

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 544472**

(P2002 - 544472A)

(43)公表日 平成14年12月24日(2002.12.24)

| (51) Int.Cl <sup>7</sup> | 識別記号 | F I            | テ-コード ( 参考 ) |
|--------------------------|------|----------------|--------------|
| G 0 1 N 33/53            |      | G 0 1 N 33/53  | D 2 B 0 3 0  |
| A 0 1 H 5/00             |      | A 0 1 H 5/00   | A 2 G 0 4 5  |
| A 0 1 K 67/027           |      | A 0 1 K 67/027 | 4 B 0 2 4    |
| A 6 1 K 38/00            |      | A 6 1 K 45/00  | 4 C 0 8 4    |
| 45/00                    |      | A 6 1 P 37/02  | 4 H 0 4 5    |

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 60数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 598526(P2000 - 598526)

(86)(22)出願日 平成12年2月10日(2000.2.10)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月10日(2001.8.10)

(86)国際出願番号 PCT/US00/03448

(87)国際公開番号 W000/47610

(87)国際公開日 平成12年8月17日(2000.8.17)

(31)優先権主張番号 09/247,406

(32)優先日 平成11年2月10日(1999.2.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 パナシーア ファーマス-ティカルズ エルエルシー  
アメリカ合衆国 06490 - 2038 コネティカット、サウスポート、ピーオーボックス433

(72)発明者 マイケル キャプラン  
アメリカ合衆国 06255 コネティカット、ウッドブリッジ、レースブルック ロード 1217

(74)代理人 弁理士 倉内 基弘 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリペプチドに対する望ましくない免疫応答を変更する方法

(57)【要約】

開示するのは、望ましくない免疫応答を、望ましくない免疫応答を一層少しし尚且つ少なくとも1つの望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドを同定することにより変更する方法である。かかるポリペプチドは、ヒトその他の哺乳動物又は他の動物に導入した際に、一層安全であり且つ一層効き目があり得る。変化された免疫応答又は免疫応答の代わりとなるもの(測定可能な免疫特性という)を、この方法により評価することができる。一般に、この測定可能な免疫特性は、それ自体望ましくない免疫応答であり得、測定可能な免疫特性は、望ましくない免疫応答に関与し得、及び/又は望ましくない免疫応答は、測定可能な免疫特性によって媒介され得る。開示する方法は、変異型ポリペプチドのコレクションを用意し(各変異型ポリペプチドのアミノ酸は、少なくとも1つの位置で関心あるポリペプチドと異なる)、関心あるポリペプチドより一層少しの免疫応答を示す変異型ポリペプチドを同定し、そして望ましくない免疫応答を誘出する一層少しの潜在能力を有し、しかも尚望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドを同定することを含む。この変異型ポリペプチドのコレクションは、関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、突然変異誘発された核酸を発現させて変異型ポリ

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 変異型ポリペプチドのコレクションを用意し、各変異型ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも1つの位置で関心あるポリペプチドと異なり、そして

このコレクション中で(1)関心あるポリペプチドと比較して抗体反応性に変化を有し且つ(2)少なくとも1つの望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドを同定する

ことを含む方法であって、抗体反応性の変化を、変異型ポリペプチドを、関心あるポリペプチドに対して単一特異的である個々の抗体又は抗体断片にさらすことにより測定する上記の方法。

【請求項2】 変異型ポリペプチドのコレクションを下記により用意する、請求項1に記載の方法

関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、そして

突然変異誘発された核酸を発現させて変異型ポリペプチドのコレクションを生成する。

【請求項3】 関心あるポリペプチドをコードする核酸を、ランダムに突然変異したポリペプチドのコレクションをコードするランダムに突然変異誘発した核酸のコレクションを生成するように突然変異誘発する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 抗体反応性及びその変化の何れか又は両方が、望ましくない免疫応答と関係している、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 抗体反応性が、望ましくない免疫応答であり、その望ましくない免疫応答が抗体反応性により媒介され、抗体反応性が望ましくない免疫応答に関与し、抗体反応性が望ましくない免疫応答又はこれらの組合せと関係している、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 ポリペプチドに対して単一特異的である抗体又は抗体断片が、哺乳動物から得られるモノクローナル抗体であるか又は組合せライブラリーから得られる抗体若しくは抗体断片である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 抗体又は抗体断片が、組合せライブラリーから得られる抗体

断片である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 抗体反応性が、I g A抗体に対する反応性、I g D抗体に対する反応性、I g E抗体に対する反応性、I g G抗体に対する反応性、又はI g M抗体に対する反応性である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 抗体反応性が、関心あるポリペプチドと反応性のI g E抗体に対する反応性である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 望ましい特性が、T細胞活性化である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 望ましい特性が、脱感作に関与する免疫特性である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 抗体反応性に変化を有する変異型ポリペプチドの同定を、望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドの同定の前に、同時に、又は後に行う、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 望ましい特性が、関心あるポリペプチドに存在する対生物活性である、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 対生物活性を、酵素活性、レセプター結合、抗癌活性、免疫抑制活性、免疫刺激活性、免疫特性、免疫系細胞の機能の変化、抗体活性、抗ウイルス活性、及び栄養活性よりなる群から選択する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 対生物活性が、T細胞活性化又はB細胞活性化である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 対生物活性が、脱感作に関与する免疫特性である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 対生物活性が、免疫系細胞の機能の変化であり、これらの細胞が樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞、好塩基球又は好酸球である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】 関心あるポリペプチドが、ウイルスタンパク質であり、対生物活性がウイルスアセンブリ及び感染又は細胞への侵入の媒介である、請求項13に記載の方法。

【請求項19】 下記を更に含む請求項1に記載の方法  
同定された変異型ポリペプチド中に存在する突然変異を同定し、そして  
2以上の同定された変異を単一の変異型ポリペプチド中に合わせる。

【請求項20】 ポリペプチドをトランスジェニック動物又は植物中で発現  
させることを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】 関心あるポリペプチドが、トランスジェニック動物又は植  
物と同じ種類の非トランスジェニック動物又は植物中に天然にある、請求項20  
に記載の方法。

【請求項22】 下記を更に含む、請求項1に記載の方法  
少なくとも一の同定された変異型ポリペプチドから得られた少なくとも一のポ  
リペプチドを、少なくとも1回、個体に投与する。

【請求項23】 少なくとも一のポリペプチドの各々が、同定された変異型  
ポリペプチドの1つであるか又は2以上の同定された変異型ポリペプチドからの  
変異を合わせたポリペプチドである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 ポリペプチドを、免疫調節分子と組み合わせて投与する、  
請求項22に記載の方法。

【請求項25】 ポリペプチドと免疫調節分子が、物理的に結合されている  
、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 ポリペプチドと免疫調節分子が、一緒にカプセル封入され  
、共有結合され、又は非共有結合されている、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 ポリペプチドと免疫調節分子が、化学的にカップルされて  
いる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 免疫調節分子が、ポリペプチドに融合されたポリペプチド  
である、請求項24に記載の方法。

【請求項29】 請求項1に記載の方法により同定された少なくとも一の変  
異型ポリペプチドから得られたポリペプチドであって、(1)関心あるポリペチ  
ドと比較して抗体反応性に変化を有し且つ(2)望ましい特性を保持している当該  
ポリペプチド。

【請求項30】 同定された変異型ポリペプチドの1つであるか又は2つ以

上の同定された変異型ポリペプチドからの変異を合わせたポリペプチドである、請求項29に記載のポリペプチド。

【請求項31】 変異型ポリペプチドが、望ましくない免疫応答と関係する少なくとも1つの測定可能な免疫特性に変化を有し、

測定可能な免疫特性が、関心あるポリペプチドと反応するIgE抗体に対する反応性である、請求項29に記載のポリペプチド。

【請求項32】 ポリペプチドを、トランスジェニック植物又は動物において生成する、請求項29に記載のポリペプチド。

【請求項33】 請求項29に記載のポリペプチドと免疫調節活性を有するポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項34】 請求項29に記載のポリペプチドと免疫調節分子を含む組成物。

【請求項35】 ポリペプチドと免疫調節分子が物理的に結合されている、請求項34に記載の組成物。

【請求項36】 ポリペプチドと免疫調節分子と一緒にカプセル封入され、共有結合され、又は非共有結合されている、請求項35に記載の組成物。

【請求項37】 ポリペプチドと免疫調節分子が化学的にカップルされている、請求項36に記載の組成物。

【請求項38】 免疫調節分子が、ポリペプチドに融合されたポリペプチドである、請求項34に記載の組成物。

【請求項39】 請求項29に記載のポリペプチドをコードする核酸。

【請求項40】 核酸が、組換え宿主におけるポリペプチドの発現のためのベクターを含む、請求項39に記載の核酸。

【請求項41】 ポリペプチドが、トランスジェニック植物又は動物において発現される、請求項40に記載の核酸。

【請求項42】 請求項29に記載のポリペプチドを発現するトランスジェニック植物。

【請求項43】 関心あるポリペプチドが、トランスジェニック植物と同じ種類の非トランスジェニック植物中に天然にある、請求項42に記載のトランス

ジェニック植物。

【請求項44】 請求項29に記載のポリペプチドを発現するトランスジェニック動物。

【請求項45】 関心あるポリペプチドが、トランスジェニック動物と同じ種類の非トランスジェニック動物中に天然にある、請求項44に記載のトランスジェニック動物。

【請求項46】 下記を含む方法

変異型ポリペプチドのコレクションを用意し、各変異型ポリペプチドのアミノ酸配列が、関心あるポリペプチドと少なくとも1つの位置で異なり、関心あるポリペプチドがアレルゲンであり、そして

このコレクション内で、(1)関心あるポリペプチドより一層少ないアレルギー応答を示し又はアレルギー応答を示す一層低い潜在能力を有し且つ(2)少なくとも一の望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドを同定する。

【請求項47】 変異型ポリペプチドのコレクションを下記により用意する、請求項46に記載の方法

関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、そして

突然変異誘発された核酸を発現させて変異型ポリペプチドのコレクションを生成する。

【請求項48】 アレルギー応答を一層少し示し又は該応答を示す一層少しの潜在能力を有する変異型ポリペプチドの同定を、それらの変異型ポリペプチドを、関心あるポリペプチドと反応性の別々のIgE抗体又は抗体断片にさらすことにより達成する、請求項46に記載の方法。

【請求項49】 関心あるポリペプチドと反応性のIgE抗体又は抗体断片が、哺乳動物から得られたモノクローナルIgE抗体であるか又は組合せIgEライブラリーから得られたIgE抗体若しくは抗体断片である、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 IgE抗体又は抗体断片が、組合せIgEライブラリーから得られたIgE抗体断片である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】 望ましい特性が、T細胞活性化である、請求項46に記載

の方法。

【請求項52】 望ましい特性が、アレルギー脱感作に關与する免疫特性である、請求項46に記載の方法。

【請求項53】 アレルギー応答を一層少し示すか又は該応答を示す一層少しの潜在能力を有する変異型ポリペプチドの同定を、望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドの同定の前に、同時に、又は後に行う、請求項46に記載の方法。

【請求項54】 アレルゲンに対するアレルギー応答を低減させるために個人を治療する方法であって、下記を含む当該方法

その個人に、請求項46に記載の方法により同定された少なくとも一の変異型ポリペプチドから得られた少なくとも一のポリペプチドを、少なくとも一回投与する。

【請求項55】 少なくとも一のポリペプチドの各々が、同定された変異型ポリペプチドの一つであるか又は同定された変異型ポリペプチドの少なくとも2つからの変異を合わせたポリペプチドである、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 ポリペプチドを、免疫調節分子と組み合わせて投与する、請求項54に記載の方法。

【請求項57】 ポリペプチドと免疫調節分子が、物理的に結合されている、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 ポリペプチドと免疫調節分子と一緒にカプセル封入され、共有結合され、又は非共有結合されている、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 ポリペプチドと免疫調節分子が、化学的にカップルされている、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 免疫調節分子が、ポリペプチドに融合されたポリペプチドである、請求項56に記載の方法。

【請求項61】 変異型ポリペプチドのコレクションを用意し、各変異型ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも1つの位置で関心あるポリペプチドと異なり、

各変異型ポリペプチドは、変異型ポリペプチドとレポータータンパク質を含む

融合ポリペプチドの部分であり、そして

このコレクション内で、(1)関心あるポリペプチドより一層少しの望ましくない免疫応答を示し又は該応答を示す一層少しの潜在能力を有し且つ(2)望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドを同定し、  
そして、機能的レポータータンパク質との融合タンパク質を同定することを含む方法。

**【請求項62】 変異型ポリペプチドのコレクションを**

関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、そして

突然変異誘発された核酸を発現させて、変異型ポリペプチドのコレクションを生成する

ことにより用意することを含み、突然変異誘発された核酸が、レポータータンパク質をコードする核酸に操作可能に結合され、それにより、結合された核酸が、変異型ポリペプチドとレポータータンパク質を含む融合ポリペプチドをコードしている、請求項61に記載の方法。

