

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-510518

(P2014-510518A)

(43) 公表日 平成26年5月1日(2014.5.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 136 頁)

(21) 出願番号	特願2013-553420 (P2013-553420)	(71) 出願人	504333972 メディミュン、エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーランド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミュン ウェイ
(86) (22) 出願日	平成23年8月9日 (2011.8.9)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月30日 (2013.9.30)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/047040	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 国際公開番号	W02012/112188	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 国際公開日	平成24年8月23日 (2012.8.23)	(74) 代理人	100170221 弁理士 小瀬村 暁子
(31) 優先権主張番号	PCT/US2011/024855		
(32) 優先日	平成23年2月15日 (2011.2.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H S A 関連組成物および使用方法

(57) 【要約】

天然H S Aよりも改善された特性がある、ヒト血清アルブミン (H S A) 組成物が提供される。

【選択図】 図 1 7

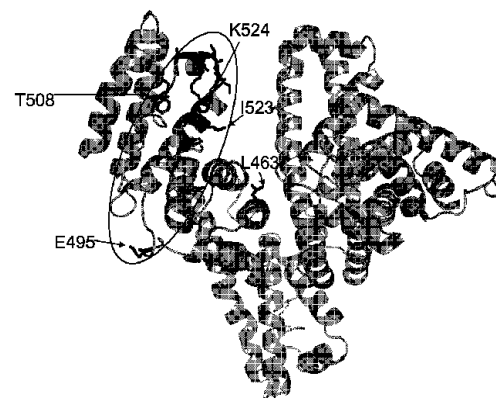


Figure 17

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト血清アルブミン（H S A）部分を含んでなるポリペプチドであって、そのH S A部分がH S AドメインI I I、またはその新生児F c受容体（F c R n）結合断片を含んでなり、前記H S AドメインI I I、またはその新生児F c受容体（F c R n）結合断片が、完全長成熟H S A中の位置に対応して番号付けされた、

- (a) 残基4 6 3および5 0 8；
- (b) 残基4 6 3および5 2 3；
- (c) 残基4 6 3および5 2 4；
- (d) 残基5 0 8および5 2 3；
- (e) 残基5 0 8および5 2 4；
- (f) 残基5 2 3および5 2 4；
- (g) 残基4 6 3、5 0 8、および5 2 3；
- (h) 残基4 6 3、5 0 8、および5 2 4；
- (i) 残基4 6 3、5 2 3、および5 2 4；
- (j) 残基5 0 8、5 2 3、および5 2 4；および
- (k) 残基4 6 3、5 0 8、5 2 3、および5 2 4

からなる群から選択される位置におけるアミノ酸置換を含んでなり、前記置換が、H S A部分が前記アミノ酸置換を含まない対照ポリペプチドと比較して、前記ポリペプチドのF c R n親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる、ポリペプチド。

【請求項 2】

X₁がロイシンでなく、および／またはX₂がスレオニンでなく、および／またはX₃がイソロイシンでなく、および／またはX₄がリジンでない、配列番号1 8を含んでなるポリペプチドであって、X₁がロイシンであり、X₂がスレオニンであり、X₃がイソロイシンであり、X₄がリジンである対照ポリペプチドと比較して、F c R n親和性増大および血清半減期増大の片方または双方を有するポリペプチド。

【請求項 3】

X₁が、システイン、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、アスパラギン、セリン、またはグルタミンであり；X₂がシステイン、グルタミン酸、イソロイシン、リジン、アルギニン、またはセリンであり；X₃が、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファン、またはチロシンであり；およびX₄が、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、グルタミン、スレオニン、またはバリンである、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

X₁がアスパラギンであり、および／またはX₂がアルギニンであり、またはX₃がグリシンであり、および／またはX₄がロイシンである、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが、前記対照ポリペプチドよりも高い親和性でF c R nに結合する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、前記対照ポリペプチドよりも高い親和性でF c R nに結合し、前記親和性が酸性p Hで測定される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

残基4 6 3における置換が、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Qから選択され；残基5 0 8における置換が、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 Sから選択され；残基5 2 3における置換が、I 5 2 3 A、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 H、I 5 2 3 I、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3

M、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Yから選択され；および残基 5 2 4 における置換が、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 Vから選択される、請求項 1、または請求項 5～6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

残基 4 6 3 における置換が、L 4 6 3 F、L 4 6 3 Nから選択され；残基 5 0 8 における置換が、T 5 0 8 R、T 5 0 8 Sから選択され；残基 5 2 3 における置換が、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 Rから選択され；残基 5 2 4 における置換が K 5 2 4 L である、請求項 7 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 9】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が、

- (a) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R ；
- (b) L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G ；
- (c) L 4 6 3 N / K 5 2 4 L ；
- (d) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G ；
- (e) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L ；
- (f) I 5 2 3 G / K 5 2 4 L ；
- (g) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G ；
- (h) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L ；
- (i) L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L ；
- (j) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L ；および
- (k) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L

20

からなる群から選択される、請求項 7 または 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / T 5 0 8 R である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 12】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / K 5 2 4 L である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が T 5 0 8 R / I 5 2 3 G である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が T 5 0 8 R / K 5 2 4 L である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 16】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L で

50

ある、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換が L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

配列番号のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド。

【請求項 21】

前記ポリペプチドが、異種タンパク質の機能活性を保持して F c R n に結合でき、異種タンパク質を含んでなる請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 22】

前記異種タンパク質が、抗体またはその抗原結合性断片を含んでなる、請求項 21 に記載のポリペプチド。

【請求項 23】

前記異種タンパク質が、治療用タンパク質を含む、請求項 21 または 22 に記載のポリペプチド。

【請求項 24】

前記異種タンパク質が、前記 H S A 部分と化学的にまたは組換え的に結合している、請求項 21 ～ 23 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 25】

前記ポリペプチドが、異種非タンパク質作用物質の機能活性を保持し F c R n に結合できる、非タンパク質作用物質に結合する請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 26】

前記異種タンパク質または前記非タンパク質作用物質が、前記 H S A 部分の N 末端アミノ酸に、前記 H S A 部分の C 末端アミノ酸に、または前記 H S A 部分の内部アミノ酸に結合している、請求項 21 ～ 25 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 27】

H S A 部分が H S A ドメイン I の少なくとも一部；または H S A ドメイン I I の少なくとも一部；または H S A ドメイン I の少なくとも一部と、H S A ドメイン I I の少なくとも一部をさらに含んでなる、請求項 1 ～ 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 28】

請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載のポリペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる組成物。

【請求項 29】

請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項 28 に記載の組成物を前記対象に投与するステップを含んでなる、それを必要とする対象を治療する方法。

【請求項 30】

請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、核酸構築物。

【請求項 31】

タンパク質を請求項 1 ～ 15 または 27 のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合させるステップを含んでなる、タンパク質の F c R n 親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる方法。

【請求項 32】

非タンパク質作用物質を請求項 1 ～ 15 または 27 のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合させるステップを含んでなる、非タンパク質作用物質の F c R n 親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

1 関連出願の相互参照

本出願は、その内容全体を参照によって援用する、2011年2月15日に出願された、PCT出願第PCT/US2011/24855号明細書の優先権を主張する。

【0002】

2 配列表への言及

本出願は、2011年8月7日に作成され、45,056バイトのサイズを有する、「MED0554__PCT2__ST25」と題されたテキストファイルとして、EFS-Webを介して本出願と共に提出された配列表を参照によって組み込む。

【背景技術】

【0003】

10

3 発明背景

新生児のFc受容体(FcRn)は、pH依存性機序によって、特にエンドソームの酸性pHで双方の分子を結合し、それらを再循環して細胞表面に戻し、したがって双方の分子をデフォルトのリソソーム分解経路からそらすことによって、IgGおよびヒト血清アルブミン(HSA)の双方の寿命を延長する。FcRn結合能力は、アルブミンのドメインIIIに内在性であることが示されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

20

4 発明の概要

本開示は、HSA関連組成物および使用方法を提供する。本開示は、新生児FcRn結合断片および異種ポリペプチドまたはその生物活性断片を含んでなる、ヒト血清アルブミン(HSA)部分を含んでなるキメラポリペプチド、ならびに薬学的担体と組み合わせられた、キメラポリペプチドを含んでなる組成物を提供する。このようなキメラポリペプチドを生成するのに有用な構築物もまた、開示される。さらに本開示は、キメラポリペプチドと、それらをコードする構築物を生成する方法を教示する。本開示は、ヒト血清アルブミン(HSA)部分を含んでなるポリペプチドをさらに提供し、そのHSA部分は、HSAドメインIII、またはその新生児Fc受容体(FcRn)結合断片を含んでなり、HSAドメインIIIは、1~18個のアミノ酸置換を含んでなって、HSA部分が前記アミノ酸置換を含まない対照ポリペプチドと比較して、ポリペプチドのFcRn親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる。本開示はまた、ヒト血清アルブミン(HSA)部分を含んでなるキメラポリペプチドも提供し、そのHSA部分は、HSAドメインIII、またはその新生児Fc受容体(FcRn)結合断片、および異種タンパク質を含んでなり、キメラポリペプチドは異種タンパク質の機能活性を保持してFcRnに結合することができ、HSAドメインIIIは、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むことで、HSA部分が前記アミノ酸置換を含まない対照キメラポリペプチドと比較して、キメラポリペプチドのFcRn親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる。さらに本明細書では、キメラポリペプチドを使用して、例えばタンパク質の血清半減期を増大させる方法が開示される。ポリペプチドの多様な大集団のスクリーニングに有用な、アデノウイルスライブラリーの生成に有用な、方法およびベクターもまた開示される。このような方法は、FcRn親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる、HSAドメインIIIアミノ酸置換のスクリーニングと同定のために有用である。

30

40

【0005】

特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、HSA部分を含まない対照ポリペプチドと比較して、FcRn親和性増大と血清半減期増大の片方または双方を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは血清半減期増大を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、FcRn親和性増大と、血清半減期増大の双方を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、酸性pH(例えばおよそ5.5のpH)においてFcRn親和性増大を有する。別の実施形態では、キメラポリペプチドは、酸性pH(例えばおよそ5.5のpH)においてFcRn増大を有し、中性pH(例えばおよそ7.4の

50

pH)では、FcRnに対するキメラポリペプチドの親和性は、実質的に変化しない。

【0006】

本開示は、前述の態様および実施形態のいずれかの全ての組み合わせ、ならびに詳細な説明および実施例に記載される実施形態のいずれかとの組み合わせを想定する。

【0007】

5 図面の簡単な説明

本発明を例証する目的で、本発明の特定の実施形態が図面に描写される。しかし本発明は、図面に描写される実施形態の正確な配置、および手段に限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1A】図1は、ヒトFcRnに結合する、ヒト血清アルブミン(HSA)のドメインIIIの動態および平衡解析を提供する。pH5.5で固定化ドメインIIIに結合するヒトFcRnについて、SPR由来の結合、解離動態、および平衡結合定数が、ここに提示される。図1Aは、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)からのHSAのドメインIII(矢印で示される)の成功裏の発現および精製を実証する、クーマシー染色PAGEゲルを表す。

【図1B】図1Bは、CM5チップ固定化ドメインIII上への一連のFcRn濃度の注入によって作成された、結合センサーグラムを表す。

【図1C】図1Cは、定常状態親和性モデルに適合させた、FcRn濃度と対比した、平衡時における結合反応のプロットを表す。

【図2A】図2は、様々な構築物デザインの略図、ならびにHSA融合IgG、およびドメインIII融合IgGの精製および特性解析に関する情報を提供する。図2Aは、組換えIgG-HSAの重鎖のDNA構築物またはIgG-ドメインIII融合タンパク質、ならびにYTE変種を表す。

【図2B】図2Bは、還元および非還元条件下における、精製融合タンパク質(5μg/レーン)のSDS-PAGE分析を表す。

【図2C】図2Cは、精製IgG融合タンパク質の分析サイズ排除クロマトグラフィーを表す。

【図3A】HSAと融合したIgG、およびドメインIIIと融合したIgGに結合する、ヒトFcRnのSPR由来平衡定数を提供する。各FcRn注入について、ヒトFcRn濃度と対比して平衡時のRU(Req)をプロットし、データを定常状態親和性モデルに適合させ、固定化IgG(パネルA)、HSA融合IgG(パネルB)、およびドメインIII融合IgG(パネルC)のKDを計算した。挿入図のセンサーグラムは、X軸上の時間と対比して、Y軸上に空試験を減じた後の固定化リガンドに結合するFcRnの質量(共鳴単位)を示す。

【図3B】HSAと融合したIgG、およびドメインIIIと融合したIgGに結合する、ヒトFcRnのSPR由来平衡定数を提供する。各FcRn注入について、ヒトFcRn濃度と対比して平衡時のRU(Req)をプロットし、データを定常状態親和性モデルに適合させ、固定化IgG(パネルA)、HSA融合IgG(パネルB)、およびドメインIII融合IgG(パネルC)のKDを計算した。挿入図のセンサーグラムは、X軸上の時間と対比して、Y軸上に空試験を減じた後の固定化リガンドに結合するFcRnの質量(共鳴単位)を示す。

【図3C】HSAと融合したIgG、およびドメインIIIと融合したIgGに結合する、ヒトFcRnのSPR由来平衡定数を提供する。各FcRn注入について、ヒトFcRn濃度と対比して平衡時のRU(Req)をプロットし、データを定常状態親和性モデルに適合させ、固定化IgG(パネルA)、HSA融合IgG(パネルB)、およびドメインIII融合IgG(パネルC)のKDを計算した。挿入図のセンサーグラムは、X軸上の時間と対比して、Y軸上に空試験を減じた後の固定化リガンドに結合するFcRnの質量(共鳴単位)を示す。

【図4】FcRnのためのHSA上のエピトープが、立体構造エピトープであることを示

10

20

30

40

50

唆する証拠を提供する。3つの異なる様式で処理したセファロース (S) -H S A、S -I g GまたはS -トリリスをヒトF c R nと共に、p H 5. 5でインキュベートした。結合F c R nを溶出させて、抗 β 2-ミクログロブリン抗体を用いた免疫ブロット法によって定量化した。分子量マーカー (M、k D単位) の位置が示される。レーン1は、全ての吸着材サンプルに添加された量である、20 μ gのヒトF c R nを含有する。

【図5A】酵母細胞 (S. セレヴィシエ (S. cerevisiae)) 表面に提示されるH S AおよびドメインI I Iが、F c R n結合能力を保持することを示す。図5Aは、F I T C結合抗H S A抗体を使用した、ガラクトース誘導性p Y D 1細胞表面ディスプレイプラスミドにより形質転換された、S. セレヴィシエ (S. cerevisiae) 細胞上のH S AまたはドメインI I Iのフローサイトメトリー検出を表す。細胞は、表示の時間によりガラクトースで誘導された。

10

【図5B】酵母細胞 (S. セレヴィシエ (S. cerevisiae)) 表面に提示されるH S AおよびドメインI I Iが、F c R n結合能力を保持することを示す。図5Bは、フローサイトメトリーを使用して抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって視覚化された、48時間にわたり誘導されたS. セレヴィシエ (S. cerevisiae) 細胞上に提示されたH S AまたはドメインI I Iに対する、ビオチン化ヒトF c R nの結合を表す。F I T Cならびにフィコエリトリンのバックグラウンド蛍光については、s c f vで形質転換された酵母細胞を対照として使用した。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度 (対数目盛り) のヒストグラムとして表される。

【図6A】異なる種 (ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマ) からのドメインI I Iのアミノ酸配列アラインメントを提供する。パネルA~Dのアラインメントがニワトリを含むのに対し、パネルE~Hではニワトリは除外されている。異なる種間で保存されたアミノ酸残基を実線で示し、保存されたシステイン残基を点線で示す。網掛けしたアミノ酸残基は、種間で保存されていない。図6のアミノ酸の番号付けは、完全長成熟H S Aに対するドメインI I Iの番号に関して示されるのではなく、ヒトドメインI I Iのみに関することに留意されたい。

20

【図6B】図6Aの続きである。

【図6C】図6Bの続きである。

【図6D】図6Cの続きである。

【図6E】図6Dの続きである。

【図6F】図6Eの続きである。

【図6G】図6Fの続きである。

【図6H】図6Gの続きである。

30

【図7】野生型を有するI g GへのH S Aの融合が、I g G-Y T E変種で見られるのと同様のレベルに、血清持続を増大させることを示す。血清に残留する注入サンプル%が、経時的にプロットされる (1~240時間)。

【図8A】s c F v-F c細胞表面ディスプレイライブラリー侵入ベクターのプラスミドマップを描写する。パネルAは、プロモーター (ここではC M Vプロモーター) と作動可能に連結して、ポリA配列 (ここではB G HポリA配列) で終結する、s c F v-F c-G P I-アンカーカセットを含有する、p E N D i s p l a yベクターのプラスミドマップを描写する。s c F v部分は、S f i IおよびN o t I制限酵素部位で挟まれて、多様なs c F v配列のクローニングを容易にする。a t t L 1およびa t t L 2部位は、s c F v-F c-G P I-アンカー発現カセットの側面に位置する。

40

【図8B】s c F v-F c細胞表面ディスプレイライブラリー侵入ベクターのプラスミドマップを描写する。パネルBは、パネルAで示されるベクターをベースとするが、s c F v-F c-G P I-アンカーカセットのポリAテール後にO r i P配列が組み込まれた (図9Cを参照されたい)、p E N D i s p l a y-O r i Pベクターのプラスミドマップを描写する。

【図9A】E B N A-1およびO r i Pの代表例を提供する。E B N A-1のアミノ酸お

50

よびヌクレオチド配列が、それぞれパネルAおよびBに提供される。Ori Pの配列は、パネルCで提供される。

【図9B】EBNA-1およびOri Pの代表例を提供する。EBNA-1のアミノ酸およびヌクレオチド配列が、それぞれパネルAおよびBに提供される。Ori Pの配列は、パネルCで提供される。

【図9C】EBNA-1およびOri Pの代表例を提供する。EBNA-1のアミノ酸およびヌクレオチド配列が、それぞれパネルAおよびBに提供される。Ori Pの配列は、パネルCで提供される。

【図10】対象タンパク質を発現させるための、代表的な一般的アデノウイルス発現ベクターの概略図を提供する。描写されるベクターは、1つまたは複数の対象タンパク質をコードする対象DNA配列；Ori P配列、および任意選択的にEBNA-1コード領域を含む。これらの構成要素は、ベクター構築のために使用されていてもよいatt組換え部位で、任意選択的に挟まれる。これらの構成要素は、片側に、本例ではE1および／またはE3遺伝子が欠失している、アデノウイルスゲノムがあり、側面にITR配列がある。3'および5' ITR配列が示される。ベクターはまた、構築、増殖、および選択を容易にするための、細菌細胞における複製（例えば大腸菌（E. coli）起源）および抗生物質選択（例えばアンピシリン（ampicillin）耐性）のための配列も提供し、これらの構成要素は、レスキューアデノウイルスに組み込まれないように位置される。

【図11A】哺乳類細胞（293F細胞）表面に提示されるHSAが、FcRn結合能力を保持することを示す。パネルAは、HSA部分（斜線ボックス）の側面に位置する、CMVプロモーター（太線）、シグナル配列（太い点線）、N末端Flagタグ（細い点線）、(G₄S)₃リンカー（細い実線）と、DAF-GPI配列とを含んでなる、pEN-HSA-GPIと称される哺乳類発現構築物を描写する。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度（対数目盛り）のヒストグラムとして表される。

【図11B】哺乳類細胞（293F細胞）表面に提示されるHSAが、FcRn結合能力を保持することを示す。パネルBは、FITC結合抗HSA抗体を使用した、pEN-HSA-GPI（パネルA）から生成されたアデノウイルスに感染させた293F細胞表面の16および24時間後のHSA、または対照scFv-Fc融合タンパク質をコードする対照プラスミドのフローサイトメトリー検出を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度（対数目盛り）のヒストグラムとして表される。

【図11C】哺乳類細胞（293F細胞）表面に提示されるHSAが、FcRn結合能力を保持することを示す。パネルCおよびDは、フローサイトメトリーを使用して、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって視覚化された、293F細胞上に提示されたHSAに対する、ビオチン化ヒトFcRn（それぞれ25 μg/mlおよび5 μg/ml）の結合を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度（対数目盛り）のヒストグラムとして表される。

【図11D】哺乳類細胞（293F細胞）表面に提示されるHSAが、FcRn結合能力を保持することを示す。パネルCおよびDは、フローサイトメトリーを使用して、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって視覚化された、293F細胞上に提示されたHSAに対する、ビオチン化ヒトFcRn（それぞれ25 μg/mlおよび5 μg/ml）の結合を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度（対数目盛り）のヒストグラムとして表される。

【図12】293F細胞上に提示される、野生型HSA（HSA-wt）および2つのHSA変異ライブラリー（HSA-DIII-1およびHSA-DIII-2）に対する、ビオチン化ヒトFcRnの結合プロファイルの変化を示す。パネルAは、野生型および変異HSA-DIIIライブラリーに感染させた、293F細胞表面のHSAのフローサイトメトリー検出を表す。パネルBは、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって視覚化された、細胞表面のビオチン化ヒトFcRn結合HSAのフローサイトメトリー検出を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度（対数目盛り）のヒストグラムとして表される。

10

20

30

40

50

【図13A】野生型HSA (HSA-wt、パネルA)、および2つのHSA変異ライブラリー (HSA-DIII-Ilib1およびHSA-DIII-Ilib2、それぞれパネルBおよびC) を発現する細胞のFACS選別プロファイルを示し、染色されたビオチン化ヒトFcRn ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) は、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって検出された。

【図13B】野生型HSA (HSA-wt、パネルA)、および2つのHSA変異ライブラリー (HSA-DIII-Ilib1およびHSA-DIII-Ilib2、それぞれパネルBおよびC) を発現する細胞のFACS選別プロファイルを示し、染色されたビオチン化ヒトFcRn ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) は、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって検出された。

【図13C】野生型HSA (HSA-wt、パネルA)、および2つのHSA変異ライブラリー (HSA-DIII-Ilib1およびHSA-DIII-Ilib2、それぞれパネルBおよびC) を発現する細胞のFACS選別プロファイルを示し、染色されたビオチン化ヒトFcRn ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) は、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって検出された。

【図14A】選別前と1回目および2回目の選別後における、細胞表面に野生型HSA (HSA-wt)、HSA-DIII-Ilib1変異ライブラリーを発現する293F細胞に対する、ビオチン化ヒトFcRnの結合プロファイルの変化を示す。パネルAは、選別前と1回目および2回目の選別後における、野生型、HSA-DIII-Ilib1を発現する293F細胞表面のHSAのフローサイトメトリー検出を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度 (対数目盛り) のヒストグラムとして表される。

【図14B】選別前と1回目および2回目の選別後における、細胞表面に野生型HSA (HSA-wt)、HSA-DIII-Ilib1変異ライブラリーを発現する293F細胞に対する、ビオチン化ヒトFcRnの結合プロファイルの変化を示す。パネルBおよびCは、フローサイトメトリーを使用して、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって視覚化された、同一細胞セットに対する、ビオチン化ヒトFcRn (それぞれ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) の結合を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度 (対数目盛り) のヒストグラムとして表される。

【図14C】選別前と1回目および2回目の選別後における、細胞表面に野生型HSA (HSA-wt)、HSA-DIII-Ilib1変異ライブラリーを発現する293F細胞に対する、ビオチン化ヒトFcRnの結合プロファイルの変化を示す。パネルBおよびCは、フローサイトメトリーを使用して、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって視覚化された、同一細胞セットに対する、ビオチン化ヒトFcRn (それぞれ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) の結合を表す。実験は、細胞数と対比して、蛍光強度 (対数目盛り) のヒストグラムとして表される。

【図15】細胞表面に提示される変異HSAに対するFcRnの結合が、pH依存性であることを示す。パネルAおよびBは、pH5.5 ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ FcRn; パネルA) およびpH7.2 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$; パネルB) において、対照scFv-Fc融合タンパク質、野生型HSA、および3つの代表的変異 (表5を参照されたい) を発現する293F細胞の表面において、抗ストレプトアビジンフィコエリトリンによって検出された、ビオチン化ヒトFcRnのフローサイトメトリー検出を示す。パネルCは、FITCコンジュゲート抗HSA抗体を使用した、これらの細胞表面のHSAのフローサイトメトリー検出を示す。

【図16】フローサイトメトリーによる測定で、大部分の単離HSA変異が、より高いFcRn親和性を有することを示す。フローサイトメトリーによって、異なる濃度におけるビオチン化ヒトFcRn結合について、野生型HSAおよび選択された変異体パネルを分析した。データはMFIとして、FcRn濃度に対してプロットされる。

【図17】解析されたHSA構造体上における、いくつかの変異の位置を描写する (PDB受入番号1BM0)。構造体の大半は、リボン略図として表され、残基L463、E495、T508、I523、およびK534は、スティックによって表され、矢印で示さ

10

20

30

40

50

れる。残基 492～536 を包含する、ループ 6 および 7 と、ヘリックス 7 および 8 が丸で囲まれる。ホットスポットおよび好ましいスポットの大部分は、この領域に見られる

【図 18】ヒト FcRn 遺伝子組換えマウス中における、いくつかのコンビナトリアル変異 HSA の半減期曲線を示す。これらの結果は、実施例 8. 14 の表 11 にも要約される。

【発明を実施するための形態】

【0009】

6 発明の詳細な説明

6. 1 緒言

新生児の Fc 受容体 (FcRn) は、pH 依存性機序によって、特にエンドソームの酸性 pH で双方の分子を結合し、それらを再循環して細胞表面に戻し、したがって双方の分子をデフォルトのリソソーム分解経路からそらすことによって、IgG およびヒト血清アルブミン (HSA) の双方の寿命を延長する。FcRn 結合能力は、アルブミンのドメイン I I I に内在性であることが示されている。本明細書で実証されるように、HSA の FcRn 結合断片の付加を使用して、タンパク質の血清半減期を増大させ、および／または抗体、抗体代替物、タンパク質、タンパク質スキャフォールド、およびペプチドなどの治療薬の FcRn 結合親和性を増大させ得る。特に本明細書で実証されるように、酸性 pH (例えばおよそ 5.5 の pH) では FcRn 結合親和性が増大するのに対し、中性 pH (例えばおよそ 7.4 の pH) では親和性は実質的に変化しない。本開示の FcRn 結合領域変種を含んでなるキメラポリペプチドは、野生型 FcRn 結合領域よりもなおさらに、タンパク質の血清半減期または FcRn 結合親和性を増大させてもよい。本発明の HSA 変種ポリペプチドは、治療標的に結合するスキャフォールドの役割を果たしてもよく、または治療薬と共役してもよい。

【0010】

本開示は、ドメイン I I I の変種を提供する。このようなドメイン I I I の変種は、単独で使用され、または追加的な HSA 配列の文脈で使用されて、異種タンパク質および／または非タンパク質作用物質の血清半減期および／または FcRn 結合親和性を増大させ得る。

【0011】

本明細書で開示されるキメラポリペプチドと HSA 変種は、多数の用途を有する。タンパク質およびその他の分子は、時に比較的急速に人体または動物体から除去されると理解される。急速なクリアランスは、動物モデル中でタンパク質およびその他の分子を研究する能力を失わせ得て、治療目的で効果的にそれらを使用する能力を失わせ得る。場合によっては、タンパク質は、非常に急速に除去されるので、それは治療効果を有しない。その他の事例では、タンパク質は頻繁な投与を要する速度で除去される。頻繁な投与は治療法に付随するコストを上昇させて、薬剤投与計画の非服薬遵守のリスクもまた増大させる。場合によっては、タンパク質は、より大きな用量の投与を要する速度で除去される。活性薬剤のより大きな用量は、免疫反応をはじめとする、副作用のリスクを増大させることもある。

【0012】

本開示のキメラポリペプチドおよび変種 HSA ポリペプチドは、血清半減期および／または FcRn 親和性を増大させることにより、急速なまたは比較的急速なタンパク質クリアランスに付随する問題に対処するのを助ける。同様に、非タンパク質作用物質は、本開示の変種 HSA ポリペプチドと結合して、血清半減期および／または FcRn 親和性を増大させ得る。

【0013】

6. 2 用語法

本発明のさらに詳細な記述を継続する前に、特定の組成物または工程段階は変動することもあるため、本発明はそれらに限定されないものと理解される。本明細書および添付の特許請求範囲の用法では、文脈上例外が明記されていない限り、単数形「a」、「an」

、および「the」は、複数指示対象を含むことに留意すべきである。

【0014】

特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が関連する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。例えば Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; および Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press が、本発明で使用される多くの用語の一般的辞書を当業者に提供する。

10

【0015】

アミノ酸は、本明細書では、それらの一般に知られている三文字記号、または IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission によって推奨される一文字記号のいずれによって参照されてもよい。同様にヌクレオチドは、それらの一般に認められた一文字コードによって参照されてもよい。本明細書の用法では「アミノ酸置換」は、親ポリペプチド配列中の特定位置における、別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を意味する。例えば置換 L463N は、その中で位置 463 のロイシンが、アスパラギンで置換されている、変種ポリペプチドを指す。

20

【0016】

特に断りのない限り、抗体の可変領域、相補性決定領域 (CDR)、およびフレームワーク領域 (FR) 内のアミノ酸の番号付けは、Kabata et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) に記載の Kabata 定義に従う。この番号方式を使用して、実際の直鎖アミノ酸配列は、可変領域の FR または CDR の短縮または挿入に相当する、より少ないまたは追加的なアミノ酸を含有してもよい。例えば重鎖可変領域は、H2 の残基 52 の後に、単一アミノ酸挿入 (Kabata による残基 52a) を含み、重鎖 FR 残基 82 の後に挿入残基 (例えば Kabata による残基 82a、82b、および 82c など) を含んでもよい。残基の Kabata 番号付けは、「標準」Kabata 番号配列を用いた、抗体配列の相同領域における整列によって、所与の抗体について決定されてもよい。フレームワーク残基の最大の整列は、Fv 領域で使用されるために、番号方式において頻繁に、「スペーサー」残基の挿入を要する。これに加えて、種間のまたは対立遺伝子の多様性のために、任意の所与の Kabata 部位数の特定の個々の残基の同一性は、抗体鎖毎に変動してもよい。

30

【0017】

本明細書の用法では、免疫グロブリンとしてもまた知られている「抗体 (antibody)」および「抗体 (antibodies)」という用語は、(完全長モノクローナル抗体をはじめとする) モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも 2 つの異なるエピトープ結合断片 (例えば二重特異性抗体) から形成された多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖 Fvs (scFv)、一本鎖抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、所望の生物学的活性 (例えば抗原結合部分) を提示する抗体断片、ジスルフィド結合 Fvs (dsFv)、および抗イディオタイプ (抗 Id) 抗体 (例えば本発明の抗体に対する抗 Id 抗体をはじめとする)、細胞内抗体、および上のいずれかのエピトープ結合断片を包含する。特に抗体としては、免疫グロブリン分子と、例えば少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する分子などの免疫グロブリン分子の免疫学的活性断片が挙げられる。免疫グロブリン分子は、任意のアイソタイプ (例えば IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、および IgY)、サブアイソタイプ (例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およ

40

50

び I g A 2) またはアロタイプ (例えば G m、例えば G 1 m (f、z、a、または x)、G 2 m (n)、G 3 m (g、b、または c)、A m、E m、および K m (1、2 または 3)) であり得る。抗体は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスなどはじめとするが、これに限定されるものではない任意の哺乳類、または (例えばニワトリなどの) 鳥類などのその他の動物に由来してもよい。

【0018】

本明細書の用法では、「完全長 H S A」という用語は、成熟完全長ヒト血清アルブミンタンパク質、またはこのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列を指す。完全長 H S A タンパク質は、(N 末端プローおよびプレプロー配列の除去に続いて) およそ 585 個のアミノ酸である。成熟完全長 H S A (完全長成熟 H S A とも称される) タンパク質は、配列番号 2 で記載される。特定の実施形態では、完全長 H S A は、プロ配列がない H S A の成熟完全長形態を指す。(N 末端プローおよびプレプロ配列の除去に先行する) プレプロ H S A の配列は、609 個のアミノ酸であり、Gen Bank 受入番号 NP_000468 で記載される。これに加えて、特定の個々の残基の同一性は、対立遺伝子多様性のために、配列番号 2 で示されるものから変動してもよい。H S A のドメイン I I I 中に生じる対立遺伝子のバリエーションとしては、残基 410 における R→C；残基 466 における K→E；残基 479 における E→K；残基 494 における D→N；残基 501 における E→K；残基 505 における E→K；残基 533 における V→M；残基 536 における K→E；残基 541 における K→E；残基 550 における D→A または D→G；残基 560 における K→E；残基 563 における D→N；残基 565 における E→K；残基 570 における E→K；残基 573 における K→E；残基 574 における K→E；残基 572～585 における G K K L V A A S Q A A L G L→P T M R I R E R K；および 575～585 における L V A A S Q A A L G L→T C C C K S S C L R L I T S H L K A S Q P T M R I R E R K が挙げられ、番号付けは完全長成熟 H S A 中の位置に対応する。

【0019】

本明細書の用法では、「H S A のドメイン I I I」という用語は、完全長成熟 H S A のアミノ酸 381～585 にわたる、およそ 205 個のアミノ酸である、従来の H S A のドメイン I I I、またはこのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列を指す。H S A のドメイン I I I はまた、本明細書でドメイン I I I または単に D I I I と略される。ドメイン I I I ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 で記載される。上述のように特定の個々の残基の同一性は、対立遺伝子の多様性のために、配列番号 1 で提示されるものから変動してもよい。

【0020】

本明細書の用法では、「キメラポリペプチド」という用語は、互いに異種でない、少なくとも 2 つの部分を含んでなるポリペプチドを指す。例えば融合ポリペプチドまたは融合タンパク質とも称されるキメラポリペプチドは、異種タンパク質部分に連結する H S A 部分を少なくとも含んでなる。H S A 部分および異種タンパク質部分は、それ自身が、例えば F c またはその他の部分との融合物であり得る。H S A 部分および異種タンパク質部分は、共有結合または非共有結合相互作用によって連結してもよい。一例として、H S A 部分と異種タンパク質部分は、互いに化学的に結合してもよく、または組換え的に融合してもよい (例えばインフレームの翻訳融合)。

【0021】

本明細書の用法では、「異種タンパク質」という用語は、H S A でないタンパク質の全部または一部を指す。「異種タンパク質」という総称が本明細書で使用されるが、用語は、様々な長さの生物活性ペプチド、ならび抗体および抗体断片をはじめとする、完全長または実質的に完全長のタンパク質を包含することが意図される。好ましい異種タンパク質は、治療目的で、使用されまたは研究され得る。異種タンパク質の例示的なクラスとしては、酵素、サイトカイン、および増殖因子が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0022】

10

20

30

40

50

本明細書の用法では、H S Aポリペプチドとしては、野生型H S Aポリペプチドの様々な生物活性断片および変種、融合タンパク質、および修飾形態が挙げられる。このようなH S Aポリペプチドの生物活性断片または変種、融合タンパク質、および修飾形態は、天然H S Aタンパク質とかなりの配列同一性があるアミノ酸配列の少なくとも一部を有し、少なくとも天然H S Aタンパク質のF c R n結合活性を保持する。特定の実施形態では、H S Aポリペプチドの生物活性断片、変種、または融合タンパク質は、H S Aポリペプチドと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一である、アミノ酸配列を含んでなる。本明細書の用法では、「断片」には、F c R n結合活性を示す生物活性断片または生物活性変種が含まれると理解される。適切な生物活性断片を使用してキメラポリペプチド生成し得て、本明細書に記載される方法のいずれかにおいて、このようなキメラポリペプチドを使用し得る。

10

【0023】

本明細書の用法では、「変異された」、「変異体」などという用語は、部位特異的変異誘発のための周知の技術、または任意のその他の従来法を使用して、1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加または置換を受けた分子、特にH S Aポリペプチドを指す。

【0024】

6. 3 H S AドメインI I I

特定の態様では、本開示は、H S AドメインI I Iを含んでなる、ヒト血清アルブミン(H S A)変種ポリペプチドまたはその新生児F c受容体(F c R n)結合断片を提供し、前記変種ポリペプチドはF c R nに結合し得て、前記H S AドメインI I Iは、1~18個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換を欠く対照H S Aポリペプチドと比較して、前記変種ポリペプチドの血清半減期を増大させ、またはF c R n親和性を増大させる。

20

【0025】

特定の実施形態では、1~18個のアミノ酸置換は、F c R nに対するH S A変種ポリペプチドの親和性を増大させる。特定の実施形態では、1~18個のアミノ酸置換は、H S A変種ポリペプチドの血清半減期を増大させる。特定の実施形態では、1~18個のアミノ酸置換は、F c R nに対するH S A変種ポリペプチドの親和性と、H S A変種ポリペプチドの血清半減期の双方を増大させる。特定の実施形態では、1~18個のアミノ酸置換は、酸性pH(例えばおよそ5.5のpH)において、F c R nに対するH S A変種ポリペプチドの親和性を増大させる。特定の実施形態では、1~18個のアミノ酸置換は、酸性pH(例えばおよそ5.5のpH)において、F c R nに対するH S A変種ポリペプチドの親和性を増大させるが、中性pH(例えばおよそ7.4のpH)では、F c R nに対するH S A変種ポリペプチドの親和性を実質的に変化させない。

30

【0026】

特定の実施形態では、H S A変種はF c R nに結合し、前記対照H S Aポリペプチドと異なるオフ速度またはオン速度を有する。例えば特定の実施形態では、H S A変種はF c R nに結合し、より急速なオン速度および/またはより緩慢なオフ速度を有する。別の実施形態では、オン速度はより緩慢であり、および/またはオフ速度はより急速である。

【0027】

特定の実施形態では、本開示は、H S A部分を含むキメラポリペプチドを提供し、そのH S A部分は、ドメインI I I、またはそのF c R n結合部分、および異種タンパク質を含んでなり、キメラポリペプチドは異種タンパク質の機能活性を保持する。特定の実施形態では、H S A部分は、H S Aポリペプチド全体を含んでなり、またはH S AドメインI I I、またはその新生児F c受容体(F c R n)結合断片を含んでなる生物活性断片を含んでなる。特定の実施形態では、H S A部分は、H S AドメインI I I、またはその新生児F c受容体(F c R n)結合断片と、例えばH S AドメインIの少なくとも一部またはH S AドメインI Iの少なくとも一部、またはH S AドメインIおよびI Iの少なくとも一部などのH S Aの別のドメインの少なくとも一部とを含んでなる。本明細書の用法では、H S AドメインIは残基1~197を含んでなり; H S AドメインI Iは残基189~

40

50

385を含んでなり；HSAドメインIIIは残基381～585を含んでなり、番号付けは完全長成熟HSA中の位置に対応する。

【0028】

特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、HSA部分を含まない対照ポリペプチドと比較して、FcRn親和性増大と血清半減期増大の片方または双方を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、FcRn親和性増大を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、血清半減期増大を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、FcRn親和性増大と、血清半減期増大の双方を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは酸性pH（例えばおよそ5.5のpH）において、FcRn親和性増大を有する。別の実施形態では、キメラポリペプチドは、酸性pH（例えばおよそ5.5のpH）においてFcRn増大を有し、中性pH（例えばおよそ7.4のpH）では、FcRnに対するキメラポリペプチドの親和性は、実質的に変化しない。

10

【0029】

さらに、本明細書に記載されるように、特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばHSA変種またはキメラポリペプチド）のHSA部分のドメインIIIは、1～18個のアミノ酸置換を含み、HSA部分が前記アミノ酸置換を含まない対照キメラポリペプチドと比較して、キメラポリペプチドのFcRn親和性と血清半減期の片方または双方を増大させる。特定の実施形態では、1～18個のアミノ酸置換は、FcRnに対するキメラポリペプチドの親和性を増大させる。特定の実施形態では、1～18個のアミノ酸置換は、キメラポリペプチドの血清半減期を増大させる。特定の実施形態では、1～18個のアミノ酸置換は、FcRnに対するキメラポリペプチドの親和性と、キメラポリペプチドの血清半減期の双方を増大させる。

20

【0030】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばHSA変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のHSA部分のドメインIIIは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18個のアミノ酸置換を含む。同様に、ドメインIIIを含んでなるHSA変種ポリペプチド、またはそのFcRn結合部分の文脈で、ドメインIIIは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18個のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態では、そのアミノ酸置換は、対立遺伝子変種中に存在する別の残基への単一アミノ酸の置換だけではない。

30

【0031】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばHSA変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のHSA部分のドメインIIIは、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかに、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：残基381、残基383、残基391、残基401、残基402、残基407、残基411、残基413、残基414、残基415、残基416、残基424、残基426、残基434、残基442、残基445、残基447、残基450、残基454、残基455、残基456、残基457、残基459、残基463、残基495、残基506、残基508、残基509、残基511、残基512、残基515、残基516、残基517、残基519、残基521、残基523、残基524、残基525、残基526、残基527、残基531、残基535、残基538、残基539、残基541、残基557、残基561、残基566、残基569。

40

【0032】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばHSA変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のHSA部分のドメインIIIは、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかに、アミノ酸置換を含んでなる：（a）残基383および413；（b）残基401および523；（c）残基407および447；（d）残基407および447および539；（e）残基407および509；（f）残基407および526；（g）残基411および535；（h）残基414および456；（i）残

50

基 4 1 5 および 5 6 9 ; (j) 残基 4 2 6 および 5 2 6 ; (k) 残基 4 4 2 および 4 5 0
および 4 5 9 ; (l) 残基 4 6 3 および 5 0 8 ; (m) 残基 5 0 8 および 5 1 9 および 5
2 5 ; (n) 残基 5 0 9 および 5 2 7 ; (o) 残基 5 2 3 および 5 3 8 ; (p) 残基 5 2
6 および 5 5 7 ; (q) 残基 5 4 1 および 5 6 1 ; (r) 残基 4 6 3 および 5 2 3 ; (s
) 残基 5 0 8 および 5 2 3 ; (t) 残基 5 0 8 および 5 2 4 ; (u) 残基 4 6 3、5 0 8
、および 5 2 3 ; (v) 残基 4 6 3、5 0 8、および 5 2 4 ; (w) 残基 5 0 8、5 2 3
、および 5 2 4 ; (x) 残基 4 6 3、5 0 8、5 2 3、および 5 2 4 ; (y) 残基 4 6 3
および 5 2 4 ; (z) 残基 5 2 3 および 5 2 4 ; および (a a) 残基 4 6 3、5 2 3、お
よび 5 2 4。

【0033】

一実施形態では、ポリペプチド（例えば H S A 変種ポリペプチドまたはキメラポリペ
チド）の H S A 部分のドメイン I I I は、配列番号 1 8 を含んでなり、その中で X₁ はロ
イシンでなく、および／または X₂ はスレオニンでなく、および／または X₃ はイソロイ
シンでなく、および／または X₄ はリジンでない。特定の実施形態では、X₁ は、システ
イン、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、アスパラギン、セリン
、またはグルタミンであり；X₂ は、システイン、グルタミン酸、イソロイシン、リジン
、アルギニン、またはセリンであり；X₃ は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、
グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイ
シン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオ
ニン、バリン、トリプトファン、またはチロシンであり；および X₄ は、アラニン、フェ
ニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、グルタミ
ン、スレオニン、またはバリンである。別の実施形態では、X₁ はフェニルアラニンまた
はアスパラギンであり；X₂ はアルギニンまたはセリンであり；X₃ はアスパラギン酸、
グルタミン酸、グリシン、フェニルアラニン、リジン、またはアルギニンであり；およ
び／または X₄ はロイシンである。なおも別の実施形態では、X₁ はアスパラギンであり、
および／または X₂ はアルギニンであり、および／または X₃ はグリシンであり、およ
び／または X₄ はロイシンである。

【0034】

特定の実施形態では、F c R n 親和性増大および／または血清半減期増大は異なる対照
と対比して評価される。例えばキメラポリペプチドの特性は、H S A 部分不在下で異種タン
パク質と対比して評価し得て、またはアミノ酸置換不在下で、および／または異種タン
パク質不在下で、同一または類似 H S A 部分と対比して評価し得る。同様に H S A 変種ポ
リペプチドは、アミノ酸置換を有しない H S A 分子と対比して評価し得る。

【0035】

特定の実施形態では、キメラポリペプチド／H S A 変種ポリペプチドは、前記対照ポリ
ペプチドよりも高い親和性で、F c R n に結合する。特定の実施形態では、1 ～ 1 8 個の
アミノ酸置換は、酸性 p H（例えばおよそ 5. 5 の p H）において、F c R n に対するキ
メラポリペプチド／H S A 変種ポリペプチドの親和性を増大させる。特定の実施形態では
、1 ～ 1 8 個のアミノ酸置換は、酸性 p H（例えばおよそ 5. 5 の p H）において、F c
R n に対するキメラポリペプチド／H S A 変種ポリペプチドの親和性を増大させるが、中
性 p H（例えばおよそ 7. 4 の p H）では、F c R n に対するキメラポリペプチドの親和
性を実質的に変化させない。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、酸性 p H に
おいてより高い親和性で F c R n に結合し、血清半減期増大を有する。

【0036】

特定の実施形態では、キメラポリペプチド／H S A 変種ポリペプチドは F c R n に結合
し、前記対照ポリペプチドと異なるオフ速度オン速度を有する。例えば、特定の実施形態
では、キメラポリペプチド／H S A 変種ポリペプチドは、F c R n に結合して、より急速
なオン速度および／またはより緩慢なオフ速度を有する。別の実施形態では、オン速度は
より緩慢であり、および／またはオフ速度はより急速である。

【0037】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A 変種、またはH S A 部分があるキメラポリペプチド）のH S A ドメインI I I は、1～10個のアミノ酸置換を含んでなり、H S A 部分が前記アミノ酸置換を含まない対照ポリペプチドと比較して、F c R n に対するポリペプチドの親和性増大させ、および／またはポリペプチドの血清半減期を増大させる。特定の実施形態では、H S A ドメインI I I は、1つのアミノ酸置換を含んでなる。特定の実施形態では、H S A ドメインI I I は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸置換を含んでなる。特定の実施形態ではH S A ドメインI I I は、11、12、13、14、15、16、17、または18個のアミノ酸置換を含んでなる。特定の実施形態では、H S A ドメインI I I は、少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる。特定の実施形態では、H S A ドメインI I I は、少なくとも10個のアミノ酸置換を含んでなる。

10

【0038】

例示的なアミノ酸置換としては、(i) アラニンによる置換；(i i) 保存的アミノ酸置換；(i i i) 非保存的アミノ酸置換が挙げられる。本開示は、所与のポリペプチドのドメインI I I 中のアミノ酸置換が全て、これらの置換カテゴリーの1つの構成員であってもよいことが想定され、また所与のポリペプチド（例えばH S A 変種、H S A 部分があるキメラポリペプチド）のドメインI I I 中のアミノ酸置換が全て、個々に独立してこれらのカテゴリーから選択されてもよいことも想定される。

【0039】

特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、H S A 中の残基のアラニンへの置換である。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、別の中性アミノ酸残基によって、H S A 中の所与の中性アミノ酸残基を置き換える。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、別の酸性アミノ酸残基によって、H S A 中の所与の酸性アミノ酸残基を置き換える。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、別の塩基性アミノ酸残基によって、H S A 中の所与の塩基性アミノ酸残基を置き換える。本開示は、各置換が、前述した置換クラスから独立して選択される、実施形態を想定する。前述の置換カテゴリーの任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えばH S A 変種、H S A 部分のあるキメラポリペプチド）が、具体的に検討される。

20

30

【0040】

特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：リジン（K；L y s）、アルギニン（R；A r g）；ヒスチジン（H；H i s）。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：アスパラギン酸（D；A s p；アスパラギン酸）およびグルタミン酸（E；G l u；グルタミン酸）。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：アスパラギン（N；A s n）、グルタミン（Q；G l n）、セリン（S；S e r）、スレオニン（T；T h r）、およびチロシン（Y；T y r）。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：アラニン（A；A l a）、バリン（V；V a l）、イソロイシン（I；I l e）、ロイシン（L；L e u）、プロリン（P；P r o）、フェニルアラニン（F；P h e）、トリプトファン（W；T r p）、メチオニン（M；M e t）、システイン（C；C y s）、およびグリシン（G；G l y）。特定の実施形態では、置換（少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S A ドメインI I I 置換）は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン。特定の実施形態では、置換（少なくと

