる、請求項６～１７のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
前記ポリペプチドが、生物活性化合物に結合できるさらなるリンカーをさらに含んでなる、請求項６～１８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
請求項６～１９のいずれか１項に記載のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。
【請求項２１】
請求項２０に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、プラスミド。
【請求項２２】
請求項２０に記載のポリヌクレオチド及び／又は請求項２１に記載のプラスミドを含んでなる、宿主細胞。
【請求項２３】
酵母細胞である、請求項２２に記載の宿主細胞。
【請求項２４】
前記酵母細胞が、出芽酵母細胞である、請求項２３に記載の宿主細胞。
【請求項２５】
生物活性化合物及び請求項６～１９のいずれか１項に記載のポリペプチドを含んでなる

複合体であって、ここで生物活性化合物が、ポリペプチドの結合コンピテントシステイン残基を介してポリペプチドに結合される複合体。
【請求項２６】
１又は複数のさらなる生物活性化合物をさらに含んでなり、各生物活性化合物が、ポリペプチドの結合コンピテントシステイン残基を介してポリペプチドに結合される、請求項２５に記載の複合体。
【請求項２７】
ａ）前記ポリペプチドの発現が可能な条件下で、請求項２２～２４のいずれか１項に記載の宿主細胞を培養する段階；及び、
ｂ）宿主細胞及び／又は宿主細胞成長培地からポリペプチドを回収する段階、
を含んでなる、請求項６～１９のいずれか１項に記載のポリペプチドの製造方法。
【請求項２８】
前記ポリペプチドの結合コンピテントシステイン残基を介して、請求項６～１８のいずれか１項に記載のポリペプチドに、生物活性化合物を結合させる段階を含んでなる、請求項２５又は２６に記載の複合体の製造方法。
【請求項２９】
前記宿主細胞が増強されたシャペロン活性を示す、請求項２７に記載の方法。
【請求項３０】
請求項２５又は２６に記載の複合体、及び少なくとも１個の医薬的に許容されるキャリア又は希釈剤を含んでなる組成物。
【請求項３１】
請求項６～１９のいずれか１項に記載のポリペプチド、及び／又は請求項２５若しくは２６に記載の複合体を含んでなるゲル。
【請求項３２】
疾病の治療、疾患の治療及び／又は診断のための医薬の製造における、請求項２５若しくは２６に記載の複合体、又は請求項２７～２９のいずれか１項に記載の方法によって生成される複合体の使用。
【請求項３３】
前記ポリペプチドの受容体結合能力及び／又は結合コンピテンスを測定する段階、並びに受容体結合能力及び／又は結合コンピテンスを有するポリペプチドを選択する段階をさらに含んでなる、請求項２７又は２８に記載の方法。
【請求項３４】
ゲルの産生のための、請求項６～１９のいずれか１項に記載のポリペプチド、及び／又は請求項２５又は２６に記載の複合体の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表への言及
本願は、コンピューター可読形式の配列表を含む。コンピューター可読形式は、明細書中に参照により組み込まれている。
【０００２】
本発明の分野
本発明は、結合コンピテントアルブミン及びアルブミン関連ポリペプチド、並びに少なくとも一部分を有するこれらの複合体、並びにこれらをコードするポリヌクレオチドに関する。
【背景技術】
【０００３】
血清アルブミンは、融合分子の特性を改善するために、遺伝子融合又は化学融合を介して、生物活性分子が融合する重要なスキャフォールドを供する（Leger, R. et al. (2004). Bioorg Med Chem Lett 14(17): 4395-8; Thibau- deau, K., et al. (2005). Bioconj

ug Chem 16(4): 1000～8; Balan, V. et al. (2006). Antivir Ther 11 (1): 35～45; EP 0 413 622; WO 90/13653; EP 1 681 304; WO 1997/024445; WO 01/79271）。アルブミン及びアルブミン粒子はまた、薬物及びプロドラッグをこれらの作用部位に運ぶ又は届けるために重要である（Kratz (2008) Journal of Controlled Release, 132 (3), p.171-183）。融合及び粒子技術は、改善された薬物動態特性、例えば半減期の延長などに起因する改善された投与計画を供し、そしてバイオアベイラビリティを改善し、融合した生物活性分子を不活化から保護する。

【０００４】

アルブミンの生化学、遺伝学及び医学的な応用は、特徴がはっきりしている（「All about Albumin」, T. Peters Jr., Academic Press N. Y., and http://www. albumin.org/）。ヒト血清アルブミン（HSA, HAとも呼ばれる）は、～６０ｇ／Ｌ濃度のヒト血漿中で最も豊富なタンパク質である。ＨＳＡの配列は、配列番号１で供される。ＨＳＡの自然変異体は生じており、そして周知の多型の一覧は、Ｍｉｎｃｈｉｏｔｔｉ等（2008）のＨｕｍ Ｍｕｔａｔ ２９（８）：１００７－１６．，及びｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０２７６８に掲載される。

【０００５】

組換え型ヒトアルブミンの生成物及び精製は、確立されており（WO 95/23857; WO 00/44772; WO 2006/066595; EP 0 305 216; Sleep et al. 1990 Biotechnology (N Y). 1990 Jan; 8(1):42-6)）、薬学的応用のための組換え型ヒトアルブミンを含む（Bosse et al. (2005). J Clin Pharmacol 45(1): 57-67）。ＨＳＡの三次元構造は、Ｘ線結晶によって解明されている（Carter et al. (1989). Science 244(4909): 1 195～8; Sugio et al. (1999). Protein Eng 12(6): 439-46）。ＨＳＡポリペプチド鎖は、３５個のシステイン残基を有し、成熟タンパク質（配列番号1）の３４位に１７個のジスルフィド結合及び１つの不対（自由）システインを形成する。システイン３４は、分子のアルブミンへの結合のために使用されており（Leger et al. (2004) Bioorg Med Chem Lett 14(17): 4395-8; Thibaudeau et al. (2005). Bioconjug Chem 16(4): 1000-8）、結合に関して正確であり且つ十分に規定された部位を供する。しかしながら、システイン３４での結合は、単一部分の付着のためのたった１つの部位を供し、従って結合部位の選択はない。また、１つの結合部位の提供は、たった１つの部分を各アルブミン分子に結合させることができることを意味する。よって、１又は複数の代替付着部位を供するアルブミン分子が必要である。

【発明の概要】

【０００６】

ヒト血清アルブミン（HSA）、アルブミンポリペプチド内の保存残基及びこれらの自然多型の三次元構造の分析に基づいて、本発明者は、１又は複数の結合コンピテント（conjugation competent）システイン残基を有するアルブミンの変異体ポリペプチド（変異タンパク質）をデザインした。用語「チオアルブミン」は、１又は複数の不対システイン残基を含んでなるアルブミン変異体、特に１又は複数の不対システイン残基がアルブミンの自然発生の変異体中に生じないアルブミン変異体を説明するために本明細書中で使用される。従って、チオアルブミンは、「結合コンピテントアルブミン」である。チオアルブミンは、「アルブミンのシステイン変異体」と呼んでもよい。

本明細書を通じて、用語「アルブミン」は、自然発生のアルブミン、アルブミン関連タンパク質及びこれらの変異体、例えば天然及び組換え変異体などを含む。変異体は、多型、断片、例えばドメイン及びサブドメイン、断片及び／又は融合タンパク質などを含む。アルブミンは、配列番号１と少なくとも４０、５０、６０、７０、８０、９０、９５、９６、９７、９８、９９％の類似性又は同一性を有する。従って、本発明のチオアルブミンは、このようなアルブミンのいずれかの誘導体である、又はいずれかに基づいてよい。

【０００７】

不対システイン残基は、アルブミン配列の挿入、欠失、置換、付加又は延長によって提供されてよい。本発明はまた、少なくとも１つ、例えば２、３、４、５又は６個の結合パ

ートナー、例えば生物活性化合物及び本発明のポリペプチドなどを含んでなる複合体に関する。

【０００８】

本発明はまた、結合コンピテントアルブミンをデザインするための方法を供する。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１－１】図１－１は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－２】図１－２は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－３】図１－３は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－４】図１－４は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－５】図１－５は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－６】図１－６は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－７】図１－７は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－８】図１－８は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－９】図１－９は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－１０】図１－１０は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－１１】図１－１１は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－１２】図１－１２は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－１３】図１－１３は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－１４】図１－１４は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。

【図１－１５】図１－１５は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用

される判定基準を示している表である。
【図１－１６】図１－１６は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。
【図１－１７】図１－１７は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。
【図１－１８】図１－１８は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。
【図１－１９】図１－１９は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。
【図１－２０】図１－２０は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。
【図１－２１】図１－２１は、結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）中の部位選択のために使用される判定基準を示している表である。
【００１０】
【図２－１】図２－１は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【図２－２】図２－２は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【図２－３】図２－３は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【図２－４】図２－４は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【図２－５】図２－５は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【図２－６】図２－６は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。

【図２－７】図２－７は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【図２－８】図２－８は、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列（配列番号1=ヒト-P02768.pro）の、１５種の他の哺乳類由来のアルブミンとのアライメントを示している。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、１６個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。
【００１１】
【図３－１】図３－１は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。
【００１２】
【図３－２】図３－２は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spot

ted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【００１３】

【図３－３】図３－３は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－４】図３－４は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－５】図３－５は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列

間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－６】図３－６は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－７】図３－７は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿

００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－８】図３－８は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－９】図３－９は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリ

ア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１０】図３－１０は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１１】図３－１１は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１２】図３－１２は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２

．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１３】図３－１３は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１４】図３－１４は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウ

ミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１５】図３－１５は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１６】図３－１６は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１７】図３－１７は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共

に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１８】図３－１８は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【図３－１９】図３－１９は、一部が哺乳類である他の３２種に由来するアルブミンと共に、ヒト血清アルブミン（P02768.pro=配列番号1）のアミノ酸配列のアライメントを示す。「マジョリティ」は、コンセンサス配列を示す。「＋マジョリティ」は、３３個全ての配列間の相対的相同性を棒グラフ形態で示し、棒の長さは相対的相同性２０、４０、６０、８０及び１００％を示す。タンパク質配列は、リーダー配列を含む。Ｐ０２７６８．ｐｒｏ：ヒト；Ｐ０２７６９．ｐｒｏ：ウシ；Ｐ４９０６４．ｐｒｏ：ネコ；Ｐ４９８２２．ｐｒｏ：イヌ；Ｑ５ＸＬＥ４．ｐｒｏ：ロバ；Ｊ Ｃ５８３８．ｐｒｏ：スナネズミ；ＡＣＦ１０３９１，１．ｐｒｏ：ヤギ断片；ＡＡＱ２００８８．ｐｒｏ：モルモット；Ｐ３５７４７．ｐｒｏ：ウマ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：マカク；Ｐ０７７２４．ｐｒｏ：ネ

ズミ；Ｐ０８８３５．ｐｒｏ：ブタ；Ｐ０２７７０．ｐｒｏ：ラット；Ｐ４９０６５．ｐｒｏ：ウサギ；Ｑ２８５２２．ｐｒｏ：アカゲザル；Ｐ１４６３９．ｐｒｏ：ヒツジ；ＮＰ＿００１１２７１０６．ｐｒｏ：オランウータン；Ｐ１９１２１．ｐｒｏ：ニワトリ；Ｐ０１０１２．ｐｒｏ：ニワトリ卵白アルブミン；０７３８６０．ｐｒｏ：シチメンチョウ卵白アルブミン；ＡＡＣ６３４０７．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｑ９１２７４．ｐｒｏ：ウミヤツメ；Ｐ２１８４７．ｐｒｏ：ウシガエル；ＡＡＤ０９３５８．ｐｒｏ：アルバニア水カエル（Rana shqiperica）；ＡＢＸＬ６８．ｐｒｏ：ゼノパス；ＮＰ＿００１００４８８７．ｐｒｏ：ゼノパス；ＡＡＬ５６６４６．ｐｒｏ：スポッティッドサラマンダー（Spotted Salamander）；Ｑ０３１５６．ｐｒｏ：大西洋サケ；Ｐ２１８４８．ｐｒｏ：大西洋サケ；ＡＡＭ４６１０４．ｐｒｏ：ムカシトカゲ；Ｐ８３５１７．ｐｒｏ：オーストラリア肺魚；Ｓ５９５１７．ｐｒｏ：モノクルコブラ；ＡＡＬ０８５７９．ｐｒｏ：マンソン住血吸虫。

【００１４】

【図４】図４は、２０個のアミノ酸のクラス及び関係を示しているベン図である。

【図５Ａ】図５Ａは、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図５Ｂ】図５Ｂは、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図５Ｃ－１】図５Ｃ－１は、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図５Ｃ－２】図５Ｃ－２は、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図５Ｄ－１】図５Ｄ－１は、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図５Ｄ－２】図５Ｄ－２は、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のためのアミノ酸置換、挿入及び欠失のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図６Ａ】図６Ａは、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のための１又は複数のジスルフィド結合の切断のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図６Ｂ】図６Ｂは、１又は複数の結合コンピテントシステインの生成のための１又は複数のジスルフィド結合の切断のための、ヒト血清アルブミン（配列番号1）における好適な部位のグループを示す表である。

【図７】図７は、プラスミドｐＤＢ２２４４のマップである。

【図８】図８は、プラスミドｐＤＢ２２４３のマップである。

【図９】図９は、プラスミドｐＤＢ２７１３のマップである。

【００１５】

【図１０－１】図１０－１は、配列番号１の折り畳みアルブミン上の結合のための好適な部位の相対的位置に従って分類した、これらの部位を示している表である。

【図１０－２】図１０－２は、配列番号１の折り畳みアルブミン上の結合のための好適な部位の相対的位置に従って分類した、これらの部位を示している表である。

【図１１－１】図１１－１は、自然のヒト血清アルブミンのＣｙｓ－３４に加えて単一遊離チオール基を有する分子を生成するために、自然のヒト血清アルブミンに対して行った変異（第二列を参照されたい）を示している表である。

【図１１－２】図１１－２は、自然のヒト血清アルブミンのＣｙｓ－３４に加えて単一遊

離チオール基を有する分子を生成するために、自然のヒト血清アルブミンに対して行った変異（第二列を参照されたい）を示している表である。
【図１２】図１２は、プラスミドｐＤＢ３９２７のマップである。
【図１３】図１３は、プラスミドｐＤＢ３９６４のマップである。
【図１４】図１４は、プラスミドｐＢＤ３９３６のマップである。
【図１５】図１５は、配列番号１のＣｙｓ－３４における遊離チオール基及び棒グラフで下に示す位置においてさらなる遊離チオールを有するアルブミン分子の発現（標準偏差でμg/ml）を示している、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析、及びＨＰＬＣデータ（棒グラフ）を示す。
【００１６】
【図１６－１】図１６－１は、自然のヒト血清アルブミンのＣｙｓ－３４に加えて１又は複数の遊離チオール基を有する及び／又はＣｙｓ－３４を除去した分子を生成するために、自然のヒト血清アルブミンに対して行った変異（第二列を参照されたい）を示している表である。
【図１６－２】図１６－２は、自然のヒト血清アルブミンのＣｙｓ－３４に加えて１又は複数の遊離チオール基を有する及び／又はＣｙｓ－３４を除去した分子を生成するために、自然のヒト血清アルブミンに対して行った変異（第二列を参照されたい）を示している表である。
【図１７】図１７は、自然のヒト血清アルブミンのＣｙｓ－３４に加えて１又は複数の遊離チオール基を有する及び／又はＣｙｓ－３４を除去したアルブミン分子の発現（標準偏差でμg/ml）を示しているＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析、及びＨＰＬＣデータ（棒グラフ）を示す。
【図１８】図１８は、発酵収量及び１又は複数の遊離チオールを含んでなるアルブミン分子への結合の相対レベルを示している表である。
【図１９】図１９は、ＤＴＮＢでの処理前の、３個の遊離チオール（Cys-34，A2C及び585C）を有するようデザインされたｒＨＡ分子の質量分析データである。
【図２０】図２０は、ＤＴＮＢでの処理後の、３個の遊離チオール（Cys-34，A2C 及びL585C）を有するようデザインされたｒＨＡ分子の質量分析データである。
【図２１】図２１は、ＤＴＮＢでの処理前の、４個の遊離チオール（Cys-34，D129C，C360S及びL585C）を有するようにデザインされたｒＨＡ分子の質量分析データである。
【図２２】図２２は、ＤＴＮＢでの処理後に４個の遊離チオール（Cys-34，D129C，C360S及びL585C）を有するようにデザインされたｒＨＡ分子の質量分析データである。
【図２３】図２３は、ＤＴＮＢでの処理前に３個の遊離チオール（Cys-34，A2C及びＣ末端遊離チオール）を有するようデザインされたｒＨＡ分子の質量分析データである。
【図２４】図２４は、３個の遊離チオール（Cys-34，A2C及びＣ末端遊離チオール）を有するようデザインされたｒＨＡ分子の質量分析データである。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
本発明の詳細な説明
本発明の第一の態様は、１又は複数の結合コンピテントシステイン残基を含んでなる変異体アルブミンをデザイン及び／又は調製するための方法を供する。従って、ポリペプチドは、結合能力があるとみなしてよい。このようなアルブミンは、「チオアルブミン」又はアルブミンの「システイン変異体」と呼ぶ。用語「結合コンピテントシステイン」は、他のシステインにジスルフィド結合しておらず、且つ好適には、好ましくない立体障害に起因する（「結合パートナー」と呼ぶ）他の分子への結合がブロックされていないチオールを有するシステインを含む。すなわち、好適には折り畳みポリペプチド内又は上のシステインの位置は、結合に使用可能である。
【００１８】
多数の選択判定基準は、結合コンピテントシステイン残基の導入のための適当な部位を特定するために、単独又は任意の組合せで使用しても使用しなくてもよい。従って、本発

明は、結合コンピテントシステインが導入される、アルブミンのアミノ酸配列の部位の演繹的な同定のための方法及び／又はルールを供する。このような部位は、「候補残基」と呼ぶ。変異体アルブミンが基づくアルブミン配列は、配列番号１又は任意の他のアルブミンである。例えば、変異体アルブミンは、アミノ酸配列の３４位、又は等価な位置にシステインを有する又は有しないアルブミンに基付いている。システイン残基は、１又は複数の置換、挿入、欠失、延長及び付加によって導入されても導入されなくてもよい。部位は、アルブミン又はこの変異体の三次元構造に関して選択されても選択されなくてもよい。次の判定基準は、適当な部位を選択するために使用されても使用されなくてもよい：

【００１９】

（ａ）溶媒接触可能表面領域（「表面接触性」(% SASA)）。

表面接触性は高いことが好適である。例えば、好適には表面接触性が、少なくとも６０％、より好適には６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８又は９９％から６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９又は１００％までである。％ＳＡＳＡは、明細書中で説明される方法を使用して「生スコア（raw score）」として測定されても、又はタンパク質中の最大表面接触性を有する残基のスコアに対して計算されてもよい。例えば、ＨＳＡ １ＡＯ６のアルブミンは、最大表面接触性２２９．０を有し、これはＨＳＡ中の最も高いスコアの残基である。高い表面接触性は、残基がタンパク質の表面上にあり、これにより結合に利用可能であることを示す。このような接触性は、明細書中で説明されるような方法を使用して計算されてよい。

【００２０】

（ｂ）結晶Ｂファクターの存在又は非存在。

Ｂファクターは、三次元構造内のアミノ酸残基の相対的可塑性を示す。好適には、Ｂファクターは、少なくとも３０、４０、５０、６０、７０、８０又は９０％から、少なくとも４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００％までであり、これは分子内の任意のアミノ酸残基の最大のＢファクタースコアに対するものでも対するものでなくてもよい。ＨＳＡ（例えば、1AO6）に関して、好適にはＢファクタースコアは、（例えば、明細書中で説明されるＢファクタースコア化システムを使用して）例えば少なくとも３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００から、少なくとも４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００又は１０６までと高い。また、Ｂファクタースコアは、明細書中で説明されるように、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０又は１０％未満若しくは同等でよい。

【００２１】

シミュレーションの最後のナノ秒中のＣ－アルファ炭素原子のＢファクター（根平均二乗揺らぎ）は、Ｄ．ｖａｎ ｄｅｒＳｐｏｅｌ，Ｅ．Ｌｉｎｄａｈｌ，Ｂ．Ｈｅｓｓ，Ｇ．Ｇｒｏｅｎｈｏｆ，Ａ．Ｅ．Ｍａｒｋ及びＨ．Ｊ．Ｃ．Ｂｅｒｅｎｄｓｅｎ：ＧＲＯＭＡＣＳ：Ｆａｓｔ，Ｆｌｅｘｉｂｌｅ ａｎｄ Ｆｒｅｅ，Ｊ．Ｃｏｍｐ．Ｃｈｅｍ．２６ ｐｐ．１７０１－１７１８（2005）に基づいた、Ｇｒｏｍａｃｓ ｔｏｏｌ「ｇ＿ｒｍｓｆ」、バージョン３．３を使用して計算されてよい。

【００２２】

（ｃ）二次構造（SS）の存在の有無。

候補残基は、二次構造、例えばＨ（ヘリックス）、Ｂ（単離されたベータブリッジ）又はＥ（拡張シート）内に位置しても位置しなくてもよい。二次構造の外側の残基の位置は、二次構造内に位置する残基よりも二次構造にあまり重要でなく且つ／又は結合に利用可能である可能性が高いことを示す。

【００２３】

（ｄ）他のアルブミンとの相対的相同性。

所定のタンパク質配列内で、他の類似配列との高い相同性を示しているアミノ酸残基は、このような残基又は領域がタンパク質の構造及び／又は機能に重要であることを示す可能性がある。従って、残基が周知のアルブミン（例えば、哺乳類アルブミン、例えば図2に示されるものなど、又は哺乳類及び非哺乳類アルブミン、例えば図3に示されるものな

どの組み合わせ）を有して位置するアルブミンのアライメント（alignment）に対して、候補残基が１００％未満の相同性を示すことが好ましい。１００、９８、９６、９５、９４、９２、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５％未満の相同性が好適である。相同性は、当技術分野で周知のアルゴリズム、例えばＣｌｕｓｔａｌ、例えばＣｌｕｓｔａｌ Ｗ（Thompson et al. (1994). Nucleic Acids Res 22(22): 4673-80）又はＣｌｕｓｔａｌ Ｖ（Higgins, D. G. and P. M. Sharp (1989). "Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer." Comput Appl Biosci 5(2): 151-3.）を使用して測定することができる。低い相同性は、残基が特にタンパク質の構造及び／又は機能に重要又は重大でないことを示す。好適には、相同性は、図２の１６個の哺乳類アルブミン、又は図３の３３個の哺乳類及び非哺乳類アルブミンに関して測定される。

【００２４】

（ｅ）隣接保存残基の存在の有無。

アミノ酸配列内で、各残基は１又は２個の隣接残基を有する。候補残基が直接隣接する１又は複数の周知のアルブミンに対して低相同性を有する残基の場合には、これは、候補残基がタンパク質の構造及び／又は機能に特に重要又は重大である可能性が低いことを示す。これは、候補残基はタンパク質の相対的に保存されない領域内に位置し得るからである。従って、候補残基がアルブミンのアライメントに関して周知のアルブミンと１００％相同性を有する残基に隣接しないことが好適である。相同性は、明細書中で説明されるように測定されてよい。候補残基は、アルブミンのアライメントに関して周知のアルブミン（例えば、図2又は図3）とそれぞれ１００％の相同性を有する２つの残基（すなわち、１つの残基が候補残基に関してＣ末端であり、１つの残基が候補残基に関してＮ末端である）に隣接してよい。候補残基が１００、９８、９６、９５、９４、９２、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５未満の相同性を有する１又は２個の残基に隣接することが好ましく、そしてこれらの相同性レベルを「閾値」と呼んでよい。相同性は、明細書中で説明されているように測定されてよい。相同性閾値を考慮すると、保存領域に対するアミノ酸の位置は、例えば相同性の閾値０を上回っている任意のアミノ酸に隣接しないアミノ酸のスコア化、閾値１を上回っている１個のアミノ酸に隣接するアミノ酸のスコア化、及び閾値２を上回っている２個のアミノ酸に隣接するアミノ酸のスコア化によって定量化されてよい。

【００２５】

（ｆ）多型についての証拠。

多型は遺伝的変異であり、多型は表現型変化が得られるタンパク質に生じても生じなくてもよい。好適には、候補残基は表現型変化を生じている多型が分かっている位置にない。より好適には、候補残基は、多型が熱不安定性を生じる又は生じることが分かっている位置にない。ＨＳＡ（配列番号1）に関して周知の多型は図１に詳述され、またＭｉｎｃｈｉｏｔｔｉ等（2008） Ｈｕｍ Ｍｕｔａｔ ２９（８）：１００７～１６及びｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０２７６８においても考察される。多型の存在、非存在及び／又は効果は、例えば表現型変化がない周知の多型の０でのスコア化、表現型変化が周知の（しかしながら熱不安定性を生じることが分かっていない）多型の１でのスコア化、及び熱不安定性を生じることが分かっている多型の２でのスコア化によって定量化されてよい。

【００２６】

（ｇ）候補アミノ酸及びシステインの相対的な保存。

アミノ酸は、様々な周知のクラスに分類される。従って、一部のアミノ酸は他のアミノ酸よりもより密接に関連している。導入されたシステイン残基は、候補アミノ酸を有して保存の相対的に高いレベルを維持しても維持しなくてもよい。図４は、保存レベルを定量化することができる１つのシステムを供するベン図である。図４のスコア化システムは、高保存の置換をスコア０で示し、低保存の置換をスコア５で示し、中間的な保存の置換をスコア１、２、３又は４で示すスケール０～５を使用する。好適には、候補残基の置換は

、非保存置換でなく、つまり好適には（図4のスコア化システムを使用して）候補残基は（システインに関して）保存スコア５でない。より好適には、候補残基は、システインに関してより高い保存（例えば、スコア4，3，２、より好適には1）を有する。スコア化システムは、（以下の）「保存置換」というタイトルのセクションに記載される。

【００２７】

（ｈ）発現レベル。

チオアルブミンは、適当な発現系、例えば酵母（例えば、サッカロミセス属（Saccharomyces），例えば出芽酵母（S. cerevisiae））又はアスペルギルス属（Aspergillus.）由来の未修飾アルブミン（例えば配列番号1など）の発現に対して、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００％のレベルで発現されることができてもできなくてもよい。相対的な発現レベルは、例えば、後にＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＨＰＬＣ又はウエスタンブロット法による定量化が続くタンパク質の発現によって測定することができる。

【００２８】

（ｉ）結合コンピテンス。

チオアルブミンは、Ｃｙｓ３４において唯一の結合コンピテントシステインを有する配列番号１から成るアルブミンの結合コンピテンスに対して、例えば少なくとも５０、６０、７０、８０、９０、９５又は１００％の高レベルの結合コンピテンスを有しても有しなくでもよい。結合コンピテンスは、任意の複合体形成可能な（conjugatable）目的の分子（結合パートナー）、例えば生物活性分子又は蛍光染料に対して測定されてよい。測定は、生物活性化合物の活性の質量分析又は定量化、例えばその蛍光などを介してよい。高い結合コンピテンスを有するチオアルブミンの利点は、分子のチオアルブミンへの有効な結合を可能にすることである。結合コンピテンスは、時間に対して測定してよい。好適なチオアルブミンは、（ａ）最大結合を急速に達成するもの、又は（ｂ）最大結合をゆっくりと達成するものである。

【００２９】

（ｊ）結合化合物の活性。

本発明のチオアルブミンは、化合物（結合パートナー）、例えば生物活性化合物が、非結合状態における活性に対して高レベルの活性を有するように、化合物に結合してよい。好適には、結合化合物は、非結合状態の活性に対して少なくとも１、１０、２０、４０、５０、６０、７０、８０、８０、最も好適には１００％の活性を示す。高レベル活性を有する結合化合物の利点は、望ましい効果、例えば所望の治療効果の達成に必要な結合化合物の量を減少することである。

【００３０】

（ｋ）アルブミンの受容体結合能力。

結合及び／又は非結合チオアルブミンは、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００％のヒト血清アルブミン（配列番号1）の受容体結合活性を有しても有さなくてもよい。或いは、結合及び／又は非結合チオアルブミンは、ヒト血清アルブミンよりも、例えば多くて0、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０又は９０％低い受容体結合活性を有しても有さなくてもよい。受容体結合活性は、例えばＦｃＲｎへの結合などに関して、アッセイによって測定される。図１は、ＨＳＡ（配列番号1）の各アミノ酸残基のスコアをそれぞれのパラメーター（ａ）～（ｇ）に関して示す。明確にするために、インビボ（in vivo）で、ＨＳＡは初めは、最初の２４個のアミノ酸がリーダー配列である６０９個のアミノ酸タンパク質として生成される。リーダー配列は切断され、５８５個のアミノ酸成熟タンパク質を生じる。本明細書を通じて、成熟タンパク質は配列番号１と呼ぶ。ＨＳＡモデルＡ１０６の構造は、配列番号１の最初の４個の残基及び最後の３個の残基が３Ｄモデル中で分解されないのでこれらを無視する。従って、モデルＡ１０６の残基１は、配列番号１の残基５と等価である。本明細書を通じて、特に記載しない限り、全ての残基は配列番号１に関して言及される。ＨＳＡ（すなわち、天然のＣ末端リーダー配列を有するHSA）の未成熟配列は、配列番号１０２で供され

る。
【００３１】
図１の列の表示を、以下に詳述する：
１ＡＯ６における位置：ＰＤＢ ｉｄｅｎｔｉｔｙ １ＡＯ６又は１ａｏ６の入力でのＲＣＳＤタンパク質データバンク（PDB, http://www.rcsb.org/pdb/）に由来する、ヒト血清アルブミンの結晶構造におけるアミノ酸の位置を意味する（Sugio, S., A. Kashima, et at. (1999). Protein Eng 12(6): 439-46）。成熟ＨＳＡ配列（配列番号1）と比較すると、１ＡＯ６構造は配列番号１の（当該構造から欠失する最初の４個のアミノ酸を有する）残基５Ｓで開始し、（当該構造から欠失する終末の３つのアミノ酸を有する）５８２Ａで終了することに留意されたい。結合コンピテントシステインを生じるために変化する位置を説明するために、明細書中で使用されるアミノ酸の位置は、１ａｏ６でなく、配列番号１中の位置を意味する。
【００３２】
成熟ＨＳＡにおける位置：ＨＳＡの５８５残基分泌型に由来する配列番号１におけるアミノ酸の位置｛国立生物工学情報センター、受入番号：1A06_A VERSION GI:3212456 (24-SEP-2008), A鎖, ヒト血清アルブミンの結晶構造｝（Sugio et at. (1999). Protein Eng 12(6): 439-46）。
【００３３】
リーダー配列を有する位置：２４個のアミノ酸分泌リーダー配列を含有するヒト血清アルブミンの未処理形態中の位置に言及する。
【００３４】
アミノ酸：２０個の各アミノ酸に関する標準的な１文字コード（例えば、A = Ala = アラニン）。
【００３５】
％ＳＡＳＡ：Ｋａｂｓｃｈａｎｄ及びＳａｎｄｅｒ（1983）．Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２（12）：２５７７～６３７で説明されるＤＳＳＰソフトウェアを使用して、各残基に関して計算される溶媒接触可能表面領域。各溶媒接触可能表面領域を、その位置において確認される特定のアミノ酸の標準値で割り１００を乗じ、これにより各残基に関する標準値のパーセンテージを得た。２０個の異なるアミノ酸に関する標準的な溶媒接触可能表面領域は、（アミノ酸に関して１文字コードを使用して）：Ａ＝６２、Ｃ＝９２、Ｄ＝６９、Ｅ＝１５６、Ｆ＝１２３、Ｇ＝５０、Ｈ＝１３０、Ｉ＝８４、Ｋ＝１７４、Ｌ＝９７、Ｍ＝１０３、Ｎ＝８５、Ｐ＝６７、Ｑ＝１２７、Ｒ＝２１１、Ｓ＝６４、Ｔ＝８０、Ｖ＝８１、Ｗ＝１２６、Ｙ＝１０４と定義する。
Ｂファクター：Ｃアルファ原子に関する結晶Ｂファクター値を、ＰＤＢファイルから直接抽出した。Ｂファクターは、１ａｏ６ ＰＤＢ ファイルＰＤＢ, （http://www.rcsb.org/pdb/）の桁番号６１にある。
【００３６】
ＳＳ（二次構造）：ＤＳＳＰソフトウェア Ｋａｂｓｃｈ ａｎｄ Ｓａｎｄｅｒ（1983）．Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２（１２）：２５７７－６３７を使用して、各残基に対して測定した二次構造。二次構造をＨ（ヘリックス）、Ｂ（単離されたベータブリッジ）又はＥ（拡張シート）を定義する場合に、残基を「１」、或いは「０」で表示する。
【００３７】
アライン（Align）１（Mamm. W）：Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗに基づくＭｅｇＡｌｉｇｎプログラム（DNASTAR, Lasergene, version 8.0.2）を使用して求められたＰ０２７６８で特定される、様々な哺乳類アルブミンファミリータンパク質のアライメントのＨＳＡ（配列番号1）との相同性レベル；相同性は、最高＝１００％、これから２０％ずつ減少し、最低＝０％である６つのレベルで測定される（図2）。
【００３８】
隣接１００％（アライン1）：ＨＳＡを図２の哺乳類アルブミンと並べた場合の、隣接残基の保存が高かった（100%）か否かに関するスコア。スコア０は、ＨＳＡを図２の哺乳

類アルブミンと並べた場合に、残基が１００％の相同性を有する残基に隣接しないことを示し；スコア１は、ＨＳＡを哺乳類アルブミンと並べた場合に、残基が１００％の相同性を有する１つの残基に隣接することを示し；スコア２は、ＨＳＡを哺乳類アルブミンと並べた場合に、残基が１００％の相同性を有する２つの残基に隣接することを示す。

【００３９】

アライン２（Var. Sps. V）：Ｃｌｕｓｔａｌ Ｖに基づくＭｅｇＡｌｉｇｎプログラム（DNASTAR, Lasergene, version 8.0.2）を使用して求められたＰ０２７６８で特定される、様々なアルブミンファミリータンパク質のアライメントのＨＳＡ（配列番号1）との相同性レベル；最高＝１００％、これから２０％ずつ徐々に減少し、最低＝０％である６個の相同性レベルで測定される（図3）。

【００４０】

多形．：これは、アミノ酸残基において多型が判明しているか否かを特定するものである。ヒト血清アルブミン（配列番号1）の単一アミノ酸多型は、２４個のアミノ酸分泌リーダー配列を含むヒト血清アルブミンの未処理形態由来のアミノ酸位置を有するもので、Ｍｉｎｃｈｉｏｔｔｉ等（2008）Ｈｕｍ Ｍｕｔａｔ ２９（８）：１００７－１６、及びｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０２７６８から抜粋され、標準的な１文字アミノ酸コードを使用して説明される（例えば、D25Vは、配列番号1の位置1においてバリンへ変化されているアスパラギン酸を意味する）。

【００４１】

表現型変化：判明している表現型変化の源（上記で言及の「多形」）に由来する表現型変化の「程度」を表すスコアであり；０＝判明している表現型変化なし、１＝熱安定性を減少することになる変化を除いたいずれかの変異に関して、配列番号１の残基と比べてこの位置において、表現型変化が存在することを説明するものであり、２＝熱安定性の減少を生じるものとして説明される、配列番号１のこの位置における変異が存在することを示す。

【００４２】

システインに対する保存された変異：（明細書中で説明される）図４から導かれるように、アミノ酸がシステインと比べてどれほどよく保存されているかを言及しているスコアであり、システインに対する変異を１～５の範囲で示す。スコア１は、可能性のある最も保存的な変化（例えば、アラニンからシステイン）に割り当てられ、スコアは、システインと比べて最低の保存（例えば、ヒスチジンからシステインへ）に関するスコア５に及ぶ。

【００４３】

選択判定基準を任意の所望の組合せで使用することができるが、選択判定基準の４つの好適なグループ（A, B, C, D）をほんの一例として、以下に説明する。これらの（Ａ）及び（Ｂ）はまた、選択グループ１及び２と（それぞれ）呼ぶ：

【００４４】

（Ａ）特に好適な本発明の実施形態の第一態様は、チオアルブミンをデザイン及び／又は調製するための方法を供するものであり、当該方法は以下の段階を含んでなる：

少なくともアルブミン配列の１種のインスタンスを含んでなる三次元モデルを提供する段階（好適には三次元モデルはアルブミンのアミノ酸配列に関し、最も好適にはアルブミン配列のアミノ酸配列が供され、アミノ酸配列は、三次元モデルのＣ及び／又はＮ末端で分解されない１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のアミノ酸を含んでなり、好適にはアミノ酸配列が「全長」、すなわちアルブミンの成熟アミノ酸配列である）；

【００４５】

候補アミノ酸残基が、（モデル又はアミノ酸配列の）アルブミン配列のＮ若しくはＣ末端に関して１番目、２番目、３番目、４番目若しくは５番目の残基に相当する、又は（好適には三次元モデルに関して）以下の条件：二次構造内に存在しない；少なくとも９０％の表面接触性（SASA）を有する；少なくともＢファクタースコア６０を有する；周知の哺乳類アルブミン（例えば、図2）と８０％未満の相同性を有する；周知の哺乳類アルブミ

ン（例えば、図2）と１００％相同性を有する隣接残基を有しない；周知の表現型変化を有する多型がない；且つスコア５以上を有するシステインへの非保存的なアミノ酸変化がない；ことを満たす、アルブミン配列におけるアミノ酸残基を選択する段階、

選択残基のＮ側又はＣ側において、システインで１又は複数の選択アミノ酸残基を置換する段階、又はシステインを挿入する段階、

各変化がアミノ酸欠失、置換、延長、付加又は挿入である、１又は複数のさらなる変化を、アルブミン配列へ任意に加える段階；及び、

必要なアミノ酸配列を有するポリペプチドを任意に調製する段階。

【００４６】

モデル１Ａ０６及び配列番号１に関して、選択判定基準（Ａ）で同定された候補残基は、（溶媒接触性の降順で）Ｌ５８５、Ｄ１、Ａ２、Ｄ５６２、Ａ３６４、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ７９及びＥ８６を含み、図５Ａにも示す。

【００４７】

（Ｂ）本発明の第一態様の他の好適な実施形態は、チオアルブミンをデザイン及び／又は調製するための方法を供し、当該方法は以下の段階を含んでなる：

アルブミン配列の少なくとも１種のインスタンスを含んでなる三次元モデル（好適には、三次元モデルは、アルブミンのアミノ酸配列に関し、最も好適にはアルブミン配列のアミノ酸配列もまた供され、アミノ酸配列は、三次元モデルのＣ及び／又はＮ末端で分解されない１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のアミノ酸を含んでよく、好適にはアミノ酸配列は「全長」、すなわち、アルブミンの成熟アミノ酸配列である）を供する段階；

（モデル又はアミノ酸配列の）アルブミン配列において候補アミノ酸残基を選択する段階であって、（好適には三次元モデルに関して）以下の条件：二次構造内に存在する；少なくとも９０％の表面接触性を有する；少なくとも４０のＢファクタースコアを有する；周知の哺乳類アルブミン（例えば、図2）と８０％未満の相同性を有する；周知の哺乳類アルブミン（例えば、図2）と１００％相同性を有する隣接残基を有しない；周知の表現型変化を有する多型を有しない；及び５以上のスコアを有するシステインへの非保存アミノ酸変化を有しない；ことを満たす、段階、

選択残基のＮ側又はＣ側で、１又は複数の選択アミノ酸残基をシステインで置換する段階、又はシステインを挿入する段階、

各変化がアミノ酸欠失、置換、延長、付加又は挿入である、アルブミン配列への１又は複数のさらなる変化を任意に行う段階；並びに

必要なアミノ酸配列を有するポリペプチドを任意に調製する段階。

【００４８】

モデル１Ａ０６及び配列番号１に関して、選択判定基準（Ｂ）で同定された候補残基は、（溶媒接触性の降順で）Ｄ１２９、Ｄ５４９、Ａ５８１、Ｄ１２１、Ｅ８２、Ｓ２７０、Ｑ３９７及びＡ５７８を含み、図５Ｂにもまた示される。

【００４９】

（Ｃ）本発明の第一態様の他の好適な実施形態は、チオアルブミンをデザイン及び／又は調製するための方法を供し、当該方法は以下の段階を含んでなる：少なくともアルブミン配列の１種のインスタンスを含んでなる三次元モデルを提供する段階（好適にはアルブミンのアミノ酸配列に関する三次元モデル、そして最も好適にはアルブミン配列のアミノ酸配列もまた供し、当該アミノ酸配列は三次元モデルのＣ及び／又はＮ末端で分解されない１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のアミノ酸を含んでなり、好適にはアミノ酸配列は、「全長」、すなわちアルブミンの成熟アミノ酸配列である）；

（モデル又はアミノ酸配列の）アルブミン配列において候補アミノ酸残基を選択する段階であって、当該アミノ酸残基が、（好適には三次元モデルに関して）以下の条件：二次構造内に存在しない；少なくとも８０％の表面接触性を有する；少なくとも５０のＢファクタースコアを有する；周知の哺乳類アルブミン（例えば、図2）と１００％未満の相同性を有する；図３に並べられた様々なアルブミンと８０％未満の相同性を有する；熱不安

定性を生じる周知の多型がない；及び４以上のスコアを有する１又は複数のシステインへの非保存アミノ酸変化を有しない；ことを満たす、段階

選択残基のＮ側又はＣ側で、システインを有する選択アミノ酸残基を置換する段階又はシステインを挿入する段階；

各変化がアミノ酸欠失、置換、延長、付加又は挿入である１又は複数のさらなる変化をアルブミン配列に任意に行う段階；並びに、

必要なアミノ酸配列を有するポリペプチドを任意に調製する段階。

【００５０】

モデル１Ａ０６及び配列番号１に関して、選択判定基準（Ｃ）で同定された候補残基を図５Ｃに示す。

（Ｄ）本発明の第一態様の他の好適な実施形態は、チオアルブミンをデザイン及び／又は調製するための方法を供するものであり、当該方法は、以下の段階を含んでなる：アルブミン配列の少なくとも１種のインスタンスを含んでなる三次元モデルを提供する段階（好適には、三次元モデルはアルブミンのアミノ酸配列に関し、最も好適にはアルブミン配列のアミノ酸配列もまた供し、アミノ酸配列が三次元モデルのＣ及び／又はＮ末端で分解されない１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のアミノ酸を含んでなる）；

アルブミン配列で候補アミノ酸残基を選択する段階であって、アミノ酸残基が（好適には、三次元モデルに関して）以下の条件：二次構造内に存在する；少なくとも８０％の表面接触性を有する；少なくとも３０のＢファクタースコアを有する；周知の哺乳類アルブミン（例えば、図2）に対して１００％未満の相同性を有する；図３に並べられた様々なアルブミンに対して８０％未満の相同性を有する；熱不安定性を生じることが周知の多型がない；且つ４以上のスコアを有するシステインへの非保存アミノ酸変化がない；ことを満たす、段階

選択残基のＮ側又はＣ側において、システインで１又は複数の選択アミノ酸残基を置換する段階、又はシステインを挿入する段階、

各変化がアミノ酸欠失、置換、延長、付加又は挿入である、１又は複数のさらなる変化を、アルブミン配列へ任意に行う段階；並びに、

必要なアミノ酸配列を有するポリペプチドを任意に調製する段階。

【００５１】

モデル１Ａ０６及び配列番号１に関して、選択判定基準（Ｄ）で同定された候補残基を図５Ｄに示す。

【００５２】

図５Ａ、５Ｂ、５Ｃ及び５Ｄは図１から選択したものなので、列の見出しは同様である。

【００５３】

候補残基は、アルブミン分子に存在するジスルフィド結合に関与する１又は複数のシステイン残基である（ＨＳＡ、配列番号1の場合は、１７個のジスルフィド結合が存在し、従って３４個のシステインがジスルフィド結合に関与する）。ジスルフィド結合によって結合された２つのシステインを「カウンターパート」と呼ぶ。結合コンピテントシステインを生じるために、候補残基は削除し又はパートナーシステインにおいて遊離チオールを生じるために異なるアミノ酸、特にＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａｌ又はＡｌａで置換してよい。ジスルフィド結合に関与する配列番号１の３４個のシステイン残基は、Ｃ５３、Ｃ６２、Ｃ７５、Ｃ９１、Ｃ９０、Ｃ１０１、Ｃ１２４、Ｃ１６９、Ｃ１６８、Ｃ１７７、Ｃ２００、Ｃ２４６、Ｃ２４５、Ｃ２５３、Ｃ２６５、Ｃ２７９、Ｃ２７８、Ｃ２８９、Ｃ３１６、Ｃ３６１、Ｃ３６０、Ｃ３６９、Ｃ３９２、Ｃ４３８、Ｃ４３７、Ｃ４４８、Ｃ４６１、Ｃ４７７、Ｃ４７６、Ｃ４８７、Ｃ５１４、Ｃ５５９、Ｃ５５８及びＣ５６７である。本発明に関して、これらの３４個の候補残基の一部は他のものより好適である。

