

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-518224

(P2005-518224A)

(43) 公表日 平成17年6月23日(2005.6.23)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

F I

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

テーマコード (参考)

4 B O 6 3

D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2003-571707 (P2003-571707)  
 (86) (22) 出願日 平成15年2月26日 (2003. 2. 26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月18日 (2004. 10. 18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/005670  
 (87) 国際公開番号 W02003/073068  
 (87) 国際公開日 平成15年9月4日 (2003. 9. 4)  
 (31) 優先権主張番号 60/360, 057  
 (32) 優先日 平成14年2月26日 (2002. 2. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500284580  
 ジェネンコー・インターナショナル・イン  
 ク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ  
 ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
 (74) 代理人 100071010  
 弁理士 山崎 行造  
 (74) 代理人 100121762  
 弁理士 杉山 直人  
 (74) 代理人 100126767  
 弁理士 白銀 博  
 (74) 代理人 100122839  
 弁理士 星 貴子  
 (74) 代理人 100118647  
 弁理士 赤松 利昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の相対免疫原性をランク付けるための集団ベースの評価及び手段

## (57) 【要約】

本発明は集団の免疫反応プロファイルを評価する方法を提供する。特に、本発明はヒト集団の免疫反応を定性評価する方法を提供し、目的のタンパク質に対する免疫反応を分析する。本発明はさらに、それらの相対免疫原性に基づいてタンパク質をランク付けする方法を提供する。さらに、本発明は種々の用途に使用するための免疫原性が減少したタンパク質を作成する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

第 1 のタンパク質と少なくとも 1 の他のタンパク質の相対免疫原性をランク付けする方法であって、以下の工程を含む：

( a ) 第 1 のタンパク質から第 1 のペプセットを調製し、前記他の各タンパク質から少なくとも 1 の他のペプセットを調製する工程；

( b ) 1 のヒト血液源から樹状細胞を含む溶液及びナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞の溶液を含む溶液を得る工程；

( c ) 前記樹状細胞を分化させて、分化樹状細胞の溶液を生成する工程；

( d ) 分化樹状細胞の前記溶液及び前記ナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞の溶液と前記第 1 のペプセットを混合する工程； 10

( e ) 分化樹状細胞及び前記ナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞の溶液と前記他のタンパク質由来の前記各ペプセットを混合する工程；

( f ) 前記工程 ( d ) 及び ( e ) の増殖を測定して、第 1 及び他のペプセット中の各ペプチドに対する反応を測定する工程；

( g ) 前記第 1 のタンパク質及び前記他のタンパク質に関して工程 ( f ) における前記 T 細胞の反応を編集する工程；

( h ) 前記第 1 のタンパク質及び前記他のタンパク質に関して工程 ( g ) の前記編集反応の構造値を決定する工程；及び

( i ) 前記第 1 のタンパク質に関して得られた構造値と前記他のタンパク質の構造値を比較して、前記第 1 のタンパク質及び前記他のタンパク質をランク付ける免疫原性を決定する工程。 20

## 【請求項 2】

最も低い構造値を有するタンパク質をそれよりも高い構造値を有するタンパク質より免疫原性が低いものとしてランク付けする、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

前記少なくとも 2 つのタンパク質を酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体、構造タンパク質及び結合タンパク質からなる群より選択する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

前記第 1 のタンパク質に対する陽性反応が約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数値を含む、請求項 1 の方法。 30

## 【請求項 5】

前記他のタンパク質に対する陽性反応が約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数値を含む、請求項 1 の方法。

## 【請求項 6】

工程 ( d ) の前記 T 細胞の前記増殖が約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 7】

工程 ( e ) の前記 T 細胞の増殖が約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 8】

少なくとも 1 の他のヒト血液源が工程 ( b ) で用いられる、請求項 1 の方法。 40

## 【請求項 9】

前記ヒト血液源及び前記タンパク質のそれぞれに関して得た構造値を比較する、請求項 8 の方法。

## 【請求項 10】

前記タンパク質の構造値及びバックグラウンド反応比率値を前記タンパク質をランク付けるために使用する、請求項 9 の方法。

## 【請求項 11】

2 つのタンパク質の相対免疫原性をランク付けする方法であって、前記第 2 のタンパク質が第 1 のタンパク質のタンパク質変異体であり、以下の工程を含む： 50

- ( a ) 第 1 のタンパク質から第 1 のペプセット及び第 2 のタンパク質から第 2 のペプセットを調製する工程；
- ( b ) 1 のヒト血液源から樹状細胞溶液及びナイーブ C D 4 + 及び / または C D 8 + T 細胞の溶液を得る工程；
- ( c ) 前記樹状細胞溶液中で、前記樹状細胞を分化して分化樹状細胞溶液を生成する工程；
- ( d ) 前記分化樹状細胞溶液及び前記ナイーブ C D 4 + 及び / または C D 8 + T 細胞の溶液と前記第 1 のペプセットを混合する工程；
- ( e ) 前記分化樹状細胞溶液及び前記ナイーブ C D 4 + 及び / または C D 8 + T 細胞の溶液と前記第 2 のペプセットを混合する工程；
- ( f ) 工程 ( d ) 及び ( e ) における前記 T 細胞の増殖を測定して、前記第 1 及び第 2 のペプセット中の各ペプチドに対する反応を測定する工程；
- ( g ) 前記第 1 のタンパク質及び前記第 2 のタンパク質に関して工程 ( f ) における前記 T 細胞の反応を編集する工程；
- ( h ) 前記第 1 のタンパク質及び前記第 2 のタンパク質に関して工程 ( g ) の前記編集反応の構造値を決定する工程；及び
- ( i ) 前記第 1 のタンパク質に関して得られた構造値と前記第 2 のタンパク質の構造値を比較して、前記第 1 のタンパク質及び前記第 2 のタンパク質をランク付ける免疫原性を決定する工程。

10

## 【請求項 12】

前記第 2 のタンパク質が前記第 1 のタンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付ける、請求項 11 の方法。

20

## 【請求項 13】

前記第 1 のタンパク質が前記第 2 のタンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付ける、請求項 11 の方法。

## 【請求項 14】

前記第 1 及び第 2 のタンパク質を酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体、構造タンパク質及び結合タンパク質からなる群より選択する、請求項 11 の方法。

## 【請求項 15】

前記第 1 のタンパク質に対する陽性反応が約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数値を含む、請求項 11 の方法。

30

## 【請求項 16】

前記第 2 のタンパク質に対する陽性反応が約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数値を含む、請求項 11 の方法。

## 【請求項 17】

工程 ( d ) の前記 T 細胞の前記増殖が約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる、請求項 11 の方法。

## 【請求項 18】

工程 ( e ) の前記 T 細胞の増殖が約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる、請求項 11 の方法。

40

## 【請求項 19】

前記第 2 のタンパク質が前記第 1 のタンパク質の少なくとも 1 の顕著な領域の減少を含む、請求項 11 の方法。

## 【請求項 20】

工程 ( e ) における前記 T 細胞の増殖がバックグラウンドレベルである、請求項 11 の方法。

## 【請求項 21】

工程 ( b ) で少なくとも 1 の他のヒト血液源が用いられる、請求項 11 の方法。

## 【請求項 22】

各前記ヒト血液源及び前記タンパク質に関して得た構造値を比較する、請求項 11 の方法

50

。

【請求項 2 3】

前記タンパク質の構造値及びバックグラウンド反応比率値を前記タンパク質をランク付けるために用いる、請求項 2 2 の方法。

【請求項 2 4】

第 1 のタンパク質及び少なくとも 1 の変異体タンパク質の相対免疫原性をランク付けする方法であって、以下の工程を含む：

( a ) 第 1 のタンパク質から第 1 のペプセット及び前記各変異体タンパク質からペプセットを調製する工程；

( b ) 1 のヒト血液源から樹状細胞溶液及びナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞の溶液を得る工程； 10

( c ) 前記樹状細胞を分化して分化樹状細胞溶液を生成する工程；

( d ) 分化樹状細胞溶液及び前記ナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞の溶液と前記第 1 のペプセットを混合する工程；

( e ) 分化樹状細胞溶液及び前記ナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞の溶液と前記変異体タンパク質から調製した各ペプセットを混合する工程；

( f ) 工程 ( d ) 及び ( e ) における前記 T 細胞の増殖を測定して、前記第 1 のペプセット及び前記変異体タンパク質由来の各ペプセット中の各ペプチドに対する反応を測定する工程；

( g ) 前記第 1 のタンパク質及び前記変異体タンパク質に関して工程 ( f ) における前記 T 細胞の反応を編集する工程； 20

( h ) 前記第 1 のタンパク質及び前記変異体タンパク質に関して工程 ( g ) の前記編集反応の構造値を決定する工程；及び

( i ) 前記第 1 のタンパク質に関して得られた構造値と前記変異体タンパク質の構造値を比較して、前記第 1 のタンパク質及び前記変異体タンパク質をランク付ける免疫原性を決定する工程。

【請求項 2 5】

少なくとも 1 の前記変異体タンパク質が前記第 1 のタンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付ける、請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 6】 30

前記第 1 のタンパク質が少なくとも 1 の前記変異体タンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付ける、請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 7】

前記第 1 及び変異体タンパク質が酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体、構造タンパク質及び結合タンパク質からなる群より選択される、請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 8】

前記第 1 のタンパク質に対する陽性反応が約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数値を含む、請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 の前記変異体タンパク質に対する陽性反応が約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数値を含む、請求項 2 4 の方法。 40

【請求項 3 0】

工程 ( d ) の前記 T 細胞の増殖が約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる、請求項 2 4 の方法

。

【請求項 3 1】

工程 ( e ) の前記 T 細胞の増殖が約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる、請求項 2 4 の方法

。

【請求項 3 2】

少なくとも 1 の変異体タンパク質が前記第 1 のタンパク質の少なくとも 1 の顕著な領域の減少を含む、請求項 2 4 の方法。

## 【請求項 33】

少なくとも 1 の変異体タンパク質に関する工程 ( e ) における前記 T 細胞の増殖がバックグラウンドレベルである、請求項 32 の方法。

## 【請求項 34】

工程 ( b ) で少なくとも 1 の他のヒト血液源が用いられる、請求項 22 の方法。

## 【請求項 35】

各前記ヒト血液源及び前記タンパク質に関して得た構造値を比較する、請求項 22 の方法。

## 【請求項 36】

前記タンパク質の構造値及びバックグラウンド反応比率値を前記タンパク質をランク付けするために用いる、請求項 35 の方法。 10

## 【請求項 37】

試験タンパク質に対する試験集団の免疫反応を測定する方法であって、以下の工程を含む：

- ( a ) 前記試験タンパク質からペプセットを調製する工程；
- ( b ) ヒト樹状細胞を含む複数の溶液及びナイーブヒト DC4 + 及び / または CD8 + T 細胞の複数の溶液を得る工程であって、ヒト樹状細胞の前記溶液及びナイーブヒト DC4 + 及び / または CD8 + T 細胞の溶液を前記試験集団内で複数の個体から得る工程；
- ( c ) 前記樹状細胞を分化して分化樹状細胞を含む複数の溶液を生成する工程；
- ( d ) 前記分化樹状細胞の複数の溶液及び前記ナイーブ CD4 + 及び / または CD8 + T 細胞溶液と前記ペプセットを混合する工程であって、ここで前記試験集団内の個々由来の前記分化樹状細胞の各溶液及び前記ナイーブ CD4 + 及び / または CD8 + T 細胞溶液を混合する工程； 20
- ( e ) 工程 ( d ) の前記 T 細胞の増殖を測定して前記ペプセット内の各ペプチドに対する反応を測定する工程；
- ( g ) 前記試験タンパク質に関して工程 ( e ) における前記 T 細胞の反応を編集する工程；
- ( h ) 前記試験タンパク質に関して工程 ( g ) の編集反応の構造値を決定する工程；及び
- ( i ) 前記試験タンパク質に対する前記複数の個体の曝露レベルを決定する工程。 30

## 【請求項 38】

前記試験タンパク質が少なくとも 2 つの試験タンパク質を含む、請求項 37 の方法。

## 【請求項 39】

前記試験タンパク質に対する前記複数の個体の曝露レベルを比較する、請求項 37 の方法。

## 【請求項 40】

前記タンパク質の構造値及びバックグラウンド反応比率値を前記タンパク質をランク付けするために用いる、請求項 37 の方法。

## 【請求項 41】

前記試験集団が減少された免疫反応を示す変異体タンパク質を生成するために前記タンパク質を修飾する、請求項 37 の方法。 40

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は集団の免疫反応プロファイルを評価するための手段を提供する。特に、本発明はヒト集団の免疫反応を定性評価するための手段を提供し、目的のタンパク質に対する免疫反応を分析する。本発明はさらに、それらの相対免疫原性に基づいてタンパク質をランク付けるための手段を提供する。さらに、本発明は種々の用途で用いるために免疫原性を減少させたタンパク質を作成する手段を提供する。

## 【0002】

## 発明の背景

タンパク質は潜在的に生死にかかわる免疫反応を引き起こす可能性がある。この制限により消費者の最終製品用途及び製品での広範囲に及ぶ使用を妨げてきた。実際、この免疫反応を生じる可能性については米国食品医薬品局（FDA）の注意下にあり、新しいタンパク質治療の承認前及び後の両方で免疫原性試験を必要とする。しかしながら、免疫原性を評価するために利用可能な多数の動物モデルがあるが、ヒトにおいて相対免疫原性を識別するための正当な方法がない。

## 【0003】

これらは関心されているにも関わらず、タンパク質の免疫原性は酵素製造業において長い間、懸案事項となっている。職業上のタンパク質への被曝は工業及び研究所作業員の感作を生じることが実証されている。特定のタンパク質への曝露は通常、個人がタンパク質に対する免疫反応を開始しているかどうかを示すスキンプリックテストなどの試験により評価される。

10

## 【0004】

実際、職業上のタンパク質への被曝は工業及び研究所作業員の感作を生じることが実証されている。ほとんどの環境において、感作は空気中に浮遊するタンパク質のレベルを減少させることにより制御する（Sarilo and Kirchner, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 2: 97 - 101 [2002]; 及び Schweigert et al., Clin. Exp. Allergy 30: 1511 - 1518 [2000]を参照）。職業被曝ガイドラインはタンパク質への空気中浮遊曝露の制御を実行してきた。これらのガイドラインは、特定のタンパク質への曝露を許容レベルにするものであり、所定の工業的環境で起こる全体的な感作事象の数を減少させるのに有用であった。新しいタンパク質が製造される場合、新しいタンパク質に関する職業被曝の樹立（OEG）は重大な関心事である。これらのガイドラインを決定するために一般に承認されている方法はモルモット気管内試験（GPIT）である（Sarilo, Fundam. Appl. Toxicol., 39: 44 - 52 [1997]を参照）。この試験において、モルモットは気管内喉頭注入法を用いて、約10～12週間で試験タンパク質に曝露する。動物由来の血清サンプルを周期的に採取し、当業界に公知の適当な方法により抗原特異抗体レベルについて試験する（例えば、IgG<sub>1</sub>に関する受身皮膚試験（PCA）及び増悪IgGに関するマイクロ免疫拡散試験（MID））。これらの結果を、被曝ガイドラインで効果的であることを公知の制御タンパク質（例えば、ALCALASE（登録商標）酵素、Novoから市販）を用いて試験した1組のモルモットから得た結果と比較する。血清滴定量、MID陽性（positivity）及び応答時間の測定を考慮し、相対可能性値を測定する。この方法は多数の工業的酵素に関するOEGを定めるためにうまく用いることができた。

20

30

## 【0005】

しかしながら、GPIT試験は有用であるが、時間及び費用がかかり、多数の動物及び複数の試験回数を必要とする。比較的最近、マウスに基づいた試験が確立され、より安く、面倒が少ない動物モデルを用いることにより、GPITで得られた結果を再生することが報告されている。マウス鼻腔内試験（MINT; Robinson et al., Toxicol. Sci. 43: 39 - 46 [1998]を参照）はOEFガイドラインを設定するためにいくつかの会社で用いられている。しかしながら、このモデルは工業的に広く受け入れられてはいない（タンパク質アレルギーに関する予測試験の検討のため、Robinson et al., supra及びKimber et al., (Kimber et al., Fundam. Appl. Toxicol., 33: 1 - 10 [1996]; 及びKimber et al., Toxicol. Sci., 48: 157 - 162 [1999]を参照）。

40

## 【0006】

従って、動物モデルは有用であるが、制限されている。GPITにおける部分的に非近

50

親交配のモルモットの使用は、グループ間の反応を比較する場合、統計的意義を達成するために多数の動物の使用を必要とする。さらに、対照動物反応における実験相互の変動は非常に高く、単一の組の対照反応に基づいた可能性測定信頼性は低い。MINT分析は、使用するマウスが、2つの高近交系マウス株間の交配種である、通常BDF1マウスなので、抗体反応における変動性の影響をそれほど受けない。この別のレベルの対照はより堅調なデータ分析を可能にするが、マウスの異なる株は通常、類似酵素に関して全く異なる潜在的ランク付けになる (Blaikie, Food Chem. Toxicol., 37: 897-904 [1999]; 及び Blaikie and Basketter, Food Chem. Toxicol., 37: 889-896 [1999] を参照)。これは、非常に制限されたMHC分子を発現する近交系であるマウス系統の免疫反応の特異性に起因すると思われる。さらに、MINT分析を用いる個々の研究所から得たデータは堅調であり得るが、MINT分析も研究所間の違いに悩まされている。

#### 【0007】

重大なことは、全ての動物試験はヒトの所定のタンパク質に対して免疫反応を適切に発現できないため苦労しているということである。マウスの近交系株はそれらのマウスMHC分子が与える特異性を有するペプチド分子を提示する。ヒトHLA分子は、マウスMHC分子に大きく関係するが、同一のペプチド特異性を有さない。さらに、近交マウス株は単一I-A及び/またはI-E分子の発現のために高非近親交配ヒト集団において非常にまれにしか起こらない状況について選択される。さらに、マウス免疫系はヒトには見られない多数の性質を有する (例えば、マウスにおいて記載されてきたTh1とTh2パラダイムはヒトにおいてはほとんどはつきりしない)。例えば、ヒトにおいて、Th1とTh2表現型は柔軟性があり、IFN- $\gamma$  遺伝子の遺伝的不一致により説明できる。それに対し、マウスは、Th1とTh2表現型が動的ではなく、これらの動物のIFN- $\gamma$  における挿入に起因する (Farrar, Nat. Immunol., 1: 65-69 [2000] を参照)。さらに、ヒトは活性化T細胞上にHLAクラスII分子を発現するが、マウスは発現しない。さらに、ヒトドナーは通常、内生ウイルスを運び、無症状感染することが多いが、研究所マウスは通常、特定病原体未感染(SPF)環境で維持される。別の問題は、トランスジェニックマウスモデルの作成に一般的なバックグラウンドである、C57BL/6マウス株は、信頼性に問題のあるヒト由来データと比較する特定の抗原処理欠陥を有する (Kim and Jang, Eur. J. Immunol., 22: 775-782 [1992])。ヒトHLAトランスジェニックマウスはヒト免疫反応の力学的研究への応用に利用できる (Boyton and Altmann, Clin. Exp. Immunol., 127: 4-11 [2002]; Black et al., J. Immunol., 169: 5595-5600 [2002]; Raju et al., Hum. Immunol., 63: 237-247 [2002]; 及び Das et al., Rev. Immunogenet., 2: 105-114 [2000] を参照)。しかしながら、HLAトランスジェニックマウスは種特異免疫系複雑性があるので、これらの動物の使用は制限される。さらに、これらのマウスを構築するために使用する少なくともいくつかの方法は、HLAトランス遺伝子の発現が正確に調節されないので、ペプチド特異反応の正確な分析ができない。HLAトランスジェニックマウスは、ヒトには見られない状態の、単一のHLA分子を発現する場合にマッピング研究に用いられることが多い。これは異なるHLA-DQ対立遺伝子間のクロスペアが新しいペプチド提示特異性を作成するために示される場合、HLA-DQトランスジェニックマウスの特に注目すべきところである (Krco et al., J. Immunol., 163: 1661-1665 [1999] を参照)。従って、タンパク質の免疫原性の測定、評価及び比較における進展にも関わらず、依然として当該測定を行うための、簡単で、信頼性があり、再現性のある方法への必要性が当業界にある。

#### 【0008】

同様に、治療的、工業的及び栄養学用途へのタンパク質の応用は有害な免疫反応を引き起こすまたは悪化させる潜在性により制限される。この潜在性は特に組換えヒト由来タン

パク質の使用に関して問題となる。実際、組換えヒト由来タンパク質は、自己のタンパク質に対して免疫反応を誘導し、自己免疫の進行をもたらすことが実証されている (Li et al., Blood 98:3241-3248 [2001]; 及び Casadevall et al., N. Eng. J. Med., 346:469-475 [2002])。工業的または食物タンパクに対する免疫反応の意図しない誘導後の次に起こる免疫系の再活性化は回避して最小限にできる。しかしながら、これはヒト由来治療タンパク質の場合ではない。従って、投与タンパク質の安全性及び効果を向上させるために免疫原性が減少されたタンパク質変異体を選択及び/または作成することが必要である。天然低免疫原性タンパク質異性体の選択は類似の活性を有するいくつかの関連分子が存在する場合、任意である。残念ながら、多くの治療タンパク質に関してこれは任意のものではない。従って、治療及びその他の用途の使用に適した低免疫原性タンパク質を生成する手段が当業界では長い間必要とされている。