40

50

も1、2、3、4、5、6個などのH S AドメインI I I置換)は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：システイン、セリン、およびスレオニン。特定の実施形態では、置換(少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S AドメインI I I置換)は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸。特定の実施形態では、置換(少なくとも1、2、3、4、5、6個などのH S AドメインI I I置換)は、以下の群内の別のアミノ酸によって、1つのアミノ酸を置き換える。グリシン、セリン、スレオニン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン。本開示は、各置換が、前述した置換カテゴリーから独立して選択される、実施形態を想定する。前述の置換クラスの任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド(例えばH S A変種、H S A部分のあるキメラポリペプチド)が、具体的に検討される。

10

【0041】

特定の実施形態では、F c R n親和性増大、および／または血清半減期増大を有する、ポリペプチド(例えばH S A変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド)のH S A部分のドメインI I Iは、以下からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：V 3 8 1 N、V 3 8 1 Q、E 3 8 3 A、E 3 8 3 G、E 3 8 3 I、E 3 8 3 L、E 3 8 3 V、N 3 9 1 A、N 3 9 1 G、N 3 9 1 I、N 3 9 1 L、N 3 9 1 V、Y 4 0 1 D、Y 4 0 1 E、K 4 0 2 A、K 4 0 2 G、K 4 0 2 I、K 4 0 2 L、K 4 0 2 V、L 4 0 7 F、4 0 7 H、4 0 7 M、L 4 0 7 N、L 4 0 7 Q、4 0 7 R、L 4 0 7 W、L 4 0 7 Y、Y 4 1 1 Q、Y 4 1 1 N、K 4 1 3 C、K 4 1 3 S、K 4 1 3 T、K 4 1 4 S、K 4 1 4 T、V 4 1 5 C、V 4 1 5 L、V 4 1 5 S、V 4 1 5 T、Q 4 1 6 H、Q 4 1 6 P、V 4 2 4 A、V 4 2 4 D、V 4 2 4 G、V 4 2 4 I、V 4 2 4 L、V 4 2 4 M、V 4 2 4 N、V 4 2 4 Q、V 4 2 4 W、V 4 2 6 D、V 4 2 6 E、V 4 2 6 F、V 4 2 6 H、V 4 2 6 L、V 4 2 6 N、V 4 2 6 P、V 4 2 6 Q、G 4 3 4 C、G 4 3 4 S、G 4 3 4 T、E 4 4 2 K、E 4 4 2 R、R 4 4 5 F、R 4 4 5 W、R 4 4 5 Y、P 4 4 7 S、P 4 4 7 T、E 4 5 0 D、E 4 5 0 E、S 4 5 4 C、S 4 5 4 M、S 4 5 4 T、V 4 5 5 N、V 4 5 5 Q、V 4 5 6 N、V 4 5 6 Q、L 4 5 7 F、L 4 5 7 W、L 4 5 7 Y、Q 4 5 9 K、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 F、T 5 0 6 M、T 5 0 6 N、T 5 0 6 R、T 5 0 6 W、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 C、F 5 0 9 D、F 5 0 9 G、F 5 0 9 I、F 5 0 9 L、F 5 0 9 M、F 5 0 9 P、F 5 0 9 V、F 5 0 9 W、F 5 0 9 Y、A 5 1 1 D、A 5 1 1 F、A 5 1 1 I、A 5 1 1 R、A 5 1 1 T、A 5 1 1 V、A 5 1 1 W、A 5 1 1 Y、D 5 1 2 F、D 5 1 2 M、D 5 1 2 Q、D 5 1 2 W、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 C、T 5 1 5 D、T 5 1 5 E、T 5 1 5 E、T 5 1 5 G、T 5 1 5 H、T 5 1 5 L、T 5 1 5 N、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、T 5 1 5 W、T 5 1 5 Y、L 5 1 6 C、L 5 1 6 F、L 5 1 6 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、L 5 1 6 Y、S 5 1 7 C、S 5 1 7 F、S 5 1 7 M、S 5 1 7 T、S 5 1 7 W、S 5 1 7 Y、K 5 1 9 A、K 5 1 9 G、K 5 1 9 I、K 5 1 9 L、K 5 1 9 V、R 5 2 1 F、R 5 2 1 H、R 5 2 1 M、R 5 2 1 Q、R 5 2 1 T、R 5 2 1 W、R 5 2 1 Y、I 5 2 3 A、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 H、I 5 2 3 I、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 M、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 A、K 5 2 5 G、K 5 2 5 I、K 5 2 5 L、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 A、Q 5 2 6 C、Q 5 2 6 F、Q 5 2 6 H、Q 5 2 6 L、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 P、Q 5 2 6 S、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 V、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 F、T 5 2 7 W、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 A、E 5 3 1 G、E 5 3 1 I、E 5 3 1 L、E 5 3 1 V、H 5 3 5 D、H 5 3 5 E、H 5 3 5 K、H 5 3 5 L、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、H 5 3 5 S、K 5 3 8 F、K 5 3 8 W、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I

20

30

40

50

、A 5 3 9 L、A 5 3 9 V、K 5 4 1 F、K 5 4 1 W、K 5 4 1 Y、K 5 5 7 A、K 5 5 7 G、K 5 5 7 I、K 5 5 7 L、K 5 5 7 N、K 5 5 7 S、K 5 5 7 V、A 5 6 1 F、A 5 6 1 W、A 5 6 1 Y、T 5 6 6 F、T 5 6 6 W、T 5 6 6 Y、A 5 6 9 H、およびA 5 6 9 P。特定の実施形態では、2 個以上のアミノ酸置換（例えば2、3、4、5...）

【0042】

その他の特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A 変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A 部分のドメイン I I I は、以下からなる群から選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：V 3 8 1 N、E 3 8 3 G、N 3 9 1 V、Y 4 0 1 E、K 4 0 2 A、L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、Y 4 1 1 Q、K 4 1 4 S、K 4 1 3 S、V 4 1 5 T、V 4 1 5 C、Q 4 1 6 P、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、G 4 3 4 C、E 4 4 2 K、R 4 4 5 W、P 4 4 7 S、E 4 5 0 D、S 4 5 4 C、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 5 7 F、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 H、L 4 6 3 M、L 4 6 3 N、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 I、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 C、S 5 1 7 W、K 5 1 9 I、R 5 2 1 W、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 H、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 G、I 5 2 3 R、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 I、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、K 5 4 1 F、K 5 5 7 G、A 5 6 1 F、T 5 6 6 W、およびA 5 6 9 P。特定の実施形態では、ドメイン I I I の2 個以上（例えば2、3、4、5 個...）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

【0043】

その他の特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A 変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A 部分のドメイン I I I は、以下からなる群から選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、V 4 1 5 T、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、P 4 4 7 S、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 6 3 N、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 R、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 Q、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 W、R 5 2 1 W、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 R、K 5 2 4 L、Q 5 2 6 M、T 5 2 7 Y、H 5 3 5 P、およびK 5 5 7 G。特定の実施形態では、ドメイン I I I の2 個以上（例えば2、3、4、5 個...）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

【0044】

その他の特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A 変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A 部分のドメイン I I I は、以下からなる群から選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む：L 4 0 7 Y、V 4 1 5 T、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、P 4 4 7 S、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 6 3 N、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 R、S 5 1 7 W、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 R、K 5 2 4 L、Q 5 2 6 M、T 5 2 7 Y、H 5 3 5 P、およびK 5 5 7 G。特定の実施形態では、ドメイン I I I の2 個以上（例えば2、3、4、5 個...）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

【0045】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A 変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A 部分のドメイン I I I は、残基 4 6 3 および 5 0 8；または残基 4 6 3 および 5 2 3；または残基 4 6 3 および 5 2 4；または残基 5 0 8 および 5 2 4；または残基 4 6 3、5 0 8 および 5 2 3；または残基 4 6 3、5 0 8、および 5 2 4；または 5 0 8、5 2 3、および 5 2 4、または残基 4 6 3、5 0 8、5 2 3、および 5 2 4

における、H S Aドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含み、残基 4 6 3 における置換は、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Q から選択され；残基 5 0 8 における置換は、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S から選択され；残基 5 2 3 における置換は、I 5 2 3 A、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 H、I 5 2 3 I、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 M、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Y から選択され；および残基 5 2 4 における置換は、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V から選択される。

10

【0046】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A部分のドメイン I I I は、H S Aドメイン I I I 中に、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む：（a）E 3 8 3 G / K 4 1 3 S；（b）Y 4 0 1 E / I 5 2 3 G；（c）L 4 0 7 N / P 4 4 7 S；（d）L 4 0 7 N / P 4 4 7 S / A 5 3 9 I；（e）L 4 0 7 N / F 5 0 9 M；（f）L 4 0 7 Y / Q 5 2 6 T；（g）Y 4 1 1 Q / H 5 3 5 N；（h）K 4 1 4 S / V 4 5 6 N；（i）V 4 1 5 T / A 5 6 9 P；（j）V 4 2 6 H / Q 5 2 6 Y；（k）E 4 4 2 K / E 4 5 0 D / Q 4 5 9 R；（l）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R；（m）T 5 0 8 R / K 5 1 9 I / K 5 2 5 V；（n）F 5 0 9 I / T 5 2 7 Y；（o）I 5 2 3 Q / K 5 3 8 Y；（p）Q 5 2 6 M / K 5 5 7 G；（q）K 5 4 1 F / A 5 6 1 F；（r）L 4 6 3 N / K 5 2 4 L；（s）T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；（t）T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；（u）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；（v）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；（w）T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；（x）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；（y）L 4 6 3 N / I 5 2 3 G；（z）I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；および（a a）L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L。特定の実施形態では、ドメイン I I I の2個以上（例えば2、3、4、5個．．．）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

20

【0047】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A部分のドメイン I I I は、H S Aドメイン I I I 中に、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む：（a）L 4 0 7 N / P 4 4 7 S；（b）L 4 0 7 N / P 4 4 7 S / A 5 3 9 I；（c）L 4 0 7 N / F 5 0 9 M；（d）Y 4 1 1 Q / H 5 3 5 N；（e）K 4 1 4 S / V 4 5 6 N；（f）V 4 2 6 H / Q 5 2 6 Y；（g）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R；（h）F 5 0 9 I / T 5 2 7 Y；（i）I 5 2 3 Q / K 5 3 8 Y；（j）Q 5 2 6 M / K 5 5 7 G；（k）K 5 4 1 F / A 5 6 1 F；（l）L 4 6 3 N / K 5 2 4 L；（m）T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；（n）T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；（o）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；（p）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；（q）T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；（r）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；（s）L 4 6 3 N / I 5 2 3 G；（t）I 5 2 3 G / K 5 2 4 L および（u）L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L。

30

40

【0048】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）のH S A部分のドメイン I I I は、H S Aドメイン I I I 中に、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む：（a）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R；（b）L 4 6 3 N / K 5 2 4 L；（c）T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；（d）T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；（e）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；（f）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；（g）T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；および（h）L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L。

【0049】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えばH S A変種ポリペプチドまたはキメラポリ

50

ペプチド)のHSA部分のドメインI I Iは、HSAドメインI I I中に、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む：(a) L 4 6 3 N / K 5 0 8 R；(b) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；(c) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；および(d) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G。

【0050】

これに加えて、断片または変種は、従来のMerrifield固相f-Mocまたはt-Boc化学などの当該技術分野で公知の技術を使用して化学的に合成し得る。断片または変種を(組換え的にまたは化学合成によって)生成して試験し、例えば天然HSAタンパク質と同様に良好に、または実質的に同様に機能し得る断片または変種を同定し得る。

10

【0051】

特定の実施形態では、本発明は、治療的または予防的効力または安定性(例えば血清半減期、生体外貯蔵寿命、および生体内タンパク質分解に対する耐性)を促進するなどの目的で、HSAポリペプチドの構造体を修飾することを想定する。このような改変HSAポリペプチドは、天然に存在する(すなわち天然または野生型)HSAポリペプチドと、同一のまたは実質的に同一の生物活性を有する。修飾HSAポリペプチドは、本明細書に記載されるようなその他の治療的部分(例えばタンパク質および非タンパク質作用物質)と結合してもよい。修飾ポリペプチドは、例えばアミノ酸の置換、欠失、または付加によって生成され得る。例えばイソロイシンまたはバリンによるロイシンの、グルタミン酸によるアスパラギン酸の、セリンによるスレオニンの隔離された置換、または構造的に関連するアミノ酸によるアミノ酸の同様の置換(例えば保存的アミノ酸置換)が、結果として生じる分子の生物学的活性に対して大きな影響を及ぼさないと予想することは、理にかなっている。保存的置換は、それらの側鎖が関連しているアミノ酸ファミリー内で起きるものである。

20

【0052】

特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、複数種を越えて保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、複数種を越えて保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、類人猿およびサルなどの種からの、ヒトにおいて高度に保存された血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、類人猿およびサルなどの種からの、ヒトにおいて高度に保存された血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、非哺乳類動物からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、非哺乳類動物からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも2つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1

30

40

50

つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも3つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも4つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも5つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、2～5つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、大多数のヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも2つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも3つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも4つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、少なくとも5つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、2～5つの種からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。前述のアミノ酸置換カテゴリーの任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えばH S A変種およびキメラポリペプチド）もまた検討される。

【0053】

特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の少なくとも1つのアミノ酸置換は、完全長成熟H S A中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基383、残基389、残基391、残基410、残基417、残基425、残基442、残基465、残基467、残基468、残基486、残基499、残基502、残基520、残基532、残基536、残基543、および残基571。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の少なくとも1つのアミノ酸置換は、完全長成熟H S A中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基417、残基442、残基499、および残基502。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の少なくとも1つのアミノ酸置換は、完全長成熟H S A中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基392、残基399、残基403、残基411、残基412、残基414、残基416、残基418、残基420、残基423、残基434、残基437、残基438、残基445、残基448、残基450、残基453、残基461、残基476、残基477、残基484、残基485、残基487、残基488、残基494、

残基 4 9 7、残基 5 0 7、残基 5 0 9、残基 5 1 4、残基 5 2 9、残基 5 3 4、残基 5 3 7、残基 5 4 0、残基 5 5 1、残基 5 5 8、残基 5 5 9、残基 5 6 7、残基 5 6 8、残基 5 7 2。特定の実施形態では、2 個以上（例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 個）のアミノ酸置換、またはドメイン I I I 中のアミノ酸置換の全てさえもが、前述の残基にある。任意の 1 つまたは複数の前述の残基の中における、アミノ酸置換の全ての組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えば H S A 変種およびキメラポリペプチド）が、具体的に検討される。

【0054】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、完全長成熟 H S A ドメイン I I I 中の位置に対応して番号付けされる以下の位置のいずれかにある：残基 3 8 3、残基 3 9 1、残基 4 1 1、残基 4 1 4、残基 4 1 6、残基 4 3 4、残基 4 4 2、残基 4 4 5、残基 4 5 0、および残基 5 0 9。

10

【0055】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、以下からなる群から選択される：E 3 8 3 A、E 3 8 3 G、E 3 8 3 I、E 3 8 3 L、E 3 8 3 V、N 3 9 1 A、N 3 9 1 G、N 3 9 1 I、N 3 9 1 L、N 3 9 1 V、Y 4 1 1 Q、Y 4 1 1 N、K 4 1 4 S、K 4 1 4 T、Q 4 1 6 H、Q 4 1 6 P、G 4 3 4 C、G 4 3 4 S、G 4 3 4 T、E 4 4 2 K、E 4 4 2 R、R 4 4 5 F、R 4 4 5 W、R 4 4 5 Y、E 4 5 0 D、E 4 5 0 E、F 5 0 9 C、F 5 0 9 D、F 5 0 9 G、F 5 0 9 I、F 5 0 9 L、F 5 0 9 M、F 5 0 9 P、F 5 0 9 V、F 5 0 9 W、および F 5 0 9 Y。特定の実施形態では、ドメイン I I I の 2 個以上（例えば 2、3、4、5 個．．．）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

20

【0056】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、完全長成熟 H S A ドメイン I I I 中の位置に対応して番号付けされる以下の位置のいずれかにある：残基 3 8 0、残基 3 8 1、残基 3 8 4、残基 3 8 7、残基 3 9 6、残基 4 0 1、残基 4 0 4、残基 4 0 5、残基 4 0 6、残基 4 0 9、残基 4 1 9、残基 4 2 1、残基 4 2 2、残基 4 2 4、残基 4 2 8、残基 4 3 0、残基 4 3 1、残基 4 3 3、残基 4 4 1、残基 4 5 7、残基 4 5 8、残基 4 6 3、残基 4 6 4、残基 4 6 6、残基 4 6 9、残基 4 7 0、残基 4 7 4、残基 4 7 5、残基 4 8 0、残基 4 8 1、残基 4 8 9、残基 4 9 1、残基 4 9 5、残基 5 0 0、残基 5 0 8、残基 5 1 0、残基 5 1 5、残基 5 1 6、残基 5 2 4、残基 5 2 5、残基 5 2 6、残基 5 2 8、残基 5 3 1、残基 5 3 5、残基 5 3 9、残基 5 4 4、残基 5 4 7、残基 5 7 6。特定の実施形態では、2 個以上（例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 個）のアミノ酸置換、またはドメイン I I I 中のアミノ酸置換の全てさえもが、前述の残基にある。前述の残基の任意の 1 つまたは複数の中における、アミノ酸置換の全ての組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えば H S A 変種およびキメラポリペプチド）が、具体的に検討される。

30

【0057】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、完全長成熟 H S A ドメイン I I I 中の位置に対応して番号付けされる以下の位置のいずれかにある：残基 3 8 1、残基 4 0 1、残基 4 2 4、残基 4 5 7、残基 4 6 3、残基 4 9 5、残基 5 0 8、残基 5 1 5、残基 5 1 6、残基 5 2 4、残基 5 2 5、残基 5 2 6、残基 5 3 1、残基 5 3 5、および残基 5 3 9。いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば H S A 変種ポリペプチドまたはキメラポリペプチド）の H S A 部分のドメイン I I I は、残基 4 6 3 および 5 0 8；または残基 4 6 3 および 5 2 4；または残基 5 0 8 および 5 2 4；または残基 4 6 3、5 0 8 および 5 2 4 における、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含む。

40

【0058】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、以

50

下からなる群から選択される：V 3 8 1 N、V 3 8 1 Q、Y 4 0 1 D、Y 4 0 1 E、V 2 4 2 A、V 2 4 2 G、V 4 2 4 I、V 4 2 4 L、V 4 2 4 N、V 4 2 4 Q、V 4 2 4 V、L 4 5 7 F、L 4 5 7 W、L 4 5 7 Y、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、T 5 1 5 C、T 5 1 5 H、T 5 1 5 N、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 F、L 5 1 6 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、L 5 1 6 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 A、K 5 2 5 G、K 5 2 5 I、K 5 2 5 L、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 C、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 S、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 Y、E 5 3 1 A、E 5 3 1 G、E 5 3 1 I、E 5 3 1 L、E 5 3 1 V、H 5 3 5 D、H 5 3 5 E、H 5 3 5 P、A 5 3 9 I、A 5 3 9 L、および A 5 3 9 V。特定の実施形態では、ドメイン I I I の 2 個以上（例えば 2、3、4、5 個．．．）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

【0059】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、複数種を越えて保存されていない残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、複数種を越えて保存されていない残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、ヒト、ラット、イヌ、ウサギ、およびウシからの血清アルブミンタンパク質間で保存されていない残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ラット、イヌ、ウサギ、およびウシの血清アルブミンタンパク質間で保存されない残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、ヒト、ラット、イヌ、ウサギ、およびウシからの血清アルブミンタンパク質間で保存されない残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ラット、イヌ、ウサギ、およびウシからの血清アルブミンタンパク質間で保存されない残基の置換である。前述のアミノ酸置換カテゴリーの任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えば H S A 変種、H S A 部分のあるキメラポリペプチド）もまた検討される。

【0060】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 3 8 2、残基 3 8 5、残基 3 9 0、残基 3 9 7、残基 4 0 0、残基 4 0 2、残基 4 1 5、残基 4 2 9、残基 4 3 2、残基 4 3 5、残基 4 3 9、残基 4 4 0、残基 4 4 3、残基 4 4 4、残基 4 4 6、残基 4 4 7、残基 4 5 9、残基 4 7 1、残基 4 7 2、残基 4 7 8、残基 4 7 9、残基 4 8 3、残基 4 9 0、残基 4 9 2、残基 4 9 3、残基 5 0 3、残基 5 1 1、残基 5 1 7、残基 5 1 8、残基 5 1 9、残基 5 2 1、残基 5 3 8、残基 5 4 1、残基 5 4 2、残基 5 4 6、残基 5 4 9、残基 5 5 0、残基 5 5 2、残基 5 5 4、残基 5 5 6、残基 5 6 0、残基 5 6 2、残基 5 6 3、残基 5 6 5、および残基 5 6 6。特定の実施形態では、2 個以上（例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 個）のアミノ酸置換、またはドメイン I I I 中のアミノ酸置換の全てでさえもが、前述の残基にある。前述の残基の任意の 1 つまたは複数の中における、アミノ酸置換の任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えば H S A 変種、H S A 部分のあるキメラポリペプチド）が、具体的に検討される。

【0061】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 4 0 2、残基 4 1 5、残基 4 4 7、残基 4 5 9、残基 5 1 1、残基 5 1 7、残基 5 1 9、残基 5 2 1、残基 5 3 8、残基 5 4 1、および残基 5 6 6。

【0062】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、以

下からなる群から選択される：K 4 0 2 A、K 4 0 2 G、K 4 0 2 I、K 4 0 2 L、K 4 0 2 V、V 4 1 5 C、V 4 1 5 S、V 4 1 5 T、P 4 4 7 S、P 4 4 7 T、Q 4 5 9 K、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 N、L 4 6 3 Q、A 5 1 1 F、A 5 1 1 W、A 5 1 1 Y、S 5 1 7 C、S 5 1 7 F、S 5 1 7 M、S 5 1 7 T、S 5 1 7 W、S 5 1 7 Y、K 5 1 9 A、K 5 1 9 G、K 5 1 9 I、K 5 1 9 L、K 5 1 9 V、R 5 2 1 F、R 5 2 1 W、R 5 2 1 Y、K 5 3 8 F、K 5 3 8 W、K 5 3 8 Y、K 5 4 1 F、K 5 4 1 W、K 5 4 1 Y、T 5 6 6 F、T 5 6 6 W、および T 5 6 6 Y。特定の実施形態では、ドメイン I I I の 2 個以上（例えば 2、3、4、5 個．．．）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

【0063】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、表面接近可能な残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能な残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 3 8 3、残基 3 8 9、残基 3 9 1、残基 4 1 0、残基 4 1 7、残基 4 2 5、残基 4 4 2、残基 4 6 5、残基 4 6 7、残基 4 6 8、残基 4 8 6、残基 4 9 9、残基 5 0 2、残基 5 2 0、残基 5 3 2、残基 5 3 6、残基 5 4 3、および残基 5 7 1。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 4 1 7、残基 4 4 2、残基 4 9 9、および残基 5 0 2。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 3 8 3、残基 3 9 1、および残基 4 4 2。特定の実施形態では、2 個以上（例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 個）のアミノ酸置換、またはドメイン I I I 中のアミノ酸置換の全てでさえもが、前述の残基にある。前述のアミノ酸置換カテゴリの任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えば H S A 変種およびキメラポリペプチド）が、具体的に検討される。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、E 3 8 3 A、E 3 8 3 G、E 3 8 3 I、E 3 8 3 L、E 3 8 3 V、N 3 9 1 A、N 3 9 1 G、N 3 9 1 I、N 3 9 1 L、N 3 9 1 V、E 4 4 2 K、E 4 4 2 R からなる群から選択される。特定の実施形態では、ドメイン I I I の 2 個以上（例えば 2、3、4、5 個．．．）のアミノ酸置換、またはアミノ酸置換の全てでさえも、前述の置換から選択される。

【0064】

特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、R 4 1 0 C；K 4 6 6 E；E 4 7 9 K；D 4 9 4 N；E 5 0 1 K；E 5 0 5 K；V 5 3 3 M；K 5 3 6 E 5 3 6；K 5 4 1 E；D 5 5 0 A または D 5 5 0 G；K 5 6 0 E；D 5 6 3 N；E 5 6 5 K；E 5 7 0 K；K 5 7 3 E；または K 5 7 4 E の置換だけではない。

【0065】

特定の実施形態では、ポリペプチド（例えば H S A 変種、H S A 部分のあるキメラポリペプチド）は、配列番号 1 と少なくとも 80 %、85 %、または少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含んでなる、H S A ドメイン I I I を含んでなる。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I は、配列番号 1 と少なくとも 95 % 同一である、アミノ酸配列を含んでなる。特定の実施形態では、H S A ドメイン I I I は、配列番号 1 と少なくとも 98 % 同一である、アミノ酸配列を含んでなる。特定の実施形態では、H S A 部分は、配列番号 2 の対応する部分と少なくとも 80 %、85 %、または少なくとも 90 % 同一である、アミノ酸配列を含んでなる。特定の実施形態では、H S A 部分は、配列番号 2 の対応

する部分と少なくとも95%同一である、アミノ酸配列を含んでなる。特定の実施形態では、HSA部分は、配列番号2の対応する部分と少なくとも98%同一である、アミノ酸配列を含んでなる。

【0066】

特定の実施形態では、本開示は、HSAドメインIII中の1つまたは複数のアミノ酸置換に加えて、ポリペプチド（例えばHSA変種、HSA部分のあるキメラポリペプチド）が、ドメインIIIの外部のHSA部分中の1つまたは複数のアミノ酸置換を含んでもよいことを想定する。

【0067】

特定の実施形態では、本開示は、HSAドメインIII中の1つまたは複数のアミノ酸置換に加えて、ポリペプチド（例えばHSA変種、HSA部分のあるキメラポリペプチド）が、ドメインIII中の1つまたは複数（例えば1、2、3、4、5、6、7、8）のアミノ酸欠失および／または挿入も含んでもよいことを想定する。HSA部分が1つまたは複数のアミノ酸欠失および／または挿入を含有する場合、このような挿入または欠失残基は、天然HSAと比較した残基の番号付けを混乱させないように、文字を使用して示され得ることに留意されたい。例えば残基414と415の間にアミノ酸残基が挿入された場合、このような残基は414aと表記され得る。特定の実施形態では、挿入アミノ酸残基は、表面接近可能なループ中に挿入されて、このようなループのサイズを増大させる。特定の実施形態では、挿入アミノ酸残基は、ヘリックス中に挿入されて、このようなヘリックスのサイズを増大させおよび／または構造を変化させる。

【0068】

特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ2中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、HSAドメインIIIのループ2中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～5個（1、2、3、4、5個）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換はHSAドメインIIIのループ2中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～5個（1、2、3、4、または5個）のアミノ酸置換をHSAドメインIIIのループ2中に含んでなり、HSAドメインIII中のループ2中になく1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ3中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、HSAドメインIIIのループ3中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～5個（1、2、3、4、5個）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換はHSAドメインIIIのループ3中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～5個（1、2、3、4、または5個）のアミノ酸置換をHSAドメインIIIのループ3中に含んでなり、HSAドメインIII中のループ3中になく1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ6中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、HSAドメインIIIのループ6中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～18個（1、2、3、4、5、6個など）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～18個のアミノ酸置換はHSAドメインIIIのループ6中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～18個（1、2、3、4、5、6個など）のアミノ酸置換をHSAドメインIIIのループ6中に含んでなり、HSAドメインIII中のループ6中になく1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのヘリックス7中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、HSAドメインIIIのヘリックス7中にある。特定の実施形態では、HSAドメインIIIは1～6個（1、2、3、4、5、または6個）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～18個のアミノ酸置換はHSAドメインIIIのヘリ

ックス7中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは、1～6個（1、2、3、4、5、または6個）のアミノ酸置換をH S AドメインI I Iのヘリックス7中に含んでなり、H S AドメインI I I中のヘリックス7中にない1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S AドメインI I Iのループ7中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、H S AドメインI I Iのループ7中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～3個（1、2、または3個）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～3個のアミノ酸置換はH S AドメインI I Iのループ7中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～3個（1、2、または3個）のアミノ酸置換をH S AドメインI I Iのループ7中に含んでなり、H S AドメインI I I中のループ7中にない1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S AドメインI I Iのヘリックス8中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、H S AドメインI I Iのヘリックス8中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～18個（1、2、3、4、5、6個など）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～18個のアミノ酸置換はH S AドメインI I Iのヘリックス8中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～6個（1、2、3、4、5、6個など）のアミノ酸置換をH S AドメインI I Iのヘリックス8中に含んでなり、H S AドメインI I I中にヘリックス8中にない1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S AドメインI I Iのループ8中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、H S AドメインI I Iのループ8中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～5個（1、2、3、4、5個）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換はH S AドメインI I Iのループ8中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは、1～5個（1、2、3、4、または5個）のアミノ酸置換をH S AドメインI I Iのループ8中に含んでなり、H S AドメインI I I中のループ8中にない1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S AドメインI I Iのループ9中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換の全部が、H S AドメインI I Iのループ9中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～4個（1、2、3、4個）のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～4個のアミノ酸置換はH S AドメインI I Iのループ9中にある。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iは1～5個（1、2、3、4個）のアミノ酸置換をH S AドメインI I Iのループ9中に含んでなり、H S AドメインI I I中のループ9中にない1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。上で詳述されるように、各位置で独立して可能なアミノ酸置換は、上で詳述される置換クラス（例えばアラニン、保存的置換など）のいずれかから選択される。前述のアミノ酸置換カテゴリーの任意の組み合わせを含んでなるポリペプチド（例えばH S A変種およびキメラポリペプチド）もまた検討される。

【0069】

特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのループ2中にない。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのループ3中にない。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのループ6中にない。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのヘリックス7中にない。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのループ7中にない。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのヘリックス8中にない。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのループ8中にない。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記アミノ酸置換は、H S AドメインI I Iのループ9中にない。

【0070】

特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I の少なくとも 2 つのループ中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I の少なくとも 3 つのループ中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I の少なくとも 4 つのループ中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換は、ヘリックス 7 または 8 中にある。

【0071】

特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 2 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9、およびヘリックス 7 および 8 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I のループおよび／またはヘリックスの少なくとも 2 つの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 3 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9、およびヘリックス 7 および 8 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I のループおよび／またはヘリックスの少なくとも 3 つの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 4 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9、およびヘリックス 7 および 8 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I のループおよび／またはヘリックスの少なくとも 4 つの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 5 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9、およびヘリックス 7 および 8 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I のループおよび／またはヘリックスの少なくとも 5 つの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 6 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、ループ 2、3、6、7、8、および 9、およびヘリックス 7 および 8 からなる群から選択される、H S Aドメイン I I I のループおよび／またはヘリックスの少なくとも 6 つの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 5 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、H S Aドメイン I I I のループ 2、3、6、7、8、および 9 のそれぞれの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 6 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、H S Aドメイン I I I のループ 2、3、6、7、8、および 9 のそれぞれの中にある。特定の実施形態では、ドメイン I I I は、少なくとも 2 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記アミノ酸置換は、H S Aドメイン I I I のヘリックス 7、および 8 のそれぞれの中にある。

【0072】

特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つはループ 2 中にあり、残基 415、残基 416、残基 417、残基 418、および残基 419 から選択される。特定の実施形態では、2 個以上（2、3、4、5 個）のアミノ酸置換はループ 2 中にあり、残基 415、残基 416、残基 417、残基 418、および残基 419 から選択される。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I ループ 2 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、V 415 C、V 415 S、V 415 T、Q 416 H、および Q 416 P から選択される。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つはループ 3 中にあり、残基 439、残基 440、残基 441、残基 442、および残基 443 から選択される。特定の実施形態では、2 個以上（2、3、4、5 個）のアミノ酸置換はループ 3 中にあり、残基 439、残基 440、残基 441、残基 442、および残基 443 から選択される。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I ループ 3 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、E 442 K、および E 442 R から選択される。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つはループ 6 中にあり、残基 492、残基 493、残基 494、残基 495、残基 496、残基 497、残基 498、残基 499、残基 500、残基 501、残基 5

02、残基503、残基504、残基505、残基506、残基507、残基508、および残基509から選択される。特定の実施形態では、2個以上（2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）のアミノ酸置換がループ6中にあり、残基492、残基493、残基494、残基495、残基496、残基497、残基498、残基499、残基500、残基501、残基502、残基503、残基504、残基505、残基506、残基507、残基508、および残基509から選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIILループ6中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、T506F、T506W、T506Y、T508C、T508E、T508I、T508K、T508R、T508S、F509C、F509I、F509L、F509M、F509V、F509W、およびF509Yから選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIIL中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヘリックス7中にあり、残基510、残基511、残基512、残基513、残基514、および残基515から選択される。特定の実施形態では、2個以上（2、3、4、5、6個）のアミノ酸置換はヘリックス7中にあり、残基510、残基511、残基512、残基513、残基514、および残基515から選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIILループ7中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、A511F、A511W、A511Y、D512F、D512W、D512Y、T515C、T515H、T515N、T515P、T515Q、およびT515Sから選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIIL中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つはループ7中にあり、残基516、残基517、および残基518から選択される。特定の実施形態では、2個以上（2、3個）のアミノ酸置換はループ7中にあり、残基516、残基517、および残基518から選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIILループ7中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、L516F、L516S、L516T、L516W、L516Y、S517C、S517F、S517M、S517T、S517W、およびS517Yから選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIIL中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つはヘリックス8中にあり、残基519、残基518、残基519、残基520、残基521、残基522、残基523、残基524、残基525、残基526、残基527、残基528、残基529、残基530、残基531、残基532、残基533、残基534、残基535、および残基536から選択される。特定の実施形態では、2個以上（2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）のアミノ酸置換はヘリックス8中にあり、残基519、残基518、残基519、残基520、残基521、残基522、残基523、残基524、残基525、残基526、残基527、残基528、残基529、残基530、残基531、残基532、残基533、残基534、残基535、および残基536から選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIILヘリックス8中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、K519A、K519G、K519I、K519L、K519V、R521F、R521W、R521Y、I523A、I523C、I523D、I523E、I523F、I523G、I523H、I523I、I523K、I523L、I523M、I523N、I523P、I523Q、I523R、I523S、I523T、I523V、I523W、I523Y、K524A、K524F、K524G、K524H、K524I、K524L、K524M、K524Q、K524T、K524V、K525A、K525G、K525I、K525L、K525V、Q526C、Q526M、Q526S、Q526T、Q526Y、T527F、T527W、T527Y、E531A、E531G、E531I、E531L、E531V、H535D、H535E、およびH535Pから選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIIL中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つはループ8中にあり、残基537、残基538、残基539、残基540、および残基541から選択される。特定の実施形態では、2個以上（2、3、4、5個）のアミノ酸置換はループ8中にあり、残基537、残基538、残基539、残基540、残基541から選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIIL中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つはループ9中にあり、残基561、残基562、残基563、残基564から選択される。特定の実施形態では、HSAドメインIIILループ8中の前

記アミノ酸置換の少なくとも1つは、K 5 3 8 F、K 5 3 8 W、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、A 5 3 9 L、A 5 3 9 V、K 5 4 1 F、K 5 4 1 W、K 5 4 1 Yから選択される。特定の実施形態では、2個以上の(2、3、4個)アミノ酸置換はループ9中にあり、残基561、残基562、残基563、残基564から選択される。特定の実施形態では、H S AドメインI I Iループ9中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、A 5 6 1 F、A 5 6 1 W、およびA 5 6 1 Yから選択される。

【0073】

さらに例えばH S AドメインI I Iループの長さを増大、または低下させるドメインI I I中の挿入または欠失も検討された。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ2の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ3の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ6の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ヘリックス7の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ7の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ヘリックス8の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ8の長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ9の長さを变化させる。特定の実施形態では、ドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ2、3、6、7、8、および9、およびヘリックス7および8からなる群から選択される、少なくとも2つのループおよび/またはヘリックスの長さを变化させる。特定の実施形態では、ドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ2、3、6、7、8、および9、およびヘリックス7および8からなる群から選択される、少なくとも3つのループおよび/またはヘリックスの長さを变化させる。特定の実施形態では、ドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ2、3、6、7、8、および9、およびヘリックス7および8からなる群から選択される、少なくとも4つのループおよび/またはヘリックスの長さを变化させる。特定の実施形態では、ドメインI I I中の前記挿入または欠失は、ループ2、3、6、7、8、および9、およびヘリックス7および8からなる群から選択される、少なくとも5つのループおよび/またはヘリックスの長さを变化させる。特定の実施形態では、H S AドメインI I I中の前記挿入または欠失は、H S AドメインI I Iのループ2、3、6、7、8、および9のそれぞれの長さを变化させる。複数ループおよび/またはヘリックスが変化する場合、本開示は、1つまたは複数のループ/ヘリックスが、挿入によって増大してもよく、1つまたは複数のループ/ヘリックスが欠失によって減少してもよいように、ループおよび/またはヘリックスが独立して変化することを想定することに留意されたい。

【0074】

ドメインI I Iがアミノ酸の挿入または欠失を含む実施形態では、本開示は、1つのアミノ酸の挿入または欠失を想定する。2、3、4、5、6、7、8、9、10個のアミノ酸など、2個以上のアミノ酸の挿入または欠失もまた検討される。特定の実施形態では、本開示は、10~20、20~40、40~50、50~100個のアミノ酸など、10個を超えるアミノ酸残基の挿入を想定する。本開示のキメラポリペプチドおよびH S A変種ポリペプチドで一貫して、挿入または欠失を含む組成物が試験され、それらがF c R n結合活性を保持することが確認される。好ましい組成物は、対照と比較して改善された、F c R n結合および/または血清半減期を提供する組成物である。

【0075】

明確さの目的で、本開示は、具体的に、前述のまたは以下の態様および実施形態のいずれかの組み合わせを想定する。H S A部分を含んでなるキメラポリペプチドの文脈で、ならびにH S A部分を含んでなる変種H S Aポリペプチドの文脈で、このようなH S A部分は、ドメインI I I、またはそのF c R n結合部分を含んでなる。さらに本明細書に記載されるように、H S A部分のドメインI I Iは、1~18個のアミノ酸置換を含む。特定

の実施形態では、H S A 部分のドメイン I I I は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18個のアミノ酸置換を含む。例示的なアミノ酸置換としては、(i) アラニンによる置換；(i i) 保存的アミノ酸置換；(i i i) 非保存的アミノ酸置換が挙げられる。本開示は、所与のポリペプチドのドメイン I I I 中の全てのアミノ酸置換が、これらのアミノ酸置換カテゴリーの1つの構成員であってもよいことが想定され、また所与のポリペプチドのドメイン I I I 中の各アミノ酸置換が、個々に独立してこれらのカテゴリーから選択されてもよいことも想定される。特定の実施形態では、ドメイン I I I 中の天然システイン残基は保持されて置換されない。特定の実施形態では、ドメイン I I I 中の天然プロリン残基は保持されて置換されない。特定の実施形態では、ドメイン I I I 中の天然システイン残基および天然プロリン残基は保持されて置換されない。特定の実施形態では、システイン残基は置換されない（例えばシステインは天然残基を置換するのに使用されない）。特定の実施形態では、プロリン残基は置換されない（例えばプロリンは天然残基を置換するのに使用されない）。別の実施形態では、20個のアミノ酸のいずれか1つを使用して、所与の天然残基を置換する。

10

【0076】

前述のアミノ酸置換クラスの任意の組み合わせを含んでなる、H S A 変種およびキメラポリペプチドもまた検討される。

【0077】

本発明は、本明細書に記載されるアミノ酸配列と実質的に同一配列のアミノ酸を含んでなる、H S A 部分がある変種およびキメラポリペプチドを包含する。本明細書に記載される配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、保存的アミノ酸置換、ならびにアミノ酸欠失および／または挿入を含んでなる配列が挙げられる。保存的アミノ酸置換とは、第1のアミノ酸と類似した化学および／または物理特性（例えば電荷、構造、極性、疎水性／親水性）を有する第2のアミノ酸による、第1のアミノ酸の置換を指す。保存的アミノ酸置換としては、リジン（K）、アルギニン（R）およびヒスチジン（H）；アスパラギン酸（D）およびグルタミン酸（E）；アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、スレオニン（T）、チロシン（Y）、K、R、H、DおよびE；アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、プロリン（P）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、システイン（C）およびグリシン（G）；F、WおよびY；C、SおよびTの各群内における、別のアミノ酸による1つのアミノ酸の置換が挙げられる。

20

30

【0078】

特定の実施形態では、前記H S A 変種ポリペプチドは実質的に精製されている。特定の実施形態では、前記キメラポリペプチドは実質的に精製されている。特定の態様では、本開示は、本開示のH S A 変種またはキメラポリペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる組成物を提供する。特定の実施形態では、組成物は無菌組成物である。特定の実施形態では、組成物是非発熱性である。

【0079】

6. 4 コンビナトリアルドメイン I I I 変異体

40

本発明は、ドメイン I I I を含んでなるH S A 部分のコンビナトリアル変異体セット、ならびにランケーション変異体を作り出すことをさらに想定し、生物活性変種配列を同定するのに特に有用である。天然H S A ポリペプチドと比較して選択的効力を有する、コンビナトリアルケミストリー由来変種を生成し得る。同様に、変異誘発は、対応する野生型H S A ポリペプチドと劇的に異なる、細胞内半減期を有する変種を生成し得る。例えば変性タンパク質は、対象タンパク質の破壊か、そうでなければ不活性化をもたらす、タンパク質分解またはその他の細胞プロセスに対して、より安定またはより不安定のいずれかにし得る。このような変異を利用してそれらの半減期を調節することで、H S A ポリペプチドレベルを変化させ得る。例えば縮重オリゴヌクレオチド配列から、可能なH S A 変種配列のライブラリーを作成し得る、多数の様式がある。自動D N A 合成機内で縮重遺伝子

50

配列の化学合成を実施し、次に発現のために、合成遺伝子を適切な遺伝子にライゲートし得る。遺伝子の縮重セットの目的は、可能なポリペプチド配列の所望のセットをコードする配列を全て、1つの混合物中に提供することである。縮重オリゴヌクレオチドの合成については、当該技術分野で周知である（例えばNarang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照されたい）。このような技術は、その他のタンパク質の指向性進化において用いられている（例えばScott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249:404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87:6378-6382; ならびに米国特許第5, 223, 409号明細書、米国特許第5, 198, 346号明細書、および米国特許第5, 096, 815号明細書を参照されたい）。

【0080】

代案としては、その他の変異誘発形態を利用して、コンビナトリアルライブラリーを作成し得る。例えば以下を使用して、HSAポリペプチド変種を生成し、ライブラリーをスクリーニングして単離し得る：アラニンスキャニング変異誘発（Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; およびCunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085）、リンカースキャニング変異誘発（Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316）; PCR変異誘発（Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19）; または化学変異誘発をはじめとするランダム変異誘発（Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; およびGreener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34）。特にコンビナトリアル状況における、リンカースキャニング変異誘発は、HSAポリペプチドのトランケート型（生物活性）形態を同定する魅力的な方法である。HSAポリペプチド変種のライブラリーを作り出してスクリーニングする追加的な方法が本明細書で提供され、例えば「例証」と題された第8節を参照されたい。特にコンビナトリアルHSAドメインIII変異体ライブラリーの作成およびスクリーニングで有用な、特定の方法のための第8.10節および第8.11節。

【0081】

本開示のポリペプチド中のアミノ酸置換について上述した実施形態のいずれかを使用して、ペプチドライブラリーを作成してもよい。特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種が、HSAドメインIIIの残基中で生成される。特定の実施形態では、(i) 変種ドメインIII構築物のみ; (ii) 完全長HSAの文脈で提示される変

異ドメイン I I I 構築物；または (i i i) 少なくともドメイン I I I を含んでなるトランケート型 H S A またはキメラポリペプチドの文脈の 1 つ以上の文脈で、ドメイン I I I 変異が導入されてスクリーニングされる。特定の実施形態では、出発ポリペプチドと比較して、F c R n 親和性増大および血清半減期増大の片方または双方を有する変種について、ペプチドのライブラリーをスクリーニングする。特定の実施形態では、変種は、本出願に記載される標準生体外アッセイ（例えばフローサイトメトリー）を使用して評価される。特定の実施形態では、F c R n 親和性改善を示す変種が同定される。別の実施形態では、変種をスクリーニングして、F c R n 親和性改善が酸性 p H（例えばおよそ 5.5 の p H）のみで起きて、中性 p H（例えばおよそ 7.4 の p H）で起きないかどうか判定される。

10

【0082】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来の変種は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかに、少なくとも 2 個のアミノ酸置換を含んでなる。残基 407、残基 415、残基 463、残基 495、残基 508、残基 509、残基 511、残基 512、残基 515、残基 516、残基 517、残基 521、残基 523、残基 524、残基 526、残基 527、および残基 557。

【0083】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、以下からなる群から選択される少なくとも 2 個のアミノ酸置換を含んでなる：L 407 N、L 407 Y、V 415 T、L 463 N、L 463 F、E 495 D、T 508 R、T 508 S、F 509 M、F 509 W、F 509 I、A 511 F、D 512 Y、D 512 M、T 515 Q、L 516 T、L 516 W、S 517 W、R 521 W、I 523 D、I 523 E、I 523 F、I 523 G、I 523 K、I 523 R、K 524 L、Q 526 A、Q 526 M、Q 526 Y、T 527 Y、および T 557 G。

20

【0084】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来の変種は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置における、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる：(a) 残基 383 および 413；(b) 残基 401 および 523；(c) 残基 407 および 447；(d) 残基 407 および 447 および 539；(e) 残基 407 および 509；(f) 残基 407 および 526；(g) 残基 411 および 535；(h) 残基 414 および 456；(i) 残基 415 および 569；(j) 残基 426 および 526；(k) 残基 442 および 450 および 459；(l) 残基 463 および 508；(m) 残基 508 および 519 および 525；(n) 残基 509 および 527；(o) 残基 523 および 538；(p) 残基 526 および 557；(q) 残基 541 および 561；(r) 残基 463 および 523；(s) 残基 508 および 523；(t) 残基 508 および 524；(u) 残基 463、508、および 523；(v) 残基 463、508、および 524；(w) 残基 508、523、および 524；(x) 残基 463、508、523、および 524；(y) 残基 463 および 524；(z) 残基 523 および 524；および (a a) 残基 463、523、および 524。

30

【0085】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来の変種は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、(a) 残基 463 および 508；(b) 残基 463 および 523；(c) 残基 508 および 523；(d) 残基 508 および 524；(e) 残基 463、508、および 523；(f) 残基 463、508、および 524；(g) 残基 508、523、および 524；(h) 残基 463、508、523、および 524；(i) 残基 463 および 523；および (j) 残基 523 および 524 からなる群から選択される位置における、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなり、残基 463 における置換は、L 463 C、L 463 F、L 463 G、L 463 H、L 463 I、L 463 N、L 463 S、L 463 Q から選択され；残基 508 における置換は、T 508 C、T 508 E、T 508 I、T 508 K、T 508 R、T 508 S から選択され；残

40

50

基 5 2 3 における置換は、I 5 2 3 A、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 H、I 5 2 3 I、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 M、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Y から選択され；および残基 5 2 4 における置換は、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V から選択される。

【0086】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来の変種は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、(a) 残基 4 6 3 および 5 2 4；(b) 残基 5 0 8 および 5 2 3；(c) 残基 5 0 8 および 5 2 4；(d) 残基 4 6 3、5 0 8、および 5 2 3 からなる群から選択される位置における、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなり、残基 4 6 3 における置換は、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Q から選択され；残基 5 0 8 における置換は、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S から選択され；残基 5 2 3 における置換は、I 5 2 3 A、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 H、I 5 2 3 I、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 M、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Y から選択され；および残基 5 2 4 における置換は、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V から選択される。