**【請求項63】 望ましくない免疫応答を一層少し示すか該応答を示す一層少しの潜在能力を有する変異型ポリペプチドの同定を、望ましくない免疫応答と関係する少なくとも1つの測定可能な免疫特性の変化を同定することにより達成し、**

測定可能な免疫特性とその変化の何れか又は両方が望ましくない免疫応答と関係する、請求項61に記載の方法。

**【請求項64】 測定可能な免疫特性が、抗体反応性である、請求項63に記載の方法。**

**【請求項65】 測定可能な免疫特性の変化が、抗体反応性の減少である、請求項64に記載の方法。**

**【請求項66】 測定可能な免疫特性の変化を、変異型ポリペプチドを、関心あるポリペプチドと反応性の個々の抗体又は抗体断片にさらすことにより測定し、**

このポリペプチドと反応性の抗体又は抗体断片が、哺乳動物から得られたモノクローナル抗体であるか又は組合せライブラリーから得られた抗体若しくは抗体

断片である、請求項64に記載の方法。

【請求項67】 抗体又は抗体断片が、組合せライブラリーから得られた抗体断片である、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 測定可能な免疫特性が、IgA抗体に対する反応性、IgD抗体に対する反応性、IgE抗体に対する反応性、IgG抗体に対する反応性、又はIgM抗体に対する反応性である、請求項64に記載の方法。

【請求項69】 測定可能な免疫特性が、関心あるポリペプチドと反応性のIgE抗体に対する反応性である、請求項68に記載の方法。

【請求項70】 測定可能な免疫特性の変化を、変異型ポリペプチドを、関心あるポリペプチドと反応性の個々のIgE抗体又は抗体断片にさらすことにより測定し、

関心あるポリペプチドと反応性のIgE抗体又は抗体断片が、哺乳動物から得られたモノクローナルIgE抗体であるか又は組合せIgEライブラリーから得られたIgE抗体若しくは抗体断片である、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 IgE抗体又は抗体断片が、組合せIgEライブラリーから得られたIgE抗体断片である、請求項70に記載の方法。

【請求項72】 望ましい特性が、T細胞活性化である、請求項69に記載の方法。

【請求項73】 望ましい特性が、脱感作に關与する免疫特性である、請求項69に記載の方法。

【請求項74】 測定可能な免疫特性が、T細胞活性化、B細胞活性化、NK細胞活性化、又は樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞、好塩基球又は好酸球の機能の変化である、請求項63に記載の方法。

【請求項75】 測定可能な免疫特性が、望ましい免疫応答であり、望ましくない免疫応答が測定可能な免疫特性により測定され、測定可能な免疫特性が望ましくない免疫応答に關与し、測定可能な免疫特性が望ましくない免疫応答又はこれらの組合せと關係する、請求項63に記載の方法。

【請求項76】 望ましくない免疫応答を一層少し示し又は該応答を示す一層少しの潜在能力を有する変異型ポリペプチドの同定を、望ましい特性を保持し

ている変異型ポリペプチドの同定の前に、同時に、又は後に行う、請求項61に記載の方法。

【請求項77】 望ましくない免疫応答が、I g A抗体に対する反応性、I g D抗体に対する反応性、I g E抗体に対する反応性、I g G抗体に対する反応性、又はI g M抗体に対する反応性、B細胞活性化、T細胞活性化、NK細胞活性化又はこれらの組合せである、請求項61に記載の方法。

【請求項78】 望ましくない免疫応答が、液性免疫応答、細胞性免疫応答又はアレルギー応答である、請求項61に記載の方法。

【請求項79】 変異型ポリペプチドのコレクションを用意し、各変異型ポリペプチドのアミノ酸配列が、関心あるポリペプチドと少なくとも1つの位置で異なっており、

(1)関心あるポリペプチドより一層少ない望ましくない免疫応答を示すか又は該応答を示す一層少ない潜在能力を有し、(2)少なくとも1つの望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドを同定して、機能的レポータータンパク質との融合タンパク質を同定する

ことを含む方法であって、一層少しの望ましくない免疫応答を示し又は該応答を示す一層少しの潜在能力を有する変異型ポリペプチドの同定を、望ましくない免疫応答と関係する抗体反応性以外の測定可能な免疫特性の変化を同定することにより達成する当該方法。

【請求項80】 変異型ポリペプチドのコレクションを、下記により用意する、請求項79に記載の方法

関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、そして

突然変異誘発された核酸を発現させて、変異型ポリペプチドのコレクションを生成する。

【請求項81】 関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、それにより、ランダムに変異したポリペプチドのコレクションをコードするランダムに突然変異された核酸のコレクションを生成する、請求項80に記載の方法。

【請求項82】 測定可能な免疫特性及びその変化の何れか又は両方が、望

ましくない免疫応答と関係している、請求項79に記載の方法。

【請求項83】 測定可能な免疫特性が、T細胞活性化、B細胞活性化、NK細胞活性化、又は樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞、好塩基球又は好酸球の機能の変化である、請求項79に記載の方法。

【請求項84】 望ましくない免疫応答が、液性免疫応答、細胞性免疫応答又はアレルギー応答である、請求項79に記載の方法。

【請求項85】 一層少しの望ましくない免疫応答を示し又は該応答を示す一層少しの潜在能力を有する変異型ポリペプチドの同定を、望ましい特性を保持している変異型ポリペプチドの同定の前に、同時に、又は後に行う、請求項79に記載の方法。

【請求項86】 望ましい特性が、関心あるポリペプチドに存在する対生物活性である、請求項79に記載の方法。

【請求項87】 対生物活性を、酵素活性、レセプター結合、抗癌活性、免疫抑制活性、免疫刺激活性、免疫特性、免疫系細胞の機能の変化、抗生物質活性、抗ウイルス活性、及び栄養活性よりなる群から選択する、請求項86に記載の方法。

【請求項88】 下記を更に含む、請求項79に記載の方法

同定された変異型ポリペプチド中に存在する突然変異を同定し、そして

同定された突然変異の少なくとも2つを単一の変異型ポリペプチド中に合わせる。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の背景**

開示する発明は、一般に、タンパク質の修飾と低減された免疫応答の分野にあり、特に、望ましくない免疫応答の誘出が一層少ないタンパク質及びペプチドの生成の領域にある。

**【0002】**

免疫系は、精緻で効率的であるが、それは、不適當で不十分な仕方で反応し得るし、又は適当な若しくは望ましい仕方で反応できないかもしれない(特に、タンパク質及びペプチドに対して)。望ましくない免疫応答の周知の例は、アレルギー反応であり、該反応では、タンパク質にさらされた個人がヒスタミンその他の炎症メディエーターを放出する。加えて、治療剤として投与されたタンパク質が、しばしば、十分な治療結果が達成される前に、免疫系により攻撃されて排除される。

**【0003】**

アレルギーその他の疾患の治療における新規なタンパク質ベースのストラテジーの開発は、有意の患者の免疫応答の開始及び発散を避ける必要性により妨げられてきた(DeMatteo等、Transplantation 63:315-319(1997))。例えば、Wadhwa等、Clin and Exp.Immunol.104:351-358(1996)は、免疫応答によるGM-CSFの低下された効力を報告している。Rosenchein等、Israel J.Med.Sci.27:541-545(1991))は、医薬ストレプトキナーゼに対する免疫応答を報告し、Lantin等、Clin .and Exp.Rheumatology 12:429-433(1994)、及びZilliox等、J.Clin.Immunol.13:415-423(1993)は、同じ物質に対する一層重大な免疫応答を報告した。同様に、ウイルス、ウイルスベクター又はウイルスキャプシッドの核酸その他の治療剤の送達のための利用が、これらのウイルスタンパク質に対する免疫応答によって妨げられている(DeMatteo等、Transplantation 63:315-319(1997))。

**【0004】**

少数のよく研究されたタンパク質に対する免疫反応を減じるための幾つかの試みが為された。一の研究において、FASEB Journal 12:231-242(1998)は、一層低

いIgE反応性を有する変異した樺アレルゲンに記載している。Ferreira等は、タンパク質ファミリーの機能特性にリンクしていると推定されるアミノ酸を同定するアルゴリズムを用いて、経験的に、抗原中の変異させるべきアミノ酸を同定した。Ferreira等の方法は、以前に一層低アレルギー性であるとして同定されたアレルゲンを含む種々の形態のアレルゲンの同定と比較に依存した。この同定方法は、一層低反応性のアレルゲンを生じたが、変異部位の選択が、アルゴリズムにより同定されたものに限られた。

#### 【0005】

Collenとその同僚は、カラム上の抗体と反応し得なかった変異体を同定するための抗スタフィロキナーゼマウスモノクローナル抗体又は抗スタフィロキナーゼポリクローナルヒト抗体を充填したカラムを通したファージディスプレイされたランダムなスタフィロキナーゼ変異体を含むタンパク質中のエピトープをマップする方法を記載した(Jespers等、J.Molecular Biology 5:704-718(1997))。この技術は、スタフィロキナーゼ変異体の単一の非ヒトモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体プールに対する反応性の評価に限られたものであった。これは、関連抗体の全範囲のスタフィロキナーゼとの相互作用の効率的な評価を妨げる。

#### 【0006】

タンパク質又はペプチドを改変してそれらの有用な特性を保存又は増大させる尚且つそれらの望ましくない免疫応答を誘出する潜在能力を最小にし又は排除する効率的で信頼できる技術を開発することは望ましい。

#### 【0007】

それ故、タンパク質及びペプチドに対する望ましくない免疫応答を低減させる方法を提供することは、本発明の目的である。

#### 【0008】

低減された免疫応答を誘出するタンパク質及びペプチドを提供することは、本発明の別の目的である。

#### 【0009】

望ましくない免疫応答と関係するタンパク質及びペプチドの測定可能な免疫特性を低減させる方法を提供することは、本発明の別の目的である。

## 【0010】

低減された測定可能な免疫特性を有するタンパク質及びペプチドを提供することは、本発明の他の目的である。

## 【0011】

動物への導入に関して一層安全で一層効き目のあるタンパク質及びペプチドを製造する方法を提供することは、本発明の他の目的である。

## 【0012】

## 発明の要約

望ましくない免疫応答を、望ましくない免疫応答を誘出できないか又は一層少し誘出する変異型ポリペプチドを生成し及び/又は同定することによって、低減させ又は排除し尚且つ少なくとも1つの望ましい特性を保持する方法を開示する。かかるポリペプチドは、ヒト又は他の動物に導入する場合に、一層安全であり且つ一層効き目があってよい。この開示する方法は、変異型ポリペプチドのコレクションを用意し(各変異型ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも一部で、関心あるポリペプチドと異なる)、関心あるポリペプチドより少ない免疫応答を示す変異型ポリペプチドを同定し、そして望ましくない免疫応答の誘出の一層少ない潜在能力を有するが望ましい性質は依然として保持している変異型ポリペプチドを同定することを含む。変異型ポリペプチドのコレクションは、関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発し、変異した核酸を発現させて変異型ポリペプチドを生成させることにより用意することができる。免疫応答自体又は免疫応答の代替のもの(測定可能な免疫特性と呼ぶ)をこの方法により評価することができる。一般に、測定可能な免疫特性は、それ自体、望ましくない免疫応答であり得、測定可能な免疫特性は、望ましくない免疫応答に含まれ得、測定可能な免疫特性は、望ましくない免疫応答に関係し得て、且つ/又は望ましくない免疫応答は、測定可能な免疫特性により媒介され得る。

## 【0013】

低減させるべき望ましくない免疫応答は、何れの型であってもよく、一般に、特定の関心あるポリペプチドと関係することが知られ又は発見された免疫応答により測定される。望ましくない免疫応答は、免疫応答の存在又は非存在の何れで

あってもよい。従って、望ましくない免疫応答の低減は、下にある免疫応答の低減又は増加の何れであってもよい。潜在的な望ましくない免疫応答には、例えば、液性免疫応答、細胞性免疫応答、アレルギー応答、これらの免疫応答の任意の原因又は効果、中和抗体の産生、I g A抗体の反応性、I g D抗体に対する反応性、I g E抗体に対する反応性、I g G抗体に対する反応性、I g M抗体に対する反応性、B細胞活性化、T細胞活性化、NK細胞活性化、又はこれらの又は他の免疫反応及び相互作用の任意の組合せが含まれる。他の潜在的な望ましくない免疫応答には、例えば、液性免疫応答の欠如、細胞性免疫応答の欠如、アレルギー応答の欠如、これらの免疫応答の任意の原因又は効果の欠如、中和抗体産生の欠如、I g A抗体に対する反応性の欠如、I g D抗体に対する反応性の欠如、I g E抗体に対する反応性の欠如、I g G抗体に対する反応性の欠如、I g M抗体に対する反応性の欠如、B細胞活性化の欠如、T細胞活性化の欠如、NK細胞活性化の欠如、又はこれらの若しくは他の免疫反応及び相互作用の任意の組合せの欠如が含まれる。

#### 【0014】

望ましくない免疫応答がペプチド例えば食物アレルギーに対するアレルギー反応である場合には、変異型ポリペプチドを、関心あるポリペプチドの少なくとも1つの望ましい特性を保持しつつのI g E反応性の低減について試験することができる。この場合において、I g E反応性は、測定可能な免疫特性と考えられる。これらの変異型ポリペプチドをアレルギー疾患の免疫療法において使用すべき場合には、変異型ポリペプチドが保持すべき望ましい特性には、そのポリペプチドのT細胞活性化を媒介する能力及びアレルギー脱感作に關与する任意の他の免疫応答に参加する能力が含まれる。

#### 【0015】

この望ましくない免疫応答が治療用ポリペプチド例えばストレプトキナーゼ又はGM - C S Fの中和である場合には、これらの変異型ポリペプチドを、それらのポリペプチドによる、関心あるポリペプチドの少なくとも1つの望ましい特性を保持しつつの、I g G結合又はT細胞活性化の低減(及び/又は他の一般的免疫応答の局面又はメディエーター)について試験することができる。この場合に