10

#### 【0009】

##### 発明の概要

本発明は集団の免疫反応プロファイルを評価する手段を提供する。特に、本発明はヒト集団の免疫反応を定性評価する手段を提供し、ここで目的のタンパク質に対する免疫反応が分析される。本発明はさらに、それらの相対免疫原性に基づいてタンパク質をランク付けする手段を提供する。さらに、本発明は種々の用途に使用するための免疫原性が減少されたタンパク質を作成する手段を提供する。

#### 【0010】

本発明はヒト以外の動物における免疫原性分析から生じる問題を避けるために開発された。本発明の好ましい実施態様において、試験“被験体”としてのヒト末梢血単球 (PBMC) を用いてタンパク質の免疫原性をランク付けるための手段を提供する。多数のヒトサンプル複製を用いるので、提供情報はヒトの一般的な集団に適用可能である。重要なのは、当該データは近交系マウスの使用を取り巻く特異性問題がないということである。好ましい実施態様において、本発明はその全体的な免疫原性に基づいてタンパク質をランク付ける手段を提供する。さらに、以前から存在する動物データと比較することにより、本発明の方法はタンパク質の相対潜在性に付随する情報を提供する。例えば、本発明の開発時に、4つの特徴のある工業的アレルギー誘発物質がGPIT及びMINT試験により測定された順に認識され、職業被曝従業員の感作を測定するなど本発明の方法を用いて得た結果と比較した。

20

30

#### 【0011】

好ましい実施態様において、本発明により提供される方法は抗原提示細胞として樹状細胞、目的のタンパク質の全体配列を包含する3アミノ酸で補正される15マーペプチド及び樹状細胞ドナーから得られるCD4<sup>+</sup>T細胞の使用を含む。T細胞はペプチド及び分化樹状細胞の存在下、サンプル中での増殖が可能である(各ペプチドは個々に試験する)。本発明のいずれの方法も、ペプセット(pepsets)の調製及び樹状細胞の分化に関する限りは、特定の順番で実施することを意図するものではない。例えば、いくつかの実施態様において、ペプセットは樹状細胞が分化される前に調製し、一方、他の実施態様において、樹状細胞はペプセットを調製する前に分化し、さらに別の実施態様において、樹状細胞の分化とペプセットの調製は同時に行う。従って、本発明はこれらの工程を特定の順番で行う方法に限定することを意図するものではない。

40

#### 【0012】

ペプチドに反応した増殖が1.5~4.5の刺激指数(SI)を生じる場合、当該反応は“陽性”としてみなして計算される。各ペプチドの結果はドナーセットに関して集計され、いくつかの変動を含むが、好ましくは集団の一般的なHLA対立遺伝子頻度を反映する。線形性とは異なる測定に基づく“構造値(structure value)”を測定し、この値はタンパク質の相対免疫原性をランク付けるために用いる。従って、本発明はタンパク質の修飾に有用な情報を提供し、ヒトにおいて効果的であると予測される減少された反応率を感作されたボランティアを必要とすることなく達成する。低免疫原性にな

50

るように設計されたこれらの新しいタンパク質に基づくペプチドセットに対するドナー反応の分析はそれから新しいタンパク質の構造値を計算するために行い、それらの免疫原性及び曝露潜在性を確認する。

#### 【0013】

いくつかの好ましい実施態様において、本発明はタンパク質の相対免疫原性をランク付けるための分析システムを提供する（すなわち、IMUNE（登録商標）分析）。1の実施態様において、本方法は *in vitro* でタンパク質のペプチド断片に反応した CD4<sup>+</sup> T細胞増殖を測定する工程、タンパク質の測定反応を編集する工程、編集した反応の構造値を決定する工程及びタンパク質の構造値と第2のタンパク質の構造値を比較する工程を含み、ここで最も低い構造値を有するタンパク質はより高い構造値を有するタンパク質に比べてヒトに対して免疫原性が低いものとしてランク付けられる。別の実施態様において、試験タンパク質は酵素である。さらに別の実施態様において、酵素はプロテアーゼである。さらに別の実施態様において、試験タンパク質は抗体、サイトカイン及びホルモンからなる群より選択される。さらに別の実施態様において、各ペプチド断片及び各タンパク質の T細胞増殖は比較試験において測定される。他の実施態様において、“陽性”反応は 2.7 ~ 3.2 の SI 値に基づいて測定される。特に好ましい実施態様において、増殖レベルは 2.95 以上の刺激指数を生じる。

10

#### 【0014】

本発明はヒトの変異体タンパク質の減少した免疫原性潜在性を評価する方法も提供する。いくつかの実施態様において、本方法は親タンパク質の1以上の顕著な領域（*prominent region*）を変異体タンパク質を作成するためにバックグラウンドレベルまで減少させ、変異体の構造値を測定し、及び変異体の構造値と親タンパク質の構造値を比較することを含み、ここで低構造値は免疫原性が減少したタンパク質であることを示す。いくつかの好ましい実施態様において、タンパク質は酵素である。いくつかの別の実施態様においてタンパク質はプロテアーゼ、サイトカイン、ホルモン、抗体、アミラーゼ及びその他の酵素、限定されないが、ズブチリシン、ALCALASE（登録商標）酵素、セルラーゼ、リパーゼ、オキシダーゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ラクタマーゼ及びレダクターゼなどからなる群より選択される。さらに別の実施態様において、バックグラウンドレベルまで減少させた顕著な領域の数は 1 ~ 10 であり、好ましくは 1 ~ 5 である。さらに別の実施態様において、1 以上のアミノ酸残基が親タンパク質の顕著な領域において変異し、変異体を生成する。

20

30

#### 【0015】

また、本発明は関連タンパク質のグループから最も免疫原性の低いタンパク質を選択する方法を提供する。1の実施態様において、関連タンパク質は抗体であり、一方、別の実施態様においてそれらはサイトカインであり、別の実施態様においてはホルモンである。さらに別の実施態様において、関連タンパク質は構造タンパク質である。さらに別の実施態様において、タンパク質は酵素である。いくつかの好ましい実施態様において、酵素はプロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、オキシダーゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ラクタマーゼ、及びレダクターゼからなる群より選択される。

40

#### 【0016】

本発明はさらに関連タンパク質の相対ランク付けを用いて、タンパク質、特にヒトのタンパク質の免疫原性を減少させるために適した T細胞エピトープ修飾を決定する方法を提供する。本発明はバックグラウンド反応比率及びそれらの構造値の両方に基づきタンパク質を分類する手段も提供する。従って、いくつかの実施態様において、分析されるタンパク質はそれらのバックグラウンド反応比率及び構造値に従って分類及び/またはランク付けされる。

#### 【0017】

いくつかの実施態様において、本発明は第1のタンパク質と少なくとも1の別のタンパク質の相対免疫原性をランク付けする方法を提供し、以下の工程を含む：(a) 第1のタンパク質から第1のペプチドセットを調製し、別のタンパク質各々から少なくとも1の別のペ

50

プセットを調製する工程であって、ここで各ペプセット ( b ) 単一のヒト血液源から樹状細胞を含む溶液及びナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞溶液を得る工程 ; ( c ) 樹状細胞を分化させて、分化樹状細胞溶液を生成する工程 ; ( d ) 分化樹状細胞溶液とナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞と第 1 のペプセットを混合する工程 ; ( e ) 分化樹状細胞溶液とナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞と別のタンパク質由来の各ペプセットを混合する工程 ; 工程 ( d ) 及び ( e ) における T 細胞の増殖を測定して、第 1 及び別のペプセットにおける各ペプチドに対する反応を測定する工程 ; ( g ) 第 1 のタンパク質及び別のタンパク質に関する工程 ( f ) の T 細胞の反応を編集する工程 ; ( h ) 第 1 のタンパク質及び別のタンパク質に関する工程 ( g ) の編集した反応の構造値を決定する工程 ; 及び ( i ) 第 1 のタンパク質に関して得られた構造値と別のタンパク質に関する構造値を比較して、第 1 のタンパク質と別のタンパク質の免疫原性ランク付けを決定する工程。いくつかの好ましい実施態様においてペプセットは約 15 アミノ酸長のペプチドを含み、一方、特に好ましい実施態様において、各ペプチドは隣接ペプチドと約 3 アミノ酸重複する。しかしながら、ペプセット内のペプチドを特定の長さまたは重複に制限する意図のものではなく、その他のペプチド長及び重複量でも本発明で使用できる。

10

#### 【 0 0 1 8 】

いくつかの実施態様において、最も低い構造値を有するタンパク質はより高い構造値を有するタンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付けされる。別の実施態様において、少なくとも 2 つのタンパク質を酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体、構造タンパク質及び結合タンパク質からなる群より選択する。さらに別の実施態様において、第 1 のタンパク質に対する陽性反応は約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数を含む。さらに他の実施態様において、別のタンパク質に対する陽性反応は約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数を含む。さらに別の実施態様において、第 1 のタンパク質に対する陽性反応は約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数であり、別のタンパク質に対する陽性反応は約 2 . 7 ~ 約 3 . 2 の刺激指数を含む。いくつかの実施態様において、工程 ( d ) の T 細胞増殖は約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じるが、別の実施態様において、工程 ( e ) の T 細胞増殖は約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる。さらに別の実施態様において、工程 ( d ) の T 細胞増殖は約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じ、かつ工程 ( e ) の T 細胞増殖は約 2 . 9 5 以上の刺激指数を生じる。特に好ましい実施態様において、少なくとも 1 の別のヒト血液源を工程 ( b ) で用いる。いくつかの特に好ましい実施態様において、各ヒト血液源とタンパク質に関して得られる構造値を比較する。本発明はバックグラウンド反応比率及びその構造値の両方に基づいてタンパク質を分類する手段も提供する。従って、別の実施態様において、分析されるタンパク質はバックグラウンド反応比率及びその構造値に従って分類及び / またはランク付けされる。

20

30

#### 【 0 0 1 9 】

本発明は 2 つのタンパク質の相対免疫原性をランク付けする方法も提供し、ここで、第 2 のタンパク質は第 1 のタンパク質のタンパク質変異体であり、以下の工程を含む : ( a ) 第 1 のタンパク質から第 1 のペプセットを調製し、第 2 のタンパク質から第 2 のペプセットを調製する工程 ; ( b ) 単一のヒト血液源から樹状細胞を含む溶液及びナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞溶液を得る工程 ; ( c ) 樹状細胞を分化させて、分化樹状細胞溶液を生成する工程 ; ( d ) 分化樹状細胞溶液とナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞と第 1 のペプセットを混合する工程 ; ( e ) 分化樹状細胞溶液とナイーブ CD 4 + 及び / または CD 8 + T 細胞と第 2 のペプセットを混合する工程 ; ( f ) 工程 ( d ) 及び ( e ) における T 細胞の増殖を測定して、第 1 及び第 2 のペプセットにおける各ペプチドに対する反応を測定する工程 ; ( g ) 第 1 のタンパク質及び第 2 のタンパク質に関する工程 ( f ) の T 細胞の反応を編集する工程 ; ( h ) 第 1 のタンパク質及び第 2 のタンパク質に関する工程 ( g ) の編集した反応の構造値を決定する工程 ; ( i ) 第 1 のタンパク質に関して得られた構造値と第 2 のタンパク質に関する構造値を比較して、第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質の免疫原性ランク付けを決定する工程。いくつかの実施態様において、第 2 のタンパク質は第 1 のタンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付

40

50

けされ、一方、他の実施態様において、第1のタンパク質は第2のタンパク質よりも免疫原性が低いものとしてランク付けされる。いくつかの好ましい実施態様において、ペプセットは約15アミノ酸長のペプチドを含み、一方、特に好ましい実施態様において、各ペプチドは隣接ペプチドと約3アミノ酸重複している。しかしながら、ペプセット内のペプチドを特定の長さまたは重複に制限する意図のものではなく、その他のペプチド長及び重複量でも本発明で使用できる。別の実施態様において、第1及び第2のタンパク質は酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体、構造タンパク質、及び結合タンパク質からなる群より選択される。さらに別の実施態様において、第1のタンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2の刺激指数を含み、一方、他の実施態様において、第2のタンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2の刺激指数を含む。別の実施態様において、第1のタンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2の刺激指数を含み、かつ第2のタンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2の刺激指数を含む。さらに別の実施態様において、工程(d)のT細胞の増殖は約2.95以上の刺激指数を生じ、工程(e)のT細胞の増殖は約2.95以上の刺激指数を生じる。いくつかの特に好ましい実施態様において、少なくとも1の別のヒト血液源が工程(b)で用いられる。いくつかの特に好ましい実施態様において、各ヒト血液源及びタンパク質から得られた構造値を比較する。いくつかの実施態様において、第2のタンパク質は第1のタンパク質における少なくとも1の顕著な領域の減少を含む。さらに別の実施態様において、工程(e)のT細胞の増殖はバックグラウンドレベルである。いくつかの特に好ましい実施態様において、各ヒト血液源及びタンパク質から得られた構造値を比較する。本発明はバックグラウンド反応比率及びその構造値の両方に基づいてタンパク質を分類する手段も提供する。従って、いくつかの実施態様において、分析されるタンパク質はそのバックグラウンド反応比率及び構造値に従い分類及び/またはランク付けされる。

#### 【0020】

本発明は第1のタンパク質及び少なくとも1の変異体タンパク質の相対免疫原性をランク付けする方法も提供し、以下の工程を含む：(a)第1のタンパク質から第1のペプセットを調製し、各変異体タンパク質からペプセットを調製する工程；(b)単一のヒト血液源から樹状細胞を含む溶液及びナイーブCD4+及び/またはCD8+T細胞溶液を得る工程；(c)樹状細胞を分化させて、分化樹状細胞溶液を生成する工程；(d)分化樹状細胞溶液とナイーブCD4+及び/またはCD8+T細胞と第1のペプセットを混合する工程；(e)分化樹状細胞溶液とナイーブCD4+及び/またはCD8+T細胞と各変異体タンパク質から調製した各ペプセットを混合する工程；(f)工程(d)及び(e)におけるT細胞の増殖を測定して、第1及び第2のペプセットにおける各ペプチドに対する反応を測定する工程；(g)第1のタンパク質及び変異体タンパク質に関する工程(f)のT細胞の反応を編集する工程；(h)第1のタンパク質及び変異体タンパク質に関する工程(g)の編集した反応の構造値を決定する工程；及び(i)第1のタンパク質に関して得られた構造値と変異体タンパク質に関する構造値を比較して、第1のタンパク質と変異体タンパク質の免疫原性ランク付けを決定する工程。いくつかの好ましい実施態様において、ペプセットは約15アミノ酸長のペプチドを含み、一方、特に好ましい実施態様において、各ペプチドは隣接ペプチドと約3アミノ酸重複している。しかしながら、ペプセット内のペプチドを特定の長さまたは重複に制限する意図のものではなく、その他のペプチド長及び重複量でも本発明で使用できる。いくつかの好ましい実施態様において、変異体タンパク質のうち少なくとも1つは第1のタンパク質より免疫原性が低いものとしてランク付けされ、一方、他の実施態様において、第1のタンパク質は変異体タンパク質のうち少なくとも1つよりも免疫原性が低いものとしてランク付けされる。別の実施態様において、第1及び変異体タンパク質は酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体、構造タンパク質、及び結合タンパク質からなる群より選択される。さらに別の実施態様において、第1のタンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2の刺激指数を含み、一方、他の実施態様において、変異体タンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2の刺激指数を含む。別の実施態様において、第1のタンパク質に対する陽性反応は約2.7~約3.2

の刺激指数を含み、かつ変異体タンパク質に対する陽性反応は約 2.7 ~ 約 3.2 の刺激指数を含む。さらに別の実施態様において、工程 (d) の T 細胞の増殖は約 2.95 以上の刺激指数を生じ、工程 (e) の T 細胞の増殖は約 2.95 以上の刺激指数を生じる。いくつかの特に好ましい実施態様において、少なくとも 1 の別のヒト血液源が工程 (b) で用いられる。いくつかの特に好ましい実施態様において、各ヒト血液源及びタンパク質から得られた構造値を比較する。いくつかの実施態様において、変異体タンパク質は第 1 のタンパク質における少なくとも 1 の顕著な領域の減少を含む。さらに別の実施態様において、工程 (e) の T 細胞の増殖はバックグラウンドレベルである。いくつかの特に好ましい実施態様において、各ヒト血液源及びタンパク質から得られた構造値を比較する。さらに別の実施態様において、少なくとも 1 の別のヒト血液源を工程 (b) で用いる。本発明はバックグラウンド反応比率及びその構造値の両方に基づいてタンパク質を分類する手段も提供する。従って、いくつかの実施態様において、分析されるタンパク質はそのバックグラウンド反応比率及び構造値に従い分類及び/またはランク付けされる。

10

20

30

#### 【0021】

本発明はさらに試験タンパク質に対する試験集団の免疫反応を測定する方法を提供し、以下の工程を含む：(a) 試験タンパク質からペプセットを調製する工程；(b) ヒト樹状細胞を含む複数の溶液及びナイーブヒト CD4+ 及び/または CD8+ T 細胞の複数の溶液を得る工程であって、ここでヒト樹状細胞の溶液及びナイーブヒト CD4+ 及び/または CD8+ T 細胞の溶液は試験集団内で複数の個体から得られる；(c) 樹状細胞を分化させて、複数の分化樹状細胞を含む溶液を生成する工程；(d) 複数の分化樹状細胞溶液及びナイーブ CD4+ 及び/または CD8+ T 細胞溶液とペプセットを混合する工程であって、ここで分化樹状細胞の各溶液とナイーブ CD4+ 及び/または CD8+ T 細胞溶液は混合した試験集団内で個々から得られる；(e) 工程 (d) における T 細胞の増殖を測定して、ペプセットにおける各ペプチドに対する反応を測定する工程；(g) 試験タンパク質に関する工程 (e) の T 細胞の反応を編集する工程；(h) 試験タンパク質に関する工程 (g) の編集した反応の構造値を決定する工程；及び (i) 試験タンパク質に対する複数の個人の被曝レベルを測定する工程。いくつかの好ましい実施態様において、ペプセットは約 15 アミノ酸長のペプチドを含み、一方、特に好ましい実施態様において、各ペプチドは隣接ペプチドと約 3 アミノ酸重複している。しかしながら、ペプセット内のペプチドを特定の長さまたは重複に制限する意図のものではなく、その他のペプチド長及び重複量でも本発明で使用できる。いくつかの実施態様において、少なくとも 2 つの試験タンパク質を試験した。いくつかの好ましい実施態様において、複数の個体の試験タンパク質に対する被曝レベルを比較する。いくつかの特に好ましい実施態様において、試験タンパク質は試験集団において減少した免疫原性反応を示す変異体タンパク質を生成するように修飾される。本発明はバックグラウンド反応比率及びその構造値の両方に基づいてタンパク質を分類する手段も提供する。従って、いくつかの実施態様において、分析されるタンパク質はそのバックグラウンド反応比率及び構造値に従い分類及び/またはランク付けされる。

#### 【0022】

##### 発明の説明

本発明は集団の免疫反応プロファイルを評価するための手段を提供する。特に、本発明はヒト集団の免疫反応を定性評価する手段を提供し、目的のタンパク質に対する免疫反応を分析する。本発明はさらにそれらの相対免疫原性に基づいてタンパク質をランク付けする手段を提供する。さらに、本発明は種々の用途での使用のために免疫原性が減少したタンパク質を生成するための手段を提供する。

40

#### 【0023】

本発明は、ヒト集団に基づく CD4+ T 細胞エピトープの同定に関する *ex vivo* 技術を提供する。目的のタンパク質に前もって感作させたドナー集団内で、全てのリコールエピトープを明確にできる。目的のタンパク質に感作していないとされたドナー集団は主要な、または相互反応性のエピトープが同定される。後者は正式に除外できるものでは