【0087】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を H S A ドメイン I I I 中に含んでなる：(a) E 3 8 3 G / K 4 1 3 S；(b) Y 4 0 1 E / I 5 2 3 G；(c) L 4 0 7 N / P 4 4 7 S；(d) L 4 0 7 N / P 4 4 7 S / A 5 3 9 I；(e) L 4 0 7 N / F 5 0 9 M；(f) L 4 0 7 Y / Q 5 2 6 T；(g) Y 4 1 1 Q / H 5 3 5 N；(h) K 4 1 4 S / V 4 5 6 N；(i) V 4 1 5 T / A 5 6 9 P；(j) V 4 2 6 H / Q 5 2 6 Y；(k) E 4 4 2 K / E 4 5 0 D / Q 4 5 9 R；(l) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R；(m) T 5 0 8 R / K 5 1 9 I / K 5 2 5 V；(n) F 5 0 9 I / T 5 2 7 Y；(o) I 5 2 3 Q / K 5 3 8 Y；(p) Q 5 2 6 M / K 5 5 7 G；(q) K 5 4 1 F / A 5 6 1 F；(r) L 4 6 3 N / K 5 2 4 L；(s) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；(t) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；(u) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；(v) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；(w) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；(x) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；(y) L 4 6 3 N / I 5 2 3 G；(z) I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；および (a a) L 4 6 3 N / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L。

【0088】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を H S A ドメイン I I I 中に含んでなる：(a) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R；(b) L 4 6 3 N / K 5 2 4 L；(c) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；(d) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；(e) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；(f) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；(g) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L；および (h) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L。

【0089】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、以下からなる群から選択されるアミノ酸置換を H S A ドメイン I I I 中に含んでなる：(a) L 4 6 3 N / K 5 0 8 R；(b) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G；(c) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L；および (d) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G。

【0090】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は配列番号 1 8 を含んでなり、その中で X₁ はロイシンでなく、および / または X₂ はスレオニンでなく、および

／またはX₃はイソロイシンでなく、および／またはX₄はリジンでない。特定の実施形態では、X₁は、システイン、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、アスパラギン、セリン、またはグルタミンであり；X₂は、システイン、グルタミン酸、イソロイシン、リジン、アルギニン、またはセリンであり；X₃は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニン、バリン、トリプトファン、またはチロシンであり；およびX₄は、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、グルタミン、スレオニン、またはバリンである。別の実施形態では、X₁はフェニルアラニンまたはアスパラギンであり；X₂はアルギニンまたはセリンであり；X₃はアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、フェニルアラニン、リジン、またはアルギニンであり；および／またはX₄がロイシンである。なおも別の実施形態では、X₁はアスパラギンであり、および／またはX₂はアルギニンであり、および／またはX₃はグリシンであり、および／またはX₄はロイシンである。

10

【0091】

特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、複数種を越えて保存された残基中で生成される。特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、表面接近可能な残基中で生成される。特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基中で生成される。特定の実施形態では、コンビナトリアルケミストリー由来変種は、複数種を越えて保存されているが、ニワトリHSA中では保存されていない、残基中で生成される。

20

【0092】

特定の態様では、本開示は、複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーを提供し、前記複数のポリペプチドのそれぞれは、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれは独立して、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる。

【0093】

特定の態様では、本開示は、複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーを提供し、前記複数のポリペプチドのそれぞれは、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれは独立して、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存され、ニワトリからの血清アルブミン中では保存されない、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる。

30

【0094】

特定の態様では、本開示は、複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーを提供し、前記複数のポリペプチドのそれぞれは、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれは独立して、表面接近可能な残基である、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる。

40

【0095】

特定の態様では、本開示は、複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーを提供し、前記複数のポリペプチドのそれぞれは、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれは独立して、(i)表面接近可能であり、また(ii)ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存されてもいる、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる。

50

【0096】

特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のループ 2 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のループ 3 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のループ 6 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のヘリックス 7 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のループ 7 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のヘリックス 8 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のループ 8 中にある。特定の実施形態では、前記表面接近可能な残基は、H S Aドメイン I I I のループ 9 中にある。

10

【0097】

特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 383、残基 389、残基 391、残基 410、残基 417、残基 425、残基 442、残基 465、残基 467、残基 468、残基 486、残基 499、残基 502、残基 520、残基 532、残基 536、残基 543、および残基 571。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 417、残基 442、残基 499、および残基 502。

【0098】

特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある：残基 392、残基 399、残基 403、残基 411、残基 412、残基 414、残基 416、残基 418、残基 420、残基 423、残基 434、残基 437、残基 438、残基 445、残基 448、残基 450、残基 453、残基 461、残基 476、残基 477、残基 484、残基 485、残基 487、残基 488、残基 494、残基 497、残基 507、残基 509、残基 514、残基 529、残基 534、残基 537、残基 540、残基 551、残基 558、残基 559、残基 567、残基 568、残基 572。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中のアミノ酸置換の少なくとも 1 つは、完全長成熟 H S Aドメイン I I I 中の位置に対応して番号付けされる以下の位置のいずれかにある：残基 380、残基 381、残基 384、残基 387、残基 396、残基 401、残基 404、残基 405、残基 406、残基 409、残基 419、残基 421、残基 422、残基 424、残基 428、残基 430、残基 431、残基 433、残基 441、残基 457、残基 458、残基 463、残基 464、残基 466、残基 469、残基 470、残基 474、残基 475、残基 480、残基 481、残基 489、残基 491、残基 495、残基 500、残基 508、残基 510、残基 515、残基 516、残基 524、残基 525、残基 526、残基 528、残基 531、残基 535、残基 539、残基 544、残基 547、残基 576。

20

30

【0099】

特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、H S Aドメイン I I I のループ 2 中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のループ 2 中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つを含んでなる H S Aドメイン I I I は、H S Aドメイン I I I のループ 2 中にあり、ループ 2 中にない H S Aドメイン I I I の 1 つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つは、H S Aドメイン I I I のループ 3 中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のループ 3 中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I は、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を H S Aドメイン I I I のループ 3 中に含んでなり、ループ 3 中にない H S Aドメイン I I I 中に、1 つまたは複数の

40

50

追加的な置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S Aドメイン I I I のループ6中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のループ6中にある。特定の実施形態では、H S Aドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換をH S Aドメイン I I I のループ6中に含んでなり、ループ6中にないH S Aドメイン I I I 中に、1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S Aドメイン I I I のヘリックス7中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のヘリックス7中にある。特定の実施形態では、H S Aドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換をH S Aドメイン I I I のヘリックス7中に含んでなり、ヘリックス7中にないH S Aドメイン I I I 中に、1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S Aドメイン I I I のループ7中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のループ7中にある。特定の実施形態では、H S Aドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換をH S Aドメイン I I I のループ7中に含んでなり、ループ7中にないドメイン I I I 中に、1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S Aドメイン I I I のヘリックス8中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のヘリックス8中にある。特定の実施形態では、H S Aドメインは、少なくとも1つのアミノ酸置換をH S Aドメイン I I I のヘリックス8中に含んでなり、ヘリックス8中にないH S Aドメイン I I I 中に、1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S Aドメイン I I I のループ8中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のループ8中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I は、少なくとも1つのアミノ酸置換をH S Aドメイン I I I のループ8中に含んでなり、ループ8中にないH S Aドメイン I I I 中に、1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、H S Aドメイン I I I のループ9中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、H S Aドメイン I I I のループ9中にある。特定の実施形態では、H S Aドメイン I I I は、H S Aドメイン I I I 中に少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなり、ループ9中にないH S Aドメイン I I I に、1つまたは複数の追加的なアミノ酸置換をさらに含む。

【0100】

前述の特定の実施形態では、または以下の態様または実施形態のいずれかでは、アミノ酸置換は、残基のアラニンへの変化であってもよい。前述のいずれかの特定の実施形態では、または以下の態様または実施形態では、アミノ酸置換は、残基が同様の電荷およびその他の特性の残基で置換されている、保存的アミノ酸置換であってもよい。前述のいずれかの特定の実施形態では、または以下の態様または実施形態では、アミノ酸置換は、残基が、同様の電荷またはその他の特性を有しない残基で置換されている、非保存的アミノ酸置換であってもよい。前述の特定の実施形態では、または以下の態様または実施形態のいずれかでは、アミノ酸置換は、残基のその他の任意の残基への変化であってもよい。H S A部分が2個以上のアミノ酸残基を含む場合、置換は、前述のアミノ酸置換カテゴリーの任意の1つまたは任意の組み合わせに分類されもよいことが検討される。例えば全ての置換は、アラニンへの変化であってもよく、または保存的アミノ酸置換であってもよく、または非保存的アミノ酸置換であってもよい。代案としては、アミノ酸置換は、例えば、1つのアラニンへの変化、1つの保存的アミノ酸置換、および1つの非保存的アミノ酸置換などの任意の組み合わせを含んでもよい。

【0101】

点変異およびトランケーションによって作成された、コンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、さらに言えば、一定の特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするための広範囲に及ぶ技術が、当該技術分野で公知である。このような技術は、概して、HSAポリペプチドのコンビナトリアル変異誘発によって作成された遺伝子ライブラリーの急速なスクリーニングのために、応用できる。大型遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための最も広く利用されている技術は、典型的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローンするステップと、得られたベクターライブラリーで適切な細胞を形質転換するステップと、所望の活性の検出がその生成物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的容易な単離を促進する条件下において、コンビナトリアル遺伝子を発現するステップとを含んでなる。後述する例証的アッセイのそれぞれは、コンビナトリアル変異誘発技術によって生成される多数の縮重配列のスクリーニングに必要なハイスループット分析を受け入れやすい。

10

【0102】

特定の実施形態では、HSAポリペプチドは、ペプチドとペプチド模倣薬を含んでもよい。本明細書の用法では、「ペプチド模倣薬」という用語は、非天然アミノ酸、ペプチドなどを含有する、化学修飾ペプチドおよびペプチド様分子を含む。ペプチド模倣薬は、ペプチドと比べて、対象への投与時の改善された安定性をはじめとする、様々な利点を提供する。ペプチド模倣薬を同定する方法は、当該技術分野で周知であり、可能なペプチド模倣薬のライブラリーを含有するデータベースのスクリーニングが挙げられる。例えばCambridge Structural Databaseは、既知の結晶構造を有する300,000を超える化合物のコレクションを含有する(Allen et al., Acta Crystallogr. Section B, 35:2331 (1979))。利用できる標的分子の結晶構造がない場合、例えばプログラムCONCORD(Rusinko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251 (1989))を使用して構造を作成し得る。別のデータベースAvailable Chemicals Directory(Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.)は、市販される約100,000個の化合物を含有し、HSAポリペプチドの可能なペプチド模倣薬を検索して同定し得る。

20

【0103】

特定の実施形態では、HSAポリペプチドは、翻訳後修飾をさらに含んでなってもよい。例示的な翻訳後タンパク質修飾としては、リン酸化、アセチル化、メチル化、ADPリボース化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、SUMO化、ビオチン化、またはポリペプチド側鎖付加または疎水性基付加が挙げられる。その結果、修飾HSAポリペプチドは、脂質、多糖類または単糖類、およびリン酸などの非アミノ酸要素を含有してもよい。このような非アミノ酸要素のHSAポリペプチドの機能性に対する影響は、例えばそのFcRn結合能力などのその生物学的活性について試験されてもよい。天然HSAポリペプチドがグリコシル化され得ることを前提として、特定の実施形態では、本開示に従ったキメラポリペプチドで使用されるHSAポリペプチドは、グリコシル化される。特定の実施形態では、グリコシル化のレベルおよびパターンは、天然HSAポリペプチドと同一であり、または実質的に同一である。別の実施形態では、グリコシル化のレベルおよび/またはパターンは、天然HSAポリペプチドと異なる(例えば過小グリコシル化、過剰グリコシル化、非グリコシル化)。

30

40

【0104】

本発明の特定の実施形態では、HSA部分(例えばHSA変種またはキメラポリペプチド)を含んでなるポリペプチドは、非タンパク質作用物質と結合してもよい。このような非タンパク質作用物質としては、核酸分子、化学薬剤、有機分子などが挙げられるが、これに限定されるものではなく、そのそれぞれが例えば天然物スクリーニングなどの天然起源に由来してもよく、または化学的に合成されてもよい。特定の実施形態では、HSA部分は、非タンパク質作用物質と化学的に結合している。

50

【0105】

本発明の特定の一実施形態では、HSAポリペプチドは、非タンパク性ポリマーによって修飾されてもよい。特定の一実施形態では、ポリマーは、米国特許第4,640,835号明細書；米国特許第4,496,689号明細書；米国特許第4,301,144号明細書；米国特許第4,670,417号明細書；米国特許第4,791,192号明細書または米国特許第4,179,337号明細書に記載されるようなポリエチレングリコール（「PEG」）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンである。PEGは良く知られている水溶性ポリマーであり、それは市販され、または当該技術分野で周知の方法に従って、エチレングリコールの開環重合によって調製し得る（Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161）。

10

【0106】

特定の実施形態では、HSAポリペプチドの断片または変種は、好ましくは、天然HSAポリペプチドに付随する生物学的活性の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%を保持する。特定の実施形態では、HSAポリペプチドの断片または変種は、天然タンパク質の半減期と比較して、改善された半減期（ $t_{1/2}$ ）を有する。半減期が改善された実施形態では、HSA断片または変種の半減期は、天然HSAタンパク質の半減期と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%または500%、または1000%にさえ至って改善される。いくつかの実施形態では、タンパク質の半減期は、緩衝食塩水中または血清中などの生体外で測定される。別の実施形態では、タンパク質の半減期は、動物の血清またはその他の体液中のタンパク質の半減期などの生体内半減期である。

20

【0107】

特定の態様では、HSA部分を含んでなるポリペプチドは、融合タンパク質であってもよく、それは1つまたは複数の融合ドメインをさらに含んでなる。このような融合ドメインの周知の例としては、特に親和性クロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に有用である、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、および免疫グロブリン重鎖定常領域（Fc）、マルトース結合タンパク質（MBP）が挙げられるが、これに限定されるものではない。親和性精製の目的で、グルタチオンー、アミラーゼー、およびニッケルーまたはコバルトー共役樹脂などの親和性クロマトグラフィーのための妥当なマトリックスが使用される。融合ドメインはまた、それに対する特異的抗体が入手できる、通常短いペプチド配列である「エピトープタグ」も含む。それに対する特異的モノクローナル抗体が容易に入手できる、周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルス赤血球凝集素（HA）、およびc-mycタグが挙げられる。場合によっては、融合ドメインは、Xa因子またはトロンビンなどのためのプロテアーゼ切断部位を有して、それは妥当なプロテアーゼが、融合タンパク質を部分的に消化できるようにし、それによって組換えタンパク質をそれから遊離させる。次に引き続くクロマトグラフ分離によって、遊離タンパク質を融合ドメインから単離し得る。特定の実施形態では、HSAポリペプチドは、ポリペプチドを安定化できる、1つまたは複数の修飾を含有してもよい。例えばこのような修飾は、ポリペプチドの生体外半減期を増大させ、ポリペプチドの循環半減期を増大させ、またポリペプチドのタンパク質分解を低下させる。同様に、キメラポリペプチドの文脈で、前述の修飾タイプは、それに加えて、または代案として、キメラポリペプチドの異種タンパク質部分に付加されてもよい。

30

40

【0108】

いくつかの実施形態では、HSA部分を含んでなるポリペプチドは、免疫グロブリンのFc領域の全部または一部がある融合タンパク質であってもよい。特定の実施形態では、融合タンパク質は、IgGのFcRn結合領域またはその断片を含んでなる。同様に特定の実施形態では、免疫グロブリンのFc領域の全部または一部をリンカーとして使用して

50

、異種タンパク質のH S A部分に連結させ得る。既知のように、各免疫グロブリン重鎖定常領域は、4または5つのドメインを含んでなる。ドメインは、順次、次のように命名される：C H 1－ヒンジ－C H 2－C H 3（－C H 4）。重鎖ドメインのD N A配列は、免疫グロブリンクラス間で交雑相同性を有し、例えばI g GのC H 2ドメインは、I g AおよびI g DのC H 2ドメインと、およびI g MおよびI g EのC H 3ドメインと相同的である。本明細書の用法では、「免疫グロブリンF c領域」という用語は、免疫グロブリン鎖定常領域、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域、またはその一部のカルボキシル末端部分を意味すると理解される。例えば免疫グロブリンF c領域は、1）C H 1ドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメイン、2）C H 1ドメインおよびC H 2ドメイン、3）C H 1ドメインおよびC H 3ドメイン、4）C H 2ドメインおよびC H 3ドメイン、または5）2つ以上のドメインと免疫グロブリンヒンジ領域との組み合わせを含んでなくてもよい。好ましい実施形態では、免疫グロブリンF c領域は、少なくとも免疫グロブリンヒンジ領域、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含んでなり、好ましくはC H 1ドメインを欠く。一実施形態では、それに重鎖定常領域が由来する免疫グロブリンのクラスは、I g G（I g γ ）（ γ サブクラス1、2、3、または4）である。免疫グロブリンのその他のクラスI g A（I g α ）、I g D（I g δ ）、I g E（I g ϵ ）、およびI g M（I g μ ）を使用してもよい。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択は、米国特許第5, 541, 087号明細書、および米国特許第5, 726, 044号明細書で詳細に考察される。特定の結果を達成するための、特定の免疫グロブリンクラスおよびサブクラスからの特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列の選択は、当該技術分野の技術レベルの範囲内であると見なされる。免疫グロブリンF c領域をコードするD N A構築物の部分は、好ましくはF c γ のヒンジドメインの少なくとも一部、および好ましくはC H₃ドメインの少なくとも一部、またはI g A、I g D、I g E、またはI g Mのいずれかの中の相同ドメインを含んでなる。さらに免疫グロブリン重鎖定常領域内のアミノ酸の置換または欠失が、本発明の実施に有用であってもよいことが検討される。一例は、F c受容体への親和性が低下しているF c変種をもたらし、上部C H 2領域へのアミノ酸置換の導入である（C o l e e t a l.（1997）J. I M M U N O L. 159：3613）。当業者は、周知の分子生物学技術を使用して、このような構築物を調製し得る。同様にキメラポリペプチドの文脈で、キメラポリペプチドの異種タンパク質部分に、それに加えて、または代案として、前述の修飾タイプが付加されてもよい。

【0109】

特定の態様では、H S Aポリペプチドは、スキャフォールドであってもよい。特定の実施形態では、標的に特異的に結合し得るタンパク質フレームワークを選択またはデザインするために、タンパク質が使用される。スキャフォールドからタンパク質をデザインする際、フレームワークの好ましい特性に重要なアミノ酸残基が保持される一方で、その他の残基は変動してもよい。特定の実施形態では、スキャフォールドは、異なる特性を有するタンパク質誘導体間で変動する50%以下のアミノ酸残基と、このような誘導体間で不変の50%以上の残基とを有してもよい。特定の実施形態では、スキャフォールドは、異なる特性を有するタンパク質誘導体間で変動する、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%以上の残基と、このような誘導体間で不変の45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%以下のアミノ酸残基とを有してもよい。特定の実施形態では、スキャフォールドは、異なる特性を有するタンパク質誘導体間で変動する、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%以上のアミノ酸残基と、このような誘導体間で不変の55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%以下の残基とを有してもよい。特定の実施形態では、これらの不変残基は、それらの特性にかかわらず、全ての変種ドメインに同じ全体的三次元折り畳みをもたらす。特定の実施形態では、本開示のその他の態様および実施形態で考察されるように、H S Aポリペプチドスキャフォールドは、修飾または置換されてもよい。特定の実施形態では、H S Aポリペプチドスキャフォールドは、治療薬であってもよい。特定の実施形態では、H S Aポリペプチドスキ

ャフォールドは、標的に対して作動性であってもよい。特定の実施形態では、H S A ポリペプチドスキャフォールドは、標的に対して拮抗性であってもよい。

【0110】

6. 5 キメラポリペプチド

本開示のH S A変種ポリペプチドをはじめとするH S A部分を含んでなるポリペプチドは、任意の異種タンパク質と結合してもよい。特定の実施形態では、異種タンパク質は治療薬である。特定の実施形態では、治療薬は抗体またはペプチドである。特定の実施形態では、キメラポリペプチドの異種タンパク質部分は、抗体またはその抗原結合性断片を含んでなる。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、I g G免疫グロブリンの定常領域をさらに含んでなる。特定の実施形態では、異種タンパク質は、非抗体治療用タンパク質を含んでなる。特定の実施形態では、キメラポリペプチドの異種タンパク質部分は、増殖因子またはサイトカインを含んでなる。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、エピトープをさらに含んでなる。例えば検出および／または精製に有用なエピトープ（例えばH i s タグ、F L A G タグなど）。

【0111】

特定の実施形態では、H S A 部分は、異種タンパク質と化学的に結合している。特定の実施形態では、H S A 部分は、異種タンパク質と組換え的に結合している。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、H S A 部分と異種タンパク質の双方をコードする組換えベクターを使用して生成される。

【0112】

特定の実施形態では、H S A 変種は、原核生物または真核細胞中で生成される。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、原核生物または真核細胞中で生成される。特定の実施形態では、真核細胞は、酵母細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞から選択される。

【0113】

本発明のキメラポリペプチドは、様々な様式で作られる。特定の実施形態では、H S A 部分のC末端は、異種タンパク質（例えば抗体または治療用ペプチド）のN末端に連結し得る。代案としては、異種タンパク質（例えば抗体または治療用ペプチド）のC末端が、H S A 部分のN末端に連結し得る。特定の実施形態では、H S A 部分は、異種タンパク質の内部アミノ酸と結合している。特定の実施形態では、可能な立体配置は、必要に応じて抗体の重鎖および軽鎖配列のトランケート部分の使用を含んで、付着H S A 部分および／または付着異種タンパク質の機能的統合性を維持する。特定のその他の実施形態では、H S A 部分は、H S A ドメインI I I、またはその新生児F c 受容体（F c R n）結合断片、およびH S A ドメインI、またはH S A ドメインI I、またはH S A ドメインI およびI I の少なくとも一部を含んでなる。さらになおも、異種タンパク質は、H S A 部分またはその変種の露出内部（非末端）残基に連結し得る。さらなる実施形態では、H S A - 異種タンパク質立体配置の任意の組み合わせを用い得て、それによって1 : 1を超えるH S A : 異種タンパク質比がもたらされる（例えば1つの異種タンパク質に対して2つのH S A 分子）。

【0114】

H S A 部分と異種タンパク質は、互いに直接結合してもよい。代案としては、それらは、各ドメインがその二次および三次構造に適切に折り畳まれることを確実にするのに十分な距離に、H S A 部分と異種タンパク質とを隔てるリンカー配列を介して互いに連結してもよい。特定の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。好ましいリンカーは、（1）可撓性の伸長コンフォメーションを取るべきであり、（2）H S A ポリペプチドまたは異種タンパク質の機能ドメインと相互作用し得る、規則正しい二次構造を生じる性向を示してはならず、（3）機能性タンパク質ドメインとの相互作用を促進し得る、疎水性または荷電特徴が最小であるべきである。

【0115】

特定の実施形態では、リンカー長さは、少なくとも80オングストローム（Å）、また

は少なくとも100 Å、または少なくとも120 Å、または少なくとも140 Å、または少なくとも160 Å、または少なくとも180 Å、または少なくとも200 Åである。特定の実施形態では、リンカー長さは、約80 Å～約200 Å、または約100 Å～約180 Å、または約120 Å～約160 Åである。

【0116】

特定の実施形態では、リンカーはペプチドリinkerである。特定の実施形態では、リンカーはペプチドリinkerであり、ペプチドリinkerは、以下の特性の1つまたは複数を含む：a) それは異種タンパク質配列とHSA部分が互いに回転できるようにする；b) それはプロテアーゼ消化に対する耐性を示し；c) それは異種タンパク質配列またはHSA部分と相互作用しない。可撓性のタンパク質領域の典型的な表面アミノ酸としては、Gly、Asn、およびSerが挙げられる。Gly、Asn、およびSerを含むアミノ酸配列の並べ替えは、リンカー配列についての上の基準を満たすことが予想される。ThrおよびAlaなどのその他のほぼ中性のアミノ酸もまた、リンカー配列中で使用し得る。特定の実施形態では、ペプチドリinker中の各アミノ酸は、Gly、Ser、Asn、Thr、およびAlaからなる群から選択される。特定の実施形態では、ペプチドリinkerはGly-Ser要素を含む。特定の実施形態では、ペプチドリinkerは1つまたは複数のGly-Gly-Gly-Gly-Ser反復を含んでなる。特定の実施形態では、リンカーは1、2、3、4、5、6または7個のGly-Gly-Gly-Gly-Ser反復を含む。特定の実施形態では、約20個のアミノ酸のリンカー配列長を使用して、機能性タンパク質ドメインの適切な隔たりを提供し得るが、より長いまたはより短いリンカー配列もまた使用してもよい。HSAポリペプチドと異種タンパク質を隔てるリンカー配列の長さは、5～500アミノ酸長、より好ましくは5～100アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、約5～60または約5～30のアミノ酸長である。特定の実施形態では、リンカー配列は、約5～約20個のアミノ酸、有利には約10～約30個のアミノ酸である。別の実施形態では、HSA部分と異種タンパク質を連結するリンカーは、抗体（例えば抗体のFc領域全部または一部）の定常領域であり得る。特定の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。

【0117】

特定の実施形態では、本発明のキメラポリペプチドは、良く知られている架橋試薬とプロトコルを使用して生成し得る。例えば当業者に知られている、異種タンパク質（例えば抗体）によるHSAポリペプチドの架橋に有用な多数の化学的架橋剤がある。例えば架橋剤は、分子を段階的様式で連結するのに使用し得る、ヘテロ二機能性架橋剤である。ヘテロ二機能性架橋剤は、タンパク質を結合させるためのより特異的な共役法をデザインする能力を提供し、それによってホモタンパク質ポリマーなどの望まれない副反応の発生を低下させる。スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)；N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノ安息香酸塩(SIAB)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)酪酸塩(SMPB)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)；4-スクシンイミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン(tolune)(SMPT)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート]ヘキサノエート(LC-SPDP)をはじめとする、多種多様なヘテロ二機能性架橋剤が当該技術分野で公知である。N-ヒドロキシスクシンイミド部分を有する架橋剤は、概してより大きな水溶性を有する、N-ヒドロキシルホスクリンイミドアナログとして得られる。さらに生体内におけるリンカー切断量を低下させるように、アルキル誘導体の代わりに、連結鎖内にジスルフィド架橋を有する架橋剤を合成し得る。ヘテロ二機能性架橋剤に加えて、ホモ二官能性および光反応性架橋剤をはじめとする、いくつかのその他の架橋剤が存在する。スベリン酸ジスクシンイミジル(Dissuccinimidyl subcrate)(DSS)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)、およびジメチル

10

20

30

40

50

ピメルイミド酸・2HCl (DMP) が、有用なホモ二官能性架橋剤の例であり、ビス-[B-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド(BASED)およびN-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート(SANPAH)が、本発明で使用する有用な光反応性架橋剤の例である。タンパク質共役技術の最近のレビューについては、本明細書で参照によって援用する、Means et al. (1990) Bioconjugate Chemistry 1:2-12を参照されたい。

【0118】

上に含まれる、特に有用なヘテロ二機能性架橋剤の1つのクラスは、一級アミン反応基、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、またはその水溶性アナログ、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(スルホ-NHS)を含有する。アルカリpHでは一級アミン(リジンε基)はプロトン化されず、NHSまたはスルホ-NHSエステルに対する求核攻撃によって反応する。この反応は、アミド結合の形成、および副産物としてのNHSまたはスルホ-NHSの放出をもたらす。ヘテロ二機能性架橋剤の一部として有用な別の反応基は、チオール反応基である。一般的チオール反応基としては、マレイミド、ハロゲン、およびピリジルジスルフィドが挙げられる。マレイミドは、わずかに酸性から中性(pH 6.5~7.5)条件下で、遊離スルフヒドリル(システイン残基)と分単位で特異的に反応する。ハロゲン(ヨードアセチル官能基)は、生理学的pHにおいて-SH基と反応する。これらの反応基は、どちらも安定したチオエーテル結合の形成をもたらす。ヘテロ二機能性架橋剤の第3の構成要素は、スペーサーアームまたは架橋である。架橋は、2つの反応性末端を結合する構造である。架橋の最も明白な属性は、立体障害に対するその影響である。場合によっては、より長い架橋は、2つの複雑な生体分子を連結するのに必要な距離に、より容易に広がり得る。

【0119】

ヘテロ二機能性試薬を使用したタンパク質複合体の調製は、アミン反応およびスルフヒドリル反応を伴う二段法である。第一段階であるアミン反応では、選択されたタンパク質は一級アミンを含有すべきである。これは、ほとんどのタンパク質のN末端に見られる、リジンεアミンまたは一級αアミンであり得る。タンパク質は、遊離スルフヒドリル基を含有してはならない。結合する双方のタンパク質が遊離スルフヒドリル基を含有する場合、例えばN-エチルマレイミドを使用して、全てのスルフヒドリルが、ブロックされるように、片方のタンパク質を修飾し得る(本明細書で参照によって援用する、Partis et al. (1983) J. Pro. Chem. 2:263を参照されたい)。エルマン試薬を使用して、特定タンパク質中のスルフヒドリルの量を計算し得る(例えば本明細書で参照によって援用する、Ellman et al. (1958) Arch. Biochem. Biophys. 74:443およびRiddles et al. (1979) Anal. Biochem. 94:75を参照されたい)。

【0120】

特定の実施形態では、本発明のキメラポリペプチドは、Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993)およびGrant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)に記載されるものなどの標準タンパク質化学技術を使用して生成し得る。これに加えて、自動ペプチド合成機が市販される(例えばAdvanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。HSAを異種タンパク質に化学的に結合させる、前述の架橋方法のいずれにおいても、切断可能なドメインまたは切断可能なリンカーを使用し得る。切断は、異種タンパク質とHSAポリペプチドとを分離できるようにする。例えばキメラポリペプチドの細胞への侵入に続く、切断可能なリンカーの切断は、HSAを異種タンパク質から分離できるようにする。

【0121】

特定の実施形態では、本発明のキメラポリペプチドは、連続ポリペプチド鎖として発現される、H S A 部分と異種タンパク質（例えば抗体または治療用ペプチド）とを含有する、融合タンパク質として生成し得る。このようなキメラポリペプチドは、本明細書で組換え的に結合すると言及される。このような融合タンパク質の調製では、H S A 部分と異種タンパク質とをコードする核酸、および任意選択的にH S A 部分と異種タンパク質に広がるペプチドリンカー配列を含んでなる、融合遺伝子が構築される。翻訳生成物が所望の融合タンパク質である、融合遺伝子を生成するための組換えDNA技術の使用については、当該技術分野で公知である。遺伝子のコード配列およびその調節領域のどちらも再デザインして、タンパク質生成物の機能特性、タンパク質生成量、またはその中でタンパク質が生成される細胞型を変化させ得る。遺伝子のコード配列は、例えばその一部を異なる遺伝子のコード配列に融合させ、融合タンパク質をコードする新規ハイブリッド遺伝子を生成することにより、大幅に変化させ得る。融合タンパク質を生成する方法の例については、本明細書で参照によって援用する、P C T 出願 P C T / U S 8 7 / 0 2 9 6 8 号明細書、P C T / U S 8 9 / 0 3 5 8 7 号明細書、および P C T / U S 9 0 / 0 7 3 3 5 号明細書、ならびに Trauneker et al. (1989) Nature 339: 68 に記載される。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の連結は、ライゲーションのための平滑末端または突出末端、適切な末端を提供する制限酵素消化、必要に応じた付着端充填、望ましくない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーションを用いて、従来技術に従って実施される。代案としては、融合遺伝子は、自動DNA合成機をはじめとする従来技術によって合成され得る。別の方法では、2つの連続的遺伝子断片間に相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを使用して、遺伝子断片のPCR増幅を実施し得て、それを引き続いてアニールして、キメラ遺伝子配列を生成し得る（例えば Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992 を参照されたい）。融合遺伝子によってコードされるキメラポリペプチドは、当該技術分野で周知のように、様々な発現系を使用して組換え的に生成してもよい（下記もまた参照）。

【0122】

組換え的に結合しているキメラポリペプチドとしては、その中でH S A 部分が異種タンパク質のN末端またはC末端に結合している、実施形態が挙げられる。

【0123】

いくつかの実施形態では、米国特許出願公開第2003/0166877号明細書に記載されるように、キメラポリペプチドに広がる接合部領域内の候補T細胞エпитープを同定して、接合部領域内のアミノ酸を変化させることで、キメラポリペプチドの免疫原性を低下させてもよい。

【0124】

キメラタンパク質という用語は、これらの部分がどのように相互連結されるか（例えば化学的結合、組換え的結合）に関係なく、（H S A 変種ポリペプチドなどの）H S A 部分と異種タンパク質とを含んでなる、タンパク質を指すのに使用される。したがってキメラタンパク質、融合タンパク質、および複合タンパク質という用語は、同義的に使用される。

【0125】

異種タンパク質の例示的なカテゴリーとしては、酵素、増殖因子、およびサイトカインが挙げられるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、異種タンパク質は抗体である。

【0126】

H S A 部分を含んでなるキメラポリペプチドで使用される異種タンパク質は、増殖因子、酵素、骨形成タンパク質、および可溶性受容体断片などの治療用タンパク質、またはその断片であってもよい。例示的な異種ポリペプチドとしては、肝細胞増殖因子（HGF）、神経増殖因子（NGF）、表皮増殖因子（EGF；EGFファミリー増殖因子構成員）

、線維芽細胞増殖因子（F G F； F G Fファミリー増殖因子構成員）、形質転換増殖因子（例えばT G F- α 、T G F- β 、T G F- β 2、T G F- β 3）、血管内皮増殖因子（V E G F；例えばV E G F-2）などの増殖因子；インターフェロン（例えばI N F- α 、I N F- β ）；インターロイキン（例えばI L-1、I L-2）；サイトカイン；およびインシュリンが挙げられる。その他の例示的な異種タンパク質としては、酵素が挙げられる。その他の例示的な異種ポリペプチドとしては、骨形成タンパク質（B M P；B M Pタンパク質ファミリー構成員）、エリスロポエチン（E P O）、ミオスタチン、および腫瘍壊死因子（例えばT N F- α ）が挙げられる。その他の例示的な異種ポリペプチドとしては、細胞受容体の任意の天然細胞外ドメインをはじめとする、膜貫通受容体の細胞外ドメイン、ならびに（変異体、断片およびペプチド模倣形態をはじめとする）その任意の変種が挙げられる。

10

【0127】

H S A部分を含んでなるキメラポリペプチド中で使用される異種タンパク質は、抗体またはその抗原結合部分をはじめとする、治療用タンパク質、またはその断片であってもよい。例示的な抗体および抗体断片としては、ヒュミラ（登録商標）、レミケード（登録商標）、シンボニー（登録商標）、リツキサナ（登録商標）、ハーセプチン（登録商標）、アバスチン（登録商標）、アービタックス（登録商標）；シナジス（登録商標）、マイロタッグ（登録商標）、キャンパス（登録商標）、セラC I M（登録商標）、ベクティビックス（登録商標）、タイサブリ（登録商標）、レオプロ（登録商標）、ルセンティス（登録商標）、シムジア（登録商標）などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

20

【0128】

6. 6 H S A関連核酸および発現

特定の態様では、本開示は、本開示のポリペプチド（例えばH S A変種、H S A部分のあるキメラポリペプチド）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、核酸構築物を提供する。さらに本発明は、キメラポリペプチドまたはH S A変種ポリペプチド（例えばそれらの生物活性断片、変種、および融合物をはじめとするH S A部分）を生成するために、このような核酸を利用する。ある特定の実施形態では、本発明の組換えキメラタンパク質を生成するために、核酸は、異種タンパク質（例えば抗体または治療用ペプチド）をコードするD N Aをさらに含んでなってもよい。これらの核酸は全て、集合的にH S A核酸と称される。

30

【0129】

特定の態様では、本開示は、（i）ヒト血清アルブミン（H S A）部分をコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸構築物を提供し、そのH S A部分は、H S AドメインI I I、またはそのF c R n結合断片を含んでなり、そのH S AドメインI I Iは、（i i）異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結する1～18個のアミノ酸置換を含んでなり、核酸構築物は異種タンパク質の機能活性を保持して、F c R nに結合し得る、キメラポリペプチドをコードして、前記キメラポリペプチドは、H S A部分が前記アミノ酸置換を含まない対照キメラポリペプチドと比較して、血清半減期および／またはF c R n親和性の増大を有する。

【0130】

特定の実施形態では、核酸構築物によってコードされるキメラポリペプチドは、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性で、F c R nに結合する。特定の実施形態では、核酸構築物によってコードされるキメラポリペプチドは、前記対照キメラポリペプチドと比較して、増大した血清半減期を有する。特定の実施形態では、核酸構築物によってコードされるキメラポリペプチドは、これらの特性の双方を有する。

40

【0131】

特定の実施形態では、（i）ヒト血清アルブミン（H S A）部分をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、そのH S A部分はH S AドメインI I I、またはそのF c R n結合断片を含んでなり、そのH S AドメインI I Iは1～18（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18）個のアミ

50

ノ酸置換を含んでなる。

【0132】

特定の実施形態では、核酸構築物によってコードされるHSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、複数種を越えて保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、複数種を越えて保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、表面接近可能な残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能な残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である。特定の実施形態では、HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である。

10

【0133】

特定の実施形態では、(i)配列番号1と少なくとも90%同一であるHSAドメインIIIをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。特定の実施形態では、(i)配列番号1と少なくとも95%同一であるHSAドメインIIIをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。特定の実施形態では、(i)配列番号1と少なくとも98%同一であるHSAドメインIIIをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。

20

【0134】

特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ2中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ3中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ6中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのヘリックス7中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ7中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのヘリックス8中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ8中にある。特定の実施形態では、前記アミノ酸置換の少なくとも1つは、HSAドメインIIIのループ9中にある。

30

【0135】

特定の実施形態では、(ii)異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、その異種タンパク質は抗体またはその抗原結合性断片を含んでなる。特定の実施形態では、(ii)異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、その異種タンパク質は治療用タンパク質を含んでなる。

40

【0136】

特定の実施形態では、ヌクレオチド配列は、IgG免疫グロブリンの定常領域をさらにコードする。

【0137】

特定の実施形態では、(ii)異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、その異種タンパク質は増殖因子またはサイトカインを含んでなる。特定の実施形態では、核酸構築物は、リンカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでなる。

【0138】

核酸は、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNA分子であってもよい。特定の実施形態では、本開示は、HSA配列（例えば配列番号1および2）の同一領域と少なくとも8

50

0 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %または100 %同一であるHSA部分をコードする、単離または組換え核酸配列に関する。さらなる実施形態では、HSA核酸配列は、単離、組換え、および／または異種ヌクレオチド配列との融合であり、またはDNAライブラリー中にあり得る。

【0139】

特定の実施形態では、HSA核酸はまた、高度にストリンジェントな条件下で、上述の天然HSAヌクレオチド配列、またはその補体配列のいずれかとハイブリダイズするヌクレオチド配列も含む。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する、適切なストリンジェンシー条件が変動し得ることを容易に理解するであろう。例えば約45℃で6.0×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム(SSC)と、それに続く50℃で2.0×SSCの洗浄のハイブリダイゼーションを実施し得る。例えば洗浄ステップの塩濃度は、50℃で約2.0×SSCの低ストリンジェンシーから、50℃で約0.2×SSCの高ストリンジェンシーより選択し得る。これに加えて、洗浄ステップの温度は、約22℃の室温の低ストリンジェンシー条件から、約65℃の高ストリンジェンシー条件に上昇させ得る。温度および塩のどちらも変動してもよく、または温度または塩濃度が一定に保たれる一方で、別の変数が変化してもよい。一実施形態では、本発明は、室温で6×SSCと、それに続く室温で2×SSCの洗浄の低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。

【0140】

遺伝コード中の縮重のために天然HSA核酸と異なる単離核酸もまた、本発明の範囲内である。例えばいくつかのアミノ酸は、2つ以上のトリプレットによって指定される。同一アミノ酸を指定するコドンまたは同義コドン(例えばCAUおよびCACは、ヒスチジンの同義コドンである)は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント」変異をもたらしてもよい。しかし対象タンパク質のアミノ酸配列変化をもたらすDNA配列多型性が、哺乳類細胞の間に存在することが予測される。当業者は、天然対立遺伝子の多様性のために、特定タンパク質をコードする核酸の1つまたは複数のヌクレオチド(最高で約3~5%のヌクレオチド)中のこれらの多様性が、所与の種の個体間に存在してもよいことを理解するであろう。ありとあらゆるこのようなヌクレオチドの多様性、および結果として生じるアミノ酸の多型性は、本発明の範囲内である。

【0141】

特定の実施形態では、組換えHSA核酸は、発現構築物中の1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列と、作動可能に連結してもよい。調節ヌクレオチド配列は、発現のために使用される宿主細胞に、一般に適切である。多様な宿主細胞について、適切な発現ベクターの多数のタイプおよび適切な制御配列が、当該技術分野で公知である。典型的に、前記1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダーまたはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、およびエンハンサーまたは活性化因子配列が挙げられるが、これに限定されるものではない。当該技術分野で公知の構成的または誘導性プロモーターが、本発明によって検討される。プロモーターは、天然プロモーター、または2つ以上のプロモーターの要素を組み合わせたハイブリッドプロモーターのいずれかであってもよい。プラスミドなどの発現構築物が、細胞中のエピソーム上に存在してもよく、または発現構築物が染色体中に挿入されてもよい。好ましい実施形態では、発現ベクターは選択可能なマーカー遺伝子を含み、形質転換宿主細胞を選択できるようにする。選択可能なマーカー遺伝子は、当該技術分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なる。特定の態様では、本発明は、HSAポリペプチドをコードして、少なくとも1つの制御配列と作動可能に連結する、ヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターに関する。制御配列は技術分野で認められ、コードされたポリペプチドの発現を誘導するように選択される。したがって制御配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、およびその他の発現調節因子を含む。例示的な制御配列は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Di

10

20

30

40

50

e g o, C A (1 9 9 0) に記載される。発現ベクターのデザインは、形質転換される宿主細胞の選択、および／または発現が所望されるタンパク質タイプなどの要素に左右されてもよいものと理解すべきである。さらにベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、および抗生物質マーカーなどのベクターによってコードされる任意のその他のタンパク質の発現もまた、考慮すべきである。

【0142】

本発明はまた、本発明のH S Aポリペプチドまたはキメラポリペプチドをコードする組換え遺伝子で形質移入された、宿主細胞に関する。宿主細胞は、任意の原核生物または真核細胞であってもよい。例えばH S Aポリペプチドまたはキメラポリペプチドは、大腸菌 (E . c o l i) などの細菌細胞、 (例えばバキュロウイルス発現系を使用する) 昆虫細胞、酵母、または哺乳類細胞中で発現されてもよい。その他の適切な宿主細胞が、当業者に知られている。

10

【0143】

本発明は、本発明のH S Aポリペプチド、異種タンパク質、および／またはキメラポリペプチドを生成する方法にさらに関する。例えばH S Aポリペプチドまたはキメラポリペプチドをコードする発現ベクターで形質移入された宿主細胞が、ポリペプチドを発現できるようにする適切な条件下で培養され得る。ポリペプチドは分泌されて、細胞とポリペプチド含有培地との混合物から単離されてもよい。代案としては、ポリペプチドは細胞質内にまたは膜画分内に保持され、細胞が収集、溶解されて、タンパク質が単離されてもよい。細胞培養物は、宿主細胞、培地、およびその他の副産物を含む。細胞培養に適する培地は、当該技術分野で周知である。ポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、およびポリペプチド (例えばH S Aポリペプチド) の特定エピトープに特異的な抗体による免疫親和性精製をはじめとする、タンパク質精製のための当該技術分野で公知の技術を使用して、細胞培養液、宿主細胞、またはその双方から単離し得る。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含有する、融合タンパク質である。

20

【0144】

組換えH S A核酸は、クローン遺伝子またはその一部を、原核生物細胞、真核生物細胞 (酵母、鳥類、昆虫または哺乳類) 、またはその双方のいずれかの発現に適するベクター中に連結することで、生成され得る。組換えポリペプチド生成のための発現ビヘクルとしては、プラスミドおよびその他のベクターが挙げられる。例えば適切なベクターとしては、大腸菌 (E . c o l i) などの原核生物細胞中での発現のための、p B R 3 2 2 由来プラスミド、p E M B L 由来プラスミド、p E X 由来プラスミド、p B T a c 由来プラスミド、およびp U C 由来プラスミドタイプのプラスミドが挙げられる。好ましい哺乳類発現ベクターは、細菌中におけるベクター増殖を容易にする原核生物配列と、真核生物細胞中で発現される1つまたは複数の真核生物転写単位との双方を含有する。p c D N A I / a m p 、 p c D N A I / n e o 、 p R c / C M V 、 p S V 2 g p t 、 p S V 2 n e o 、 p S V 2 - d h f r 、 p T k 2 、 p R S V n e o 、 p M S G 、 p S V T 7 、 p k o - n e o 、 およびp H y g 由来ベクターが、真核生物細胞の形質移入に適する哺乳類発現ベクターの例である。これらのベクターのいくつかは、p B R 3 2 2 などの細菌プラスミドからの配列により改変されて、原核生物と真核生物細胞の双方で、複製および薬剤耐性選択を容易にする。代案としては、真核生物細胞中におけるタンパク質の一過性発現のために、ウシ乳頭腫ウイルス (B P V - 1) 、またはエプスタイン・バーウイルス (p H E B o 、 p R E P 由来、およびp 2 0 5) などのウイルスの誘導体を使用し得る。プラスミド調製および宿主生物形質転換で用いられる様々な方法は、当該技術分野で周知である。原核生物および真核生物細胞の双方のためのその他の適切な発現系、ならびに一般的組換え手順については、M o l e c u l a r C l o n i n g A L a b o r a t o r y M a n u a l , 2 n d E d . , e d . b y S a m b r o o k , F r i t s c h a n d M a n i a t i s (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , 1 9 8 9) C h a p t e r s 1 6 a n d 1 7 を参照されたい。場合によっては

30

40

50

、バキュロウイルス発現系の使用によって、組換えポリペプチドを発現することが望ましいことがある。このようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター（pVL1392、pVL1393、およびpVL941など）、pAcUW由来ベクター（pAcUW1など）、およびpBlueBac由来ベクター（sgal含有pBlueBac I I Iなど）が挙げられる。

【0145】

融合遺伝子を生成する技術は、良く知られている。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の連結は、ライゲーションのための平滑末端または突出末端、適切な末端を提供する制限酵素消化、必要に応じた付着端充填、望ましくない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーションを用いて、従来の技術に従って実施される。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機をはじめとする従来の技術によって合成され得る。代案としては、2つの連続的遺伝子断片間に相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを使用して、遺伝子断片のPCR増幅を実施し得て、それを引き続いてアニールして、キメラ遺伝子配列を生成し得る（例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992を参照されたい）。

【0146】

6.7 処置方法

特定の実施形態では、本開示は、本開示のキメラ融合物の異種タンパク質を使用して、処置可能な病的状態を処置する方法を提供する。特定の実施形態では、本開示は、前記タンパク質をHSA部分に結合させるステップを含んでなり、そのHSA部分が、ドメインI I I、またはその新生児Fc受容体（FcRn）結合断片を含んでなる、対象中のタンパク質の血清半減期を増大させ、および／またはFcRn結合親和性を増大させる方法を提供する。特定の実施形態では、HSAドメインI I Iは、1～18個のアミノ酸置換を含んでなり、得られる対照ポリペプチドと比較して、相対的キメラポリペプチドのFcRn親和性、および血清半減期の片方または双方を増大させる。これらの方法は、上述したようなキメラまたはHSA変種ポリペプチドの治療有効量をそれを必要とする個体に投与するステップを伴う。特定の実施形態では、方法は、（a）HSA部分またはその生物活性断片と、（b）異種タンパク質とを含んでなる、キメラポリペプチドを投与するステップを含んでなる。これらの方法は、特に動物、およびより具体的にはヒトの治療的および予防的処置を目的としている。