において、I g G結合又はT細胞活性化は、測定可能な免疫特性と考えられる。関心あるポリペプチドがストレプトキナーゼである場合には、変異型ポリペプチドが保持すべき望ましい特性には、ストレプトキナーゼの血餅溶解能が含まれるべきである。関心あるポリペプチドがGM-CSFである場合には、測定可能な免疫特性は、I g G結合であってよく、望ましい特性は、GM-CSFの栄養活性であるべきである。

#### 【0016】

望ましくない免疫応答が治療用ウイルス、ウイルスベクター又はウイルスキャプシッド例えばレトロウイルスベクターの中和又は除去である場合には、ウイルスコートタンパク質を、関心あるポリペプチドとして用いることができる。これらの変異型ポリペプチド(ウイルスタンパク質の変異型)を、これらのポリペプチドによる、関心あるポリペプチドの少なくとも1つの望ましい特性を保持しつつ、T細胞活性化(及び/又は他の一般的免疫応答の局面又はメディエーター)の低減について試験することができる。この場合には、T細胞活性化を、測定可能な特性と考えることができる。関心あるポリペプチドがウイルスベースの治療剤中に存在するウイルスタンパク質である場合には、変異型ポリペプチドが保持すべき望ましい特性には、ウイルス又はキャプシッドのアセンブリ及び細胞への感染性又は侵入の媒介が含まれるべきである。

#### 【0017】

この免疫系のタンパク質に対する反応は、その関連する直鎖状及び/又は立体配座エピトープの検出に基づいている。エピトープを同定し又はタンパク質に対する免疫応答を変更する殆どの従来法は、関心あるタンパク質の個々のペプチド断片の試験を含んでいる。一般に、かかるペプチドは、タンパク質中に存在し得る立体配座エピトープを具体化せず、従って、かかる立体配座エピトープは、これらの技術によっては評価されない。かかる従来法は、直鎖状エピトープの同定には有用であるが、開示する方法は、関心あるポリペプチド上の直鎖状及び/又は立体配座エピトープが関係する免疫応答の低減に特に有用である。これは、この方法における突然変異誘発のための基質として用いる組換えポリペプチドが本質的に完全長であり、関心あるポリペプチドと構造的に類似のままであって本質

的に同じ立体配座エピトープをディスプレイしているので、可能である。

【0018】

開示する方法は、一層安全で且つ一層効き目のある形態のポリペプチドをデザインするのに特に有用であり、又はヒト、他の哺乳動物、又は他の動物への導入が意図される。特に、治療剤として若しくは治療剤において又は食品として用いられる一層安全な形態のポリペプチドを、開示する方法によって作成することができる。

【0019】

発明の詳細な説明

定義

アレルゲン。アレルゲンは、他のイソタイプの抗体に加えてIgE産生を誘出する抗原である。

【0020】

アレルギー反応。アレルギー反応は、主として皮膚(ウチカリア、脈管炎、そう痒)、呼吸器(ぜん鳴、咳、喉頭水腫、鼻漏、涙目/かゆい眼)、胃腸(嘔吐、腹痛、下痢)、及び循環器(全身性の反応が生じた場合)系を含む臨床症状を有するIgE媒介される免疫応答である。

【0021】

動物。ここで用いる場合、動物は、すべての動物界の多細胞のメンバーをいう。ヒト以外のすべての動物を、非ヒト動物という。

【0022】

抗体反応性。抗体反応性は、免疫グロブリンとポリペプチドとの間の特異的結合をいう。この特異的結合は、免疫グロブリン相互作用の顕著な特徴である抗原特異的結合の型をいう。

【0023】

抗原。抗原は、免疫応答例えば抗体産生(液性応答)又はT細胞の抗原特異的応答(細胞性応答)を誘出する分子である。

【0024】

対生物活性。対生物活性は、ポリペプチドが有し得る任意の生物学的効果又は

機能であってよい。例えば、対生物活性には、生体分子(例えば、レセプターリガンド)に対する特異的結合、酵素活性、ホルモン活性、サイトカイン活性及び生物学的活性の阻害又は他の生体分子との相互作用(例えば、レセプター結合のアゴニスト及びアンタゴニスト)が含まれる。

【0025】

細胞。用語細胞、細胞株及び細胞培養物は、ここでは、交換可能に用い、かかる呼称は、すべて、子孫の細胞を包含する。

【0026】

コードする。タンパク質、ペプチド、ポリペプチド又はアミノ酸配列をコードするとして言及される核酸は、その核酸のヌクレオチド配列が、そのタンパク質、ペプチド、ポリペプチド又はアミノ酸配列のアミノ酸を特定するコドンに対応することを意味する。

【0027】

エピトープ。エピトープは、約6～15アミノ酸のアミノ酸モチーフを有し、抗原提示細胞により主要組織適合性抗原複合体(MHC)と共に提示された場合に、免疫グロブリンが結合し又はT細胞レセプターが認識し得る結合部位である。直鎖状エピトープは、アミノ酸が単純な直鎖状配列のコンテキストにおいて認識されるものである。立体配座エピトープは、アミノ酸が特定の三次元構造のコンテキストにおいて認識されるものである。

【0028】

発現。発現は、コードされた遺伝情報に影響を与える任意の又はすべてのステップをいい、転写、RNAプロセッシング、翻訳、翻訳後プロセッシング、輸送、及びポリペプチド活性又は機能を含む。従って、例えば、ポリペプチドを生成する核酸の発現は、核酸の転写及びポリペプチドを生成する転写物の翻訳をいう。

【0029】

発現用配列。発現用配列は、特定の宿主せいぶつにおいて、操作可能に結合されたコード配列の発現に必要な核酸配列をいう。核酸は、他の核酸と機能的関係になるように配置された場合に、他の核酸に操作可能に結合される。

## 【0030】

免疫特性。免疫特性は、免疫応答又は免疫系の分子若しくは細胞と、関与し、相互作用し、応答し又は関連する分子の任意の特性である。特に有用な免疫特性は、測定することのできるもの(測定可能免疫特性)及び免疫応答と相関し及び/又は関係するものである。免疫応答は、免疫特性の形態であってよい。

## 【0031】

免疫応答。免疫応答は、動物の体内において免疫系が媒介し又は関与する任意の効果である。免疫応答は、免疫系の分子と細胞の直接的反応及び応答並びに免疫系の刺激から生じる任意の間接的反応及び効果を含む。免疫応答は、任意の抗体反応性、免疫応答例えば液性免疫応答、細胞性免疫応答、及びアレルギー応答、T細胞、B細胞及びNK細胞の活性化、及び他の免疫系細胞例えばマクロファージ、マスト細胞、好塩基球、好酸球及び樹状細胞の変化した機能を含む(例えば、Abbas等、Cellular and Molecular Immunology(W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1994)参照)。免疫応答は又、免疫系刺激の効果例えばヒスタミンその他の炎症メディエーターが放出又は生成された場合のアレルギー反応の効果をも包含する。

## 【0032】

免疫調節剤。免疫調節剤分子又はポリペプチドは、免疫応答又は免疫系分子の特徴又は状態を変更する分子である。免疫調節剤分子の例には、アジュバント及びインターロイキンが含まれる。

## 【0033】

哺乳動物。哺乳動物は、ヒト、家畜例えばウシ、ヒツジ、ヤギ及びウマ、並びにペット例えばネコ及びイヌのすべての種類の哺乳動物をいう。ヒト以外のすべての哺乳動物を、非ヒト哺乳動物という。

## 【0034】

測定可能な免疫特性。測定可能な免疫特性は、アッセイにおいて測定し或は評価することのできる免疫特性である。ポリペプチドの測定可能な特性は、開示する方法により評価されるものである。一般に、測定可能な免疫特性は、望ましくない免疫応答と関係する特性であり、この測定可能な免疫特性の変化は、免疫応

答の変化を指示し又は予言する。望ましくない免疫応答と関係する測定可能な免疫特性は、動物における実際の免疫応答の少なくとも一の成分の測定の指標又はスタンディングとして利用することができる。

【0035】

単一特異性抗体。単一特異性抗体(又は、抗体断片)は、単一のエピトープを認識する抗体である。

【0036】

突然変異誘発された。突然変異誘発された核酸及び突然変異した核酸は、ヌクレオチド配列の変化(ここでは、突然変異という)を含むように作られ又は処理された核酸をいう。核酸の突然変異誘発は、突然変異誘発された核酸を生成する処理をいう。ランダムに突然変異誘発された核酸とは、核酸内に、種類及び位置の両方において多かれ少なかれランダムに分布した様々な突然変異を集合的に含む突然変異誘発された一群の核酸をいう。

【0037】

変異型ポリペプチド。変異型ポリペプチドは、関心あるポリペプチドと比較して変化したアミノ酸配列を有する関心あるポリペプチドの型をいう。

【0038】

核酸。核酸は、ポリヌクレオチド分子又はポリヌクレオチド分子のセグメントをいう。好ましくは、開示する方法で用いるための核酸は、RNA又はDNAよりなる。

【0039】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質。タンパク質は、100アミノ酸より大きいアミノ酸の鎖又はかかるアミノ酸鎖の会合多量体をいう。ペプチドは、5～99アミノ酸のアミノ酸鎖をいう。5～99アミノ酸の任意のサブレンジのペプチドを特に別々に企図する。開示する方法で用いるのに好適なペプチドは、1つのエピトープを含むペプチドである。ここで用いる場合、ポリペプチドは、タンパク質又はペプチドをいう。立体配座エピトープを有するポリペプチドは、立体配座エピトープを有するタンパク質及びペプチドをいう。ランダム変異型ポリペプチドは、一群のランダムに突然変異誘発された核酸によりコードされる変異型

ポリペプチドをいう。

【0040】

関心あるポリペプチド。ここで用いる場合、関心あるポリペプチドとは、開示する方法の焦点である元のポリペプチドをいう。関心あるポリペプチドとは、開示する方法により生成される変異型の非変異型ポリペプチドである。用語「非変異型」の使用は、非変異型ポリペプチドが、如何なる厳密な意味で非変異型であることをも意味しない。むしろ、この用語は、単に、関心ある元のポリペプチドと開示する方法により生成された変異型ポリペプチドとの関係を反映するように用いられる。従って、例えば、ポリペプチドの「変異」型は、関心あるポリペプチドとして用いることができ、このコンテキストにおいて、「非変異型」ポリペプチドとなる。

【0041】

望ましくない免疫応答。好ましくない免疫応答は、主観的に望ましくない任意の免疫応答である。従って、一のコンテキストにおいて望ましくない免疫応答は、別のコンテキストにおいて望ましいかもしれない。

【0042】

説明

関心あるポリペプチドに対する望ましくない免疫応答を低減させ又は排除するために、開示する方法は、関心あるポリペプチドの変異型のプールを利用し、このプールから望ましくない免疫応答の誘出について一層低い潜在能力を有する型を同定する。この開示する方法は、望ましくない免疫応答を媒介する関心あるポリペプチド上の特定のエピトープの如何なる知識も必要としない。この開示する方法は又、望ましくない免疫応答の誘出について一層少ない潜在能力を有するポリペプチドを、たとえそのポリペプチド上の複数のエピトープが望ましくない免疫応答を引き起こすことに関与していても、同定することができるという利点も有する。これは、開示する方法の殆どの具体例が、変異型ポリペプチドを、個々のエピトープに特異的な免疫グロブリン又はそれらの誘導體に対して試験することを含んでいるので可能である。もし望ましくない免疫応答を破壊し又は低減させるのに複数の変異体が必要であるならば、それらを、開示する方法を用いて個

々に同定してから複数の変異を含む単一ポリペプチドに結合することができる。

#### 【0043】

開示する方法により低減させ又は排除すべき望ましくない免疫応答には、主観的又は客観的に望ましくない任意の免疫応答を包含することを意図している。例えば、哺乳動物に導入されたウイルスを中和し又は除去する免疫応答は、ウイルス感染の場合には望ましいが、ウイルスベースの治療の場合には望ましくない。開示した方法については、任意の免疫応答を望ましくない免疫応答として見ることができる。一般に、必要とされるすべては、標的免疫応答が望ましくないという主観的信念である。

#### 【0044】

望ましくない免疫応答は、多くの形態を取り得る。例えば、患者に導入されるタンパク質及びペプチドが免疫応答を刺激することは、珍しいことではない。外来タンパク質を身体から排除するのに役立つ免疫応答は、治療剤の効果をその治療用タンパク質を身体から除去することにより又はそれが所望の効果を有するのを阻止することにより劇的に低減させ得る。この例は、GM-CSFであり、GM-CSF機能を中和する抗体が、患者の約40%において生じる(Wadhwa等、Clin and Exp.Immunol.104:351-358(1996))。同様に、Rosenchein等、Israel J.Med.Sci.27:541-545(1991))は、ストレプトキナーゼに対する非威嚇的免疫応答を報告したが、Lantin等、Clin and Exp.Rheumatology 12:429-433(1994)及びZilliox等、J.Clin.Immunol.13:415-423(1993)は、一層重大な免疫応答を報告した。治療目的のために加えたウイルスに対する望ましくない免疫応答も又、記載された(DeMatteo等、Transplantation 63:315-319(1997))。他のポリペプチドは、IgA、IgD、IgE、IgG又はIgM応答を低減させ、又は液性免疫応答よりも細胞性免疫応答を刺激することができる。導入されたタンパク質は、客観的に望ましくない免疫応答例えばアレルギー反応をも生成し得る。

#### 【0045】

幾つかの免疫応答は、免疫グロブリンにより媒介され、開示する方法は、ポリペプチドとかかる免疫グロブリンとの間の反応を利用して、変異型ポリペプチドによる免疫応答の潜在能力の低減の時期を評価する。この目的のためには、免疫