50

ないが、多数の点で見つかったエピトープが主要エピトープであるという結論をサポートする。まず、工業的タンパク質において見つかったエピトープは *in vitro* 結合分析において低  $IC_{50}$  値を有する大きく乱雑な結合剤である。リコール反応は、最も高い結合値に狭められるというよりも、長時間にわたる低閾値により特徴付けられる (Hesse et al., *J. Immunol.*, 167:1353-1361 [2001] を参照)。第2に、合計リコールエピトープの小集団は推定上の非感作ドナーを用いた場合、常に見られる。これは主要な、免疫優性エピトープの特徴である (Muraro et al., *J. Immunol.*, 164:5474-5481 [2000]; Vanderlugt, *Nat. Rev. Immunol.*, 2:85-95 [2002]; Vanderlugt, *J. Immunol.*, 164:670-678 [2000]; 及び Yin et al., *J. Immunol.*, 26:2063-2068 [1998] を参照)。第3に、 $\alpha$ -2ミクログロブリンを3アミノ酸で補正した15マーペプチドのセットとして試験し、顕著なエピトープ反応が見られなかった52のペプチドグループを示した。これらの配列はその他のタンパク質において相互反応性配列ではないと考えられる。第4に、エピトープがヒト由来のタンパク質にある配列と相互反応性である場合、1の試験した細菌性酵素タンパク質に関するケースと同様に、病原因子が見られ、エピトープペプチドに対する反応比率は非常に高く(30%)、実施例7で試験したその他の10の工業的酵素で照合される反応よりもかなり高い(データは示していない)。第5に、本発明の I-MUNE (登録商標) 分析システムは反応性細胞を濃縮した CD4+T細胞及び APCとして活性化単球由来樹状細胞を用いて実施する。観測された増殖反応の重要性は非常に小さく、抗原特異性 CD4+T細胞の低前駆体頻度と一致する。リコール増殖反応は推定上の非感作集団において検出される反応よりもかなり堅調なものとして検出された。最終的に、BLAST調査をエピトープ配列を用いて行った。パチルス由来タンパク質に関して、パチルス種は同定されたエピトープ配列内に変異を有するプロテアーゼ変異体を含む。しかしながら、ドナープールはこれら、またはその他のパチルスセリンプロテアーゼ(上述の著しい相互反応性例)に感作されないと考えられる。興味深いことに、BPN'Y217Lにおいてアミノ酸70~84エピトープ領域は推定ヒト由来 ATP依存 RNAヘリカーゼにおける領域に対して相同性(66%相同性)がある (Imamura et al., *Nucl. Acids Res.*, 26:2063-2068 [1998] を参照)。このような広く発現したハウスキーピング遺伝子に対する相同性は相互反応性応答を引き起こすというよりもむしろ耐性を引き起こすことが予想される。

#### 【0024】

バックグラウンド率は集団データを分析する際に重要な検討材料である。バックグラウンド率はエピトープペプチドに陽性反応を蓄積すること、及び2.95SI切り捨て値に達するランダム事象の両方が寄与する。低レベルのランダムに蓄積した陽性反応はヒトドナーにおける CD4+T細胞の増殖状態の不均一性を反映する (Asquith et al., *Trends Immunol.*, 23:595-601 [2002] を参照)。バックグラウンドは切り捨て反応値を上げることにより人工的に減少させることができるが、測定可能なバックグラウンド率を有することで非ランダム法で反応頻度が蓄積する場合の測定を可能とする。例えば、HPV16 E6に対するバックグラウンド反応率は、工業的酵素の率よりも著しく高く、地域ドナー集団における HPV16感染の高い流行率を反映しているようである (Lazcano-Ponce et al., *Int'l J. Cancer* 91:412-420 [2001]; 及び Stone et al., *J. Infect. Dis.*, 186:1396-1402 [2002])。同じ状況はスタフィロキナーゼにも起こり得る。

#### 【0025】

全ての変量が I-MUNE (登録商標) 分析システムに含まれるにも関わらず、エピトープ反応頻度に関する変動係数(CV)が非常に良かった(4つの試験ペプチドの平均が20%)。このレベルの再現性は、研究室内及びドナー相互の繰り返し試験の主要な ELISPOTデータ、類似 *ex vivo* 分析で報告された変数値の係数と比較して優れて

いる (Keilhoz et al., J. Immunother., 25: 97-138 [2002]; 及び Asai et al., Clin. Diag. Lab Immunol., 7: 145-154 [2000])。通常、CV値はエピトープペプチドに対する反応比率が増加するにつれて下降する。さらに、頻度が減少した (通常、10%以下のドナー集団) 非エピトープペプチド反応は増加したCV値を有する。例えば、実施例7において、全体的なバックグラウンド率は3.15%であり、標準偏差が1.6%、CVが51%だった。

#### 【0026】

エピトープペプチドを定義する統計的方法は、当該集団が目的のタンパク質に対して提示 (presentation) を示す場合、異なる。増加したバックグラウンド反応はリコール反応において見られる機能的活性の減少した閾値に起因するようである (Hesse et al., supraを参照)。機能的活性の減少した閾値は本発明のI-MUNE (登録商標) 分析システムにより、より多くのエピトープを検出する。I-MUNE (登録商標) 分析システムの比較は感作ドナーから、I-MUNE (登録商標) 分析データにおける顕著なエピトープ反応がクローンCD4+ T細胞株により定義されるエピトープ反応を配列したことを示すデータを生じる。統計的方法のストリンジェンシーレベルを減少させることにより、I-MUNE (登録商標) 分析システム内のエピトープペプチドの選択は公表されているエピトープ配列に一致した。非常に低いバックグラウンド率を有するデータセット、例えば工業的酵素データなどにおけるエピトープ状態の指定はよりストリンジェントであった。バックグラウンド反応が非常に低い場合、多くのペプチドは、減少したストリンジェンシー測定を用いるが、全体的な反応頻度が非常に低く、再生が難しい場合、切り捨て値に合う反応を蓄積する。一般的に、反応が全体集団の10%以下の場合、100以上のドナーを試験することが技術的に困難であるので、再生が難しくなる。重要なエピトープ反応は、エピトープ反応が外れ値である場合、頻度データから容易に推定される。非感作ドナーにおけるエピトープペプチド配列は、新たに増殖を誘導できる堅い結合乱雑 (promiscuous) エピトープを反映するようである (Viola and Lanzavecchi, Science 273: 104-106 [1996]; 及び Rachmilewitz and Lanzacchia, Trends Immunol., 23: 592-595 [2002])。これは、in vitroペプチド結合研究により2つの工業的酵素において指定されるエピトープペプチドに関して確認された (実施例7を参照)。

#### 【0027】

本発明のI-MUNE (登録商標) 分析システムはヒト 2-ミクログロブリンにおけるエピトープは同定しなかった。この結果は本発明のI-MUNE (登録商標) 分析システムとアルゴリズムベースのHLAクラスII結合予測方法との違いを強調する。ペプチド結合アルゴリズムはインターネットを通して無料で利用可能であり、当業界に公知であり、この配列におけるクラスII結合エピトープを予測する。しかしながら、ここに示す結果により実証されるように、クラスII分子への結合は必ずしも機能的エピトープの存在を示すとは限らない。HLAクラスIIへの結合はT細胞エピトープの特定に必須だが、十分ではない。これは予測方法の公知の特性であり、従って、これらの方法は機能的試験を用いて補うことが多い。しかしながら、本発明はこの情報をより直接的に得る方法を提供する。

#### 【0028】

ここに記載するエピトープ決定は集団に基づいて明確にするということは重要である。顕著なエピトープはある程度のレベルのHLA特異性を示すことが多いが、エピトープペプチドはそれらの乱雑なHLA結合能力により主として明確にされる。このため、これらのエピトープは基底型 (スーパータイプ) 結合剤のようであり、従って、低免疫原性タンパク質を探す場合、優れた修飾のための候補を示す。しかしながら、集団に基づく分析に起因して、参考のためにこれらの結果を用いて作成された低免疫原性タンパク質は必ずしも全ての別個の事例において非免疫原性であるわけではないと考えられる。それにもかか

ならず、集団に基づいてT細胞エピトープを明確にすることは、病原菌に対する免疫反応の同定に有用である (Novitsky et al., J. Virol., 76: 10155 - 10168 [2002]; 及び Pathan et al., J. Immunol., 167: 5217 - 5225 [2001] を参照)。このような研究の1つの目的は有効なワクチンを設計することであり、乱雑な基底型結合剤を含めることも保証される。興味深いことに、これらの研究の1つに示されるデータ (Pathan et al., supra) をここで定義する被曝ドナー方法により分析した場合、同じセットの優性エピトープ反応が選択された (データは示していない)。

#### 【0029】

感染症設定及びタンパク質分析における有用性に加え、本発明の方法は目的のタンパク質において機能的CD4+ T細胞エピトープの場所を特定する手段を提供する。ドナー集団が目的のタンパク質に曝露されていないと考えられる場合、バックグラウンド反応率は低く、ストリンジェント統計はCD4+エピトープ配列の選択に適用できる。興味深いことに、ヒトタンパク質は非常に低いバックグラウンド反応を有する。高バックグラウンドレベルは目的のタンパク質へのドナー被曝に相当し、エピトープ決定はストリンジェント基準にほとんど依存しない。エピトープの指定は感作が確認されたドナーに関する結果と比較することにより立証されてきた。上述の通り、ヒト - 2ミクログロブリンにおいてエピトープは見つからず、当該免疫系において耐性を表した偏在的に発現するタンパク質であることが予測される。従って、本発明のI-MUNE (登録商標) 分析システムは集団に基づいたCD4+ T細胞エピトープを予測するための有用な手段を提供するものである。この技術の用途としては、低免疫原性タンパク質変異体の作成、エピトープベースのワクチンを作成するためのエピトープ領域の選択、及び全ての市販タンパク質のリスク評価において手段として含めることを含む。

#### 【0030】

実際に、本発明はCD4+ T細胞の感作の可能性を減少させる手段を提供する。これは以前に潜在的な市販タンパク質またはヒト及びその他の動物による使用を目的としたその他のタンパク質に曝露されたことのない標的集団において特に有用である。実際に、低アレルギー性/免疫原性市販タンパク質変異体の作成に加え、T細胞エピトープ同定は多くのワクチン方針の基盤となる (Alexander et al., Immunol. Res., 18: 79 - 2 [1998]; 及び Berzofsky, Ann. N. Y. Acad. Sci., 690: 256 - 264 [1993])。病原体を認識しない個人に対して病原体を除去する個人により認識されるT細胞エピトープの同定は癌及びウイルス性ワクチン両方の設計にとって重要である (Manici et al., J. Exp. Med., 189: 871 - 87 [1999]; Doolan et al., J. Immunol., 165: 1123 - 1137; 及び Novitsky et al., J. Virol., 76: 10155 - 10168 [2002])。また、低アレルギー性/免疫原性タンパク質の有用性はパーソナルケア、健康ケア及びホームケア環境並びに商業用途に関して明らかである。実際、そのような低アレルギー性/免疫原性タンパク質は無数の環境及び用途において有用である。

#### 【0031】

CD4+ T細胞エピトープ修飾タンパク質の生成に関して、第1の重要な工程はタンパク質内の機能的エピトープの位置測定である。HLAクラスII分子に結合するペプチド配列の位置測定を予測するための、多数のコンピューターベースの方法がある (Yuet al., Mol. Med., 8: 137 - 148 [2002]; Rammensee et al., Immunogenet., 50: 213 - 219 [1990]; Sturniolo et al., Nat. Biotechnol., 17: 555 - 561 [1999]; 及び Altuvia et al., J. Mol. Biol., 249: 244 - 250 [1995])。CD4+ T細胞活性のために、HLAへの結合は必須だが十分ではない。最適には、機能性を確認するために *in vitro* 及び *in vivo* 試験を行わなければならない。コンピューターベースの方法は堅いHLA結合を

10

20

30

40

50

正確に同定するための能力は改善するが、非HLA-D RクラスII分子の結合に関する予測ができず、及び大きく誤ったマイナス率が依然としてある。さらに、耐性誘導、及び活性T細胞により反応差を誘導するエピトープなどの機能的違いはコンピューターモデルを用いて評価できない。

#### 【0032】

従って、本発明はCD4+ T細胞エピトープ修飾タンパク質を評価する方法の機能性を同定及び確認するためのこれまで利用できなかった手段を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、免疫優性、目的のタンパク質由来の乱雑HLAクラスIIエピトープの位置測定のための*in vitro*のヒト細胞に基づく方法を提供する。本方法は、病原体由来タンパク質及びその他の目的タンパク質に対する集団に基づいたエピトープ反応の描写に対して行うのと同様に、工業的酵素、食物アレルゲン及びヒト治療タンパク質に十分に適用される。好ましい実施態様において、大ドナーセットはHLA型を前もって選択しないで試験する。エピトープ測定はタンパク質配列由来の全ペプチドに対するドナーセット全体により反応速度の統計的分析に基づいて行い、従って、集団に基づいたエピトープを表す。ここに示すように、本発明の方法はドナー集団が被曝されたタンパク質とドナー集団が以前に接触したことがない、または感作されていないタンパク質を識別できる。本発明の開発において、両タイプの分析を抗原感作が確認されたドナーからの増殖結果と比較した。さらに、ヒト2-ミクログロブリンを陰性対照として試験及び確認した。

10

#### 【0033】

ここで言及するように、エピトープペプチドはバックグラウンド反応率との違いにより示される。エピトープペプチド反応は再生可能であり、複数のランダムドナーセットにおいて試験した場合、変動係数の中央値が21%である。さらに、ここにさらに詳細に記載するように、本発明のI-MUNE（登録商標）分析システムはタンパク質スタフィロキナーゼのリコールエピトープを同定し、及び全リコールエピトープの小集団を示す工業的プロテアーゼにおいて免疫優性乱雑エピトープを同定した。さらに、I-MUNE（登録商標）分析システムは陰性対照（すなわち、ヒト2-ミクログロブリン）においてエピトープを発見しなかった。重要なことに、本発明は、HLAクラスII型を前もって選択しないで、任意のタンパク質における機能的CD4+ T細胞エピトープを同定するための手段を提供し、ドナー集団が目的タンパク質に前もって曝露されているかどうかを示唆し、*in vitro*試験のための感作ドナーを必要としない。

20

30

#### 【0034】

本発明の開発において、ヒトドナー大プールにおけるペプチド特異反応の統計的分析を使用することにより、マウスとモルモット曝露モデルの両方により測定された順番で4つの工業的酵素をランク付ける測定基準を提供した。当該ランク付け方法は職業被曝労働者におけるヒト感作率にも勝るものであった。本発明の方法はヒトにおいて感作を引き起こすことが公知のタンパク質に関する構造値に基づいても追加的に確認された。これらの結果の比較は、感作レベルがヒト2-ミクログロブリンに関して測定された値より高かったことを示した。好ましい実施態様において、本発明は、ヒトにおいて関連する及び関連しない種々のタンパク質の免疫原性を予測するための比較法を提供する。従って、本発明により提供される情報はタンパク質治療の早期開発及び減少された免疫原性変異体を選択または作成するためのその他のタンパク質ベースの用途に有用である。

40

#### 【0035】

##### 定義

ここで特に別に定義しない限り、ここで使用する全ての技術及び科学的用語はこの発明が属する分野の通常の技術を有する者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。例えば、Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第2版、John Wiley and Sons, NY (1994); 及びHale and Marham, The Harper Collins Dictionary o

50

f *Biology, Harper Perennial, NY (1991)* は当業者にとってここで用いる用語の多くの一般的な辞書となるものである。ここに記載した方法及び物質に類似または同等のものは本発明の実施に用いることができるが、好ましい方法及び物質についてここに記載する。従って、下記に定義される用語は本明細書の全体を参照することによりさらに詳細に説明される。

【0036】

ここで、“集団”の語は所定の領域に関する及び/または属する複数の個体をいう。いくつかの実施態様において、該語は共通の特徴を共有する多数の個体に関して用いる（例えば、特定のHLA型を有する集団等）。該語は好ましい実施態様においてヒト集団に関して用いるが、ヒトに制限するものではなく、その他の動物及び生物に関するも用いることができる。いくつかの実施態様において、該語は例えば、サンプルを採取する事項、特徴、個体等の全体集合に関して用いる。

10

【0037】

ここで用いる“集団に基づいた免疫反応”の語は集団のメンバーの免疫反応プロファイル（すなわち、特徴）をいう。

【0038】

ここで用いる“免疫反応”の語は、免疫原に対する生物（例えば、ヒトまたはその他の動物）により開始される免疫学的反応をいう。該語は全てのタイプの免疫反応を包含することを意図し、限定されないが、体液（すなわち、抗体媒介性）、細胞及び非特異免疫反応を含む。いくつかの実施態様において、該語は集団の免疫レベルを反映する（すなわち、特定の抗原に“免疫された”人々の数、及び/または特定の抗原に“免疫されていない”人々の数）。

20

【0039】

ここで用いる“減少された免疫原性”の語は、最初の野生型（例えば、母体または供給源）タンパク質と比較して、変異体（例えば、誘導体）タンパク質を用いて観測される免疫反応が減少していることをいう。本発明の好ましい実施態様において、供給源タンパク質と比較して、*in vitro*及び/または*in vivo*であまり堅調でない免疫反応を刺激する変異体タンパク質を提供する。減少した免疫原性を有するこれらのタンパク質は種々の用途での使用が考えられ、限定されないが、バイオ製品、タンパク質治療、食品及び飼料、パーソナルケア、洗剤及びその他の消費者関連製品、及びその他の治療管理、診断等を含む。

30

【0040】

ここで用いる“高められた免疫原性”の語は、原型の野生型（例えば、母体または供給源）タンパク質と比較して、変異体（例えば、誘導体）タンパク質を用いて観測される免疫反応が増加していることをいう。本発明の好ましい実施態様において、供給源タンパク質と比較して、*in vitro*及び/または*in vivo*でより堅調な免疫反応を刺激する変異体タンパク質を提供する。高められた免疫原性を有するこれらのタンパク質は種々の用途での使用が考えられ、限定されないが、バイオ製品、タンパク質治療、食品及び飼料添加剤及びその他の消費者関連製品、及びその他の治療管理、診断等を含む。

【0041】

ここで用いる“アレルギー性食品タンパク質”とは、ヒト及びその他の動物においてアレルギー反応を引き起こす原因となる食品タンパク質をいう。“推定アレルギー性食品タンパク質”はアレルギー性の可能性がある食品タンパク質である。“減少したアレルギー性を有する食品タンパク質”とは原形の、非修飾タンパク質よりもアレルギー性が少なくなるように（すなわち“低アレルギー性”）修飾された食品タンパク質である。これらの語は天然食品タンパク質及び合成的に及び/または組換え技術を用いて生成した食品タンパク質を含む。

40

【0042】

ここで用いる“変化した免疫反応”とは、増加または減少した免疫反応をいう。タンパク質及びペプチドは、それらが引き起こすT細胞及び/またはB細胞反応が母体（例えば

50

、前駆体)タンパク質またはペプチド(例えば、目的のタンパク質)により引き起こされたものより大きい場合、“増加した免疫反応”を示す。この高い反応の最終結果は変異体タンパク質またはペプチドに対する直接の増加した抗体反応である。タンパク質及びペプチドはそれらが引き起こすT細胞及び/またはB細胞反応が母体(例えば、前駆体)タンパク質またはペプチドにより引き起こされたものより少ない場合、“減少した免疫反応”を示す。この低い反応の最終結果は変異体タンパク質またはペプチドに対する直接の減少した抗体反応である。いくつかの好ましい実施態様において、母体タンパク質は野生型タンパク質またはペプチドである。

#### 【0043】

ここで用いる“刺激指数”(SI)は対照と比較したペプチドのT細胞増殖反応の指標をいう。SIは、CD4+T細胞及びペプチドを含んだ樹状細胞培養物を試験して得た平均CPM(カウント毎分)を、樹状細胞及びペプチドを含まないCD4+T細胞を含んだ対照培養物の平均CPMで割ることにより計算される。この値は各ドナー及び各ペプチドについて計算する。いくつかの実施態様において、約1.5~4.5のSI値を用いて陽性反応を示すが、陽性反応を示すための好ましいSI値は2.5~3.5であり、好ましくは2.7~3.2を含み、より好ましくは2.9~3.1を含む。ここに記載する最も好ましい実施態様は2.95のSI値を用いる。

10

#### 【0044】

ここで用いる“データセット”の語は、1組のペプチドの編集データ、及び各試験タンパク質(すなわち、目的タンパク質)に対する反応を試験するための1組のドナーの編集データをいう。

20

#### 【0045】

ここで用いる、“ペプセット”の語は各試験タンパク質(すなわち、目的タンパク質)のために生成したペプチドのセットをいう。ペプセット(または“ペプチドセット”)におけるこれらのペプチドは各ドナー由来の細胞を用いて試験する。

#### 【0046】

ここで用いる、“構造”及び“構造値”の語はタンパク質の相対免疫原性をランク付けするための値をいう。該構造値は下記式“均等までの全変動距離”に従い決定する：

#### 【数1】

$$\sum \left| f(i) - \frac{1}{p} \right|$$

30

#### 【0047】

ここで、(大文字シグマ)は各ペプチドに対する反応頻度の絶対値から該セットにおけるペプチドの頻度を引いた合計である；f(i)は個々のペプチドに関する反応頻度として定義される；及びpはペプチドセットにおけるペプチドの数である。本発明の好ましい実施態様において、構造値は試験した各タンパク質について決定する。得られた構造値に基づいて、試験タンパク質を一連の試験タンパク質の中で最も低い値から最も高い値にランク付けする。このランク付けの連続において、最も低い値は最も免疫原性が少ないタンパク質を示し、最も高い値は免疫原性が最も高いタンパク質を示す。

40

#### 【0048】

構造値は試験したドナーの数(すなわち、異なる個体から得た血液サンプルの数)に依存する。通常、データセット全体にわたるゼロ反応は1.0の構造値を与える。各ペプチドでの同じ数の反応は構造値ゼロに戻る。従って、好ましい実施態様において、ペプチドセットはデータセットの大半にわたって反応があるまで、特定ペプチド及びペプチド領域への感度を正確に反映するためにデータの順番で、試験すべきである。特に好ましい実施態様において、データセットの全ペプチドに対して反応がある。しかしながら、いくつか