【0147】

処置し得る特定の疾患および病的状態は、キメラタンパク質の異種タンパク質部分に依存することに留意されたい。さらに本開示は、特定の疾患または病的状態の処置に適する異種タンパク質を含むキメラポリペプチドが、特定の疾患または病的状態の処置に適する1つまたは複数のその他の化合物またはその他の治療方法と共に、薬剤投与計画の一部として投与され得ることを想定する。さらに本開示は、キメラポリペプチドが、患者の年齢、体重、健康、疾患重症度などを考慮して、医学的に適切な処置と調和した様式で投与されることを想定する。

【0148】

一例として、異種タンパク質がヒュミラであれば、キメラポリペプチドは、例えば関節リウマチ、乾癬、若年性関節炎、およびクローン病の処置で使用されてもよい。異種タンパク質がインシュリンであれば、キメラポリペプチドは、例えばインシュリン治療で使用されてもよい。

【0149】

「処置」、「処置する」などの用語は、一般に所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを意味するために、本明細書で使用される。効果は、疾患、病的状態、またはその症状を完全にまたは部分的に防止する観点から予防的であってもよく、および／または疾患または病的状態、および／または疾患または病的状態に帰属される悪影響の部

分的または完全治癒の観点から治療的であってもよい。「処置」は、本明細書の用法では、哺乳類、特にヒトの疾患または病的状態の任意の処置をカバーして、以下を含む：（a）疾患または病的状態の素因があってもよいが、なおもそれにかかっていると診断されていない対象において、疾患または病的状態が発生するのを予防する；（b）疾患または病的状態を抑制する（例えばその進行抑止）；または（c）疾患または病的状態を軽減する（例えば疾患または病的状態の退縮を引き起こし、1つまたは複数の症状の改善を提供する）。任意の病的状態の改善は、標準法および当該技術分野で公知の技術に従って容易に評価し得る。疾患方法によって処置される対象集団としては、望ましくない病的状態または疾患を患っている対象、ならびに病的状態または疾患を発症するリスクがある対象が挙げられる。

10

【0150】

「治療有効用量」または「有効量」という用語は、それがそのために投与される、所望の効果を生じる用量を意味する。正確な用量は処理の目的に左右され、既知の技術を使用して、当業者によって確かめられるであろう（例えばLloyd（1999）The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compoundingを参照されたい）。

【0151】

特定の実施形態では、本発明の1つまたは複数のキメラまたはHSA変種ポリペプチドは、一緒に（同時）または異なる時間に（逐次）投与され得る。これに加えて、本発明のキメラまたはHSA変種ポリペプチドは、同一疾患または症状を処置するための1つまたは複数の追加的な化合物または治療法と組み合わせて、投与し得る。例えば1つまたは複数の治療用化合物と併せて、1つまたは複数のキメラまたはHSA変種ポリペプチドを同時投与し得る。併用療法は、同時のまたは交互の投与を包含してもよい。これに加えて、組み合わせは、急性または慢性投与を包含してもよい。任意選択的に、疾患または症状の処置のために、本発明のキメラまたはHSA変種ポリペプチドと追加的な化合物が、相加的または相乗の様式で作用する。併用療法で使用される追加的な化合物としては、小型分子、ポリペプチド、抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNA分子が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに併用療法はまた、その他の非薬剤治療法と共に、本明細書で開示される方法を含む。組み合わせ治療法の性質次第で、その他の治療法を投与する間に、および／またはその後、本発明のキメラまたはHSA変種ポリペプチドの投与を継続してもよい。キメラまたはHSA変種ポリペプチドの投与は、単回投与、または複数回投与で行ってもよい。場合によっては、キメラまたはHSA変種ポリペプチドの投与は、その他の治療法の少なくとも数日前に開始される一方、その他の事例では、投与は、その他の治療法の直前または投与時のいずれかに開始される。

20

30

【0152】

6.8 投与方法

特定の実施形態では、前記対象への投与は、HSA変種またはキメラポリペプチドを全身投与するステップを含んでなる。特定の実施形態では、前記対象への投与は、HSA変種またはキメラポリペプチドを経口的に投与するステップを含んでなる。特定の実施形態では、前記対象への投与は、前記HSA変種またはキメラポリペプチドを静脈内投与するステップを含んでなる。

40

【0153】

特定の態様では、本開示は、本開示のHSA変種またはキメラポリペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる組成物を提供する。特定の実施形態では、組成物は無菌組成物である。特定の実施形態では、組成物は非発熱性である。

【0154】

例えばリポソーム内カプセル封入、微粒子、マイクロカプセル、化合物を発現できる組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシスなどの様々な送達系が知られており、本開示のキメラまたはHSA変種ポリペプチドを投与するのに使用し得る（例えばWu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照されたい）。

50

）。導入方法は、腸内；または皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、肺、鼻腔内、眼内、硬膜外、局所、および経口経路をはじめとするが、これに限定されるものではない非経口であり得る。特定の実施形態では、非経口導入としては、筋肉内、皮下、静脈内、血管内、および心膜内投与が挙げられる。

【0155】

キメラまたはHSA変種ポリペプチドは、例えば輸液またはボーラス投与、上皮層または皮膚粘膜層（例えば口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を通じた吸収などの任意の都合良い手段によって投与されてもよく、その他の生物学的活性作用物質と共に投与されてもよい。投与は、全身性または局所性であり得る。例えば吸入器またはネブライザー、およびエアロゾル化剤との調合物の使用によって、肺投与もまた用い得る。

10

【0156】

特定の実施形態では、処置を必要とする領域（例えば筋肉）に、本発明のキメラまたはHSA変種ポリペプチドを局所的に投与することが望ましいことがあり；これは限定を意図せず、例えば外科手術中の局所注入、例えば注射による、カテーテルの手段による、または移植片の手段による局所施用によって達成されてもよく、移植片は、シラスティック膜などの膜、繊維、または市販の皮膚代替物をはじめとする、多孔性、非多孔性、またはゼラチン質材料である。

【0157】

別の実施形態では、本開示のキメラまたはHSA変種ポリペプチドは、小胞、特にリソソームに送達され得る（Langer, 1990, Science 249:1527-1533を参照されたい）。さらに別の実施形態では、本開示のキメラまたはHSA変種ポリペプチドは、放出制御系中で送達され得る。別の実施形態では、ポンプを使用してもよい（Langer, 1990、前出、を参照されたい）。別の実施形態では、ポリマー材料を使用し得る（Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105を参照されたい）。ある特定の実施形態では、本開示のキメラまたは変種ポリペプチドは、静脈内送達され得る。

20

【0158】

特定の実施形態では、キメラまたはHSA変種ポリペプチドは静脈輸液によって投与される。特定の実施形態では、キメラまたはHSA変種ポリペプチドは、少なくとも10分間、少なくとも15分間、少なくとも20分間、または少なくとも30分間にわたって輸液される。別の実施形態では、キメラまたはHSA変種ポリペプチドは、少なくとも60分間、90分間、または120分間にわたって輸液される。輸液期間に関わりなく、本開示は、各輸液が、キメラまたはHSA変種ポリペプチドが一定のスケジュール（例えば毎週、毎月など）に従って投与される全治療計画の一部であることを想定する。

30

【0159】

6.9 評価方法

本開示のキメラポリペプチドは、(i)異種タンパク質の機能を実質的に保持して、(ii)非修飾HSA部分に結合したキメラポリペプチドと比較して、または別の適切な対照と比較して、FcRn親和性が増大し、および／または血清半減期が増大することに基づいて特徴付けられる。本開示のHSA変種ポリペプチドは、天然HSA部分と比較して、または別の適切な対照と比較して、FcRn親和性が増大し、および／または血清半減期増大することに基づいて特徴付けられる。キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドの特性は、生体外(in vitro)または生体内(in vivo)の任意の1つまたは複数の適切なアッセイで評価してもよい。

40

【0160】

一例として、例えば実施例に記載される任意の1つまたは複数のアッセイ、またはその他の結合アッセイを使用して、FcRn親和性(K_aおよび／またはK_d)を生体外で評価してもよい。同様に、例えば実施例に記載される任意の1つまたは複数のアッセイ、またはその他の結合アッセイを使用して、k_{off}および／またはk_{on}を生体外で評価してもよい。

50

【0161】

抗原と抗体間の結合の親和定数および特異性の測定は、抗HSA抗体を使用した、治療法、診断法、および研究法の有効性を判定する際の中心要素である。「結合親和性」は、一般に、分子の単一結合部位（例えば抗体、HSA部分）と、その結合パートナー（例えば抗原、FcRn）間の非共有結合の相互作用強度の合計を指す。特に断りのない限り、本明細書の用法では、「結合親和性」は、結合対構成員（例えば抗体および抗原）間の1：1の相互作用を反映する、固有結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般に平衡解離定数（ K_d または K_D ）によって表され、それは比率 k_{off}/k_{on} として計算される。例えばChen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881を参照されたい。親和性は、BIACoreなどの本明細書で記載され例示されるものをはじめとする、当該技術分野で公知の一般的方法によって測定し得る。低親和性抗体が、概して抗原に緩慢に結合して容易に解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は、概して抗原により急速に結合してより長く結合する傾向がある。結合親和性を測定する多様な方法は、当該技術分野で公知であり、そのいずれかを本発明の目的で使用し得る。

10

【0162】

特定の実施形態では、キメラポリペプチドまたは変種HSAポリペプチドは、対照と比較して、ほぼ1.5、2、2.5、3、4、またはほぼ5倍改善されたFcRn親和性を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドは、対照と比較して、5倍を上回り、または10倍さえ上回って改善された親和性を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドは、対照と比較して、20、25、40倍を上回り、または50倍を上回って改善された親和性を有する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドは、対照と比較して、ほぼ5～10倍、ほぼ10～20倍、ほぼ25～40倍、ほぼ40～50倍、ほぼ50～75、またはほぼ75～100倍改善された親和性を有する。 K_a の計算によって親和性を評価すると、これらの親和性改善は、 K_a の増大（例えば上で概説されるように2倍、5倍、10倍など）に変換される。 K_d の計算によって親和性を評価すると、これらの親和性改善は、 K_d の低下（例えば上で概説されるように2倍、5倍、10倍など）に変換される。

20

【0163】

特定の実施形態では、低pH（例えば約5.5のpH）におけるFcRn親和性が改善される。特定のその他の実施形態では、低pHにおけるFcRn親和性が改善され、中性pH（例えば約7.2のpH）における親和性は変化しない。

30

【0164】

さらなる例として、ヒトまたは動物モデルにおいて血清半減期を測定してもよい。（ヒトFcRnを有する遺伝子組換え動物をはじめとするが、これに限定されるものではない）任意の動物モデル中の血清半減期の増大は、キメラまたはHSA変種ポリペプチドが、対照と比較して、血清半減期増大を有すると特徴付けるのに十分である。

【0165】

一実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドは、10日間以上、好ましくは約14日間以上、および最も好ましくは天然血清アルブミンタンパク質またはその相同体の半減期の50%以上の血中半減期を有する。別の実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドの半減期は、対照ポリペプチドと比較して、ほぼ1.5、2、2.5、3、4、またはほぼ5倍増大する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドの半減期は、対照ポリペプチドと比較して、5倍を上回り、または10倍さえ上回って増大する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドの半減期は、対照ポリペプチドと比較して、20、25、40倍を上回り、または50倍を上回って増大する。特定の実施形態では、キメラポリペプチドまたはHSA変種ポリペプチドの半減期は、対照ポリペプチドと比較して、ほぼ5～10倍、ほぼ10～20倍、ほぼ25～40倍、ほぼ40～50倍、ほぼ50～75倍、またはほぼ75～100倍増大する。

40

50

【0166】

キメラポリペプチドが異種タンパク質の機能を実質的に保持するかどうかを評価するための適切なアッセイは、異種タンパク質とその固有の機能に左右される。しかし機能は、動物モデルをはじめとする任意の適切な生体外または生体内アッセイで、評価してもよい。例示的な機能としては、(i) 特定の受容体に結合する能力；(ii) 特定の情報伝達経路を介したシグナル伝達を誘発または阻害する能力；(iii) アポトーシスを誘発または阻害する能力；(iv) 血管新生を誘発または阻害する能力；(v) 細胞増殖を刺激または阻害する能力；(vi) 細胞分化を促進または阻害する能力；(vii) 細胞生存を促進する能力；および(viii) 別のタンパク質因子の分泌を促進または阻害する能力が挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

【0167】

特定の実施形態では、生物学的に活性の異種タンパク質を含んでなる本開示のキメラポリペプチドは、例えばHSA部分に融合していない、生物学的に活性の異種タンパク質それ自体よりも強力である。例えばキメラポリペプチドは、生物学的に活性のタンパク質配列単独よりも、例えば1、2、または3桁にさえ至ってより高い活性など、2倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、または1000倍にさえ至って活性が高くてもよい。したがって生物学的に活性のペプチド配列が、生物学的活性を阻害する実施形態では、キメラポリペプチドのIC₅₀は、生物学的に活性のタンパク質単独のIC₅₀よりも10倍低く、100倍低く、または1000倍にさえ至ってより低くあってもよく、および生物学的に活性のタンパク質配列が、生物学的活性を誘導または促進する実施形態では、キメラポリペプチドのEC₅₀は、生物学的に活性のペプチド単独のEC₅₀よりも10倍低く、100倍低く、または1000倍にさえ至ってより低くあってもよい。生物学的に活性のタンパク質配列が、核酸、ペプチド、または炭水化物などの生体分子に結合する実施形態では、キメラポリペプチドとそれが結合する生体分子の解離定数K_dは、生体分子と生物学的に活性のタンパク質単独のK_dよりも10倍低く、100倍低く、または1000倍にさえ至ってより低くあってもよく、例えば2つの実体の結合がそれらの解離よりもいっそう支持される。

20

【0168】

6. 10 医薬組成物

特定の実施形態では、本開示の対象キメラまたはHSA変種ポリペプチドは、薬学的に許容可能な担体と配合される。1つまたは複数のキメラまたはHSA変種ポリペプチドは、単独でまたは製剤処方（組成物）の成分として投与し得る。キメラまたはHSA変種ポリペプチドは、医学または獣医学で使用するために、任意の都合良い投与方法のために配合されてもよい。ラウリル硫酸ナトリウムやステアリン酸マグネシウムなどの湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤；ならびに着色剤、剥離剤、コート剤、甘味剤、着香料および芳香剤、保存料および抗酸化剤もまた、組成物中に存在し得る。

30

【0169】

対象キメラまたはHSA変種ポリペプチド製剤としては、経口、経鼻、局所、非経口、直腸、および／または腔内投与に適するものが挙げられる。製剤は、好都合には単位投与形態で提供されてもよく、薬学技術分野で周知の任意の方法で調製されてもよい。単回投与形態を製造するために担体材料と組み合わせ得る活性成分量は、処置される宿主と特定の投与様式次第で変動する。単回投与形態を製造するために担体材料と組み合わせ得る活性成分量は、一般に治療効果を生じる化合物量である。

40

【0170】

特定の実施形態では、これらの製剤または組成物を調製する方法は、別のタイプの治療薬と担体、そして任意選択的に、1つまたは複数の副成分を組み合わせるステップを含む。一般に、製剤は、液体担体、または超微粒子固体担体、またはその双方を用いて調製され、次に必要ならば製品に整形される。

【0171】

経口投与のための製剤は、それぞれ活性成分として所定量の対象ポリペプチド治療薬を

50

含有する、カプセル、カシェ剤、丸薬、錠剤、ロゼンジ（通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカントであるフレーバー基礎原料使用）、粉末、顆粒、または水性または非水性液中の溶液または懸濁液、または水中油または油中水型液体エマルション、またはエリキシル剤またはシロップ、または香錠（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤使用）、および／または口内洗浄液などの形態であってもよい。懸濁液は、活性化合物に加えて、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、およびソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカント、およびそれらの混合物などの懸濁剤を含有してもよい。

【0172】

経口投与のための固体剤形（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣丸、粉末、顆粒など）では、本発明の1つまたは複数のポリペプチド治療薬と、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および／または以下のいずれかなどの1つまたは複数の薬学的に許容可能な担体とが混合されてもよい：（1）デンプン、乳糖、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸などの充填剤または増量剤；（2）例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および／またはアカシアなどのバインダー；（3）グリセロールなどの湿潤剤；（4）寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；（5）パラフィンなどの溶液遅延剤；（6）四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤；（7）例えばセチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセリンなどの湿潤剤；（8）カオリンおよびベントナイト粘土などの吸収剤；（9）滑石、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物などの潤滑剤；および（10）着色剤。カプセル、錠剤、および丸薬の場合、医薬組成物は、緩衝剤もまた含んでもよい。乳糖または乳糖類、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を使用して、類似タイプの固体組成物もまた、軟質および硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤として用いられてもよい。経口投与のための液体投薬形態としては、薬学的に許容可能なエマルション、微小エマルション、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤が挙げられる。活性成分に加えて、液体投薬形態は、水またはその他の溶媒、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿実、ラッカセイ、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、およびそれらの混合物などの可溶化剤および乳化剤などの当該技術分野で一般に使用される不活性希釈剤を含有してもよい。不活性希釈剤に加えて、経口組成物はまた、湿潤剤、乳化および懸濁剤、甘味剤、着香料、着色料、芳香剤、および保存料などのアジュバントを含み得る。

【0173】

非経口投与に適する医薬組成物は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、製剤を意図される受容者の血液と等張にする溶質、または懸濁剤または増粘剤を含有してもよい、1つまたは複数の薬学的に許容可能な無菌等張水性または非水性溶液、分散体、懸濁液またはエマルション、または使用直前に無菌注射液または分散体に戻されてもよい無菌粉末と組み合わせ、1つまたは複数のキメラまたはHSA変種ポリペプチドを含んでなってもよい。本発明の医薬組成物中で用いられてもよい適切な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えばレシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散体の場合は必要な粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持される。

【0174】

これらの組成物は、保存料、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントもまた含有してもよい。例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの様々な抗菌剤および抗真菌剤の包含によって、微生物の活動防止を確実にしてもよい。組成物に、糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を含めることが望ましいこともある。これに加えて、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる作用物質の包含によって、注射用医薬製剤の持続的吸収をもたらしてもよい。

【0175】

特定の実施形態では、医薬組成物をはじめとする本開示の組成物は、非発熱性である。換言すれば、特定の実施形態では、組成物は実質的に発熱物質を含有しない。一実施形態では、本発明の製剤は、実質的に内毒素および／または関連発熱性物質がない、発熱性物質を含まない製剤である。内毒素としては、微生物中に閉じ込められて、微生物が分解または死滅した場合にのみ放出される毒素が挙げられる。発熱性物質としてはまた、細菌およびその他の微生物の外膜からの発熱誘導熱安定性物質（糖タンパク質）が挙げられる。ヒトに投与した場合、これらの物質はどちらも、発熱、血圧低下、およびショックを引き起こし得る。可能な有害効果のために、少量の内毒素でさえも、静脈内投与される医薬品溶液から除去されなくてはならない。食品医薬品局（「FDA」）は、静脈内薬剤用途について、1時間の1期間内のキログラム体重用量あたり5内毒素単位（EU）という上限を設定している（The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26（1）：223（2000））。抗体がそうであるように、治療用タンパク質が、1キログラムの体重あたり数百または数千ミリグラムの量で投与される場合、有害かつ危険な内毒素は痕跡量でさえも除去しなくてはならない。ある特定の実施形態では、組成物中の内毒素および発熱性物質レベルは、10 EU/mg未満、5 EU/mg未満、1 EU/mg未満、0.1 EU/mg未満、0.01 EU/mg未満、または0.001 EU/mg未満である。

【0176】

注射用デポー製剤は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマーで、1つまたは複数のポリペプチド治療薬の微小カプセル化マトリックスを形成することで製造される。薬剤とポリマーとの比率、および用いられる特定のポリマーの性質次第で、薬剤放出速度が制御され得る。その他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられる。デポー注射用製剤はまた、体組織に適合するリポソームまたは微小エマルジョン中に薬剤を封入することによっても調製される。

【0177】

特定の実施形態では、本開示のキメラまたはHSA変種ポリペプチドは、ヒトへの静脈内投与に適応された医薬組成物として、日常手順に従って配合される。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤およびリドカインなどの局所麻酔薬を含んで、注射部位の疼痛を緩和してもよい。組成物が輸液によって投与される場合、それは無菌製薬等級水または生理食塩水を含有する輸液ボトルによって、分注し得る。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合されてもよいように、無菌注射用水または生理食塩水のアンブルが提供されてもよい。

【0178】

組織関連病的状態または疾患の処置において効果的な本開示のキメラまたはHSA変種ポリペプチドの量は、標準臨床技術によって判定し得る。これに加えて、生体外アッセイを任意選択的に用いて、最適投与量範囲の同定を助けてもよい。配合中で用いられる正確な用量はまた、投与経路および病的状態の重篤性にも左右され、施術者の判断と各対象の状況に従って決定すべきである。しかし静脈内投与のための適切な投与量範囲は、一般に体重1キログラムあたり、約20～5000マイクログラムの活性キメラまたはHSA変種ポリペプチドである。鼻腔内投与に適する投与量範囲は、一般に約0.01 pg/kg体重～1 mg/kg体重である。効果的な用量は、生体外または動物モデル試験系から誘導された用量応答曲線から外挿されてもよい。

【0179】

6. 1 1 製品およびキット

特定の実施形態では、本開示は、本開示の少なくとも1つのキメラまたはH S A変種ポリペプチドで充填された、1つまたは複数の容器を含んでなる医薬品包装またはキットもまた提供する。特定の実施形態では、本開示の製剤は、異種タンパク質、異種ポリペプチド、異種ペプチド、大分子、小分子、マーカー配列、診断用薬または検出可能作用物質、治療成分、薬剤成分、放射性金属イオン、第2の抗体、および固体担体をはじめとするが、これに限定されるものではない別の部分と、組換え的に融合または化学的に結合する、キメラまたはH S A変種ポリペプチドを含んでなる。特定の実施形態では、本開示の製剤は、無菌液体として単回投与バイアルに調合される。本開示の製剤は、目標体積1. 2 m Lの3 c c U S P I型ハウケイ酸褐色バイアル (W e s t P h a r m a c e u t i c a l S e r i c e s ; パーツ番号6 8 0 0 - 0 6 7 5) で提供されてもよい。例示的な容器としては、バイアル、ボトル、充填済みシリンジ、I V バッグ、ブリストア包装 (1つまたは複数の丸薬を含んでなる) が挙げられるが、これに限定されるものではない。医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する行政機関によって規定される形式の注意書きは、このような容器に任意選択的に付随してもよく、その注意書きは、行政機関によるヒトの診断および／または投与のための製造、使用または販売認可を反映する。

【0180】

特定の実施形態では、例えば治療薬の血清半減期を増大させ、またはF c R n結合親和性を増大させるなどの様々な目的のために有用なキメラまたはH S A変種ポリペプチドを含んでなるキットもまた提供される。試薬の単離および精製のために、キットはビーズ (例えばセファロースビーズ) と共役しているポリペプチドを含有してもよい。例えばE L I S Aまたはウエスタンブロットにおいて、生体外で標的を検出および定量化するための、ポリペプチドを含有するキットが提供されてもよい。製造品と同様に、キットは、容器と、容器上のまたはそれに付随するラベルまたは添付文書とを含んでなる。容器は、本開示の少なくとも1つのキメラまたはH S A変種ポリペプチドを含んでなる組成物を収容する。例えば希釈剤および緩衝液、対照診断試薬を含有する、追加的な容器が含まれてもよい。ラベルまたは添付文書が、組成物の説明、ならびに意図される生体外または診断用途のための指示を提供してもよい。

【0181】

6. 1 2 アデノウイルスベクターおよび方法

宿主細胞からの組換えアデノウイルス粒子の生成に有用なD N Aベクターは、当該技術分野で周知であり、市販の試薬が容易に入手できる (例えばI n v i t r o g e nからのカタログ番号V 4 9 3 - 2 0およびV 4 9 4 - 2 0を参照されたい)。本開示は、アデノウイルス粒子の生成に有用なD N Aベクター中にO r i P配列を組み込むことで、組換えアデノウイルス (本明細書中でアデノウイルスベクターとも称される) の生成を促進する方法を提供する。O r i P含有アデノウイルスベクターは、E B N A - 1タンパク質の発現のための配列をさらに含んでなってもよく、または代案としては、E B N A - 1タンパク質を発現する宿主細胞が、組換えアデノウイルス粒子を生成するために使用される。O r i P含有アデノウイルスベクターは、対象D N A配列 (例えばH S AドメインI I I変種をコードするD N A配列) の多様な／複合体ライブラリーを含んでなる、組換えアデノウイルスの集団を生成するのに特に有用である。

【0182】

O r i P配列は、当該技術分野で既知の多数の技術を使用して、任意の既知のアデノウイルスベクターに容易に組み入れ得る。例えばG a t e w a y組換え系を利用する場合、O r i P配列は、エントリーベクターまたはアデノウイルス目的ベクターのa t t組換え部位間に位置するべきである。アデノウイルスベクターに配列を追加する場合、アデノウイルスD N Aの複製またはアセンブリーに干渉する部位に挿入するのを回避するように留意すべきである。代案としては、または任意選択的に、O r i P配列を含有するアデノウイルスベクターを改変して、E B N A - 1タンパク質もまた発現させてもよい (図10を

参照されたい)。アデノウイルスベクターからEBNA-1タンパク質を直接発現させることで、宿主細胞にEBNA-1遺伝子を発現させる必要がなくなる。

【0183】

本発明のアデノウイルスベクターは、Ori P配列とアデノウイルスゲノム配列を含んでなる。本発明のアデノウイルスベクターは、以下の要素の1つまたは複数をさらに含んでなってもよい；

(i) 別のベクターによる組換えクローニングのための組換え部位(例えばattR1およびattR2)、このような部位は、当該ベクターから作成された組換えアデノウイルス中における発現のために、対象DNA配列のクローニングをもたらしのに有用である；

(ii) 選択および/または対抗選択に有用な抗生物質/薬剤(例えばクロラムフェニコール)耐性遺伝子および/または毒素発現遺伝子(例えばccdB遺伝子)；

(iii) 対象DNA配列のサブクローニングに有用なクローニング部位(マルチクローニング部位であってもよい)；

(iv) 1つまたは複数の対象タンパク質をコードする、1つまたは複数の対象遺伝子を含んでなってもよい対象DNA；

(v) 幅広い哺乳類細胞(例えばヒトサイトメガロウイルス(CMV)即時初期プロモーター)中における対象遺伝子発現のためのプロモーター、プロモーターは、構成的であってもまたは誘導性であってもよい；

(vi) 対象タンパク質の検出および/または精製のためのエピトープタグ(例えばHis6Xエピトープ)。エピトープタグは、対象組換えタンパク質の5'または3'末端のいずれに存在してもよい；

(vii) mRNAの効率的な転写終結、およびポリアデニル化のためのポリアデニル化(ポリA)配列(例えばシミアンウイルス40ポリA配列)；

(viii) 大腸菌(E. coli)中のプラスミドの高コピー数複製と維持のための複製起点；

(ix) 大腸菌(E. coli)中における選択のための抗生物質耐性遺伝子；

(x) ベクターの線形化のための制限酵素部位(例えばPacI)、制限酵素部位は要素(viii)および(ix)の側面に位置してもよい；および

(xi) EBNA-1タンパク質をコードするDNA配列。

【0184】

プラスミドDNA合成のエプスタイン・バーウイルス(EBV)起点Ori Pは、多様な高等真核生物細胞中におけるDNA合成を効率的に支持する。代表的Ori P配列を図9Cに提供する。この起点が1つのウイルスタンパク質EBNA-1のみを使用する一方、その他の要素は全て細胞によって提供される。特定の実施形態では、EBNA-1タンパク質は宿主細胞(例えば293E細胞)によって提供される。別の実施形態では、本発明のアデノウイルスベクターは、要素(xi)EBNA-1タンパク質をコードするDNA配列、をさらに含んでなる。代表的EBNA-1タンパク質およびDNA配列をそれぞれ図9Aおよび9Bに提供する。

【0185】

アデノウイルスの適切なパッケージングと生成に必要である、アデノウイルスゲノム配列(例えばヒトアデノウイルス5型配列は、遺伝子およびその他の要素(例えば左右逆方向末端反復(ITR)、カプシド形成シグナル配列、後期遺伝子をコードする)が特に検討される。(Hitt et al., 1999, The Development of Human Gene Therapy, T. Friedmann, ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 61-86; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81, 2573-2604)。アデノウイルスゲノム配列は、完全アデノウイルスゲノムをコードしてもよい。代案としては、アデノウイルスゲノム配列は、トランスに提供される1つまたは複数のタンパク質および/または調節因子を除く、全

10

20

30

40

50

てのタンパク質およびその他の調節因子をコードして、複製能力がないアデノウイルスを生成してもよい。例えばE1タンパク質をコードするE1領域(E1aおよびE1b)が、本発明のアデノウイルスベクターから除外されてもよい(Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81, 2573-2604)。次に欠損タンパク質および／またはその他の要素は、例えばE1領域のゲノムのコピーを含有する293細胞系などの、アデノウイルスを生成するのに使用される宿主によって通常、トランスに提供される。特定の実施形態では、アデノウイルスゲノム配列は、野生型配列1~458および3513~35935に相当する、ヒトアデノウイルス5型配列を含んでなる、またはそれから本質的になる。

【0186】

特定の要素が、組み合わせで提供され、および／またはその他の要素を組み込んでもよいことが、当業者によって理解され、例えば要素(iv)は、要素(v)~(vii)を組み込んでもよい。その他の要素に対して5'および／または3'に、特定の要素が提供されることがさらに理解され、例えば要素(x)は、アデノウイルスベクターの直線化のために有用であってもよく、要素(x)は直線化のために組み込まれる場合、5' ITRに対して5'および／または3' ITRに対して3'で提供されるべきである。同様に、存在する場合、要素(viii)および(ix)は、一般に、レスキューされるアデノウイルスにそれらが組み込まれないように位置し、例えばこれらの要素は、5' ITRに対して5'および3' ITRに対して3'に位置してもよい。存在する場合、OriPおよび要素(i)~(vii)は、3' ITRを含むアデノウイルスゲノム配列が片側に配置され、別の側には5' ITR配列が配置される(例えば図10)。

【0187】

要素(i)、(ii)、(iv)、(viii)~(x)、および任意選択的に(xi)を組み込んだ、本発明の代表的アデノウイルスベクターが、図10に提供される。

【0188】

7 実施形態

1. (a) ヒト血清アルブミン(HSA)部分と、(b) 異種タンパク質とを含んでなるキメラポリペプチドであって、そのHSA部分が、HSAドメインIII、またはその新生児Fc受容体(FcRn)結合断片を含んでなり、キメラポリペプチドが異種タンパク質の機能活性を保持してFcRnに結合し得て、前記HSAドメインIIIが1~18個のアミノ酸置換を含んでなって、HSA部分が前記アミノ酸置換を含まない対照キメラポリペプチドと比較して、キメラポリペプチドのFcRn親和性および血清半減期の片方または双方を増大させる、キメラポリペプチド。

【0189】

2. キメラポリペプチドが、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合する、実施形態1のキメラポリペプチド。

【0190】

3. キメラポリペプチドが、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合し、前記親和性が酸性pHで測定される、実施形態1または2のキメラポリペプチド。

【0191】

4. 酸性pHが5.0~6.0である、実施形態3のキメラポリペプチド。

【0192】

5. 酸性pHが5.5±0.2である、実施形態4のキメラポリペプチド。

【0193】

6. キメラポリペプチドが、酸性pHにおいて、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合するが、そのキメラポリペプチドが、中性pHでは、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合しない、実施形態1~3のいずれか1つのキメラポリペプチド。

【0194】

7. 中性pHが6.9～7.9である、実施形態6のキメラポリペプチド。

【0195】

8. 中性pHが7.4±0.2である、実施形態7のキメラポリペプチド。

【0196】

9. キメラポリペプチドがFcRnに結合して、前記対照キメラポリペプチドと異なるオフ速度またはオン速度を有する、実施形態1～6のいずれかのキメラポリペプチド。

【0197】

10. キメラポリペプチドがFcRnに結合し、前記対照ポリペプチドと比較して、オン速度増大および／またはオフ速度低下を有する、実施形態9のキメラポリペプチド。

【0198】

11. キメラポリペプチドがFcRnに結合し、前記対照ポリペプチドと比較して、オフ速度増大を有する、実施形態9のキメラポリペプチド。

【0199】

12. HSAドメインIIIが、1～10個のアミノ酸置換を含んでなり、HSA部分が前記アミノ酸置換を含まない対照キメラポリペプチドと比較して、キメラポリペプチドの血清半減期を増大させる、実施形態1～11のいずれかのキメラポリペプチド。

【0200】

13. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、複数の種を越えて保存された残基の置換である、実施形態1～12のいずれかのキメラポリペプチド。

【0201】

14. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、複数の種を越えて保存された残基の置換である、実施形態13のキメラポリペプチド。

【0202】

15. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である、実施形態1～13のいずれかのキメラポリペプチド。

【0203】

16. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である、実施形態15のキメラポリペプチド。

【0204】

17. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、表5に列举されるものから選択される、実施形態1～15のいずれかのキメラポリペプチド。

【0205】

18. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA（配列番号2）中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態1～15のいずれかのキメラポリペプチド：残基381、残基383、残基391、残基401、残基402、残基407、残基411、残基413、残基414、残基415、残基416、残基424、残基426、残基434、残基442、残基445、残基447、残基450、残基454、残基455、残基456、残基457、残基459、残基463、残基495、残基506、残基508、残基509、残基511、残基512、残基515、残基516、残基517、残基519、残基521、残基523、残基524、残基525、残基526、残基527、残基531、残基535、残基538、残基539、残基541、残基557、残基561、残基566、残基569。

【0206】

19. キメラポリペプチドが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置にあるHSAドメインIII中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態1～15のいずれかのキメラポリペプチド：（a）残基383および4

10

20

30

40

50

13; (b) 残基401および523; (c) 残基407および447; (d) 残基407および447および539; (e) 残基407および509; (f) 残基407および526; (g) 残基411および535; (h) 残基414および456; (i) 残基415および569; (j) 残基426および526; (k) 残基442および450および459; (l) 残基463および508; (m) 残基508および519および525; (n) 残基509および527; (o) 残基523および538; (p) 残基526および557; (q) 残基541および561; (r) 残基463および523; (s) 残基508および523; (t) 残基508および524; (u) 残基463、508、および523; (v) 残基463、508、および524; (w) 残基508、523、および524; (x) 残基463、508、523、および524; (y) 残基463および524; (z) 残基523および524; および (aa) 残基463、523、および524。

10

【0207】

20. キメラポリペプチドが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置にあるHSAドメインIII中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態1～15のいずれかのキメラポリペプチド: (a) 残基463および508; (b) 残基463および523; (c) 残基508および523; (d) 残基508および524; (e) 残基463、508、および523; (f) 残基463、508、および524; (g) 残基508、523、および524; (h) 残基463、508、523、および524; (i) 残基463および523; および (j) 残基523および524。

20

【0208】

21. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態1～15、または18～20のいずれかのキメラポリペプチド: V381N、V381Q、E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、Y401D、Y401E、K402A、K402G、K402I、K402L、K402V、L407F、407H、407M、L407N、L407Q、407R、L407W、L407Y、Y411Q、Y411N、K413C、K413S、K413T、K414S、K414T、V415C、V415L、V415S、V415T、Q416H、Q416P、V424A、V424D、V424G、V424I、V424L、V424M、V424N、V424Q、V424W、V426D、V426E、V426F、V426H、V426L、V426N、V426P、V426Q、G434C、G434S、G434T、E442K、E442R、R445F、R445W、R445Y、P447S、P447T、E450D、E450E、S454C、S454M、S454T、V455N、V455Q、V456N、V456Q、L457F、L457W、L457Y、Q459K、Q459R、L463C、L463F、L463G、L463H、L463I、L463N、L463S、L463Q、E495D、T506F、T506M、T506N、T506R、T506W、T506Y、T508C、T508E、T508I、T508K、T508R、T508S、F509C、F509D、F509G、F509I、F509L、F509M、F509P、F509V、F509W、F509Y、A511D、A511F、A511I、A511R、A511T、A511V、A511W、A511Y、D512F、D512M、D512Q、D512W、D512Y、T515C、T515D、T515E、T515E、T515G、T515H、T515L、T515N、T515P、T515Q、T515S、T515W、T515Y、L516C、L516F、L516S、L516T、L516W、L516Y、S517C、S517F、S517M、S517T、S517W、S517Y、K519A、K519G、K519I、K519L、K519V、R521F、R521H、R521M、R521Q、R521T、R521W、R521Y、I523A、I523C、I523D、I523E、I523F、I523G、I523H、I523I、I523K、I523L、I523M、I52

30

40

50

3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 A、K 5 2 5 G、K 5 2 5 I、K 5 2 5 L、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 A、Q 5 2 6 C、Q 5 2 6 F、Q 5 2 6 H、Q 5 2 6 L、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 P、Q 5 2 6 S、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 V、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 F、T 5 2 7 W、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 A、E 5 3 1 G、E 5 3 1 I、E 5 3 1 L、E 5 3 1 V、H 5 3 5 D、H 5 3 5 E、H 5 3 5 K、H 5 3 5 L、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、H 5 3 5 S、K 5 3 8 F、K 5 3 8 W、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、A 5 3 9 L、A 5 3 9 V、K 5 4 1 F、K 5 4 1 W、K 5 4 1 Y、K 5 5 7 A、K 5 5 7 G、K 5 5 7 I、K 5 5 7 L、K 5 5 7 N、K 5 5 7 S、K 5 5 7 V、A 5 6 1 F、A 5 6 1 W、A 5 6 1 Y、T 5 6 6 F、T 5 6 6 W、T 5 6 6 Y、A 5 6 9 H、および A 5 6 9 P。

10

【0209】

22. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態1～15、または18～20のいずれかのキメラポリペプチド：V 3 8 1 N、E 3 8 3 G、N 3 9 1 V、Y 4 0 1 E、K 4 0 2 A、L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、Y 4 1 1 Q、K 4 1 4 S、K 4 1 3 S、V 4 1 5 T、V 4 1 5 C、Q 4 1 6 P、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、G 4 3 4 C、E 4 4 2 K、R 4 4 5 W、P 4 4 7 S、E 4 5 0 D、S 4 5 4 C、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 5 7 F、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 H、L 4 6 3 M、L 4 6 3 N、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 I、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 C、S 5 1 7 W、K 5 1 9 I、R 5 2 1 W、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 H、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 G、I 5 2 3 R、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 F、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 I、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、K 5 4 1 F、K 5 5 7 G、A 5 6 1 F、T 5 6 6 W、および A 5 6 9 P。

20

【0210】

23. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中の1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態1～15、または18～20のいずれかのキメラポリペプチド：V 3 8 1 N、E 3 8 3 G、N 3 9 1 V、Y 4 0 1 E、K 4 0 2 A、L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、Y 4 1 1 Q、K 4 1 4 S、K 4 1 3 S、V 4 1 5 T、V 4 1 5 C、Q 4 1 6 P、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、G 4 3 4 C、E 4 4 2 K、R 4 4 5 W、P 4 4 7 S、E 4 5 0 D、S 4 5 4 C、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 5 7 F、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 H、L 4 6 3 M、L 4 6 3 N、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 I、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 C、S 5 1 7 W、K 5 1 9 I、R 5 2 1 W、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 H、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 G、I 5 2 3 R、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 F、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 I、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、K 5 4 1 F、K 5 5 7 G、A 5 6 1 F、T 5 6 6 W、および A 5 6 9 P。

30

40

【0211】

24. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態22のキメラポリペプチド：L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、V 4 1 5 T、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、P 4 4 7 S、V 4 5 5 N、

50

V 4 5 6 N、L 4 6 3 N、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 R、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 Q、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 W、R 5 2 1 W、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 R、K 5 2 4 L、Q 5 2 6 M、T 5 2 7 Y、H 5 3 5 P、および K 5 5 7 G。

【0212】

25. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中の1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態23のキメラポリペプチド：L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、V 4 1 5 T、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、P 4 4 7 S、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 6 3 N、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 R、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 Q、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 W、R 5 2 1 W、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 R、K 5 2 4 L、Q 5 2 6 M、T 5 2 7 Y、H 5 3 5 P、および K 5 5 7 G。

10

【0213】

26. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態1～14、または18～20のいずれかのキメラポリペプチド：(a) E 3 8 3 G/K 4 1 3 S；(b) Y 4 0 1 E/I 5 2 3 G、(c) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S；(d) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S/A 5 3 9 I；(e) L 4 0 7 N/F 5 0 9 M；(f) L 4 0 7 Y/Q 5 2 6 T；(g) Y 4 1 1 Q/H 5 3 5 N；(h) K 4 1 4 S/V 4 5 6 N；(i) V 4 1 5 T/A 5 6 9 P；(j) V 4 2 6 H/Q 5 2 6 Y；(k) E 4 4 2 K/E 4 5 0 D/Q 4 5 9 R；(l) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R；(m) T 5 0 8 R/K 5 1 9 I/K 5 2 5 V；(n) F 5 0 9 I/T 5 2 7 Y；(o) I 5 2 3 Q/K 5 3 8 Y；(p) Q 5 2 6 M/K 5 5 7 G；(q) K 5 4 1 F/A 5 6 1 F；(r) L 4 6 3 N/K 5 2 4 L；(s) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(t) T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(u) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(v) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(w) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(x) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(y) L 4 6 3 N/I 5 2 3 G；(z) I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；および (a a) L 4 6 3 N/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L。

20

【0214】

27. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態26のキメラポリペプチド：(a) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S；(b) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S/A 5 3 9 I；(c) L 4 0 7 N/F 5 0 9 M；(d) Y 4 1 1 Q/H 5 3 5 N；(e) K 4 1 4 S/V 4 5 6 N；(f) V 4 2 6 H/Q 5 2 6 Y；(g) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R；(h) F 5 0 9 I/T 5 2 7 Y；(i) I 5 2 3 Q/K 5 3 8 Y；(j) Q 5 2 6 M/K 5 5 7 G；(k) K 5 4 1 F/A 5 6 1 F；(l) L 4 6 3 N/K 5 2 4 L；(m) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(n) T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(o) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(p) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(q) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(r) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(s) L 4 6 3 N/I 5 2 3 G；(t) I 5 2 3 G/K 5 2 4 Lおよび (u) L 4 6 3 N/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L。

30

【0215】

28. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態26のキメラポリペプチド：(a) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R；(b) L 4 6 3 N/K 5 2 4 L；(c) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(d) T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(e) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(f) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(g) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；および (h) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L。

40

【0216】

29. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態26のキメラポリペプチド：(a) L 4 6 3 N/K 5 0 8 R；(b) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(c) T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；および

50

(d) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G。

【0217】

30. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存されているが、ニワトリ血清アルブミン中では保存されていない残基の置換である、実施形態1～15のいずれかのキメラポリペプチド。

【0218】

31. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存されているが、ニワトリ血清アルブミン中では保存されていない残基の置換である、実施形態30のキメラポリペプチド。

10

【0219】

32. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA（配列番号2）中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態15のキメラポリペプチド：残基383、残基389、残基391、残基410、残基417、残基425、残基442、残基465、残基467、残基468、残基486、残基499、残基502、残基520、残基532、残基536、残基543、および残基571。

【0220】

33. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態32のキメラポリペプチド：残基383、残基391、残基434、残基442、残基445、および残基450。

20

【0221】

34. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態33のキメラポリペプチド：V381N、E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、G434C、G434S、G434T、E442K、E442R、R445F、R445W、R445Y、E450D、およびE450E。

30

【0222】

35. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態32のキメラポリペプチド：残基417、残基442、残基499、および残基502。

【0223】

36. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態30のキメラポリペプチド：残基380、残基381、残基384、残基387、残基396、残基401、残基404、残基405、残基406、残基409、残基419、残基421、残基422、残基424、残基428、残基430、残基431、残基433、残基441、残基457、残基458、残基463、残基464、残基466、残基469、残基470、残基474、残基475、残基480、残基481、残基489、残基491、残基495、残基500、残基508、残基510、残基515、残基516、残基524、残基525、残基526、残基528、残基531、残基535、残基539、残基544、残基547、および残基576。

40

【0224】

37. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態36のキメラポリペプチド：残基381、残基401、残基424、残基457、残基463、残基495、残基508、残基515、残基516、残基524、残基525、残基52

50

6、残基 5 3 1、残基 5 3 5、および残基 5 3 9。

【0 2 2 5】

3 8. H S A ドメイン I I I が、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置における、アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 3 7 のキメラポリペプチド：残基 4 6 3 および 5 0 8；残基 4 6 3 および 5 2 4；残基 5 0 8 および 5 2 4；残基 4 6 3、5 0 8 および 5 2 4。

【0 2 2 6】

3 9. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、以下からなる群から選択される、実施形態 3 7 または 3 8 のキメラポリペプチド：V 3 8 1 N、V 3 8 1 Q、Y 4 0 1 D、Y 4 0 1 E、V 4 2 4 N、V 4 2 4 Q、L 4 5 7 F、L 4 5 7 W、L 4 5 7 Y、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、T 5 1 5 C、T 5 1 5 H、T 5 1 5 N、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 F、L 5 1 6 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、L 5 1 6 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 A、K 5 2 5 G、K 5 2 5 I、K 5 2 5 L、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 C、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 S、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 Y、E 5 3 1 A、E 5 3 1 G、E 5 3 1 I、E 5 3 1 L、E 5 3 1 V、H 5 3 5 D、H 5 3 5 E、H 5 3 5 P、A 5 3 9 I、および A 5 3 9 L、A 5 3 9 V。

【0 2 2 7】

4 0. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態 3 2 のキメラポリペプチド：残基 3 8 3、残基 3 8 9、残基 3 9 1、残基 4 1 0、残基 4 1 7、残基 4 2 5、残基 4 4 2、残基 4 6 5、残基 4 6 7、残基 4 6 8、残基 4 8 6、残基 4 9 9、残基 5 0 2、残基 5 2 0、残基 5 3 2、残基 5 3 6、残基 5 4 3、および残基 5 7 1。

【0 2 2 8】

4 1. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態 3 6 のキメラポリペプチド：残基 3 8 0、残基 3 8 1、残基 3 8 4、残基 3 8 7、残基 3 9 6、残基 4 0 1、残基 4 0 4、残基 4 0 5、残基 4 0 6、残基 4 0 9、残基 4 1 9、残基 4 2 1、残基 4 2 2、残基 4 2 4、残基 4 2 8、残基 4 3 0、残基 4 3 1、残基 4 3 3、残基 4 4 1、残基 4 5 7、残基 4 5 8、残基 4 6 3、残基 4 6 4、残基 4 6 6、残基 4 6 9、残基 4 7 0、残基 4 7 4、残基 4 7 5、残基 4 8 0、残基 4 8 1、残基 4 8 9、残基 4 9 1、残基 4 9 5、残基 5 0 0、残基 5 0 8、残基 5 1 0、残基 5 1 5、残基 5 1 6、残基 5 2 4、残基 5 2 5、残基 5 2 6、残基 5 2 8、残基 5 3 1、残基 5 3 5、残基 5 3 9、残基 5 4 4、残基 5 4 7、および残基 5 7 6。

【0 2 2 9】

4 2. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態 3 2 または 3 6 のキメラポリペプチド：残基 3 8 0、残基 3 8 1、残基 3 8 4、残基 3 8 3、残基 3 8 7、残基 3 8 9、残基 3 9 1、残基 3 9 6、残基 4 0 1、残基 4 0 4、残基 4 0 5、残基 4 0 6、残基 4 0 9、残基 4 1 0、残基 4 1 7、残基 4 1 9、残基 4 2 1、残基 4 2 2、残基 4 2 4、残基 4 2 5、残基 4 2 8、残基 4 3 0、残基 4 3 1、残基 4 3 3、残基 4 4 1、残基 4 4 2、残基 4 5 7、残基 4 5 8、残基 4 6 3、残基 4 6 4、残基 4 6 5、残基 4 6 6、残基 4 6 7、残基 4 6 8、残基 4 6 9、残基 4 7 0、残基 4 7 4、残基 4 7 5、残基 4 8 0、残基 4 8 1、残基 4 8 6、残基 4 8 9、残基 4 9 1、残基 4 9 5、残基 4 9 9、残基 5 0 0、残基 5 0 2、残基 5 0 8、残基 5 1 0、残基 5 1 5、残基 5 1 6、残基 5 2 0、残基 5 2 4、残基 5 2 5、残基 5 2 6、残基 5 2 8、残基 5 3 1、残基 5 3 2、残基 5 3 5、残基 5 3 6、残基 5 3 9、残基 5 4 3、残基 5 4 4、残基 5 4 7、残基 5 7 1、および残基 5 7 6。

