

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6441682号  
(P6441682)

(45) 発行日 平成30年12月19日(2018.12.19)

(24) 登録日 平成30年11月30日(2018.11.30)

(51) Int.Cl.	F 1
C 07 K 14/765	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
C 12 N 1/19	(2006.01)
C 12 N 1/15	(2006.01)
C 12 N 1/21	(2006.01)
	C O 7 K 14/765
	C 12 N 5/10
	C 12 N 1/19 Z N A
	C 12 N 1/15
	C 12 N 1/21

請求項の数 14 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-561473 (P2014-561473)
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(65) 公表番号	特表2015-512893 (P2015-512893A)
(43) 公表日	平成27年4月30日 (2015.4.30)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/055487
(87) 國際公開番号	W02013/135896
(87) 國際公開日	平成25年9月19日 (2013.9.19)
審査請求日	平成28年3月4日 (2016.3.4)
(31) 優先権主張番号	12160007.6
(32) 優先日	平成24年3月16日 (2012.3.16)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2012/058206
(32) 優先日	平成24年5月4日 (2012.5.4)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者	518220970 アルブミディクス リミティド イギリス国, ノッティンガム エヌジー7 1エフディー, キャッスル ブールバー ド 59, キャッスル コート
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(74) 代理人	100141977 弁理士 中島 勝
(74) 代理人	100150810 弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アルブミン変種

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列を有する親アルブミンの変種アルブミン、その断片、または前記変種アルブミンもしくはその断片を含んでなる融合ポリペプチドであるポリペプチドであって、

前記ポリペプチドが、前記変種アルブミン、断片、または融合ポリペプチドのドメイン I 内に、親アルブミンのドメイン I と比較して 1 つまたは複数の改変を有し、且つ、前記変種アルブミン、断片、または融合ポリペプチドのドメイン III 内に、親アルブミンのドメイン III と比較して 1 つまたは複数の改変を有し、

ここで、親アルブミンは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有すると共に、親アルブミンのドメイン I は、配列番号 2 の 1 ~ 197 位に対応するアミノ酸残基により規定され、且つ、親アルブミンのドメイン III は、配列番号 2 の 381 ~ 585 位に対応するアミノ酸残基により規定され、

ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 98 % の配列同一性を有し、

前記ポリペプチドが、親アルブミン、その断片、または前記親アルブミンもしくはその断片を含んでなる融合ポリペプチドの F c R n に対する結合親和性と比較して、F c R n に対するより強力な結合親和性および / またはより長い血漿半減期を有し、

ここで、ドメイン I 内の前記改変が、配列番号 2 の 83 位に対応する位置のアミノ酸残基における T 83 N , K から選択される改変と、配列番号 2 の 111 位に対応する位置のア

10

20

ミノ酸残基におけるN 1 1 1 D , E , G , Qから選択される改変とを少なくとも含み、ドメインIII内の前記改変が、配列番号2の5 7 3位に対応する位置のアミノ酸残基の改変を少なくとも含む、ポリペプチド。

**【請求項 2】**

ドメインI内の前記改変が、配列番号2の7 8 ~ 8 2位、8 4 ~ 1 1 0位及び1 1 2 ~ 1 2 0位のいずれかに相当する位置から選択される1又は2以上の位置のアミノ酸残基の改変を更に含み、ドメインIII内の前記改変が、配列番号2の4 2 5、5 0 5、5 1 0、5 1 2、5 2 4、5 2 7、5 3 1、5 3 4、5 6 9、5 7 5位のいずれかに相当する位置から選択される位置のアミノ酸残基の改変を更に含む、請求項1に記載のポリペプチド。

**【請求項 3】**

請求項1又は2のいずれか一項に記載のポリペプチドと、治療的、予防的、診断用、造影用またはその他の有益な部分から選択される融合パートナーポリペプチドとを含んでなる、融合ポリペプチド。

**【請求項 4】**

アルブミン変種、その断片、または前記変種アルブミンもしくはその断片を含んでなる融合ポリペプチドであって、親アルブミン、その断片、または前記親アルブミンもしくはその断片を含んでなる融合ポリペプチドのFcRnに対する結合親和性と比較して、FcRnに対するより強い結合親和性および/またはより長い血漿半減期を有するポリペプチドを調製する方法であって、親アルブミンは、配列番号2のアミノ酸配列を有すると共に、前記方法が、

(a) 配列番号2に対する少なくとも9 4 %の配列同一性を有するアルブミンをコードする核酸を提供するステップと；

(b) ステップ(a)の前記核酸配列を修飾して、i. 前記親アルブミンのドメインIの1つまたは複数の位置に相当する位置における改変、および、前記親アルブミンのドメインIIIの1つまたは複数の位置に相当する位置における改変を含んでなる、変種アルブミン、その断片、または前記変種アルブミンもしくはその断片を含んでなる融合ポリペプチドであるポリペプチドをコードし、ここで、親アルブミンのドメインIは、配列番号2の1 ~ 1 9 7位に対応するアミノ酸残基により規定され、且つ、親アルブミンのドメインIIIは、配列番号2の3 8 1 ~ 5 8 5位に対応するアミノ酸残基により規定されるステップと；

(c) 任意選択的に、ステップ(b)の前記配列修飾を適切な宿主細胞中に導入するステップと；

(d) 任意選択的に、前記ポリペプチドの発現をもたらす条件下で、前記細胞を適切な成長培地中で培養するステップと；

(e) 任意選択的に、前記ポリペプチドを前記成長培地から回収するステップとを含んでなり、

(f) 前記ポリペプチドが、親アルブミン、その断片、または前記親アルブミンもしくはその断片を含んでなる融合ポリペプチドと比較して、FcRnに対するより強力な結合親和性および/またはより長い血漿半減期を有するとともに、

前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも9 8 %の配列同一性を有し、

ここで、ドメインI内の前記改変が、配列番号2の8 3位に対応する位置のアミノ酸残基におけるT 8 3 N , Kから選択される改変と、配列番号2の1 1 1位に対応する位置のアミノ酸残基におけるN 1 1 1 D , E , G , Qから選択される改変とを少なくとも含み、ドメインIII内の前記改変が、配列番号2の5 7 3位に対応する位置のアミノ酸残基の改変を少なくとも含む、方法。

**【請求項 5】**

ドメインI内の前記改変が、配列番号2の7 8 ~ 8 2位、8 4 ~ 1 1 0位及び1 1 2 ~ 1 2 0位のいずれかに相当する位置から選択される1又は2以上の位置のアミノ酸残基の改変を更に含み、ドメインIII内の前記改変が、配列番号2の4 2 5、5 0 5、5 1 0、

10

20

30

40

50

512、524、527、531、534、569、575位のいずれかに相当する位置から選択される位置のアミノ酸残基の改変を含む、請求項4に記載の方法。

**【請求項6】**

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドと、複合化パートナーとを含んでなる、複合体。

**【請求項7】**

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドと、治療的、予防的、診断用、造影用またはその他の有益な部分とを含んでなる、会合体。

**【請求項8】**

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項6に記載の複合体、または請求項7に記載の会合体を含んでなる、ナノ粒子または微粒子。 10

**【請求項9】**

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項6に記載の複合体、請求項7に記載の会合体、または請求項8に記載のナノ粒子または微粒子を含んでなる組成物であって、前記組成物が、対応する親アルブミン、その断片、または前記親アルブミンもしくは断片を含んでなる融合ポリペプチド、複合体、会合体またはナノ粒子もしくは微粒子を含んでなる組成物と比較して、FcRnに対するより強力な結合親和性および/またはより長い血漿半減期を有する、組成物。

**【請求項10】**

治療的、予防的、診断用、造影用またはその他の有益な部分のFcRnに対する結合親和性および/または血漿中半減期を増加させるための、請求項9に記載の組成物。 20

**【請求項11】**

(a) 分子がポリペプチドである場合、前記分子を請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドに、または請求項6に記載の複合体に、融合または複合化させるステップと；前記分子を請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドに、または請求項6に記載の複合体に、結合させるステップと；前記分子を請求項8に記載のナノ粒子または微粒子中で、または請求項9又は10に記載の組成物中で、請求項7に記載の会合体に組み込むステップと；

(b) 分子がポリペプチドでない場合、前記分子を請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドに、または請求項6に記載の複合体に、複合化させるステップと；前記分子を請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドに、または請求項6に記載の複合体に、結合させるステップと；前記分子を請求項8に記載のナノ粒子または微粒子中で、または請求項9又は10のいずれか一項に記載の組成物中で、請求項7に記載の会合体に組み込むステップとを含んでなる、分子のFcRnに対する結合親和性および/または血漿中半減期を増加させる方法。 30

**【請求項12】**

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは融合ポリペプチドをコードする、核酸。

**【請求項13】**

請求項12に記載の核酸を含んでなる、ベクター。 40

**【請求項14】**

請求項12に記載の核酸または請求項13に記載のベクターを含んでなる、宿主細胞。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

配列表への言及

本出願は、参照によって本明細書に援用する、コンピューター可読形式の配列表を含有する。

**【0002】**

本発明は、アルブミン、その断片、またはアルブミンまたはその断片を含んでなる融合 50

ポリペプチドと比較して、FcRnに対する結合親和性の変化および／または半減期の変化を有する、アルブミン変種またはその断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドに関する。本発明は、使用者または用途の要件および希望に応じて、アルブミンの結合親和性および／または半減期を調節できるようにする。

#### 【背景技術】

##### 【0003】

アルブミンは、哺乳類の血漿に自然に見られるタンパク質であり、その中で最も豊富なタンパク質である。それは所望の血液浸透圧を維持する上で、また血流中の様々な物質輸送においても重要な役割を有する。アルブミンは、ヒト、ブタ、マウス、ラット、ウサギおよびヤギをはじめとする多数の種から特性解析されており、それらは配列および構造の高度な相同意を共有する。10

##### 【0004】

アルブミンは、生体内でその受容体である新生児Fc受容体(FcRn)「Bramble 11」に結合し、この相互作用は、アルブミンの血漿半減期にとって重要であることが知られている。FcRnは、膜結合タンパク質であり、多数の細胞および組織型中で発現する。FcRnは、アルブミンを細胞内分解から守ることが分かっている(Roopenarian D.C. and Akilesh, S. (2007), Nat. Rev. Immunol. 7, 715-725)。FcRnは、ヒトなどの哺乳類血清中において、IgGsおよびアルブミンの高レベルを維持するのに寄与する二官能性分子である。

##### 【0005】

FcRnと免疫グロブリン(IgG)の相互作用が、先行技術で特性解析されている一方で、FcRnとアルブミンの相互作用は、特徴がよく分かっていない。主なFcRn結合部位は、DIII(381~585)中に局在化する(Andersen et al. (2010), Clinical Biochemistry 43, 367-372)。特にヒスチジンH464、H510、およびH536、およびLys500などのいくつかの主要アミノ酸が、結合に重要であることが示されている(Andersen et al. (2010), Nat. Commun. 3: 610. DOI: 10.1038/ncomms1607)。データは、IgGとアルブミンが、FcRn上の異なる部位に非協調的に結合することを示す(Andersen et al. (2006), Eur. J. Immunol. 36, 3044-3051; Chaudhury et al. (2006), Biochemistry 45, 4983-4990)。2030

##### 【0006】

マウスFcRnは、マウスおよびヒトからのIgGに結合する一方で、ヒトFcRnは、識別力がより高そうであることが知られている(Ober et al. (2001) Int. Immunol. 13, 1551-1559)。Andersen et al. (2010) Journal of Biological Chemistry 285 (7): 4826-36は、マウスおよびヒトアルブミン(全ての可能な組み合わせ)のそれぞれに対する、ヒトおよびマウスFcRn親和性を記載する。生理学的pHでは、どちらの受容体に対しても、どちらの種からのアルブミンの結合も観察されなかった。酸性pHでは、結合親和性に100倍の違いが観察された。いかなる場合でも、双方の受容体に対する、いずれの種からのアルブミンおよびIgGの結合も相加的であった。40

##### 【0007】

ヒト血清アルブミン(HSA)は、585個のアミノ酸のポリペプチドとして良く特性解析されおり、その配列は、Peters, T., Jr. (1996) All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications pp10, Academic Press, Inc., Orlando (ISBN 0-12-552110-3)にある。それは、その受容体FcRnに対する特徴的な結合を有して、pH 6.0で結合するが、pH 7.4では結合しない。

##### 【0008】

10

20

30

40

50

HSAの血漿半減期は、およそ19日間であることが分かっている。置換D494Nを有する、より短い血漿半減期を有する天然変種が同定されている（Peach, R. J. and Brennan, S. O., (1991) *Biochim Biophys Acta*. 1097: 49 - 54）。この置換は、野生型アルブミンには存在しないN-グリコシル化部位をこの変種中に生じた。グリコシル化またはアミノ酸変化が、血漿半減期の変化の原因であるかどうかは分かっていない。

#### 【0009】

アルブミンは長い血漿半減期を有し、この特性のために、薬物送達で利用することが提案されている。アルブミンは、薬理的に有益な化合物に複合化結合されており（国際公開第2000/69902号パンフレット）、複合体はアルブミンの長い血漿半減期を維持することが分かった。結果として生じる複合体の血漿半減期は、有益な治療用化合物のみの血漿半減期よりも、一般に大幅に長い。

10

#### 【0010】

さらにアルブミンは、治療的に有益なペプチドに遺伝子的に融合されており（国際公開第2001/79271A号パンフレットおよび国際公開第2003/59934号パンフレット）、典型的な結果では、融合物は、治療的に有益なペプチドの活性と、治療的に有益なペプチドのみの血漿半減期よりも大幅に長い血漿半減期とを有する。

#### 【0011】

Otagiri et al (2009), *Biol. Pharm. Bull.* 32 (4), 527 - 534 は、70個を上回るアルブミン変種を開示し、その内25個は、ドメインIII内で変異していることが分かった。カルボキシ末端の最後の175個のアミノ酸を欠く天然変種は、半減期の低下を有することが示されている（Andersen et al (2010), *Clinical Biochemistry* 43, 367 - 372）。Iwao et al (2007) は、マウスモデルを使用して天然のヒトアルブミン変種の半減期を研究し、K541EおよびK560Eは半減期を低下させ、E501KおよびE570Kは半減期を増大させ、K573Eの半減期に対する効果はほぼ皆無であることを見出した（Iwao, et al. (2007) *B. B. A. Proteins and Proteomics* 1774, 1582 - 1590）。Galliano et al (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1225, 27 - 32 は、天然変種E505Kを開示する。Minchiotti et al (1990) は、天然変種K536Eを開示する。Minchiotti et al (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 916, 411 - 418 は、天然変種K574Nを開示する。Takahashi et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4413 - 4417 は、天然変種D550Gを開示する。Carlson et al (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8225 - 8229 は、天然変種D550Aを開示する。

20

#### 【0012】

国際公開第2011/051489号パンフレットおよび国際公開第2012/150319号パンフレット（PCT/EP2012/058206）は、FcRnに対するアルブミンの結合を調節するアルブミン中のいくつかの点変異を開示し、国際公開第2010/092135号パンフレットは、アルブミン中の複合化結合のために利用できるチオール数を増大させるアルブミン中のいくつかの点変異を開示し、開示はアルブミンとFcRnの結合に対する変異の効果については言及していない。国際公開第2011/103076号パンフレットは、HSAのドメインIII内にそれぞれ置換を含有する、アルブミン変種を開示する。国際公開第2012/112188号パンフレットは、HSAのドメインIII内に置換を含有する、アルブミン変種を開示する。

30

#### 【0013】

アルブミンは、いくつかのリガンドと結合する能力を有し、これらはアルブミンと結合（会合）するようになる。この特性は、アルブミンと非共有結合的に結合する能力を有する、薬剤の血漿半減期を延長するのに利用されている。これは、わずかなまたは皆無のア

50

ルブミン結合特性を有する薬学的に有益な化合物 (pharmaceutical beneficial compound) を、アルブミン結合特性を有する部分に結合させることでも達成され得る、総説、Kratz (2008) Journal of Controlled Release 132, 171 - 183、およびその中の参考文献を参照されたい。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0014】

アルブミンは、薬理的に有益な化合物の製剤中で使用され、このような製剤は、例えばアルブミンのナノ粒子または微粒子であってもよいが、これに限定されるものではない。これらの例では、薬理的に有益な化合物または化合物混合物の送達は、アルブミンの受容体に対する親和性の改変から恩恵を被ってもよく、その中では、有益な化合物が、送達手段としてアルブミンと結びつくことが示されている。形成される会合（例えばLevemir（登録商標）、Kurtzhals et al. Biochem. J. 1995; 312: 725 - 731であるが、これに限定されるものではない）、複合体または融合ポリペプチドの血漿半減期を、何が決定するのかは明らかでないが、アルブミンと、選択された薬理的に有益な化合物 / ポリペプチドとの組み合わせの結果であると思われる。治療が意図される適応症の詳細に従って、特定の薬物をデザインできるように、結合、複合化または融合の構成要素が与えるよりも、長いまたはより短い血漿半減期を達成し得るように、所与のアルブミン複合体、会合またはアルブミン融合ポリペプチドの血漿半減期を制御できることが望ましいであろう。

#### 【0015】

アルブミンは、腫瘍中で蓄積して分解することが知られており；関節リウマチ患者の炎症性関節に蓄積することが示されている。総説、Kratz (2008) Journal of Controlled Release 132, 171 - 183、およびその中の参考文献を参照されたい。FcRnに対する親和性が増大しているHSA変種は、薬理的に有益な化合物の送達に有利であろうことが想定される。

#### 【0016】

Kenanova et al (2009) J. Nucl. Med. ; 50 (Supplement 2) : 1582) によって記載されるような、より短い半減期または制御された血清薬物動態を提供するために、FcRnに対する結合がわずかまたは皆無であるアルブミン変種を有することが望ましいかもしれない。

#### 【0017】

Kenanova et al (2010, Protein Engineering, Design & Selection 23(10) : 789 - 798 ; 国際公開第2010/118169号パンフレット) は、(pH 7 ~ 8で溶解する) HSAのドメインIIIの構造モデルと(pH 6.4で溶解する) FcRnの構造モデルとを含んでなる、ドッキングモデルを開示する。Kenanova et al は、ドメインIII内の464、505、510、531および535位が、FcRnと潜在的に相互作用することを開示する。464、510および535位のヒスチジンは特に興味深いことが、Chaudhury et al. (2006、前掲書中) によって特定され、これらはマウス中で、顕著な親和性低下とより短い半減期を有することが、Kenanova (2010、前掲書中) によって示された。しかしKenanova et al の研究は、HSAのドメインIIIに限定され、したがってHSAをその天然の無傷の形状で検討していない。さらに同定された位置は、FcRn受容体に対する親和性の低下をもたらす。

#### 【0018】

本発明は、FcRn受容体に対する調節された（すなわち変化した）結合親和性を有する、さらなる変種を提供する。したがってアルブミン部分または部分群を使用して、アルブミン部分を含んでなる、融合ポリペプチド、複合体、会合、ナノ粒子および組成物のFcRnに対する結合親和性および / または半減期を調節してもよい。

10

20

30

40

50

**【課題を解決するための手段】**

**【0019】**

本発明は、配列番号2の成熟ポリペプチドのドメインI内に、およびドメインIII内に、1つまたは複数の（いくつかの）改変を含んでなり、またはその他のアルブミンまたはその断片の同等の位置に、1つまたは複数の（いくつかの）改変を含んでなる、アルブミン変種に関する。

**【0020】**

本発明はまた、配列番号2の成熟ポリペプチドのドメインI内に、またはその他のアルブミンまたはその断片の同等の位置に、1つまたは複数の（いくつかの）改変を含んでなる、アルブミン変種にも関する。

10

**【0021】**

本発明はまた、配列番号2の成熟ポリペプチドのドメインII内に、またはその他のアルブミンまたはその断片の同等の位置に、1つまたは複数の（いくつかの）改変を含んでなるアルブミン変種にも関する。

**【0022】**

本発明また、変種をコードする単離ポリヌクレオチド；ポリヌクレオチドを含んでなる核酸コンストラクト、ベクター、および宿主細胞に関し；変種を生成する方法にも関する。

**【0023】**

本発明はまた、本発明による変種アルブミンまたはその断片と、有益な治療成分とを含んでなる複合体または会合に関し、または本発明の変種アルブミンまたはその断片と、融合パートナーポリペプチドとを含んでなる融合ポリペプチドにも関する。

20

**【0024】**

本発明は、変種アルブミン、その断片、変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、または本発明による変種アルブミンまたはその断片を含んでなる複合体、または本発明による変種アルブミンまたはその断片を含んでなる会合を含んでなる、組成物にさらに関する。組成物は、好ましくは医薬組成物である。

**【0025】**

本発明は、変種アルブミン、その断片、変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる複合体、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる会合を含んでなる、医薬組成物にさらに関する。

30

**【0026】**

本発明はまた、変種、断片、融合ポリペプチド、複合体、会合、ナノ粒子、および微粒子の使用にも関する。

**【0027】**

本発明はまた、変種アルブミン、その断片、変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる複合体、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる会合を調製する方法にも関する。

**【図面の簡単な説明】**

**【0028】**

40

【図1-1】(i) 完全長成熟HSA(Hu\_1\_2\_3)、(ii) HSA(Hu\_1\_3)のドメインIおよびドメインIIIを含んでなるアルブミン変種、(iii) HSA(Hu\_2\_3)のドメインIIおよびドメインIIIを含んでなるアルブミン変種、(iv) 完全長アカゲザル(Macaca mulatta)アルブミン(Mac\_mu1)、(v) 完全長ドブネズミ(Rattus norvegicus)アルブミン(ラット)、および(vi) 完全長ハツカネズミ(Mus musculus)アルブミン(マウス)のアミノ酸配列の多重アラインメントである。(完全長HSAに対する)500、550、および573位が、矢印で示される。図1-1では、ドメインI、II、およびIIIは、(それぞれ)1、2、および3と称される。

**【図1-2】**(i) 完全長成熟HSA(Hu\_1\_2\_3)、(ii) HSA(Hu\_1

50

\_3) のドメインIおよびドメインIIIIを含んでなるアルブミン変種、(iii) HSA(Hu\_2\_3)のドメインIIおよびドメインIIIIを含んでなるアルブミン変種、(iv) 完全長アカゲザル(Macaca mulatta)アルブミン(Mac\_mu1)、(v) 完全長ドブネズミ(Rattus norvegicus)アルブミン(ラット)、および(vi) 完全長ハツカネズミ(Mus musculus)アルブミン(マウス)のアミノ酸配列の多重アラインメントである。(完全長HSAに対する)500、550、および573位が、矢印で示される。図1-2では、ドメインI、II、およびIIIは、(それぞれ)1、2、および3と称される。

【図2-1】ヒト、ヒツジ、マウス、ウサギおよびヤギからの成熟アルブミン、およびチンパンジー(「Chimp」)、マカク、ハムスター、モルモット、ラット、ウシ、ウマ、ロバ、イヌ、ニワトリ、およびブタからの未熟アルブミンのアミノ酸配列の多重アラインメントである。ドメイン1、2、および3の開始および末端アミノ酸(Docktail et al(The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274(41): 29303-29310)によって定義される)は、成熟ヒトアルブミンに対して示される。10

【図2-2】ヒト、ヒツジ、マウス、ウサギおよびヤギからの成熟アルブミン、およびチンパンジー(「Chimp」)、マカク、ハムスター、モルモット、ラット、ウシ、ウマ、ロバ、イヌ、ニワトリ、およびブタからの未熟アルブミンのアミノ酸配列の多重アラインメントである。ドメイン1、2、および3の開始および末端アミノ酸(Docktail et al(The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274(41): 29303-29310)によって定義される)は、成熟ヒトアルブミンに対して示される。20

【図2-3】ヒト、ヒツジ、マウス、ウサギおよびヤギからの成熟アルブミン、およびチンパンジー(「Chimp」)、マカク、ハムスター、モルモット、ラット、ウシ、ウマ、ロバ、イヌ、ニワトリ、およびブタからの未熟アルブミンのアミノ酸配列の多重アラインメントである。ドメイン1、2、および3の開始および末端アミノ酸(Docktail et al(The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274(41): 29303-29310)によって定義される)は、成熟ヒトアルブミンに対して示される。

【図2-4】ヒト、ヒツジ、マウス、ウサギおよびヤギからの成熟アルブミン、およびチンパンジー(「Chimp」)、マカク、ハムスター、モルモット、ラット、ウシ、ウマ、ロバ、イヌ、ニワトリ、およびブタからの未熟アルブミンのアミノ酸配列の多重アラインメントである。ドメイン1、2、および3の開始および末端アミノ酸(Docktail et al(The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274(41): 29303-29310)によって定義される)は、成熟ヒトアルブミンに対して示される。30

【図3】それらの特性に基づく、保存アミノ酸群である。

【図4】shFcRn-HSAドッキングモデルの描写である。(A~B)複合体の2つの配向が示される。アルブミンは空間充填略図によって示され、FcRnはリボン略図として示される。HSAのコア結合境界面は、ピンクで強調表示される(グレースケールではこれは最も濃い(ほぼ黒色の)領域として見られる; DI(CBI))一方で、境界面から遠位に局在化する領域は、DII(オレンジ)として示され、DIIDIはサブドメインDIIIA(カラーではシアン)とDIIIB(カラーでは青色)に分けられる。40

【図5】サンプルをpH5.5で固定化shFcRn-HIS(約1500~2500RU)上に注入した、pH5.5におけるWT\_HSA、HSA\_K573P、およびHSA\_N1111Q/K573PのshFcRn結合である。

【図6】shFcRn(空間充填略図)と、78~88位および108~112位を含んでなるHSAループを含むHSA(リボン略図)DI、DIIおよびDIIDIとの間の空間的関係性を示す、提案されるshFcRn-HSAドッキングモデルである。

【発明を実施するための形態】50

## 【0029】

## 定義

変種：「変種」という用語は、1つまたは複数の（いくつかの）改变、すなわち1つまたは複数の（いくつかの）位置における、置換、挿入、および／または欠失による、親アルブミンに由来するポリペプチドを意味する。置換は、異なるアミノ酸による、位置を占めるアミノ酸の置換を意味し；欠失は、位置を占めるアミノ酸の除去を意味し；挿入は、位置を占めるアミノ酸に直接隣接する、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個などの1個以上（いくつか）の、好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することを意味する。置換に関して、「直接隣接する」は、位置を占めるアミノ酸（「指名されたアミノ酸」）のN側（「上流」）またはC側（「下流」）であってもよい。したがって「X」と指名された／番号付けされたアミノ酸では、挿入は、「X+1」（「下流」）の位置または「X-1」（「上流」）の位置であってもよい。10

## 【0030】

変異体：「変異体」という用語は、変種をコードするポリヌクレオチドを意味する。

## 【0031】

野生型アルブミン：「野生型」（WT）アルブミンという用語は、動物またはヒトで自然に見られるのと同じアミノ酸配列を有するアルブミンを意味する。

## 【0032】

親アルブミン：「親」または「親アルブミン」という用語は、それに対して人の手によつて改变が加えられて、本発明のアルブミン変種が作成される、アルブミンを意味する。20  
親は、天然の（野生型）ポリペプチド、またはそのアレルまたはその変種であってもよい。  
。

## 【0033】

アルブミン：アルブミンは、タンパク質であり、哺乳類の血漿中で最も大量のタンパク質を構成し、多数の哺乳類からのアルブミンが、生化学的方法によっておよび／または配列情報によって、特性解析されている。例えばヒト血清アルブミン（HSA）などのいくつかのアルブミンは、結晶学的に特性解析され、構造が決定されている（HSA : He XM, Carter DC (July 1992). "Atomic structure and chemistry of human serum albumin". Nature 358 (6383) : 209 - 15; ウマアルブミン : Ho, J. X. et al. (2001). X-ray and primary structure of horse serum albumin (*Equus caballus*) at 0.27-nm resolution. Eur J Biochem. 215 (1) : 205 - 12）。30