応答に關与する特定の種類の免疫グロブリン(又は、それらの誘導体)をこの開示する方法において用いるべきである。他の免疫応答は、免疫系細胞により媒介される。免疫特性及び免疫応答を評価するための多くの技術が開発されてきており、望ましくない免疫応答の誘出の一層低い潜在能力を有するポリペプチドを同定するために開示する方法において用いることができる。かかる免疫アッセイで用いるための免疫グロブリン及び免疫系細胞を操作するための多くの技術も公知であり、免疫グロブリンライブラリー、組換え免疫グロブリン及び免疫グロブリン断片の作成を含む。

#### 【0046】

開示する方法は、関心あるポリペプチドと反応する免疫グロブリン(又は、対応する免疫グロブリン断片又は免疫系細胞)だけを用いることにより最も効率的に実施される。この方法により、関連免疫相互作用が評価される。ポリペプチドに対する望ましくない免疫応答に關与することが知られているか又は疑われている免疫グロブリン(又は、誘導体)だけを用いるのが最も好ましい。これらのゴールを達成する効果的な手段は、関心あるポリペプチドに対する望ましくない免疫応答を示す患者に由来する免疫グロブリンを利用することである。

#### 【0047】

免疫グロブリン(及び関連する誘導体)には、I g A抗体、I g D抗体、I g E抗体、I g G抗体及びI g M抗体が含まれる。開示する方法に適した免疫系細胞には、B細胞、T細胞、NK細胞、マクロファージ、マスト細胞、好塩基球、好酸球、樹状細胞及び他の免疫系細胞が含まれる。かかる免疫グロブリン及び免疫系細胞の特性、機能、製造法及び利用は、一般に公知である(Abbas等、Cellular and Molecular Immunology(W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1994); Johnstone and Thorpe, 「Immunochemistry in Practice」第三版(Blackwell Science Publications, Oxford, 1996); Harlow and Lane, 「Antibodies-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor, 1988), 「Monoclonal Antibodies」(Kennett等、編、Plenum Press, 1980); Steward and Steensgaard, 「Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance」(CRC Press, 1983))。かかる技術の例は、以下に記載する。

## 【0048】

望ましくない免疫応答が食物アレルゲン等のポリペプチドに対するアレルギー反応である場合には、変異型ポリペプチドを、それらのポリペプチドの、関心あるポリペプチドの少なくとも1つの所望の特性を保持しつつの、I g E 反応性の低減について試験することができる。この場合には、I g E 反応性は、アレルギー反応を媒介するので、測定可能な免疫特性と考えられ得る。これらの変異型ポリペプチドを、好ましくは、関心あるポリペプチドと反応性であって且つ関心あるポリペプチドに対してアレルギー性である患者から得られたの一組のI g E 抗体(又は、抗体断片)に対して試験する。これは、関連エピトープが変異されることを一層ありそうにする。これらの変異型ポリペプチドを免疫療法で用いる場合には、変異型ポリペプチドにより保持されるべき望ましい特性には、そのポリペプチドのT細胞活性化及び他の任意の脱感作に關与する免疫応答を媒介する能力が含まれる。

## 【0049】

望ましくない免疫応答が治療用ポリペプチド例えばストレプトキナーゼ又はGM - C S F の中和である場合には、これらの変異型ポリペプチドを、I g G 結合又はT細胞活性化(及び/又は全身性免疫応答の局面又はメディエーター)の、ポリペプチドによる、関心あるポリペプチドの少なくとも1つの望ましい特性を保持しつつの低減について試験することができる。種々の免疫応答が、ストレプトキナーゼ又はGM - C S F の導入により刺激され得る。これらの場合に、I g G 結合又はT細胞活性化は、測定可能な免疫特性と考えられ得る。関心あるポリペプチドがストレプトキナーゼである場合には、変異型ポリペプチドにより保持されるべき望ましい特性は、ストレプトキナーゼの血餅溶解能(即ち、ストレプトキナーゼを有用にする活性)を包含すべきである。関心あるポリペプチドがGM - C S F である場合には、変異型ポリペプチドにより保持されるべき望ましい特性は、GM - C S F の栄養活性である。

## 【0050】

望ましくない免疫応答が治療用のウイルス、ウイルスベクター又はウイルスキャプシッド例えばレトロウイルスベクター中和又は除去である場合には、ウイル

スコートタンパク質を、関心あるポリペプチドとして用いることができる。これらの変異型ポリペプチド(ウイルスタンパク質の変異型)を、T細胞活性化、免疫グロブリン結合、及び/又は全身性免疫応答の局面若しくはメディエーターの、これらのポリペプチドによる、関心あるポリペプチドの少なくとも1つの望ましい特性を保持しつつの低減について試験することができる。この場合には、評価されるT細胞活性化、免疫グロブリン結合、又は他の全身性免疫応答の局面若しくはメディエーターが、測定可能な免疫特性と考えられ得る。これらの変異型ポリペプチドにより保持されるべき望ましい特性には、ウイルス又はキャプシッドアセンブリ及び感染性又は細胞への侵入の媒介が含まれるべきである。即ち、これらのウイルスタンパク質は、治療目的を媒介することのできる感染性粒子へのアセンブリが可能であるべきである。この目的のためには、感染性は、細胞への侵入及びウイルス遺伝子の発現(適当であれば)をいうが、必ずしも病原性とは限らない。

#### 【0051】

##### 方法

開示する方法は、変異型ポリペプチドのコレクションを用意し、各変異型ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも1つの位置で関心あるポリペプチドと異なり、関心あるポリペプチドより一層少ない望ましくない免疫応答を示し且つ少なくとも1つの望ましい特性を依然として保持している変異型ポリペプチドを同定することを含む。変異型ポリペプチドのコレクションは、関心あるポリペプチドをコードする核酸の突然変異を誘発し、突然変異を誘発された核酸を発現させて変異型ポリペプチドを生成することにより用意することができる。これらの望ましくない免疫応答を一層少し発現する変異型ポリペプチドは、その望ましくない免疫応答と関連する測定可能な免疫特性の変化を同定することにより同定することができる。例えば、望ましくない免疫応答は、この方法により評価される測定可能な免疫特性により媒介され得て、この評価される測定可能な免疫特性は、望ましくない免疫応答に関与し得、又はそれ自体が望ましくない免疫応答であり得る。かかる関係は、相互に排他的でなく且つ多数の評価される測定可能な免疫特性と望ましくない免疫応答との間の関係が企図され、開示する方法において、

標的とされ得る。

### 【0052】

#### A. 核酸の突然変異

開示する方法において、関心あるポリペプチドをコードする核酸を、先ず、突然変異誘発して、一組のランダムに変異したポリペプチドを集合的にコードする一組のランダムに変異誘発された核酸を生成することができる。これらの変異型ポリペプチドは、免疫応答を誘出し得ないか一層少なく誘出するポリペプチドを選択する原料である。核酸の突然変異誘発を、変異を誘発された核酸の製造方法という。ここで用いる場合、突然変異誘発は、核酸の変化を造る如何なる特定の方法にも限定されない。例えば、突然変異誘発は、決定前の配列(たとえ変化していても)の核酸の化学合成並びに忠実度の低いPCR及び遺伝子変異を造る伝統的方法を包含する。ランダムに変異誘発された核酸とは、種類と位置の両方において、核酸中に多かれ少なかれランダムに分布された様々な突然変異を集合的に含むように突然変異誘発された一群の核酸をいう。しかしながら、突然変異誘発方法がある種の変異だけが形成されるか又はある種の変異が他よりも優先的となるようなものである場合にも、それらの核酸は、やはりランダムに変異誘発された核酸と呼ばれるということは理解される。かかるランダムに変異誘発された核酸の製造方法は、ランダムな又は位置指定でない変化を含む必要はない(該変化が好適であろうが)ということも理解される。必要とされるすべては、一組の核酸が種類と位置の両方においてその核酸中に多かれ少なかれランダムに分布された様々な突然変異を集合的に含むという結果である。

### 【0053】

この核酸は、任意の適当な技術を用いて突然変異誘発することができる。突然変異誘発の多くの方法は、公知であり、開示する方法において用いることができる。ランダム突然変異誘発法即ち位置指定でない方法が、好ましい。好適な方法には、低忠実度PCR増幅、化学的突然変異誘発、又はX線による突然変異誘発が含まれる。

### 【0054】

この突然変異誘発のステップは、低忠実度PCRを含む後述の実施例によって

説明され得る。低忠実度PCRを用いて、関心あるポリペプチドをコードする核酸のランダム突然変異誘発を実施する場合には、Parent及びDevreotes(Parent及びDevreotes, J.Biol.Chem.270:22693-22696(1995))により記載されたような技術を用いることができる。簡単にいえば、関心あるポリペプチドをコードする核酸(例えば、そのポリペプチドをコードするcDNAを含むプラスミド)をPCR反応におけるテンプレートとして用いることができる。これらのプライマーは、関心あるポリペプチドの全コード配列又はその一部分を増幅するように選択することができる。これらのプライマーは、PCR生成物を直接発現ベクター中にサブクローン化し(全ポリペプチド配列を増幅する場合)又は発現ベクター中に予め挿入してあるポリペプチド配列の適当な部位にサブクローン化する(抗原配列の一部分を増幅する場合)ことを容易にし得る制限部位をコードしている。後者は、このポリペプチドの一部分に対する突然変異誘発を可能にする。

#### 【0055】

次いで、PCRを、ポリメラーゼが取り込みエラーをしやすくなる条件下で実施することができる。かかる条件は、例えば、5ユニットのTaqポリメラーゼの、6mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM MnCl<sub>2</sub>、10mM トリスHCl(pH8.3)、50mM KCl、0.01%ゼラチン、0.5mM dATP及び各1mMのdCTP、dTTP及びdGTPの存在下での利用を含む。このPCRプロトコールの温度及びステップ持続時間は、各ポリペプチド配列及びプライマーセットについて、公知技術を用いて最適化することができる。一般に、PCRの30サイクルを行うべきである。PCR増幅に続いて、その生成物を適当な制限酵素で切断して発現ベクター中にサブクローン化することができる。その結果生成した関心あるポリペプチドをコードするランダムに変異した核酸を含む発現プラスミドのライブラリーを、細菌(又は、他の適当な細胞)中にトランスフォームして発現させることができる。

#### 【0056】

他のPCR突然変異誘発技術の例は、Parikh及びGuengerich, Biotechniques 24(3):428-31(1998); Loreno及びBlasco, Biotechniques 24(2):308-13(1998); Lin-Goerke等、Biotechniques 23(3):409-12(1997); Kawasaki等、J.Biol.Che

m.272(25):15668-74(1997) ; Burns等、J.Biol.Chem.271(27):15879-83(1996) ; 及びLight及びLerner, Bioorgan.Medicinal Chem.3(7):955-67(1995)により記載されている。ランダムな化学的変異誘発の例は、Encell等、Cancer Res.58(5):1013-20(1998)により記載されている。Zaccolo等、J.Mol.Biol.255(4):589-603(1996)は、DNA合成中のヌクレオシド類似体の取り込みを含む突然変異誘発の方法を記載している。Little等、J.Biotechnology 41:187-95(1995)は、ランダムオリゴヌクレオチドを用いるランダム突然変異誘発の方法を記載している。これらの方法及びその他を開示する方法において用いることができる。

#### 【0057】

関心あるポリペプチドをコードする核酸を、それを発現させるベクターに挿入する前に突然変異を誘発することは、好適である。これは、ベクター又は発現配列に対する偽の突然変異を排除する。しかしながら、これは、殆どの偽のベクターの変異はポリペプチドの発現を阻止するので、必須ではない。関心あるポリペプチドを他のポリペプチド(免疫調節性ポリペプチド又はレポータータンパク質等)に融合すべきである場合には、関心あるポリペプチドをコードする核酸を別々に突然変異誘発するか又は融合タンパク質をコードする核酸を突然変異誘発することができる。ポリペプチドの融合とは、2つ以上のポリペプチドの任意の結合(好ましくは、通常のペプチド結合)をいう。関心あるポリペプチドをコードする核酸を、別々に突然変異誘発して、他のポリペプチドにおける望ましくない突然変異を回避することは、好ましい。

#### 【0058】

##### B. 核酸の発現

突然変異誘発後に、その突然変異を誘発された核酸を発現させて、コードされている変異したポリペプチドを生成する。発現は、任意の適当な遺伝子発現技術を用いて達成することができる。例えば、適当な発現系が、細菌細胞、酵母細胞、他の菌類細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、及びイン・ビトロ合成について利用可能である。多くのかかる技術は、公知であり、殆どを開示する方法で用いることができる。変異型ポリペプチドの発現のための幾つかの例は、Methods in Enzymology, 第153巻、第23-34章(Wu及びGrossman編、Academic Press, 1987)及びT

he 1995 Lab Manual Source Book(Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1995)に記載されている。突然変異誘発された核酸の発現は、公知の発現用配列、ベクター及び細胞株により促進される。必要とされるすべては、変異型ポリペプチドの免疫応答又は測定可能な免疫特性が測定でき又は検出できるような変異型ポリペプチドの発現である。多くの場合に、これは、変異型ポリペプチドの精製を必要としない。

#### 【0059】

開示する方法で用いる変異型ポリペプチドを、関心あるポリペプチドをコードする核酸を突然変異誘発した後にその変異誘発された核酸を発現させることにより用意するのが好適であるが、これは、必須ではない。変異型ポリペプチドは、適当な方法を用いて生成することができる。例えば、これらのポリペプチドは、直接的化学合成により又はペプチドの化学的若しくは酵素的結合により作成することができる。