【0 2 3 0】

4 3. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態

42のキメラポリペプチド：残基381、残基383、残基391、残基401、残基424、残基442、残基463、残基495、残基506、残基508、残基515、残基516、残基524、残基525、残基526、残基531、残基535、および残基539。

【0231】

44. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態43のキメラポリペプチド：V381N、V381Q、E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、Y401D、Y401E、V424A、V424G、V424I、V424L、V424N、V424Q、E442K、E442R、L463C、L463F、L463G、L463H、L463M、L463N、L463Q、E495D、T506F、T506W、T506Y、T508C、T508E、T508I、T508K、T508R、T508S、T515C、T515H、T515N、T515P、T515Q、T515S、L516S、L516T、L516W、L516Y、K524A、K524F、K524G、K524I、K524L、K524M、K524T、K524V、K525A、K525G、K525I、K525L、K525V、Q526C、Q526M、Q526S、Q526T、Q526Y、E531A、E531G、E531I、E531L、E531V、H535D、H535E、H535P、A539I、A539L、およびA539V。

【0232】

45. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、表面接近可能な残基の置換である、実施形態1～44のいずれかのキメラポリペプチド。

【0233】

46. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能な残基である、実施形態45のキメラポリペプチド。

【0234】

47. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である、実施形態1～12のいずれかのキメラポリペプチド。

【0235】

48. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である、実施形態47のキメラポリペプチド。

【0236】

49. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態47または48のキメラポリペプチド：残基383、残基389、残基391、残基410、残基417、残基425、残基442、残基465、残基467、残基468、残基486、残基499、残基502、残基520、残基532、残基536、残基543、および残基571。

【0237】

50. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態49のキメラポリペプチド：残基383、残基391、および残基442。

【0238】

51. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態49のキメラポリペプチド：E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、およびE442K、E442R。

【0239】

52. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態49のキメラポリペプチド：残基417、残基442、残基499、および残基502。

【0240】

53. HSAドメインIIIが、配列番号1と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態1～52のいずれかのキメラポリペプチド。

【0241】

54. HSAドメインIIIが、配列番号1と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態53のキメラポリペプチド。

【0242】

55. HSAドメインIIIが、配列番号1と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態53のキメラポリペプチド。

【0243】

56. HSA部分が、配列番号2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態1～52のいずれかのキメラポリペプチド。

【0244】

57. HSAドメイン部分が、配列番号2と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態56のキメラポリペプチド。

【0245】

58. HSAドメイン部分が、配列番号2と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態56のキメラポリペプチド。

【0246】

59. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態1～58のいずれかのキメラポリペプチド。

【0247】

60. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態1～23、30～32、35、36、40～42、45～49、または52～59のいずれかのキメラポリペプチド。

【0248】

61. HSAドメインIII中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態59または60のキメラポリペプチド。

【0249】

62. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態1～59のいずれかのキメラポリペプチド。

【0250】

63. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態1～23、30～36、40～58、または62のいずれかのキメラポリペプチド。

【0251】

64. HSAドメインIII中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態62または63のキメラポリペプチド。

【0252】

65. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ6中にある、実施形態1～59または62のいずれかのキメラポリペプチド。

【0253】

66. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのループ6中にある、実施形態1～23、30～32、35、36～49、52～58また

10

20

30

40

50

は 65 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0254】

67. HSAドメイン I I I 中に 1～18 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記 1～18 個のアミノ酸置換が HSAドメイン I I I のループ 6 中にある、実施形態 65 または 66 のキメラポリペプチド。

【0255】

68. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のヘリックス 7 中にある、実施形態 1～59、62、または 65 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0256】

69. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメイン I I I のヘリックス 7 中にある、実施形態 1～23、30～32、35、36～49、52～58 または 68 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0257】

70. HSAドメイン I I I 中に 1～3 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記 1～6 個のアミノ酸置換が HSAドメイン I I I のヘリックス 7 中にある、実施形態 71 または 72 のキメラポリペプチド。

【0258】

71. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 7 中にある、実施形態 1～59、62、65、68 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0259】

72. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメイン I I I のループ 7 中にある、実施形態 1～23、30～32、35、36～49、52～58 または 71 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0260】

73. HSAドメイン I I I 中に 1～3 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記 1～3 個のアミノ酸置換が HSAドメイン I I I のループ 7 中にある、実施形態 71 または 72 のキメラポリペプチド。

【0261】

74. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のヘリックス 8 中にある、実施形態 1～59、62、65、68、または 71 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0262】

75. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメイン I I I のヘリックス 8 中にある、実施形態 1～23、30～31、41、42～45、48～53 または 74 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0263】

76. HSAドメイン I I I 中の 1～5 個のアミノ酸置換を含んでなり、前記 1～18 個のアミノ酸置換が HSAドメイン I I I のヘリックス 8 中にある、実施形態 74 または 75 のキメラポリペプチド。

【0264】

77. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 8 中にある、実施形態 1～59、62、65、68、71、または 74 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0265】

78. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメイン I I I のループ 8 中にある、実施形態 1～23、30～31、41、42、45～48、53～58 または 77 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0266】

79. H S Aドメイン I I I 中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がH S Aドメイン I I I のループ8中にある、実施形態77または78のキメラポリペプチド。

【0267】

80. H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、H S Aドメイン I I I のループ9中にある、実施形態1～59、62、65、68、71、74、または77のいずれかのキメラポリペプチド。

【0268】

81. H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全てが、H S Aドメイン I I I のループ9中にある、実施形態1～23、30～31、45～48、53～58または80のいずれかのキメラポリペプチド。

10

【0269】

82. H S Aドメイン I I I 中に1～4個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～4個のアミノ酸置換がH S Aドメイン I I I のループ9中にある、実施形態80または81のキメラポリペプチド。

【0270】

83. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、アラニンによるアミノ酸残基の置換を含んでなる、実施形態1～82のいずれかのキメラポリペプチド。

【0271】

84. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、保存的アミノ酸置換を含んでなる、実施形態1～83のいずれかのキメラポリペプチド。

20

【0272】

85. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、別の塩基性アミノ酸による塩基性アミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～84のいずれかのキメラポリペプチド。

【0273】

86. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、別の酸性アミノ酸による酸性アミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～85のいずれかのキメラポリペプチド。

【0274】

87. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、別の中性アミノ酸による中性アミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～87のいずれかのキメラポリペプチド。

30

【0275】

88. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～87のいずれかのキメラポリペプチド：リジン、アルギニン、およびヒスチジン。

【0276】

89. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～88のいずれかのキメラポリペプチド：アスパラギン酸およびグルタミン酸。

【0277】

90. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～89のいずれかのキメラポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシン。

40

【0278】

91. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～90のいずれかのキメラポリペプチド：アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、システイン、およびグリシン。

【0279】

92. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～91のいずれかのキメラポリペプチド：フ

50

フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン。

【0280】

93. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～92のいずれかのキメラポリペプチド：システイン、セリン、およびスレオニン。

【0281】

94. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～93のいずれかのキメラポリペプチド。

【0282】

95. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態1～94のいずれかのキメラポリペプチド：グリシン、セリン、スレオニン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0283】

96. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、非保存的置換を含んでなる、実施形態1～95のいずれかのキメラポリペプチド。

【0284】

97. 前記アミノ酸置換の全部が、アミノ酸残基のアラニンによる置換を含んでなる、実施形態83のキメラポリペプチド。

【0285】

98. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、保存的アミノ酸置換を含んでなる、実施形態84のキメラポリペプチド。

【0286】

99. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、別の塩基性アミノ酸による塩基性アミノ酸置換を含んでなる、実施形態85のキメラポリペプチド。

【0287】

100. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、別の酸性アミノ酸による酸性アミノ酸置換を含んでなる、実施形態87のキメラポリペプチド。

【0288】

101. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、別の中性アミノ酸による中性アミノ酸置換を含んでなる、実施形態87のキメラポリペプチド。

【0289】

102. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態88のキメラポリペプチド：リジン、アルギニン、およびヒスチジン。

【0290】

103. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態89のキメラポリペプチド：アスパラギン酸およびグルタミン酸。

【0291】

104. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態90のキメラポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシン。

【0292】

105. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態91のキメラポリペプチド：アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、システイン、およびグリシン。

【0293】

10

20

30

40

50

106. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態92のキメラポリペプチド：フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン。

【0294】

107. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態93のキメラポリペプチド：システイン、セリン、およびスレオニン。

【0295】

108. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態94のキメラポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸。

【0296】

109. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態95のキメラポリペプチド：グリシン、セリン、スレオニン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0297】

110. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、非保存的置換を含んでなる、実施形態96のキメラポリペプチド。

【0298】

111. 異種タンパク質が、抗体またはその抗原結合性断片を含んでなる、実施形態1～110のいずれかのキメラポリペプチド。

【0299】

112. 異種タンパク質が、治療用タンパク質を含んでなる、実施形態1～111のいずれかのキメラポリペプチド。

【0300】

113. IgG免疫グロブリンの定常領域をさらに含んでなる、実施形態1～112のいずれかのキメラポリペプチド。

【0301】

114. HSA部分が異種タンパク質と化学的に結合する、実施形態1～113のいずれかのキメラポリペプチド。

【0302】

115. HSA部分が異種タンパク質と組換え的に結合する、実施形態1～113のいずれかのキメラポリペプチド。

【0303】

116. キメラポリペプチドが、HSA部分と異種タンパク質の双方をコードする組換えベクターを使用して生成される、実施形態115のキメラポリペプチド。

【0304】

117. キメラポリペプチドが、原核生物または真核細胞中で生成される、実施形態115または116のキメラポリペプチド。

【0305】

118. 真核細胞が、酵母細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞から選択される、実施形態117のキメラポリペプチド。

【0306】

119. HSA部分と異種タンパク質が互いに直接結合する、実施形態114～118のいずれかのキメラポリペプチド。

【0307】

120. HSA部分と異種タンパク質がリンカーを介して結合する、実施形態114～118のいずれかのキメラポリペプチド。

【0308】

10

20

30

40

50

1 2 1. リンカーが、1つまたは複数の G l y - G l y - G l y - G l y - S e r 反復を含んでなる、実施形態 1 2 0 のキメラポリペプチド。

【0 3 0 9】

1 2 2. H S A 部分が異種タンパク質の N 末端アミノ酸に結合する、実施形態 1 ～ 1 2 1 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0 3 1 0】

1 2 3. H S A 部分が異種タンパク質の C 末端アミノ酸に結合する、実施形態 1 ～ 1 2 1 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0 3 1 1】

1 2 4. H S A 部分が異種タンパク質の内部アミノ酸に結合する、実施形態 1 ～ 1 2 1 のいずれかのキメラポリペプチド。 10

【0 3 1 2】

1 2 5. H S A 部分が、H S A ドメイン I の少なくとも一部；または H S A ドメイン I I の少なくとも一部；または H S A ドメイン I の少なくとも一部と、H S A ドメイン I I の少なくとも一部をさらに含んでなる、実施形態 1 ～ 1 2 4 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0 3 1 3】

1 2 6. 前記キメラポリペプチドが実質的に精製されている、実施形態 1 ～ 1 2 5 のいずれかのキメラポリペプチド。

【0 3 1 4】

1 2 7. 実施形態 1 ～ 1 2 6 のいずれかのキメラポリペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる組成物。 20

【0 3 1 5】

1 2 8. 無菌組成物である、実施形態 1 2 7 の前記組成物。

【0 3 1 6】

1 2 9. 前記組成物が非発熱性である、実施形態 1 2 7 または 1 2 8 の組成物。

【0 3 1 7】

1 3 0. 実施形態 1 ～ 1 2 6 のいずれかに従ったキメラポリペプチド、または実施形態 1 2 7 ～ 1 2 9 のいずれかに従った組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、対象を治療する方法。 30

【0 3 1 8】

1 3 1. 実施形態 1 ～ 1 2 6 のいずれかに従ったキメラポリペプチドをそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、対象中でタンパク質の血清半減期を増大させる方法。

【0 3 1 9】

1 3 2. 前記対象に投与するステップが、前記キメラポリペプチドを全身投与するステップを含んでなる、実施形態 1 3 0 または 1 3 1 の方法。

【0 3 2 0】

1 3 3. 前記対象に投与するステップが、皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、静脈内、血管内、心膜内、皮下、肺、鼻腔内、眼内、硬膜外、局所、および経口からなる群から選択される手段によって、前記キメラポリペプチドを投与するステップを含んでなる、実施形態 1 3 0 または 1 3 1 の方法。 40

【0 3 2 1】

1 3 4. 前記対象に投与するステップが、前記キメラポリペプチドを静脈内投与するステップを含んでなる、実施形態 1 3 0 または 1 3 1 の方法。

【0 3 2 2】

1 3 5. 実施形態 1 ～ 1 2 5 のいずれかに記載のキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、核酸構築物。

【0 3 2 3】

1 3 6. H S A ドメイン I I I、またはその新生児 F c 受容体 (F c R n) 結合断片を 50

含んでなるヒト血清アルブミン（HSA）変種ポリペプチドであって、前記変種ポリペプチドがFcRnに結合し得て、前記HSAドメインIIIが1～18個のアミノ酸置換を含んでなり、前記置換を欠く対照HSAポリペプチドと比較して、前記変種ポリペプチドのFcRn親和性を増大させる、ポリペプチド。

【0324】

137. 変種ポリペプチドが、前記対照ポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合し、前記親和性が酸性pHで測定される、実施形態136の変種ポリペプチド。

【0325】

138. 酸性pHが5.0～6.0である、実施形態136または137の変種ポリペプチド。

【0326】

139. 酸性pHが5.5±0.2である、実施形態138の変種ポリペプチド。

【0327】

140. 変種ポリペプチドが、酸性pHにおいて、前記対照ポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合するが、その変種ポリペプチドが、中性pHでは、前記対照ポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合しない、実施形態136のいずれかの変種ポリペプチド。

【0328】

141. 中性pHが6.9～7.9である、実施形態140の変種ポリペプチド。

【0329】

142. 中性pHが7.4±0.2である、実施形態141の変種ポリペプチド。

【0330】

143. 変種ポリペプチドが、前記対照HSAポリペプチドよりも長い血清半減期を有する、実施形態136のいずれかの変種ポリペプチド。

【0331】

144. HSAドメインIIIが1～10個のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態136～143のいずれかの変種ポリペプチド。

【0332】

145. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、複数の種を越えて保存された残基の置換である、実施形態136～144のいずれかの変異ポリペプチド。

【0333】

146. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、複数の種を越えて保存された残基の置換である、実施形態145の変種ポリペプチド。

【0334】

147. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である、実施形態136～144のいずれかの変種ポリペプチド。

【0335】

148. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である、実施形態147の変種ポリペプチド。

【0336】

149. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、表5に列举されるものから選択される、実施形態136～147のいずれかの変種ポリペプチド。

【0337】

150. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態13

10

20

30

40

50

6～147のいずれかの変種ポリペプチド：残基381、残基383、残基391、残基401、残基402、残基407、残基411、残基413、残基414、残基415、残基416、残基424、残基426、残基434、残基442、残基445、残基447、残基450、残基454、残基455、残基456、残基457、残基459、残基463、残基495、残基506、残基508、残基509、残基511、残基512、残基515、残基516、残基517、残基519、残基521、残基523、残基524、残基525、残基526、残基527、残基531、残基535、残基538、残基539、残基541、残基557、残基561、残基566、残基569。

【0338】

151. 変種ポリペプチドが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置にあるHSAドメインIII中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態136～147または150のいずれかの変種ポリペプチド：(a) 残基383および413；(b) 残基401および523；(c) 残基407および447；(d) 残基407および447および539；(e) 残基407および509；(f) 残基407および526；(g) 残基411および535；(h) 残基414および456；(i) 残基415および569；(j) 残基426および526；(k) 残基442および450および459；(l) 残基463および508；(m) 残基508および519および525；(n) 残基509および527；(o) 残基523および538；(p) 残基526および557；(q) 残基541および561；(r) 残基463および523；(s) 残基508および523；(t) 残基508および524；(u) 残基463、508、および523；(v) 残基463、508、および524；(w) 残基508、523、および524；(x) 残基463、508、523、および524；(y) 残基463および524；(z) 残基523および524；および(aa) 残基463、523、および524。

【0339】

152. 変種ポリペプチドが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置にあるHSAドメインIII中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態151の変種ポリペプチド：(a) 残基463および508；(b) 残基463および523；(c) 残基508および523；(d) 残基508および524；(e) 残基463、508、および523；(f) 残基463、508、および524；(g) 残基508、523、および524；(h) 残基463、508、523、および524；(i) 残基463および524；(j) 残基523および524；(k) 残基463、523、および524。

【0340】

153. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態136～148、または150～152のいずれかの変種ポリペプチド：V381N、V381Q、E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、Y401D、Y401E、K402A、K402G、K402I、K402L、K402V、L407F、407H、407M、L407N、L407Q、407R、L407W、L407Y、Y411Q、Y411N、K413C、K413S、K413T、K414S、K414T、V415C、V415L、V415S、V415T、Q416H、Q416P、V424A、V424D、V424G、V424I、V424L、V424M、V424N、V424Q、V424W、V426D、V426E、V426F、V426H、V426L、V426N、V426P、V426Q、G434C、G434S、G434T、E442K、E442R、R445F、R445W、R445Y、P447S、P447T、E450D、E450E、S454C、S454M、S454T、V455N、V455Q、V456N、V456Q、L457F、L457W、L457Y、Q459K、Q459R、L463C、L463F、L463G、L463H、L463I、L463N、L463S、L463Q、E495D、T506F、T506M、T506

N、T506R、T506W、T506Y、T508C、T508E、T508I、T508K、T508R、T508S、F509C、F509D、F509G、F509I、F509L、F509M、F509P、F509V、F509W、F509Y、A511D、A511F、A511I、A511R、A511T、A511V、A511W、A511Y、D512F、D512M、D512Q、D512W、D512Y、T515C、T515D、T515E、T515E、T515G、T515H、T515L、T515N、T515P、T515Q、T515S、T515W、T515Y、L516C、L516F、L516S、L516T、L516W、L516Y、S517C、S517F、S517M、S517T、S517W、S517Y、K519A、K519G、K519I、K519L、K519V、R521F、R521H、R521M、R521Q、R521T、R521W、R521Y、I523A、I523C、I523D、I523E、I523F、I523G、I523H、I523I、I523K、I523L、I523M、I523N、I523P、I523Q、I523R、I523S、I523T、I523V、I523W、I523Y、K524A、K524F、K524G、K524H、K524I、K524L、K524M、K524Q、K524T、K524V、K525A、K525G、K525I、K525L、K525V、Q526A、Q526C、Q526F、Q526H、Q526L、Q526M、Q526P、Q526S、Q526T、Q526V、Q526Y、T527F、T527W、T527Y、E531A、E531G、E531I、E531L、E531V、H535D、H535E、H535K、H535L、H535N、H535P、H535S、K538F、K538W、K538Y、A539I、A539L、A539V、K541F、K541W、K541Y、K557A、K557G、K557I、K557L、K557N、K557S、K557V、A561F、A561W、A561Y、T566F、T566W、T566Y、A569H、およびA569P。

【0341】

154. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態136～148、または150～153のいずれかの変種ポリペプチド：V381N、E383G、N391V、Y401E、K402A、L407N、L407Y、Y411Q、K414S、K413S、V415T、V415C、Q416P、V424I、V424Q、V426E、V426H、G434C、E442K、R445W、P447S、E450D、S454C、V455N、V456N、L457F、Q459R、L463C、L463F、L463H、L463M、L463N、L463Q、E495D、T506Y、T508C、T508E、T508I、T508R、T508S、F509I、F509M、F509W、A511F、D512Y、T515P、T515Q、T515S、L516T、L516W、S517C、S517W、K519I、R521W、I523C、I523D、I523E、I523F、I523Q、I523H、I523K、I523L、I523N、I523P、I523G、I523R、I523Y、K524A、K524F、K524I、K524L、K524M、K524T、K524V、K525V、Q526T、Q526M、Q526Y、T527Y、E531I、H535N、H535P、K538Y、A539I、K541F、K557G、A561F、T566W、およびA569P。

【0342】

155. 変種ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメインIII中の1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態136～148、または150～153のいずれかの変種ポリペプチド：V381N、E383G、N391V、Y401E、K402A、L407N、L407Y、Y411Q、K414S、K413S、V415T、V415C、Q416P、V424I、V424Q、V426E、V426H、G434C、E442K、R445W、P447S、E450D、S454C、V455N、V456N、L457F、Q459R、L463C、L463F、L463H、L463M、L463N、L463Q、E495D、T506Y、T508C、T508E、T50

8 I、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 I、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 C、S 5 1 7 W、K 5 1 9 I、R 5 2 1 W、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 H、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 G、I 5 2 3 R、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 I、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、K 5 4 1 F、K 5 5 7 G、A 5 6 1 F、T 5 6 6 W、および A 5 6 9 P。

【0343】

156. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態154の変種ポリペプチド：L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、V 4 1 5 T、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、P 4 4 7 S、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 6 3 N、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 R、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 Q、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 W、R 5 2 1 W、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 R、K 5 2 4 L、Q 5 2 6 M、T 5 2 7 Y、H 5 3 5 P、および K 5 5 7 G。

【0344】

157. 変種ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中の1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態155の変種ポリペプチド：L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、V 4 1 5 T、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、P 4 4 7 S、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 6 3 N、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 R、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 Q、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 W、R 5 2 1 W、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 G、I 5 2 3 K、I 5 2 3 R、K 5 2 4 L、Q 5 2 6 M、T 5 2 7 Y、H 5 3 5 P、および K 5 5 7 G。

【0345】

158. 変種ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態136～147、または150～152のいずれかの変種ポリペプチド：(a) E 3 8 3 G/K 4 1 3 S；(b) Y 4 0 1 E/I 5 2 3 G；(c) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S；(d) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S/A 5 3 9 I；(e) L 4 0 7 N/F 5 0 9 M；(f) L 4 0 7 Y/Q 5 2 6 T；(g) Y 4 1 1 Q/H 5 3 5 N；(h) K 4 1 4 S/V 4 5 6 N；(i) V 4 1 5 T/A 5 6 9 P；(j) V 4 2 6 H/Q 5 2 6 Y；(k) E 4 4 2 K/E 4 5 0 D/Q 4 5 9 R；(l) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R；(m) T 5 0 8 R/K 5 1 9 I/K 5 2 5 V；(n) F 5 0 9 I/T 5 2 7 Y；(o) I 5 2 3 Q/K 5 3 8 Y；(p) Q 5 2 6 M/K 5 5 7 G；(q) K 5 4 1 F/A 5 6 1 F；(r) L 4 6 3 N/K 5 2 4 L；(s) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(t) T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(u) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(v) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(w) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(x) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(y) L 4 6 3 N/I 5 2 3 G；(z) I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；および (a a) L 4 6 3 N/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L。

【0346】

159. 変種ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態158の変種ポリペプチド：(a) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S；(b) L 4 0 7 N/P 4 4 7 S/A 5 3 9 I；(c) L 4 0 7 N/F 5 0 9 M；(d) Y 4 1 1 Q/H 5 3 5 N；(e) K 4 1 4 S/V 4 5 6 N；(f) V 4 2 6 H/Q 5 2 6 Y；(g) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R；(h) F 5 0 9 I/T 5 2 7 Y；(i) I 5 2 3 Q/K 5 3 8 Y；(j) Q 5 2 6 M/K 5 5 7 G；(k) K 5 4 1 F/A 5 6 1 F；(l) L 4 6 3 N/K 5 2 4 L；(m) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(n) T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(o) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G；(p) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/K 5 2 4 L；(q) T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(r) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K 5 2 4 L；(r) L 4 6 3 N/T 5 0 8 R/I 5 2 3 G/K

10

20

30

40

50

5 2 4 L ; (s) L 4 6 3 N / I 5 2 3 G ; (t) I 5 2 3 G / K 5 2 4 L および (u)
L 4 6 3 N / / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L 。

【 0 3 4 7 】

1 6 0 . 変種ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 1 5 8 の変種ポリペプチド : (a) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R ; (b) L 4 6 3 N / K 5 2 4 L ; (c) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G ; (d) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L ; (e) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G ; (f) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / K 5 2 4 L ; (g) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L ; および (h) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G / K 5 2 4 L 。

【 0 3 4 8 】

1 6 1 . 変種ポリペプチドが、以下からなる群から選択される、H S A ドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 1 5 8 の変種ポリペプチド : (a) L 4 6 3 N / K 5 0 8 R ; (b) T 5 0 8 R / I 5 2 3 G ; (c) T 5 0 8 R / K 5 2 4 L ; および (d) L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G 。

【 0 3 4 9 】

1 6 2 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存されているが、ニワトリ血清アルブミン中では保存されていない残基の置換である、実施形態 1 3 6 ~ 1 4 7 のいずれかの変種ポリペプチド。

【 0 3 5 0 】

1 6 3 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存されているが、ニワトリ血清アルブミン中では保存されていない残基の置換である、実施形態 1 6 2 の変種ポリペプチド。

【 0 3 5 1 】

1 6 4 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、完全長成熟 H S A (配列番号 2) 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態 1 4 7 の変種ポリペプチド : 残基 3 8 3 、残基 3 8 9 、残基 3 9 1 、残基 4 1 0 、残基 4 1 7 、残基 4 2 5 、残基 4 4 2 、残基 4 6 5 、残基 4 6 7 、残基 4 6 8 、残基 4 8 6 、残基 4 9 9 、残基 5 0 2 、残基 5 2 0 、残基 5 3 2 、残基 5 3 6 、残基 5 4 3 、および残基 5 7 1 。

【 0 3 5 2 】

1 6 5 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態 1 6 4 の変種ポリペプチド : 残基 3 8 3 、残基 3 9 1 、残基 4 3 4 、残基 4 4 2 、残基 4 4 5 、および残基 4 5 0 。

【 0 3 5 3 】

1 6 6 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、V 3 8 1 N 、E 3 8 3 A 、E 3 8 3 G 、E 3 8 3 I 、E 3 8 3 L 、E 3 8 3 V 、N 3 9 1 A 、N 3 9 1 G 、N 3 9 1 I 、N 3 9 1 L 、N 3 9 1 V 、G 4 3 4 C 、G 4 3 4 S 、G 4 3 4 T 、E 4 4 2 K 、E 4 4 2 R 、R 4 4 5 F 、R 4 4 5 W 、R 4 4 5 Y 、E 4 5 0 D 、および E 4 5 0 E からなる群から選択される、実施形態 1 6 5 の変種ポリペプチド。

【 0 3 5 4 】

1 6 7 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態 1 6 4 の変種ポリペプチド : 残基 4 1 7 、残基 4 4 2 、残基 4 9 9 、および残基 5 0 2 。

【 0 3 5 5 】

1 6 8 . H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態 1 6

10

20

30

40

50

2の変種ポリペプチド：残基380、残基381、残基384、残基387、残基396、残基401、残基404、残基405、残基406、残基409、残基419、残基421、残基422、残基424、残基428、残基430、残基431、残基433、残基441、残基457、残基458、残基463、残基464、残基466、残基469、残基470、残基474、残基475、残基480、残基481、残基489、残基491、残基495、残基500、残基508、残基510、残基515、残基516、残基524、残基525、残基526、残基528、残基531、残基535、残基539、残基544、残基547、および残基576。

【0356】

169. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態168の変種ポリペプチド：残基381、残基401、残基424、残基457、残基463、残基495、残基508、残基515、残基516、残基524、残基525、残基526、残基531、残基535、および残基539。

10

【0357】

170. HSAドメインIIIが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置における、アミノ酸置換を含んでなる、実施形態169の変種ポリペプチド：残基463および508；残基463および524；残基508および524；残基463、508および524。

【0358】

171. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態169または170の変種ポリペプチド：V381N、V381Q、Y401D、Y401E、V424N、V424Q、L457F、L457W、L457Y、L463C、L463F、L463G、L463H、L463I、L463N、L463S、L463Q、E495D、T508C、T508E、T508I、T508K、T508R、T508S、T515C、T515H、T515N、T515P、T515Q、T515S、L516F、L516S、L516T、L516W、L516Y、K524A、K524F、K524G、K524H、K524I、K524L、K524M、K524T、K524V、K525A、K525G、K525I、K525L、K525V、Q526C、Q526M、Q526S、Q526T、Q526Y、E531A、E531G、E531I、E531L、E531V、H535D、H535E、H535P、A539I、およびA539L、A539V。

20

30

【0359】

172. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態164の変種ポリペプチド。残基383、残基389、残基391、残基410、残基417、残基425、残基442、残基465、残基467、残基468、残基486、残基499、残基502、残基520、残基532、残基536、残基543、および残基571。

【0360】

173. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態168の変種ポリペプチド：残基380、残基381、残基384、残基387、残基396、残基401、残基404、残基405、残基406、残基409、残基419、残基421、残基422、残基424、残基428、残基430、残基431、残基433、残基441、残基457、残基458、残基463、残基464、残基466、残基469、残基470、残基474、残基475、残基480、残基481、残基489、残基491、残基495、残基500、残基508、残基510、残基515、残基516、残基524、残基525、残基526、残基528、残基531、残基535、残基539、残基544、残基547、および残基576。

40

【0361】

174. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形

50

態 1 6 4 または 1 6 8 の変種ポリペプチド：残基 3 8 0、残基 3 8 1、残基 3 8 4、残基 3 8 3、残基 3 8 7、残基 3 8 9、残基 3 9 1、残基 3 9 6、残基 4 0 1、残基 4 0 4、残基 4 0 5、残基 4 0 6、残基 4 0 9、残基 4 1 0、残基 4 1 7、残基 4 1 9、残基 4 2 1、残基 4 2 2、残基 4 2 4、残基 4 2 5、残基 4 2 8、残基 4 3 0、残基 4 3 1、残基 4 3 3、残基 4 4 1、残基 4 4 2、残基 4 5 7、残基 4 5 8、残基 4 6 3、残基 4 6 4、残基 4 6 5、残基 4 6 6、残基 4 6 7、残基 4 6 8、残基 4 6 9、残基 4 7 0、残基 4 7 4、残基 4 7 5、残基 4 8 0、残基 4 8 1、残基 4 8 6、残基 4 8 9、残基 4 9 1、残基 4 9 5、残基 4 9 9、残基 5 0 0、残基 5 0 2、残基 5 0 8、残基 5 1 0、残基 5 1 5、残基 5 1 6、残基 5 2 0、残基 5 2 4、残基 5 2 5、残基 5 2 6、残基 5 2 8、残基 5 3 1、残基 5 3 2、残基 5 3 5、残基 5 3 6、残基 5 3 9、残基 5 4 3、残基 5 4 4、残基 5 4 7、残基 5 7 1、および残基 5 7 6。

10

【0 3 6 2】

1 7 5. 前記アミノ酸置換の全部が、以下からなる群の構成員から選択される、実施形態 1 7 4 の変種ポリペプチド：残基 3 8 1、残基 3 8 3、残基 3 9 1、残基 4 0 1、残基 4 2 4、残基 4 4 2、残基 4 6 3、残基 4 9 5、残基 5 0 8、残基 5 1 5、残基 5 1 6、残基 5 2 4、残基 5 2 5、残基 5 2 6、残基 5 3 1、残基 5 3 5、および残基 5 3 9。

【0 3 6 3】

1 7 6. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、以下からなる群から選択される、実施形態 1 7 5 の変種ポリペプチド：V 3 8 1 N、V 3 8 1 Q、E 3 8 3 A、E 3 8 3 G、E 3 8 3 I、E 3 8 3 L、E 3 8 3 V、N 3 9 1 A、N 3 9 1 G、N 3 9 1 I、N 3 9 1 L、N 3 9 1 V、Y 4 0 1 D、Y 4 0 1 E、V 4 2 4 A、V 4 2 4 G、V 4 2 4 I、V 4 2 4 L、V 4 2 4 N、V 4 2 4 Q、E 4 4 2 K、E 4 4 2 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 M、L 4 6 3 N、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 F、T 5 0 6 W、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、T 5 1 5 C、T 5 1 5 H、T 5 1 5 N、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、L 5 1 6 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 A、K 5 2 5 G、K 5 2 5 I、K 5 2 5 L、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 C、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 S、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 Y、E 5 3 1 A、E 5 3 1 G、E 5 3 1 I、E 5 3 1 L、E 5 3 1 V、H 5 3 5 D、H 5 3 5 E、H 5 3 5 P、A 5 3 9 I、A 5 3 9 L、および A 5 3 9 V。

20

30

【0 3 6 4】

1 7 7. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、表面接近可能な残基の置換である、実施形態 1 3 6 ~ 1 7 4 のいずれかの変種ポリペプチド。

【0 3 6 5】

1 7 8. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能な残基である、実施形態 1 7 7 の変種ポリペプチド。

【0 3 6 6】

1 7 9. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である、実施形態 1 3 6 ~ 1 7 4 のいずれかの変種ポリペプチド。

40

【0 3 6 7】

1 8 0. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である、実施形態 1 7 9 の変種ポリペプチド。

【0 3 6 8】

1 8 1. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、完全長成熟 H S A 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態 1 7 9 または 1 8 0 の変種ポリペプチド：残基 3 8 3、残基 3 8 9、残基 3 9 1、残基 4 1 0、残基 4 1 7、残基 4 2 5、残基 4 4 2、残基 4 6 5、残基 4 6 7、残基 4 6 8、残基 4

50

86、残基499、残基502、残基520、残基532、残基536、残基543、および残基571。

【0369】

182. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、完全長成熟HSA中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態181の変種ポリペプチド：残基383、残基391、および残基442。

【0370】

183. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態182の変種ポリペプチド：E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、およびE442K、E442R。

10

【0371】

184. HSAドメインIIIが、配列番号1と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態136～180のいずれかの変種ポリペプチド。

【0372】

185. HSAドメインIIIが、配列番号1と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態184の変種ポリペプチド。

【0373】

186. HSAドメインIIIが、配列番号1と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を含んでなる、実施形態177185の変種ポリペプチド。

20

【0374】

187. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態136～186のいずれかの変種ポリペプチド。

【0375】

188. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態136～155、162～164、168、172～174、177～181または184～187のいずれかの変種ポリペプチド。

【0376】

189. HSAドメインIII中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態187または188の変種ポリペプチド。

30

【0377】

190. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態136～187のいずれかの変種ポリペプチド。

【0378】

191. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態136～155、162～168、172～174～186、または190のいずれかの変種ポリペプチド。

40

【0379】

192. HSAドメインIII中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態190または191の変種ポリペプチド。

【0380】

193. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ6中にある、実施形態136～173または190のいずれかの変種ポリペプチド。

【0381】

194. HSAドメイン中のIII前記アミノ酸置換の全部が、HSAドメインIII

50

のループ6にある、実施形態136～155、162～164、167～181、184～186、または193の変種ポリペプチド。

【0382】

195. HSAドメインIII中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのループ6中にある、実施形態193または194の変種ポリペプチド。

【0383】

196. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのヘリックス7中にある、実施形態136～173、190または193のいずれかの変種ポリペプチド。

10

【0384】

197. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのヘリックス7中にある、実施形態136～155、162～164、167～181、184～186、または196の変種ポリペプチド。

【0385】

198. HSAドメインIII中に1～3個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～6個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのヘリックス7中にある、実施形態196または200の変種ポリペプチド。

【0386】

199. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ7中にある、実施形態136～173、190、193、または196のいずれかの変種ポリペプチド。

20

【0387】

200. HSAドメイン中のIII前記アミノ酸置換の全部が、HSAドメインIIIのループ7にある、実施形態136～155、162～164、167～181、184～186、または199の変種ポリペプチド。

【0388】

201. HSAドメインIII中に1～3個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～3個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのループ7中にある、実施形態199または200の変種ポリペプチド。

30

【0389】

202. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのヘリックス8中にある、実施形態136～173、190、193、196、または199のいずれかの変種ポリペプチド。

【0390】

203. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのヘリックス8中にある、実施形態136～155、162～164、173～174、177～181、184～186、または202の変種ポリペプチド。

【0391】

204. HSAドメインIII中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～18個のアミノ酸置換がHSAドメインIIIのヘリックス8中にある、実施形態202または203の変種ポリペプチド。

40

【0392】

205. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、HSAドメインIIIのループ8中にある、実施形態136～173、190、193、196、199、または202のいずれかの変種ポリペプチド。

【0393】

206. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全てが、HSAドメインIIIのループ8中にある、実施形態136～155、162～164、173～174、177～181、184～186または205の変種ポリペプチド。

50

【0394】

207. H S Aドメイン I I I 中の1～5個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～5個のアミノ酸置換がH S Aドメイン I I I のループ8中にある、実施形態205または206の変種ポリペプチド。

【0395】

208. H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、H S Aドメイン I I I のループ9中にある、実施形態136～173、190、193、または205のいずれかの変種ポリペプチド。

【0396】

209. H S Aドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全てが、H S Aドメイン I I I のループ9中にある、実施形態136～155、162、163、177～180、184～186、または208のいずれかの変種ポリペプチド。

【0397】

210. H S Aドメイン I I I 中に1～4個のアミノ酸置換を含んでなり、前記1～4個のアミノ酸置換がH S Aドメイン I I I のループ9中にある、実施形態208または209の変種ポリペプチド。

【0398】

211. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、アラニンによるアミノ酸残基の置換を含んでなる、実施形態136～210のいずれかの変種ポリペプチド。

【0399】

212. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、保存的アミノ酸置換を含んでなる、実施形態136～211のいずれかの変種ポリペプチド。

【0400】

213. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、別の塩基性アミノ酸による塩基性アミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～212のいずれかの変種ポリペプチド。

【0401】

214. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、別の酸性アミノ酸による酸性アミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～213のいずれかの変種ポリペプチド。

【0402】

215. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、別の中性アミノ酸による中性アミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～214のいずれかの変種ポリペプチド。

【0403】

216. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～215のいずれかの変種ポリペプチド：リジン、アルギニン、およびヒスチジン。

【0404】

217. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～216のいずれかの変種ポリペプチド：アスパラギン酸およびグルタミン酸。

【0405】

218. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～217のいずれかの変種ポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシン。

【0406】

219. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態136～218のいずれかの変種ポリペプチド：アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、システイン、およびグリシン。

【0407】

220. 前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1

10

20

30

40

50

つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態 136～219 のいずれかの変種ポリペプチド：フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン。

【0408】

221. 前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1 つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態 136～220 のいずれかの変種ポリペプチド：システイン、セリン、およびスレオニン。

【0409】

222. 前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1 つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態 136～221 のいずれかの変種ポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸。

10

【0410】

223. 前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、以下の群内の別のアミノ酸による、1 つのアミノ酸の置換を含んでなる、実施形態 136～222 のいずれかの変種ポリペプチド：グリシン、セリン、スレオニン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0411】

224. 前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、非保存的置換を含んでなる、実施形態 136～223 のいずれかの変種ポリペプチド。

【0412】

225. 前記アミノ酸置換の全部が、アミノ酸残基のアラニンによる置換を含んでなる、実施形態 211 の変種ポリペプチド。

20

【0413】

226. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、保存的アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 212 の変種ポリペプチド。

【0414】

227. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、別の塩基性アミノ酸による塩基性アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 213 の変種ポリペプチド。

【0415】

228. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、別の酸性アミノ酸による酸性アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 214 の変種ポリペプチド。

30

【0416】

229. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、別の中性アミノ酸による中性アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 215 の変種ポリペプチド。

【0417】

230. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による 1 つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 216 の変種ポリペプチド：リジン、アルギニン、およびヒスチジン。

【0418】

231. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による 1 つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 217 の変種ポリペプチド：アスパラギン酸およびグルタミン酸。

40

【0419】

232. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による 1 つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 218 の変種ポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシン。

【0420】

233. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による 1 つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 219 の変種ポリペプチド：アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチ

50

オニン、システイン、およびグリシン。

【0421】

234. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態220の変種ポリペプチド：フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン。

【0422】

235. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態221の変種ポリペプチド：システイン、セリン、およびスレオニン。

【0423】

236. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態222の変種ポリペプチド：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸。

【0424】

237. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、以下の群内の別のアミノ酸による1つのアミノ酸置換を含んでなる、実施形態223の変種ポリペプチド：グリシン、セリン、スレオニン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン。

【0425】

238. 前記アミノ酸置換の全部が、独立して各位置に、非保存的置換を含んでなる、実施形態224の変種ポリペプチド。

【0426】

239. HSA部分がHSAドメインIの少なくとも一部；またはHSAドメインIIの少なくとも一部；またはHSAドメインIの少なくとも一部と、HSAドメインIIの少なくとも一部をさらに含んでなる、実施形態136～238のいずれかの変種ポリペプチド。

【0427】

240. 前記変種ポリペプチドが実質的に精製されている、実施形態136～239のいずれかの変種ポリペプチド。

【0428】

241. 標的上のエピトープへの結合部位をさらに含んでなる、実施形態136～240のいずれかの変種ポリペプチド。

【0429】

242. 結合部位が前記標的と拮抗する、実施形態241の変種ポリペプチド。

【0430】

243. 結合部位が前記標的を刺激する、実施形態241の変種ポリペプチド。

【0431】

244. 実施例136～243のいずれかの変種ポリペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる組成物。

【0432】

245. 無菌組成物である、実施形態244の組成物。

【0433】

246. 前記組成物が非発熱性である、実施形態244または245の組成物。

【0434】

247. 実施形態136～243のいずれかの変種ポリペプチドを前記プロテインに結合させるステップを含んでなる、タンパク質の血清半減期を増大させる方法。

【0435】

248. 実施形態241～243のいずれかの変種ポリペプチドをそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、対象を処置する方法。

【0436】

10

20

30

40

50

249. 実施例136～239のいずれかに記載の変種ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、核酸構築物。

【0437】

250. (a) ヒト血清アルブミン(HSA)部分をコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸構築物であって、そのHSA部分が、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、そのHSAドメインIIIが、(b) 異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結する1～18個のアミノ酸置換を含んでなり、核酸構築物が、異種タンパク質の機能活性を保持してFcRnに結合できるキメラポリペプチドをコードして、前記キメラポリペプチドが、HSA部分が前記アミノ酸置換を含まない対照キメラポリペプチドと比較して、血清半減期増大および／またはFcRn親和性増大を有する、核酸構築物。

10

【0438】

251. キメラポリペプチドが、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合する、実施形態250の核酸構築物。

【0439】

252. キメラポリペプチドが、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合し、前記親和性が酸性pHで測定される、実施形態250または251の核酸構築物。

【0440】

253. 酸性pHが5.0～6.0である、実施形態252の核酸構築物。

20

【0441】

254. 酸性pHが5.5±0.2である、実施形態253の核酸構築物。

【0442】

255. キメラポリペプチドが、酸性pHにおいて、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合するが、そのキメラポリペプチドが、中性pHでは、前記対照キメラポリペプチドよりも高い親和性でFcRnに結合しない、実施形態250～255のいずれかの核酸構築物。

【0443】

256. 中性pHが6.9～7.9である、実施形態255の核酸構築物。

【0444】

30

257. 中性pHが7.4±0.2である、実施形態256の核酸構築物。

【0445】

258. (i) ヒト血清アルブミン(HSA)部分をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、そのHSA部分が、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、そのHSAドメインIIIが、1～10個のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態250のいずれかの核酸構築物。

【0446】

259. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、複数の種を越えて保存された残基の置換である、実施形態250～258のいずれかの核酸構築物。

【0447】

40

260. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、複数の種を越えて保存された残基の置換である、実施形態259の核酸構築物。

【0448】

261. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である、実施形態250～258のいずれかの核酸構築物。

【0449】

262. HSAドメインIII中の前記アミノ酸置換の全部が、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマ

50

からの血清アルブミンタンパク質間で保存された残基の置換である、実施形態 261 の核酸構築物。

【0450】

263. HSAドメイン III 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、表 5 に列挙されるものから選択される、実施形態 250～262 のいずれかの核酸構築物。

【0451】

264. HSAドメイン III 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、完全長成熟 HSA 中の位置に対応して番号付けされた、以下の位置のいずれかにある、実施形態 250～262 のいずれかの核酸構築物：残基 381、残基 383、残基 391、残基 401、残基 402、残基 407、残基 411、残基 413、残基 414、残基 415、残基 416、残基 424、残基 426、残基 434、残基 442、残基 445、残基 447、残基 450、残基 454、残基 455、残基 456、残基 457、残基 459、残基 463、残基 495、残基 506、残基 508、残基 509、残基 511、残基 512、残基 515、残基 516、残基 517、残基 519、残基 521、残基 523、残基 524、残基 525、残基 526、残基 527、残基 531、残基 535、残基 538、残基 539、残基 541、残基 557、残基 561、残基 566、残基 569。

【0452】

265. HSAドメイン III が、完全長成熟 HSA 中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置における、アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 250～262 のいずれかの核酸構築物：。(a) 残基 383 および 413；(b) 残基 401 および 523；(c) 残基 407 および 447；(d) 残基 407 および 447 および 539；(e) 残基 407 および 509；(f) 残基 407 および 526；(g) 残基 411 および 535；(h) 残基 414 および 456；(i) 残基 415 および 569；(j) 残基 426 および 526；(k) 残基 442 および 450 および 459；(l) 残基 463 および 508；(m) 残基 508 および 519 および 525；(n) 残基 509 および 527；(o) 残基 523 および 538；(p) 残基 526 および 557；(q) 残基 541 および 561；(r) 残基 463 および 523；(s) 残基 508 および 523；(t) 残基 508 および 524；(u) 残基 463、508、および 523；(v) 残基 463、508、および 524；(w) 残基 508、523、および 524；(x) 残基 463、508、523、および 524；(y) 残基 463 および 524；(z) 残基 523 および 524；および (aa) 残基 463、523、および 524。

【0453】

266. HSAドメイン III が、完全長成熟 HSA 中の位置に対応して番号付けされた、以下からなる群から選択される位置における、アミノ酸置換を含んでなる、実施形態 250～262 のいずれかの核酸構築物：(a) 残基 463 および 508；(b) 残基 463 および 523；(c) 残基 508 および 523；(d) 残基 508 および 524；(e) 残基 463、508、および 523；(f) 残基 463、508、および 524；(g) 残基 508、523、および 524；(h) 残基 463、508、523、および 524；(i) 残基 463 および 524；(j) 残基 523 および 524；および (k) 残基 463、523、および 524。

【0454】

267. HSAドメイン III 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、以下からなる群から選択される、実施形態 250～262 または 264～266 のいずれかの核酸構築物：V381N、V381Q、E383A、E383G、E383I、E383L、E383V、N391A、N391G、N391I、N391L、N391V、Y401D、Y401E、K402A、K402G、K402I、K402L、K402V、L407F、L407H、L407M、L407N、L407Q、L407R、L407W、L407Y、Y411Q、Y411N、K413C、K413S、K413T、K414S、K414T、V415C、V415L、V415S、V415T、Q416H、Q416P、V424A、V424D、V424G、V424I、V424L、V424M、V424