【００５４】

システイン残基は、ＰｙＭＯＬソフトウェア（Warren L. De- Lano 「The PyMOL Molecular Graphics System.」DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. http://www.py

mol.org）を使用して視覚的に点検し、ジスルフィド結合中のシステインは以下の３つのカテゴリーに分けた：
－カウンターパートシステインを結合部位である可能性の高い遊離チオールとしたまま、例えばセリンで置換することができるもの。これらは、Ｃ７５、Ｃ９１、Ｃ１２４、Ｃ１６８、Ｃ１６９、Ｃ３１６、Ｃ３６０、Ｃ３６１、Ｃ５６７、Ｃ５５８に相当する。
－カウンターパートを結合部位である可能性が中程度である遊離チオールとしたまま、セリンで置換することができるもの。これらは、Ｃ９０、Ｃ１０１、Ｃ１７７、Ｃ２６５、Ｃ２７９、Ｃ２７８、Ｃ２８９、Ｃ３６９、Ｃ３９２、Ｃ４３８、Ｃ４７６、Ｃ４８７、Ｃ５１４、Ｃ５５９に相当する。
－カウンターパートを結合部位である可能性が低い遊離チオールとしたまま、セリンで置換することができるもの。これらは、Ｃ５３、Ｃ６２、Ｃ２００、Ｃ２４６、Ｃ２４５、Ｃ２５３、Ｃ４３７、Ｃ４４８、Ｃ４６１、Ｃ４７７に相当する。

【００５５】
判断は、表面接触性及び折り畳みポリペプチドに関連する潜在的な遊離チオールのＣ－アルファ－Ｃ－ベータ結合の配向性に基づく。この判断を使用して、ＨＳＡの各システイン残基に関して修飾スコアを抽出し、そして高、中、又は低とランク付けした。

【００５６】
図６Ａは、高い修飾スコアを有する全システイン残基の一覧（右側欄）を供し、この位置におけるシステイン残基の修飾が、結合部位としての使用に適当である可能性が高い遊離チオールを供しているカウンターパートシステインとなる可能性を示唆している。

【００５７】
図６Ｂは、不対の（従って遊離チオールを供している）場合に、結合部位としての使用に適当である可能性の高いカウンターパートシステインの一覧を供する。
図６の列の表示は、以下に記載するもの及び、図１について説明されるものと同様である：
修飾スコア：明細書中で説明されるように、「高」、「中」又は「低」で定義される。
ジスルフィド情報：配列番号１におけるジスルフィド対合を要約する。
（多形）表現型変化：図１において列に表示された「多形」及び「表現型変化」を要約する。

【００５８】
修飾のための好適なシステイン残基は、図６Ａにおいて供される他の情報、例えば指定の二次構造、｛（Clustal Wによって並べられた）哺乳類アルブミンの間で100%の｝隣接保存残基を有しないシステイン残基、表現型変化を生じる周知の多型が存在しないことに基づいてさらに選択することができるかもしれない。

【００５９】
あるいは、修飾のためのシステイン残基は、図６Ａにおいて供されるそのカウンターパートシステイン残基の修飾によって生じる（遊離チオール基を含有する）システイン残基の環境を調べることによって選択することができ、特性は例えば高い％ＳＡＳＡなどが好適である（図6B，５つ目の列）。

【００６０】
明確にすると、配列番号１のヒト血清アルブミン以外のアルブミンに関する等価な残基が、変異に好適である。このような等価な残基は、配列番号１と同一の残基数を有しても有さなくてもよいが、例えば配列番号１並びに他のアルブミン、例えば図２及び／又は図３などに記載のものとの相同アライメントに関して、当業者によって明確に同定できる。例えば、図２において、横の「目盛」の１６０における位置の残基は等価であるが、異なる残基数を有し、時折、異なるアミノ酸、例えばヒトではＬ１５９、ヤギ断片ではＷ１３４、マカクではＬ１５１及びマウスではＭ１５９を有する。アライメント、例えば図２又は図３等に関して、等価な残基は配列番号１の候補アミノ酸の１０、９、８、７、６、５、４、３、２又は１個のアミノ酸の範囲内であることが好ましい。当該アライメントの上部の「目盛」は、アミノ酸が配列番号１の候補アミノ酸の１～１０個のアミノ酸の範囲か

否かを示す。
【００６１】
グループ（Ａ）の選択判定基準は、グループ（Ｂ）より好適であり、同様にグループ（Ｂ）はグループ（Ｃ）より好適であり、グループ（Ｃ）は同様にグループ（Ｄ）より好適である。
【００６２】
当該方法は、ポリペプチドの受容体結合能力及び／又は結合コンピテンス（competence）を測定すること、並びに受容体結合能力及び／又は結合コンピテンスを有する又は有さないポリペプチドを任意に選択することをさらに含んでも含まなくてもよい。ポリペプチドを「調製すること」は、宿主細胞中でポリペプチドを発現すること及び／又はポリペプチドを宿主又は宿主細胞培地から精製することを含んでも含まなくてもよい。当該方法は、次の判定基準の１つ又は全てを満たす残基の選択を支持することを含んでよい：
－高い表面接触性を有する残基が、低い表面接触性を有するものより好適であること；
－他のアミノ酸からシステインへの保存的変異が非保存的変異より好適であること；
あるいは、又はさらに、本明細書を通じて詳述する通り選択判定基準は、本発明の第一態様の方法において、残基を選択するために使用しても使用しなくてもよい。
【００６３】
本発明の第二態様は、本発明の第一態様に従ってデザイン及び／又は産生されたポリペプチド配列及び／又はポリペプチドを含んでなるチオアルブミンを供する。
【００６４】
好適には、ポリペプチドは組換え型ポリペプチドである。好適にはポリペプチドは、単離及び／又は精製されたポリペプチドである。好適には、ポリペプチドは合成されたもの且つ／又は本来天然に生じないものである。具体的には、本発明は配列番号１の残基１～５８５と少なくとも６０％同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はこの断片若しくは融合物を供し、ここで：
（ａ）配列番号１の位置３４と等価な位置に、結合コンピテントシステイン残基が存在し；且つ
（ｂ）ポリペプチド中の他の箇所に、１個又は複数の、好適には２個以上の結合コンピテントシステイン残基が存在する。
【００６５】
さらに、本発明は、配列番号１の残基１～５８５と少なくとも６０％同一であるアミノ酸配列、又はこの断片若しくは融合物を含んでなる結合コンピテントポリペプチドを供し、当該ポリペプチド中に：
（ａ）配列番号１の位置３４と等価な位置に、結合コンピテントシステイン残基が存在せず；且つ、
（ｂ）ポリペプチド中の他の箇所に、１又は複数の、好適には２個以上又は３個以上の結合コンピテントシステイン残基が存在する。
【００６６】
ポリペプチドは、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の結合コンピテントシステイン残基を含んでも含まなくてもよい。
【００６７】
さらに詳細には、（周知のアルブミン配列、例えば配列番号1などに関して説明される）ポリペプチドは、１又は複数の以下のものを含んでも含まなくてもよい：
（ａ）配列番号１の残基Ｌ５８５、Ｄ１、Ａ２、Ｄ５６２、Ａ３６４、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ７９、Ｅ８６、Ｄ１２９、Ｄ５４９、Ａ５８１、Ｄ１２１、Ｅ８２、Ｓ２７０、Ｑ３９７及びＡ５７８のいずれかと等価な位置に相当する位置での、システインでないアミノ酸のシステインでの置換；
（ｂ）配列番号１の残基Ｌ５８５、Ｄ１、Ａ２、Ｄ５６２、Ａ３６４、Ａ５０４、Ｅ５０５、Ｔ７９、Ｅ８６、Ｄ１２９、Ｄ５４９、Ａ５８１、Ｄ１２１、Ｅ８２、Ｓ２７０、Ｑ

３９７及びＡ５７８のいずれかと等価な位置に相当する又は相当しないアミノ酸のＮ又はＣ側に隣接する位置でのシステインの挿入；
（ｃ）Ｃ３６０、Ｃ３１６、Ｃ７５、Ｃ１６８、Ｃ５５８、Ｃ３６１、Ｃ９１、Ｃ１２４、Ｃ１６９及び／又はＣ５６７の欠失又は置換によって生じる又は生じない、Ｃ３６９、Ｃ３６１、Ｃ９１、Ｃ１７７、Ｃ５６７、Ｃ３１６、Ｃ７５、Ｃ１６９、Ｃ１２４及びＣ５５８のいずれかに相当する又は相当しない位置の、遊離チオール基を有するシステイン。
（ｄ）アルブミン配列のＮ末端残基のＮ側及び／又はアルブミン配列のＣ末端残基のＣ側へのシステインの付加。

【００６８】

（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の置換、欠失、付加又は挿入事象により、置換、挿入、欠失及び付加現象の前のポリペプチドに対して、最終的に、ポリペプチド配列の結合コンピテントシステイン残基の数が増加する。上記の（ａ）～（ｄ）内において、前記残基の全ての残基が好適である。しかしながら、各（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）において、残基は優先度が低下していく順で収載される。

【００６９】

チオアルブミンは、１又は複数の自然発生の遊離チオール基、例えばＨＳＡ中のシステイン３４（配列番号1）などが、システインでないアミノ酸へ修飾されるポリペプチドを含んでも含まなくてもよい。例えば、システインは相対的に高い保存スコア（例えば、図4に従って計算されるような1，2又は3）を有するアミノ酸、例えばアラニン又はセリンなどによって置換されても置換されなくてもよい。チオアルブミンは、１又は複数の自然に生じる遊離チオール基、例えばＨＳＡ（配列番号1）中のシステイン３４などが存在するポリペプチドを含んでも含まなくてもよい。

【００７０】

明細書中で詳述するように、本発明は、１又は複数の延長、付加、挿入、置換又は欠失によって、システイン残基を導入することによって達成される。

【００７１】

付加は、延長及び／又は挿入によって行われてもよい。

【００７２】

例えば、１又は複数の結合コンピテントシステインは、延長によって；例えば、単一システイン残基、あるいは１又は複数の結合コンピテントシステインを含む長いポリペプチドとして付加されても付加されなくてもよいさらなるシステイン残基を、分子のＮ末端又はＣ末端へ付加することによって、アルブミン中に生じても生じなくてもよい。システイン残基は、アルブミンのＮ又はＣ末端に直接隣接して付加してもよい。あるいは、アルブミン及びシステイン残基のＮ及び／又はＣ末端の間に位置する１又は複数の他のアミノ酸残基が存在してもよい。２個以上のシステイン残基を付加する場合には、付加されたシステインの一部又は全ては、１又は複数の他のアミノ酸、例えば１～５０個のアミノ酸、例えば１から、１０、２０、３０又は４０個のアミノ酸～１０から、２０、３０、４０又は５０個のアミノ酸によって互いに分離してもよい。好適なＮ末端延長は、成熟アルブミン（すなわち、そのリーダー配列から切断されたアルブミン）のＮ末端に直接隣接するＣｙｓの付加である。例えば、配列番号１を含んでなる又は配列番号１から成るアルブミンに関して、Ｃｙｓは好適には、１番目のＡｓｐ（D1）に対して直接的にＮ末端となることである。このようなアルブミンは、「Ｃｙｓ－アルブミン」、例えば（ＨＳＡがヒト血清アルブミンである）「Ｃｙｓ－ＨＳＡ」と呼ぶ。アルブミン、例えば配列番号１などの他の好適なＮ末端延長は、Ｃｙｓ－Ａｌａ－アルブミン、例えばＣｙｓ－Ａｌａ－ＨＳＡなどを含む。好適なＣ末端延長は、アルブミン、例えば成熟アルブミンなどのＣ末端に直接隣接するＣｙｓの付加である。例えば、配列番号１を含んでなる又はからなるアルブミンに関して、Ｃｙｓは好適には、最後のＬｅｕ（L585）残基に対して直接的なＣ末端である。このようなアルブミンは、「アルブミン－Ｃｙｓ」、例えば、ＨＳＡ－Ｃｙｓと呼ぶ。アルブミン、例えば配列番号１などの他の好適なＣ末端延長は、アルブミン－Ａｌａ－Ｃｙ

ｓ、例えばＨＳＡ－Ａｌａ－Ｃｙｓなどを含む。上述のように延長を供するのに適当なポリペプチドは、アルブミンのＣ又はＮ末端アミノ酸のＣ又はＮ側、例えば配列番号１中のＬ５８５のＣ側などへ付加又は挿入してよい。

【００７３】

ポリペプチドは、結合パートナー、例えば生物活性化合物などが結合されるさらなるリンカーをさらに含んでも含まなくてもよい。例えばリンカーは、１級アミン、例えばリジンなどを含んでよい。

【００７４】

１又は複数の結合コンピテントシステインは、挿入によって、例えばアルブミン配列からアミノ酸残基の除去なしに１又は複数の付加システインを添加することによって、あるいは１又は複数の隣接アミノ酸を少なくとも１つのシステインを含む多くの残基で置換することによって、アルブミン中に生成されてもされなくてもよく、従ってこれによりポリペプチドの全長が伸展する。例えば、システイン残基は、明細書中で同定されるアルブミン残基に直接隣接して導入されてよい。システイン残基は、単一システイン残基として又はポリペプチド内に導入されてよい。ポリペプチドは、２～５０個のアミノ酸長、好適には２、１０、２０、３０又は４０～１０、２０、３０、４０又は５０個のアミノ酸長でよい。

【００７５】

あるいは、又は加えて、本発明は、アルブミンの１又は複数のジスルフィド結合中のシステイン残基の１つの異なるアミノ酸残基での置換を含み、これによりジスルフィド結合が切断され付加遊離チオール基から離れる。例えば、１又は複数のＨＳＡの１７個の自然発生のジスルフィド結合のシステインは、結合コンピテントシステインを供するために置換されてよい。このような置換は、ジスルフィド結合パートナーをもはや有しないために置換されていないシステインを生じ、従って遊離チオール基を供する。結合コンピテントシステインは、アルブミンの１又は複数の自然発生のジスルフィド結合、例えばアルブミン、例えばＨＳＡ（例えば、配列番号1）などの１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７個の自然発生のジスルフィド結合から供されてよい。例えば、他のシステイン残基とジスルフィド結合を自然に形成する１個のシステイン残基は、相対的に保存されたアミノ酸残基、特にＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｖａｌ又はＡｌａで置換されても置換されなくてもよい。配列番号１に関して、ジスルフィド結合に関与するシステイン残基は、Ｃ５３、Ｃ６２、Ｃ７５、Ｃ９１、Ｃ９０、Ｃ１０１、Ｃ１２４、Ｃ１６９、Ｃ１６８、Ｃ１７７、Ｃ２００、Ｃ２４６、Ｃ２４５、Ｃ２５３、Ｃ２６５、Ｃ２７９、Ｃ２７８、Ｃ２８９、Ｃ３１６、Ｃ３６１、Ｃ３６０、Ｃ３６９、Ｃ３９２、Ｃ４３８、Ｃ４３７、Ｃ４４８、Ｃ４６１、Ｃ４７７、Ｃ４７６、Ｃ４８７、Ｃ５１４、Ｃ５５９、Ｃ５５８及びＣ５６７である。修飾（すなわち、欠失又は置換）に好適なシステイン残基は、特にＣ３６０、Ｃ３１６、Ｃ７５、Ｃ１６８、Ｃ５５８、Ｃ３６１、Ｃ９１、Ｃ１２４、Ｃ１６９及び／又はＣ５６７に相当し、従って配列番号１の１又は複数のＣ３６９、Ｃ３６１、Ｃ９１、Ｃ１７７、Ｃ５６７、Ｃ３１６、Ｃ７５、Ｃ１６９、Ｃ１２４及びＣ５５８に結合コンピテントシステインを生じる。

【００７６】

さらに、結合コンピテントシステインは、タンパク質構造におけるジスルフィド結合のシステインの１つの欠失によって、アルブミン中に生じても生じなくてもよく、これによりジスルフィド結合が切断されさらなる遊離チオール基が供される。

【００７７】

あるいは、又は加えて、アルブミン分子に存在するがジスルフィド結合に関与しない１又は複数のシステイン残基（例えば、配列番号1の場合はCys34）は、削除されても削除されなくてもよい（すなわち、異なるアミノ酸での置換なしに）或いは異なるアミノ酸、特にＳｅｒ、Ｔｈｒ、ＶａＩ又はＡｌａで置換されても置換されなくてもよい。

【００７８】

２個以上の結合コンピテントシステイン残基を含んでなるポリペプチドに関して、ポリ

ペプチドが折り畳まれる場合に、結合コンピテントシステイン残基は折り畳まれたタンパク質の表面上に相対的に均一に分布されても分布されなくてもよい。用語「折り畳み」は、天然の立体配置、例えば最も熱力学的に安定な折り畳み立体配置中に、ポリペプチド／タンパク質を折り畳むことを含む。相対的に均一な分布の利点は、２つ以上の結合部分の間に立体障害なく、２つ以上の部分のチオアルブミンへの結合ができることである。これは、チオアルブミンに結合される隣接部分（結合パートナー）間の、例えば立体障害などの問題に起因する潜在的な活性喪失を最小限にし、且つ任意に除去する利点を有する。このような部分、例えば生物活性分子は、相対的に大きくてよい。

【００７９】

好適には２個以上の結合コンピテントシステインは、チオアルブミン分子の表面上に分布され、これらは可能な限り、例えば幾何的に可能な限り互いから離れるようスペースが置かれる。好適には、２個以上の結合コンピテントシステインの間の距離は、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０又は８０オングストロームである。好適には、各結合コンピテントシステインは、分子において全ての他の結合コンピテントシステインから少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０又は８０オングストローム離れる。２つの結合コンピテントシステイン間の距離は、好適には、例えばアルブミンモデルで示されるように、折り畳みアルブミン分子の最長軸の長さの、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は９５％、最も好適には１００％の距離である。例えば、タンパク質構造１ＡＯ６で示されるように、配列番号１の最長軸は約８５オングストロームである。従って、２個以上のシステイン残基は少なくとも６５、７０、７５又は最も好適には８０オングストローム離れていることが好ましい。最も好適には、各結合コンピテントシステイン残基は、折り畳みアルブミン分子の最長軸の少なくとも８０、９０又は９５％、そして最も好適には１００％の長さの距離である。

【００８０】

好適には、結合コンピテントシステインの側鎖は、互いから離れる方向へ向けられ且つ／又はシステインに結合された部分がアルブミン構造の中心から離れる方向へ向けられるように方向付けられる。これは、結合部分及び／又はアルブミン部分自体の間の相互作用を防止する利点を供する。

【００８１】

アミノ酸配列に関して、候補アミノ酸残基は、ソフトウェア、例えばＰｙＭＯＬ（Warren L. DeLano 「The PyMOL Molecular Graphics System」 DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. http://www.pymol.org）などを使用して視覚的に点検されてよい。候補アミノ酸は、その基の他のメンバーへの近接性に基づいてカテゴリーに分けてよい。例えば、候補アミノ酸は、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個のカテゴリーに分けてよい。候補アミノ酸の組合せが異なるカテゴリーから選択されることが好ましい。すなわち、チオアルブミンが各カテゴリー由来の１又は少数の変異を含むことが好ましい。

【００８２】

配列番号１に関して、システイン変異の特に好適な組合せを特定するために、図５Ａ及び５Ｂの候補残基を分析するためにＰｙＭＯＬを使用した。このような組合せは、２個以上の結合コンピテントシステイン残基を有するチオアルブミンをデザインするために使用してよい。選択グループ１及び２は、明細書中で説明される選択方法の図５Ａ及び５Ｂ由来の選択判定基準（Ａ）及び（Ｂ）に（それぞれ）相当する。選択グループ３は、図６Ｂで特定される残基に相当する。特に好適な残基は、列の見出しが図１と同様の図６Ａ及び６Ｂに示されるものに加え、さらに明細書中で説明される「選択グループ」及び「近接グループ」である。

【００８３】

列の見出しが図１及び図６で使用されたものと同様である図１０に示されるものに加え、さらに以下の分析結果を示す：

近接グループ：ＨＳＡ（特に、配列番号1）内の部位のサブセットを説明するための、明細書中で説明される近接グループの割り当て。

【００８４】
例えば、（図5Aに収載される）選択グループ１で選択される候補アミノ酸残基はＰｙＭＯＬソフトウェアを使用して視覚的に点検し、選択されたアミノ酸は、選択グループ１の他のメンバーへのこれらの近接性に基づいたカテゴリーに分けた。（図10「近接グループ」，右側欄でA～Eと表示された）５つのグループを生じ、４つは外観検査によって生じた。グループＥは、Ｎ末端領域に存在することが周知である１ＡＯ６中の不可視のアミノ酸残基を含有する。加えて、ｃｙｓ３４が近接グループＡ中に存在することが観察された。
【００８５】
同様に、（図5Bに収載された）選択グループ２で選択されたアミノ酸残基は、ＰｙＭＯＬソフトウェアを使用して視覚的に点検され、選択されたアミノ酸は、選択グループ２の他のメンバーへのこれらの近接性に基づいたカテゴリー分けられた。（図10「近接グループ」，右側欄で、Ｆ～Ｊと表示された）５つのグループを生じた。
同様に、ジスルフィド結合の切断を生じている変異によって生じることができる、（図6Bに収載される）選択グループ３で選択される好適な自由システイン残基は、ＰｙＭＯＬソフトウェアを使用して視覚的に点検され、選択されたアミノ酸をそのグループの他のメンバーへのこれらの近接性に基づいたカテゴリーに分けた。（図10「近接グループ」，右側欄で、K～Nと表示された）４つのグループを生じた。選択グループ３の残基を言及する場合、前述の残基は生じる結合コンピテントシステイン（例えば、図6B）である。このような結合コンピテントシステインを生じるために、ジスルフィド結合にあるカウンターパートシステイン（例えば、図6A）は、例えば欠失又は置換によって除去すべきであることは明らかである。
【００８６】
２個以上の変異の組合せが望まれる場合、（例えば、配列番号1に関して）異なる「近接」グループ内に存在するアミノ酸残基は、同一の近接グループ内に存在するものよりも好適である。配列番号１に関して、１４個の近接グループ（すなわち、A～N）が存在する。２個以上の結合コンピテントシステインを有するチオアルブミンに関して、１４個のグループそれぞれから定義される結合コンピテントシステインが存在しない、又は１つ存在することが好ましい。つまり、このようなチオアルブミンが、同一グループに含まれる２個以上の結合コンピテントシステインを含まないことが好ましい。この判定基準を満たす多くの置換（permutation）が存在する。
【００８７】
例えば、２つの遊離チオール基を含有するチオアルブミン変異体に関して、選択グループ１を生じた選択判定基準に基づく残基であって、一方の残基が近接グループＣのＡ３６４と結合するために近接グループＡから選択される、Ｔ７９＋Ａ３６４の組合せは、近接グループＡにどちらも存在するＴ７９＋Ｅ８６よりも好適である。
【００８８】
システイン３４を含む組合せに関して、近接グループＡ、Ｆ又はＫから残基を選択しないことが好ましい。つまり、１又は複数の近接グループＢ～Ｅ、Ｇ～Ｊ及びＬ～Ｎから残基を選択することが好ましい。
【００８９】
選択グループ１の中から選択される好適な変異の例には、以下のものが含まれてよい：
－選択グループ１から選択される２個のアミノ酸残基に関して；近接グループＡ＋Ｃ由来のアミノ酸残基、例えばＴ７９＋Ａ３６４が好適であり、同様に、近接グループＣ＋Ｅから選択されるアミノ酸残基、例えばＡ３６４＋Ｄ１もまた好適である。さらに、近接グループＤ＋Ｅに由来するアミノ酸残基、例えばＬ５８５＋Ａ２、又は＋Ｌ５８５のＣ側＋Ａ２、或いはＧ＋Ｉに由来するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ａ５８１が好適である。
－選択グループ１から選択される３個のアミノ酸残基に関して；近接グループＡ＋Ｃ＋Ｂに存在するアミノ酸残基は、例えばＴ７９＋Ａ３６４＋Ｄ５６２が好適である。同様に、近接グループＢ＋Ｃ＋Ｅ、例えばＤ５６２＋Ａ３６４＋Ａ２又はＤ５６２＋Ａ３６４＋Ｄ１から選択されるアミノ酸残基もまた好適である。

－選択グループ１から選択される４個のアミノ酸残基に関して；近接グループＡ＋Ｃ＋Ｂ＋Ｄに存在するアミノ酸残基、例えばＴ７９＋Ａ３６４＋Ｄ５６２＋Ａ５０４、或いはＴ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｌ５８５が好適である。近接グループＡ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｅ、例えばＣ３４＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ａ２、Ｔ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｄ１などから選択されるアミノ酸残基がさらに好適である。
－選択グループ１から選択される５個のアミノ酸残基に関して；近接グループＡ＋Ｃ＋Ｂ＋Ｄ＋Ｅに存在するアミノ酸残基、例えばＴ７９＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ｌ５８５＋Ｄ１などが好適である。同様に、Ｅ８６＋Ｄ５６２＋Ａ３６４＋Ａ５０４＋Ａ２もまた好適である。
－上述のアルブミン変異体は、配列番号１のＣｙｓ３４、又は他のアルブミン中の等価な位置に、システインをさらに含んでも含まなくてもよい。

【００９０】

選択グループ２の中から選択される好適な変異の例には、以下を含んでよい：
－選択グループ２から選択される２個のアミノ酸残基に関して；近接グループＧ＋Ｉに存在するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ａ５８１が好適である。あるいは、近接グループＧ＋Ｈに存在するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ｄ１２９が好適である。
－選択グループ２から選択される３個のアミノ酸残基に関して；近接グループＧ＋Ｉ＋Ｆに存在するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ａ５８１＋Ｅ８２が好適である。あるいは、近接グループＧ＋Ｉ＋Ｈに存在するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ａ５８１＋Ｄ１２９が好適である。
－選択グループ２から選択される４個のアミノ酸残基に関して；近接グループＧ＋Ｉ＋Ｆ＋Ｈに存在するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ａ５８１＋Ｅ８２＋Ｄ１２９が好適である。
－選択グループ２から選択される５個のアミノ酸残基に関して；近接グループＧ＋Ｉ＋Ｆ＋Ｈ＋Ｊに存在するアミノ酸残基、例えばＳ２７０＋Ａ５８１＋Ｅ８２＋Ｄ１２９＋Ｑ３９７が好適である。しかしながら、変異Ａ５７８、Ａ５８１と組合せたＤ５４９は好適でない。さらに、Ｄ５４９、Ａ５７８、Ａ５８１への変異、又は選択グループ１由来のＬ５８５の変異との組合せは好適でない。

【００９１】

結合コンピテント遊離チオールのために、選択グループ３の中から選択された好適な部位の例には、以下の事項が含まれる：
－選択グループ３から選択される２個のアミノ酸残基に関して；近接グループＭ＋Ｌに存在するアミノ酸残基、例えばＣ３６９＋Ｃ１７７が好適である。同様に、Ｃ３６１＋Ｃ１２４もまた好適である。
－ジスルフィド結合を切断する２個以上の変異は少ない方が好適である。
－上述のアルブミン変異体は、さらに配列番号１のＣｙｓ３４、又は他のアルブミン中の等価な位置にシステインを含んでも含まなくてもよい。

【００９２】

選択グループ１、２及び３由来の部位の組合せはまた、選択グループ１由来の部位が選択グループ２由来の典型的に好ましい部位であり、選択グループ３から選択される典型的に好ましい部位であるものとすることができる。

【００９３】

選択グループ１＋２由来の部位の例には、近接グループＣ＋Ｉ由来の残基、例えばＡ３６４＋Ａ５８１が含まれてよい。あるいは、近接グループＡ＋Ｇ＋Ｉ由来の残基、例えばＣ３４＋Ｓ２７０＋Ａ５８１、近接グループＡ＋Ｈ＋Ｇ＋Ｉ由来の残基、例えばＣ３４＋Ｄ１２９＋Ｓ２７０＋Ａ５８１、近接グループＡ＋Ｃ＋Ｉ由来の残基、例えばＴ７９＋Ａ３６４＋Ａ５８１、又は近接グループＣ＋Ｉ＋Ｈ由来の残基、例えばＡ３６４＋Ａ５８１＋Ｄ１２９もまた好適である。

【００９４】

選択グループ１＋３由来の部位の例には、近接グループＡ＋Ｌ＋Ｍ由来の残基、例えば

Ｃ３４＋Ｃ１６９＋Ｃ３１６、近接グループＣ＋Ｌ由来の残基、例えばＡ３６４＋Ｃ１７７を含むことが好適である。あるいは、近接グループＢ＋Ｍ由来の残基、例えばＤ５６２＋Ｃ３６９が好適である。

【００９５】

選択グループ２＋３由来の部位の例には、近接グループＨ＋Ｍ由来の残基、例えばＤ１２９＋Ｃ３６９を含むことが好適である。あるいは、近接グループＩ＋Ｍ由来の残基、例えばＡ５８１＋Ｃ３６９が好適である。

【００９６】

選択グループ１＋２＋３由来の部位の例には、近接グループＡ＋Ｈ＋Ｍ＋Ｄ由来の残基、例えばＣ３４＋Ｄ１２９＋Ｃ３６０＋Ｌ５８５、近接グループＢ＋Ｈ＋Ｍ由来の残基、例えばＤ５６２＋Ｄ１２９＋Ｃ３６９を含むことが好適である。

【００９７】

上述の組合せは、近接グループの次のセット由来の残基の組合せより、一般的に好適である：（ｉ）Ａ、Ｋ及びＦ；（ｉｉ）Ｂ、Ｄ、Ｉ、Ｊ及びＮ；（ｉｉｉ）Ｃ及びＭ；（ｉｖ）Ｈ及びＬ。

【００９８】

本発明の上述のアルブミン変異体は、配列番号１以外のアルブミンに基づく場合、配列番号１のＣｙｓ３４、又は等価な位置にシステインをさらに含んでも含まなくてもよい。１個以上の遊離チオール基（結合コンピテントシステイン）の導入のための部位は、選択グループ１、２及び３から選択されていることを、当業者であれば理解するであろう。しかしながら、このアプローチはまた配列番号１から選択される他の残基由来の１個以上の遊離チオール基の導入のための部位を選択するために使用されてよく、すなわち他の有効な選択グループを生じるために開示された方法を使用することができる。

【００９９】

好適なチオアルブミンは、位置３４の天然に生じるＣｙｓに加えて、位置２及び５８５にＣｙｓを有する配列番号１を含んでなる（配列番号78，コンストラクト「TA33」）。より好適なチオアルブミンは、位置３４の天然に生じるＣｙｓに加えて、位置２、３６４、５６２、５８５にＣｙｓを有する配列番号１を含んでなる（配列番号82，コンストラクト「TA38」）。位置２、３６４、５６２及び５８５に３個又は４個のＣｙｓを含んでなるチオアルブミンもまた、好適である。

【０１００】

ポリペプチドは、グリコシル化を減少する少なくとも１個の変異を含んでも含まなくてもよい。

【０１０１】

本発明の第三の態様は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを供する。ポリヌクレオチドは、発現され得る宿主に対してコドン最適化されてもされなくてもよい。配列番号２は、ＨＳＡ（配列番号1）の通常のコード配列を供する。配列番号３は、出芽酵母からの発現のためにコドン最適化されたＨＳＡ（配列番号1）のコード配列を供する。本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを供するために、配列番号２又は３は変異されてよい。好適には、ポリヌクレオチドは合成且つ／又は組換え型である。好適には、ポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、リーダー配列を有する又は有しないＨＳＡをコードする。例えば、ポリヌクレオチドは、ＨＳＡの天然のリーダー配列を有するＨＳＡ（配列番号102のアミノ酸1～24個）又は融合リーダー配列を有するＨＳＡ（配列番号49のアミノ酸1～24個）をコードする。

【０１０２】

本発明の第４の態様は、本発明の第３の態様のポリヌクレオチドを含んでなるプラスミドを供する。プラスミドは、（参照により明細書中に全て組み込まれる）ＷＯ２００５／０６１７１９、ＷＯ２００５／０６１７１８及びＷＯ２００６／０６７５１１において説明されるような、２ミクロン単位のプラスミドである。プラスミドは、例えばシャペロン、特にＰＤＩの発現を通じて、増強されたシャペロン活性を示してよい。

【０１０３】
本発明の第５の態様は、発現系、例えば本発明の第３の態様のポリヌクレオチド及び／又は本発明の第４の態様のプラスミドを含んでなる宿主細胞を供する。好適には、宿主細胞は、例えばヒト又はウシ細胞の哺乳類細胞、或いは真菌細胞、例えば酵母細胞等である。あるいは、宿主細胞は、バクテリア細胞、例えばバシラス属（Bacillus）若しくは大腸菌（Escherichia coli）又はウイルス細胞、例えばバキュロウイルス（Baculovirus）、又は植物細胞、例えば米、例えばオリザセティバ（Oryza sativa）であってよい。最も好適には、細胞は、例えばサッカロミセス属（Saccharomyces）（例えば、出芽酵母）、ピチア属（Pichia）又はアスペルギルス属（Aspergillus）の細胞等の酵母細胞である。
【０１０４】
本発明の第６の態様は、結合パートナー、例えば生物活性化合物、及び本発明のポリペプチドを含んでなる複合体であって、ここで結合パートナーがポリペプチドの結合コンピテントシステイン残基を介してポリペプチドに結合される複合体を供する。結合パートナーは、治療、診断又は造影化合物、例えば明細書中で言及するものである。複合体は、それぞれ異なる且つ／又は同一化合物の複数のコピーである、２個以上、例えば２、３、４、５、６、７、８、９又は１０個の結合パートナーを含んでよい。好適には、各結合パートナーは、ポリペプチドの結合コンピテントシステイン残基を介してポリペプチドに結合され、しかしながら結合パートナーは、他の手段、例えば遺伝子融合又はシステインでないアミノ酸、例えばリジン等への共有結合によって結合されてよい。
【０１０５】
本発明の第７の態様は、以下を含んでなる本発明のポリペプチドの製造方法を供する：
（ａ）ポリペプチドの発現が可能な条件下で、本発明の宿主細胞を培養する段階；並びに、
（ｂ）宿主細胞及び／又は宿主細胞成長培地由来のポリペプチドを回収する段階。
【０１０６】
従って、本発明はまた、以下：（ａ）上記で定義されるような選択のポリヌクレオチドコードタンパク質産生物を含んでなる本発明の宿主細胞を供する段階；及び（ｂ）宿主細胞を成長させる段階（例えば、培養液で宿主細胞を培養する段階）、
を含んでなる本発明のポリペプチド（又はタンパク質）の製造のための方法を供し、これにより、１又は複数のヘルパータンパク質の過剰発現を生じるように遺伝的に修飾されていない同一宿主細胞を、同一条件下で成長させる段階（例えば、培養する段階）によって達成される選択のタンパク質産生物の産生レベルと比べて、増加されたレベルの選択のタンパク質産生物を含んでなる細胞培養又は組換え型生物を生じる。
宿主細胞を成長させる段階は、多細胞生物由来の宿主細胞を再成長させて多細胞の組換え型生物（例えば植物又は動物など）にする段階、及び、任意に、これに由来する１又は複数の後代世代を生じる段階を含んでも含まなくてもよい。
【０１０７】
当該方法は、これにより発現された選択のタンパク質産生物を、培養された宿主細胞、組換え型生物又は培養液から精製する段階をさらに含んでも含まなくてもよい。
当該産生方法は、ポリペプチドの結合コンピテントシステイン残基を通して、結合パートナーを本発明のポリペプチドに結びつける段階を含んでよい。適切な結合方法及び結合パートナーは、明細書中で説明される。
【０１０８】
本発明の第８の態様は、本発明の複合体並びに少なくとも１つの医薬的に許容されるキャリア及び／又は希釈剤を含んでなる組成物を供する。
【０１０９】
本発明の第９の態様は、医薬成分及び／又は医薬産生物を製造するための方法を供し、本発明のチオアルブミンを製造する段階、任意にさらなる分子をチオアルブミンに結合する段階、得られる複合体を医薬的に許容される希釈剤及び／又はキャリアで任意に製剤する段階、並びに産生物を単位剤形で任意に調製する段階を含んでなる。

【０１１０】
本発明の第１０の態様は、チオアルブミン複合体の産生のための本発明のポリペプチドの使用を供する。
【０１１１】
本発明の第１１の態様は、本発明に記載の及び／又は本発明の方法によって生成される複合体の、疾病の治療、疾患の治療及び／又は診断のための使用を供する。
【０１１２】
本発明の第１２の態様は、本発明の１又は複数のアルブミンを含んでなるゲルを供する。ゲルは、任意の適当な方法によって形成されてよい。例えば、ゲルは、適当な温度、例えば室温（15～25℃，例えば20℃）又は体温（36～38℃，好適には36.9℃）で、アルブミン溶液、又は懸濁液をインキュベートすることによって形成されてよい。ゲルは、医療機器、例えばステントをコーティングするために使用してよい。ゲルは、創傷被覆中に又は上に使用してよい。アルブミンは、ゲル化する前に又はした後に、医療機器又は創傷被覆に適用されてよい。アルブミンは、実験施設内（ex situ）で又はインサイチュ（in situ）で（例えば、ヒト又は動物体上への適用又は中への挿入の前後、或いは挿入中に、医療機器又は被覆に）適用されてよい。
【０１１３】
本発明のポリペプチド及び／又は複合体は、例えば、血管新生の適用、抗血管新生の適用において使用してよいナノ粒子を調製するために、及び医療機器、例えばステントをコーティングするために使用してよい。ナノ粒子は、例えば非密着結合へのターゲティングに有効であり、従って腫瘍、例えば癌腫瘍のターゲティングに関して有用である。ナノ粒子は貪食細胞による貪食及び提示に特に感受性が高いので、免疫反応を誘発するために、ナノ粒子はまた抗原をターゲットにするのに有用であるとすることができる。本発明は、部分（結合パートナー）に結合されても結合されなくてもよい、本発明のチオアルブミンのみから成るナノ粒子を供する。本発明はまた、本発明のチオアルブミンを含んでなる、部分に結合されても結合されなくてもよいナノ粒子、並びにアルブミン関連であっても関連でなくてもよいナノ粒子の１又は複数の他の構成物を供する。好適な実施形態において、本発明のチオアルブミンは、ポリペプチドの表面上に位置する、少なくとも２つの結合コンピテントシステイン残基を含んでなる。このようなチオアルブミンは、１又は複数の結合コンピテントシステイン残基がナノ粒子の形成において使用され、１又は複数の結合コンピテント残基が、結合パートナー、例えば生物活性分子への結合のために使用されるナノ粒子の調製のために使用してよい。
【０１１４】
本発明は、あらゆるアルブミンに関する。好適な残基が配列番号１との関連で同定されている一方で、当業者であれば他のアルブミン、例えば図２及び３に開示されるアルブミンの配列中の等価な残基を特定し、そしてこのような等価な残基における（配列番号1以外の）アルブミンの変異は本発明の一部であることを理解することができるであろう。等価な残基は、例えば配列番号１と相同性アライメントで同定することができる。配列番号１以外のアルブミン中の残基は、配列番号１中のその等価な残基に同調する同一の残基を有しても有さなくてもよい。従って、本発明は、任意のアルブミン配列、例えばに表１に示される配列、さらに好適には、図２及び／又は３示される配列に基づいたチオアルブミンを供する。「に基づいた」は、１又は複数のさらなる遊離チオールを導入するためのアルブミン配列の修飾を含む。
【０１１５】
組換え型アルブミンは、高レベルの結合コンピテント遊離チオール基を有することによって、動物由来のアルブミンに比べて利点があり、病原性プリオン及びウイルスの混入の危険性なしに、製造することができる。チオアルブミン複合体の利点は、結合パートナーのために、チオアルブミン部分が別々に調製されることである。従って、チオアルブミンの１バッチは、多くの異なるチオアルブミン複合体を生成するために使用してよい。また、複合体の個々の構成成分は異なる方法によって製造することができ、従って１つの方法

、例えば、宿主細胞、例えば酵母における異種タンパク質発現に限定されない。さらに、チオアルブミンは、複数の結合部位を含んでなり、従って単一のチオアルブミンは１タイプ以上の結合パートナー（例えば、治療剤、診断剤、ターゲティング剤、造影剤）、及び／又は１又は複数のタイプの結合パートナーの複数のコピーに結合されてよい。異なるタイプの結合パートナーにチオアルブミンを結合する能力により、多機能性種を供することができる。チオアルブミンを結合パートナーの複数のコピーへ結合する能力により、分子濃度を増加することができ、これにより結合パートナーのたった１つのコピーを有する複合体と比較して、所定の目的に必要なチオアルブミン複合体の量、又は体積は増加する。アルブミン融合タンパク質を介した薬物送達の利点は、Ｏｓｂｏｒｎ等（２００２）、Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｅｘｐ Ｔｈｅｒ ３０３（２）：５４０～８で考察される。本発明の結合を介した薬物送達は、同様の利点を有することが期待される。

【０１１６】

本発明に従って使用してもしなくてもよいさらに詳細な説明を以下にする：

【０１１７】

三次元（3D）モデル

上記の開示は、配列番号１に関連する１Ａ０６として周知のアルブミンモデル（Protein Data Bank）に関してされている。図１は、１ＡＯ６に関するアミノ酸残基を示す。

【０１１８】

しかしながら、本発明はあらゆるアルブミン及びこれらの構造に関する。当業者であればアルブミンの構造を利用することができ、例えばヒトアルブミンの三次構造に関する原子座標は、ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖのＧｅｎＢａｎｋ ＤＮＡデータベースで利用できる。

【０１１９】

構造は、適当なソフトウェア例えばＲａｓＭ．１ Ｃｈｉｍｅ（Sayle, TIBS 20, 374, 1995）を使用して見られる。利用できるアルブミン座標は以下を含む：

１ＡＯ６，１ＢＭ０（Sugio et al. (1999). Protein Enq 12(6): 439-46）であり、これはトップの１７個の要求タンパク質中のものであった。

１ＵＯＲ，Ｈｅ ＆ Ｃａｒｔｅｒ（1992）.Ｎａｔｕｒｅ ３５８（6383）：２０９～１５。

１ｂｊ５及び１ｂｋｅ，Ｃｕｒｒｙ等（1998）．Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ ５（9）：８２７～３５。

１ｅ７ａ，１ｅ７ｂ，１ｅ７ｃ，Ｂｈａｔｔａｃｈａｒｙａ等（2000）．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７５（49）：３８７３１～８。

１ｅ７ｅ，１ｅ７ｆ，１ｅ７ｇ，１ｅ７ｈ及び１ｅ７ｉ，Ｂｈａｔｔａｃｈａｒｙａ等（2000）．Ｊ ＭｏＩ Ｂｉｏｌ ３０３（５）：７２１～３２。

１ＧＮＪ，Ｐｅｔｉｔｐａｓ等（2001）．Ｊ ＭｏＩ Ｂｉｏｌ ３１４（５）：９５５～６０。

１ＨＡ２及び１Ｈ９Ｚ Ｐｅｔｉｔｐａｓ等（2001）．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７６（25）：２２８０４～９。