#### 【0060】

##### C. 低い免疫応答を誘出する突然変異ポリペプチドの同定

突然変異した核酸が発現した後、低い免疫応答を誘出する突然変異ポリペプチドを同定する。望ましくない免疫応答を誘出する突然変異ポリペプチドの可能性は、望ましくない免疫応答に関連する測定可能な免疫特性の評価に用いるアッセイを含む、いずれかの適切なアッセイを用いて評価することができる。例えば、測定可能な免疫特性が抗体に対して反応性である場合、突然変異ポリペプチドを個々の抗体または抗体フラグメントに曝露することによって、低い反応性のポリペプチドが選択される。可能な場合には、突然変異ポリペプチドを、個々の抗体または抗体フラグメントに対して試験すべきである。というのは、個々の突然変異体が、対象のポリペプチドと反応するすべての抗体に対して、低減された反応性を有すると期待できないからである。突然変異ポリペプチドは、対象のポリペプチドに対して反応性である抗体または抗体フラグメントに対してのみ試験することが好ましい。抗体または抗体フラグメントは、対象のポリペプチドに対して反応性の望ましくない抗体を示す、またはその抗体にかかりやすい患者もしくは他の動物由来であることもまた好ましい。

## 【0061】

例えば、その抗体または抗体誘導体は、組換えFabフラグメント、ヒトもしくはマウスなどの哺乳類のハイブリドーマから調製されたモノクローナル抗体、またはポリクローナル血清から分別された単一特異的抗体である。抗体および抗体フラグメント両方を個々に、ライブラリーの一部として調製する方法を以下に説明する。これらのいずれかまたは抗体の他のソースを用いることが可能である。抗体反応性は、免疫沈降反応、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫放射定量測定法(IRMA)、および酵素免疫測定法(ELISA)など、多くの適切な方法のうちの1つを用いて測定することができる。抗体反応性を決定するのに用いる、これらの方法および他の有用な方法は、Johnstone およびThorpe著「Immunochimistry in Practice」, Third Edition (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1996年)に記載されている。

## 【0062】

開示の方法における同定ステップを、突然変異したポリペプチドのバクテリオファージディスプレイライブラリーを含む以下の例により説明する。レプリカ法により、ライブラリーをフィルター上に移し、突然変異したポリペプチドの発現を誘導する(例えば、IPTGでフィルターをインキュベーションすることによって)。次いで、細菌のコロニーを溶解し、3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有するリン酸緩衝液(PBS)などの溶液を用いてインキュベーションすることによって、非特異的結合部位をブロックする。続いて、対象のポリペプチドに対する抗体(または誘導体)で、フィルターをインキュベーションする。このインキュベーションの後、繰り返し洗浄して、結合していない抗体を除去する。

## 【0063】

次いで、結合していない抗体を検出する。例えば、検出可能なレポーターに結合した二次抗体を用いてインキュベーションすることによって、結合していない抗体を検出することが可能である。このレポーターは、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)または蛍光色素(フルオレセインもしくはローダミンなど)である。組換えFabの場合には、緑色蛍光タンパク質(GFP)をエンコードする配列を、Fab自体をエンコードする

配列の後ろにつなげ、したがって、検出可能な標識を直接 Fab に融合することができ、その結果、標識付けした二次抗体でインキュベーションする必要がなくなる。結合していない二次抗体を洗浄によって除去し、酵素アッセイまたは蛍光の測定によって、結合していない二次抗体を検出することができる。したがって、抗体と反応しないそれらのクローンは、測定可能な免疫特性（抗体反応性）が低く、望ましくない免疫応答を誘出する可能性が低い、突然変異ポリペプチドが産生する際に同定される。対応するクローンを選択かつ増大し、その突然変異ポリペプチドをエンコードする DNA を回収し、シーケンシングする。

#### 【0064】

免疫応答、T細胞活性化およびB細胞活性化を検出および測定する技術は公知であり、開示の方法において免疫応答を誘出する可能性を評価するのに用いることができる。例えば、突然変異ポリペプチドが、T細胞を活性化する能力を保持しているかどうか決定するため、Current Protocols in Immunology, volume 1, pages 3.12.1ff (Coligan他, eds., John Wiley and Sons)に記載の以下に示す標準アッセイを行う。対象のポリペプチドに対する免疫応答を発現するヒトまたは他の哺乳類の末梢血リンパ球を、フィコールヒストパックを用いて全血液から単離する。回収した個々の細胞を洗浄し、濃度  $4 \times 10^6$  cells/ml で培地中に浮遊させる。増殖アッセイについては、 $2 \times 10^5$  PBLs/well で 96 ウェルプレートの中の6ウェルを、培地（対照）または適切な量のポリペプチドを用い、 $37^\circ\text{C}$  で3倍に刺激する。96 ウェルプレート中の細胞を、培地がない状態かつポリペプチドの存在下で6日間増殖させる。6日目に、放射性チミジン ( $1 \mu\text{Ci/well}$ ) で細胞を処理し、 $37^\circ\text{C}$  で6~8時間、再度インキュベーションし、ガラス繊維フィルター上に採取する。増殖細胞DNA中への [ $^3\text{H}$ ] - チミジンの取り込みを定量することによって、T細胞の増殖を推定する。 [ $^3\text{H}$ ] - チミジンの取り込みは、培地で処理された（対照）細胞 上での刺激指数 (SI) として記録する。2.0を超えるSIを誘導するポリペプチドはいずれも、刺激となるとみなされる。

#### 【0065】

抗体活性および免疫応答を検出および決定する他の有用な技術の多くは、Harl

ow およびLane著,「Antibodies A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor, 1988年),「Monoclonal Antibodies」(Kennett 他, eds., Plenum Press, 1980年), StewardおよびSteensgaard著,「Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance」(CRC Press, 1983年)に記載されている。

公知のアレルゲンの場合には、既に使用されているポリペプチドを主成分とする薬剤(例えば、ストレプトキナーゼ)、または既に試験済みのポリペプチドを主成分とする薬剤、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を、本明細書における他の場合に記載されるように誘導することができる。本明細書における他の場合に記載されるように、組換え免疫グロブリンファージディスプレイライブラリーの作製に使用される末梢血単球のソースとして、アレルゲンに対して既にアレルギーがあるか、または薬剤にさらされている患者(または試験対象)を用いることが好ましい。望ましくない免疫応答を示すかかる個体を、そのソースとして用いることがさらに好ましい。免疫グロブリンファージディスプレイライブラリーの種類(IgG、IgE、IgA、IgD、IgM)は、特定のポリペプチドに関連する免疫応答の特性に合わせることができる。

#### 【0066】

その関連する反応性モノクローナル免疫グロブリン種を、対象のポリペプチド(つまり、非突然変異ポリペプチド)でパニングすることによって選択し、続いて、それを用いて、低い反応性の突然変異ポリペプチドを開示の方法で同定する。

まだ使用または試験されていない、新規なポリペプチドを主成分とする薬剤(または他のポリペプチド)の場合には、そのポリペプチドを動物に投与し、組換え免疫グロブリンファージディスプレイライブラリーの作製にその末梢血単球を用いる。代替方法としては、ハイブリドーマの産生に用いる標準方法によって、ポリペプチドを主成分とする薬剤に対するモノクローナル抗体を直接産生する。この方法により、免疫応答を誘出する可能性を低減する手法において、ポリペプチドを変更することが可能となる。

#### 【0067】

既にヒトで試験済みのそれらのポリペプチドに、動物モデルを用いる方法の代

替方法は、「ナイーブな」個体（つまり、ポリペプチドに曝露されていない個体）から、組換え組合せファージディスプレイ免疫グロブリンライブラリーを作製することを含む。適切な抗原に応答するクローン増殖を受けていないB細胞が低多重度で存在するが、潜在的体液性応答の代表的なレパートリーは、非免疫個体のB細胞に存在する。代表的な「ナイーブな」組合せライブラリーを作製する方法が開発されている（Sodoyer 他, Human Antibodies 8: 37-42 (1997年)）。かかる方法を用いて、対象の抗体と反応する組換えFabまたは他の抗体フラグメントを産生することができる。次いで、これらのエピトープ特異的モノクローナル組換え抗体を開示の方法で用いて、抗体結合を低減または排除する突然変異についてスクリーニングすることができる。完全なB細胞レパートリー中に存在する可能性があるポリペプチド特異的免疫グロブリンとの反応性を排除するため、突然変異を誘発することによって、まだ使用または試験されていないタンパク質を主成分とする薬剤が、望ましくない免疫応答を誘出する可能性を低減することが可能なはずである。望ましくない低い免疫応答を誘出するポリペプチドの形状を同定すれば、種々の望ましくない免疫応答の導入または他の副作用について、さらにこれらのポリペプチドを試験することが可能である。

#### 【0068】

望ましくない免疫応答を誘出する可能性を決定する前に、発現した突然変異ポリペプチドをスクリーニングし、フレームシフトおよび大きな欠失などの著しい突然変異を有するものを除去することが好ましい。これは、レポータータンパク質を用いて、融合タンパク質としての突然変異ポリペプチドを発現させることによって行うことが好ましい。著しい突然変異のほとんどの場合、レポータータンパク質は発現しないか、または機能しない。したがって、レポータータンパク質をサーチし、そのレポータータンパク質が発現していない突然変異タンパクを除去することによって、著しい突然変異をスクリーニングする。

#### 【0069】

対象のポリペプチドをエンコードする、突然変異した核酸を挿入する場合には、その検出可能なレポーターが突然変異ポリペプチドのCOOH末端につながる融合タンパク質を形成するよう、レポーター配列を配列すべきである。例えば、

そのポリペプチドの終止コドンを除去し、同一の読み枠内でレポーターをエンコードする配列の後ろに、ポリペプチドをエンコードする配列をつなげるように、突然変異生成で用いられる3'PCRプライマーを設計することによって、これを達成することができる。その検出可能なレポーターは、例えば酵素（ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなど）または蛍光色素（緑色蛍光タンパク質など）または単一特異的抗体により識別されるエピトープ標識である。次いで、突然変異した融合核酸のセットを、望ましくない免疫応答（上述の）を誘出する可能性およびCOOH末端レポーターの発現の両方について、スクリーニングする。レポーターを発現するが、測定可能な免疫特性の低減を示すクローンのみを、さらに研究するために選択すべきである。それらのクローンのみを選択することによって、望ましくない免疫応答を誘出する可能性を排除または低減する突然変異は、大きな欠失、早期終結、フレームシフト、もしくは他の著しい突然変異にほとんど起因しないことが立証される。例えば、GFPをCOOH末端レポーターに用い、抗原に結合する抗体をレポートするのにローダミン共役二次抗体を用いる場合には、GFPを産生するコロニーだけでなくローダミン蛍光シグナルも保持すべきである。適切な二次抗体および融合タンパク質レポーター（例えば、2種の蛍光標識）を選択することによって、開示の方法における検出ステップをオートメーション化することができる。

上述のようにスクリーニングした後、望ましくない免疫応答が低減されているか、または排除されているかどうかを評価することによって、同定した突然変異ポリペプチドをさらに試験する。

#### 【0070】

#### D. 突然変異の組合せ

所望の特性を保持し、低程度の測定可能な免疫特性または望ましくない免疫応答を誘出する突然変異ポリペプチドを同定すれば、個々の突然変異ポリペプチドにおける突然変異を同定することができる。ひとたび同定すれば、その突然変異を単一の突然変異ポリペプチドに組合せて、さらに低程度の望ましくない免疫応答を誘出する突然変異ポリペプチドを産生することができる。例えば、複数の抗体は、付与のポリペプチドに対する、望ましくない免疫応答の要因となるか、ま

たは望ましくない免疫応答に関係することがあるため、これが望ましい。ひとたび複数の突然変異を1つのポリペプチドに組合せたなら、そのポリペプチドを所望の特性の保持しているか試験すべきである。

#### 【0071】

単一ポリペプチド中の様々な突然変異の組合せは、いずれかの適切な組換えDNA技術を用いて達成することができる。かかる多くの技術は公知であり、かつ利用可能である。例えば、特定の第二突然変異をエンコードするために、核酸配列が変更されるような第一突然変異ポリペプチドをエンコードする核酸の部位特異的突然変異誘発によって、1つの突然変異を他のもう1つの突然変異と組合せることが可能である。

#### 【0072】

開示の方法で同定された突然変異ポリペプチドは、治療または食物としての目的が含まれるいずれかの所望の目的で、動物に導入するのに有用である。低減または排除された測定可能な免疫特性により、望ましくない免疫特性のリスクが低減されるはずである。

#### 【0073】

##### E. 所望の特性を保持する突然変異ポリペプチドの同定

突然変異ポリペプチドをスクリーニングし、1種または複数種の所望の特性を保持するものを同定することもまた可能である。保持する好ましい特性には、T細胞活性化、酵素活性、生物活性、およびアレルギーの脱感作を促進する能力が含まれる。かかる特性を検出するのに用いる方法は、含まれる特性によって異なる。一般に、所望の特性は、対象のポリペプチドについて公知の特性、かつ検出方法が利用可能な特性であることが企図される。抗体反応性およびT細胞活性化などの一部の特性は、含まれる特定のポリペプチドに依存しない、一般化された技術を用いて測定することができる。かかる方法は公知であり、開示の突然変異ポリペプチドのいずれにも適用することができる。所望の場合には、複数の所望の特性を保持するかどうか、突然変異ポリペプチドをスクリーニングすることが可能である。所望の特性がT細胞活性化である場合には、かかる活性化を上述のように測定することが可能である。最終的に、開示の方法の一部として行わない