50

のデータセットは種々の因子（例えば、不溶性の問題）に起因してデータセットにおいて全てのペプチドに対しては反応を示さない。

【0049】

上述の式は構造値を決定するための使用に好ましい式であるが、その他の等式は本発明で使用できる。例えば、“分布エントロピー”式は本発明で使用でき、その他種々の式が当業者に公知である。

【0050】

いくつかの実施態様において、ペプチドセットは少なくともドナーが全体的に3%の非特異反応率を与えるペプチド当たり生じる反応の数と同じ数のドナーを用いて試験する。例えば、好ましい実施態様において、88ペプチドのペプチドセットは最小で30のドナーを用いて試験する。従って、より多くのペプチドを含むペプチドセットの実施態様において、ドナーの数はそれに従って調節する。とはいえ、30のドナーが好ましい最小の数である。もちろん、ペプチドセット内に存在するペプチドがより少ない場合であっても、本発明の方法を用いてより多くのドナーを試験できる。いくつかの好ましい実施態様において、データセットは、良いHLA対立遺伝子発現を得るために、少なくとも50ドナーを含む。

10

【0051】

ここで用いる“顕著な反応”とは、約2.0倍バックグラウンド反応率より大きいデータセット内で*in vitro*でT細胞反応率を生じるペプチドをいう。別の実施態様において、反応はバックグラウンド反応率より約2.0倍～約5.0倍増加する。また、この語はバックグラウンド反応率より約2.5～3.5倍増加、約2.8～3.2倍増加及び2.9～3.1倍増加を示す反応を含む。例えば、本発明の開発において、顕著な反応はペプチドのいくつかについて顕著であった。

20

【0052】

ここで用いる“顕著な領域”とは、バックグラウンド反応率より約2.0倍大きい特定のペプチドセットを用いて得られるI-MUNE（登録商標）分析反応をいう。本発明の1の実施態様において、タンパク質の全顕著な領域は、それらの本発明のI-MUNE（登録商標）分析システムにおける反応が減少されるように減少させる。さらに別の実施態様において、顕著な領域の数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上減少し、好ましくは1～5の顕著な領域が関連タンパク質において減少される。いくつかの実施態様において、顕著な領域もT細胞エピトープの要件に合う。

30

【0053】

ここで用いる“サンプル”の語はその最も広い意味において用いる。しかしながら、好ましい実施態様において、該語は、分析、同定、修飾及び/またはその他のペプチドと比較されるペプチド（例えば、ペプチドセット内のペプチド、目的タンパク質の配列を含む）を含むサンプル（例えば、アリコート）に関して用いる。従って、ほとんどの場合において、この語は目的のタンパク質またはペプチドを含む物質に関して用いる。

【0054】

ここで用いる“バックグラウンドレベル”及び“バックグラウンド反応”とは任意の試験タンパク質のデータセットにおける所定のペプチドに対する反応者の平均比率である。この値は該セットにおける全ペプチドに関する反応者比率を平均することにより測定し、試験ドナー全てに関して編集される。例として、3%バックグラウンド反応は100のドナーについて試験した場合、データセットにおいて任意のペプチドに関して平均して3つの陽性（SIが2.95以上）反応があるであろうことを示す。

40

【0055】

ここで用いる、“抗原提示細胞（APC）”とは、その表面に抗原を提示し、抗原がT細胞の表面上の受容体により認識されるようにする免疫系の細胞をいう。抗原提示細胞は、限定されないが、樹状細胞、相互連結細胞、活性化B細胞及びマクロファージを含む。

【0056】

ここで用いる、“Tリンパ球”及び“T細胞”とは、T細胞前駆体（再配列されていないT細胞受容体遺伝子を有するThy1陽性細胞など）由来のTリンパ球系統から成熟T

50

細胞（すなわち、CD4またはCD8シングルポジティブ、表面TCR陽性細胞）内の細胞を包含する。

【0057】

ここで用いる、“Bリンパ球”及び“B細胞”とは、プレ細胞（Ig重鎖遺伝子を配列し始めるB220<sup>+</sup>細胞）などのB細胞前駆体由来のB細胞系列から成熟B細胞及び形質細胞内の細胞を包含する。

【0058】

ここで用いる“CD4<sup>+</sup>T細胞”及び“CD4 T細胞”とは、ヘルパーT細胞をいい、一方“CD8<sup>+</sup>T細胞”及び“CD8 T細胞”とは細胞障害性T細胞をいう。

【0059】

ここで用いる“B細胞増殖”とは、抗原の存在の有無に関わらず、抗原提示細胞を用いたB細胞の培養時に生成されたB細胞の数をいう。

【0060】

ここで用いる“基準B細胞増殖”とは、ペプチドまたはタンパク質抗原が存在しない中で、抗原提示細胞に曝露された個体反応において通常見られるB細胞増殖の程度をいう。本目的において、基準B細胞増殖レベルは抗原の不存在下、B細胞増殖として各個人に関して各サンプルに基づき測定される。

【0061】

ここで用いる“B細胞エピトープ”とは、抗原を含むペプチド（すなわち、免疫原）に対する免疫反応においてB細胞受容体により認識される、ペプチドまたはタンパク質の特徴をいう。

【0062】

ここで用いる、“変化したB細胞エピトープ”とは、前駆体ペプチドまたは目的ペプチドとは異なり、目的の変異体ペプチドがヒトまたはその他の動物において異なる（すなわち、変化した）免疫反応を生じるエピトープアミノ酸配列をいう。変化した免疫反応は変化した免疫原性及び/またはアレルギー性を含むと考える（すなわち、増加または減少した全体的な免疫反応）。いくつかの実施態様において、変化したB細胞エピトープは同定エピトープ内の残基から選択されたアミノ酸の置換及び/または欠失を含む。別の実施態様において、変化したB細胞エピトープはエピトープ内に1以上の残基の付加を含む。

【0063】

ここで用いる“T細胞増殖”とは、抗原の有無に関わらず、抗原提示細胞を用いたT細胞培養時に生成されたT細胞の数をいう。

【0064】

ここで用いる“基準T細胞増殖”とは、ペプチドまたはタンパク質抗原が存在しない中で、抗原提示細胞に曝露された個体反応において通常見られるT細胞増殖の程度をいう。本目的において、基準T細胞増殖レベルは抗原の不存在下、抗原提示細胞に反応したT細胞増殖として各個人に関して各サンプルに基づき測定される。

【0065】

ここで用いる“T細胞エピトープ”とは、抗原を含むペプチド（すなわち、免疫原）に対する免疫反応の開始においてT細胞受容体により認識される、ペプチドまたはタンパク質の特徴をいう。本発明を特定のメカニズムに限定する趣旨ではないが、T細胞によるT細胞エピトープの認識はT細胞が、抗原提示細胞上で発現するクラスIまたはクラスII MHC（すなわち、HLA）分子に結合する抗原のペプチド断片を認識するメカニズムによるものと一般的に考えられている（例えば、Moeller, Immunol. Rev., 98: 187 [1987]を参照）。

【0066】

ここで用いる、“変化したT細胞エピトープ”とは、前駆体ペプチドまたは目的ペプチドとは異なり、目的の変異体ペプチドがヒトまたはその他の動物において異なる免疫反応を生じるエピトープアミノ酸配列をいう。変化した免疫反応は変化した免疫原性及び/またはアレルギー性を含むと考える（すなわち、増加または減少した全体的な免疫反応）。

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様において、変化した T 細胞エピトープは同定エピトープ内の残基から選択されたアミノ酸の置換及び/または欠失を含む。別の実施態様において、変化した T 細胞エピトープはエピトープ内に 1 以上の残基の付加を含む。

#### 【0067】

ここで用いる、“目的タンパク質”とは、分析、同定及び/または修飾されるタンパク質（例えば、プロテアーゼ）をいう。天然及び組換えタンパク質は本発明で使用できる。実際、本発明はヒト（またはその他の動物）の免疫反応を特徴付ける及び/または調節するために望ましいタンパク質を用いることができる。いくつかの実施態様において、ホルモン、サイトカイン、抗体、酵素、構造タンパク質及び結合タンパク質などのタンパク質が本発明で使用できる。いくつかの実施態様において、ホルモンは、限定されないが、インスリン、エリスロポエチン（EPO）、スロモポエチン（Thromopoietin）（TPO）及び黄体形成ホルモン（LH）などが本発明で使用できる。さらに別の実施態様において、サイトカインは限定されないが、インターフェロン（例えば、IFN-及びIFN-）、インターロイキン（例えば、IL-1~IL-15）、腫瘍壊死因子（例えば、TNF-及びTNF-）、及びGM-CSFなどが本発明で使用できる。さらに別の実施態様において、抗体（すなわち、免疫グロブリン）は、限定されないが、ヒト及びヒト化抗体、任意のクラスの抗体由来断片（例えば、一本鎖抗体）などが本発明で使用できる。さらに別の実施態様において、構造タンパク質、限定されないが、食物アレルギー（例えば、Ber e 1 [ブラジルナッツアレルギー]及びAra H 1 [ピーナッツアレルギー]）などが本発明で使用できる。別の実施態様において、タンパク質は工業的及び/または薬剤酵素である。いくつかの実施態様において、酵素の好ましいクラスは、限定されないが、プロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、アミラーゼ、フェノールオキシダーゼ、オキシダーゼ、パーミアゼ、プルナーゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ラクタマーゼ及びレダクターゼなどがある。

10

20

#### 【0068】

ここで用いる“タンパク質”とは、アミノ酸からなり、当業者によりタンパク質として認識される任意の組成物をいう。“タンパク質”、“ペプチド”及びポリペプチドの語はここでは交換可能に用いられる。ペプチドはタンパク質の一部であり、当業者であれば本文中の該語の使用は当然理解する。“タンパク質”の語は成熟型タンパク質及びプロ及びプレプロ型の関連タンパク質を包含する。プレプロ型のタンパク質は、タンパク質のアミノ末端に作動可能に連結するプロ配列、及びプロ配列のアミノ末端に作動可能に連結する“プレ”または“シグナル”配列を有する成熟型のタンパク質を含む。

30

#### 【0069】

ここで用いる“野生型”及び“天然”タンパク質は天然に見られるタンパク質である。“野生型配列”及び“野生型遺伝子”の語はここで交換可能に用いられ、宿主細胞において天然または元からある配列をいう。いくつかの実施態様において、野生型配列はタンパク質工学プロジェクトの出発点である目的の配列をいう。

#### 【0070】

ここで用いる“プロテアーゼ”とは天然プロテアーゼ及び組換えプロテアーゼをいう。プロテアーゼは一般的に、タンパク質またはペプチドのペプチド結合を切断する働きを有するカルボニルヒドロラーゼである。天然プロテアーゼは、限定されないが、-アミノアシルペプチドヒドロラーゼ、ペプチジルアミノ酸ヒドロラーゼ、アシルアミノヒドロラーゼ、セリンカルボキシペプチダーゼ、メタロカルボキシペプチダーゼ、チオールプロテイナーゼ、カルボキシルプロテイナーゼ及びメタロプロテイナーゼなどの例を含む。セリン、メタロ、チオール及び酸プロテアーゼはエンド及びエキソプロテアーゼもまた含まれる。実際、いくつかの好ましい実施態様において、キモトリプシン及びズブチリシンなどのセリンプロテアーゼは使用できる。これらのセリンプロテアーゼの両方は、アスパラギン酸、ヒスチジン及びセリンを含む触媒の三点セットを有する。ズブチリシンプロテアーゼにおいて、カルボキシ末端から読むこれらのアミノ酸の相対オーダーはアスパラギン酸-ヒスチジン-セリンであり、一方、キモトリプシンプロテアーゼにおいて、カルボキシ

40

50

末端から読むこれらのアミノ酸の相対オーダーはヒスチジン - アルパラギン酸 - セリンである。ズブチリシンは通常、細菌、真菌または酵母源から得られるが、ここで用いる“ズブチリシン”とは、上に定義したズブチリシンプロテアーゼの触媒三点セットを有するセリンプロテアーゼをいう。さらに、ヒトズブチリシンはズブチリシン触媒活性を有するヒト起源のタンパク質であり、例えば、ヒト由来プロテアーゼのケキシファミリーである。ズブチリシンは当業界に公知であり、例えば、パチルス・アミロリケファシエンスズブチリシン (BPN')、パチルス・レントスズブチリシン、パチルス・ズブチリスズブチリシン、パチルス・リケニフォルミスズブチリシン (例えば、米国特許第4,760,025号 (RE34,606)、米国特許第5,204,015号、米国特許第5,185,258号、EP0 328 299、及びWO 89/06279を参照)。

10

## 【0071】

ここで用いる、機能的に類似のタンパク質は“関連タンパク質”とみなす。いくつかの実施態様において、これらのタンパク質は異なる属及び/または種 (例えば、B. スブチリスズブチリシン及びB. レントスズブチリシン) に由来し、生物の分類間の違いを含む (例えば、細菌性ズブチリシンと真菌性ズブチリシン)。別の実施態様において、関連タンパク質は同じ種から得られる。実際、本発明はいかなる供給源由来の関連タンパク質にも限定するものではない。

## 【0072】

ここで用いる、“誘導体”の語は、前駆体タンパク質 (例えば、天然プロテアーゼ) に1以上のアミノ酸をC及び/またはN末端に付加、1以上のアミノ酸をアミノ酸配列中の1以上の異なる部位で置換、及び/またはタンパク質の末端またはアミノ酸配列中の1以上の部位で1以上のアミノ酸が欠失、及び/またはアミノ酸配列中の1以上の部位で1以上のアミノ酸を挿入することにより得られたタンパク質 (例えば、プロテアーゼ) をいう。プロテアーゼ誘導体の調製は好ましくは、天然タンパク質をエンコードするDNA配列を修飾し、DNA配列を適当な宿主に形質転換、及び修飾DNA配列を発現させて誘導体プロテアーゼを形成させることにより達成される。

20

## 【0073】

関連 (及び誘導体) タンパク質の1の種類としては“変異体タンパク質”がある。好ましい実施態様において、変異体タンパク質は親タンパク質と異なり、お互い少数のアミノ酸残基が異なる。アミノ酸残基の違いの数は1以上であり、好ましくは、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50以上のアミノ酸残基である。1の好ましい実施態様において、変異体間の異なるアミノ酸の数は1~10である。特に好ましい実施態様において、関連タンパク質及び特に変異体タンパク質は少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%アミノ酸配列同一性を含む。さらに、ここで用いる関連タンパク質または変異体タンパク質は顕著な領域の数が他の関連タンパク質または親タンパク質とは異なるタンパク質をいう。例えば、いくつかの実施態様において、変異体タンパク質は、親タンパク質とは異なる1、2、3、4、5または10の対応する顕著な領域を有する。1の実施態様において、変異体の顕著な対応領域はバックグランドレベルの免疫反応しか生じない。

30

## 【0074】

ここで用いる“対応する”とはタンパク質またはペプチドの列挙した位置での残基または他のタンパク質またはペプチドの列挙した残基に類似、相同または同等である残基をいう。

40

## 【0075】

ここで用いる“対応領域”とは通常、関連タンパク質または親タンパク質内の類似位置をいう。

## 【0076】

ここで用いる、“類似配列”とは、目的タンパク質と類似の機能、三次構造及び/または保存残基を与えるタンパク質内の配列をいう。特に好ましい実施態様において、類似配列はエピトープの、またはその近くの配列を含む。例えば、ヘリックスまたはシート

50

構造を含むエピトープ領域において、類似配列内の置換アミノ酸は好ましくは同じ特異構造を維持する。

【0077】

ここで用いる“相同タンパク質”とは、目的タンパク質（例えば、プロテアーゼ）と類似の触媒作用、構造、抗原性及び/または免疫反応を有するタンパク質（例えば、プロテアーゼ）をいう。目的の相同体及びタンパク質（例えば、プロテアーゼ）は必ずしも進化に関連することは意図されない。従って、該語は異なる種から得られた同じ機能的タンパク質を包含するものである。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質に類似の三次及び/または一次構造を有する相同体を同定することは、相同体と類似断片を有する目的タンパク質におけるエピトープの置換が変化による破壊を減少させるので、望ましい。従って、ほとんどの場合において、相同体に近いタンパク質はエピトープ置換の最も望ましい供給源となる。もしくは、所定のタンパク質のヒト類似体に目を向けることは有益である。

10

【0078】

ここで用いる“相同性遺伝子”とは、異なるが通常関連する種由来の少なくとも遺伝子の対をいい、お互い対応し、お互い同一または非常に類似したものとなっている。該語は種形成（すなわち、新しい種の発達）により分離された遺伝子（例えば、オーソログ遺伝子）及び遺伝子重複により分離された遺伝子（例えば、）を包含する。

【0079】

ここで用いる“オーソログ”及び“オーソログ遺伝子”とは、種形成により共通の祖先の遺伝子（すなわち、相同性遺伝子）から進化した、異なる種における遺伝子をいう。通常、オーソログは進化の過程において同じ機能を保有する。オーソログの同定は新しく配列決定されたゲノムの遺伝子機能について信頼性のある予測を行うために使用できる。

20

【0080】

ここで用いる、“パラログ”及び“パラログ遺伝子”とはゲノム内の重複により関連する遺伝子をいう。オーソログは進化の過程において同じ機能を保有するが、パラログは、同じ機能が元々の遺伝子に関連することが多くても、新しい機能を発展させる。パラログ遺伝子の例としては、限定されないが、トリプシン、キモトリプシン、エラストラーゼ及びトロンピンをエンコードする遺伝子などがあり、これらは全てセリンプロテイナーゼであり、同じ種内で一緒に起こる。

30

【0081】

配列間の相同性の程度は当業界に公知の適当な方法を用いて決定できる（例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482 [1981]; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443 [1970]; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 [1988]; Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, マディソン, ウィスコンシン州) のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTAなどのプログラム; 及びDevereux et al., Nucl. Acid Res., 12: 387-395 [1984]を参照)。

40

【0082】

例えば、PILEUPは配列相同性レベルを決定するのに有用なプログラムである。PILEUPは、進行性、対合アラインメントを用いて関連配列のグループから複数の配列アラインメントを作成する。また、当該アラインメントを作成するために用いる集積性関係を示す系図をプロットできる。PILEUPはFengとDoolittleの進行性アラインメント法の簡略化を用いる（Feng and Doolittle, J. Mol. Evol., 35: 351-360 [1987]）。当該方法はHigginsとSharpにより説明された方法と類似している（Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-153 [1989]）。有用なPILEUPパラメーターは、初期設定ギャップウェイト3.00、初期設定ギャップ長さウェイト0.10及び加重

50

ウェイトギャップを含む。有用なアルゴリズムの他の例としては、Altschul et al. により説明されるBLASTアルゴリズムである(Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, [1990]; 及びKarlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993])。特に有用なBLASTプログラムはWU-BLAST-2プログラムである(Altschul et al., Meth. Enzymol., 266:460-480 [1996]を参照)。パラメーター“W”、“T”及び“X”はアラインメントの感度及び速度を決定する。BLASTプログラムは初期設定として、語長(W)が11、BLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]を参照)アラインメント(B)として50、期待値(E)として10、M'5、N'-4及び両ストランドの比較を用いる。

【0083】

ここで用いる“核酸配列同一性比率(%)”とは、当該配列のヌクレオチド残基と同一である、候補配列におけるヌクレオチド残基の比率として定義される。

【0084】

ここで用いる“ハイブリダイゼーション”の語は核酸ストランドが塩基対合により相補的ストランドに結合するプロセスをいい、当業界に公知である。

【0085】

ここで用いる“最大ストリンジェンシー”とは、約 $T_m - 5$  (プローブの $T_m$ より5低い)で通常起こるハイブリダイゼーションのレベルをいい、“高ストリンジェンシー”は $T_m$ より約5 ~ 10 低く、“中ストリンジェンシー”は $T_m$ より約10 ~ 20 低く、及び“低ストリンジェンシー”は $T_m$ より約20 ~ 25 低い。当業者に理解されるように、最大ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは同一のポリヌクレオチド配列を同定または検出するために使用でき、中または低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションはポリヌクレオチド配列相同体を同定または検出するために使用できる。

【0086】

いくつかの実施態様において、“同等残基”とは、前駆体タンパク質(すなわち目的タンパク質)の三次構造レベルで相同性を決定することにより定義され、その三次構造はX線結晶学により決定される。同等残基は前駆体タンパク質及びその他のタンパク質の特定アミノ酸残基の2以上の主鎖原子の原子座標が配列後0.13 nm及び好ましくは0.1 nm内であるものとして定義される。配列はベストモデルに合わせ、タンパク質の非水素タンパク質原子の原子座標が最大重複を与えるようにランク付けした後に達成される。ほとんどの実施態様において、ベストモデルは、利用可能な最高解像度での実験回折データに関して最も低いR因子を与える結晶モデルである。