10

20

30

40

50

N、V 4 2 4 Q、V 4 2 4 W、V 4 2 6 D、V 4 2 6 E、V 4 2 6 F、V 4 2 6 H、V 4 2 6 L、V 4 2 6 N、V 4 2 6 P、V 4 2 6 Q、G 4 3 4 C、G 4 3 4 S、G 4 3 4 T、E 4 4 2 K、E 4 4 2 R、R 4 4 5 F、R 4 4 5 W、R 4 4 5 Y、P 4 4 7 S、P 4 4 7 T、E 4 5 0 D、E 4 5 0 E、S 4 5 4 C、S 4 5 4 M、S 4 5 4 T、V 4 5 5 N、V 4 5 5 Q、V 4 5 6 N、V 4 5 6 Q、L 4 5 7 F、L 4 5 7 W、L 4 5 7 Y、Q 4 5 9 K、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 G、L 4 6 3 H、L 4 6 3 I、L 4 6 3 N、L 4 6 3 S、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 F、T 5 0 6 M、T 5 0 6 N、T 5 0 6 R、T 5 0 6 W、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 K、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 C、F 5 0 9 D、F 5 0 9 G、F 5 0 9 I、F 5 0 9 L、F 5 0 9 M、F 5 0 9 P、F 5 0 9 V、F 5 0 9 W、F 5 0 9 Y、A 5 1 1 D、A 5 1 1 F、A 5 1 1 I、A 5 1 1 R、A 5 1 1 T、A 5 1 1 V、A 5 1 1 W、A 5 1 1 Y、D 5 1 2 F、D 5 1 2 M、D 5 1 2 Q、D 5 1 2 W、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 C、T 5 1 5 D、T 5 1 5 E、T 5 1 5 E、T 5 1 5 G、T 5 1 5 H、T 5 1 5 L、T 5 1 5 N、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、T 5 1 5 W、T 5 1 5 Y、L 5 1 6 C、L 5 1 6 F、L 5 1 6 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、L 5 1 6 Y、S 5 1 7 C、S 5 1 7 F、S 5 1 7 M、S 5 1 7 T、S 5 1 7 W、S 5 1 7 Y、K 5 1 9 A、K 5 1 9 G、K 5 1 9 I、K 5 1 9 L、K 5 1 9 V、R 5 2 1 F、R 5 2 1 H、R 5 2 1 M、R 5 2 1 Q、R 5 2 1 T、R 5 2 1 W、R 5 2 1 Y、I 5 2 3 A、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 G、I 5 2 3 H、I 5 2 3 I、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 M、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 R、I 5 2 3 S、I 5 2 3 T、I 5 2 3 V、I 5 2 3 W、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 A、K 5 2 4 F、K 5 2 4 G、K 5 2 4 H、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 Q、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 A、K 5 2 5 G、K 5 2 5 I、K 5 2 5 L、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 A、Q 5 2 6 C、Q 5 2 6 F、Q 5 2 6 H、Q 5 2 6 L、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 P、Q 5 2 6 S、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 V、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 F、T 5 2 7 W、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 A、E 5 3 1 G、E 5 3 1 I、E 5 3 1 L、E 5 3 1 V、H 5 3 5 D、H 5 3 5 E、H 5 3 5 K、H 5 3 5 L、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、H 5 3 5 S、K 5 3 8 F、K 5 3 8 W、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、A 5 3 9 L、A 5 3 9 V、K 5 4 1 F、K 5 4 1 W、K 5 4 1 Y、K 5 5 7 A、K 5 5 7 G、K 5 5 7 I、K 5 5 7 L、K 5 5 7 N、K 5 5 7 S、K 5 5 7 V、A 5 6 1 F、A 5 6 1 W、A 5 6 1 Y、T 5 6 6 F、T 5 6 6 W、T 5 6 6 Y、A 5 6 9 H、および A 5 6 9 P。

【0 4 5 5】

2 6 8. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からなる群から選択される、実施形態 2 5 0 ~ 2 6 2 または 2 6 4 ~ 2 6 6 のいずれかの核酸構築物：V 3 8 1 N、E 3 8 3 G、N 3 9 1 V、Y 4 0 1 E、K 4 0 2 A、L 4 0 7 N、L 4 0 7 Y、Y 4 1 1 Q、K 4 1 4 S、K 4 1 3 S、V 4 1 5 T、V 4 1 5 C、Q 4 1 6 P、V 4 2 4 I、V 4 2 4 Q、V 4 2 6 E、V 4 2 6 H、G 4 3 4 C、E 4 4 2 K、R 4 4 5 W、P 4 4 7 S、E 4 5 0 D、S 4 5 4 C、V 4 5 5 N、V 4 5 6 N、L 4 5 7 F、Q 4 5 9 R、L 4 6 3 C、L 4 6 3 F、L 4 6 3 H、L 4 6 3 M、L 4 6 3 N、L 4 6 3 Q、E 4 9 5 D、T 5 0 6 Y、T 5 0 8 C、T 5 0 8 E、T 5 0 8 I、T 5 0 8 R、T 5 0 8 S、F 5 0 9 I、F 5 0 9 M、F 5 0 9 W、A 5 1 1 F、D 5 1 2 Y、T 5 1 5 P、T 5 1 5 Q、T 5 1 5 S、L 5 1 6 T、L 5 1 6 W、S 5 1 7 C、S 5 1 7 W、K 5 1 9 I、R 5 2 1 W、I 5 2 3 C、I 5 2 3 D、I 5 2 3 E、I 5 2 3 F、I 5 2 3 Q、I 5 2 3 H、I 5 2 3 K、I 5 2 3 L、I 5 2 3 N、I 5 2 3 P、I 5 2 3 G、I 5 2 3 R、I 5 2 3 Y、K 5 2 4 F、K 5 2 4 I、K 5 2 4 L、K 5 2 4 M、K 5 2 4 T、K 5 2 4 V、K 5 2 5 V、Q 5 2 6 T、Q 5 2 6 M、Q 5 2 6 Y、T 5 2 7 Y、E 5 3 1 I、H 5 3 5 N、H 5 3 5 P、K 5 3 8 Y、A 5 3 9 I、K 5 4 1 F、K 5 5 7 G、A 5 6 1 F、T 5 6 6 W、および A 5 6 9 P。

【0 4 5 6】

2 6 9. H S A ドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも1つが、以下からな

る群から選択される、実施形態 268 の核酸構築物：L407N、L407Y、V415T、V424I、V424Q、V426E、V426H、P447S、V455N、V456N、L463N、E495D、T506Y、T508R、F509M、F509W、A511F、D512Y、T515Q、L516T、L516W、S517W、R521W、I523D、I523E、I523G、I523K、I523R、K524L、Q526M、T527Y、H535P、および K557G。

【0457】

270. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 250～262、または 264269 のいずれかの核酸構築物：(a) E383G/K413S；(b) Y401E/I523G；(c) L407N/P447S；(d) L407N/P447S/A539I；(e) L407N/F509M；(f) L407Y/Q526T；(g) Y411Q/H535N；(h) K414S/V456N；(i) V415T/A569P；(j) V426H/Q526Y；(k) E442K/E450D/Q459R；(l) L463N/T508R；(m) T508R/K519I/K525V；(n) F509I/T527Y；(o) I523Q/K538Y；(p) Q526M/K557G；(q) K541F/A561F；(r) L463N/K524L；(s) T508R/I523G；(t) T508R/K524L；(u) L463N/T508R/I523G；(v) L463N/T508R/K524L；(w) T508R/I523G/K524L；(x) L463N/T508R/I523G/K524L；(y) L463N/I523G；(z) I523G/K524L；および (aa) L463N/I523G/K524L。

【0458】

271. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 270 の核酸構築物：(a) L407N/P447S；(b) L407N/P447S/A539I；(c) L407N/F509M；(d) Y411Q/H535N；(e) K414S/V456N；(f) V426H/Q526Y；(g) L463N/T508R；(h) F509I/T527Y；(i) I523Q/K538Y；(j) Q526M/K557G；(k) K541F/A561F；(l) L463N/K524L；(m) T508R/I523G；(n) T508R/K524L；(o) L463N/T508R/I523G；(p) L463N/T508R/K524L；(q) T508R/I523G/K524L；(r) L463N/T508R/I523G/K524L；(s) L463N/I523G；(t) I523G/K524L および (u) L463N/I523G/K524L。

【0459】

272. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 270 の核酸構築物：(a) L463N/T508R；(b) L463N/K524L；(c) T508R/I523G；(d) T508R/K524L；(e) L463N/T508R/I523G；(f) L463N/T508R/K524L；(g) T508R/I523G/K524L；および (h) L463N/T508R/I523G/K524L。

【0460】

273. キメラポリペプチドが、以下からなる群から選択される、HSAドメイン I I I 中のアミノ酸置換を含んでなる、実施形態 270 の核酸構築物：(a) L463N/K508R；(b) T508R/I523G；(c) T508R/K524L；および (d) L463N/T508R/I523G。

【0461】

274. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、表面接近可能な残基の置換である、実施形態 250～262 のいずれかの核酸構築物。

【0462】

275. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能な残基で

10

20

30

40

50

ある、実施形態 274 の核酸構築物。

【0463】

276. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である、実施形態 250 ~ 258 のいずれかの核酸構築物。

【0464】

277. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の全部が、表面接近可能であり、また複数の種を越えて保存されてもいる残基の置換である、実施形態 276 の核酸構築物。

【0465】

10

278. (i) 配列番号 1 と少なくとも 90 % 同一である、HSAドメイン I I I をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態 250 ~ 277 のいずれかの核酸構築物。

【0466】

279. (i) 配列番号 1 と少なくとも 95 % 同一である、HSAドメイン I I I をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態 278 の核酸構築物。

【0467】

280. (i) 配列番号 1 と少なくとも 98 % 同一である、HSAドメイン I I I をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態 279 の核酸構築物。

【0468】

20

281. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 2 中にある、実施形態 250 ~ 280 のいずれかの核酸構築物。

【0469】

282. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 3 中にある、実施形態 250 ~ 281 のいずれかの核酸構築物。

【0470】

283. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 6 中にある、実施形態 250 ~ 282 のいずれかの核酸構築物。

【0471】

284. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のヘリックス 7 中にある、実施形態 250 ~ 272 のいずれかの核酸構築物。

30

【0472】

285. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 7 中にある、実施形態 250 ~ 284 のいずれかの核酸構築物。

【0473】

286. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のヘリックス 8 中にある、実施形態 250 ~ 285 283 のいずれかの核酸構築物。

【0474】

287. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 8 中にある、実施形態 250 ~ 286 のいずれかの核酸構築物。

40

【0475】

288. HSAドメイン I I I 中の前記アミノ酸置換の少なくとも 1 つが、HSAドメイン I I I のループ 9 中にある、実施形態 250 ~ 287 のいずれかの核酸構築物。

【0476】

289. (i i) 異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、その異種タンパク質が抗体またはその抗原結合性断片を含んでなる、実施形態 250 ~ 288 のいずれかの核酸構築物。

【0477】

290. リンカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでなる、実施形態 250

50

～289のいずれかの核酸構築物。

【0478】

291. ヌクレオチド配列が、1つまたは複数のGly-Gly-Gly-Gly-Ser反復を含んでなるリンカーをコードする、実施形態290の核酸構築物。

【0479】

292. HSA部分がHSAドメインIの少なくとも一部；またはHSAドメインIIの少なくとも一部；またはHSAドメインIの少なくとも一部と、HSAドメインIIの少なくとも一部をさらに含んでなる、実施形態250～291のいずれかの核酸構築物。

【0480】

293. 複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーであって、前記複数のポリペプチドのそれぞれが、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれが独立して、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存された、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる、ライブラリー。

10

【0481】

294. 複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーであって、前記複数のポリペプチドのそれぞれが、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれが独立して、ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存され、ニワトリからの血清アルブミン中で保存されない、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる、ライブラリー。

20

【0482】

295. 複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーであって、前記複数のポリペプチドのそれぞれが、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれが独立して、表面接近可能な残基である、前記HSAドメインIII中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる、ライブラリー。

【0483】

296. 前記表面接近可能な残基が、HSAドメインIIIのループ2中にある、実施形態295のライブラリー。

30

【0484】

297. 前記表面接近可能な残基が、HSAドメインIIIのループ3中にある、実施形態295または296のライブラリー。

【0485】

298. 前記表面接近可能な残基が、HSAドメインIIIのループ6中にある、実施形態295～297のいずれかのライブラリー。

【0486】

299. 前記表面接近可能な残基が、HSAドメインIIIのループ7中にある、実施形態295～299のいずれかのライブラリー。

【0487】

300. 前記表面接近可能な残基が、HSAドメインIIIのループ8中にある、実施形態295～299のいずれかのライブラリー。

40

【0488】

301. 前記表面接近可能な残基が、HSAドメインIIIのループ9中にある、実施形態295～300のいずれかのライブラリー。

【0489】

302. 複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーであって、前記複数のポリペプチドのそれぞれが、HSAドメインIII、またはそのFcRn結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれが独立して、(i)表面接近可能であり、また(ii)ヒト、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒ

50

ツジ、ネコ、およびウマからの血清アルブミンタンパク質間で保存されてもいる、前記H S AドメインI I I中の残基の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んでなる、ライブラリー。

【0490】

303. 複数のポリペプチドを含んでなるライブラリーであって、前記複数のポリペプチドのそれぞれが、H S AドメインI I I、またはそのF c R n結合断片を含んでなり、前記複数のポリペプチドのそれぞれが独立して、前記H S AドメインI I I中の残基の少なくとも1つのアミノ酸の、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ウシ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマからなる群から選択される、ヒト以外の2種以上からの血清アルブミンタンパク質間で保存されたアミノ酸への置換を含んでなる、ライブラリー。

10

【0491】

304. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのループ2中にある、実施形態302または303のライブラリー。

【0492】

305. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのループ3中にある、実施形態302～304のいずれかのライブラリー。

【0493】

306. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのループ6中にある、実施形態302～305のいずれかのライブラリー。

20

【0494】

307. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのヘリックス7中にある、実施形態302～306のいずれかのライブラリー。

【0495】

308. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのループ7中にある、実施形態302～307のいずれかのライブラリー。

【0496】

309. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのヘリックス8中にある、実施形態302～308のいずれかのライブラリー。

【0497】

30

310. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのループ8中にある、実施形態302～309のいずれかのライブラリー。

【0498】

311. 前記少なくとも1つのアミノ酸置換が、H S AドメインI I Iのループ9中にある、実施形態302～310のいずれかのライブラリー。

【0499】

312. 実施形態293～311のいずれかのライブラリーであって、前記複数のポリペプチドのそれぞれが、H S AドメインIの少なくとも一部；またはH S AドメインI Iの少なくとも一部；またはH S AドメインIの少なくとも一部と、H S AドメインI Iの少なくとも一部をさらに含んでなる、ライブラリー。

40

【0500】

313. ライブラリーがディスプレイライブラリーである、実施形態293～312のいずれかのライブラリー。

【0501】

314. ディスプレイライブラリーのタイプが、酵母、ファージ、および哺乳類からなる群から選択される、実施形態313のライブラリー。

【0502】

315. (a) スクリーニングのために複数のポリペプチドを選択するステップと； (b) F c R n結合親和性増大または血清半減期増大があるポリペプチドをスクリーニングするステップと； (c) F c R n結合親和性増大または血清半減期増大があるポリペプチ

50

ドを配列決定するステップとを含んでなる、実施形態 293～314 のいずれかのライブラリーをスクリーニングする方法。

【実施例】

【0503】

8 例証

ここで本発明を一般的に記述し、それは、本発明の特定の態様および実施形態の単なる例証のみを目的とし、本発明の限定を意図しない、以下の実施例を参照してより容易に理解されるであろう。例えば本明細書で開示される特定の構築物および実験デザインは、適切な機能を検証するための例示的なツールと方法に相当する。したがって開示される特定の構築物および実験計画のいずれかを本開示の範囲内で置換し得ることは、容易に分かるであろう。さらに使用される特定の装置と試薬、サイズ、製造会社などの特定の一例または説明は、特にそうである旨の断りのない限り、本発明の限定と見なされないことが理解されるであろう。同様に機能するその他の装置および試薬で容易に置換してもよいことが、さらに理解されるであろう。

【0504】

8.1 実施例 1：ヒト血清アルブミン (HSA) のドメイン III に結合するヒト FcRn の動態および親和性解析

本実施例は、表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用して、ヒト FcRn に対する HSA のドメイン III の結合、解離、および平衡親和定数を測定する。ドメイン III (「DIII」とも略記される) は、アミノ酸残基 381～585 に及ぶ、ヒト血清アルブミンタンパク質断片である。ドメイン III のアミノ酸配列は、配列番号 1 で記載される。完全長成熟 HSA のアミノ酸配列は、配列番号 2 で記載される。これらの実験で使用するために、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (*Pichia Pat* or is) からドメイン III を発現させて精製した。

【0505】

8.1.1 組換えタンパク質発現および精製

ドメイン III 遺伝子をコードする組換えプラスミドは、Geneart AG, Regensburg, Germany から得られた。制限酵素 EcoRI および NotI を使用して、供給業者が提供するベクターからドメイン III 遺伝子を摘出し、pPICZ- α -A ピキア属 (*Pichia*) 発現ベクター (Invitrogen; カタログ番号 V195-20) にクローニングした。組換えドメイン III タンパク質は、製造会社の使用説明書に概説される様式で発現させた。組換えドメイン III タンパク質は培地中に分泌され、GE Healthcare (カタログ番号 17519701) からの HiTrap ブチルセファロース・ファストフロー・カラム上の疎水性相互作用クロマトグラフィーによって精製された。簡単に述べると、培養液の塩分および pH は、1.5 M 硫酸アンモニウムおよび 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 に、最初に調節した。培養液を濾過してブチルセファロースカラムに通過させ、低塩 pH 7.0 ナトリウムリン酸緩衝液を使用して、結合ドメイン III を溶出した。50℃ に保たれる循環水ジャケット付きヒドロキシアロコキシプロピル デキストラン (Hydroxyl oxypso py l Dextran) (Sigma-Aldrich; カタログ番号 H6258) カラムに、精製タンパク質の画分を通過させて脱脂した。クマシーブルー染色による 4～12% SDS PAGE による視覚化で、脱脂および非脱脂形態双方の純度は 99% であった (図 1A)。タンパク質濃度は、A280 で測定した。これまで公表された測定と密な相関性がある、近紫外線 CD および遠紫外線 CD の測定によって、精製ドメイン III の適切な折り畳みが確認された。(例えば Giancola et al. International Journal of Biological Macromolecules 20 (1997) 193-204 を参照されたい)。

【0506】

8.1.2 反応速度測定

BIAcore T100 装置 (Uppsala, Sweden) 上で、25℃ で平衡

、結合、および解離速度定数を測定し、B I A c o r e T 1 0 0 評価ソフトウェア v . 1 . 1 (B I A c o r e , I n c , U p p s a l a , S w e d e n) を使用してデータを分析した。標準アミン共役 (B I A c o r e H a n d b o o k , 2 0 0 2) によって、C M 4 (カタログ番号 B R - 1 0 0 5 - 3 9) または C M 5 チップ (カタログ番号 B R - 1 0 0 0 - 1 4) 上に、ドメイン I I I の非脱脂および脱脂の双方の形態をそれぞれ 1 0 1 6 および 1 1 8 4 R U の共役密度で、共有結合的に固定化した。フローセルの 1 つは、同一固定化プロトコルを使用して、タンパク質なしで模擬共役させて空試験とした。全ての注入は、p H 5 . 5 、 5 0 m M リン酸および 1 5 0 m M N a C l 緩衝液中で作成し、チップ表面を p H 7 . 4 のリン酸緩衝食塩水 (P B S) で、注入と注入の間に再生した。結合定数 (k_{on}) 、解離定数 (k_{off}) 、および平衡解離定数 (K_D) を単一実験で測定するために、固定化ドメイン I I I タンパク質上に、増大する濃度のヒト F c R n (3 9 n M ~ 4 0 μ M) を 5 0 μ L / 分で注入した (図 1 B 、左パネル) 。結合を平衡に至らせて、運動定数 k_{on} および k_{off} は、曲線の結合相 (4 分間) および解離相 (1 分間) の双方を 1 : 1 ラングミュアモデルに同時に適合させることで誘導した。 K_D は、非線形回帰分析を使用して、検体濃度と対比される平衡結合応答 (R e q) プロットを定常状態親和性モデルに適合させることで誘導した (図 1 B 、右パネル) 。ドメイン I I I の脱脂および非脱脂双方の形態は、同様の結合センサーグラム、および R e q 対リガンド濃度プロットを示した。

【 0 5 0 7 】

F c R n とドメイン I I I の相互作用は、急速な結合 ($k_{on} = 7 \times 10^3$) と、解離 ($k_{off} = 4 \times 10^{-2}$) 動態を示す (表 1) 。ドメイン I I I の F c R n の K_D は、 5 ~ 8 μ M であり、それは完全長 H S A の F c R n のほぼ 7 倍大きい (例えばより大きな解離定数) (表 1) 。この K_D の差は、H S A と比較して、ドメイン I I I のより急速な k_{off} が主因である一方で、双方の分子の k_{on} は同等である。 k_{on} および k_{off} から誘導された K_D は、実験的に得られた値と密接に一致し、それによって反応速度測定を裏付ける。さらに可変カルボキシ部分がある 2 つの異なる種類のセンサーチップ (C M 4 および C M 5) が、同様の親和性を与えた。運動定数および平衡定数は、ドメイン I I I の脱脂および非脱脂形態の間で同等であり、脂質分子がドメイン I I I の F c R n 結合を媒介または促進しないことが示唆される。

【 0 5 0 8 】

【表 1】

表 1. 表は、ヒト血清アルブミン(HSA)のドメイン III に対するヒト FcRn 結合の SPR 由来運動定数および平衡定数、および公表された完全長 HSA の運動定数(下方パネル)との比較を提供する

固定化 DIII	センサーチップ	動態解析			定常状態解析
		$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$k_D (\mu M)$	$k_D (\mu M)$
脱脂	CM4	7.7e3	6.5e-2	8.5	7.9
	CM5	7.2e3	5.1e-2	7.1	6.0
	CM5	7.4 e3	4.7e-2	6.3	5.5
非脱脂	CM4	7.3 e3	6.6e-2	9.1	8.4
	CM5	7.8 e3	6.5e-2	6.3	6.6
	CM5	7.9 e3	4.9e-2	5.7	6.2
固定化 HSA	CM5	9.3e3	4.5e-3	0.74	1.2

【 0 5 0 9 】

8 . 2 実施例 2 : 完全長 H S A またはドメイン I I I のみとの融合はヒト I g G の F c R n 親和性を高める

この実験は、H S Aのドメイン I I Iと治療用タンパク質または抗体、またはその変種との融合が、相互作用のp H依存性に影響を及ぼすことなく、酸性p Hにおける、治療用タンパク質／抗体のF c R nに対する親和性を改善することを実証した。これはp H 5.5におけるF c R nの親和性を増大させ、血清半減期増大につながるとと思われる（例えば生体内または適切なモデル系中の寿命改善）。例えば、ヒトF c R n遺伝子の単一コピーを発現する（が、マウスF c R nを欠く）遺伝子組換えマウス中において、治療用タンパク質に融合したドメイン I I Iを含んでなるH S A部分の薬物動態学的半減期測定を実施して、野生型または変種ドメイン I I Iを含んでなる部分との融合の半減期に対する影響を評価してもよい。

【0510】

10

8. 2. 1 構築物デザイン

代表的タンパク質としてヒトI g G 1を使用し、I g G単独と、H S Aまたはドメイン I I Iに融合したI g Gとの間で、F c R n親和性を比較した。H S Aまたはドメイン I I Iは、G l y－G l y－G l y－G l y－S e rの4つの反復単位を含んでなるリンカーを介して、ヒトI g G 1重鎖のC末端に融合させた（図2 A）。F c R n上のI g G結合部位とH S A結合部位の間の距離に基づいて、リンカーの長さをデザインし、双方のリガンドをそれぞれの結合部位に同時に結合させた。天然I g Gと比較して、10倍改善されたF c R n親和性を示す、以前記載されているI g Gの高親和性変種（I g G－Y T E、D a l l ’ A c q u a, e t a l., 2002, J I m m u n o l., 169: 5171－5180を参照されたい）のH S Aおよびドメイン I I I融合バージョンもまた、同様に生成した。したがって以下の構築物が生成されて、使用された：

20

I g G
I g G (Y T E)
I g G－(G 4 S)₄－H S A
I g G－(G 4 S)₄－ドメイン I I I
I g G (Y T E)－(G 4 S)₄－H S A
I g G (Y T E)－(G 4 S)₄－ドメイン I I I

【0511】

8. 2. 2 精製および特性解析

簡単に述べると、全ての6つの構築物を発現ベクターにクローンして、293 F細胞（G I B C Oカタログ番号R 7 9 0 0 7）中における一過性発現によってタンパク質を精製した。G E H e a l t h c a r eからのH i T r a p（商標）プロテインAアフィニティカラム（カタログ番号17－0403－03）を使用して、培養液中に分泌されたI g G 1および融合タンパク質を精製した。還元および非還元の双方の条件下で、S D S P A G Eによって精製タンパク質を分離し、クーマシー染色で視覚化して99%の純度を観察した（図2 B）。

30

【0512】

I g G－(G 4 S)₄－H S A融合タンパク質の推定分子量が284キロダルトン（K D a）であるのに対し、I g G－(G 4 S)₄－ドメイン I I Iの推定分子量は196 K D aである。観察された分子量は、これらの推定値と非常に良好な相関性があった。それらのより大きなサイズまたは物理化学的特性変化が原因で、これらの融合タンパク質が凝集体を形成するかどうかを評価するために、A g i l e n t T e c h n o l o g i e s 1200シリーズS E Cを使用して、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）によって融合タンパク質を分析した（図2 C）。I g G－(G 4 S)₄－H S AおよびI g G－(G 4 S)₄－ドメイン I I IのどちらもA 280対滞留時間（分）プロット上で、モノマーに相当する単一ピークを示し、融合タンパク質が、いかなる測定可能な程度にも凝集しないことが示唆される。I g G－Y T E変種の融合タンパク質のS E Cプロファイルは、I g G－(G 4 S)₄－H S AまたはI g G－(G 4 S)₄－H S Aキメラタンパク質と識別不能であった。

40

【0513】

50

8. 2. 3 平衡結合定数 (K_D) の測定

融合タンパク質のヒトFcRnの親和性 (K_D) をBIAcore T100装置 (Uppsala, Sweden) 上で測定した。簡単に述べると、ヒトIgG、IgG-(G4S)₄-ドメインIII、IgG-(G4S)₄-HSA、IgG-YTE、IgG-YTE-(G4S)₄-ドメインIII、およびIgG-YTE-(G4S)₄-HSAは、装置製造会社により概説されるようにして、標準アミノ共役化学を使用して、2つのSeries 5センサーチップ (GE Healthcare) 上の別個のフローセルに高密度で固定化した。最終表面IgG密度は、それぞれ5116、5258、6097、5256、5561、および5531RUであった。参照フローセルもまた、いかなるタンパク質もなしに同一固定化プロトコルを使用して、各センサーチップ上で調製した。タンパク質共役セルと参照セル双方の表面に、50mMのPO₄、150mMのNaCl緩衝液、pH5.5中の5.86nM~3000nMの範囲にわたるヒトFcRnの2倍連続希釈液を5μL/分の流速で注入した。50分間にわたり結合データを収集し、0.05%のTween20を含有するpH7.4リン酸緩衝食塩水の複数回の60秒間の注入による再生がそれに続いた。BIAcore T100評価ソフトウェアv. 1.1 (BIAcore, Inc, Uppsala, Sweden) を使用して、各注入の平衡結合応答 (Req) を濃度に対してプロットし、定常状態親和性モデル (図3) に適合させて、平衡結合定数 K_D を得た。挿入図は、固定化リガンドに対する、一連の濃度のFcRnの結合を表す。IgG-YTE変種と、対応する融合タンパク質の K_D もまた、同一様式で誘導された (データ示さず)。

10

20

【0514】

IgG-(G4S)₄-HSAの K_D は183nMであり、IgG-(G4S)₄-ドメインIIIの K_D は305nMであり、IgG単独の1.51μMと比較して、HSAまたはドメインIIIをIgGに融合させることで、FcRn親和性がそれぞれ10倍および5倍改善することが実証される (表2)。同様であるがあまりはっきりしない傾向は、YTE変種でもまた観察され、IgG-YTEと比較して、IgG-YTE-(G4S)₄-HSAは3.8倍 (42.5nM)、IgG-YTE-(G4S)₄-ドメインIIIは2.5倍 (65.1nM) の親和性改善を示す (表2)。

【0515】

【表2】

30

表2. 表は、pH5.5における、HSAと融合したIgG、またはドメインIIIと融合したIgG、ならびにそれらのYTE変種類似体と融合したIgGに対する、ヒトFcRn結合のSPR由来平衡定数を提供する

コンストラクト	K_D (nM)
IgG	1510
IgG-(G4S) ₄ -HSA	183
IgG-(G4S) ₄ -DIII	305
IgG-YTE	161
IgG-YTE-(G4S) ₄ -HSA	42.5
IgG-YTE-(G4S) ₄ -DIII	65.1

40

【0516】

しかしpH5.5における親和性の改善は、中性pHにおけるFcRn結合に影響を及ぼさない。これは同一固定化表面に、pH7.2で1μMのFcRnを注入することで試験された。IgG/IgG-YTE対照と比較して、融合タンパク質共役表面のいずれかとFcRnの結合中に、測定可能な差は検出されなかった (データ示さず)。

50

【0517】

酸性pH（約5.5～6.0）におけるHSA融合物のFcRnへの結合、および中性pH（約7.4）における遊離は、このような特性が生体内結合を模倣することから、生体内有効性と相関する。したがって好ましいHSA変種は、（i）天然HSA、または天然HSAを含む抱合体と比較して、親和性が改善された変種、および（ii）酸性pHで親和性改善が観察される変種である。さらに中性pHにおけるFcRnへの結合親和性増大がある変種は、有効性を損なって、酸性pHにおける親和性増大の有益な効果を低下させることもある。

【0518】

8.3 実施例3：完全長HSAとの融合はヒトIgGの血清持続を高める

10

この実験は、HSAと抗体の融合が、抗体の血清半減期を増大させることを実証した。図7に示されるように、実施例1に記載されるIgG-HSA融合体の血清持続は、IgG単独と比較して増大した。血清半減期増大は、IgG-YTE変種で見られたのと同等であった。しかしこの研究では、IgG-YTE変種へのHSAの付加は、YTE単独を上回る著しい増強をもたらさないようであった。

【0519】

マウス新生児Fc受容体（mFcRn）が、単一コピーのヒトFcRn（huFcRn）で置換されている、4～5ヶ月齢のヒトFcRn C57BL/6 遺伝子組換えマウス（JAX laboratories）を使用して、PK試験を実施した。マウスに、リン酸緩衝食塩水、pH7.2中で希釈された適切なタンパク質の15mg/kg用量を尾静脈を介して注射する。注射の1時間後に、全ての動物を眼窩後方神経叢から出血させて、（75μl）血清を採取し、循環に注入された実際の量を判定する。次に注射の24、72、168、および240時間後に、血清サンプルを採取して-80℃で保存する。血清中に残留する、示されるタンパク質の量をELISAによって分析する。簡単に述べると、抗HSA被覆プレートを使用して、様々なIgG融合構築物を捕捉し、抗κ検出抗体を使用して検出する。IgGおよびYTE構築物では、抗原被覆プレートを使用してIgGを捕捉し、抗重鎖検出抗体を使用して検出する。時間と対比して、注入量（1時間サンプル）の画分として、血清中に残留するタンパク質%をプロットする。

20

【0520】

8.4 実施例4：FcRnに対するHSA上のエピトープは立体構造である

30

ヒトFcRnは、抗β-2ミクログロブリン抗体を用いた免疫プロット法によって視覚化されるように、濃度依存様式で、天然HSAウェルに結合することが観察された。しかし同様の実験条件下で試験された変性HSAを使用して、同様の結果は観察されなかった。

【0521】

Sigma-Aldrichからのヒト血清アルブミン（HSA；カタログ番号A-8763）とヒトIgG（hIgG；カタログ番号I-4506）、およびトリス緩衝液をCNBr-活性化セファロース4B（GE Healthcare）上に、10mgタンパク質/mlのセファロースで固定化した。CNBr活性化セファロース4Bの反応基を0.1MのTrizma塩基、0.5MのNaCl、pH8でブロックして、セファロース-トリスを調製した。HSA、hIgGまたはトリスに連結したセファロースビーズ（20μlのビーズは約180μgの連結タンパク質に相当する）は、還元（1%2-メルカプトエタノール）または非還元条件下で、SDS含有サンプル緩衝液（60mMのトリス、pH6.8、2.3%SDS、10%グリセロール、0.01%ブロモフェノールブルー）存在下において、10分間煮沸され、または未処理のままにされた。このように処理されたタンパク質またはトリス共役ビーズを0.1%アイシングラス（BIOFX Laboratories Inc；カタログ番号PFGP-1000-01）を含有する、50mMのリン酸ナトリウム、150mMのNaCl緩衝液、pH5.5で洗浄し、次に200μlのpH5.5緩衝液中の様々な濃度のヒトFcRn（0～20μg）と共に、室温で2時間インキュベートした。pH5.5の緩衝液を使用して、非結合タンパク質を

40

50

洗い流した。1% 2-メルカプトエタノールを含有する、SDS含有サンプル緩衝液と共に沸騰して、結合タンパク質を溶出し、SDSポリアクリルアミドゲル上で分析して、抗 β 2ミクログロブリン抗体（Abcam；カタログ番号Ab6608）による免疫ブロット法がそれに続いた。

【0522】

FcRn濃度範囲全体において、セファロース-HSAへのヒトFcRnの結合は、天然HSAに対して最大であった。しかし還元および非還元条件の双方の下でHSAを変性させると、結合は大幅に減少し、FcRnに対するHSA上のエピトープが、立体構造エピトープである見込みが高いことが示唆された。（図4）。予期されたように、セファロース-IgGがヒトFcRnに結合した一方で、トリスブロックされたビーズはいかなる条件下でもFcRnに結合しなかった。

10

【0523】

8. 5 実施例5：HSAおよびドメインIIIは、酵母細胞表面に提示され得て、提示タンパク質はFcRn結合能力を保持する

本実施例は、HSAおよびドメインIIIが成功裏に、酵母細胞表面に発現され得て、また酸性pHで実施された修正フローサイトメトリーで評価されるように、これらの提示タンパク質がpH依存様式でFcRnに結合もし得ることを実証する。したがって酵母細胞上の発現は、ドメインIIIにバリエーションを含有する構築物（例えばドメインIIIのみ、完全長HSA、トランケート型HSA、または少なくともドメインIIIを含んでなるキメラポリペプチド）をスクリーニングして、このような構築物が、例えば（i）FcRnに結合する能力、および（ii）非変種構築物と比較して増大した親和性でFcRnに結合する能力を評価する1つの方法を提供する。

20

【0524】

8. 5. 1 酵母細胞表面ディスプレイ

HSA、ドメインIIIまたは一本鎖Fv断片（scfv）をpYD1酵母ディスプレイベクター（Invitrogen；カタログ番号V835-01）にクローンして、酵母細胞表面における提示のために、S. セレヴィシエ（S. cerevisiae）に形質転換した。pYD1は、ガラクトース誘導性プロモーターの制御下にある、S. セレヴィシエ（S. cerevisiae）タンパク質Aga2pとのC末端融合として、対象タンパク質を提示する。全ての実験的手順は、供給業者のマニュアルに記載されるようにして実施した。形質転換細胞は、栄養要求性選択マーカーであるウラシルおよびトリプトファンを使用して選択し、適切な選択培地中で培養した（Teknova Inc.；カタログ番号C8140）。培養物をガラクトースで最高48時間誘導し、Aga2p融合タンパク質を発現させた。細胞を0、24、および48時間目に試料採取した。0.1%アイシングラスを含有するpH7.2のPBSで、細胞サンプルを洗浄してブロックし、FITC結合ウサギポリクローナル抗HSA抗体（Abcam Inc.；カタログ番号AB34669）で染色して、フローサイトメトリーにより分析した。

30

【0525】

0時間目には、HSAまたはドメインIIIの細胞表面発現は、観察されなかった一方、24時間目には酵母細胞上で双方のタンパク質の発現が観察された。このような発現は、誘導後48時間維持された。発現は、陽性FITC染色によって視覚化した。図5Aは、HSAおよびドメインIIIの双方が、酵母細胞表面で成功裏に発現され得ることを示す。予期されたように、scfv形質転換細胞は抗HSAで染色されなかった（例えば陰性であった）。したがってscfv形質転換細胞は、陰性対照の役割を果たした。

40

【0526】

8. 5. 2 表面発現されたHSAまたはドメインIIIのFcRn結合能力

HSA、ドメインIIIまたはscfvを発現し、ガラクトースで48時間誘導された酵母細胞を、0.1%アイシングラスを含有するpH5.5、50mMのリン酸ナトリウム、150mMのNaCl緩衝液（FACS緩衝液とも称される）で、1時間ブロックした。次にpH5.5リン酸緩衝液中のビオチン化FcRn（70 μ M）と共に細胞をイン

50

キュベートし、ストレプトアビジンフィコエリトリン (PE) (Invitrogen Inc.) を使用して、結合FcRnを視覚化した。このように染色された細胞を、慣例的に使用されるPBSの代わりに、pH 5.5、50 mMのリン酸ナトリウム、150 mMのNaCl緩衝液を用いて、フローサイトメトリーによって分析した。

【0527】

scfvと比較したヒストグラム中の移行から分かるように、HSAおよびドメインII発現細胞が、どちらもPEについて陽性に染色されたのに対し、陰性対照scfv発現細胞は染色されず、(図5B)、酵母細胞表面で発現されるHSAおよびドメインIIがFcRn結合能力を保持し、したがって機能性であることが実証された。別途の実験では、FcRn結合の低pHフローサイトメトリーと同様に細胞を処理し、ハイスループット試料採取技術HyperCyt (登録商標) システム (IntelliCyt Corporation) を使用してアッセイし、同様の結果を得た。

【0528】

8.6 実施例6 高度多様性ライブラリーを作成するための、OriPを含んでなるアデノウイルス哺乳類細胞表面ディスプレイベクター

遺伝子操作されてpENDisplayと称されるscFv-Fc発現カセット (図8Aを参照されたい) を含有するGateway (登録商標) エントリーベクター中で、scFv-Fcタンパク質の表面ディスプレイのために、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを使用する哺乳類表面ディスプレイライブラリーを構築した。異なるscFv配列のライブラリーが、Sfi/NotI部位に容易に挿入される。pENDisplayベクター中のライブラリーは、製造会社に従って、pAd/PL-DEST (商標) ベクター (Invitrogen; カタログ番号V494-20) ベクターと組み合わせられて、アデノウイルス発現ライブラリーが作成され、合計約 5×10^6 個のコロニー形成単位 (cfu) が得られた。アデノウイルスを生成するために、トランスに組換えアデノウイルスを生成するのに必要なE1タンパク質 (E1aおよびE1b) を提供する、安定して組み込まれたE1遺伝子のコピーを含有する293A細胞 (Invitrogen; カタログ番号R70507) に、直線化されて左右逆方向末端反復 (ITR) が露出されるアデノウイルス発現ライブラリーを形質移入した。FACS分析によって、直線化アデノウイルスライブラリーで直接形質移入された293A細胞の少なくとも50%が、それらの表面に抗体を提示することが分かった。しかしアデノウイルス生成のために、直線化アデノウイルスライブラリーを293A細胞に形質移入すると、110mm (径) のシャーレあたり50個を下回るプラークが得られた。アデノウイルスを10日目に収穫してウイルスDNAを単離し、PCRを使用してscFvコード領域を増幅し、それをpENDisplayベクターに再度クローンして戻し、96個のコロニーを拾って配列決定した。14個のみの特有のVH配列が、96個のクローン分析から同定された。プラーク回収の低効率、直線化アデノウイルスベクターの分解に起因することもあり、アデノウイルスライブラリー複雑度の著しい低下をもたらす。

【0529】

エプスタイン・バー核抗原1 (EBNA-1) は核局在化シグナル (NLS) を含有して、プラスミドなどのOriP含有核酸に結合する。EBNA-1タンパク質 (図9Aを参照されたい) は、NLSを介して、OriP含有核酸が核に移行するのを助け、エピソームの維持を増強してもよい。エピソーム維持は、アデノウイルスレスキューに必須とは考えられないが、OriP配列 (図9Cを参照されたい) は、pENDisplayベクターのattL1およびattL2配列間のscFv-FcカセットのポリA配列の後ろに導入される。pENDisplay-OriPと称される新しいベクターは、図8Bに描写される。pENDisplay-OriP中のライブラリーは、pAd/PL-DEST (商標) ベクター (Invitrogen; カタログ番号V494-20) ベクターと組み合わせられて、これもまた約 5×10^6 cfuを有する、第2のアデノウイルス発現ライブラリーが作成された。pENDisplay-OriPベクターから生成されたライブラリーを直線化して、エプスタイン・バーウイルス核抗原 (EBNA-1) とアデノ

ウイルス E1a タンパク質を安定して発現する 293E 細胞 (Invitrogen; カタログ番号 R620-07) に形質移入し、110mm (径) シャーレあたり 10,000 個を優に超えるプラークがもたらされた。ウイルスを 7 日目に収穫して、96 個のクローンを上述したように分析した。OriP 部位なしの第 1 のライブラリーから単離された特有のクローンの低い数とは対照的に、全ての 96 VH 配列分析は特有であった。総合してこれらの結果は、アデノウイルス発現ライブラリーベクターへの OriP 配列の付加が、EBNA-1 発現細胞からのアデノウイルスレスキューと、アデノウイルスライブラリーの多様性の双方を大幅に改善することを実証する。

【0530】

アデノウイルスベクターへの OriP 配列 (例えば図 9C) の付加は、EBNA-1 タンパク質存在下における、宿主細胞からの組換えアデノウイルス粒子の生成効率を高める。アデノウイルス発現ライブラリーを構築する際に、ウイルス生成の改善された効率は、クローン損失数を低下させることにより、ライブラリーの多様性／複雑度を維持する。下の実施例 7 は、本質的に上述したように、OriP 配列をアデノウイルス発現ベクターに組み込む、HSA ドメイン III 変種を発現する、哺乳類表面ディスプレイライブラリーの構築とスクリーニングについて詳述する。

【0531】

図 10 は、対象タンパク質の発現のための、代表的な一般的アデノウイルス発現ベクターの概略図を提供する。本実施例では、E1 および／または E3 部分が欠失した、変異アデノウイルスゲノムが提供される。欠損ウイルス遺伝子は、ウイルスレスキューに使用される宿主細胞によってトランスに提供される。欠失は、対象タンパク質発現に使用される宿主細胞中において、アデノウイルスの複製を妨げる。対象 DNA は、コード配列、プロモーター配列、終結シグナル、ポリ A 配列などをはじめとするが、これに限定されるものではない、タンパク質の発現に必要な全ての構成要素を含む。対象タンパク質は可溶性であってもよく、あるいは膜貫通ドメインまたは GPI アンカーシグナルなどのタンパク質を細胞表面に固着させる配列を含んでもよい。本明細書で例示されるように、アデノウイルスベクターは、変種タンパク質のライブラリーを発現するようにデザインされてもよい。図 10 に描写されるアデノウイルス発現ベクターは、構築のための Gateway (商標) エントリーおよびデスティネーションプラスミドを使用して得られる、att 組換え部の位置を提供する。EBNA-1 DNA 配列が位置し得る、1 つの可能な位置もまた描写される。ベクター構成要素のその他の位置および方向が検討される。ベクター領域の方向および／または相対的位置は、変動してもよいことが、当業者によって理解される。

【0532】

8. 7 実施例 7 HSA およびドメイン III のためのその他のディスプレイプラットフォームの使用

ファージディスプレイおよび哺乳類細胞表面提示技術もまた、HSA およびドメイン III の可能なディスプレイプラットフォームとして評価された。ファージディスプレイプラットフォームは、恐らくこれらの分子中の多数のジスルフィド結合のために、細菌細胞表面に HSA およびドメイン III のどちらも発現しなかった (データ示さず)。しかし 293-F 細胞中の一過性の表面発現を使用する、哺乳類細胞ディスプレイシステムは、崩壊促進因子からのグリコシルホスファチジルイノシトール (Glycosylphosphatidylinositol) (GPI) アンカーシグナルによって媒介され (例えば米国特許出願公開第 2007/0111260 号明細書に記載される変異 DAF)、HSA およびドメイン III を成功裏に提示した。提示されるタンパク質は、FcRn 結合能力を保持した (データ示さず)。

【0533】

pEN-HSA-GPI と称される追加的な哺乳類発現構築物が生成され、その中ではエピトプタグ (例えば Flag タグ) が二重染色のために付加され、リンカーが HSA の 5' および 3' の双方に付加されて、融合タンパク質の可撓性を増大させて HSA の FcRn への結合を促進し (図 11A)、この構築物は一過性形質移入のために直接使用さ

れ、または pAd-HSA-GPI と称される OriP 配列もまた組み込むアデノウイルス発現ベクターの生成のために使用される。機能性 HSA は、双方の一過性形質移入アッセイで（データ示さず）、アデノウイルス発現系を使用して、哺乳類細胞（例えば 293 F 細胞）表面で、この構築物から発現された。図 11 は、抗 HSA（図 11 B）、または $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $5 \mu\text{l}/\text{ml}$ の FcRn（それぞれ図 11 C および 11 D）で染色された細胞のヒストグラムにおける、結果として生じた移行を示す。したがって HSA およびドメイン III 変種を発現して、このような変種を（i）FcRn への結合、および（ii）例えば非変種構築物と比較して、増大した親和性で FcRn に結合する能力について、スクリーニングする、いくつかの可能なシステムが存在する。

【0534】

細胞表面に HSA を提示するための 293 F 細胞の形質移入：1. $5 \mu\text{g}$ のプラスミド および 2. $25 \mu\text{l}$ の 293 フェクチンを別個の試験管内の $100 \mu\text{l}$ の OptiMem 培地（Invitrogen）に添加して、室温で 5 分間インキュベートし、次に 2 つの構成要素を共に合わせた。室温でさらに 20 分間インキュベーションした後、混合物を 24 穴ディープウェルプレート内において、 1×10^6 細胞/ ml の密度で、 2ml の 293 F 細胞に添加した。8% CO_2 の存在下、 250rpm で形質移入細胞を 24 時間培養した。

【0535】

アデノウイルス発現ベクターの生成と使用：Gateway（登録商標）技術（Invitrogen）を使用して、エントリーベクター（pEN-HSA-GPI）中の HSA を Invitrogen デスティネーションベクターに組換えて、アデノウイルス発現ベクターを生成した。簡単に述べると、 150ng の pEN-HSA-GPI ベクター、 300ng の pAd/PL-DEST（Invitrogen）、 $2 \mu\text{l}$ の LR Clonase II（Invitrogen）、および TE 緩衝液を合計 $10 \mu\text{l}$ の反応混合物に添加した。 25°C で一晩の培養後、 $2 \mu\text{l}$ の反応混合物を使用し、製造会社のプロトコルに従って、One-shot Top 10 コンピテント細胞（Invitrogen）を形質転換した。形質転換 TOP10 細胞をアンピシリンプレート上に播種して、 37°C で一晩培養した。単一コロニーを拾って LB 培地に入れ、プラスミドを調製した。アデノウイルス発現ベクターを含有する HSA 遺伝子を PacI で直線化してから、形質移入してアデノウイルスを生成した。 $2 \mu\text{g}$ の直線化アデノウイルスベクターおよび $6 \mu\text{l}$ の lipofectamine-2000 を使用して、293E 細胞を形質移入してアデノウイルスを生成した。形質移入後 7 日目に、2～3 回、交互に凍結（ -80°C ）および解凍（ 37°C ）することにより、アデノウイルスを形質移入細胞から放出した。 3000rpm で 10 分間の遠心分離によって細胞残骸を除去し、アデノウイルス含有上清を新しい試験管内に等分して、 -80°C で保存した。製造会社の使用説明書に従って、Adeno-X™ rapid titer kit（Clontech：PT3651-2）を使用してウイルス力価を判定した。HSA 構築物発現のために、アデノウイルスを MOI = 1 で使用した。