場合には、同定したポリペプチドを、ヒト、他の哺乳類、または他の動物での望ましくない免疫応答の低減および所望の効果の保持について試験することができる。

#### 【0074】

低減された測定可能な免疫特性を有する突然変異ポリペプチドの同定および1種または複数種の所望の特性を保持する突然変異ポリペプチドの同定は、任意の順序で、または同時に行うことが可能である。つまり、低程度の望ましくない免疫応答を示す、または望ましくない免疫応答を示す可能性が低い突然変異ポリペプチドの同定は、所望の特性を保持する突然変異ポリペプチドを同定する前、同時に、またはその後に行う。その特性のうちの1つを最初にスクリーニングする場合には、最初のスクリーニングで同定された突然変異ポリペプチドのみを第二の同定にかけることが好ましい。例えば、低程度の望ましくない免疫応答を示す、または望ましくない免疫応答を示す可能性が低い、突然変異ポリペプチドのセットを最初に同定する場合には、同定されたポリペプチドのみ、所望の特性を保持しているか試験する必要がある。

#### 【0075】

##### F. 実例

開示の方法がアレルゲンのコンテキストでどのように使用できるのか、その例を以下に説明する。アレルギー性疾患は、ヒトに影響を及ぼす、よく知られた健康上の問題である。マスト細胞表面のレセプターに結合したIgE抗体が抗原により架橋した際に、活動を誘発するマスト細胞または関連する細胞により、ヒスタミンおよび他の炎症性メディエーターが産生および放出することによってアレルギーが表れる。回避する以外に、症状を緩和することのみ可能な薬剤（例えば、抗ヒスタミン薬、鬱血除去剤、およびステロイド）は好ましくない副作用を有し、往々にして一時的な緩和を提供するのみであって、アレルギーに対して現在医学的に認められている治療は、免疫療法のみである。

#### 【0076】

従来の免疫療法には、アレルゲン抽出物を数年の期間にわたって繰り返し注入し、アレルゲンに対して患者を脱感作することが含まれる。残念ながら、従来の

免疫療法は、アレルゲン抽出物自体に対する患者のアレルギー反応のため、危険かつ苦痛である。一部のアレルゲンについては、免疫療法は不可能である。というのは、低レベルのアレルゲンでさえ、例えば、アナフィラキシーの原因となるマスト細胞の脱顆粒によって生じる、一部の患者に命を脅かす反応が起こりうるからである。これらの問題は開示の方法で改善することができる。

#### 【0077】

開示の方法のコンテキストでは、望ましい免疫応答はアレルギー応答である。I g E がアレルゲンに対するアレルギー応答を仲介するため、アレルゲンの場合に、評価される測定可能な好ましい免疫特性はI g E 反応性である。アレルギー性は低い、有効な脱感作免疫療法に用いることが可能な種類のアレルゲンを産生することが目標の場合には、保持される所望の特性は、脱感作に含まれる特性である。開示の方法において、T細胞活性化を評価することによって、この特性を検出することができる。

#### 【0078】

この方法は、アレルゲンに対してアレルギー性であることが分かっている患者由来のI g E 抗体または抗体フラグメントを用いて最良に行われる。標準技術を用いて、アレルゲンに対してアレルギー性の患者から組合せ抗体ライブラリーを作製することができる(Steinberger他, J. Biol. Chem. 271: 10967-10982 (1996年))。1人または複数のアレルギー性患者の末梢血単核細胞から単離したm R N Aからの組合せI g E フェージディスプレイライブラリーを作製する。96ウェルマイクロタイタープレート上に固定したアレルゲンに対してI g E F a b を発現する繊維状フェージを、その表面にパニングすることによって、アレルゲン特異的I g E を選択する。次いで、c D N Aをアレルゲン結合フェージから単離し、大量のモノクローナル、組換え、アレルゲン特異的I g E F a bを産生するために大腸菌中に形質転換する。

#### 【0079】

抗体ライブラリーが、患者の血清中に存在するポリペプチド特異的I g E 抗体の完全なインベントリーを含むかどうかを決定するために、免疫競合アッセイを行う。このために、固定化された対象のポリペプチドで、プールされた組換えF

a bをブレインキュベーションする。

洗浄して、結合していないF a bを除去した後、次いで固定化されたポリペプチドを患者の血清でインキュベーションする。洗浄して、結合していない血清タンパク質を除去した後、抗体F cドメインに対して特異的なレポーター連結二次抗体を用いたインキュベーションを行う。結合レポーターを検出することによって、血清抗体がポリペプチドへ結合するのを阻害F a bが防いだ程度を定量することが可能となる。最大の、不競合血清抗体結合は、F a bでブレインキュベーションしていない、またはナンセンスF a bでインキュベーションしたポリペプチドを用いて決定される。

#### 【0080】

アレルゲンをエンコードする核酸の低い忠実度のPCR突然変異誘発によって、試験用にポリペプチドアレルゲンの突然変異体形状を産生する。次いで、上述のように作製したI g Eライブラリーに対して試験するため、またT細胞活性化（望ましい特性）について試験するために、突然変異した核酸を発現させて、ランダムな突然変異アレルゲンのプールを作製する。アレルゲン上の様々なエピートープは様々なアレルゲン特異的I g Eと反応すると考えられることから、単一のアレルゲン特異的I g Eとさえ反応しない突然変異アレルゲンはその方法では次に繰り返すべきである（関係のある種々の異なる突然変異は後に組合せることが可能である）。望ましい特性を評価するために、T細胞との反応性の保持について突然変異ポリペプチドを試験する。2種類のアッセイ（I g E反応性とT細胞活性化についてのアッセイ）を順に、または同時に行う。アレルゲン特異的I g Eと反応せず、T細胞に対する反応性を保持するアレルゲンを同定すると、個々の突然変異を同定することができる。次いで、様々なアレルゲン特異的I g E sに対する反応性を破壊する、突然変異を具体化する複合アレルゲンを産生することが可能である。次いで、関連するアレルゲン特異的I g E、および複合アレルゲンにおいて十分なT細胞反応性を保持するが、I g E反応性を確実に低減するT細胞に対して、この複合突然変異アレルゲンを試験すべきである。最終的に、複合突然変異アレルゲンは、マイナスの副作用のリスクが低減された免疫療法に用いることができる。

## 【0081】

素材

## A. 抗体

開示の方法で使用する抗体は、ヒトまたは適切な哺乳類から得られた抗体、およびそれに由来の抗体であることが好ましく、望ましくない免疫応答を示すか、または示す傾向がある患者由来の抗体がさらに好ましい。例えば、好ましくは、アレルギー性患者から得た抗体、およびアレルギー性患者由来の抗体であり、さらに好ましくは、対象のポリペプチドに対してアレルギー性の患者由来の抗体である。開示の方法で使用する好ましい抗体は、対象のポリペプチドに対して反応性の抗体である。

## 【0082】

標準技術を用いてモノクローナル抗体を産生することができる。本発明の方法では、対象のポリペプチドに対する反応性について、モノクローナル抗体を選択すべきである。結合特異性を保持する抗体フラグメントの産生もまた、確立された技術を用いて達成することができる。開示の方法で使用するのに好ましい抗体はFabである。

## 【0083】

開示の方法で使用する抗体は、組合せ抗体ライブラリーから得ることが好ましい。組合せ抗体ライブラリーを作製する技術は公知である。例えば、Barbas他の方法 (Barbas 他, J. Mol. Biol. 230: 812-823 (1993年))を用いて、開示の方法に使用する、組合せファージディスプレイ免疫グロブリンライブラリーを作製、かつスクリーニングすることができる。以下の例は、かかる組合せ抗体がどのように作製されるのかを説明するものである。血液サンプルは、対象のポリペプチドに対する免疫応答を発現する患者から得る (または数人の患者からプールする)。遠心分離により、Ficoll-Paque (Pharmacia社)の密度勾配を用いて、末梢血単球を調製する (Steinberger 他, Allergy Clin. Immunol. 96: 209-218 (1995年))。グアナドレルHCl抽出法などの標準技術を用い、これらの細胞からmRNAを調製する (Davis 他, Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, New York, 1986年))。次いで、ランダムDNAヘキ

サマーまたは免疫グロブリン配列特異的オリゴヌクレオチドを最初の逆転写に用いる。逆転写されたcDNAをPCR反応において鋳型として用いて、重鎖および軽鎖の可変領域および/定常領域をエンコードする配列を増幅することができる。これらのプライマー配列を選択し、特定のクラスの免疫グロブリン配列を増幅することができる。例えば、IgE配列を増幅するために、Steinberger 他, J. Biol. Chem. 271: 10967-10972 (1996年)により記載されているプライマー配列および条件を用いることが可能である。IgG配列については、Tomlinson 他, J. Mol. Biol. 227: 776 (1992年)、またはBarbas 他, J. Mol. Biol. 230: 812-823 (1993年)により記載されているプライマーを用いることが可能である。

#### 【0084】

PCR増幅反応の発生は、pComb3発現ベクターなどの適切な発現ベクター中にサブクローニングするために、適切な制限酵素で消化することができる。pCom3ファージミドベクターによって、重鎖および軽鎖の可変配列を組合せ混合し、組換えFabフラグメントをエンコードする構造のライブラリーを作製することが可能となる。そのライブラリーは大腸菌に形質転換し、ヘルパーファージを用いた救助によってファージ産生を開始する。pCom3ベクターは、そのFab配列を遺伝子IIIコートタンパク質に融合することから、Fabタンパク質は組換えファージ表面に現れる。

#### 【0085】

対象のポリペプチドに対するFabをエンコードする配列を運ぶファージを「パニング」によって同定することができる。パニングするために、対象のポリペプチドをELISAプレートのウェル中またはニトロセルロース上に固定化する。3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有するリン酸緩衝液(PBS)などの溶液でインキュベーションすることによって、非特異的結合部位をブロックした後、固定化したポリペプチドを組換えファージ(約 $10^{12}$ プラーク形成ユニット)でインキュベーションする。次いで、PBAまたは0.05%Tween20などの洗浄剤を含有するトリス緩衝溶液中で洗浄することによって、結合していないファージを除去する。結合していないファージを0.1%BSAおよびp

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 M グリシン HCl を含有する溶液で溶離する。

【0086】

溶離用液を 2 M トリスで中和した後、溶出したファージおよび成長したファージ感染バクテリアの培養で大腸菌を感染させる。ヘルパーファージを用いた同時感染によって、再度「パニング」アッセイに使用することができる繊維状ファージを産生することが可能となる。個々のファージミドを単離し、そのエンコードされた免疫グロブリン配列を決定した後、パニング、ファージ溶離、および細菌形質転換を数回（3～5回）行うべきである。

【0087】

可溶性組換え Fab フラグメントを産生するために、対象の免疫グロブリン配列をエンコードするプラスミド（つまり、対象のポリペプチドと反応するもの）を、酵素（Com3 の場合には、Spe I および Nhe I が使用可能）を用いて制限消化することによってファージミドから取り出す。直鎖化されたプラスミドをファージ配列からアガロースゲル電気泳動により単離し、ガラスミルク（glass milk）精製によってアガロースから回収し、標準 DNA 連結反応プロトコルに従って再循環させる。Fab をエンコードするプラスミドで形質転換された大腸菌を、抗生物質選択により単離する。Fab タンパク質の産生は、イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド（IPTG）の存在下、30℃で数時間インキュベーションすることによって誘導する。次いで、遠心分離により細菌を回収し、Fab を含有する上澄み液を保持する。必要な場合には、Fab を細菌培地からアフィニティー精製することができる。これは、対象となる組換えまたは精製された自然抗体が結合しているクロマトグラフィー樹脂に培地を通すことによって達成される。

【0088】

上述のように、免疫競合アッセイを行い、抗体ライブラリーがポリペプチド特異的抗体の完全なインベントリーを含むかどうかを決定することができる。手短かに言うと、プールされた組換え Fab を、固定化された対象のポリペプチドでブレインキュベーションし、次いでその固定化されたポリペプチドを患者の血清でインキュベーションする。血清抗体がポリペプチドへ結合するのを組換え Fab

が防いだ程度を、抗体Fcドメインに対して特異性のレポーター連結二次抗体を用いて、固定化されたポリペプチドをインキュベーションすることによって評価する。対照として、不競合血清抗体結合は、Fabでプレインキュベーションされていない、またはナンセンスFabでインキュベーションされているポリペプチドを用いて決定することができる。抗体、モノクローナル抗体、および抗体フラグメントを単離および産生する、他の有用な多くの技術が、HarlowおよびLane著「Antibodies-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor, 1988年)、「Monoclonal Antibodies」(Kennett 他, eds., Plenum Press, 1980年)およびStewardおよびSteensgaard著「Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance」(CRC Press, 1983年)に記載されている。

#### 【0089】

##### B. ポリペプチド

開示の方法を用いて、いずれかのプロテイン、ペプチド、または対象のポリペプチドに対する望ましくない免疫応答の可能性を低減または排除することができる。開示の方法で選択するのに好ましい標的には、酵素、治療用タンパク質およびペプチド、アレルゲン、他の抗原性タンパク質およびペプチド、ヒト、他の哺乳類、他の動物に導入する目的の他のいずれかのタンパク質またはペプチドが含まれる。