【0087】

いくつかの実施態様において、修飾は好ましくは前駆体酵素のアミノ酸配列をエンコードする“前駆体DNA配列”に対して行うが、別の実施態様において、前駆体タンパク質を操作することにより行う。保存されていない残基の場合、1以上のアミノ酸の置換は天然に見られる配列に一致しないアミノ酸配列を有する変異体を生成する置換に限定される。保存残基の場合、当該置換は天然配列を生じないはずである。本発明により提供される誘導体はさらにプロテアーゼの特徴を変化させる化学修飾を含む。

【0088】

いくつかの好ましい実施態様において、タンパク質遺伝子は適当な発現プラスミド内に連結される。クローンタンパク質遺伝子はそれから宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトしてタンパク質遺伝子を発現するために用いる。このプラスミドは、プラスミド複製に必要な公知の要素を含むという意味で宿主において複製し、またはプラスミドは宿主染色体中に統合するために設計される。必須要素が効率的な遺伝子発現のために提供される(例えば、目的遺伝子に作動可能に連結するプロモーター)。いくつかの実施態様において、これらの必須要素は、認識される場合(すなわち、宿主により転写される場合)該

遺伝子自身の相同性プロモーター、外来性の転写ターミネーター（真核宿主細胞のポリアダニル化領域）として供給され、またはタンパク質遺伝子の内生ターミネーター領域により供給される。いくつかの実施態様において、抗菌剤含有培地中での成長により、プラスミド感染宿主細胞の連続培養持続を可能とする抗生物質耐性遺伝子などの選択遺伝子も含む。

**【0089】**

プロテアーゼを含む実施態様において、変異体プロテアーゼ活性はプロテアーゼと種々の市販基質（限定されないが、カゼイン、ケラチン、エラスチン及びコラーゲン）の相互作用を試験することにより目的プロテアーゼを用いて測定及び比較される。実際、プロテアーゼ活性は当業界に公知の適当な方法により決定される。プロテアーゼ活性を測定する典型的な分析としては、限定されないが、スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-paraニトロアニリド(SAAPFPNA)（引用）分析；及び2,4,6-トリニトベンゼン・スルホネートナトリウム塩(TNBS)分析がある。SAAPFPNA分析において、プロテアーゼはペプチドとp-ニトロアニリン間の結合を切断し、405nmで目に見える黄色吸収が得られる。TNBS呈色反応法において、当該分析は遊離アミノ基を含むポリペプチド中での基質の酵素的加水分解を測定する。これらのアミノ基はTNBSと反応して黄色複合体を形成する。従って、反応の呈色がより深くなると、より多くの活性が測定される。黄色呈色は当業界に公知の種々の分析器または分光光度計により測定できる。

10

**【0090】**

種々のプロテアーゼのその他の特徴は当業界に公知の方法により測定できる。典型的な特徴としては、限定されないが、熱安定性、アルカリ安定性及び種々の基質または緩衝液また生成物設計における特定プロテアーゼの安定性がある。

20

**【0091】**

ここに記載の酵素安定性分析手順と組み合わせた場合、ランダム突然変異により得られた変異は、酵素的活性を維持しながら増加または減少したアルカリまたは熱安定性を示すものが同定できる。

**【0092】**

アルカリ安定性は公知の手順またはここに記載の方法により測定できる。アルカリ安定性における実質的な変化は、前駆体タンパク質と比較した場合、変異体の酵素活性の半減期が少なくとも約5%またはそれ以上増加または減少（ほとんどの実施態様において、好ましくは増加）することにより証明される。

30

**【0093】**

熱安定性は公知の手順またはここに記載の方法により測定できる。熱安定性の実質的な変化は、比較的高温及び中性pHに曝露された場合前駆体タンパク質と比較して、変異体の触媒活性の半減期が少なくとも5%またはそれ以上増加または減少（ほとんどの実施態様において、好ましくは増加）することにより証明される。

**【0094】**

本発明のタンパク質変異体の多くは、パーソナルケアから工業生産に及ぶ多数の用途の種々の組成物を処方するのに有用である。例えば、多数の公知化合物は本発明のタンパク質変異体を含む洗剤組成物に有用な適した界面活性剤である。これらは非イオン性、陰イオン性、陽イオン性または両性イオン性洗剤を含む（例えば、米国特許第4,404,128号、米国特許第4,261,868号、及び米国特許第5,204,015号を参照）。従って、ここに記載するように特徴付けられる及び修飾されるタンパク質は種々の洗剤用途において使用できる。当業者であれば異なる処方が洗浄組成物として使用できることを知っている。通常の洗浄組成物に加え、本発明のタンパク質変異体は天然または野生型タンパク質が使用される目的においても使用できることは容易に理解される。従って、これらの変異体は例えば、パー状または液体石けん用途、食器用製剤、表面洗浄用途、コンタクトレンズ洗浄溶液及び/または製品、ペプチド加水分解、廃棄物処理、織物用途、タンパク質製品の溶融切断酵素等においても使用できる。例えば、本発明の変異体は減少

40

50

したアレルギー性に加え、洗剤組成物において高められた性能を含むことができる（前駆体と比べて）。実際に、本発明の変異体は特定の用途に限定されるものではない。ここで用いるように、“洗剤における高められた性能”とは、標準の洗浄サイクル後の通常評価により決定した、特定の酵素感受性のシミ（例えば、草または血液）の洗浄の増加として定義される。

**【0095】**

いくつかの実施態様において、本発明の方法により提供されたタンパク質、特に酵素は約0.01～約5重量%（好ましくは0.1%～0.5%）のレベルでpH6.5～12.0を有する公知の粉末及び液体洗剤に処方できる。いくつかの実施態様において、これらの洗剤洗浄組成物はさらに、プロテアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼまたは

10

**【0096】**

従来 of 洗浄組成物に追加したタンパク質はいかなる特別の用途限定を生じない。言い換えると、洗剤に適した温度及びpHはpHが上述の範囲内であり、温度が記載したタンパク質の変性温度以下である限り、本組成物に関しても適している。さらに、本発明のタンパク質は洗剤を含まなくても、さらに単独でまたはビルダー及び安定剤との組み合わせにおいても洗浄組成物に使用できる。

**【0097】**

1の実施態様において、本発明は本発明の種々のタンパク質を含む織物処理のための組成物を提供する。当該組成物は例えば、絹またはウールを処理するために用いることができる（例えば、RE216, 034; EP134, 267; 米国特許第4,533,359号及びEP344,259を参照）。いくつかの実施態様において、これらの変異体は当業界に公知の方法に従い、タンパク質分解活性に関してスクリーニングする。

20

**【0098】**

上述の通り、好ましい実施態様において、本発明のタンパク質は、前駆体DNAによりエンコードされる天然タンパク質と比較して、修飾された免疫反応を示す（例えば、抗原性及び/または免疫原性）。好ましい実施態様において、タンパク質（例えば、プロテアーゼ）は減少されたアレルギー性を示す。本発明のプロテアーゼの使用は大部分が、タンパク質の免疫特性について決定されることは当業者であれば容易に理解することである。例えば、減少した免疫反応を示すプロテアーゼは洗浄組成物に使用できる。ここに記載する1以上の効果的な量のプロテアーゼ変異体はタンパク質汚れの除去が必要な種々の表面洗浄に有用な組成物に使用できる。当該洗浄組成物は、塗装面のための洗浄組成物、織物洗浄洗剤組成物、食器洗い組成物、口内洗浄組成物及び入れ歯洗浄組成物を含む。

30

**【0099】**

本発明の方法に従いランク付けされ、減少したアレルギー性/免疫原性を有する効果的な量の1以上の関連及び/または変異体タンパク質は、爪及び髪などの角質物質に適用される種々の組成物において使用でき、限定されないが、ヘアスプレー組成物、ヘアシャンプー及び/またはコンディショニング組成物、育毛調節の目的に適用される組成物、及び脂漏症、皮膚炎及び/またはふけを処理する目的で髪及び頭皮に適用する組成物として有用である。

40

**【0100】**

別の実施態様において、ここに記載する効果的な量の1以上のプロテアーゼ変異体は皮膚または髪に対する局所的用途に適した組成物に含めて使用できる。これらの組成物はクリーム、ローション、ジェル等の形態とすることができ、水性組成物として処方してもよく、または水性連続相中の1以上の油相乳液として処方してもよい。

**【0101】**

さらに、減少したアレルギー性/免疫原性を有する関連及び/または変異体タンパク質はその他の用途にも使用でき、医薬用途、ドラッグデリバリー用途、及びその他のヘルスケア用途がある。

50

## 発明の詳細な説明

## 【0102】

本発明は集団の免疫反応プロファイルを評価するための手段を提供する。特に、本発明はヒト集団の免疫反応を定性評価する手段を提供し、ここで目的タンパク質に対する免疫反応を分析する。本発明はさらに相対免疫原性に基づいてタンパク質をランク付けする手段を提供する。さらに、本発明は種々の用途で使用するために減少した免疫原性を有するタンパク質を作成する手段を提供する。

## 【0103】

本発明は、目的タンパク質を表すペプチドのセットに対する個々のドナーの反応率を分析することにより、任意のタンパク質の全体的な免疫原性の可能性を評価する方法を提供する。これらの方法は関連タンパク質の免疫原性が最小の異性体を選択するために使用できる。さらに、これらの方法は減少した免疫原性を有する変異体タンパク質の開発を導くためにも使用できる。

10

## 【0104】

いくつかの好ましい実施態様において、集団に基づいた免疫反応プロファイルは減少した免疫原性を有するタンパク質を開発するこれらの方法において使用できる。さらに、本発明は特定集団が目的タンパク質に曝露されたかどうか、及び集団における個々間の免疫反応レベルを決定するための手段を提供する。この決定は、バイオ製品、食品及び飼料、タンパク質治療、パーソナルケア、ヘルスケア製品、洗剤及びその他の消費者関連商品などの用途に望ましい、変化した免疫原性特性を有するタンパク質の開発に有用な情報を提供

20

## 【0105】

本発明は集団の免疫反応を研究するための新規な手段を提供する。ここに示すように、ヒトへの投与のためのタンパク質に関する用途の潜在性の決定は現在のところ非ヒト動物モデルを活用している。さらに、アルゴリズムに基づいたT細胞エピトープ決定は本発明の使用により提供される必要な情報を提供しない。実際に、本発明は個人及び集団の免疫反応プロファイルを評価するための手段を提供し、タンパク質含有製品の合理的設計及び開発のために重要な情報を提供する。

## 【0106】

タンパク質のバックグラウンド反応及び構造値を分析することにより、目的タンパク質の免疫の“経歴”が集団に基づいて決定できる。高バックグラウンド反応は集団の以前の被曝を示す（すなわち、約4%以上の集団が試験タンパク質に対して免疫反応を示す）。高構造値は、タンパク質が高バックグラウンドを有する場合、低バックグラウンド値を有するタンパク質の潜在的な免疫原及び最近の、頻繁な“高品質”な免疫反応を示す。いくつかの実施態様において、“高品質”免疫反応は高レベルの免疫原、免疫原に対する堅調な免疫反応及び/または強い補助剤により増強された反応に起因して観測される。

30

## 【0107】

いくつかの実施態様において、高バックグラウンドを有する低構造値は徐々に弱まる免疫記憶反応、集団におけるまれな反応、外来性抗原により導入された耐性、及び/または多種多様なタンパク質に対する反応（すなわち、“徐々に弱まる”記憶反応により生成されるものでもある）を表す。通常の、非アレルギー性食品タンパク質はこの種類の反応プロファイルで表されると考えられる。さらに、低構造値及び低バックグラウンド反応を有するタンパク質は集団において記憶反応がない比較的、非免疫原性タンパク質及び/またはヒト集団が耐性化されたタンパク質を表す。いくつかの好ましい実施態様において、曝露が低バックグラウンドレベルを有するタンパク質は“低アレルギー性”を有するために修飾する（すなわち、ヒトまたはその他の動物に対する曝露において、免疫反応を誘導しないように、または低反応を誘導するように）。

40

## 【0108】

通常のドナー集団に接触していないタンパク質のバックグラウンド値を定めるために、I - M U N E（登録商標）分析をプロテアーゼ、アミラーゼ、ラッカーゼ及びキチナーゼ

50

などの11の工業的酵素について行った (Mathies, Tenside Surf. Det., 34: 450-454 [1997] を参照)。プロテアーゼの1つを2つの異なる構成で生成したペプチドを用いて2回試験した (PepSet versus purified peptides from Mimotopes)。ペプチドセット毎に試験したドナーの数は19~113と様々であった。各ペプチドセットにおけるペプチドの数は80~188と様々であった。反応を個々のペプチドの刺激指数 (S.I. またはSI) が2.95以上のとき、集計した。各ペプチドに反応する試験ドナーセットにおけるドナー比率を計算した。各試験タンパク質のペプチド毎の平均反応比率を計算し、試験したドナーの数に対してグラフに示す (図11を参照)。相関係数は  $R_2 = 0.86$  だった。相互関係の勾配は反応の平均蓄積率として3.01%を示す。従って、工業的タンパク質由来のペプチドを用いて試験した所定のドナーに関して、100のうち3つのペプチドの平均は陽性 (SI 2.95) 反応に戻る。この平均反応率はエピトープペプチド (下記参照) 及び非エピトープペプチドの両方を含む。

10

## 【0109】

バックグラウンド反応は完全なデータセット中のペプチド毎の反応比率を平均することによっても計算した。12の試験のバックグラウンド反応を平均して、当該値は  $3.15 \pm 0.45$  (平均  $\pm$  標準誤差) であり、相関関係トレンドラインの勾配により求めた値と一致する。

## 【0110】

本発明の開発において、タンパク質のグループを通常ヒト集団における被曝の推測に基づいて選択した。これらのタンパク質はヒトパピローマ・ウイルス (HPV) 株16及び株18 E6タンパク質、ブラジルナッツアレルギー Ber e1及びスタフィロキナーゼを含んだ。HPV16及び18は発癌性HPVウイルスの最も一般的な形態である。これらのウイルスへの曝露レベルは若い女性の断面解析に関して5%以上と見積もられている (Lazcano-Ponce et al., Intl. J. Cancer 91: 412-420 [2001]; Stone et al., J. Infect. Dis., 186: 1396-1402 [2002]; Goldsborough et al., Mol. Cell Probes 6: 451-457 [1992]; 及び Lorincz et al., Obstet. Gynecol., 79: 328-337 [1992])。この率は場所と年齢とともに変化する。ブラジルナッツアレルギーは1%未満の集団において起こるが、食物のブラジルナッツへの曝露は広範囲に及ぶ (Sicherer and Sampson, Curr. Opin. Pediatr., 12: 567-573 [2000])。さらに、ヒト末梢血液細胞培養物中のスタフィロキナーゼ特異T細胞反応率は年齢とともに増加し、若いドナーは30%が反応し、40歳を超えたドナーは70%以上が反応する (Warmerdam et al., J. Immunol., 168: 155-161 [2002])。これらの4つのタンパク質に対するペプチドセットは地域コミュニティ血液バンクからのサンプルを用いて試験した。これらの4つ全てのタンパク質に対するバックグラウンド反応は11の工業的酵素に見られる平均反応よりも高かった。これは、図11から、11の工業的酵素から得たデータに基づいた予測値と比較して、高い全体的なバックグラウンド反応比率として、及びペプチド毎の高い反応頻度の両方として示される。HPV18 E6及びスタフィロキナーゼに対するバックグラウンド反応は著しく高かった。この結果はドナープールにおけるこれらのタンパク質に対する推測曝露率と一致する。HPV16 E6及びBer e1に対するバックグラウンド反応は工業的タンパク質平均よりも高かったが、著しい違いはなかった。工業的タンパク質値と比較したバックグラウンド値の増加は、振幅を増加し、所定のタンパク質に対する全体的な反応の数及び複雑性を増加させるドナー集団におけるCD4+記憶反応の寄与によるものである (Kuhns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12711-12716 [2000]; Muraro et al., J. Immunol., 164: 5474-5481 [2000]; 及び Vandergugt and Miller, Nat. Rev. Immunol., 2: 85-9

20

30

40

50

5 [ 2 0 0 2 ] )。従って、高いバックグラウンド率は試験タンパク質に対する高いレベルの感作を表す。しかしながら、本発明はこれらのタンパク質に関する全体的な反応に関して特定のメカニズムに限定されるものではない。ここに記載するタンパク質に関して、我々のドナー集団はHPV16 E6及びスタフィロキナーゼに対して著しく被曝され、HPV18 E6及びBer e1に対してはほとんど被曝されないと結論付けることができる。Ber e1及びHPV18 E6に対するバックグラウンド反応はタンパク質への曝露を示唆するが、HPV16 E6またはスタフィロキナーゼのレベルでは示唆しない。

#### 【0111】

これらのタンパク質に加えて、ヒトタンパク質を表すペプチドセットも本発明の開発において試験した。これらのタンパク質はインターフェロン- (IFN-)、免疫反応時に広く発現されるサイトカイン、トロンボポエチン(TPO)、骨髄に発現が制限されるサイトカイン、及び溶解性組換えサイトカイン受容体分子(腫瘍壊死因子受容体-1; TNF-R1)を含んだ。これらのタンパク質の4つ全てに対するバックグラウンド反応は工業的酵素バックグラウンドデータに類似しており、ドナーは、非曝露またはこれらのタンパク質に“ナイーブ”であるかのようにこれらのセットのペプチドに対して反応した。これらのデータはこれらの特定タンパク質に対する周辺耐性の無知のメカニズムと一致する。

10

#### 【0112】

別の実施態様において、試験タンパク質に関するT細胞及び/またはB細胞エピトープの評価を行う。さらに別の実施態様において、この評価は試験タンパク質の免疫原性/アレルギー性を減少させるために(すなわち、免疫原性が減少した変異体タンパク質を生成するために)当該エピトープを合理的に変化させるのに利用される。これらの変異体タンパク質はそれから、種々の用途で利用でき、限定されないが、バイオ製品、タンパク質治療、食品及び飼料、パーソナルケア、洗剤、及びその他の消費者関連製品並びにその他の治療管理、診断等を含む。

20

#### 【0113】

好ましい実施態様において、本方法は、抗原提示細胞、タンパク質の全体配列を包含する3アミノ酸で補正した15マーペプチド、及び樹上細胞ドナー由来のCD4+T細胞として樹状細胞を用いる。“陽性”反応は、特定ペプチドに関するトリチウム化チミジン結合の平均CPMがバックグラウンドCPMより2.95以上である場合、集計される。各ペプチドについての結果は、通常HLA対立遺伝子頻度(多少の変異あり)を反映すべき大ドナーセットに関して集計する。“線形性からの違い”の測定に基づく統計的計算を行い、この構造値はこれらのタンパク質の相対免疫原性をランク付けするために用いる。ここに示すように、本発明の方法を用いて得られたランク付け結果は免疫原性測定(すなわち、Sarilo [1997]、前述のMID分析によるもの)及び職業被曝労働者において(Sarilo、前述参照)またはGPITまたはMINT分析システム(Robinson、[1998]、前述参照)測定した場合の呼吸器系アレルギーとしてのこれらタンパク質のアレルギー性を綿密に反映する。

30

#### 【0114】

本発明の開発において、3つの公知の免疫原を含むタンパク質のセットに関する構造値は比較的高く、これらのタンパク質が多数の曝露された人々において免疫反応を誘導できるであろうことを示した。反対に、マウスVH36-60遺伝子ファミリーメンバーの構造値は低く、予測免疫原性に釣り合ったものであった(Olsson, J. Theor. Biol., 151:111-122 [1991]を参照)。最後に、2-ミクログロブリンの構造値は低く、この分子が周辺及び中心耐性メカニズムの両方を受けると推定すると、予測した通りであった(Guery et al., J. Immunol., 154:545-554 [1995]を参照)。

40

#### 【0115】

別の実験において、ここに記載するように、25の多様なタンパク質を試験した。これ

50

らのデータは本発明を立証するための骨組みを提供し、本発明をこれらの25のタンパク質に限定する趣旨のものではない。実際に、本発明は適当な目的集団における適当な目的タンパク質の分析において使用できる。上述の最初の実験を用いて、タンパク質をここに記載したI-MUNE(登録商標)分析システムで試験し、構造値を決定した。これらの25のタンパク質に関して、構造値及びバックグラウンド反応は、試験集団間で種々の目的の特性を有する4つのタンパク質の小集団を描いた。ここに記載するランク付け方法は低バックグラウンド反応を有するこれらのタンパク質について立証された。さらに、試験タンパク質の全ては高バックグラウンド反応を有するタンパク質と比較した。タンパク質の潜在的免疫原性をランク付けすることに加えて、これらの実施態様は、通常の集団が試験タンパク質に対して起こす免疫反応の種類に関する情報を提供する。

10

## 【0116】

本発明のI-MUNE(登録商標)分析システムで試験したタンパク質の比較免疫原性は、タンパク質が同じ投与量、同じ処方、対応したドナーセット及び同じ投与過程において*in vivo*で比較されることを推測する。この分析はタンパク質における任意の処理及び/または提示の違い、並びに通常の物理的及び構造的特性(すなわち安定性及び活性)を除外する。