【０１２０】

アルブミン

本発明で使用されるアルブミンは、自然発生のアルブミン、アルブミン関連タンパク質又はこれらの変異体、例えば天然又は組換え変異体である。変異体は、多型、断片、例えばドメイン及びサブドメイン、断片及び／又は融合タンパク質を含む。本発明のアルブミンは、任意の供給源から得られるアルブミンタンパク質の配列を含んでなる。典型的には、供給源は、哺乳類、例えばヒト又はウシである。好適な一実施形態では、血清アルブミンはヒト血清アルブミン（「HSA」）である。用語「ヒト血清アルブミン」は、ヒトで自然に生じているアミノ酸配列を有する血清アルブミン及びこの変異体を含む。好適には、アルブミンは、配列番号１のアミノ酸配列或いはこの変異体又は断片、好適にはこの機能変異体又は断片を有する。ＨＳＡコード配列は、ヒト遺伝子に相当するｃＤＮＡを単離す

るための周知の方法によって得られ、また、例えばＥＰ００７３６４６及びＥＰ０２８６４２４に開示される。断片又は変異体は、機能的でも機能的でなくてもよい。例えば、断片又は変異体は、アルブミン受容体、例えばＦｃＲｎへ結合する能力を、（断片又は変異体が由来する）親アルブミンの受容体に結合する能力の少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００％まで保持する。相対的な結合能力は、当業者に周知の方法、例えば表面プラスモン共鳴試験によって測定される。

【０１２１】

アルブミンは、ヒトアルブミン又はヒトアルブミン類似体の自然に生じている多形変異体である。通常、ヒトアルブミンの変異体又は断片は、モル比で（mole for mole）、ヒトアルブミンのリガンド結合活性（例えば、FcRN結合）の少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％（好適には、少なくとも80%，90%，95%，100%，105%又はそれ以上）、を有する。

【０１２２】

「アルブミン」は、ウシ血清アルブミンの配列を含んでなる。用語「ウシ血清アルブミン」は、ウシで自然に生じるアミノ酸配列を有する血清アルブミン、例えばスイスプロット受入番号Ｐ０２７６９に由来するもの、及び明細書中で定義されるこの変異体を含む。用語「ウシ血清アルブミン」はまた、明細書中で定義される全長のウシ血清アルブミン又はこの変異体の断片を含む。

【０１２３】

多数のタンパク質は、アルブミンファミリー内に存在することが知られており；非排他的なリストを以下の表１に示す。リストは、（他に指示しない限り）成熟タンパク質及びリーダー配列を含む配列の全長を示す。

【０１２４】

アルブミンは、イヌ（例えば、スイスプロット受入番号P49822-1を参照されたい）、ブタ（例えば、スイスプロット受入番号P08835-1を参照されたい）、ヤギ（例えば、製品番号A2514又はA4164としてSigmaから利用できる）、ネコ（例えば、スイスプロット受入番号P49064-1を参照されたい）、ニワトリ（例えば、スイスプロット受入番号P19121-1を参照されたい）、卵白アルブミン（例えば、トリ卵白アルブミンを参照されたい）（例えば、スイスプロット受入番号P01012-1を参照されたい）、シチメンチョウ卵白アルブミン（例えば、スイスプロット受入番号073860-1を参照されたい）、ロバ（例えば、スイスプロット受入番号Q5XLE4-1を参照されたい）、モルモット（例えば、スイスプロット受入番号Q6WDN9-1を参照されたい）、ハムスター（DeMarco et al. (2007). International Journal for Parasitology 37(11): 1201-1208を参照されたい）、ウマ（例えば、スイスプロット受入番号P35747-1を参照されたい）、アカゲザル（例えば、スイスプロット受入番号Q28522-1を参照されたい）、マウス（例えば、スイスプロット受入番号P07724-1を参照されたい）、ハト（例えば、Khan et al，2002，Int. J. Biol. Macromol.，30(3-4)，171-8で定義される）、ウサギ（例えば、スイスプロット受入番号P49065-1を参照されたい）、ラット（例えば、スイスプロット受入番号P02770-1を参照されたい）及びヒツジ（例えば、スイスプロット受入番号P14639-1を参照されたい）由来の１つの血清アルブミンに由来するアルブミンの配列を含んでなり、明細書中で規定するものとしてこれらの変異体及び断片を含む。

【０１２５】

アルブミンは、例えば血清アルブミン又は卵白アルブミン等のアルブミン、例えば以下の表１に示すものの配列を含んでなり、さらに明細書中で定義されるこの変異体及び断片を含む。

【０１２６】

【表１－１】

表１：様々な種由来のアルブミン

タンパク質	普通名称	種	スイスプロット受入番号	配列番号１に対する同一性(Clustal V)	長さ(aa)
SA	アフリカツメガエル	Xenopus laevis	P08759-1	37.3	608
SA	ウシ	Bos taurus (配列番号94)	P02769-1	76.1	607
SA	ネコ	Felis catus (配列番号95)	P49064-1	82.2	608
SA	ニワトリ	Gallus gallus	P19121-1 (Version 2 text)	46.5	615
SA	コブラALB	Naja kaouthia	Q91134-1	30.9	614
SA	イヌ	Canis lupus familiaris (配列番号96)	P49822-1	80.3	608
SA	ロバ	Equus asinus (配列番号97)	Q5XLE4-1	76.6	607
SA	ヨーロッパ水ガエル	Rana shqiperica	Q9YGH6-1	31.5	603
SA	住血吸虫	Schistosoma mansoni	AAL08579 Q95VB7-1	76.0	608
SA	スナネズミ	Meriones unguiculatus (配列番号98)	035090-1 / JC5838	73.2	609

【表１－２】

タンパク質	普通名称	種	スイスプロット受入番号	配列番号１に対する同一性(Clustal V)	長さ(aa)
SA	ヤギ	Capra hircus (配列番号99)	B3VHM9-1	74.3	607
SA	モルモット	Cavia porcellus (配列番号100)	Q6WDN9-1	73.0	608
SA	ウマ	Equus caballus (配列番号101)	P35747-1	76.4	607
SA	ヒト	Homo sapiens (配列番号102)	P02768-1	100.0	609
SA	オーストラリア肺魚	Neoceratodus fosteri	P83517-1	22.8	101 (NL)
SA	マカク(赤毛猿)	Macaca mulatta (配列番号103)	Q28522-1	93.5	608
SA	マウス	Mus musculus (配列番号104)	P07724-1 Version 3.	72.4	608
SA	北アメリカウシガエル	Rana catesbeiana	P21847-1	36.1	382 (NL)
SA	ブタ	Sus scrofa (配列番号105)	P08835-1 Version 2	75.6	607
SA	ウサギ	Oryctolagus cuniculus(配列番号106)	P49065-1 Version 2	75.3	608
SA	ラット	Rattus norvegicus (配列番号107)	P02770-1 Version 2.	73.4	608
SA	サラマンダー	Ambystoma maculatum	Q8UW05-1	38.8	626
SA	サーモンALB1	Salmo salar	P21848-1	25.0	608
SA-2	サーモンALB2	Salmo salar	Q03156-1	24.8	608
SA	ウミヤツメウナギ	Petromyzon marinus	Q91274-1	16.9	1423
SA	ウミヤツメウナギ	Petromyzon marinus-AS	O42279-1	17.4	551

【表１－３】

タンパク質	普通名称	種	スイスプロット受入番号	配列番号１に対する同一性 (Clustal V)	長さ (aa)
SA	ヒツジ	Ovis aries (配列番号108)	P14639-1	75.3	607
SA	スマトラオランウータン	Pongo abelii	Q5NVH5-1	100.0	609
SA	ムカシトカゲ	Sphenodon punctatus	Q8JIA9-1	43.8	527 (NL)
SA	ウエスターンツメガエル	Xenopus (Silurana) tropicalis	Q6DJ95-1	10.5	572 (NL)
OA	ニワトリ	Gallus gallus	P01012-1 Version 2	10.9	383 (NL)
OA	シチメンチョウ	Meleagris gallopavo	O73860-1 Version 3.	11.4	386 (NL)

SA：血清アルブミン，SA-2：血清アルブミン-2，OA：卵白アルブミン，NL：リーダー配列なし

【０１２７】
アルブミンの多くの自然に生じている変異形態は周知である。多くは、Ｐｅｔｅｒｓ，（1996, All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, Inc., San Diego, California, p.170-181）において説明される。明細書中で定義する変異体は、これらの自然に生じている変異体、例えばＭｉｎｃｈｉｏｔｔｉ等（2008）Ｈｕｍ Ｍｕｔａｔ ２９（８）：１００７～１６．，及びｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ０２７６８で説明されるものの１つであってよい。

【０１２８】
「変異体アルブミン」は、変化が、少なくとも１つの基本特性、例えば結合活性（ある種の且つ特異的な活性、例えばビリルビン又は脂肪酸、例えば長鎖脂肪酸、例えばオレイン酸（C18:1）、パルミチン酸（C16:0）、リノール酸（C18:2）、ステアリン酸（C18:0）、アラキドン酸（C20:4）及び／又はパルミトレイン酸（C16:1）への結合）、モル浸透圧濃度（膠質浸透圧，コロイド浸透圧）、特定のｐＨ領域（pH安定性）での性質（behaviour）等が顕著に変化していないアルブミンタンパク質を生じる場合には、１又は複数の位置においてアミノ酸挿入、欠失、又は置換が存在した、保存的又は非保存的なアルブミンタンパク質を意味する。ここで「顕著に」は、変異体の特性が、元のタンパク質、例えば変異体が由来するタンパク質からかなり明確に異なっていることである、と当業者であれば言及することを意味する。このような特性は、本発明におけるさらなる選択判定基準として使用してよい。

【０１２９】
典型的には、アルブミン変異体は、自然に生じているアルブミン、例えば配列番号１と、４０％以上、通常少なくとも５０％、より典型的には少なくとも６０％、好適には少なくとも７０％、さらに好適には少なくとも８０％、さらに好適には少なくとも９０％、さらに好適には少なくとも９５％、最も好適には少なくとも９８％以上の配列同一性を有する。２つのポリペプチド間のパーセント配列同一性は、適当なコンピュータープログラム、例えばＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ ＧｒｏｕｐのＧＡＰグログラムを使用して測定されてよく、配列が最適に並べられているポリペプチドに関するパーセント同一性が計算されると理解される。あるいはア

ライメントは、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ ｐｒｏｇｒａｍ又はＣｌｕｓｔａｌ Ｖ ｐｒｏｇｒａｍを使用して実行され、これにより複数のアライメントの配列間の％相同性及び／又はペアワイズアライメントの配列間の％同一性を計算できる。使用されるパラメーターは、次の通りである：

ＦＡＳＴペアワイズアライメントパラメーター：Ｋ－ｔｕｐｌｅ（word）ｓｉｚｅ；１、ウィンドウサイズ；５、ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｙ；３、ｎｕｍｂｅｒ ｏｆ ｔｏｐ ｄｉａｇｏｎａｌｓ；５。スコア化方法：Ｘパーセント。複数のアライメントパラメーター：ｇａｐ ｏｐｅｎ ｐｅｎａｌｔｙ；１０、ｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ；０．０５。Ｓｃｏｒｉｎｇ ｍａｔｒｉｘ：ＢＬＯＳＵＭ

Ｃｕｓｔａｌ Ｗ：ペアワイズアライメントパラメーター：「Ｓｌｏｗ－Ａｃｃｕｒａｔｅ」、Ｇａｐ Ｐｅｎａｌｔｙ：１０、Ｇａｐ Ｌｅｎｇｔｈ：０．１、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｗｅｉｇｈｔ Ｍａｔｒｉｘ：Ｇｏｎｎｅｔ ２５０、ＤＮＡ Ｗｅｉｇｈｔ Ｍａｔｒｉｘ：ＩＵＢ。複数のアライメントパラメーター：Ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｙ １０．００，ｇａｐ ｌｅｎｇｔｈ ｐｅｎａｌｔｙ ０．２０，Ｄｅｌａｙ Ｄｉｖｅｒｇｅｎｔ Ｓｅｑｓ（％）３０，ＤＮＡ ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ ｗｅｉｇｈｔ ０．５０，Ｐｒｏｔｅｉｎ ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘ＝Ｇｏｎｎｅｔ ｓｅｒｉｅｓ，ＤＮＡ ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘ＝ＩＵＢ。

Ｃｌｕｓｔａｌ Ｖ：ペアワイズアライメントパラメーター：Ｋｔｕｐｌｅ：１，Ｇａｐ Ｐｅｎａｌｔｙ：３，Ｗｉｎｄｏｗ：５，Ｄｉａｇａｎｏｌｓ：５；複数のアライメントパラメーター：Ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｙ １０，ｇａｐ ｌｅｎｇｔｈ ｐｅｎａｌｔｙ １０。

【０１３０】

保存的置換

明細書中で使用されるように、用語「保存的」アミノ酸置換は、同一のグループ内で行われ、典型的には実質的にタンパク質機能に影響しない置換を意味する。「保存的置換」は、目的の組合せ、例えばＧＩｙ、Ａｌａ；ＶａＩ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ；Ａｓｐ、ＧＩｕ；Ａｓｎ、ＧＩｎ；Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；Ｌｙｓ、Ａｒｇ；及びＰｈｅ、Ｔｙｒである。このような変異体は、当技術分野に周知の技術、例えば、明細書中で参照により組み込まれる、米国特許第４，３０２，３８６号（issued 24 November 1981 to Stevens）において開示される、部位特異的な変異原性によって作成されてよい。

一実施形態において、ベン図４は、保存的アミノ酸置換を測定するために使用してよく：図４を使用して、（0～5に渡る）保存された変異のスコアが計算される。スコア０は、最も高い保存であり、システインに関しては、システイン残基の他のシステイン残基との置換のみに対して割り当てられる。任意の他のアミノ酸からシステインへの変化に関しては、スコアは１、２、３、４、５である。スコア１は、スコア２、３、４又は５より保存的な置換である。スコア５は、置換アミノ酸及びシステイン間の最も低い保存に割り当てられる。スコア０～５は、システインから適切なアミノ酸に到達するのに交差される境界線（すなわち、線）の数として、図４から計算される。従って、システインに関するスコアは、境界線が交差しないので０である。同様に、３つの境界線が交差するので、アスパラギン酸（Ｄ）のスコアは３である。

【０１３１】

２０個の異なるアミノ酸のための（図4に関する）保存された変異のスコアは、（当該アミノ酸に関して１文字コードを使用して）定義する：Ａ＝１、Ｃ＝Ｏ、Ｄ＝３、Ｅ＝４、Ｆ＝４、Ｇ＝２、Ｈ＝５、Ｉ＝４、Ｋ＝４、Ｌ＝４、Ｍ＝３、Ｎ＝２、Ｐ＝３、Ｑ＝３、Ｒ＝５、Ｓ＝１、Ｔ＝１、Ｖ＝３、Ｗ＝３、Ｙ＝３。図１、５Ａ、５Ｂ、５Ｃ及び５Ｄに関しては、列に表示される「システインに対する保存された変異」において、それぞれのアミノ酸残基に対するこれらのスコアが供される。保存的な変異のスコアを使用する場合、スコア３以下である残基、すなわちアスパラギン酸メチオニン、プロリン、グルタミン、バリン、トリプトファン、チロシン、グリシン、アスパラギン、アラニン、セリン及びスレオニン等は、システインと共に比較的保存されるので好適である。より好適には、

スコア２以下のアミノ酸、すなわち、グリシン、アスパラギン、アラニン、セリン、スレオニンである。最も好適には、スコア１のアミノ酸、すなわち、アラニン、セリン、スレオニンである。同様に、図４の保存された変異のスコアシステムを使用する場合、スコア４以上の残基、すなわち、グルタミン酸、フェニルアラニン、イソロイシン、リジン、ロイシン、ヒスチジン及びアルギニンは、あまり好適でない、又は全く好適でないかもしれない。

【０１３２】

あるいは、又は加えて、「保存的な」アミノ酸置換は、同一のグループ内、例えば塩基性アミノ酸（例えばアルギニン，リジン，ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えば、グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（例えば、グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（例えば、ロイシン，イソロイシン，バリン）、芳香族アミノ酸（例えば、フェニルアラニン，トリプトファン，チロシン）並びに分子量の小さいアミノ酸（例えば、グリシン，アラニン，セリン，スレオニン，メチオニン）のグループ内でなされる置換を意味する。

【０１３３】

例えば、配列番号１におけるアラニン－２の保存的置換は、グリシン又はセリンを含むことができる。非保存的置換は、あるグループ中のアミノ酸の、その他のグループのアミノ酸での置換を包含する。例えば、非保存的置換は、疎水性アミノ酸の極性アミノ酸での置換を含むことができる。

【０１３４】

断片

明細書中で使用される用語「断片」は、少なくとも１つの塩基性特性、例えば結合活性（ある種の且つ特異的な活性、例えばビリルビンへの結合）、モル浸透圧濃度（膠質浸透圧，コロイド浸透圧）、特定のｐＨ領域（pH安定性）での性質が顕著に変化していない限り、全長アルブミン又はこの変異体の任意の断片を含む。ここで「顕著に」は、変異体の特性が、元のタンパク質由来のものから非常に明確に異なっている、と当業者であれば言及することを意味する。断片は、典型的には少なくとも５０個のアミノ酸長である。断片は、少なくとも１つのアルブミンの完全なサブドメインを含んでなる。ＨＳＡのドメインは、組換え型タンパク質として発現されており（Dockal et a/., 1999, J. Biol. Chem., 274, 29303-29310）、ここでドメインＩはアミノ酸１～１９７から成っていると定義され、ドメインＩＩはアミノ酸１８９～３８５から成っていると定義され、そしてドメインＩＩＩはアミノ酸３８１～５８５から成っていると定義されている。ドメインＩとＩＩとの間、且つドメインＩＩとＩＩＩとの間に存在する伸展αヘリックス構造（h10-h1）のために、ドメインの一部の重複が生じる（Peters, 1996, op. cit, 表2～4）。ＨＳＡはまた、６個のサブドメイン（サブドメインIA, IB, IIA, IIB, IIIA 及びIIIB）を含んでなる。サブドメインＩＡは、アミノ酸６～１０５を含んでなり、サブドメインＩＢはアミノ酸１２０～１７７を含んでなり、サブドメインＩＩＡはアミノ酸２００～２９１を含んでなり、サブドメインＩＩＢはアミノ酸３１６～３６９を含んでなり、サブドメインＩＩＩＡはアミノ酸３９２～４９１を含んでなり、さらにサブドメインＩＩＩＢはアミノ酸５１２～５８３を含んでなる。断片は、完全な又は部分的な１又は複数の上記で定義されるドメイン又はサブドメイン、或いはこれらのドメイン及び／又はサブドメインの任意の組合せを含んでよい。断片は、アルブミン又はアルブミンのドメインの少なくとも５０、６０、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８又は９９％を含んでなる又はから成ってよい。

【０１３５】

さらに、上記のいずれかを含んでなる単一若しくは複数の異種の融合物；又はアルブミンへの単一若しくは複数の異種の融合物、或いはこれらのいずれかの変異体又は断片を使用してよい。このような融合物は、ＷＯ ０１／７９２７１で例示されるようなアルブミンＮ末端融合物、アルブミンＣ末端融合物、並びにＮ末端及びＣ末端アルブミン共融合物を含む。

【０１３６】
相同性
図２及び３は、「Ｐ０２７６８」として特定される、ＨＳＡ（配列番号1）を有する様々なアルブミンファミリータンパク質のアライメントを示す。タンパク質配列は、アルブミンリーダー配列を含む。これらのアライメントは、上記で説明されるように選択されるＨＳＡ中のものに相当する保存領域及びアミノ酸残基を特定するために使用することができる。一方、配列又はどちらのアライメントもまた、相同性スコアをアルブミン配列中のアミノ酸残基に割り当てるために使用することができる。
【０１３７】
このような手順の一例は、Ｈｅｉｎ，ＪＪ．（1990）の、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１８３：ｐｐ．６２６～６４５中の「アライメント及び系統発生のための統一アプローチ」に基づき、Ｌａｓｅｒｇｅｎｅ ｓｕｉｔｅの一部である、ＤＮＡＳＴＡＲ Ｉｎｃ．によって開発されたＭｅｇＡｌｉｇｎ ｐｒｏｇｒａｍ（version 8.0.2）である。Ｊｏｔｕｎ Ｈｅｉｎ Ｍｅｔｈｏｄ及び以下の設定、ＧＡＰ ＰＥＮＡＬＴＹ＝１１、複数のアライメントのためのＧＡＰ ＬＥＮＧＴＨ ＰＥＮＡＬＴＹ＝３、且つペアワイズアライメントのためのＫＴＵＰＬＥ＝２、を使用して、一連のパーセンテージ同一性値を計算することができる。あるいは、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ Ｍｅｔｈｏｄ及び以下の設定、ＧＡＰ ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０、複数のアライメントに関するＧＡＰ ＬＥＮＧＴＨ １０及び、ペアワイズアライメントのためのＫＴＵＰＬＥ＝１、ＧＡＰ ＰＥＮＡＬＴＹ＝３、ＷＩＮＤＯＷ＝５及びＤＩＡＧＯＮＡＬ＝５を使用して、一連のパーセンテージ同一性値を計算することができる。あるいは、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ Ｍｅｔｈｏｄ及び次の設定、ＧＡＰ ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０、ＧＡＰ ＬＥＮＧＴＨ ＰＥＮＡＬＴＹ＝０．２、ＤＥＬＡＹ ＤＩＶＥＲＧＥＮＣＥ＝３０、ＤＮＡ ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ＝０．５、並びにＰｒｏｔｅｉｎ Ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘのためのＧＯＮＮＥＴ ＳＥＲＩＥＳ及び複数のアライメントのためのＤＮＡ Ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘに関するＩＵＢ、並びにＳｌｏｗ ａｃｃｕｒａｔｅ，ＧＡＰ ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０、ＧＡＰ ＬＥＮＧＴＨ ＰＥＮＡＬＴＹ＝０．１を使用して、且つＰｒｏｔｅｉｎ Ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘに関してＧＯＮＮＥＴ ＳＥＲＩＥＳ、並びにペアワイズアライメントのためのＤＮＡ Ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘに関してＩＵＢを使用して、一連のパーセンテージ同一性値を計算することができる。あるいは、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｖ Ｍｅｔｈｏｄを（上記で）使用してよい。２つのアミノ酸配列のアライメントはまた、ＥＭＢＯＳＳ ｐａｃｋａｇｅ（http://emboss.org）バージョン２．８．０．由来のＮｅｅｄｌｅ ｐｒｏｇｒａｍを使用して測定してよい。Ｎｅｅｄｌｅ ｐｒｏｇｒａｍは、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ及びＷｕｎｓｃｈ（1970）の「２個のタンパク質のアミノ酸配列中の類似性をサーチするために適用可能な一般的方法」Ｊ．ＭｏＩ．Ｂｉｏｌ．４８，４４３～４５３において説明される包括的なアライメントアルゴリズムを実行する。使用される代替行列は、ＢＬＯＳＵＭ６２であり、ｇａｐ ｏｐｅｎｉｎｇ ｐｅｎａｌｔｙは１０、そしてｇａｐ ｏｐｅｎｉｎｇ ｐｅｎａｌｔｙは０．５である。
【０１３８】
図２は、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗに基づいたＭｅｇＡｌｉｇｎ ｐｒｏｇｒａｍ（version 8.0.2）を使用して求められたＨＳＡ（アライメントでP02768と同定される、配列番号1）を含む１６個の哺乳類アルブミンファミリータンパク質のアライメントを示す。タンパク質配列は、アルブミンリーダー配列を含む。各配列は、由来する動物及びデータベース受入番号で表示される。
【０１３９】
図３は、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｖに基づいてＭｅｇＡｌｉｇｎ ｐｒｏｇｒａｍ（version 8.0.2）を使用して求められた、ＨＳＡ（アライメントでP02768と同定される、配列番号1）を含む３３個のアルブミンファミリー（哺乳類及び非哺乳類両方の）タンパク質のアライメントを示す。タンパク質配列は、アルブミンリーダー配列を含む。
【０１４０】

相同性は、図２及び／又は図３に関して測定してよい。所定のアミノ酸配列と配列番号１との同一性の程度は、２つの配列の短い方の長さによって分けられる、２つの配列のアライメント中の正確な対応の数として計算してよい。結果は、パーセント同一性で表現する。２つの配列が重複する同一の位置に同一のアミノ酸残基を有する場合に、正確な対応が生じる。配列の長さは、配列中のアミノ酸残基の数である。

【０１４１】

隣接残基の保存

さらに、ＨＳＡの個々のアミノ酸残基は、同位置における他のアルブミンファミリータンパク質のアミノ酸へのこれらの保存に従って、ランク付けすることができる。図１の列に表示される「アライン１」（Mamm. W （哺乳類, Clustal W））は、図２で示される哺乳類アルブミンのアライメントで計算されるように、配列番号１の各位置に関する相同性レベルを供する。相同性レベルスコアは、計算されてよい。明細書中で使用される、相同性レベルをスコア化するための１つの方法は、ＭｅｇＡｌｉｇｎ ｐｒｏｇｒａｍ（version 8.0.2）によって供されるヒストグラムの長さを使用することによって（0～100%の範囲で）計算され；最高＝１００％から、２０％ずつ低下し、最低（0%）までの６つのレベルの相同性が測定され、図２においてバーの高さで示される。スコア１００は、ヒト血清アルブミン由来の配列を他の哺乳類アルブミン配列と比較した場合に、最も高い保存を表し、且つその残基に修飾がないことを示し、一方スコア０は並べられた配列間の最も低い保存レベルを示す。

【０１４２】

同様に、（非哺乳類アルブミンを含む）様々なアルブミンがＣｌｕｓｔａｌ Ｖを使用して並べられる場合には、ＨＳＡ中の各アミノ酸残基に関する相同性レベルスコア（図1の列に表示される「アライン2」（Var. Sps. V（「様々な種（すなわち、哺乳類及び非哺乳類）, Clustal V」））はＭｅｇａｌｉｇｎによって供されるヒストグラムの長さを使用して計算される。異なるアルブミン配列及びアライメントアルゴリズム範囲が相同性レベルスコアを計算するために使用されると、当業者であれば理解できる。

【０１４３】

相同性スコア、例えば図２及び３のアライメントに関して、本発明の候補残基を特定するために説明されるものを使用する場合、好適な残基には、保存性が高くないもの（例えば、スコアが40未満、より好適には20未満、最も好適には0のもの）が含まれ、相同性レベルの高いもの（例えば、スコアが40以上、60以上、80以上、最も好適には100のもの）はあまり好適でない。

【０１４４】

ＨＳＡ（配列番号1）中の各アミノ酸残基は、ＨＳＡが哺乳類アルブミンと並べられた場合、隣接残基が高保存（100%）されているかに従ってスコア化された（図1の、列に表示される「隣接１００％（アライン1）」）。これは、アミノ酸が高保存ドメイン内に存在する場合、これはタンパク質の機能の構造に重要であり、従って切断は望ましくないからである。図１において、スコア０は、ＨＳＡが哺乳類アルブミンと並べられる場合に、残基が（図2のアライメントに関して）１００％の相同性を有する任意の残基に隣接していないことを示し；スコア１は、ＨＳＡが哺乳類アルブミンと並べられる場合に、残基が１００％相同性を有する１つの残基に隣接することを示し；スコア２は、ＨＳＡが哺乳類アルブミンと並べられる場合に、残基が１００％の相同性を有する２つの残基に隣接することを示す。スコア０又は１を有する残基が好適である。スコア０を有する残基が最も好適である。

【０１４５】

例えば、スコア２を有するアミノ酸残基（例えば、バリン７（V7））は、代替アミノ酸への変異を受ける可能性が低い高相同性領域に生じる可能性があるので、これらのアミノ酸残基は好適には本発明の方法を使用して除外される。同様に、フェニルアラニン１１（F11）は、保存残基の領域の、１００％保存された１つの残基に隣接し、隣接する１００％保存残基を有しない残基、例えばアラニン２（A2）、に隣接することはあまり好ましく

ない。

【０１４６】

本発明によれば、さらなる情報、例えば挿入、欠失又は置換のための好適な部位はまた、アライメント分析によって得られてよい。例えば、ネズミアルブミンは３６個のシステイン残基を含み、（HSAへの相同性による）ジスルフィド結合に関与するシステインは全てシステイン３４として存在するが、システイン残基は他の哺乳類アルブミン配列ではなく成熟ネズミタンパク質の５７９に存在し、他の哺乳類アルブミンとの相同性の欠如はこのアルブミンの構造及び／又は機能に特に重要でないことを示しているので、従ってチオアルブミン変異タンパク質５７９Ｃが好適である。さらに、様々な哺乳類アルブミンファミリー及びＣｌｕｓｔａｌ Ｗのアライメントの使用（図2）は、他の哺乳類アルブミンと比べて、スナネズミアルブミンがアラニン－２（A2）とヒスチジン－３（H3）との間にさらなるアラニン残基を有することを示し、残基２（例えば、配列番号1のA2）の後及び残基３（例えば、配列番号1のH3）の前のシステイン残基の挿入が好適であることを示している。他の哺乳類アルブミンと比べて、モルモットアルブミンは、システイン３４（C34）にセリン残基を有する。遊離チオール基のシステイン３４における欠失が必要な実施例において、変異、例えばＣ３４Ｓが好適である。

【０１４７】

（ヒト血清アルブミンを除いて）ほとんどの哺乳類アルブミン配列は、長さが５８４個未満又は同等のアミノ酸（リーダー配列を含む608個未満又は同等のアミノ酸）の配列を有する。図２におけるアライメントを使用して、ヒト血清アルブミン上に存在するさらなるアミノ酸残基は、他の哺乳類血清アルブミン配列中の任意の類似アライメントのアミノ酸残基なしにＣ末端に存在するように見える。従って、Ｇ５８４Ｃを含有し且つＬ５８５を欠失のチオアルブミン変異体が、好適である。多数のアルブミン配列（ウシ，ロバ，ヤギ，ウマ，ヒツジ，ブタ）は、長さ５８３個のアミノ酸（リーダー配列を含む607個のアミノ酸）である。図２中のアライメントを使用すると、これらの種のアルブミン配列はＲ１１７（リーダー配列を含むR141）に相当する残基を有しないので、Ｖ１１６Ｃ及びＲ１１７の欠失を含むチオアルブミン又はＲ１１７及びＰ１１８Ｃの欠失を含むチオアルブミンが好適であると見える。このようなチオアルブミンでは、アミノ酸配列の長さは配列番号１に比較して減少される。

【０１４８】

図２で使用されるアライメント及び導き出される結果は、特に哺乳類アルブミン及びＣｌｕｓｔａｌ Ｗに関するものであり、当業者であれば、この教示はアルブミンファミリーの他のメンバー及び代替アライメントアルゴリズムに同様にあてはまると理解できる。

【０１４９】

アライメント及び同一性

アルブミン変異体は、配列番号１と少なくとも４０％、特に少なくとも４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の同一性を有する。

【０１５０】

同一性は、任意の方法、例えば明細書中で説明されるものを使用して計算されてよい。

【０１５１】

結合

チオアルブミンは、例えば遺伝又は化学融合を介して、１又は複数の結合パートナーに任意に融合されてよい。遺伝子融合を含んでなるチオアルブミンに関して、融合はＮ又はＣ末端に存在する、或いは挿入を含んでなる。

【０１５２】

アルブミンの遺伝子融合に関して、任意の他の遺伝子又は変異体、或いは部分又はいずれかの翻訳領域は、本発明と共に使用するための翻訳領域として利用されることができるということを当業者であればまた理解できる。例えば、翻訳領域は、任意の配列を含んで

なるタンパク質をコードし、これは（酵素前駆体を含む）天然タンパク質、若しくは変異体、又は天然タンパク質の断片（例えば，ドメイン）；或いは全体的な合成タンパク質；或いは異なるタンパク質（天然又は合成）の単一又は複数の融合物であってよい。このようなタンパク質は、ＷＯ０１／７９２５８、ＷＯ０１／７９２７１、ＷＯ０１／７９４４２、ＷＯ０１／７９４４３、ＷＯ０１／７９４４４及びＷＯ０１／７９４８０で供されるリストに由来するもの、又はこれらの変異体若しくは断片とすることができるが、これに限定されない；なお、この開示は明細書中で参照により組み込まれる。これらの特許出願は、アルブミンのための融合パートナーとの関連でタンパク質のリストを示すが、本発明はこれらに限定されず、本発明の目的のために、これらの中に収載されたタンパク質のいずれかは単独で示される、或いはアルブミンのための融合パートナーとして、或いは上記のいずれかの任意の他のタンパク質若しくは断片又は変異体、所望のポリペプチドとして示されてよい。アルブミンの化学（又は結合として周知の）融合の例は、Ｌｅｇｅｒ等（2004）Ｂｉｏｏｒｇ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ Ｌｅｔｔ １４（17）：４３９５～８；及びＴｈｉｂａｕｄｅａｕ等（2005）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ １６（4）：１０００～８に示される。

【０１５３】

遺伝的又は化学的に融合されたアルブミンを使用する利点は、融合に寄与する分子のいずれか又は全ては非融合分子に対して改善された特性を有することである（Balan et al. (2006) Antivir Ther 11 (1): 35-45）。アルブミン及びアルブミン粒子はまた、薬物及びプロドラッグの作用部位への輸送及び投与のために重要である（Kratz, F. (2008) Journal of Controlled Release, 132 (3), p.171-183）。融合及び粒子技術は、改善された薬物動態特性、例えば半減期の延長のために改善された投与計画を供し、バイオアベイラビリティを改善し且つ融合された結合パートナー、例えば生物活性分子を不活化から保護する。

【０１５４】

ポリペプチドは、修飾（例えば、還元）グリコシル化、例えば、還元Ｎ結合グリコシル化又は還元Ｏ結合型グリコシル化を提示するがこれらに限定されない。アルブミン分子のＮ結合型グリコシル化のパターンは、任意の又は全てのＮ、Ｘ、又はＳ／Ｔ位置でアミノ酸グリコシル化コンセンサス配列、例えばＮ－Ｘ－Ｓ／Ｔを追加／除去することによって、修飾することができる。アルブミン多型はＮ結合型グリコシル化と共に存在する。アルブミン変異体は、リサイクル時間（recycling time）を有し、これにより生物活性キャリアとしての変異体の有効性が改善される。組換えで発現されたタンパク質は、宿主細胞を製造することによって望ましくない翻訳後の修飾に供することができる。例えば、配列番号１のアルブミンタンパク質配列は、Ｎ結合型グリコシル化に対する任意の部位を含まず、天然に、Ｏ結合型グリコシル化によって修飾されると報告されていない。しかしながら、多数の酵母種において生成された組換え型ヒトアルブミン（「rHA」）は、通常マンノースを含む、Ｏ結合型グリコシル化によって修飾することができることが分かっている。マンノシル化されたアルブミンは、レクチンコンカナバリンＡに結合することができる。酵母によって生成されるマンノシル化されたアルブミンの量は、１又は複数のＰＭＴ遺伝子欠損の酵母菌株（WO 94/04687）を使用することによって減少される。これを達成する最も便利な方法は、ゲノムに欠損を有する酵母を生み出すことであり、これによりＰｍｔタンパク質の１つのレベルの減少が生じる。例えば、コード配列又は制御領域（又はPMT遺伝子において１つの発現を制御している他の遺伝子）において欠失、挿入又は転移があり、これによりＰｍｔタンパク質がほとんど又は全く生成されない。あるいは、抗Ｐｍｔ剤、例えば抗Ｐｍｔ抗体を生成するために酵母を形質転換することができる。

【０１５５】

出芽酵母以外の酵母を使用する場合、出芽酵母のＰＭＴ遺伝子に等価な遺伝子の１又は複数の切断はまた、例えばピキア・パストリス（Pichia pastoris）又はクルイベロミセス・ラクチス（Kluyveromyces lactis）において有益である。出芽酵母から単離されたＰＭＴ１（又は任意の他のPMT遺伝子）の配列は、他の真菌種において同様の酵素活性をコ

ード化している遺伝子の同定又は切断のために使用される。クルイベロミセス・ラクチスのＰＭＴ１相同体のクローン化は、ＷＯ９４／０４６８７において説明される。

【０１５６】

「培養された宿主細胞又は培養液由来のこれによって発現された異種タンパク質を精製する」段階は、任意に細胞固定化、細胞分離及び／又は細胞破砕を含んでなるが、常にこの段階又は細胞固定化、分離及び／又は破砕の段階と異なる少なくとも１つの他の精製段階を含んでなる。細胞固定化技術、例えばアルギン酸カルシウムビーズを使用して細胞を包むことは、当技術分野で周知である。同様に、細胞分離技術、例えば遠心分離、濾過（例えば、直交流濾過，膨張層（expanded bed）クロマトグラフィ等）は、当技術分野で周知である。同様に、ビーズ粉砕、超音波処理、酵素曝露等を含む細胞破砕方法は、当技術分野で周知である。

【０１５７】

少なくとも１つの他の精製段階は、当業者に周知のタンパク質精製に適当な任意の他の段階であってよい。例えば、組換え発現されたアルブミンの回収のための精製技術は次の：ＷＯ ９２／０４３６７の、マトリックス由来の染料の除去；ＥＰ ４６４ ５９０の、酵母由来の着色料の除去；ＥＰ ３１９ ０６７の、アルカリ沈殿及びその後のアルブミンの油相への適用；並びに完全な精製プロセスを説明するＷＯ ９６／３７５１５、ＵＳ ５ ７２８ ５５３及びＷＯ ００／４４７７２で開示されており；これらは全て明細書中で参照により組み込まれる。

【０１５８】

結合コンピテントアルブミン（「チオアルブミン」）の産生。

チオアルブミン又はチオアルブミンと他のタンパク質との融合は、当技術で周知の方法によって調製することができ（Sanker, (2004), Genetic Eng. News, 24, 22-28, Schmidt, (2004), Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 363-372）、これには、形質転換又は一過性発現による細胞株、例えばＣＨＯ（及びその変異体）、ＮＳＯ、ＢＨＫ、ＨＥＫ２９３、Ｖｅｒｏ又はＰＥＲＣ６細胞由来の哺乳類細胞培養（Mason et al., (2004), Protein Expr. Purif., 36, 318-326; Mason et al., (2002), Biochemistry, 41 , 9448-9454）；昆虫細胞培養（Lim et al., (2004) Biotechnol. Prog., 20, 1 192-1 197）；アオウキクサ属又はイネような植物由来の植物細胞培養；トランスジェニック動物（Dyck et al., (2003) Trends in Bio- technology, 21 , 394-399）；トランスジェニック植物（Ma et al., (2003) Nature Reviews Genetics, 4, 794-805）；グラム陽性及びグラム陰性バクテリア、例えば桿菌及び大腸菌（Steinlein, and Ikeda, (1993), Enzyme Microb. Technol., 15, 193-199）；アスペルギルス属（Aspergillus）菌種（EP 238023, US 5,364,770, US 5,578,463, EP184438, EP284603, WO 2000/056900, WO9614413）、トリコデルマ属及びフザリウム属（Navalainen et al., (2005), Trends in Biotechnology, 23, 468-473）を含むがこれに限定されない糸状菌、における発現を含むがこれに限定されない。

【０１５９】

宿主細胞は、任意のタイプの細胞であってよい。宿主細胞は、動物（例えば、哺乳類，トリ，昆虫等）、植物（例えばイネ）、真菌又はバクテリア細胞であってもこれらでなくてもよい。バクテリア及び真菌、例えば酵母は、宿主細胞として好適であっても好適でなくてもよい。

【０１６０】

典型的な原核生物ベクタープラスミドは：Ｂｉｏｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Richmond, CA, USA）から利用できるｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＢＲ３２２、及びｐＢＲ３２９；Ｐｈａｒｍａｃｉａ（Piscataway, NJ, USA）から利用できるｐ７ｒｃ９９Ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０及びｐＲＩＴ５；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（La JoIIa, CA 92037, USA）から利用できるｐＢＳベクター、Ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔベクター、Ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター、ｐＮＨ８Ａ、ｐＮＨ１６Ａ、ｐＮＨ１８Ａ、ｐＮＨ４６Ａである。

典型的な哺乳類細胞ベクタープラスミドは、Ｐｈａｒｍａｃｉａ（Piscataway, NJ, USA）から利用できるｐＳＶＬである。このベクターは、ＳＶ４０後期プロモーターをクローン化遺伝子の発現を誘導するために使用し、最も高い発現レベルはＴ抗原産生細胞、例えばＣＯＳ－１細胞で確認される。誘導性哺乳類発現ベクターの例としてはｐＭＳＧが挙げられ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ（Piscataway, NJ, USA）からもまた利用できる。このベクターは、クローン化遺伝子の発現を誘導するために、ネズミ乳腺腫瘍ウイルス末端反復配列のグルココルチコイド誘導性プロモーターを使用する。

【０１６１】

当業者に周知の方法は、コード配列を含む発現ベクターを構築する、及び例えば適切な転写又は翻訳制御をするために使用することができる。このような方法の１つは、付着末端を介した核酸連結を含む。適合性付着末端は、適当な制限酵素の作用によってＤＮＡ断片及びベクター上に生じることができる。これらの末端は、相補的塩基対合を介して急速にアニールし、残存する切れ目はＤＮＡリガーゼの作用によって閉鎖することができる。

【０１６２】

さらなる方法は、合成二本鎖オリゴヌクレオチドリンカー及びアダプターを使用する。平滑末端を有するＤＮＡ断片は、突出３’末端を除去し陥凹３’末端を充填する、バクテリオファージＴ４ ＤＮＡポリメラーゼ又は大腸菌ＤＮＡポリメラーゼＩによって生じる。合成リンカー及び限定制限酵素のための認識配列を含む平滑末端二本鎖ＤＮＡの部分は、Ｔ４ＤＮＡリガーゼによって平滑末端ＤＮＡ断片に結合されることができる。これらは、続いて付着末端を生じるために適切な制限酵素で消化され、適合性末端で発現ベクターに結合される。アダプターはまた、核酸連結のために使用される１つの平滑末端を含むが、予め形成された付着末端の１つもまた有する、化学的に合成されたＤＮＡ断片である。あるいは、ＤＮＡ断片は、付着末端を任意に含有する１又は複数の合成二本鎖オリゴヌクレオチドの存在又は非存在下で、ＤＮＡリガーゼの作用によって一緒に結合することができる。

【０１６３】

様々な制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、Ｓｉｇｍａ－Ｇｅｎｏｓｙｓ Ｌｔｄ, Ｌｏｎｄｏｎ Ｒｏａｄ, Ｐａｍｐｉｓｆｏｒｄ, Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ, Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍを含む多数の供給元から市販されている。チオアルブミン、又はチオアルブミンと他のタンパク質との融合は、１又は複数のイントロンを含んでも含まなくてもよい、ヌクレオチド配列から発現されてよい。さらに、ヌクレオチド配列は、当技術分野で周知の方法によって、宿主に対してコドン最適化されてもされなくてもよい。

【０１６４】

チオアルブミン、又はチオアルブミンと他のタンパク質との融合は、還元Ｎ結合型グリコシル化で変異体として発現することができる。従って、ヒト血清アルブミン（HSA）の場合、例えば遺伝子コード配列の切断によって、タンパク質のＯ－グリコシル化に関与する１又は複数のタンパク質マンノシルトランスフェラーゼ欠損の酵母を使用することが特に有効である。組換え発現されたタンパク質は、宿主細胞を製造することによって、望ましくない翻訳後の修飾に供することができる。マンノシル化されたアルブミンは、レクチンコンカナバリンＡに結合することができるであろう。酵母によって生成されるマンノシル化されたアルブミンの量は、１又は複数のＰＭＴ遺伝子欠損の酵母菌株を使用することによって減少することができる（WO 94/04687）。これを達成する最も簡便な方法は、ゲノムに欠損を有する酵母を作出することであり、これにより１つのＰｍｔタンパク質の減少レベルが生じる。例えば、コード配列又は制御領域（或いは、他の遺伝子の１つのＰＭＴ遺伝子の発現制御）において欠失、挿入又は転移が存在しても存在しなくてもよく、これによりＰｍｔタンパク質がほとんど又は全く生成されない。あるいは、酵母は、抗Ｐｍｔ剤、例えば抗Ｐｍｔ抗体を生成するために形質転換することができる。あるいは、酵母は、ＰＭＴ遺伝子の１つの活性を抑制する化合物の存在下で培養することができる（Duffy et al, "Inhibition of protein mannosyltransferase 1 (PMT1) activity in the Pathogenic yeast Candida albicans", International Conference on Molecular Mechanism

s of Fungal Cell Wall Biogenesis, 26-31 August 2001 , Monte Verita, Swit-zerland , Poster Abstract P38; 当該ポスター要旨はhttp://www.micro.biol.ethz.ch/cellwall/ で見られる）。出芽酵母以外の酵母が使用される場合、出芽酵母のＰＭＴ遺伝子に相当する遺伝子の１又は複数の切断はまた、例えば、ピキア・パストリス又はクルイベロミセス・ラクチスにおいて有益である。出芽酵母から単離されたＰＭＴ１（又は任意の他のPMT遺伝子）の配列は、他の真菌種において同様の酵素活性をコード化する遺伝子の同定又は切断のために使用されてよい。クルイベロミセス・ラクチスのＰＭＴ１相同体のクローン化は、ＷＯ９４／０４６８７で説明される。