#### 【0090】

対象のポリペプチドとして酵素を用いる場合には、突然変異体ペプチドに保持される特性はその酵素活性であることが好ましい。開示の方法では、任意の酵素を使用することができる。抗原性の酵素が好ましく、アレルギー性の酵素が最も好ましい。生物活性を有するペプチドおよびタンパク質もまた、開示の方法で使用するのに好ましいポリペプチドである。生物活性ポリペプチドを用いる場合、ポリペプチドの生物活性は、突然変異ポリペプチドの保持された特性であることが好ましい。

#### 【0091】

開示の方法で使用するのに好ましいポリペプチドは抗原である。開示の方法で使用するのに好ましい抗原はアレルゲンである。少々刺激がある程度から命を脅

かす程度の範囲である、アレルギー応答を誘出する多くのアレルゲンが知られている。アレルゲンには、昆虫、食物、かび、ダスト、花粉、植物、魚、貝類や甲殻類、哺乳類由来のポリペプチドが含まれる。これらのいずれかを、開示の方法で用いることができる。

#### 【0092】

##### 1. 突然変異ポリペプチド

突然変異ポリペプチドは、少なくとも1つの位置で対象のポリペプチドと異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。突然変異ポリペプチドは、対象のポリペプチドをエンコードする突然変異した核酸から発現したポリペプチドであることが好ましい。これらの突然変異ポリペプチドは、1種または複数種の所望の特性を保持するが、低程度の望ましくない免疫応答を誘出する突然変異ポリペプチドの選択に用いる原料である。開示の方法を実施することにより、いくつかの種類の突然変異ポリペプチドが存在する。一般に、これらには、望ましくない免疫応答を誘出するその可能性または所望の特性の有無にかかわらず、対象のポリペプチドのいずれかの突然変異体形状を含む突然変異ポリペプチド；望ましくない免疫応答を誘出する可能性が低減された突然変異ポリペプチドであって、非突然変異ポリペプチド（つまり、対象のポリペプチド）に対して、選択されたアッセイ（または一組のアッセイ）で測定可能な免疫特性の低減を示す突然変異ポリペプチド；選択された免疫アッセイ（または一組のアッセイ）において検出可能、測定可能な免疫特性を持たない、望ましくない免疫応答を誘出する可能性が低減された突然変異ポリペプチドのクラスのサブセットである、望ましくない応答反応を誘出できない突然変異ポリペプチド；1種または複数種の所望の特性を保持する突然変異ポリペプチド；望ましくない免疫応答を誘出する可能性が低減され、かつ開示の方法の所望の結果である、1種または複数種の所望の特性を保持する突然変異ポリペプチド；が含まれる。

#### 【0093】

これらのクラスの突然変異ポリペプチドのうち、いくつかのメンバーは、開示の方法で同定されるはずである。かかる突然変異ポリペプチドは、同定突然変異ポリペプチドと呼ばれるか、またはそれによって突然変異ポリペプチドが同定さ

れたことを特徴とすることを意味する。したがって、例えば、開示の方法で同定された、I g E との反応性が低い突然変異ポリペプチドは、低いI g E 反応性を有する同定突然変異ポリペプチドまたは単に低反応性突然変異ポリペプチドと呼ぶことができる。

【0094】

望ましくない免疫応答を誘出できない突然変異ポリペプチドのクラスは、アッセイでの検出の限界内で、付与の1種の免疫アッセイまたは複数のアッセイで検出可能、測定可能な免疫特性を持たない突然変異ポリペプチドを意味する。

したがって、突然変異ポリペプチドの測定可能な免疫特性は、望ましい免疫応答を誘出できない突然変異ポリペプチドと見なすために絶対レベル未満である必要はない。さらに、標準として用いられるアッセイにおいて、突然変異ポリペプチドが測定可能な免疫特性を示さない場合には、たとえその突然変異ポリペプチドが異なるアッセイで測定可能な免疫特性を示すことがあったとしても、望ましくない免疫応答を誘出できない突然変異ポリペプチドとみなすことができるようにその1種の免疫アッセイまたは複数のアッセイは自由に選択できる。

【0095】

突然変異ポリペプチドは、対象のポリペプチドに対する突然変異ポリペプチドの比較によって同定することができる突然変異を含む。かかる突然変異は同定突然変異と呼ばれる。突然変異ポリペプチドと対象のポリペプチドの差異を決定するために、多くの技術が利用可能である。突然変異は、突然変異ポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列および対照のポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列を比較することによって、同定することが好ましい。

【0096】

対象のポリペプチドと突然変異ポリペプチドの関係を認識して、対象のポリペプチドを非突然変異ポリペプチドと呼ぶことができる - つまり突然変異誘発する前に、核酸によりエンコードされる対象のポリペプチドの形状。これは、非突然変異ポリペプチドが絶対的な意味で非突然変異体であることを意味するものではない。むしろその用語は単に、元の対象となるポリペプチドと、開示の方法で産生された突然変異ポリペプチドとの関係を表すために用いられる。したがって、

例えば「突然変異体」形状のポリペプチドを対象のポリペプチドとして用いることが可能であり、このコンテキストでは「非突然変異」ポリペプチドになる。低程度の望ましくない免疫応答を示す突然変異ポリペプチドを任意の目的に用いることができる。例えば、かかる突然変異ポリペプチドを、対象のポリペプチドの公知の用途に用いることが可能である。かかる用途は、突然変異ポリペプチドの保持された特性に関連することが好ましい。開示の突然変異ポリペプチドの好ましい用途は、動物の体に突然変異ポリペプチドを導入することを含む用途および突然変異ポリペプチドに動物を曝露することを含む用途である。かかる用途には、食物または栄養補助食品での使用、治療用物質としての使用、および治療としての使用が含まれる。突然変異ポリペプチドの好ましい用途は、免疫療法またはその代替の他の方法、操作、または免疫系のモジュレーションでの使用である。これらの用途に用いる技術の多くが公知であり、開示の突然変異ポリペプチドと共に用いられる。例えば、薬剤および治療用物質の投与のための非常に多くの技術を開示のポリペプチドに用いることが可能である。多くの組成物、製剤、および薬物送達の仕組みが公知であり、開示のペプチドを投与するのに用いることができる。

#### 【0097】

開示の方法で同定された突然変異ポリペプチド、または開示の方法で同定された突然変異ポリペプチドから得られた突然変異ポリペプチドは、1種または複数種の免疫修飾物質分子を含む組成物中に、または1種または複数種の免疫修飾物質分子と組合せて用いることもできる。好ましい免疫修飾物質分子には、IL-12などのインターロイキンおよびアジュバント分子または組成物が含まれる。多くのアジュバントが公知であり、開示の突然変異ポリペプチドと共に用いることができる。その突然変異ポリペプチドおよび免疫修飾物質分子は物理的に関連することが好ましい。かかる物理的関連には、例えばポリペプチドと免疫修飾物質分子の共カプセル化、ポリペプチドと免疫修飾物質分子の共有結合会合、またはポリペプチドと免疫修飾物質分子の非共有結合会合が含まれる。共有結合会合の例には、突然変異ポリペプチドと免疫修飾物質分子の化学結合または架橋、または免疫修飾物質分子がポリペプチドである場合、突然変異ポリペプチドと免疫

修飾物質ポリペプチドとの融合ポリペプチドが含まれる。

【0098】

低程度の望ましくない免疫応答を示す突然変異ポリペプチドは、形質転換植物または動物に発現する。これは、例えば、突然変異ペプチドが誘導される対象のポリペプチドが、その植物または動物に天然に存在する場合に有用である。突然変異ポリペプチドを発現する形質転換植物または動物は2つの成果を有する。第一に、それらは突然変異タンパク質のソースとして用いることが（例えば、治療用物質としての使用または免疫療法における使用）可能であり、第二に、適切に形質転換された植物または動物を、元の植物または動物の代わりに用いることが可能であり、それによって、その植物または動物が消費された場合またはその植物または動物から得られた生産物が動物に導入される場合に、望ましくない免疫応答のリスクが低減される。例えば、かかる形質転換動物または植物は、2つの効果：（1）それら自体で望ましくない免疫応答を付与しないことと、（2）形質転換されたソースに免疫療法薬剤として作用することによって、形質転換されていないソースからの保護を付与することのいずれかまたは両方を有する。

【0099】

植物および動物をエンジニアリングする方法は公知であり、10年になる。例えば、植物については、Day, Crit. Rev. Food Sci. & Nut. 36 (S): 549-567 (1996年)、Fuchs およびAstwood, Food Tech. 83-88 (1996年)を参照のこと。組換え動物を作製する方法もまた十分に確立されている。例えば、Colman, Biochem. Soc. Symp. 63: 141-147 (1998年) ; Espanion およびNiemann, DTWDtxch Tierarztl Wochenschr 103 (8-9): 320-328 (1996年) ; Colman, Am. J. Clin. Nutr. 63 (4): 639S-645Sを参照のこと。相同遺伝子組換えおよび/または三重らせん形成オリゴマーを用いて、部位特異的变化を誘発することも可能である。例えば、Rooney およびMoore, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2141-2149 (1995年) ; Agrawal 他, BioWorld Today, 9 (41): 1を参照のこと。

【0100】

開示の方法で同定した突然変異ポリペプチド、または開示の方法で同定した突然変異ポリペプチドから得られた突然変異ポリペプチドを、1種または複数種の

他のポリペプチドに融合することが可能である。本明細書において融合パートナーポリペプチドと呼ばれる他のポリペプチドは、任意のペプチドまたはタンパク質であり、任意の目的で突然変異ポリペプチドに融合することができる。融合パートナーポリペプチドは、免疫修飾物質活性を有することが好ましい。好ましい融合パートナーポリペプチドには、IL-12などのインターロイキンおよびアジュバントポリペプチドが含まれる。アレルゲンとインターロイキンとの融合は、アレルギーの脱感作を促進するのにさらに有効であることが示されている (Kim 他, J. Immunology 158: 4137-4144 (1997年))。

#### 【0101】

##### 2. ポリペプチドの特性

開示する方法は、望ましくない免疫応答を誘出させる可能性の小さいポリペプチドの変異型を同定することによって関心のあるポリペプチドへの望ましくない免疫応答を低減させることに関する。望ましくない免疫応答を誘出させる可能性の小さいそのような変異型ポリペプチドは、それらが元のポリペプチドの特性を保持する時に、最も有用である。保持される特性は、ポリペプチドの任意の有用な又は望ましい特性、酵素活性、生物活性、及びT細胞活性のようなものに行うことができる。

#### 【0102】

特性は、特性が変異型ポリペプチドに存在する時に、保持される。保持されると考えられるには、特性は、関心のあるポリペプチドと同じレベルである必要はないが、同じレベルであるのが好ましい。特性は、有用なレベルにだけ保持する必要があるのが普通である。所望の特性が免疫学的特性（例えば、抗体活性、T細胞活性、又は感度低下活性）である時は、そのような特性は、本明細書中どこかに記載する又は引用する技術を使用して評価することができる。所望の特性のレベルの増大が、また望ましく、開示する方法から排除することを意図しないのが普通である。

#### 【0103】

生物活性は、変異型ポリペプチドによって保持されるべき別の好適な特性である。生物活性は、ペプチド、又はタンパク質が有し得る任意の生物学的作用又は

機能にすることができる。例えば、生物活性は、生体分子（例えば、レセプターリガンド）への特異的な結合、ホルモン活性、サイトカイン活性、及び生物学的活性の抑制又はその他の生体分子（例えば、レセプター結合の作用物質及び拮抗物質）の相互作用、酵素活性、抗ガン活性、免疫抑制活性、免疫刺激活性、免疫特性、免疫系細胞の機能の変性、抗生物質活性、抗ウイルス活性、及び栄養活性を含む。生物活性は、当分野で知られている適当な技術及びアッセイを使用して測定しかつ検出することができる。抗体反応性及びT細胞活性化は、生物活性と考えることができる。これに鑑みて、生物活性に関係する所望の特性を、本明細書中で一般的な生物活性、抗体反応性及びT細胞活性化と異なる生物活性、抗体反応性及びT細胞活性化、抗体反応性、及びT細胞活性化として分類することができる。生物活性は、また、適する場合には、インビボで評価することもできる。これは、関心のある生物活性の有用なレベルの存在の最も正確な評価になることができる。酵素活性は、当分野で知られている適当な技術及びアッセイを使用して測定しかつ検出することができる。

#### 【0104】

ウイルスタンパク質 - 例えば、ウイルスベクター、治療ウイルス、及びウイルスキャプシッド送達組成物に関して使用するため - 保持されるべき所望の特性は、集合してウイルス粒子又はキャプシッドになる能力及び細胞に混入する又は入る能力を含むことができる。そのような特性は、ウイルスタンパク質の送達性質が関心のある場合に、有用である。

#### 【0105】

##### C. 標的ポリペプチドをコードする核酸

開示する方法は、関心のあるタンパク質又はペプチドの変異型を選定することに関する。これらの変異型は、ポリペプチドをコードする核酸分子に突然変異源を与え、突然変異を起こされた核酸分子から変異型ポリペプチドを表現することによって生成する。これより、開示する方法は、関心のあるポリペプチドをコードする核酸分子が入手可能又は得ることが可能であることを要する。ポリペプチドをコードする核酸は、多数知られており、他の核酸は、定着したクローニング技術を使用して得ることができる。

## 【0106】

開示する方法は、関心のあるポリペプチドをコードする核酸、及びこの核酸の変異型を表現して、それがコードするポリペプチドを生成することに関するのが好ましい。関心のあるポリペプチドをコードする核酸は、任意の適した表現配列を使用して表現することができる。多数の表現配列が知られていて、関心のある遺伝子を表現するために使用することができる。関心のあるポリペプチドをコードする核酸は、直接表現してよいばかりでなく、また、別のポリペプチド、好ましくは上記した通りのフレームシフトや大きな欠失のようなグロス突然変異を有する突然変異源を与えられた核酸を同定しかつ排除するのに使用することができるレポータータンパク質との融合としても表現してよい。