【0536】

8. 8 実施例 8：FcRn 結合エピトープを同定するための DIII 上の表面露出ループのアラニンスキャニング変異誘発

本実施例は、HSA への FcRn 結合仲介における、ドメイン III 上の表面露出ループの役割を描写する。

【0537】

ドメイン III は 205 個のアミノ酸残基から構成され、9 つのループを介して連結し、6 個のジスルフィド結合を通じて安定化される 10 個のヘリックスをコードする（Sugio et al. 1999, Protein Eng. 12: 439-46、および PDB: 1BM0）。これらのループを構成するアミノ酸残基の位置、ならびに各ループの長さを下に列挙する。アミノ酸の番号付けは、完全長成熟 HSA タンパク質（配列番号 2）中のループの位置に対する。

10

20

30

40

50

ループ 1：残基 398～400＝3 個のアミノ酸
 ループ 2：残基 415～419＝5 個のアミノ酸
 ループ 3：残基 439～443＝5 個のアミノ酸
 ループ 4：残基 468～470＝3 個のアミノ酸
 ループ 5：残基 480～482＝3 個のアミノ酸
 ループ 6：残基 492～509＝18 個のアミノ酸
 ループ 7：残基 516～517＝2 個のアミノ酸
 ループ 8：残基 537～541＝5 個のアミノ酸
 ループ 9：残基 561～564＝4 個のアミノ酸

【0538】

10

ループ番号 2、3、6、8、および 9 は、溶媒接近可能であり、分子表面に露出する (Sugio et al. 同所、および PDB: 1BM0)。

【0539】

特定の実施例では、個々の表面接近可能なループ中の交互のアミノ酸をアラニンに変異させ (変異されないプロリンおよびシステインを除く)、1 つのセットでは奇数の残基を変異させ、別のセットでは偶数の残基を変異させる。実験デザインを適合させるために 1 つの構築物のみを要するループ 9 を除いて、このような変異セットをループあたり 2 つ生成する。細胞表面提示のために、合計 9 つのこのような構築物をベクター中で生成し (例えば pYD1 酵母ディスプレイベクター)、FcRn 結合能力について評価する。変種は、出願に記載される標準生体外アッセイ (例えばフローサイトメトリー) を使用して評価してもよい。FcRn に対する改善された親和性を提示する変種が、同定される。各変種はまた、スクリーニングされて、FcRn 親和性改善が酸性 pH のみで起きて、中性 pH で起きないかどうか判定されてもよい。酸性 pH では改善されるが、中性 pH では改善されない FcRn 親和性は、(i) 変種ドメイン III 構築物のみ；(ii) 完全長 HSA の文脈で提示される変異ドメイン III 構築物；または (iii) 少なくともドメイン III を含んでなるトランケート型 HSA またはキメラポリペプチドの文脈で試験されてもよい。前述の事項は、野生型ドメイン III、野生型完全長 HSA、または変異なしのキメラポリペプチドと比較される。

20

【0540】

特定の実施例では、前述のスクリーニング事項から得られる情報は、FcRn 結合能力を保持しながら (または改善さえしながら)、バリエーションを受け入れやすい、表面接近可能なループ中の残基を同定する。その中で、このような同定された位置が他の 20 個のアミノ酸のそれぞれに変異される、一連の変種が構築され、このような変種はまた、スクリーニングもされる。2 つ以上の位置に変異を含むさらなる変種が、引き続いて構築され、スクリーニングされる。

30

【0541】

特定の実施例では、変種のライブラリーが作成され評価される。

【0542】

8. 9 実施例 9：保存的表面露出残基のアラニンスキャニング変異誘発

アミノ酸配列アラインメントによって、13 の異なる動物種間において、ドメイン III 中で保存された表面接近可能なアミノ酸残基が同定された。このような保存された残基をアラニンに単独に変異させて、FcRn 結合中におけるそれらの役割を判定する。

40

【0543】

HSA のドメイン III アミノ酸配列は、ラット、マウス、ウシ、イヌ、ウサギ、ブタ、ニワトリ、ロバ、スナネズミ、ヒツジ、ネコ、およびウマをはじめとする 12 の異なる種からの血清アルブミンドメイン III 配列と比較され、全てのこれらの種間で保存された残基が同定された (図 6A～D)。ニワトリ HSA は哺乳類 HSA タンパク質と異なるので、哺乳類のみの第 2 のアラインメントが提供される (図 6E～H)。ブタ、ラット、マウス、イヌ、ヒツジ、ウサギ、およびウシからの血清アルブミンについては、ELISA、免疫ブロット法、および SPR によって、ヒト FcRn に結合することが既に示され

50

ている（データ示さず）。別途の分析において、ドメイン I I I 中の表面露出残基は、インターネット上の GETAREA 1.0 β ソフトウェア (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>) を使用して同定された。このソフトウェアは、個々の原子の接近可能表面積およびそれらの勾配を計算して、それぞれ接近不能および接近可能を示す「i」または「o」として表される、表面接近可能性について各アミノ酸残基をスコアする（表 3）。これらの異なる全種間で保存され、また表面が露出していることがソフトウェアによって計算されて H S A 結晶構造の手動検査によって確認されたアミノ酸が、同定された（表 3 の囲み）。

【0544】

このように同定された全ての 18 個のアミノ酸残基を単独にアラニンに変異させ、細胞表面ディスプレイ（例えば p Y D 1 酵母ディスプレイシステム）を使用して、F c R n 結合に対する影響について評価した。ドメイン I I I 単独、全長 H S A タンパク質、トランケート型 H S A、または少なくともドメイン I I I を含んでなるキメラポリペプチドの 1 つまたは複数の文脈で、ドメイン I I I 変異が導入されてスクリーニングされる。保存された表面露出システインおよびプロリンは、分析に含まれない。

【0545】

別の実施例では、全ての 18 個のアミノ酸残基（またはアラニン実験が特定位置が置換に耐えないことを示唆する場合は、全 18 個を下回る）をその他の 19 個のアミノ酸残基のそれぞれに単独に変異させ、p Y D 1 酵母ディスプレイシステム（または別のディスプレイシステム）を使用して、F c R n 結合に対する影響について評価する。

【0546】

別の実施例では、変異組み合わせを含む変種を構築して評価する。変種は、出願に記載される標準生体外アッセイ（例えばフローサイトメトリー）を使用して評価してもよい。F c R n に対する改善された親和性を提示する変種が、同定される。各変種はまた、スクリーニングされて、F c R n 親和性改善が酸性 p H のみで起きて、中性 p H で起きないどうか判定されてもよい。酸性 p H では改善されるが、中性 p H では改善されない F c R n 親和性は、(i) 変種ドメイン I I I 構築物のみ；(i i) 完全長 H S A の文脈で提示される変異ドメイン I I I 構築物；または (i i i) 少なくともドメイン I I I を含んでなるトランケート型 H S A またはキメラポリペプチドの文脈の 1 つまたは複数で試験されてもよい。前述の事項は、野生型ドメイン I I I、野生型完全長 H S A、または変異なしのキメラポリペプチドと比較される。

【0547】

表 3. 表は、ドメイン I I I 中の全アミノ酸の溶媒接近性パラメータを描写する。図 6 A ~ D で配列比較された全種間で保存された残基（配列番号 2 で提示される、成熟完全長 H S A 配列に関して番号付けされる）を太字で示して（##）で示し、表面接近可能であり、また配列比較された全種間で保存されてもいる残基を枠で囲んだ。<http://curie.utmb.edu/getarea.html>. さらに、ニワトリを除く、図 6 E ~ H で配列比較された全種間で保存された残基は（@@）で示した。残基は（i）および（o）として注釈され、それぞれ表面接近可能および表面接近不能を表示する。

【0548】

【表 3】

残基		合計	無極性	主鎖	側鎖	比率(%)	接近可能/接近不能
@@ LEU	380	56.42	56.02	0.75	55.67	38.1	
@@ VAL	381	19.57	19.57	0.00	19.57	16.0	i
GLU	382	99.24	31.30	0.67	98.57	69.8	o
GLU	383	69.94	52.61	5.53	64.41	45.6	
@@ PRO	384	0.05	0.05	0.00	0.05	0.1	i
GLN	385	82.77	29.73	6.62	76.15	53.0	o
ASN	386	78.25	23.65	1.24	77.01	67.4	o
@@ LEU	387	32.41	32.41	3.66	28.75	19.7	i
ILE	388	11.04	11.04	2.42	8.62	5.9	i
LYS	389	98.41	62.10	0.70	97.71	59.4	o
GLN	390	119.91	30.84	1.91	117.99	82.1	o
ASN	391	24.47	5.20	0.08	24.39	21.3	
## CYS	392	5.45	2.53	0.11	5.34	5.2	i
GLU	393	99.50	48.97	2.36	97.14	68.8	o
LEU	394	63.00	63.00	0.87	62.13	42.5	
PHE	395	31.26	30.80	0.46	30.80	17.1	i
@@ GLU	396	114.69	53.25	27.05	87.64	62.1	o
GLN	397	140.39	48.20	36.11	104.28	72.6	o
LEU	398	37.07	28.66	11.72	25.35	17.3	i
## GLY	399	38.33	37.17	38.33	0.00	44.0	
GLU	400	67.29	26.00	3.58	63.71	45.1	
@@ TYR	401	45.66	45.21	0.90	44.76	23.2	
LYS	402	110.95	67.17	1.41	109.53	66.6	o
## PHE	403	0.77	0.77	0.00	0.77	0.4	i
@@ GLN	404	2.71	0.00	0.00	2.71	1.9	i
@@ ASN	405	11.20	10.68	0.03	11.17	9.8	i
@@ ALA	406	27.44	24.63	11.95	15.49	23.9	
LEU	407	4.22	4.22	0.00	4.22	2.9	i
LEU	408	0.25	0.25	0.00	0.25	0.2	i
@@ VAL	409	21.68	21.68	0.09	21.59	17.7	i
ARG	410	71.52	60.94	5.56	65.95	33.7	
## TYR	411	7.20	1.62	0.00	7.20	3.7	i
## THR	412	0.05	0.05	0.00	0.05	0.1	i
LYS	413	25.26	23.68	3.75	21.51	13.1	i
## LYS	414	11.99	7.84	0.02	11.97	7.3	i
VAL	415	0.20	0.20	0.04	0.16	0.1	i
## PRO	416	3.69	2.47	1.22	2.47	2.3	i
GLN	417	52.78	30.06	14.94	37.84	26.3	
## VAL	418	3.63	3.62	1.19	2.44	2.0	i
@@ SER	419	54.77	51.36	9.44	45.33	58.6	o
## THR	420	9.84	7.74	0.88	8.96	8.4	i
@@ PRO	421	101.86	100.54	10.53	91.33	86.8	o
@@ THR	422	11.77	1.22	0.72	11.04	10.4	i
## LEU	423	1.05	1.05	0.00	1.05	0.7	i
@@ VAL	424	5.56	5.56	0.00	5.56	4.5	i
GLU	425	66.36	34.10	4.64	61.72	43.7	
VAL	426	0.54	0.54	0.00	0.54	0.4	i
SER	427	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
@@ ARG	428	28.01	6.40	0.00	28.01	14.3	i
ASN	429	27.74	1.54	0.00	27.74	24.3	
@@ LEU	430	7.30	7.09	0.21	7.09	4.9	i
@@ GLY	431	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LYS	432	80.30	40.11	0.01	80.29	48.8	
@@ VAL	433	11.51	11.51	0.00	11.51	9.4	i

10

20

30

40

## GLY	434	0.14	0.02	0.14	0.00	0.2	i
SER	435	57.78	16.10	14.45	43.33	56.0	o
LYS	436	85.65	58.15	10.32	75.33	45.8	
## CYS	437	0.35	0.35	0.00	0.35	0.3	i
## CYS	438	8.30	1.53	6.41	1.89	1.8	i
LYS	439	162.28	116.42	39.17	123.11	74.8	o
HIS	440	38.03	24.38	3.93	34.10	22.1	
@@ PRO	441	89.28	89.28	13.53	75.75	72.0	o
GLU	442	121.29	28.48	25.71	95.58	67.7	o
ALA	443	63.34	57.69	17.11	46.23	71.2	o
LYS	444	132.96	87.59	1.81	131.15	79.7	o
## ARG	445	25.14	7.16	0.00	25.14	12.9	i
MET	446	10.99	10.94	0.05	10.94	6.9	i
PRO	447	29.51	28.45	1.15	28.37	27.0	
## CYS	448	28.63	21.61	16.45	12.17	11.9	i
ALA	449	2.04	2.04	0.00	2.04	3.1	i
## GLU	450	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
ASP	451	36.51	31.08	1.41	35.10	31.1	
TYR	452	40.33	35.83	5.38	34.95	18.1	i
## LEU	453	14.95	14.95	0.00	14.95	10.2	i
SER	454	11.34	10.42	2.62	8.72	11.3	i
VAL	455	15.44	14.89	0.55	14.89	12.2	i
VAL	456	4.31	4.31	0.71	3.60	2.9	i
@@ LEU	457	0.66	0.66	0.00	0.66	0.4	i
@@ ASN	458	0.55	0.01	0.00	0.55	0.5	i
GLN	459	30.73	11.43	0.96	29.78	20.7	
LEU	460	0.81	0.81	0.00	0.81	0.6	i
## CYS	461	5.78	5.21	0.59	5.19	5.1	i
VAL	462	12.56	11.51	1.05	11.51	9.4	i
@@ LEU	463	11.00	11.00	0.00	10.99	7.5	i
@@ HIS	464	8.67	7.03	4.93	3.74	2.4	i
GLU	465	81.88	39.50	12.23	69.65	49.3	
@@ LYS	466	123.40	80.33	29.10	94.30	57.3	o
THR	467	66.67	56.99	5.55	61.12	57.6	o
PRO	468	92.50	70.96	21.54	70.96	67.5	o
@@ VAL	469	90.51	73.61	23.88	66.63	54.5	o
@@ SER	470	5.53	4.62	5.14	0.39	0.5	i
ASP	471	122.67	42.14	3.75	118.92	100.0	o
ARG	472	92.31	48.09	3.99	88.32	45.2	
VAL	473	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
@@ THR	474	57.41	55.78	2.30	55.11	51.9	o
@@ LYS	475	131.17	87.36	4.11	127.07	77.2	o
## CYS	476	0.27	0.00	0.00	0.27	0.3	i
## CYS	477	14.41	11.81	2.60	11.81	11.5	i
THR	478	89.89	62.73	11.19	78.69	74.1	o
GLU	479	98.03	36.44	36.37	61.66	43.7	
@@ SER	480	18.58	18.58	4.99	13.59	17.6	i
@@ LEU	481	19.63	15.94	3.69	15.94	10.9	i
VAL	482	11.85	10.99	0.87	10.99	9.0	i
ASN	483	39.73	8.35	0.00	39.73	34.8	
## ARG	484	11.05	4.76	0.00	11.05	5.7	i
## ARG	485	5.72	5.41	0.30	5.41	2.8	i
PRO	486	23.90	21.92	2.55	21.35	20.3	
## CYS	487	20.34	9.90	8.30	12.03	11.8	i
## PHE	488	0.15	0.15	0.00	0.15	0.1	i
@@ SER	489	28.76	10.00	17.50	11.26	14.5	i
ALA	490	84.33	64.50	32.36	51.97	80.1	o
@@ LEU	491	25.03	17.27	8.78	16.25	11.1	i
GLU	492	127.22	68.17	2.88	124.34	88.1	o
VAL	493	59.47	50.11	9.36	50.11	41.0	

## ASP	494	23.97	5.10	11.99	11.99	10.6	i
@@ GLU	495	151.35	58.71	32.51	118.84	84.2	o
THR	496	128.82	92.46	28.49	100.33	94.5	o
## TYR	497	39.86	23.56	15.79	24.07	12.5	i
VAL	498	127.91	120.24	7.78	120.14	98.2	o
PRO	499	48.26	38.96	9.29	38.96	37.0	
@@ LYS	500	148.50	107.74	5.26	143.24	87.1	o
GLU	501	137.88	67.19	7.44	130.44	92.4	o
PHE	502	145.85	127.83	18.01	127.83	71.0	o
ASN	503	79.74	11.97	2.89	76.85	67.2	o
ALA	504	67.05	47.09	20.71	46.34	71.4	o
GLU	505	112.60	25.86	4.28	108.31	76.7	o
THR	506	61.97	54.22	17.79	44.18	41.6	
## PHE	507	39.42	28.99	10.43	28.99	16.1	i
@@ THR	508	34.75	25.10	10.55	24.20	22.8	
## PHE	509	7.64	6.14	3.09	4.55	2.5	i
@@ HIS	510	92.59	80.12	2.75	89.84	58.1	o
ALA	511	33.98	30.78	3.23	30.75	47.4	
ASP	512	79.47	46.67	5.24	74.23	65.7	o
ILE	513	0.51	0.51	0.00	0.51	0.3	i
## CYS	514	42.31	19.66	23.41	18.90	18.5	i
@@ THR	515	123.18	80.99	37.55	85.63	80.6	o
@@ LEU	516	48.28	43.20	7.83	40.45	27.7	
SER	517	54.47	51.13	20.10	34.38	44.4	
GLU	518	100.49	23.48	2.18	98.32	69.6	o
LYS	519	138.34	93.44	0.25	138.09	83.9	o
GLU	520	74.95	33.52	2.44	72.51	51.3	o
ARG	521	42.31	11.10	0.00	42.31	21.6	
GLN	522	24.47	0.98	0.00	24.47	17.0	i
ILE	523	63.17	63.17	0.00	63.17	42.9	
@@ LYS	524	86.04	57.44	1.03	85.01	51.7	o
@@ LYS	525	8.72	0.27	0.00	8.72	5.3	i
@@ GLN	526	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
THR	527	44.15	37.83	0.00	44.15	41.6	
@@ ALA	528	2.30	2.30	0.31	2.00	3.1	i
## LEU	529	1.24	1.24	0.00	1.24	0.8	i
VAL	530	0.18	0.18	0.17	0.02	0.0	i
@@ GLU	531	33.31	0.91	0.00	33.31	23.6	
LEU	532	40.59	40.59	0.00	40.59	27.8	
VAL	533	0.62	0.62	0.02	0.60	0.5	i
## LYS	534	22.23	12.56	0.05	22.18	13.5	i
@@ HIS	535	16.21	12.70	3.51	12.70	8.2	i
LYS	536	125.97	80.88	1.15	124.82	75.9	o
## PRO	537	27.87	20.96	6.91	20.96	19.9	i
LYS	538	175.55	132.98	24.90	150.65	91.6	o
@@ ALA	539	56.44	54.45	12.79	43.65	67.3	o
## THR	540	13.80	0.29	13.29	0.51	0.5	i
LYS	541	151.76	134.73	10.81	140.96	85.7	o
GLU	542	143.28	57.29	0.82	142.46	100.0	o
GLN	543	94.49	50.37	5.53	88.96	61.9	o
@@ LEU	544	7.38	7.00	0.39	6.99	4.8	i
LYS	545	122.91	82.05	5.96	116.95	71.1	o
ALA	546	52.65	52.51	2.40	50.25	77.4	o
@@ VAL	547	37.83	37.83	0.46	37.37	30.6	
MET	548	7.10	7.09	0.01	7.09	4.5	i
ASP	549	79.72	33.37	9.30	70.42	62.3	o
ASP	550	81.72	24.24	6.19	75.53	66.8	o
## PHE	551	16.40	16.40	0.00	16.40	9.1	i
ALA	552	26.97	15.46	11.51	15.46	23.8	
ALA	553	46.71	43.76	6.20	40.51	62.4	o

10

20

30

40

PHE	554	31.60	31.60	0.92	30.68	17.0	i
VAL	555	1.51	1.51	0.00	1.51	1.2	i
GLU	556	87.68	24.41	9.37	78.31	55.5	o
LYS	557	108.24	67.45	6.00	102.25	62.2	o
## CYS	558	0.47	0.00	0.47	0.00	0.0	i
## CYS	559	40.50	20.21	20.91	19.58	19.1	i
LYS	560	171.40	121.84	23.55	147.84	89.9	o
ALA	561	40.51	22.45	32.45	8.06	12.4	i
ASP	562	140.81	38.02	34.22	106.59	94.3	o
ASP	563	89.28	21.77	5.33	83.95	74.3	o
LYS	564	179.18	123.99	17.96	161.22	98.0	o
GLU	565	81.62	24.70	3.45	78.18	55.4	o
THR	566	65.21	52.57	9.24	55.97	52.7	o
## CYS	567	18.00	6.61	2.26	15.75	15.4	i
## PHE	568	7.30	5.31	1.99	5.31	2.9	i
ALA	569	69.77	60.43	19.45	50.32	77.5	o
GLU	570	122.28	62.01	33.64	88.64	62.8	o
GLU	571	91.89	17.51	27.02	64.87	45.9	
## GLY	572	80.42	41.46	80.42	0.00	92.2	o

10

【0552】

8. 10 実施例10：単一アミノ酸変異体ライブラリーを作成するためのドメイン I I I 上の各残基の全ての可能なアミノ酸への変異誘発

20

システインおよびプロリンを除く、ドメイン I I I 中の全てのアミノ酸を全ての20個のアミノ酸に変異させ（すなわち野生型アミノ酸および全ての19個の非野生型アミノ酸）、個々の変異体が単一変異を1つの位置にのみ有するように、変異体ライブラリーを作成する。205個のアミノ酸の全長が、ライブラリー構築によってカバーされ；したがって184個の残基は個々に変異して、3496種の全ライブラリー多様性がもたらされる。ドメイン I I I 単独、全長HSAタンパク質、トランケート型HSA、または少なくともドメイン I I I を含んでなるキメラタンパク質の1つまたは複数の文脈で、ドメイン I I I 変異が導入されてスクリーニングされる。標準変異誘発法を利用して、ドメイン I I I 変異体ライブラリーを作成し得る。任意選択的にまたは代案としては、Geneart

30

AG, Germanyなどの商業施設によって、ドメイン I I I 変異体のライブラリーが、作成される。組換えアデノウイルスの生成改善のためにOriP配列を含んでなる（OriPを含んでなる汎用エンターベクターの概略図については図10を参照されたい）、上述される、pYD1酵母ディスプレイベクターまたは哺乳類ディスプレイベクターpEN-HSA-GPIなどのディスプレイベクターに、変異体ライブラリーをクローンして、本出願に記載されるに標準生体外アッセイ（例えばフローサイトメトリー）を使用して、FcRn結合能力についてスクリーニングする。FcRnに対する改善された親和性を提示する変種が、同定される。各変種はまた、スクリーニングされて、FcRn親和性改善が酸性pHのみで起きて、中性pHで起きないかどうか判定されてもよい。酸性pHでは改善されるが、中性pHでは改善されないFcRn親和性は、（i）変種ドメイン I I I 構築物のみ；（ii）完全長HSAの文脈で提示される変異ドメイン I I I 構築物；または（iii）キメラポリペプチドの文脈で試験されてもよい。前述の事項は、野生型ドメイン I I I、野生型完全長HSA、または変異なしのキメラポリペプチドと比較される。実験デザインは、FcRn親和性を改善する変異がある結合エピトープを同定できるようにする。

40

【0553】

6×10⁴個の独立した形質転換体を有する合成ドメイン I I I（D I I I）ライブラリーが、上述したように作成された。ライブラリーは、個々の変異体が単一変異を1つの位置のみに有するようにデザインされたが、いくつかの二重変異、および三重変異でさえも生成された。合成D I I IライブラリーをPCR増幅し、オーバーラップPCRによってD I およびD I Iと共に組み立てて、完全長HSAライブラリーを形成した。PCR

50

を S f i I および E c o R I で消化して、同様に消化されたベクター p E N - H S A - G P I にクローンしたが、これは上述したような O r i P 配列を含んでなる、改善された哺乳類ディスプレイ G a t e w a y (商標) エントリーベクターである (例えば図 8 B および 10 を参照されたい)。D I I I ライブラリーを増幅するのに使用されたプライマーは、N および C 末端に 6 個の野生型アミノ酸残基を有し、したがってドメイン I I I のこれらの 12 個のアミノ酸の多様性は撤廃される。2 つのライブラリーが p E N - H S A - G P I ベクター中に作成され、相当するアデノウイルスライブラリーは、12 μ g の P A C I 直線化アデノウイルス発現ベクターがライブラリー作成に使用されたこと以外は、本質的に上述したように作成される。各ライブラリーのサイズが、(表 4) に示される。p E N - H S A - G P I ライブラリーの多様性をライブラリー 1 中で調べたところ、約 50 % のクローンが野生型であったのに対し、ライブラリー 2 では約 30 % のクローンが野生型であった。

【0554】

【表 4】

表 4: DIII ライブラリーサイズ

	pEN-HSA	pAd-HSA
ライブラリー 1	1.3×10^6	5.4×10^6
ライブラリー 2	6.4×10^6	1.7×10^7

【0555】

野生型 H S A、H S A - D I I I ライブラリー 1、または H S A - D I I I ライブラリー 2 を発現するアデノウイルスによって感染された細胞は、本質的に上の実施例 5 に記載されるように、抗 H S A - F I T C 抗体と F c R n - ビオチンで染色され (S A - P E により検出)、後述するように F A C S によって分析 / スクリーニングした。野生型 H S A および 2 つのライブラリーの発現レベルは、同等であった (図 12 A)。10 μ g / m l の F c R n で染色した際に、H S A - D I I I ライブラリーを発現する細胞集団のみがヒストグラム中で移行を示した (図 12 B)。図 13 は、対応する二重染色 F A C S プロファイルを示す。選別から回収された富化細胞集団は、増幅されて、選別により 2 回目の富化を受け、または後述するように個々のクローンを単離するのに使用された。図 14 A のヒストグラムに見られるように、野生型 H S A、出発ライブラリー、およびソートされたライブラリーの発現レベルは同等である。しかし F c R n による染色は、1 回および 2 回ソートされたライブラリーが、1 μ g / m l および 0.1 μ g / m l にさえ至る低濃度で存在する、F c R n と結合し得る H S A - D I I I 変異体を発現する細胞について、富化されていることを示す (図 14 B および C)。

【0556】

いくつかの個々のクローンは、(後述されるように) 単離され、実験を p H 7.2 で実施したこと以外は、本質的に上の実施例 2 に記載されるようにして、p H 依存性 F c R n 結合についてスクリーニングされる。図 15 は、p H 5.5 (パネル A) および p H 7.2 (パネル B) における、対照細胞、野生型 H S A、およびいくつかの代表的クローンの代表的ヒストグラムを示す。これらの H S A 変異体と野生型 H S A の発現レベルは、同等である (図 15 C)。図 16 に示されるように、p H 依存性結合 (すなわち低 p H における優先的な結合) を保持すると同定されたクローンを配列決定し、いくつかの F c R n 濃度 (例えば 0.1 μ g / m l、1 μ g / m l、および 10 μ g / m l の F c R n - ビオチン) を使用して、野生型 H S A および対照細胞と共に、追加的 F A C S 分析を実施し、F

c R n に対する変異体の相対的親和性を分析してもよい。さらに、任意のその他の特性解析に先だって。富化集団からの約 1 1 0 0 個のクローンを配列決定した。表 5 は、ライブラリーから単離および／または配列決定されたクローン中において同定された、アミノ酸置換の概要を提供する。太字の位置は、約 1 ～ 5 % のクローンではこの位置に置換が見られ、「好ましいスポット」であると称されてもよいことを示す。太字下線の位置は、5 % を超えるクローンではこの位置に置換が見られ、「ホットスポット」であると称されてもよいことを示す。斜体で列挙されるアミノ酸置換（置換 A A の列）は、二重／三重変異の文脈でのみ同定された。5 個以上のクローンで見られるアミノ酸置換（置換 A A の列）は、太字で示される。3 つ以上のクローンで見られる組み合わせもまた太字で示され、同定されたクローン数が括弧内に示される。アミノ酸番号は、配列番号 2 で提供される成熟完全長 H S A に関する。同一アミノ酸置換を同一位置に、および／または異なるアミノ酸置換を同一位置に含有する複数クローンが単離され（表 5 を参照されたい）、これらの位置が、変異ホットスポットに相当してもよいことが示唆される。

10

【0557】

H S A の解析された構造体上における、いくつかの好ましいスポットおよび／またはホットスポットの位置が、図 1 7 に示される。アミノ酸 4 0 7、4 1 5、および 4 6 3 を除く、ホットスポットおよび好ましいスポットの大部分は、ループ 6 および 7（それぞれ残基 4 9 2 ～ 5 0 9 および 5 1 6 ～ 5 1 8 を包含する）およびヘリックス 7 および（それぞれ残基 5 1 0 ～ 5 1 5 および 5 1 9 ～ 5 3 6 を包含する）中に見られ、図 1 6 中で丸で囲まれる。

20

【0558】

【表 5】

表 5 同定された DIII 変異の要約

位置 *	置換 AA **	組み合わせ *
V381	D2; N1	V381D/T506R/Q522R
E382	なし	
E383	A1; <i>G1</i>	E383G/K413S
P384	<i>AI</i> ; S2	P384A/L463N; P384S/Q459A
Q385	<i>E1</i> ; <i>L4</i>	Q385E/Q526H; Q385L/R472W; Q385L/T412G; Q385L/S454C; Q385L/L463N
N386	<i>SI</i>	N386S/I523T
L387	なし	
I388	なし	
K389	G1; <i>MI</i>	K389M/406P/408E
Q390	なし	
N391	E2; L1; <i>TI</i> ; V2	N391T/D549L
C392	なし	
E393	C2; <i>V2</i>	E393V/K524L; E393V/Q522H
L394	なし	
F395	<i>K1</i>	F395K/K414N
E396	<i>K1</i>	E396K/I523H
Q397	<i>G1</i>	Q397G/L463N
L398	K3	L398K/L463F/K524H; L398K/K524H
G399	なし	
E400	<i>II</i>	E400I/I523T
Y401	<i>E1</i> ; <i>K1</i> ; Q2; <i>VI</i>	Y401E/I523G; Y401K/F488Y/L516F; Y401V/F509G
K402	A1; D1; W2	
F403	<i>LI</i> ; <i>NI</i> ; <i>VI</i> ; W1	F403L/V426N/T515G; F403N/I523G; F403V/A443P
Q404	H1; <i>NI</i> ; <i>MI</i> ; T1; W2	Q404N/K524L; Q404M/K525E
N405	E1; <i>T5</i>	N405T/T508R; N405T/E495D/H510P; N405T/K524L; N405T/E495D; N405T/L516C
A406	K1; <i>MI</i> ; P1	K389M/406P/408E
L407	H2; M1; N6 ; Y6 ; <i>RI</i>	L407N/P447S (3 Ω); L407N/P447S/A539I (3); L407Y/F509M (5); L407Y/Q526T; L407R/V555P
L408	E2; F1; R1	K389M/406P/408E
V409	P1; W1	
R410	K1; L2;	R410L/E495D
Y411	<i>AI</i> ; F1; <i>HI</i> ; <i>L3</i> ; Q3; <i>RI</i>	Y411A/455E; Y411H/I523L; Y411L/L463N/T508R; Y411L/I523Q (2); Y411Q/H535N (3); Y411R/I523M
T412	<i>GI</i> ; L1; <i>RI</i> ; S1; W1	Q385L/T412G; T412R/K534G; T412L/E479Q/I523A
K413	<i>SI</i>	E383G/K413S
K414	<i>NI</i> ; Q1; S3; <i>YI</i>	K414S/V456N (3); K414Y/E465W; F395K/K414N
V415	C1; <i>LI</i> ; T11	V415L/T467N; V415T/A569P; V415T/571K
P416	P1	
Q417	<i>PI</i>	Q417P/I523D
V418	K1; L1	
S419	<i>MI</i> ; P1	S419M/K524L
T420	K1; S1	
P421	なし	

10

20

30

40

位置 *	置換 AA **	組み合わせ *
T422	なし	
L423	H1; <i>NI</i> ; R2; Y1	L423N/I523D; L423R/A443D (2)
V424	<i>DI</i> ; I5 ; M2; Q4; W1	V424D/E505H; V424I/L463F; V424M/E531I
E425	K3	
V426	E4; F1; H3; <i>LI</i> ; N2; <i>QI</i>	F403L/V426N/T515G; V426E/K524L; V426H/Q526Y (2); V426L/E495D/Q526Y; V426N/T515G; V426Q/D512M/E520N
S427	なし	
R428	<i>EI</i> ; F2	R428E/T506M/L516I
N429	W1	
L430	なし	
G431	<i>FI</i> ; M2	G431F/L516T/E520Y
K432	C1	
V433	G1; <i>T2</i>	V433T/L463N/T508R; V433T/T508R
G434	C1; K1	
S435	なし	
K436	<i>P2</i>	K436P/I523G
C437	なし	
C438	なし	
K439	なし	
H440	<i>FI</i> ; R2	H440F/F488G
P441	なし	
E442	<i>KI</i>	E442K/E450D/Q459R
A443	P2; <i>D2</i>	F403V/A443P; L423R/A443D (2)
K444	<i>SI</i> ; <i>QI</i>	K444S/D549L; K444Q/E465G
R445	<i>D2</i> ; W1; <i>YI</i>	R445D/I523C; R445D/N503T; R445Y/K519I/K525V
M446	<i>TI</i> ; W3	M446W/H535P; M446T/T515Y
P447	<i>S7</i>	L407N/P447S (3Ω); L407N/P447S/A539I (3); P447S/A539V;
C448	なし	
A449	なし	
E450	<i>DI</i>	E442K/E450D/Q459R
D451	なし	
Y452	R1	
L453	なし	
S454	C4; E2; K1	Q385L/S454C; S454C/A539R
V455	D1; <i>EI</i> ; G1; I1; N6	Y411A/455E; 455N/K524L
V456	<i>AI</i> ; E3; F1; L2; N5 ;	K414S/V456N (3); V456A/E518Y; V456E/L516W; V456E/R521W; V456N/R472S/F509M (2)
L457	F1; I1;	
N458	なし	
Q459	<i>AI</i> ; P1; <i>RI</i>	P384S/Q459A; E442K/E450D/Q459R
L460	N1	L460N/K524L
C461	なし	
V462	なし	

10

20

30

40

位置 *	置換 AA **	組み合わせ *
L463	<i>F3; GI; II; N~230†; S2</i>	P384A/L463N; Q385L/L463N; Q397G/L463N; L398K/L463F/K524H; V424I/L463F; L463F/E505I; L463N/T506N; L463N/T506Y; L463N/T508S (2); L463N/T508R€ (~190¥); L463G/D512Y; L463N/D512Y; L463I/S517W; L463N/Q526M (2); L463N/K534M;
H464	E2; <i>VI</i>	H464V/T474N
E465	<i>GI</i> ; W2	K414Y/E465W; K444Q/E465G
K466	W3	K466W/S517W;
T467	<i>NI</i> ; P1; W1	V415L/T467N;
P468	なし	
V469	なし	
S470	なし	
D471	<i>NI</i>	D471N/R521Q
R472	<i>DI; RI; S2; WI</i>	Q385L/R472W; V456N/R472S/F509M (2); R472D/I523G; R472R/Q522D
V473	E1; <i>L2</i>	V473L/S517W (2)
T474	N2; Q1	H464V/T474N
K475	F1; Y1	
C476	なし	
C477	なし	
T478	なし	
E479	<i>QI</i>	T412L/E479Q/I523A
S480	なし	
L481	なし	
V482	<i>EI; II</i>	V482E/I523R; V482I/I523K
N483	<i>KI</i>	N483K/K524L
R484	なし	
R485	<i>PI</i>	R485P/N503V
P486	なし	
C487	なし	
F488	<i>GI; YI</i>	Y401K/F488Y/L516F; H440F/F488G
S489	なし	
A490	なし	
L491	なし	
E492	なし	
V493	なし	
D494	なし	
E495	D9	N405T/E495D/H510P; N405T/E495D; R410L/E495D; V426L/E495D/Q526Y; L463N/E495D/T508R (2); E495D/Q526Y
T496	なし	
Y497	なし	
V498	M1	
P499	なし	
K500	なし	
E501	なし	

10

20

30

40

位置 *	置換 AA **	組み合わせ *
F502	なし	
N503	T1; V2	R445D/N503T; R485P/N503V; N503V/A539R
A504	なし	
E505	H1; I5	V424D/E505H; L463F/E505I
T506	M1; N1; R2; W1; Y6	V381D/T506R/Q522R; R428E/T506M/L516I; L463N/T506N; L463N/T506Y; T506R/Q522C; T506Y/C559R
F507	V1; W1	F507W/I523F
T508	R~200; S3	N405T/T508R; V433T/T508R; L463N/T508R (~190¥); L463N/T508S (2);
F509	D2; G1; I4; M12; P1; W6	Y401V/F509G; L407Y/F509M (5); F509W/K557G; 456N/R472S/F509M (2); F509I/T527Y (4);
H510	C5; P3; Q2; R1	N405T/E495D/H510P; H510C/H535L; H510R/K557G
A511	D1; F9; I1; R1; T1; V1; Y1	A511F/Q526P; A511I/K538W; A511V/H535S/K541T; A511Y/V555E;
D512	F1; M2‡; Q1; Y13	V426Q/D512M/E520N; L463G/D512Y; L463N/D512Y; D512M/E520N
I513	T1; Q1;	I513Q/I523Y
C514	Y1	
T515	C3; D2; E2; G1; H2; L2; N1; P2; Q11; S4; W2; Y2	326N/T515G; F403L/V426N/T515G; M446T/T515Y; T515W/Q522K; T515P/I523R; T515L/M548F; T515N/D549S;
L516	C2; F3; G1; I1; T6; W6; Y1	Y401K/F488Y/L516F; N405T/L516C; R428E/T506M/L516I; G431F/L516T/E520Y; V456E/L516W; L516W/A539V; L516W/Q543W;
S517	C1, W7	L463I/S517W; K466W/S517W; V473L/S517W (2)
E518	A2; V1; Y1	V456A/E518Y;
K519	C3; D2; E1; I3	R445Y/K519I/K525V; T508R/K519I/K525V
E520	C1; N2; V1; W2; Y1	V426Q/D512M/E520N; G431F/L516T/E520Y; D512M/E520N
R521	H1; M1; Q1; T1; W18; Y1	V456E/R521W; D471N/R521Q; R521M/D563F
Q522	C1; D1; H1; K1; R2; W1; Y2	V381D/T506R/Q522R; E393V/Q522H; R472R/Q522D; T506R/Q522C; T515W/Q522K;
I523	A2; C1; D13; E8; F4; G31; H3; K13; L1; M1; P1; Q4; R11; S2; T3; W2; Y2‡	N386S/I523T; E396K/I523H; E400I/I523T; F403N/I523G; Y411H/I523L; Y411L/I523Q (2); Y411R/I523M; T412L/E479Q/I523A; 416P/I523D; Q417P/I523D; L423N/I523D; K436P/I523G; R445D/I523C; R472D/I523G; V482E/I523R; V482I/I523K; F507W/I523F; I513Q/I523Y; T515P/I523R; I523Q/K538Y
K524	H3; I2; L68; M2; Q3; V4	E393V/K524L; L398K/L463F/K524H; L398K/K524H; Q404N/K524L; N405T/K524L; S419M/K524L; V426E/K524L; 455N/K524L; L460N/K524L; N483K/K524L; K524L/T540I/571K; K524Q/K545M;
K525	E1; V3	Q404M/K525E; R445Y/K519I/K525V; T508R/K519I/K525V

位置 *	置換 AA **	組み合わせ *
Q526	A4; F1; <i>HI</i> ; L1; M10 ; <i>P1</i> ; <i>T1</i> ; V1; <i>Y4</i>	Q385E/Q526H; V426H/Q526Y (2); V426L/E495D/Q526Y; L407Y/Q526T; L463N/Q526M (2); E495D/Q526Y; A511F/Q526P; Q526M/K557G
T527	E1; V1; Y7	F509I/T527Y (4);
A528	G1; N1;	
L529	F1	
V530	E1; I1;	
E531	G1; I2; P1;	V424M/E531I;
L532	V2;	
V533	S1	
K534	<i>GI</i> ; <i>MI</i>	T412R/K534G; L463N/K534M
H535	D1; K1; <i>L1</i> ; N3; P5 ; S2	Y411Q/H535N (3); M446W/H535P; H510C/H535L; A511V/H535S/K541T;
K536	L1; R1; T1	
P537	なし	
K538	C1; D2; <i>WI</i> ; <i>YI</i>	A511I/K538W; I523Q/K538Y
A539	I3; N1; R1; V2	L407N/P447S/A539I (3); P447S/A539V; P447S/A539I (3); S454C/A539R; N503V/A539R; L516W/A539V
T540	I1; K1	K524L/T540I/E571K;
K541	P1; T2; F2	A511V/H535S/K541T; K541F/A561F
E542	W1	
Q543	P1; <i>WI</i>	L516W/Q543W
L544	M1	
K545	<i>MI</i> ; N1	K524Q/K545M;
A546	I1; D1	
V547	なし	
M548	F2	T515L/M548F;
D549	A1; L3; S2	N391T/D549L; K444S/D549L; T515N/D549S
D550	なし	
F551	なし	
A552	P2	
A553	なし	
F554	P2	
V555	D1; <i>EI</i> ; P2	L407R/V555P; A511Y/V555E
E556	なし	
K557	G11 ; N1; S1	F509W/K557G; H510R/K557G; Q526M/K557G
C558	なし	
C559	<i>RI</i>	T506Y/C559R
K560	Q1	
A561	F2; T1	K541F/A561F
D562	V1; S1	
D563	A1; Y1; M1; <i>FI</i>	R521M/D563F
K564	I1; R2	
E565	K1; Y5 ; W1	L463N/T508R/E565Y;
T566	K1; W1	
C567	なし	
F568	I3; T1	

10

20

30

40

位置 *	置換 AA **	組み合わせ *
A569	H2; P2; Y1	V415T/A569P
E570	なし	
E571	K5; D1	V415T/571K; K524L/T540I/E571K
G572	E1; R2; Y1	
K573	A1	
K574	なし	
L575	M1; Y1	
V576	D2	
A577	なし	
A578	T1; V2	
S579	なし	
Q580	なし	
A581	なし	
A582	D2; T2	
L583	なし	
G584	なし	
L585	なし	

10

* 成熟完全長 HSA(配列番号 2)に関して番号付けされる;置換アミノ酸残基にはその残基が見られた回数を表示する数が続く;組み合わせは概して、組み合わせ中で見られた各位置について横列に列挙される

20

Ω 3つのクローンの内2つでは、配列は位置407において確定的でない

† L463N は、最初にクローン12として同定された

€ L463N/T508R は最初にクローン45として同定された

¥ 時折、w/a 第3の置換(例えば Y411L、V433T、E495D、A504G、E531G、571K)

‡ これらのクローンは523における欠失も有する

£ I523Y は最初にクローン46として同定された

【0564】

このように同定されたいくつかの変異体は、部位特異的変異誘発によって、可溶性タンパク質として生成され、さらなる分析のために後述するようにして精製された。結合親和性 (pH 5.5 において K_D) および pH 依存性 (7.2 対 5.5) は、(後述するような) Protein および/または (本質的に上述したような) Biacore によって測定された。表6は、結合研究の概要を提供し、これらの研究のタンパク質密度を含む。いくつかの変異体は、pH 5.5 において、表6中で太字表記される L407Y/Q526T; L463N/T508R; I523G; V424Q; L83N/I28R/I143G; および K144 をはじめとする、結合強化を有することが分かった。これらの試験された中で、pH 5.5 で結合増強を示した全てが、pH 依存性結合を維持することもまた分かった (表6の最後の列を参照されたい)。いくつかのアッセイされた変異体は、pH 5.5 において、無変化であり、または K_D が増大さえすることが分かった (すなわち無変化またはより劣る結合)。このようなクローンが同定されるいくつかの可能な理由があり、例えばこれらの変異は、ディスプレイシステム中におけるタンパク質の発現または安定性を高めてもよい。また提示に使用される GPI アンカーが、結合に何らかの影響を及ぼす可能性もあり、変異 HSA が可溶性分子として発現される場合に、複製されないものをこれらの変異体が代償し得る。さらにスクリーニング手順のデザインは、オフ速度安定化変異体を捕捉するために最適化され、それが全体的な親和性改善に変換されても、されなくてもよい。それはまた、これらの変異が、1つまたは複数のその他の変異と組み合わせられた場合に、増強を提供することを反映してもよい。いくつかの変異は、組み合わさって見られた (表5を参照されたい)。

30

40

【0565】

50

【表 6】

表 6 結合研究の要約

huFcRn 対	$K_D(\mu\text{M})$ – ProteOn	表面密度 (RU)	pH 依存性
WT	2.83	1880	Y
L407Y/Q526T	0.191	3940	Y
L463N/T508R	0.105	3950	Y
F509W	nb	4920	
A511I	nb	3720	
K519E	nb	3260	
R521W	3.13	3940	
I523G	0.074	3740	Y
huFcRn 対	K_D (μM)-BIAcore	表面密度 (RU)	pH 依存性
WT	0.91	2952	Y
V424Q	0.46	3441	Y
V426E	2.50	7279	Y
V426H	3.59	6665	
L463N/T508R/I523G	約 0.184**	6427	
F509M	約 27.4*	7337	
A511F	1.48	3395	Y
D512Y	1.00	3355	Y
T515S	2.88	3522	N
L516T	5.02	6780	
S517W	0.69	3144	
I523G	0.360		Y
K524L	約 0.360**	6388	Y

空欄は未試験を示す;nb は使用した条件下で結合がないことを示す

* 推定-弱い親和性+10 μM での最高濃度は平衡対濃度等温線にわずかな曲率のみをもたらした

** 推定-強力な親和性 - 低下濃度曲線の結合は「真の」定常状態に到達しなかった

【0566】

細胞染色および FACS 分析および選別：密度 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の 3000 万個の 293 F 細胞に、 $\text{MOI} = 1$ で HSA アデノウイルスライブラリーを感染させた。遠心分離による形質導入の 16 時間後に細胞を収集し、冷 FACS 緩衝液で洗浄して、約 1×10^7 細胞 / ml で再懸濁した。1 回目の選別のために、ビオチン化 FcRn を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ (212 nM) で添加した。4℃で 60 分間の培養後、細胞を FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、1 : 500 の希釈でストレプトアビジン-PE に再懸濁した。4℃で 30 分間培養し、FACS 緩衝液で 1 回洗浄して、FcRn 結合についてソートした後、pH 5.5 で FcRn に結合する細胞を富化した。ソートされた細胞を追加的なスクリーニングのために

増幅した。2回目の選別では、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (21.2nM) でビオチン化FcRnを使用したこと以外は、本質的に上述したようにして富化細胞集団をソートし、高親和性HSA変異体をさらに富化した。富化ライブラリーの追加的な分析は、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.12nM) でもまた実施され、例えば図14を参照されたい。いくつかのスクリーニングでは、1回目または2回目のスクリーニングに、「除外」ステップが組み込まれ、その中で富化細胞集団がソートされて、中性pH (pH7.4) でFnRcに結合するものが除去された。個々のクローンを同定するために、ウイルスDNAが富化細胞集団から抽出され、293F細胞の一過性形質移入のために、DIIHSA変種を哺乳類発現ベクターにクローンされる。本質的に上述したように、pH5.5およびpH7.4において、フローサイトメトリーによって、個々のクローンをpH依存性結合についてスクリーニングする。

10

【0567】

HSA-DII変異体の生成および発現：特異的変異誘発プライマーを使用して、哺乳類発現ベクター中で標準プロトコル (QuickChange (登録商標) IIXL部位特異的変異誘発キット、Agilent；カタログ番号200521) を使用して、野生型HSAを変異させていくつかのDII変異体を生成する。製造会社のプロトコルに従って、293fectin (商標) 形質移入試薬 (Invitrogen；カタログ番号Skul2347-019) を用いた一過性形質移入によって、変異体が293F細胞中で発現され、変異体は標準手順を使用して、抗FLAGM2親和性ゲル (Sigma-Aldrich；カタログ番号A2220) 上で精製される。このように精製された全ての変異体をSDS PAGE、およびサイズ排除クロマトグラフィーによって分析し、純度と凝集を評価した。全ての変異体は約99%純粋と判定され、著しい凝集はなかった (単量体が95%を上回る) (データ示さず)。