【０１６５】

酵母は、ＷＯ９５／３３８３３及びＷＯ９５／２３８５７においてそれぞれ示されるように、ＨＳＰ１５０及び／又はＹＡＰ３遺伝子の欠失を有しても有さなくてもよい。

【０１６６】

ＨＳＡ変異体は、組換え型発現及び分泌によって生成されてよい。発現系（すなわち、宿主細胞）が酵母、例えば出芽酵母である場合、出芽酵母のための適当なプロモーは、ＰＧＫ１遺伝子、ＧＡＬ１又はＧＡＬ１０遺伝子、ＴＥＦ１、ＴＥＦ２、ＰＹＫ１、ＰＭＡ１、ＣＹＣ１、ＰＨ０５、ＴＲＰ１、ＡＤＨ１、ＡＤＨ２、グリセルアルデヒド－３－フォスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、トリオースフォスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、グルコキナーゼ、α－接合因子フェロモン、ａ－接合因子フェロモン、ＰＲＢ１プロモーター、ＰＲＡ１プロモーター、ＧＰＤ１プロモーター、及び他のプロモーターの５’制御領域の部分又は上流活性化部位との、５’制御領域の部分のハイブリッドを含むハイブリッドプロモーター（例えば、EP-A-258 067のプロモーター）に対する遺伝子、に関するものを含む。

【０１６７】

適当な転写終結シグナルは当技術分野で周知である。宿主細胞が真核生物由来の場合、転写終結シグナルは好適には、真核生物遺伝子の３’隣接配列に由来し、転写終結及びポリアデニル化に適切なシグナルを含む。適当な３’隣接配列は、例えば、使用される発現制御配列のために天然に結合された遺伝子の配列であり、すなわちプロモーターに対応する。あるいは、これらは異なってもよい。この場合、及び宿主が酵母、好適には出芽酵母の場合、出芽酵母ＡＤＨ１、ＡＤＨ２、ＣＹＣ１又はＰＧＫ１遺伝子の終了シグナル遺伝子が好適である。

【０１６８】

任意の隣接遺伝子、例えば２μｍ遺伝子中への転写の読み過ごし又はその逆を防止する目的で、転写終結配列がプロモーター及び翻訳領域の上流下流いずれにも位置するように、プロモーター及びアルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質をコードする遺伝子の翻訳領域を、転写終結配列の近くに隣接させることが有益である。

【０１６９】

一実施形態において、酵母、例えば出芽酵母における好適な制御配列は：酵母プロモーター（例えば、ＥＰ ４３１ ８８０に示される、出芽酵母PRB1プロモーター）；及び転写ターミネーター、好適にはＥＰ ６０ ０５７に示されるサッカロミセス属ＡＤＨ１由来のターミネーターを含む。

【０１７０】

翻訳の読み過ごしを最小限化し、これにより伸長された非天然の融合タンパク質の産生を回避するために、翻訳終止コドン、例えばＵＡＡ、ＵＡＧ又はＵＧＡをコードする、１つ以上のＤＮＡ配列を組み込むことは、非コード領域に対して有益である。翻訳終止コドンはＵＡＡが好適である。

【０１７１】

好適な一実施形態において、アルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質が分泌される。この場合、分泌リーダー配列をコードしている配列は、翻訳領域に含まれてよい。従って、本発明のポリヌクレオチドは、分泌リーダー配列をコードするポリヌク

レオチド配列に操作可能に結合されたアルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質をコードする配列を含んでなる。リーダー配列は、必ずしも必要でないが、通常、ＯＲＦのの一次翻訳産生物のＮ末端に位置し、そして必ずしも必要でないが、通常、「成熟」タンパク質を得るために分泌プロセス中にタンパク質が切断される。従って、一実施形態において、リーダー配列との関連で用語「操作可能に結合された」は、アルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質をコードする配列が、５’末端且つインフレームで、分泌リーダー配列をコードするポリヌクレオチド配列の３’末端に結合されるという意味を含む。あるいは、分泌リーダー配列をコードするポリヌクレオチド配列は、アルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質のコード配列内のインフレームに、又はアルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質のコード配列の３’末端に位置してよい。

【０１７２】

（分泌プレ領域及びプレ／プロ領域とも呼ばれる）多数の天然又は人工のポリペプチドリーダー配列は、宿主細胞からタンパク質を分泌するために、使用又は開発されてきた。リーダー配列は、新生タンパク質を、細胞から周囲の媒体、又は場合によっては、細胞膜周辺腔中にタンパク質を排出する細胞機構へ向ける。

【０１７３】

真核生物種、例えば酵母、出芽酵母、ザイゴサッカロミセス属の種、クルイベロミセス・ラクチス及びピキア・パストリスにおけるタンパク質の産生に関して、分泌リーダー配列を使用してよい。これは、シグナル（プレ）配列又はプレプロリーダー配列を含んでなる。シグナル配列は、アミノ酸配列中で不均一であることが周知である（Nothwehr and Gordon 1990, Bioessays 12, 479-484, 若しくはGierasch 1989, Biochemistry 28, p923-930）。本質的に、シグナル配列は通常Ｎ末端に位置し、塩基性ｎ領域、疎水性ｈ領域及び極性ｃ領域を有する。この構造が保持される限り、アミノ酸組成物に関係なく、シグナル配列は機能する。これらがいかに良好に機能するか、すなわちどれほど成熟タンパク質が分泌されるかは、アミノ酸配列次第である。従って、用語「シグナルペプチド」は、自然界において主に疎水性であり、酵母において発現される細胞外のタンパク質の前駆体型のＮ末端配列として存在するプレ配列を意味すると考えられる。シグナルペプチドの機能により、発現されたタンパク質を小胞体に入るように分泌することができる。シグナルペプチドは、このプロセスの過程中に通常は切断される。シグナルペプチドは、タンパク質を製造する酵母生物と異種又は同属であってよい。周知のリーダー配列は、出芽酵母の酸ホスファターゼタンパク質（Pho5p）（EP 366 400を参照されたい）、インベルターゼタンパク質（Suc2p）（Smith et al. (1985) Science, 229, 1219-1224を参照されたい）及び熱ショックタンパク質－１５０（Hsp150p）（WO 95/33833を参照されたい）に由来するものを含む。さらに、出芽酵母接合因子アルファ－１タンパク質（MFα-1）並びにヒトリゾチーム及びヒト血清アルブミン（HSA）タンパク質に由来するリーダー配列は、使用されており、後者は特に、ヒトアルブミンを分泌するために使用されてきたが、これに限定されない。ＷＯ９０／０１０６３は、（融合リーダー配列(FL)としても周知の）ＭＦα－１及びＨＳＡリーダー配列の融合を開示する。さらに、天然のアルブミンリーダー配列は、アルブミン変異体の配列を含んでなる組換え型タンパク質の分泌を指示するために使用されても使用されなくてもよい。

【０１７４】

当業者であれば、任意の適当なプラスミド、例えばセントロメアプラスミドを使用してよいということは理解できる。実施例は、本発明の酵母宿主細胞を形質転換するための使用に適当なプラスミド（セントロメアYCplac33に基づくベクター）を提供する。あるいは、任意の他の適当なプラスミド、例えば酵母適合性の２μｍに基づくプラスミドを使用してよい。

【０１７５】

１つの酵母タイプから得られるプラスミドは、他の酵母タイプで維持することができる（Irie et al, 1991 , Gene, 108(1), 139-144; Irie et al, 1991 , MoI. Gen. Genet,

225(2), 257-265）。例えば、耐塩性酵母由来のｐＳＲ１は、出芽酵母で維持することができる。一実施形態において、プラスミドは２μｍ－ファミリープラスミドであってもこのプラスミドでなくてもよく、宿主細胞は使用される２μｍ－ファミリープラスミド（次のプラスミドの全記載を参照されたい）と適合性を有する。例えば、プラスミドがｐＳＲ１、ｐＳＢ３又はｐＳＢ４に基づいている場合、適当な酵母細胞は耐塩性酵母であり；プラスミドがｐＳＢ１又はｐＳＢ２に基づいている場合、適当な酵母細胞はザイゴサッカロミセス・バイリイ（Zygosaccharomyces bailli）であり；プラスミドがｐＳＭ１に基づいている場合、適当な酵母細胞はザイゴサッカロミセス・ファーメンタティであり（Zygosaccharomyces fermentati）；プラスミドがｐＫＤ１に基づいている場合、適当な酵母細胞は、クルイベロマイセス・ドロソフィラルム（Kluyveromyces drosophilarum）であり；プラスミドがｐＰＭ１に基づいている場合、適当な酵母細胞は、ピキア・メンブラーナエファシエンス（Pichia membranaefaciens）であり；プラスミドが２μｍプラスミドに基づいている場合、適当な酵母細胞は出芽酵母又はサッカロミセス・カルスベルゲネシス（Saccharomyces carlsbergensis）である。従って、プラスミドは２μｍプラスミドに基づいてよく、酵母細胞は、出芽酵母でよい。２μｍファミリープラスミドは、自然に生じているプラスミドに由来する配列を有している、１、２又は好適には３個の遺伝子ＦＬＰ、ＲＥＰ１及びＲＥＰ２を含んでなる場合、自然に生じているプラスミド「に基づいて」いると言える。

【０１７６】

有用な酵母エピソームプラスミドベクターは、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ クローン化システム（La JoIIa, CA 92037, USA）から通常利用することができる、ｐＲＳ４０３～４０６及びｐＲＳ４１３～４１６、ＹＥｐ２４（Botstein, D., et al. (1979) Gene 8, 17-24）、並びにＹＥｐｌａｃ１２２、ＹＥｐｌａｃ１９５及びＹＥｐｌａｃ１８１（Gietz, R.D. and Sugino. A. (1988) Gene 74, 527-534）である。ＥＰ－Ａ－２８６ ４２４及びＷＯ２００５０６１７１９の「壊変（disintegration）ベクター」と同様に、他の酵母プラスミドは、ＷＯ９０／０１０６３及びＥＰ４２４ １ １７に記載される。プラスミドｐＲＳ４０３、ｐＲＳ４０４、ｐＲＳ４０５及びｐＲＳ４０６は、酵母組み込み型プラスミド（Yeast Integrating plasmids)（Yips）であり、酵母選択可能マーカーＨＩＳ３、ＴＲＰ１、ＬＥＵ２及びＵＲＡ３を、Ｙｌｐｌａｃ２０４、ＹＩｐ－Ｉａｃ２１１及びＹｌｐｌａｃ１２８と同様に組み込む（Gietz, R.D. and Sugino. A. (1988) Gene 74, 527-534）。プラスミドｐＲＳ４１３－４１６は、ＹＣｐｌａｃ２２、ＹＣｐｌａｃ３３及びＹＣｐｌａｃ１１１と同様に酵母セントロメアプラスミド（YCps）である（Gietz, R.D. and Sugino. A. (1988) Gene 74, 527-534）。

１又は複数の（「シャペロン」としても周知である）ヘルパータンパク質及び／又は選択のタンパク質産生物は、プラスミド由来のポリヌクレオチド配列によってコードされ、宿主細胞のタイプは使用されているプラスミドタイプとの適合性に関して選択される。このようなプラスミドは、ＷＯ２００５０６１７１９に開示される。好適なヘルパータンパク質は、ＰＤＨ、ＡＨＡ１、ＡＴＰ１１、ＣＣＴ２、ＣＣＴ３、ＣＣＴ４、ＣＣＴ５、ＣＣＴ６、ＣＣＪｌ、ＣＣＴ８、ＣＮＳ１、ＣＰＲ３、ＣＰＲ６、ＤＥＲ１、ＤＥＲ３、ＤＯＡ４、ＥＲ０１、ＥＵＧ１、ＥＲＶ２、ＥＰＳ１、ＦＫＢ２、ＦＭ０１、ＨＣＨ１、ＨＲＤ３、ＨＳＰ１０、ＨＳＰ１２、ＨＳＰ１０４、ＨＳＰ２６、ＨＳＰ３０、ＨＳＰ４２、ＨＳＰ６０、ＨＳＰ７８、ＨＳＰ８２、ＫＡＲ２、ＪＥＭ１、ＭＤＪ１、ＭＤＪ２、ＭＰＤ１、ＭＰＤ２、ＰＤＩ１、ＰＦＤ１、ＡＢＣ１、ＡＰＪ１、ＡＴＰ１１、ＡＴＰ１２、ＢＴＴ１、ＣＤＣ３７、ＣＰＲ７、ＨＳＣ８２、ＫＡＲ２、ＬＨＳ１、ＭＧＥ１、ＭＲＳ１１、ＮＯＢ１、ＥＣＭ１０、ＳＣＪ１、ＳＳＡ１、ＳＳＡ２、ＳＳＡ３、ＳＳＡ４、ＳＳＢ１、ＳＳＢ２、ＳＳＣ１、ＳＳＥ２、ＳＩＬ１、ＳＬＳ１、０ＲＭ１、０ＲＭ２、ＰＥＲ１、ＰＴＣ２、ＰＳＥ１、ＵＢＣ７、ＵＢＩ４及びＨＡＣ１或いは切断型イントロン無しのＨＡＣ１を含む（Valkonen et al. 2003, Applied Environ. Micro.,69, 2065）。このようなヘルパータンパク質は、ＷＯ２００５／０６１７１８、ＷＯ２００６／０６７５１ １及びＷＯ２００６／１３６８３１に開示される。

【０１７７】
明細書中で定義するように、プラスミドは標準的な技術を介して宿主中に導入される。原核生物宿主細胞の形質転換に関しては、例えば、Ｃｏｈｅｎ等（1972）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ６９，２１１０及びＳａｍｂｒｏｏｋ等（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ．を参照されたい。酵母細胞の形質転換は、Ｓｈｅｒｍａｎ等（1986）のＭｅｔｈｏｄ Ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹにおいて説明される。Ｂｅｇｇｓ（1978）Ｎａｔｕｒｅ ２７５，１０４～１０９の方法もまた有用である。出芽酵母の形質転換のための方法は、ＥＰ ２５１ ７４４、ＥＰ ２５８ ０６７及びＷＯ９０／０１０６３に一般的に示され、これらは全て参照により明細書中で組み込まれる。脊椎動物細胞に関しては、このような細胞のトランスフェクトで有用な試薬、例えばカルシウムフォスフェート及びＤＥＡＥ－デキストラン又はリポソーム製剤は、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ、又はＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ ２０８７７，ＵＳＡから利用できる。

【０１７８】
電気穿孔もまた細胞の形質転換に有用であり、（酵母を含む）真菌細胞、植物細胞、バクテリア細胞及び動物（脊椎動物を含む）細胞の形質転換の技術分野で周知である。電気穿孔による酵母の形質転換のための方法は、Ｂｅｃｋｅｒ ＆ Ｇｕａｒｅｎｔｅ（1990）のＭｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９４，１８２に開示される。
通常、プラスミドは、宿主の全てを形質転換するわけではなく、従って形質転換された宿主細胞のために選択することが必要である。従って、プラスミドは、選択可能なマーカーを含んでなり、これにはバクテリア性の選択可能なマーカー及び／又は酵母の選択可能なマーカーを含むがこれに限定されない。典型的なバクテリアの選択可能なマーカーは、他の多くのものが当業者に周知にも関わらず、β－ラクタマーゼ遺伝子である。典型的な酵母の選択可能なマーカーは、ＬＥＵ２、ＴＲＰＩ、ＨＩＳ３、ＨＩＳ４、ＵＲＡ３、ＵＲＡ５、ＳＦＡ１、ＡＤＥ２、ＭＥＴ１５、ＬＹＳ５、ＬＹＳ２、ＩＬＶ２、ＦＢＡ１、ＰＳＥ１、ＰＤＨ及びＰＧＫｌを含む。当業者であれば、ｐｇｋ１酵母菌株においてＰＧＫ１に関して説明されるように、機能遺伝子がプラスミド上に供される場合、染色体の欠失又は不活化が宿主の生存不可能を生じる任意の遺伝子、いわゆる必須遺伝子は、選択的マーカーとして使用することができる、と理解することができる（Piper and Curran, 1990, Curr. Genet. 17, 119）。適当な必須遺伝子は、スダンフォードゲノムデータベース（SGD）（http:://db. yeastgenome.org）内で確認することができる。削除又は不活化される場合、栄養要求性（生合成要求性）が生じることにならない、任意の必須遺伝子産生物（例えば、PDH , PSE1 , PGK1 又はFBA1）は、プラスミドの非存在下で、特異的且つ選択的な条件下で細胞が培養されることが必要であるという不都合はなく、増加したプラスミド安定性を達成するための遺伝子産生物を生成することができない宿主細胞中の、プラスミド上の選択可能なマーカーとして使用することができる。「栄養要求性（生合成要求性）」とは、成長培地への付加又は修飾によって補足することができる欠損を含む。従って、本出願との関連で好適な「必須マーカー遺伝子」は、宿主細胞で削除又は不活化される場合に、成長培地への付加又は修飾によって補足することができない欠損を生じることになるものである。さらに、プラスミドは、１つ以上の選択可能なマーカーを含んでなる。

【０１７９】
形質転換された宿主細胞は、ヘルパータンパク質及び選択のタンパク質産生物の発現を可能にするため、十分な時間且つ当業者に周知の適切な条件下で、そして、明細書中で開示された教示を考慮して培養されてよい。

【０１８０】
培養液は、非選択的であるか又はプラスミドの維持で選択圧をかけてよい。

【０１８１】
原核生物宿主細胞、例えば大腸菌、及び真核生物宿主細胞、例えば哺乳類細胞を培養するための方法は、当技術分野で周知である。酵母の培養のための方法は、一般的にＥＰ３３０　４５１及びＥＰ　３６１　９９１に示される。
【０１８２】
このように生成された選択のタンパク質産生物は、細胞内に存在するか、又は分泌される場合、培養液且つ／又は宿主細胞の細胞膜周辺腔中に存在する。
【０１８３】
ポリペプチドの調製
「培養された宿主細胞、組換え型生物又は培養液からこれによって発現された選択のタンパク質産生物を精製する」段階は、任意に細胞固定、細胞分離及び／又は細胞破砕を含んでなるが、常に少なくとも１つ以上の細胞固定、分離及び／又は破砕の段階と異なる他の精製段階を含んでなるものではない。
【０１８４】
本発明のチオアルブミンは、このようなタンパク質の精製に有用であることが確認されてきた任意の技術によって、培養液から精製されてよい。同様に、細胞分離技術、例えば遠心分離、濾過（例えば、直交流濾過，膨張層クロマトグラフィ等）は、当技術分野で周知である。同様に、ビーズ粉砕、超音波処理、酵素曝露等を含む細胞破砕方法は、当技術分野で周知である。
【０１８５】
「少なくとも１つの他の精製段階」は、当業者に周知のタンパク質精製に適当な任意の他の段階であってよい。例えば組換えで発現されたアルブミンの回収のための精製技術は、以下に開示されている：ＷＯ９２／０４３６７、マトリックス由来の染料の除去；ＥＰ４６４　５９０、酵母由来の着色料の除去；ＥＰ３１９　０６７、アルカリ沈殿及びその後の続くアルブミンの油相への適用；並びに完全な精製プロセスを説明する、ＷＯ９６／３７５１５、ＵＳ５　７２８　５５３及びＷＯ００／４４７７２；これらは全て明細書中で参照により組み込まれる。適当な方法は、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸又は溶媒抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、レクチンクロマトグラフィ、濃度、希釈、ｐＨ調節、ダイアフィルトレーション、超濾過、高速液体クロマトグラフィ（「HPLC」）、逆相ＨＰＬＣ、伝導率調節等を含む。
【０１８６】
ポリペプチドは、商業上又は産業上許容される純度レベルまで精製されてよい。商業上又は産業上許容される純度レベルとは、他の物質（例えば，１又は複数の混入物）が５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％又は０．０００００１％未満のレベルで、最も好適には０％のレベルで存在するチオアルブミン及び／又はチオアルブミン複合体の提供を含む。
【０１８７】
商業上又は産業上許容される純度レベルは、選択のタンパク質産生物が本来の目的に適当な形態となる、比較的に粗い精製方法によって得られてよい。商業上又は産業上許容される純度レベルまで精製されたタンパク質調製は、選択のタンパク質産生物に加えて、例えば、細胞培養構成成分、例えば宿主細胞又はこれに由来するデブリもまた含んでなる。あるいは、高分子量の構成成分（例えば、宿主細胞又はこれ由来のデブリ）は、選択のタンパク質産生物を含んでなる組成物、及び任意に、機能的に許容されるレベルの細胞培養プロセスに由来する低分子量の混入物を得るために、（例えば、濾過又は遠心分離によって）除去されてもされなくてもよい。
【０１８８】
タンパク質は、医薬的に許容される純度レベルを得るために、精製されても精製されな

くてもよい。タンパク質は、本質的にピロゲンを含まず、さらに本来の目的に使用し、且つタンパク質の活性に関係のない医学的効果をこれによって生じることなく医薬上有効量で投与することができる場合、医薬的に許容される純度レベルを有する。

【０１８９】

チオアルブミン及び／又はチオアルブミン複合体は、少なくとも10^{-4}g．L^{-1}、10^{-3}g．L^{-1}、０．０１g．L^{-1}、０．０２g．L^{-1}、０．０３g．L^{-1}、０．０４g．L^{-1}、０．０５g．L^{-1}、０．０６g．L^{-1}、０．０７g．L^{-1}、０．０８g．L^{-1}、０．０９g．L^{-1}、０．１g．L^{-1}、０．２g．L^{-1}、０．３g．L^{-1}、０．４g．L^{-1}、０．５g．L^{-1}、０．６g．L^{-1}、０．７g．L^{-1}、０．８g．L^{-1}、０．９g．L^{-1}，１g．L^{-1}、２g．L^{-1}、３g．L^{-1}、４g．L^{-1}、５g．L^{-1}、６g．L^{-1}、７g．L^{-1}、８g．L^{-1}、９g．L^{-1}、１０g．L^{-1}、１５g．L^{-1}、２０g．L^{-1}、２５g．L^{-1}、３０g．L^{-1}、４０g．L^{-1}、５０g．L^{-1}、６０g．L^{-1}、７０g．L^{-1}、８０g．L^{-1}、９０g．L^{-1}、１００g．L^{-1}、１５０g．L^{-1}、２００g．L^{-1}、２５０g．L^{-1}、３００g．L^{-1}、３５０g．L^{-1}、４００g．L^{-1}、５００g．L^{-1}、６００g．L^{-1}、７００g．L^{-1}、８００g．L^{-1}、９００g．L^{-1}、１０００g．L^{-1}、の濃度で供されてよい。

【０１９０】

本発明の方法は、精製された選択のタンパク質産生物をキャリア又は希釈剤で製剤する段階、及びこれによって製剤化されたタンパク質を単位剤形で任意に呈する段階をさらに含んでも含まなくてもよい。

【０１９１】

本発明のプロセスによって得られる治療上有用なタンパク質は単独で投与されることができるが、１又は複数の許容されるキャリア又は希釈剤と混合の医薬製剤として呈することが好適である。キャリア又は希釈剤は、所望のタンパク質に適合するという意味で「許容され」なければならない。典型的には、キャリア又は希釈剤は、無菌且つピロゲンを含まない水又は生理食塩水である。

【０１９２】

あるいは、本発明の方法は、これによって精製された選択のタンパク質産生物を凍結乾燥する段階をさらに含んでも含まなくてもよい。

【０１９３】

チオアルブミン又は複合体の製剤化

チオアルブミンは、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ２０００によって出版された「タンパク質の製剤化及び送達」、Ｅ．Ｊ．ＭｃＮａＩＩｙ（Ｅｄ．）、及び「安定タンパク質製剤化の合理的設計－理論と実際」、Ｊ．Ｆ．Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ及びＭ．Ｃ．Ｍａｎｎｉｎｇ（Ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ １３．Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ／Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ２００２、Ｙａｚｄｉ及びＭｕｒｐｈｙ、（１９９４）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５４、６３８７～６３９４、Ｗｉｄｅｒａ等、（２００３）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０、１２３１～１２３８；Ｌｅｅ等、（２００５）Ａｒｃｈ．Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．２８、７２２～７２９で示される方法によって製剤化されてよい。製剤化方法の例としては次の通りである：

【０１９４】

方法＃１：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールを、０．０１Ｍ～０．２ＭのＮａＣｌを含む０．０１Ｍ～０．１Ｍのフォスフェート緩衝生理食塩水（pH 7.0～8.0）中で、４℃、－２０℃又は－８０℃で貯蔵することができる。

【０１９５】

方法＃２：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールを、０．０１Ｍ～０．２ＭのＮａＣｌ及び１０～２０ｍｇ／Ｌのポリソルベート８０を

含む０．０１Ｍ～０．１Ｍのフォスフェート緩衝生理食塩水（pH 7.0～8.0）中で、４℃、－２０℃又は－８０℃で貯蔵することができる。

【０１９６】

方法＃３：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールを、０．０１Ｍ～０．２ＭのＮａＣｌ（pH 7.0～8.0）中で、４℃、－２０℃又は－８０℃で貯蔵することができる。

【０１９７】

方法＃４：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールを、１０～２０ｍｇ／Ｌのポリソルベート８０を含む０．０１Ｍ～０．２ＭのＮａＣｌ（pH 7.0～8.0）中で、４℃、－２０℃又は－８０℃で貯蔵することができる。

【０１９８】

凍結乾燥製剤

方法＃５：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールを、水に対して透析し、凍結乾燥し、そして４℃、－２０℃又は－８０℃で貯蔵することができる。

【０１９９】

方法＃６：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールを、０．０１Ｍ～０．２Ｍ ＮａＣｌ（ｐＨ７．０～８．０）に対して透析し、凍結乾燥し、そして４℃、－２０℃又は－８０℃で貯蔵することができる。

【０２００】

ナノ粒子製剤

本発明のチオアルブミン（及び／又は、その結合された形態）は、ナノ粒子を生成し且つ／又はナノ粒子又はリポソーム内に封入するために使用してよい。

【０２０１】

本発明のチオアルブミンは、ナノ粒子及び／若しくはリポソームと共に、且つ／又はナノ粒子及び／若しくはリポソーム中に、並びに／或いはナノ粒子及び／若しくはリポソームとして使用してよい。現在の結合方法の課題は、結合パートナー、例えば生物活性－ターゲティングリガンド複合体の薬理及び免疫活性のどちらも保持している。タンパク質への結合が可能な最大数のタンパク質ターゲティングリガンド／生物活性部分（結合パートナー）が存在している可能性があり、この数を超える場合、ターゲティングリガンドは生物活性を保持しない。好適には、結合パートナーの生物活性は本発明のアルブミンへの結合によって低下されない。

【０２０２】

リポソーム及びナノ粒子は、生物活性化合物を封入するために使用されてよい。これらは、治療指数を増加し且つ／若しくは副作用を減少することになる、薬物、例えば生物活性化合物の増強された送達、又はターゲット細胞による取り込み及び／又は非標的器官に生物活性のない毒性の減少のための機構を供する。さらに、一部の生物活性化合物（例えば、タキサン）の送達に必要である多くの溶剤型製剤は、患者に投与することができる最大投与量を制限する毒性と関連している。リポソーム及びナノ粒子により生物活性化合物のより多くの量を送達することができるので、溶剤型製剤の毒性を回避しながら、リポソーム及びナノ粒子の送達はまた、このような生物活性化合物に対して有利である（Hawkins et al (2008) Advanced Drug Delivery Reviews, 60, 8, p876-885）。

【０２０３】

ターゲティングリガンドをリポソーム及びナノ粒子に付着するための方法は、当業者に周知であり（reviewed in Nobs et al (2004) Journal of Pharmaceutical Sciences VoI 93 p1980-1992）、本発明に従って使用されてよい。付着方法は、非共有結合又は共有結合であってよい。共有結合は非共有結合方法よりも安定なので、共有結合反応が好ましいように見える。タンパク質、ペプチド、又は薬物のリポソーム表面への共有結合又は非共有結合付着のための脂質は、（例えばAvanti PolarLipids lnc Alabaster, Alabama, USAから）商業上利用できる。機能性の３つの主要なクラスが存在し：ジスルフィド又はチオ

エーテル構造を介した結合、アミド結合構造、又はビオチン／ストレプトアビジン結合であり、本発明においてこれらのいずれかを使用してよい。

【０２０４】

チオエーテル結合を介したリポソームの表面への共有結合リガンドを利用した多数の方法は、マレイミドのチオール基との非常に有効な反応を最もよく利用しながら、説明されてきた。機能性脂質アンカーは、通常リポソームに添加され、そしてこれは本発明の中で又は本発明と共に使用されてよく、マレイミドを含むもの、例えば安定性のあるチオエーテル結合を介したターゲティング部分の簡便な共有結合を可能にするＮ－［４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチルアミド］－ＰＥ（Ｎ－ＭＰＢ］－ＰＥ）又はＮ－［４－（ｐ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－カルボキサミド）（ＭＣＣ－ＰＥ）を含むが、これらに限定されない（Martin & Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286-288）。

【０２０５】

方法＃７：精製後に、本発明のアルブミン変異タンパク質又は複合体を含む遊離チオールは、ナノ粒子を調製するための周知の手順、例えば、ＷＯ２００４／０７１５３６ Ａ１及びＷＯ２００８／００７１４６ Ａ１で開示される手順に従って調製されたナノ粒子中に製剤化することができ、これらはどちらも明細書中で参照により組み込まれる。

【０２０６】

同様に、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（PLGA）、及びＣＯＯＨ－ＰＬＡを含むがこれらに限定されないナノ粒子の形成のための物質は、商業上利用でき、マレイミド又はナノ粒子形成に関する公知文献による他の周知の化学構造で機能性を有してよい。これらののいずれかは、本発明中で又は本発明と共に使用されてよい。

【０２０７】

リガンドのリポソームへの共有結合のための他の簡便な方法は、ジスルフィドを形成するための２つのチオールの結合を含むが；しかしながら、血清中の還元条件下では、１つの遊離チオール基を含むより安定性のある結合化学構造が好適である。化学構造、例えば（PDP-PE）により、ジスルフィド結合を介した共有結合が可能である。遊離チオール基又は機能性リンカーを導入するためにリガンドの修飾を使用してよい。本発明のチオアルブミンの利点は、リガンド修飾が必要ないことである。しかしながら、本発明に加えて、リガンド修飾は任意に使用してよい。

【０２０８】

チオール基はタンパク質中にそれほど頻繁に存在しない、或いは十分な量で又は所望の位置に存在しない。従って、チオエーテル又はジスルフィド結合を介した、リポソームへのより多くのリガンドの１つの共有結合の大抵の場合は、（結合に関して明細書中で説明される）ヘテロ二機能性架橋剤の使用が必要である。一部のヘテロ二機能性架橋剤（例えば、SPDP及びSATA）は、脱保護段階が必要である。本発明のチオアルブミンによって、このさらなる処理の要求が克服される。

【０２０９】

あるいは、チオアルブミンは、当技術分野に周知の他の化学構造によって、リポソーム又はナノ粒子へ結合させることができる。例えば、チオアルブミンは、リガンドの１級アミンと反応するアミン又はカルボキシル官能基を有する機能性脂質アンカー（例としては、DSPE-PEG-COOHを含む）を使用して、アミド結合によって付着することができる。１級アミンとリポソームの表面の間の直接的な架橋もまた、使用してよい。従って、チオアルブミンの１又は複数の遊離チオール基は、他の結合パートナーへの結合に利用可能である。

【０２１０】

結合の後に、結合パートナー（例えば、生物活性分子）は、活性（例えば、生物活性）において低下を示す。本発明で説明されるチオアルブミンは、結合パートナーがチオアルブミンに関して位置し且つ／又は位置が定められる複合体、ナノ粒子及び／又はリポソームを供することによってこの課題を克服するので、結合パートナーは少なくとも１０、２

０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００％の非結合型活性を保持する。

【０２１１】

結合パートナー

用語「結合パートナー」は、生物活性剤、造影剤（imaging agent）、診断薬、コントラスト剤（contrast agent）及び治療化合物、例えば化学療法薬物及び放射性医薬を含む。本発明のチオアルブミンは、１又は複数の結合パートナーに結合してよい。

【０２１２】

造影剤、診断化合物、コントラスト剤及び治療化合物

診断薬、造影剤及び生物「コントラスト」剤の使用は、当技術分野に周知である。診断薬は、（すなわち、テスト結果を算定するのに必要な設備及び手順と共に）診断テストの一部として使用される任意の医薬製品である。診断薬は、インビボ（in vivo）で、エクスビボ（ex vivo）で、又はインビトロ（in vitro）で使用してよい。

【０２１３】

ジストロフィー筋の損傷した筋繊維中に蓄積するアルブミンの能力は、かなり説明されている。例えば、ガドリニウム－ＤＴＰＡ－アルブミン複合体は、併用診断及び治療ツールとして、例えば、磁気共鳴画像法（MRI）によってジストロフィー筋を可視化及びモニターするために、そしてジストロフィー筋への有効なターゲティングのためのアルブミンに結合された推定治療薬の送達のために使用してよい（Amthor et al. (2004) Neuromuscular Disorders 14912: 791-796）。悪性腫瘍はよく、アルブミンの取り込み及び代謝の増加を示す。ガドリニウム－アルブミン複合体の使用はまた、悪性腫瘍の改善された造影に関して、そして薬物を結合させたアルブミンでの治療に敏感な腫瘍をＭＲＩによって決定するために説明されている（Kiessling et al. (2002) Investigative Radiology 37(4): 93-198）。

【０２１４】

持続性薬剤がしばしば有毒である一方で、現在の造影剤は急速に分解する。アルブミン複合体の使用は、特に造影剤の半減期を増加するのに有用であってよく、従って長期間の造影が可能となる。ＷＯ２００５／０８２４２３は、蛍光物質に結合させた血清アルブミンの造影のための使用を説明する。

【０２１５】

本発明のチオアルブミンは、造影剤、診断薬、治療化合物及びコントラスト剤から選択される２つ以上の分子に結合させてよい。

【０２１６】

腫瘍（及び筋変性）は、アルブミンの増強された取り込みを示す（EPR：増強された浸透及び貯留）。アルブミン複合体は、増強造影のために、また腫瘍（又は他の組織及び器官）がアルブミン結合薬物に適当か否かを評価するために使用してよい。

【０２１７】

生物活性化合物

生物活性化合物は、治療又は診断化合物であってよい。治療化合物は、癌化学療法で使用するための化学療法薬物であってよい。これは細胞分裂阻害又は細胞障害性であってよく；腫瘍抑制剤であってよい。

【０２１８】

生物活性化合物は、既に遊離チオール基を含んでよく、例えば遊離チオール基を有するシステイン残基を含むポリペプチドであってよい。あるいは、生物活性化合物は、遊離チオール基を含むように修飾されてよい。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列は、遊離チオール基を有するシステイン残基を含むように変更されてよく、又は生物活性化合物は化学的に遊離チオール基を含むために誘導体化されてよい。

【０２１９】

生物活性化合物は、ポリペプチド（タンパク質）、特に組換え型タンパク質医薬であってよい。これは、癌及び他の関連疾患を治療するために使用される化学療法又は放射性治

療薬物であってよい。

【０２２０】

本発明のアルブミン変異タンパク質（チオアルブミン）を含む遊離チオールは、本発明のアルブミン変異タンパク質が１つ以上の遊離チオールを含む場合、遊離チオール基を介して、当技術で周知の方法によって少なくとも１つの生物活性化合物に結合させることができる。生物活性化合物は、（天然、組換え型、又は合成の）ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質（Debinski, (2002) Cancer Investigation 20, 801-809, O'Keefe and Draper et al., (1985) JBC 260, 932-937, Xia et al., (2000) J. Pharmacology Experimental Therapeutics 295, 594-600, Kavimandan et al., (2006) Bioconjugate Chem. 17, 1376-1384, Humphries, et al., (1994) J. Tissue Culture Methods 16, 239-242, Wenning et al., (1998) Biotech. Bioeng. 57, 484-496, Yazdi and Murphy, (1994) Cancer Research 54, 6387-6394, Weaver and Laske (2003) J. Neuro-Oncology 65, 3-13, Widera et al., (2003) Pharmaceutical Research 20, 1231-1238, Daniels, T.R. et al. (2006) Clinical Immunology 121, 159-176、これらは明細書中で参照により組み込まれる）；治療及び診断薬物又は化合物（Mishra et al., (2006) J. Drug Targeting 14, 45-53, Lim and Shen, (2004) Pharmaceutical Research 21 , 1985-1992, Fritzer et al. , (1996) Biochemical Pharmacology 51, 489-493, Lubgan and Jozwiak (2002) Cell. MoI. Biol. Lett. 7, 98, Daniels, T.R. et al. (2006) Clinical Immunology 121 , 159-176、これらは明細書中で参照により組み込まれる）；リポソーム、ウイルス及びナノ粒子を含むがこれに限定されない高分子量複合体（Mishra et al., (2006) J. Drug Targeting 14, 45-53, Daniels, T.R. et al. (2006) Clinical Immunology 121 , 159-176、これらは明細書中で参照により組み込まれる）；ＤＮＡ、（ｓｉＲＮＡを含む）ＲＮＡ及びこれらの類似体を含む核酸及び放射性核種（Lee et al., (2005) Arch. Pharm. Res. 28, 722-729, Huang et al., (2007) FASEB J. 21 , 1117-1125, Daniels, T.R. et al. (2006) Clinical Immunology 121 , 159-176、これらは明細書中で参照により組み込まれる）並びにデバイス（Humphries, et al., (1994) J. Tissue Culture Methods 16, 239-242 、これらは明細書中で参照により組み込まれる）を含むがこれに限定されない。さらにその本質は、当技術分野に周知の方法によって変更することができる。

【０２２１】

治療化合物

４－１ＢＢリガンド、５－ヘリックス、ヒトＣ－Ｃケモカイン、ヒトＬ１０５ケモカイン、ｈｕＬ１０５＿３と命名されたヒトＬ１０５ケモカイン、ガンマインターフェロン（MIG）誘発のモノカイン、部分的ＣＸＣＲ４Ｂタンパク質、血小板塩基性タンパク質（PBP）、α１－抗トリプシン、ＡＣＲＰ－３０相同体；補体成分Ｃ１ｑ Ｃ、アデノイド発現ケモカイン（ADEC）、ａＦＧＦ；ＦＧＦ－１、ＡＧＦ、ＡＧＦタンパク質、アルブミン、エトポシド、アンギオスタチン、炭疽ワクチン、コラプシンに特異的な抗体、アンチスタシン（antistasin）、抗ＴＧＦベータファミリー抗体、抗トロンビンＩＩＩ、ＡＰＭ－１；ＡＣＲＰ－３０；ファモキシン（Famoxin）、アポリポタンパク質種、アリールスルファターゼＢ、ｂ５７タンパク質、ＢＣＭＡ、ベータートロンボグロブリンタンパク質（ベーターＴＧ）、ｂＦＧＦ；ＦＧＦ２、血液凝固因子、ＢＭＰプロセシング酵素フューリン、ＢＭＰ－１０、ＢＭＰ－１２、ＢＭＰ－１５、ＢＭＰ－１７、ＢＭＰ－１８、ＢＭＰ－２Ｂ、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－９、骨形態形成タンパク質－２、カルシトニン、カルパイン－１０ａ、カルパイン－１０ｂ、カルパイン－１０ｃ、癌ワクチン、カルボキシペプチダーゼ、Ｃ－Ｃケモカイン、ＭＣＰ２、ＣＣＲ５変異体、ＣＣＲ７、ＣＣＲ７、ＣＤ１１ａＭａｂ、ＣＤ１３７；４－１ ＢＢ受容体タンパク質、ＣＤ２０ Ｍａｂ、ＣＤ２７、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０、ＣＤ３０リガンド、ＣＤ３３免疫毒素、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ５２ Ｍａｂ、セレバス（Cerebus）タンパク質、ケモカインエオタキシン、ケモカインｈｌＬ－８、ケモカインｈＭＣＰ１、ケモカインｈＭＣＰＩａ、ケモカインｈＭＣＰＩ ｂ、ケモカインｈＭＣＰ２、ケモカインｈＭＣＰ３、ケモカインｈＳＤＦｌｂ、ケモカインＭＣＰ－４、ケモカインＴＥＣＫ及びＴＥＣＫ変異体、全長

且つ成熟のケモカイン様タンパク質ＩＬ－８Ｍ１、全長且つ成熟ケモカイン様タンパク質ＩＬ－８Ｍ１０、ケモカイン様タンパク質ＩＬ－８Ｍ３、全長且つ成熟ケモカイン様タンパク質ＩＬ－８Ｍ８、全長且つ成熟ケモカイン様タンパク質ＩＬ－８Ｍ９、全長且つ成熟ケモカイン様タンパク質ＰＦ４－４１４、全長且つ成熟ケモカイン様タンパク質ＰＦ４－４２６、全長且つ成熟ケモカイン様タンパク質ＰＦ４－Ｍ２、コレラワクチン、コンドロモジュリン様タンパク質、Ｃ－キットリガンド；ＳＣＦ；マスト細胞成長因子；ＭＧＦ；線維肉腫由来の幹細胞因子、ＣＮＴＦ及びこの断片（例えば、CNTFA×15’（アキソカイン（Axokine）（登録商標））、プレ形態と活性形態いずれもの凝固因子、コラーゲン、補体Ｃ５ Ｍａｂ、結合組織活性化タンパク質－ＩＩＩ、ＣＴＡＡ１６．８８Ｍａｂ、ＣＴＡＰ－ＩＩＩ、ＣＴＬＡ４－ｌｇ、ＣＴＬＡ－８、ＣＸＣ３、ＣＸＣ３、ＣＸＣＲ３；ＣＸＣケモカイン受容体３、シアノビリン－Ｎ、ダーベボエチン、エクソダス（exodus）と命名されるもの、ｈｕＬ１０５＿７と命名されるもの、ＤＩＬ－４０、デオキシリボヌクレアーゼ、ＥＤＡＲ、ＥＧＦ受容体Ｍａｂ、ＥＮＡ－７８、エンドスタチン、エオタキシン、上皮性好中球活性タンパク質－７８、ＥＰＯ受容体；ＥＰＯＲ、エリスロポエチン（EPO）及びＥＰＯ模倣体、エウトロピン、エクソダスタンパク質、第ＩＸ因子、第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩ因子、第X因子及び第ＸＩＩＩ因子、ＦＡＳリガンド抑制タンパク質（DcR3）、ＦａｓＬ、ＦａｓＬ、ＦａｓＬ、ＦＧＦ、ＦＧＦ－１２；線維芽細胞成長因子相同性因子－１、ＦＧＦ－１５、ＦＧＦ－１６、ＦＧＦ－１８、ＦＧＦ－３；ＩＮＴ－２、ＦＧＦ－４；ゲロニン、ＨＳＴ－１；ＨＢＧＦ－４、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－６；ヘパリン結合分泌形質転換因子－２（heparin binding secreted transforming factor-2）、ＦＧＦ－８、ＦＧＦ－９；ＧＮａ活性化因子、フィブリノゲン、ｆｌｔ－１、ｆｌｔ－３リガンド、卵胞刺激ホルモンアルファサブユニット、卵胞刺激ホルモンベータサブユニット、フォリトロピン、フラクタルカイン、断片、筋細線維タンパク質トロポニンＩ、ＦＳＨ、ガラクトシダーゼ、Ｇａレクチン－４、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＤＦ－１、遺伝子治療、グリオーマ由来の成長因子、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド、グルコセレブロシダーゼ、グルコース酸化酵素、グルコシダーゼ、グリコデリン－Ａ；プロゲステロン関連子宮内膜タンパク質、ＧＭ－ＣＳＦ、ゴナドトロピン、顆粒球走化性タンパク質－２（GCP-2）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、成長ホルモン、増殖関連癌遺伝子アルファ（GRO-アルファ）、増殖関連癌遺伝子ベータ（GRO-ベータ）、増殖関連癌遺伝子ガンマ（GRO-ガンマ）、ｈＡＰＯ－４；ＴＲＯＹ、ｈＣＧ、Ｂ型肝炎表面抗原、Ｂ型肝炎ワクチン、ＨＥＲ２受容体Ｍａｂ、ヒルジン、ＨＩＶ ｇｐ１２０、ＨＩＶ ｇｐ４１、ＨＩＶ抑制ペプチド、ＨＩＶ抑制ペプチド、ＨＩＶ抑制ペプチド、ＨＩＶプロテアーゼ抑制ペプチド、ＨＩＶ－１プロテアーゼ抑制剤、ＨＰＶワクチン、ヒト６ＣＫｉｎｅタンパク質、ヒトＡｃｔ－２タンパク質、ヒト脂質生成抑制因子、ヒトＢ細胞刺激因子－２受容体、ヒトベーターケモカインＨ１３０５（MCP-2）、ヒトＣ－ＣケモカインＤＧＷＣＣ、ヒトＣＣケモカインＥＬＣタンパク質、ヒトＣＣタイプケモカインインターロイキンＣ、ヒトＣＣＣ３タンパク質、ヒトＣＣＦ１８ケモカイン、ＳＬＣ（二次リンパケモカイン）と命名されるヒトＣＣ－タイプケモカインタンパク質、ヒトケモカインベーター８短縮形態、ヒトケモカインＣ１０、ヒトケモカインＣＣ－２、ヒトケモカインＣＣ－３、ヒトケモカインＣＣＲ－２、ヒトケモカインＣｋベーター７、ヒトケモカインＥＮＡ－７８、ヒトケモカインエオタキシン、ヒトケモカインＧＲＯアルファ、ヒトケモカインＧＲＯアルファ、ヒトケモカインＧＲＯベータ、ヒトケモカインＨＣＣ－１、ヒトケモカインＨＣＣ－１、ヒトケモカインｌ－３０９、ヒトケモカインＩＰ－１０、ヒトケモカインＬ１０５＿３、ヒトケモカインＬ１０５＿７、ヒトケモカインＭＩＧ、ヒトケモカインＭＩＧ－ベータタンパク質、ヒトケモカインＭＩＰ－１アルファ、ヒトケモカインＭＩＰ１ベータ、ヒトケモカインＭＩＰ－３アルファ、ヒトケモカインＭＩＰ－３ベータ、ヒトケモカインＰＦ４、ヒトケモカインタンパク質３３１Ｄ５、ヒトケモカインタンパク質６１１６４、ヒトケモカイン受容体ＣＸＣＲ３、ヒトケモカインＳＤＦ１アルファ、ヒトケモカインＳＤＦＩベータ、ヒトケモカインＺＳＩＧ－３５、ヒトＣｈｒ１９Ｋｉｎｅタンパク質、ヒトＣＫベーター９、ヒトＣＫベーター９、ヒトＣＸ３Ｃ１１１アミノ酸ケモカイン、ヒトＤＮＡＸインター