## 【0107】

関心のあるポリペプチドをコードする核酸は、関心のあるポリペプチドをコードする配列、及びこの配列の下流の、レポータータンパク質をコードする配列を含む融合タンパク質をコードすることができる。この配列は、レポータータンパク質の表現に関心のあるポリペプチドの表現に依存させる。すなわち、関心のあるポリペプチドをコードする核酸がフレームシフトや大きな欠失のようなグロス突然変異を有するならば、これは、レポータータンパク質に影響を与えることになり、レポータータンパク質の表現の損失は、そのような突然変異が存在するという簡便なしるしとして働くことができる。グロス突然変異は、望ましくない免疫応答を誘出させる可能性が小さいようであるが、所望の特性を保持しないので、望ましくない。

## 【0108】

レポータータンパク質は、タンパク質又はペプチドであって、それらの表現を検出することができる任意のものにすることができる。レポータータンパク質として使用するための好適なポリペプチドは、細胞増殖のために必要とされるポリペプチドである。細胞増殖のために必要なポリペプチドを使用することによって、グロス突然変異による表現の排除は、それらの細胞の死を引き起こすことになる。このようにして、望ましくないグロス突然変異を持つ細胞は、変異型ポリペプチドを表現する細胞のプールに存在することになる。

## 【0109】

レポータータンパク質は、また、ポリペプチドであって、その表現を直接か又は間接のいずれかで検出することができる任意のものにすることができる。これらは、 - ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、及びアルカリホスファターゼのような特異的な検出可能な生成物を産生することができる酵素、並びに直接検出することができるポリペプチドを含む。例えばポリペプチドへの特異的な抗体を使用することによって、事実上いずれのポリペプチドも直接検出することができる。直接検出することができる好適なレポータータンパク質は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) である。クラゲ *Aequorea victoria* からの GFP は、基質を加えないで紫外線に暴露する際に蛍光を生じる (Chalfie 等、*Science* 263:802~5 (1994))。標準の条件下で野生型 GFP に比べて50倍程に大きな蛍光を発生する多数の改質された GFP が造り出された (Cormack 等、*Gene* 173:33-8 (1996); Zolotukhin 等、*J. Virol* 70:4646-54 (1996))。この蛍光のレベルは、細胞において低いレベルの表現の検出を可能にする。

## 【0110】

蛍光信号を生成するレポータータンパク質は、そのような信号が FACS を使用して選別することを可能にするので、有用である。レポータータンパク質の表現に基づいて細胞を選別する別の方法は、レポータータンパク質を、細胞を結合するためのフックとして使用することに関係する。例えば、レポータータンパク質のような細胞表面タンパク質は、特異的な抗体によって結合することができる。そのようなレポータータンパク質を表現する細胞は、例えば固体基質に結合された抗体を使用し、磁気ビーズに結合された抗体を使用し、又はレポータータンパク質に結合された抗体を捕獲することによって、捕獲することができる。抗体を捕獲剤として使用する技術は、多数知られており、開示する方法によって使用することができる。

## 【0111】

レポータータンパク質は、また、別の遺伝子の表現を調節するポリペプチドにすることもできる。これは、調節された遺伝子の表現を検出することによって

レポータータンパク質の表現の検出を可能にする。例えば、リプレッサータンパク質は、レポータータンパク質として使用することができる。レポータータンパク質の表現の抑制は、次いで調節された遺伝子の低下を生じるであろう。このタイプの間接検出は、アフェクターRNA分子によりレポータータンパク質の表現の抑制のポジティブな検出を可能にする。このタイプの調節の一つの好適な形態は、レポータータンパク質として使用するリプレッサータンパク質によって調節される抗生物質耐性遺伝子を使用することである。宿主細胞を抗生物質に暴露することによって、抗生物質耐性遺伝子の表現が抑制されることになるので、レポーター遺伝子の表現が抑制されたそれらの細胞だけが増殖することになる。

#### 【0112】

レポーターを、それが関心のあるポリペプチドの生物活性を妨げないことを確実にするように選ぶ又は関心のあるポリペプチドにプロテアーゼ開裂のような標準方法によって容易に取り去ることができる（生物活性を評価する前に）ように結合させることが好適である。

#### 【0113】

本明細書中に記載する特定の方法論、プロトコル、及び試薬は、変わり得るので、開示する発明をこれらに限定しないことは、理解される。また、本明細書中で用いる用語は、特定の実施態様を記載するだけのためであり、かつ本発明の範囲を制限することを意図せず、本発明は、特許請求の範囲の記載によってだけ制限されることも理解されるべきである。

#### 【0114】

本明細書中及び特許請求の範囲に記載する用語は、内容が明瞭に示さない場合には、単数及び複数形を含むことに留意しなければならない。これより、例えば、「宿主」に関する言及は、そのような宿主の単数及び複数を含み、「抗体」に関する言及は、一種又はそれ以上の抗体及び当業者に知られているそれらの均等物を言う、等である。

#### 【0115】

本明細書中で用いる技術的及び科学的用語は、他の方法で規定しない場合には、開示する発明が属する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有す

る。本明細書中に記載するのと同様のいずれの方法及び物質又は均等物を本発明の実施又はテストイングにおいて使用することができるとはいえ、好適な方法、装置及び物質は、記載する通りである。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PC, US 00/03448

|   |  |  |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>IPC 7 G01N33/68 A61K39/35 C12N15/82 C07K14/00  |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |  |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 G01N   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  |  |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |  |  |
| Category <sup>a</sup>   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X   | FERREIRA F ET AL: "Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy" FASEB JOURNAL, US, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, vol. 12, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 231-242, XP002085249 ISSN: 0892-6638 cited in the application abstract | 1-6,<br>8-16,19,<br>22,23,<br>29-31,<br>39,40,<br>46-49,<br>51-55  |
| Y   | page 234, column 2, paragraph 3<br>page 236, column 1, paragraph 3 -column 2,<br>paragraph 2<br>---<br>-/--  | 1,20,21,<br>29,32,<br>40-43,45                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.   |  |  |
| <sup>a</sup> Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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.<br>"Z" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>15 June 2000   |  | Date of mailing of the international search report<br>19. 09. 2000 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 65 1 80 01,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br>Gundlach, B                                  |

Form PCT/ISA/Z10 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PC1/US 00/03448

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |   |
|--|--|---|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| Y  | WO 98 06861 A (AGRIVAX INC ;WELTER LISA M<br>(US)) 19 February 1998 (1998-02-19)<br><br>the whole document   | 1,20,21,<br>29,32,<br>40-43,45                                    |
| X  | SMITH A M AND CHAPMAN M D: "Localization<br>of antigenic sites on Der p 2 using<br>oligonucleotide-directed mutagenesis<br>targeted to predicted surface residues"<br>CLINICAL AND EXPERIMENTAL<br>ALLERGY,GB,BLACKWELL SCIENTIFIC<br>PUBLICATIONS, LONDON,<br>vol. 27, no. 5, 1 May 1997 (1997-05-01),<br>pages 593-599, XP002085251<br>ISSN: 0954-7894<br>the whole document | 1-6,<br>8-16,19,<br>22,23,<br>29-31,<br>39,40,<br>46-49,<br>51-55 |
| X  | WO 97 33910 A (UNIV ROCKEFELLER)<br>18 September 1997 (1997-09-18)   | 1-6,<br>8-16,19,<br>22,23,<br>29-31,<br>39,40,<br>46-49,<br>51-55 |
| A  | the whole document   | 7,24-28,<br>32-38,<br>42-45                                       |
| X  | WIEDEMANN P ET AL: "Molecular and<br>structural analysis of a continuous birch<br>profilin epitope defined by a monoclonal<br>antibody"<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL<br>CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF<br>BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD,<br>vol. 271, no. 47,<br>22 November 1996 (1996-11-22), pages<br>29915-29929, XP002085250<br>ISSN: 0021-9258<br>the whole document  | 1-6,<br>8-16,19,<br>22,23,<br>29-31,<br>39,40,<br>46-49,<br>51-55 |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/03448

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.: -  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy  
Although claims 22-28 and 54-60 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/03448**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
of the used compounds/ compositions.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 13, 22, 46, 54, (partially) 2-12, 14-17, 19-21, 23, 29-32, 39-45, 47-53, 55 (fully)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

page 2 of 2

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1,13,22,46,54 (partially), 2-12,14-17,19-21,23, 29-32,39-45,47-53,55 (fully)

Identification of polypeptides exhibiting less of an undesirable immune response

2. Claims: 1,13 (partially) 18 (fully)

Identification of improved polypeptides derived from viral proteins

3. Claims: 1,22,46,54 (partially) 24-28,33-38,56-80 (fully)

Identification of polypeptides exhibiting less of an undesirable immune response functioning in combination with immunomodulatory molecules

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 22-28 and 54-60 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the used compounds/ compositions.

-----

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/03448

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9806861 A                           | 19-02-1998       | AU 3825497 A            | 06-03-1998       |
|  |                  | EP 0939826 A            | 08-09-1999       |
| WO 9733910 A                           | 18-09-1997       | US 5804201 A            | 08-09-1998       |
|  |                  | AU 2320897 A            | 01-10-1997       |
|  |                  | CA 2248537 A            | 18-09-1997       |
|  |                  | EP 0954530 A            | 10-11-1999       |
|  |                  | JP 2000506864 T         | 06-06-2000       |
|  |                  | US 6106844 A            | 22-08-2000       |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号   | F I     | テ-マ-ト' (参考)               |
|--------------------------|--|---------|---------------------------|
| A 6 1 P                  | 37/02  | C 0 7 K | 14/435                    |
| C 0 7 K                  | 14/435   | G 0 1 N | 33/15                     |
| C 1 2 N                  | 15/01  |         | 33/50                     |
|                          | 15/09  |         | 37/00                     |
| G 0 1 N                  | 33/15  | C 0 7 K | 19/00                     |
|                          | 33/50  | C 1 2 N | 15/00                     |
|                          | 37/00  |         |                           |
| // C 0 7 K               | 19/00  | A 6 1 K | 37/02                     |
| (81)指定国                  | EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW |         | Z<br>Z<br>1 0 2<br>A<br>X |
| Fターム(参考)                 | 2B030 AD08 CA15 CA17 CA19<br>2G045 AA40 DA36 FB03 FB07<br>4B024 AA01 BA31 HA15<br>4C084 AA02 AA17 AA20 BA44 CA53<br>CA62 NA05 NA06 NA14 ZB071<br>ZB072<br>4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA54<br>CA40 DA75 DA86 EA20 EA50   |         |                           |

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 改变对多肽的不良免疫应答的方法   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2002544472A</a>   | 公开(公告)日 | 2002-12-24 |
| 申请号            | JP2000598526  | 申请日     | 2000-02-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 帕纳什叶派制药有限责任公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Panashia制药有限责任公司  |         |            |
| [标]发明人         | マイケルキャプラン   |         |            |
| 发明人            | マイケル キャプラン  |         |            |
| IPC分类号         | A01H5/00 A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P37/02 C07K14/435 C07K19/00 C12N15/01 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68 G01N37/00  |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6878   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.D A01H5/00.A A01K67/027 A61K45/00 A61P37/02 C07K14/435 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N37/00.102 C07K19/00 C12N15/00.A C12N15/00.X A61K37/02  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2B030/AD08 2B030/CA15 2B030/CA17 2B030/CA19 2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/HA15 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA62 4C084/NA05 4C084/NA06 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 |         |            |
| 优先权            | 09/247406 1999-02-10 US   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

公开了通过鉴定表现出较少的不需要的免疫应答并保留至少一种所需性质的变体多肽来修饰不需要的免疫应答的方法。当将此类多肽引入人或 其他哺乳动物或其他动物时，它们可能更安全有效。可以通过这种方法 评估改变的免疫应答或免疫应答的替代物，称为可测量的免疫特性。通常，可测量的免疫特性本身可以是不想要的免疫反应，可以测量的免疫特性可以与不想要的免疫反应有关，和/或不想要的免疫反应是可以测量的免疫特性。可以通过所公开的方法提供了变体多肽的集合（其中每个变体多肽的氨基酸在至少一个位置上与目标多肽不同）和突变所表现出的免疫应答低于目标多肽。并鉴定出具有较小潜力引起不想要的免疫应答并仍保留所需特性的变体多肽。突变多肽的这种收集可通过诱变编码目的多肽的核酸并表达诱变的核酸以产生突变多肽来制备。该方法对于减少涉及目标多肽上的线性和/或构象表位的免疫应答特别有用。这是因为在该方法中用作诱变底物的重组多肽基本上是全长的，在结构上与目标多肽相似，并且基本上是相同的构象表位。可能因为显示了它。

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |   | International Application No.<br>PC /, US 96/03448                   |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>IPC 7 G01N33/53 A61K39/35 C12N15/02 C07K14/00  |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                             |   |  |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 G01N |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)    |   |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X   | FERREIRA F ET AL: "Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy" FASEB JOURNAL US, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, vol. 12, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 231-242, XP002085249 ISSN: 0892-6638 cited in the application abstract | 1-6,<br>8-15, 19,<br>22, 23,<br>29-31,<br>39, 40,<br>46-49,<br>51-55 |
| Y   | page 234, column 2, paragraph 3<br>page 235, column 1, paragraph 3 -column 2,<br>paragraph 9  | 1, 29, 21,<br>29, 32,<br>40-43, 45                                   |