20

【0568】

Protein解析：Protein XPR36タンパク質相互作用アレイシステム (BioRad) 上で、HSA変種に対するヒトFcRnの親和性 (KD) を測定した。簡単に述べると、製造会社によって概説されるように、Proteinアミン共役キットを使用して、HSA変種をProtein GLMセンサーチップ上の別個のフロー表面に高密度で固定化した。最終表面HSA密度は、 $3740\sim3950\text{RU}$ であった。参照フロー表面もまた、いかなるタンパク質もなしに同一固定化プロトコルを使用して、チップ上で調製した。共役タンパク質と参照セル表面の双方の上に、 50mM の PO_4 、 150mM の NaCl 緩衝液、pH5.5中の $5.86\text{nM}\sim10000\text{nM}$ の範囲にわたるヒトFcRnの2倍連続希釈液を $25\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で注入した。8分間にわたり結合データを収集し、 0.05% のTween20を含有するpH7.4リン酸緩衝食塩水の複数回の60秒間の注入による再生がそれに続いた。各注入の平衡結合応答 (Req) を濃度に対してプロットして、Protein Managerソフトウェアを使用して、定常状態親和性モデルに適合させて平衡結合定数KDを導出した。

30

【0569】

この分析に基づいて、同定された組み合わせ変異のさらなる分析を実施して、個々の変異の活性を評価した。それに加えて、変異の異なる組み合わせ (例えばスクリーニング中に直接同定されなかった、2つ以上の位置に変異を有する構築物) が、FcRnに対する親和性改善を提供するかどうかを同定する、さらなるスクリーニングが行われる。

40

【0570】

8.11 実施例11：ドメインIII上の選択された残基のコンビナトリアル変異誘発
実施例10 (上記) で同定される最も頻度の高い変異の組み合わせを調べるために、残基407；415；463；495；508；509；511；512；515；516；517；521；523；524；526；527；および557が、表7に示される残基に変異されるように、合成ドメインIIIライブラリーを作成して、個々の変異体が2～4個の変異を有するように、変異体ライブラリーを作成する。代案としては、列挙される各残基が、全ての20個のアミノ酸 (すなわち野生型アミノ酸と全ての19個の非野

50

生型アミノ酸)に変異されるようにライブラリーを作成して、より大規模な組み合わせのセットを調べてもよい。

【0571】

ドメイン I I I 単独、全長 H S A タンパク質、トランケート型 H S A、または少なくともドメイン I I I を含んでなるキメラタンパク質の 1 つまたは複数の文脈で、ドメイン I I I コンビナトリアル変異が導入されてスクリーニングされる。標準変異誘発法を利用して、ドメイン I I I 変異体ライブラリーを作成し得る。任意選択的にまたは代案としては、Geneart AG, Germany などの商業施設によって、ドメイン I I I 変異体のライブラリーが、作成される。

【0572】

コンビナトリアル変異体のライブラリーは、上述したような p Y D 1 酵母ディスプレイベクターまたは哺乳類ディスプレイベクター p E N - H S A - G P I などのディスプレイベクターにクローンされ、本出願に記載される標準生体外アッセイ（例えばフローサイトメトリー）を使用して、F c R n 結合能力についてスクリーニングされる。実施例 10 に記載されるものなどの陽性および／または負の選択法を用いてもよい。F c R n に対する親和性改善を提示するコンビナトリアル変種が、同定される。各コンビナトリアル変種はまた、スクリーニングされて、F c R n 親和性改善が酸性 p H のみで起きて、中性 p H で起きないかどうか判定されてもよい。酸性 p H では改善されるが、中性 p H では改善されない F c R n 親和性は、(i) 変種ドメイン I I I 構築物のみ；(i i) 完全長 H S A の文脈で提示される変異ドメイン I I I 構築物；または(i i i) キメラポリペプチドの文脈で試験されてもよい。前述の事項は、野生型ドメイン I I I、野生型完全長 H S A、または変異なしのキメラポリペプチドと比較されてもよい。代案としては、または任意選択的に、コンビナトリアル変異をドメイン I I I、完全長 H S A、または各変異を単独に含んでなるキメラポリペプチドと比較して、組み合わせが、F c R n 親和性および／または血清半減期をさらに高めるかどうかを判定もよい。実験デザインは、F c R n 親和性を改善しおよび／または血清半減期改善するコンビナトリアル変異を同定できるようにする。

【0573】

【表 7】

表 7 コンビナトリアルライブラリーの変異

位置	変異	位置	変異	位置	変異
407	N, Y	511	F	523	D, E, F, G, K, R
415	T	512	M, Y	524	L
463	F, N	515	Q	526	A, M, Y
495	D	516	T, W	527	Y
508	R, S	517	W	557	G
509	I, M, W	521	W		

【0574】

8. 12 実施例 12 : F c R n 親和性改善についてスクリーニングされる、単一アミノ酸変異体をもたらすドメイン I I I 上の残基の変異誘発

18 個の単一アミノ酸がドメイン I I I 中の保存アミノ酸から選択され、本出願に記載される標準法を使用して、各変種が単一変異を 1 つの位置のみに有するように、単独にアラニンに変異させる。18 個の変種を導入して、全長 H S A タンパク質の文脈で、または代案としてはトランケート型 H S A、または少なくともドメイン I I I を含んでなるキメラタンパク質中でスクリーニングする。本出願に記載される i 標準生体外アッセイを使用して、F c R n 結合能力について 18 個の変種をスクリーニングする。F c R n に対する親和性改善を提示する変種が、同定される。各変種はまた、スクリーニングされて、F c

R n 親和性改善が酸性 p H のみで起きて、中性 p H で起きないどうか判定される。酸性 p H では改善されるが、中性 p H では改善されない F c R n 親和性は、(i) 変種ドメイン I I I 構築物のみ；(i i) 完全長 H S A の文脈で提示される変異ドメイン I I I 構築物；または(i i i) キメラポリペプチドの文脈で試験されてもよい。前述の事項は、野生型ドメイン I I I 、野生型完全長 H S A 、または変異なしのキメラポリペプチドと比較される。

【0575】

この分析に基づいて、変異の組み合わせ（例えば2つ以上の位置に変異を有する構築物）が、F c R n 親和性改善を提供するかどうかを同定するためのさらなるスクリーニングが実施される。

10

【0576】

8. 13 追加的な「ホットスポット」変種およびコンビナトリアル変種

位置463、508、523、および524を全ての19個の非野生型アミノ酸に別々に変異させ、本質的に上述したように、76個の個々の点変異のセットをクローンして発現させた（「H S A - D I I I 変異体の生成および発現」と題された上の節を参照されたい）。チップと共役している抗H S A （非ドメイン I I I バインダー）を使用して、B I A c o r e 分析を実施し、細胞上清からH S A 変種を捕捉した。次にヒトF c R n をチップ上に通過させてp H 5. 5 で結合させ、p H 5. 5 における結合と解離を測定した。この構成では、解離定数（ k_d （1 / s））が、結合定数よりもさらに正確である。野生型H S A よりも少なくとも2. 5 倍遅いオフ速度を有する単一変異体の結合定数が、表8に提供される。表8を見ても分かるように、これらの位置における多数の置換が、野生型H S A と比較して、より緩慢なオフ速度と、F c R n 結合改善をもたらす。

20

【0577】

【表 8】

表 8. 「ホットスポット」単一変異体の結合定数

変異	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
K524L	3.39E+04	1.14E-03	3.36E-08	37.2
L463C	1.72E+04	1.34E-03	7.77E-08	155
I523D	3.94E+04	1.37E-03	3.48E-08	224
I523N	4.09E+04	1.58E-03	3.86E-08	109
K254I	2.07E+04	1.71E-03	8.22E-08	176
I523H	3.51E+04	1.85E-03	5.27E-08	302
K524V	1.92E+04	1.85E-03	9.65E-08	373
I523C	2.95E+04	1.99E-03	6.74E-08	262
I523E	3.05E+04	2.03E-03	6.66E-08	224
L463G	3.16E+04	2.14E-03	6.78E-08	58.4
T508E	3.52E+04	2.17E-03	6.17E-08	160
K524M	2.76E+04	2.18E-03	7.88E-08	134
I523G	3.29E+04	2.23E-03	6.77E-08	92.1
K524T	2.04E+04	2.27E-03	1.11E-07	155
I523P	2.59E+04	2.39E-03	9.24E-08	188
L463Q	2.93E+04	2.42E-03	8.27E-08	428
I523Q	2.47E+04	2.44E-03	9.88E-08	272
I523L	2.68E+04	2.45E-03	9.14E-08	403
T508R	3.40E+04	2.53E-03	7.44E-08	259
L463H	3.19E+04	2.71E-03	8.50E-08	451
K524F	2.88E+04	2.95E-03	1.02E-07	25.3
L463M	3.31E+04	2.97E-03	8.96E-08	18.4
I523R	3.25E+04	3.01E-03	9.27E-08	150
T508C	2.70E+04	3.04E-03	1.12E-07	369
T508I	3.12E+04	3.05E-03	9.76E-08	34.6
I523K	2.75E+04	3.06E-03	1.11E-07	398
L463N	2.48E+04	3.13E-03	1.26E-07	360
L463F	2.60E+04	3.17E-03	1.22E-07	54
K524N	2.07E+04	3.27E-03	1.58E-07	242
I523F	3.42E+04	3.31E-03	9.69E-08	141

10

20

30

40

【 0 5 7 8 】

実施例 10（上記）で同定された「ホットスポット」変異のそれぞれが合わさった一連

50

の二重、三重、四重のH S A 変異組み合わせが生じた。「ホットスポットコンビナトリアル」変異体をクローンして発現させ、本質的に上述したようにして、平衡結合定数およびpH依存性FcRn結合（ヒトおよびカニクイザル（*cynomolgus monkey*））を測定した（「H S A - D I I I 変異体の生成および発現」および「反応速度測定」と題された上記の節を参照されたい）。pH 5.5および7.4において、流速5 μ l /分で3 μ MのFcRnを注入し、pH 5.5と比較したpH 7.4における平衡時の応答率を導出し、FcRn結合のpH依存性を計算した。表9に要約されるように、「ホットスポット」コンビナトリアル変異のそれぞれは、結合親和性に少なくとも2～3倍の改善を示し、四重変異が最大の改善（20～75倍）を示した。これに加えて、変異体のいくつかは、ほぼ野生型レベルのpH依存性FcRn結合を維持した（L 4 6 3 N / T 1 2 8 R ; L 4 6 3 N / K 5 2 4 L ; T 5 0 8 R / I 5 2 3 G ; および L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G）。いくつかの「ホットスポット」コンビナトリアルH S A 変種のS P R 由来運動定数および平衡定数が、表10に提供される。これに加えて、カニクイザル（*cynomolgus monkey*）FcRnに対するいくつかの「ホットスポット」コンビナトリアル変種のS P R 由来平衡定数およびpH依存性（表10）は、ヒトFcRnで見られたのと同様であることが示された（表9）。

10

【0579】

【表9】

表9 ヒトFcRn のSPR 由来平衡定数およびpH 依存性

20

HSA タンパク質	K _D (nM)	pH 依存性 7.4/5.5 (%)†
WT	700-1500	0
L463N/T508R	460	0
L463N/K524L	100	2.6
T508R/I523G	142	4.9
T508R/K524L	70	28.9
L463N/T508R/K524L	59	68
T508R/I523G/K524L	147	32
L463N/T508R/I523G	96	0
L463N/T508R/I523G/K524L	20	63

30

† pH5.5 と比較した pH7.4 における平衡時の応答率×100

【0580】

【表 10】

表 10 SPR 由来運動定数および平衡定数

タンパク質	運動定数			平衡定数
	$k_a \times 10^4$ ($M^{-1} s^{-1}$)	$k_d \times 10^{-3}$ (s^{-1})	K_D (mM)	K_D (mM)
WT-HSA	0.79 ± 0.37	7.3 ± 4.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 1.2
L463N/K524L	0.59 ± 0.16	0.2 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.109 ± 0.001
T508R/I523G	1.2 ± 0.31	1.1 ± 0.2	0.09 ± 0.4	0.127 ± 0.01
L463N/T508R/I523G	1.7 ± 0.25	1.2 ± 0.2	0.07 ± 0.02	0.095 ± 0.04

10

【0581】

【表 11】

表 11 カニクイザル(cynomologus monkey)FcRn の SPR 由来平衡定数および pH 依存性

20

HSA タンパク質	K_D (nM)	pH 依存性 7.4/5.5 (%)†
WT	1420	0
L463N/K524L	118	11.4
T508R/I523G	189	12.6
L463N/T508R/I523G	136	16

† pH5.5 と比較した pH7.4 における平衡時の応答率×100

30

【0582】

8. 14 半減期測定

改善された FcRn 結合 HSA 変異体が、長期の半減期を有するという概念実証を試験するために、目下利用できる唯一のマウスモデルは、huFcRn tgn マウスである (マウス遺伝子の同型接合 KO、およびヒト遺伝子の異型接合 KI) (Petkova S. B et al, (2006) International Immunology, Vol. 18, No. 12, pp. 1759-1769)。このモデルは、HSA 半減期測定の観点から、Wt HSA よりも 10 倍高い親和性で、ヒト FcRn と結合する、マウス血清アルブミン ($600 \mu M$) の非常に高い循環濃度という、重大な限界を有する。しかしこのモデルは、試験された HSA 変種が、マウス血清アルブミン (MSA) と成功裏に競合できれば使用し得る。

40

【0583】

生体外 Biacore 競合実験をデザインし、親和性改善を示す変異体が huFcRn 結合について、マウス血清アルブミン (MSA) と成功裏に競合できるかどうかを予測した。これらの実験は、 $1 \mu M$ の FcRn を一連の濃度 ($41 nM \sim 100 \mu M$) の MSA と予備混合して、変異 HSA 表面上に注入して実施し、MSA が FcRn 結合について HSA 変種と競合する能力を試験した。データを単一クラス競合的結合部位モデルに適合させて、 IC_{50} を計算した。

【0584】

L463N/K524L; T508R/I523G; および L463N/T508R/

50

I 5 2 3 G の 3 つの変異体が最初に試験され、これらの変異体のそれぞれが、F c R n への親和性改善を示し、p H 依存性を維持した（表 8 を参照されたい）。T 5 0 8 R / I 5 2 3 G および L 4 6 3 N / K 5 2 4 L は、W t H S A または M S A よりも 1 0 ～ 1 5 倍高い I C ₅₀ 値を有することが分かった（表 1 1）。これらの I C ₅₀ 値はオフ速度測定値に合致し、T 5 0 8 R / I 5 2 3 G および L 4 6 3 N / K 5 2 4 L が、F c R n とより安定した複合体を形成することが示唆された。

【 0 5 8 5 】

次にこれらの 3 つの各変異体の半減期が、h u F c R n t g n マウス中で生体内測定された（下の P K 解析を参照されたい）。表 1 1 に示されるように、このモデル系変異体 L 4 6 3 N / K 5 2 4 L は、半減期に 5 時間の改善を示し、変異体 T 5 0 8 R / I 5 2 3 G は 3 時間の改善を示す。しかし変異体 L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G は、モデル中で W t よりも急速に除去された。L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G のより急速なクリアランスは、上述のように、マウスモデルの限界に起因する人為結果であってもよい。代案としては、変異が、タンパク質の生体内安定性に影響を及ぼしてもよく、またはその生体内分布に影響を及ぼしてもよい。L 4 6 3 N / K 5 2 4 L および T 5 0 8 R / I 5 2 3 G の半減期の値は、変異体のオフ速度プロファイルと一致する。またこれらのデータは、M S A との競合実験を使用して実施された I C ₅₀ 測定値とも一致する。

【 0 5 8 6 】

表 11

HSA	t1/2 (hr)	IC50 (μM)
L463N/K524L	30.2	7.41
L463N/T508R/I523G	17.7	0.93
T508R/I523G	28.7	4.42
野生型	24.7	0.72

【 0 5 8 7 】

P K 解析：野生型 H S A （W t H S A）または L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G、T 5 0 8 R / I 5 2 3 G、L 4 6 3 N / K 5 2 4 L 変種が、N 末端 H i s 1 0 タグを保有するように生成された。全てのタンパク質は、既述のように 2 9 3 F 細胞中で発現され、製造会社の説明に従って、G E H e a l t h c a r e （カタログ番号 1 7 - 5 2 4 8 - 0 2）からの H i s T r a p H P カラムを使用して精製された。h u F c R n t g n マウスに、1 5 m g / K g の W t H S A または L 4 6 3 N / T 5 0 8 R / I 5 2 3 G、T 5 0 8 R / I 5 2 3 G、L 4 6 3 N / K 5 2 4 L 変種を尾静脈を介して静脈内輸液し、1、1 6、2 4、4 8、7 2、9 6、および 1 2 0 時間の時点において、5 匹のマウス／時点／群を使用して血清サンプルを採取した。E L I S A によって、マウスからの血清サンプルを分析した。簡単に述べると、E L I S A プレート（当施設内で生成された）抗 H i s m A b でコーティングし、血清サンプルの適切な希釈液とのインキュベーションがそれに続き、ウサギ抗 H S A ポリクローナル抗体（A b C a m；カタログ番号 A B 6 0 1 9 1）およびロバ抗ウサギ I g G H R P （J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h；カタログ番号 7 1 1 - 0 3 5 - 1 5 2）を用いて、血清中に残留する H S A / 変種の量を検出した。全ての動物実験は、施設内審査委員会によって認可された。

【 0 5 8 8 】

W i n N o n l i n P r o f e s s i o n a l （v 5 . 2；P h a r s i g h t C o r p .）を使用して、ノンコンパートメント解析を実施して、平均血清タンパク質濃度

時間プロファイルから、薬物動態学的パラメータを判定した。 $C_{p, last} / \lambda_z$ (式中、 λ_z は、最小二乗によって、排除の最終相に適合された線の傾斜であった) から、最後の測定値を超える面積 ($C_{p, last}$) を推定して、対数台形法を使用して、曲線下面積 (AUC) を計算した。タンパク質のクリアランス (CL) 値は、 $CL = \text{用量} / AUC$ から計算され、用量は輸液された c_{pm} であった。半減期 ($t_{1/2}$) は、 $\ln 2 / \lambda_z$ から計算された。

【0589】

9 配列

配列番号 1 - ヒト HSADI I I I タンパク質配列

VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC
CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEV
DETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

10

【0590】

配列番号 2 - ヒト完全長 H S A タンパク質配列

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARR
HPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLE
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCA
EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET
FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

20

30

【0591】

配列番号 18

VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC
CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCV(X₁)HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALE
VDETYVPKEFNAETF(X₂)FHADICTLSEKERQ(X₃)(X₄)KQTALVELVKHKPKATKEQL
KAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

40

【0592】

図 6 は、様々な種からの血清アルブミンタンパク質のドメイン I I I のアラインメントを提供する。

【0593】

ラット血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 3 として記載される。ラット血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 4 として記載される。ウシ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 5 として記載される。ヒト血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 2 として記載される。イヌ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 6 として記載される。ウサギ血清アル

50

ブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 7 として記載される。ブタ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 8 として記載される。ニワトリ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 9 として記載される。ロバ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 10 として記載される。スナネズミ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 11 として記載される。ヒツジ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 12 として記載される。ネコ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 13 として記載される。ウマ血清アルブミンのドメイン I I I の野生型アミノ酸配列は、図 6 で配列番号 14 として記載される。

10

【0594】

本明細書で言及される全ての刊行物および特許は、あたかも個々の出版物または特許を具体的に個々に参照によって援用すると示されるように、その内容全体を参照によって本明細書に援用する。これに加えて、2010年2月16日に出願された米国仮特許出願第61/304,954号明細書；および2010年7月15日に提出された米国仮特許出願第61/364,503号明細書は、あらゆる目的のためにその内容全体を参照によって援用する。

【0595】

主題発明の特定の実施形態を考察したが、上の明細書は例示的であり、限定は意図されない。本発明の多数のバリエーションは、本明細書および下の請求項を検討すれば、当業者には明白である。本発明の全範囲は、このようなバリエーションと共に、その同等物の完全な範囲および明細書と共に、特許請求の範囲を参照して判定されるべきである。

20

【図 1 A】

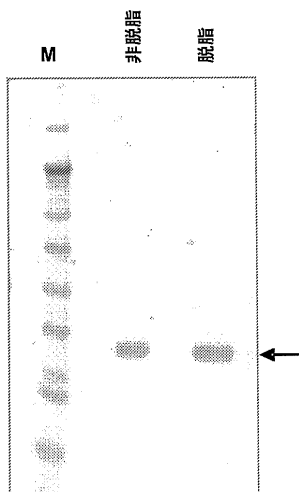


図 1A

【図 1 B】

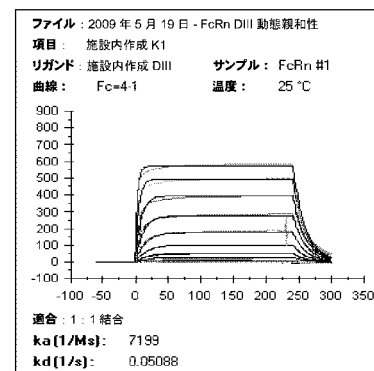


図 1B

【図 1 C】

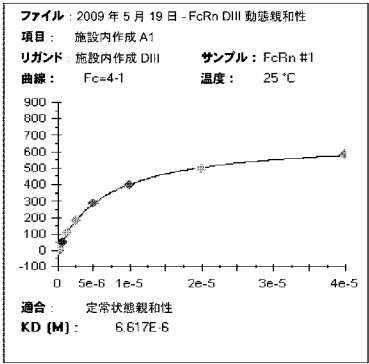
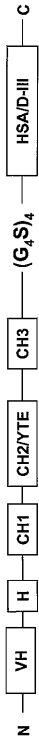


図 1C

【図 2 A】



【図 2 B】

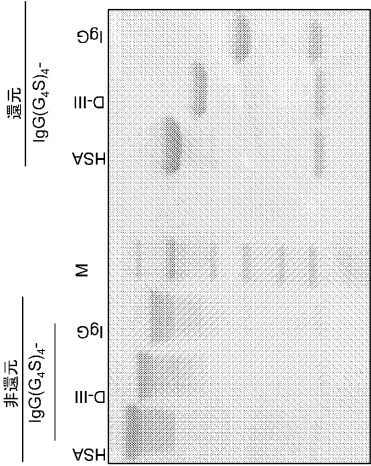


図 2B

【図 2 C】

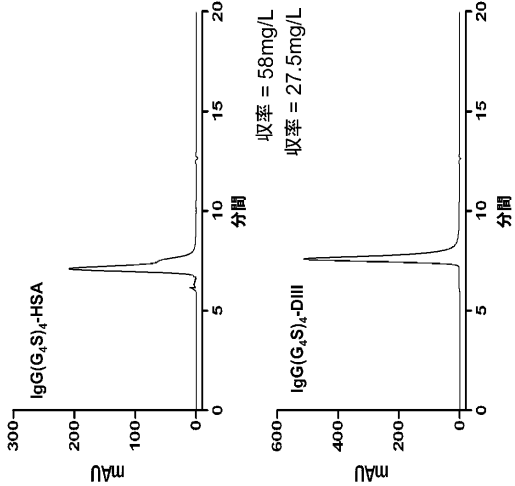


図 2C

【図 5 A】

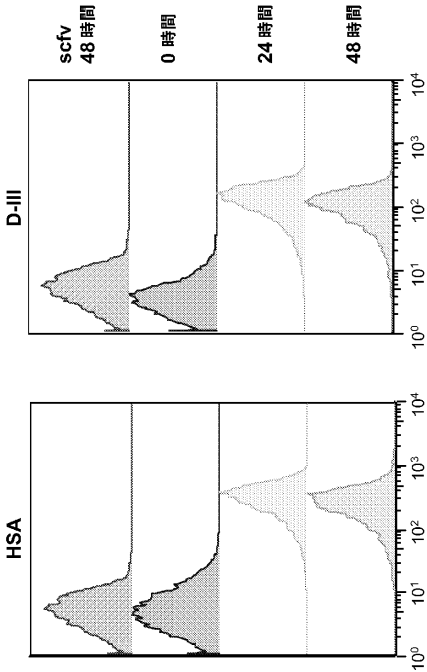


図 5A

【図 5 B】

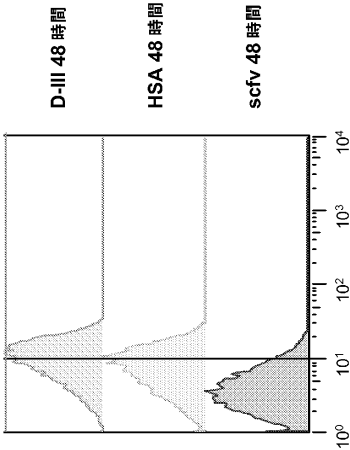


図 5B

【図 6 A】

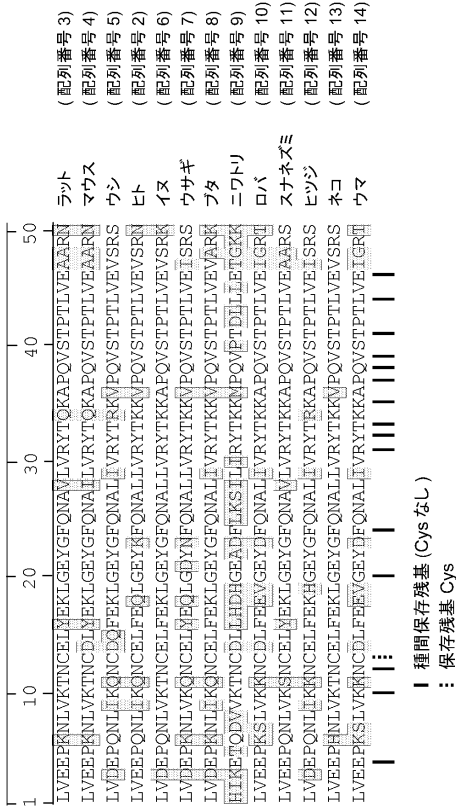


図 6A

【図 6 B】

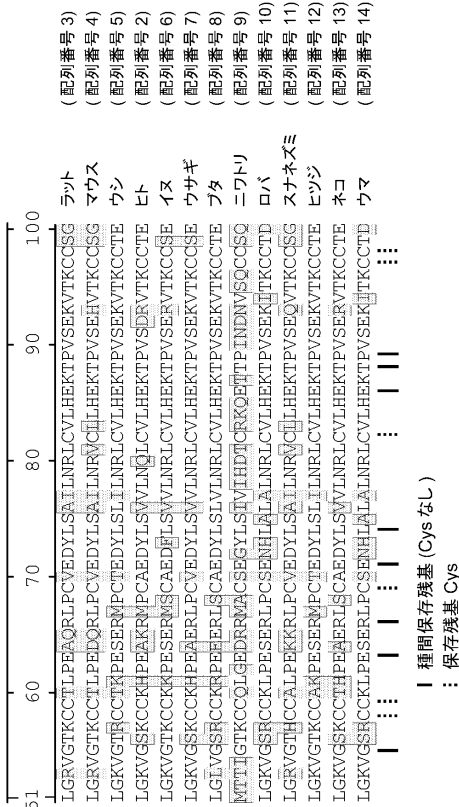


図 6B

【図 6 C】

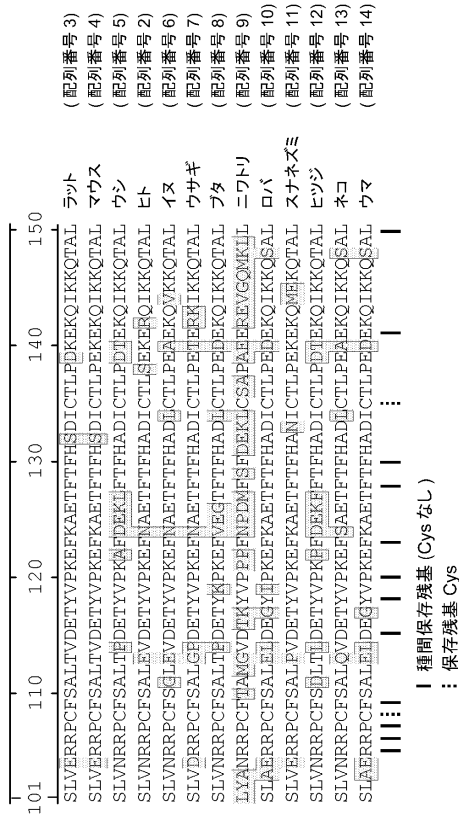


図 6C

【図 6 D】

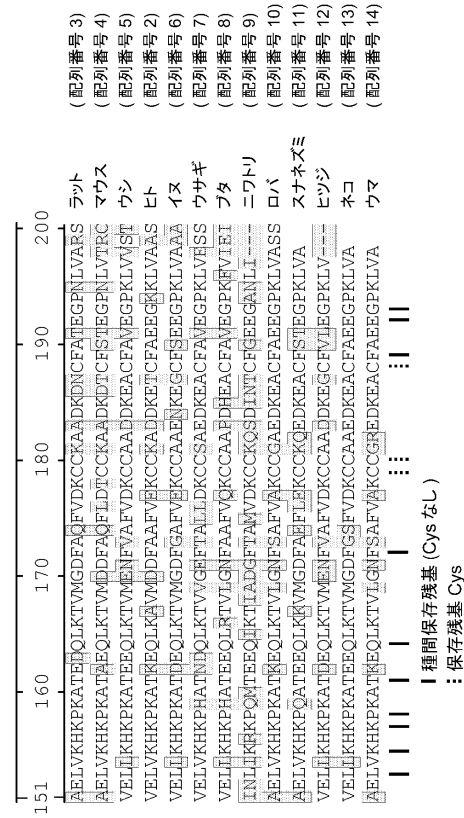


図 6D

【図 6 E】

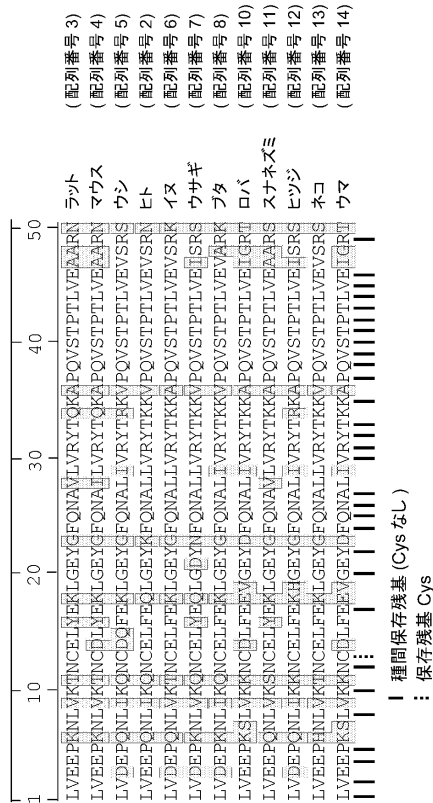


図 6E

【図 6 F】

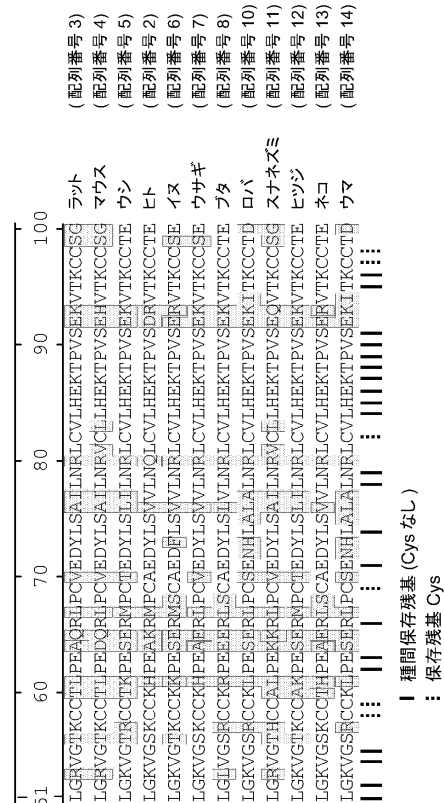


図 6F

【 図 6 G 】

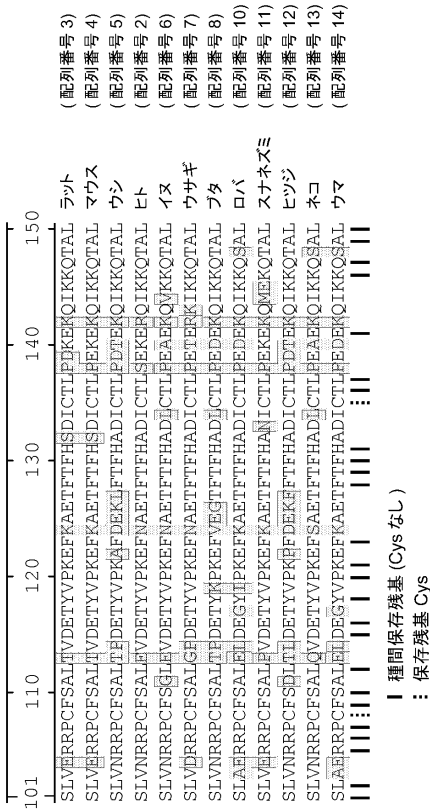


図 6G

【 図 6 H 】

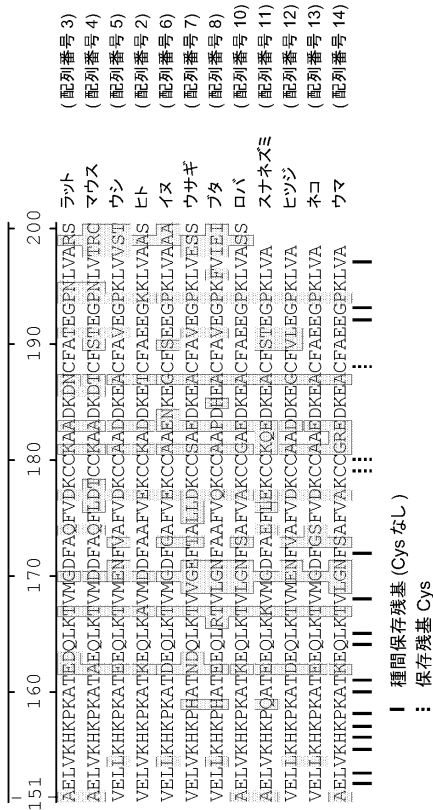


図 6H

【 図 7 】

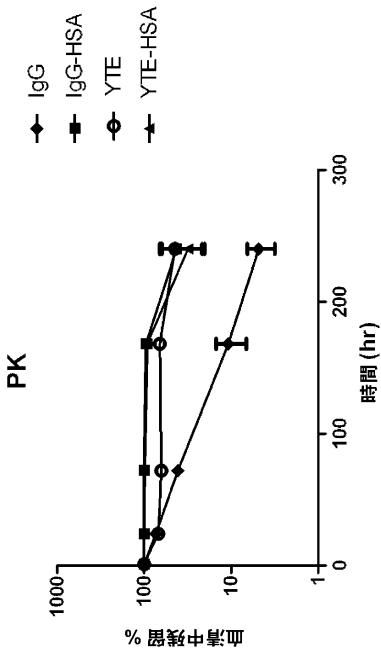


図 7

【 図 8 A 】

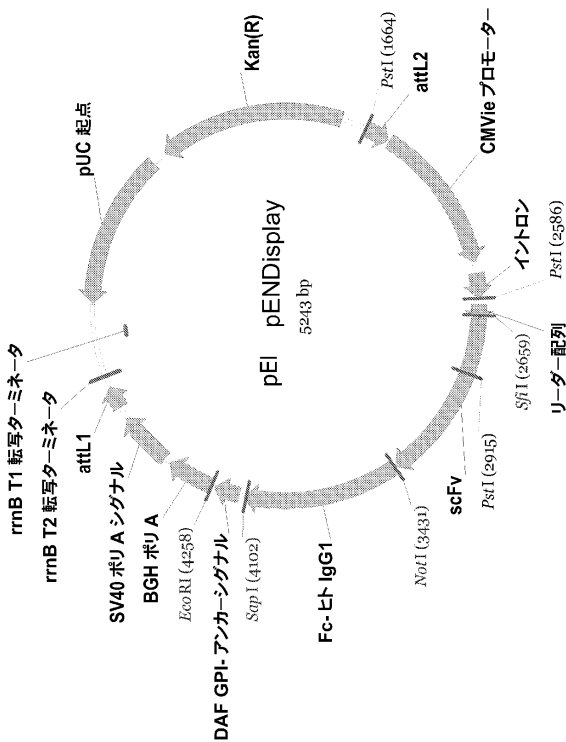


図 8A

【図 1 1 D】

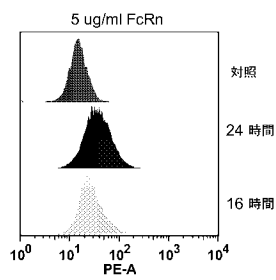


図 11D

【図 1 2】

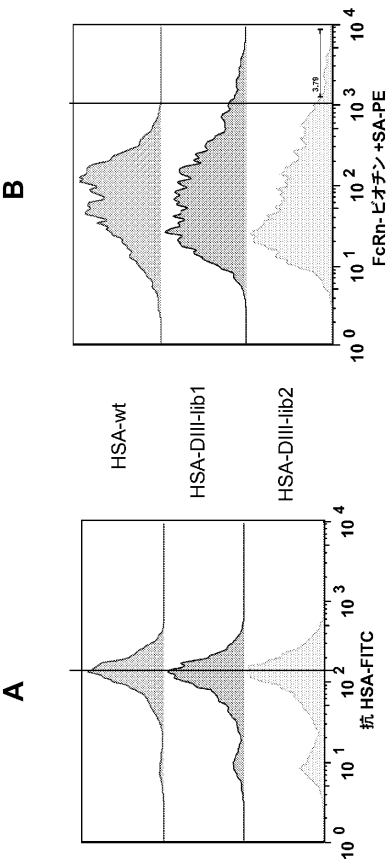


図 12

【図 1 3 A】

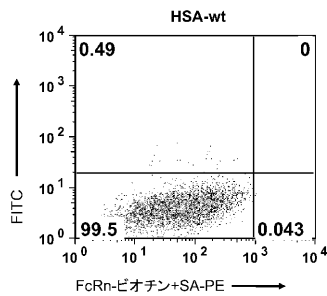


図 13A

【図 1 3 B】

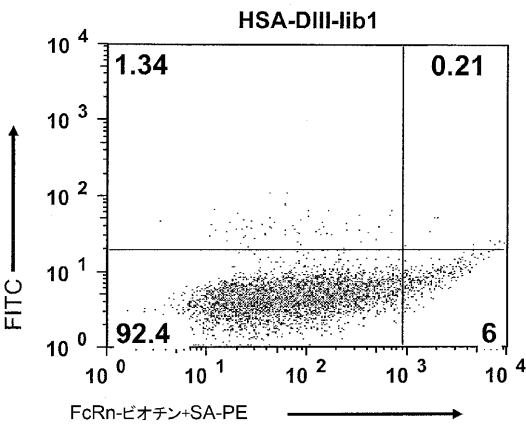


図 13B

【図 1 3 C】

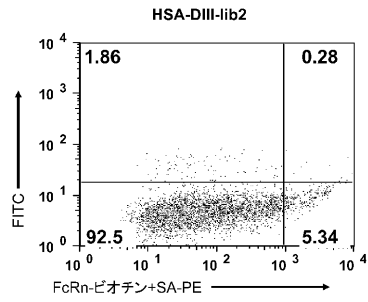


図 13C

【図 1 4 A】

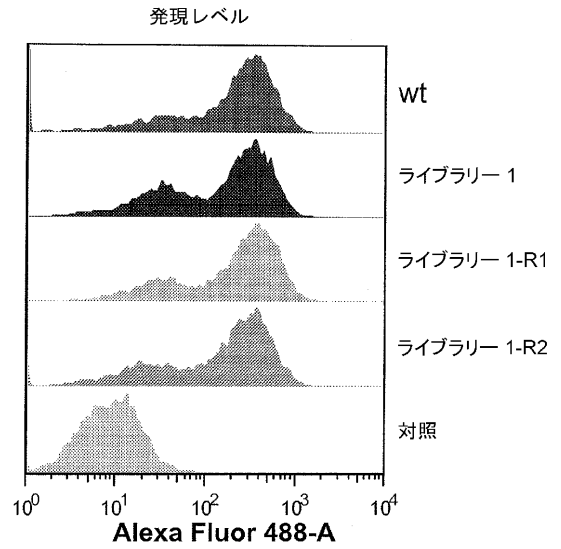


図 14A

【図 1 4 B】

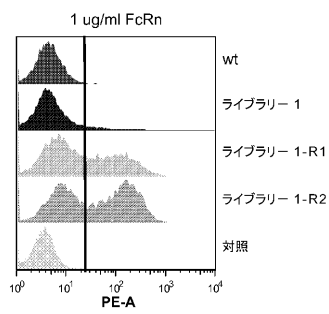


図 14B

【図 1 4 C】

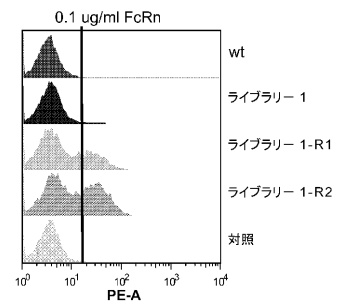


図 14C

【 図 1 5 】

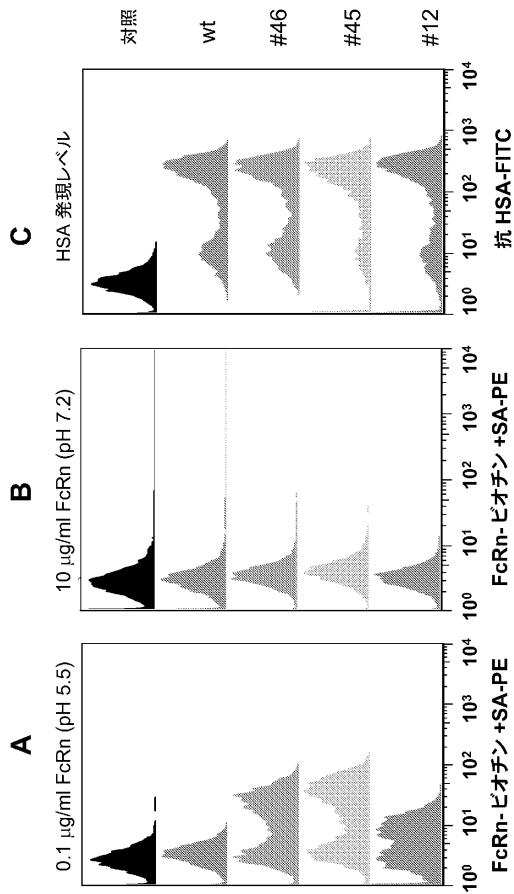


図 15

【 図 1 6 】

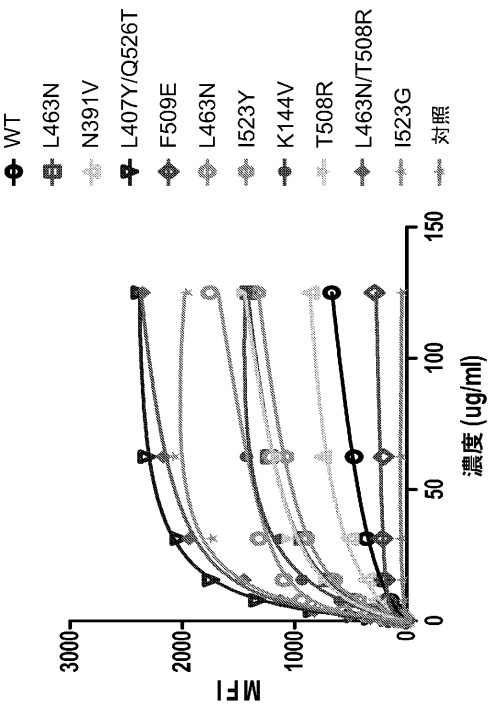


図 16

【 図 1 7 】

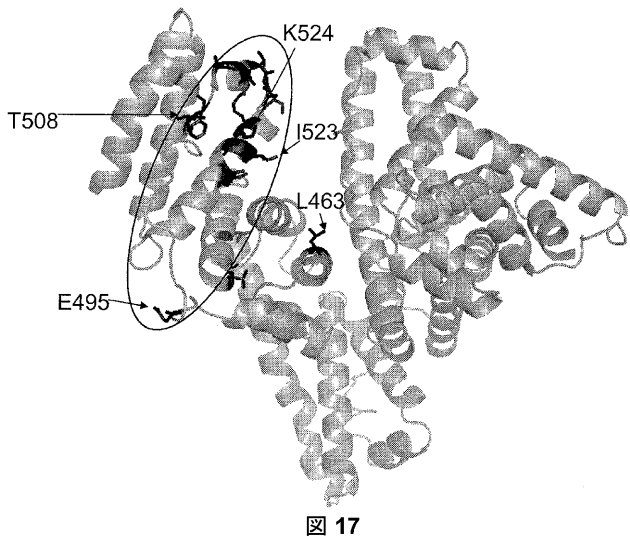


図 17

【 図 1 8 】

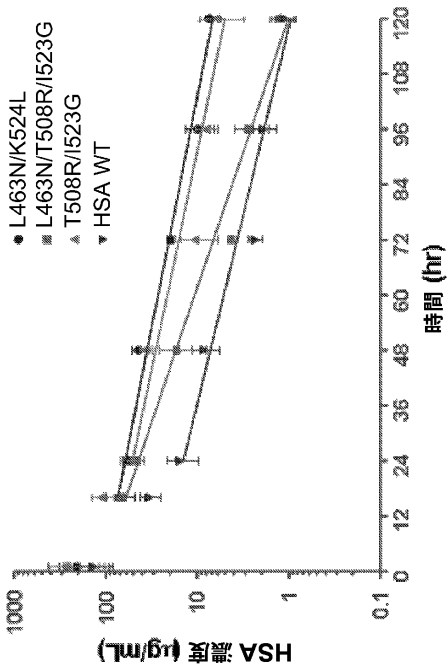


図 18

【配列表】

2014510518000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/47040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/38; A61K 47/48; C07K 1/00 (2012.01) USPC - 514/15.2, 530/363 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/15.2, 530/363 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/776 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar: "Human serum albumin", HSA; position or amino acid or Leu or Thr or Ile or Lys or substitution or mutation; serum half-life; 463 OR 508 OR 523 OR 524 GenCore 6.3: SEQ ID NO: 2 and 18		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/126920 A2 (McDonagh, et al.) 15 October 2009 (15.10.2009) claim 89, SEQ ID NO 57; pg 23, ln 1-15; pg 52, ln 27-31	2 and 2/5
A	US 2011/0002888 A1 (Rosen, et al.) 06 January 2011 (06.01.2011) para [0141]	1-5
A	Andersen et al. Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding. J. Biol. Chem. 2010, 285(7):4826-4836	1-5
A	Kenanova, et al. Tuning the serum persistence of human serum albumin domain III: diabody fusion proteins. Protein Engineering, Design & Selection 2010, 23(10):789-798	1-5
A,P	Andersen et al. Structure-based mutagenesis reveals the albumin-binding site of the neonatal Fc receptor. Nature Communications ePub 03 January 2012, Volume:3, Article number:610	1-5
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 January 2012 (23.01.2012)		Date of mailing of the international search report 13 FEB 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/47040

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
because the claim is directed to an unspecified SEQ ID NO:
3. ☒ Claims Nos.: 6-19, 21-32
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

(72)発明者 ガオ, チャンショウ

アメリカ合衆国 20854 メリーランド州, ポトマック, メープルクレスト レーン 10822

(72)発明者 チャウダリー, チェティ

アメリカ合衆国 20874 メリーランド州, ジャーマンタウン, アpartment 24, スイートガム サークル 19904

(72)発明者 ヤオ, シャオタオ

アメリカ合衆国 20874 メリーランド州, ジャーマンタウン, ファルコンクレスト ロード 13914

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA40 CA02 HA01

4C084 AA02 AA07 BA44 NA03 NA13

4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA70 EA20 FA74