## 【0034】

「アルブミン」という用語は、HSAまたはHSAドメインと同一のおよび／または非常に良く似た、三次元の（三次）構造を有して、HSAまたは該当するドメインに類似した特性を有する、タンパク質を意味する。同様の三次元構造は、例えば本明細書で言及される種からのアルブミンの構造である。アルブミンのいくつかの主な特性は、i) 血漿容積を調節する能力（膨張活性）、ii) 約19日間±5日の長い血漿半減期、iii) FcRnに対する結合、iv) リガンド結合、例えばビリルビン、脂肪酸、ヘミンおよびチロキシンをはじめとする、酸性親油性化合物などの内在性分子の結合（参照によって本明細書に援用する、Kragh-Hansen et al., 2002, Biol. Pharm. Bull. 25, 695の表1もまた参考されたい）、v) 例えばワルファリン、ジアゼパム、イブプロフェンおよびパクリタキセルのような薬剤などの酸性または電気陰性特性がある小型有機化合物の結合（参照によって本明細書に援用する、Kragh-Hansen et al., 2002, Biol. Pharm. Bull. 25, 695の表1もまた参考されたい）である。タンパク質または断片をアルブミンとして特徴付けるために、これらの全ての特性が満たされなくてもよい。例えば断片が、特定のリガンドまたは有機化合物の結合に関与するドメインを含まなければ、このような断片の変種もまた40  
50

、これらの特性も有することが期待されない。

**【0035】**

アルブミンは、一般におよそ20日間以上の長い血漿半減期を有し、例えばHSAは19日間の血漿半減期を有する。HSAの長い血漿半減期は、その受容体FcRnとの相互作用を通じて媒介されていることが知られているが、HSAの長い半減期の背後にある正確な機序の理解または知識は、本発明に必須でない。

**【0036】**

本発明によるアルブミンタンパク質の例としては、ヒト血清アルブミン（例えばAA A 9 8 7 9 7 または P 0 2 7 6 8 - 1、配列番号2（成熟）、配列番号4（未熟））、靈長類血清アルブミン、（チンパンジー血清アルブミンなど（例えば予測配列 X P \_ 5 1 7 2 10 3 3 . 2、配列番号5）、ゴリラ血清アルブミンまたはマカク血清アルブミン（例えばN P \_ 0 0 1 1 8 2 5 7 8、配列番号6）、齧歯類血清アルブミン（ハムスター血清アルブミン（例えばA 6 Y F 5 6、配列番号7）、モルモット血清アルブミン（例えばQ 6 W D N 9 - 1、配列番号8）、マウス血清アルブミン（例えばA A H 4 9 9 7 1 または P 0 7 7 2 4 - 1バージョン3、配列番号9）、およびラット血清アルブミン（例えばA A H 8 5 3 5 9 または P 0 2 7 7 0 - 1バージョン2、配列番号10）など）、ウシ血清アルブミン（例えばウシ血清アルブミン P 0 2 7 6 9 - 1、配列番号：11）、ウマ血清アルブミン（例えばP 3 5 7 4 7 - 1、配列番号12）またはロバ血清アルブミン（例えばQ 5 X L E 4 - 1、配列番号13）などのウマ科血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン（例えばP 4 9 0 6 5 - 1バージョン2、配列番号14）、ヤギ血清アルブミン（例えばA C F 1 0 3 9 1、配列番号15）、ヒツジ血清アルブミン（例えばP 1 4 6 3 9 - 1、配列番号16）、イヌ血清アルブミン（例えばP 4 9 8 2 2 - 1、配列番号17）、ニワトリ血清アルブミン（例えばP 1 9 1 2 1 - 1バージョン2、配列番号18）、およびブタ血清アルブミン（例えばP 0 8 8 3 5 - 1バージョン2、配列番号19）またはこのようなアルブミンと、少なくとも70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドが挙げられる。親または参照アルブミンは、HSA K 5 7 3 P（配列番号3）などの人為的変種、またはHSAのN末端とマカクアルブミンのC末端（配列番号20）、HSAのN末端とマウスアルブミンのC末端（配列番号21）、HSAのN末端とウサギアルブミンのC末端（配列番号22）、HSAのN末端とヒツジアルブミンのC末端（配列番号23）などのキメラアルブミンであってもよい。

**【0037】**

本出願の範囲に含まれるアルブミンのその他の例としては、卵白アルブミンが挙げられる（例えばP 0 1 0 1 2 . p r o : ニワトリ卵白アルブミン；O 7 3 8 6 0 . p r o : シチメンチョウ卵白アルブミン）。

**【0038】**

配列番号2で開示されるHSAまたはそのあらゆる天然アレルが、本発明による好ましいアルブミン（親アルブミン）である。HSAは、585個のアミノ酸残基からなり、67kDaの分子量を有するタンパク質である。その天然形態では、それはグリコシル化されていない。当業者は、HSAと本質的に同一特性を有するが、配列番号2と比較して1つまたは複数の（いくつかの）アミノ酸変化を有する、天然アレルが存在してもよいことを理解するであろう。本発明者らは、本発明による親アルブミンとしてこのような天然アレルの使用もまた想定する。

**【0039】**

親アルブミン、その断片、または本発明によるアルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドのアルブミン部分は、好ましくは、配列番号2で示されるHSAの配列と、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも86%、好ましくは少なくとも87%、好ましくは少なくとも88%、好ましくは少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも91%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくと

10

20

30

40

50

も 9 3 %、好ましくは少なくとも 9 4 %、好ましくは少なくとも 9 5 %、より好ましくは少なくとも 9 6 %、より好ましくは少なくとも 9 7 %、より好ましくは少なくとも 9 8 %、最も好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する。親アルブミンは、アルブミンの主な特性の少なくとも 1 つを、または H S A などのアルブミンと類似した三次構造を保つことが好ましい。配列同一性は、配列番号 2 の完全長に対するものでも、またはドメイン I I I からなり、またはそれを含んでなる分子（例えば配列番号 2 7）、ドメイン I I とドメイン I I I とからなり、またはそれを含んでなる分子（例えば配列番号 2 5）、ドメイン I とドメイン I I I とからなり、またはそれを含んでなる分子（例えば配列番号 2 4）、ドメイン I I I の 2 つのコピーからなり、またはそれを含んでなる分子（例えば配列番号 2 6）、ドメイン I I I の 3 つのコピーからなり、またはそれを含んでなる分子（例えば配列番号 2 8）、またはドメイン I とドメイン I I I の 2 つのコピーとからなり、またはそれを含んでなる分子（例えば配列番号 2 9）などの、配列番号 2 の 1 つまたは複数の（いくつかの）ドメインなどの断片からなり、またはそれを含んでなる分子に対するものであってもよい。10

#### 【 0 0 4 0 】

親は、好ましくは配列番号 4 ( H S A の未熟配列)、または配列番号 2 ( H S A の成熟配列) のアミノ酸配列を含んでなり、またはそれからなる。

#### 【 0 0 4 1 】

別の実施形態では、親は、配列番号 2 の成熟ポリペプチドのアレル変種である。

#### 【 0 0 4 2 】

親アルブミンは、非常に低いストリンジエンシー条件、低ストリンジエンシー条件、中程度のストリンジエンシー条件、中程度に高いストリンジエンシー条件、高ストリンジエンシー条件、または非常に高いストリンジエンシー条件下で、( i ) 配列番号 1 の成熟ポリペプチドコーディング配列、または( i i ) ( i ) の完全長相補鎖とハイブリダイズする、ポリヌクレオチドによってコードされてもよい( J . S a m b r o o k , E . F . F r i t s c h , a n d T . M a n i a t i s , 1 9 8 9 , 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 d e d i t i o n , C o l d Spring Harbor , New York )。

#### 【 0 0 4 3 】

当該技術分野で周知の方法に従って、配列番号 1 のポリヌクレオチドまたはその部分配列、ならびに配列番号 2 のアミノ酸配列またはその断片を使用して、核酸プローブをデザインし、異なる属または種の株からの親をコードする D N A を同定しクローンしてもよい。特に、その中の対応遺伝子を同定および単離するために、標準サンプルロット手順に続いて、このようなプローブを、関心のある属または種のゲノムまたは c D N A とのハイブリダイゼーションのために利用し得る。このようなプローブは、配列全体よりも大幅に短くあり得るが、例えば少なくとも 2 5 、少なくとも 3 5 、または少なくとも 7 0 など、少なくとも 1 4 ヌクレオチド長であるべきである。好ましくは、核酸プローブは、例えば少なくとも 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも 3 0 0 ヌクレオチド、少なくとも 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも 7 0 0 ヌクレオチド、少なくとも 8 0 0 ヌクレオチド、または少なくとも 9 0 0 ヌクレオチド長など、少なくとも 1 0 0 ヌクレオチド長である。D N A および R N A プローブの双方を利用し得る。プローブは、対応遺伝子を検出するために、( 例えば <sup>32</sup> P 、 <sup>3</sup> H 、 <sup>35</sup> S 、ビオチン、またはアビジンで ) 典型的に標識される。このようなプローブは、本発明に包含される。3040

#### 【 0 0 4 4 】

このようなその他の生物から作成されたゲノム D N A または c D N A ライブラリーを、上述のプローブとハイブリダイズして、親をコードする D N A についてスクリーニングしてもよい。このようなその他の生物からのゲノムのまたはその他の D N A は、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはその他の分離技術によって分離してもよい。ライブラリーからの D N A または分離 D N A は、ニトロセルロース、またはその他の

10

20

30

40

50

適切な担体材料上に移して、固定化してもよい。配列番号1またはその部分配列と相同的なクローンまたはDNAを同定化するために、担体材料がサザンプロット法で使用される。

#### 【0045】

本発明の目的では、ハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチドが、低い～非常に高いストリンジエンシー条件下で、配列番号1で示されるポリヌクレオチド、その相補鎖、またはその部分配列に相当する標識ヌクレオチドプローブとハイブリダイズすることを意味する。プローブがハイブリダイズする分子は、例えばX線フィルムまたは当該技術分野で公知のあらゆるその他の検出手段を使用して、検出し得る。

#### 【0046】

核酸プローブは、配列番号1の成熟ポリペプチドコーディング配列、すなわち配列番号1のヌクレオチド1～1785を含んでなり、またはそれからなってもよい。核酸プローブは、配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を含んでなり、またはそれからなってもよい。

#### 【0047】

少なくとも100ヌクレオチド長の長いプローブでは、非常に低い～非常に高いストリンジエンシー条件は、標準サザンプロット法手順に従って、至適には12～24時間にわたる、5×SSPE、0.3%SDS、200マイクログラム/m1の剪断変性サケ精子DNA、非常に低いおよび低いストリンジエンシーでは25%ホルムアミド、中程度のおよび中程度に高いストリンジエンシーでは35%ホルムアミド、または高いおよび非常に高いストリンジエンシーでは50%ホルムアミド中における、42°での予備ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションと定義される。担体材料は、最後に、45°(非常に低いストリンジエンシー)、50°(低ストリンジエンシー)、55°(中程度のストリンジエンシー)、60°(中程度に高いストリンジエンシー)、65°(高ストリンジエンシー)、または70°(非常に高いストリンジエンシー)で、2×SSC、0.2%SDSを使用して、それぞれ15分間にわたり3回洗浄される。

#### 【0048】

約15ヌクレオチド～約70ヌクレオチド長の短いプローブでは、ストリンジエンシー条件は、Bolton and McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48: 1390)に従った計算を使用して計算されたT<sub>m</sub>を約5°～約10°下回る温度における、0.9MのNaCl、pH 7.6の0.09Mのトリス-HCl、6mMのEDTA、0.5%NP-40、1×デンハルト液、1mMのピロリン酸ナトリウム、1mMのリン酸二水素ナトリウム、0.1mMのATP、および1mLあたり0.2mgの酵母RNA中における、標準サザンプロット法手順に従った、至適には12～24時間にわたる予備ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションと定義される。担体材料は、最後に、計算されたT<sub>m</sub>を約5°～約10°下回る温度で、0.1%SDS添加6×SCC中で15分間にわたり1回、および6×SSCを使用してそれぞれ15分間にわたり2回洗浄される。

#### 【0049】

親は、配列番号1の成熟ポリペプチドのコーディング配列と、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%などの少なくとも60%の配列同一性があり、アルブミンとして機能できるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドによって、コードされてもよい。一実施形態では、親は、配列番号1を含んでなり、またはそれからなる、ポリヌクレオチドによってコードされる。

#### 【0050】

アルブミン部分：本発明によるアルブミン変種またはその断片を含んでなる、融合ポリペプチド、複合体、会合、ナノ粒子、または組成物のアルブミン部分は、「アルブミン部分」または「アルブミン成分」と称されてもよい。本発明によるポリペプチドは、アルブ

10

20

30

40

50

ミン部分を含んでなり、またはそれからなってもよい。

【0051】

F c R n および s h F c R n : 「F c R n」という用語は、ヒト新生児 F c 受容体 (F c R n) を意味する。s h F c R n は、F c R n の可溶性組換え形態である。h F c R n は、配列番号 30 (主要組織適合性複合体クラス I 様 F c 受容体 (FCGRT) のトランケート型重鎖) および配列番号 31 (-2-ミクログロブリン) のヘテロ二量体である。配列番号 30 および 31 は、一緒になって h F c R n を構成する。

【0052】

単離された変種：「単離された変種」という用語は、人の手によって改変され、天然でそれと共に存在する少なくとも 1 つの成分から、完全にまたは部分的に分離された変種を意味する。「単離された変種」という用語は、天然では存在しない形態にあるまたは環境にある、変種を意味する。単離された物質の非限定的例としては、(1) あらゆる非天然変種；(2) 自然界でそれが付随する 1 つまたは複数の（いくつかの）または全ての天然の構成物から、少なくとも部分的に取り出されたあらゆる変種；(3) それが由来するポリペプチド（例えば天然に見られるようなそれが由来するポリペプチドなど）と比較して、人の手によって改変されたあらゆる変種；または(4) それが天然に結合しているその他の成分と比較して変種 e (variant e) の量を増大させることで修飾された、あらゆる変種（例えば物質をコードする遺伝子の複数コピー；物質をコードする遺伝子と天然で結合するプロモーターよりも強力なプロモーターの使用）が挙げられる。単離された変種は、発酵プロセスサンプル中に存在してもよい。変種は、SDS-PAGE または GPC-HPLC による測定で、例えば少なくとも 5 % の純度、少なくとも 10 % の純度、少なくとも 20 % の純度、少なくとも 40 % の純度、少なくとも 60 % の純度、少なくとも 80 % の純度、および少なくとも 90 % の純度など、少なくとも 1 % の純度であってもよい。

10

【0053】

実質的に純粋な変種：「実質的に純粋な変種」という用語は、それが天然で付隨し、または組換えるに付隨する、他のポリペプチド材料を、重量基準で、最大 10 %、最大 8 %、最大 6 %、最大 5 %、最大 4 %、最大 3 %、最大 2 %、最大 1 %、および最大 0.5 % 含有する調製品を意味する。好ましくは変種は、製剤中に存在する全ポリペプチド材料の重量基準で、例えば少なくとも 94 % の純度、少なくとも 95 % の純度、少なくとも 96 % の純度、少なくとも 97 % の純度、少なくとも 98 % の純度、少なくとも 99 %、少なくとも 99.5 % の純度、および 100 % の純度など、少なくとも 92 % の純度である。純度は、SDS-PAGE または GPC-HPLC によって測定されてもよい。本発明の変種は、好ましくは実質的に純粋な形態である。これは、例えば周知の組換え法によって、および精製法によって、変種を作成することで達成し得る。

20

【0054】

成熟ポリペプチド：「成熟ポリペプチド」という用語は、翻訳および N 末端プロセッシング、C 末端トランケーション、グリコシル化、リン酸化などのあらゆる翻訳後修飾に続いて、その最終形態にあるポリペプチドを意味する。成熟ポリペプチドは、例えば本発明による改変があるおよび / またはあらゆる翻訳後修飾を包含する、配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 585 であってもよい。

30

【0055】

成熟ポリペプチドコード配列：「成熟ポリペプチドコード配列」という用語は、成熟アルブミンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。成熟ポリペプチドコード配列は、例えば本発明による変種をコードするのに必要な包含がある、配列番号 1 のヌクレオチドの 1 ~ 1758 であってもよい。

40

【0056】

配列同一性：2 つのアミノ酸配列または 2 つのヌクレオチド配列間の関連性は、「配列同一性」パラメータによって記述される。

【0057】

50

本発明の目的では、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16 : 276 - 277)の好ましくはバージョン3.0.0以降、より好ましくはバージョン5.0.0以降で実装されるように、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48 : 443 - 453)を使用して、2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を判定する。使用される任意選択のパラメータは、gap open penalty = 10、gap extension penalty = 0.5、およびEBLOSUM62(BLOSUM62のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。「最長同一性」と標識されるNeedleの出力(-nobriefオプションを使用して得られる)は、%同一性として使用され、次のようにして計算される。  
10

(同一残基×100)/(アラインメント長 - アラインメント中のギャップ総数)

#### 【0058】

本発明の目的では、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000、前出)好ましくはバージョン3.0.0以降、より好ましくはバージョン5.0.0以降で実装されるように、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970、前出)を使用して、2つのデオキシリボヌクレオチド配列間の配列同一性の程度を判定する。使用される任意選択のパラメータは、gap open penalty = 10、gap extension penalty = 0.5、およびEDNA FULL(NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。「最長同一性」と標識されるNeedleの出力(-nobriefオプションを使用して得られる)は、%同一性として使用され、以下のように計算される。  
20

(同一デオキシリボヌクレオチド×100)/(アラインメント長 - アラインメント中のギャップ総数)

#### 【0059】

断片：「断片」という用語は、アルブミンのアミノおよび/またはカルボキシル末端、および/またはアルブミンの内部領域から、1つまたは複数の(いくつかの)アミノ酸が欠失した、FcRn結合能力を保つポリペプチドを意味する。断片は、HSAに由来する1つの中断されていない配列からなってもよく、またはそれはHSAに由来する2つ以上の(いくつかの)配列を含んでなってもよい。本発明による断片は、およそ20アミノ酸残基を超える、好ましくは30アミノ酸残基を超える、より好ましくは40アミノ酸残基を超える、より好ましくは50アミノ酸残基を超える、より好ましくは75アミノ酸残基を超える、より好ましくは100アミノ酸残基を超える、より好ましくは200アミノ酸残基を超える、より好ましくは300アミノ酸残基を超える、なおもより好ましくは400アミノ酸残基を超える、最も好ましくは500アミノ酸残基を超えるサイズを有する。断片は、DI+DI I、DI+DI II、DI I + DI II、DI II + DI III、DI I + DI II + DI III、DI II + DI III + DI IIなどのもう1つのアルブミンのドメイン、またはこのようなドメインの断片、またはドメイン組み合わせを含んでなり、またはそれからなってもよい。  
30  
40

#### 【0060】

ドメインI、IIおよびIIIは、HSA(配列番号2)を参照して定義されてもよい。例えば、HSAドメインIは、配列番号2のアミノ酸1～194(±1～15アミノ酸)からなってもまたはそれを含んでなってもよく、HSAドメインIIは、配列番号2のアミノ酸192(±1～15アミノ酸)～387(±1～15アミノ酸)からなってもまたはそれを含んでなってもよく、ドメインIIIは、配列番号2のアミノ酸残基381(±1～15アミノ酸)～585(±1～15アミノ酸)からなってもまたはそれを含んでなってもよい。「±1～15アミノ酸」は、残基番号が、記述されるアミノ酸位置のC末  
50

端および／またはN末端から、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸外れてもよいことを意味する。ドメインI、II、およびIIIの例は、Dockal et al (The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol. 274 (41) : 29303 - 29310) and Kjeldsen et al (Protein Expression and Purification, 1998, Vol 13 : 163 - 169)によって記載され、下で一覧にされる。

## 【0061】

【表1】

10

配列番号2に関するHSAドメインI、II、およびIIIのアミノ酸残基	Dockal et al	Kjeldsen et al
ドメインI	1~197	1~192
ドメインII	189~385	193~382
ドメインIII	381~585	383~585

20

## 【0062】

当業者は、例えば、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16 : 276 - 277)の好ましくはバージョン3.0.0以降、より好ましくはバージョン5.0.0以降で実装されるように、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48 : 443 - 453)を使用して、HSAとのアミノ酸配列アラインメントによって、非ヒトアルブミン中でドメインI、II、およびIIIを同定し得る。使用される任意選択のパラメータは、gap open penalty = 10、gap extension penalty = 0.5、およびEBLOSUM62(BLOSUM62のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。その他の適切なソフトウェアとしては、利用者用ガイド(バージョン3.6、2005年9月)に記載されるようにして、デフォルト設定で使用してもよい、MUSCLE((Multiple sequence comparison by log-expectation, Robert C. Edgar, Version 3.6, http://www.drive5.com/muscle; Edgar (2004) Nucleic Acids Research 32 (5), 1792 - 97、およびEdgar (2004) BMC Bioinformatics, 5 (1) : 113)が挙げられ、MUSCLEの3.6以降のバージョンもまた、本発明のあらゆる態様で使用してもよい)。適切なアラインメントの例は、図1および2に提供される。

30

## 【0063】

ドメインが、HSA(配列番号2)のドメインI、IIまたはIIIと、少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、99.5%の同一性または100%の同一性を有することが好ましい。

40

## 【0064】

アレル変種：「アレル変種」という用語は、同じ染色体の遺伝子座を占める2つ以上の(いくつかの)遺伝子の代案形態のいずれかを意味する。アレルの多様性は、変異を通じて自然に生じて、集団内に多形性をもたらすこともある。遺伝子変異は、サイレント(コードされたポリペプチドに変化がない)であり得て、またはアミノ酸配列変化を有するポ

50

リペプチドをコードしてもよい。ポリペプチドのアレル変種は、遺伝子のアレル変種によってコードされるポリペプチドである。

【0065】

コード配列：「コード配列」という用語は、その翻訳されたポリペプチド生成物のアミノ酸配列を直接規定する、ポリヌクレオチドを意味する。コード配列の境界は、一般に、通常は、A T G 開始コドンまたはG T G およびT T Gなどの代案の開始コドンで始まり、T A A、T A G、およびT G Aなどの停止コドンで終了する、読み取り枠によって定まる。コード配列は、D N A、c D N A、合成、または組換えポリヌクレオチドであってもよい。

【0066】

c D N A：「c D N A」という用語は、真核細胞から得られる、成熟スプライスm R N A分子からの逆転写によって作成され得るD N A分子を意味する。c D N Aは、対応するゲノムD N A中に存在することもあるイントロン配列を欠く。最初の一次R N A転写物は、成熟スプライスm R N Aとして出現する前のスプライシングをはじめとする、一連の段階を通じてプロセシングされる、m R N Aの前駆体である。

【0067】

核酸コンストラクト：「核酸コンストラクト」という用語は、自然に存在する遺伝子から単離されるか、さもなければ自然に存在しないはずの様式で核酸断片を含有するよう改変された、または合成された、一本鎖または二本鎖のいずれかの核酸分子を意味する。核酸コンストラクトが本発明のコーディング配列の発現に必要な制御配列を含有する場合、核酸コンストラクトという用語は、「発現力セット」という用語と同義である。

【0068】

制御配列：「制御配列」という用語は、本発明の変種をコードするポリヌクレオチドの発現に必要な全ての成分（例えば核酸配列）を意味する。各制御配列は、変種をコードするポリヌクレオチドにとって、天然（すなわち同一遺伝子由来）または異質（すなわち異なる遺伝子由来）であってもよく、または互いに天然または異質であってもよい。このような制御配列としては、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列、および転写ターミネーターが挙げられるが、これに限定されるものではない。少なくとも制御配列は、プロモーターと、転写および翻訳停止シグナルを含む。制御配列は、変種をコードするポリヌクレオチドのコード領域内において制御配列のライゲーションを容易にする、特定の制限酵素認識部位を導入する目的で、リンカーと共に提供されてもよい。

【0069】

作動可能に連結する：「作動可能に連結する」という用語は、その中で、制御配列がコーディング配列の発現を誘導するように、对照配列が、ポリヌクレオチドのコーディング配列に対して適切な位置に配置される、立体配置を意味する。

【0070】

発現：「発現」という用語は、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、および分泌をはじめとするが、これに限定されるものではない、変種の生成に関与するあらゆるステップを含む。

【0071】

発現ベクター：「発現ベクター」という用語は、変種をコードするポリヌクレオチドを含んでなり、その発現を提供する追加的なヌクレオチド（例えば制御配列）と作動可能に連結する、直鎖または環状D N A分子を意味する。

【0072】

宿主細胞：「宿主細胞」という用語は、本発明のポリヌクレオチドを含んでなる核酸コンストラクトまたは発現ベクターによる、形質転換、形質移入、形質導入などを受けやすい、あらゆる細胞型を意味する。「宿主細胞」という用語は、複製中に起きる変異のために、親細胞と同一でない、親細胞のあらゆる子孫を包含する。

【0073】

10

20

30

40

50

**血漿半減期**：血漿半減期は、理想的には適切な個体／個人において、生体内で判定される。しかしこれは時間がかかる高価であり、動物またはヒトにおける実験の実施と結びついた倫理的懸念が不可避であることから、血漿半減期が延長または短縮したかどうかを判定するために、生体外アッセイを利用するすることが望ましい。アルブミンの受容体 F c R n への結合は、血漿半減期にとって重要であることが知られており、受容体結合と血漿半減期の間の相関は、アルブミンの受容体に対するより高い親和性が、より長い血漿半減期をもたらす関係である。したがって本発明では、アルブミンの F c R n に対するより高い親和性は、血漿半減期の増大を示唆し、アルブミンのその受容体に対するより低い親和性は、血漿半減期の低下を示唆すると見なされる。

## 【0074】

10

本出願および特許請求の範囲では、アルブミンの受容体 F c R n への結合は、親和性という用語と、「より強力な」または「より弱い」という表現を使用して記述される。したがって F c R n に対して H S A よりも高い親和性を有する分子は、F c R n に H S A よりも強力に結合すると見なされ、F c R n に対して H S A よりも低い親和性を有する分子は、F c R n に H S A よりも弱く結合すると見なされると理解すべきである。

## 【0075】

20

「より長い血漿半減期」または「より短い血漿半減期」という用語、および類似表現は、対応する親または参照または対応アルブミン分子との相関におけるものと理解される。したがって本発明の変種アルブミンに関するより長い血漿半減期は、変種が、例えば、( 例えれば配列番号 2 中の ) ドメイン I 内の 1 つまたは複数の ( いくつかの ) 位置、およびドメイン I I I 内の 1 つまたは複数の ( いくつかの ) 位置における、本明細書に記載される改変以外は、同一配列を有する対応するアルブミンよりも、長い血漿半減期を有することを意味する。