## 【0117】

本発明は任意の目的タンパク質において、T細胞エピトープの位置測定を促進する方法を提供する。例えば、いくつかの好ましい実施態様において、CD4+T細胞エピトープは試験タンパク質に対して感作された個々を除外して測定する。従って、ペプチドエピトープの修飾は、減少した反応率がヒトにおいて効果的であることが予測されるように、感作ボランティアを必要とせず達成できる。いくつかの実施態様において、修飾ペプチド変異体へのドナー反応の分析は新しいタンパク質の構造値を計算するために使用する。例えば、図9に示すように、プロテアーゼ変異体は、親タンパク質と比較して、*in vitro*で著しく少ない増殖を引き起こす減少した構造値を有するように構築する。

20

## 【0118】

本発明はタンパク質の免疫原性を測定する明確な利点を提供する。本発明に対して、ヒトドナーの多数の複製を含む*in vitro*でより少ない反応を引き起こすことにより免疫原性が少なくなるように設計されたタンパク質変異体の試験はモルモットまたはマウスでは合理的に試験できない。トランスジェニックマウスは、通常1以上のHLA対立遺伝子を発現せず、発現する場合にも、正しい状況で発現しないことが多いという事実により、その実用性が制限される。

30

## 【0119】

タンパク質のランク付けは折りたたみの違いの可能性を示唆しないが、モルモットとマウスモデルにおける違いの可能性は不正確であり、研究所内及び実験内の変動の影響を受け易いことは有名であり、マウスにより変形される。実際に、動物、特にモルモットにおける有効測定はせいぜい主観的な科学である。現在のところ、有効性を決定するための信頼性のある方法はない。しかしながら、本発明は、動物実験から得られたデータを用いた本発明の方法を用いて測定したデータ配列に基づきデータを出すことにより有効測定を行うための手段を提供する。これらの有効値が構造値結果を標準化するために用いる動物データと同じ固有の不正確さを有しやすいという事実にも関わらず、本発明は免疫原性、特にヒトにおける免疫原性を評価及びタンパク質の免疫原性を減少させる最善の方法を決定するための非常に改善された手段を提供する。

40

## 【0120】

さらに、本発明は、被験体を目的タンパク質に曝露する必要性なしに、ヒト被験体(またはその他の動物)におけるタンパク質の相対免疫原性を測定するための手段を提供する。従って、測定を行うために個々を潜在的なアレルギー性/免疫原性物質に感作させる危険性がない。重要なことに、本発明はお互いを比較してタンパク質の免疫原性をランク付けする、及び集団の免疫反応プロファイルを評価するための手段を提供する。実際、本発明は免疫原性が減少したタンパク質を選択及び/または開発するための手段、及びタンバ

50

ク質の合理的な修飾を目的とした手段を提供し、ヒト及びその他の動物、特にヒトでの使用に適した低免疫原性変異体を作成及び試験する。

#### 【0121】

##### 実験

以下の実施例は特定の好ましい実施態様及び本発明の側面を説明するためのものであるが、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるものではない。

#### 【0122】

以下の実験的記載において、以下の省略形は、eq (同等物)、M (モル濃度)、 $\mu$ M (マイクロモル濃度)、N (通常)、mol (モル)、mmol (ミリモル)、 $\mu$ mol (マイクロモル)、nmol (ナノモル)、g (グラム)、mg (ミリグラム)、kg (キログラム)、 $\mu$ g (マイクログラム)、L (リットル)、ml (ミリリットル)、 $\mu$ l (マイクロリットル)、cm (センチメートル)、mm (ミリメートル)、 $\mu$ m (マイクロメートル)、nm (ナノメートル)、(摂氏温度)、h (時間)、min (分)、sec (秒)、msec (ミリ秒)、xg (時間比重 (times gravity)、Ci (Curies)、OD (光学密度)、Dulbecco's phosphate buffered solution (ダルベッコリン酸緩衝液) (DPBS)、HEPES (N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N-[2-エタンスルホン酸])、HBS (HEPES緩衝生理食塩水)、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、Tris-HCl (tris[ヒドロキシメチル]アミノメタン-塩酸塩)、Klenow (DNAポリメラーゼI大 (Klenow)断片)、rpm (1分当たりの回転数)、EGTA (エチレングリコール-bis(-アミノエチルエーテル)N,N,N',N'-テトラ酢酸)、EDTA (エチレンジアミンテトラ酢酸)、SPT+ (皮膚プリックテスト陽性)、SPT- (皮膚プリックテスト陰性)、ATCC (米国菌培養収集所、ロックビル、メリーランド州)、Cedar Lane (Cedar Lane Laboratories, オンタリオ、カナダ)、Gibco/Life Technologies (Gibco/Life Technologies、グランドアイランド、NY)、Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, ミズーリ州)、Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, ニュージャージー)、プロクター&ギャンブル (プロクター アンド ギャンブル、シンシナティ、OH)、ジェネンコー (ジェネンコー・インターナショナル、パロアルト、カリフォルニア)、Endogen (Endogen、ウォバートン、マサチューセッツ)、Cedarlane (Cedarlane、トロント、カナダ)、Dyna1 (Dyna1、ノルウェー)、Novo (Novo Industries A/S、コペンハーゲン、デンマーク)、Biosynthesis (Biosynthesis、ルイビル、テキサス)、TriLuc Beta (TriLuc Beta、Wallac、フィンランド)、DuPont/NEN (DuPont/NEN Research Products、ボストン、マサチューセッツ)、TomTec (ハムデン、コネチカット)及びStratagene (Stratagene、ラ・ホーヤ、カリフォルニア)である。

#### 【0123】

##### ペプチド

全てのペプチドは市販のものから得た (Mimotopes、サンディエゴ、カリフォルニア)。ここに記載したI-MUNE (登録商標)分析システムについて、目的のタンパク質の全体的な配列を記載した3アミノ酸で補正した15マーペプチドを複数ピン構成 (multipin format)で合成した (Maeki et al., J. Immunol. Meth., 134:23-33 [1990]を参照)。ペプチドを約1~2mg/mlでDMSO中で再懸濁させ、-70℃で使用する前に保存した。各ペプチドを少なくとも2回試験したが、小ペプチドセットに関しては (例えば、Berel)、ペプチドを定期的に3回試験した。各ペプチドに関する結果を平均し、刺激指数 (SI)を各ペプチドに関して計算した。

10

20

30

40

50

## 【0124】

## タンパク質配列

以下のよく性格付けられた工業的酵素由来のアミノ酸配列を試験し、本発明の方法を用いて順番にランク付けた。これらのタンパク質の配列はMedlineなどのデータベースから公に利用可能である。最も詳細にここに記載するタンパク質はB．レントスズブチリシン(Swissprotアクセッション番号P29600)、BPN' Y217L(Swissprotアクセッション番号P00782)、ALCALASE(登録商標)酵素(Swissprotアクセッション番号P00780)、及び -アミラーゼ(Swissprotアクセッション番号P06278)を含む。

## 【0125】

## ヒトドナー血液サンプル

ボランティアドナーのヒト血液軟膜サンプルを2つの商業的供給源から得た(Stanford Blood Center, パロアルト、カリフォルニア及びSacramento Medical Foundation, サクラメント、カリフォルニア)。軟膜サンプルをさらに濃度分離により精製した。各サンプルは、市販のPCRベースキットを用いて(Bio-Synthesis)HLA-DR及びHLA-DQに関してHLA型だった。ドナープールにおけるHLA-DR及びDQ発現を、北米基準から著しく異なるないように測定した(Mori et al., Transplant., 64:1017-1027[1997])。しかしながら、ドナープールはサンフランシスコ湾岸地帯に共通する民族性をわずかに濃縮した証拠をまさに示した。

## 【0126】

樹状細胞及びCD4<sup>+</sup>T細胞の調製

単球をAIM V培地中の樹脂に付着させることにより精製した(Gibco/Life Technologies)。接着細胞を500単位/mlの組換えヒトIL-4(Endogen)及び800単位/ml組換えヒトGM-CSF(Endogen)を含んだAIM V培地中で5日間培養した。5日目に、組換えヒトIL-1(Endogen)及び組換えヒトTNF-(Endogen)をそれぞれ50単位/ml及び0.2単位/ml加えた。7日目に、完全に成熟した樹状細胞を50µg/mlマイトマイシンC(Sigma)を用いて、1時間、37℃で処理した。処理した樹状細胞をPBS中50mM EDTAを用いて除去し、AIM V培地中で洗浄し、計算し、2×10<sup>5</sup>細胞/mlでAIM V培地中で再懸濁した。

## 【0127】

CD4<sup>+</sup>T細胞を、Celllect CD4カラム(Cedarlane)を用いてヒト末梢血単核細胞(PBMC)の冷凍アリコートから陰性選択することにより精製した。CD4<sup>+</sup>T細胞集団はトリパンブルー(Sigma)排除により判断して、定期的に80%以上純粋及び95%以上生存可能であった。CD4<sup>+</sup>T細胞を2×10<sup>6</sup>細胞/mlでAIM V培地中で再懸濁した。

## 【0128】

## I-MUNE(登録商標)分析条件

CD4<sup>+</sup>T細胞及び樹状細胞を丸底96ウェルフォーマットプレート中に100µlの各細胞混合物/ウェルでひいた。ペプチドを0.25~0.5% DMSO中、約5µg/mlの最終濃度になるように加えた。対照ウェルはペプチドを加えず、0.5%のDMSOを含んだ。各ペプチドを2回試験した。培養物を37℃、5%CO<sub>2</sub>、5日間で培養した。5日目に、0.5uCiのトリチウム化チミジン(NEN Dupont)を各ウェルに加えた。6日目に、培養物をTomTecマニュアルハーベスター(TomTec)を用いてガラス繊維マット上に集菌し、それからシンチレーション計数処理した。増殖を平均カウント毎分(CPM)値を2通りの各ウェルセット(Trilux Beta)について測定することにより評価した。この方法は、ここに引用するものとする米国特許第6,218,165号及びStickler et al., J. Immunother. 23:654-660(2000)にも記載されている。

10

20

30

40

50

## 【0129】

## データ分析

各個々の軟膜サンプルについて、全ペプチドの平均CPM値を分析した。各ペプチドの平均CPM値を対照(DMSOのみ)ウェルの平均CPM値で割り、“刺激指数”(SI)を測定した。ドナーを各ペプチドセットを用いて、ペプチド毎に少なくとも2つの反応の平均が蓄積するまで試験した。各タンパク質のデータはセット内の各ペプチドに対する反応者比率を示すグラフにした。陽性反応をSI値が2.95以上である場合、照合した。この値を正常集団分布中の3つの標準偏差の差異に近づくように選択した。評価する各タンパク質について、個々のドナーによる個々のペプチドに対する陽性反応を蓄積させた。所定のタンパク質に関するバックグラウンド反応を測定するために、当該セットにおける各ペプチドの反応者比率を平均し、標準偏差を計算した。各ドナーのSI値を各ペプチドセット及び記録された反応者比率について編集した。各ペプチドセットの平均バックグラウンド反応率を当該セットにおける全ペプチドの反応比率を平均することにより計算した。統計的有意性はデータセット内の各ペプチドに対する反応者の数のポアソン統計を用いて計算した。ここに記載したように異なる統計的方法を用いた。ペプチドに対する反応は、ペプチドに対するドナー反応の数が $p < 0.05$ のデータセットにより定義されたポアソン分布と異なる場合、有意であるとした。

10

## 【0130】

## ペプチド結合分析

上述のI-MUNE(登録商標)分析に加え、ペプチド結合分析も行った。本発明の開発において用いたペプチド結合分析は当業界に公知である(Southwood et al., J. Immunol., 160:3363-3373[1998])。要するに、HLA-DR及び-DQ分子をEBV形質転換細胞株のパネルから精製した。競合分析を明確な標準ペプチド及び未知のペプチドを用いて行った。50%の標準ペプチド結合と競合することが必要な未知のペプチド量はそれから決定した(IC<sub>50</sub>として示す)。

20

## 【0131】

## 統計的方法

ペプチド反応の統計的有意性をポアソン統計に基づいて計算した。反応者の平均頻度を反応の合計数及び当該セット中のペプチドの数に基づいてポアソン分布を計算するために用いた。反応は $p < 0.05$ の場合、有意であるとした。さらに、両者が正しいとする仮説を用いて両側生徒t-検定を行った。低バックグラウンド反応率を有するデータを用いるエピトープ測定に関して、保守的ポアソンベースの式を適用した：

30

## 【数2】

$$= 1 - e^{-n \left( 1 - \sum \frac{\lambda^x e^{-\lambda}}{x!} \right)}$$

40

## 【0132】

ここで、 $n$ はセット中のペプチドの数、 $x$ は目的ペプチドでの反応頻度、及び $\lambda$ はデータセット内の中央値反応頻度である。高バックグラウンド反応率を有するデータに基づいたエピトープ測定に関して、ほとんどストリンジェントでない以下のポワソンベース測定を用いた：

【数 3】

$$1 - \left( \sum_{i=0}^x \frac{\lambda^i e^{-\lambda}}{i!} \right)$$

【0133】

ここで、 $\lambda$  はデータセット内の中央値反応頻度、及び  $x$  は目的ペプチドでの反応頻度である。 10

【0134】

別の実施態様において、構造決定を以下の式に基づいて計算した：

【数 4】

$$\sum \left| f(i) - \frac{1}{p} \right|$$

20

【0135】

ここで、 $\Sigma$  (大文字シグマ) は各ペプチドに対する反応頻度の絶対値からセット内のペプチドの反応頻度を引いたものの合計であり、 $f(i)$  は個々のペプチドに関して反応頻度として定義されるものであり、及び  $p$  はペプチドセット内のペプチドの数である。

【0136】

この方程式は“構造値”に等しい、1～2の値に回帰する。0の値は結果が構築しなくても完全であることを示し、2.0の値は全構造が一箇所の周辺で高度に構築されているということを示す。値が2.0に近づくと、タンパク質はより免疫原性が高くなる。従って、低い値は免疫原性が低いタンパク質を示す。 30

【0137】

ドナープール内のHLA型

HLA-DR及びDQ型を特定エピトープペプチドに対する反応に関して分析した。1自由度のカイ二乗分析を有意性を決定するために用いた。対立遺伝子が反応者及び非反応者プールの両方に存在した場合、相対危険度を計算した。

【0138】

HLA-DRB1対立遺伝子発現を約185のランダムな個体に関して測定した。HLA型割り出しを低ストリンジェンシーPCR測定を用いて行った。PCR反応をメーカー(Bio-Synthesis)の指示通りに行った。スタンフォード及びサクラメントサンプルに関して編集されたデータは公表されている“Caucasian(白人)”HLA-DRB1頻度(Marsh et al., HLA Facts Book, The Academic Press, サンディエゴ、カリフォルニア[2000]、398頁、図1を参照)に匹敵した。これらの地域のドナー集団はHLA-DR4及びHLA-DR15に富んでいた。しかしながら、これらの集団のこれらの対立遺伝子の頻度は、十分にこれらの2つの対立遺伝子に関して報告されている範囲内である(HLA-DR4に関して5.2～24.8%、及びHLA-DR15に関して5.7～25.6%)。同様に、HLA-DR3、-DR7及びDR11に関して、頻度は平均Caucasian(白人)頻度よりも低い、それらの対立遺伝子に関して報告されている範囲内である。また、注目すべきことは、HLA-DR15はサンフランシスコ湾岸地帯で多く代表される民族集団において高い頻度で見られる。 40

50

## 【0139】

## 実施例 1

4つの公知の呼吸器系アレルゲンの編集結果

この実施例では、4つの公知の呼吸器系アレルゲンを試験するための、上述の本発明の I - M U N E (登録商標) 分析及び方法を用いて得た結果について説明する。

## 【0140】

## A. - アミラーゼ

これらの実験では、82の個体を - アミラーゼ配列から得たペプチドを用いて試験した。このセットにおけるペプチドに対するバックグラウンド反応は  $2.80 + / - 3.69\%$  であり、十分に、 $3.16 + / - 1.57$  の11の工業的酵素を用いて試験して得た 10 全体的な平均内であった(データは示していない)。顕著な反応は - アミラーゼのアミノ酸 34 - 48、160 - 174、及び 442 - 456 に注目した(図2を参照)。これらの反応3つ全てはバックグラウンド反応を上回る非常に有意性が高いものであった( $p < 0.0001$ )。

## 【0141】

## B. バチルス・レンタスズブチリシン

これらの実験では、65の個体をこのタンパク質の2つの複製ペプチドセットを用いて試験し、当該結果を編集した。このペプチドセットのバックグラウンドは  $3.45 + / - 2.90\%$  であったが、構築された範囲内であった。顕著な反応はアミノ酸 160 - 174 に注目した( $p = 0.0003$ ) (図3参照)。 20

## 【0142】

## C. B P N ' Y 2 1 7 L

これらの実験では、113の個体を2つのペプチドセットを用いて試験した。このデータセットの編集した平均は  $3.62\%$  であった。顕著な反応はアミノ酸 70 - 84 及び 109 - 123 に注目した(図4を参照)。反応の領域はアミノ酸 154 周辺にも注目した。

## 【0143】

## D. A L C A L A S E (登録商標) 酵素

これらの実験では、92の個体をこの酵素由来のペプチドを用いて試験した。このタンパク質に対するバックグラウンド反応は低かった( $2.35\%$ )。同じペプチドセットは 30 2つの時間的に間隔を空けた分析において試験し、当該データを編集した。さらにこのタンパク質のセット内でかなり多くの無反応のペプチドがあった。顕著な反応はアミノ酸番号 19 - 33 に注目した( $p < 0.0001$ ) (図5を参照)。

## 【0144】

## 実施例 2

## 構造計算

この実施例は4つの試験酵素に関して得られた構造値について説明する。構造値は試験ドナーの数に依存する。データセットのほとんどにわたるゼロ反応率は構造値  $\sim 1.0$  を生じる。各ペプチドでの同じ数の反応は構造値 0 を生じる。従って、特定のペプチド及びペプチド領域に反応して正確に反映するデータのために、大部分のデータセットにわたる 40 反応が蓄積するまでペプチドセットを試験することが重要である。構造値は水平状態のレベル(プラトーレベル)、通常ペプチド当たり 2 ~ 3 の反応、に達するまで試験ドナーの数が増加すると減少する(図6を参照)。水平状態(プラトー)構造値は構造値を比較するために使用しなければならない。

## 【0145】

各試験酵素に関して、データセット内の構造を計算するために編集反応を用いた。構造値は、表1に示すように、アミラーゼは  $0.81$ 、A L C A L A S E (登録商標) 酵素が  $0.72$ 、B . レンタスズブチリシンが  $0.64$ 、及び B P N ' Y 2 1 7 L が  $0.53$  だった。

【表 1】

表1. 4つの呼吸器系アレルゲンの構造測定

酵素	ペプチド	n	ペプチド当たりの反応	エピトープ領域の数	構造値
アミラーゼ	157	82	2.29	3	0.81
B. レンタスズブチリシン	86	65	2.24	1	0.64
ALCALASE®	88	92	2.16	1	0.72
BPNY217L	88	113	3.65	2	0.53

10

【0146】

これらの結果は、CD4+ T細胞活性がSIが2.95以上生じる増殖レベルにより測定された場合、その他のペプチドセットを用いて測定した活性と比較して、より多くの活性がアミラーゼペプチドセットにより導入される、ということを示す。BPN'Y217Lの結果はこのタンパク質配列由来のペプチドセットが最も活性が少なく、最も少ない構造量であることを示す。構造値は4つの試験タンパク質を以下の通り順序付ける：アミラーゼ > ALCALASE（登録商標）酵素 > B. レンタスズブチリシン > BPN'Y217L。

20

【0147】

実施例 3

動物モデルとの比較

上述の通り、2つの動物モデルを工業的タンパク質のアレルギー性及び免疫原性の予測のために用いた。従って、この実施例では、これらの2つの動物モデル間の比較及び本発明の方法について説明する。モルモット（GPIT）及びBDF1マウス（MINT）モデルの両方はタンパク質を以下のようにランク付ける：アミラーゼ > ALCALASE（登録商標）酵素 > B. レンタスズブチリシン > BPN'Y217L。しかしながら、相対値は異なる。図7はGPIT（パネルA）及びMINT（パネルB）潜在値に対してグラフに描いた構造値を示す。本発明の方法を用いて得たヒト細胞ベースの構造データは両方法との相関性を示す（R<sup>2</sup>値がそれぞれ0.86及び0.84）。

30

【0148】

実施例 4

別のタンパク質の構造値

この実施例では、別のタンパク質に関して得られた構造値について説明する。例えば、構造値をBer e 1（すなわち、ブラジルナッツに見られる主なアレルゲン）、ヒト・インターフェロン-（IFN-）、ヒト・トロンボポエチン（Tpo）、マウスVH 36-60ファミリーメンバー及びヒト 2-ミクログロブリンに関して計算した（表2を参照）。

40

【表 2】

表2. 他の選択したタンパク質の構造値

	ペプチド	n	平均バックグラウンド	ペプチド当たりの反応	エピトープ領域の数	構造値
hTpo	52	99	2.56	2.54	1	0.65
hIFN-B	52	88	3.17	2.79	1	0.75
Ber e 1	27	92	4.27	3.92	2	0.66
マウス Vh 36-60 ファミリー	35	74	7.0	5.23	0	0.38
B2- ミクログロブリン	36	87	3.9	3.39	0	0.39