ロイキン－４０、ヒトＤＶｉｃ－１Ｃ－Ｃケモカイン、ヒトＥＤＩＲＦ Ｉ タンパク質配列、ヒトＥＤＩＲＦ ＩＩタンパク質配列、ヒト好酸球ＣＣタイプケモカインエオタキシン、ヒト好酸球発現ケモカイン（EEC）、ヒト速筋線維骨格筋トロポニンＣ、ヒト速筋線維骨格筋トロポニンＩ、ヒト速筋線維骨格筋トロポニンサブユニットＣ、ヒト速筋線維骨格筋トロポニンサブユニットＩタンパク質、ヒト速筋線維骨格筋トロポニンサブユニットＴ、ヒト速筋線維骨格筋トロポニンＴ、ヒト胎児脾臓発現ケモカイン、ＦＳＥＣ、ヒトＧＭＣＳＦ受容体、ヒトｇｒｏアルファケモカイン、ヒトｇｒｏ－ベータケモカイン、ヒトｇｒｏ－ガンマケモカイン、ヒトＩＬ－１６タンパク質、ヒトＩＬ－１ ＲＤ１０タンパク質配列、ヒトＩＬ－１ＲＤ９、ヒトＩＬ－５受容体アルファ鎖、ヒトＩＬ－６受容体、ヒトＩＬ－８受容体タンパク質ｈｌＬ８ＲＡ、ヒトＩＬ－８受容体タンパク質ｈｌＬ８ＲＢ、ヒトＩＬ－９受容体タンパク質、ヒトＩＬ－９受容体タンパク質変異体＃３、ヒトＩＬ－９受容体タンパク質変異体断片、ヒトＩＬ－９受容体タンパク質変異体断片＃３、ヒトインターロイキン１デルタ、ヒトインターロイキン１０、ヒトインターロイキン１０、ヒトインターロイキン１８、ヒトインターロイキン１８誘導体、ヒトインターロイキン－１ベータ前駆物質、ヒトインターロイキン－１ベータ前駆物質、ヒトインターロイキン－１受容体アクセサリータンパク質、ヒトインターロイキン－１受容体拮抗剤ベータ、ヒトインターロイキン－１タイプ－３受容体、ヒトインターロイキン－１０（前駆物質）、ヒトインターロイキン－１０（前駆物質）、ヒトインターロイキン－１１受容体、ヒトインターロイキン－１２ ４０ｋＤサブユニット、ヒトインターロイキン－１２ベーター１受容体、ヒトインターロイキン－１２ベーター２受容体、ヒトインターロイキン－１２ ｐ３５タンパク質、ヒトインターロイキン－１２ ｐ４０タンパク質、ヒトインターロイキン－１２受容体、ヒトインターロイキン－１３アルファ受容体、ヒトインターロイキン－１３ベータ受容体、ヒトインターロイキン－１５、クローンＰ１由来のヒトインターロイキン－１５受容体、ヒトインターロイキン－１７受容体、ヒトインターロイキン－１８タンパク質（IL-18）、ヒトインターロイキン－３、ヒトインターロイキン－３受容体、ヒトインターロイキン－３変異体、ヒトインターロイキン－４受容体、ヒトインターロイキン－５、ヒトインターロイキン－６、ヒトインターロイキン－７、ヒトインターロイキン－７、ヒトインターロイキン－８（IL-8）、ヒト細胞内にＩＬ－１受容体拮抗剤、ヒトＩＰ－１０及びＨＩＶ－１ｇｐ１２０高頻度可変領域融合タンパク質、ヒトＩＰ－１０及びヒトＭｕｃ－１コアエピトープ（VNT）融合タンパク質、ヒト肝臓及び活性制御ケモカイン（LARC）、ヒトＬｋｎ－１全長及び成熟タンパク質、全長及び成熟ヒト乳腺関連ケモカイン（MACK）タンパク質、ヒト成熟ケモカインＣｋベーター７、ヒト成熟ｇｒｏ－アルファ、敗血症を治療するために使用されるヒト成熟ｇｒｏ－ガンマポリペプチド、ヒトＭＣＰ－３及びヒトＭｕｃ－１コアエピトープ（VNT）融合タンパク質、ヒトＭＩ１０タンパク質、ヒトＭＩ１Ａタンパク質、ヒト単球化学誘引物質因子ｈＭＣＰ－１、ヒト単球化学誘引物質因子ｈＭＣＰ３、ヒト単球走化性プロタンパク質（MCPP）配列、ヒトニューロタクチンケモカイン様ドメイン、ヒト非ＥＬＲ ＣＸＣ ケモカイン Ｈ１７４、ヒト非ＥＬＲ ＣＸＣ ケモカインＩＰ１０、ヒト非ＥＬＲ ＣＸＣ ケモカイン Ｍｉｇ、ヒトＰＡｌ－１変異体、ＩＬ－１６活性を有するヒトタンパク質、ＩＬ－１６活性を有するヒトタンパク質、ヒト二次リンパケモカイン（SLC）、ヒトＳＩＳＤタンパク質、ヒトＳＴＣＰ－１、ヒト間質細胞由来のケモカイン、ＳＤＦ－１、ヒトＴ細胞混合リンパ球反応発現ケモカイン（TMEC）、ヒト胸腺及び活性制御サイトカイン（TARC）、ヒト胸腺発現、ヒトＴＮＦ－アルファ、ヒトＴＮＦ－アルファ、ヒトＴＮＦ－ベータ（ＬＴ－アルファ）、ヒトＣＣ型ケモカインエオタキシン３タンパク質配列、ヒトＩＩ型インターロイキン－１受容体、ヒト野生型インターロイキン－４（hlL-4）タンパク質、ヒトＺＣＨＥＭＯ－８タンパク質、ヒト化抗ＶＥＧＦ抗体、及びこの断片、ヒト化抗ＶＥＧＦ抗体、及びこの断片、ヒアルロニダーゼ、ＩＣＥ１０ ｋＤサブユニット、ＩＣＥ ２０ ｋＤ サブユニット、ＩＣＥ ２２ ｋＤサブユニット、イズロネート－２－スルファターゼ、イズロニダーゼ、ＩＬ－１アルファ、ＩＬ－１ベータ、ＩＬ－１抑制剤（ＩＬ－１ｉ）、成熟ＩＬ－１、ＩＬ－１０受容体、ＩＬ－１１、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２ ｐ４０サブユニット、ＩＬ－１３、

ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１５受容体、ＩＬ－１７、ＩＬ－１７受容体、ＩＩ－１７受容体、ＩＩ－１７受容体、ＩＬ－１９、ＩＬ－１ｉ断片、ＩＬ１－受容体拮抗剤、ＩＬ－２１（TIF）、ＩＬ－３含有融合タンパク質、ＩＬ－３変異体タンパク質、ＩＬ－３変異体、ＩＬ－３変異体、ＩＬ－４、ＩＬ－４変異タンパク質、ＩＬ－４変異タンパク質Ｙ１２４Ｇ、ＩＬ－４変異タンパク質Ｙ１２４Ｘ、ＩＬ－４変異タンパク質、ＩＩ－５受容体、ＩＬ－６、ＩＩ－６受容体、ＩＬ－７受容体クローン、ＩＬ－８受容体、ＩＬ－９成熟タンパク質変異体（Met117 version）、免疫グロブリン若しくは免疫グロブリンに基づく分子又は断片（例えば、Small Modular Immuno Pharmaceutical（登録商標）（「SMIP」）若しくはdAb，Fab' 断片
，F(ab')2，scAb，scFv 又はscFv 断片）、を含むがこれに限定されないプラスミノーゲン、インフルエンザワクチン、インヒビンアルファ、インヒビンベータ、インスリン、インスリン様成長因子、インテグリンＭａｂ、インターアルファトリプシン抑制剤、インターアルファトリプシン抑制剤、インターフェロンガンマ誘導性タンパク質（ＩＰ－１０）、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ種及び亜種、インターフェロンベータ種及び亜種、インターフェロンガンマ種及び亜種）、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ種及び亜種，インターフェロンベータ種及び亜種、インターフェロンガンマ種及び亜種）、インターロイキン６、インターロイキン８（IL-8）受容体、インターロイキン８受容体Ｂ、インターロイキン－１アルファ、インターロイキン－２受容体関連タンパク質ｐ４３、インターロイキン－３、インターロイキン－４変異タンパク質、インターロイキン－８（IL-8）タンパク質、インターロイキン－９、インターロイキン－９（IL-9）成熟タンパク質（Thr117 version）、インターロイキン（例えば、IL10，IL11 及びIL2）、インターロイキン（例えば、IL10，IL11及びIL2）、日本脳炎ワクチン、カリクレイン抑制剤、ケラチノサイト成長因子、クニッツドメインタンパク質（例えば、アルブミン融合物を有する又は有しない、アプロチニン，アミロイド前駆タンパク質及びWO03/066824で説明されるもの）、クニッツドメインタンパク質（例えば、アルブミン融合物を有する又は有しない、アプロチニン，アミロイド前駆タンパク質及びWO03/066824で説明されるもの）、ＬＡＣＩ、ラクトフェリン、Ｌａｔｅｎｔ ＴＧ Ｆ－ベータ結合タンパク質ＩＩ、レプチン、肝臓発現ケモカイン－１（LVEC-1）、肝臓発現ケモカイン－２（LVEC-2）、ＬＴ－アルファ、ＬＴ－ベータ、黄体形成ホルモン、ライム病ワクチン、リンホタクチン、マクロファージ由来のケモカイン類似体ＭＤＣ（n+1）、マクロファージ由来のケモカイン類似体ＭＤＣ－ｅｙｆｙ、マクロファージ由来のケモカイン類似体ＭＤＣ－ｙｌ、マクロファージ由来のケモカイン、ＭＤＣ、マクロファージ由来のケモカイン（MDC）、マスピン；プロテアーゼ抑制剤５、ＭＣＰ－１受容体、ＭＣＰ－１ａ、ＭＣＰ－１ｂ、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－４受容体、Ｍ－ＣＳＦ、メラノーマ抑制タンパク質、膜結合性タンパク質、Ｍｅｔ１１７ヒトインターロイキン９、ＭＩＰ－３アルファ、ＭＩＰ－３ベータ、ＭＩＰ－ガンマ、ＭＩＲＡＰ、修飾ランテス、モノクローナル抗体、ＭＰ５２、変異インターロイキン６ Ｓ１７６Ｒ、筋細線維収縮タンパク質トロポニンｌ、ナトリウム利尿ペプチド、神経成長因子ベータ、神経成長因子ベータ２、ニューロピリン－１、ニューロピリン－２、ニューロタクチン、ニューロトロフィン－３、ニューロトロフィン－４、ニューロトロフィン－４ａ、ニューロトロフィン－４ｂ、ニューロトロフィン－４ｃ、ニューロトロフィン－４ｄ、好中球活性化ペプチド－２（NAP-2）、ＮＯＧＯ－６６受容体、ＮＯＧＯ－Ａ、ＮＯＧＯ－Ｂ、ＮＯＧＯ－Ｃ、ＰＴＥＣと命名された新規ベーターケモカイン、Ｎ末端修飾ケモカインＧｒｏＨＥＫ／ｈＳＤＦ－１アルファ、Ｎ末端修飾ケモカインＧｒｏＨＥＫ／ｈＳＤＦ－１ベータＮ末端修飾ケモカインｍｅｔ－ｈＳＤＦ－１アルファ、Ｎ末端修飾ケモカインｍｅｔ－ｈＳＤＦ－１ベータ、ＯＰＧＬ、骨形成タンパク質－１；ＯＰ－１；ＢＭＰ－７、骨形成タンパク質－２、ＯＸ４０；ＡＣＴ－４、ＯＸ４０Ｌ、オキシトシン（ニューロフィジンｌ）、副甲状腺ホルモン、パッチド（Patched）、パッチド－２、ＰＤＧＦ－Ｄ、百日咳トキソイド、下垂体発現ケモカイン（PGEC）、胎盤成長因子、胎盤成長因子－２、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤－１；ＰＡＩ－１、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤－２；ＰＡＩ－２、プラスミノーゲン活性化因

子阻害剤－２；ＰＡＩ－２、血小板由来の成長因子、血小板由来の成長因子Ｂｖ－ｓｉｓ、血小板由来の成長因子前駆物質Ａ、血小板由来の成長因子前駆物質Ｂ、血小板Ｍａｂ、血小板由来の内皮細胞成長因子（PD-ECGF）、血小板由来の成長因子Ａ鎖、血小板由来の成長因子Ｂ鎖、敗血症治療のために使用されたポリペプチド、プレプロアポリポタンパク質「ミラノ」変異体、プレプロアポリポタンパク質「パリ」変異体、プレトロンビン、霊長類ＣＣケモカイン「ＩＬＩＮＣＫ」、霊長類ＣＸＣケモカイン「ＩＢＩＣＫ」、プロインスリン、プロラクチン、プロラクチン２、プロサプチド、プロテアーゼ抑制因子ペプチド、タンパク質Ｃ、タンパク質Ｓ、プロトロンビン、プロウロキナーゼ、ランテス、ランテス８－６８、ランテス９－６８、ランテスペプチド、ランテス受容体、組換え型インターロイキン－１６、レジスチン、レストリクトシン、レトロウイルスプロテアーゼ抑制剤、リシン、ロタウイルスワクチン、ＲＳＶ Ｍａｂ、サポリン、サルシン（sarcin）、分泌及び膜貫通型ポリペプチド、分泌及び膜貫通型ポリペプチド、血清コリンエステラーゼ、血清タンパク質（例えば、血液凝固因子）、可溶性ＢＭＰ受容体キナーゼタンパク質－３、可溶性ＶＥＧＦ受容体、幹細胞抑制因子、ブドウ球菌ワクチン、間質細胞由来因子－１アルファ、間質細胞由来因子－１ベータ、物質Ｐ（タキキニン）、Ｔ１２４９ペプチド、Ｔ２０ペプチド、Ｔ４エンドヌクレアーゼ、ＴＡＣＩ、Ｔａｒｃ、ＴＧＦ－ベータ１、ＴＧＦ－ベータ２、Ｔｈｒ１１７ヒトインターロイキン９、トロンビン、トロンボポエチン、トロンボポエチン誘導体１、トロンボポエチン誘導体２、トロンボポエチン誘導体３、トロンボポエチン誘導体４、トロンボポエチン誘導体５、トロンボポエチン誘導体６、トロンボポエチン誘導体７、胸腺発現ケモカイン（TECK）、甲状腺刺激ホルモン、ダニ抗凝固ペプチド、Ｔｉｍ－１タンパク質、ＴＮＦ－アルファ前駆物質、ＴＮＦ－Ｒ、ＴＮＦ－ＲＩＩ；ＴＮＦ ｐ７５受容体；細胞死受容体、ｔＰＡ、トランスフェリン、形質転換成長因子ベータ、トロポニンペプチド、切断型単球走化性タンパク質２（6-76）、切断型単球走化性タンパク質２（6-76）、切断型ランテスタンパク質（3-68）、腫瘍壊死因子、尿酸酸化酵素、ウロキナーゼ、バソプレシン（ニューロフィジンII）、ＶＥＧＦ Ｒ－３；ｆｌｔ－４、ＶＥＧＦ受容体；ＫＤＲ；ｆｌｋ－１、ＶＥＧＦ－１１０、ＶＥＧＦ－１２１、ＶＥＧＦ－１３８、ＶＥＧＦ－１４５、ＶＥＧＦ－１６２、ＶＥＧＦ－１６５、ＶＥＧＦ－１８２、ＶＥＧＦ－１８９、ＶＥＧＦ－２０６、ＶＥＧＦ－Ｄ、ＶＥＧＦ－Ｅ；ＶＥＧＦ－Ｘ、フォン・ヴィルブランド因子、野生型単球走化性タンパク質２、野生型単球走化性タンパク質２、ＺＴＧＦ－ベータ９。

【０２２２】

化学療法薬物

１３－ｃｉｓ－レチノイン酸、２－ＣｄＡ、２－クロロデオキシアデノシン、５－アザシチジン、５－フルオロウラシル、５－ＦＵ、６－メルカプトプリン、６－ＭＰ、６－ＴＧ、６－チオグアニン、Ａ、アブラキサン、アキュテイン（登録商標）、アクチノマイシンＤ、アンドリアマイシン（登録商標）、アドルシル（登録商標）、アグリリン（登録商標）、アラ－コート（登録商標）、アルデストリキン、アレムツズマブ、アリミタ（ALIMTA）、アリトレチノイン、アルカバン（Alkaban）－ＡＱ（登録商標）、アルケラン（Alkeran）（登録商標）、オールトランス（All-trans）レチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン（Altretamine）、アメトプテリン、アミホスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド（Anagrelide）、アナンドロン（Anandron）（登録商標）、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、アラ（Ara）－Ｃ、アラネスプ（登録商標）、アレディア（登録商標）、アリミデックス（登録商標）、アロマイシン（登録商標）、アラノン（登録商標）、亜ヒ酸、アスパラギナーゼ、アトラ（ATRA）、アバスチン（登録商標）、アザシチジン、ＢＣＧ、ＢＣＮＵ、ベバシズマブ、ベキサロテン、ＢＥＸＸＡＲ（登録商標）、ビカルタミド、ＢｉＣＮＵ、ブレノキサン（登録商標）、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェクス（Busulfex）（登録商標）、Ｃ２２５、カルシウム・ロイコボリン、キャンパス（登録商標）、カンプトサー（Camptosar）（登録商標）、カンプトセシン－１１、カペシタビン、カラック（Carac）（登録商標）、カルボプラチン、カルムスチン、カルムスチンウエハー、カソデックス（登録商標）、ＣＣ－５

０１３、ＣＣＮＵ、ＣＤＤＰ、ＣｅｅＮＵ、セルビジン（登録商標）、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、シトロボラム因子、クラドリビン、コルチゾン、コスメゲン（登録商標）、ＣＰＴ－１１、シクロホスファミド、シタドレン（Cytadren）（登録商標）、シタラビン、シタラビンリポソーム、サイトサールＵ（Cytosar-U）（登録商標）、シトキサン（登録商標）、ダカルバジン、ダコゲン（Dacogen）、Ｄアクチノマイシン、ダーベポエチンアルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルビシン、ダウノルビシン塩酸塩、ダウノルビシンリポソーム、ダウノキソーム（DaunoXome）（登録商標）、デカドロン、デシタビン、デルターコルテフ（登録商標）、デルタソーン（Deltasone）（登録商標）、デニロイキンジフチトクス、デポサイト（DepoCyt）（登録商標）、デキサメタゾン、デキサメタゾンアセテート、デキサメタゾンナトリウムフォスフェート、デキサゾン（Dexasone）、デクスラゾキサン、ＤＨＡＤ、ＤＩＣ、ジオデックス（Diodex）、ドセタキセル、ドキシル（登録商標）、ドキソルビシン、ドキソルビシンリポソーム、ドロキサ（Droxia）（登録商標）、ＤＴＩＣ、ＤＴＩＣ－Ｄｏｍｅ（登録商標）、デュラロン（Duralone）（登録商標）、エフデックス（登録商標）、エリガード（登録商標）、エレンス（登録商標）、エロキサチン（登録商標）、エルスパー（登録商標）、Ｅｍｃｙｔ（登録商標）、エピルビシン、エポエチンアルファ、エルビタックス（Erbitux）（登録商標）、エルロチニブ、エルウィニア Ｌ－アスパラギナーゼ、エストラムスチン、エチオール、エトポフォス（Etopophos）（登録商標）、エトポシド、エトポシドフォスフェート、Ｅｕｌｅｘｉｎ（登録商標）、エビスタ（登録商標）、エキセメスタン、フェアストン（登録商標）、ファスロデクス（Faslodex）（登録商標）、フェマーラ（登録商標）、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラ（登録商標）、フルダラビン、フルオロプレクス（登録商標）、フルオロウラシル、フルオロウラシル（クリーム）、フルオキシメステロン、フルタミド、フォリン酸、ＦＵＤＲ（登録商標）、フルベストラント、Ｇ－ＣＳＦ、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ジェムザール（登録商標）、ブリーベック（登録商標）、グリアデル（登録商標）ウエハー、ＧＭ－ＣＳＦ、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ハトテスチン（登録商標）、ハーセプチン（登録商標）、ヘキサドロール、ヘキサレン（登録商標）、ヘキサメチルメラミン、ＨＭＭ、ハイカムチン（登録商標）、ハイドレア（登録商標）、酢酸ヒドロコート（Hydrocort acetate）（登録商標）、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンナトリウムフォスフェート、ヒドロコルチゾンナトリウムサクシナート、ハイドロコートンフォスフェート、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、イダマイシン（登録商標）、イダルビシン、アイフェックス（Ｉｆｅｘ）（登録商標）、ＩＦＮ－アルファ、イホスファミド、ＩＬ－１１、ＩＬ－２、イマチニブメシラート、イミダゾールカルボキサミド、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ－２ｂ（PEG複合体）、インターロイキン－２、インターロイキン－１１、イントロンＡ（登録商標）（インターフェロンアルファ－２ｂ）、イレッサ（登録商標）、イリノテカン、イソトレチノイン、カイドロラーゼ（Kidrolase）（登録商標）、ラナコート（Lanacort）（登録商標）、ラパチニブ、Ｌ－アスパラギナーゼ、ＬＣＲ、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、リューケラン、リューカイン（登録商標）、ロイプロリド、ロイコクリスチン、ロイスタチン（登録商標）、リポソームアラ（Ａｒａ）－Ｃ、リキドプレッド（Liquid Pred）（登録商標）、ロムスチン、Ｌ－ＰＡＭ、Ｌ－サルコリシン、リュープロン（登録商標）、リュープロンデポ（Lupron Depot）（登録商標）、Ｍ，マチュレーン（登録商標）、マキシデックス、メクロレタミン、メクロレタミン塩酸塩、メドラロン（Medralone）（登録商標）、メドロール（登録商標）、メゲース（登録商標）、メゲストロール、メゲストロールアセテート、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス（Mesnex）（登録商標）、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メチルプレドニゾロン、メチコルテン（Meticorten）（登録商標）、マイトマイシン、マイトマイシン－Ｃ、ミトキサントロン、Ｍ－プレドニソール（Prednisol）（登録商標）、ＭＴＣ、ＭＴＸ、マスタージェン（Mustargen）（登録商標）、ムスチン、ムタミシン（Mutamycin）（登録商標）、マイレラン（登録商標）、ミロセル（Myloc

el）（登録商標）、マイロターグ（登録商標）、ナベルビン（登録商標）、ネララビン、ネオサル（Neosar）（登録商標）、ニューラスタ（Neulasta）（登録商標）、ニューメガ（Neumega）（登録商標）、ニューポジェン（登録商標）、ネクサバール（登録商標）、ニランドロン（Nilandron）（登録商標）、ニルタミド（Nilutamide）、ニペント（Nipent）（登録商標）、ナイトロジェンマスタード、ノルバデックス（登録商標）、ノバントロン（登録商標）、オクトレオチド、オクトレオチドアセテート、オンコスパー（Oncospar）（登録商標）、オンコビン（Oncovin）（登録商標）、オンタック（登録商標）、オンキサル（Onxal）（登録商標）、オプレベルキン（Oprevelkin）、オラプレッド（Orapred）（登録商標）、オラソン（Orasone）（登録商標）、オキサリプラチン、パクリタキセル、タンパク質結合パクリタキセル、パミドロネート、パニツムマブ、パンレチン（Panretin）（登録商標）、パラプラチン（登録商標）、ペジアプレド（Pediapred）（登録商標）、ＰＥＧインターフェロン、ペグアスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ＰＥＧ－イントロン（登録商標）、ＰＥＧ－Ｌ－アスパラギナーゼ、ペメトレックスド（PEMETREXED）、ペントスタチン、フェニルアラニンマスタード、プラチノール（Platinol）（登録商標）、プラチノール－ＡＱ（Platinol-AQ）（登録商標）、プレドニゾロン、プレドニゾン、プレロン（Prelone）（登録商標）、プロカルバジン、ＰＲＯＣＲＩＴ（登録商標）、プロロイキン（Proleukin）（登録商標）、カルムスチンインプラントを有するプロリフェプロスパン（Prolifeprospan）２０、プリネトール（Purinethol）（登録商標）、Ｒ，ラロキシフェン、レブリミド（登録商標）、リウマトレックス（登録商標）、リツキサン（登録商標）、リツキシマブ、ロフェロン－Ａ（Roferon-A）（登録商標）（インターフェロンアルファ－２ａ）、ルベックス（登録商標）、ルビドマイシン（Rubidomycin）塩酸塩、サンドスタチン（登録商標）、サンドスタチンＬＡＲ（登録商標）、サルグラモスチム、ソルーコルテフ（Solu-Cortef）（登録商標）、ソルーメドロール（Solu-Medrol）（登録商標）、ソラフェニブ、スプライセル（SPRYCEL）（登録商標）、ＳＴＩ－５７１、ストレプトゾシン、ＳＬＭ １２４８、スニチニブ、スーテント（登録商標）、タモキシフェン、タルセバ（登録商標）、タルグレチン（Targretin）（登録商標）、タクソール（登録商標）、タキソテール（登録商標）、テモダル（Temodar）（登録商標）、テモゾロマイド、テニポシド、ＴＥＳＰＡ、サリドマイド、サロミド（登録商標）、テラシス（TheraCys）（登録商標）、チオグアニン、チオグアニンタブロイド（登録商標）、チオフォスフォアミド（Thiophosphoamide）、チオプレクス（Thioplex）（登録商標）、チオテパ、ＴＩＣＥ（登録商標）、トポサル（Toposar）（登録商標）、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、トレキサール（Trexall）（登録商標）、トリセノックス（登録商標）、ＴＳＰＡ、ＴＹＫＥＲＢ（登録商標）、ＶＣＲ、ベクティビックス（登録商標）、ベルバン（Velban）（登録商標）、ベルケイド（登録商標）、ベプシド（登録商標）、ベサノイド（登録商標）、バイアジュール（Viadur）（登録商標）、ビダザ（Vidaza）（登録商標）、ビンブラスチン、ビンブラスチン硫酸塩、ビンカサル（Vincasar）Ｐｆｓ（登録商標）、ビンクリスチン、ビノレルビン、ビノレルビン酒石酸、ＶＬＢ、ＶＭ－２６、ボリノスタット、ＶＰ－１６、ブモン（Vumon）（登録商標）、ゼローダ（登録商標）、ザノサル（Zanosar）（登録商標）、ゼバリン（登録商標）、ザインカード（登録商標）、ゾラデックス（登録商標）、ゾレドロン酸、ゾリンザ、ゾメタ（登録商標）。

【０２２３】

放射性医薬

カルボン－１１、カルボン－１４、クロム－５１、コバルト－５７、コバルト－５８、エルビウム－１６９、フッ素－１８、ガリウム－６７、ゴールド－１９８、インジウム－１１１、インジウム－１１３ｍ、ヨード－１２３、ヨード－１２５、ヨード－１３１、鉄－５９、クリプトン－８１ｍ、窒素－１３、酸素－１５、リン－３２、レニウム－１８６、ルビジウム－８２、サマリウム－１５３、セレン－７５、ストロンチウム－８９、テクネチウム－９９ｍ、タリウム－２０１、トリチウム、キセノン－１２７、キセノン－１３３、イットリウム－９０。

【０２２４】
造影剤
ガドリニウム、マグネタイト、マンガン、テクネチウム、１１２５、１１３１、Ｐ３２、ＴＩ２０１、ロパミドール、ＰＥＴ－ＦＤＧ。
【０２２５】
精製タグ
アルブミンはまた、１又は複数の精製タグ、例えば（AIa-Trp-Trp-Pro）ｎ、アビジン／ストレプトアビジン／連鎖球菌（Strep）タグ、ＢＣＣＰ、Ｂ－タグ（ブルータング病ウイルスのVP7タンパク質領域）、カルモジュリン結合タンパク質（CBP）、セルロース結合ドメイン（CBD's）、キチン結合ドメイン、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ、ｃ－ｍｙｃ、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）、ＦＬＡＧ（登録商標）ペプチド（DYKDDDDK）、ガラクトース結合タンパク質、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（GST）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、成長ホルモン、Ｎ末端、赤血球凝集素インフルエンザウイルス（HAI）、ヒスパッチチオレドキシン、ヒスタグ、ＨＳＢ－タグ、ＫＳＩ、ｌａｃＺ（β－ガラクトシダーゼ）、マルトース結合タンパク質（MBP）、ＮｕｓＡ、ｏｍｐＴ／ｏｍｐＡ／ｐｅｌＢ／ＤｓｂＡ／ＤｓｂＣ、ポリアルギニン、ポリアスパラギン酸、ポリシステイン、ポリフェニルアラニン、Ｓ－タグ、ブドウ球菌タンパク質Ａ、連鎖球菌タンパク質Ｇ、Ｔ４ ｇｐ５５、Ｔ７ｇｅｎｅ１０、Ｔ７－タグ、チオレドキシン、ｔｒｐＥ、ユビキチン、に融合されてよい。
【０２２６】
リガンド結合
ＨＳＡは、「アルブミンに関して全て」、Ｔ．Ｐｅｔｅｒｓ Ｊｒ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｎ．Ｙ．で説明されるように、リガンド結合及びエステラーゼ活性を有する。リガンド結合特性は、アニオン性及び中性リガンド、例えば長鎖脂肪酸、ビリルビン及び他の種々のリガンドに結合することを含む。
【０２２７】
長鎖脂肪酸、オレイン酸（C18:1）、パルミチン酸（C16:0）、リノール酸（C18:2）、ステアリン酸（C18:0）、アラキドン酸（C20:4）及びパルミトレイン酸（C16:1）は、ＨＳＡを結合することが知られている。
【０２２８】
ポリペプチドは、保存的又は非保存的な、挿入、欠失及び置換を含んでよく、このような変化は、例えばＦｃＲＮ、ビリルビン及び／又は脂肪酸への、アルブミンの有用なリガンド結合、免疫又は受容体結合特性を実質的に低下しない。ポリペプチドは、モル比で少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％又は５０％、６０％、７０％、少なくとも８０％、９０％、９５％、１００％、１０５％又はそれ以上のヒト血清アルブミンの受容体結合活性を有してよい。ポリペプチドは、アルブミン受容体に対してアフィニティーを増大していてよい。
【０２２９】
リガンド結合試験は、本目的に適切とされている温滴定熱量測定方法を使用してＨＳＡ及びチオアルブミン上で実施してよい。試料は、脱脂すること（明細書中で参照により組み込まれる、Sogami, M. and J. F. Foster (1968). Biochemistry 7(6): 2172-82）、続いてチオールをブロックすること（明細書中で参照により組み込まれる、Sogami, M., H. A. Pe- tersen, et al. (1969). Biochemistry 8(1): 49-58）、さらにその後のゲル浸透クロマトグラフィによって予め処理することができる。チオアルブミン及びオクタン酸塩を有するＨＳＡに対して作成された結合曲線は、例えば、続いて比較され、そして機能の類似性が確定されてよい。
【０２３０】
結合方法
本発明のアルブミン変異タンパク質（チオアルブミン）は、１又は複数の結合パートナー、例えば生物活性化合物に共有結合で、当業者に周知の方法（例えば、Pierce, Thermo

Fisher Scientific, Rockford, IL, USA; http://www.piercenet.com/files/1601361 Crosslink.pdfによって提供されるもの）によって結合することができる。これらは、例えば結合パートナー上に存在する他の遊離チオールを取り込む又は組み込むことによって；或いは結合パートナー上にピリジルジスルフィド基を取り込む又は組み込むことによって；或いは生物活性化合物上にヨードアセチル基を取り込む又は組み込むことによって、又はマレイミド基を結合パートナー上に取り込む又は組み込むことによって、結合パートナー中に又は上にチオール反応基を取り込む又は組み込むことを含むがこれに限定されない。例えば、Ｎ－エチルマレイミド（NEM, Pierce）、２－アミノ－２’－アミノエタンチオールスルホン酸（Pierce）、Ｎ－ベーター－マレイミドプロピオン酸（BMPA Pierce）、メチルメタンチオスルホン酸（MMTS, Pierce）、フルオレセイン－５－マレイミド（Pierce）、５－ヨードアセトアミド－フルオレセイン（5-IAF, Pierce）又は、Ｎ－［６－７－アミノ－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）ヘキシル］－３’－［２’－ピリジルジチオ］プロピオンアミド（AMCA-HPDP, Pierce）等である。

【０２３１】

結合パートナーが少なくとも１つのチオール基を含む場合、結合パートナーは、当技術分野で周知の方法、例えば、酸化、又は架橋試薬、例えば、１，４－ビス－マレイミドブタン（BMB, Pierce）；１，４－ビス－マレイミジル－２，３－ジヒドロキシブタン（BMDB, Pierce）；ビス－マレイミドヘキサン（BMH, Pierce）、ビス－マレイミドエタン（BMOE, Pierce）；１，８－ビス－マレイミドトリエチレングリコール（BM[PEO]3 Pierce）；１，１１－ビス－マレイミドテトラエチレングリコール（BM[PEO]4 Pierce）；１，４－ジ－［３’－（２’－ピリジルジチオ）－プロピオンアミド］ブタン（DPDPB, Pierce）；ジチオ（dithuio）－ビス－マレイミドエタン（DTME Pierce）；１，６－ヘキサン－ビス－ビニルスルホン（HBVS, Pierce）及びトリス－［２－マレイミドエチル］アミン（TMEA, Pierce）の使用によって、本発明のアルブミン変異タンパク質に架橋結合されてよく、当該方法及び試薬はこれらに限定されない。

【０２３２】

結合パートナーがチオール反応基を含まない場合、当技術で周知の方法によって化学修飾又は遺伝子操作で、１又は複数のこのような基を組み込むために修飾されてよい（Chapman, A.P. (2002) Adv. Drug DeNv. Rev., 54 531-545: Humphreys, D. P. et al. Protein Engineering, Design & Selection vol. 20 no. 5 pp. 227-234, 2007）。これらの２つの参考文献は、抗体又は抗体断片内の組換え遊離チオールにＰＥＧを架橋結合するための方法論を説明すると同時に、当該技術は本発明のアルブミン変異タンパク質内の結合パートナーを組換え遊離チオールに架橋結合するために使用してよい。あるいは、例えば、ＷＯ２０００６９９０２で説明される、ＣｏｎｊｕＣｈｅｍ Ｉｎｃ．によって開発された薬物アフィニティー複合体（DAC（登録商標））技術（Montreal, Quebec, Canada, H2X 3Y8）を使用してよい。各ＤＡＣ（登録商標）コンストラクトは次の３つの部分が存在する：１）薬物成分（生物活性に関与する部分）；２）薬物成分に付着するリンカー、及び３）リンカー、通常チオールに対して選択性のあるソフト求電子剤の反対側末端の反応化学基；マレイミドが最も有用な実施形態である。他の適用可能な結合方法は、明細書中で参照により組み込まれるＷＯ２００７／０７１０６８において説明される。

【０２３３】

結合パートナーがチオール反応基を含有しないが、１又は複数のアミノ基を含有する場合、当技術分野に周知の方法、例えば架橋試薬の使用によって化学修飾で１又は複数のチオール反応基を組み込むために修飾されてよく、当該架橋試薬は、例えば、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（AMAS, Pierce）、Ｎ－［ベーター－マレイミドプロピルオキシ］スクシンイミドエステル（BMPS, Pierce）、Ｎ－η－マレイミドカプロン酸（EMCA, Pierce）、Ｎ－［η－マレイミドカプロイルオキシ］スクシンイミドエステル（EMCS, Pierce）、Ｎ－［η－マレイミドカプロイルオキシ］スルホスクシンイミドエステル（sulfo-EMCS, Pierce）、Ｎ－［ガンマ－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（GMBS, Pierce）、Ｎ－［ガンマ－マレイミドブチリルオキシ］スル

ホスクシンイミドエステル（sulfo-GMBS, Pierce）、Ｎ－κ－マレイミドウンデカン酸（KMUA, Pierce）、Ｎ－[κ－マレイミドウンデカン酸]ヒドラジド（KMUH, Pierce）、Ｎ－［κ－マレイミドウンデカノイルオキシ］スルホスクシンイミドエステル（sulfo-KMUS, Pierce）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ハイドロキシスクシンイミド（MBS, Pierce）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（sulfo-MBS, Pierce）、Ｎ－スクシニミジルＳ－アセチルチオ－アセテート（SA-TA, Pierce）、Ｎ－スクシニミジルＳ－アセチルチオポロピオン酸塩（SATP, Pierce）、スクシニミジル３－［ブロモアセトアミド］ポロピオン酸塩（SBAP, Pierce）、Ｎ－スクシニミジルヨードアセテート（SIA, Pierce）、Ｎ－スクシニミジル［４－ヨードアセチル］アミノ安息香酸塩（SIAB, Pierce）、スルホスクシニミジル［４－ヨードアセチル］アミノ安息香酸塩（sulfo-SIAB, Pierce）、スクシニミジル［４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボン酸塩（SMCC, Pierce）、スルホスクシニミジル［４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボン酸塩（sulfo-SMCC, Pierce）、スクシニミジル－［４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１－カルボキシ－［６－アミドカプロン酸（LC-SMCC, Pierce）、４－スクシニミジルオキシカルボニル－メチル－アルファ［２－ピリジルジチオ］トルエン（SMPT, Pierce）、スルホスクシニミジル－６－［アルファ－メチル－アルファ２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサン酸塩（sulfo-LC-SMPT, Pierce）、スクシニミジル４－［ｐ－マレイミドフェニル］－ブチラート（SMPB, Pierce）、スルホスクシニミジル４－［ｐ－マレイミドフェニル］－ブチラート（sulfo-SMPB, Pierce）、スクシニミジル－６－［（ベーター－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサン酸塩］（SMPH, Pierce）、Ｎ－スクシニミジル３－［２－ピリジルジチオ］ポロピオン酸塩（SPDP, Pierce）、スクシニミジル［３－（２－ピリジルジチオ）プロピオンアミド］ヘキサン酸塩（LC-ＳＰＤＰ, Pierce）、スルホスクシニミジル［３’－（２－ピリジルジチオ）プロピオンアミド］ヘキサン酸塩（sulfo-LC-SPDP, Pierce）及びＮ－スクシニミジル－［４－ビニルスルホニル］安息香酸塩（SVSB Pierce）であるが、これらに限定されない。Ｋａｖｉｍａｎｄａｎ等（2006）のＢｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１７，１３７６～１３８４によって説明されるように、一定のアミン残基をブロックすることが好適である。

【０２３４】

結合パートナーがチオール反応基を含有しないが、１又は複数のカルボニル（酸化炭水化物）基を含有する場合、当技術分野に周知の方法によって化学修飾で１又は複数のチオール反応基を組み込むために修飾することができ、当該方法は例えば架橋試薬、例えばＮ－［η－マレイミドカプロン酸］ヒドラジド（EMCH, Pierce）、４－［Ｎ－マレイミドメチル］シクロヘキサン－１カルボキシルヒドラジド・ＨＣｌ・１／２ジオキサン（M2C2H, Pierce）、３－マレイミドフェニルボロン酸（MPBH, Pierce）及び３－［２－ピリジルジチオ］プロピオニルヒドラジド（PDPH, Pierce）の使用であるがこれらに限定されない。

【０２３５】

結合パートナーがチオール反応基を含まないが、１又は複数のヒドロキシル基を含む場合、当技術分野に周知の方法によって化学修飾で１又は複数のチオール反応基を組み込むために修飾されてよく、当該方法は、例えば架橋試薬、例えば、Ｎ－［ｐ－マレイミドフェニル］イソシアネート（PMPI, Pierce）の使用であるが、これに限定されない。

【０２３６】

アルブミン変異体の結合コンピテンス

本発明のポリペプチドの結合コンピテンスは、ＭｃＧｒａｗ等（1987）の、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１０５，２０７～２１４、及びＰｒｅｓｌｅｙ等（1993）の、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１２２，１２３１～１２４１によって説明されるように、蛍光標識及び細胞の取り込みによってテストされてよい。結合コンピテンスをテストする他の方法は、アルブミンの他の分子、例えばＨＲＰへの結合を含む。続いて、得られる複合体及び／又は結合化合物の活性の質量

は、例えば質量分析又は酵素アッセイによってアッセイされてよい。

【０２３７】

微生物

本発明における使用に適当な宿主株は、Ｓ．Ｍ．Ｋｅｒｒｙ－Ｗｉｌｌｉａｍｓ等（1998）のＹｅａｓｔ １４：１６１～１６９に開示される、ＤＸＹ１のｈｓｐ１５０－欠損バージョンを含む。ＷＯ９５／３３８３３は、ｈｓｐ１５０－欠損酵母をどのように調製するのかを当業者に教示する。この宿主株は、「株１」と呼んでよい。