## 【0076】

30

参照：参照は、それに対してアルブミン変種、融合物、複合体、組成物、会合またはナノ粒子が比較される、アルブミン、融合物、複合体、組成物、会合またはナノ粒子である。参照は、完全長アルブミン ( H S またはその天然アレルなど ) またはその断片 ( o f a fragment thereof ) を含んでなり、またはそれからなってもよい。参照はまた、それに対して、アルブミン変種、融合物、複合体、組成物、会合またはナノ粒子が比較される、「対応する」アルブミン、融合物、複合体、組成物、会合またはナノ粒子と称されることもある。参照は、H S A ( 配列番号 2 ) またはその断片、融合物、複合体、会合、ナノ粒子または微粒子を含んでなり、またはそれからなってもよい。好ましくは参照は、アルブミン部分を除いて、本発明による ( 「試験対象の」 ) ポリペプチド、融合ポリペプチド、複合体、組成物、会合、ナノ粒子または微粒子と同一である。好ましくは、参照のアルブミン部分は、アルブミン ( 例えれば H S A 、配列番号 2 ) またはその断片を含んでなり、またはそれからなる。参照のアルブミン部分のアミノ酸配列は、アルブミン部分のアミノ配列より長くても、より短くてもよく、または好ましくは本発明による ( 「試験対象の」 ) ポリペプチド、融合ポリペプチド、複合体、組成物、会合、ナノ粒子または微粒子と同じ長さ ( ± 1 ~ 1 5 アミノ酸 ) である。

## 【0077】

40

同等のアミノ酸位置：本明細書全体を通じて、アミノ酸位置は、完全長成熟ヒト血清アルブミン ( すなわちリーダー配列なし、配列番号 2 ) との関連で定義される。しかし当業者は、本発明がまた、非ヒトアルブミンの変種、例えは本明細書で開示されるもの ) 、および / またはヒトまたは非ヒトアルブミンの断片にも関することを理解する。同等の位置は、ペアワイズ ( 例えば C l u s t a l W ) または複数 ( 例えれば M U S C L E ) アラインメントを使用して、アミノ酸配列を比較することによって、ヒト血清アルブミン断片中、動物アルブミン中、およびその断片、融合物、およびその他の誘導体または変種中で同定され得る。例えは図 1 は、完全長ヒト血清アルブミン中の 5 0 0 、 5 5 0 および 5 7 3 と同等の位置が、ヒト血清アルブミン断片中、およびその他の種のアルブミン中で容易に同定されることを示す。 5 0 0 、 5 5 0 、および 5 7 3 位は、矢印によって示される。さら

50

なる詳細が、下の表に提供される。

【0078】

【表2】

HSA、動物アルブミン、およびアルブミン断片中の対応する位置の同定の例

生物 (タンパク質受入番号)	アルブミン			ヒト血清アルブミン(天然アミノ酸) に相当する位置:		
	完全長 または断片	断片詳細	成熟タンパク質 全長	500 (K)	550 (D)	573 (K)
ヒト( <i>Homo sapiens</i> ) (AAA98797)	完全長	-	585	500 (K)	550 (D)	573 (K)
ヒト( <i>Homo sapiens</i> )	断片	D <small>I</small> , D <small>III</small>	399	314 (K)	364 (D)	387 (K)
ヒト( <i>Homo sapiens</i> )	断片	D <small>I</small> , D <small>III</small>	403	318 (K)	368 (D)	391 (K)
アカゲザル ( <i>Macaca mulatta</i> ) (NP_001182578)	完全長	-	584	500 (K)	550 (N)	573 (P)
ドブネズミ ( <i>Rattus norvegicus</i> ) (AAH85359)	完全長	-	584	500 (K)	550 (D)	573 (P)
ハツカネズミ ( <i>Mus musculus</i> ) (AAH49971)	完全長	-	584	500 (K)	550 (D)	573 (P)

【0079】

図1は、C l u s t a l W 1 . 8 1 形式の出力をはじめとする、デフォルトパラメータを使用して、M U S C L E によって作成された。未加工出力データは、出力形式：R T F \_ n e w ; フォントサイズ：10；コンセンサスライン：コンセンサスラインなし；配列画分（これは網掛けのために一致しなくてはならない）：0 . 5；入力配列形式：A L N を使用する、B o x S h a d e 3 . 2 1 ( h t t p : / / w w w . c h . e m b n e t . o r g / s o f t w a r e / B O X \_ f o r m . h t m l ) を使用して、網掛けされた。したがって本明細書全体を通じて、ヒト血清アルブミン中で定義されるアミノ酸位置はまた、ヒト血清アルブミンの断片、誘導体または変種および融合物中の、その他の種からの動物の、およびその断片および融合物の、同等の位置に当たる。このような同等の位置は、( i ) その天然タンパク質中における異なる残基番号、および / または ( i i ) その天然タンパク質中における異なる天然アミノ酸を有してもよい。

【0080】

同様に、図2は、配列番号2(H S A)を参照して、アルブミンの断片（例えばドメイン）中で同定され得る同等の位置を示す。

【0081】

変種の命名規則

本発明の目的で、配列番号2で開示される成熟ポリペプチドを使用して、別のアルブミン中の対応するアミノ酸残基を判定する。別のアルブミンのアミノ酸配列は、配列番号2で開示される成熟ポリペプチドと配列比較され、アラインメントに基づいて、配列番号2で開示される成熟ポリペプチド中のあらゆるアミノ酸残基に対応するアミノ酸位置番号が

10

20

30

40

50

、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)の好ましくはバージョン3.0.0以降、より好ましくはバージョン5.0.0以降で実装されるように、Needleman-Wunsch algorithm(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)を使用して判定される。

#### 【0082】

別のアルブミン中の対応するアミノ酸残基の同定は、それぞれのデフォルトパラメータを使用した、「ClustalW」(Larkin et al., 2007, Bioinformatics 23: 2947-2948), MUSCLE(multiple sequence comparison by log expectation; バージョン3.5以降; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT(バージョン6.857以降; Katoh and Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh and Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900)、およびClustalWを用いたEMBOSS EMMA(1.83以降; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680)をはじめとするが、これに限定されるものではない、適切なコンピュータプログラムを使用して、複数ポリペプチド配列のアラインメントによって、判定または確認し得る。

#### 【0083】

別のポリペプチド(またはタンパク質)が、従来の配列ベースの比較ではそれらの関係性を検出できないように配列番号2の成熟ポリペプチドから分化している場合(Lindahl and Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615)、その他のペアワイズ配列比較アルゴリズムを利用し得る。配列ベースの検索におけるより大きな感受性は、検索データベースに対するポリペプチドファミリーの確率的表現(プロファイル)を利用する、検索プログラムを使用して達成され得る。例えばPSI-BLASTプログラムは、反復データベース検索プロセスを通じてプロファイルを生成し、遠縁のホモログを検出できる(Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402)。ポリペプチドのファミリーまたはスーパーファミリーが、タンパク質構造データベース中に、1つまたは複数の(いくつかの)代表を有する場合は、さらにより大きな感受性を達成し得る。GenTHREADER(Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuiffin and Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881)などのプログラムは、クエリー配列の構造的折り畳みを予測するニューラルネットワークへの入力として、多様な情報源(PSI-BLAST、二次構造予測、構造アラインメントプロファイル、および溶媒和ポテンシャル)からの情報を利用する。同様に、Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919の方法を利用して、SCOPデータベース中に存在するスーパーファミリーモデルによって、未知の構造の配列をアラインさせ得る。次にこれらのアラインメントを使用して、ポリペプチドの相同性モデルを作成し得て、その目的のために開発された多様なツールを使用して、このようなモデルを正確度について評価し得る。

#### 【0084】

既知の構造のタンパク質では、構造アラインメントを検索して作成するために、いくつかのツールおよび資源が利用できる。例えばタンパク質のSCOPスーパーファミリーは

10

20

30

40

50

、構造的に配列比較され、これらのアラインメントは、アクセスおよびダウンロードできる。距離アラインメントマトリックス (Holm and Sander, 1998, Proteins 33: 88 - 96) またはコンビナトリアル伸長 (Shindyalova and Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739 - 747) などの多様なアルゴリズムを使用して、2つ以上のタンパク質構造を配列比較し得て、これらのアルゴリズムの実装は、可能な構造ホモログを発見するために、対象構造によって構造データベースをクエリーするのにさらに利用される（例えば Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566 - 567）。

## 【0085】

10

本発明のアルブミン変種について記述する上で、参考しやすいように下述の命名法を適応させる。一般に認められた IUPAC一文字、または三文字アミノ酸略語が用いられる。「点変異」および／または「改変」という用語は、欠失、挿入および置換を含む。

## 【0086】

置換。アミノ酸置換では、以下の命名法が使用される：元のアミノ酸、位置、置換アミノ酸。したがって例えば 226 位におけるスレオニンのアラニンによる置換は、「Thr 226 Ala」または「T 226 A」と命名される。複数変異（または改変）は、加算記号（「+」）によって区切られ、例えば「Gly 205 Arg + Ser 411 Phe」または「G 205 R + S 411 F」は、それぞれ 205 位および 411 位におけるグリシン（G）のアルギニン（R）による置換、およびセリン（S）のフェニルアラニン（F）による置換に相当する。図はまた、例えば「E 492 T / N 503 D」のように（「/」）も利用し、これは（「+」）と同義と見なすべきである。

20

## 【0087】

欠失。アミノ酸欠失では、以下の命名法が使用される：元のアミノ酸、位置 \*。したがって 195 位におけるグリシンの欠失は、「Gly 195 \*」または「G 195 \*」と命名される。複数の欠失は、例えば「Gly 195 \* + Ser 411 \*」または「G 195 \* + S 411 \*」のように、加算記号（「+」）によって区切られる。

## 【0088】

30

挿入。上で開示されるように、挿入は、位置を占めるアミノ酸（指名される（または元の）アミノ酸、「X」）の N 側（「上流」、「X - 1」）または C 側（「下流」、「X + 1」）であってもよい。

## 【0089】

元のアミノ酸（「X」）の C 側（「下流」、「X + 1」）へのアミノ酸挿入では、以下の命名法が使用される：元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入アミノ酸。したがって 195 位におけるグリシンの後へのリジンの挿入は、「Gly 195 Gly Lys」または「G 195 GK」と命名される。複数のアミノ酸の挿入は、[元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入アミノ酸 # 1、挿入アミノ酸 # 2 など] と命名される。例えば位置 195 におけるグリシン後へのリジンおよびアラニンの挿入は、「Gly 195 Gly Lys Ala」または「G 195 GKA」として示される。

## 【0090】

40

このような場合、挿入されたアミノ酸残基は、挿入されたアミノ酸残基に先行する、アミノ酸残基の位置番号への小文字の追加によって番号付けされる。したがって上の例では、配列は次のようになる。

## 【0091】

## 【表3】

<u>親:</u>	<u>変異体:</u>
195	195 195a 195b
G	G - K - A

10

## 【0092】

元のアミノ酸（「X」）のN側（「上流」、「X-1」）へのアミノ酸挿入では、下の命名法が使用される：元のアミノ酸、位置、挿入アミノ酸、元のアミノ酸。したがって195位におけるグリシン（G）前へのリジン（K）の挿入は、「G1y195Ly s G1y」または「G195KG」と命名される。複数アミノ酸の挿入は、[元のアミノ酸、位置、挿入アミノ酸#1、挿入アミノ酸#2など、元のアミノ酸]と命名される。例えば195位におけるグリシン前へのリジン（K）およびアラニン（A）の挿入は、「G1y195Ly s A1a G1y」または「G195KAG」として示される。このような場合、挿入されたアミノ酸残基は、挿入されたアミノ酸残基に続く、アミノ酸残基の位置番号へのプライム記号付き小文字の追加によって番号付けされる。したがって上の例では、配列は次のようになる。

20

## 【0093】

## 【表4】

<u>親:</u>	<u>変異体:</u>
195	195a' 195b' 195
G	K - A - G

30

## 【0094】

複数の改変。複数の改変を含んでなる変種は、加算記号（「+」）によって区切られ、例えば「Arg170Ty r + G1y195Glu」または「R170Y + G195E」は、それぞれ、170位および195位における、アルギニンおよびグリシンのチロシンおよびグルタミン酸による置換に相当する。

## 【0095】

異なる改変（例えば置換）。異なる改変（例えば置換）を位置に導入し得る場合、異なる改変（例えば置換）は、コンマによって区切られ、例えば「Arg170Ty r, G1u」は、170位におけるアルギニンのチロシンまたはグルタミン酸による置換に相当する。したがって「Ty r167Gly, Ala + Arg170Gly, Ala」は、以下の変種を指す：

「Ty r167Gly + Arg170Gly」、「Ty r167Gly + Arg170Ala」、「Ty r167Ala + Arg170Gly」、および「Ty r167Ala + Arg170Ala」。

40

## 【0096】

本発明は、配列番号2の成熟ポリペプチドのドメインI内の位置に、およびドメインII内の位置に改変を含んでなり、またはその他のアルブミンまたはその断片中の同等の位置に改変を含んでなる、アルブミン変種に関する。

50

## 【0097】

## 変種

本発明の第1の態様は、HSA(配列番号2)などのアルブミンのドメインI内の1つまたは複数の(いくつかの)改変、およびHSA(配列番号2)などのアルブミンのドメインII内の1つまたは複数の(いくつかの)改変を含んでなる、親アルブミンの変種アルブミンまたはその断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドである、ポリペプチドを提供する。

## 【0098】

親アルブミンおよび/または変種アルブミンは、  
 (a) 配列番号2の成熟ポリペプチドと少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド；  
 (b) 低ストリンジエンシー条件下で、(i)配列番号1の成熟ポリペプチドコード配列と、または(ii)(i)の完全長補体とハイブリダイズする、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；  
 (c) 配列番号1の成熟ポリペプチドコード配列と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；および/または  
 (d) 配列番号2の成熟ポリペプチドの断片  
 を含んでなり、またはそれからなることが好ましい。

## 【0099】

配列番号2の成熟ポリペプチドのドメインI内の位置に、およびドメインII内の位置に、置換、欠失または挿入などの1つまたは複数の(いくつかの)改変を含んでなり、またはその他のアルブミンまたはその変種または断片中の同等の位置に、置換、欠失または挿入などの1つまたは複数の(いくつかの)改変を含んでなる、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド。本明細書に記載される改変に加えて、停止コドンが導入されてもよく、導入される場合、それは574位またはさらに下流である(例えば配列番号2中では574～585位に導入される)  
 。

## 【0100】

本発明による、変種アルブミン、その断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドのアルブミン部分は、配列番号2で示されるHSAの配列と、一般に、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する。変種は、配列番号2に対して100%未満の同一性を有する。

## 【0101】

本発明による、変種アルブミン、その断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドのアルブミン部分は、親アルブミンの配列と、一般に、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する。変種は、親アルブミンの配列に対して100%未満の同一性を有する。

## 【0102】

一態様では、本発明の変種中の改変の数は、配列番号2と比較して、または親アルブミンの配列と比較して、1～20個であり、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個など、1～10個および1～5個の改変である。

## 【0103】

ドメインI内の1つまたは複数の(いくつかの)改変は、HSA(配列番号2)の78～88位(すなわち78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、8

10

20

30

40

50

8位)および/または105~120位(すなわち105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120位)に相当する位置から選択されてもよい。HSA中では、78~88位はループを構成し、105~120位はループを構成する。したがってその他のアルブミンの同等のループ中の位置もまた、本発明に含まれる。好ましい残基は、残基81~85、特に82および83、および残基110~114、特に111および112である。

#### 【0104】

配列番号2の82位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)では、改変は、天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、より好ましいのはQ、DまたはA、さらにより好ましいのはDまたはA、最も好ましいのはAへの置換である。配列番号2中では、82位の天然アミノ酸はグルタミン酸であり、したがってグルタミン酸への置換は好ましくない。10

#### 【0105】

配列番号2の83位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)では、改変は、天然アミノ酸から、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、より好ましいのはN、KまたはS、さらにより好ましいのはNまたはK、最も好ましいのはNへの置換である。配列番号2中では、82位の天然アミノ酸はスレオニンであり、したがってスレオニンへの置換は好ましくない。20

#### 【0106】

配列番号2の111位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)では、改変は、天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、よりも好ましいのはN、E、Q、D、GまたはH、さらにより好ましいのはEまたはQ、最も好ましいのはEへの置換である。配列番号2中では、111位の天然アミノ酸はアスパラギンであり、したがってアスパラギンへの置換は好ましくない。

#### 【0107】

配列番号2中の112位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)では、改変は天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどの置換であることが好ましく、より好ましいのはF、YまたはW、さらにより好ましいのはFまたはY、最も好ましいのはFへの置換である。配列番号2中では、112位の天然アミノ酸はロイシンであり、したがってロイシンへの置換は好ましくない。30

#### 【0108】

配列番号2の573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)では、改変は、天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、よりも好ましいのはP、Y、W、H、F、T、IまたはV、さらによりよりも好ましいのはP、YまたはW、最好ましいのはPへの置換である。配列番号2中では、573位の天然アミノ酸はリジンであり、したがってリジンへの置換は好ましくない。40

#### 【0109】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82および83位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

#### 【0110】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82および111位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

#### 【0111】

10

20

30

40

50

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 82 および 112 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 2 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82および573位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 3 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 83 および 111 位（または他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 4 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 83 および 112 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 5 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 83 および 573 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 6 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 111 および 112 位（または他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 7 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 111 および 573 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 8 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 1 1 2 および 5 7 3 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 1 9 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 82、83、および 111 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

[ 0 1 2 0 ]

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 82、83、および 112 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 2 1 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 82、83、および 573 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 2 2 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 82、111、および 112 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

【 0 1 2 3 】

アルブミン変種は、例えば、配列番号 2 のアルブミン、特に配列番号 2 のその変種または断片の 82、111、および 573 位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変

種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0124】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0125】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の83、111、および112位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0126】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の83、111、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

10

【0127】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の83、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0128】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の111、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

20

【0129】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82、83、111、および112位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0130】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82、83、111、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0131】

30

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82、83、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0132】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82、111、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0133】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の83、111、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

40

【0134】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の82、83、111、112、および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0135】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の425および573位(またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置)における置換などの改変を含んでなってもよい。

【0136】

50

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の505および573位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

### 【0137】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の527および573位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

### 【0138】

アルブミン変種は、例えば、配列番号2のアルブミン、特に配列番号2のその変種または断片の534および573位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）における置換などの改変を含んでなってもよい。

10

### 【0139】

特に好ましいアルブミン変種は、T 8 3 N / N 1 1 1 E（例えば配列番号32）；T 8 3 N / N 1 1 1 E / K 5 7 3 P（例えば配列番号33）；T 8 3 N / K 5 7 3 P（例えば配列番号34）；T 8 3 K / K 5 7 3 P（例えば配列番号38）；E 8 2 A / K 5 7 3 P（例えば配列番号39）；L 1 1 2 F / K 5 7 3 P（例えば配列番号40）；E 8 2 D / K 5 7 3 P（例えば配列番号43）；P 1 1 0 G / K 5 7 3 P（例えば配列番号44）；N 1 1 1 D / K 5 7 3 P（例えば配列番号60）；N 1 1 1 G / K 5 7 3 P（例えば配列番号61）；N 1 1 1 H / K 5 7 3 P（例えば配列番号62）；E 4 2 5 A / K 5 7 3 P（例えば配列番号64）；E 5 0 5 Q / K 5 7 3 P（例えば配列番号65）；T 5 2 7 M / K 5 7 3 P（例えば配列番号66）；N 1 1 1 E / K 5 7 3 P（例えば配列番号68）；K 5 3 4 V / K 5 7 3 P（例えば配列番号73）；N 1 1 1 Q / K 5 7 3 P（例えば配列番号74）の置換を含んでなり、それらはHSA（配列番号2）を参照して記述される。その他の好ましいアルブミン変種は、HSA（配列番号2）以外のアルブミン中に同等の置換を含んでなる。

20

### 【0140】

また本発明によるアルブミン変種は、HSA（配列番号2）の78～88（78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91）および/または105～120（105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120）および/または425、505、510、512、524、527、531、534、569、575、またはその他のアルブミンの同等の位置から選択される位置における、1つまたは複数の（いくつかの）改変を含んでなってもよい。好ましい改変は、本発明の第1の態様で、これらの位置について記載されるものなどの置換である。特に好ましい置換としては、D 1 0 8 A（配列番号59）；D 1 0 8 E（例えば配列番号70）；N 1 0 9 K（例えば配列番号69）；P 1 1 0 G（例えば配列番号42）；N 1 1 1 D（例えば配列番号46）；N 1 1 1 E（例えば配列番号67）；N 1 1 1 G（例えば配列番号48）；N 1 1 1 H（例えば配列番号49）；N 1 1 1 K（例えば配列番号54）；L 1 1 2 F（例えば配列番号37）；E 4 2 5 A（例えば配列番号63）；E 4 2 5 K（例えば配列番号55）；E 5 0 5 Q（例えば配列番号45）；H 5 1 0 D（例えば配列番号57）；D 5 1 2 E（例えば配列番号50）；K 5 2 4 A（例えば配列番号51）；T 5 2 7 A（例えば配列番号52）；T 5 2 7 M（例えば配列番号47）；E 5 3 1 H（例えば配列番号53）；K 5 3 4 V（例えば配列番号56）；A 5 6 9 S（例えば配列番号58）；L 5 7 5 F（例えば配列番号72）；E 8 2 A（例えば配列番号36）；E 8 2 D（例えば配列番号41）；T 8 3 K（例えば配列番号35）；T 8 3 N（例えば配列番号71）が挙げられ、それらはHSA（配列番号2）を参照して記述される。1つまたは複数の（いくつかの）改変を含んでなるその他の好ましいアルブミン変種は、HSA（配列番号2）以外のアルブミン中に同等の置換を含んでなってもよい。

30

40

### 【0141】

変種アルブミン、その断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ボ

50

リペプチドは、対応する親または参照アルブミン、その断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドと比較して、FcRnに対する結合親和性の変化および／または血漿半減期の変化および／またはFcRnに対する結合親和性の変化を有することが好ましい。

#### 【0142】

特に好ましい実施形態では親または参照アルブミンは、HSA（配列番号2）および変種アルブミン、その断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドであり、HSA、対応する断片、またはHSAまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドと比較して、FcRnに対する結合親和の変化性および／または血漿半減期の変化および／またはFcRnに対する結合親和性の変化を有する。

10

#### 【0143】

本発明者らは、HSA D494Nの天然アレルに基づいて、アルブミンおよびその受容体の結合と、血漿半減期との間の相関に気付いた。本発明者らは、このアレルを以前分析して、それが受容体FcRnに対して、WT HSAのFcRnに対する親和性よりも低い親和性を有することを見出した。

#### 【0144】

さらに、ヒトFcRnで置換された天然マウスFcRnを有する遺伝子組換えマウスは、正常なマウスよりも高い血清アルブミンレベルを有することが、開示されている（J. Exper. Med. (2003) 197(3): 315-22）。本発明者らは、ヒトFcRnがマウス血清アルブミンに対して、マウスFcRnがマウス血清アルブミンに対して有するよりも、より高い親和性を有することを以前発見しており、したがって遺伝子組換えマウスの血清アルブミン中で観察された増大は、血清アルブミンとその受容体間のより高い親和性に対応するものであり、FcRnに対するアルブミンの結合と、血漿半減期との間の相関が確認された。さらにFcRnに対してわずかなまたは皆無の結合を有するアルブミン変種は、マウスマodel中で半減期の低下を有することが示されているKenna et al (2009) J. Nucl. Med.; 50 (Supplement 2): 1582。

20

#### 【0145】

変種アルブミンのFcRnに対する親和性が、親または参照アルブミンより高いかまたはより低いかを判定する1つの方法は、下述するように、表面プラズモン共鳴アッセイ（SPR）を利用することである。当業者は、例えば結合定数KDの測定および比較などの他の方法が、変種アルブミンのFcRnに対する親和性が、親または参照アルブミンのFcRnに対する親和性より高いかまたはより低いかを判定するのに有用かもしれないことを理解するであろう。第1の分子（例えばリガンド）と第2の分子（例えば受容体）との間の結合親和性（KD）は、 $K_D = k_d / k_a$ に従った、結合速度（オン速度、 $k_a$ ）および解離速度（オフ速度、 $k_d$ ）の動態定数の関数である。したがって本発明によって、天然HSAのKDよりも低いKDを有する変種アルブミンは、HSAよりも長い血漿半減期を有し、天然HSAのKDよりも高いKDを有する変種アルブミンは、HSAよりも短い血漿半減期を有すると見なされる。

30

#### 【0146】

本発明の一実施形態では、本発明による、アルブミン変種またはその断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドは、親または参照アルブミン、その断片、または親または参照アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドの血漿半減期より長い血漿半減期を有し、および／またはFcRnに対するより強力な結合親和性を有する。

40

#### 【0147】

さらなる実施形態では、本発明による、アルブミン変種またはその断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドは、親または参照アルブミン、その断片、または親または参照アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドの血漿半減期より短い血漿半減期を有し、および／またはFcRnに対するより弱い結合親

50

和性を有する。

**【0148】**

ドメイン I 内（本明細書に記載されるループ 78～88 内および / またはループ 105～120 内などの）、および II 内の位置（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）の改変に加えて、本発明による、変種アルブミンまたはその断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドは、分子のその他の位置に、追加的な置換、欠失または挿入を含有してもよい。このような追加的な置換、欠失または挿入は、グリコシル化改変；チオール基などの反応基の表面への導入、カルバモイル化部位の除去 / 生成などであるが、これに限定されるものではない、分子のその他の特性の改変に、有用であってもよい。

10

**【0149】**

表面の反応性残基を提供するために、改変され、有利には本発明で応用され得る残基は、（参照によって本明細書に援用する）国際公開第 2010/092135 号パンフレットで開示される。特定の好ましい残基としては、配列番号 2 中の位置に相当する位置が挙げられる。

**【0150】**

表面に反応性チオール基を提供するために、配列番号 2 に、またはその他のアルブミンの相当する位置に、加え得る改変の例としては、配列番号 2 中の以下の改変に相当する改変が挙げられる：L 585C、D 1C、A 2C、D 562C、A 364C、A 504C、E 505C、T 79C、E 86C、D 129C、D 549C、A 581C、D 121C、E 82C、S 270C、A 578C、L 595LC、D 1DC、A 2AC、D 562DC、A 364AC、A 504AC、E 505EC、T 79TC、E 86EC、D 129DC、D 549DC、A 581AC、A 581AC、D 121DC、E 82EC、S 270SC、S 579AC、C 360\*、C 316\*、C 75\*、C 168\*、C 558\*、C 361\*、C 91\*、C 124\*、C 169\*、および C 567\*。代案としては、アルブミンの N または C 末端に、システイン残基を付加してもよい。「反応性チオール」という用語は、システインに結合するジスルフィドでなく、および / または複合化パートナーなどのパートナーとの結合に立体的に利用できる、Cys によって提供されるチオール基を意味しある / またはそれを含む。

20

**【0151】**

**融合ポリペプチド**

本発明の第 2 の態様は、融合ポリペプチドに関する。したがって本発明によるアルブミン変種またはその断片は、非アルブミンポリペプチド融合パートナーと融合していくてもよい。融合パートナーは、原則的にあらゆるポリペプチドであってもよいが、一般に、融合パートナーは、治療的、（ワクチンをはじめとする）予防的、診断用、造影用またはその他の有益な特性を有するポリペプチドであることが好ましい。このような特性は、「薬理的に有益な特性」と称されてもよい。アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドは、当該技術分野で公知である。アルブミンまたはその断片と、融合パートナーポリペプチドとを含んでなるこのような融合ポリペプチドは、融合していない融合パートナーポリペプチドのみと比較して、より長い血漿半減期を有することが分かった。本発明によれば、先行技術の相当する融合ポリペプチドと比較して、本発明による融合ポリペプチドの血漿半減期を変化させることが可能である。「変化させる」は、血漿半減期を増大させること、および血漿半減期を低下させることの双方を含む。血漿半減期を増大させることができ、好ましい。本発明は、半減期を所望の期間に調節できるようにする。

40

**【0152】**

1つまたは複数の（いくつかの）治療的、（ワクチンをはじめとする）予防的、診断用、造影用またはその他の有益な部分を N 末端、アルブミンの C 末端に融合してもよく、アルブミン構造中のループまたはそれらのあらゆる組み合わせに挿入してもよい。それは融合ポリペプチドの様々な構成要素を隔てるリンカー配列を含んでなってもよく、または含まなくてよい。