10

## 【0149】

ヒトIFN-、Tpo及びBer e 1は全てヒトにおいて免疫反応を引き起こすことが知られている(Scagnolari et al., J. Interferon Cytokine Res., 22:207-213 [2002];及びSichere r and Sampson, Curr. Opin. Pediatr., 12:567-573 [2000];及びLi et al., Blood 98:3241-3248 [2001]を参照)。IFN-、Tpo及びBer e 1の構造値は全て比較的高い。マウスVH領域の値は比較的低く、このタンパク質が比較的非免疫原性であるということを示唆している。この結果はマウス重鎖ファミリーの潜在的免疫原性の構造分析に一致するものである(Olsson et al., [1991]、上述を参照)。さらに、B2-ミクログロブリンの結果は低く、この偏在的に発現するタンパク質に対する耐性誘導に一致するものである(Guery et al., [1995]上述)。

20

## 【0150】

## 実施例5

## 集団に基づいた免疫反応

30

この実施例では、集団を集団に基づいて免疫反応を評価するために行う実験について説明する。ドナー血液を上述の通り、スタンフォード及びサクラメントから得、この集団は上述のI-MUNE(登録商標)分析システムにおいて試験したこれらのドナー血液から得た一般的な米国サンプルの“白人”集団と統計的に異なる分布を有する。構造値を計算し、ペプチド当たり2以上の反応があった、I-MUNE(登録商標)分析において試験した全タンパク質に関して照合した。試験したタンパク質はBer e 1(ブラジルナツアレルゲン)、scFv(抗体の1本鎖V領域;VH及びVL断片)、BLA(-ラクタマーゼ)、IFN-B(インターフェロン-)、FNA(ズブチリシン-BPN'Y217L)、-アミラーゼ、E6(HPV株16、18、31及び33におけるヒト乳頭腫ウイルスE6タンパク質)、E7(HPV株16、18、31、33、45及び52におけるHPV E7タンパク質)、エグリン(リーチ(leech)プロテアーゼ阻害剤;GenBankアクセッション番号CAA25380)、RECK(ヒトプロテアーゼ阻害剤、実際に971アミノ酸RECKタンパク質内の小ドメイン[GenBankアクセッション番号NP\_066934]を試験した)、スタフィロキナーゼ、TPO(ヒトトロンボポエチン)、ecotin(大腸菌K12由来のセリンプロテアーゼ阻害剤;GenBankアクセッション番号NP\_416713);ALCALASE(登録商標)酵素、サビナーゼ、ヒト-2ミクログロブリン、sTNFR1(溶性腫瘍壊死因子受容体1)である。これらの実験の結果を表3に示す。この表で、データはペプセット内の各ペプチドに対してどれだけのドナーが反応したか(すなわちSI>2.95の増殖反応を開始したか)を示す。

40

50

【表 3】

表3. 結果

試験タンパク質	構造値	反応/ペプチド	バックグラウンド比率
Ber e 1	0.66	3.93	4.26
scFv	0.39	3.96	4.9
BLA	0.56	2.62	3.27
IFN-B	0.75	2.79	3.17
FNA	0.65	3.61	3.65
アミラーゼ	0.81	2.29	2.79
E6 16	0.72	3.92	7.12
18	0.79	2.32	4.23
31	0.53	3.26	4.66
33	0.68	1.97	2.83
E7 16	0.66	3.9	4.33
18	0.44	3.19	3.55
31	0.78	3.1	5.26
33	0.54	2.55	4.32
45	0.76	2.44	3.75
52	0.59	3.69	5.68
Eglin	0.43	4.9	5.57
RECK	0.39	4.1	4.64
スタフィロキナーゼ	0.44	4.48	6.22
Tpo	0.65	2.24	2.53
Ecotin	0.64	3.98	5.69
Alcalase	0.72	2.16	2.35
GG36	0.65	2.24	3.45
B-2 ミクログロブリン	0.39	3.38	3.9
sTNFR1	0.47	2.9	4.2

10

20

30

## 【0151】

4つの曝露領域及び免疫反応レベルを測定した。ズブチリシン10は相対構造値及びこれらのタンパク質に関するバックグラウンド比率を示すグラフを提供する。四分儀“1”は試験タンパク質に曝露されなかった集団における個々の数を反映し（1データポイント（ひし形）により表される）、一方、四分儀“2”は試験タンパク質に曝露された集団における個々の数を反映し、ここで当該曝露はより最近で、より頻繁及び/または質的により免疫原性であり、四分儀“3”は試験タンパク質に耐性を有した集団における個々の数及び/または試験タンパク質が非免疫原性である数を反映し、及び四分儀“4”は試験タンパク質に曝露されたが、曝露がかなり過去の場合、または不定期であった及び/または試験タンパク質が質的にほとんど免疫原性を有さない集団における個々の数を反映する。

40

## 【0152】

四分儀“1”におけるタンパク質はBLA、IFN-、FNA、アミラーゼ、HPV

50

33 E6、HPV45 E7、TPO、ALCALASE（登録商標）酵素及びGG36であり、一方、四分儀“2”におけるタンパク質はBer e1、HPV16 E6、HPV18 E6、HPV31 E6、HPV16 E7、HPV31 E7、HPV33 E7、HPV45 E7、及びHPV52 E7及びecotinであり、四分儀“3”におけるタンパク質はHPV18 E7及び-2ミクログロブリン、及び四分儀“4”におけるタンパク質はscFv、エグリン、RECK、スタフィロキナーゼ、及びsTNFR1である。従って、本発明が任意のタンパク質の集団に基づいた免疫反応を評価するための手段を提供することが明らかである。

#### 【0153】

##### 実施例6

##### 減少した構造値を有する変異体の作成

この実施例は、減少した構造値を有する変異体を作成する方法を提供する。ヒトの免疫原性を減少させるために設計した変異体タンパク質の全体的な免疫原性の計算に構造分析がどのように使用できるかの例として、構造値を、BPN'Y217Lにおけるアミノ酸70-84及び109-123に対する顕著な反応がバックグラウンドレベル反応に対して減少した変異体に関して計算した。48の個体の限定データセットはBPN'Y217Lの70-84及び109-123領域に対するペプチド変異体を用いて試験した。変異体に対する反応はバックグラウンドレベルであった。113の個体の完全なデータセットはバックグラウンドレベルに対する70-84及び109-123への反応を減少させることにより構造計算に関して修飾した。113の個体が親分子と共に試験されていた場合、構造値は何であったかを予測するために、構造をこのように計算した。反応は計算から除去されたので、等しい数の反応を反応の同じ全体的な割合を維持するためにデータセットを通じてランダムに散在させた。修飾タンパク質変異体の構造値を0.40になるように計算した（表4を参照）。

#### 【表4】

表4. 潜在的プロテアーゼ変異体の構造計算

プロテアーゼ	顕著なエピトープ	構造値
BPN'Y217L	2	0.53
BPN' 変異体	0	0.40

#### 【0154】

さらに、in vitroデータは低構造値を有するプロテアーゼ変異体がほとんど増殖を誘導しないということを示した。これらの実験では、30の地域ドナーからのPMB Cは全タンパク質親酵素（BPN'Y217L）または変異体プロテアーゼを用いてパラメータ的に試験した。酵素を不活化し、5~40µg/mlの範囲の投与で試験した。各タンパク質の達した最も高いSI値を図9に示す。親プロテアーゼは0.53の構造値を有し、変異体は0.40の構造値を有した。これらの30のドナーについて試験した2つのタンパク質に関する最適SI値間の違いは著しく、両側パラメータt-試験値がp<0.01であった。これらの結果は構造値を0.53から0.40に減少することは、in vitroの分子の抗原性に計り知れない影響を有することを示す。

#### 【0155】

本発明の好ましい方法において、変異体タンパク質を親タンパク質とin vitroまたはin vivoで比較する場合、タンパク質は好ましくは同じ投与量、剤形、均一なドナーセット、及び同じ投与曲線にわたって比較する。変異体タンパク質は親タンパク質の、安定性及び活性など通常の物理的及び構造的性質を保持すべきである。さらに、構造分析は親タンパク質及びその変異体間のいかなる処理上の違いも避けるものとする。

## 【0156】

## 実施例7

CD4<sup>+</sup>T細胞エピトープの指定

この実施例では、非曝露及び曝露ドナーから得たデータを示す。これらのデータは上述の実施例のデータに加えて提供するものである。

## 【0157】

## 非曝露ドナー

65のドナーをパチルス・レンタスズブチリシンの配列をカバーするために合成した15マーペプチドのセットを用いて試験した。65ドナーの各ペプチドに対する反応比率を図12Aに示す。位置番号54での顕著な反応は、アミノ酸160-174に対応し、明らかである。別の顕著な領域もペプチド位置23及び31で明らかである(アミノ酸67-81及び91-105)。セット中のペプチドに対する反応頻度を図12Bに示す。アミノ酸160-174でのペプチドに対する反応頻度はセット中の他のペプチドに対する反応頻度と異なることは明らかである。しかしながら、アミノ酸67-81及び91-105での反応の有意性を決定しなければならない。有意性は頻度データに関するポアソン分布を設定し、それからセット中のペプチド数により表された値の数を含むデータセットが問題の値を最も高いメンバーとして含むであろう確率を決定することにより決定した。アミノ酸160-174により表されるペプチドに関して、この確立は $p = 0.0004$ であった。他の2つのペプチドに関して、確立は $p = 0.50$ であった。

## 【0158】

エピトープ選択基準の試験として、スキンプック試験によりB・レンタスズブチリシンに曝露されたことが確認された7のドナーセットをここに記載のI-MUNE(登録商標)分析システムを用いても試験した。各ペプチドでの反応数は7人全部のドナーに関して示す(図13を参照)。1のペプチドだけが2以上の反応を引き起こした。アミノ酸163-177ペプチドに対する3人の反応者はHLA-DR2(15)陽性ドナーの両方を含んだ。このペプチドとHLA-DR2(15)に対する反応との関連性は以前に注目されていた(Stickler et al., J. Immunother., 23:654-660 [2000])。2人のドナーが、67-81領域を含む6のペプチド領域に反応した。曝露ドナーデータ由来のペプチドは非曝露ドナーデータにおいて顕著なものは他になかった。67-81領域は関連プロテアーゼにおける公知のCD4<sup>+</sup>T細胞エピトープに対して高い相同性(14/15アミノ酸同一性)を有し、これらのドナーの半分もこの第2のプロテアーゼに対してSPT<sup>+</sup>であった。従って、控えめに見積もって、実証された1のエピトープが非曝露ドナー集団中であることがわかり、このエピトープは実証されたタンパク質曝露ドナーにより認識されたエピトープのセットにおいて顕著であることがわかる。

## 【0159】

類似の結果がB・アミロリケファシエンス由来の他の関連ズブチリシンに関して観測された。有意性が高かった2つの顕著なエピトープ領域を記載し、これらの2つのエピトープも実証されたSPT<sup>+</sup>ドナーのセットにおいて見つかった(データは示していない)。上述の通り、より顕著なエピトープ領域が曝露ドナーの編集データに見られ、非曝露ドナーセットで明確なエピトープペプチドはこれらの小集団であった。

## 【0160】

## 記憶反応

上述のI-MUNE(登録商標)分析をスタフィロキナーゼ配列由来のペプチドセットについて行った。通常のコロニー形成は、このタンパク質に対して時間とともに特異な反応を蓄積するという事実に起因して、スタフィロキナーゼをこれらの実験に関して選択した(Warmerdam et al., J. Immunol., 168:155-161 [2002]参照)。72の地域のドナーのセットをこのタンパク質を用いて本発明のI-MUNE(登録商標)分析システムを用いて試験した。スタフィロキナーゼセットにおけるペプチドに対する反応を図14Aに示す。スタフィロキナーゼデータセットでは明確に顕著な

反応はない。B・レントスズプチリシンに関する頻度データとは違って、その他のペプチドに対する反応分布から明確に区別できる率で反応を蓄積した個々のペプチドがない場合、これは頻度データにおいて明確に示される（図4Bを参照）。しかしながら、位置5（アミノ酸13-27）、20及び21（アミノ酸58-75）、29（アミノ酸85-99）及び36（アミノ酸106-120）での顕著な反応率は重要である。データセットはペプチド当たり4.48の反応の平均反応を示す（バックグラウンド=6.22%、下記の表5を参照）。この値がポアソン分布の中央値を特定するために使用される場合、上述の顕著なペプチド全てによって示される反応頻度が有意である（ $p < 0.05$ ）ということを示す保守的な分析はほとんどない。この分析は非曝露ドナーに見られるエピトープに対する有意性を割り当てるために用いる分析よりも保守性がかなり少なく、ポアソン分布は中央バックグラウンド値により特定され、この値との違いは有意性を決定するために用いる。

10

【表5】

表5. 前もって曝露されたことが推測されるドナーのタンパク質に関するバックグラウンド値

	試験ドナー	予測反応/ ペプチド e <sup>b</sup>	反応/ ペプチド e found <sup>c</sup>	バックグラウンド +/- sd <sup>d</sup>	t-試験 <sup>e</sup>
11の工業的 酵素	n.a. <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	3.15 +/- 1.57	n.a.
HPV 16 E6	55	1.65	3.92	7.12 +/- 6.48	P=0.0003
HPV 18 E6	55	1.65	2.32	4.23 +/- 4.25	P=0.16
Bere 1	92	2.77	3.92	4.26 +/- 4.05	P=0.22
スタフィロ キナーゼ	72	2.17	4.48	6.22 +/- 3.47	P=0.0001
IFN- $\beta$	88	2.65	2.79	3.17 +/- 3.28	n.d. <sup>f</sup>
Tpo	99	2.99	2.51	2.54 +/- 2.23	n.d.
TNF-R1	69	2.08	1.54	2.23 +/- 1.95	n.d.

20

30

【0161】

このデータで“a”は“不適用”を示し、“b”は図11に示す11の工業的タンパク質から得たデータに基づく、試験ドナーの数に関してペプチド当たりの反応の予測数を示し、“c”は試験タンパク質に関して実験的に求めたペプチド値当たりの反応を示し、“d”は試験タンパク質に関してバックグラウンド反応値を示し、“e”は試験タンパク質のバックグラウンド反応と11の工業的酵素に関するバックグラウンド値を比較する、両側、不等変化t-試験を示し、及び“f”は“測定せず”を示す。

40

【0162】

I-MUNE（登録商標）分析で同定された5つのエピトープペプチドを、スタフィロキナーゼに対して抗原特異反応を有するドナー由来のクローンCD4+ T細胞系を用いて特定された公開エピトープと比較した（図15）。

【0163】

10人のドナーからのクローンT細胞を用いて特定した領域、D1、F2、C3及びD4は、それぞれI-MUNE（登録商標）分析同定ペプチド5、20、21及び36に対応するコア配列（反応クローンの大部分で共通するペプチド配列）を含む。I-MUNE（登録商標）分析はCD4+ T細胞クローンを用いて検出されなかった位置29（アミノ酸85-99）でのエピトープペプチドを同定した。このペプチドはHLA-DR5（

50

11)の存在に関連した。CD4+ T細胞クローン研究にクローンを与えるドナーだけがこの対立遺伝子を持っており、それ故に、見逃されていたのであろう。もしくは、このペプチドはスタフィロキナーゼから処理できず、当該結果はそれ故にI-MUNE(登録商標)分析データセット内で偽陽性となるのであろう。しかしながら、タンパク質のカルボキシ末端、A5領域はT細胞クローンにより認識されることが以前に報告されている(Warmerdam et al., 上述を参照)。I-MUNE(登録商標)分析は隣接D4領域に対応する領域の小集団、ペプチド36中のエピトープの位置を定めた。概して、エピトープ間の配列は記載したほとんど保守的でないエピトープ指定を用いて見つかり、公表エピトープが優れていた。さらに、記録したHLA関連性は2つのデータセット間で一致する(図15を参照)。

10

## 【0164】

## 陰性対照

陰性対照として、ヒト2-ミクログロブリンも87の地域ドナー由来サンプルを用いてI-MUNE(登録商標)分析において試験した。このタンパク質は全ての体細胞の表面上のHLAクラスI分子の一部として存在するので陰性対照として選択した。さらに、2-ミクログロブリンはT細胞成長中、胸腺において発現する。中枢性免疫寛容及び末梢免疫寛容

の両方のメカニズムはT細胞レパートリーに影響を与え、2-ミクログロブリン由来ペプチドに対して著しい交差反応でCD4+ T細胞を取り除く(Guery et al., J. Immunol., 154:545-554 [1995]を参照)。最終的に、この分子中で最小限の対立遺伝子変異がある。1の対立遺伝子変異体がデータベース調査において見つかった(示していない)。当該結果を図16に示す。2-ミクログロブリンに対する平均バックグラウンド反応は3.90+/-1.82パーセントである。ペプチドに対する反応比率を図16Aに示し、反応頻度を図16Bに示す。低バックグラウンド反応率の非曝露ドナー集団に関する統計的方法に基づいて有意なペプチド反応はなかった。

20

## 【0165】

## 反応率の再現性

エピトープペプチド反応の再現性をエピトープペプチドの繰り返し試験により測定した。ペプチドを少なくとも2回合成し、複数の個々のドナーグループについて試験した。各試験について試験を行ったドナーの数は27~103人である。ペプチドに対する平均反応比率を比較した。結果を表6に示す。4のエピトープペプチドに関する平均変動係数(CV)は20%であり、中央値は21%であった。CVの範囲は9.3~27%であった。これらの値は他のヒト細胞に基づいたex vivo分析と比べて勝るものである(Keilholz et al., J. Immunother., 25:97-138 [2000];及びAsai et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7:145-154 [2000])。表6において、“S.d.”は標準偏差であり、“S.e.”は標準誤差、及び“S.d./平均x100”はCV比率である。4つのペプチドの平均及び中央値を示す。

30

【表 6】

表6. エピトープペプチド反応の再現性

	試験の数	平均	s. d.	s. e.	%CV
IFN-B	3	16.41	1.53	0.88	9.32
TPO	3	9.18	1.83	1.06	19.99
BPN'Y217L#24	4	11.69	2.71	1.35	23.18
BPN'Y217L#37	4	12.91	3.51	1.76	27.19
				全体の平均	19.92
				中央値	21.59

10

【0166】

結合研究を確認するエピトープ

H L AクラスIIタンパク質結合に関する  $IC_{50}$  を2つの関連工業的細菌プロテアーゼにより特定されるペプチドエピトープに関して測定した(図17参照)。ペプチドを18の異なるH L A - D R及びD Qタンパク質への結合に関する競合分析において試験した。B . レンタスズブチリシンにおける顕著なエピトープは2つの異なるフレーム(160 - 174及び157 - 171)においてH L A - D R及びD Q分子の範囲で結合しており、乱雑な結合を示した。H L A - D R 2 ( 15 ) へのペプチド結合は、127 n Mの  $IC_{50}$  を有し、優れたものであった。H L A - D R 1だけがより低い  $IC_{50}$  値を示した。B . アミロリケファシエンスズブチリシンBPN'Y217LにおけるI - MUNE (登録商標)分析により特定された2つのエピトープのうち、第2のエピトープ(アミノ酸109 - 123)はH L A分析及びこの実施例に記載した結合分析の両方において乱雑であった。第1のエピトープ(アミノ酸70 - 84)も試験したH L AクラスII分子のほとんどに結合するが、0.69 n Mの  $IC_{50}$  でH L A - D R 6 ( 13 ) に結合する。このことは、H L A - D R 6 ( 13 ) ドナー (  $p = 0.00015$ 、相対危険度 = 7.22、 $n = 113$  試験ドナー ) の当該ペプチドに対する反応に関するデータに見られる関連性を説明するようである。500 n M以下の値のこれら結果は優れた結合剤であると考えられ、図17で太字で協調してある。また、この図において、縮退は、18の試験した対立遺伝子全てのうち、500 n M以下の  $IC_{50}$  で結合するH L AクラスIIタンパク質の数を示す。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0167】

【図1】図1は、公の“白人”H L A - D R B 1集団と比較した地域ドナー集団の184ランダム個体に関するH L A - D R B 1対立遺伝子の平均頻度を示す。

【図2】図2は、パチルス・リケニフォルミス - アミラーゼ由来ペプチドを用いて試験した82のランダム個体の集団から得た反応者比率を示す。3アミノ酸で補正される連続した15マーペプチドをx軸に記載し、各ペプチドに反応するドナー比率をy軸に示す。

40

【図3】パチルス・レンタスズブチリシン由来ペプチドを用いて試験した65のランダム個体の集団から得た反応者比率を示す。3アミノ酸で補正される連続した15マーペプチドをx軸に記載し、各ペプチドに反応するドナー比率をy軸に示す。

【図4】パチルスBPN'ズブチリシンY217L由来の2つのペプチドセットを用いて試験した113のランダム個体の集団から得た反応者比率を示す。3アミノ酸で補正される連続した15マーペプチドをx軸に記載し、各ペプチドに反応するドナー比率をy軸に示す。