前述の全ての参考資料は、全体において参照により組み込まれている。

本発明は、以下の実施例に関して一例として説明する。

【実施例】

【０２３８】

実施例１：アルブミン変異タンパク質発現プラスミドの構築

ＨＳＡコード配列は、ヒト遺伝子に対応するｃＤＮＡを単離するための周知の方法によって得られ、例えば、ＥＰ０ ０７３ ６４６及びＥＰ０ ２８６ ４２４にもまた開示される。本発明のアルブミン変異体のための発現プラスミドは、出芽酵母由来のヒト血清アルブミンの発現のためのＷＯ００／４４７７２において説明されるｐＤＢ２２４４、又はＷＯ／２００６／０１３８５９において説明されるｐＤＢ２３０５と同様の方法で構築できる。プラスミドｐＤＢ２３０５は、出芽酵母における発現に対して最適化されたＨＳＡ配列コドンを含む。代替コドンの最適化方法は、チオアルブミン産生のために選択される特定の宿主生物のために使用してよい。本発明のアルブミン変異体のための発現プラスミドはまた、出芽酵母由来のヒト血清アルブミンの改善された発現に関するＷＯ２００５／０６１７１９Ａ１において説明されるものと同様の方法で構築される。チオアルブミン変異タンパク質は、部位特異的な変異原性によって、プラスミドｐＤＢ２２４４（図7）又はｐＤＢ２３０５の修飾に続いて作成することができる。変異原性オリゴヌクレオチド配列を重複させることは、商業上利用できるキットによって表示される手順（例えば、Stratagene's Quikchange（登録商標）Kit）を使用して、システイン残基（TGT又はTGC）をコードする任意のＤＮＡ配列に選択残基のコドンを修飾するために使用することができる。あるいは、合成ＤＮＡ断片はポリヌクレオチド配列への所望の修飾を含みながら、産生することができる。

【０２３９】

チオアルブミン変異体発現プラスミドの構築

プラスミドｐＤＢ２２４４（図7）を作出するために使用してよいサブクローニングプラスミドは、（WO00/44772で説明される）プラスミドｐＤＢ２２４３（図8）及び（EP286424で説明される）プラスミドｐＳＡＣ３５である。プラスミドｐＤＢ２２４３及びｐＤＢ２２４４は、天然のＨＳＡ遺伝子を含有する。当業者であれば、発現カセットは、最適化されたコドンでも当該コドンでなくてもよく；出芽酵母における発現のために最適化されたＨＳＡコドンを含んでいる発現プラスミドを構築するための方法は、ＷＯ／２００６／０１３８５９において説明されている、と理解できるであろう。ＨＳＡをコードしている天然のヌクレオチド配列は、配列番号２で供される。出芽酵母における発現のためのコドン最適化されたＨＳＡヌクレオチド配列は、配列番号３で供される。

【０２４０】

プラスミドｐＤＢ２２４３（6.203kb）を、２．９９２ｋｂのヒト血清アルブミン発現カセットを放出するために、制限エンドヌクレアーゼＮｏｔｌを使用して、消化し完了した。

【０２４１】

プラスミドｐＳＡＣ３５は、Ｃｈｉｎｅｒｙ及びＨｉｎｃｈｌｉｆｆｅ（1989）のＣｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．１６，２１～２５、及びＥＰ２８６４２４に記載のｐＳＡＣ３の誘導体である。プラスミドｐＳＡＣ３５（11.037kb）を、制限エンドヌクレアーゼＮｏｔｌで消化し完了し、且つウシのアルカリ性腸ホスファターゼを使用して脱リン酸化し、さらにＬＥＵ２遺伝子（図7）と同方向に位置が定められたヒト血清アルブミン発現カセットを

有する１４．０３７ｋｂのｐＤＢ２２４４を生成するために、２．９９２ｋｂのＮｏｔｌヒト血清アルブミン発現カセットと結合させた。当業者であれば、発現カセットは最適化されたコドンであっても当該コドンでなくてもよく、発現カセットは本発明の一部として発現ベクター中でいずれかの向きにクローン化されてもされなくてもよい、と理解できるであろう。

【０２４２】

あるいは、プラスミドｐＤＢ２６９０を使用してよい。プラスミドｐＤＢ２６９０の構築は、ＷＯ／２００５０６１７１９Ａ１で説明される。プラスミドｐＤＢ２６９０（13.018kb）を、完了のために制限エンドヌクレアーゼＮｏｔｌで消化し、仔ウシ腸由来のアルカリ性ホスファターゼを使用して脱リン酸化し、１６．０３９ｋｂのプラスミドｐＤＢ２７１３を生成するために、ＬＥＵ２遺伝子と同一方向に位置が定められるヒト血清アルブミン発現カセットを有する２．９９２ｋｂ Ｎｏｔｌヒト血清アルブミン発現カセットと結合させた（図9）。当業者であれば、発現カセットは最適化されたコドンであっても当該コドンでなくてもよく、発現カセットは、本発明の一部として発現ベクターにおいていずれかの方向でクローン化されてもされなくてもよい、と理解できるであろう。

【０２４３】

部位特異的な変異原性への代替として、本発明のチオアルブミン（すなわち、結合コンピテントアルブミン）変異体のための発現プラスミドは、ｐＳＡＣ３５又はｐＤＢ２６９０中へのクローン化に先立って、合成ＤＮＡ断片をプラスミドｐＤＢ２２４３中にサブクローニングすることによって作成することができる（図8）。（配列番号1に関する）１つのさらなる結合コンピテントシステインを含有するチオアルブミンサブクローニングプラスミドの構築方法は、単に一例として、以下に説明する。

【０２４４】

ｐＤＢ２２４３のアルブミンＤＮＡ配列は、２つのＨｉｎｄＩＩＩ制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。

【０２４５】

合成ＤＮＡは、ヒト血清アルブミンタンパク質コード配列が、選択されたコドンにおいてシステインコドンに修飾される、又は現存するシステインコドンが削除若しくは他のアミノ酸に関するコドンに修飾されるように修飾されてよい。あるいは、成熟チオアルブミンのためのコード配列は、１又は複数のシステインを含むシステイン又はポリペプチドをコードしている新規な配列を加えるために、５’若しくは３’末端で伸展される、又は挿入がポリペプチド内にされてよい。

【０２４６】

あるいは、ヒト血清アルブミンタンパク質をコードしている配列が選択システインコドンにおいて、不対システインを作出するための代替コドンへ修飾されるように、合成ＤＮＡは修飾されてよい。あるいは、ヒト血清アルブミンタンパク質をコードする配列が、特定の部位での２つのコドンの置換によって、システインコドンへ修飾される（アミノ酸鎖長が減少する）ように、合成ＤＮＡは修飾されてよい。あるいはヒト血清アルブミンタンパク質をコードする配列（例えば、HASに関する配列番号2又は配列番号3）が、特定部位におけるシステインコドンの挿入によって修飾される（アミノ酸鎖長が増加する）ように、合成ＤＮＡは修飾されてよい。プラスミドｐＤＢ２２４３は、完了のためにＨｉｎｄＩＩＩの制限エンドヌクレアーゼで消化してよく、そして断片（約4.383kb）を回収且つ脱リン酸化し、ヒト血清アルブミンをコードする配列への適切な修飾を含んでなる合成ＤＮＡは、続いて必要なチオアルブミンサブクローニングプラスミドを生成するためにクローン化されてよい。チオアルブミンサブクローニングプラスミドは続いて、ｐＤＢ２２４４、ｐＤＢ２３０５又はｐＤＢ２７１３の構築と同様の方法で適当な発現プラスミド中にクローン化される発現カセットを生成するために消化してよい。

【０２４７】

当業者であれば、アルブミタンパク質配列へのさらなる修飾を伴うチオアルブミン変異体のための発現カセットは、（配列番号1に関する）１つの更なる結合コンピテントシス

テインを含むチオアルブミンサブクローニングプラスミドの構築に関して説明されるものと同様の方法を使用して生成することができる、ということを理解できるであろう。

【０２４８】

出芽酵母菌株、例えば、系統１は、ヒト血清アルブミン又は適切なチオアルブミン発現プラスミドの発現のために、ｐＤＢ２２４４（WO00/44772）、又はｐＤＢ２３０５（WO/2006/013859）を有するロイシン原栄養性に形質転換されてよい。酵母は、修飾リチウムアセテート方法を使用して形質転換されてよい（Sigma yeast transformation kit, YEAST-1 , protocol 2; lto et al, 1983, J. Bacterid., 153, 16; EIbIe, 1992, Biotechniques, 13, 18）。形質転換体は、ＢＭＭＤ－寒天プレート上で選択されてよく、続いてＢＭＭＤ－寒天プレート上にパッチ状で適用されてよい。ＢＭＭＤ組成物は、Ｓｌｅｅｐ等，２００２，Ｙｅａｓｔ，１８，４０３によって説明される。凍結保存されたストックは、１０ｍＬのＢＭＭＤの振とうフラスコ培養から２０％（w/v）トレハロース中で調製されてよい（24時間、30℃，200rpm）。

【０２４９】

実施例２：ＨＳＡと比較して、単一アミノ酸変化を有するアルブミン変異タンパク質の発現

単一アミノ酸変化を有するチオアルブミン変異体は、表５Ａ、５Ｂ及び６Ａから選択される。これらの変異体は、上記で説明される方法に従って好適な変異として特定された。各変異体の詳細は、コンストラクトリファレンス（Construct Reference）（例えば、rHA A2CのためのTA1）、各チオアルブミン変異体発現コンストラクトをコードし且つギャップ修復によるインビボ（in vivo）での組換えに必要な配列に隣接しているプラスミドの名称、及び各チオアルブミン変異体を生成する凍結保存された酵母ストックに与えられる番号（酵母ストック番号）を供する図１１に示される。配列番号２と比較した変異体コドンの詳細はまた、チオアルブミン変異体（DNA及びタンパク質）に対する配列番号として供される。

【０２５０】

非ヒト血清アルブミン中でアミノ酸を修飾するために、ＨＡＳ中の特定の位置に対する等価な位置は、ヒト血清アルブミン（配列番号1）を含むアライメント、例えば図２及び３から決定されてよい。当業者であれば、アライメントを熟知しており、配列中のアミノ酸が他の配列のアミノ酸と等価か否かを容易に決定することができる。例えば、非ヒトアルブミン中のアミノ酸の位置は、ＨＡＳのＮ末端に対して必ずしも同一であることは必須でない。例えば、図２から、ＨＡＳの位置２３９はアラニン残基であり、一方ウシの配列の対応する残基はセリン－２３８である。同様に、ＨＡＳのバリン－４７９は、ヒツジアルブミンのロイシン－４７８に相当する。プラスミドｐＤＢ３９２７（図12）は、プラスミドｐＤＢ２２４４から構築された（図7, WO0044772A, 「FL」: 融合リーダー配列）。ｐＤＢ２２４４は、制限酵素Ｓｗａｌ及びＨｐａｌ（いずれも平滑末端を生じる）で消化し、ｐＤＢ３９２７を形成するために自己結合させた。プラスミドｐＤＢ３９６４を作出するために（図13）、以下に概略を説明するように、制限酵素部位は、タンパク質配列を修飾することなくｐＤＢ３９２７のアルブミンＤＮＡ配列（配列番号2）において修飾された。得られるＤＮＡ配列は、配列番号４である。

【０２５１】

１）導入された酵素部位：（括弧内の塩基対位置は、配列番号4における位置を意味する）配列番号４

【０２５２】

【化１】

	制限酵素部位	配列番号		配列番号４	位置
a	*Sac*II:	GAGTCAGCTGAAAA	→(へ)	GAGTCCGCGGAAAA	(bp 173-178)
b	*Nhe*I/*Bmt*I:	AAGGCTTCGTCTGC	→(へ)	AAGGCTAGCTCTGC	(bp 571-576)
c	*Xho*I:	TCTGCTTGAATGTGC	→(へ)	TCTGCTCGAGTGTGC	(bp 751-756)
d	*Bam*HI:	GTGGGCAGCAAAT	→(へ)	GTGGGATCCAAAT	(bp 751-756)
e	*Sal*I:	GGAAGTCGATGAAA	→(へ)	GGAAGTCGACGAAA	(bp 1477-1482)

【０２５３】

ｐＤＢ３９６４におけるＨＳＡのコード配列は、配列番号４として供される。ＤＮＡ合成及びクローン化は、ｐＤＢ３９２７からｐＤＢ３９６４を生じるために使用された（DNA2.0 Inc, USA）。合成ＤＮＡ断片は、ｐＤＢ３９６４のアルブミン遺伝子内で、又は修飾と組み合わせて特異的なアミノ酸コドンを変更するためにデザインされた（以下の実施例3を参照されたい）。これらの修飾を含むＤＮＡ断片を合成し（DNA 2.0 Inc, USA）、チオアルブミン配列を含むプラスミドを生成するためにｐＤＢ３９６４中にクローン化した（図11）。これらの合成遺伝子及び隣接領域は、各チオアルブミン変異体並びにコントロールｐＤＢ３９２７、ｐＤＢ３９６４及びｐＤＢ２２４４に関して生じるＤＮＡ断片の精製前に、図１１において命名されるプラスミドから制限酵素ＢｓｆＥＩＩ及びＢｓｒＢＩで切除した（PCR精製キット, Qiagen）。ＤＮＡ断片を、直線化したｐＤＢ３９３６を用いたインビボ（in vivo）でのギャップ修復を可能とするために、以下に説明する酵母形質転換手順で使用した。

【０２５４】

プラスミドｐＤＢ３８５３（図示なし）をベースベクターｐＤＢ２６９０（Ref DB88 / WO2005/061719A1）及び以下に説明する合成リンカーから構築した。合成リンカーは、９６℃～室温までの温度勾配（１℃あたり１分）を使用して蒸留水中で、アニール化された２つのオリゴヌクレオチドから構築した（Sigma-Genosys）。ｐＤＢ２６９０をＫｐｎｌ及びＮｏｔｌを使用して消化し、アニール化したリンカーの核酸連結前にゲル抽出（Qiagen）によって精製した：

【０２５５】

【化２】

'KpnI (リンカー) *BamHI NotI'*

5′ - CGCTAGCCTCGAGGTTTAAACGCTAGCGAGCTCGGATCC -3′

3′ - CATGGCGATCGGAGCTCCAAATTTGCGATCGCTCGAGCCTAGGCCGG -5′

【０２５６】

ｐＤＢ３８５３の構築に続いて、ｐＤＢ３９３６を形成するために、ゲル抽出されたＰｓｔｌ／Ｓｃａｌ ｃｕｔ ｐＳＡＣ３５プラスミド中への核酸連結前に、Ｐｓｔｌ及びＳｃａｌ（3787bp断片）を使用してリンカーを切除した（WO0044772A及びWO2005/061719A1

）（図14）。

【０２５７】

アガロースゲル電気泳動による分離に続く９７２１ｂｐ断片の精製の前に、制限酵素Ａｃｃ６５１及びＢａｍＨｌでｐＤＢ３９３６を直線化した。（以下に説明する）インビボ（in vivo）でのギャップ修復を可能にする酵母形質転換手順に関して、直線化したｐＤＢ３９３６及びチオアルブミンコード配列をコードする各ＢｓｒＢｌ－ＢｓｔＥｌｌ断片の濃度を計算し、各１００ｎｇを各酵母形質転換反応に使用した。

代替の発現宿主はまた適当であるにもかかわらず、出芽酵母系統ＢＸＰ１０を発現宿主として終始使用した（So-low, S. P., J. Sengbusch, et al. (2005). "Heterologous protein production from the inducible MET25 promoter in Saccharomyces cerevisiae." Biotechnol Prog 21 (2): 617-20.）。

【０２５８】

出芽酵母ＢＸＰ１０の凍結保存したストックを、同体積の４０％ ｗ／ｖの無菌トレハロース溶液で混合した１０ｍＬのＹＥＰＰＤ（1% w/v 酵母抽出物, 2% w/v 植物ペプトン, 2% w/vブドウ糖）振とうフラスコ培養（30℃, 200rpmで24時間培養させたもの）から調製し、そして－８０℃における保存のために１ｍＬアリコートに分注した。１０ｍＬ ＢＭＭＤ、ＹＥＰＰＤ及びＬＢ（1% w/v細菌用トリプトン, 0.5% w/v酵母抽出物, 0.5% w/v NaCl）振とうフラスコに１００μＬ凍結保存酵母ストックを播種し、純粋培養であることを確かめるために顕微鏡によって観察する前に、上記のように３０℃、２００ｒｐｍで４日間インキュベートした。

【０２５９】

ＯＤ６００＝０．３となるように３００ｍＬのＹＥＰＰＤを播種するための使用前に、３０℃、２００ｒｐｍで２日間インキュベートした１０ｍＬのＹＥＰＰＤ中に、１００μＬの凍結保存酵母ストックを播種することによって、凍結能力のある出芽酵母ＢＸＰ１０細胞を調製した。約４時間又はOD_{600}の値が倍増するまで、上記のように細胞をインキュベートした。更なる遠心分離段階が続く１２０ｍＬの蒸留水中での再懸濁の前に、遠心分離（3000×g、5分、室温）によって細胞を回収した。－８０℃におけるアリコート中での保存前に、ペレットを３ｍＬのＴＥ／ＬｉＡｃ（10mMトリス, 1mM EDTA, pH7; 500mMリチウムアセテート）中で再懸濁し、最終濃度１５％（v/v）までグリセロールを添加した。

【０２６０】

修飾リチウムアセテート方法を使用して、出芽酵母ＢＸＰ１０細胞をロイシン原栄養性へ形質転換した（EIbIe, R. "A simple and efficient procedure for transformation of yeasts." Biotechniques 13.1 (1992): 18-20. Ito, H., et al. "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." J. Bacterid. 153.1 (1983): 163-68.）。上記で説明したギャップ修復のためのＤＮＡ断片の付加前に、５０μｌの解凍した能力のある細胞を４８ウェルのマイクロタイタープレート（Nunc）中にアリコートした。実験台上で水平にしながら、プレートを回転することによってプレートを混ぜた。３００μｌのＰＥＧ／ＬｉＡｃ（40% w/v PEG 3350, 100mMリチウムアセテート）を各ウェルに添加し、そして再度混合した。４２℃で３０分間の静置培養へ移す前に、プレートを２００ｒｐｍでの１時間振とうしながら３０℃でインキュベートした。氷上での１分間の培養後、プレートを遠心分離し（2000×g、5分、室温）、続いて上澄みの除去及びペレットの２００μｌの１Ｍソルビトール中での再懸濁を行った。ＣＳＭ－Ｌｅｕで栄養補助したＢＭＭＤ寒天プレート上に全量を播種し（MP Biomedicals, Bio 101）、３０℃で４日間インキュベートした。

【０２６１】

単一コロニー形質転換体を採取し、短期間保存のために、新鮮なＢＭＭＤ寒天プレート上にパッチ状で適用した（patched）。これらのパッチを３０℃で再成長させ、細胞を１０ｍＬのＢＭＭＤの振とうフラスコ中に播種し、上記で説明したように凍結保存した。１０μｌの酵母ストックを、１ウェルあたり０．５ｍＬのＢＭＭＤを含む４８ウェルプレー

ト中に播種した。増殖条件下で～１００％湿度及び５日間で０．２５％以下の蒸発損失を供するために、湿らせたペーパータオルを含む密封したパースペクス（Perspex）箱である湿度室内で、マイクロタイタープレート中の培養物の成長を達成した。プレートを、振とう湿度室（30℃，200rpm）で５日間３０℃でインキュベートした。４８ウェルプレートをペレット細胞まで遠心分離し（2000×g，10分，室温）、上澄みを回収した。

【０２６２】

培養上澄み中のチオアルブミン変異体の濃度を、ゲル浸透高圧液体クロマトグラフィ（GP-HPLC）によって測定した。Ｓｈｉｍａｄｚｕ ＶＰ７．３クライアントサーバーソフトウェアコントロール下で、紫外線検出を備えたＬＣ２０１０ ＨＰＬＣシステム（Shimadzu）を使用して、タンパク質濃度を測定した。７．８ｍｍ内径×３００ｍｍ長のＴＳＫ ＧＳＷＸＬカラム（Tosoh Bioscience）上で、６．０ｍｍ内径×４０ｍｍ長のＴＳＫ ＳＷガードカラウム（Tosoh Bioscience）で２５μＬの注入を行った。試料を、１５分間のランタイムで１ｍＬ．ｍｉｎ$^{-1}$で、ｐＨ７．０の２５ｍＭリン酸ナトリウム、１００ｍＭ硫酸ナトリウム、０．０５％（ｗ／ｖ）アジ化ナトリウム中でクロマトグラフ分析した。試料を、既知濃度（10mg/mL）の組換え型ヒトアルブミン標準に対して、２８０ｎｍでの紫外線検出でピーク高さによって定量化した。

【０２６３】

図１５において、単一変異を伴う各チオアルブミン変異体に関する非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析及び（GP-HPLCによる）発現力価をコントロールと比較した。チオアルブミン変異体は全て、出芽酵母ＢＸＰ１０からの分泌に成功したことは明らかである。好適な変異は、高発現の力価を有し、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によるｒＨＡコントロールと等価なはっきりとしたクーマシー染色されたバンドを示す。

【０２６４】

実施例３：さらなるチオアルブミン変異体の発現

図１６は、２個以上の遊離チオール基を有するチオアルブミン変異体のさらなる選択を説明する。結合に利用可能である複数の遊離チオール基を有するようにデザインされた配列を生じるために、上記実施例２で発現されることが示された変異を併用した。この選択は、最大５つの遊離チオール基を有するようデザインされたチオアルブミン変異体、１つの選択グループ内又は１つ以上の選択グループ由来の遊離チオール基を有するようデザインされたチオアルブミン変異体、ＨＳＡのＣ３４に自然発生の遊離チオールを有する又は有しない遊離チオール基を有するようにデザインされたチオアルブミン変異体、近接グループ範囲から遊離チオール基を有するようにデザインされたチオアルブミン変異体、並びに挿入、延長、付加及び／又は欠失に由来する遊離チオール基を有するようにデザインされたチオアルブミン変異体を含む。これは複数の結合コンピテントシステイン残基を有するチオアルブミンのサブセットを表す。これらのチオアルブミン変異体の詳細、これらをコードするプラスミド及びこれらのＤＮＡ及びタンパク質配列に対する配列番号を、単一修飾を伴うチオアルブミン変異体に関する図１１と同様の方法で図１６に記載する。出芽酵母ＢＸＰ１０からのプラスミド構築及び発現のための方法は、上記で説明したものと同様である。

【０２６５】

図１７は、ｒＨＡコントロール（pDB3927コード配列）と比較したこれらのさらなるチオアルブミン変異体それぞれに関する非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析及び（GP-HPLCによる）発現力価を示す。また、全てのチオアルブミン変異体が出芽酵母ＢＸＰ１０から良好に分泌されていることは明らかである。従って、選択判定基準により適当なチオアルブミン変異体を生じることが可能であることが確認され、これにより好ましくないミスフォールディング又は凝集を伴う問題がないことが示される。重ねて、変異の好適な組合せは高発現力価を有し、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によってｒＨＡコントロールに等価な明確なクーマシー染色バンドを示す。

【０２６６】

実施例４：チオアルブミン変異体の産生、精製及び結合

１ｍＬアリコート中の５つの凍結保存酵母ストック（9116，9118，9124，9125及び9130；図11）をそれぞれ、１００ｍＬのＢＭＭＳ成長培地（アミノ酸及び$(NH_4)_2SO_4$を含まない酵母窒素塩基，Difco 1.7g/L；クエン酸一水和物6.09g/L；無水Na_2HPO_4 20.16g/L；$(NH_4)_2SO_4$ 5.0g/L；pH6.5±0.2；20g/Lまでショ糖添加）を含む振とうフラスコ中に播種する。発酵槽において細胞播種濃度が≧１０ｍｇ／Ｌ（10mg/L以上）を達成する振とうフラスコ中の細胞濃度が０．８～１．２ｇ／Ｌに達した場合に、振とうフラスコから発酵槽｛10Lの操作容積（working volume），Sartorius Biostat C 10-3 発酵槽｝へ細胞を移した。

【０２６７】

５つの酵母菌株の各々の純粋培養によって、チオアルブミン変異体タンパク質を高細胞密度（HCD）流加発酵（fed-batch fermentation）において生成した。発酵の目的は、供給速度付加を制御することによって、最大バイオマス及び生産性を達成することであり、これにより副生成物、例えばエタノールおよびアセテートの形成を回避した。発酵プロセスのさらなる詳細は、ＷＯ９６／３７５１５で説明される。温度及びｐＨは、それぞれ３０℃且つｐＨ５．５に制御した。培養物の上澄みをＳｏｒｖａｌｌ ＲＣ ３Ｃ遠心分離機（DuPont）を使用して遠心分離によって回収し、その後の精製で解凍する前に保存のために凍結した。最終産物濃度を、上記のＳｈｉｍａｄｚｕ ＶＰ７．３クライアントサーバーソフトウェアコントロール下で、紫外線検出を備えたＬＣ２０１０ ＨＰＬＣシステム（Shimadzu）を使用したＧＰ ＨＰＬＣによって測定した。図１８は、各チオアルブミン変異体の収量（g/L培養上澄み中）を供し、全ての場合において１ｇ／Ｌ以上の培養上澄みの高生成物力価が得られることを示す。

【０２６８】

質量分析に適当な物質を調製するために、一段階のクロマトグラフィ手順を使用した。この精製段階は、ＡｌｂｕＰｕｒｅ（登録商標）マトリックス（ProMetic BioSciences Ltd，Cambridge UK or Novozymes Biophama UK Ltd.）で充たされたカラム（総容積約200μL）を使用した。これは、５０ｍＭのナトリウムフォスフェート、ｐＨ５．３と平衡に達し、約ｐＨ５．５～６．５で、約４０ｍｇタンパク質／ｍＬマトリックスまで、純培養物の上澄みを入れた。５０ｍＭのナトリウムフォスフェート、ｐＨ５．３、及び５０ｍＭアンモニウムアセテート、ｐＨ８．０それぞれの約３カラム容積で、カラムを洗浄した。５０ｍＭアンモニウムアセテート、１０ｍＭオクタン酸塩、ｐＨ７．０の約５つのカラム容積を使用して、結合タンパク質を溶出させた。添加段階のための流量は１３７μＬ／分であり、一方洗浄及び溶出段階は、３００ｒｐｍでＨｅｒａｅｕｓ Ｍｕｌｔｉｆｕｇｅ３遠心分離機を使用して遠心力によって実行した。最終濃度は１．８～４．０ｍｇ／ｍＬの範囲であり、試料は体積約２ｍＬであった。遊離チオールの測定を、以下に説明する手順に従って試料溶出直後に実行した。

【０２６９】

タンパク質上の遊離チオールの数は、エルマン試薬を使用して分光光度法で測定することができる。エルマン試薬（5'5'-ジチオ-bis(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)）は、チオール基と反応し、（タンパク質スルフヒドリル基１モルあたり）タンパク質及び１モルの５－チオ－２－ニトロ安息香酸（TNB）の混合ジスルフィドを形成する芳香族ジスルフィドである。この反応はまた、溶液中で放出される遊離ＴＮＢから黄色を生じる。あるいは、タンパク質上の遊離チオールの数は、ＤＴＮＢ試薬で処理されたタンパク質試料の質量分析を使用して測定することができる。５－チオ－２－ニトロ安息香酸（TNB）は、分子量１９９Ｄａを有し、従って１９７Ｄａ（テストタンパク質上の遊離チオール基とのジスルフィド結合形成中のTNBからのH_2の損失）の質量における増加は、タンパク質試料上の１つの遊離チオール基の存在を示す。

【０２７０】

７００μＬのテストタンパク質試料を、１００μｌのバッファー２（4mg/mL DTNB及び500mMナトリウムフォスフェート，pH 7.0）及び９００μＬのバッファー１（0.1Mトリス-HCl，100mM EDTA，pH8.0）に添加した。調製は外気温（21～25℃）で２５分間混合することができ、その後に低分子量カットオフフィルター（cut-off filter）（Vivaspin 2-100

00 MWCO Sartorius Stedim Germany）を介して濾過を行った。フィルターを２倍量の０．１％トリフルオロ酢酸（TFA）で洗浄し、試料を１ｍｌの０．１％ＴＦＡ中で再懸濁した。ＴＮＢ標識した又は標識していない試料を、固相抽出（SPE）を使用した脱塩／濃縮によって質量分析のために調製した。まず１ｍＬの７０％アセトニトリル（ACN Fisher）／０．１％ＴＦＡでの湿潤、続いて０．１％ＴＦＡの添加に対応した平衡化により、ＳＰＥカラムを調製した。タンパク質が結合する時間を考慮して、平衡化したＳＰＥカラム上で、１ｍＬの試料を添加した。続いて、結合タンパク質及びＳＰＥカラムを１ｍＬの０．１％ギ酸（Merck）中で３回洗浄した。最終的に、結合タンパク質を、０．５ｍＬの７０％ＡＣＮ／０．１％ＦＡで予洗した１ｍＬのマイクロチューブ中に溶出させた。

【０２７１】

飛行時間型質量分析に関して、３０μＬの試料を、フローインジェクション分析法（FIA）を使用して、陽イオンモードのイオンスプレーＴＭ源を備えたハイブリッド四極子飛行時間型質量分析計（QqOaTOF, Applied Biosystems, QSTAR-XL(R)）に導入した。盛んに調整される機器パラメーターだけが、脱共役電位（decoupling potential）（DP）であり、典型的には２５０Ｖにセットされる。典型的には、２分間の試料スキャンが平均である。タンパク質分析に関して、ＴＯＦ分析をウマミオグロビン（Sigma）のプロント化分子イオンに対して較正し、解像度は典型的には＞１４，０００である。機器コントロール及びデータ収集及びプロセシングを、ＡｎａｌｙｓｔＴＭ ＱＳ ｖ１．１ソフトウェア（Applied Biosystems）を使用して実行した。

【０２７２】

精製されたチオアルブミン試料の上記分析の結果を、以下に説明する。ＤＴＮＢの付加において、全試料は、多数の遊離チオールの存在に起因して予想通り急速に黄色に調整された。１つの遊離チオールを含む、ｒＨＡの等価な試料と当該試料を視覚的に比較した場合、チオアルブミン試料に関して観察される色調変化は、顕著により強く、各チオアルブミン分子上の複数の遊離チオールの存在を示している。結果は、色の強さの増加に伴って「＋」の数が増加する図１８に要約する。

【０２７３】

高発酵収量で生成されるチオアルブミン変異体は、上記の質量分析方法による分析に好適であった。従って、組換え型タンパク質ｒＨＡ（A2C, L585C）（３つの遊離チオールの総数）、ｒＨＡ（D129C, C360S, L585C）（４つの遊離チオールの総数）、及びＡ２Ｃ ｒＨＡ－Ｃｙｓ（３つの遊離チオールの総数）を、各分子上に存在する遊離チオールの数を測定するためのＥＳＩ ＴＯＦ（電気スプレーイオン化飛行時間型）質量の分析によってＤＴＮＢ処理前又は後に分析した。

【０２７４】

ＤＴＮＢ処理前にｒＨＡ（A2C, L585C）を分析した場合（図19）、観察された主要なデコンボリューション（deconvoluted）ピークは、期待質量の６６４６１Ｄａ以上の、１７２Ｄａ及び３４６Ｄａに相当する６６６３３Ｄａ及び６６８０７Ｄａに存在した。ｒＨＡ（A2C, L585C）中の遊離チオールに架橋形成する培養基に存在する～１７２Ｄａのこれらの修飾は、種が原因の可能性がある。ＤＴＮＢ処理後の質量分析（図20）は、３つの遊離チオールを有するタンパク質に対する期待質量以上の、３７６Ｄａに相当する６７４２８Ｄａに主要なデコンボリューションピークを生じる結果となった。この過度の質量は、遊離チオール及びさらなる１７９Ｄａに結合された過度のＴＮＢに起因する可能性が最も高く、これは４つの遊離チオール及び～１７９Ｄａの種でブロックされたさらなるチオールの存在を強く示唆する。それ故、結合に対して利用可能である期待数以上の反応基を供する点において、ｒＨＡ（A2C, L558C）チオアルブミン変異体は特に驚きである。また、標識されたｒＨＡ（A2C, L558C）分子とのＤＴＮＢ付加物形成を生じるイオン化時点においてまだ存在する、過度のＤＴＮＢに起因する～３９６Ｄａ離れた一連のピークが存在する。この付加物形成は、過度のＤＴＮＢの存在下で生じることが周知である。

【０２７５】

ｒＨＡ（D129C, C360S, L585C）（総数4個の遊離チオール）をＤＴＮＢ処理の前に分析

した場合（図21）、観察された主要なデコンボリューションピークは、期待質量６６４０３Ｄａ以上の６６５７５Ｄａ及び６６７４７Ｄａに存在し、これらは１７２Ｄａ及び３４４Ｄａに相当する。これらの変化は、ｒＨＡ（D129C，C360S，L585C）中の遊離チオールに架橋形成した培養基に存在する、～１７２Ｄａの分子に起因した可能性がある。ＤＴＮＢ処理後の質量分析（図22）は、４つの遊離チオールを有するタンパク質に対する期待質量以上の、３７３Ｄａに相当する６７５６４Ｄａに主要なデコンボリューションピークを有する結果となった。この過度の質量は、遊離チオール及び更なる１７６Ｄａに結合された過度のＴＮＢに起因している可能性が最も高く、これは５個の遊離チオール及び～１７６Ｄａの種でブロックされた潜在的な更なるチオールの存在を強く示唆する。従って、ｒＨＡ（D129C，C360S，L585C）チオアルブミン変異体は、結合に利用可能である期待数以上のグループを供しているという点において特に意外である。また、標識されたｒＨＡＤ１２９Ｃ、Ｃ３６０Ｓ、Ｌ５８５Ｃを有するＤＴＮＢ付加物形成を生じているイオン化時点においてまだ存在する、過度のＤＴＮＢに起因する～３９６Ｄａ離れた一連のピークが存在する。この付加物形成は、過度のＤＴＮＢの存在下で生じることが分かっている。

【０２７６】

最後に、ＤＴＮＢ処理前にＡ２Ｃ　ｒＨＡ－Ｃｙｓ（合計3個の遊離チオール）を分析した場合（図23）、観察された主要なデコンボリューションピークは、期待質量６６５７４Ｄａ以上の、１７２Ｄａと３４４Ｄａに相当する６６７４７Ｄａ及び６６９１９Ｄａに存在した。しかしながら、６６５７５Ｄａにおいて未変化の期待質量に相当するより小さなピークもまた存在した。この質量分析スペクトルは、期待される３個の遊離チオールを含む分子が一部存在する一方で、一部の遊離チオールのブロックを示す。ＤＴＮＢ処理後の質量分析（図24）は、３個のＴＮＢ分子で標識された６７１６５Ｄａのタンパク質の期待質量よりも２３Ｄａ小さい６７１４２Ｄａに、主要なデコンボリューションピークを有するという結果となり、これは２つのＴＮＢ分子の存在及び１７５Ｄａの変化に起因した可能性が高く、３個のチオールの存在を示唆しており、１つは未知の～１７５Ｄａ種によってブロックされた。しかしながら、図２４をより詳細に検討してみると、各種より２３Ｄａ高い第２のピークの存在を確認することができる。これらの第二のピークは、３個のＴＮＢ分子で変化される分子の存在を示す可能性がある生データ（図示のないデータ）中の小さなショルダーに相当し、３個の遊離チオールを示す。存在する他の主要な種は、標識されたｒＨＡ　Ｄ１２９Ｃ、Ｃ３６０Ｓ、Ｌ５８５ＣとのＤＴＮＢ付加物形成を生じているイオン化時においてまだ存在する過度のＤＴＮＢに起因する。この付加物形成は、過度のＤＴＮＢの存在下に生じることが知られる。

【０２７７】

つまり、様々なチオアルブミン変異体は、３個又はそれ以上の結合コンピテントシステイン残基と共に生成されている。結合コンピテントシステインは、二次構造を有する若しくは有しない、及び／又は天然のジスルフィド結合から生じる若しくは生じない、並びに／或いはさらなるシステイン残基（例えば、天然のＨＳＡのＣ末端から伸展しているシステイン残基）である若しくはこれらのシステイン残基でない領域に存在し得る。

【０２７８】

実施例５：チオアルブミン変異体由来のゲル構造

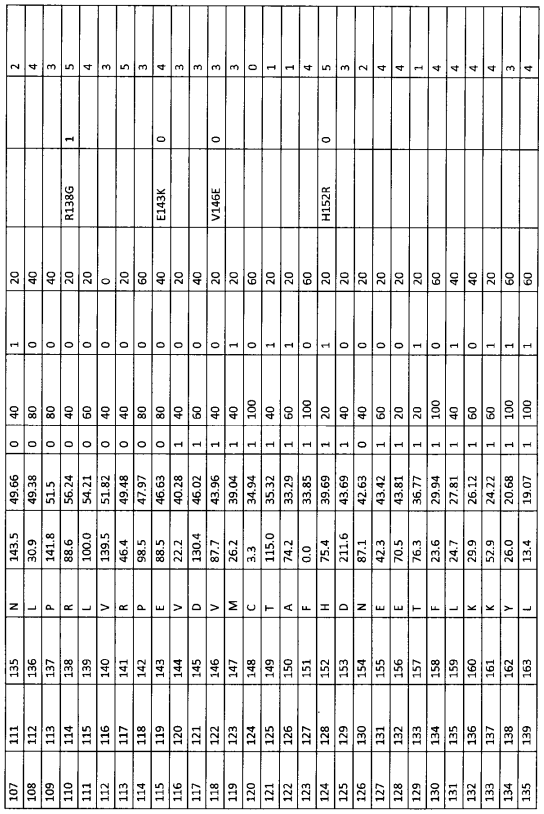
ＴＡ３５（すなわち、自然に生じているC34に加えてA2C，A364，D562）とＴＡ３３（すなわち、自然に生じているC34に加えてA2C，L585C）の試料を２４時間室温でインキュベートし、どちらもゲルを形成した。

【図１－１】

Figure 1

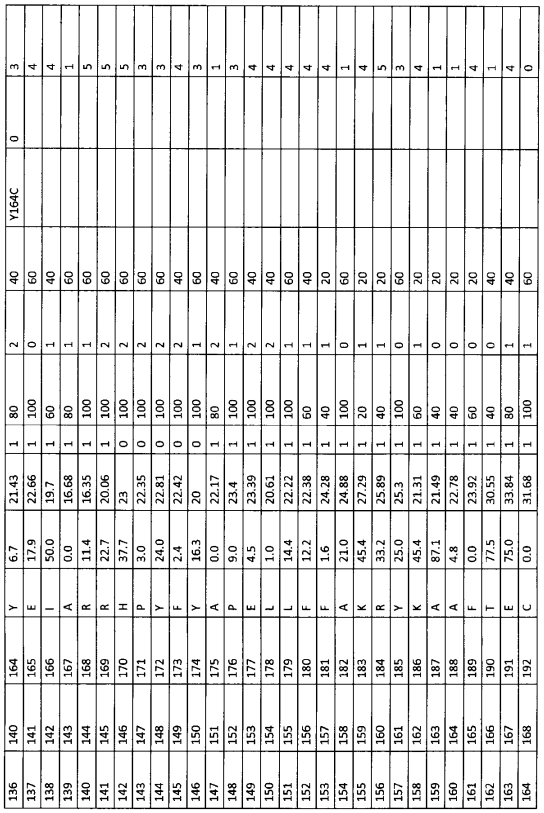
| | | |

【図１－５】



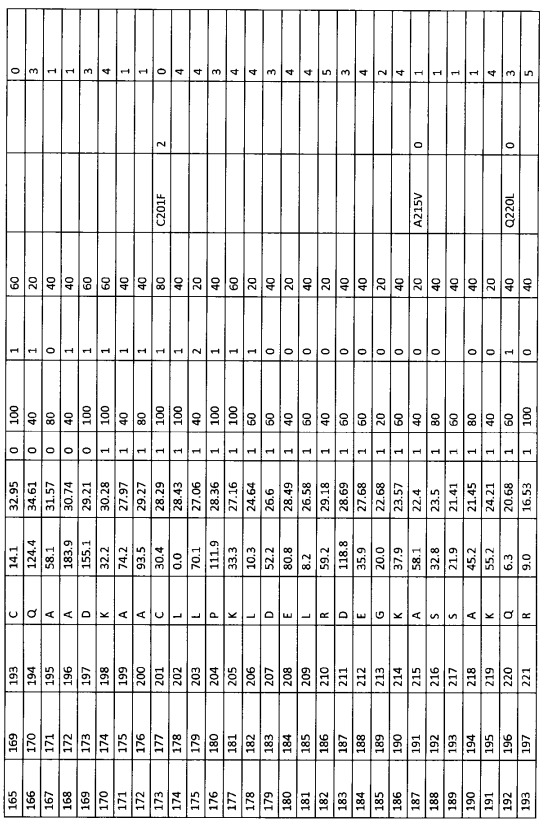
107	111	135	N	143.5	49.66	0	40	1	20																						2
108	112	136	L	30.9	49.38	0	80	0	40																						4
109	113	137	P	141.8	51.5	0	80	0	40																						3
110	114	138	R	88.6	56.24	0	40	0	20	R138G	1	5																			
111	115	139	L	100.0	54.21	0	60	0	20																						4
112	116	140	V	139.5	51.82	0	40	0	0																						3
113	117	141	R	46.4	49.48	0	40	0	20																						5
114	118	142	P	98.5	47.97	0	80	0	60																						3
115	119	143	E	88.5	46.63	0	80	0	40	E143K	0	4																			
116	120	144	V	22.2	40.28	1	40	0	20			3																			
117	121	145	D	130.4	46.02	1	60	0	40																						3
118	122	146	V	87.7	43.96	1	40	0	20	V146E	0	3																			
119	123	147	M	26.2	39.04	1	40	1	20			3																			
120	124	148	C	3.3	34.94	1	100	0	60			0																			
121	125	149	T	115.0	35.32	1	40	1	20			1																			
122	126	150	A	74.2	33.29	1	60	1	20			1																			
123	127	151	F	0.0	33.85	1	100	0	60			4																			
124	128	152	H	75.4	39.69	1	20	1	20	H152R	0	5																			
125	129	153	D	211.6	43.69	1	40	0	20			3																			
126	130	154	N	87.1	42.63	0	40	0	20			2																			
127	131	155	E	42.3	43.42	1	60	0	20			4																			
128	132	156	E	70.5	43.81	1	20	0	20			4																			
129	133	157	T	76.3	36.77	1	20	1	20			1																			
130	134	158	F	23.6	29.94	1	100	0	60			4																			
131	135	159	L	24.7	27.81	1	40	1	40			4																			
132	136	160	K	29.9	26.12	1	60	0	40			4																			
133	137	161	K	52.9	24.22	1	60	1	20			4																			
134	138	162	Y	26.0	20.68	1	100	1	60			3																			
135	139	163	L	13.4	19.07	1	100	1	60			4																			