50

## 【0153】

アルブミン融合物またはその断片に関する教示は、当該技術分野で公知であり、当業者は、このような教示を本発明にもまた応用し得ることを理解するであろう。（それぞれその内容全体を参照によって本明細書に援用する）国際公開第2001/79271A号パンフレット（特に9頁および／または表1）、国際公開第2003/59934号パンフレット（特に表1）、国際公開第03/060071号パンフレット（特に表1）、および国際公開第01/079480号パンフレット（特に表1）もまた、アルブミンまたはその断片と融合していてもよい、治療的、（ワクチンをはじめとする）予防的、診断用、造影用、またはその他の有益なポリペプチドの例を含み、これらの実施例はまた、本発明にも当てはまる。

10

## 【0154】

本発明の第2の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および／または本発明の態様および／またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数（いくつか）と、組み合わせてもよいことを理解する。

## 【0155】

## ポリヌクレオチド

本発明の第3の態様は、本発明の変種または融合ポリペプチドのいずれかをコードする、単離ポリヌクレオチドに関する。ポリヌクレオチドは、単離ポリヌクレオチドであってもよい。ポリヌクレオチドは、（プラスミドなどの）ベクターおよび／または宿主細胞に含まれてもよい。

20

## 【0156】

本発明の第3の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および／または本発明の態様および／またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数（いくつか）と、組み合わせてもよいことを理解する。

## 【0157】

## 核酸コンストラクト

30

本発明の第4の態様は、制御配列と適合性の条件下で、適切な宿主細胞中におけるコーディング配列の発現を誘導する、1つまたは複数の（いくつかの）制御配列と作動可能に連結する、本発明の変種または融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる、核酸コンストラクトに関する。

## 【0158】

ポリヌクレオチドを多様な方法で操作して、変種の発現を提供してもよい。発現ベクタ－次第で、ベクターへの挿入に先だつポリヌクレオチドの操作が望ましい、または必要なことがある。組換えDNA法を利用する、ポリヌクレオチドを修飾する技術は、当該技術分野で周知である。

## 【0159】

制御配列は、ポリヌクレオチドの発現のために宿主細胞によって認識される、プロモーター配列であってもよい。プロモーター配列は、変種の発現を媒介する転写制御配列を含有する。プロモーターは、変異、トランケート型、および雑種プロモーターをはじめとする、宿主細胞中で転写活性を示すあらゆる核酸配列であってもよく、宿主細胞に対して同種または異種のいずれかの、細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られてもよい。

40

## 【0160】

酵母宿主中では、有用なプロモーターは、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）エノラーゼ（ENO-1）、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）プロテアーゼA（P

50

R A 1 ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) プロテアーゼ B ( PRB1 ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) 翻訳延長因子 ( TEF1 ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) 翻訳延長因子 ( TEF2 ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) ガラクトキナーゼ ( GAL1 ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) アルコールデヒドロゲナーゼ / グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ ( ADH1 、 ADH2 / GAP ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) トリオースリン酸イソメラーゼ ( TPI ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) メタロチオネイン ( CUP1 ) 、およびサッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞に有用なその他のプロモーターは、 Romanos et al . , 1992 , Yeast 8 : 423 - 488 によって記載される。

## 【 0161 】

当業者は、 CHO または HEK などの、イネおよび哺乳類細胞における利用に有用なプロモーターを理解している。イネ宿主では、有用なプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA 遺伝子 ( CaMV 35S ) 、トウモロコシアルコールデヒドロゲナーゼ ( Adh1 ) 、および Amy3 から得られる。

## 【 0162 】

CHO または HEK などの哺乳類宿主細胞では、有用なプロモーターは、サイトメガロウイルス ( CMV ) および CAG 雜種プロモーター ( CMV 初期エンハンサー因子およびニワトリ アクチンプロモーターの雑種 ) 、サル空胞化ウイルス 40 ( SV40 ) から得られる。

## 【 0163 】

制御配列はまた、宿主細胞によって認識されて転写を終結する、適切な転写ターミネーター配列であってもよい。ターミネーター配列は、変種をコードするポリヌクレオチドの 3' 末端と作動可能に連結する。宿主細胞中で機能性のあらゆるターミネーターを使用してもよい。

## 【 0164 】

酵母宿主細胞の好ましいターミネーターは、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) エノラーゼ、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) チトクローム C ( CYC1 ) 、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) アルコールデヒドロゲナーゼ ( ADH1 ) 、およびサッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のその他の有用なターミネーターは、前出の Romanos et al . , 1992 によって記載される。当業者は、 CHO または HEK などの、イネおよび哺乳類細胞における利用に有用なターミネーターを理解している。例えばイネ宿主では、好ましいターミネーターは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス ( Agrobacterium tumefaciens ) ノパリンシンターゼ ( Nos ) およびカリフラワーモザイクウイルス 35S RNA 遺伝子 ( CaMV 35S ) から得られる。

## 【 0165 】

制御配列はまた、宿主細胞による翻訳に重要な mRNA の非翻訳領域である、適切なリーダー配列であってもよい。リーダー配列は、変種をコードするポリヌクレオチドの 5' 末端と作動可能に連結する。宿主細胞中で機能性のあらゆるリーダー配列を使用してもよい。

## 【 0166 】

酵母宿主細胞の適切なリーダーは、サッカロミセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) のリーダー配列である。

10

20

30

40

50

yces cerevisiae) エノラーゼ(ENO-1)、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) 因子、およびサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) アルコールデヒドロゲナーゼ／グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(ADH2/GAP)の遺伝子から得られる。

#### 【0167】

制御配列はまた、変種をコードする配列の3'末端と作動可能に連結し、転写されると、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するシグナルとして宿主細胞によって認識される配列である、ポリアデニル化配列であってもよい。宿主細胞中で機能性のあらゆるポリアデニル化配列を使用してもよい。10

#### 【0168】

酵母宿主細胞に有用なポリアデニル化配列は、Guo and Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990によって記載される。

#### 【0169】

制御配列はまた、変種のN末端と連結して、変種を細胞の分泌経路内に誘導するシグナルペプチドをコードする、シグナルペプチドコード領域であってもよい。ポリヌクレオチドのコーディング配列の5'末端は、翻訳読み枠内で、変種をコードするコード領域断片と天然に連結する、シグナルペプチドコード領域を生得的に含有してもよい。代案としては、コーディング配列の5'末端は、コーディング配列にとって異質である、シグナルペプチドコード領域を含有してもよい。コーディング配列がシグナルペプチドコード領域を天然に含まない場合、異質シグナルペプチドコード領域が必要なこともある。代案としては、変種の分泌を向上させるために、異質シグナルペプチドコード領域で、天然シグナルペプチドコード領域を単に置き換えてよい。しかし発現した変種を宿主細胞の分泌経路内に誘導する、あらゆるシグナルペプチドコード領域が使用されてもよい。20

#### 【0170】

酵母宿主細胞に有用なシグナルペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) 因子、およびサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) インベルターゼの遺伝子から得られる。その他の有用なシグナルペプチドコード配列は、前出のRomanos et al., 1992によって記載される。当業者は、CHOまたはHEKなどの、イネおよび哺乳類細胞における利用に有用なシグナルペプチドを理解している。30

#### 【0171】

シグナルペプチドおよびプロペプチド領域の双方が、変種のN末端に存在する場合、プロペプチド領域が変種のN末端の隣に配置され、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のN末端の隣に配置される。

#### 【0172】

本発明の第4の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および／または本発明の態様および／またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数(いくつかの)と、組み合わせてもよいことを理解する。40

#### 【0173】

##### 変種の調製

本発明の第5の態様は、

(a) 親アルブミンまたはその断片、または親アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドに、ドメインI内の1つまたは複数の(いくつかの)改变、およびドメインII内的1つまたは複数の(いくつかの)改变を導入するステップと；

(b) 变種アルブミンまたはその断片、または变种アルブミンまたはその断片を含んでな50

る融合ポリペプチドを回収するステップと

を含んでなる、変種アルブミンまたはその断片、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、または変種アルブミンまたはその断片の会合を調製したまは得る方法に関する。

**【0174】**

好みしい改変は、本発明の第1の態様に関して記載されるとおりである。結果として得られる変種アルブミンまたはその断片は、改変を含まない親アルブミンまたは断片などの参照のFcRn結合親和性と比較して、FcRn結合親和性の変化を有してもよい。より好みしくは、結果として得られる変種アルブミンまたはその断片は、より強力なFcRn結合親和性を有する。

10

**【0175】**

本発明は、アルブミン変種、その断片、または前記変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドであって、参照アルブミン、断片、またはその融合物のFcRnに対する結合親和性と比較して、FcRnに対する結合親和性の変化を有する、ポリペプチドを調製する方法を含み、上記方法は、

(a) 配列番号2に対する少なくとも60%の配列同一性を有するアルブミンなどの、親アルブミンをコードする核酸を提供するステップと；

(b) ステップ(a)の配列を修飾して、

(i) 親アルブミンのドメインI内の1つまたは複数の(いくつかの)位置、およびドメインIII(ドメイン3)中の1つまたは複数の(いくつかの)位置に相当する位置における改変、または

20

(ii) 配列番号2のドメインIの78～120位のいずれか1つまたは複数(いくつか)に相当する位置、または配列番号2のドメインIIIの425、505、510、512、524、527、531、534、569、573、575位のいずれか1つまたは複数(いくつか)に相当する位置における改変

を含んでなる、変種アルブミン、その断片、または前記変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドである、ポリペプチドをコードするステップと；

(c) 任意選択的に、ステップ(b)の改変配列を適切な宿主細胞に導入するステップと；

(d) 任意選択的に、ポリペプチドの発現をもたらす条件下で、細胞を適切な成長培地中で培養するステップと；

30

(e) 任意選択的に、ポリペプチドを成長培地から回収するステップとを含んでなり、

上記ポリペプチドは、FcRnに対する結合親和性の変化、および/または親アルブミン、参照アルブミン、その断片、または前記親アルブミン、参照アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、またはその融合物の半減期と比較して、血漿半減期の変化を有する。

**【0176】**

親アルブミンおよび/または変種アルブミンは、

(a) 配列番号2の成熟ポリペプチドと少なくとも60%の配列同一性を有するポリペプチド；

40

(b) 低ストリンジエンシー条件下で、(i)配列番号1の成熟ポリペプチドコード配列と、または(ii)(i)の完全長補体とハイブリダイズする、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(c) 配列番号1の成熟ポリペプチドコード配列と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；および/または

(d) 配列番号2の成熟ポリペプチドの断片

を含んでなり、またはそれからなることが好みしい。

**【0177】**

変種は、部位特異的変異誘発、合成遺伝子構築、半合成遺伝子構築、ランダム変異誘発

50

、シャフリングなどの当該技術分野で公知のあらゆる変異誘発手順を使用して、当業者によって作成され得る。

【0178】

部位特異的変異誘発は、親をコードするポリヌクレオチド中の1つまたは複数の（いくつかの）規定部位において、1つまたは複数の（いくつかの）変異（改変）を作り出す技術である。

【0179】

部位特異的変異誘発は、所望の変異を含有するオリゴヌクレオチドプライマーの使用を伴うPCRによって、生体外で達成し得る。部位特異的変異誘発はまた、親をコードするポリヌクレオチドを含んでなるプラスミド中の部位における制限酵素による切断と、引き続くポリヌクレオチド中の変異を含有するオリゴヌクレオチドのライゲーションを伴う、カセット変異誘発によっても生体外で実施し得る。通常は、プラスミドおよびオリゴヌクレオチドを消化する制限酵素は同一であり、プラスミドのライゲーションおよび相互の挿入を可能にする。例えば、Scherer and Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949 - 4955; およびBarton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349 - 4966を参照されたい。

【0180】

部位特異的変異誘発はまた、当該技術分野で公知の方法によっても生体内で達成し得る。例えば、米国特許出願公開第2004/0171154号明細書；Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773 - 776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285 - 290; およびCalissano and Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15 - 16を参照されたい。

【0181】

あらゆる部位特異的変異誘発手順を本発明で使用し得る。変種を調製するために使用できる、利用可能な多くの市販のキットがある。

【0182】

合成遺伝子構築は、対象ポリペプチドをコードするようにデザインされた、ポリヌクレオチド分子の生体外合成を必然的に伴う。遺伝子合成は、Tian et al. (2004, Nature 432: 1050 - 1054)によって記載される多重マイクロチップベースの技術、および光プログラム可能なマイクロ流体チップ上でオリゴヌクレオチドが合成され組み立てられる同様の技術などの、いくつかの技術を利用して実施し得る。

【0183】

単一または複数のアミノ酸置換、欠失、および／または挿入は、変異誘発、組換え、および／またはシャフリングなどの既知の方法と、それに続く、Reidhaar-Olsson and Sauer, 1988, Science 241: 53 - 57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152 - 2156; 国際公開第95/17413号パンフレット；または国際公開第95/22625号パンフレットによって開示されるような、妥当なスクリーニング手順とを使用して、作成し試験し得る。利用し得るその他の方法としては、誤りがちなPCR、ファージディスプレイ（例えば、Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832 - 10837；米国特許第5,223,409号明細書；国際公開第92/06204号パンフレット）、および領域特異的突然変異誘発（Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145；Ner et al., 1988, DNA 7: 127）が挙げられる。

【0184】

変異誘発／シャフリング方法をハイスループット自動スクリーニング法と組み合わせて、宿主細胞によって発現されるクローン化変異誘発ポリペプチドによる活性を検出し得る（Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 15: 1005 - 1010）。

7 : 893 - 896)。活性ポリペプチドをコードする変異誘発DNA分子は、当該技術分野の標準法を使用して、宿主細胞から回収し、迅速に配列決定し得る。これらの方法は、ポリペプチド中における個々のアミノ酸残基の重要性の迅速な判定を可能にする。

#### 【0185】

半合成遺伝子構築は、合成遺伝子構築、および／または部位特異的変異誘発、および／またはランダム変異誘発、および／またはシャフリングの態様を組み合わせることで達成される。半合成構築は、PCR技術と組み合わせて、合成されたポリヌクレオチド断片を利用する方法を特徴とする。したがって遺伝子の規定領域が新規に合成されてもよい一方で、その他の領域は、部位特異的変異原性プライマーを使用して増幅されてもよく、その一方で、なおもその他の領域は、誤りがちなPCRまたは誤りがちでないPCR増幅の対象となってもよい。次にポリヌクレオチドサブ配列をシャッフルしてもよい。

10

#### 【0186】

本発明の第5の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および／または本発明の態様および／またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数(いくつか)と、組み合わせてもよいことを理解する。

#### 【0187】

#### 生成方法

本発明の第6の態様は、本発明による変種の調製法に関する。本発明の変種は、当業者に周知の技術を使用して作成し得る。1つの便利な方法は、親アルブミンまたはその断片、またはアルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドをコードする核酸をクローニングし、前記核酸を修飾して、配列番号2の成熟ポリペプチドのドメインIおよびドメインII内の位置(またはその他のアルブミンまたはその断片中の同等の位置)に所望の置換を導入して、その中で修飾核酸が、プロモーター、ターミネーター、活性化部位、リボソーム結合部位などの適切な調節遺伝要素と作動可能に結合される適切な遺伝子コンストラクトを調製し、遺伝子コンストラクトを適切な宿主生物に導入し、変種の発現をもたらす条件下で形質転換宿主生物を培養して、変種を回収することである。これらの技術は全て当該技術分野で公知であり、本発明による特定の変種の適切な調製法をデザインすることは、平均的実務家の技能の範囲内である。

20

#### 【0188】

本発明の変種ポリペプチドはまた、形質転換宿主生物の培養中に、変種ポリペプチドを成長培地中に分泌させるために、シグナル配列と連結させてもよい。容易な回収と精製のために、変種ポリペプチドを成長培地中に分泌させることが、一般に有利である。

30

#### 【0189】

変種ポリペプチドを作成する技術は、(参照によって包含される)国際公開第2009019314号パンフレットで開示されており、これらの技術を本発明に応用してもよい。

#### 【0190】

アルブミンは、真菌(アスペルギルス属(*Aspergillus*))(国際公開第06066595号パンフレット)、クリベロミセス属(*Kluyveromyces*)(Fleer 1991, Bio/technology 9, 968-975)、ピキア属(*Pichia*)(*Kobayashi* 1998 Therapeutic Apheresis 2, 257-262)およびサッカロミセス属(*Saccharomyces*)(Sleep 1990, Bio/technology 8, 42-46)をはじめとするが、これに限定されるものではない)、細菌(*Pandjaitab* 2000, J. Allergy Clin. Immunol. 105, 279-285))、動物(*Barash* 1993, Transgenic Research 2, 266-276)、および植物(ジャガイモおよびタバコ(*Siemons* 1990, Bio/technology 8, 217 and Farran 2002, Transgen

40

50

ic Research 11, 337 - 346) および例えばイネ (Oryza sativa) などのイネをはじめとするが、これに限定されるものではない)、および CHO および HEK などの哺乳類細胞をはじめとする様々な宿主中で、組換えタンパク質として成功裏に発現されている。本発明の変種ポリペプチドは、好ましくは適切な宿主細胞中で組換え的に生成される。原則的に、適切な量でポリペプチドを産生できるあらゆる宿主細胞を使用してもよく、本発明による適切な宿主細胞を選択することは、平均値実務家の技能の範囲内である。好ましい宿主生物は酵母であり、好ましくサッカロミセス科 (Saccharomyces cereviciae) から選択され、より好ましいのはサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) である。

## 【0191】

10

本発明の変種ポリペプチドは、濾過、遠心分離、クロマトグラフィー、およびアフィニティ分離技術などの既知の分離技術の組み合わせを使用して、成長培地から回収および精製してもよい。このような既知の分離手順の特定の組み合わせを使用して、本発明の変種を精製することは、平均的実務家の技能の範囲内である。本発明の変種に応用してもよい精製技術の一例としては、国際公開第 00/44772 号パンフレットの教示に言及し得る。

## 【0192】

20

それを必要とする動物個体またはヒト個人に、(ワクチンなどの予防的に有益な化合物をはじめとする) 治療的に有益な化合物を送達するために、本発明の変種ポリペプチドを使用してもよい。このような治療的に有益な化合物としては、様々な造影技術などの診断法で利用される、標識および容易に検出可能な化合物; 薬剤などの薬学的に活性の化合物、または抗体などの特異的結合部分が挙げられるが、これに限定されるものではない。本発明の変種は、組み合わされた分子に、所望の標的と特異的に結合する能力を与え、それによって特定の標的において高濃度の結合薬物を提供する、例えば抗体および薬物などの、2種以上(いくつかの)異なる治療的に有益な化合物と、さらに結合されてもよい。

## 【0193】

30

本発明の第 6 の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第 1 の態様のものと、本発明の第 12 の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および / または本発明の態様および / またはその他の本明細書の開示の選択性の 1 つまたは複数(いくつか)と、組み合わせてもよいことを理解する。

## 【0194】

## 複合体

本発明の第 7 の態様は、複合体(結合)に関する。したがって当該技術分野で知られている技術を使用して、本発明によるアルブミン変種またはその断片または融合ポリペプチドを第 2 の分子(「複合化パートナー」)と複合化させてもよい。複合化パートナーは、治療的、(ワクチンをはじめとする)予防的、診断用、造影用またはその他の有益な部分であってもよい。前記複合化パートナーは、ポリペプチドまたは非ポリペプチド化学物質であってもよい。複合化パートナーは、ポリペプチド、化学物質(例えば化学的に合成された薬物)または核酸(例えば DNA、RNA、siRNA)であってもよい。

40

## 【0195】

前記第 2 の分子は、診断用または造影用部分を含んでなってもよく、この実施形態では、複合体は、造影などの診断ツールとして有用であってもよく; または第 2 の分子は、治療的または予防的(例えばワクチン)化合物であってもよく、この実施形態では、複合体を治療的または予防的(例えばワクチン接種)目的で使用してもよく、複合体は、治療的または予防的化合物の治療的または予防的特性、ならびに複合体のアルブミン部分によって提供される望ましい血漿半減期を有する。アルブミンと治療的分子の複合体は、当該技術分野で公知であり、このような複合体は、非複合化遊離治療的分子それ自体と比較して、長い血漿半減期を有することが確認されている。本発明によれば、対応する先行技術の複合体と比較して、本発明による複合体の FcRn に対する結合親和性および / または血

50

漿半減期を変化させることが可能である。「変化させる」は、血漿半減期を増大させること、および FcRnに対する血漿半減期結合親和性を低下させること、および / または FcRnに対する結合親和性を増大させること、および結合親和性を低下させることの双方を含む。血漿半減期および / または FcRnに対する結合親和性を増大させることが好ましい。複合体は、好都合には、周知の化学検査を使用して、HSA表面に存在する遊離チオール基(成熟HSAのアミノ酸残基34)を介して結合してもよい。

#### 【0196】

特定の好ましい一態様では、変種アルブミンまたはその断片は、有益な治療的または(ワクチンをはじめとする)予防的化合物と複合化し、複合体は、それを必要とする患者における病状の治療に使用され、その病状は、特定の選択された治療的化合物に応答性である。このような治療的に有用な化合物を変種アルブミンまたはその断片と複合化させる技術は、当該技術分野で公知である。(その内容全体を参照によって本明細書に援用する)国際公開第2009/019314号パンフレットは、治療的化合物をポリペプチドに複合化させるのに適した技術の例を開示しており、その技術は、本発明にもまた応用し得る。さらに国際公開第2009/019314号パンフレットは、置換トランスフェリンと複合化していてもよい化合物および部分の例を開示しており、これらの実施例は、本発明にもまた応用してもよい。国際公開第2009/019314号パンフレットの教示は、参考によって本明細書に包含される。

10

#### 【0197】

HSAは、その天然形態中で、1つの遊離チオール基を(Cys34に)含有し、それは好都合には複合化のために使用されてもよい。この態様内の特定の実施形態として、変種アルブミンまたはその断片は、表面に追加的な遊離チオール基を生じるように提供される、さらなる改変を含んでなってもよい。これは、変種アルブミンまたはその断片の装填量が増大する利点を有し、その結果、治療的(例えば予防的)化合物の2つ以上の分子が、変種アルブミンまたはその断片の各分子に複合化し得て、または2つ以上の(いくつかの)治療的化合物が、異なる変種アルブミンまたはその断片の各分子に複合化されてもよく、例えば変種アルブミンまたはその断片に複合化された、腫瘍特異的抗体などの標的化特性を有する化合物;および細胞毒性薬など、それによって腫瘍に対する高度に特異的な薬物が作り出される。改変されて、表面にさらなる遊離チオール基を提供してもよい特定の残基の教示は、参考によって援用する同時係属特許出願、国際公開第2010/092135号パンフレットにある。

20

#### 【0198】

複合化パートナーは、代案としては(本明細書に記載される)融合ポリペプチド複合化して、アルブミンに融合した融合パートナー、ならびに同一アルブミンと複合化しましたは融合パートナーとさえ複合化する、複合化パートナーを含んでなる分子をもたらしてもよい。

30

#### 【0199】

本発明の第7の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および / または本発明の態様および / またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数(いくつか)と、組み合わせてもよいことを理解する。

40

#### 【0200】

##### 会合

本発明の第8の態様は、会合に関する。したがってアルブミン変種またはその断片または融合ポリペプチドを、「会合」の形態でさらに使用してもよい。これに関連して「会合」という用語は、アルブミン変種またはその断片と、変種アルブミンまたはその断片に非共有結合によって結合または会合する別の化合物とを含んでなる、化合物を意味することが意図される。このような会合の一例として、変種アルブミンと、疎水性相互作用によってアルブミンに会合する脂質とからなる会合に言及し得る。このような会合は、当該技術

50

分野で公知であり、それは周知の技術を使用して調製されてもよい。本発明による好ましい会合の一例として、変種アルブミンと、タキサン、タキソールまたはタキソール誘導体（例えばパクリタキセル）とを含んでなる会合に言及し得る。会合のさらなる例は、治療的、（ワクチンをはじめとする）予防的、診断用、造影用またはその他の有益な部分を含んでなる。

#### 【0201】

本発明によるアルブミン会合の半減期は、「その他の化合物」のみの半減期より長くともまたは短くてもよい。本発明によるアルブミン会合の半減期は、（本発明によるアルブミン変種または誘導体の代わりに）天然HSAなどの参照アルブミンと、「その他の化合物」とを含んでなり、またはそれからなる、類似／同等のアルブミン会合の半減期より長くともまたは短くてもよい。同様に、本発明によるアルブミン会合のFcRnに対する結合親和性は、（本発明によるアルブミン変種または誘導体の代わりに）天然HSAなどの参照アルブミンと、「その他の化合物」とを含んでなり、またはそれからなる、類似／同等のアルブミン会合のFcRnに対する結合親和性より強力でもまたは弱くてもよい。会合を調製する方法は当業者に周知であり、例えばHSAとリポ化合物の（会合による）調合は、Hussain, R. and Siligardi, G. (2006) International Journal of Peptide Research and Therapeutics, Vol. 12, NO: 3, pp. 311 - 315に記載される。

#### 【0202】

本発明の第8の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および／または本発明の態様および／またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数（いくつか）と、組み合わせてもよいことを理解する。

#### 【0203】

##### 組成物

本発明の第9の態様は、組成物に関する。したがって本発明はまた、医薬組成物を製造するための、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる複合体、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる会合の使用を対象とし、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる複合体、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる会合は、HSAまたは対応するその断片、またはHSAまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、またはHSAを含んでなる複合体と比較して、FcRnに対する結合親和性の変化および／または血漿半減期の変化を有する。

#### 【0204】

これに関連して、HSAの対応する断片とは、それが比較される変種アルブミン断片と配列比較されて、同一アミノ酸番号を有するHSA断片を意味することが意図される。同様に、HSAを含んでなる対応する融合ポリペプチド、またはHSAを含んでなる複合体とは、それが比較される変種アルブミンを含んでなる複合体の融合ポリペプチドと、同一サイズおよびアミノ酸配列を有する分子を意味することが意図される。

#### 【0205】

組成物は、水、ポリソルベート80、またはヒトアルブミンについてUS薬局方で規定されるものなどの、薬学的に許容できる担体または賦形剤を含んでなってもよい。

#### 【0206】

本発明の第9の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および／または本発明の態様および／またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数（いくつか）と、組み合わせてもよ

10

20

30

40

50

いことを理解する。

【0207】

ナノ粒子

本発明の第10の態様は、本明細書で開示される変種、融合物、複合体、会合、ナノ粒子、組成物またはポリヌクレオチドを含んでなるナノ粒子に関する。

【0208】

ナノ粒子または微粒子への分子組み込み技術は、当該技術分野で公知である。本発明によるアルブミン、その変種、断片、融合物、複合体または会合に応用してもよいナノ粒子または微粒子を作成する好ましい方法は、参照によって本明細書に援用する、国際公開第2004/071536号パンフレット、または国際公開第2008/007146号パンフレット、またはOne & Groves (Pharmaceutical Research, Vol 10 (9), 1993, pages 1387 to 1388) で開示される。好ましくはナノ粒子の平均径は、5~1000nm、より好ましくは5、10、20、30、40、50、80、100、130、150、200、300、400、500、600、700、800、900、または999~5、10、20、30、40、50、80、100、130、150、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000nmである。直径が200nm未満、より特には130nm未満の微粒子の利点は、0.2μm(ミクロン)フィルターを通過させる濾過滅菌に適していることである。好ましくはマイクロ粒子の平均径は、1000nm(1μm(ミクロン))~100μm(ミクロン)、より好ましくは1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100~1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100μm(ミクロン)である。