【図5】A L C A L A S E (登録商標)酵素由来ペプチドを用いて試験した92のランダム個体の集団から得た反応者比率を示す。3アミノ酸で補正される連続した15マーペ

50

チドを x 軸に記載し、各ペプチドに反応するドナー比率を y 軸に示す。

【図 6】図 6 は、計算構造値がペプチドごとの反応の数が増加するにつれて減少することを示すグラフである。示された構造値は、反応が蓄積するごとに、 $\beta$ -アミラーゼ（四角）及び BPN'Y217L（ひし形）に関して測定した。

【図 7 A】パネル A は GPII ランク付けデータと 4 つの工業的酵素の構造指数値間の比較を提供する。モルモットベースの分析で測定した  $\beta$ -アミラーゼ、ALCALASE（登録商標）酵素、BPN'Y217L 及び B・レントスズブチリシンの相対アレルギー性を構造指数値（y 軸）と比較する。

【図 7 B】パネル B は MINT ランク付けデータと 4 つの工業的酵素の構造指数値間の比較を提供する。マウスベースの分析で測定した  $\beta$ -アミラーゼ、ALCALASE（登録商標）酵素、BPN'Y217L 及び B・レントスズブチリシンの相対アレルギー性を構造指数値（y 軸）と比較する。

【図 8】図 8 は、BPN'Y217L 変異体に関する構造を計算するために使用される変異体ペプチド反応を示す制限データセットを表すグラフである。48 の地域ドナーは BPN'Y217L の配列由来ペプチドを用いて試験した。3 アミノ酸で補正される連続した 15 マーペプチドを x 軸に記載し、各ペプチドに反応するドナー比率を y 軸に示す。最後の 2 つのペプチドはペプチド番号 24 と 37 の変異体配列を示す。

【図 9】BPN'Y217L（白ぬき三角形、構造値 = 0.53）及び非修飾 BPN'Y217L 変異体（黒塗り四角、構造値 = 0.40）に対する 30 の地域ドナー由来の P BMC の最大増殖反応を示すグラフである。各ドナーの最大反応は y 軸上に示される。2.0 の SI を“陽性”反応に関して切り捨てた。BPN'Y217L と変異体間の増殖反応における違いは  $p < 0.01$  だった。

【図 10】実施例 5 で試験した 25 タンパク質に対する相対構造値及びバックグラウンド反応比率を示すグラフである。

【図 11】試験したドナーの各 11 の試験タンパク質に関する平均反応比率 / ペプチドを示すグラフである。

【図 12 A】B・レントスズブチリシン（n = 65 地域ドナー）に対する反応頻度を示すグラフを提供する。パネル A はズブチリシン配列を記載する線状ペプチドに対する反応比率を示す。連続ペプチドを x 軸上に示す。65 のドナー内の反応比率は y 軸上である。

【図 12 B】B・レントスズブチリシン（n = 65 地域ドナー）に対する反応頻度を示すグラフを提供する。パネル B はセット内の反応頻度を示す。B・レントスズペプチドセット内のペプチドに対する反応頻度を示す。

【図 13】7 つの SPT+（スキンプックテスト陽性）ドナーの B・レントスズペプチドに対する反応を示す。スキンプックテストにより B・レントスズブチリシンに対して感作したことを確認した 7 ドナーからの P BMC を B・レントスズブチリシンペプチドに対するそれらの反応を試験するための本発明の I-MUNE（登録商標）分析に用いた。ペプチドに対する反応は 2.95 以上の SI が観測された場合、陽性であると考えられる。各ペプチドに反応したドナーの数を y 軸上に示す。連続 B・レントスズペプチドを x 軸上に示す。

【図 14 A】スタフィロキナーゼに関する I-MUNE（登録商標）分析データ結果を示すグラフである。パネル A はペプチドごとの反応者比率を与える（n = 72）。連続スタフィロキナーゼペプチドは x 軸上に示す。72 のドナーセット内の反応比率は y 軸上に示す。

【図 14 B】スタフィロキナーゼに関する I-MUNE（登録商標）分析データ結果を示すグラフである。パネル B はペプチドごとの反応頻度を示す。

【図 15】本発明の I-MUNE（登録商標）分析システムを用いて得た I-MUNE（登録商標）分析結果間のエピトープ配列及びスタフィロキナーゼに関して公表されているエピトープを示す表である。

【図 16 A】2-ミクログロブリンに関する I-MUNE（登録商標）分析結果を示すグラフである。パネル A はペプチドごとの反応者比率を与える（n = 87）。連続ヒト

10

20

30

40

50

2 - ミクログロブリンペプチドを X 軸上に示す。87 のドナーセット内の反応比率は y 軸上に示す。

【図16B】 2 - ミクログロブリンに関する I - MUNE (登録商標) 分析結果を示すグラフである。パネル B はペプチドごとの反応頻度を示す。

【図17】 本発明の I - MUNE (登録商標) 分析システムにより細菌性プロテアーゼにおいて同定されたエピートープペプチドに関する IC<sub>50</sub> 結合値を示す表である。500 nM 以下の値は優れた結合剤であると考えられ、表中、太字で強調して示す。縮退は試験した 18 の合計対立遺伝子からの 500 nM 以下の IC<sub>50</sub> と結合する HLA クラス II タンパク質の数を示す。

【図1】

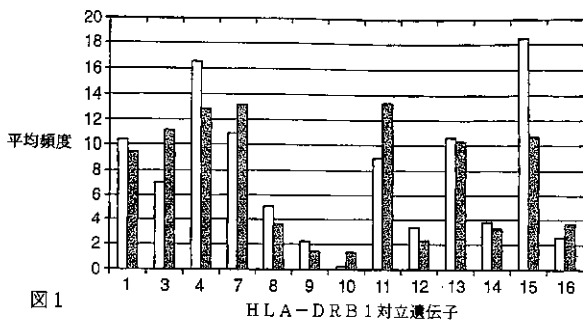


図1

【図2】

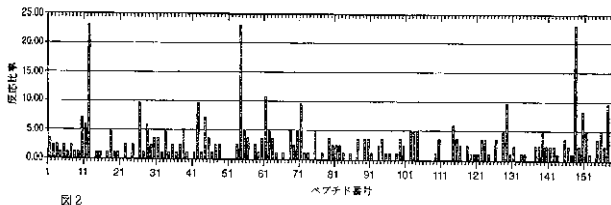


図2

【図3】

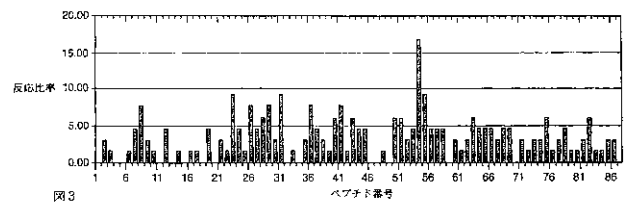


図3

【図4】

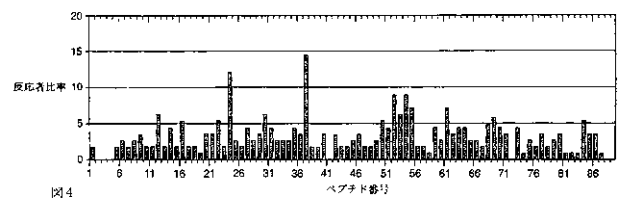


図4

【図5】

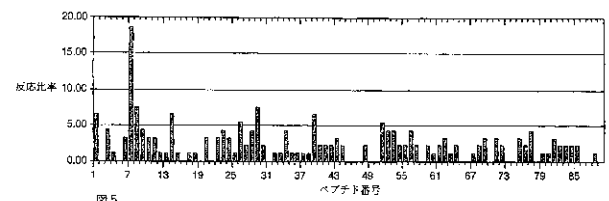


図5

【 図 6 】

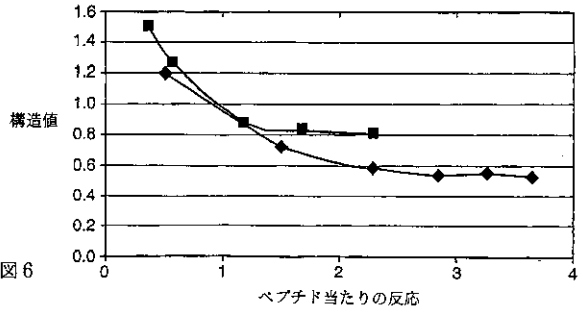


図 6

【 図 7 B 】

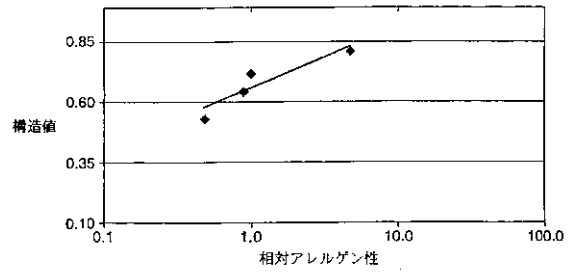


図 7 B

【 図 7 A 】

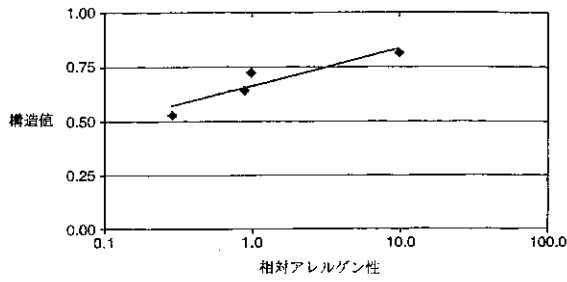


図 7 A

【 図 8 】

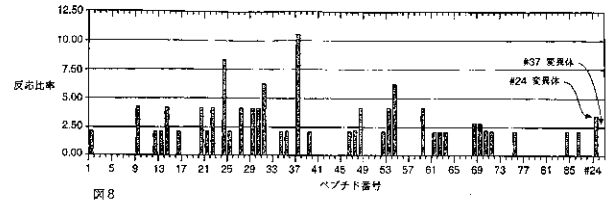


図 8

【 図 9 】

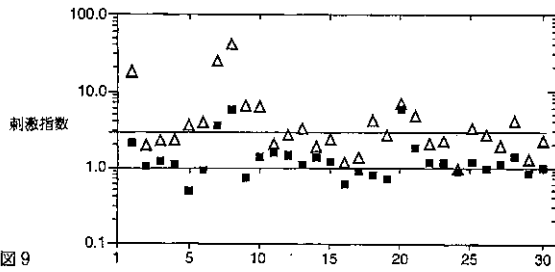


図 9

【 図 1 1 】

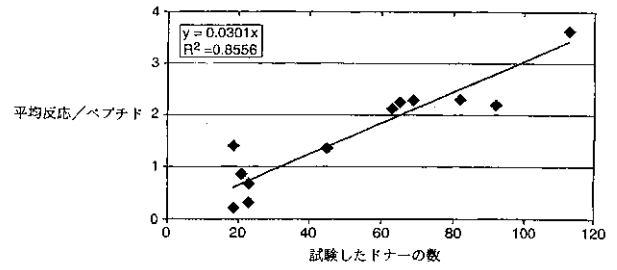


図 1 1

【 図 1 0 】

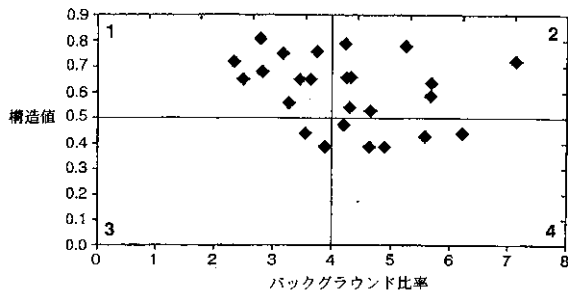


図 1 0

【 図 1 2 A 】

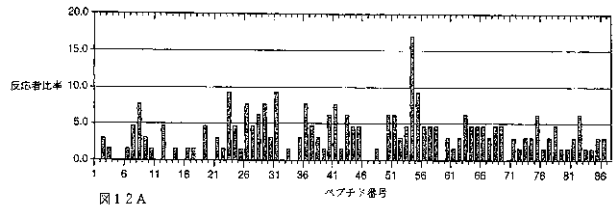


図 1 2 A

【図 1 2 B】

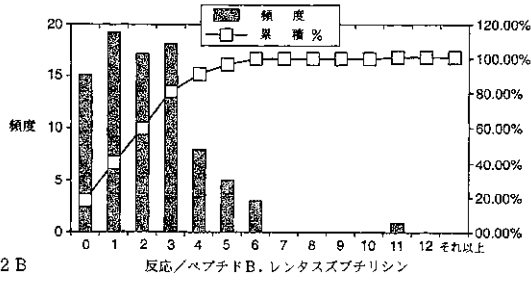


図 1 2 B

反応ノペプチド B. レンタスズプチリン

【図 1 3】

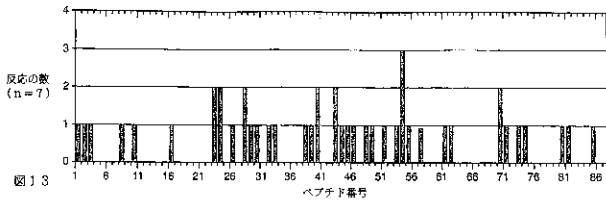


図 1 3

【図 1 4 A】

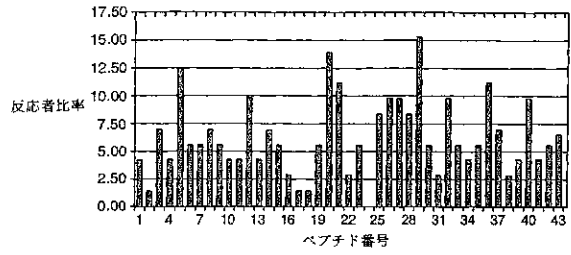


図 1 4 A

【図 1 4 B】

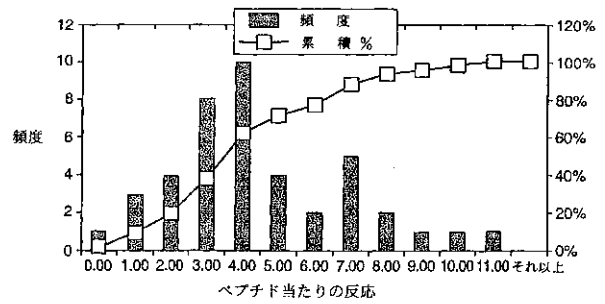


図 1 4 B

【図 1 5】

Franssen et al (2002)*	HLA	ペプチド	増加した HLA	減少した HLA	Wormerda et al (2002)*
5			DQ2		D1 DR3, 7, 2
20	DR2 (15)	p < 0.03	DQ6	DR7	0% vs 23%, p < 0.09
21			DR6 (10)		F2 D1, 4
29	DR5 (11)	p < 0.01			C8 DR2, 3, 4, 6, 7, 8
38			DR3		n.f.# n.f.#
n.f.#					D4 DR3, 8
					A5 DR2, 5, 6, 8

図 1 5

【図 1 6 B】

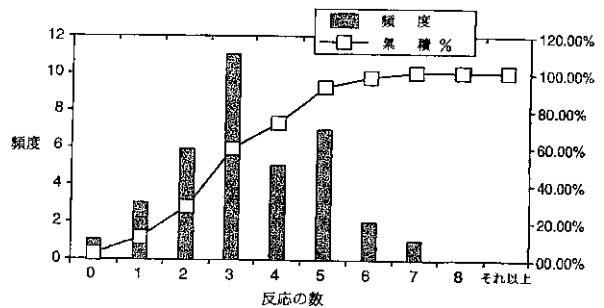


図 1 6 B

【図 1 6 A】

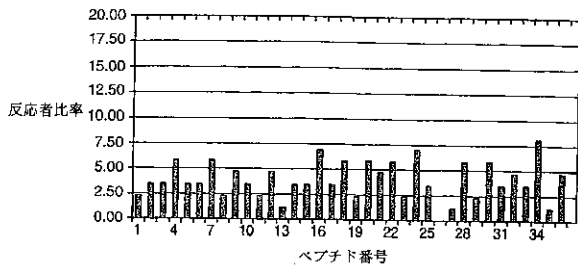


図 1 6 A

【図 1 7】

頻度HLAへの結合のためのnM 1 C<sub>50</sub>

タンパク質	DRB1									
	'0101 (DR1)	'0301 (DR3w17)	'0401 (DR4w1)	'0404 (DR4w14)	'0405 (DR4w15)	'0701 (DR7)	'0802 (DR8w2)	'0801 (DR8)	'1101 (DR5w11)	'1201 (DR5w12)
SPN Y217L_70	6.5	6737	33	5.7	166	154	1711	46	2362	80
BNV Y217L_109	8.8	-	33	166	37	59	2192	43	3019	1255
IL12p71_157	1065	16,433	4794	7575	6784	724	>16,233	1484	-	-
RhDp92_160	13	-	142	5542	1348	138	2033	164	5554	-

DRB1		DRB3/4/5			DQ		総計
'1302 (DR6w19)	'1501 (DR2w22)	'DRB3*0101 (DR32e)	'DRB4*0101 (DR438)	'DRB5*0101 (DR2w232)	DQA1*0201/DOB1*0201 (DQ2)	DQA1*0301/DOB1*0301 (DQ3.1)	
0.89	21	2010	31	15,689	670	440	2059
9.6	563	119	1071	1624	97	2182	60
2009	865	>9434	>6687	-	8167	6009	5009
558	127	8157	8257	1726	1296	63	1046

図 1 7

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/05670		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : G01N 33/53, 33/567; C12N 5/06.				
US CL : 435/7.1, 4, 354, 366, 355, 372.3, 373, 384; 530/350; 536/23.1, 23.5				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 4, 354, 366, 355, 372.3, 373, 384; 530/350; 536/23.1, 23.5				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PALM, EAST				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	US 5,691,147 A (DRAETTA et al.) 25 November 1997 (25.11.1997), col. 1, line 45-col. 4, line 47.	1-41		
A,P	US 6,451,316 B1 (SRIVASTAVA) 17 September 2002 (17.09.2002), col. 2, line 1-col. 6, line 20.	1-41		
A	US 6,110,695 A (GUNN et al.) 29 August 2000 (29.08.2000), col. 1, line 45-col. 2, line 5.	1-41		
A	US 5,627,025 A (STEINMAN et al.) 06 May 1997 (06.05.1997), col. 3, line 10-col. 8, line 6.	1-41		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">               "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                "E" earlier application or patent published on or after the international filing date                "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed             </td> <td style="width: 50%; border: none;">               "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                "&amp;" document member of the same patent family             </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 01 October 2003 (01.10.2003)		Date of mailing of the international search report <b>30 OCT 2003</b>		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris for</i> Patent Officer Telephone No. 703-308-0196		

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(72)発明者 ハーディング、フィオーナ・エイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 95050、サンタ・クララ、ルイス・ストリート 772  
Fターム(参考) 4B063 QA07 QQ79 QR77 QS10 QS22 QS31 QS40

专利名称(译)	基于组的评估和用于对蛋白质的相对免疫原性进行排序的手段		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005518224A</a>	公开(公告)日	2005-06-23
申请号	JP2003571707	申请日	2003-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
申请(专利权)人(译)	Genencor International的公司		
[标]发明人	ハーディングフィオーナエイ		
发明人	ハーディング、フィオーナ・エイ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N9/56 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/567		
CPC分类号	G01N33/505 C12N9/54 G01N2333/96433		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/566		
F-TERM分类号	4B063/QA07 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B063/QS10 4B063/QS22 4B063/QS31 4B063/QS40		
代理人(译)	山崎 行造 杉山直人 白银 博 赤松俊明		
优先权	60/360057 2002-02-26 US		
其他公开文献	JP4430944B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种评估群体免疫应答谱的方法。特别地，本发明提供了一种定性评估人群免疫应答和分析对目的蛋白质的免疫应答的方法。本发明进一步提供了基于蛋白质的相对免疫原性对蛋白质进行分级的方法。此外，本发明提供了制备具有降低的免疫原性的蛋白质的方法，用于各种应用。

		(43) 公表日 平成17年6月23日 (2005.6.2)
61) Int. Cl. <sup>7</sup>	FI	テーマコード (参考)
C12Q 1/02	C12Q 1/02	4B063
G01N 33/53	G01N 33/53	D
G01N 33/566	G01N 33/566	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)
(21) 出願番号	特願2003-571707 (P2003-571707)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成15年2月26日 (2003.2.26)	ジェネンコー・インターナショナル・イ
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月18日 (2004.10.18)	ク
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005670	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ノッ
(87) 国際公開番号	W02003/073068	・アルト、ページ・ミル・ロード 92
(87) 国際公開日	平成15年8月4日 (2003.8.4)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	60/360,057	弁理士 山崎 行造
(32) 優先日	平成14年2月26日 (2002.2.26)	(74) 代理人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 杉山 直人
		(74) 代理人
		100126767
		弁理士 白银 博
		(74) 代理人
		100122839
		弁理士 星 貴子
		(74) 代理人
		100118647
		弁理士 赤松 利昭