【図１－６】



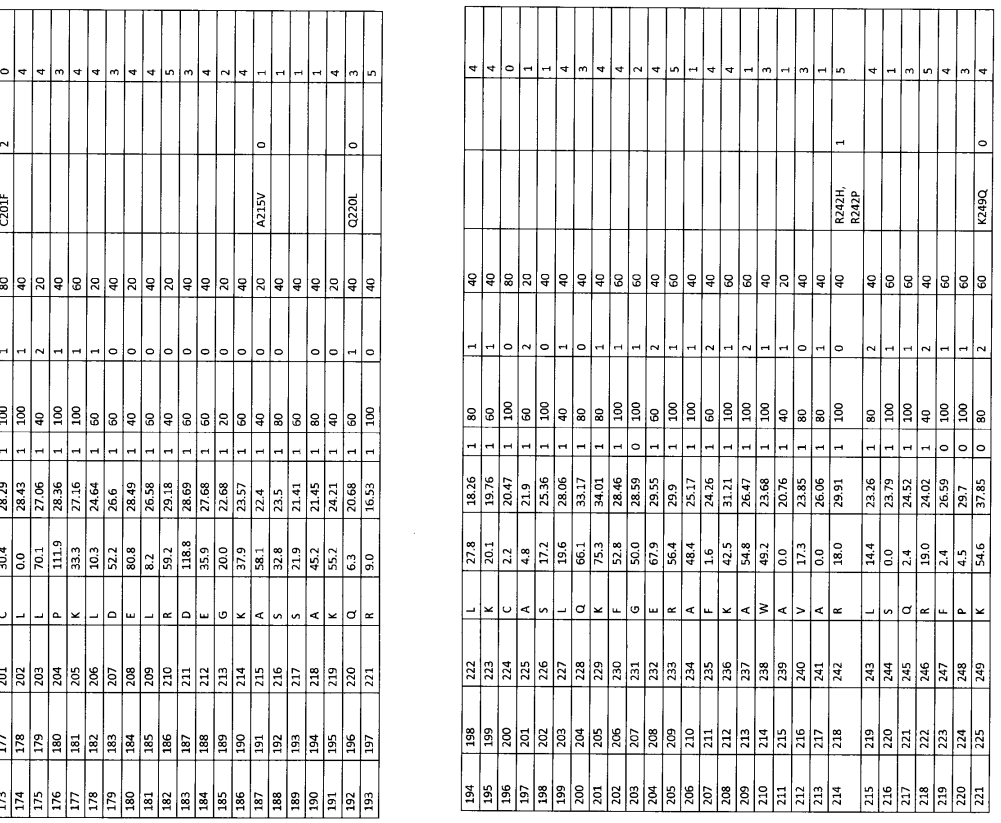
136	140	164	Y	6.7	21.43	1	80	2	40	Y164C	0	3																			
137	141	165	E	17.9	22.66	1	100	0	60			4																			
138	142	166	I	50.0	19.7	1	60	1	40			4																			
139	143	167	A	0.0	16.68	1	80	1	60			1																			
140	144	168	R	11.4	16.35	1	100	1	60			5																			
141	145	169	R	22.7	20.06	1	100	2	60			5																			
142	146	170	H	37.7	23	0	100	2	60			5																			
143	147	171	P	3.0	22.35	0	100	2	60			3																			
144	148	172	Y	24.0	22.81	0	100	2	60			3																			
145	149	173	F	2.4	22.42	0	100	2	40			4																			
146	150	174	Y	16.3	20	0	100	1	60			3																			
147	151	175	A	0.0	22.17	1	80	2	40			1																			
148	152	176	P	9.0	23.4	1	100	1	60			3																			
149	153	177	E	4.5	23.39	1	100	2	40			4																			
150	154	178	L	1.0	20.61	1	100	2	40			4																			
151	155	179	L	14.4	22.22	1	100	1	60			4																			
152	156	180	F	12.2	22.38	1	60	1	40			4																			
153	157	181	F	1.6	24.28	1	40	1	20			4																			
154	158	182	A	21.0	24.88	1	100	0	60			1																			
155	159	183	K	45.4	27.29	1	20	1	20			3																			
156	160	184	R	33.2	25.89	1	40	1	20			4																			
157	161	185	Y	25.0	25.3	1	100	0	60			5																			
158	162	186	K	45.4	21.31	1	60	1	20			3																			
159	163	187	A	87.1	21.49	1	40	0	20			4																			
160	164	188	A	4.8	22.78	1	40	0	20			1																			
161	165	189	F	0.0	23.92	1	60	0	20			4																			
162	166	190	T	77.5	30.55	1	40	0	40			1																			
163	167	191	E	75.0	33.84	1	80	1	40			4																			
164	168	192	C	0.0	31.68	1	100	1	60			0																			

【図１－７】



165	169	193	C	14.1	32.95	0	100	1	60																						0
166	170	194	Q	124.4	34.61	0	40	1	20																						3
167	171	195	A	58.1	31.57	0	80	0	40																						1
168	172	196	A	183.9	30.74	0	40	1	40																						1
169	173	197	D	155.1	29.21	0	100	1	60																						3
170	174	198	K	32.2	30.28	1	100	1	60																						4
171	175	199	A	74.2	27.97	1	40	1	40																						1
172	176	200	A	93.5	29.27	1	80	1	40																						1
173	177	201	C	30.4	28.29	1	100	1	80	C201F	2	0																			
174	178	202	L	0.0	28.43	1	100	1	40			4																			
175	179	203	L	70.1	27.06	1	40	2	20			4																			
176	180	204	P	111.9	28.36	1	100	1	40			3																			
177	181	205	K	33.3	27.16	1	100	1	60			4																			
178	182	206	L	10.3	24.64	1	60	1	20			4																			
179	183	207	D	52.2	26.6	1	60	0	40			3																			
180	184	208	E	80.8	28.49	1	40	0	20			4																			
181	185	209	L	8.2	26.58	1	60	0	40			4																			
182	186	210	R	59.2	29.18	1	40	0	20			5																			
183	187	211	D	118.8	28.69	1	60	0	40			3																			
184	188	212	E	35.9	27.68	1	60	0	40			4																			
185	189	213	G	20.0	22.68	1	20	0	20			2																			
186	190	214	K	37.9	23.57	1	60	0	40			4																			
187	191	215	A	58.1	22.4	1	40	0	20	A215V	0	1																			
188	192	216	S	32.8	23.5	1	80	0	40			1																			
189	193	217	S	21.9	21.41	1	60		40			1																			
190	194	218	A	45.2	21.45	1	80	0	40			1																			
191	195	219	K	55.2	24.21	1	40	0	20			4																			
192	196	220	Q	6.3	20.68	1	60	1	40	Q220L	0	3																			
193	197	221	R	9.0	16.53	1	100	0	40			5																			

【図１－８】



194	198	222	L	27.8	18.26	1	80	1	40																						4
195	199	223	K	20.1	19.76	1	60	1	40																						4
196	200	224	C	2.2	20.47	1	100	0	80																						0
197	201	225	A	4.8	21.9	1	60	2	20																						1
198	202	226	S	17.2	25.36	1	100	0	40																						1
199	203	227	L	19.6	28.06	1	40	1	40																						4
200	204	228	Q	66.1	33.17	1	80	0	40																						3
201	205	229	K	75.3	34.01	1	80	1	40																						4
202	206	230	F	52.8	28.46	1	100	1	60																						4
203	207	231	G	50.0	28.59	0	100	1	60																						2
204	208	232	E	67.9	29.55	1	60	2	40																						4
205	209	233	R	56.4	29.9	1	100	1	60																						5
206	210	234	A	48.4	25.17	1	100	1	40																						1
207	211	235	F	1.6	24.26	1	60	2	40																						4
208	212	236	K	42.5	31.21	1	100	1	60																						4
209	213	237	A	54.8	26.47	1	100	2	60																						1
210	214	238	W	49.2	23.68	1	100	1	40																						3
211	215	239	A	0.0	20.76	1	40	1	20																						1
212	216	240	V	17.3	23.85	1	80	0	40																						3
213	217	241	A	0.0	26.06	1	80	1	40																						1
214	218	242	R	18.0	29.91	1	100	0	40	R242H, R242P	1	5																			
215	219	243	L	14.4	23.26	1	80	2	40																						4
216	220	244	S	0.0	23.79	1	100	1	60																						1
217	221	245	Q	2.4	24.52	1	100	1	60																						3
218	222	246	R	19.0	24.02	1	40	2	40																						5
219	223	247	F	2.4	26.59	0	100	1	60																						4
220	224	248	P	4.5	29.7	0	100	1	60																						3
221	225	249	K	54.6	37.85	0	80	2	60	K249Q	0	4																			

【図１－９】

222	226	250	A	1.6	35.15	0	100	0	60															1
223	227	251	E	89.7	38.91	0	40	2	20															4
224	228	252	F	30.9	37.46	1	100	0	60															4
225	229	253	A	109.7	36.47	1	60	1	40															1
226	230	254	E	17.3	32.11	1	80	0	40															4
227	231	255	V	0.0	29.49	1	40	0	20															3
228	232	256	S	54.7	29.63	1	60	0	20															1
229	233	257	K	43.7	28.65	1	80	0	60															4
230	234	258	L	3.1	32.28	1	40	0	20															4
231	235	259	V	6.2	29.28	1	80	1	40															3
232	236	260	T	92.5	29.1	1	100	0	40															1
233	237	261	D	62.3	28.36	1	80	1	40															3
234	238	262	L	30.9	23.28	1	80	0	40															4
235	239	263	T	6.3	24.55	1	80	1	40															1
236	240	264	K	63.8	24.54	1	100	0	40	K264E	0	4												
237	241	265	V	1.2	23.3	1	80	1	40															3
238	242	266	H	3.1	20.96	1	60	0	40															5
239	243	267	T	66.3	21.82	1	60	1	40															1
240	244	268	E	17.9	24.56	1	100	1	60															4
241	245	269	C	10.9	22.73	1	100	2	60															0
242	246	270	C	3.3	20.77	1	100	2	80															0
243	247	271	H	53.8	25.67	0	100	2	40															5
244	248	272	G	16.0	19.18	0	100	2	80															2
245	249	273	D	37.7	18.57	0	100	2	60															3
246	250	274	L	5.2	18.31	1	100	2	40															4
247	251	275	L	3.1	16.12	1	100	2	40															4
248	252	276	E	17.3	19.95	1	100	2	60															4
249	253	277	C	0.0	19.89	1	100	2	60															0
250	254	278	A	21.0	20.33	1	100	2	40															1

【図１－１０】

251	255	279	D	10.1	21.47	1	100	2	40															3
252	256	280	D	47.8	23.25	1	100	2	60															3
253	257	281	R	9.0	26.57	1	100	1	60															5
254	258	282	A	38.7	25.99	1	80	1	40															1
255	259	283	D	123.2	23.81	1	60	1	20															3
256	260	284	L	17.5	21.77	1	100	0	60															4
257	261	285	A	8.1	27.58	1	80	2	40															1
258	262	286	K	64.4	31.33	1	100	1	40															4
259	263	287	Y	51.0	30.7	1	100	1	60															3
260	264	288	I	14.3	32.27	1	40	2	20															4
261	265	289	C	18.5	38.84	1	100	0	80															0
262	266	290	E	83.3	41.21	1	80	1	40															4
263	267	291	N	54.1	36.4	0	60	1	20															2
264	268	292	Q	32.3	37.75	1	100	0	60	Q292R	0	3												
265	269	293	D	229.0	45.46	1	60	1	60	D293G	1	3												
266	270	294	S	114.1	43.53	1	40	0	20															1
267	271	295	I	2.4	35.55	1	80	1	40															4
268	272	296	S	7.8	36.26	0	100	0	60															1
269	273	297	S	112.5	40.24	0	60	1	40															1
270	274	298	K	23.6	38.39	0	80	1	60															4
271	275	299	L	0.0	37.35	0	100	0	80															4
272	276	300	K	64.9	45.27	0	80	1	40	K300N	1	4												
273	277	301	E	79.5	46.31	0	60	1	20															4
274	278	302	C	1.1	40.66	0	100	1	80															0
275	279	303	C	20.7	40.94	0	100	1	80															0
276	280	304	E	99.4	44.93	0	60	2	40															4
277	281	305	K	59.2	41.28	0	100	0	60															4
278	282	306	P	116.4	40.02	0	80	1	60															3
279	283	307	L	87.6	36.51	1	40	1	20															4

【図１－１１】

280	284	308	L	22.7	33.27	1	100	0	60															4
281	285	309	E	32.7	32.98	1	60	2	40															4
282	286	310	K	26.4	30.79	1	100	0	40															4
283	287	311	S	12.5	31.54	1	80	1	40															1
284	288	312	H	27.7	33.63	1	80	1	40															5
285	289	313	C	22.8	34.65	1	100	0	80															0
286	290	314	I	14.3	34.3	1	60	1	40															4
287	291	315	A	53.2	35.49	1	60	0	40															1
288	292	316	E	58.3	40.82	0	80	0	40															4
289	293	317	V	32.1	40.52	0	60	0	40															3
290	294	318	E	89.1	40.97	0	40	0	40															4
291	295	319	N	65.9	40.65	0	20	1	20															2
292	296	320	D	15.9	44.56	0	100	0	60															3
293	297	321	E	80.8	49.85	0	40	1	20															4
294	298	322	M	84.5	53.49	0	20	1	20															3
295	299	323	P	44.8	59.14	0	100	0	60															3
296	300	324	A	180.6	63.75	0	40	1	40															1
297	301	325	D	218.8	64.56	0	60	1	40															3
298	302	326	L	44.3	61.34	0	100	0	60															4
299	303	327	P	119.4	59.59	0	80	1	60															3
300	304	328	S	134.4	57.01	0	20	0	20															1
301	305	329	L	13.4	53.51	0	80	0	40															4
302	306	330	A	33.9	49.21	1	60	0	20															1
303	307	331	A	67.7	48.5	1	60	0	40															1
304	308	332	D	131.9	47.92	1	80	0	40															3
305	309	333	F	10.6	43.2	1	80	0	40															4
306	310	334	V	25.9	50.47	0	60	1	40															3
307	311	335	E	92.9	55.73	0	100	0	60															4
308	312	336	S	75.0	57.48	0	60	1	40															1

【図１－１２】

309	313	337	K	92.0	64.18	0	80	0	40	K337N	1	4												
310	314	338	D	131.9	65.86	0	40	0	40	D338G, D338V	1	3												
311	315	339	V	2.5	62.66	1	80	1	60															3
312	316	340	C	23.9	62.19	1	100	1	80															0
313	317	341	K	79.3	62.49	1	100	1	60															4
314	318	342	N	107.1	59.91	1	80	1	40	N342K	0	2												
315	319	343	Y	13.5	58.72	1	80	0	60															3
316	320	344	A	119.4	64	1	40	0	20	A344T	1	1												
317	321	345	E	88.5	67.18	1	80	1	40	E345K	0	4												
318	322	346	A	75.8	66.17	0	100	1	40															1
319	323	347	K	52.9	62.98	1	100	1	60															4
320	324	348	D	120.3	58.69	1	80	1	60															3
321	325	349	V	100.0	50.37	1	80	1	40															3
322	326	350	F	8.1	44.71	1	100	1	60															4
323	327	351	L	18.6	42.37	1	100	2	60															4
324	328	352	G	30.0	38.93	1	100	1	60															2
325	329	353	M	65.0	37.18	1	40	2	20															3
326	330	354	F	0.8	29.72	1	100	1	60															4
327	331	355	L	8.2	29.23	1	100	2	60															4
328	332	356	Y	13.5	30.36	1	100	2	60															3
329	333	357	E	23.7	29.68	1	100	2	60	E357K	0	4												
330	334	358	Y	14.4	32.04	1	100	1	60															3
331	335	359	A	0.0	31.27	1	60	2	60															1
332	336	360	R	8.5	31.88	1	100	1	60															5
333	337	361	R	16.6	33.45	0	100	2	60															5
334	338	362	H	33.1	32.11	0	100	2	60															5
335	339	363	P	62.7	28.98	0	100	1	60															3
336	340	364	D	84.1	24.21	0	40	2	40															3

【図１－１３】

337	341	365	Y	24.0	20.57	0	100	0	40				3
338	342	366	S	0.0	20.06	0	80	1	60				1
339	343	367	V	2.5	23.25	1	80	0	40				3
340	344	368	V	14.8	24.72	1	60	0	20				3
341	345	369	L	0.0	25.04	1	60	1	40				4
342	346	370	L	0.0	25.17	1	100	1	60				4
343	347	371	L	16.5	25.68	1	100	2	60				4
344	348	372	R	3.3	24.63	1	100	1	60				5
345	349	373	L	0.0	26.75	1	60	1	40				4
346	350	374	A	27.4	27.71	1	80	1	60				1
347	351	375	K	60.3	33.28	1	100	0	60				4
348	352	376	T	33.8	31.6	1	20	2	20				1
349	353	377	Y	0.0	34.39	1	100	1	60				3
350	354	378	E	13.5	35.62	1	100	1	60	E378K	0	4	
351	355	379	T	86.3	40.3	1	80	1	40				1
352	356	380	T	15.0	45.68	1	80	1	40				1
353	357	381	L	0.0	49.17	1	100	0	80				4
354	358	382	E	66.0	53.47	1	80	1	60	E382K	0	4	
355	359	383	K	91.4	55.14	1	60	1	40	K383N	2	4	
356	360	384	C	2.2	60.95	1	100	1	80			0	
357	361	385	C	42.4	66.33	0	100	2	80				0
358	362	386	A	140.3	72.72	0	100	1	60				1
359	363	387	A	75.8	76.03	0	20	1	20				1
360	364	388	A	164.5	80.24	0	40	0	20				4
361	365	389	D	168.1	84.23	0	80	1	40	D389H, D389V	1	3	
362	366	390	P	35.8	82.14	1	100	0	60				3
363	367	391	H	65.4	80.75	1	40	1	20				5
364	368	392	E	109.6	77.34	1	60	1	20				4

【図１－１４】

365	369	393	C	48.9	69.93	1	100	1	80				0
366	370	394	Y	1.9	65.2	0	100	1	60				3
367	371	395	A	100.0	63.92	0	60	1	40				1
368	372	396	K	73.0	64	0	40	1	20	K396E	0	4	
369	373	397	V	0.0	58.46	1	100	0	40				3
370	374	398	F	51.2	53.71	1	60	1	40				4
371	375	399	D	152.2	50.78	1	80	0	40	D399N, D399H	0	3	
372	376	400	E	66.0	44.4	1	60	0	20	E400K, E400Q	0	4	
373	377	401	F	2.4	39.67	0	60	0	40				4
374	378	402	K	72.4	36.35	1	40	0	20				4
375	379	403	P	119.4	32.33	1	80	1	40				3
376	380	404	L	50.5	32.53	1	100	0	40				4
377	381	405	V	17.3	36.18	1	80	1	40				3
378	382	406	E	61.5	39.76	1	40	1	20	E406K	0	4	
379	383	407	E	49.4	39.21	1	100	1	60				4
380	384	408	P	0.0	36.35	1	100	1	40				3
381	385	409	Q	68.5	41.13	1	40	1	20				3
382	386	410	N	94.1	42.58	1	80	1	40				2
383	387	411	L	21.6	44.35	1	100	0	60				4
384	388	412	I	11.9	45.79	1	60	1	40				4
385	389	413	K	69.5	50.24	1	80	0	60				4
386	390	414	Q	96.9	52.9	1	40	1	20				3
387	391	415	N	22.4	52.97	1	100	1	60				2
388	392	416	C	3.3	52.58	1	100	1	80				0
389	393	417	F	71.2	57.82	1	60	1	40				4
390	394	418	L	52.6	55.99	1	80	0	40				4
391	395	419	F	30.1	58.68	1	60	0	40				4

【図１－１５】

392	396	420	E	85.9	62.51	1	80	0	40	E420K	0		4
393	397	421	Q	101.6	58.94	1	40	0	20				3
394	398	422	L	21.6	53.27	1	60	1	40				4
395	399	423	G	62.0	50.77	0	100	0	60				2
396	400	424	E	51.9	50.07	1	80	2	40				4
397	401	425	Y	53.8	50.48	1	100	0	60				3
398	402	426	K	66.7	46.35	1	40	2	20				4
399	403	427	F	0.8	40.68	1	100	1	60				4
400	404	428	Q	0.8	37.32	1	100	2	40				3
401	405	429	N	21.2	34.37	1	100	2	60				2
402	406	430	A	54.8	29.99	1	100	1	40				1
403	407	431	L	8.2	28.56	1	80	1	60				4
404	408	432	L	0.0	32.59	1	40	1	40				4
405	409	433	V	34.6	36.52	1	100	1	60				3
406	410	434	R	31.8	38.85	1	100	2	60	R434C	1	5	
407	411	435	Y	15.4	32.48	1	100	2	80				3
408	412	436	T	0.0	29.54	1	100	1	60				1
409	413	437	K	27.6	33.11	1	60	1	40				4
410	414	438	K	6.3	32.07	1	100	0	60				4
411	415	439	V	0.0	28.94	0	40	2	20				3
412	416	440	P	7.5	31.07	0	100	1	80				3
413	417	441	Q	45.7	31.05	0	100	2	60				3
414	418	442	V	3.7	28.94	0	100	2	60				3
415	419	443	S	98.4	27.89	0	100	2	60				1
416	420	444	T	13.8	27.97	1	100	2	40				1
417	421	445	P	132.8	24.74	1	100	2	40				3
418	422	446	T	18.8	25.07	1	100	2	60				1
419	423	447	L	3.1	24.57	1	100	2	60				4
420	424	448	V	6.2	25.83	1	100	2	60				3

【図１－１６】

421	425	449	E	48.1	30.55	1	100	1	60				4
422	426	450	V	3.7	28	1	40	1	20				3
423	427	451	S	1.6	31.38	1	40	1	20				1
424	428	452	R	18.0	30.58	1	100	0	40				5
425	429	453	N	22.4	29.18	1	20	2	20				2
426	430	454	L	7.2	31.68	1	100	1	40				4
427	431	455	G	0.0	35.59	1	100	1	40				2
428	432	456	K	27.6	36.58	0	60	2	40				4
429	433	457	V	17.3	37.59	0	100	1	60				3
430	434	458	G	4.0	40.74	1	100	1	60				2
431	435	459	S	73.4	41.51	1	40	1	20				1
432	436	460	K	58.0	40.92	1	60	1	40				4
433	437	461	C	2.2	41.74	1	100	1	80				0
434	438	462	C	13.0	46.67	0	100	1	80				0
435	439	463	K	106.3	52.99	0	40	1	20				4
436	440	464	H	44.6	54.37	0	40	1	20				5
437	441	465	P	119.4	55.7	0	100	1	60				3
438	442	466	E	112.8	57.25	0	100	1	60				4
439	443	467	A	93.5	55.15	0	40	1	20				1
440	444	468	K	63.8	50.64	0	40	1	20				4
441	445	469	R	24.2	42.52	1	100	0	60				5
442	446	470	M	8.7	35.96	1	40	1	20				3
443	447	471	P	35.8	36.33	1	60	1	40				3
444	448	472	C	43.5	35.54	1	100	0	80				0
445	449	473	A	3.2	33.69	1	40	2	20				1
446	450	474	E	0.0	29.58	1	100	0	60				4
447	451	475	D	42.0	25.46	1	80	1	40				3
448	452	476	Y	34.6	20.82	1	80	1	40				3
449	453	477	L	20.6	21.5	1	100	0	60				4

【図１－１７】

450	454	478	S	23.4	20.37	1	80	1	40				1
451	455	479	V	23.5	16.54	1	40	0	20				3
452	456	480	V	3.7	20.05	1	40	1	20				3
453	457	481	L	3.1	17.71	1	100	1	60				4
454	458	482	N	3.5	19.76	1	100	1	40				2
455	459	483	Q	25.2	25.52	1	80	1	40				3
456	460	484	L	2.1	26.58	1	80	1	40				4
457	461	485	C	7.6	27.06	1	100	0	80				0
458	462	486	V	12.3	25.4	1	80	2	40				3
459	463	487	L	17.5	29.09	1	100	1	40				4
460	464	488	H	6.9	35.51	1	100	2	40				5
461	465	489	E	60.3	42.01	1	100	2	60				4
462	466	490	K	54.0	45.63	1	100	2	60	K490E	0		4
463	467	491	T	111.3	47.62	0	100	2	60				1
464	468	492	P	128.4	44.24	0	100	2	40				3
465	469	493	V	97.5	41.69	0	100	2	40				3
466	470	494	S	4.7	43.02	0	100	1	40				1
467	471	495	D	205.8	45.67	1	80	1	40				3
468	472	496	R	25.6	43.1	1	40	0	20				5
469	473	497	V	0.0	35.26	1	80	1	60				3
470	474	498	T	66.3	36.92	1	100	1	40				1
471	475	499	K	63.2	36.72	1	100	2	40				4
472	476	500	C	2.2	29.85	1	100	2	80				0
473	477	501	C	9.8	29.96	1	100	1	80				0
474	478	502	T	125.0	35	1	60	1	40				1
475	479	503	E	94.2	40.83	1	60	1	20	E503K	0		4
476	480	504	S	62.5	40.31	0	100	1	60				0
477	481	505	L	34.0	34.26	0	100	1	40				4
478	482	506	V	32.1	32.41	0	80	1	40				3

【図１－１８】

479	483	507	N	85.9	30.93	0	60	1	40				2
480	484	508	R	8.1	26.02	1	100	1	60				5
481	485	509	R	2.4	27.43	1	100	2	60				5
482	486	510	P	26.9	27.41	1	100	2	60				3
483	487	511	C	34.8	28.7	1	100	2	80				0
484	488	512	F	0.0	26.54	1	100	2	60				4
485	489	513	S	39.1	29.37	1	100	1	40				1
486	490	514	A	130.6	32.03	1	80	2	40				1
487	491	515	L	12.4	36.77	0	100	0	60				4
488	492	516	E	83.3	48.42	0	40	1	20				4
489	493	517	V	67.9	54.02	0	40	1	20				3
490	494	518	D	26.1	62.32	0	100	1	60	D518N	1		3
491	495	519	E	100.6	69.16	0	100	1	60				4
492	496	520	T	148.8	70.07	0	60	2	40				1
493	497	521	Y	46.2	69.63	0	100	0	60				3
494	498	522	V	149.4	74.11	0	80	2	60				3
495	499	523	P	89.6	78.71	0	100	1	80				3
496	500	524	K	86.8	87.39	0	100	1	40				4
497	501	525	E	99.4	95.25	0	60	2	40	E525K	0		4
498	502	526	F	48.8	97.09	0	100	0	60				4
499	503	527	N	81.2	99.86	0	40	1	20				2
500	504	528	A	108.1	98.55	0	60	0	40				1
501	505	529	F	105.8	93.84	0	60	0	40	E529K	0		4
502	506	530	T	92.5	88	0	60	1	40				1
503	507	531	F	3.3	82.27	0	100	1	60				4
504	508	532	T	100.0	80.18	0	100	2	40				1
505	509	533	F	13.8	78.2	0	100	2	60				4
506	510	534	H	88.5	76.46	0	100	1	60				5
507	511	535	A	48.4	69.68	0	80	1	40				1

【図１－１９】

508	512	536	D	139.1	61.05	0	80	0	40				3
509	513	537	I	4.8	50.62	0	60	1	40				4
510	514	538	C	45.7	44.69	0	100	1	80				0
511	515	539	T	145.0	40.33	0	100	2	60				1
512	516	540	L	46.4	40.23	0	100	1	40				4
513	517	541	S	78.1	46.03	0	60	1	40				1
514	518	542	E	51.9	49.65	1	60	0	40				4
515	519	543	K	62.6	49.4	1	40	1	20				4
516	520	544	E	23.7	43.06	1	100	0	60				4
517	521	545	R	16.6	40.16	1	80	1	40				5
518	522	546	Q	37.0	39.72	1	80	0	60				3
519	523	547	I	71.4	36.13	1	60	0	40				4
520	524	548	K	60.3	34.29	1	80	1	60				4
521	525	549	K	6.9	35.18	1	100	1	60				4
522	526	550	Q	0.0	30.63	1	100	1	60				3
523	527	551	T	53.8	28.26	1	60	2	20				1
524	528	552	A	6.5	31.62	1	100	1	40				1
525	529	553	L	7.2	30.26	1	100	1	80				4
526	530	554	V	0.0	33.2	1	60	2	40				3
527	531	555	E	28.2	41.25	1	100	1	60				4
528	532	556	L	14.4	49.88	1	100	1	60				4
529	533	557	V	2.5	54.97	1	60	2	40	V557M	0	3	
530	534	558	K	10.9	60.16	0	100	1	60			4	
531	535	559	H	27.7	70.44	0	100	2	60			5	
532	536	560	K	23.0	79.19	0	100	1	60	K560E	0	4	
533	537	561	P	34.3	87.27	0	100	1	60			3	
534	538	562	K	115.5	96.73	0	80	2	40			4	
535	539	563	A	90.3	99.48	0	100	0	40			1	
536	540	564	T	26.3	97.44	0	80	1	60			1	

【図１－２０】

537	541	565	K	98.3	96.84	0	20	0	20	K565E	1	4
538	542	566	E	105.8	96.98	1	80	1	60			4
539	543	567	Q	53.5	92.83	1	100	0	60			3
540	544	568	L	6.2	91.34	1	80	1	60			4
541	545	569	K	63.8	92.51	1	80	0	60			4
542	546	570	A	80.6	91.51	1	60	1	40			1
543	547	571	V	27.2	88.34	1	100	0	60			3
544	548	572	M	8.7	86.47	1	60	1	40			3
545	549	573	D	146.4	84.68	1	40	0	20			3
546	550	574	D	94.2	80.18	1	40	1	20	D574G, D574A	0	3
547	551	575	F	0.8	74.2	1	100	0	80			4
548	552	576	A	38.7	71.8	1	40	1	20			1
549	553	577	A	69.4	71.17	1	60	0	40			1
550	554	578	F	0.8	71.18	1	80	0	40			4
551	555	579	V	1.2	73.7	1	60	0	60			3
552	556	580	E	60.9	77.5	1	40	0	20			4
553	557	581	K	71.8	77.55	1	80	1	60			4
554	558	582	C	1.1	76.28	1	100	1	80			0
555	559	583	C	40.2	71.47	0	100	1	80			0
556	560	584	K	92.5	81.9	0	40	1	20	K584E	0	4
557	561	585	A	77.4	89.44	0	80	0	60			1
558	562	586	D	217.4	95.72	0	40	0	40			3
559	563	587	D	63.8	98.46	0	80	0	60	D587N	1	3
560	564	588	K	97.1	100.08	0	80	0	40			4
561	565	589	E	87.8	98.18	0	80	0	40	E589K	0	4
562	566	590	T	86.3	94.83	1	40	1	40			1
563	567	591	C	25.0	92.56	1	100	1	80			0
564	568	592	F	1.6	95.34	1	100	1	60			4

【図１－２１】

565	569	593	A	74.2	96.55	1	60	1	20		1
566	570	594	E	73.1	97.9	1	40	0	40	E594K	2	4
567	571	595	E	48.7	96.74	1	80	1	60			4
568	572	596	G	6.0	97.47	1	100	0	60			2
569	573	597	K	81.6	98.2	1	80	1	40	K597E	0	4
570	574	598	K	90.8	99.51	1	80	0	40	K598N	0	4
571	575	599	L	33.0	99.45	1	80	1	60			4
572	576	600	V	25.9	98.42	1	100	0	60			3
573	577	601	A	93.5	97.86	1	60	1	40			1
574	578	602	A	96.8	98.62	1	20	0	20			1
575	579	603	S	21.9	100.74	1	40	0	40			1
576	580	604	Q	86.6	101.91	1	60	0	40			3
577	581	605	A	133.9	103.91	1	40	0	40			1
578	582	606	A	88.7	106.05	0	80	1	40			1
n/a	583	607	L	n/a	n/a	0	100	0	60			4
n/a	584	608	G	n/a	n/a	0	60	1	40			2
n/a	585	609	L	n/a	n/a	0	0	0	0			4

【図２－１】

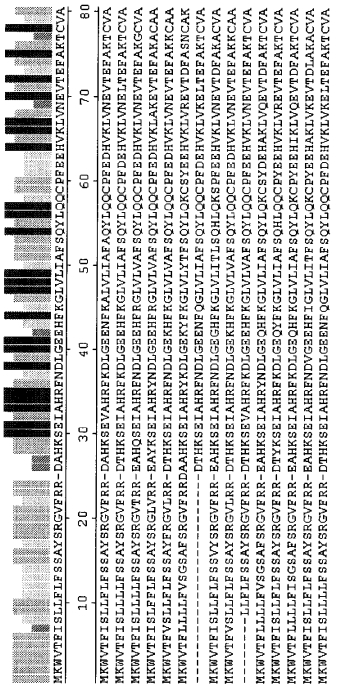
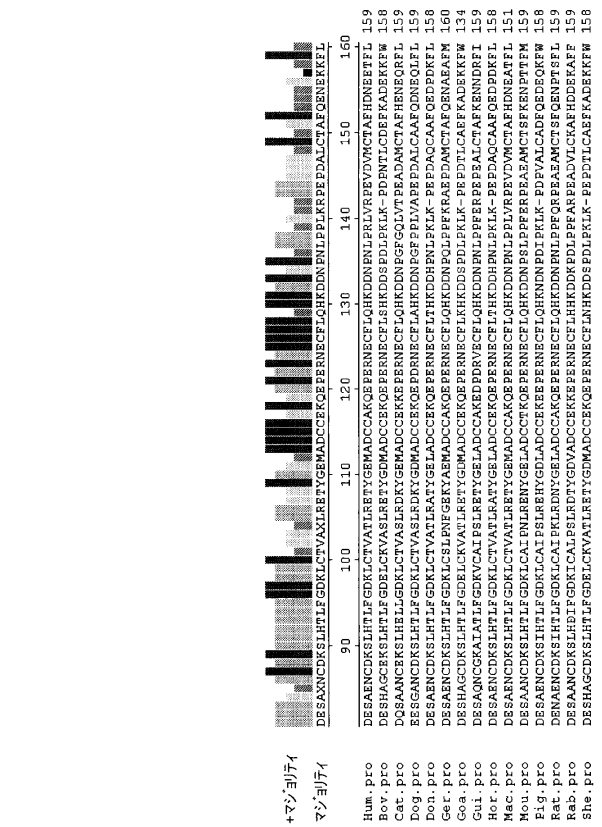


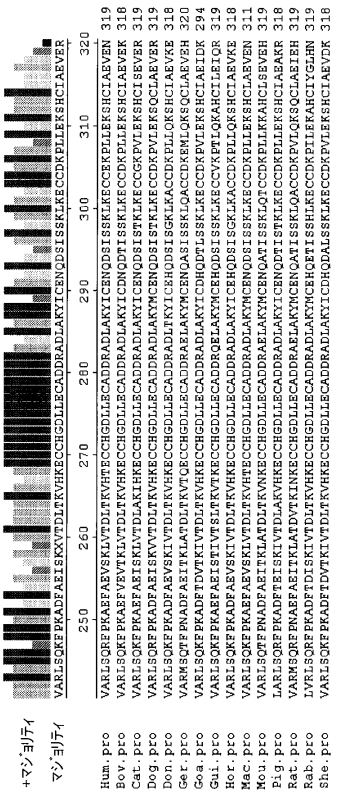
Figure 2

【図２－２】

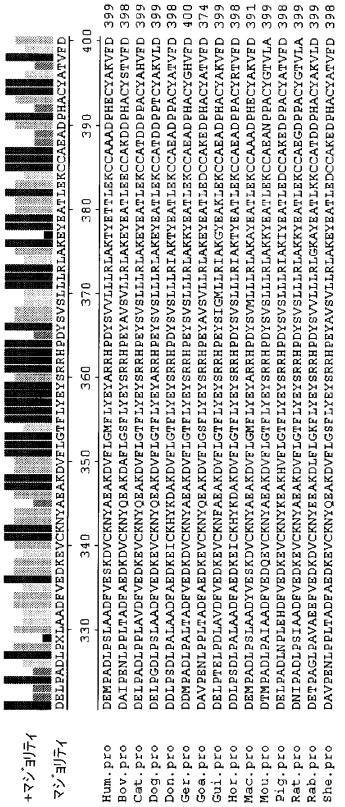


【図２－３】

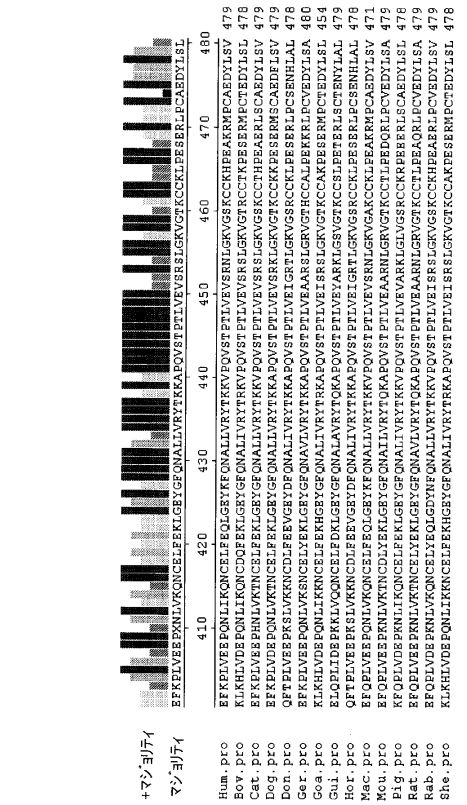
【図２－４】



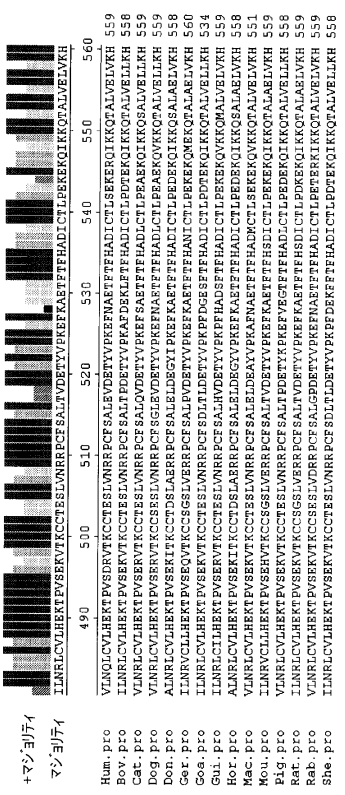
【図２－５】



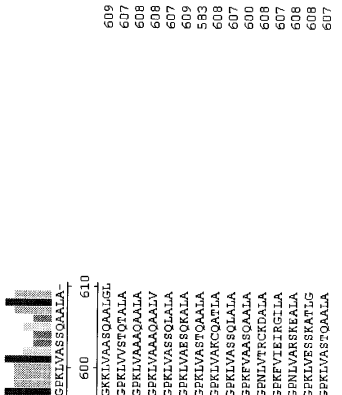
【図２－６】



【図２－７】



【図２－８】



【図３－１】

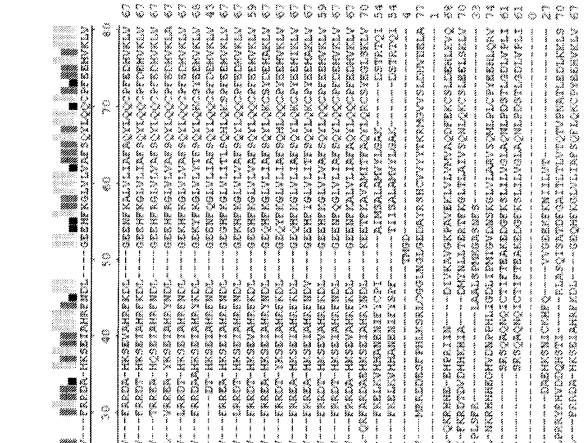
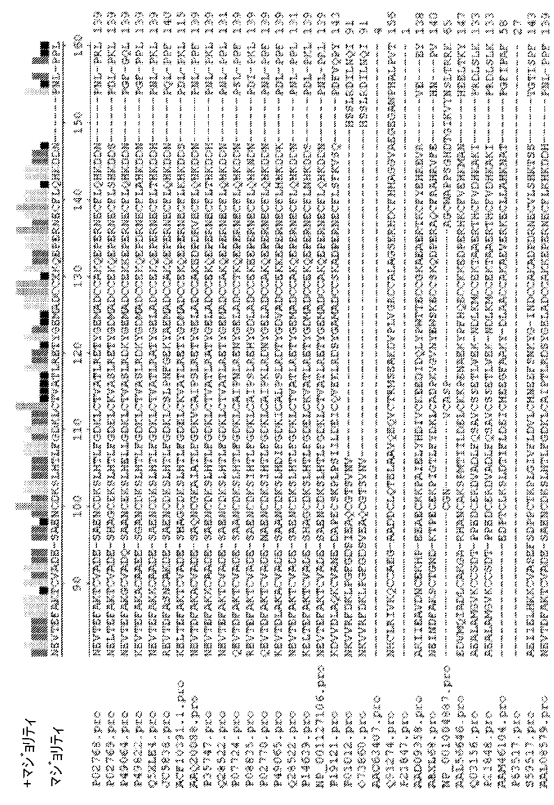