【0209】

本発明の第10の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第1の態様のものと、本発明の第12の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および/または本発明の態様および/またはその他の本明細書の開示の選択性の1つまたは複数(いくつか)と、組み合わせてもよいことを理解する。

【0210】

使用

本発明の第11の態様は、変種アルブミン、その断片、融合物または複合体、またはそのナノ粒子または会合の使用に関する。使用は、例えば、治療法、予防法、診断または造影における使用であってもよい。本発明による変種アルブミンまたはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチドは、それらのFcRnに対する結合親和性および/または血漿半減期が、親または参照アルブミンまたはその断片、または親または参照アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドと比較して、変化している利点を有する。これは本発明による変種アルブミンまたはその断片を含んでなる複合体、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる会合のFcRnに対する結合親和性および/または血漿半減期が、特定の治療目的に従って選択され得る利点を有する。

【0211】

状況によっては、参照分子または組成物よりも長い血漿半減期を有する、アルブミン、変種、断片、融合物、複合体または会合またはその組成物を利用することは、アルブミン、変種、断片、融合物、複合体または会合またはその組成物の投与が、参照分子または組成物が使用された状況と比較して、より低い頻度で、またはより低い用量で必要とされるであろう(および結果的により少ない副作用がある)ことから、有利であろう。変種、融合物、複合体、会合、ナノ粒子、組成物またはポリヌクレオチドの使用に関して、アルブミン部分は、本明細書で開示されるようなもう1つの改変を含んでなってもよい。

【0212】

他の状況では、参照分子または組成物よりも短い血漿半減期を有する、アルブミン

10

20

30

40

50

、変種、断片、融合物、複合体または会合またはその組成物を利用することは、アルブミン、変種、断片、融合物、複合体または会合またはその組成物の投与が、参照分子または組成物が使用された状況と比較して、より高い用量で実施され得る利点を有するであろうことから有利であり、投与された化合物が、参照分子または組成物を使用した場合よりも、受容者からより迅速に除去される利点がある。変種、融合物、複合体、会合、ナノ粒子、組成物またはポリヌクレオチドの使用に関して、アルブミン部分は、本明細書で開示されるようなもう1つの改変を含んでなってもよい。

#### 【0213】

例えれば、造影部分が非常に短い半減期を有し、HSAを含んでなる複合体または融合ポリペプチドが造影目的で必要なよりもはるかにより長い血漿半減期を有する、動物またはヒトにおける造影目的で使用される複合体、会合または融合ポリペプチドでは、親または参照アルブミンまたはその断片よりも短い血漿半減期を有する、本発明の変種アルブミンまたはその断片を利用して、造影目的のために十分に長いが、それが施用される特定の患者の身体から除去される(cleared form)のに十分に短い血漿半減期を有する、融合ポリペプチドの複合体を提供することが有利であろう。

10

#### 【0214】

このような治療を必要とする患者において、特定の病状を治療したは緩和するのに効果的な治療的化合物を含んでなる、複合体、会合または融合ポリペプチドの別の例では、親または参照アルブミンまたはその断片よりも長い血漿半減期を有する変種アルブミンまたはその断片を利用して、より長い血漿半減期を有する会合または複合体または融合ポリペプチドを提供することが有利であり、それは本発明の会合または複合体または融合ポリペプチドの投与が、親または参照アルブミンまたはその会合またはその断片を使用した状況と比較して、副作用がより少ない、より低い頻度またはより低い用量で必要とされる利点を有するであろう。例えれば、本発明は、個人にタキサン、タキソールまたはタキソール誘導体(例えばパクリタキセル)を含んでなる、本発明による会合の有効量を投与するステップを含んでなる、個人において増殖性疾患治療する方法を提供する。

20

#### 【0215】

さらなる態様では、本発明は、本発明による変種アルブミン、その会合またはその断片、変種アルブミン断片またはその会合、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドを含んでなる組成物に関する。組成物は、好ましくは医薬組成物である。組成物は、医薬分野の一般に認められている手引き書に開示されるような領域で公知の技術を使用して、調製されてもよい。アルブミン、その変種、断片、融合物、複合体または会合は、調節された、参照分子よりも(より強力なまたはより弱いおよび/またはより長いまたはより短い)FcRnに対する結合親和性および/または血漿半減期を有するので、組成物もまた、本明細書に記載されるようなアルブミン、その変種、断片、融合物、複合体または会合の代わりに参照分子を含んでなる対応する組成物と比較して、FcRnに対する結合親和性および/または調節された(すなわち変化した)血漿半減期を有する。組成物は、ワクチンであってもよい。本発明によるポリペプチドは、活性剤または賦形剤であってもよい。任意選択的に、組成物は、単一剤形で提供される。

30

#### 【0216】

好ましくは、アルブミン、その変種、断片、融合物、複合体または会合は、例えはアルブミン成分(例えはアルブミン、変種、断片、融合物、複合体または会合)が野生型アルブミン(例えはHSA)または変種、断片、融合物、複合体または会合である以外は、同一組成物である、参照分子の血漿半減期より長い血漿半減期を有する。

40

#### 【0217】

特定の実施形態では、組成物は、本発明による変種アルブミンまたはその断片を含んでなり、化合物は、薬理的に有益な部分およびアルブミン結合領域(ABD)を含んでなる。本発明によれば、ABDとは、生体内で循環アルブミンに結合し、それによって循環中にABDの輸送を与え得る部位、部分またはドメイン、および前記ABDに結合するあらゆる化合物または部分を意味する。ABDは当該技術分野で公知であり、アルブミンと非

50

常に密接に結合することが示されており、したがってアルブミンに結合した A B D を含んでなる化合物は、ある程度まで單一分子として挙動する。本発明者らは、本発明による変種アルブミンまたはその断片と、薬理的に有益な部分および A B D を含んでなる化合物とを一緒に使用することで、前記化合物が、それを必要とする患者に、そのまま注射され、または天然アルブミンまたはその断片を含んでなる調合物中で投与される状況と比較して、薬理的に有益な部分および A B D を含んでなる化合物の F c R n に対する結合親和性および / または血漿半減期を変化させられるようになることに気付いた。

#### 【 0 2 1 8 】

本発明による変種アルブミンまたはその断片、変種アルブミンまたはその断片を含んでなる複合体、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、または変種アルブミンまたはその断片を含んでなる会合はまた、当該技術分野内で周知の技術を使用して、ナノ粒子または微粒子中に組み込まれてもよい。本発明による変種アルブミンまたはその断片に応用されてもよい、好ましいナノ粒子または微粒子調製法は、参照によって本明細書に援用する、国際公開第 2004 / 071536 号パンフレットまたは国際公開第 2008 / 007146 号パンフレットまたは Oner & Groves (Pharmaceutical Research, Vol 10 (9), 1993, pages 1387 to 1388) で開示される。

10

#### 【 0 2 1 9 】

本発明の第 11 の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第 1 の態様のものと、本発明の第 12 の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および / または本発明の態様および / またはその他の本明細書の開示の選択性の 1 つまたは複数 (いくつか) と、組み合わせてもよいことを理解する。

20

#### 【 0 2 2 0 】

分子の F c R n 結合親和性または半減期を変化させる方法

本発明の第 12 の態様は、

( a ) 分子がポリペプチドである場合、分子を本明細書で開示されるポリペプチドまたは本明細書で開示される複合体に、融合または複合化させるステップと；分子を本明細書で開示されるポリペプチド、または本明細書で開示される複合体に結合させるステップと；分子を本明細書で開示されるナノ粒子、または本明細書で開示される組成物に組み込むステップと；

30

( b ) 分子がポリペプチドでない場合、分子を本明細書で開示されるポリペプチド、または本明細書で開示される複合体に複合化させるステップと；分子を本明細書で開示されるポリペプチドまたは本明細書で開示される複合体に結合させるステップと；分子を本明細書で開示されるナノ粒子、または本明細書で開示される組成物に組み込むステップとを含んでなる、分子の F c R n 結合親和性または半減期を変化させる方法を提供する。

#### 【 0 2 2 1 】

「分子」の例としては、本明細書で記載されるものなどの、治療法、(活性医薬品成分または賦形剤のいずれかとして、ワクチンで使用されるものをはじめとする) 予防法、造影および診断で有用なものが挙げられる。

40

#### 【 0 2 2 2 】

本発明の第 12 の態様のためのさらなる選択性としては、本発明の第 1 の態様のものと、本発明のこの第 12 の態様の下に提供されるものとが挙げられる。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および / または本発明の態様および / またはその他の本明細書の開示の選択性の 1 つまたは複数 (いくつか) と、組み合わせてもよいことを理解する。

#### 【 0 2 2 3 】

本発明の全ての態様の選択性は、下に提供される。当業者は、本発明のあらゆる態様を、本発明の別の態様または態様群と、および / または本発明の態様および / またはその他の本明細書の開示の選択性の 1 つまたは複数 (いくつか) と、組み合わせてもよいことを

50

理解する。

【0224】

アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物は、対応するアルブミンまたはその断片、またはアルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物の血漿半減期よりも長いかまたは短いかのいずれかで、好ましくはより長い血漿半減期を有してもよく、またはFcRnに対するより強力なまたはより弱い、好ましくはより弱い結合を有してもよい。好ましくはアルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物は、HSAまたは相当するアルブミンまたはその断片、またはアルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物の血漿半減期より長い血漿半減期を有する。  
10

【0225】

代案としては、これは、FcRnに対するHSAの、または対応するその断片、またはHSAまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドの対応するKDよりも低い、FcRn(例えばshFcRn)に対するKDを有する、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物として表されてもよい。好ましくは、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物のKDは、HSAのFcRnに対するKDの0.9×未満であり、より好ましくはHSAのFcRnに対するKDの0.5×未満であり、より好ましくはHSAのFcRnに対するKDの0.1×未満であり、なおもより好ましくはHSAのFcRnに対するKDの0.05×未満であり、なおもより好ましくはHSAのFcRnに対するKDの0.02×未満であり、最も好ましくはHSAのFcRnに対するKDの0.01×未満である(×は「乗数」を意味する)。アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物のKDは、FcRnに対するWTアルブミン(例えば配列番号2)のKDと、FcRnに対するHSACK573P(配列番号3)のKDとの間であってもよい。このようなKDは、HSAとFcRn間の結合親和性よりも高い結合親和性に相当する。より高い結合親和性は、より長い例えば血漿半減期などの半減期を示唆する。  
20

【0226】

代案としては、アルブミン変種またはその断片、または変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチドアルブミン、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物は、HSAまたは対応するその断片、またはHSAまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチドの血漿半減期より短い血漿半減期を有する。

【0227】

これは、FcRnに対するHSAの、または対応するアルブミンまたはその断片、またはアルブミンまたはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物の対応するKDよりも高い、FcRnに対するKDを有する、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物として表されてもよい。好ましくは、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる複合体のKDは、HSAのFcRnに対するKDの2×を超えて、より好ましくはHSAのFcRnに対するKDの5×を超えて、より好ましくはHSAのFcRnに対するKDの10×を超えて、なおもより好ましくはHSAのFcRnに対するKDの25×を超えて、さらに最も好ましくはHSAのFcRnに対するKDの50×を超える。アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド  
40  
50

、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物は、FcRnに対してヌルバインダーであってもよい。

#### 【0228】

アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる複合体またはナノ粒子または会合または組成物は、好ましくは、本発明によるアルブミン変種またはその断片を含んでなるアルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、または複合体またはナノ粒子または会合または組成物である。より低い結合親和性は、例えばより短い血漿半減期などの半減期を示唆する。

10

#### 【0229】

本発明の1つの利点は、使用者の要求を満たす結合親和性または半減期を達成するために、アルブミン、アルブミン変種またはその断片、またはアルブミン変種またはその断片を含んでなる融合ポリペプチド、その断片、複合体、ナノ粒子、会合または組成物の半減期を調整できることである。

#### 【0230】

KDを測定するおよび／または比較する際には、以下のパラメータの1つまたは複数の（および好ましくは全て）を使用してもよい。

装置：Biacore 3000装置(GE Healthcare)

20

フローセル：CM5センサーチップ

FcRn：好ましくは可溶性ヒトFcRnであるヒトFcRn、任意選択的に、GSTまたはHisなどのタグ、最も好ましくは-2-ミクログロブリン（配列番号31）のC末端の6ヒスチジンなどのHisと連結される。

FcRnの量：1200～2500 RU

複合化化学反応：（例えば装置の製造会社によって提供されるプロトコルに記載される）アミン複合化化学反応。

複合化法：複合化は、pH5.0の10mMの酢酸ナトリウム(GE Healthcare)への20μg/mlのタンパク質の注入によって実施してもよい。リン酸緩衝液(67mMのリン酸緩衝液、0.15MのNaCl、0.005%のツイーン20)pH5.5を泳動用緩衝液および希釈緩衝液として使用してもよい。表面再生は、pH7.4におけるHBS-EP緩衝液(0.01MのHEPES、0.15MのNaCl、3mMのEDTA、0.005%の界面活性剤P20)(Biacore AB)の注入を使用して、実施してもよい。

30

試験分子（例えばHSAまたは変種）の注入量 20～0.032μM

注入の流速：例えば30μl/mlなどの一定速度

注入温度：25

データ評価ソフトウェア：BIA evaluation 4.1ソフトウェア(Biacore AB)。

#### 【0231】

KDを求める好ましい方法は、実施例2に提供される。

40

#### 【0232】

本発明は、アルブミン、断片、融合物、複合体、会合、ナノ粒子または組成物の結合親和性および／または例えば血漿半減期などの半減期を調節する（増大または低下させる）ために、配列番号2のドメインI II内の1つまたは複数の（いくつかの）位置（したがってヒト血清およびアルブミンおよび非ヒト血清アルブミンからのアルブミンおよび断片中の同等の位置）と組み合わせて、ドメインI内の1つまたは複数の（いくつかの）位置を変化させてもよいことを開示する。改変は、置換、挿入または欠失であってもよい。置換が好ましい。

#### 【0233】

置換または挿入は、保存アミノ酸、すなわち対象位置のアミノ酸との関連で保存された

50

アミノ酸の導入を含んでなってもまたは含まなくてもよい。保存アミノ酸の例は、図3の脂肪族、芳香族、疎水性、荷電、極性、陽性、極小、および小型の集団で示される。

#### 【0234】

配列番号2の82位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）では、改変は、天然アミノ酸から、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、より好ましいのはQ、D、A、さらにより好ましいのはD、A、最も好ましいのはAへの置換である。配列番号2中では、82位の天然アミノ酸はグルタミン酸であり、したがってグルタミン酸への置換は好ましくない。

#### 【0235】

配列番号2の83位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）では、改変は、天然アミノ酸から、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、より好ましいのはN、K、S、さらにより好ましいのはN、K、最も好ましいのはNへの置換である。配列番号2中では、83位の天然アミノ酸はスレオニンであり、したがってスレオニンへの置換は好ましくない。

#### 【0236】

配列番号2の111位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）では、改変は、天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、よりも好ましいのはN、E、Q、D、G、H、さらにより好ましいのはE、Q、最も好ましいのはEへの置換である。配列番号2中では、111位の天然アミノ酸はアスパラギンであり、したがってアスパラギンへの置換は好ましくない。

#### 【0237】

配列番号2中の112位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）では、改変は天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどの置換であることが好ましく、より好ましいのはF、Y、W、さらにより好ましいのはF、Y、最も好ましいのはFへの置換である。配列番号2中では、112位の天然アミノ酸はロイシンであり、したがってロイシンへの置換は好ましくない。

#### 【0238】

配列番号2の573位（またはその他のアルブミンまたはその断片の変種の相当する位置）では、改変は、天然アミノ酸からA、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yなどへの置換であることが好ましく、よりも好ましいのはP、Y、W、H、F、T、IまたはV、さらによりよりも好ましいのはP、YまたはW、最好ましいのはPへの置換である。配列番号2中では、573位の天然アミノ酸はリジンであり、したがってリジンへの置換は好ましくない。

#### 【0239】

位置82における改変は、Aに対して保存的であることが好ましい。位置83における改変は、Nに対して保存的であることが好ましい。位置111における改変は、Eに対して保存的であることが好ましい。位置112における改変は、Fに対して保存的であることが好ましい。位置573における改変は、Pに対して保存的であることが好ましい。

#### 【0240】

特に好ましいアルブミン変種は、T83N/N111E（例えば配列番号32）；T83N/N111E/K573P（例えば配列番号33）；T83N/K573P（例えば配列番号34）；T83K/K573P（例えば配列番号38）；E82A/K573P（例えば配列番号39）；L112F/K573P（例えば配列番号40）；E82D/K573P（例えば配列番号43）；P110G/K573P（例えば配列番号44）；N111D/K573P（例えば配列番号60）；N111G/K573P（例えば配列番号61）；N111H/K573P（例えば配列番号62）；E425A/K573P

10

20

30

40

50

(例えば配列番号 64) ; E 505Q / K573P (例えば配列番号 65) ; T527M / K573P (例えば配列番号 66) ; N111E / K573P (例えば配列番号 68) ; K534V / K573P (例えば配列番号 73) ; N111Q / K573P (例えば配列番号 74) の置換を含んでなり、それらは HSA (配列番号 2) を参照して記述される。その他の好ましいアルブミン変種は、HSA (配列番号 2) 以外のアルブミン中に同等の置換を含んでなる。

#### 【0241】

また本発明によるアルブミン変種は、HSA (配列番号 2) の 78 ~ 88 および / または 105 ~ 120 および / または 425、505、510、512、524、527、531、534、569、575、またはその他のアルブミンの同等の位置から選択される位置における、1つまたは複数の (いくつかの) 改変を含んでなってもよい。好ましい改変は、本発明の第 1 の態様で、これらの位置について記載されるものなどの置換である。特に好ましい置換としては、D108A (配列番号 59) ; D108E (例えば配列番号 70) ; N109K (例えば配列番号 69) ; P110G (例えば配列番号 42) ; N111D (例えば配列番号 46) ; N111E (例えば配列番号 67) ; N111G (例えば配列番号 48) ; N111H (例えば配列番号 49) ; N111K (例えば配列番号 54) ; L112F (例えば配列番号 37) ; E425A (例えば配列番号 63) ; E425K (例えば配列番号 55) ; E505Q (例えば配列番号 45) ; H510D (例えば配列番号 57) ; D512E (例えば配列番号 50) ; K524A (例えば配列番号 51) ; T527A (例えば配列番号 52) ; T527M (例えば配列番号 47) ; E531H (例えば配列番号 53) ; K534V (例えば配列番号 56) ; A569S (例えば配列番号 58) ; L575F (例えば配列番号 72) ; E82A (例えば配列番号 36) ; E82D (例えば配列番号 41) ; T83K (例えば配列番号 35) ; T83N (例えば配列番号 71) が挙げられ、それらは HSA (配列番号 2) を参照して記述される。1つまたは複数の (いくつかの) 改変を含んでなるその他の好ましいアルブミン変種は、HSA (配列番号 2) 以外のアルブミン中に同等の置換を含んでなってもよい。

#### 【0242】

有利なことに、ポリペプチドは、HSA などの参照または親アルブミンと、実質的に同じ三次構造 (または断片の場合は、構造の該当する部分) を維持する。全てのタンパク質は、ある程度の構造融通性を有するので、当業者は、三次構造中のある程度の変動が予期されることを念頭に置いて、「実質的に同じ三次構造」という用語を理解する。これは特に、親または参照アルブミン (例えば HSA) が FcRn に対して有するよりも、より高い FcRn に対する結合親和性を有するポリペプチドに当てはまる。

#### 【0243】

His 残基の 1つまたは複数 (いくつか) は、親アルブミンに対して維持されてもまたはされなくてもよい。例えば配列番号 2 に関して、以下の His 残基の 1つまたは複数 (いくつか) が維持されてもよい : 3、9、39、67、105、128、146、242、247、288、338、367、440、464、510、および / または 535。ドメイン I 内の His 残基の 1つまたは複数 (いくつか) が、好ましくは全て (すなわち 3、9、39、67、105、128、146) が維持される。ドメイン II 内の His 残基の 1つまたは複数 (いくつか) が、好ましくは全て (すなわち 242、247、288、338、367) が維持される。ドメイン III 内の His 残基の 1つまたは複数 (いくつか) が、好ましくは全て (すなわち 440、464、510、535) が維持される。His 464、510、535 の 1つまたは複数 (いくつか) または全てが、維持されてもよい。

#### 【0244】

アルブミンのジスルフィド結合の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 または 17 個が、ポリペプチド中に維持されることが好ましい。完全長アルブミンに由来するポリペプチドでは、通常はそのアルブミン中に存在する全てのジスルフィド結合が、維持されることが好ましい。アルブミン断片に

由来するポリペプチドでは、通常はその断片中に存在する全てのジスルフィド結合が、維持されることが好ましい。Cys34（または非ヒトアルブミン中の同等物）が維持されることが好ましい。

#### 【0245】

本発明の全ての態様で、融合パートナーポリペプチドおよび／または複合体は、以下の1つまたは複数（いくつか）を含んでなってもよい。4-1BBリガンド、5-らせん、ヒトC-Cケモカイン、ヒトL105ケモカイン、h u L 1 0 5 \_ 3 . と称されるAヒトL105ケモカイン、-インターフェロン（MIG）によって誘導されるモノカイン、部分的CXCR4Bタンパク質、血小板塩基性タンパク質（PBP）、1-アンチトリプシン、ACRP-30ホモログ；補体成分C1qC、アデノイド発現ケモカイン（ADC）、aFGF；FGF-1、AGF、AGFタンパク質、アルブミン、エトポシド、アンギオスタチン、炭疽病ワクチン、コラブシンに対して特異的な抗体、アンチスタチン、抗TGFベータファミリー抗体、抗トロンビンIII、APM-1；ACRP-30；ファモキシン、アボ-リボタンパク質種、アリールスルファターゼB、b57タンパク質、BCMA、-トロンボグロブリンタンパク質（-TG）、bFGF；FGF2、血液凝固因子、BMPプロセッシング酵素フューリン、BMP-10、BMP-12、BMP-15、BMP-17、BMP-18、BMP-2B、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-9、骨形態形成タンパク質-2、カルシトニン、カルパイン-10a、カルパイン-10b、カルパイン-10c、がんワクチン、カルボキシペプチダーゼ、C-Cケモカイン、MCP2、CCR5変種、CCR7、CCR7、CD11a Mab、CD137；4-1BB受容体タンパク質、CD20 Mab、CD27、CD27L、CD30、CD30リガンド、CD33免疫毒素、CD40、CD40L、CD52 Mab、セレブスタンパク質、ケモカインエオタキシン、ケモカインhIL-8、ケモカインhMCP1、ケモカインhMCP1a、ケモカインhMCP1b、ケモカインhMCP2、ケモカインhMCP3、ケモカインhSDF1b、ケモカインMCP-4、ケモカインTECKおよびTECK変種、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質IL-8M1、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質IL-8M10、ケモカイン様タンパク質IL-8M3、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質IL-8M8、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質IL-8M9、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質PF4-414、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質PF4-426、完全長および成熟ケモカイン様タンパク質PF4-M2、コレラワクチン、コンドロモジュリン様タンパク質、c-キットリガンド；SCF；肥満細胞成長因子；MGF；線維肉腫由来幹細胞因子、CNTFおよびその断片（CNTFAx15`（アキソキン（商標））など）、プレおよび活性形態双方の凝固因子、コラーゲン、補体C5 Mab、結合組織活性化タンパク質-III、CTAA16.88 Mab、CTAP-III、CTLA4-Ig、CTLA-8、CX3C、CX3C、CXCR3；CX3ケモカイン受容体3、シアノビリン-N、ダルベポエチン、名称exodus、名称h u L 1 0 5 \_ 7、DIL-40、デオキシリボヌクレアーゼ、EDAR、EGF受容体Mab、ENA-78、エンドスタチン、エオタキシン、上皮好中球活性化タンパク質-78、EPO受容体；EPOR、エリスロポエチン（EPO）およびEPO模倣体、ユートロピン、Exodusタンパク質、第IX因子、第VII因子、第VII因子、第X因子、および第XIII因子、FASリガンド阻害タンパク質（DcR3）、FasL、FasL、FasL、FGF、FGF-12；線維芽細胞成長因子相同因子-1、FGF-15、FGF-16、FGF-18、FGF-3；INT-2、FGF-4；ゲロニン、HST-1；HBGF-4、FGF-5、FGF-6；ヘパリン結合分泌形質転換因子-2、FGF-8、FGF-9；Glia活性化因子、フィブリノーゲン、f1t-1、f1t-3リガンド、濾胞刺激ホルモンサブユニット、濾胞刺激ホルモンサブユニット、フォリトロピン、フラクタルカイン、断片・筋原線維タンパク質トロポニンI、FSH、ガラクトシダーゼ、ガレクチン-4、G-CSF、GDF-1、遺伝子療法、神経膠腫由来成長因子、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド、グルコセレブロシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ、グ

10

20

30

40

50

リコデリン - A ; プロゲステロン結合子宮内膜タンパク質、G M - C S F、ゴナドトロビン、顆粒球走化性タンパク質 - 2 ( G C P - 2 )、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、成長ホルモン、増殖関連発がん遺伝子 - ( G R O - )、増殖関連発がん遺伝子 - ( G R O - )、増殖関連発がん遺伝子 - ( G R O - )、h A P O - 4 ; T R O Y 10  
 、h C G、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ワクチン、H E R 2受容体M a b、ヒルジン、H I V g p 1 2 0、H I V g p 4 1、H I V阻害ペプチド、H I V阻害ペプチド、H I V阻害ペプチド、H I Vプロテアーゼ阻害ペプチド、H I V - 1プロテアーゼ阻害剤、H P Vワクチン、ヒト6 C K i n e タンパク質、ヒトA c t - 2タンパク質、ヒト脂肪生成阻害因子、ヒトB細胞刺激因子 - 2受容体、ヒトベータ - ケモカインH 1 3 0 5 ( M C P - 2 )、ヒトC - CケモカインD G W C C、ヒトC C ケモカインE L C タンパク質、ヒトC C型ケモカインインターロイキンC、ヒトC C C 3 タンパク質、ヒトC C F 1 8 ケモカイン、S L C ( 二次リンパ系ケモカイン ) と称されるヒトC C型ケモカインタンパク質、ヒトケモカインベータ - 8 短鎖形態、ヒトケモカインC 1 0 , ヒトケモカインC C - 2 、ヒトケモカインC C - 3 、ヒトケモカインC C R - 2 、ヒトケモカインC k ベータ - 7 、ヒトケモカインE N A - 7 8 、ヒトケモカインエオタキシン、ヒトケモカインG R Oアルファ、ヒトケモカインG R Oアルファ、ヒトケモカインG R Oベータ、ヒトケモカインH C C - 1 、ヒトケモカインH C C - 1 、ヒトケモカインI - 3 0 9 、ヒトケモカインI P - 1 0 、ヒトケモカインL 1 0 5 \_ 3 、ヒトケモカインL 1 0 5 \_ 7 、ヒトケモカインM I G 、ヒトケモカインM I G - タンパク質、ヒトケモカインM I P - 1 アルファ、ヒトケモカインM I P 1 ベータ、ヒトケモカインM I P - 3 アルファ、ヒトケモカインM I P - 3 ベータ、ヒトケモカインP F 4 、ヒトケモカインタンパク質3 3 1 D 5 、ヒトケモカインタンパク質6 1 1 6 4 、ヒトケモカイン受容体C X C R 3 、ヒトケモカインS D F 1 20  
 アルファ、ヒトケモカインS D F 1 ベータ、ヒトケモカインZ S I G - 3 5 、ヒトC h r 1 9 K i n e タンパク質、ヒトC K ベータ - 9 、ヒトC K ベータ - 9 、ヒトC X 3 C 1 1 1 アミノ酸ケモカイン、ヒトD N A X インターロイキン - 4 0 、ヒトD V i c - 1 C - C ケモカイン、ヒトE D I R F I タンパク質配列、ヒトE D I R F I I タンパク質配列、ヒト好酸球C C型ケモカインエオタキシン、ヒト好酸球発現ケモカイン( E E C )、ヒト速収縮骨格筋トロポニンC、ヒト速収縮骨格筋トロポニンI、ヒト速収縮骨格筋トロポニンサブユニットC、ヒト速収縮骨格筋トロポニンサブユニットIタンパク質、ヒト速収縮骨格筋トロポニンサブユニットT、ヒト速収縮骨格筋トロポニンT、ヒト胎児脾臓発現ケモカイン、F S E C 、ヒトG M - C S F 受容体、ヒトg r o - アルファケモカイン、ヒトg r o - ベータケモカイン、ヒトg r o - ガンマケモカイン、ヒトI L - 1 6 タンパク質、ヒトI L - 1 R D 1 0 タンパク質配列、ヒトI L - 1 R D 9 、ヒトI L - 5 受容体鎖、ヒトI L - 6 受容体、ヒトI L - 8 受容体タンパク質h I L 8 R A 、ヒトI L - 8 受容体タンパク質h I L 8 R B 、ヒトI L - 9 受容体タンパク質、ヒトI L - 9 受容体タンパク質変種# 3 、ヒトI L - 9 受容体タンパク質変種断片、ヒトI L - 9 受容体タンパク質変種断片# 3 、ヒトイントラロイキン1 デルタ、ヒトイントラロイキン1 0 、ヒトイントラロイキン1 0 、ヒトイントラロイキン1 8 、ヒトイントラロイキン1 8 誘導体、ヒトイントラロイキン - 1 ベータ前駆体、ヒトイントラロイキン - 1 ベータ前駆体、ヒトイントラロイキン - 1 受容体アクセサリータンパク質、ヒトイントラロイキン - 1 受容体拮抗薬 30  
 、ヒトイントラロイキン - 1 受容体3型、ヒトイントラロイキン - 1 0 ( 前駆体 ) 、ヒトイントラロイキン - 1 0 ( 前駆体 ) 、ヒトイントラロイキン - 1 1 受容体、ヒトイントラロイキン - 1 2 の4 0 k D サブユニット、ヒトイントラロイキン - 1 2 受容体 - 1 、ヒトイントラロイキン - 1 2 受容体 - 2 、ヒトイントラロイキン - 1 2 のp 3 5 タンパク質、ヒトイントラロイキン - 1 2 のp 4 0 タンパク質、ヒトイントラロイキン - 1 2 受容体、ヒトイントラロイキン - 1 3 受容体、ヒトイントラロイキン - 1 3 受容体、ヒトイントラロイキン - 1 5 、クローンP 1 からのヒトイントラロイキン - 1 5 受容体、ヒトイントラロイキン - 1 7 受容体、ヒトイントラロイキン - 1 8 タンパク質( I L - 1 8 ) 40  
 、ヒトイントラロイキン - 3 、ヒトイントラロイキン - 3 受容体、ヒトイントラロイキン - 3 变種、ヒトイントラロイキン - 4 受容体、ヒトイントラロイキン - 5 、ヒトイントラ 50

ロイキン - 6、ヒトイントーロイキン - 7、ヒトイントーロイキン - 7、ヒトイントーロイキン - 8 ( I L - 8 )、ヒト細胞内 I L - 1 受容体拮抗薬、ヒト I P - 1 0 および H I V - 1 の g p 1 2 0 超可変領域融合タンパク質、ヒト I P - 1 0 およびヒト M u c - 1 コアエピトープ ( V N T ) 融合タンパク質、ヒト肝臓および活性化調節ケモカイン ( L A R C )、ヒト L k n - 1 完全長および成熟タンパク質、完全長および成熟ヒト乳腺関連ケモカイン ( M A C K ) タンパク質、ヒト成熟ケモカイン C k b e t a - 7、ヒト成熟 g r o - アルファ、敗血症を治療するのに使用されるヒト成熟 g r o - ガンマポリペプチド、ヒト M C P - 3 およびヒト M u c - 1 コアエピトープ ( V N T ) 融合タンパク質、ヒト M I 1 0 タンパク質、ヒト M I 1 A タンパク質、ヒト単球走化性因子 h M C P - 1 、ヒト単球走化性因子 h M C P - 3 、ヒト単球走化性プロタンパク質 ( M C P P ) 配列、ヒトニューロタクチンケモカイン様ドメイン、ヒト非 E L R C X C ケモカイン H 1 7 4 、ヒト非 E L R C X C ケモカイン I P 1 0 、ヒト非 E L R C X C ケモカイン M i g 、ヒト P A I - 1 変異体、 I L - 1 6 活性があるヒトタンパク質、 I L - 1 6 活性があるヒトタンパク質、ヒト二次リンパ系ケモカイン ( S L C )、ヒト S I S D タンパク質、ヒト S T C P - 1 、ヒト間質細胞由来ケモカイン、 S D F - 1 、ヒト T 細胞混合リンパ球反応発現ケモカイン ( T M E C )、ヒト胸線および活性化調節サイトカイン ( T A R C )、ヒト胸線発現、ヒト T N F - 、ヒト T N F - 、ヒト T N F - ( L T - )、ヒト C C 型ケモカインエオタキシン 3 タンパク質配列、ヒト I I 型インターロイキン - 1 受容体、ヒト野生型インターロイキン - 4 ( h I L - 4 ) タンパク質、ヒト Z C H E M O - 8 タンパク質、ヒト化抗 V E G F 抗体、およびその断片、ヒト化抗 V E G F 抗体、およびその断片、ヒアルロニダーゼ、 I C E 1 0 k D サブユニット、 I C E 2 0 k D サブユニット、 I C E 2 2 k D サブユニット、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、イズロニダーゼ、 I L - 1 、 I L - 1 、 I L - 1 阻害剤 ( I L - 1 i )、成熟 I L - 1 、 I L - 1 0 受容体、 I L - 1 1 、 I L - 1 1 、 I L - 1 2 p 4 0 サブユニット、 I L - 1 3 、 I L - 1 4 、 I L - 1 5 、 I L - 1 5 受容体、 I L - 1 7 、 I L - 1 7 受容体、 I l - 1 7 受容体、 I l - 1 7 受容体、 I L - 1 9 、 I L - 1 i 断片、 I L 1 - 受容体拮抗薬、 I L - 2 1 ( T I F )、 I L - 3 含有融合タンパク質、 I L - 3 変異タンパク質、 I L - 3 変種、 I L - 3 変種、 I L - 4 、 I L - 4 ムテイン、 I L - 4 ムテイン Y 1 2 4 G 、 I L - 4 ムテイン Y 1 2 4 X 、 I L - 4 ムテイン、 I l - 5 受容体、 I L - 6 、 I l - 6 受容体、 I L - 7 受容体クローニン、 I L - 8 受容体、 I L - 9 成熟タンパク質変種 ( M e t 1 1 7 バージョン ) 、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンベースの分子またはいずれかの断片 ( 例えば S m a l 1 Modular ImmunoPharmaceutical ( 商標 ) ( 「 S M I P 」 ) ま

たは d A b 、 F a b ' 断片、 F ( a b ' ) 2 、 s c A b 、 s c F v または s c F v 断片 ) 、限定するものではないが、例えばプラスミノーゲン、インフルエンザワクチン、インヒビン、インヒビン、インスリン、インスリン様成長因子、インテグリン M a b 、インターリトリプシン阻害剤、インターリトリプシン阻害剤、インターフェロン誘導性タンパク質 ( I P - 1 0 )、インターフェロン (インターフェロン 種およびサブ種、インターフェロン 種およびサブ種、インターフェロン 種およびサブ種など)、インターフェロン (インターフェロン 種およびサブ種、インターフェロン 種およびサブ種、インターフェロン 種およびサブ種など)、インターロイキン 6 、インターロイキン 8 ( I L - 8 ) 受容体、インターロイキン 8 受容体 B 、インターロイキン - 1 、インターロイキン - 2 受容体会合タンパク質 p 4 3 、インターロイキン - 3 、インターロイキン - 4 ムテイン、インターロイキン - 8 ( I L - 8 ) タンパク質、インターロイキン - 9 、インターロイキン - 9 ( I L - 9 ) 成熟タンパク質 ( T h r 1 1 7 バージョン ) 、インターロイキン ( I L 1 0 、 I L 1 1 および I L 2 など)、インターロイキン ( I L 1 0 、 I L 1 1 および I L 2 など)、日本脳炎ワクチン、カリクレイン ( K a l i k r e i n ) 阻害剤、ケラチノサイト増殖因子、クニッツドメインタンパク質 ( アルブミン融合ありまたはなしの、アプロチニン、アミロイド前駆体タンパク質および国際公開第 0 3 / 0 6 6 8 2 4 号パンフレットに記載されるものなど)、クニッツドメインタンパク質 ( アルブミン融合ありま

10

20

30

40

50

たはなしのアプロチニン、アミロイド前駆体タンパク質および国際公開第03/0668  
24号パンフレットに記載されるものなど)、LACI、ラクトフェリン、潜在型TGF  
- 結合タンパク質II、レプチン、肝臓発現ケモカイン-1(LVEC-1)、肝臓発  
現ケモカイン-2(LVEC-2)、LT-、LT-、黄体形成ホルモン、ライム病  
ワクチン、リンホタクチン、マクロファージ由来ケモカイン類似体MDC(n+1)、マ  
クロファージ由来ケモカイン類似体MDC-e y f y、マクロファージ由来ケモカイン類  
似体MDC-イル、マクロファージ由来ケモカイン、MDC、マクロファージ由来ケモカ  
イン(MDC)、マスピン；プロテアーゼ阻害剤5、MCP-1受容体、MCP-1a、  
MCP-1b、MCP-3、MCP-4受容体、M-CSF、黒色腫阻害タンパク質、膜  
結合タンパク質、Met117ヒトイントロイキン9、MIP-3、MIP-3、  
MIP-、MIRAP、修飾ランテス、モノクローナル抗体、MP52、変異イント  
ロイキン6S176R、筋原線維収縮タンパク質トロポニンI、ナトリウム利尿ペプチド  
、神経成長因子-、神経成長因子-2、ニューロピリン-1、ニューロピリン-2、  
ニューロタクチン、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフ  
イン-4a、ニューロトロフィン-4b、ニューロトロフィン-4c、ニューロトロフィ  
ン-4d、好中球活性化ペプチド-2(NAP-2)、NOGO-66受容体、NOGO  
-A、NOGO-B、NOGO-C、PTECと命名される新規-ケモカイン、N末端  
修飾ケモカインGroHEK/hSDF-1、N末端修飾ケモカインGroHEK/h  
SDF-1、N末端修飾ケモカインmet-hSDF-1、N末端修飾ケモカインm  
et-hSDF-1、OPGL、骨形成タンパク質-1；OP-1；BMP-7、骨形  
成タンパク質-2、OX40；作用し-4、OX40L、オキシトシン(ニューロフィシ  
ンI)、副甲状腺ホルモン、Patched、Patched-2、PDGF-D、百日  
咳類毒素、下垂体発現ケモカイン(PGEC)、胎盤成長因子、胎盤成長因子-2、プラ  
スミノーゲン活性化因子阻害剤-1；PAI-1、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-  
2；PAI-2、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2；PAI-2、血小板由来成長  
因子、血小板由来成長因子Bv-sis、血小板由来成長因子前駆体A、血小板由来成長  
因子前駆体B、血小板Mab、血小板由来内皮細胞成長因子(PD-ECGF)、血小板  
由来成長因子A鎖、血小板由来成長因子B鎖、敗血症治療に使用されるポリペプチド、ブ  
レプロアポリポタンパク質「milano」変種、ブレプロアポリポタンパク質「par  
isi」変種、ブレトロンビン、靈長類CCケモカイン「ILINCK」、靈長類CXCK  
ケモカイン「IBICK」、プロインスリン、プロラクチン、プロラクチン2、プロサブチ  
ド、プロテアーゼ阻害剤ペプチド、タンパク質C、タンパク質S、プロトロンビン、プロ  
ウロキナーゼ、ランテス、ランテス8-68、ランテス9-68、ランテスペプチド、ラン  
テス受容体、組換えインターロイキン-16、レジスタン、レストリクトシン、レトロ  
ウイルスプロテアーゼ阻害剤、リシン、ロタウイルスワクチン、RSV Mab、サボリ  
ン、サルシン、分泌膜貫通ポリペプチド、分泌膜貫通ポリペプチド、血清コリンエステラ  
ーゼ、血清タンパク質(血液凝固因子など)、可溶性BMP受容体キナーゼタンパク質-  
3、可溶性VEGF受容体、幹細胞阻害因子、スタフィロコッカス(Staphylo  
coccus)ワクチン、間質由来因子-1、間質由来因子-1、物質P(タキニ  
ン)、T1249ペプチド、T20ペプチド、T4エンドヌクレアーゼ、TACI、Ta  
rc、TGF-1、TGF-2、Thr117ヒトイントロイキン9、トロンビン  
、トロンボポエチン、トロンボポエチン誘導体1、トロンボポエチン誘導体2、トロンボ  
ポエチン誘導体3、トロンボポエチン誘導体4、トロンボポエチン誘導体5、トロンボ  
ポエチン誘導体6、トロンボポエチン誘導体7、胸線発現ケモカイン(TECK)、甲状腺  
刺激ホルモン、ダニ抗凝固性ペプチド、Tim-1タンパク質、TNF- 前駆体、TN  
F-R、TNF-RII；TNFp75受容体；細胞死受容体、tPA、トランスフェリ  
ン、形質転換成長因子、トロポニンペプチド、トランケート型单球走化性タンパク質2  
(6-76)、トランケート型单球走化性タンパク質2(6-76)、トランケート型ラン  
テスタンパク質(3-68)、腫瘍壞死因子、尿酸オキシダーゼ、ウロキナーゼ、バソ  
プレシン(ニューロフィシンII)、VEGFR-3；flt-4、VEGF受容体；K 10  
20  
30  
40  
50

D R ; f 1 k - 1、V E G F - 1 1 0、V E G F - 1 2 1、V E G F - 1 3 8、V E G F - 1 4 5、V E G F - 1 6 2、V E G F - 1 6 5、V E G F - 1 8 2、V E G F - 1 8 9、V E G F - 2 0 6、V E G F - D、V E G F - E；V E G F - X、フォン・ウィルブラント因子、野性型単球走化性タンパク質2、野性型単球走化性タンパク質2、Z T G F - 9、例えばアンチカリンやアドネクチンやフィブリノーゲン断片などの代案の抗体スキヤフォールド、ラクダ科動物ナノボディ、インフェスチン、および／または（それぞれその内容全体を参照によって本明細書に援用する）国際公開第01/79271号パンフレット（特に9頁および／または表1）、国際公開第2003/59934号パンフレット（特に表1）、国際公開第03/060071号パンフレット（特に表1）または国際公開第01/079480号パンフレット（特に表1）のいずれかで言及される分子。  
10

## 【0246】

さらに複合体は、13-시스-レチノイン酸、2-CdA、2-クロロデオキシアデノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、5-FU、6-メルカプトプリン、6-MP、6-TG、6-チオグアニン、A、アブラキサン、アキュテイン（登録商標）、アクチノマイシン-D、アドリアマイシン（登録商標）、アドルシル（登録商標）、アグリリン（登録商標）、アラコート（登録商標）、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリムタ、アリトレチノイン、アルカバン-AQ（登録商標）、アルケラン（登録商標）、オールトランスレチノイン酸、インターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミホスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド、アナンドロン（登録商標）、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、Ara-C、アラネスプ（登録商標）、アレディア（登録商標）、アリミデックス（登録商標）、アロマシン（登録商標）、アラノン（登録商標）、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、ATRA、アバスチン（登録商標）、アザシチジン、BCG、BCNU、ベバシズマブ、ベキサロテン、ベキサール（登録商標）、ビカルタミド、BicNU、ブレノキサン（登録商標）、ブレオマイシン、ポルテゾミブ、ブルファン、ブルフェクス（登録商標）、C225、カルシウムロイコボリン、キャンパス（登録商標）、カンプトサール（登録商標）、カンプトテシン-11、カペシタピン、カラック（商標）、カルボプラチン、カルムスチン、カルムスチンウエハ、カソデックス（登録商標）、CC-5013、CCNU、CDDP、CeeNU、セルビジン（登録商標）、セツキシマブ、クロランブシリ、シスプラチン、シトロボラム因子、クラドリビン、コルチゾン、コスメゲン（登録商標）、CPT-11、シクロホスファミド、シタドレン（登録商標）、シタラビン、リポソーム性シタラビン、シトサール-U（登録商標）、シトキサン（登録商標）、ダカルバジン、ダコゲン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルビシン、塩酸ダウノルビシン、リポソーム性ダウノルビシン、ダウノキソーム（登録商標）、デカドロン、デシタピン、デルタ-コルテフ（登録）、デルタソン（登録商標）、デニロイキンジフチトクス、デボサイト（商標）、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸ナトリウムデキサメタゾン、デキサソン、デクスラゾキサン、DHAD、DIC、ジオデックス、ドセタキセル、ドキシリル（登録商標）、ドキソルビシン、リポソーム性ドキソルビシン、ドロキシア（商標）、DTIC、DTIC-Dome（登録商標）、デュラロン（登録商標）、エフデックス（登録商標）、エリガード（商標）、エレンス（商標）、エロキサチン（商標）、エルスパー（登録商標）、エムサイト（登録商標）、エピルビシン、エポエチナルファ、アービタックス（商標）、エルロチニブ、エルウェニニアL-アスパラギナーゼ、エストラムスチン、エチオール、エトポホス（登録商標）、エトボシド、エトボシドホスフェート、オイレキシン（登録商標）、エビスタ（登録商標）、エキセメスタン、フェアストン（登録商標）、フェソロデックス（登録商標）、フェマーラ（登録商標）、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラ（登録商標）、フルダラビン、フルオロプレックス（登録商標）、フルオロウラシル、フルオロウラシル（クリーム）、フルオキシメステロン、フルタミド、フォリン酸、FUDR（登録商標）、フルベストラント、G-CSF、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ジェムザール（登録商標）、グリベ  
20  
30  
40  
50

ック（商標）、グリアデル（登録商標）ウエハ、G M - C S F、ゴセレリン、顆粒球 - コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ハロテスチン（登録商標）、ハーセプチン（登録商標）、ヘキサドロール、ヘキサレン（登録商標）、ヘキサメチルメラミン、H M M、ハイカムチン（登録商標）、ハイドレア（登録商標）、酢酸ヒドロコート（登録商標）、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンリン酸ナトリウム、ヒドロコルチゾンナトリウムコハク酸、ハイドロコートンホスフェート、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、イダマイシン（登録商標）、イダルビシン、I f e x（登録商標）、I F N - 、イホスファミド、I L - 1 1、I L - 2、イマチニブメシレート、イミダゾールカルボキサミド、インターフェロン 、インターフェロン - 2 b ( P E G 複合体)、インターロイキン - 2、インターロイキン - 1 1、イントロン A (登録商標) (インターフェロン - 2 b )、イレッサ（登録商標）、イリノテカン、イソトレチノイン、キドロラーゼ（登録商標）、ラナコート（登録商標）、ラバチニブ、L - アスパラギナーゼ、L C R、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、ロイケラン、ロイキン（商標）、ロイプロリド、ロイロクリスチン、ロイスタチン（商標）、リポソーム性A r a - C、液体P r e d（登録商標）、ロムスチン、L - P A M、L - サルコリシン、リュープロン（登録商標）、ルプロンデボ（登録商標）、M、マツラン（登録商標）、マキシデックス、メクロレタミン、塩酸メクロレタミン、メドラロン（登録商標）、メドロール（登録商標）、メゲース（登録商標）、メゲストロール、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス（商標）、メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、メチルプレドニゾロン、メチコルテン（登録商標）、マイトイシン、マイトイシン - C、ミトキサントロン、M - プレドニゾール（登録商標）、M T C、M T X、マスターージェン（登録商標）、ムスチン、ムタマイシン（登録商標）、ミレラン（登録商標）、ミロセル（商標）、マイロターグ（登録商標）、ナベルビン（登録商標）、ネララビン、ネオサール（登録商標）、ニューラスタ（商標）、ニューメガ（登録商標）、ニューポジエン（登録商標）、ネクサバール（登録商標）、ニランドロン（登録商標）、ニルタミド、ニペント（登録商標）、ナイトロジエンマスターード、ノルバデックス（N o v a l d e x ）（登録商標）、ノバントロン（登録商標）、オクトレオチド、酢酸オクトレオチド、オンカスパー（O n c o s p a r ）（登録商標）、オンコビン（登録商標）、オンタック（登録商標）、オンキサール（商標）、オプレルベキン（O p r e v e l k i n ）、オラブレッド（登録商標）、オラソン（登録商標）、オキサリプラチニン、例えはパクリタキセルまたはタンパク質結合パクリタキセルなどのタキソールまたはタキソール誘導体、パミドロネット、パニツマブ、パンレチン（登録商標）、パラプラチニン（登録商標）、ペジアブレッド（登録商標）、P E G インターフェロン、ペグアスパラガーゼ、ペグフィルグラスチム、P E G - イントロン（商標）、P E G - L - アスパラガーゼ、ペメトレキセド、ペントスタチン、フェニルアラニンマスターード、プラチノール（登録商標）、プラチノール - A Q（登録商標）、プレドニゾロン、プレドニゾン、ブレロン（登録商標）、プロカルバジン、P R O C R I T（登録商標）、プロロイキン（登録商標）、包埋カルムスチン含有プロリフェプロスパン2 0、プリネトール（登録商標）、R、ラロキシフェン、レブラミド（登録商標）、リウマトレックス（登録商標）、リツキサン（登録商標）、リツキシマブ、ロフェロン - A（登録商標）(インターフェロン - 2 a )、ルベックス（登録商標）、塩酸ルビドマイシン、サンドスタチン（登録商標）、サンドスタチンL A R（登録商標）、サルグラモスチム、ソルーコルテフ（登録商標）、ソルーメドロール（登録商標）、ソラフェニブ、スプリセル（商標）、S T I - 5 7 1、ストレプトゾシン、S U 1 1 2 4 8、スニチニブ、ステント（登録商標）、タモキシフェン、タルセバ（登録商標）、タルグレチン（登録商標）、タキソール（登録商標）、タキソテール（登録商標）、テモダール（登録商標）、テモゾロマイド、テニポシド、T E S P A、サリドマイド、サロミド（登録商標）、テラシス（登録商標）、チオグアニン、チオグアニンタブロイド（登録商標）、チオホスホアミド、チオブレックス（登録商標）、チオテバ、T I C E（登録商標）、トボサール（登録商標）、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、トレキサル（商標）、トリセノック 10  
20  
30  
40  
50

ス（登録商標）、T S P A、タイケルブ（登録商標）、V C R、ベクティビックス（商標）、ベルバン（登録商標）、ベルケイド（登録商標）、VePesi d（登録商標）、ベサノイド（登録商標）、ビアドゥール（商標）、ビダーザ（登録商標）、ビンプラスチン、硫酸ビンプラスチン、ビンカサー P f s（登録商標）、ビンクリスチン、ビノレルピン、ビノレルピン酒石酸、V L B、V M - 2 6、ボリノstattt、V P - 1 6、ブモン（登録商標）、ゼローダ（登録商標）、ザノサー（登録商標）、ゼバリン（商標）、ジネカード（登録商標）、ゾラデックス（登録商標）、ゾレドロン酸、ゾリンザ、ゾメタ（登録商標）；炭素 - 1 1、炭素 - 1 4、クロム - 5 1、コバルト - 5 7、コバルト - 5 8、エルビウム - 1 6 9、フッ素 - 1 8、ガリウム - 6 7、金 - 1 9 8、インジウム - 1 1 1、インジウム - 1 1 3 m、ヨウ素 - 1 2 3、ヨウ素 - 1 2 5、ヨウ素 - 1 3 1、鉄 - 5 9、クリプトン - 8 1 m、窒素 - 1 3、酸素 - 1 5、亜リン酸 - 3 2、レニウム - 1 8 6、ルビジウム - 8 2、サマリウム - 1 5 3、セレン - 7 5、ストロンチウム - 8 9、テクネチウム - 9 9 m、タリウム - 2 0 1、トリチウム、キセノン - 1 2 7、キセノン - 1 3 3、イットリウム - 9 0 などの放射性医薬品；ガドリニウム、磁鉄鉱、マンガン、テクネチウム、I 1 2 5、I 1 3 1、P 3 2、T I 2 0 1、イオパミドール、P E T - F D G などの造影剤などの化学療法薬の1つまたは複数（いくつか）を含んでなってもよい。  
10

## 【0247】

本発明によるナノ粒子、会合または組成物に組み入れるためのさらなる融合パートナー、複合化パートナーおよび／または分子としては、以下が挙げられる。例えばソマチュリン、ランレオチド、オクトレオチド、サンドスタチンなどの先端巨大症治療薬；例えばビバリルジン、アンギオマックス、ダルテバリン、フラグミン、エノキサバリン、ラブノックス、ドロトレコギンアルファ（例えば活性化）、ザイグリス、ヘパリンなどの抗血栓薬；例えば絨毛性ゴナドトロピン、オビドレル、フォリトロピン・アルファ／ベータなどの生殖補助医療化合物；例えばなどの酵素ヒアルロニダーゼ、ハイレネット；例えばエクセナチド、バイエッタ、グルカゴン、インスリン、リラグルチド、アルビグルチド、G L P - 1 作動薬、エキセンジンまたはエキセンジン類似体などの糖尿病治療薬；例えばプロチレリン、サイレルT R Hチピノン、セクレチン（例えば合成ヒト）、シロスチム、甲状腺刺激ホルモン（例えば）などの診断で有用な化合物；例えばダルベポエチンアルファ、アラネスブ、エポエチンアルファ、エポジェン、エプレックスなどのタイロゲンの赤血球生成治療薬；例えばペガデマーゼなどの遺伝的欠陥の治療薬；例えばアダジエン、メカセルミン、リンファバートなどの成長障害の治療薬；例えばドルナーゼアルファ、ブルモザイムなどの囊胞性線維症の治療薬；例えばアガルシダーゼベータ、ファブラザイム、アルグルコシダーゼアルファ、ミオザイム、ラロニダーゼ、アルドラザイムなどの代謝障害の治療薬；例えばインターフェロン - n 3、アルフェロンNなどの生殖器疣病巣内の治療薬；例えばインターフェロン - 1 b、アクティミューンなどの肉芽腫性疾患の治療薬；例えばペグビソマント、ソマバート、ソマトロピン、ジェノトロピン、ニュートロピン、ヒューマトロープ、セロスティム、プロトロピンなどの成長障害の治療薬；例えばネシリチド、ナトレコールなどの心不全の治療薬；例えば第V I I I 因子とヘリキセートF SとコージネイトF Sと第I X 因子とベネフィックスと第V I I a 因子とノボセブンなどの凝固因子、デスマブレッシン、スチメート、D D A V P などの血友病の治療薬；例えばフィルグラスチム（G - C S F ）、ニューポジエン、オプレルベキン、ニューメガ、ペグフィルグラスチム、ニューラスタ、サルグラモスチム、ロイキンなどの造血治療薬；例えばインターフェロン - 2 a、ロフェロンA、インターフェロン - 2 b、イントロンA、インターフェロンアルファコン - 1、インフェルゲン、ペグインターフェロン - 2 a、ペガシス、ペグインターフェロン - 2 b、P E G - イントロンなどのC型肝炎の治療薬；例えばエンフビルチド、フゼオンなどのH I Vの治療薬；例えばF a b（抗トロンビン）、アブシキシマブ、レオプロなどのF a b；例えばダクリズマブ、ゼナバックスなどのモノクローナル抗体；例えばパリビズマブ、シナジスなどの抗ウイルスモノクローナル抗体；例えばオマリズマブ、ゾレアなどの喘息治療のためのモノクローナル抗体；例えばアルシツモマブ、C E A - スキャン、カプロマブベンデチド、プロスタント、サツモマブ  
20  
30  
40  
50