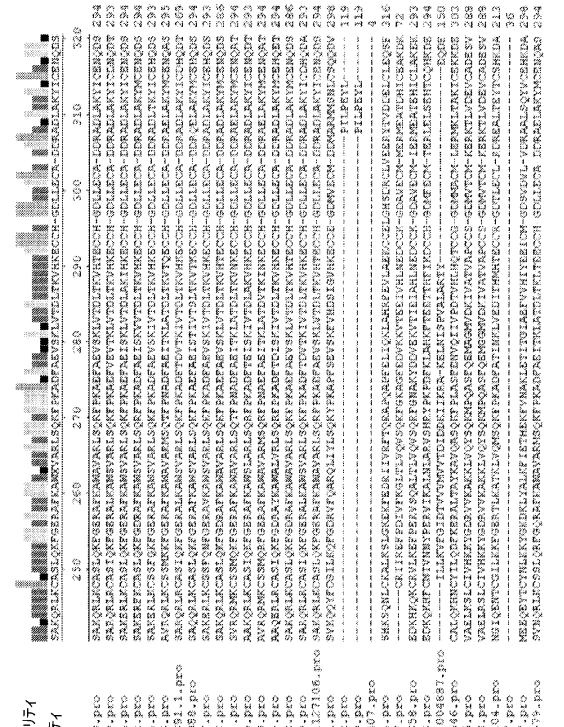
Figure 3

【図３－２】

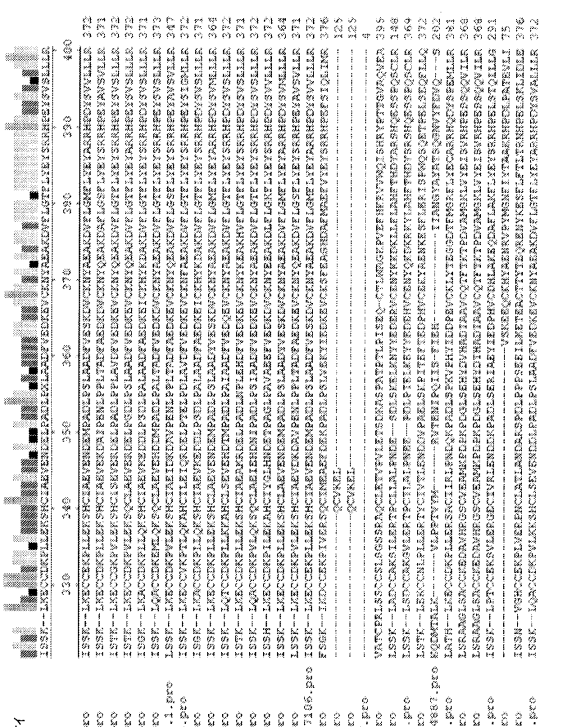


【図３－３】

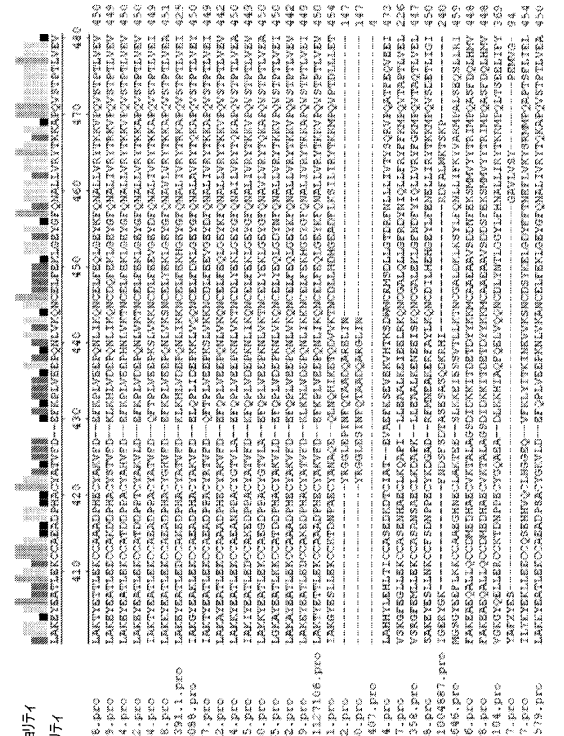
【図３－４】



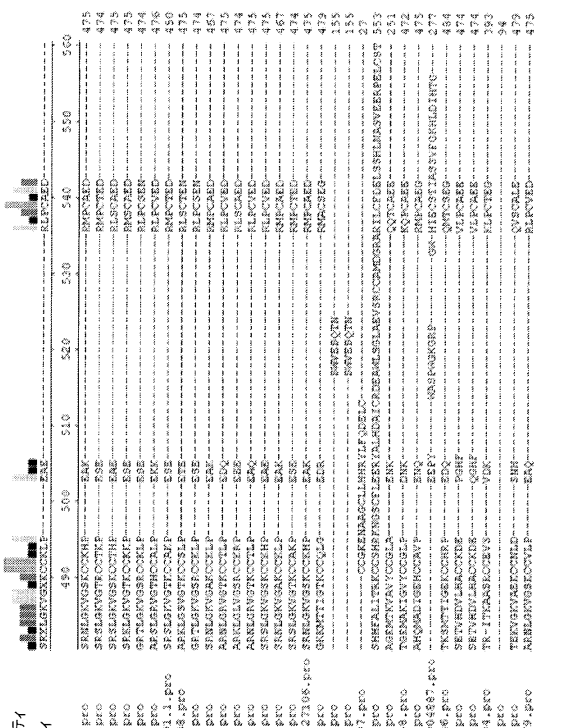
【図３－５】



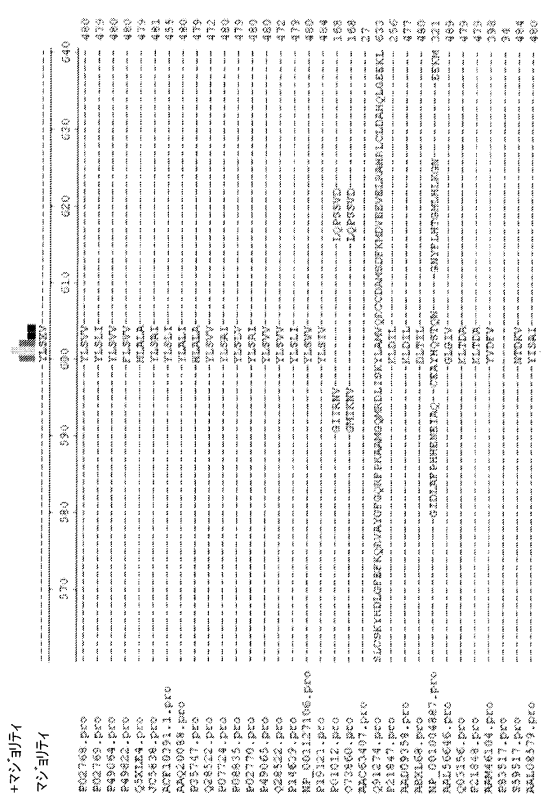
【図３－６】



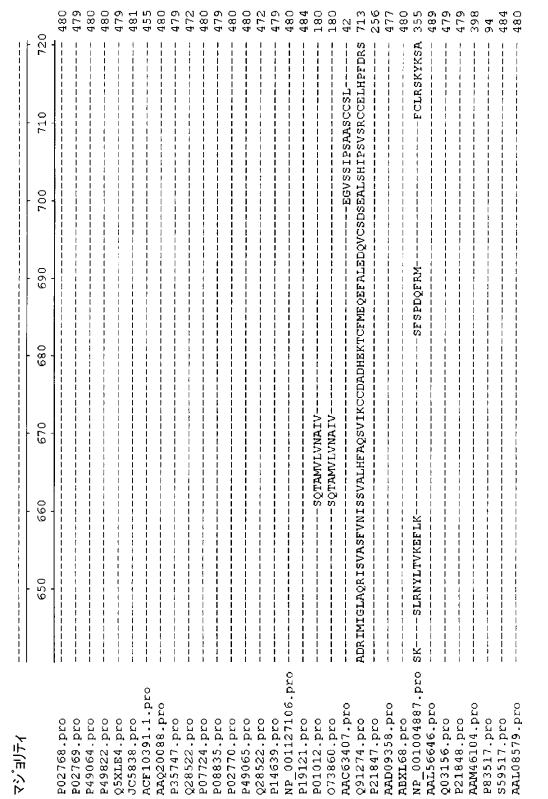
【図３－７】



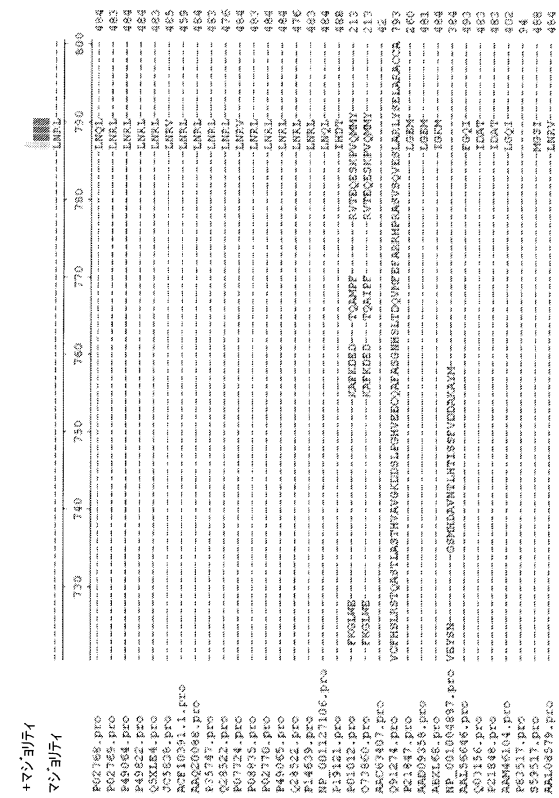
【図３－８】



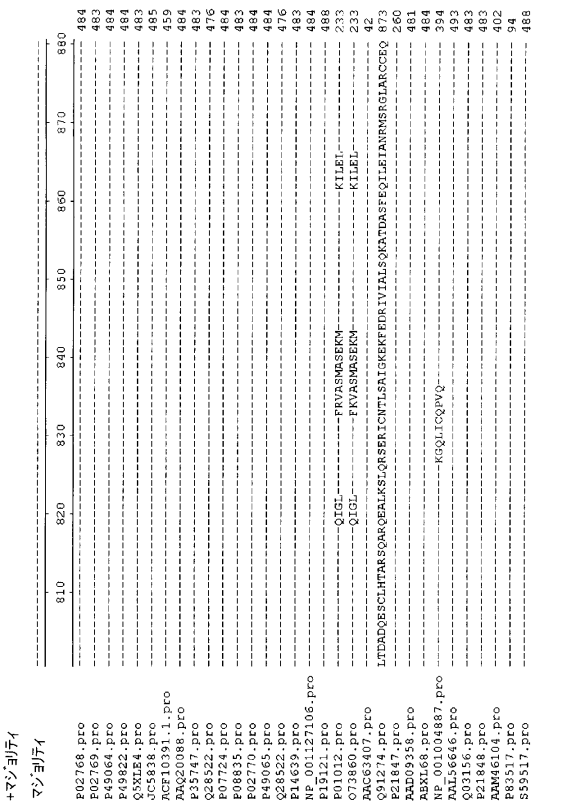
【図３－９】



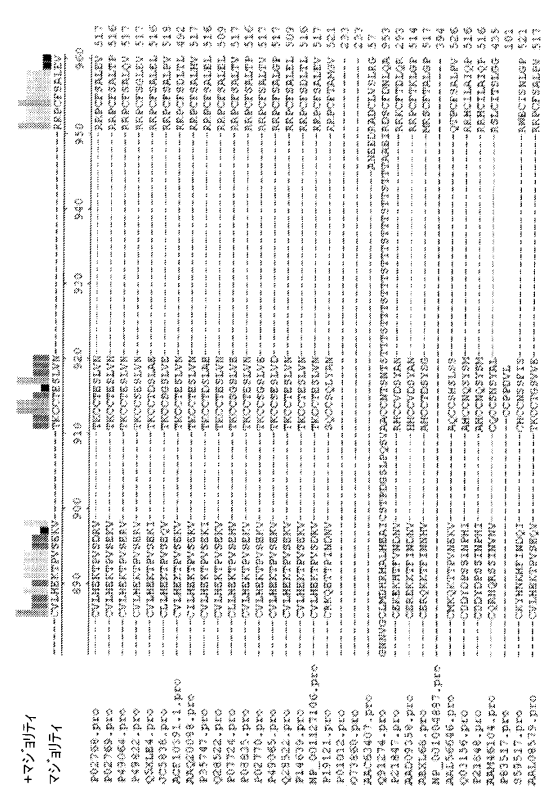
【図３－１０】



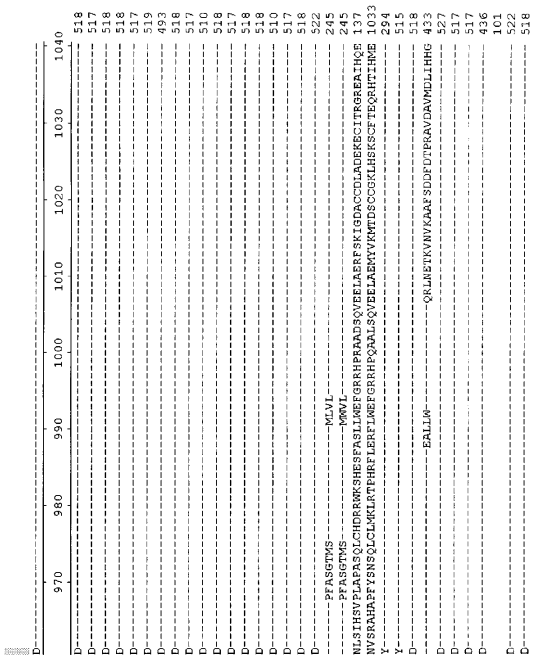
【図３－１１】



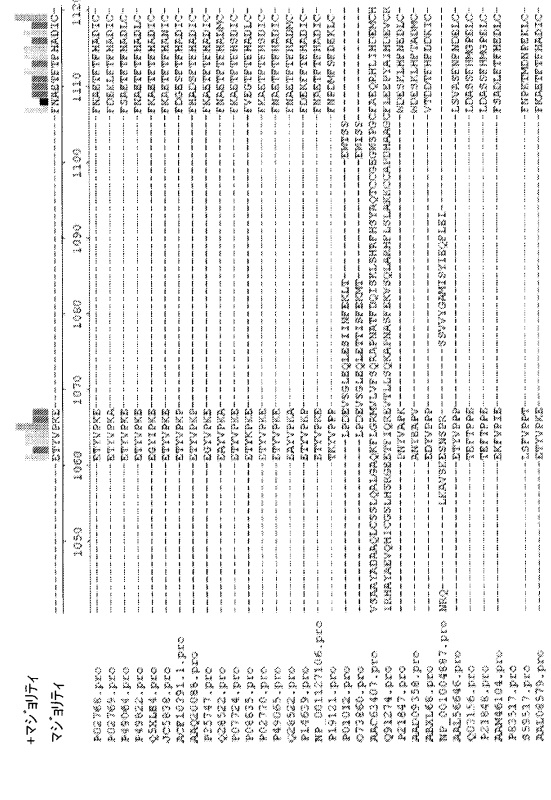
【図３－１２】



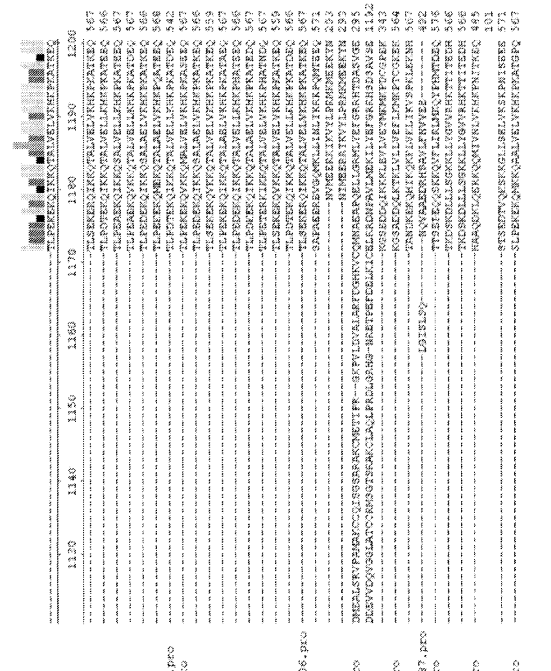
【図３－１３】



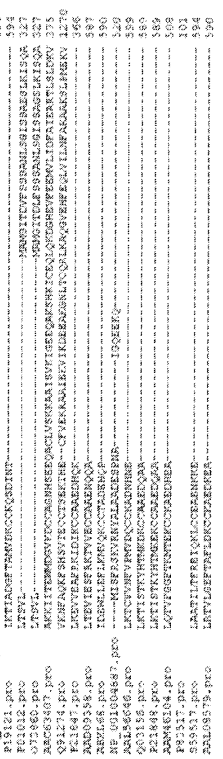
【図３－１４】



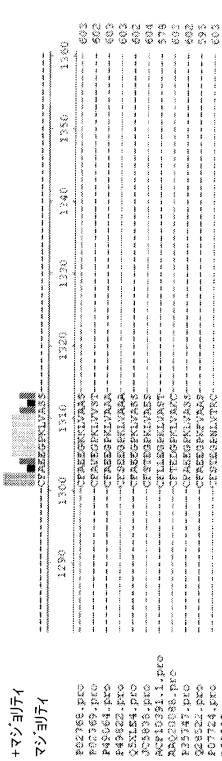
【図３－１５】



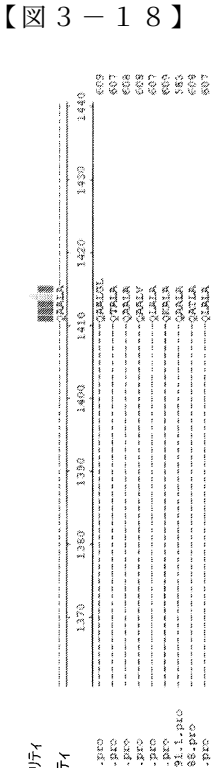
【図３－１６】



【図３－１７】



【図３－１８】



【図３－１９】

【図４】

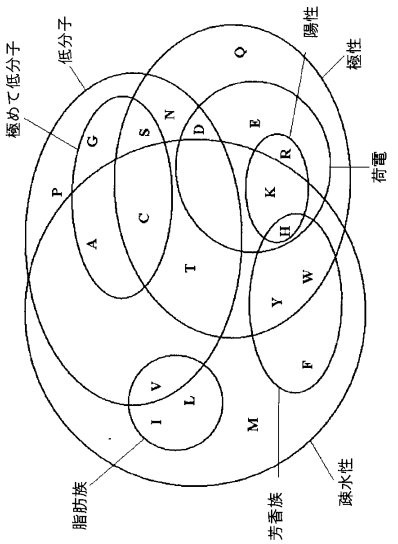


Figure 4

【図５Ａ】

システインに対する保存された変異

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (Var. Sps. V)	多形	表現型変化	
n/a	1	25	D	n/a	n/a	0	40	0	40	D25V	0	3
n/a	585	609	L	n/a	n/a	0	0	0	0			4
n/a	2	26	A	n/a	n/a	0	40	0	20			1
558	562	586	D	217.4	95.72	0	40	0	40			3
360	364	388	A	164.5	80.24	0	40	0	20			1
500	504	528	A	108.1	98.55	0	60	0	40			1
501	505	529	E	105.8	93.84	0	60	0	40	E529K	0	4
75	79	103	T	103.8	67.13	0	40	0	20			1
82	86	110	E	99.4	88.78	0	60	0	20			4

Figure 5A

【図５Ｂ】

システインに対する保存された変異

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (Var. Sps. V)	多形	表現型変化	
125	129	153	D	211.6	43.69	1	40	0	20			3
545	549	573	D	146.4	84.68	1	40	0	20			3
577	581	605	A	133.9	103.91	1	40	0	40			1
117	121	145	D	130.4	46.02	1	60	0	40			3
78	82	106	E	130.1	96.77	1	60	0	40	E106K	0	4
266	270	294	S	114.1	43.53	1	40	0	20			1
393	397	421	Q	101.6	58.94	1	40	0	20			3
574	578	602	A	96.8	98.62	1	20	0	20			1

Figure 5B

【図５Ｃ－１】

システインに対する保存された変異

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (Var. Sps. V)	多形	表現型変化	
n/a	585	609	L	n/a	n/a	0	0	0	0			4
n/a	2	26	A	n/a	n/a	0	40	0	20			1
n/a	1	25	D	n/a	n/a	0	40	0	40	D25V	0	3
n/a	584	608	G	n/a	n/a	0	60	1	40			2
n/a	4	28	K	n/a	n/a	0	80	1	40			4
297	301	325	D	218.8	64.56	0	60	1	40			3
558	562	586	D	217.4	95.72	0	40	0	40			3
296	300	324	A	180.6	63.75	0	40	1	40			1
361	365	389	D	168.1	84.23	0	80	1	40	D389H, D389V	1	3
360	364	388	A	164.5	80.24	0	40	0	20			1
54	58	82	S	164.1	53.12	0	80	0	40			1
494	498	522	V	149.4	74.11	0	80	2	60			3
492	496	520	T	148.8	70.07	0	60	2	40			1
109	113	137	P	141.8	51.5	0	80	0	40			3
112	116	140	V	139.5	51.82	0	40	0	0			3
508	512	536	D	139.1	61.05	0	80	0	40			3
300	304	328	S	134.4	57.01	0	20	0	20			1
310	314	338	D	131.9	65.86	0	40	0	40	D338G, D338V	1	3
299	303	327	P	119.4	59.59	0	80	1	60			3
534	538	562	K	115.5	96.73	0	80	2	40			4
56	60	84	E	110.3	53.87	0	40	0	20	E84K	0	4

Figure 5C

【図５Ｃ－２】

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (Var. Spe. V)	多形	表現型変化	
72	76	100	T	105.0	32.05	1	40	1	20			1
393	397	421	Q	101.6	58.94	1	40	0	20			3
60	40	64	E	101.3	31.14	1	40	1	40			4
321	325	349	V	100.0	50.37	1	80	1	40			3
386	390	414	Q	96.9	52.9	1	40	1	20			3
574	578	602	A	96.8	98.62	1	20	0	20			1
475	479	503	E	94.2	40.83	1	60	1	20	E503K	0	4
546	550	574	D	94.2	80.18	1	40	1	20	D574G, D574A	0	3
382	386	410	N	94.1	42.58	1	80	1	40			2
573	577	601	A	93.5	97.86	1	60	1	40			1
44	48	72	E	91.0	31.25	1	60	1	40			4
570	574	598	K	90.8	99.51	1	80	0	40	K598N	0	4
317	321	345	E	88.5	67.18	1	80	1	40	E345K	0	4
118	122	146	V	87.7	43.96	1	40	0	20	V146E	0	3
279	283	307	L	87.6	36.51	1	40	1	20			4
34	38	62	D	87.0	34.73	1	60	1	40			3
576	580	604	Q	86.6	101.91	1	60	0	40			3
562	566	590	T	86.3	94.83	1	40	1	40			1
48	52	76	T	86.3	35.9	1	40	1	20			1
351	355	379	T	86.3	40.3	1	80	1	40			1
392	396	420	E	85.9	62.51	1	80	0	40	E420K	0	4
262	266	290	E	83.3	41.21	1	80	1	40			4
569	573	597	K	81.6	98.2	1	80	1	40	K597E	0	4
542	546	570	A	80.6	91.51	1	60	1	40			1

システインに対する保存された変異

【図５Ｄ－１】

Figure 5D

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (Var. Spe. V)	多形	表現型変化	
265	269	293	D	229.0	45.46	1	60	1	60	D293G	1	3
125	129	153	D	211.6	43.69	1	40	0	20			3
467	471	495	D	205.8	45.67	1	80	1	40			3
371	375	399	D	152.2	50.78	1	80	0	40	D399N, D399H	0	3
51	55	79	A	148.4	43.59	1	80	0	40			1
545	549	573	D	146.4	84.68	1	40	0	20			3
577	581	605	A	133.9	103.91	1	40	0	40			1
304	308	332	D	131.9	47.92	1	80	0	40			3
486	490	514	A	130.6	32.03	1	80	2	40			1
117	121	145	D	130.4	46.02	1	60	0	40			3
78	82	106	E	130.1	96.77	1	60	0	40	E106K	0	4
474	478	502	T	125.0	35	1	60	1	40			1
320	324	348	D	120.3	58.69	1	80	1	60			3
375	379	403	P	119.4	32.33	1	80	1	40			3
316	320	344	A	119.4	64	1	40	0	20	A344T	1	1
121	125	149	T	115.0	35.32	1	40	1	20			1
266	270	294	S	114.1	43.53	1	40	0	20			1
79	83	107	T	113.8	98.21	1	60	1	20			1
100	104	128	Q	111.0	32.1	1	40	2	20			3
225	229	253	A	109.7	36.47	1	60	1	40			1
364	368	392	E	109.6	77.34	1	60	1	20			4
314	318	342	N	107.1	59.91	1	80	1	40	N342K	0	2
538	542	566	E	105.8	96.98	1	80	1	60			4

システインに対する保存された変異

【図５Ｄ－２】

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (全 Spe.V)	ジスルフィド情報	(多形) 表現型変化	修飾スコア
71	75	99	C	20.7	24.72	1	100	0	80	C91との対		高
87	91	115	C	32.6	33.58	0	100	1	60	C75との対		高
120	124	148	C	3.3	34.94	1	100	0	60	C169との対		高
164	168	192	C	0.0	31.68	1	100	1	60	C177との対		高
165	169	193	C	14.1	32.95	0	100	1	60	C124との対		高
312	316	340	C	23.9	62.19	1	100	1	80	C361との対		高
356	360	384	C	2.2	60.95	1	100	1	80	C369との対		高
357	361	385	C	42.4	66.33	0	100	2	80	C316との対		高
554	558	582	C	1.1	76.28	1	100	1	80	C567との対		高
563	567	591	C	25.0	92.56	1	100	1	80	C558との対		高

【図６Ａ】

Figure 6A

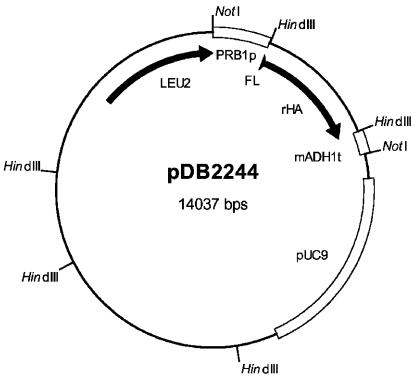
【図６Ｂ】

Figure 6B

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	隣接100% (アライン1)	アライン2 (全 Spo. V)	シングルフォード情報	(多形) 表現型変化	修飾スコア
71	75	99	C	20.7	24.72	1	100	0	80	C91との対		高
87	91	115	C	32.6	33.58	0	100	1	60	C75との対		高
120	124	148	C	3.3	34.94	1	100	0	60	C169との対		高
165	169	193	C	14.1	32.95	0	100	1	60	C124との対		高
173	177	201	C	30.4	28.29	1	100	1	80	C168との対	(C201F) 2	中
312	316	340	C	23.9	62.19	1	100	1	80	C361との対		高
357	361	385	C	42.4	66.33	0	100	2	80	C316との対		中
365	369	393	C	48.9	69.93	1	100	1	80	C360との対		中
554	558	582	C	1.1	76.28	1	100	1	80	C567との対		高
563	567	591	C	25.0	92.56	1	100	1	80	C558との対		高

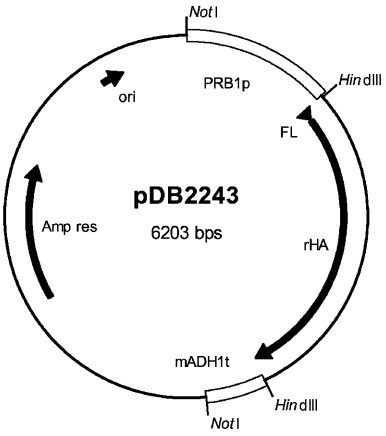
【図７】

Figure 7



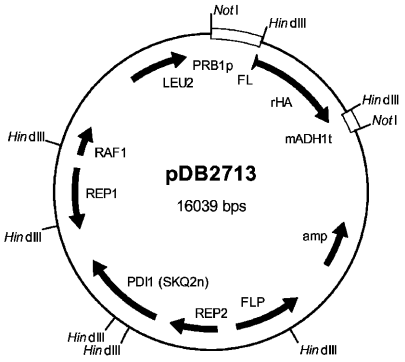
【図８】

Figure 8



【図９】

Figure 9



【図１０－１】

Figure 10

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	アライン2 (Var. Sps. V)	(多形)表現型変化	選択グループ	近接グループ
n/a	1	25	D	n/a	n/a	0	40	40	(D25V) 0	1	E
n/a	2	26	A	n/a	n/a	0	40	20		1	E
71	75	99	C	20.7	24.72	1	100	80		3	K
75	79	103	T	103.8	67.13	0	40	20		1	A
78	82	106	E	130.1	96.77	1	60	40	(E106K) 0	2	F
82	86	110	E	99.4	88.78	0	60	20		1	A
87	91	115	C	32.6	33.58	0	100	60		3	K
117	121	145	D	130.4	46.02	1	60	40		2	H
120	124	148	C	3.3	34.94	1	100	60		3	L
125	129	153	D	211.6	43.69	1	40	20		2	H
165	169	193	C	14.1	32.95	0	100	60		3	L
173	177	201	C	30.4	28.29	1	100	80	(C201F) 2	3	L
266	270	294	S	114.1	43.53	1	40	20		2	G
312	316	340	C	23.9	62.19	1	100	80		3	M
357	361	385	C	42.4	66.33	0	100	80		3	M
360	364	388	A	164.5	80.24	0	40	20		1	C
365	369	393	C	48.9	69.93	1	100	80		3	M
393	397	421	Q	101.6	58.94	1	40	20		2	J
500	504	528	A	108.1	98.55	0	60	40		1	D
501	505	529	E	105.8	93.84	0	60	40	(E529K) 0	1	D
545	549	573	D	146.4	84.68	1	40	20		2	J

隣接100%(アライン1)

【図１０－２】

1A06における位置	成熟HSAにおける位置	リーダー配列を有する位置	アミノ酸	% SASA	Bファクター	SS	アライン1 (Mamm. W)	アライン2 (Var. Sps. V)	(多形)表現型変化	選択グループ	近接グループ
554	558	582	C	1.1	76.28	1	100	80		3	N
558	562	586	D	217.4	95.72	0	40	40		1	B
563	567	591	C	25	92.56	1	100	80		3	N
574	578	602	A	96.8	98.62	1	20	20		2	I
577	581	605	A	133.9	103.91	1	40	40		2	I
n/a	585	609	L	n/a	n/a	0	0	0		1	D

隣接100%(アライン1)

【図１１－１】

Figure 11

コンストラクトリファレンス	変異	プラスミドの名称	形質転換体	酵母ストック番号	配列番号2における修飾された位置	オリジナルコドン	オリジナル残基	変異コドン	変異残基	DNA配列番号
TA1	A2C	pDB4029	B	9012	4-6	GCA	A	TGT	C	5
TA2	D1C	pDB4030	B	9013	1-3	GAT	D	TGT	C	6
TA3	C75S	pDB4031	A	9014	223-225	TGC	C	TCT	S	7
TA4	T79C	pDB4032	D	9015	235-237	ACT	T	TGT	C	8
TA5	E82C	pDB4033	D	9016	244-246	GAA	E	TGT	C	9
TA6	E86C	pDB4034	A	9017	256-258	GAA	E	TGT	C	10
TA7	C124S	pDB4035	D	9018	370-372	TGC	C	TCT	S	11
TA8	C168S	pDB4036	B	9019	502-504	TGT	C	TCT	S	12
TA9	C169S	pDB4037	B	9020	505-507	TGC	C	TCT	S	13
TA10	C91S	pDB4038	B	9021	271-273	TGT	C	TCT	S	14
TA11	D121C	pDB4039	B	9022	361-363	GAT	D	TGT	C	15

タンパク質配列番号

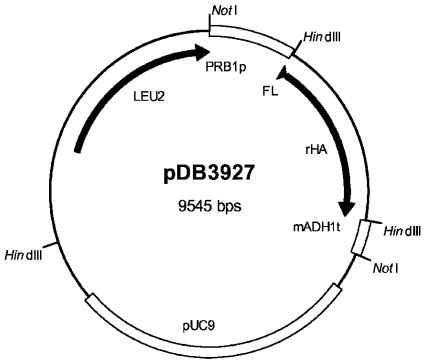
【図１１－２】

コンストラクトリファレンス	変異	プラスミドの名称	形質転換体	酵母ストック番号	配列番号2における修飾された位置	オリジナルコドン	オリジナル残基	変異コドン	変異残基	DNA配列番号
TA12	D129C	pDB4040	C	9023	385-387	GAC	D	TGT	C	16
TA13	S270C	pDB4041	D	9024	808-810	TCG	S	TGT	C	17
TA14	C316A	pDB4042	B	9025	946-948	TGC	C	GCT	A	18
TA16	C360S	pDB4044	B	9026	1078-1080	TGC	C	TCT	S	19
TA17	C361A	pDB4045	A	9027	1081-1083	TGT	C	GCT	A	20
TA18	C361S	pDB4046	C	9028	1081-1083	TGT	C	TCT	S	21
TA19	A364C	pDB4047	D	9029	1090-1092	GCT	A	TGT	C	22
TA20	Q397C	pDB4048	A	9030	1189-1191	CAG	Q	TGT	C	23
TA21	A504C	pDB4049	A	9031	1510-1512	GCT	A	TGT	C	24
TA22	A578C	pDB4050	D	9032	1732-1734	GCA	A	TGT	C	25
TA23	A581C	pDB4051	C	9033	1741-1743	GCT	A	TGT	C	26
TA24	C558S	pDB4052	D	9034	1672-1674	TGC	C	TCT	S	27
TA25	C567S	pDB4053	B	9035	1699-1701	TGC	C	TCT	S	28
TA26	D549C	pDB4054	B	9036	1645-1647	GAT	D	TGT	C	29
TA27	D562C	pDB4055	B	9037	1684-1686	GAC	D	TGT	C	30
TA28	E505C	pDB4056	D	9038	1513-1515	GAA	E	TGT	C	31
TA29	L585C	pDB4057	B	9039	1753-1755	TTA	L	TGT	C	32
TA30	N/A	pDB3927	A	9040	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	2
TA31	N/A	pDB3964	D	9041	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4
TA32	N/A	pDB2244	B	9042	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	2

タンパク質配列番号

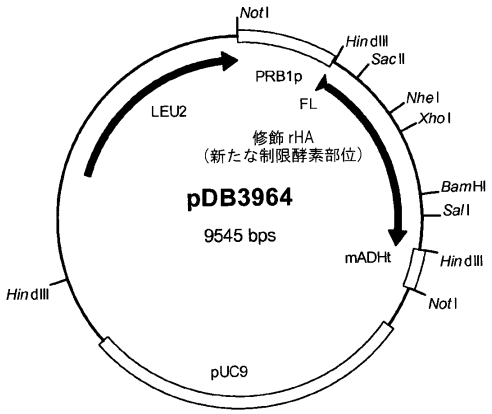
【図１２】

Figure 12



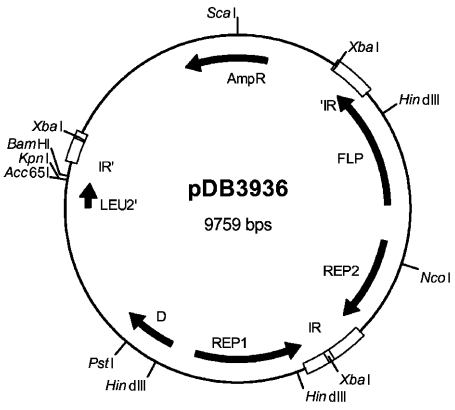
【図１３】

Figure 13



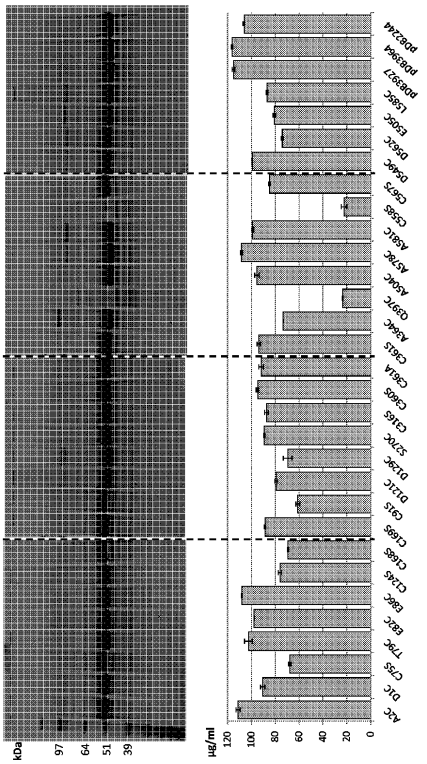
【図１４】

Figure 14



【図１５】

Figure 15



【図１６－１】

Figure 16

配列番号2における修飾された位置

コンストラクトリファレンス	変異	プラスミド番号	形質転換体	酵母ストック番号	単一変異体の組合せ	さらなる変異	さらなる変異		DNA配列番号	タンパク質配列番号
							オリジナルコドン	変異コドン		
TA33	A2C, L585C	pDB4058	C	9116	配列番号5 配列番号33	N/A	N/A	N/A	33	78
TA34	A2C, A504C	pDB4059	B	9117	配列番号5 配列番号25	N/A	N/A	N/A	34	79
TA35	A2C, A364C, D562C	pDB4060	B	9118	配列番号5 配列番号23 配列番号31	N/A	N/A	N/A	35	80
TA36	A2C, C34A, A364C, D562C	pDB4061	A	9119	配列番号5 配列番号23 配列番号31	C34A	100-102	TGT	36	81
TA38	A2C, A364C, D562C, L585C	pDB4062	C	9130	配列番号5 配列番号23 配列番号31 配列番号33	N/A	N/A	N/A	37	82
TA39	C34A, A504C, E505C	pDB4063	C	9120	配列番号25 配列番号32	C34A	100-102	TGT	GCT	38
TA41	S270C, A581C	pDB4064	A	9121	配列番号17 配列番号27	N/A	N/A	N/A	39	84
TA43	D129C, S270C, A581C	pDB4065	A	9122	配列番号16 配列番号17 配列番号27	N/A	N/A	N/A	40	85
TA46	C169S, C316A	pDB4066	A	9123	配列番号13 配列番号18	N/A	N/A	N/A	41	86
TA47	D129C, C360S, L585C	pDB4067	B	9124	配列番号16 配列番号20	N/A	N/A	N/A	42	87

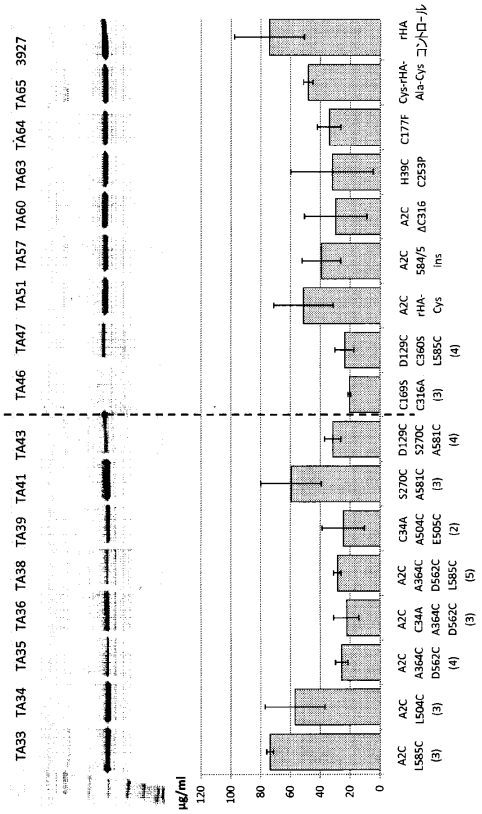
【図１６－２】

配列番号2における修飾された位置

コンストラクトリファレンス	変異	プラスミド番号	形質転換体	酵母ストック番号	単一変異体の組合せ	さらなる変異	さらなる変異		DNA配列番号	タンパク質配列番号
					配列番号33		オリジナルコドン	変異コドン		
TA51	A2C, rHA-Cys	pDB4068	A	9125	配列番号 5	-Cys	1756の前に付加	N/A	TGT	43	88
TA57	A2C, G584_L585insC	pDB4069	C	9126	配列番号 5	G584_L585insC	1753の前に付加	N/A	TGT	44	89
TA60	A2C, C316del	pDB4070	A	9127	配列番号 5	C316del	946-948（欠失）	TGC	N/A	45	90
TA63	H39C, C253P	pDB4071	A	9128	N/A	H39C, C253P	115-117, 757-759	CAT, TGT	TGT, CCA	46	91
TA64	C177F	pDB4072	C	9129	N/A	C177F	529-531	TGC	TTT	47	92
TA65	Cys-rHA-Ala-Cys	4073	D	9131	N/A	Cys-及び-Ala-Cys	1及び1756の前に付加	N/A	TGT, GCTTGT	48	93

【図１７】

Figure 17

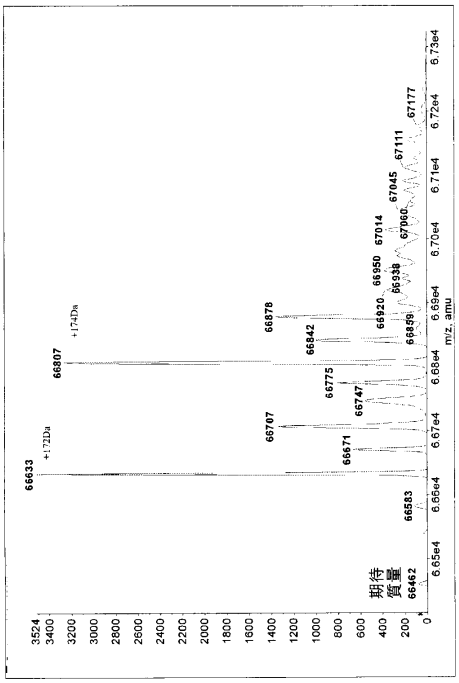


【図１８】

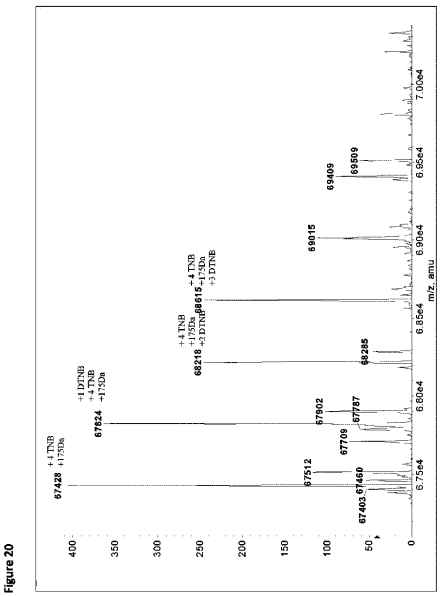
Figure 18

タンパク質	コンストラクトリファレンス	配列番号	発酵収量（g/L 上澄み）	DTNB処理後の色の強度
ネガティブコントロール（トランスフェリン）	N/A	N/A	N/A	-
ポジティブコントロール（rHA,ヒトアルブミン,リコンビミン(登録商標)）	N/A	50	N/A	+
rHA (A2C, L585C)	TA33	80	2.8	++++
rHA (A2C, A364C, D562C)	TA35	82	1.1	++++
rHA (A2C, A364C, D562C, L585C)	TA38	84	1.3	++++
rHA (D129C, C360S, L585C)	TA47	89	1.6	++++
A2C, rHA-Cys	TA51	90	2.9	++++

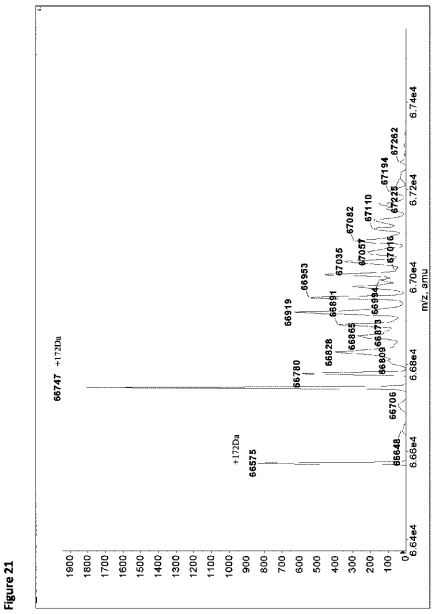
【図１９】



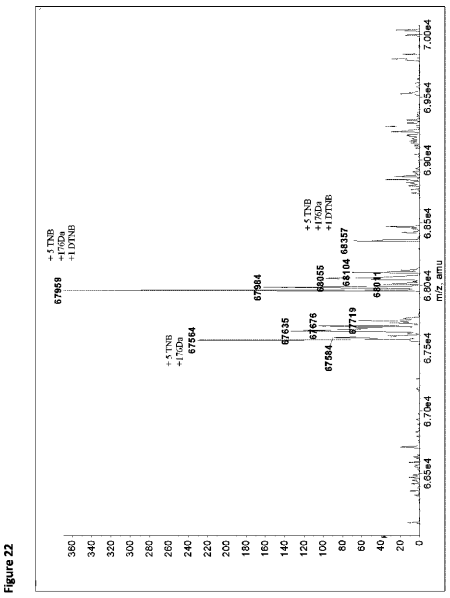
【図２０】



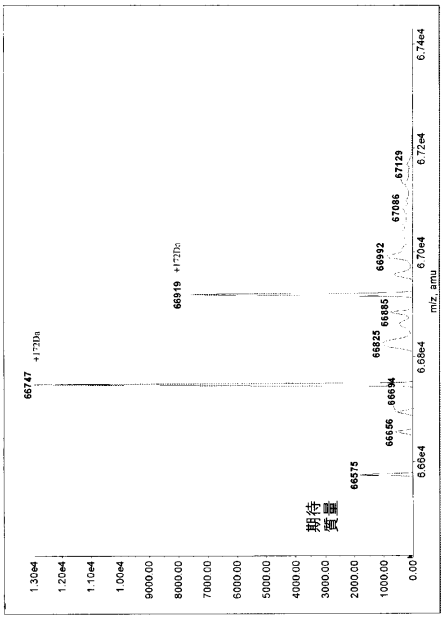
【図２１】



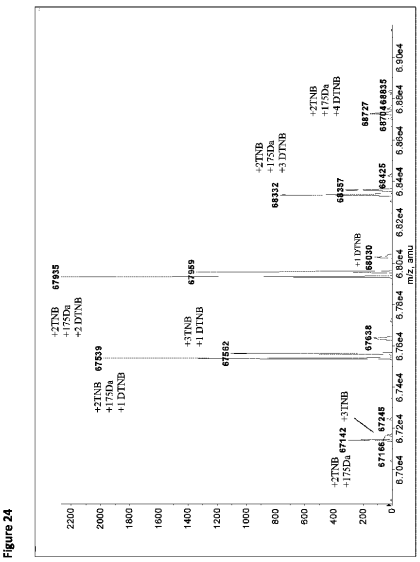
【図２２】



【図２３】



【図２４】



【配列表】

0005936112000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
A61P	***17/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	17/02
C12N	***1/19***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/19
C08J	***3/075***	***(2006.01)***	Ｃ０８Ｊ	3/075
A61K	*47/42*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/42

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(72)発明者 クリストファー ジョン アーサー フィニス
イギリス国, ノッティンガム ノッティンガムシャー エヌジー７ １ジェイビー, レントン, ハーラックストン ドライブ ７４
(72)発明者 ジョアンナ マリー ヘイ
イギリス国, コリトン デボン イーエックス２４ ６アールピー, リッジウェイ １
(72)発明者 エスベン ペテル フリス
デンマーク国, デーコー－２７３０ ヘアレウ, ガメルガールスバイ ２７アー
(72)発明者 ジェイソン キャメロン
イギリス国, ノッティンガムシャー, キャッスル ブールバード ５９, キャッスル コート
(72)発明者 ダレル スリープ
イギリス国, ノッティンガム ノッティンガムシャー エヌジー７ １エフディー, キャッスル ブールバード ５９, キャッスル コート

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特開２００５－２０６５７７（ＪＰ，Ａ）
ISHIMA YU, JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 米国, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, ２００７年 3月 1日, Vol.320, No.3, p.969-977
MINCHIOTTI LORENZO, EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, ２００１年 1月, Vol.268, No.2, p.344-352
SUGIO S, PROTEIN ENGINEERING, 英国, OXFORD UNIVERSITY PRESS, １９９９年 1月 1日, Vol.12, No.6, p.439-446
ISHIMA YU, , JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 米国, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, ２００７年 3月 1日, V320 N3, P969-977
MINCHIOTTI LORENZO, EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, ２００１年 1月, V268 N2, P344-352
SUGIO S, PROTEIN ENGINEERING, 英国, OXFORD UNIVERSITY PRESS, １９９９年 1月 1日, V12 N6, P439-446

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｐ １／００－４１／００
ＣＡ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