ベンデチド、オンコシント C R / O V などの画像診断で使用されるモノクローナル抗体；例えばノフェツモマブ、ベルルマなどの画像診断で使用される F a b ；例えばバシリキシマブ、シムレクト、ムロモナブ C D 3 、オルソクローン O K T 3 などの免疫抑制 ( i m m u n o - s u p p r e s s a n t ) モノクローナル抗体；例えばアレムツズマブ、キャンパス、イブリツモマブチウキセタン、ゼバリン、リツキシマブ、リツキサン、トラスツズマブ、ハーセプチニンなどの悪性病変治療のためのモノクローナル抗体；例えばアダリムマブ、ヒュミラ、インフリキシマブ、レミケードなどの関節リウマチ ( R A ) 治療のためのモノクローナル抗体；例えばトシツモマブおよびヨウ素 I <sup>131</sup> 、トシツモマブ、ベキサールなどの放射免疫療法剤として使用されるモノクローナル抗体；例えばペガブタニブ、マクジエンなどの黄斑変性の治療薬；例えばアルデスロイキン、プロロイキン、インターロイキン - 2 、アスパラギナーゼ、エルスパー、ラスブリカーゼ、 E l i t e k 、デニロイキンジフチトクス、オントック、ペグアスパラガーゼ、オンカスパー、ゴセレリン、ロイブロリドなどの悪性病変の治療薬；例えば酢酸グラチラマー（例えば共重合体 - 1 ）、コパキソン、インターフェロンベータ - 1 a 、アボネックス、インターフェロンベータ - 1 a 、レビフ、インターフェロンベータ - 1 b 、ベタセロンなどの多発性硬化症 ( M S ) の治療薬；例えばパリフェルミン、ケピバンスなどの粘膜炎の治療薬；例えば神経毒、ボツリヌス毒素タイプ A 、ボトックス、ボトックス化粧品、 B 型ボツリヌス毒素、ミオブロックなどの筋緊張異常の治療薬；例えばテリパラチド、フォルテオなどの骨粗鬆症の治療薬；例えばアレファセプト、アメビブなどの乾癬の治療薬；例えばアバタセプト、オレンシア、アナキンラ、キネレット、エタネルセプト、エンブレルなどの R A の治療薬；例えばアルテプラーゼ、アクチバーゼ、組換え組織プラスミノーゲン活性化因子 ( r t P A ) 、アニストレプラーゼ、エミナーゼ、レテプラーゼ、レタバーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプターゼ、テネクテプラーゼ、 T N K アーゼ ( テネクテプラーゼ ) 、ウロキナーゼ、アボキナーゼ、キンリティックなどの血栓溶解薬；例えばカルシトニン（例えばサケ）、ミアカルシン、フォルティカルなどの骨粗鬆症の治療薬、例えばベカブレルミン、レグラネクス、コラゲナーゼ、サンチルなどの皮膚潰瘍の治療薬。

#### 【 0 2 4 8 】

このようなポリペプチドおよび化合物は、診断部分、治療的部分、予防的部分または有益な部分と称されてもよい。

#### 【 0 2 4 9 】

好ましくは融合パートナーおよび / または複合化パートナーは、アルブミン、その変種または断片でない。

#### 【 0 2 5 0 】

1 つまたは複数の（いくつかの）治療的または予防的なポリペプチドをアルブミンの N 末端、 C 末端に融合して、アルブミン構造中のループまたはそれらのあらゆる組み合わせに挿入してもよい。それは融合ポリペプチドの様々な構成要素を隔てるリンカー配列を含んでなってもよく、または含まなくてもよい。

#### 【 0 2 5 1 】

アルブミン融合物またはその断片に関する教示は、当該技術分野で公知であり、当業者は、このような教示を本発明にもまた応用し得ることを理解するであろう。国際公開第 2 0 0 1 / 7 9 2 7 1 A 号パンフレットおよび国際公開第 2 0 0 3 / 5 9 9 3 4 号パンフレット（参照によって本明細書に援用される）はまた、アルブミンまたはその断片に融合されてもよい治療的および予防的ポリペプチドの例も含み、これらの実施例は、本発明にもまた応用される。

#### 【 0 2 5 2 】

本発明の範囲を制限するものと解釈すべきではない、以下の実施例によって、本発明をさらに説明する。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 2 5 3 】

実施例 1 : H S A ムテイン発現プラスミドの調製。

10

20

30

40

50

HSA変種は、Sambrook, J. and D.W. Russell, 2001 (Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)に記載されるような標準分子生物学技術を使用して、発現させた。

【0254】

K573P発現プラスミドの構築は、(参照によって本明細書に援用する)国際公開第2011/051489号パンフレットに記載される。残りの発現プラスミドの構築は、国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206、参照によって本明細書に援用する)に記載されるようにして実施した。変種HSAT83K、HSAE82A、HSAE82D、HSAP110G、HSAL112F、およびHSAT83N/N111Eは、国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206、参照によって本明細書に援用する)の実施例6の方法2に記載されるようにして生成した。K573P置換を含有する組み合わせ変異体は、「K573Pによる組み合わせ変異体の生成」(国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206))に記載されるようにして生成し、適切に消化されたpDB4852中に、必要な断片を挿入した(国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206、参照によって本明細書に援用する)に記載される)。T83N/N111E、T83K、E82A、E82D、P110G、およびL112Fを含有する断片は、示された制限酵素認識部位(表1)を介して、合成コンストラクトから除去した。T83N置換を含有する断片をpDB4874(国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206、参照によって本明細書に援用する)に記載される)から除去した。HSA変種をコードするポリヌクレオチドおよびプラスミドpDB3964/pDB4852のライゲーションからはプラスミドが生じ、それを使用して所望の変異体を発現させた(表1)。全てのプラスミドは、配列決定して、HSA配列が所望の位置のみで変異していることを確認した。

【0255】

HSA T83N、HSA N111EおよびHSA N111E/K573Pの構築は、国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206、参照によって本明細書に援用する)に記載されるとおりであった。

30

【0256】

S.セレヴィシエ(S. cerevisiae)の形質転換は、宿主株が、PDIのコピーがゲノムに組み込まれているS.セレヴィシエ(S. cerevisiae)DYB7(Payne et al(2008)Applied and Environmental Microbiology Vol. 74(24):7759-7766)であったことを除いては、国際公開第2011/051489号パンフレットに記載される24時間貯蔵法を用いて、国際公開第2012/150319号パンフレット(PCT/EP12/058206、参照によって本明細書に援用する)に記載されるようにして実施した。

【0257】

40

## 【表5】

表1:HSA ムテイン発現プラズミドの構築

変異体	制限酵素	消化断片サイズ(kb)	プラスミド	配列番号
HSA T83N/N111E	SacII/NheI	0.395	pDB4966	32
HSA T83N/N111E/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4967	33
HSA T83N/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4968	34
HSA T83K	SacII/NheI	0.395	pDB4903	35
HSA E82A	SacII/NheI	0.395	pDB4904	36
HSA L112F	SacII/NheI	0.395	pDB4907	37
HSA T83K/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4908	38
HSA E82A/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4909	39
HSA L112F/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4912	40
HSA E82D	SacII/NheI	0.395	pDB4905	41
HSA P110G	SacII/NheI	0.395	pDB4906	42
HSA E82D/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4910	43
HSA P110G/K573P	SacII/NheI	0.395	pDB4911	44

10

20

30

## 【0258】

実施例2：アルブミン変種のFcRnに対する結合親和性のSPR分析

SPR分析は、国際公開第2012/150319号パンフレット（PCT/EPI2/058206、参照によって本明細書に援用する）に記載されるようにして実施した。

## 【0259】

変種は、それぞれ、D108A、N111D、N111G、N111H、N111K、K190A、R197A、K276N、R410A、Y411A、P416A、E425A、E425K、K466A、D471A、R472A、N503D、N503K、E505K、E505Q、H510D、H510E、D512A、D512E、K524A、K525A、T527A、T527D、T527M、E531A、E531H、K534V、H535F、E565V、A569L、A569S、A569V、およびV576Fから選択される1つの点変異があるアルブミン（配列番号2）であった。

40

## 【0260】

最初に、SPRによって変種を分析し、shFcRnに対するそれらの結合反応（RU）を測定した。野生型アルブミン結合反応より20%以上高いまたは低い結合反応を示す変種のみを分析して、KDを同定した（表2、下）。変異K573Pがある野生型HSAおよびHSAを対照として使用した。

## 【0261】

【表6】

表2:アルブミン変異体の shFcRn に対する結合親和性

分子	配列番号	Ka (10 <sup>3</sup> /Ms)	Kd (10 <sup>-3</sup> /s)	KD (μM)
WT rHSA	2	-	-	3.1± 0.4*
HSA K573P	3	-	-	0.4± 0.1*
HSA E505Q	45	2.1	2.9	1.4
HSA N111D	46	0.8	4.4	5.2
HSA T527M	47	2.7	3.3	1.2
HSA N111G	48	1.6	5.2	3.3
HSA N111H	49	0.5	2.4	5.0
HSA D512E	50	2.7	10.9	4.1
HSA K524A	51	3.3	11.6	3.5
HSA T527A	52	2.6	13.7	5.2
HSA E531H	53	3.5	20.8	6.2
HSA N111K	54	0.5	8.3	17.3
HSA E425K	55	3.6	12.4	3.5
HSA K534V	56	4.8	5.5	1.1
HSA H510D	57	0.2	0.4	0.2
HSA A569S	58	0.7	4.8	6.8
HSA D108A	59	0.9	12.7	13.7

\*5回の反復の平均値、したがって Ka および Kd データは提供されない

## 【0262】

野生型 HSA よりも低い KD がある変種は、shFcRn に対してより高い結合親和性を有する。逆に、野生型 HSA よりも高い KD がある変種は、shFcRn に対してより低い結合親和性を有する。

## 【0263】

108 および 111 位のデータは、FcRn との相互作用における、105~120 位をはじめとするループの関与を支持し、したがってこのループ内のあらゆる位置における変更は、アルブミンの FcRn に対する結合親和性を調節する。

## 【0264】

実施例3：アルブミン変種の FcRn に対する結合親和性の SPR 分析

変種は、それぞれ、上に記載されるようにして調製された、N111D、N111G、N111H、N111D/K573P、N111G/K573P、N111H/K573P、E505Q、E425A、T527M、E505Q/K573P、E425A/K5

10

20

30

40

50

73P、およびT527M/K573Pから選択される1つの点変異があるアルブミン(配列番号2)であった。

【0265】

【表7】

表3:アルブミン変異体のshFcRn-HISに対する結合親和性

分子	配列番号	Ka (10 <sup>3</sup> /Ms)	Kd (10 <sup>-3</sup> /s)	KD (μM)
WT rHSA	2	-	-	3.6±0.54*
HSA K573P	3	-	-	0.6±0.12**
HSA N111D	46	9.8	9.1	17.9
HSA N111G	48	7.4	7.4	20.5
HSA N111H	49	4.4	4.0	15.6
HSA N111D/K573P	60	4.0	4.2	1.9
HSA N111G/K573P	61	4.1	4.7	1.7
HSA N111H/K573P	62	2.9	3.0	1.7
HSA E505Q	45	5.1	5.0	4.9
HSA E425A	63	6.6	7.9	34.1
HSA T527M	47	4.9	4.8	4.4
HSA E425A/K573P	64	3.4	3.6	2.5
HSA E505Q/K573P	65	0.4	0.4	0.5
HSA T527M/K573P	66	2.6	2.8	1.2
				2.2
				0.5
				0.8

\*8の平均値および標準偏差 \*\*5の平均値および標準偏差。

【0266】

野生型HSAよりも低いKDがある変種は、shFcRnに対してより高い結合親和性を有する。逆に、野生型HSAよりも高いKDがある変種は、shFcRnに対してより低い結合親和性を有する。

【0267】

K573Pを含む変種のデータは、K573P置換のみと一致して、親和性の増加を生じる。

【0268】

実施例4：アルブミン変種のFcRnに対する結合親和性のSPR分析

変種は、それぞれ、上述したとおりに調製されたN111R、N111Q、N111E、N111R/K573P、N111Q/K573P、N111E/K573P、N109D、N109E、N109Q、N109R、N109K、N109H、N109G、D108E、T83N、L575F、およびK534V/K573Pから選択される1つの点変異があるアルブミン(配列番号2)であった。

【0269】

10

20

30

40

【表8】

表4a:アルブミン変異体のshFcRn-HISに対する結合親和性

分子	配列番号	Ka ( $10^3/\text{Ms}$ )		Kd ( $10^{-3}/\text{s}$ )		KD ( $\mu\text{M}$ )	
WT HSA	2	-		-		$2.0 \pm 0.3^*$	
HSA K573P	3	-		-		$0.3 \pm 0.0^{**}$	
HSA N111E	67	15.3	14.3	13.1	15.2	0.8	1.1
HSA N111E/K573P	68	4.2	-	2.4	-	0.6	-
HSA N109K	69	9.7	6.3	18.3	21.6	1.9	3.4
HSA D108E	70	13.9	7.5	16.6	19.5	1.2	2.6
HSA T83N	71	17.7	15.2	15.6	16.8	0.9	1.1
HSA L575F	72	11.8	8.3	31.3	32.2	2.7	4.0
HSA K534V/K573P	73	4.7	4.5	6.9	6.9	1.5	1.5

\*11 の平均値および標準偏差 \*\*5 の平均値および標準偏差。

【0270】

【表9】

表4b

分子	配列番号	Ka ( $10^3/\text{Ms}$ )		Kd ( $10^{-3}/\text{s}$ )		KD ( $\mu\text{M}$ )	
WT rHSA	2	-		-		$3.6 \pm 0.54^*$	
HSA K573P	3	-		-		$0.6 \pm 0.12^{**}$	
HSA N111D	46	9.8	9.1	17.9	17.9	1.8	2.0
HSA N111G	48	7.4	7.4	20.5	19.2	2.7	2.6
HSA N111H	49	4.4	4.0	15.6	14.2	3.5	3.6

\*8 の平均値および標準偏差 \*\*5 の平均値および標準偏差。

【0271】

データは、HSAのFcRnへの結合における108~111ループの役割を実証し、D108AおよびN111K変種中における結合親和性の低下が観察される（表2）。位置111における追加的な変異は、N111K変種について観察された親和性低下から、WT HSAと比較してFcRnに対する親和性増大を示すN111E変種に至る、一連の結合親和性を実証した（表4）。変種N111Q/K573P（図5、配列番号74）は、WT HSAと比較して増大した応答と、WT HSAと比較してより緩慢な解離とがある結合曲線を示し、これはK573P置換に一致する。HSAおよびFcRnに対するループ領域108~112の相対的位置（図6）は、実施例2で予測されたように、こ

10

20

30

40

50

の領域が FcRn 結合に寄与する可能性を有することを示唆する。図 5 および 6 に関するさらなる詳細は、国際公開第 2012 / 150319 号パンフレット (PCT / E P 12 / 058206、参照によって本明細書に援用する) に提供される。

#### 【0272】

残基 78 ~ 88 を含んでなるドメイン I (ドメイン 1) の隣接するループ領域の相対的位置 (図 6) は、この領域が FcRn 結合に寄与する可能性を有することを示唆する。これは、T83N 変種が、WT-HSA と比較して、FcRn に対する親和性の増大を示すという観察によって支持される (表 4)。

#### 【0273】

隣接する残基、特に E82、P110、および L112 (図 6) の変異は、HSA の FcRn に対する結合親和性を変化させると予測される。 10

#### 【0274】

実施例 5 : アルブミン変種の FcRn に対する結合親和性の SPR 分析

SPR 分析は、Biacore 3000 装置 (GE Healthcare) 上で実施した。固定化は、製造会社の使用説明書に従って GE Healthcare アミン複合化化学反応を使用して、shFcRn (GeneArt 1177525) とカップリングされた CM5 チップ上で実施した。shFcRn - HIS (2 ミクログロブリン C 末端に 6-His テールがある shFcRn) の固定化レベルは約 1200 RU であり、pH 4.5 の酢酸ナトリウム (GE Healthcare) への 20 μg/mL の shFcRn 注入によって達成された。一定流量 (5 μL/分) の泳動用緩衝液、pH 5.5 の二塩基性 / 一塩基性リソ酸緩衝液によって、チップ表面を 25 で一晩安定化させた。リガンド安定化後、30 μL/分で 3 × 45 μL の二塩基性 / 一塩基性リソ酸緩衝液の注入によって、チップ表面を調整し、各注入間の pH 7.4 における HBS-EP (0.01 M の HEPES、0.15 M の NaCl、3 mM の EDTA、0.005% の界面活性剤 P20) (GE Healthcare) 再生手順 (12 s) がそれに続いた。次に 30 μL/分で 3 × 45 μL の陽性対照の注入によって、活性について表面をチェックし、12 s 再生パルス投与がそれに続いた。 20

#### 【0275】

pH 5.5 結合解析 : 結合データのセンサーグラムは、二重反復試験中で、(pH 5.5 の緩衝液中で希釈された) 45 μL の 20 μM 分析物の注入によって、30 μL/分の pH 5.5 の泳動用緩衝液中で得た。注入後に 2 × 12 s の再生パルス投与を実施して、ベースラインを復元した (pH 7.4 の HBS-EP; 50 μL/分で 10 μL)。次に参考を差し引いて、BiaEvaluation ソフトウェア 4.1 を使用して、結合解析データを得た。 30

#### 【0276】

pH 5.5 動態解析 : 注入によって、動態データのためのセンサーグラムは、90 s の遅延注入 (動態モデル化のための滑らかな解離を可能にするために) で、pH 5.5 の 30 μL/分の泳動用緩衝液中の 20 μM、4 μM、0.8 μM、0.16 μM、および 0.032 μM の 5 つの濃度の 45 μL の分析物を注入することで得た。注入後に 2 × 12 s の再生パルス投与を実施して、ベースラインを復元した (pH 7.4 の HBS-EP; 50 μL/分で 10 μL)。解析は、2 つの別個の機会に実施した。次に対照セル値を差し引いて、BiaEvaluation ソフトウェア 4.1 を使用して、動態データを得て KD 値を確認した。 40

#### 【0277】

SPR を使用して、FcRn に対する変種の結合反応を同定し、結果を表 5a および 5b に示す。

#### 【0278】

【表 1 0】

表 5a:

分子	配列番号	結合反応 (RU)
WT rHSA	2	229
HSA K573P	3	300
HSA T83K	35	194
HSA T83K/K573P	38	285
HSA E82A	36	221
HSA E82A/K573P	39	275
HSA E82D	41	227
HSA E82D/K573P	43	269
HSA P110G	42	235
HSA P110G/K573P	44	284
HSA L112F	37	253
HSA L112F/K573P	40	290

示される値は 2 回の試行からの平均値である。

【0 2 7 9】

【表 1 1】

10

20

30

表 5b

分子	配列番号	結合反応 (RU)
WT rHSA	2	148
HSA K573P	3	181
HSA T83N/N111E	32	167

示される値は 2 回の試行からの平均値である。

40

【0 2 8 0】

変種に対して K D 分析を実施し、 H S A - K 5 7 3 と F c R n の結合親和性と比較して、変種と F c R n の結合親和性を評価した。結果は、表 6 に示される。さらなる分析を実施して、結合親和性を計算した（表 7）。

【0 2 8 1】

【表 1 2】

表 6:

分子	配列番号	KD (μM)	結合親和性(HSA 野生型と比較した倍数差)
WT rHSA	2	3.82	-
HSA L112F	37	1.44	2.7
HSA T83K	35	1.42	2.7
HSA E82A	36	2.81	1.4
HSA K573P	3	0.18	21.2
HSA L112F/K573P	40	0.108	35.4
HSA T83K/K573P	38	0.147	26.0
HSA E82A/K573P	39	0.174	22.0

10

20

【0 2 8 2】

【表 1 3】

表 7:

分子	配列番号	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (μM)	平均 KD (μM)	HSA 野生型と 比較した倍数差
WT rHSA	2	$0.63 \times 10^4$	0.0133	2.11	1.97	-
		$0.78 \times 10^4$	0.0141	1.83		
HSA K573P	3	$0.81 \times 10^4$	$1.32 \times 10^{-3}$	0.162	0.20	9.9
		$0.74 \times 10^4$	$1.77 \times 10^{-3}$	0.238		
HSA T83N/N111E/K573P	33	$2.28 \times 10^4$	$1.16 \times 10^{-3}$	0.051	0.061	32.3
		$2.28 \times 10^4$	$1.59 \times 10^{-3}$	0.070		
HSA T83N/K573P	34	$1.55 \times 10^4$	$1.3 \times 10^{-3}$	0.084	0.12	16.4
		$1.22 \times 10^4$	$1.84 \times 10^{-3}$	0.15		

30

40

【0 2 8 3】

データは、HSA T83N/N111E/K573P および HSA T83N/K573P が、野生型 HSA と比較して高いFcRn 結合親和性を有することを示す。HSA E82A および HSA L112F は、野生型 HSA の FcRn への結合と比較して、どちらも FcRn に対する改善された結合を示し、これは HSA (配列番号 2) のアミノ酸 78 ~ 88 および HSA (配列番号 2) の 105 ~ 120 を含んでなるループが、HSA の

50

FcRnへの結合に関与することを示唆する。

**【0284】**

L112またはT83の位置に単一変異があるHSAは、互いに類似したFcRn結合親和性を示す。しかしL112およびK573の二重変異は、T83およびK573の二重変異よりも強力なFcRnに対する結合親和性を有する。

**【0285】**

**【表14】**

表8:

10

分子	配列番号	Ka ( $10^3/\text{MS}$ )	Kd ( $10^3/\text{s}$ )	KD ( $\mu\text{M}$ )	平均 KD ( $\mu\text{M}$ )
WT HSA	2	4.3	63.6	13.7	13.8
		5.6	77.6	13.9	
HSA-K573P	3	4.3	6.2	1.4	1.1
		5.2	4.6	0.89	
HSA-E82D	41	2.3	84.3	36.9	24.1
		6.5	73.0	11.3	
HSA-E82D/K573P	43	4.9	6.7	1.4	1.1
		5.5	5.0	0.9	

**【0286】**

表8のデータは、HSA-E82Dが、野生型アルブミンと比較して低いFcRn結合親和性を有し、HSA-K573Pが、野生型アルブミンと比較して高いFcRn結合有することを示す。しかし二重変異体HSA-E82D/K573Pは、HSA-K573Pと同じFcRn結合親和性を示し、すなわちE82D置換の包含はFcRn結合に悪影響を及ぼさない。

20

**【0287】**

本明細書で開示される特定の態様は、本発明のいくつかの態様の例証であることが意図されるので、本明細書で記載され特許請求される本発明の範囲は、これらの態様によって限定されない。あらゆる同等の態様は、本発明の範囲内であることが意図される。確かに、前述の説明から、当業者には、本明細書に示され記載されるものに加えて、本発明の様々な修正が明白になるであろう。このような修正もまた、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。矛盾がある場合、定義を含めて本開示が優先する。

30

【図1-1】

図1

Hu_1_2_3	1	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKFLVLIAFA <del>Y</del> QOCFFE <del>H</del> VKLVNEVTEFAKTCVADESAE
Hu_1_3	1	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKFLVLIAFA <del>Y</del> QOCFFE <del>H</del> VKLVNEVTEFAKTCVADESAE
Hu_2_3	1	--
Mac_mul	1	D <del>A</del> HKSEVAHRFKDGLGE <del>E</del> HFKGLV <del>N</del> VAF <del>S</del> OYI <del>L</del> QOCFFE <del>H</del> VKLVNEVTEFAKTCVADESAE
ラット	1	B <del>A</del> HKSE <del>I</del> AHRFKDGLGE <del>O</del> HFKGLV <del>L</del> IAF <del>S</del> OYI <del>L</del> KC <del>T</del> EEH <del>H</del> KLVOBVD <del>I</del> FAKTCVADESAE
マウス	1	B <del>A</del> HKSE <del>I</del> AHRFNOLGE <del>O</del> HFKGLV <del>L</del> IAF <del>S</del> OYI <del>L</del> KC <del>S</del> YDE <del>H</del> KLVOBVD <del>I</del> FAKTCVADESAE
Hu_1_2_3	61	NCDKSLHTL <del>F</del> GDKLCTVATL <del>R</del> ET <del>T</del> Y <del>G</del> EMADCC <del>C</del> AA <del>K</del> OE <del>P</del> ER <del>N</del> EC <del>F</del> LOH <del>K</del> D <del>D</del> NP <del>N</del> LP <del>R</del> LR <del>V</del> PEV
Hu_1_3	61	NCDKSLHTL <del>F</del> GDKLCTVATL <del>R</del> ET <del>T</del> Y <del>G</del> EMADCC <del>C</del> AA <del>K</del> OE <del>P</del> ER <del>N</del> EC <del>F</del> LOH <del>K</del> D <del>D</del> NP <del>N</del> LP <del>R</del> LR <del>V</del> PEV
Hu_2_3	1	--
Mac_mul	61	NCDKSLHTL <del>F</del> GDKLCTVATL <del>R</del> ET <del>T</del> Y <del>G</del> EMADCC <del>C</del> AA <del>K</del> OE <del>P</del> ER <del>N</del> EC <del>F</del> LOH <del>K</del> D <del>D</del> NP <del>N</del> LP <del>R</del> LR <del>V</del> PEV
ラット	61	NCDKSLHTL <del>F</del> GDKLCA <del>I</del> PK <del>R</del> NGE <del>A</del> DC <del>C</del> AA <del>K</del> OE <del>P</del> ER <del>N</del> EC <del>F</del> LOH <del>K</del> D <del>D</del> NP <del>N</del> LP <del>R</del> LR <del>V</del> PEV <del>P</del> PA
マウス	61	NCDKSLHTL <del>F</del> GDKLCA <del>I</del> PN <del>R</del> NGE <del>A</del> DC <del>C</del> Q <del>E</del> PER <del>N</del> EC <del>F</del> LOH <del>K</del> D <del>D</del> NP <del>N</del> LP <del>R</del> SL <del>P</del> PF <del>R</del> PA
Hu_1_2_3	121	DW <del>M</del> TAHFHDNEP <del>F</del> FL <del>K</del> LY <del>V</del> Y <del>A</del> RRH <del>P</del> Y <del>F</del> Y <del>A</del> PL <del>F</del> FL <del>F</del> Y <del>A</del> RY <del>K</del> AA <del>T</del> EC <del>C</del> QA <del>A</del> KA <del>C</del> LLP
Hu_1_3	121	DW <del>M</del> TAHFHDNEP <del>F</del> FL <del>K</del> LY <del>V</del> Y <del>A</del> RRH <del>P</del> Y <del>F</del> Y <del>A</del> PL <del>F</del> FL <del>F</del> Y <del>A</del> RY <del>K</del> AA <del>T</del> EC <del>C</del> QA <del>A</del> KA <del>C</del> LLP
Hu_2_3	1	--
Mac_mul	121	DW <del>M</del> TAHFHDNEP <del>F</del> FL <del>K</del> LY <del>V</del> Y <del>A</del> RRH <del>P</del> Y <del>F</del> Y <del>A</del> PL <del>F</del> FL <del>F</del> Y <del>A</del> RY <del>K</del> AA <del>T</del> EC <del>C</del> QA <del>A</del> KA <del>C</del> LLP
ラット	121	EAMC <del>T</del> TF <del>K</del> EN <del>P</del> TF <del>G</del> FL <del>H</del> Y <del>V</del> Y <del>A</del> RRH <del>P</del> Y <del>F</del> Y <del>A</del> PL <del>F</del> FL <del>F</del> Y <del>A</del> RY <del>K</del> AA <del>T</del> EC <del>C</del> QA <del>A</del> KA <del>C</del> LLP
マウス	121	EAMC <del>T</del> TF <del>K</del> EN <del>P</del> TF <del>G</del> FL <del>H</del> Y <del>V</del> Y <del>A</del> RRH <del>P</del> Y <del>F</del> Y <del>A</del> PL <del>F</del> FL <del>F</del> Y <del>A</del> RY <del>K</del> AA <del>T</del> EC <del>C</del> QA <del>A</del> KA <del>C</del> LLP
Hu_1_2_3	181	KLD <del>E</del> RL <del>D</del> EG <del>K</del> ASSAK <del>Q</del> R <del>L</del> K <del>A</del> S <del>L</del> Q <del>K</del> F <del>G</del> RA <del>F</del> K <del>A</del> WA <del>V</del> AR <del>L</del> S <del>Q</del> R <del>F</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> AV <del>S</del> KL <del>V</del> DL <del>T</del> TK
Hu_1_3	181	KLD <del>E</del> RL <del>D</del> EG <del>K</del> ASSA <del>K</del>
Hu_2_3	1	--
Mac_mul	181	KLD <del>E</del> RL <del>D</del> EG <del>K</del> ASSAK <del>Q</del> R <del>L</del> K <del>A</del> S <del>L</del> Q <del>K</del> F <del>G</del> RA <del>F</del> K <del>A</del> WA <del>V</del> AR <del>L</del> S <del>Q</del> R <del>F</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> AV <del>S</del> KL <del>V</del> DL <del>T</del> TK
ラット	181	KLD <del>E</del> RA <del>V</del> KE <del>K</del> AL <del>V</del> AA <del>V</del> OR <del>K</del> KS <del>S</del> Q <del>M</del> K <del>F</del> RA <del>F</del> K <del>A</del> WA <del>V</del> AR <del>L</del> S <del>Q</del> R <del>F</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> AV <del>S</del> KL <del>V</del> DL <del>T</del> TK
マウス	181	KLD <del>E</del> RA <del>V</del> KE <del>K</del> AL <del>V</del> AA <del>V</del> OR <del>K</del> KS <del>S</del> Q <del>M</del> K <del>F</del> RA <del>F</del> K <del>A</del> WA <del>V</del> AR <del>L</del> S <del>Q</del> R <del>F</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> AV <del>S</del> KL <del>V</del> DL <del>T</del> TK
Hu_1_2_3	241	VHT <del>E</del> CC <del>G</del> D <del>L</del> IL <del>E</del> CA <del>D</del> RA <del>D</del> LA <del>K</del> Y <del>C</del> EN <del>O</del> DS <del>I</del> SS <del>S</del> KL <del>K</del> EC <del>C</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> PL <del>E</del> KS <del>H</del> SH <del>E</del> AE <del>V</del> EN <del>D</del> EM <del>P</del> PA
Hu_1_3	195	--
Hu_2_3	59	VHT <del>E</del> CC <del>G</del> D <del>L</del> IL <del>E</del> CA <del>D</del> RA <del>D</del> LA <del>K</del> Y <del>C</del> EN <del>O</del> DS <del>I</del> SS <del>S</del> KL <del>K</del> EC <del>C</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> PL <del>E</del> KS <del>H</del> SH <del>E</del> AE <del>V</del> EN <del>D</del> EM <del>P</del> PA
Mac_mul	241	VHT <del>E</del> CC <del>G</del> D <del>L</del> IL <del>E</del> CA <del>D</del> RA <del>D</del> LA <del>K</del> Y <del>C</del> EN <del>O</del> DS <del>I</del> SS <del>S</del> KL <del>K</del> EC <del>C</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> PL <del>E</del> KS <del>H</del> SH <del>E</del> AE <del>V</del> EN <del>D</del> EM <del>P</del> PA
ラット	241	INK <del>E</del> CC <del>G</del> D <del>L</del> IL <del>E</del> CA <del>D</del> RA <del>D</del> LA <del>K</del> Y <del>C</del> EN <del>O</del> DS <del>I</del> SS <del>S</del> KL <del>K</del> EC <del>C</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> PL <del>E</del> KS <del>H</del> SH <del>E</del> AE <del>V</del> EN <del>D</del> EM <del>P</del> PA
マウス	241	INK <del>E</del> CC <del>G</del> D <del>L</del> IL <del>E</del> CA <del>D</del> RA <del>D</del> LA <del>K</del> Y <del>C</del> EN <del>O</del> DS <del>I</del> SS <del>S</del> KL <del>K</del> EC <del>C</del> PK <del>A</del> E <del>F</del> PL <del>E</del> KS <del>H</del> SH <del>E</del> AE <del>V</del> EN <del>D</del> EM <del>P</del> PA
Hu_1_2_3	301	DLP <del>S</del> LA <del>A</del> ADF <del>V</del> ES <del>K</del> D <del>V</del> CK <del>N</del> Y <del>A</del> E <del>K</del> D <del>V</del> FL <del>G</del> M <del>F</del> LY <del>E</del> Y <del>A</del> R <del>R</del> H <del>P</del> D <del>S</del> V <del>W</del> LL <del>R</del> LA <del>K</del> TY <del>E</del> PT <del>L</del> TK
Hu_1_3	195	--
Hu_2_3	119	DLP <del>S</del> LA <del>A</del> DF <del>V</del> ES <del>K</del> D <del>V</del> CK <del>N</del> Y <del>A</del> E <del>K</del> D <del>V</del> FL <del>G</del> M <del>F</del> LY <del>E</del> Y <del>A</del> R <del>R</del> H <del>P</del> D <del>S</del> V <del>W</del> LL <del>R</del> LA <del>K</del> TY <del>E</del> PT <del>L</del> TK
Mac_mul	301	DLP <del>S</del> LA <del>A</del> DF <del>V</del> ES <del>K</del> D <del>V</del> CK <del>N</del> Y <del>A</del> E <del>K</del> D <del>V</del> FL <del>G</del> M <del>F</del> LY <del>E</del> Y <del>A</del> R <del>R</del> H <del>P</del> D <del>S</del> V <del>W</del> LL <del>R</del> LA <del>K</del> TY <del>E</del> PT <del>L</del> TK
ラット	301	DLP <del>S</del> LA <del>A</del> DF <del>V</del> ES <del>K</del> D <del>V</del> CK <del>N</del> Y <del>A</del> E <del>K</del> D <del>V</del> FL <del>G</del> M <del>F</del> LY <del>E</del> Y <del>A</del> R <del>R</del> H <del>P</del> D <del>S</del> V <del>W</del> LL <del>R</del> LA <del>K</del> TY <del>E</del> PT <del>L</del> TK
マウス	301	DLP <del>S</del> LA <del>A</del> DF <del>V</del> ES <del>K</del> D <del>V</del> CK <del>N</del> Y <del>A</del> E <del>K</del> D <del>V</del> FL <del>G</del> M <del>F</del> LY <del>E</del> Y <del>A</del> R <del>R</del> H <del>P</del> D <del>S</del> V <del>W</del> LL <del>R</del> LA <del>K</del> TY <del>E</del> PT <del>L</del> TK
Hu_1_2_3	361	CAA <del>A</del> D <del>P</del> H <del>E</del> C <del>Y</del> A <del>K</del> V <del>F</del> DE <del>E</del> PK <del>V</del> PL <del>E</del> VE <del>P</del> Q <del>N</del> QL <del>E</del> F <del>Q</del> L <del>G</del> E <del>Y</del> K <del>F</del> Q <del>N</del> ALL <del>V</del> LR <del>T</del> KK <del>V</del> PO <del>V</del> ST
Hu_1_3	195	--
Hu_2_3	179	CAA <del>A</del> D <del>P</del> H <del>E</del> C <del>Y</del> A <del>K</del> V <del>F</del> DE <del>E</del> PK <del>V</del> PL <del>E</del> VE <del>P</del> Q <del>N</del> QL <del>E</del> F <del>Q</del> L <del>G</del> E <del>Y</del> K <del>F</del> Q <del>N</del> ALL <del>V</del> LR <del>T</del> KK <del>V</del> PO <del>V</del> ST
Mac_mul	361	CAA <del>A</del> D <del>P</del> H <del>E</del> C <del>Y</del> A <del>K</del> V <del>F</del> DE <del>E</del> PK <del>V</del> PL <del>E</del> VE <del>P</del> Q <del>N</del> QL <del>E</del> F <del>Q</del> L <del>G</del> E <del>Y</del> K <del>F</del> Q <del>N</del> ALL <del>V</del> LR <del>T</del> KK <del>V</del> PO <del>V</del> ST
ラット	361	CAA <del>A</del> D <del>P</del> H <del>E</del> C <del>Y</del> A <del>K</del> V <del>F</del> DE <del>E</del> PK <del>V</del> PL <del>E</del> VE <del>P</del> Q <del>N</del> QL <del>E</del> F <del>Q</del> L <del>G</del> E <del>Y</del> K <del>F</del> Q <del>N</del> ALL <del>V</del> LR <del>T</del> KK <del>V</del> PO <del>V</del> ST
マウス	361	CAA <del>A</del> D <del>P</del> H <del>E</del> C <del>Y</del> A <del>K</del> V <del>F</del> DE <del>E</del> PK <del>V</del> PL <del>E</del> VE <del>P</del> Q <del>N</del> QL <del>E</del> F <del>Q</del> L <del>G</del> E <del>Y</del> K <del>F</del> Q <del>N</del> ALL <del>V</del> LR <del>T</del> KK <del>V</del> PO <del>V</del> ST

【図1-2】

図1(続き)

Hu_1_2_3	421	PTL <del>V</del> EV <del>S</del> RNL <del>G</del> VG <del>S</del> K <del>C</del> C <del>K</del> H <del>P</del> AK <del>R</del> MP <del>C</del> A <del>D</del> Y <del>L</del> S <del>V</del> LN <del>C</del> V <del>L</del> H <del>E</del> K <del>T</del> P <del>V</del> SD <del>R</del> V <del>T</del> CC <del>T</del> ES
Hu_1_3	235	PTL <del>V</del> EV <del>S</del> RNL <del>G</del> VG <del>S</del> K <del>C</del> C <del>K</del> H <del>P</del> AK <del>R</del> MP <del>C</del> A <del>D</del> Y <del>L</del> S <del>V</del> LN <del>C</del> V <del>L</del> H <del>E</del> K <del>T</del> P <del>V</del> SD <del>R</del> V <del>T</del> CC <del>T</del> ES
Hu_2_3	239	PTL <del>V</del> EV <del>S</del> RNL <del>G</del> VG <del>S</del> K <del>C</del> C <del>K</del> H <del>P</del> AK <del>R</del> MP <del>C</del> A <del>D</del> Y <del>L</del> S <del>V</del> LN <del>C</del> V <del>L</del> H <del>E</del> K <del>T</del> P <del>V</del> SD <del>R</del> V <del>T</del> CC <del>T</del> ES
Mac_mul	421	PTL <del>V</del> EV <del>S</del> RNL <del>G</del> VG <del>S</del> K <del>C</del> C <del>K</del> H <del>P</del> AK <del>R</del> MP <del>C</del> A <del>D</del> Y <del>L</del> S <del>V</del> LN <del>C</del> V <del>L</del> H <del>E</del> K <del>T</del> P <del>V</del> SD <del>R</del> V <del>T</del> CC <del>T</del> ES
ラット	421	PTL <del>V</del> EV <del>S</del> RNL <del>G</del> VG <del>S</del> K <del>C</del> C <del>K</del> H <del>P</del> AK <del>R</del> MP <del>C</del> A <del>D</del> Y <del>L</del> S <del>V</del> LN <del>C</del> V <del>L</del> H <del>E</del> K <del>T</del> P <del>V</del> SD <del>R</del> V <del>T</del> CC <del>T</del> ES
マウス	421	PTL <del>V</del> EV <del>S</del> RNL <del>G</del> VG <del>S</del> K <del>C</del> C <del>K</del> H <del>P</del> AK <del>R</del> MP <del>C</del> A <del>D</del> Y <del>L</del> S <del>V</del> LN <del>C</del> V <del>L</del> H <del>E</del> K <del>T</del> P <del>V</del> SD <del>R</del> V <del>T</del> CC <del>T</del> ES

Hu_1_2_3	481	LVNRRPCFS <del>A</del> LE <del>V</del> DE <del>T</del> Y <del>V</del> P <del>K</del> FE <del>N</del> A <del>E</del> IT <del>F</del> H <del>A</del> DI <del>C</del> TL <del>S</del> E <del>K</del> E <del>O</del> KK <del>Q</del> T <del>A</del> LV <del>E</del> V <del>L</del> V <del>K</del> H <del>P</del> PK <del>A</del>
Hu_1_3	295	LVNRRPCFS <del>A</del> LE <del>V</del> DE <del>T</del> Y <del>V</del> P <del>K</del> FE <del>N</del> A <del>E</del> IT <del>F</del> H <del>A</del> DI <del>C</del> TL <del>S</del> E <del>K</del> E <del>O</del> KK <del>Q</del> T <del>A</del> LV <del>E</del> V <del>L</del> V <del>K</del> H <del>P</del> PK <del>A</del>
Hu_2_3	299	LVNRRPCFS <del>A</del> LE <del>V</del> DE <del>T</del> Y <del>V</del> P <del>K</del> FE <del>N</del> A <del>E</del> IT <del>F</del> H <del>A</del> DI <del>C</del> TL <del>S</del> E <del>K</del> E <del>O</del> KK <del>Q</del> T <del>A</del> LV <del>E</del> V <del>L</del> V <del>K</del> H <del>P</del> PK <del>A</del>
Mac_mul	481	LVNRRPCFS <del>A</del> LE <del>V</del> DE <del>T</del> Y <del>V</del> P <del>K</del> FE <del>N</del> A <del>E</del> IT <del>F</del> H <del>A</del> DI <del>C</del> TL <del>S</del> E <del>K</del> E <del>O</del> KK <del>Q</del> T <del>A</del> LV <del>E</del> V <del>L</del> V <del>K</del> H <del>P</del> PK <del>A</del>
ラット	481	LVNRRPCFS <del>A</del> LE <del>V</del> DE <del>T</del> Y <del>V</del> P <del>K</del> FE <del>N</del> A <del>E</del> IT <del>F</del> H <del>A</del> DI <del>C</del> TL <del>S</del> E <del>K</del> E <del>O</del> KK <del>Q</del> T <del>A</del> LV <del>E</del> V <del>L</del> V <del>K</del> H <del>P</del> PK <del>A</del>
マウス	481	LVNRRPCFS <del>A</del> LE <del>V</del> DE <del>T</del> Y <del>V</del> P <del>K</del> FE <del>N</del> A <del>E</del> IT <del>F</del> H <del>A</del> DI <del>C</del> TL <del>S</del> E <del>K</del> E <del>O</del> KK <del>Q</del> T <del>A</del> LV <del>E</del> V <del>L</del> V <del>K</del> H <del>P</del> PK <del>A</del>

↑

550

573

Hu_1_2_3	541	KEOLKAVMD <del>D</del> FAAF <del>V</del> E <del>K</del> CC <del>K</del> ADD <del>K</del> ET <del>C</del> CF <del>A</del> E <del>E</del> KK <del>V</del> LA <del>V</del> AS <del>Q</del> AA <del>L</del> EL
Hu_1_3	355	KEOLKAVMD <del>D</del> FAAF <del>V</del> E <del>K</del> CC <del>K</del> ADD <del>K</del> ET <del>C</del> CF <del>A</del> E <del>E</del> KK <del>V</del> LA <del>V</del> AS <del>Q</del> AA <del>L</del> EL
Hu_2_3	359	KEOLKAVMD <del>D</del> FAAF <del>V</del> E <del>K</del> CC <del>K</del> ADD <del>K</del> ET <del>C</del> CF <del>A</del> E <del>E</del> KK <del>V</del> LA <del>V</del> AS <del>Q</del> AA <del>L</del> EL
Mac_mul	541	KEOLKAVMD <del>D</del> FAAF <del>V</del> E <del>K</del> CC <del>K</del> ADD <del>K</del> ET <del>C</del> CF <del>A</del> E <del>E</del> KK <del>V</del> LA <del>V</del> AS <del>Q</del> AA <del>L</del> EL
ラット	541	EDOLKTVM <del>G</del> PF <del>C</del> EV <del>E</del> KK <del>C</del> ACK <del>D</del> PK <del>A</del> DP <del>C</del> CP <del>N</del> VR <del>S</del> K <del>G</del> FD <del>A</del> -
マウス	541	AEOLKTVM <del>G</del> PF <del>C</del> EV <del>E</del> KK <del>C</del> ACK <del>D</del> PK <del>A</del> DP <del>C</del> CP <del>N</del> VR <del>S</del> K <del>G</del> FD <del>A</del> -

↑

541

&lt;/div

【図2-3】

図2(続き)

ヒト 321 EAKDVELC<sup>G</sup>FLEYEYARHPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 マウス 321 EAKDVFELG<sup>G</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ヒツジ 320 EAKDVFELG<sup>S</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ウサギ 321 EAKDVFELG<sup>S</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ヤギ 320 EAKDVFELG<sup>S</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 チンパンジー 357 EAKDVFELC<sup>G</sup>FLEYEYARHPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 マカク 345 EAKDVFELC<sup>G</sup>FLEYEYARHPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ハムスター 345 EAKDVFELG<sup>G</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 モルモット 345 EAKDVFELG<sup>G</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ラット 345 EAKDVFELG<sup>G</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ウシ 344 EAKDVFELG<sup>S</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ウマ 344 EAKDVFELG<sup>S</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ロバ 344 EAKDVFELG<sup>S</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 イヌ 345 EAKDVFELC<sup>G</sup>FLEYEYARHPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ニワトリ 349 EAKDVFELC<sup>G</sup>FLEYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>  
 ブタ 344 EAKHVFELG<sup>G</sup>FLYEYSRHRPDYSV<sup>A</sup>LLRLAKTVE<sup>T</sup>TELEKCCAAADPHE<sup>C</sup>YAKV<sup>D</sup>FDE<sup>E</sup>RP<sup>F</sup>

ヒト 381 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 マウス 381 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ヒツジ 380 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGT<sup>C</sup>CAK<sup>H</sup>  
 ウサギ 381 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ヤギ 380 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGT<sup>C</sup>CAK<sup>H</sup>  
 チンパンジー 417 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 マカク 405 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ハムスター 405 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 モルモット 405 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ラット 405 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ウシ 405 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ウマ 404 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ロバ 404 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 イヌ 404 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ニワトリ 409 EK<sup>G</sup>TKODW<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>  
 ブタ 404 VEPPONL<sup>G</sup>KNCELEP<sup>G</sup>LGEXY<sup>G</sup>FKONALLVRYTRK<sup>G</sup>POVSTPTLV<sup>A</sup>SRNLGKVGS<sup>C</sup>KKH<sup>H</sup>

(D3-開始) (D2-終了)

ヒト 441 PEAKR<sup>G</sup>PAEADYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>VET<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 マウス 441 PEAKR<sup>G</sup>PAEADYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>VET<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ヒツジ 440 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>T<sup>I</sup>D<sup>T</sup>E<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ウサギ 441 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>T<sup>I</sup>D<sup>T</sup>E<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ヤギ 440 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>T<sup>I</sup>D<sup>T</sup>E<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 チンパンジー 477 PEAKR<sup>G</sup>PAEADYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>VET<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 マカク 465 PEAKR<sup>G</sup>PAEADYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ハムスター 465 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 モルモット 465 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ラット 465 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ウシ 464 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ウマ 464 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ロバ 464 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 イヌ 465 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ニワトリ 469 EDR<sup>G</sup>PRAS<sup>G</sup>PAEADYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>  
 ブタ 464 PEER<sup>G</sup>RPOTEDYL<sup>S</sup>V<sup>N</sup>L<sup>G</sup>NR<sup>L</sup>CVLHEKT<sup>T</sup>PVS<sup>G</sup>EVTKCCTESLV<sup>N</sup>RRCFS<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>P</sup>

(D3-終了) (D2-終了)

【図2-4】

図2(続き)

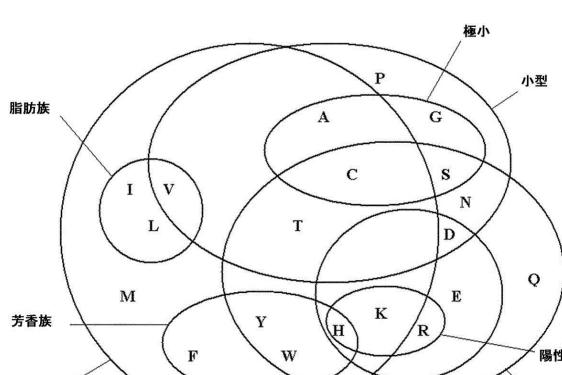
ヒト 501 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>S<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 マウス 501 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>S<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ヒツジ 500 PDE<sup>E</sup>K<sup>T</sup>TFEHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ウサギ 501 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ヤギ 500 PDE<sup>E</sup>K<sup>T</sup>TFEHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 チンパンジー 537 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>S<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 マカク 524 ANNAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>S<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ハムスター 523 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>S<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 モルモット 523 PPHHD<sup>E</sup>S<sup>T</sup>TFEHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ラット 525 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ウシ 524 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ウマ 524 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ロバ 525 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 イヌ 525 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ニワトリ 529 OSINT<sup>E</sup>TFEHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>  
 ブタ 524 EENAE<sup>T</sup>TTFHADIC<sup>T</sup>P<sup>E</sup>T<sup>E</sup>K<sup>R</sup>QIKKQTALVELVKH<sup>K</sup>PKA<sup>A</sup>EQL<sup>A</sup>WMD<sup>F</sup>RAF<sup>V</sup>ER<sup>C</sup>CK<sup>H</sup>

(D3-終了)

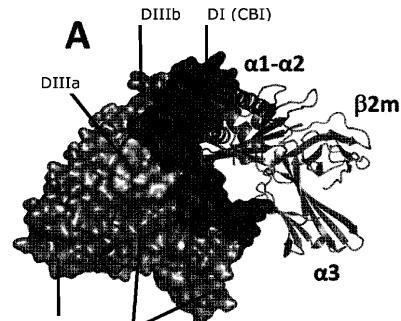
(D2-終了)

【図3】

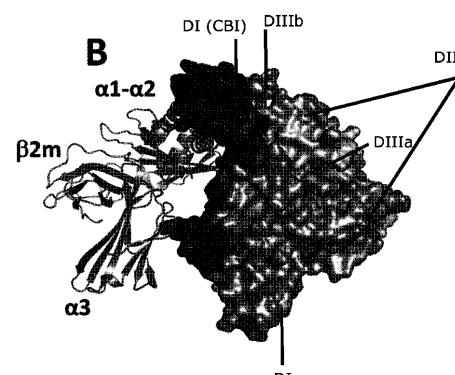
図3



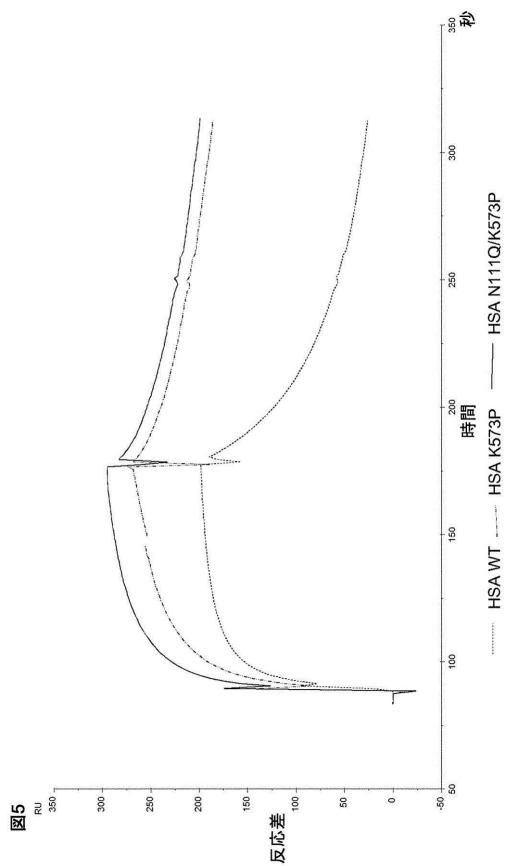
【図4 A】



【図4 B】

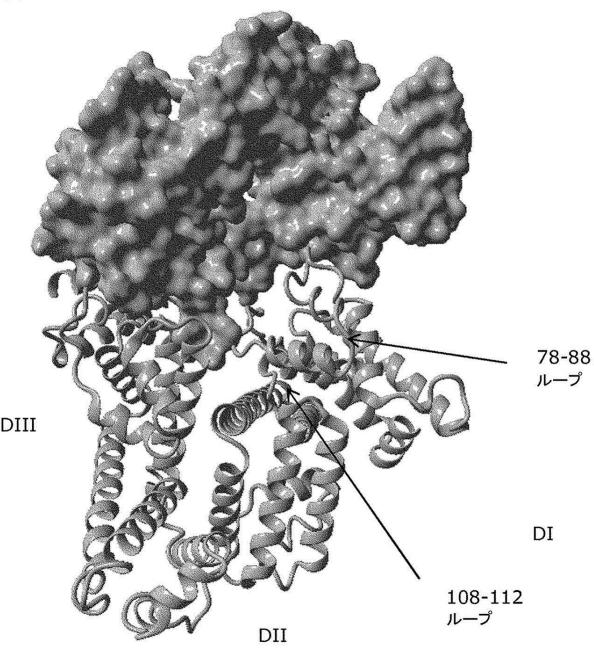


【図5】



【図6】

図6



【配列表】

0006441682000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	15/14	(2006.01) C 1 2 N 15/14
C 1 2 P	21/02	(2006.01) C 1 2 P 21/02
C 0 7 K	19/00	(2006.01) C 0 7 K 19/00
A 6 1 K	9/14	(2006.01) A 6 1 K 9/14
A 6 1 K	47/64	(2017.01) A 6 1 K 47/64
A 6 1 K	31/7088	(2006.01) A 6 1 K 31/7088

- (31)優先権主張番号 12187326.9  
(32)優先日 平成24年10月5日(2012.10.5)  
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (31)優先権主張番号 12191086.3  
(32)優先日 平成24年11月2日(2012.11.2)  
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (31)優先権主張番号 12191854.4  
(32)優先日 平成24年11月8日(2012.11.8)  
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

## 前置審査

(72)発明者 カレン アン デラヘイ  
イギリス国, ノッティンガムシャー エヌジー 13 9エイチユー ノッティンガム, ランガー,  
ベルボワ クレッセント 18

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 国際公開第2011/124718 (WO, A1)  
国際公開第2011/051489 (WO, A1)  
特表2011-518137 (JP, A)  
国際公開第2010/092135 (WO, A1)  
IWAO YASUNORI, CHANGES OF NET CHARGE AND -HELICAL 以下省略, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS & PROTEOMICS, ELSEVIER, 2007年12月 1日, Vol.1774, No.12, p1582-1590  
岩尾 康範 他, ヒト血清アルブミンの一残基変異が及ぼす構造・動態特性への影響, 日本薬学会年会要旨集, 2007年, 127(3), 154

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 15 / 0 0  
C 0 7 K 14 / 0 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q